

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170809.041

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170809.1154.082.html>

喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量与血清肿瘤标志物含量、细胞增殖活力的相关性

彭 炜, 周 明

(湖北省仙桃市第一人民医院耳鼻喉科, 湖北 仙桃 433000)

[摘要] **目的:**探讨喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量与血清肿瘤标志物含量、细胞增殖活力的相关性。**方法:**收集在本院确诊的原发性喉癌患者 48 例作为观察组,同期在本院进行喉镜检查的声带息肉患者 50 例作为对照组。采用荧光定量 PCR 法检测两组病灶组织中 Six1、MTDH、TKTL1 的表达量,癌基因及抑癌基因的表达量,检测血清中肿瘤标志物的含量。采用 Pearson 检测评估喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量与血清肿瘤标志物含量、细胞增殖活力的相关性。**结果:**观察组患者病灶组织中 Six1、MTDH、TKTL1、c-myc、STAT3、ras mRNA 的表达量以及血清中肿瘤标志物 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量均高于对照组患者病灶组织,LKB1、CDKN2、PTEN mRNA 的表达量低于对照组病灶组织;喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量与血清 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量及 c-myc、STAT3、ras 的 mRNA 表达量呈正相关,与 LKB1、CDKN2、PTEN 的 mRNA 表达量呈负相关。**结论:**喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量增高,且其具体表达量与肿瘤恶性程度直接相关。

[关键词] 喉癌;Six1;MTDH;TKTL1;肿瘤标志物;细胞增殖

[中图分类号] R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-1949-04

Correlation of Six1, MTDH and TKTL1 expression in laryngeal cancer tissue with serum tumor marker levels and cell proliferation activity

PENG Wei, ZHOU Ming

(E.N.T. Department, Xiantao First People's Hospital in Hubei Province, Xiantao City, Hubei Province, 433000)

[Foundation Project]: It is supported by the Project of Xiantao Science and Technology Bureau for Scientific Research and Development Planning in 2013 (2013-1).

[Author]: PENG Wei (1981-), Male, M.B., Attending Physician, Tel: 13997990585, E-mail: pwyjj2016@163.com.

Received: 2017-07-10 Revised: 2017-07-18

JHMC, 2017; 23(14): 1949-1952

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] Objective: To study the correlation of Six1, MTDH and TKTL1 expression in laryngeal cancer tissue with serum tumor marker levels and cell proliferation activity. **Methods:** A total of 48 patients who were diagnosed with primary laryngeal cancer in our hospital between June 2013 and December 2016 were collected as observation group, and 50 patients with vocal cord polyp who received laryngoscopy in our hospital during the same period were selected as control group. Fluorescence quantitative PCR was used to determine the expression of Six1, MTDH and TKTL1 as well as and the expression of oncogenes and tumor suppressor genes in lesion tissue of two groups of patients, and the contents of tumor markers in serum were detected.

[基金项目] 仙桃市科学技术局 2013 年指导性科技研究与开发计划项目(2013-1)

[作者简介] 彭炜(1981-),男,湖北仙桃人,本科,主治医师,电话:13997990585,E-mail:pwyjj2016@163.com.

[收稿日期] 2017-07-10 **[修回日期]** 2017-07-18 **网络出版时间:** 2017-08-09 11:54:14

ted, Pearson test was used to evaluate the correlation of Six1, MTDH and TKTL1 expression in laryngeal cancer tissue with serum tumor marker levels and cell proliferation activity. **Results:** Six1, MTDH, TKTL1, c-myc, STAT3 and ras mRNA expression in lesion tissue as well as tumor markers CA72-4, CA19-9, CYFRA21-1, SCC-Ag and TK1 levels in serum of observation group were higher than those of control group while LKB1, CDKN2 and PTEN mRNA expression were lower than those of control group; Six1, MTDH and TKTL1 expression in laryngeal cancer tissue were positively correlated with serum CA72-4, CA19-9, CYFRA21-1, SCC-Ag and TK1 levels as well as c-myc, STAT3 and ras mRNA expression, and negatively correlated with LKB1, CDKN2 and PTEN mRNA expression. **Conclusions:** Six1, MTDH and TKTL1 expression increase in laryngeal cancer tissue, and their specific expression are directly correlated with tumor malignancy.

[KEY WORDS] Laryngeal cancer; Six1; MTDH; TKTL1; Tumor marker; Cell proliferation

喉癌是口腔头面部恶性肿瘤,其发病原因及致癌机制目前不明,推测与某些基因的异常表达相关^[1,2]。近年研究显示 Six1 可促进血管内皮生长因子(VEGF)表达,加速肿瘤新生淋巴管的形成;MTDH、TKTL1 可上调缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达,进而增加肿瘤内部血管新生并促进肿瘤细胞恶性程度^[3,4]。Six1、MTDH、TKTL1 被认为是恶性肿瘤进展的重要标志物,也是肿瘤发生的重要机制,但是其在喉癌中扮演的角色未明。本次研究检测喉癌及声带息肉组织中 Six1、MTDH、TKTL1 的表达量,并进一步探讨其异常表达对肿瘤恶性程度的影响,具体汇报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

将 2013 年 6 月~2016 年 12 月间在本院确诊的原发性喉癌患者 48 例作为观察组,另取同期在本院进行喉镜检查的声带息肉患者 50 例作为对照组,患者本人签署知情同意书。观察组中男性 25 例,女性 23 例,年龄 40~76 岁;对照组中男性 24 例,女性 26 例,年龄 38~72 岁。两组患者的基线资料分布差异无统计学意义($P > 0.05$),研究获医院伦理委员会批准。

1.2 入组及排除标准

入组标准:(1)活检组织病理确诊喉癌/息肉诊断;(2)首次确诊、既往未接受系统治疗;(3)全程配合检查。排除标准:(1)继发性喉癌;(2)伴其他组织脏器原发恶性肿瘤;(3)伴全身感染性疾病。

1.3 Six1、MTDH、TKTL1 表达量

取喉癌组织、声带息肉组织,加入 Trizol 试剂(上海名劬生物科技有限公司,货号 5301100)裂解细胞 \rightarrow 0.2 mL 氯仿(上海宾智生物科技有限公司,货号 0757)离心无色水相上层 \rightarrow 等体积异丙醇(上海信裕生物科技有限公司,货号 I112016)混合、沉淀其中总 RNA 胶装块 \rightarrow 75%乙醇(上海君瑞生物技术有限公司,货号 130106)清洗 RNA 沉淀 \rightarrow 室温空气干燥 5~10 min \rightarrow 紫外光吸收法测定 RNA 纯度及浓度 \rightarrow 反转录试剂盒(赛默飞世尔科技,货号 K1642)合成样品

cDNA \rightarrow 荧光定量 PCR 试剂盒(北京华夏远洋科技有限公司,货号 RT0411-03)扩增目标基因 Six1、MTDH、TKTL1 \rightarrow 计算机软件中获取相应 PCR 扩增曲线 \rightarrow 计算目的基因 mRNA 表达量。

1.4 肿瘤标志物

入院即刻,留取两组患者的空腹肘静脉血 3~5 mL,抗凝并低速离心取上层血清,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中肿瘤标志物的含量,包括糖类抗原 72-4(CA72-4)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、鳞状细胞癌相关抗原(SCC-Ag)、胸苷激酶(TK1)。

1.5 增殖基因表达

采用荧光定量 PCR 法测定喉癌组织、声带息肉组织中癌基因:c-myc、STAT3、ras,抑癌基因:LKB1、CDKN2、PTEN mRNA 表达量,具体方法同上。

1.6 统计学处理

选择 SPSS24.0 统计软件, Six1、MTDH、TKTL1 表达量,肿瘤标志物,增殖基因表达量等计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Six1、MTDH、TKTL1 的表达量

观察组病灶组织中 Six1、MTDH、TKTL1 mRNA 的表达量均显著高于对照组患者病灶组织。两组患者病灶组织中 Six1、MTDH、TKTL1 mRNA 表达量的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组病灶组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Six1	MTDH	TKTL1
对照组	50	89.37 \pm 9.63	93.27 \pm 10.68	91.59 \pm 9.63
观察组	48	170.42 \pm 19.82	158.93 \pm 18.74	179.66 \pm 20.47
<i>t</i>		19.397	13.185	17.293
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.2 肿瘤标志物的含量

观察组血清中 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量均显著高于对照组。两组血清中肿瘤标志物 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清肿瘤标志物含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CA72-4 (ng/mL)	CA19-9 (U/mL)	CYFRA21-1 (ng/mL)	SCC-Ag (ng/L)	TK1 (pg/mL)
对照组	50	3.74±0.51	15.83±2.16	1.09±0.15	0.76±0.09	30.28±4.51
观察组	48	7.69±0.86	49.72±5.79	5.76±0.78	2.18±0.34	71.69±8.53
<i>t</i>		9.182	13.279	8.941	7.393	15.175
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 增殖基因的表达量

观察组病灶组织中癌基因 *c-myc*、*STAT3*、*ras* mRNA 的表达量显著高于对照组病灶组织,抑癌基因 *LKB1*、*CDKN2*、*PTEN* mRNA 的表达量显著低于对照组病灶组织。两组患者病灶组织中癌基因 *c-myc*、*STAT3*、*ras*,抑癌基因 *LKB1*、*CDKN2*、*PTEN* mRNA 表达量的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、4。

表 3 两组病灶组织中癌基因表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>c-myc</i>	<i>STAT3</i>	<i>ras</i>
对照组	50	93.82±10.13	99.64±10.79	100.16±13.48
观察组	48	174.91±20.74	169.77±18.63	185.48±20.16
<i>t</i>		15.195	16.282	13.284
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

表 4 两组病灶组织中抑癌基因表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>LKB1</i>	<i>CDKN2</i>	<i>PTEN</i>
对照组	50	95.47±10.19	98.38±10.42	96.27±9.93
观察组	48	50.83±6.19	47.66±6.59	36.19±5.47
<i>t</i>		10.294	14.381	15.386
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.4 相关性分析

喉癌组织中 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 表达量与血清肿瘤标志物含量、细胞增殖活力的相关性如下:经 Pearson 检验发现,喉癌组织中 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 表达量与血清肿瘤标志物 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量呈正相关;与癌基因 *c-myc*、*STAT3*、*ras* mRNA 的表达量呈正相关,与抑癌基因 *LKB1*、*CDKN2*、*PTEN* mRNA 的表达量呈负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

喉癌发生的基因学机制目前研究不多,宏观认为与相关基因影响肿瘤血管、淋巴管新生等相关。*Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 已经在多种恶性肿瘤组织中被发现高表达,其中 *Six1* 编码产物 *CyclinD1*、*Ezrin* 等可调节细胞增殖、运动,伴淋巴转移的肿瘤组织中 *Six1* 的表达量明显高于周围正常组织^[5,6]; *MTDH* 可调控微血管密度及 *VEGF* 表达,激活 *Ras*、*MAPK*、*P13K/Akt* 等信号通路,上调 *HIF-α* 表达,促进肿瘤血管生成^[7,8]; *TKTL1* 的表达与肿瘤病理分期密切相关,低分化肿瘤组织中 *TKTL1* 表达量较高,也具有促 *HIF-α* 表达、增加肿瘤血管密度的作用^[9,10]。本次研究首先明确喉癌组织中 *Six1*、

MTDH、*TKTL1* 基因表达量与良性组织(声带息肉)的差异,发现:与对照组比较,观察组病灶组织中 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* mRNA 的表达量显著增高,证实 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 基因高表达参与了喉癌的发生发展,但其对肿瘤恶性程度的影响有待下文进一步阐述明确。

肿瘤标志物是反映肿瘤恶性程度的最普遍方式,多种肿瘤标志物联合检测在敏感性、特异性方面均十分理想。CA72-4、CA19-9 属于肿瘤特异性大分子糖蛋白抗原,CA72-4 与消化系统肿瘤相关,CA19-9 与胰腺肿瘤相关,两者在其他恶性肿瘤患者血清中也可呈不同程度上升^[11]。CYFRA21-1 属于细胞角蛋白 19 可溶性片段,属于新型肿瘤标志物,在上皮性恶性肿瘤患者血清中呈异常高表达^[12,13]。SCC-Ag 在正常鳞状上皮细胞中表达,是鳞状上皮癌的标志物,目前已经有研究证实喉癌患者因 SCC-Ag 编码酸性产物合成亢进而使其在血液中的浓度升高^[14]。TK1 主要存在于胎儿组织及成人增殖细胞中,在健康人血清中含量甚微,当恶性肿瘤细胞增殖旺盛时血清中 TK1 的含量上升^[15]。本次研究对比两组患者血清中上述肿瘤标志物含量的差异,发现:与对照组比较,观察组患者血清中 CA72-4、CA19-9、CYFRA21-1、SCC-Ag、TK1 的含量较高,证实喉癌的宏观恶性程度。进一步经 Pearson 检验发现,喉癌组织中 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 表达量与上述血清肿瘤标志物含量呈正相关,说明 *Six1*、*MTDH*、*TKTL1* 表达量可宏观反映肿瘤恶性程度。

肿瘤细胞增殖旺盛是恶性肿瘤发生发展的根本机制,增殖相关基因的异常表达则是细胞恶性生物学行为改变的核心原因。*c-myc*、*STAT3*、*ras* 是公认的癌基因,*c-myc* 不但参与肿瘤的增殖分化,还涉及肿瘤的形成及演进,其水平直接反应肿瘤细胞的增殖状态^[16]; *STAT3* 高表达于绝大多数喉癌组织中,且其表达量与肿瘤分期直接相关;*ras* 也是公认的癌基因,在众多恶性肿瘤组织中呈高表达,可诱导细胞增殖并抑制其凋亡^[17]。*LKB1*、*CDKN2*、*PTEN* 属于抑癌基因,其表达减少甚至缺失是造成恶性肿瘤发生的重要原因^[18,19]。本次研究对比两组患者病灶组织中上述癌基因、抑癌基因表达量的差异,发现:与对照组比较,观察组患者病灶组织中癌基因 *c-myc*、*STAT3*、*ras* mRNA 的表达量较高,抑癌基因 *LKB1*、*CDKN2*、*PTEN* mRNA 表达量较低,证实喉

癌组织存在癌基因过度表达及抑癌基因表达减少。进一步经 Pearson 检验发现,喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量与癌基因 c-myc、STAT3、ras 表达量呈正相关,与抑癌基因 LKB1、CDKN2、PTEN 表达量呈负相关,证实 Six1、MTDH、TKTL1 基因表达可促进喉癌细胞的恶性增殖。

喉癌组织中 Six1、MTDH、TKTL1 表达量较高,且其具体表达量与肿瘤恶性程度直接相关,是导致肿瘤恶性进展的重要原因之一。

参考文献

- Hosseini SZ, Makvandi M, Samarbafzade A, et al. Frequency of Human Papillomavirus (HPV) 16 and 18 Detection in Paraffin-Embedded Laryngeal Carcinoma Tissue[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(4): 889-893.
- Shen LF, Zhao X, Zhou SH, et al. In vivo evaluation of the effects of simultaneous inhibition of GLUT-1 and HIF-1 α by antisense oligodeoxynucleotides on the radiosensitivity of laryngeal carcinoma using micro 18F-FDG PET/CT [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34709-34726.
- Popov TM, Goranova T, Stancheva G, et al. Relative quantitative expression of hypoxia-inducible factor-1 α , -2 α and -3 α , and vascular endothelial growth factor A in laryngeal carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(6): 2879-2885.
- Popov TM, Stancheva G, Goranova TE, et al. Strong Correlation Between mRNA Expression Levels of HIF-2 α , VEGFR1, VEGFR2 and MMP2 in Laryngeal Carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(4): 741-746.
- Xin X, Li Y, Yang X. SIX1 is overexpressed in endometrial carcinoma and promotes the malignant behavior of cancer cells through ERK and AKT signaling [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3435-3440.
- Wang L, Liu H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 4105-4113.
- Yang C, Zheng S, Liu T, et al. Down-regulated miR-26a promotes proliferation, migration, and invasion via negative regulation of MTDH in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *FASEB J*, 2017, 31(5): 2114-2122.
- Mataki H, Seki N, Mizuno K, et al. Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) coordinately targeted MTDH in lung squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 72084-72098.
- Shi Z, Tang Y, Li K, et al. TKTL1 expression and its down-regulation is implicated in cell proliferation inhibition and cell cycle arrest in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11): 8519-8529.
- Grimm M, Munz A, Teriete P, et al. GLUT-1(+)/TKTL1 (+) coexpression predicts poor outcome in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014, 117(6): 743-753.
- Rehena Z, Ghosh CK, Afroz F, et al. Comparison of Serum CA72-4 and CEA Levels in Patient with Endoscopically Suspected Gastric Carcinoma [J]. *Mymensingh Med J*, 2015, 24(3): 542-549.
- Song XM, Wang ZJ, Cao WJ, et al. The value of circulating CYFRA21-1 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma: a study of 529 subjects [J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(6): 1038-1045.
- Sunpaweravong S, Puttawibul P, Sunpaweravong P, et al. Correlation between Serum SCCA and CYFRA 2 1-1, Tissue Ki-67, and Clinicopathological Factors in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *J Med Assoc Thai*, 2016, 99(3): 331-337.
- Salvatici M, Achillarre MT, Sandri MT, et al. Squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) during follow-up of cervical cancer patients: Role in the early diagnosis of recurrence [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 142(1): 115-119.
- Qin Z, Chen J, Zeng J, et al. Effect of NK cell immunotherapy on immune function in patients with hepatic carcinoma: A preliminary clinical study [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(5): 323-330.
- Dolezal JM, Wang H, Kulkarni S, et al. Sequential adaptive changes in a c-Myc-driven model of hepatocellular carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(24): 10068-10086.
- Tsubaki M, Fujiwara D, Takeda T, et al. The sensitivity of head and neck carcinoma cells to statins is related to the expression of their Ras expression status, and statin-induced apoptosis is mediated via suppression of the Ras/ERK and Ras/mTOR pathways [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(2): 222-234.
- Lu C, Xie C. Radiation-induced autophagy promotes esophageal squamous cell carcinoma cell survival via the LKB1 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3559-3565.
- Ohkawa K, Asakura T, Tsukada Y, et al. Antibody to human α -fetoprotein inhibits cell growth of human hepatocellular carcinoma cells by resuscitating the PTEN molecule: in vitro experiments [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 2180-2190.