

· 论 著 ·

## MTA1 基因表达在口腔鳞癌发生、发展中作用的研究\*

王永霞,裴 华,刘 珊,桑圣刚<sup>△</sup>

(海南医学院,海南海口 571101)

**摘要:**目的 探讨口腔鳞癌组织中肿瘤转移相关基因 1(MTA1)在蛋白和 mRNA 的表达水平,揭示其与口腔鳞癌(OSCC)发生、发展的关系。方法 采用免疫组织化学法和原位杂交技术检测 46 例 OSCC 标本、15 例口腔黏膜白斑与 20 例正常口腔黏膜标本中 MTA1 基因的表达水平,并分析其与 OSCC 临床病理学参数的关系。结果 MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 在 OSCC 组织中的表达水平显著高于口腔黏膜白斑和正常口腔黏膜( $P < 0.05$ ),口腔黏膜白斑中 MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 表达水平显著高于口腔正常黏膜( $P < 0.01$ ),MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 表达与肿瘤浸润深度和淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ )。结论 MTA1 基因在蛋白和 mRNA 的表达水平在 OSCC 发生、发展及浸润转移过程中起一定促进作用,有望成为判断 OSCC 预后及选择治疗方案的一个新肿瘤标志物。

**关键词:**MTA1;癌,鳞状细胞;免疫组织化学;原位杂交

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2905-02

## The expression and function of MTA1 gene in the occurrence and evolvement of oral squamous carcinoma\*

Wang Yongxia, Pei Hua, Liu San, Sang Senggang<sup>△</sup>

(Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China)

**Abstract:** Objective To investigate the expression and function of metastasis-associated gene 1(MTA1) in tumor genesis and progression of oral squamous-cell carcinoma(OSCC). **Methods** The expression of MTA1 was detected in 46 tissue specimens with OSCC, 15 tissue specimens with leukoplakia and 10 controls by conventional and immunohistochemistry and in situ hybridization. **Results** Positive expression ratios of MTA1 and MTA1 mRNA in leukoplakia were significantly higher than controls( $P < 0.01$ ), while were significantly lower than in OSCC( $P < 0.05$ ). The expression of MTA1 in OSCC showed higher in muscle-invading and in lymph nodes metastasis cells than those of mucous-invading and submucous-invading cells and non-lymph nodes metastasis cells( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The over expression of MTA1 gene might play an important role in the pathogenesis and development of OSCC, and it might be a target for the therapy and prognostic indicator of OSCC.

**Key words:** MTA1; carcinoma, squamous cell; immuno histochemistry; in situ hybridization

肿瘤转移相关基因 1 (metastasis-associated gene 1, MTA1)是近年来新发现的一个与多种肿瘤浸润转移密切相关的基因,其基因产物与肿瘤细胞侵袭和生长过程中的信号转导密切相关<sup>[1]</sup>。已有研究表明,其编码的 MTA1 蛋白在肺癌、喉癌、卵巢癌<sup>[2-4]</sup>等多种恶性肿瘤中高表达,并与癌细胞浸润深度、淋巴结转移、病理分级及预后密切相关,说明 MTA1 基因表达上调与多种癌细胞的浸润、转移能力有关。口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)作为头面部常见的恶性肿瘤,MTA1 基因表达异常与口腔鳞癌的关系尚未见报道。本研究采用免疫组织化学方法和原位杂交技术从蛋白和 mRNA 水平对 OSCC 中 MTA1 基因的表达进行研究,探讨其在 OSCC 发生、发展中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 标本** 46 例 OSCC 组织标本来自 2006~2011 年海南医学院附属医院口腔颌面外科手术切除的标本,术后均经病理诊断证实为高、中、低分化 OSCC。其中男 29 例,女 17 例;年龄 30~74 岁,平均 49 岁,所有病例术前未接受放疗、化疗;另取 15 例口腔黏膜白斑和 20 例外伤或门诊拔牙患者的正常口腔黏膜作为正常对照。所有标本均经 4%多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚连续切片。

**1.2 主要试剂** 羊抗人 MTA1 多克隆抗体(浓缩液)购自

Santa Cruz Biotechnology 公司;S-P 免疫组化试剂盒、MTA1 原位杂交试剂盒、DAB 显色系统购自武汉博士德生物工程有限公司,其他试剂均为分析纯。

## 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学染色** 采用免疫组织化学 S-P 染色法,石蜡切片常规脱蜡,梯度乙醇至水,以柠檬酸盐缓冲液高温高压修复抗原,自然冷却至室温,继以 S-P 法检测,3,3'-四盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片,操作步骤按 S-P 试剂盒说明书进行。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,已知的阳性 OSCC 标本做阳性对照。

**1.3.2 组织标本原位杂交** 常规石蜡切片,脱蜡至水,胃蛋白酶消化。预杂交后滴加地高辛标记的 MTA1 寡核苷酸探针杂交液 37℃杂交过夜,柠檬酸钠缓冲液(SSC)冲洗后滴加封闭液。滴加生物素化鼠抗地高辛-链霉素亲和素-生物素-酶免疫组化(SABC)、生物素化过氧化物酶,最后 DAB 显色,苏木素复染、乙醇脱水、二甲苯透明,封片。

## 1.4 结果判断

**1.4.1 免疫组化结果判断** MTA1 蛋白阳性染色主要定位于细胞核,少数定位于细胞质,呈棕黄色颗粒。采用双盲法统计结果,随机选取 5 个高倍视野(×400)计数,统计阳性细胞百分比,根据阳性细胞百分比判断结果:阳性细胞小于 10%为

\* 基金项目:海南省教育厅科研基金资助项目(hjkj 2010-31)。

△ 通讯作者, Tel:15389267389; E-mail: Lytssg@126.com。

阴性;10%~30%记为弱阳性;大于 30%为阳性。

**1.4.2 原位杂交结果判断** MTA1 mRNA 阳性染色主要定位在细胞质中,呈棕黄色。原位杂交结果计算方法为:阳性细胞小于或等于 20%、小于或等于 40%、小于或等于 70%、大于 70%分别记为 1、2、3、4 分;根据杂交信号强弱分为弱、中、强 3 个等级,分别记为 1、2、3 分。上述两项计分相加,小于或等于 2 分者为阴性(-),3~4 分者为弱阳性(+);4~7 分者为阳性(++)。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计学软件进行  $\chi^2$  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 蛋白和 MTA1 mRNA 在口腔组织中的表达** MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 在 OSCC 和口腔黏膜白斑中均有不同程度的阳性表达(封 2 图 1~4)。MTA1 蛋白在 OSCC 中的阳性表达率为 76.09%,在口腔黏膜白斑中的阳性表达率为 40%,正常口腔黏膜无表达;MTA1 mRNA 在 OSCC、口腔黏膜白斑和正常口腔黏膜中的阳性表达率分别为 80.3%,46.67%和无表达。由此可见,MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 在 OSCC 中高表达,与口腔黏膜白斑和正常口腔黏膜比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );口腔黏膜白斑与正常口腔黏膜比较,MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 表达率明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),结果见表 1。

**2.2 OSCC 组织中 MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 表达与临床病理学参数的关系** MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 在肿瘤浸润至肌层和有淋巴结转移时阳性表达率明显升高,与肿瘤局限于黏膜及黏膜下层和无淋巴结转移者比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),中、低分化组和高分化组相比、临床分期 I~II 期和 III~IV 期相比,MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 阳性表达率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表 2。

表 1 MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 在口腔组织中的表达[n(%)]

组织类型	n	MTA1 蛋白阳性表达	MTA1 mRNA 阳性表达
OSCC 组织	46	35(76.09)	37(80.43)
口腔黏膜白斑	15	6(40.00)	7(46.67)
正常口腔黏膜	20	0(0.00)	0(0.00)

表 2 OSCC 组织中 MTA1 蛋白和 MTA1 mRNA 表达与临床病理学参数的关系

组织类型	n	MTA1 蛋白阳性表达		MTA1 mRNA 阳性表达	
		n(%)	P	n(%)	P
浸润深度					
黏膜及黏膜下层	21	12(57.14)	<0.05	13(61.90)	<0.05
肌层	25	23(92.00)		24(96.00)	
病理分级					
中、低分化	17	13(76.47)	>0.05	14(82.35)	>0.05
高分化	29	22(75.86)		23(79.31)	
临床分期					
I~II 期	28	22(78.57)	>0.05	24(85.71)	>0.05
III~IV 期	18	13(72.22)		13(72.22)	
淋巴结转移					
有	30	27(90.00)	<0.05	28(93.33)	>0.05
无	16	9(56.25)		10(62.50)	

## 3 讨 论

OSCC 是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,已证实其发生、发展与多个基因的异常表达有关。MTA1 基因是 Toh 等<sup>[5]</sup>于 1994 年应用差异 cDNA 文库筛选法从 13762NF 大鼠乳腺癌转移细胞系中首先克隆出来的一个与肿瘤浸润转移密切相关的基因。目前,认为 MTA1 蛋白可能为参与调控细胞信号转导通路及细胞骨架成分蛋白<sup>[6-7]</sup>,能直接或间接下调某些抑制肿瘤浸润转移相关基因的转录而促进肿瘤细胞浸润与转移,成为肿瘤发生、发展过程中起重要作用的蛋白分子<sup>[8]</sup>。黄永平和孟翔<sup>[9]</sup>研究发现,胃癌组织中 MTA1 基因高表达,且与肿瘤浸润深度和淋巴结转移密切相关;杨晶和张中明<sup>[10]</sup>发现 MTA1 蛋白在 II 期食管癌组织中高表达与术后肿瘤纵膈淋巴结转移复发有关。李中文和赵海泉<sup>[11]</sup>研究发现 MTA1 基因在肝癌组织中表达量明显增高,且转移性肝癌中 MTA1 基因的表达显著高于非转移性肝癌。本研究采用免疫组织化学法和原位杂交技术检测了 46 例 OSCC 组织、15 例口腔黏膜白斑和 20 例正常口腔黏膜标本中 MTA1 在蛋白和 mRNA 表达水平的情况,发现 MTA1 基因在蛋白和 mRNA 水平的表达是一致的,且 MTA1 蛋白和 mRNA 在 OSCC 中阳性表达率明显升高,与口腔黏膜白斑和正常口腔黏膜比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),口腔黏膜白斑中 MTA1 蛋白和 mRNA 阳性表达率明显高于正常口腔黏膜,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。通过对 46 例 OSCC 组织临床病理学参数与 MTA1 表达的相关性研究发现,MTA1 基因阳性表达与癌组织浸润深度、淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ),说明 MTA1 的表达参与了 OSCC 的发生、发展、浸润转移,此结论不仅为进一步阐明 OSCC 发生、发展的分子机制提供了依据,还对判断肿瘤的生物行为学和预后具有重要参考意义,为临床医生选择最佳治疗方案提供参考依据。但 MTA1 基因表达异常与 OSCC 发生、发展的机制尚未完全阐明。现有的研究显示,MTA1 蛋白可能与组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)结合形成核小体重塑与脱乙酰基复合体(nucleosomere modeling and histone deacetylase, NuRD)<sup>[12]</sup>,进而促进核小体重构与组蛋白脱乙酰活性而抑制抑癌基因的转录<sup>[13]</sup>;另一方面,MTA1 蛋白还可导致细胞角蛋白微丝系统装配不良,降低细胞骨架的稳定性从而促进肿瘤的发生、浸润和转移<sup>[14]</sup>。因此,在分子水平上研究如何抑制 MTA1 基因表达或抑制其表达产物的活性有望成为防治肿瘤的新方法。

本研究发现,MTA1 蛋白表达与肿瘤的病理分级和临床分期无显著相关关系( $P > 0.05$ ),这与前期的研究不符<sup>[15]</sup>,可能是由于实验本身的误差或此次标本量较少导致的,还需增加标本量进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Toh Y, Oki E, Oda S, et al. Overexpression of the MTA1 gene on gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis[J]. Int J Cancer, 1997, 74(4): 459-463.
- [2] Sasaki H, Mo Riyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1, mRNA in advanced lung cancer[J]. Lung Cancer, 2002, 35(2): 149-154.
- [3] Tang QF, Ji WY, Pan ZM, et al. Expression of the metastasis-associated gene1 in laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with cervical lymphnode(下转第 2910 页)

出、细胞浸润、间质细胞增生等为主并随病程存在明显病理学不可逆改变。病原体超微结构观察显示, Pc 在肺泡腔内多见, 滋养体附着在肺泡 I 型上皮细胞, 滋养体形态多样, 表面有管状突起和伪足样结构, 内含管状体、吞饮小泡以及线粒体、内质网、细胞核等细胞器; 包囊表面有皱褶但未见管状突起, 囊内有数个囊内小体, 具有滋养体样特征; 这些超微结构与文献报道相似<sup>[12-13]</sup>。与文献报道不同的是, 本研究还注意到在肺泡腔内的 Pc 滋养体内, 外有大量高密度特殊颗粒, 这种颗粒与 PCP 感染的严重程度正相关, 感染越严重的鼠肺类似高密度特殊颗粒越多。因此, 对于高密度特殊颗粒的成分及其在 Pc 生长发育过程中的作用需待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 冯燕梅, 江涛. 卡氏肺孢子虫肺炎治疗的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(3): 329-333.
- [2] Cushion MT, Linke MJ, Ashbaugh A, et al. Echinocandin treatment of *Pneumocystis pneumonia* in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection[J]. *Plos One*, 2010, 5(1): 24-26.
- [3] Cushion MT, Collins MS, Linke MJ. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(2): 197-206.
- [4] Kutty G, Hernandez-Novoa B, Czapiga M, et al. *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 258-267.
- [5] Kelly MN, Shellito JE. Current understanding of *Pneumo-*

*cystis immunology*[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(1): 43-65.

- [6] 任一鑫, 郑莉莉, 秦元华, 等. 卡氏肺孢子虫感染与宿主免疫应答反应的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(4): 390-392.
- [7] 谷俊朝, 刘建, 俞巍. 卡氏肺孢子虫肺炎动物模型建立的现状[J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(5): 714-717.
- [8] Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power[J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(5): 708-726.
- [9] Cho JY, Kim DM, Kwon YE, et al. Newly formed cystic lesions for the development of pneumomediastinum in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2009, 9(2): 171-173.
- [10] 郑玉强, 叶彬, 武卫华, 等. 肺孢子虫体外无细胞培养的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(4): 569-571.
- [11] 黄敏君, 安亦军, 李淑珍, 等. 从大鼠肺灌洗液中分离纯化培养卡氏肺孢子虫[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 129-132.
- [12] 姜云霞, 宫玉香, 张忠广, 等. 卡氏肺孢子虫扫描电镜观察[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 292-294.
- [13] 刘成伟, 陈雅堂, 李文桂, 等. 双氢青蒿素治疗实验大鼠卡氏肺孢子虫肺炎的透射电镜观察[J]. 重庆医学, 2003, 32(6): 701-703.

(收稿日期: 2012-02-14 修回日期: 2012-04-22)

(上接第 2906 页)

- metastasis[J]. *Zhong hua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2003, 38(3): 213-216.
- [4] Yi S, Guangqi H, Guoli H. The association of the expression of MTA1, nm23H1, with the invasion, metastasis of ovarian carcinoma[J]. *Chin Med Sci J*, 2003, 18(2): 87-92.
- [5] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis associated gene, *mta1*, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37): 22958-22963.
- [6] Cui Q, Takiguchi S, Metsusue K, et al. Assignment of the human metastasis-associated gene 1 (MTA1) to human chromosome band 14q32. 3 by fluorescence in situ hybridization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 93(2): 139-140.
- [7] 杜媛媛. *mta1*/MTA1 在乳腺癌转移过程中的作用及可能机制[J]. 国外医学生理、病理学科与临床分册, 2005, 25(3): 260-263.
- [8] Kumar R, Wang RA, Bagheri YR. Emerging roles of MTA1 family members in human cancers[J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(5): 30-37.
- [9] 黄永平, 孟翔凌. MTA1 与 KISS-1 在胃癌中的表达及临

床病理意义[J]. 皖南医学院学报, 2010, 29(4): 259-262.

- [10] 杨晶, 张中明. MTA1 蛋白在 II a 期食管癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(1): 91-92.
- [11] 李中文, 赵海泉. MTA1 在不同肝癌细胞和组织中的表达及其调控初步研究[J]. 药物生物技术, 2011, 18(2): 106-110.
- [12] Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology[J]. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5(10): 1621-1623.
- [13] Mahoney MG, Simpson A, Jost M, et al. Metastasis-associated protein (MTA1) 1 enhances migration, invasion and anchorage-independent survival of immortalized human keratinocytes[J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2161-2163.
- [14] Hofer MD, Menke A, Genze F, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(2): 455-457.
- [15] 王永霞, 陈桂林, 李伟宏. MTA1 蛋白表达与口腔鳞癌临床病理特征的关系[J]. 海南医学院学报, 2010, 16(9): 1149-1152.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-04-22)