

· 研究报告 ·

MTA1 基因在鼻咽癌中的表达及临床意义

周冬妮¹ 邓燕飞² 曾亮³ 胡骏³ 张其清¹

[关键词] 鼻咽肿瘤; MTA1 基因

[中图分类号] R739.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-1781(2009)04-0178-03

肿瘤侵袭转移是一个多基因、多步骤的复杂过程,其中转移相关基因功能丧失是肿瘤细胞由非转移型发展为转移型的一个重要事件。MTA1 基因作为一个肿瘤转移促进基因已越来越被关注,研究发现 MTA1 基因在乳腺癌、食管癌、胃肠癌、前列腺癌、肝癌、喉癌等多种恶性肿瘤中表达上调并与肿瘤发生发展尤其是侵袭转移密切相关^[1-4]。鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)在我国是一种常见的恶性肿瘤,易早期发生局部淋巴结转移,但目前国内外对 MTA1 基因与 NPC 的相关性研究报道甚少。我们应用原位分子杂交技术检测 MTA1 mRNA 在 NPC 原发灶及转移淋巴结中的表达水平,并对其表达改变与患者临床病理特征之间的关系进行分析,从而了解 MTA1 在判断 NPC 的转移、复发和预后中的意义,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2000-01 - 2002-12 湖南省肿瘤医院有完整资料的病理标本 90 例,其中 NPC60 例、NPC 颈部转移淋巴结 10 例和鼻咽黏膜慢性炎症组织(non-tumor nasopharyngeal tissue, NNP) 20 例。全部患者经病理切片证实,且取病理检查前均未接受放疗和化疗。NPC 患者 60 例中,男 41 例,女 19 例;年龄 32 ~ 75 岁,平均 50.4 岁。分为有颈淋巴结转移组和无颈淋巴结转移组,各 30 例。按 2005 年 WHO 推荐的 NPC 临床分期标准^[5]进行分期,其中 I 期 1 例, II 期 23 例, III 期 30 例, IV 期 6 例。病理确诊后经根治性放疗,生存期 ≥ 5 年者 33 例(55%), < 5 年者 27 例(45%);复发者 20 例(33.3%),未复发者 40 例(66.7%)。所有标本均由病理医师取材阅片,经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚 5 μm,贴附于多聚赖氨酸处理的载玻片上备用。

1.2 探针与试剂

¹ 厦门大学生物医学工程研究中心(福建厦门,361005)² 厦门大学附属中山医院耳鼻咽喉科³ 湖南省肿瘤医院病理科

现在厦门大学附属中山医院病理科(福建厦门,361004)

通信作者:张其清(Email:zhangqiq@xmu.edu.cn)

MTA1 寡核苷酸探针和原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。MTA1 寡核苷酸探针序列为:5'-CGCCCGTGGCACGCTGCGCGGAACCCCTACCTGCC-3';5'-ACGAGCAGCACAACGGGGTGGACGGCAACCTGAA-3';5'-CGGATGAACTGGA TCGACGCCCCGGGTGACGTGTT-3'。

1.3 检测方法

原位杂交实验所用器皿、刀片、玻片、缓冲液、双蒸水均行灭活 RNA 酶处理,玻片均予硅化处理。石蜡切片经常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 室温处理 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次,切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃ 消化 20 min,以暴露 mRNA 核酸片断,原位杂交用 PBS 洗 5 min × 3 次,蒸馏水洗 1 次。经后固定和预杂交,在每张切片上滴加地高辛标记的 MTA1 寡核苷酸探针杂交液 20 μl,42℃ 杂交过夜,2 倍标准柠檬酸盐水(standard saline citrate, SSC)洗涤 5 min × 2 次,0.5 倍 SSC 洗涤 15 min × 1 次和 0.2 倍 SSC 洗涤 15 min × 2 次,滴加封闭液 37℃ 30 min 后甩去多余液体,不洗。滴加生物素化鼠抗地高辛 37℃ 60 min 后原位杂交用 PBS 洗 5 min × 4 次;滴加 SABC 37℃ 20 min 后原位杂交用 PBS 洗 5 min × 3 次,滴加生物素化过氧化物酶 37℃ 20 min 后原位杂交用 PBS 洗涤 5 min × 4 次, DAB 显色 20 min,充分水洗,苏木精复染,充分水洗,乙醇脱水,二甲苯透明,封片。不加探针为空白对照,以排除非特异性染色。

1.4 结果判断

由两位有经验的病理医生采用双盲法对原位杂交结果进行评定。MTA1 mRNA 在石蜡切片中阳性染色主要位于细胞质中,呈棕黄色。根据肿瘤细胞染色反应的深度及阳性细胞的数量分别记为 0 ~ 3 分,其中染色深度以多数细胞的呈色反应为标准,不着色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分。无细胞染色为 0 分,阳性细胞数 < 50% 为 1 分,50% ~ 80% 为 2 分, > 80% 为 3 分,并根据这两项指标的积数分 4 级,即阴性(-) 为 0 分,弱阳性(+) 为 2 分,阳性(+++) 为 3 ~ 4

分, 强阳性(+ + +)为 5 ~ 6 分。

1.5 统计学分析

应用 SPSS15.0 统计学软件进行 χ^2 检验和 Fisher 确切概率计算, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTA1 mRNA 在各组织中的表达

MTA1 在 NNP、NPC 原发灶和 NPC 转移淋巴结 3 种组织中有不同程度的阳性表达(图 1 ~ 3), 其总阳性表达率分别为 30.0% (6/20)、71.7% (43/60) 和 80.0% (8/10), 其中 NPC 有颈淋巴结转移组与无颈淋巴结转移组的阳性率分别为 83.3% (25/30) 和 60.0% (18/30)。NPC 原发灶和 NPC 转移淋巴结中 MTA1 mRNA 表达水平较 NNP 明显上调, 其差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.2 MTA1 表达与 NPC 临床病理参数的关系

MTA1 表达与 NPC 临床病理参数的关系见表 1。NPC 原发灶中 MTA1 mRNA 阳性表达率与患者性别、年龄之间的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。T₃ ~ T₄ 分期 NPC 阳性表达率(71.9%) 高于 T₁ ~ T₂ 分期(71.4%); 临床 I ~ II 期阳性表达率(72.2%) 高于临床 III ~ IV 期(70.8%), 但其差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。有颈淋巴结转移者阳性率(83.3%) 高于无颈淋巴结转移者(60.0%); 复发者阳性率(90.0%) 高于无复发者(62.5%); NPC 治疗后生存期 ≥ 5 年者的 MTA1 mRNA 阳性表达率(60.6%) 低于生存期 < 5 年者(85.2%), 其表达差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

MTA1 基因位于人染色体 14q32.3 区, 已有研究表明, 它与肿瘤发生、发展及转移过程密切相关, 尤其是在上皮源性肿瘤中。MTA1 在肿瘤侵袭转移过程中的确切机制尚不明确, 可能通过对细胞转录水平的调控和参与信号转导来调节与肿瘤转移相关蛋白的水平, 从而参与肿瘤侵袭转移的许多过程^[6]。有转移潜能的肿瘤细胞或已发生转移的肿

瘤组织内 MTA1 表达上调, 其表达上调与肿瘤的侵袭转移及预后相关。在胃肠癌和食管癌中, MTA1 的过表达与癌浸润的深度、淋巴转移和血管侵犯等恶性表型显著相关, 并与预后相关^[1]。有作者将反义 MTA1 寡核苷酸导入至 MTA1 表达阳性的乳腺癌细胞, 可以抑制其生长和侵袭性^[6]。上述结果表明 MTA1 是一个重要的肿瘤转移促进基因, 可能成为肿瘤治疗的一个新的分子靶点。

目前对 MTA1 基因与 NPC 的关系研究很少, 有作者运用 RT-PCR 方法检测了 NPC 组织和正常鼻咽部组织中 MTA1 mRNA 的表达, 发现 MTA1 基因在 NPC 中高表达并与 NPC 的浸润转移密切相关^[7], 但邱前辉等^[8]则认为 MTA1 基因

表 1 MTA1 的表达与 NPC 临床病理参数的关系例 (%)

临床病理参数	例数	MTA1 mRNA	
		阳性	阴性
性别			
男	41	32(78.0)	9(22.0)
女	19	11(57.9)	8(42.1)
年龄/岁			
<50	26	21(80.8)	5(19.2)
50	34	22(64.7)	12(35.3)
T 分期			
T ₁ ~ T ₂	28	20(71.4)	8(28.6)
T ₃ ~ T ₄	32	23(71.9)	9(28.1)
淋巴结转移			
有	30	25(83.3)	5(16.7)
无	30	18(60.0)	12(40.0)
临床分期			
I ~ II	24	17(70.8)	7(29.2)
III ~ IV	36	26(72.2)	10(27.8)
复发			
是	20	18(90.0)	2(10.0)
否	40	25(62.5)	15(37.5)
生存期/年			
≥ 5	33	20(60.6)	13(39.4)
<5	27	23(85.2)	4(14.8)

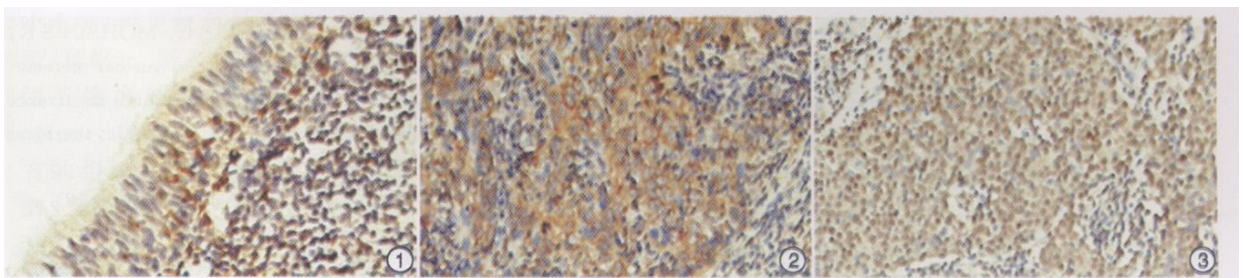


图 1 MTA1 mRNA 在 NNP 中的阳性表达 $\times 400$; 图 2 MTA1 mRNA 在 NPC 原发灶中的阳性表达 $\times 400$; 图 3 MTA1 mRNA 在 NPC 转移淋巴结中的阳性表达 $\times 400$

表达在 NPC 的侵袭中未起作用,也不是诱发 NPC 转移的原因,可能在 NPC 转移的后期起了一定的协同作用。为了进一步评估 MTA1 基因与 NPC 的关系,我们采用原位杂交方法检测了 NNP、NPC 原发灶和 NPC 转移淋巴结中 MTA1 mRNA 的表达情况,结果表明 MTA1 mRNA 在 NPC 原发灶和转移淋巴结中均过度表达,提示 NPC 作为肿瘤转移促进基因可能在 NPC 侵袭转移过程中起重要作用。

本研究对 MTA1 mRNA 表达与 NPC 患者临床病理参数的关系进行了分析,发现 MTA1 mRNA 表达与患者性别、年龄、T 分期和临床分期之间的差异无统计学意义,但 NPC 早期 ($T_1 \sim T_2$ 分期和临床 I ~ II 期) 与进展期 ($T_3 \sim T_4$ 分期和临床 III ~ IV 期) 患者中 MTA1 mRNA 的阳性表达率均较高,提示 MTA1 可能参与 NPC 侵袭转移的全过程,是 NPC 病程进展的早期事件和普遍事件。目前已有研究发现 MTA1 不仅与癌转移有关,与癌的发生、发展也有一定关系^[9]。Hofer 等^[2]运用免疫组织化学技术检测前列腺标本中 MTA1 蛋白的表达水平,结果发现,MTA1 蛋白的平均表达强度和阳性表达率在良性组织、局限性前列腺癌和转移性前列腺癌标本中呈逐步上升趋势,说明 MTA1 基因的表达与前列腺癌的演进有关。Qian 等^[10]通过研究发现 MTA1 蛋白的过表达与食管癌的发生发展有关,且发现 MTA1 能促进癌细胞的侵袭、黏附和运动,并利用 MTA1 RNA 干扰技术可降低癌细胞的恶性表型。文献报道 MTA1 基因的表达上调与肿瘤淋巴结转移显著相关^[4],本研究亦证实了 MTA1 的过表达与 NPC 颈淋巴结转移相关,提示 MTA1 在 NPC 颈淋巴结转移过程中扮演重要角色。本研究还发现 MTA1 过表达与 NPC 复发及生存期有关,复发者和生存期低于 5 年者 MTA1 表达阳性率高,提示 MTA1 可作为评估 NPC 复发及预后的分子标志。Martin 等^[11]通过对乳腺癌的研究发现 MTA1 过表达可增加其早期复发的可能性。Hamatsu 等^[3]运用 RT-PCR 技术检测了 33 例行根治性切除的肝细胞癌患者手术标本中 MTA1 的表达情况,发现 MTA1 高表达组的无瘤生存率明显低于低表达组,提示 MTA1 的表达水平可作为肝癌患者的预后指标之一。

MTA1 基因在多种肿瘤中所起的侵袭转移促进作用引起了国内外学者的广泛关注,认为其可能成为上皮源性恶性肿瘤新的基因治疗靶点。本研究亦证实 MTA1 基因与 NPC 的转移、复发及预后密切相关,它在 NPC 的进展中可能起重要作用,可

以作为预测 NPC 颈淋巴转移和判断 NPC 复发及预后的参考指标。

参考文献

- [1] TOH Y, OHGA T, ENDO K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110:362 - 367.
- [2] HOFER M D, KUEFER R, VARAMBALL Y S, et al. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 825 - 829.
- [3] HAMATSU T, RIKIMARU T, YAMASHITA Y, et al. The role of MTA1 gene expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10: 599 - 604.
- [4] 唐桥斐,季文樾,潘子民,等. 转移相关基因表达与喉鳞状细胞癌淋巴结转移的关系[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2003, 38(3): 213 - 216.
- [5] BARNES L, EVESON J, REICHART P, et al. WHO classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours [M]. Lyon: IARC Press, 2005: 81 - 106.
- [6] NICOLSON GL, NAWA A, TOH Y, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20: 19 - 24.
- [7] 王会河,黄光武,莫立根,等. MTA1 表达与鼻咽癌浸润转移的关系[J]. *广西医科大学学报*, 2006, 23(4): 546 - 548.
- [8] 邱前辉,刘鹏,陈少华,等. MTA1 基因在鼻咽癌中的表达与肿瘤转移和 EB 病毒感染的关系[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 25(3S): 105 - 107.
- [9] BAGHERF YARMAND R, TALUKDER A H, WANGRA, et al. Metastasis-associated protein 1 deregulation causes inappropriate mammary gland development and tumorigenesis[J]. *Development*, 2004, 131: 3469 - 3479.
- [10] QIAN H, LU N, XUEL, et al. Reduced MTA1 expression by RNAi inhibits in vitro invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma cell line [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22: 653 - 662.
- [11] MARTIN M D, HILSENBECK S G, MOHSIN S K, et al. Breast tumors that overexpress nuclear metastasis-associated 1 (MTA1) protein have high recurrence risks but enhanced responses to systemic therapies [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 95: 7 - 12.

(收稿日期: 2008-03-12)