

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221373

· 论著 ·

Tiam1 过表达调控喉癌生长及侵袭转移的 体内外实验研究

王爽¹, 杨新明¹, 魏明辉², 朱伟谕²

(1. 中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410011; 2. 国家癌症中心国家肿瘤临床医学研究中心中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院头颈外科, 广东深圳 518116)

摘要: 目的 前期研究显示 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (Tiam1) 与喉癌临床预后密切相关。为了进一步明确 Tiam1 对喉癌生物学行为的影响, 通过上调 Tiam1 在喉癌细胞中的表达, 观察 Tiam1 上调后对喉癌细胞体内外增殖和侵袭转移能力的影响。方法 通过质粒转染构建 Tiam1 稳定过表达的喉癌 Hep-2 细胞 (Hep-2/Tiam1); 本实验以 pcDNA3 (Mock) 质粒作为转染对照。实验共分 3 组: 空白对照组 (Hep-2), 转染 pcDNA3 (Mock) 的 Hep-2 细胞株 (Hep-2/Mock) 和稳定转染 Tiam1 基因的 Hep-2 细胞株 (Hep-2/Tiam1)。通过 MTT、划痕实验及 Transwell 侵袭实验观察 Tiam1 过表达后对 Hep-2 细胞体外增殖、迁移及侵袭能力的影响。通过构建喉癌裸鼠移植瘤动物模型, 进一步在体内水平观察 Tiam1 对喉癌的增殖及侵袭转移能力的影响。结果 MTT 实验显示 Hep-2/Tiam1 与对照组 Hep-2 及转染空载体的 Hep-2 比较, 各组之间细胞的增殖能力无明显差异 ($P > 0.05$)。划痕实验显示 Hep-2/Tiam1 细胞的迁移距离明显多于另两组 ($P < 0.05$)。Transwell 侵袭实验发现穿过聚碳酸酯膜的 Hep-2/Tiam1 较其他两组明显增多 ($P < 0.05$)。Hep-2 细胞的裸鼠移植瘤动物模型的成瘤率达 100%。实验组 Hep-2/Tiam1 移植瘤的体积及重量与其他两组相比均无明显差异 ($P > 0.05$), 但淋巴结转移率显著增加 ($P < 0.05$)。结论 Tiam1 过表达后对喉癌 Hep-2 细胞体内外增殖能力无明显影响, 但能增强 Hep-2 细胞体内外的侵袭转移能力, 提示其在喉癌的进展中发挥了重要作用。

关键词: 喉癌; T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1; 侵袭; 转移; 体内外
中图分类号: R739.65

Investigation of Tiam1 overexpression on the growth, invasiveness and metastasis of laryngeal carcinoma in vitro and in vivo

WANG Shuang¹, YANG Xinming¹, WEI Minghui², ZHU Weiyu²

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/ Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Shenzhen 518116, China)

Abstract: **Objective** Our previous study has demonstrated that T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 (Tiam1) is correlated with the prognosis of laryngeal carcinoma. Hence, we will upregulate the Tiam1 expression in cell lines of laryngeal carcinoma, and observe the effect of Tiam1 upregulation on the proliferation, migration and invasion of laryngeal carcinoma in vitro and in vivo. **Methods** The Hep-2 cell line of stable high Tiam1 expression (Hep-2/Tiam1) was successfully obtained via plasmid transfection. Plasmid pcDNA3 selected for Mock transfection, blank control group (Hep-2), Hep-2/Mock and Hep-2/Tiam1 were included. The related experiments (MTT assay, scratch assay and Transwell invasion test) were carried out to observe the effects of Tiam1 upregulation on the proliferation, migration and invasion of laryngeal carcinoma cell line Hep-2 in vitro. Then, the metastatic xenograft mouse model of laryngeal carcinoma was constructed. The related experiments were also carried out to observe the effects of Tiam1

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81502662); 深圳市“医疗卫生三名工程”(SZSM201911006)。
第一作者简介: 王爽, 女, 博士, 副主任医师。
通信作者: 朱伟谕, Email: zhuabinbin@163.com

upregulation on the proliferation and invasion of Hep-2 in vivo. **Results** Compared with the group of Hep-2 and cell line with null vector transfection, MTT assay revealed that there were no significant statistical differences in proliferation among 3 groups ($P > 0.05$). However, Tiam1 upregulation led to significantly increased migration ($P < 0.05$) and invasion ($P < 0.05$) of laryngeal carcinoma Hep-2 cells. The tumor formation rate of laryngeal carcinoma metastatic xenograft mouse model was 100%. There were no significant statistical differences among 3 groups on the tumor volume and tumor weight of xenografted tumors (both $P > 0.05$). The cervical lymph nodes metastasis rate in the group of Hep-2/Tiam1 was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Upregulation of Tiam1 has no effect on the proliferation of Hep-2 cells in vitro and in vivo, but can increase the migration and invasion of Hep-2 cells in vitro and in vivo, suggesting that Tiam1 contributes to the laryngeal carcinoma progression.

Keywords: Laryngeal carcinoma; T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1; Invasion; Metastasis; In vitro and in vivo

喉癌是世界上最常见的肿瘤之一,约占所有肿瘤的6%。在全世界范围内,喉癌平均每年新增病例超过500 000例,每年新增死亡人数超过200 000例^[1-2]。尽管喉癌在手术、放疗及化疗等方面的研究有大量的进展,但是喉癌患者的长期预后仍然不理想。肿瘤的局部复发、淋巴结转移和远处转移是影响喉癌患者预后的主要原因^[3-4]。肿瘤的恶性生物学行为需要多种特异性蛋白的激活以及失活,而这些特异性蛋白的表达和功能方面的调节就有可能阻止肿瘤细胞的恶性生物学行为。因此,寻找与肿瘤复发及转移密切相关的蛋白,从而采取有效的干预或预防措施是目前喉癌基础研究中的热点。

T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1, Tiam1)是1994年由Habets等采用前病毒插入致突变的原理,由BW5147小鼠的T淋巴瘤细胞高侵袭变异株中分离鉴定而得到的^[5]。Tiam1在人类多种恶性肿瘤中呈高表达状态,而且与恶性肿瘤细胞的侵袭、转移等特性密切相关^[6-10]。有关Tiam1在头颈肿瘤中的表达,相关研究主要集中于鼻咽癌方面,还有少许在口腔癌及甲状腺癌中的研究,而在喉癌及下咽癌中则报道甚少^[11-13]。我们前期在喉癌组织水平的研究结果已表明Tiam1的表达与喉癌患者的淋巴结转移、临床分期、组织病理学分级以及肿瘤的复发等临床病理特征密切相关^[14-15]。这些结果均提示Tiam1可能在喉癌的发生、发展中发挥了重要的作用。因此,本研究通过构建过表达Tiam1的人喉癌细胞株,观察Tiam1过表达前后细胞生物学行为的改变,从体外细胞及动物体内水平来阐明Tiam1的过表达对喉癌细胞生长,迁移及侵袭能力的影响,为进一步探讨Tiam1在喉癌中的作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、主要试剂及仪器

以pcDNA3为载体的Tiam1/C1199质粒(氨苄抗性)由John Collard(the Netherlands Cancer Institute)惠赠。Tiam1兔抗人多克隆抗体(美国Santa cruz公司), β -actin小鼠抗人单克隆抗体(上海碧云天有限公司),辣根酶标记山羊抗小鼠IgG、辣根酶标记山羊抗兔IgG、兔二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥有限公司),G418(美国Amresco公司),Lipofectamine™2000(美国Invitrogen公司),Transwell小室(美国Corning公司),Matrigel基质胶(美国BD公司),Elx800酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 细胞转染及稳定细胞株的筛选

Hep-2细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)置于37℃、5%CO₂及饱和湿度的条件下,用含有10%的胎牛血清、100 U/mL链霉素和100 U/mL青霉素的完全培养基进行常规培养。Tiam1/C1199质粒经常规的转化、抽提及鉴定。将Hep-2细胞接种于6孔板中,每孔 3×10^5 个细胞,待细胞融合率在50%~70%时,将7 μ g质粒DNA与10 μ L Lipofectamine™2000形成复合物,培养6~8 h后更换完全培养基。继续培养48 h后加入含G418(终浓度为800 μ g/mL)的培养液,持续筛选约2周,可见阳性细胞克隆出现。将细胞克隆接种于96孔板中,扩增培养(G418使用维持浓度400 μ g/mL)获得稳定转染的细胞株。Western blot验证转染后Hep-2细胞中Tiam1蛋白的上调效果。本实验以pcDNA3(Mock)质粒作为转染对照。实验

共分3组:①空白对照组(Hep-2);②转染 pcDNA3 (Mock)的 Hep-2 细胞株(Hep-2/Mock);③稳定转染 *Tiam1* 基因的 Hep-2 细胞株(Hep-2/*Tiam1*)。

1.3 Western blot

收集处于对数生长期的细胞或裸鼠移植瘤组织,加入细胞裂解液行总蛋白提取。然后按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的说明书进行蛋白浓度的测定。取 40 μg 蛋白变性处理后在 8% 的 SDS-PAGE 中进行电泳。蛋白电泳后转膜至 PVDF 膜。加入相应的抗体(*Tiam1* 按 1:100 稀释, β -actin 按 1:1 000 稀释)后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。次日在 PVDF 膜中再加入相应的二抗(山羊抗兔 IgG 按 1:1 000 稀释,山羊抗小鼠 IgG 按 1:5 000 稀释),室温下孵育 2 h。PVDF 膜稍干后滴加 DAB 显色液,PVDF 膜显色后扫描记录。以 β -actin 作为内参照,采用 Quantity One 凝胶成像分析系统对条带进行半定量灰度分析。实验重复 3 次,结果取平均灰度值。

1.4 MTT 实验检测细胞的增殖能力

以每孔 5×10^3 个处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL ,每组细胞设 6 个副孔,同时设空白对照。然后每隔 24 h,连续 3 d 用 MTT 法检测各组细胞的生长情况。到时间点时,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h 后,吸弃孔中培养基后,每孔加入 DMSO 150 μL 。Wellscan MK 2 洗板机上振荡使结晶物充分溶解,以空白对照孔调零,在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光度值(OD 值)。实验重复 3 次,结果取平均值,以相对应的 OD 值表示细胞增殖能力的大小,绘制生长曲线。

1.5 细胞划痕实验

将处于对数生长期的细胞接种于预铺有纤连蛋白的 6 孔板中,每组细胞设 2 个副孔,每孔 5×10^5 个细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养过夜,之后换无血清培养基,继续培养 24 h。待细胞长至约 90% 融合时,用 10 μL 的 Tip 头比着直尺垂直划出 1 条无细胞的细痕,PBS 溶液洗去脱落的细胞,加入无血清培养基继续培养。分别于划痕后 0、48 h 观察细胞划痕处的愈合情况并拍照。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.6 Transwell 小室侵袭实验

取 100 μL 稀释的 Matrigel 胶(3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)置于孔径为 8 μm 的 Transwell 上室的聚碳酸酯膜上,使膜上所有的微孔均被 Matrigel 胶覆盖。在 Transwell 上室加入 2 mL 无血清培养基的细胞悬液(细胞密

度为 5×10^4 个/mL),下室加入 1 mL 含 10% 胎牛血清的完全培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,棉签擦尽上室面的 Matrigel 胶和未穿透膜的细胞,下室用 95% 乙醇固定后,苏木素染色,倒置显微镜下随机取 5 个高倍镜视野观察、计数并拍照。计数小室下室的细胞数即为穿透 Matrigel 胶的细胞数,取平均数作为实验结果,以该细胞数代表肿瘤细胞的侵袭力。实验重复 3 次,每组细胞设 3 个副孔。

1.7 人喉癌裸鼠移植瘤动物模型的建立

4 周龄 SPF 级雄性 BALB/C 裸鼠(约 20 g/只)购自中国科学院上海实验动物中心。调整对数生长期的细胞浓度为 2.0×10^7 个/mL。将各组细胞以 8.0×10^6 个(0.4 mL PBS 细胞悬液)细胞/只接种于每只裸鼠右侧腋下。实验动物分 Hep-2 组 7 只, Hep-2/Mock 组 7 只, Hep-2/*Tiam1* 组 6 只。每隔 3 d 用游标卡尺测量其右侧腋下原位肿瘤的长径(a)与短径(b),按公式 $\pi/6 \times (a \times b^2)$ 计算原位肿瘤的近似体积。接种 25 d 后,断颈处死裸鼠,剥离原位肿瘤、双侧淋巴结及肝肺组织。测得原位肿瘤的重量。组织固定后石蜡包埋行连续组织切片,以明确移植瘤形成及淋巴结、肝肺转移情况。另一部分原位肿瘤用于后续组织蛋白的提取。

1.8 免疫组织化学染色

应用兔二步法免疫组化检测试剂盒进行操作。石蜡切片脱蜡、水化及进行抗原修复后,滴加 3% H_2O_2 溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育,加入兔抗人 *Tiam1* 多克隆抗体(用 PBS 液按 1:50 稀释)后,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜,次日滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,孵育后滴加 DAB 显色溶液,显微镜下控制显色时间,以阳性细胞着色而背景不着色为准,苏木素复染,蒸馏水冲洗,自来水返蓝,1% 盐酸乙醇分化;上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多样本均数的方差检验(ANOVA)进行分析。所有检验均为双侧检验,显著性检验水平 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Tiam1* 基因稳定过表达的喉癌 Hep-2 细胞株的建立

Hep-2 细胞转染 *Tiam1*/C1199 质粒后 G418 持

续筛选约 2 周,可见阳性细胞克隆出现,随机挑取 3 个转染 Tiam1/C1199 质粒的单克隆(分别命名为 T1、T2、T3)和 1 个转染空载体的单克隆(命名为 C/M)扩增培养。Western blot 进行单克隆鉴定,其结果显示 3 个 Tiam1 过表达的转染克隆细胞(T1、T2、T3)的 Tiam1 蛋白表达水平均有不同程度的增高,而与转染空载体的克隆细胞(C/M)及未转染细胞(Hep-2)相比较,差异具有统计学意义($F = 31.298, P < 0.01$);而且 T1 克隆的 Tiam1 蛋白表达量最高(图 1)。因此,可以认为 Tiam1 基因已经稳定转染到 Hep-2 细胞中,并且我们选取 Tiam1 过表达效率最高的 T1 克隆细胞进行后续的体内外功能实验。

2.2 Tiam1 过表达后对 Hep-2 细胞体外增殖能力的影响

为了验证 Tiam1 对 Hep-2 细胞体外增殖能力的影响,采用 MTT 法检测了 Hep-2 细胞的生长情况。以 OD 值为纵坐标,各时间点为横坐标绘制生长曲线(图 2)。通过连续 3d 的比较,发现 Hep-2、Hep-2/Mock 及 Hep-2/Tiam1 3 组细胞之间的增殖能力无

明显统计学差异(P 均 > 0.05)。该结果提示 Tiam1 基因过表达后对 Hep-2 细胞的体外增殖能力无明显影响。

2.3 Tiam1 过表达后对 Hep-2 细胞的体外迁移及侵袭能力的影响

通过划痕实验观察细胞迁移能力的改变,结果发现划痕 48 h 后 Hep-2/Tiam1 组细胞体外划痕后的迁移距离与对照组 Hep-2 和 Hep-2/Mock 组相比明显增加(147.00 ± 26.06 vs $83.33 \pm 23.18, 96.33 \pm 16.01$),差异具有统计学意义($F = 6.916, P < 0.05$),而 Hep-2 与 Hep-2/Mock 组间差异不明显(图 3)。之后进一步采用 Transwell 侵袭实验比较各组细胞侵袭能力的变化,结果发现 24 h 后 Hep-2/Tiam1 组细胞穿过 Transwell 小室聚碳酸酯膜的细胞数较对照组 Hep-2 和 Hep-2/Mock 组明显增多(68.33 ± 6.66 vs $43.00 \pm 8.89, 45.00 \pm 7.55$) ($F = 9.900, P < 0.05$),而 Hep-2 与 Hep-2/Mock 组间差异不明显(图 4)。上述结果证实 Tiam1 基因过表达后能增强 Hep-2 细胞的体外迁移及侵袭能力。

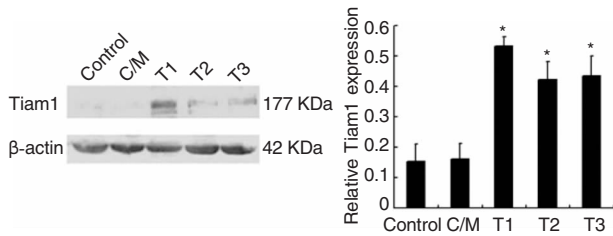


图 1 Western blot 检测 Tiam1 在蛋白水平的上调效果, Tiam1/C1199 质粒转染 Hep-2 细胞株使 Tiam1 基因过表达
注: * $P < 0.001$, T1、T2、T3 vs Control, Control 代表未转染的 Hep-2 细胞; C/M 代表转染空载体的单克隆; T1、T2、T3 代表 3 个转染 Tiam1/C1199 质粒的单克隆。

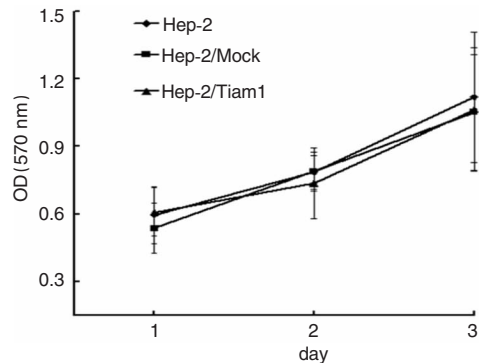


图 2 MTT 法检测 Hep-2、Hep-2/Mock 及 Hep-2/Tiam1 细胞的体外增殖情况,结果显示 Tiam1 过表达后对 Hep-2 细胞的体外增殖能力无明显影响

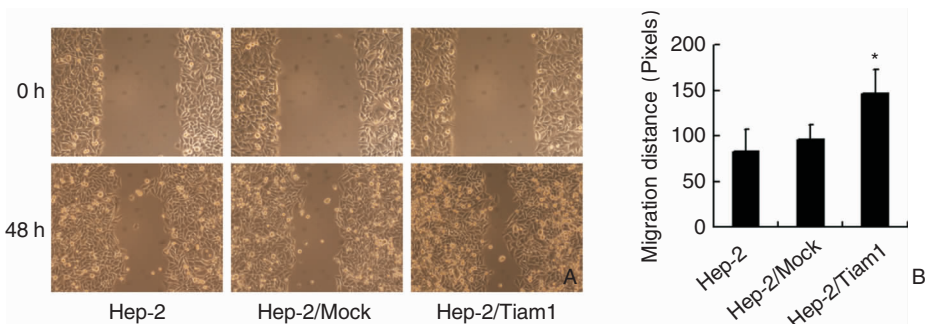


图 3 Tiam1 过表达后对喉癌细胞株 Hep-2 细胞体外迁移能力的影响 A:划痕实验结果显示 Tiam1 过表达后 Hep-2 细胞的体外迁移愈合能力明显增加 ($\times 100$); B:各组细胞体外迁移距离的柱状统计图 注: * $P < 0.05$, Hep-2/Tiam1 vs Hep-2, Hep-2/Mock。

2.4 免疫组织化学及 Western blot 检测移植瘤标本中 Tiam1 的表达水平

所有裸鼠原位肿瘤剥离石蜡包埋切片后,常规 HE 染色均可见细胞核增大,核仁深染,细胞异型性非常明显,符合 Hep-2 细胞移植瘤的特点,这说明我们成功构建了喉癌 Hep-2 细胞株的移植瘤动物模

型。所有裸鼠原位肿瘤行免疫组织化学染色技术发现 Hep-2/Tiam1 细胞移植瘤中 Tiam1 的染色强度明显强于 Hep-2 及 Hep-2/Mock 组。Western blot 检测显示 Hep-2/Tiam1 细胞移植瘤中 Tiam1 的表达水平明显高于 Hep-2 及 Hep-2/Mock 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

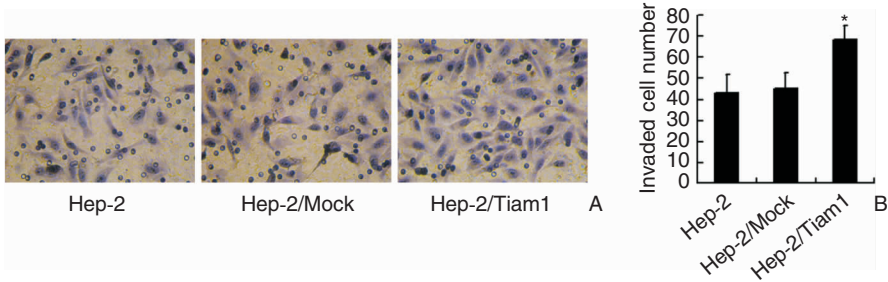


图4 Transwell 侵袭实验结果显示 Tiam1 过表达后对喉癌细胞株 Hep-2 细胞体外侵袭能力的影响 A:Tiam1 过表达后 Hep-2 细胞穿过 Transwell 聚碳酸酯膜的数量明显增加 (苏木素 $\times 200$); B:各组细胞体外侵袭细胞数的柱状统计图 注: * $P < 0.05$, Hep-2/Tiam1 vs Hep-2, Hep-2/Mock。

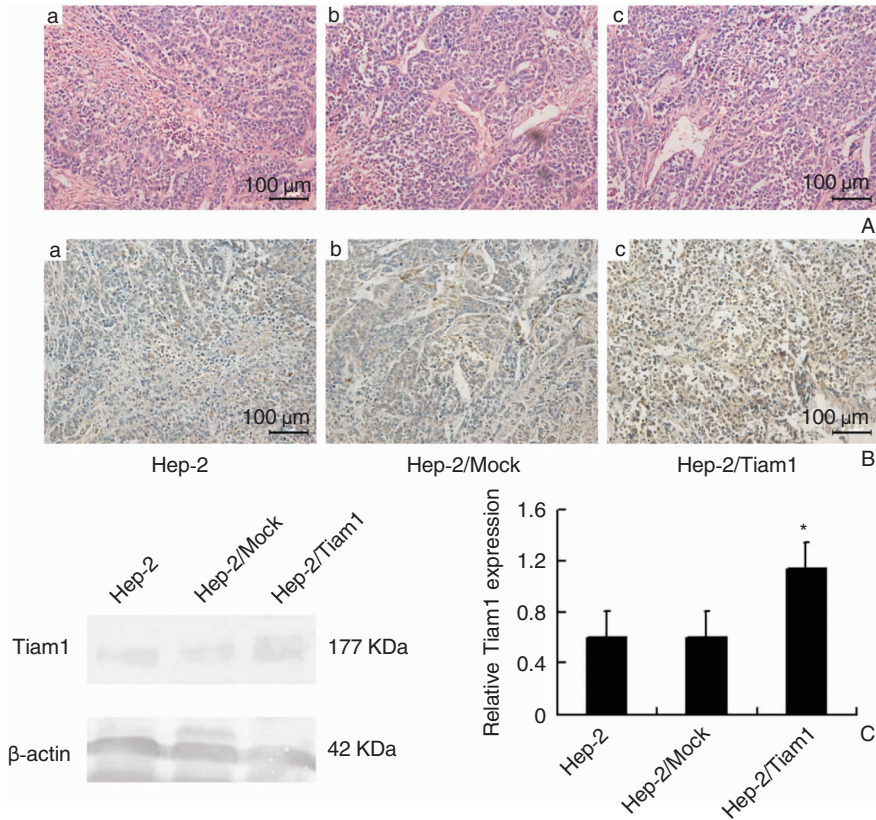


图5 免疫组织化学染色及 Western blot 检测 3 组移植瘤标本中 Tiam1 的表达 A:Hep-2 细胞接种后移植瘤 (HE $\times 200$); B:3 组移植瘤中 Tiam1 的表达情况 (免疫组化 $\times 200$); C:Western blot 检测 3 组移植瘤中 Tiam1 的表达情况 注: * $P < 0.05$, Hep-2/Tiam1 vs Hep-2, Hep-2/Mock。

2.5 *Tiam1* 基因过表达对喉癌细胞体内生长能力的影响

所有接种 Hep-2 细胞的裸鼠在第 25 天处死时, 右侧腋下均可见明显的移植瘤, 成瘤率达 100%。根据所测得的移植瘤长短径, 计算出移植瘤体积, 从而得到 3 组细胞移植瘤体积生长曲线。Hep-2、Hep-2/Mock 及 Hep-2/*Tiam1* 组细胞最终的移植瘤体积分别为 (639.661 ± 319.257、705.647 ± 397.460 及 548.836 ± 325.978) mm³/只, 方差分析结果显示 3 组细胞的最终移植瘤体积并无统计学差异 ($F = 0.324, P > 0.05$)。Hep-2、Hep-2/Mock 及 Hep-2/*Tiam1* 3 组细胞的移植瘤重量分别为 (0.650 ± 0.366、0.775 ± 0.453 及 0.566 ± 0.274) g/只, 方差分析结果亦显示 3 组细胞移植瘤重量无统计学差异 ($F = 0.511, P > 0.05$)。以上结果均提示 *Tiam1* 基因过表达后对喉癌 Hep-2 细胞接种后的移植瘤体内生长无明显影响。见图 6。

2.6 *Tiam1* 基因过表达对喉癌细胞体内淋巴结转移能力的影响

Hep-2 细胞组 7 只裸鼠中共 2 只双侧、2 只单侧 (共计 6 个淋巴结, 转移率为 42.9%) 可见淋巴结微转移灶; Hep-2/Mock 细胞组 7 只裸鼠中共 1 只双侧、3 只单侧 (共计 5 个淋巴结, 转移率为 35.7%) 可见淋

巴结微转移灶; 而 Hep-2/*Tiam1* 细胞组 6 只裸鼠中共 3 只双侧 3 只单侧 (共计 9 个淋巴结, 转移率为 75%) 可见淋巴结微转移灶。Hep-2/*Tiam1* 细胞组与前两组的淋巴结转移率比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 7。同时所有裸鼠肝肺组织中未见转移灶。因此, 这表明 *Tiam1* 基因过表达能够促进喉癌 Hep-2 细胞株在动物体内的淋巴结转移能力。

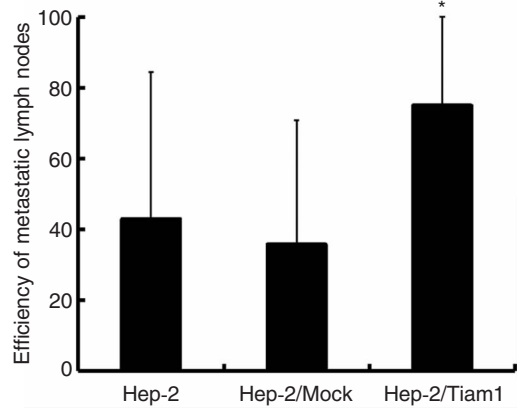


图 7 *Tiam1* 基因过表达后对喉癌 Hep-2 细胞株在裸鼠体内淋巴结转移能力的影响 注: * $P < 0.05$, Hep-2/*Tiam1* vs Hep-2, Hep-2/Mock。

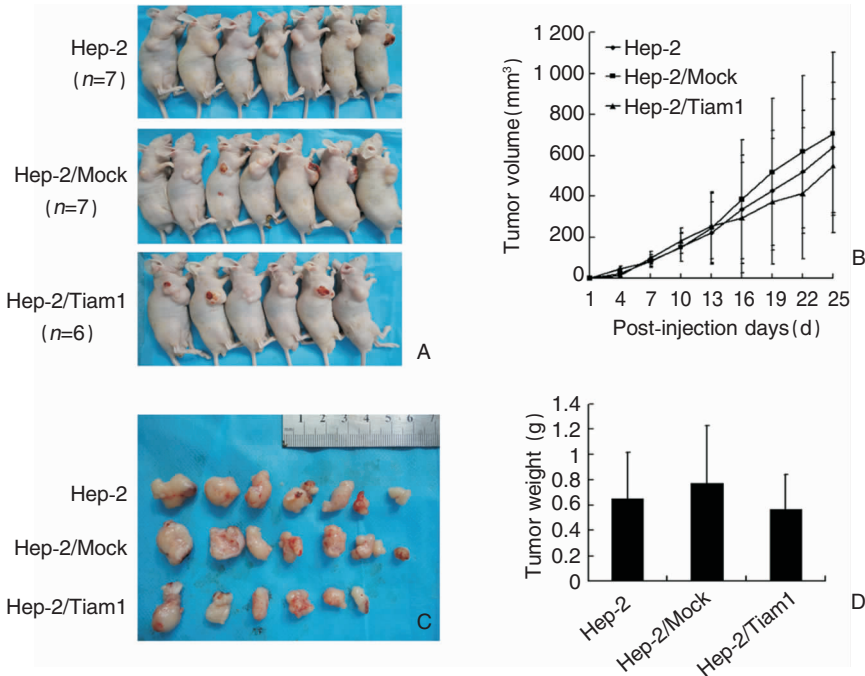


图 6 *Tiam1* 基因过表达后对喉癌 Hep-2 细胞株在裸鼠体内生长的影响 A: Hep-2 细胞接种后第 25 天裸鼠处死时的图片; B: 移植瘤的体积生长曲线; C: 右侧腋下原位移植瘤图片; D: 各组移植瘤重量的比较 注: P 均 > 0.05 。

3 讨论

在我们的研究中,MTT 实验显示 Tiam1 过表达后对 Hep-2 细胞株的体外增殖能力无明显影响 ($P > 0.05$)。而细胞划痕实验及 Transwell 侵袭实验均发现 Tiam1 过表达后,Hep-2 细胞的体外迁移及侵袭能力均显著增加 ($P < 0.05$)。本研究中 3 组细胞的裸鼠移植瘤动物模型均 100% 成瘤,而且 3 组细胞的移植瘤标本中均有肿瘤破溃的情况出现,据此,我们认为喉癌 Hep-2 细胞在裸鼠体内有着很高的致癌性。过表达 Tiam1 的 Hep-2 细胞株在裸鼠体内的成瘤速度及最终质量较两对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$),但颈淋巴结的转移率明显增加 ($P < 0.05$)。因此,我们体外及体内的研究结果均说明 Tiam1 的过表达对喉癌 Hep-2 细胞的生长能力无明显影响,但能够促进其侵袭及转移能力。我们前期组织病理学的研究结果表明 Tiam1 的高表达与喉癌的 T 分期之间无明显统计学关系,但是与喉癌患者的颈淋巴结转移密切相关^[14-15]。因此,我们现今在细胞水平上的研究结果与前期组织学上的研究结果相符。

有关 Tiam1 对其他肿瘤生物学行为的影响,刘莉等^[16]发现 Tiam1 过表达后能够增强结直肠癌细胞的体内增殖能力。Hou 等^[17]发现 Tiam1 基因沉默能够降低肺巨细胞癌的体内侵袭转移能力。还有相关研究发现 Tiam1 对肺腺癌、胆管癌细胞的体内生长及迁移侵袭能力均有影响,而且 Tiam1 的侵袭功能既依赖于 Rho 介导的细胞信号传导通路,也依赖于非 Rho 介导的细胞信号传导通路^[18-19]。Huang 等^[10]通过将肝癌细胞注射入裸鼠侧腹部皮下形成移植瘤,他们发现 Tiam1 的过表达能够促进肿瘤细胞的生长及转移能力,而下调 Tiam1 的表达水平则能够抑制肿瘤细胞的生长及转移能力。还有研究发现下调 Tiam1 的表达能够抑制结直肠癌移植瘤的生长能力,并且会减少肿瘤细胞向肝肺的转移^[20]。由此可见,以上研究均认为 Tiam1 对肿瘤细胞的体内外生长、尤其是侵袭转移能力均有影响。而对于我们的研究中 Tiam1 对喉癌生长方面影响的研究结果与其他大部分的研究结果不符,我们认为可能与细胞的特异性、体内实验的样本量及裸鼠造模的方法差异等因素有关。而有关 Tiam1 对喉癌侵袭转移能力相关的信号通路的进一步阐明将有助于深入探讨喉癌的发病机制。

4 结论

Tiam1 过表达后对喉癌细胞的体内外增殖能力无明显影响,但能增强喉癌细胞的体内外侵袭转移能力。以上结果表明 Tiam1 在喉癌的进展中可能发挥了重要的作用,其有可能成为喉癌治疗中的潜在干预靶点。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1):7-34.
- [3] Obid R, Redlich M, Tomeh C. The treatment of laryngeal cancer [J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2019, 31(1):1-11.
- [4] Meng XY, Liu J, Lv F, et al. Study on the correlation between extracellular matrix protein-1 and the growth, metastasis and angiogenesis of laryngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(6):2313-2316.
- [5] Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, et al. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins [J]. Cell, 1994, 77(4):537-549.
- [6] Shan G, Tang T, Qian H, et al. Expression of Tiam1 and Rac1 proteins in renal cell carcinoma and its clinical-pathological features [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(11):11114-11121.
- [7] Li Z, Liu QX, Piao JJ, et al. Clinicopathological implications of Tiam1 overexpression in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):681.
- [8] Wu QY, Wang Y, Tong JC, et al. Expression and clinical significance of Tiam1 gene in esophageal carcinoma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):21229-21234.
- [9] Li HW, Cui XL, Chen DB, et al. Clinical implication of Tiam1 overexpression in the prognosis of patients with serous ovarian carcinoma [J]. Oncol Lett, 2016, 12(5):3492-3498.
- [10] Huang J, Ye X, Guan J, et al. Tiam1 is associated with hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Int J Cancer, 2013, 132(1):90-100.
- [11] Ding Y, Chen B, Huang J, et al. Overexpression of Tiam1 is associated with malignant phenotypes of nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncol Rep, 2014, 32(2):607-618.
- [12] Song B, Wang LF, Fan XH, et al. Expression of T-lymphoma invasion and metastasis factor on the occurrence of oral squamous cell carcinoma [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2017, 31(2):289-295.
- [13] Liu L, Wu B, Cai HD, et al. Tiam1 promotes thyroid carcinoma metastasis by modulating EMT via Wnt/ β -catenin signaling [J]. Exp Cell Res, 2018, 362(2):532-540.

- [14] Wang S, Li SS, Yang XM, et al. Elevated expression of T-lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2):379-387.
- [15] 朱伟谕,王爽,李仕晟,等. Tiam1 蛋白在喉癌中的表达及其临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(1):47-53.
- [16] 刘莉,许岸高,杨玉芳,等. Tiam1 对结直肠癌细胞生物学特性的影响[J]. *中华病理学杂志*, 2005, 34(10):664-668.
- [17] Hou M, Tan L, Wang X, et al. Antisense Tiam1 down-regulates the invasiveness of 95D cells in vitro[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, 36(8):537-540.
- [18] Zhu G, Yuan Z, Wang Q, et al. The prognostic value of Tiam1 correlates with its roles in epithelial-mesenchymal transition progression and angiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:1741-1752.
- [19] Cheng W, Liu YL, Zuo Z, et al. Biological effects of RNAi targeted inhibiting Tiam1 gene expression on cholangiocarcinoma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12):15511-15526.
- [20] Liu L, Zhang Q, Zhang Y, et al. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(11):917-924.
- (收稿日期:2021-10-08;网络首发:2022-06-30)

本文引用格式:王爽,杨新明,魏明辉,等. Tiam1 过表达调控喉癌生长及侵袭转移的体内外实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(4):73-80. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202221373

Cite this article as: WANG Shuang, YANG Xinming, WEI Minghui, et al. Investigation of Tiam1 overexpression on the growth, invasiveness and metastasis of laryngeal carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022, 28(4):73-80. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007-1520. 202221373