

论著【临床研究】

TMEM16A在口腔癌前病变和鳞癌中的表达及意义

曾鸣,高义军*

中南大学湘雅二医院口腔中心,湖南 长沙,410011

摘要: **目的** 检测TMEM16A在口腔癌前病变组织及口腔鳞癌组织中的表达与分布情况,分析其在口腔癌变机制中的作用。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测10例正常黏膜组织、10例上皮单纯性增生、30例上皮异常增生和45例口腔鳞癌标本中TMEM16A的表达情况。**结果** TMEM16A在正常黏膜组织上皮中为阴性表达,在口腔癌前病变组织出现不同程度的表达,且随着上皮异常增生程度增加,TMEM16A蛋白表达逐渐增强。TMEM16A在口腔鳞癌中表达显著高于口腔癌前病变,在口腔鳞癌I、II、III级中,TMEM16A的表达差异无统计学意义($\chi^2=1.74, P>0.05$)。**结论** TMEM16A在不同级别口腔癌前病变及鳞癌中表达的差异提示其可能在口腔鳞癌发生早期有重要作用。

关键词: 钙激活氯通道;TMEM16A;口腔癌前病变;口腔鳞癌

中图分类号: R739.85 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2014)11-页码-页数

Expression and significance of TMEM16A in oral precancerous lesions and squamous cell carcinomas

ZENG Ming, GAO Yi-jun

Department of Stomatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410011, Hunan, P.R. China

Corresponding author: GAO Yi-jun, E-mail: gaoyijun1165@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression and distribution of TMEM16A in cases with oral squamous cell carcinomas (OSCCs) and oral precancerous lesions. **Methods** The expression of TMEM16A in samples of cases with oral precancerous lesions and OSCCs, including 10 normal oral mucosa cases, 15 epithelial hyperplasia cases, 30 epithelial dysplasia cases (12 mild, 9 moderate, and 9 severe), and 45 OSCCs cases (21 well differentiated, 16 moderately differentiated, 8 poorly differentiated) were immunochemically determined. **Results** TMEM16A expression was not detectable in the normal squamous epithelium. Variable membranous/cytoplasmic staining was observed in oral precancerous lesions and OSCCs. Statistical analysis revealed a significant increase in TMEM16A expression among cases with epithelial hyperplasia, mild epithelial dysplasia, moderate epithelial dysplasia, and severe epithelial dysplasia. TMEM16A expression was significantly increased in cases with OSCCs than that with oral precancerous lesions without showing significant difference among cases with well differentiated, moderately differentiated, and poorly differentiated OSCCs ($\chi^2=1.74, P>0.05$). **Conclusions** The differences in the immunoexpression of TMEM16A between different grades of cases with oral precancerous lesions and OSCCs suggest TMEM16A may participate in the multistep process of oral carcinogenesis since its early stages.

Key words: Calcium-activated Chloride Channels; TMEM16A; Oral precancerous lesions; Oral squamous cell carcinoma

TMEM16A (又称为 ANO1, DOG1, ORAOV2, FLJ10261 或 TAOS2), 属于 TMEM16 基因家族 (TMEM16A 到 K), 基因定位于人类染色体 11q13 的 CCND1-EMS1, 该基因编码的蛋白即为钙激活氯通道 (Calcium-activated Chloride Channels)^[1]。近年的研究表明, TMEM16A 在多种肿瘤中如头颈鳞癌、胃肠道间质瘤、前列腺癌、乳腺癌等呈现高水平表达, 并参与肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移等过程^[2-8]。TMEM16A 在口腔鳞癌的发生发展中的作用和意义目前尚不清楚, 我们应用免疫组化检测 TMEM16A 在正常口腔黏膜、癌前病变组织和口腔鳞癌组织中的表达, 以探讨 TMEM16A 在口腔鳞癌发生发展中的作用和意义, 结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集湘雅二医院 2007~2012 年间手术切除或活检的标本共 85 例 (术前均未进行化学治疗和放射治疗), 包括上皮单纯性增生 10 例, 上皮异常增生 30 例 (轻度异常增生 12 例、中度异常增生 9 例、重度异常增生 9 例), 口腔鳞癌 45 例 (鳞癌 I 级 21 例、II 级 16 例、III 级 8 例)。另选取 10 例正常黏膜组织作为对照。所有病例均经口腔病理医师确诊并按 WHO 分类标准进行分级。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 兔抗人单克隆抗体 TMEM16A (克隆号 SP31)、免疫组化 SP 试剂盒、DAB 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。所有标本均经 4% 中性甲醛固

作者简介: 曾鸣 (1986~), 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 口腔黏膜病和牙体牙髓病。

*通讯作者: 高义军, E-mail: gaoyijun1165@163.com

定,石蜡包埋,4 μm切片,HE染色,光学显微镜观察,按照免疫组织化学SP法染色,柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)高温高压进行抗原修复,DAB显色,操作步骤按照说明书进行。以已知阳性的胃肠道间质瘤组织作为阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.2 免疫组化结果判定 TMEM16A蛋白阳性定位于细胞膜和/或细胞质,呈淡黄色、棕黄色或棕褐色为阳性信号。每例均随机选择5个高倍视野(×400),至少计数500个肿瘤细胞,结果判断采用半定量积分法分级。积分=染色强度×染色细胞比例。(1)按着色细胞百分数计分:<5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;(2)按着色强度计分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。表达强度以两者计分相乘表示,将结果分为4级:0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~8分为中度阳性(++),9分及以上为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理 等级资料多组比较采用Kruskal Wallis 检验,组织类型和TMEM16A免疫组化染色的关系采用Spearman秩相关分析。所有数据计算采用SPSS16.0统计学软件,显著性水平比较采用双侧 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

TMEM16A蛋白阳性定位于细胞膜和/或细胞质,呈淡黄色、棕黄色或棕褐色。10例正常口腔黏膜上皮中未见TMEM16A阳性染色,因此正常黏膜组TMEM16A的表达仅作为对照,未纳入统计。TMEM16A在口腔癌前病变组织和鳞癌各组间的判读结果见表1。

表1 TMEM16A在口腔癌前病变和鳞癌组织中的表达
Table 1 TMEM16A expression in oral precancerous lesions and oral squamous cell carcinomas (OSCCs)

组织学分型 Histology	例数 No.case	免疫组织化学染色强度 Immunohistochemical results			
		-	+	++	+++
单纯性增生 Epithelial hyperplasia	10	4	6	0	0
轻度异常增生 Mild epithelial dysplasia	12	3	9	0	0
中度异常增生 Moderate epithelial dysplasia	9	1	4	4	0
重度异常增生 Severe epithelial dysplasia	9	1	1	6	1
鳞癌I级OSCCs grade I	21	3	0	9	9
鳞癌II级OSCCs grade II	16	2	0	4	10
鳞癌III级OSCCs grade III	8	0	0	3	5

10例单纯性增生组织中,TMEM16A阴性4例,弱阳性6例,阳性细胞主要分布于基底细胞层、棘细胞深层。30例异常增生组织中,TMEM16A阴性5例,弱阳性14例,中度阳性10例,强阳性1例。上皮轻度异常增生组织中,阳性细胞主要分布于基底细胞层、棘细胞深层,随着异常增生程度的增加,阳性细胞增多,延伸至上皮中1/3,甚至上2/3,染色强度亦增强(图1)。口腔癌前病变组织中各组(单纯性增生、轻度异常增生、中度异常增生和重度异常增生)间差异有统计学意义($\chi^2=14.73$, $P<0.01$),提示各组间TMEM16A表达强度差异有统计学意义($r=0.5956$, $P<0.01$),结果表明随着上皮异常增生程度增加,TMEM16A蛋白表达逐渐增强。

45例口腔鳞癌组织中,40例TMEM16A阳性表达(88.9%)。其中TMEM16A阴性5例,弱阳性0例,中度阳性16例,强阳性24例。鳞癌I级中TMEM16A阳性染色主要位于癌巢的周边,角化区域不表达,鳞癌II、III级中阳性细胞则弥漫分布(图2)。口腔鳞癌各组(鳞癌I级、II级、III级)间差异无统计学意义($\chi^2=1.74$, $P>0.05$);($r=0.1967$, $P>0.05$)。

单纯增生组、上皮异常增生组、口腔鳞癌组三组间差异有统计学意义($\chi^2=34.64$, $P<0.01$),($r=0.6421$, $P<0.01$)提示各组间TMEM16A表达强度存在差异,且在口腔鳞癌表达明显高于单纯增生组和上皮异常增生组。

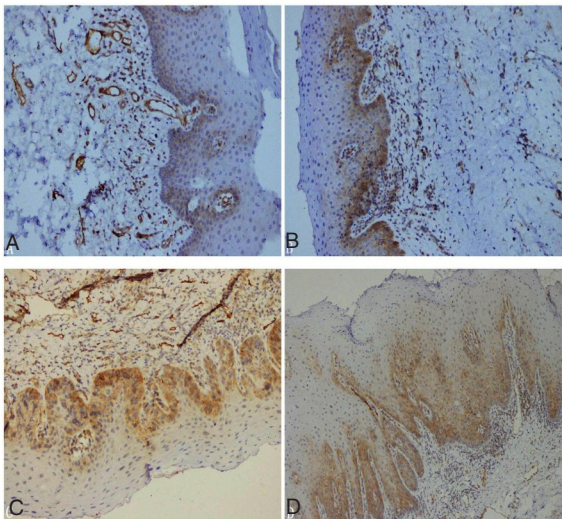


图1 TMEM16A在单纯性增生(A)、轻度上皮异常增生(B)、中度上皮异常增生(C)、重度上皮异常增生(D)中的表达
Fig. 1 TMEM16A expression in epithelial hyperplasia (A), mild epithelial dysplasia (B), moderate epithelial dysplasia (C), and severe epithelial dysplasia (D)

3 讨论

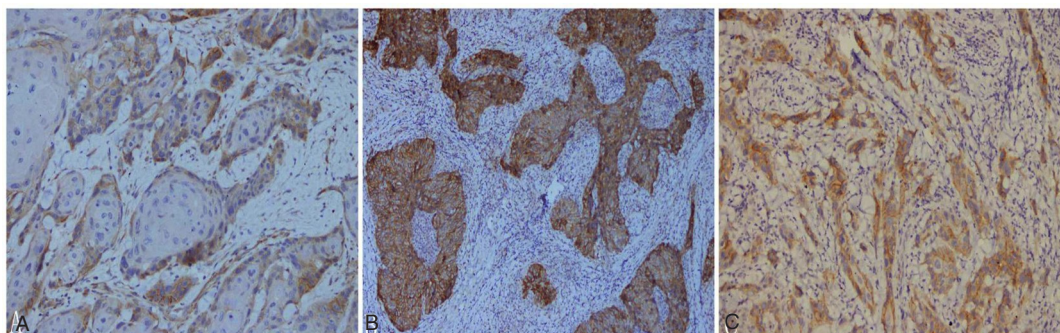


图2 TMEM16A在口腔鳞癌I级(A)、II级(B)、III级(C)中的表达

Fig. 2 TMEM16A expression in cases with well differentiated (A), moderately differentiated (B), and poorly differentiated (C) oral squamous cell carcinomas

离子通道是细胞膜上一类贯穿细胞膜的亲水性蛋白质微孔道,是许多基本生物活动如电活动、离子转运和细胞分泌等的基础。氯离子通道是一类广泛表达于生物界各种细胞膜或细胞器质膜上的阴离子跨膜通道蛋白,主要负责机体含量最多、最富有生理意义的阴离子-氯离子的转运,参与各种生物活动过程。根据功能及门控机制,氯通道可分6类:1)电压门控氯通道;2)囊性纤维跨膜转导调节因子;3)容积调控阴离子通道;4)钙激活氯通道;5)配体门控氯通道;6)线粒体相关氯通道家族^[9]。钙激活氯通道最早发现于非洲爪蟾卵母细胞中,随后,相继有报道表明上皮细胞、血管内皮细胞、神经元、平滑肌和心肌细胞中都存在钙激活氯通道。钙激活氯通道在许多生理活动中起重要作用,如心肌和神经元的兴奋、上皮细胞的分泌、嗅觉转导、受精过程等^[1,9-10]。虽然在各种细胞上分布广泛并被研究了20多年,但由于技术上的原因,钙激活氯离子通道分子基础的问题一直未能解决。直到2008年,三个实验室分别发现TMEM16A是构成钙激活氯离子通道的分子基础^[11-13]。TMEM16A基因定位于人类染色体11q13的CCND1-EMS1,包含26个外显子,编码的蛋白产物是具有8个跨膜区段的膜蛋白,含986个氨基酸,分子量为114 kDa。TMEM16A广泛存在于多种人体组织中,参与钙激活氯通道介导的多种生理性反应。目前研究证实TMEM16A异常高表达于头颈鳞癌、胃肠道间质瘤、前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤中^[2-8]。一方面,TMEM16A在一些肿瘤中特异性表达可作为肿瘤病理诊断的生物标记物,如胃肠道间质瘤。另一方面,TMEM16A高表达常与肿瘤预后不良相关,可成为肿瘤预后的标志物及癌症治疗的潜在靶点。

口腔鳞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,占口腔恶性肿瘤的90%。多项研究显示TMEM16A在头颈鳞癌包括口腔鳞癌中异常高表达,并与患者不良预后

相关。李雅冬等^[2]通过免疫组化发现TMEM16A在口腔鳞癌组织中的阳性表达率为82.7%,明显高于正常组织,有淋巴结转移的口腔鳞癌组织TMEM16A阳性表达高于无转移的口腔鳞癌组织。Duvvuri^[3]等研究发现TMEM16A阳性表达于85%的头颈鳞癌中,TMEM16A的阳性表达与患者的预后呈负相关,研究还发现TMEM16A可通过激活MAPK通路直接促进肿瘤发生。Ayoub等^[4]研究发现TMEM16A基因扩增和过度表达与头颈鳞癌的转移相关,TMEM16A参与了癌细胞的运动、侵袭和黏附。Ruiz等^[5]研究发现,TMEM16A的表达与淋巴结的转移相关,并与头颈鳞癌患者预后负相关。我们的研究同样发现TMEM16A在口腔鳞癌中存在高表达,阳性率为88.9%,与李雅冬等^[2]结果一样,TMEM16A的表达与口腔鳞癌的组织学分级无明显关联。

口腔鳞癌的发生大多数都经过黏膜的单纯性增生-异常增生-原位癌-浸润性癌的过程,因此寻找能预测口腔癌前病变恶变风险的分子标志物对于口腔鳞癌的预防具有重要的意义^[14]。本次研究发现,TMEM16A在正常口腔黏膜上皮中无表达,在77.5%的癌前病变组织中出现TMEM16A的阳性表达,TMEM16A的表达强度从单纯性增生、轻度上皮异常增生、中度上皮异常增生、重度上皮异常增生到口腔鳞癌逐渐上调。在口腔黏膜癌变过程中存在TMEM16A表达量上的累积,表明TMEM16A的异常表达不仅与口腔鳞癌的发生发展进程有关,而且可能在口腔鳞癌发生早期有重要作用。

总之,本研究表明,TMEM16A蛋白的异常表达可能与口腔鳞癌的发生发展进程有关,可成为肿瘤诊断的标志物及治疗的潜在靶点。TMEM16A蛋白的异常表达出现在口腔黏膜癌变过程中形态学变化的早期阶段,提示TMEM16A的表达增高是口腔黏膜癌变过程中的早期事件,有可能成为早期发现癌变的分子生

物学标志物之一。

参考文献

- [1] Duran C, Hartzell HC. Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels ?[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(6): 685-692.
- [2] 李雅冬, 张劲松, 杨凯, 等. ANO1在口腔鳞癌中的表达及临床分析[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(10): 1175-1178.
- [3] Duvvuri U, Shiowski DJ, Xiao D, et al. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3270-3281.
- [4] Ayoub C, Wasylyk C, Li Y, et al. ANO1 amplification and expression in HNSCC with a high propensity for future distant metastasis and its functions in HNSCC cell lines[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(5): 715-726.
- [5] Ruiz C, Martins JR, Rudin F, et al. Enhanced expression of ANO1 in head and neck squamous cell carcinoma causes cell migration and correlates with poor prognosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43265.
- [6] Espinosa I, Lee CH, Kim MK, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(2): 210-218.
- [7] Liu W, Lu M, Liu B, et al. Inhibition of Ca(2+)-activated Cl(-) channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2012, 326(1): 41-51.
- [8] Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(11): E1026-1034.
- [9] Duran C, Thompson CH, Xiao Q, et al. Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 95-121.
- [10] Berg J, Yang H, Jan LY. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 6): 1367-1371.
- [11] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity[J]. *Science*, 2008, 322(5901): 590-594.
- [12] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit[J]. *Cell*, 2008, 134(6): 1019-1029.
- [13] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance[J]. *Nature*, 2008, 455(7217): 1210-1215.
- [14] Woolgar JA, Triantafyllou A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical pathology[J]. *Periodontol 2000*, 2011, 57(1): 51-72.

收稿日期: 2014-07-01 编辑: 崔宜庆