

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201705012

· 论著 ·

MTA2 在舌癌组织中的表达及其意义

张俊杰¹, 宋 辉¹, 李 殷¹, 沈文力¹, 葛益林¹, 宋 喜¹, 周小娟¹, 俞建军²

(1. 长沙市第一医院耳鼻咽喉科, 湖南长沙 410005; 2. 湖南省肿瘤医院中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院头颈外二科, 湖南长沙 410013)

摘要: **目的** 比较舌癌患者和正常人中转移相关蛋白 2 (metastasis associated protein 2, MTA2) 的 mRNA 和蛋白表达水平, 并探讨其差异的临床意义。**方法** 选取经病理确诊为舌鳞癌患者 95 例, 同时选取癌旁正常舌黏膜 25 例; 同期另各取 20 例舌癌组织与 20 例癌旁正常上皮组织, 采用免疫组化方法检测 95 例确诊为舌癌组织及 25 例相应癌旁正常舌黏膜上皮组织中 MTA2 的表达; 采用 RT-PCR 和 Western Blot 分别检测 20 例舌癌组织与癌旁正常上皮组织中 mRNA 和蛋白的表达。分析 MTA2 在舌癌组织中的表达与患者的性别、年龄及癌组织分化程度的关系。**结果** MTA2 的 mRNA 和蛋白在舌癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。MTA2 在舌癌组织中的表达与患者性别、年龄无显著相关 ($P > 0.05$), 而与癌组织的分化程度呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** MTA2 在舌癌组织中的表达高于癌旁组织, MTA2 的表达与癌组织的分化程度呈负相关。

关键词: 转移相关蛋白 2; 舌癌; 分化程度; 相关分析

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

[中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(5): 449-452]

Expression and significance of metastasis - associated protein 2 in tongue carcinoma

ZHANG Jun - jie¹, SONG Hui¹, LI Yin¹, SHEN Wen - li¹, GE Yi - lin¹, SON Xi¹, ZHOU Xiao - juan¹, YU Jian - jun²

(1. Department of Otolaryngology, the First Hospital of Changsha City, Changsha 410005, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, Hunan Cancer Hospital the Affiliated Tumour Hospital of Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To observe the expressions of mRNA and protein of metastasis - associated protein 2 (MTA2) in tongue carcinoma and explore its clinical significance. **Methods** Protein expression of MTA2 in 95 specimens of tongue carcinoma and 25 of para - tumor normal mucosa epithelial tissue was detected by immunohistochemical method. The expressions of MTA2 mRNA and MTA2 protein in 20 specimens of tongue carcinoma and 20 of para - tumor normal tissue were measured by real - time polymerase chain reaction (RT - PCR) and Western Blot respectively. The relationships between the expressions and patients' gender, age and the degree of differentiation of carcinoma tissue were analyzed. **Results**

① The expressions MTA2 mRNA and MTA2 protein in the tongue carcinoma tissues were significantly increased compared with the para - tumor normal tissues (both $P < 0.05$). ② There were no significant relationships between the expressions and patients' gender and age (all $P > 0.05$) while the expressions were negatively correlated with the differentiation degree of carcinoma (both $P < 0.05$). **Conclusions** MTA2 expression in tongue carcinoma tissue is higher than that in the para - tumor normal tissue. MTA2 expression is negatively correlated with the differentiation degree of carcinoma.

Key words: Metastasis - associated protein 2; Tongue carcinoma; Degree of differentiation; Correlation analysis

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(5): 449-452]

舌癌是口腔颌面部常见的一种恶性肿瘤, 有研究表明舌癌通常在 40 岁以后发病, 其中男性比女性

患舌癌的概率高出 10%^[1]。目前研究发现, 吸烟酗酒、镶嵌假牙, 咀嚼甜菜属坚果以及在部分亚洲国家常见的一些咀嚼物等因素与舌癌的发生发展密切相关, 但其具体的发病机制尚不清楚^[2]。转移相关蛋白 (metastasis - associated protein, MTA) 家族总共有

作者简介: 张俊杰, 男, 主任医师
通信作者: 张俊杰, Email: junjiezhang 1968@163.com

3个成员:MTA1、MTA2和MTA3,MTA1在实质固态瘤中高表达,包括乳腺癌、食管癌、胰腺癌以及肝癌,与癌细胞的侵袭和迁移成正相关^[3]。目前有研究表明MTA2与头颈部鳞癌存在相关性,但目前还没有关于MTA2与舌鳞癌的关系报道,因此本文拟采用免疫组化、RT-PCR和Western blot的方法来观察MTA2在舌癌中表达的变化并探讨其临床意义,为舌鳞癌的发病机制的研究提供新的线索。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年10月~2015年4月湖南省肿瘤医院耳鼻咽喉头颈外科外科手术切除并经病理确诊为舌鳞癌的95例患者,癌旁正常舌黏膜25例。舌癌患者中男60例,女35例;大于40岁组为50例,小于40岁组为45例。分化程度:高-中分化55例,低分化40例。全部病例术前均未做放疗和化疗,我们分别取20例舌癌组织与癌旁正常上皮组织(经病理证实无瘤组织浸润)的新鲜标本提取蛋白及mRNA。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组织化学染色 用37%福尔马林(甲醛溶液)固定组织、石蜡包埋后进行石蜡切片。二甲苯处理使切片脱蜡、再用梯度酒精水化,最后目的蛋白的表达情况用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法检测。阴性对照选用PBS溶液代替。免疫组化结果均由2位病理医师单独做出病理诊断。对于评分结果不一致的切片结果再由两位医师讨论后重新评分,直到取得一致性。在每张切片中计数统计400个左右的肿瘤细胞,如果切片内阳性细胞数>10%则被判定为MTA-2阳性表达,否则为阴性表达。

1.2.2 Western Blot 向舌组织加入裂解液 lysis buffer(20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na₂CO₄, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF),将其剪碎,冰上充分匀浆、裂解;离心并吸取上清;利用考马斯亮蓝法测定蛋白样品的浓度。将蛋白样品置于100℃沸水中,使其变性。制胶、上样、电泳和转膜后,加入HRP标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育,TBST洗涤3次,于暗房中用ECL发光显色。用BioImaging System采集蛋白条带后进行灰度值测定。目的蛋白与β-actin的灰度值比值即为该样品的蛋白相对含量。

1.2.3 Real-time PCR 取组织标本取下立即置于液氮中,舌癌和癌旁组织RNA采用Trizol法提

取。采用逆转录试剂盒,再行Real-time PCR检测舌癌和癌旁组织中MTA2的mRNA表达水平。PCR反应在ABI7500 Real-time PCR系统上进行。引物由上海生物工程有限公司。PCR引物购于铂尚生物公司,引物序列如下:MAT2:F-TGTACCGGTTGGGAGATTAC,R-TGAGGCTACTAGAAATGTCCC TG;β-actin:F-GAGCTACGAGCTGCCTGACG,R-GTAGTTTCGTGGATGCCA CAG。根据溶解曲线,采用2-ΔΔCT法处理Real-time PCR数据,以对照组mRNA的表达水平为100%,对目的基因的mRNA表达进行分析处理。

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0软件对所有数据进行统计学分析。采用Pearson's Chi-Square检验分析MTA-2的表达与舌癌患者临床病理因素的关系。RT-PCR和Western Blot结果采用Independent-Samples T检验分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。规定 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTA-2在舌癌组织和舌癌旁组织中的蛋白表达

免疫组化染色显示,MTA-2在舌癌旁组织中为阴性表达(0%,0/25),而在舌癌组织中MTA-2呈现高表达,且阳性信号主要定位于胞核,其阳性表达率为67.38%(64/95),明显高于癌旁组织的表达水平($P < 0.05$)。见图1。

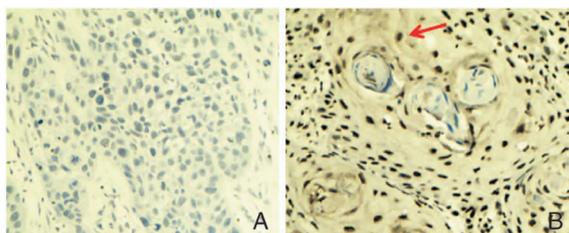


图1 MTA-2在癌旁组织及舌癌中的表达(免疫组化×200) A:MTA-2在癌旁组织中呈阴性表达;B:MTA-2在舌癌组织中高表达

2.2 舌鳞癌患者中MTA2在不同临床病理因素间的表达

MTA2在舌鳞癌患者中的表达与性别($\chi^2 = 0.13, P > 0.05$),年龄($\chi^2 = 3.15, P > 0.05$)无明显相关性;MTA2在舌鳞癌中的表达与肿瘤的分化程度有关,两者之间差异有统计学意义($\chi^2 = 5.31, P < 0.05$)。具体数据见表1。

表 1 MTA2 表达与舌鳞癌患者临床病理因素的关系[例(%)]

组别	MTA2			χ^2	P
	阳性	阴性	阳性率		
性别					
男	32	28	53.3	0.13	>0.05
女	20	15	57.1		
年龄(岁)					
≥40	22	28	40	3.15	>0.05
<40	28	17	66.7		
分化程度					
高-中分化	30	25	54.5	5.31	<0.05
低分化	31	9	77.5		

2.3 MTA-2 的 mRNA 在舌癌组织及癌旁组织的表达

选取 20 例新鲜的舌癌标本和相应的癌旁正常舌黏膜组织的总 RNA,运用 RT-PCR 检测了这些样本中 MTA-2 的 mRNA 表达情况。1/3/5 组样品为 3 次独立提取的舌癌组织的 mRNA,2/4/6 位对于的 3 次独立提取的舌癌旁组织的 mRNA。结果显示:与舌癌旁组织比较,舌癌组织中 MTA2 的 mRNA 的表达水平显著上调($P < 0.05$)。具体见图 2。

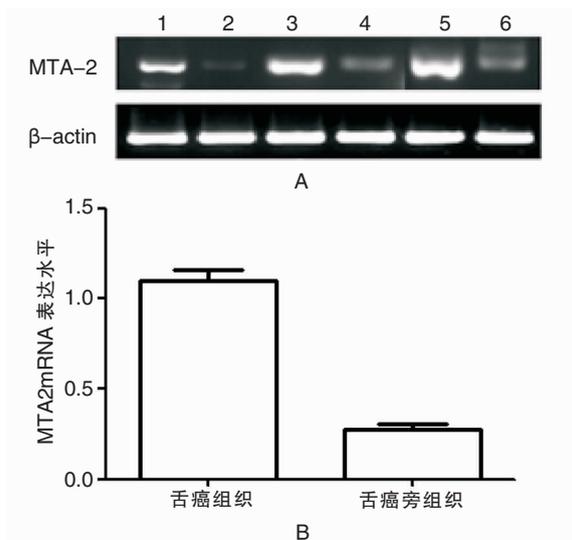


图 2 RT-PCR 检测 MTA2 mRNA 在舌癌组织及癌旁组织的表达情况 A:MTA-2 的 mRNA 在舌癌组织中以及舌癌旁组织中的表达情况;B:两组灰度数据量化分析 MTA-2 的 mRNA 水平

2.4 MTA-2 的蛋白在舌癌组织及癌旁组织的表达情况

采用 Western Blot 检测了这些样本中 MTA-2 的蛋白表达。为了更好更直观的分析蛋白水平,我们用灰度分析软件对电泳结果图进行灰度分析,1/3/5 组样品为 3 次独立提取的舌癌组织的蛋白,2/4/6 位对于的 3 次独立提取的舌癌旁组织的蛋白。舌癌组织中 MTA2 的蛋白表达显著高于舌癌旁组织($P < 0.05$)。具体见图 3。

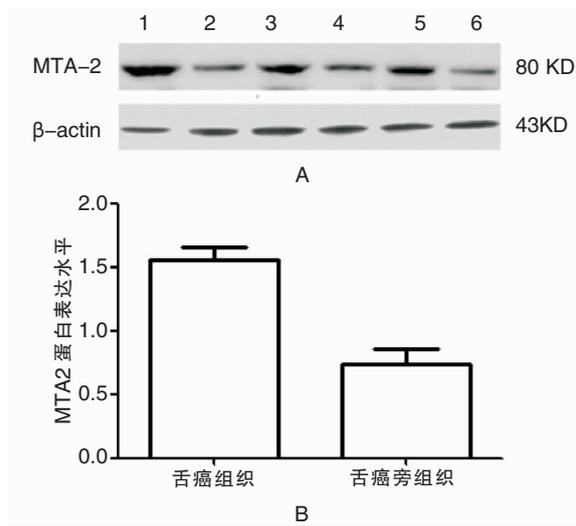


图 3 MTA-2 的蛋白在舌癌组织及癌旁组织的表达情况 A: MTA-2 的蛋白在舌癌组织中以及舌癌旁组织中的表达情况;B:两组灰度数据量化分析 MTA-2 的蛋白水平

3 讨论

目前舌癌准确的发病机制尚不十分清楚,特别是诱发舌癌的因素在不同的国家和地区发生都不尽相同,因此探寻其病因和发病机制具有重要的现实意义。肿瘤转移相关基因 (metastasis associated, MTA) 在肿瘤的发生和转移中发挥着关键作用,MTA 家族总共有 3 个成员:MTA1、MTA2 和 MTA3^[4]。MTA-2 基因是属于 MTAs 家族成员之一,MTA2 在蛋白质结构上与 MTA1 高度同源,都是由核小体结构和组蛋白脱乙酰化 (histone histone acetylation, NuDR) 酶复合体组成,MTA2 的功能与 MTA1 相似。人的 MTA-2 蛋白分子量约为 70 KD,主要在细胞核中表达,定位在人染色体的 11q12-13.1^[5]。MTA2 包含了 18 个外显子,这些外显子的碱基个数大约都在 28 至 229 bp 之间变动,MTA2 基因有 17 个内含子,除了有 3 个内含子比较大,均超过 1 KB,其余 16 个内含子都很小。启动子在 ATG 上游 350 bp 左右的位置,分子结构中有 GATA 锌指模体区域和亮氨酸链区域^[6]。

MTA2 还可以调节 Twist 介导的主细胞状态的活性^[7]。Twist 是胚层诱导和上皮间质转化过程中必不可少的因素^[8]。Fu 及其同事发现,Twist 能够结合含有 MTA2 的 Mi2 NuRD 复合物,而这个复合物是钙黏蛋白抑制、迁移、侵袭和转移必备条件^[9]。然而,更充分的定义 MTA2、细胞核调节因子和 Rho 信号通路的复杂关系需要进一步深入研究。自从报

道在卵巢颈癌中发现 MTA2 有高表达以来,MTA2 逐渐被发现并报道在多种肿瘤中表达,MTA-2 不仅在正常的组织如心、肝、肺、肾等组织中均有所表达,而且在人类恶性肿瘤中的表达是异常的,说明 MTA-2 基因在生理和病理机制中发挥着双重功能^[10]。目前认为核小体重塑活性的组蛋白脱乙酰基酶(nucleosomere modeling deacetylase, NuRD)的亚基有多个,MTA-2 则是其中的一个成员,细胞分裂是 MTA2 表达水平很高,说明 MTA2 与生物个体的发育密切相关。MTA-2 和 MTA-1 功能很近,但是它们两者参与组成的复合物是不同的,MTA-2 具有相对保守的基因转录抑制结构,而 MTA-1 是具有细胞特异性的。

MTA2 作为发现时间较晚的肿瘤相关基因,其基础研究工作目前尚不充分,现阶段研究认为 MTA2 是肿瘤细胞转移传播途径的关键调控基因^[11]。大多数研究突出了 MTA2 在癌转移级联反应的基本过程中的调节作用,尤其是细胞骨架和细胞运动。同时亦有研究发现 MTA2 与雌激素受体 α 通过影响雌激素靶基因的表达参与了肿瘤的发生和发展过程,甚至有研究发现 MTA2 与肿瘤血管生成存在可能的相关性,但目前 MTA2 其他癌基因和抑癌基因的联系尚不完全知晓。MTA2 在舌癌中的研究甚少,其与舌癌的临床病理特征间的联系仍没有相关研究。

MTA2 在肿瘤发生发展过程中作用机制仍有较多关键问题尚未解决。虽然 MTA2 和 Rho 信号通路被认为是形成前馈式调节循环机制,但是这种调节方式的分子机制尚未被充分阐述。在未来的研究中需要继续揭示更多有关此方式的机制和增进对调控细胞运动过程的探索。MTA2 是近些年发现的肿瘤转移相关蛋白家族的成员之一,是核小体重塑的核心组件并在组蛋白的去乙酰化中起着复杂的作用,MTA2 是细胞骨架组织和转录的中央枢纽,并为细胞核和细胞骨架组织提供联系。目前 MTA-2 在乳腺癌、扁桃体癌、肺癌等恶性肿瘤中的研究颇多,但在舌癌中的研究报道目前还较少。通过对 MTA 家族的研究概况的认识、其介导肿瘤转移的分子机制进行学习,同时对 MTA2 在舌癌的研究前景进行展望,旨在为该类疾病的诊疗提供新思路。

本文为了进一步了解 MTA2 与舌癌发生的关系,检测 MTA2 在舌癌中的表达情况,利用多种手段如免疫组化、qPCR 以及蛋白质印记证实了 MTA2 在舌癌组织的表达也是上升的,这就进一步确认了 MTA2 与舌癌的发病存在必然联系,也确认了 MTA2

在舌癌这类肿瘤中也是高表达的,提示 MTA2 可能是舌癌的一个分子标记。

今后将进一步研究在舌癌细胞系中,MTA-2 蛋白对瘤细胞生物学行为的影响(包括细胞增殖,细胞凋亡,侵袭转移,形态学变化等),已知有多条信号通路与肿瘤发生相关,目前研究最透彻的就是 TGF- β 信号通路,我们试图探究 MTA2 对 TGF- β 信号通路的影响,并通过染色质免疫共沉淀技术深入研究 MTA-2 在肿瘤组织中的直接靶基因。相信随着研究的深入,对 MTA2 的作用机制进行详细研究后,将会为未来开发出针对 MTA-2 的肿瘤生物靶向治疗药物提供重要的实验和理论依据。

参考文献:

- [1] Liu XF, Bagehi MK. Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by Tamoxifen Complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo[J]. J Biol Chem. 2004, 279(2): 15050-15058.
- [2] Murakami S, Verdonschot RG, Kakimoto N, et al. Preventing Complications from High-Dose Rate Brachytherapy when Treating Mobile Tongue Cancer via the Application of a Modular Lead-Lined Spacer[J]. PLoS One, 2016, 11(4):0154226.
- [3] Biri B, Kiss B, Király R, et al. Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2[J]. Biochem J, 2016, 473(1): 31-42.
- [4] 霍海峰, 范宗宪, 牟嘉砾, 等. MTA-2 蛋白在喉鳞癌中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(9): 1809-1812.
- [5] 翁伟, 徐元宏, 宋晓菲. MTA2 基因敲除抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株增殖和迁移能力[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(3): 373-377.
- [6] Fu J, Qin L, He T, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis[J]. Cell Res, 2011, 21(2): 275-289.
- [7] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. Cell, 117(7): 927-939.
- [8] Casas E, Kim J, Bendesky A, et al. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis [J]. Cancer Research, 2011, 71(1): 245-254.
- [9] 陈磊, 郑树艳, 黄永望. MTA2 对喉癌细胞系 Hep-2 的增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(6): 883-885.
- [10] Covington KR, Fuqua SA. Role of MTA2 in human cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2014, 33(4): 921-928.
- [11] 李秀娟, 李明霞, 赵轶峰, 等. 食管鳞癌组织 MTA2 表达与淋巴管生成关系探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(9): 674-677.

(收稿日期:2017-02-21)