

A 激酶相互作用蛋白 1 和瞬时受体电位通道 1 在舌鳞状细胞癌中的临床意义及其机制

石 光,焦建军,刘英奇,张 肖,杨龙龙,张 晶,张学强,孙 莹
(邯郸市中心医院,河北 邯郸 056001)

摘 要: [目的] 探讨 A 激酶相互作用蛋白 1 (A kinase interacting protein 1, AKIP1) 和瞬时受体电位通道 1 (transient receptor potential channel 1, TRPC1) 在舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSCC) 中的临床意义及影响 TSCC 的潜在机制。 [方法] 筛选 2016 年 1 月至 2019 年 12 月接受手术切除联合或不联合辅助放疗的 TSCC 患者 194 例, 采用免疫组化染色和 RT-qPCR 进行 TRPC1 和 AKIP1 蛋白和 mRNA 的检测, 根据表达情况分为高低表达组。通过 String 网站筛选与 AKIP1、TRPC1 蛋白相互作用的蛋白, 将其导入 Cytoscape 软件并利用 cytoHubba 模块 MCC 法筛选出与 AKIP1、TRPC1 蛋白显著相关的蛋白, 构建互作图; 再利用 KEGG rest API 对密切相关的蛋白进行功能富集分析。 [结果] TRPC 和 AKIP1 在 TSCC 癌组织和癌旁组织的阳性表达率分别为 59.8%、56.2% 和 40.2%、33.5%; TRPC1 mRNA 和 AKIP1 mRNA 水平在癌组织和癌旁组织的平均值分别为 2.3 ± 1.3 、 2.3 ± 1.1 和 1.4 ± 0.9 、 1.1 ± 0.4 , 高表达率分别为 57.2%、50.5% 和 30.9%、33.5%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。TRPC1 蛋白和 mRNA 表达, 在不同 N 分期和 TNM 分期患者中差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。AKIP1 蛋白表达, 在不同 N 分期和 TNM 分期患者中差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AKIP1 mRNA 表达, 在不同 N 分期、TNM 分期和病理分级患者中差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析显示, TRPC1 和 AKIP1 蛋白表达呈正相关, TRPC1 mRNA 和 AKIP1 mRNA 表达也呈正相关 ($P < 0.05$)。高表达 TRPC1 和 AKIP1 的患者生存期明显劣于低表达患者 ($P < 0.05$)。采用 String 网站和 Cytoscape 软件筛选出与 TRPC1 和 AKIP1 密切相关基因 21 个, 并经 KEGG 富集分析, 结果显示这些基因主要富集于血小板激活、钙信号通路、TRP 信号通路的炎症调控、Rap1 信号通路、cAMP-PKG 信号通路、VEGF 信号通路等。 [结论] TRPC1、AKIP1 高表达与 TSCC 预后差相关, 两者可能通过 Rap1、VEGF 等信号通路的激活进而参与肿瘤的进展。

主题词: 舌鳞状细胞癌; A 激酶相互作用蛋白 1; 瞬时受体电位通道 1; 蛋白互作分析; KEGG 通路富集分析

中国分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2024)02-0141-10

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2024.02.B008

Expression of A Kinase Interacting Protein 1 and Transient Receptor Potential Channel 1 in Patients with Tongue Squamous Cell Carcinoma and Their Clinical Significance

SHI Guang, JIAO Jianjun, LIU Yingqi, ZHAO Xiao, YANG Longlong, ZHANG Jing, ZHANG Xueqiang, SUN Ying

(Handan Central Hospital, Handan 056001, China)

Abstract: [Objective] To explore the expression and clinical significance of A kinase interacting protein 1 (AKIP1) and transient receptor potential channel 1 (TRPC1) in patients with tongue squamous cell carcinoma (TSCC). [Methods] One hundred and ninety-four TSCC patients who underwent surgical resection with or without adjuvant radiotherapy from January 2016 to December 2019 were enrolled. The expressions of TRPC1 and AKIP1 protein and mRNA were detected by immunohistochemical staining and RT-qPCR, respectively, and patients were divided into high and low expression groups. The proteins interacting with TRPC1 and AKIP1 were screened on String website, and selected by MCC methods of cytoHubba module in Cytoscape, to establish an interaction diagram. KEGG rest API was applied for functional enrichment analysis of closely related proteins. [Results] The positive rate of TRPC1 and AKIP1 was 59.8%, 56.2% in tumor tissues and 40.2%, 33.5% in adjacent tissues of TSCC ($P < 0.05$), respectively. The mean values of TRPC1 and AKIP1 mRNA in tumor and adjacent tissues were 2.3 ± 1.3 , 2.3 ± 1.1 and 1.4 ± 0.9 , 1.1 ± 0.4 , respectively; and the expression rates in tumor tissues were significantly higher than those in adjacent tissues (57.2% vs 50.5% and 30.9% vs 33.5%, $P < 0.05$). The expression of TRPC1 protein and mRNA showed statistical differences in patients with different N stages and TNM stages ($P < 0.05$). The expression of AKIP1 protein showed statistical significance in patients with different N stages and TNM stages ($P < 0.05$), while the expression of AKIP1 mRNA showed statistical significance in patients with different N stages, TNM stages, and pathological grading ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that TRPC1 protein and mRNA were positively correlated with AKIP1 protein and mRNA, respectively ($P < 0.05$). The survival of patients with high expression of TRPC1 and AKIP1 was significantly worse than that of patients with low expression ($P < 0.05$). Twenty one genes closely related to TRPC1 and AKIP1 were screened out by String website and Cytoscape soft-

基金项目: 河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划项目 (20231969)

通信作者: 孙 莹, E-mail: shuizhiyaping8941@163.com

收稿日期: 2023-05-05; **修回日期:** 2023-07-10

ware, KEGG enrichment analysis showed that these genes were mainly enriched in platelet activation, calcium signaling pathway, inflammatory regulation of TRP signaling pathway, Rap1 signaling pathway, cAMP-PKG signaling pathway and VEGF signaling pathway. [Conclusion] High expression of TRPC1 and AKIP1 is associated with poor prognosis of TSCC, they may participate in tumor progression through the activation of Rap1, VEGF and other signaling pathways.

Subject words: tongue squamous cell carcinoma; A kinase interacting protein 1; transient receptor potential channel 1; relationship analysis in proteins; KEGG signal enrichment analysis

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是常见的头颈部恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率呈逐渐上升趋势^[1]。TSCC的临床行为具有侵袭性,导致较高的局部浸润和转移倾向,早期(I/II期)TSCC发生淋巴结转移率高达42%^[2]。正因为伴有淋巴结转移的早期TSCC预后差,有研究通过建立多层感知器神经网络学习模型预测早期TSCC淋巴结转移的发生率,其中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在TSCC中表达升高可预测淋巴结转移^[3-4]。研究发现,即使超过90%的头颈部鳞状细胞癌过表达EGFR,但应用于TSCC的靶向EGFR药物却有限^[5]。因此,寻找新的治疗策略和预后生物标志物仍是TSCC的研究热点。

A激酶相互作用蛋白1(A kinase interacting protein 1, AKIP1)是一种位于细胞质、细胞核的线粒体的细胞内蛋白,是细胞内结构的适配器。临床研究发现,AKIP1在多种实体肿瘤如乳腺癌、宫颈癌、结肠癌和食管癌等中表达升高,特别是分期晚的患者,可作为肿瘤患者预后差的标志物^[6-8]。体内外实验发现AKIP1可激活Slug诱导的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进胃癌进展,介导PI3K/Akt/IKK β 信号通路诱导EMT促进宫颈癌进展等;然而,AKIP1在TSCC中的作用仍不清楚^[9-10]。

瞬时受体电位通道1(transient receptor potential channel 1, TRPC1)是TRPC亚家族成员,可通过介导钙池调控钙离子流入(store-operated Ca²⁺ entry, SOCE)参与钙离子信号的调控,研究证实,TRPC1在胰腺癌、乳腺癌及肺癌等肿瘤中高表达,是肿瘤细胞存活、迁移和侵袭的关键因素^[11-12]。其中,TRPC1通过介导EMT促进乳腺癌的进展;通过抑制铂类药物诱发的DNA损伤反应而导致铂类耐药,缺氧环境下,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的上调加速TRPC1的表达,进而促进肺癌

的进展^[11,13-14]。TRPC1在TSCC中的研究较少见。

本研究通过观察TSCC组织中AKIP1和TRPC1的表达,了解两者与患者临床病理特征的关系,探讨两者间的相互作用及其潜在机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2019年12月在邯郸市中心医院接受手术切除联合或不联合辅助放疗的TSCC患者264例,所有患者均经病理学确诊并具有肿瘤及癌旁组织标本。其中210例患者保存冷冻的肿瘤及癌旁组织。将临床资料不完整、其他恶性肿瘤病史、失访的患者排除,具体为10例患者没有适合免疫组化检测的肿瘤组织或癌旁组织标本,13例接受了新辅助治疗,2例患者出现其他癌症,最终纳入194例符合条件患者。患者平均年龄(59.5 $\pm$ 12.1)岁,中位年龄60岁;男性141例(72.7%),女性53例(27.3%);病理分级:G₁、G₂、G₃患者分别为39例(20.1%)、86例(44.3%)和69例(35.6%)。TNM分期:I、II、III、IV期患者分别为30例(15.5%)、81例(41.8%)、74例(38.1%)和9例(4.6%),其中T₁、T₂、T₃期分别为32、103、59例,N₀、N₁、N₂期分别为121、64和9例;143例(73.7%)患者接受了辅助放疗。根据TRPC1和AKIP1蛋白及mRNA的评分,分为高表达组和低表达组。研究中的所有患者均签署知情同意书,并经邯郸市中心医院伦理委员会批准(批件号:20230706)。

1.2 免疫组织化学检测及评分标准

将194例TSCC蜡块标本(包括肿瘤组织和癌旁组织)切成4 μ m薄片,脱蜡,水化,抗原提取,3% H₂O₂阻断载玻片30 min,切片用人抗兔单克隆抗体抗AKIP1(1:100, Abcam, Cambridge, USA)、TRPC1

(1:500, Abcam, Cambridge, USA)、多克隆抗兔 IgG 抗体(ab37415)(1:100, Abcam, Cambridge, USA)作为同型对照;所有一抗均在室温下应用 30 min,随后使用通用生物素化二抗(SE134, 1:200, Abcam, Cambridge, USA)复染,封片。电子显微镜下(华康剂量检验有限公司, BX51 型)随机选取 3 个高倍视野拍照。

评分标准:癌组织主要来源于 TSCC 上皮细胞;癌旁组织包括上皮细胞、肌肉细胞和成纤维细胞等。采用免疫组化半定量法,即染色强度和染色密度分值相乘进行评分。染色强度评分为 0(无染色)、1(弱染色)、2(中染色)、3(强染色);染色密度即阳性染色细胞占比,包括 0(<1%)、1(1%~25%)、2(26%~50%)、3(51%~75%)和 4(76%~100%);总分为 0~12 分。TRPC1 和 AKIP1 的阳性表达为评分>3 分,阴性表达为评分≤3 分^[12,15]。

1.3 实时定量逆转录聚合酶链反应检测

采用实时定量逆转录聚合酶链反应(real time-quantitative PCR, RT-qPCR)法检测 194 例冷冻的肿瘤组织及癌旁组织中 *TRPC1* 和 *AKIP1* mRNA 的水平。首先使用 TRIzol™ 试剂(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)提取肿瘤和癌旁组织的总 RNA,再通过 iScript™ 逆转录 Supermix(Bio-Rad, CA, USA)将 RNA 逆转录为 cDNA,最后,使用 QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒(QiaGen, Duesseldorf, Nordrhein-Westfalen, Germany)进行 PCR。以 GAPDH 为内参考,使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 TRPC1 和 AKIP1 表达量。引物如下:TRPC1 forward primer (5'→3'):GCC-AGTTTTFTCACTTTGTTATTT, reverse primer(5'→3'):CCCATTGTGTTTTCTTATCCTCA; AKIP1 forward primer(5'→3'):AGAACATCTCTAAGGACCTCTACAT, reverse primer (5'→3'):CCAGAATCAACTGCTAC-CACAT; GAPDH forward primer (5'→3'):GGAGC-GAGATCCCTCCAAAAT, reverse primer (5'→3'):GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG。采用定性分析,根据肿瘤组织的中位表达量,将 *TRPC1* 和 *AKIP1* mRNA 表达分为高低表达。

1.4 KEGG 通路富集分析及相关分析

对于基因集功能富集分析,通过 String 网站(version 11.5, <https://cn.string-db.org/cgi/input.pl>)筛选与 AKIP1、TRPC1 蛋白相互作用的蛋白,再将其导入 Cytoscape 软件,利用 cytoHubba 模块 MCC 法

筛选出与 AKIP1、TRPC1 蛋白密切相关的蛋白(基因)21 个,并建立蛋白网络图(PPI 图)。利用 KEGG rest API(<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>)获取最新的 KEGG Pathway 的基因注释作为背景,将 21 个基因映射到背景集合中,采用 R 软件包 clusterProfiler(version 3.14.3)进行富集分析。设定最小基因集为 5,最大基因集为 5 000, $P<0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR)<0.25 为差异有统计学意义。

采用 TIMER 网站(version 2, <https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)验证 TCGA 数据库中 AKIP1 基因型 *C11ORF17* 和 TRPC1 基因型 *TRPC1* 的相关性。

1.5 随访

随访主要通过电话、门诊复查形式,术后 1~2 年每 3 个月,术后 3~5 年每 6 个月,术后 5 年以上每年进行随访。总生存期(overall survival, OS)为手术后至随访截止或因肿瘤原因死亡的时间。患者死亡为终点事件,失访、存活或死于非肿瘤的计为截尾数据,末次随访时间为 2021 年 3 月 1 日,其中 26 例患者失访(包括 20 例患者失去联系,6 例患者拒绝随访),随访率为 86.74%。计算上述时间以月为单位。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计软件(IBM, Chicago, Illinois, USA)和 GraphPad Prism 8.02 软件(GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA)进行数据分析。计量资料采用均数±标准差表示,计数资料采用百分率表示;采用两两 *t* 检验比较肿瘤组织和癌旁组织 TRPC1 和 AKIP1 免疫组化评分差异,采用 McNemar 检验比较 TRPC1 和 AKIP1 蛋白表达;采用两两 *t* 检验比较 *TRPC1* 和 *AKIP1* mRNA 在癌和癌旁组织中的差异;采用 Wilcoxon 秩和检验或卡方检验分析 TRPC1 和 AKIP1 蛋白及 mRNA 表达与临床病理特征的关系;采用 Kaplan-Meier 生成生存曲线,Long-rank 检验比较组间差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

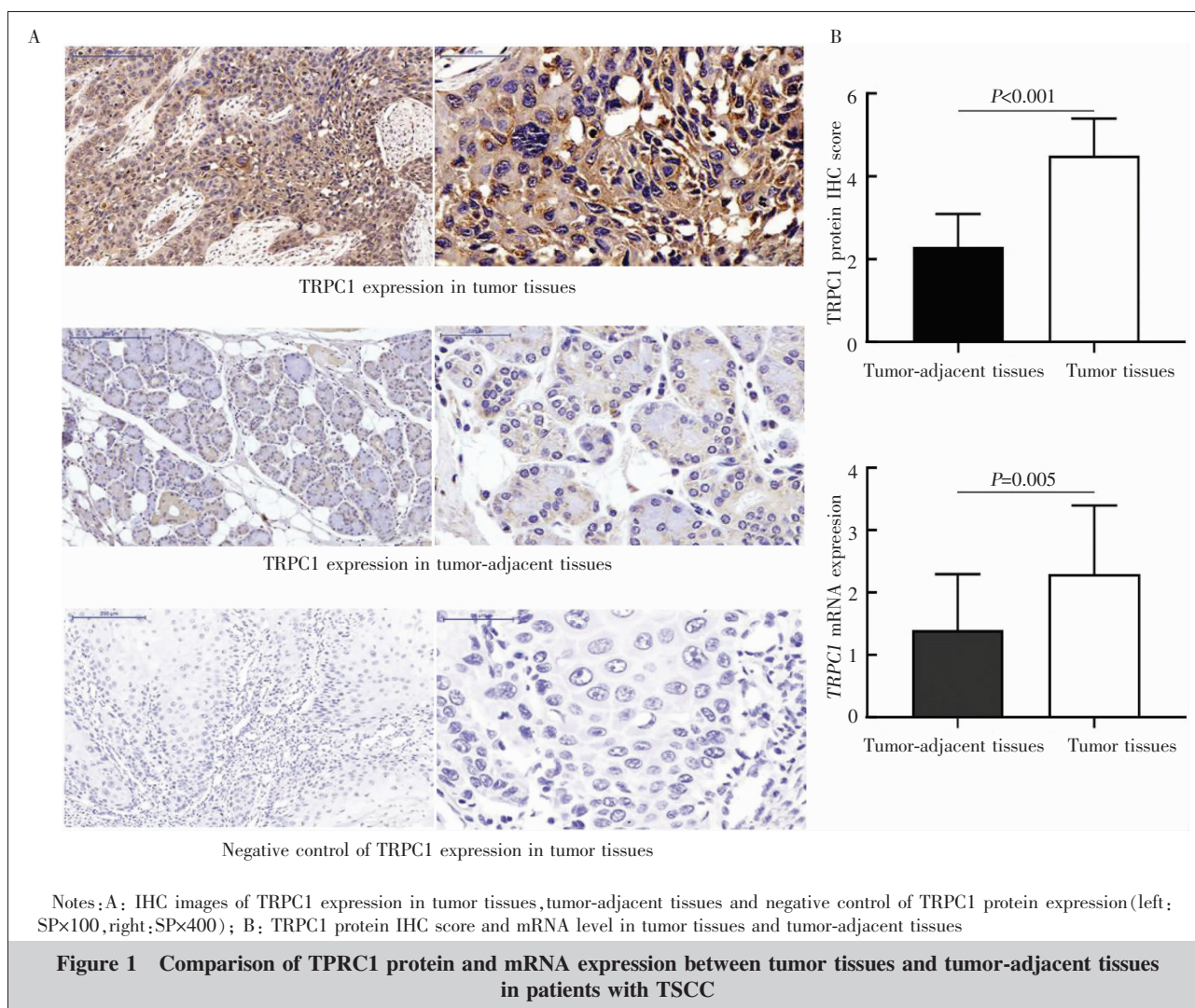
2.1 TSCC 患者癌组织和癌旁组织中 TRPC1、AKIP1 蛋白和 mRNA 的表达

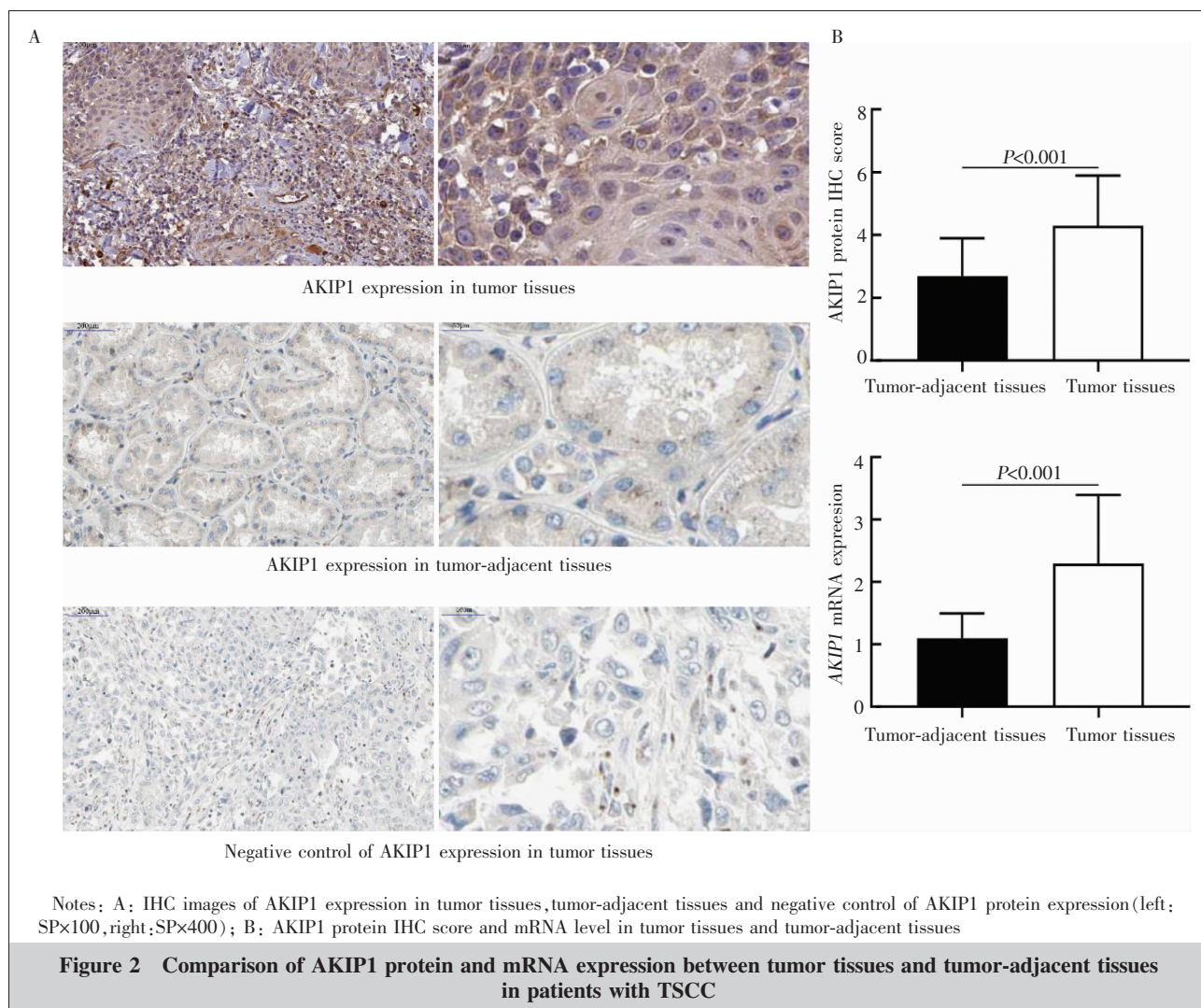
194 例 TSCC 标本中,TRPC1 蛋白多分布于细

胞膜和细胞质,呈棕褐色,在 TSCC 癌组织和癌旁组织的阳性表达率分别为 59.8%(116 例)和 40.2%(78 例),差异有统计学意义($P<0.001$)。TRPC1 mRNA 在癌组织和癌旁组织的平均值分别为 2.3 ± 1.3 和 1.4 ± 0.9 ,根据平均值,分为高低表达组,癌组织和癌旁组织中高表达分别为 111 例 (57.2%) 和 60 例 (30.9%),差异有统计学意义($P=0.005$)。AKIP1 蛋白也表达于细胞质和细胞膜,呈棕褐色,在癌组织和癌旁组织的阳性表达率分别为 56.2%(109 例)和 33.5%(65 例),差异有统计学意义($P<0.001$);AKIP1 mRNA 水平在癌组织和癌旁组织中的平均值分别为 2.3 ± 1.1 和 1.1 ± 0.4 ,根据平均值,分为高低表达组,癌组织和癌旁组织中高表达分别为 98 例 (50.5%) 和 65 例 (33.5%), 差异有统计学意义 ($P<0.001$) (Figure 1~2)。

2.2 TSCC 患者癌组织中 TRPC1、AKIP1 蛋白和 mRNA 表达与临床病理特征的关系

分析 TRPC1、AKIP1 蛋白和 mRNA 在 TSCC 患者临床病理特征中的表达差异,TRPC1 蛋白和 mRNA 表达在不同 N 分期、TNM 分期组差异均有统计学意义($P<0.05$),而在不同年龄、性别、病理分级、T 分期和辅助放疗组中差异无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 1)。AKIP1 蛋白表达在不同 N 分期、TNM 分期组差异均有统计学意义($P<0.05$),AKIP1 mRNA 表达在不同 N 分期、TNM 分期和病理分级中差异均有统计学意义($P<0.05$) (Table 2)。Pearson 相关性分析结果显示,TRPC1 和 AKIP1 蛋白和其相应的基因均呈正相关,相关系数分别为 0.86 和 0.85,差异有统计学意义($P<0.05$);TRPC1 和 AKIP1 蛋白也呈正相关 ($r=0.96, P<0.01$),TRPC1 mRNA 和 AKIP1





mRNA 也呈正相关($r=0.90$, $P<0.05$)(Figure 3)。TRPC1 和 AKIP1 蛋白的高表达与 TSCC 患者分期晚密切相关,而且两者相互影响。

2.3 TRPC1、AKIP1 表达与 TSCC 患者生存情况分析

168 例患者顺利完成随访,TRPC1 阳性表达与阴性表达 TSCC 患者的 5 年生存率分别为 46.7% 和 78.9%, 中位生存时间分别为 47.7 个月 (95%CI: 44.6~50.7) 和 53.5 个月 (95%CI: 50.2~56.8), 差异有统计学意义($P=0.028$)。虽然 TRPC1 mRNA 高表达患者中位生存时间也短于 TRPC1 mRNA 低表达患者[46.9 个月 (95%CI: 42.9~51.0) vs 52.9 个月 (95%CI: 49.1~56.6)], 5 年生存率也低于 TRPC1 mRNA 低表达患者 (43.4% vs 67.8%), 但差异无统计学意义($P=0.051$)。

AKIP1 阳性表达患者中位生存时间短于 AKIP1 阴性表达患者 [48.1 个月 (95%CI: 45.3~52.4) vs 53.3 个月 (95%CI: 48.1~57.2)], 5 年生存率也低于 TRPC1 阴性表达患者 (62.2% vs 85.8%) ($P=0.049$)。AKIP1 mRNA 高低表达患者的 5 年生存率分别为 67.1% 和 80.9%, 中位生存时间分别为 51.7 个月 (95%CI: 48.6~54.7) 和 54.6 个月 (95%CI: 51.1~57.4), 差异无统计学意义($P=0.060$)(Figure 4)。

2.4 TRPC1 与 AKIP1 的相关性及其潜在作用机制

为了了解 TRPC1 和 AKIP1 相互影响的潜在机制,本研究采用 String 网站筛选与 TRPC1 和 AKIP1 相关的基因 21 个,通过 KEGG 富集分析 21 个基因相关影响的潜在机制。结果显示,TRPC1 和 AKIP1 相关的基因有 73 个,其中 ORAI1、STIM1、TRPV4、CAV1、KCNN3、STIM2、ORAI3、TRPC4、ITPR1、PKD1、

Table 1 Relationship between expressions of TRPC1 protein and mRNA and clinicopathological characteristics of patient with TSCC[n(%)]

Index	TRPC1 protein				TRPC1 mRNA			
	Negative(n=78)	Positive(n=116)	χ^2	P	Low(n=83)	High(n=111)	χ^2	P
Age(years old)								
≤60	48(61.5)	76(65.5)	0.320	0.572	50(60.2)	74(66.7)	0.850	0.356
>60	30(38.5)	40(34.5)			33(39.8)	37(33.3)		
Gender								
Female	20(25.6)	33(28.4)	0.185	0.667	26(31.3)	27(24.3)	1.172	0.279
Male	58(74.4)	83(71.6)			57(68.7)	84(75.7)		
Pathological grade								
G ₁	17(21.8)	22(19.0)	0.737	0.692	18(21.7)	21(18.9)	1.229	0.541
G ₂	36(46.2)	50(43.1)			33(39.8)	53(47.7)		
G ₃	25(33.0)	44(37.9)			32(39.5)	37(33.4)		
T stage								
T ₁	15(19.2)	17(14.7)	2.434	0.296	13(15.7)	19(17.1)	2.272	0.321
T ₂	44(56.4)	59(50.9)			49(59.0)	54(48.6)		
T ₃	19(24.4)	40(34.6)			21(25.3)	38(34.3)		
N stage								
N ₀	57(73.1)	64(55.2)	7.702	0.021	63(75.9)	58(52.3)	11.431	0.003
N ₁	20(25.6)	44(37.9)			18(21.7)	46(41.4)		
N ₂	1(1.3)	8(6.9)			2(2.4)	7(6.3)		
TNM stage								
I	9(11.5)	21(18.1)	8.547	0.038	15(18.1)	15(13.5)	9.845	0.019
II	41(52.6)	40(34.5)			43(51.8)	38(34.2)		
III	27(34.6)	47(40.5)			23(27.7)	51(45.9)		
IV	1(1.3)	8(6.9)			2(2.3)	7(6.4)		
Adjuvant radiotherapy								
No	23(29.5)	28(24.1)	0.689	0.407	25(30.1)	26(23.4)	1.099	0.294
Yes	55(70.5)	88(75.9)			58(69.9)	85(76.6)		

PKD2、*RHOA*、*ORA12*、*TRPC3*、*TRPC5*、*ITPR3*、*SRC*、*KDR*、*AKT1* 与 *AKIP1* 和 *TRPC1* 密切相关 (Figure 5A)。经 KEGG 富集分析,上述基因主要富集于血小板激活、钙信号通路、TRP 信号通路的炎性调控、Rap1 信号通路、cAMP-PKG 信号通路、VEGF 信号通路等 (Figure 5B)。TCGA 数据中 *TRPC1* 和 *AKIP1* 基因的相关性分析,结果显示,两者呈正相关 (Figure 5C)。表明 *TRPC1* 与 *AKIP1* 存在相互影响,可能与信号通路的激活有关。

3 讨论

TRPC1 与 *AKIP1* 在肿瘤中的作用逐渐被关注,然而两者在头颈部肿瘤中的作用仍不清楚。本研究观察两者在 TSCC 中的表达及其与临床病理特征及预后的关系,结果显示,与癌旁组织相比,*TRPC1*、*AKIP1* 蛋白和 mRNA 水平均显著升高。两者无论基

因水平,还是蛋白表达,在不同 N 分期和 TNM 分期患者中均有显著性差异,且 *AKIP1* mRNA 高低表达在不同病理分级患者中也有显著性差异。Pearson 相关性分析显示,*TRPC1* 和 *AKIP1* 蛋白表达呈正相关,*TRPC1* mRNA 和 *AKIP1* mRNA 也呈正相关。高表达 *TRPC1* 和 *AKIP1* 患者的生存期明显劣于低表达患者。TCGA 数据库分析显示 *TRPC1* 和 *AKIP1* 存在相关性,其潜在机制可能与 Rap1 信号通路、信号通路炎性调控等有关。

在非小细胞肺癌的临床研究中,研究者发现 *TRPC1* 蛋白和基因均在癌组织中高表达,且明显高于癌旁组织^[12]。本研究在 TSCC 中也发现相似的结果,提示 *TRPC1* 具有促进 TSCC 作用。*TRPC1* 升高不仅可诱发肿瘤细胞 SOCE 增强和存储操作电流失调,而且可调控致癌基因的表达,激活 NFAT 的去磷酸化,进而影响肿瘤的发生及进展^[16]。免疫组化染色主要通过细胞形态学识别肿瘤细胞,本研究也发现

Table 2 Relationship between expressions of AKIP1 protein and mRNA and clinicopathological characteristics of patient with TSCC[n(%)]

Index	AKIP1 protein				AKIP1 mRNA			
	Negative(n=85)	Positive(n=109)	χ^2	P	Low(n=96)	High(n=98)	χ^2	P
Age(years old)								
≤60	54(63.5)	70(64.2)	0.010	0.921	59(61.5)	65(66.3)	0.498	0.480
>60	31(36.5)	39(35.8)			37(38.5)	33(33.7)		
Gender								
Female	23(27.1)	30(27.5)	0.005	0.943	26(27.1)	27(27.6)	0.005	0.942
Male	62(72.9)	79(72.5)			70(72.9)	71(72.4)		
Pathological grade								
G ₁	15(17.6)	24(22.0)	0.643	0.725	18(18.8)	21(21.4)	6.448	0.040
G ₂	38(44.7)	48(44.0)			51(53.1)	35(35.7)		
G ₃	32(37.4)	37(34.0)			27(28.1)	42(42.9)		
T stage								
T ₁	15(17.6)	17(15.6)	4.712	0.095	17(21.8)	15(12.9)	4.631	0.099
T ₂	51(60.0)	52(47.7)			43(55.1)	60(51.7)		
T ₃	19(22.4)	40(36.7)			18(23.1)	41(35.4)		
N stage								
N ₀	64(75.3)	57(52.3)	10.944	0.004	73(76.0)	48(49.0)	15.487	<0.001
N ₁	19(22.4)	45(41.3)			21(21.9)	43(43.9)		
N ₂	2(2.3)	7(6.4)			2(2.1)	7(7.1)		
TNM stage								
I	10(11.8)	20(18.3)	11.952	0.008	17(17.7)	13(13.3)	8.026	0.045
II	47(55.3)	34(31.2)			47(49.0)	34(34.7)		
III	26(30.6)	48(44.1)			30(31.3)	44(44.9)		
IV	2(2.3)	7(6.4)			2(2.0)	7(7.1)		
Adjuvant radiotherapy								
No	23(27.1)	28(25.7)	0.046	0.830	25(26.0)	26(26.5)	0.006	0.938
Yes	62(72.9)	81(74.3)			71(74.0)	72(73.5)		

TRPC1 分布于细胞质,然而肿瘤微环境除了鳞状上皮细胞,还有间质细胞、成纤维细胞及淋巴细胞等多种细胞,因此 TRPC1 在肿瘤组织中的染色位置仍待明确。在临床病理特征方面,本研究发现 TRPC1 阳性表达在不同 N 分期和 TNM 分期中均显著高于 TRPC1 阴性表达,说明 TRPC1 升高与 N 分期、TNM 分期晚有关,预示临床分期晚的患者可能伴有 TRPC1 的升高。有研究报道,TRPC1 的高表达可反映子宫内 膜癌宫颈间质浸润、淋巴血管浸润,与 FIGO 分期密切相关^[17]。此外,对肿瘤患者标本的筛查发现,TRPC1 高低表达在乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤分期中均有显著性差异^[18-19]。机制可能与 TRPC1 高表达通过上调 TSCC 细胞的 SOCE 调节 Ca²⁺通道诱导的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),促进癌细胞的侵袭和转移,从而导致 TNM 分期的升高^[20]。另外,肿瘤微环境中内皮细胞 Ca²⁺通道可调控多种促血管生成因子和内皮细胞功能参

与血管重构^[21]。因此,基于 TRPC1 调节细胞内 Ca²⁺通道的能力以及对细胞外生长因子的反应,推测其可能促进血管生成及重塑,促进 TSCC 患者的淋巴转移及浸润。本研究发现,TRPC1 高表达的患者生存期缩短,表明 TRPC1 表达升高预示着 TSCC 患者的预后较差。虽然 *TRPC1* mRNA 水平升高,TSCC 患者的生存期也有减少的趋势,但是差异未达到统计学意义。

AKIP1 已知是致癌的关键调控因子,在胃癌中,其在肿瘤组织中的表达明显高于非癌组织^[22]。研究者还发现,肿瘤 AKIP1 高表达与 T 分期、TNM 分期相关。Meta 分析显示,AKIP1 过表达与不良临床病理特征呈正相关,包括肿瘤大小、临床分期、肿瘤浸润深度和淋巴结转移程度,表明 AKIP1 高表达是预后不良的生物标志物,可作为癌症患者潜在的治疗靶点^[23]。本研究比较 TSCC 组织和癌旁组织中 AKIP1 的表达,发现癌组织中 AKIP1 表达明显升高;在临

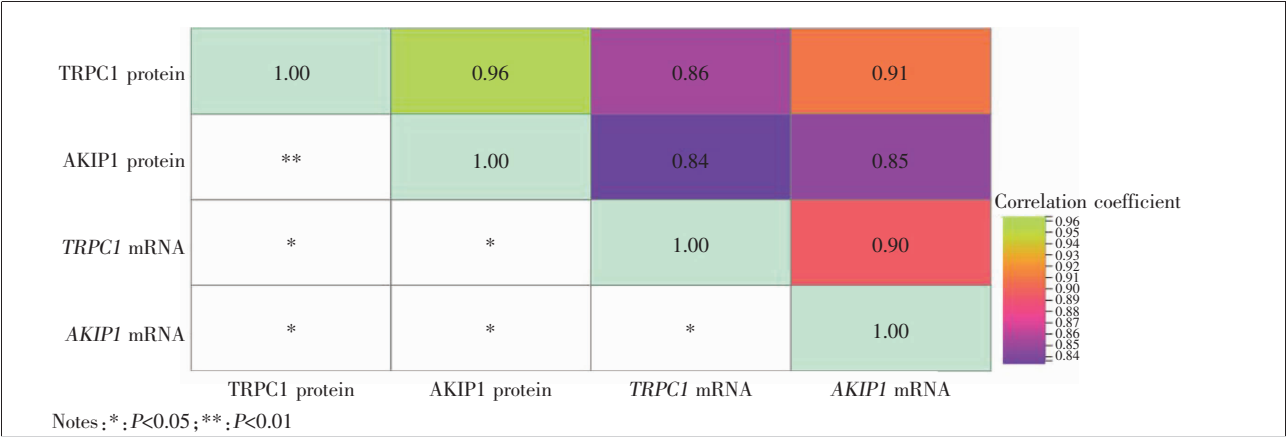


Figure 3 Pearson correlation heat map matrix analysis of TRPC1 and AKIP1 in tumor tissues of patients with TSCC

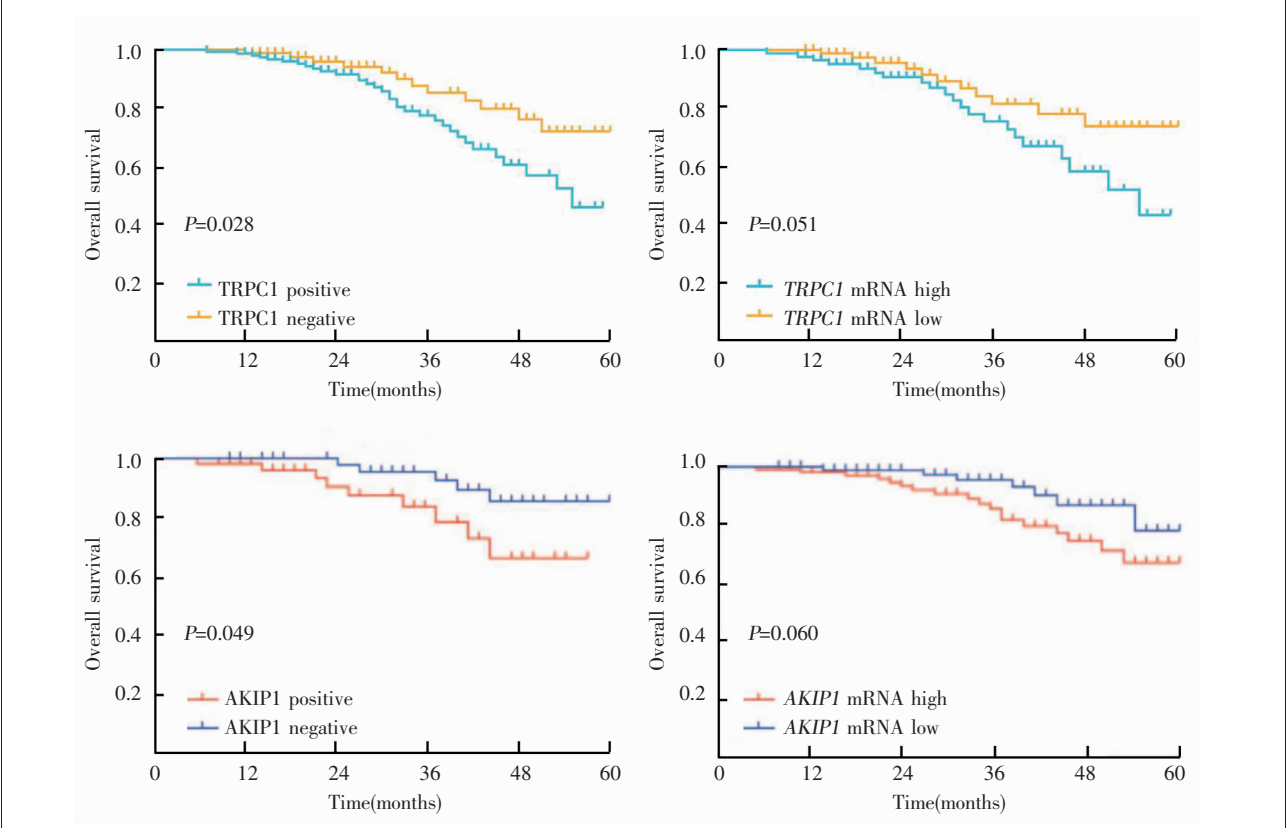


Figure 4 Relationship overall survival between TRPC1,AKIP1 proteins and mRNA levels in tumor tissues of patients with TSCC

床病理特征中,AKIP1 阳性表达与 N 分期、TNM 分期、病理分级有关,提示阳性表达 AKIP1 的 TSCC 组织易侵袭、易出现淋巴结转移,患者分期往往较晚。一方面可能与 AKIP1 具有诱发癌细胞 EMT 的形成,进而促进癌细胞的侵袭和迁移有关;另一方面可能与 κ 基因结合核因子(nuclear factor- κ -gene binding,NF- κ B) 的激活及其释放 CXCL1、CXCL12 和 CXCL8 促进肿瘤血管生成,从而参与 TSCC 的淋巴

结转移及高 TNM 分期有关^[9-10]。多项研究证实,AKIP1 阳性表达的患者具有更短的 OS 和无病生存期,说明 AKIP1 高表达的患者预后更差^[24-25]。然而,本研究仅发现 AKIP1 阳性表达的患者 OS 明显缩短,而 AKIP1 mRNA 高表达对 OS 具有一定的影响,但与 AKIP1 mRNA 低表达者相比,差异无统计学意义。由于 mRNA 表达量为相对值,而蛋白表达量为绝对值,故统计分析结果可能有所不同;此外,RT-qPCR

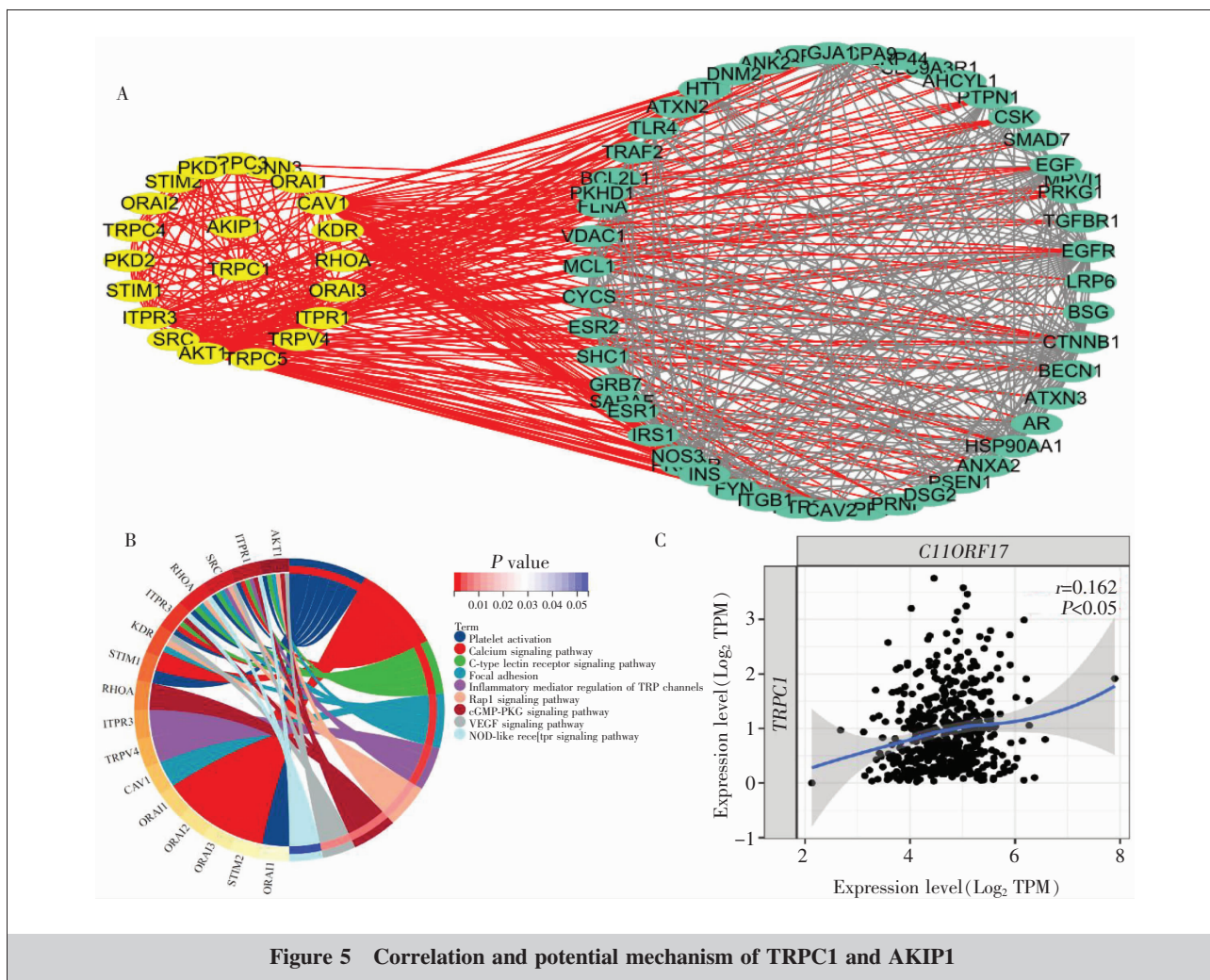


Figure 5 Correlation and potential mechanism of TRPC1 and AKIP1

使用单一的内参可能会有偏倚。

TRPC1 和 AKIP1 都可能通过 EMT 的形成参与癌症的进展,因此,TRPC1 和 AKIP1 间可能存在一定的联系^[9,20]。本研究及 TCGA 数据库资料结果均显示,TRPC1 和 AKIP1 在蛋白和基因水平均呈正相关,提示两者存在相互影响的作用,具体作用机制仍不清楚。经生物信息学分析,本研究发现与两者相关的基因有 21 个,主要富集于血小板激活、钙信号通路、TRP 信号通路的炎症调控、Rap1 信号通路、cAMP-PKG 信号通路、VEGF 信号通路等。研究发现,APIK1 可能通过 mTOR/PI3K/Akt 通路、MAPK 通路、Hippo 及 Wnt 信号通路影响 TSCC 的进展,认为其是调控多个肿瘤相关通路的关键靶点^[26]。另外,APIK1 和 TRPC1 可能都参与肿瘤血管的重构,通过功能富集分析也显示两者参与 VEGF 信号通路的激活,说明 TRPC1 和 AKIP1 可能通过调控多个信号

通路而参与肿瘤的进展。然而本研究并没有进行临床及基础实验验证,具体机制仍待进一步研究。

综上所述,TRPC1、AKIP1 蛋白和 mRNA 高低表达与 TSCC 患者 N 分期、TNM 分期相关,随着两者水平的升高,患者的 OS 也随之缩短。TRPC1 和 AKIP1 呈正相关,可能通过 Rap1、VEGF 等信号通路的激活进而参与肿瘤的进展。

参考文献:

- [1] OHTA K,YOSHIMURA H. Squamous cell carcinoma of the dorsal tongue [J]. CMAJ,2019,191(47):E1310.
- [2] HUANG Z,RUI X,YI C,et al. Silencing LCN2 suppresses oral squamous cell carcinoma progression by reducing EGFR signal activation and recycling[J]. J Exp Clin Cancer Res,2023,42(1):60.
- [3] WU J J,MA L W,JIANG C H,et al. Supraclavicular lymph

- node recurrence after radical surgery: is epidermal growth factor receptor a predictive marker [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2022, 51(5): 612–620.
- [4] KAWAMURA K, LEE C, YOSHIKAWA T, et al. Prediction of cervical lymph node metastasis from immunostained specimens of tongue cancer using a multilayer perceptron neural network [J]. *Cancer Med*, 2023, 12 (5): 5312–5322.
- [5] LIU S, YAN S, ZHU J, et al. Combination RSL3 treatment sensitizes ferroptosis- and EGFR-inhibition-resistant HNSCCs to cetuximab[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9014.
- [6] JIANG W, YANG W, YUAN L, et al. Upregulation of AKIP1 contributes to metastasis and progression and predicts poor prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6795–6801.
- [7] WAN X, HONG Z, MAO Y, et al. Correlations of AKIP1, CXCL1 and CXCL2 expressions with clinicopathological features and survival profiles in cervical cancer patients [J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9 (2): 726–734.
- [8] ZHANG W, WU Q, WANG C, et al. AKIP1 promotes angiogenesis and tumor growth by upregulating CXC-chemokines in cervical cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 448(1–2): 311–320.
- [9] ZHANG X, LIU S, ZHU Y. A-kinase-interacting protein 1 promotes EMT and metastasis via PI3K/Akt/IKK β pathway in cervical cancer [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38 (6): 782–791.
- [10] CHEN D, CAO G, LIU Q. A-kinase-interacting protein 1 facilitates growth and metastasis of gastric cancer cells via Slug-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4434–4442.
- [11] TAI Y K, CHAN K, FONG C, et al. Modulated TRPC1 expression predicts sensitivity of breast cancer to doxorubicin and magnetic field therapy: segue towards a precision medicine approach[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 783803.
- [12] KE C, LONG S. Dysregulated transient receptor potential channel 1 expression and its correlation with clinical features and survival profile in surgical non-small-cell lung cancer patients[J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(3): e24229.
- [13] GUALDANI R, DE CLIPPELE M, RATBI I, et al. Store-operated calcium entry contributes to cisplatin-induced cell death in non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 430.
- [14] WANG Y, HE J, JIANG H, et al. Nicotine enhances store-operated calcium entry by upregulating HIF-1 α and SOCC components in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2097–2104.
- [15] TIAN Y, ZHAO K, YUAN L, et al. EIF3B correlates with advanced disease stages and poor prognosis, and it promotes proliferation and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 23(2): 291–300.
- [16] ELZAMZAMY O M, PENNER R, HAZLEHURST L A. The role of TRPC1 in modulating cancer progression[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 388.
- [17] WANG Y, ZHANG C. Aberrant TRPC1 expression reflects stromal cervical invasion, lymphovascular invasion, elevated FIGO stage, and poor survival in resectable endometrial carcinoma patients[J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(8): e24560.
- [18] ZHANG Y, LUN X, GUO W. Expression of TRPC1 and SBEM protein in breast cancer tissue and its relationship with clinicopathological features and prognosis of patients [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 392.
- [19] VILLALOBOS C, HERNÁNDEZ-MORALES M, GUTIÉRREZ LG, et al. TRPC1 and ORAI1 channels in colon cancer[J]. *Cell Calcium*, 2019, 81: 59–66.
- [20] VAN DEN EYNDE C, DE CLERCQ K, VAN BREE R, et al. TRP channel expression correlates with the epithelial-mesenchymal transition and high-risk endometrial carcinoma[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1): 26.
- [21] ZHANG L Y, ZHANG Y Q, ZENG Y Z, et al. TRPC1 inhibits the proliferation and migration of estrogen receptor-positive breast cancer and gives a better prognosis by inhibiting the PI3K/AKT pathway [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 182(1): 21–33.
- [22] LUO Z, LUO Y, XIAO K. A-kinase interacting protein 1 promotes cell invasion and stemness via activating HIF-1 α and β -catenin signaling pathways in gastric cancer under hypoxia condition[J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 798557.
- [23] XUE S, ZHANG C, XU J, et al. Prognostic significance of A-kinase interacting protein 1 expression in various cancers: a meta-analysis based on the Chinese population[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(25): e29203.
- [24] LIU Y, TIAN J, QIN D, et al. AKIP1 expression in tumor tissue as a new biomarker for disease monitoring and prognosis in non-small cell lung cancer: results of a retrospective study[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(4): e23128.
- [25] FANG T, LU Q. A-kinase interacting protein 1 (AKIP1) associates with advanced overall disease condition, tumor properties, and unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(6): e23213.
- [26] WANG N, BAI D, KRISTIANSEN E, et al. AKIP1 promotes tumor progression by cancer-related pathways and predicts prognosis in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(11): 12338–12351.