

· 论 著 ·

# 喉癌及癌旁组织小眼畸形相关转录因子基因表达及临床意义

王学昌<sup>1</sup>, 钱晓云<sup>2</sup>, 顾亚军<sup>2</sup>, 宋盼盼<sup>2</sup>, 沈晓辉<sup>2</sup>, 唐瑶<sup>3</sup>, 高下<sup>1,2</sup>

1. 南京医科大学鼓楼临床医学院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210008;

2. 南京大学医学院附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科 南京鼓楼医院耳鼻咽喉研究所, 江苏 南京 210008;

3. 南京大学医学院, 江苏 南京 210008

**摘要:** **目的** 分析喉癌及癌旁组织中小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF) mRNA 的表达情况,推测其临床意义。**方法** 收集 2014 年 3 月至 2016 年 6 月南京鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科就诊的 33 例患者喉癌及癌旁新鲜组织标本,提取组织 RNA,采用 qPCR 的方法检测 MITF mRNA 表达情况,收集患者的临床病理资料进行统计分析。**结果** 喉癌组织中 MITF mRNA 的  $\Delta Ct$  值( $10.01 \pm 4.61$ ) 高于相应的癌旁组织( $7.64 \pm 6.57$ ),MITF 在喉癌中的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P=0.016$ )。喉癌组织中的 MITF 基因表达在不同年龄( $P=0.259$ )、不同 T 分期( $P=0.118$ )、是否淋巴结转移( $P=1.000$ )、不同肿瘤部位( $P=0.079$ )、不同分化程度( $P=0.481$ )之间无统计学差异。但 MITF mRNA 在晚期(Ⅲ和Ⅳ期)喉癌患者中的表达明显高于早期(Ⅰ和Ⅱ期),差异有统计学意义( $P=0.039$ )。33 例喉癌组织中 MITF 低表达患者的中位总生存期为 29 个月(12~52 个月),高表达患者的中位总生存期为 30 个月(8~56 个月),低表达与高表达患者中位总生存期差异无统计学意义( $\chi^2=1.594, P=0.207$ )。**结论** 喉癌组织中 MITF mRNA 表达较癌旁组织高,且 MITF mRNA 在晚期喉癌患者组织中的表达高于早期患者,MITF 基因的表达可能与喉癌的发生发展相关。

**关键词:** 喉癌; 小眼畸形相关转录因子; 基因表达; 临床病理

**中图分类号:** R 739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)12-1609-04

## Expression and clinical significance of microphthalmia-associated transcription factor gene in laryngeal cancer and its adjacent tissues

WANG Xue-chang\*, QIAN Xiao-yun, GU Ya-jun, SONG Pan-pan, SHEN Xiao-hui, TANG Yao, GAO Xia

\*E. N. T. Department, Drum Tower School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Corresponding author: GAO Xia, E-mail: xiagaogao@hotmail.com

**Abstract: Objective** To analyze the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mRNA in laryngeal cancer and its adjacent tissues, and to speculate its clinical significance. **Methods** A total of 33 patients with laryngeal cancer who received treatment at Nanjing Drum Tower Hospital from March 2014 to June 2016 were selected, and their fresh specimens of laryngeal cancer and adjacent tissues were collected. Tissue RNA was extracted, expression of MITF mRNA was detected by qPCR, and clinicopathological data of patients were collected for statistical analysis. **Results** The  $\Delta Ct$  value of MITF mRNA in laryngeal carcinoma was significantly lower than that in the corresponding adjacent tissues ( $10.01 \pm 4.61$  vs  $7.64 \pm 6.57, P=0.016$ ). There was no significant difference in the expression of MITF mRNA in different age ( $P=0.259$ ), T stage ( $P=0.118$ ), lymph node metastasis ( $P=1.000$ ), tumor site ( $P=0.079$ ), and differentiation degree ( $P=0.481$ ). However, the expression of MITF mRNA in patients with stage III and IV laryngeal cancer was significantly higher than that in patients with stage I and II laryngeal cancer ( $P=0.039$ ). The median total survival time of 33 patients with low expression of MITF was 29 months (12-52 months), and that of the patients with high expression was 30 months (8-56 months), and there was no significant difference between the two groups ( $\chi^2=1.594, P=0.207$ ). **Conclusion** The expression of MITF gene in laryngeal cancer is higher than that in adjacent tissues, and the expression of MITF mRNA in advanced laryngeal cancer is higher than that in early laryngeal cancer. The

expression of MITF gene may be related to the occurrence and development of laryngeal cancer.

**Key words:** Laryngeal cancer; Microphthalmos-associated transcription factor; Gene expression; Clinicopathology

**Fund program:** Project of Strengthening Health through Science and Education in Jiangsu Province (ZDXKB2016015); Nanjing Health Young Talents Training Project (QRX17012)

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,其病理类型以喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)为主。2018 年全球新发喉癌病人 177 422 人(占有恶性肿瘤的 1%),94 771 人死于喉癌<sup>[1]</sup>。喉癌的发病率男性明显多于女性,约为 5.8/100 000:1.2/100 000,吸烟、饮酒及人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)等是喉癌发生发展的危险因素,喉癌目前的主要治疗方式是以手术、放疗和化疗为主的综合治疗<sup>[2]</sup>。但是,近 10 年来我国喉癌的 5 年生存率没有显著的变化<sup>[3]</sup>。小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)基因参与黑色素细胞的凋亡、增殖、细胞周期等过程<sup>[4]</sup>,该基因的突变可导致耳聋、眼睛小、皮肤色素沉着等,与黑色素瘤、Waardenburg 综合征和 Tietz 综合征的发生、发展相关<sup>[5]</sup>。据报道,MITF 的表达与黑色素瘤、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管细胞癌、前列腺癌相关<sup>[6-8]</sup>。目前 MITF 基因在喉癌中的表达情况尚未报道。本研究收集喉癌及癌旁组织标本,通过实时定量 PCR 检测喉癌及癌旁组织中 MITF 的基因表达情况,分析 MITF 基因表达与喉癌患者临床病理间的关系,旨在为喉癌的诊断及治疗提供新的线索。

## 1 资料与方法

**1.1 标本来源及患者临床资料** 收集 2014 年 3 月至 2016 年 6 月因原发性喉癌在南京鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科行手术治疗的 33 例原发性喉癌患者的喉癌及癌旁组织新鲜手术标本,33 例患者术前未行放疗等治疗,术后均经病理组织学确诊为喉鳞状细胞癌。所有患者均签署知情同意书,标本均经过临床伦理学审核。33 例患者中行全喉切除者 29 例(87.9%),部分喉切除者 4 例(12.1%);双侧颈淋巴结清扫者 16 例(48.5%),单纯右侧颈淋巴结清扫者 5 例(15.2%),单纯左侧颈淋巴结清扫者 8 例(24.2%),未行淋巴结清扫者 4 例(12.1%)。33 例患者均为男性;中位年龄为 66 岁,≥60 岁 23 例(69.7%),<60 岁 10 例(30.3%);按照 2010 版美国癌症联合会(AJCC)喉部肿瘤指南临床分期 I 期 4 例(12.1%),II 期 3 例(9.1%),III 期 10 例(30.3%),IV 期 16 例(48.5%);有淋巴结转移者 13 例(39.4%),无淋巴结转移者 20 例(60.6%);声门上

型肿瘤 14 例(42.4%),声门型 17 例(51.5%),声门下型 2 例(6.1%);肿瘤低分化型 13 例(39.4%),中分化型 17 例(51.5%),高分化型 3 例(9.1%)。

**1.2 检测试剂** 总 RNA 提取试剂 Trizol (Thermo Fisher Scientific, 15596018);逆转录试剂盒 Prime-Script™ RT Master Mix (Takara, RR036Q);荧光定量反转录 PCR 试剂盒 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara, RR420Q);GelStain (北京全式金生物技术, GS101-01);DEPC (Sigma 公司, D5758-25ML);Agarose (西班牙 Biowest, 91622)。

**1.3 qPCR 法检测 MITF mRNA 的表达** 扩增使用 TRIzol 提取样品总 RNA, mRNA 用随机引物反转录成 cDNA; miRNA 的 3' 末端多聚 A 尾 Poly(A),再使用 Anchored oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应,最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链;根据基因序列设计特异性引物,通过实时荧光定量 PCR,采用 SYBR GREEN 染料法,以 GAPDH 为内参,做 MITF mRNA 的相对定量检测。内参引物 GAPDH 上游引物序列为 5'-TAA GGA GAC AAG CGA ACC-3',下游引物为 5'-TGA GGA AAT GTA CCA CCC-3';目的基因 MITF 的上游引物序列为 5'-ATT CCA TCC ACG GGT CTC-3',下游引物为 5'-AAG GGT GTC GTC CAT CAG-3'。反应体系的配制(总体积 20 μl):TB Green™ Premix Ex Taq 10 μl;上游引物(10 μM) 0.4 μl;下游引物(10 μM) 0.4 μl;模板(cDNA) 2 μl;加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl。反应条件:扩增曲线:94 °C 30 s;94 °C 10 s,60 °C 12 s,72 °C 30 s 循环 45 次,72 °C 单点检测信号。溶解曲线:95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,连续检测信号。反应机器为荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche, Roche480)。每个样本设置 3 个复孔,保证复孔之间 Ct 值差 <0.5。

**1.4 数据采集** 采集所有 33 例喉癌患者的临床病理资料,随访截止日期为 2018-11-30,随访时间定义为病理确诊时间至末次有效随访时间。总生存期(OS)定义为病例确诊时间至死亡时间(如随访期间患者未死亡或者失访,则以末次有效随访时间为止)。

**1.5 统计学方法** 所有数据均应用 SPSS 23.0 进行分析。癌及癌旁表达量以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用配对样本 *t* 检验;定性资料以例(%)表示,率的比较采用

Fisher 精确概率法检验;生存分析用 Kaplan-Meier 法。 $P$  值均为双侧检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 MITF mRNA 在喉癌及癌旁组织中的表达情况  
以 GAPDH 为内参基因,比较喉癌及癌旁组织中 MITF mRNA 的相对表达量  $\Delta Ct$ 。33 对喉癌及癌旁组织标本成功检测出扩增,且目的基因的溶解曲线均一。结果显示,喉癌组织中 MITF mRNA 的  $\Delta Ct$  值 ( $10.01 \pm 4.61$ ) 高于相应的癌旁组织 ( $7.64 \pm 6.57$ ), MITF 在喉癌中的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P = 0.016$ )。见图 1。

2.2 MITF mRNA 表达与临床病理之间的关系  
计算出 33 例喉癌组织中 MITF 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值,以其中位数为界, < 中位数者定义为低表达,  $\geq$  中位数者定义为高表达。喉癌组织中的 MITF mRNA 表达在不同年龄 ( $P = 0.259$ )、不同 T 分期 ( $P = 0.118$ )、是否淋巴结转移 ( $P = 1.000$ )、不同肿瘤部位 ( $P = 0.079$ )、不同分化程度 ( $P = 0.481$ ) 之间无统计学差异。但 MITF 在晚期 (III 和 IV 期) 喉癌患者中的表达明显高于早期 (I 和 II 期),  $P = 0.039$ 。见表 1。

2.3 MITF mRNA 表达与生存状况之间的关系  
截至 2018-11-30, 33 例患者中有 18 例健在, 12 例已故, 低表达者 3 例失访, 随访成功率为 90.9%。33 例喉癌组织中 MITF 低表达患者的中位总生存期为 29 个月 (12 ~ 52 个月), 高表达患者的中位总生存期为 30 个月 (8 ~ 56 个月), 差异无统计学意义 ( $P = 0.207$ )。见图 2。

表 1 33 例喉癌组织 MITF mRNA 表达与临床病理之间的关系例 (%)

临床病理参数	MITF 表达情况		$P$ 值 <sup>a</sup>
	高表达 ( $n = 17$ )	低表达 ( $n = 16$ )	
年龄 (岁)			
< 60	7 (41.2)	3 (18.8)	0.259
$\geq 60$	10 (58.8)	13 (81.2)	
临床分期			
I ~ II	1 (5.9)	6 (37.5)	0.039
III ~ IV	16 (94.1)	10 (62.5)	
T 分期			
1 ~ 2	2 (11.8)	6 (37.5)	0.118
3 ~ 4	15 (88.2)	10 (62.5)	
淋巴结转移			
无	10 (58.8)	10 (62.5)	1.000
有	7 (41.2)	6 (37.5)	
肿瘤部位			
声门上	10 (58.8)	4 (25.0)	0.079
声门及声门下	7 (41.2)	12 (75.0)	
分化程度			
低	8 (47.1)	5 (31.3)	0.481
中高	9 (52.9)	11 (64.7)	

注:<sup>a</sup> 为 Fisher 精确概率法。

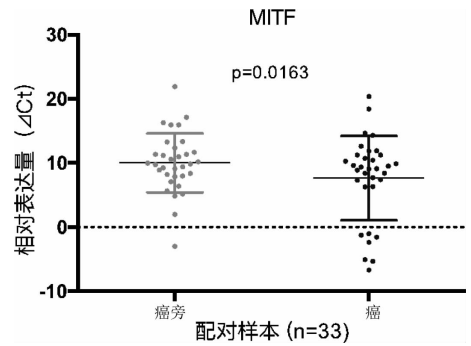


图 1 33 对喉癌及癌旁组织中 MITF mRNA 的表达情况

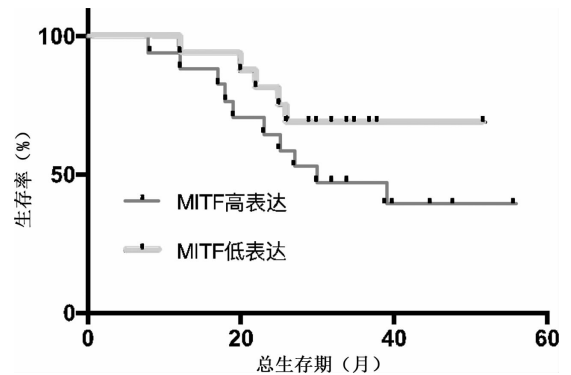


图 2 33 例喉癌组织样本中 MITF mRNA 高表达与低表达的生存曲线

## 3 讨论

喉癌是上呼吸道最常见的肿瘤,病理类型以鳞状细胞癌为主。喉癌的症状主要为声音嘶哑,晚期可出现呼吸困难,其诊断主要依赖电子喉镜及病理活检。近些年来随着内镜窄带成像术 (narrow band imaging, NBI) 的运用,大大提高了早期喉癌及喉癌术后复发的诊断率。但是目前喉癌的具体发病机制仍不明确,也缺乏特异性的肿瘤标记物,治疗主要是以手术为主、放化疗为辅的综合治疗<sup>[2]</sup>。随着 CO<sub>2</sub> 激光在临床的开展运用,早期喉癌的手术治疗创伤减小,多数声门型及声门上型喉癌避免了开放性手术。近期的研究发现低温等离子对于早期喉癌的治疗具有创伤小、恢复快、并发症少等优点,是一种有效可行的方法<sup>[9]</sup>。但是对于中晚期喉癌患者来说,喉部分乃至全喉切除术仍是主要治疗手段,喉癌术后出现的并发症,对患者的心理和生理都造成了巨大的伤害<sup>[10]</sup>。喉癌早期诊断的分子标记物、特异性的治疗靶点、患者的术后发声锻炼、营养状况、心理状态等也都是不容忽视的现实问题。

MITF 基因定位于 3 号染色体 3p12.3 ~ 3p14.1, 全长 228 900bp, 包含 23 个外显子, 共有 18 个转录本, 编码蛋白长度为 71 ~ 526 个氨基酸; 其编码的 MITF 蛋白质包含基本螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链结构特征的转录因子, 属于 Myc 转录因子超家族, 调节黑

色素细胞视网膜色素上皮细胞的分化和发育,并且还负责黑色素生成酶基因的色素细胞特异性转录<sup>[11-12]</sup>。MITF 基因被认为是黑色素瘤形成的关键基因,其突变可改变黑色素瘤的侵袭能力<sup>[13]</sup>。黑色素瘤细胞系中的 MITF 扩增伴随着 BRAF 突变和 p16 失活,异位 MITF 表达与 BRAF(V600E)突变体一起转化原代人黑色素细胞,在黑色素瘤致癌基因中起作用,而 MITF 活性的降低使黑色素瘤细胞对化学治疗剂敏感,因此将 MITF 与 BRAF 或细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂联合靶向可为黑色素瘤提供合理的治疗途径<sup>[13]</sup>。MITF 扩增在转移性疾病中更为普遍,并且与总体患者存活率降低相关<sup>[13]</sup>。黑色素瘤是一种高度耐化疗的肿瘤,最近研究显示 CDK7 抑制剂 THZ1 通过调节 MITF 和 SOX10 上的超增强子从而抑制黑色素瘤的生长<sup>[14]</sup>。MITF 突变也可导致耳聋、骨质流失、眼睛小,眼睛和皮肤色素沉着<sup>[5]</sup>。据报道 MITF 有着致癌和抑癌的双重作用。MITF 被认为是黑色素瘤和肾癌的致癌基因<sup>[6]</sup>;在肝细胞癌和胆管癌患者中检测出 MITF 高表达,并且与肝细胞癌患者的不良预后相关<sup>[7]</sup>。但是在前列腺癌中,MITF 却发挥着抑癌作用<sup>[8]</sup>。

喉癌的发病机制不明,缺乏早期诊断及术后随访的特异性肿瘤标记物,近些年来 5 年生存率也未见明显提升。MITF 参与多种肿瘤的发生发展,有着致癌与抑癌的双重作用。本研究结果显示,MITF 基因在喉癌组织中的表达高于癌旁组织,且 MITF 的高表达与患者的临床分期相关,晚期患者中 MITF 表达更高,提示着 MITF 高表达可能预示着患者预后不佳;生存曲线也能看出 MITF 高表达者生存期更短的趋势,但是生存分析的统计学分析却没有得到显著差异的结果。分析原因有可能是:(1)本研究的样本量偏小。本研究共收集并扩增了 33 对标本,还需要扩大样本进一步的研究验证。(2)本研究收集的晚期(Ⅲ和Ⅳ期)患者多于早期(Ⅰ和Ⅱ期)。因目前针对早期喉癌主要的治疗方法为 CO<sub>2</sub> 激光,肿瘤本身较小,再加上术中 CO<sub>2</sub> 激光的烧灼使得留取早期肿瘤标本变得异常困难。(3)随访时间不够长。本研究随访最长为 56 个月,最短为 8 个月,多数患者随访平均为 2 年左右,而且多数患者仍然存活,这可能是生存曲线趋势与统计学结果不一致的原因,后期还需进一步随访观察。

综上所述,本研究初步分析了 MITF 基因在喉癌及癌旁组织中的表达情况,发现 MITF mRNA 在喉癌

中的表达高于癌旁组织,且晚期患者中的表达高于早期患者。MITF 或许是喉癌诊断及治疗的一个重要靶点,其可能在喉癌的发生发展过程中起着重要的作用,但其具体作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):31-50.
- [3] Zeng H, Chen W, Zheng R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15; a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5):e555-e567.
- [4] Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, et al. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(1):27-40.
- [5] Moore KJ. Insight into the microphthalmia gene [J]. *Trends Genet*, 1995, 11(11):442-448.
- [6] Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma [J]. *Nature*, 2011, 480(7375):94-98.
- [7] Nooron N, Ohba K, Takeda K, et al. Dysregulated expression of MITF in subsets of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 242(4):291-302.
- [8] Valcarcel-Jimenez L, Macchia A, Martín-Martín N, et al. Integrative analysis of transcriptomics and clinical data uncovers the tumor-suppressive activity of MITF in prostate cancer [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(10):1041.
- [9] 郑伟昌, 张巧真, 蒋慈英, 等. 低温等离子消融术治疗早期声门型喉癌的疗效分析 [J]. *中华全科医学*, 2016, 14(4):561-562, 624.
- [10] Keszte J, Danker H, Dietz A, et al. Course of psychiatric comorbidity and utilization of mental health care after laryngeal cancer: a prospective cohort study [J]. *Eur Archs Otorhinolaryngol*, 2017, 274(3):1591-1599.
- [11] Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(2):352-358.
- [12] Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563:28-34.
- [13] Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma [J]. *Nature*, 2005, 436(7047):117-122.
- [14] Eliades P, Abraham BJ, Ji Z, et al. High MITF Expression Is Associated with Super-Enhancers and Suppressed by CDK7 Inhibition in Melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(7):1582-1590.

收稿日期:2019-02-23;修回日期:2019-03-18 编辑:王娜娜