

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 06. 012

Tiam1 和 SNAI1 在结直肠癌 EMT 中的意义

赵海燕^{1,2}, 胡洁³, 王雅娟², 吴共发², 韩慧霞^{1,2}

Significance of Tiam1 and SNAI1 in EMT of Human Colorectal Carcinoma

ZHAO Hai-yan^{1,2}, HU Jie³, WANG Ya-juan², WU Gong-fa², HAN Hui-xia^{1,2}

1. Department of Pathology, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Southern Medical University; 3. Department of Pathology, The People's Hospital of Guilin

Corresponding Author: HAN Hui-xia, E-mail: hhxia@fimmu.com

Abstract: Objective To explore the significance of Tiam1 and SNAI1 in human colorectal carcinoma. **Method** The expressions of Tiam1, SNAI1 and E-cadherin were detected by immunohistochemistry in normal colorectal epithelium, colorectal carcinoma and lymphatic metastasis of colorectal carcinoma. **Results** The expression rates of Tiam1 and SNAI1 in colorectal carcinoma were apparently higher than that in normal colorectal epithelium ($P=0.000$; $P=0.000$), and correlated with the degree of tumor differentiation ($P=0.014$; $P=0.014$). The expression rates of Tiam1 and SNAI1 in lymphatic metastasis were apparently higher than that in colorectal carcinoma ($P=0.002$; $P=0.001$). The expression rate of E-cadherin in colorectal carcinoma was remarkably lower than that in normal colorectal epithelium ($P=0.000$), and correlated with the degree of tumor differentiation ($P=0.000$). The expression rate of E-cadherin in lymphatic metastasis was remarkably lower than that in colorectal carcinoma ($P=0.007$). Tiam1 was positively correlated with SNAI1 ($r=0.584$, $P=0.000$). Tiam1 and SNAI1 were negatively correlated with E-cadherin ($r=-0.324$, $P=0.000$; $r=-0.420$, $P=0.000$). **Conclusion** Tiam1 and SNAI1 may promote invasion and metastasis of colorectal carcinoma by inducing EMT.

Key words: Colorectal carcinoma; EMT; Tiam1; SNAI1

摘要:目的 探讨 T 淋巴瘤浸润转移因子 1(T lymphoma invasion and metastasis factor 1, Tiam1) 和锌指转录因子(zinc-finger transcription factor)SNAI1 在结直肠癌中的表达及意义。**方法** 免疫组织化学二步法检测 137 例正常结直肠组织、结直肠癌组织、淋巴结转移癌组织中 Tiam1、SNAI1 及 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达情况。**结果** Tiam1 及 SNAI1 在结直肠癌组织中的表达高于正常结直肠组织($P=0.000$; $P=0.000$), 且与分化程度有关($P=0.014$; $P=0.014$), 淋巴结转移癌组织中的表达高于结直肠癌原发灶($P=0.002$; $P=0.001$); E-cadherin 在结直肠癌组织中的表达低于正常结直肠组织($P=0.000$), 且与分化程度有关($P=0.000$), 淋巴结转移癌组织中的表达低于结直肠癌原发灶($P=0.007$); Tiam1 与 SNAI1 正相关($r=0.584$, $P=0.000$), Tiam1 与 E-cadherin、SNAI1 与 E-cadherin 负相关($r=-0.324$, $P=0.000$; $r=-0.420$, $P=0.000$)。**结论** Tiam1 与 SNAI1 可能通过诱导 EMT 的发生而协同促进结直肠癌的浸润转移。

关键词: 结直肠癌; 上皮间质转化; T 淋巴瘤浸润转移因子 1; SNAI1

中图分类号: R735.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2011)06-0654-04

0 引言

结直肠癌是常见的恶性肿瘤, 其发生发展是一

个多因素、复杂的过程, 浸润转移是治疗失败和患者死亡的重要原因。Tiam1 是 Habets 等^[1]从鼠模型中分离鉴定出来的, 随后克隆了人的 Tiam1 基因, 并分析了 Tiam1 基因进化的保守性和表达形式。SNAI1 与 E-cadherin 启动子区域的 E-box 结合, 抑制 E-cadherin 表达, 调控上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[2]。为了探讨 Tiam1 与 SNAI1 在诱导 EMT 中是否发挥了协同作

收稿日期: 2010-05-10; 修回日期: 2010-10-28
作者单位: 1. 510515 广州, 南方医科大学附属南方医院病理科; 2. 南方医科大学基础医学院病理学系; 3. 桂林市人民医院病理科
通信作者: 韩慧霞, E-mail: hhxia@fimmu.com
作者简介: 赵海燕(1984-), 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤病理学基础研究

用,我们采用免疫组织化学二步法检测结直肠癌组织中 Tiam1、SNAI1 及 E-cadherin 的表达情况,并分析三者之间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集南方医院病理科 2007 年 1 月 1 日—2008 年 3 月 1 日存档的 137 个组织蜡块,包括正常结直肠组织 22 例、结直肠癌组织 85 例(高分化腺癌 26 例、中分化腺癌 23 例、低分化腺癌 36 例)和淋巴结转移癌组织 30 例。患者年龄 23~85 岁(平均 57.2 岁),术前均未接受化疗、放疗。所有组织 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,3μm 厚切片,免疫组织化学二步法进行检测。

1.2 试剂

Tiam1 兔抗人多克隆抗体、E-cadherin 鼠抗人多克隆抗体、SP 法检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉公司;SNAI1 兔抗人多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司。

1.3 检测 Tiam1、SNAI1、E-cadherin 的表达

免疫组织化学方法按试剂盒说明书操作,Tiam1、SNAI1、E-cadherin 抗体的工作浓度分别为 1:50、1:200、1:50,0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液抗原修复,DAB 显色,苏木精对比染色,中性树胶封固。PBS 取代一抗作阴性对照。

1.4 结果判断方法

1.4.1 Tiam1:细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。(1)强度分数标准:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;(2)同样物镜下计数阳性细胞数:≤10%为 1 分,>10%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。两项得分相乘,4~7 分为“+”,8~11 分为“++”,满 12 分为“+++”,“+~+++”为阳性表达。

1.4.2 SNAI1:细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。(1)强度分数标准:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;(2)同样物镜下计数阳性细胞数:1%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,75%以上为 4 分。两项得分相乘,4~7 分为“+”,8~11 分为“++”,满 12 分为“+++”,“+~+++”为阳性表达。

1.4.3 E-cadherin:E-cadherin 在细胞膜及少许细胞质出现棕黄色颗粒为阳性,仅细胞质着色视为阴性,按着色强度及范围分为 4 级:阳性细胞数 0~10%为“-”,阳性细胞数>10%~50%为“+”,阳性细胞数>50%~90%为“++”,阳性细胞数>90%为“+++”。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件处理,统计方法采用 Kruskal-Wallis Test,Mann-Whitney Test 和 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 Tiam1 表达情况

Tiam1 在正常结直肠组织、结直肠癌组织和淋巴结转移癌组织中的阳性着色主要位于细胞质,呈弥漫分布,见图 1;Tiam1 在正常结直肠组织、结直肠癌及淋巴结转移癌组织中的表达差异有统计学意义($\chi^2=46.344,P=0.000$)。两两比较差异均有统计学意义,见表 1。

2.2 SNAI1 表达情况

SNAI1 在正常结直肠组织、结直肠癌组织和淋巴结转移癌组织中的阳性着色主要位于细胞核,呈弥漫分布,见图 2。SNAI1 在正常结直肠组织、结直肠癌及淋巴结转移癌组织中的表达差异有统计学意义($\chi^2=49.550,P=0.000$)。两两比较差异均有统计学意义,见表 1。

表 1 Tiam1、SNAI1 及 E-cadherin 在正常结直肠组织、结直肠癌组织和淋巴结转移组织中的表达情况

Table 1 Expressions of Tiam1,SNAI1 and E-cadherin in normal colorectal epithelium, colorectal carcinoma and lymph node metastasis

Groups	Tiam1				SNAI1				E-cadherin				Total
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Normal colorectal epithelium	17	5	0	0	17	4	1	0	0	0	2	20	22*
Primary colorectal carcinoma	10	44	30	1	5	40	39	1	5	10	47	23	85* ^{&}
Well or Moderately differentiated	8	28	13	0	1	32	16	0	0	1	29	19	49 [#]
Poorly differentiated	2	16	17	1	4	8	23	1	5	9	18	4	36 [#]
Lymphatic metastasis	1	9	17	3	1	4	23	2	5	8	13	4	30 ^{&}

Note: Tiam1: * Z=-5.716, P=0.000; # Z=-2.457, P=0.014; & Z=-3.102, P=0.002; SNAI1: * Z=-6.018, P=0.000; # Z=-2.467, P=0.014; & Z=-3.446, P=0.001; E-cadherin: * Z=-5.153, P=0.000; # Z=-4.355, P=0.000; & Z=-2.695, P=0.007

2.3 E-cadherin 表达情况

E-cadherin 在胞膜上呈均质、连续线状表达;在正常结直肠组织、结直肠癌及淋巴结转移癌组织中 E-cadherin 的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 36.907, P = 0.000$)。两两比较差异均有统计学意义,见表 1。

2.4 Tiam1、SNAI1、E-cadherin 相关性分析

在正常结直肠组织、结直肠癌组织及淋巴结转移癌组织中 Tiam1 与 SNAI1 存在显著正相关关系($r = 0.584, P = 0.000$)见表 2;Tiam1、SNAI1 与 E-cadherin 的表达呈显著负相关关系($r = -0.324, P = 0.000; r = -0.420, P = 0.000$)。

表 2 正常结直肠组织、结直肠癌组织和淋巴结转移组织中 Tiam1 与 SNAI1 的相关性

Table 2 Relationship between the expression of Tiam1 and SNAI1 in normal colorectal epithelium, colorectal carcinoma and lymph node metastasis

Tiam1	SNAI1				Total
	-	+	++	+++	
-	15	8	5	0	28
+	8	30	20	0	58
++	0	10	35	2	47
+++	0	0	3	1	4

Note: $r = 0.584, P = 0.000$

3 讨论

EMT 是指在特定生理、病理条件下上皮细胞

向间充质细胞转化的现象。EMT 过程包含快速的、可逆的细胞形态转变、上皮细胞解除细胞间黏附结构(黏附连接和桥粒)及细胞极性改变、细胞骨架重排(中间丝从角蛋白到波形蛋白的转化),从而细胞变得易于分离并能对抗凋亡^[3]。发生 EMT 的细胞主要表现为细胞极性的丧失、细胞变梭、伸出丝状伪足并获得侵袭运动能力^[4];在分子生物学方面表现为上皮标志物缺失或减弱,如 E-cadherin 等,而获得间质标志物,如 Vimentin、SNAI1 等的表达增加^[5]。E-cadherin 是细胞黏附分子钙黏蛋白家族中的重要成员,广泛分布于上皮细胞中,E-cadherin 在维持细胞间的黏附性、细胞极性、细胞间的信息传递等方面发挥重要的作用,目前认为 E-cadherin 表达的丢失是 EMT 最显著的特征^[6]。

Tiam1 为 Rho 样 GTP 酶(包括 Rho、Rac、CDC42)的特异性鸟苷酸转换因子,可以调节细胞的骨架重构,促进细胞运动功能,从而可以诱导恶性肿瘤的侵袭转移^[7]。Tiam1 蛋白有多个重要的结构区域,如 DH 功能域,参与 GDP/GTP 转换,调节 Rho 样 GTP 酶活性;PH 功能域,参与蛋白质相互作用,这些功能区域在肿瘤的侵袭转移及信号转导方面发挥重要作用^[8]。课题组前期使用荧光定量 PCR 及细胞免疫化学方法检测 Tiam1 在不同侵袭转移能力结直肠癌细胞株中的表达情况,发现随着细胞侵袭转移能力的增强 Tiam1 表达增高^[9]。

锌指转录因子 SNAI1,属于转录抑制因子超家

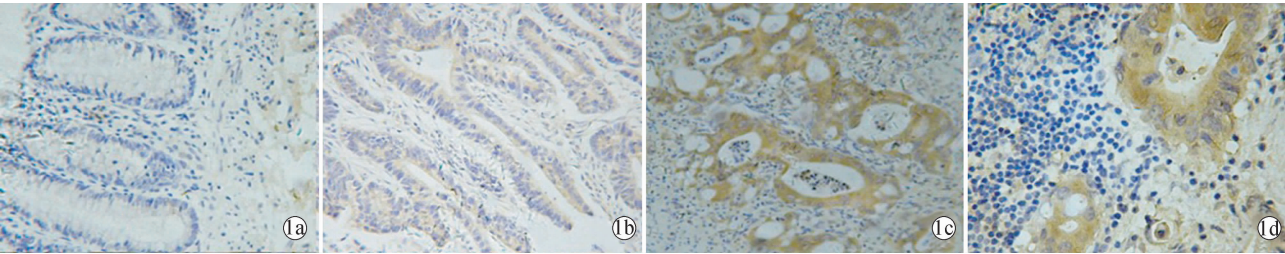


图 1 Tiam1 在结直肠正常黏膜(1a)、高中分化癌(1b)、低分化癌(1c)、淋巴结转移癌(1d)中的表达(SP × 200)
Figure 1 Expression of Tiam1 in normal colorectal epithelium(1a), well or moderately differentiated colorectal carcinoma(1b), poorly differentiated colorectal carcinoma(1c) and lymph node metastasis(1d)(SP × 200)

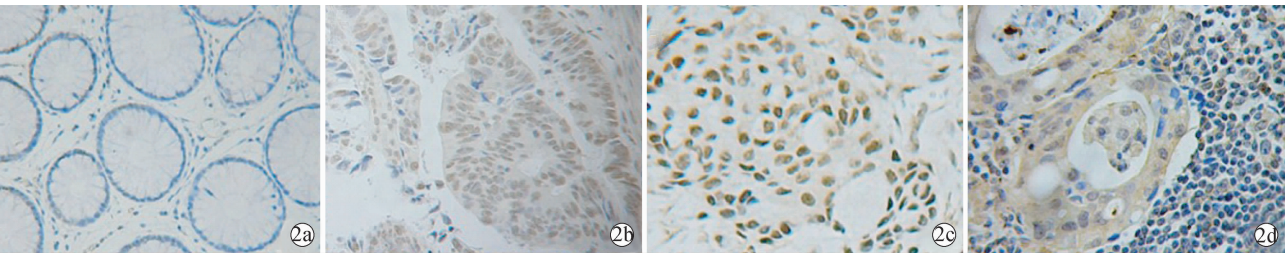


图 2 SNAI1 在结直肠正常黏膜(2a)、高中分化癌(2b)、低分化癌(2c)、淋巴结转移癌(2d)中的表达(SP × 200)
Figure 2 Expression of SNAI1 in normal colorectal epithelium(2a), well or moderately differentiated colorectal carcinoma(2b), poorly differentiated colorectal carcinoma(2c) and lymph node metastasis(2d)(SP × 200)

族,它受到多种信号通路的调控。SNAI1 通过直接抑制 E-cadherin 的表达破坏上皮细胞之间的连接,使癌细胞松散,易于发生迁移,促进 EMT 的发生,SNAI1 与恶性肿瘤的浸润、转移、复发等密切相关^[4]。

本实验通过免疫组织化学二步法在蛋白水平研究 Tiam1 与 SNAI1 在人类结直肠癌 EMT 中的意义,探讨两者是否在促进 EMT 过程中存在协同作用。实验结果显示,Tiam1 与 SNAI1 在正常结直肠组织、结直肠癌高分化组织、结直肠癌低分化组织、淋巴结转移癌组织中的表达均呈显著升高趋势,均与 EMT 重要标志物 E-cadherin 的表达呈显著负相关关系,由此可见,在结直肠癌中,Tiam1 与 SNAI1 可能参与了 EMT 的演进过程。在正常结直肠组织、结直肠癌组织、淋巴结转移癌组织中 Tiam1 与 SNAI1 存在显著正相关关系,由此推断,Tiam1 与 SNAI1 在结直肠癌发生发展、浸润转移等方面可能存在协同促进作用。在生物信息网络中,信号转导通路中的介质之间存在错综复杂的关系,发现 Tiam1 与 SNAI1 可能通过信号转导通路的交错关系而存在间接作用,其中,Tiam1 通过激活下游的信号分子 Rac1、JNK、p38MAPK、PAK1、COX-2、NF-κB 而产生一系列的生物学作用^[10],而 MAPK、Wnt、TGF-β、NF-κB 等信号通路又可以调控 SNAI1 的表达^[11],因而我们推断 Tiam1 很有可能通过激活 MAPK 和 NF-κB 信号通路,然后经过信号通路上的分子之间的级联反应来调控 SNAI1 的表达,接着 SNAI1 抑制 E-cadherin 的表达,从而协同促进 EMT 的发生发展以及癌症的浸润转移。因此,Tiam1 与 SNAI1 有可能成为结直肠癌诊断与治疗的新靶标,两者在促进 EMT 方面的协同作用机制有

待进一步探索研究。

参考文献:

[1] Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, et al. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin[J]. *Oncogene*, 1995,10(7):1371-1376.

[2] Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor SNAI1 controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(2):76-83.

[3] Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon[J]. *Ann Oncol*,2010,21(Suppl 7):vii89-vii92.

[4] Ahmed S, Nawshad A. Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta signaling[J]. *Cells Tissues Organs*, 2007,185(1-3):131-145.

[5] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. *J Clin Invest*,2009,119(6):1429-1437.

[6] Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. *Cell*,2004,118(3):277-279.

[7] Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, et al. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration[J]. *J Cell Biol*,2000,150(1):177-191.

[8] Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signaling[J]. *FEBS Lett*, 2003, 546(1):11-16.

[9] 王雅娟,胡洁,赵海燕,等. Tiam1 与大肠癌细胞 EMT 的关系[J]. *世界华人消化杂志*,2009,17(32):3337-3341.

[10] Zhong D, Li Y, Peng Q, et al. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*,2009,8(8):689-695.

[11] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*,2009,139(5):871-890.

[编辑:周永红;校对:刘红武]