

文章编号 1006-8147(2019)02-0143-04

论 著

## TIAM1 蛋白在神经母细胞瘤中的表达及临床意义

聂红艳,邱艳丽,靳燕,曹嫣娜,闫杰,李杰,王景福,赵强

(天津医科大学肿瘤医院儿童肿瘤科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

**摘要** 目的:探索 T 淋巴瘤侵袭转移 1 蛋白(TIAM1)在神经母细胞瘤(NB)中的表达及临床意义。方法:运用免疫组化法检测 61 例神经母细胞瘤组织中 TIAM1 蛋白的表达,并分析其与 NB 患者临床病理特征及预后之间的关系。结果:TIAM1 主要定位于细胞浆中,但也可表达在细胞核内,其表达与 NB 分化程度相关( $\chi^2=4.493, P=0.034$ ),分化程度越高,表达越强;但其表达与年龄,INSS 分期,肿瘤部位等无关。结论:TIAM1 的表达与 NB 的分化程度呈正相关,有望成为 NB 潜在治疗靶点。

**关键词** TIAM1;神经母细胞瘤;分化

中图分类号 R739.4

文献标志码 A

### Expression and Clinical Significance of TIAM1 in Neuroblastoma

NIE Hong-yan, QIU Yan-li, JIN Yan, CAO Yan-na, YAN Jie, LI Jie, WANG Jing-fu, ZHAO Qiang

(Department of Pediatric Oncology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the expression and clinical significance of TIAM1 (T-lymphoma invasion and metastasis 1) in the neuroblastoma. **Methods:** The expression of TIAM1 protein in 61 neuroblastoma tissues was detected by immunohistochemical method and its correlation with the clinicopathological characteristics and prognosis was analyzed. **Results:** TIAM1, mainly located in the cytoplasm, could also be expressed in the nucleus. Its expression was related to the degree of differentiation of NB ( $\chi^2=6.205, P=0.013$ ) the higher the differentiation degree, the stronger the expression. However, the expression was not related to age, INSS stage, tumor location and other factors. **Conclusion:** There is a positive correlation between the expression of TIAM1 and the differentiation of NB, which is expected to be a potential target for NB treatment.

**Key words** TIAM1; neuroblastoma; differentiation

T 淋巴瘤侵袭转移蛋白 (T-lymphoma invasion and metastasis 1, TIAM1) 基因, 即 TIAM1 基因, 是一种鸟苷酸转换因子 (GEF), 为 Rho 家族中 Rac1 特异激活剂, 参与细胞骨架活动, 以及细胞迁移、粘附和侵袭、癌变和转移等<sup>[1]</sup>。有文献表明, TIAM1 促进癌细胞的侵袭和转移, 例如: 在食管癌<sup>[2]</sup>, 肝癌<sup>[3]</sup>, 宫颈癌<sup>[4]</sup>, 甲状腺癌<sup>[5]</sup> 等疾病中。而在结直肠癌中, 有研究者提出其具有抑癌的作用<sup>[6]</sup>。有学者对 106 例原发性神经母细胞瘤组织进行二代测序发现, 具有 TIAM1 基因变异者, 其预后更好。认为可将 TIAM 抑制剂与常规疗法相联合, 来改善患者预后<sup>[7]</sup>。然而, Cao 等<sup>[8]</sup>对 33 例神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 组织进行靶向捕获的二代测序发现 1 例 TIAM1 基因缺失, 该患者组织经 HE 染色为 NB 分化差型。因此, TIAM1 是促进 NB 发生和转移还是具有抗癌作用, 仍需进一步探索。本研究通过免疫组化的方法

检测 NB 组织中 TIAM1 的表达, 探讨其是否与 NB 的发生发展相关。

### 1 资料和方法

**1.1 临床资料** 选取 2010–2015 年就诊于我院病理诊断明确、肿瘤标本保存完好、治疗规律, 随访资料完整的病例 61 例, 其中节细胞神经瘤 9 例, NB 52 例。根据 INSS 分期标准, NB 的例数为: 1 期 9 例, 2 期 6 例, 3 期 12 例, 4 期 24 例, 4S 期 1 例。定义 1、2 及 4S 期为低分期 (低危组) 15 例, 3、4 期为高分期 (中-高危组) 37 例。年龄大于 18 个月者 35 例, 小于 18 个月者 17 例; 起源于颈、腹部者 38 例, 胸、盆腔者 14 例; 初治时肿瘤大小  $\leq 6$  cm 者 26 例,  $> 6$  cm 者 26 例; 低分化者 31 例, 高分化者 21 例。采用门诊、电话随访, 统计终点为复发, 死亡或随访终点, 末次随访时间为 2017 年 9 月 1 日, 随访时间为 4~74 个月, 中位随访时间为 33 个月, 截至随访结束时, 死亡 6 例。

**1.2 免疫组化染色** 免疫组化通用试剂盒 PV-6000 操作说明进行, 简要步骤如下: 切片脱蜡水化;

作者简介 聂红艳 (1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 儿童肿瘤基础与临床; 通信作者: 赵强, E-mail: qiangzhao169@sina.com。

枸橼酸抗原修复;内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min;滴加 TIAM1 一抗(abcam),4 ℃过夜,室温复温后,滴加酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 复合物,37 ℃,20 min;DAB 显色,苏木素复染、盐酸酒精返红、氨水返蓝,脱水、透明、封片。

**1.3 结果判读** 对上述 61 例患者石蜡切片进行 TIAM1 免疫组化染色,至少 2 名专业儿童病理科医师,采用半定量分级法评分对染色结果做出判断,根据呈阳性反应的细胞所占比例和反应强度进行综合评价。阳性表达表现为棕黄色颗粒。采用双盲法,用染色强度和同样物镜视野下的阳性细胞数乘积作为评分;染色强度分为四个等级:0 分=无色;1 分=浅黄色;2 分=棕黄色;3 分=棕褐色;阳性细胞数分四个等级为:1 分=1%~10%;2 分=11%~50%;3 分=51%~75%;4 分=76%~100%,两者的乘积作为评分数值,定义评分小于等于 4 分为低表达,评分大于 4 分为高表达。

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,采用 Log-rank  $\chi^2$  检验进行单因素分析,Kaplan-Meier 法分析患者生存率, $P<0.05$  为差异有统计学意义。“\*”代表  $P<0.05$ ,”\*\*”代表  $P<0.01$ 。

## 2 结果

**2.1 TIAM1 在肿瘤组织中的表达** 在 NB 组织中,TIAM1 弱表达(评分 $\leq 4$ )16 例,TIAM1 强表达(评分 $>4$ )36 例。而在这 9 例节细胞神经瘤中 8 例为高表达,1 例为低表达,阳性率为 88.9%。TIAM1 蛋白主要定位于细胞浆中,但也可表达在细胞核内<sup>[6]</sup>(图 1),并且其表达与 NB 分化程度相关( $\chi^2=4.493$ , $P=0.034$ ),分化程度越高的组织其表达越强。TIAM1 与年龄( $\chi^2=0.243$ , $P=0.622$ ),发病部位( $\chi^2=0.043$ , $P=0.835$ ),初治时肿瘤大小( $\chi^2=1.444$ , $P=0.229$ ),INSS 分期( $\chi^2=0.843$ , $P=0.358$ ),危险度分

组( $\chi^2=1.926$ , $P=0.165$ ),转移( $\chi^2=2.066$ , $P=0.151$ ),LDH 水平( $\chi^2=0.222$ , $P=0.638$ )无关(表 1)。

表 1 TIAM1 蛋白表达与 NB 患者临床病理指标之间的关系

Tab 1 Relationship between the expression of TIAM1 protein and the clinical characteristics of patients with neuroblastoma

| 临床病理特征  | TIAM1 |     | $\chi^2$           | $P$                |
|---------|-------|-----|--------------------|--------------------|
|         | 低表达   | 高表达 |                    |                    |
| 年龄      |       |     | 0.243 <sup>a</sup> | 0.662              |
| ≤18 月   | 6     | 11  |                    |                    |
| >18 月   | 11    | 25  |                    |                    |
| 部位      |       |     | 0.043 <sup>a</sup> | 0.835              |
| 颈、腹部    | 12    | 26  |                    |                    |
| 胸、盆腔    | 4     | 13  |                    |                    |
| 肿瘤大小    |       |     | 1.443 <sup>a</sup> | 0.229              |
| ≤6 cm   | 10    | 16  |                    |                    |
| >6 cm   | 6     | 20  |                    |                    |
| INSS 分期 |       |     | 0.843 <sup>a</sup> | 0.358              |
| 1、2、4S  | 6     | 9   |                    |                    |
| 3、4     | 10    | 27  |                    |                    |
| 危险度     |       |     | 1.926 <sup>a</sup> | 0.165              |
| 低危组     | 6     | 7   |                    |                    |
| 高危组     | 10    | 29  |                    |                    |
| 分化      |       |     | 4.493 <sup>a</sup> | 0.034 <sup>a</sup> |
| 低分化     | 13    | 18  |                    |                    |
| 中高分化    | 3     | 18  |                    |                    |
| 转移      |       |     | 2.066 <sup>a</sup> | 0.151              |
| 是       | 11    | 17  |                    |                    |
| 否       | 5     | 19  |                    |                    |
| LDH     |       |     | 0.048 <sup>a</sup> | 0.826              |
| ≤1 000  | 12    | 28  |                    |                    |
| >1 000  | 4     | 8   |                    |                    |

a.  $n<5$  时采用 Fisher 检验;LDH:乳酸脱氢酶,INSS:国际神经母细胞瘤分期;在这 9 例节细胞神经瘤中 8 例为高表达,1 例为低表达,阳性率为 88.9%

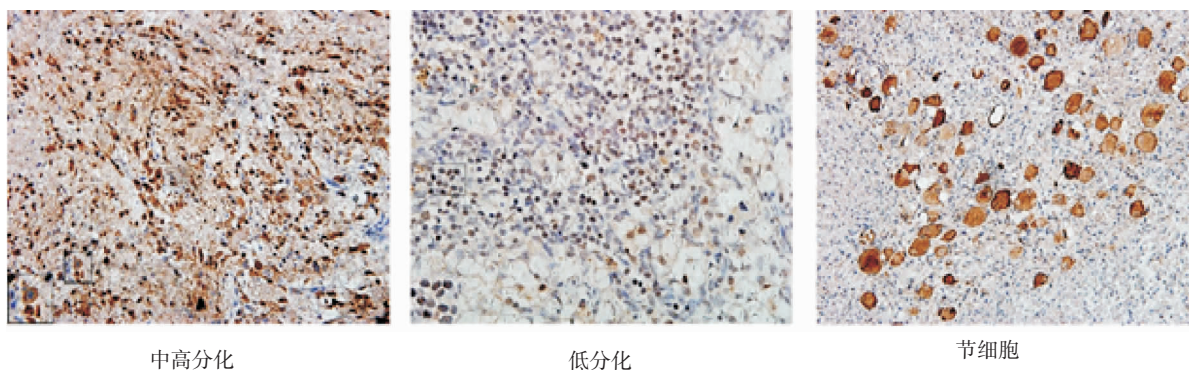


图 1 免疫组化法检测神经母细胞瘤中 TIAM1 表达情况(IHC×200)

Fig 1 The expression of TIAM1 in neuroblastoma(IHC×200)

## 2.2 生存分析 见图2。

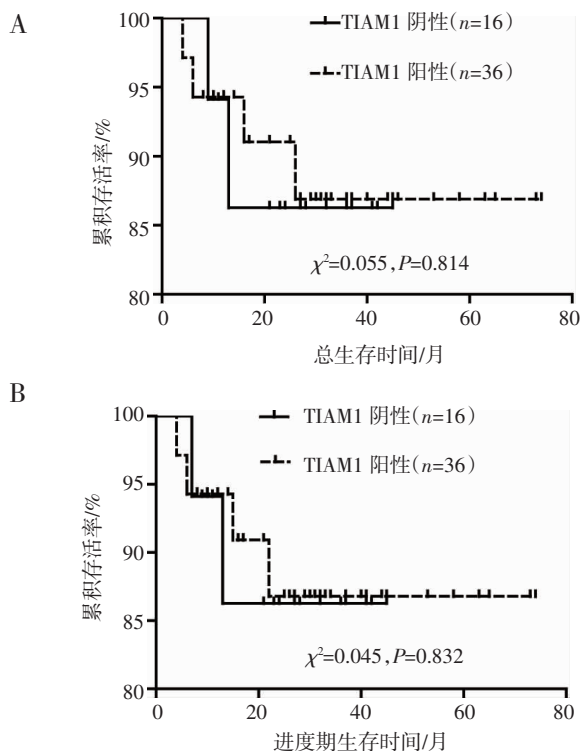


图2 NB患者TIAM1阴性表达和阳性表达生存分析

Fig 2 Survival analysis of negative and positive expression in TIAM1 in NB patients

## 3 讨论

神经母细胞瘤是儿童时期最常见的颅外实体肿瘤,全基因组相关研究(GWAS)发现,NB是一种复杂的遗传性疾病,其形成与等位基因的多态性相关,包括MYCN扩增、ALK突变,LIN28B基因多态性,ATRX基因组重排等<sup>[9]</sup>。而与NB发生或预后密切相关的基因,主要仍是MYCN扩增以及ALK突变<sup>[10]</sup>。研究表明,Aurora-A对MYCN蛋白表达具有促进作用<sup>[11]</sup>,其过表达与预后不良神经母细胞瘤密切相关<sup>[12]</sup>。但对于Aurora-A抑制剂的研究现今主要仍在动物模型中,例如,有学者证实:在N-MYCN扩增的小鼠模型中,MLN8054和MLN8237这两种Aurora-A抑制剂,能促进肿瘤消退和延长小鼠生存期<sup>[13-14]</sup>。另一方面,克唑替尼作为ALK基因突变靶向药物在非小细胞肺癌得到广泛运用并取得显著疗效,但由于NB中存在ALK激活点突变,使其对克唑替尼存在敏感性差异,甚至于ALK中某些点突变会对其产生内源性耐药<sup>[15]</sup>。并且,MYCN扩增型约占NB的18%~38%,ALK突变主要存在于家族性神经母细胞瘤患者中<sup>[11,16]</sup>。因此,NB的治疗遇到瓶颈,需要发现新的基因、新的有效治疗手段来解决这一难题。

在神经系统的发育过程中,轴突生长是通过生长锥的延伸和迁移而发生的,而TIAM1正向调控生长锥中层脂膜和丝状伪足<sup>[17]</sup>,并且可通过激活Rac1、抑制Rho-GTP酶(Rac1促进轴突生长,而Rho激活导致突起回缩),影响轴突形成,促进神经元分化<sup>[18]</sup>。研究证实:TIAM1参与星形胶质细胞突起的极化生长,其缺失导致突起中微管细胞骨架紊乱<sup>[19]</sup>。同时,TIAM1不仅参与Reelin蛋白介导的施旺细胞的迁移<sup>[20]</sup>,还与多巴胺能神经元的分化和发育相关<sup>[21]</sup>。因此,可以得出TIAM1在神经系统发育中起着至关重要的作用。

神经母细胞瘤来源于原始神经嵴细胞,主要是因神经干细胞分化为神经节细胞和施旺细胞障碍,产生了其他未成熟的神经元细胞(神经母细胞、节细胞性神经母细胞)而导致NB的发生<sup>[22]</sup>。同时,NB是一种常见的具有自发性消退趋势的疾病,这种自发性消退与分化主要存在于低危患者以及4S期患者中<sup>[23]</sup>。研究发现:神经生长因子受体TrkA在低危型及4S期NB中呈高表达状态,且当肿瘤微环境存在NGF(神经生长因子)时,其可引起NB分化<sup>[24]</sup>。此外,TrkA还可增强由Ras介导的细胞变性所引起的NB自我消退效应<sup>[25]</sup>。

TrkA能促进Rac1活化使TIAM1活性增强。而TIAM1与Ras协同作用能介导NGF诱导的RAC1活化,产生RAC1依赖的信号级联,导致突起生长所需的细胞骨架重塑。因此,TIAM1可作为NGF依赖性突起生长的信号介导因子<sup>[26]</sup>。Trk受体可激活Ras-GTP酶,使其在神经元存活和分化中起关键作用。其中,TrkC受体酪氨酸激酶作用于NT3(神经营养因子-3),激活Rac1和cdc42促进施旺细胞迁移,而TIAM1为其中的关键介质<sup>[27]</sup>。综上所述,可以看出TIAM1在神经分化中具有重要作用,而这种作用极可能通过TrkA/Ras/Tiam1/Rac1这条通路实现。TrkA、Ras对NB分化起促进作用,因此,TIAM1作为Ras的下游效应分子以及Rac/Rho通路的调节者,其可能在NB分化中具有重要作用。

上述免疫组化验证了TIAM1与NB分化相关,且分化程度越高的组织表达越强(图1)。因此,可以推断出TIAM1参与并促进NB的分化,可以作为NB治疗的潜在靶点。但通过对这52例样本进行生存分析发现,TIAM1蛋白高表达与患者3年生存率无明显相关性(图2),这可能与样本量少有关,下一步需扩大样本量并进一步探讨TIAM1在NB分化中的作用并了解其是否能成为NB潜在治疗靶点。



## 参考文献:

- [1] Boissier P, Huynh-Do U. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 483
- [2] Wu Q Y, Wang Y, Tong J C, et al. Expression and clinical significance of Tiam1 gene in esophageal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 21229
- [3] Chen G, Lu L, Liu C, et al. MicroRNA -377 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting TIAM1 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0117714
- [4] Yang Y, Wu Q, Li N, et al. Upregulation of Tiam1 contributes to cervical cancer disease progression and indicates poor survival outcome[J]. *Hum Pathol*, 2018, 75: 179
- [5] Liu L, Wu B, Cai H, et al. Tiam1 promotes thyroid carcinoma metastasis by modulating EMT via Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(2): 532
- [6] Diamantopoulou Z, White G, Fadlullah M Z H, et al. TIAM1 Antagonizes TAZ/YAP Both in the Destruction Complex in the Cytoplasm and in the Nucleus to Inhibit Invasion of Intestinal Epithelial Cells[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(5): 621
- [7] Sanmartin E, Yanez Y, Fornes-Ferrer V, et al. TIAM1 variants improve clinical outcome in neuroblastoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45286
- [8] Cao Y N, Jin Y, Yu J P, et al. Clinical evaluation of integrated panel testing by next-generation sequencing for somatic mutations in neuroblastomas with MYCN unamplification[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49689
- [9] Matthay K K, Maris J M, Schleiermacher G, et al. Neuroblastoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16078
- [10] Bosse K R, Maris J M. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations [J]. *Cancer*, 2015, 122(1): 20
- [11] Aygun N. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance[J]. *Curr Pediatr Rev*, 2018, 14(2): 73
- [12] Ro main C, Paul P, Kim K W, et al. Targeting Aurora kinase -A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma[J]. *JPediatr Surg*, 2013, 49(1): 159
- [13] Brockmann M, Poon E, Berry T, et al. Small Molecule Inhibitors of Aurora-A Induce Proteasomal Degradation of N-Myc in Childhood Neuroblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(2): 357
- [14] Ham J, Costa C, Sano R, et al. Exploitation of the Apoptosis-Primed State of MYCN-Amplified Neuroblastoma to Develop a Potent and Specific Targeted Therapy Combination[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(2): 159
- [15] Infarinato N R, Park J H, Krytska K, et al. The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(1): 96
- [16] Mosse Y P, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene[J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 930
- [17] Demarco R S, Struckhoff E C, Lundquist E A. The Rac GTP exchange factor TIAM-1 acts with CDC-42 and the guidance receptor UNC-40/DCC in neuronal protrusion and axon guidance[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4): e1002665
- [18] Leeuwen F N, Kain H E, Kammen R A, et al. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho[J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(3): 797
- [19] Ellenbroek S I, Iden S, Collard J G. The Rac activator Tiam1 is required for polarized protrusional outgrowth of primary astrocytes by affecting the organization of the microtubule network[J]. *Small GTPases*, 2012, 3(1): 4
- [20] Pasten C, Cerda J, Jausoro I, et al. ApoER2 and Reelin are expressed in regenerating peripheral nerve and regulate Schwann cell migration by activating the Rac1 GEF protein, Tiam1[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 69: 1
- [21] Cajanek L, Ganji R S, Henriques-Oliveira C, et al. Tiam1 regulates the Wnt/Dvl/Rac1 signaling pathway and the differentiation of midbrain dopaminergic neurons[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(1): 59
- [22] Speleman F, Park J R, Henderson T O. Neuroblastoma: A Tough Nut to Crack[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2016, 35: e548
- [23] Brodeur G M, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(12): 704
- [24] Diede S J. Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 71
- [25] Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, et al. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(5): 358
- [26] Shirazi Fard S, Kele J, Vilar M, et al. Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9647.
- [27] Yamauchi J, Miyamoto Y, Tanoue A, et al. Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(41): 14889

(2018-05-10 收稿)