

鼻咽癌组织中 JAM-A 表达及意义

江 雪,代保强,冯丽春

(沧州市中心医院,河北 沧州 061000)

摘 要: [目的] 探讨鼻咽癌组织中人交界粘连分子(junctional adhesion molecule, JAM-A)蛋白表达及其意义。[方法] 收集 100 例鼻咽癌病例标本(实验组)及 50 例鼻咽部黏膜增生息肉标本(对照组)。采用免疫组织化学染色测定鼻咽癌组织中 JAM-A 蛋白表达;采用荧光定量 PCR 法检测 JAM-A mRNA 表达;采用 Western Blot 实验检测 JAM-A 蛋白表达。[结果] 实验组 JAM-A 阳性表达率(63.00%)高于对照组(12.00%) ($P<0.001$)。不同性别、年龄、T 分期、临床分期、分化程度鼻咽癌患者间 JAM-A 阳性表达率差异无统计学意义(P 均 >0.05);有淋巴结转移者 JAM-A 阳性表达率高于无淋巴结转移者($P=0.003$)。实验组 JAM-A mRNA 表达量高于对照组($P<0.001$);不同性别、年龄、T 分期、临床分期和分化程度患者间 JAM-A mRNA 表达量差异无统计学意义(P 均 >0.05),有淋巴结转移者 JAM-A mRNA 表达量高于无淋巴结转移者($P<0.001$)。实验组 JAM-A 蛋白表达灰度值高于对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。[结论] 鼻咽癌组织中 JAM-A 蛋白呈高表达,且其表达与淋巴结转移相关。

关键词: 鼻咽肿瘤; JAM-A 蛋白; 淋巴结转移

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)02-0125-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2021.02.B007

Expression of JAM-A in Nasopharyngeal Carcinoma and Its Significance

JIANG Xue, DAI Bao-qiang, FENG Li-chun

(Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of junctional adhesion molecule(JAM-A) protein in nasopharyngeal carcinoma(NPC) and its significance. [Methods] One hundred NPC tissue specimens (NPC group) and 50 specimens of nasopharyngeal mucosal hyperplasia polyps(control group) were collected. The expression of JAM-A protein in tissue specimens was detected by immunohistochemical staining. The expression JAM-A mRNA and protein was detected by fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot, respectively. [Results] The positive expression rate of JAM-A in NPC group was significantly higher than that in the control group (63.00% vs 12.00%, $P<0.001$). There was no significant difference in JAM-A positive expression rate among NPC patients with different gender, age, T stage and differentiation degree(all $P>0.05$). JAM-A positive rate in patients with lymph node metastasis was higher than that in patients without metastasis ($P=0.003$). The expression of JAM-A mRNA in the NPC group was higher than that in the control group($P<0.001$). The JAM-A mRNA expression was not correlated with gender, age, T stage, clinical stage and differentiation degree of NPC patients (all $P>0.05$). JAM-A mRNA expression in patients with lymph node metastasis was higher than that in patients without metastasis ($P<0.001$). The gray value of JAM-A protein expression in the NPC group was higher than that in the control group ($P<0.05$). [Conclusion] JAM-A protein is highly expressed in nasopharyngeal carcinoma tissues, which is closely related to lymph node metastasis.

Subject words: nasopharyngeal carcinoma; JAM-A protein; lymph node metastasis

鼻咽癌是指发生于鼻咽部的恶性肿瘤,我国(特别是南方地区)及东南亚地区是鼻咽癌的高发地区^[1]。鼻咽癌最常见的发病来源于鼻咽部的黏膜上皮细

胞,上皮细胞被认为是终端分化的细胞,鼻咽部的上皮细胞如何转化进展为恶性鼻咽癌细胞,目前机制不明确^[2-3]。研究认为,上皮细胞分化为肿瘤细胞的过程中,细胞极性发生改变是重要的一个步骤,且和恶性肿瘤细胞的转移和侵犯密切相关^[4]。人交界粘连分子(junctional adhesion molecule, JAM-A)主要是

基金项目: 沧州市重点研发计划指导项目(183302105)

通信作者: 江雪,主治医师,学士;沧州市中心医院耳鼻喉科,河北省沧州市新华西路 16 号(061000);E-mail: huasky1202@163.com

收稿日期: 2019-08-09; **修回日期:** 2020-05-20

位于细胞间的一种跨膜紧密连接蛋白,和细胞极性和上皮细胞间粘连形成基底膜密切相关,JAM-A蛋白的表达与肿瘤的相关性在乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中已有研究,但其和鼻咽癌的相关性研究目前较少报道^[5-6]。因此,本研究旨在探讨鼻咽癌组织JAM-A蛋白表达和鼻咽癌临床表型的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集沧州市中心医院于2015年1月至2018年12月期间100例鼻咽癌病例标本(实验组)及50例鼻咽部黏膜增生息肉标本(对照组)。所有研究对象病理组织标本保存完整,且临床病例资料齐全,获得知情同意且经医院伦理委员会批准,排除合并恶性肿瘤,及鼻咽部腺癌和涎腺型癌。实验组100例,男性65例,女性35例;年龄37~75岁,平均年龄 54.81 ± 5.16 岁;T分期:T₁+T₂期43例,T₃+T₄期57例;临床分期:I~II期45例,III~IV期55例;淋巴结转移:有41例,无59例;分化程度:高中分化69例,低分化31例;鳞状细胞癌58,非角化性癌32,基底样鳞状细胞癌10例。对照组50例,男性32例,女性18例;年龄32~75岁,平均年龄 53.76 ± 4.27 岁。两组一般资料包括性别和年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 鼻咽癌组织JAM-A蛋白表达检测

所有标本均以10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,制成厚度为4 μ m切片,经脱蜡、脱苯、水化后,采用免疫组织化学法染色测定鼻咽癌组织中JAM-A蛋白表达。JAM-A单克隆抗体(美国Abcam公司),二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒。DAB染色:首先以3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶的活性,高压高温修复抗原,采用JAM-A一抗(1:100)放置于4℃条件下湿盒内孵育过夜,DAB显色,苏木精复染。PBS代替一抗。

1.2.2 结果判定

镜下JAM-A蛋白主要表达在细胞膜上,每片随机观察5个高倍视野,对染色阳性细胞数进行计数,其中染色细胞数1%~25%计1分,25%~50%计2分,50%~75%计3分,75%及以上计4分。染色强度

评分:以无染色计0分,且染色呈淡黄色颗粒;以染色明显高于背景计1分;以染色呈浅棕黄色颗粒计2分;以染色出现大量深棕黄色颗粒计3分。染色强度评分与阳性细胞数比例的评分之和 ≤ 2 分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~5分为中度阳性(++),6~7分为强阳性(+++),(+)(++)为阳性表达。

1.2.3 采用荧光定量PCR法检测JAM-A mRNA表达

取适量鼻咽癌病灶组织以及鼻咽黏膜增生病灶组织,应用生理盐水冲洗后用滤纸将水分吸尽,放入冻存管中且于液氮中短暂冷冻15~20min,取出后放置于-70℃下保存。取组织样本适量,加入RNAiso裂解液适量,萃取得到组织中RNA,而后采用反转录试剂盒将RNA转录成为cDNA。引物由生工(上海)生物有限公司合成,且对cDNA样本进行荧光定量PCR扩增,按照扩增曲线计算JAM-A mRNA表达量。

1.2.4 Western Blot检测JAM-A蛋白表达

采集患者鼻咽癌病灶组织以及鼻咽黏膜增生病灶组织标本,加入细胞裂解液,匀浆裂解40min,以离心半径15cm、12 000r/min,离心6min,收集上清液进行蛋白定量。取30 μ g总蛋白进行12.5%变性SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,加入预测蛋白的JAM-A抗体孵育1h,再加入辣根过氧化物酶标记的IgG二抗孵育1h,化学发光、显影、定影,以 β -actin蛋白作为内参照。

1.3 观察指标

(1)观察两组JAM-A阳性表达情况;(2)观察鼻咽癌不同临床特征JAM-A阳性表达情况,临床特征包括性别、年龄、T分期、临床分期、淋巴结转移和分化程度;(3)观察两组JAM-A mRNA表达量;(4)观察鼻咽癌不同临床特征JAM-A mRNA表达量;(5)观察两组JAM-A蛋白表达情况。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0处理数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行t检验/方差分析,计数资料采用率表示,行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组JAM-A阳性表达率比较

实验组JAM-A阳性表达63例,对照组JAM-A

阳性表达 6 例,实验组 JAM-A 阳性表达率(63.00%)高于对照组(12.00%),差异有统计学意义 ($\chi^2=43.953, P<0.001$) (Figure 1)。

2.2 鼻咽癌不同临床特征组 JAM-A 阳性表达率比较

不同性别、年龄、T 分期、临床分期、分化程度患者间 JAM-A 阳性表达率差异无统计学意义 ($P>0.05$);有淋巴结转移者 JAM-A 阳性表达率高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 1)。

2.3 两组 JAM-A mRNA 表达量比较

实验组 JAM-A mRNA 表达量(2.13 ± 0.42)高于对照组(1.02 ± 0.25),差异有统计学意义 ($t=17.208, P<0.001$)。

2.4 鼻咽癌不同临床特征 JAM-A mRNA 表达量比较

不同性别、年龄、T 分期、临床分期和分化程度患者 JAM-A mRNA 表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);有淋巴结转移者 JAM-A mRNA 表达量高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 2)。

2.5 两组 JAM-A 蛋白表达比较

实验组 JAM-A 蛋白表达灰度值(0.76 ± 0.18)高于对照组(0.14 ± 0.03),差异有统计学意义 ($t=24.149, P<0.001$) (Figure 2)。

3 讨论

鼻咽癌原发病灶多发生于鼻咽咽隐窝、顶前壁,病灶可呈黏膜下浸润型、溃疡型和结节型等多种形态^[7-9]。鼻咽癌发病机制较为复杂,其发生主要与遗传、环境及病毒等相关^[10-12]。鼻咽癌最常见的发病来源于鼻咽部的黏膜上皮细胞,上皮细胞被认为是终端分化的细胞^[12]。内皮细胞在结构上具有典型的基底及上极方向性,细胞间紧密连接和粘附连接的存在使上皮细胞紧密相连发挥功能,同时也限制了自身和其他组织细胞任意迁移的能力^[13-14]。

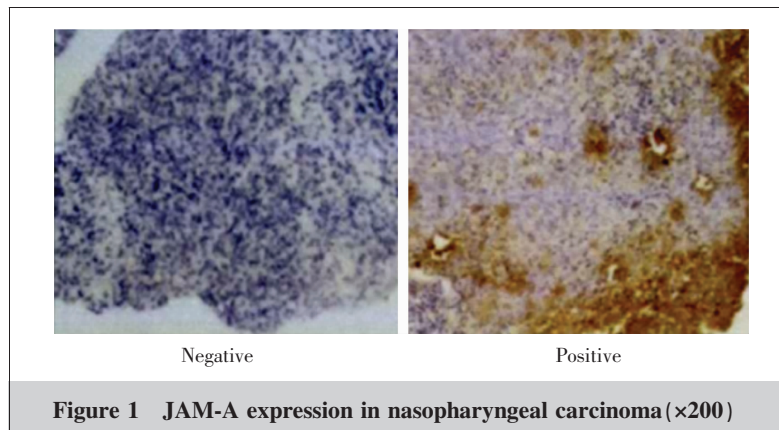


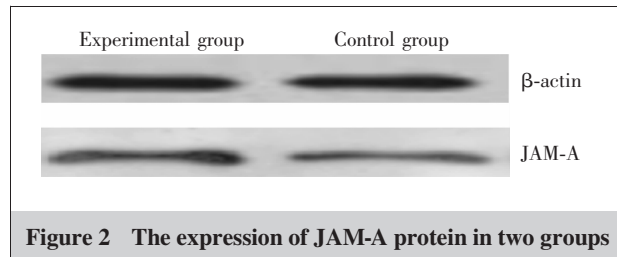
Table 1 Comparison of JAM-A positive expression with clinical features in nasopharyngeal carcinoma patients

Clinical features	N	JAM-A positive expression (%)	χ^2	P
Gender				
Male	65	39 (60.00)	0.717	0.397
Female	35	24 (68.57)		
Age (years)				
>60	40	27 (67.50)	0.579	0.447
≤60	60	36 (60.00)		
T stages				
T ₁ +T ₂	43	24 (55.81)	1.671	0.196
T ₃ +T ₄	57	39 (68.42)		
Clinical stages				
I ~ II	45	24 (53.33)	3.280	0.070
III ~ IV	55	39 (70.91)		
Lymph node metastasis				
Yes	41	33 (80.49)	9.117	0.003
No	59	30 (50.85)		
Differentiation				
High and medium	69	42 (60.87)	0.433	0.510
Poorly	31	21 (67.74)		
Type				
Squamous cell carcinoma	58	37 (63.79)	0.317	0.781
Non-keratinizing carcinoma	32	20 (62.50)		
Basaloid squamous cell carcinoma	10	6 (60.00)		

JAM 家族包括 3 个亚型,即 JAM-A、JAM-B 和 JAM-C,其中 JAM-A 是位于细胞间的跨膜紧密连接蛋白,它在细胞的侵袭、血小板聚集和淋巴细胞黏附等方面起重要作用,且可参与维持细胞屏障完整性,从而调控上皮细胞及内皮细胞运动^[15]。JAM-A 蛋白由于其可影响恶性肿瘤细胞的迁移,广泛应用于各种恶性肿瘤的浸润、侵袭机制中,这可能为肿瘤发生转移浸润提供基础支撑。且 JAM-A 蛋白能够通过不

Table 2 Comparison of JAM-A mRNA expression in nasopharyngeal carcinoma patients with different clinical features

Clinical features	N	JAM-A mRNA	t/F	P
Gender				
Male	65	2.15±0.48	0.543	0.588
Female	35	2.10±0.35		
Age(years)				
>60	40	2.18±0.40	1.024	0.309
≤60	60	2.09±0.45		
T stages				
T ₁ +T ₂	43	2.12±0.41	0.348	0.729
T ₃ +T ₄	57	2.15±0.44		
Clinical stages				
I ~ II	45	2.08±0.38	0.922	0.359
III ~ IV	55	2.16±0.47		
Lymph node metastasis				
Yes	41	2.63±0.45	11.636	<0.001
No	59	1.66±0.38		
Differentiation				
High and medium	69	2.11±0.46	0.316	0.753
Poorly	31	2.14±0.39		
Type				
Squamous cell carcinoma	58	2.13±0.48	0.281	0.823
Non-keratinizing carcinoma	32	2.09±0.35		
Basaloid squamous cell carcinoma	10	2.12±0.43		



同途径促进恶性肿瘤的迁移转移。Thee 等^[16]研究发现, miR145 通过 JAM-A 靶基因抑制乳腺癌细胞的运动和侵袭。研究发现 JAM-A 高表达的乳腺癌患者预后较差, 进一步以高表达 JAM-A 的乳腺癌细胞株研究, 结果显示 JAM-A 能增加乳腺癌细胞的侵袭能力^[17]。Tharakan 等^[18]研究发现, 通过对内皮细胞的体外实验观察, JAM-A 能够抑制 Akt/β-catenin 信号通路活性, 影响内皮细胞的增殖功能。研究表明, JAM-A 表达下降和内皮细胞失去细胞极性密切相关, 导致细胞间连接变得疏松, 细胞内骨架蛋白重组, 导致细胞突破内皮细胞组成的基底, 使得肿瘤细胞更易离开原有的位置, 随着循环发生转移^[19]。本研究显示, 实验组 JAM-A 阳性表达率和 JAM-A mRNA 表达量均高于对照组, 提示鼻咽癌患者组织中 JAM-A

蛋白呈高表达; 有淋巴结转移者 JAM-A 阳性表达率和 JAM-A mRNA 表达量均高于无淋巴结转移者, 提示随着淋巴结转移出现, 鼻咽癌组织 JAM-A 蛋白表达升高。此外, 本研究表明, 实验组 JAM-A 蛋白表达灰度值高于对照组, 说明鼻咽癌患者 JAM-A 蛋白表达上调。但本文作为初步研究, 未对其具体作用机制进行分析, 还需在后续研究中通过进一步多中心、多样本深入研究, 对其具体作用机制进行阐述, 以期能够为临床诊断和治疗鼻咽癌提供一定参考价值。

参考文献:

- [1] Li YF, Ding JW, Liao LM, et al. Expression of programmed death ligand-1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 7(3):378-382.
- [2] Ramayanti O, Juwana H, Verkuiljen SA, et al. Epstein-Barr virus mRNA profiles and viral DNA methylation status in nasopharyngeal brushings from nasopharyngeal carcinoma patients reflect tumor origin[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(1):149-162.
- [3] Peng PJ, Lv BJ, Wang ZH, et al. Multi-institutional prospective study of nedaplatin plus S-1 chemotherapy in recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma patients after failure of platinum-containing regimens [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2017, 9(2):68-74.
- [4] Rusthoven CG, Lanning RM, Jones BL, et al. Metastatic nasopharyngeal carcinoma: patterns of care and survival for patients receiving chemotherapy with and without local radiotherapy[J]. *Radiother Oncol*, 2017, 124(1):139-146.
- [5] Chee J, Loh KS, Tham I, et al. Prognostic stratification of patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma using a clinical and biochemical scoring system [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(12):2563-2570.
- [6] 陈江, 方孙阳, 傅燕萍, 等. JAM-A 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及与淋巴结转移的关系[J]. *实用肿瘤杂志*, 2015, 30(6):520-523.
- [7] Chen J, Fang SY, Fu YP, et al. Expression of JAM-A in papillary thyroid carcinoma and its relationship with lymph node metastasis[J]. *Journal of Practical Oncology*, 2015, 30(6):520-523.
- [7] Chan OS, Sze HC, Lee MC, et al. Reirradiation with inten-

- sity-modulated radiotherapy for locally recurrent T3 to T4 nasopharyngeal carcinoma[J]. *Head Neck*, 2017, 39(3):533.
- [8] Nakanishi Y, Wakisaka N, Kondo S, et al. Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(3):435–447.
- [9] Chan JW, Parvathaneni U, Yom SS. Reducing radiation-related morbidity in the treatment of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Future Oncol*, 2017, 13(5):425–431.
- [10] Chen AW, Tseng YS, Lin CC, et al. Norcantharidin induce apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma through caspase and mitochondrial pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(3):343.
- [11] Sai-Guan L, Min-Han K, Kah-Wai N, et al. Nasopharyngeal carcinoma with cystic cervical metastasis masquerading as branchial cleft cyst: a potential pitfall in diagnosis and management[J]. *Iran J Otorhinolaryngol*, 2017, 29(91): 117–120.
- [12] Lin HF, Hsieh MJ, Hsi YT, et al. Celastrol-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma is associated with the activation of the death receptor and the mitochondrial pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2):1683–1690.
- [13] 黄雪琴, 崔仲宜, 蒋东辉, 等. 鼻咽癌细胞来源分泌体的提取和鉴定[J]. *广东医学*, 2016, 37(2):191–193.
- Huang XQ, Cui ZY, Jiang DH, et al. Extraction and identification of exosomes from nasopharyngeal cancer cells [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2016, 37(2):191–193.
- [14] Shi L, Yin W, Zhang Z, et al. Down-regulation of miR-26b induces cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma by repressing JAG1 [J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6 (12): 1211–1219.
- [15] Horng S, Therattil A, Moyon S, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8):3136–3151.
- [16] Thete D, Snyder AJ, Mainou BA, et al. Reovirus mu1 protein affects infectivity by altering virus- receptor interactions[J]. *J Virol*, 2016, 90(23):10951–10962.
- [17] Ayres FM, Narita M, Takahashi M, et al. A comparative study of the JAM test and 51Cr-release assay to assess the cytotoxicity of dendritic cells on hematopoietic tumor cells [J]. *Immunol Invest*, 2013, 32(4):219–227.
- [18] Tharakan A, Halderman AA, Lane AP, et al. Reversal of cigarette smoke extract-induced sinonasal epithelial cell barrier dysfunction through Nrf2 Activation [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2016, 6(11):1145–1150.
- [19] Liao ZW, Zhao L, Cai MY, et al. P300 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (2):763–769.