

mTOR 及 Tfr1 mRNA 在腮腺黏液表皮样癌组织中的表达及与预后的关系

常攀辉¹, 艾克白尔·吐日洪², 李崑崑³

(1.首都医科大学附属北京口腔医院 综合科,北京 100006;

2.和田地区人民医院 口腔科,新疆 和田 848000;

3.唐山市工人医院 口腔科,河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:探讨雷帕霉素靶蛋白(rapamycin target protein,mTOR) mRNA、转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, Tfr1) mRNA 在腮腺黏液表皮样癌中的表达及与预后的关系。方法:选取 2013 年 6 月—2015 年 7 月唐山市工人医院口腔科收治的 35 例腮腺黏液表皮样癌患者为研究对象,检测腮腺组织 mTOR 及 Tfr1 mRNA 的相对表达量,分析 mTOR 及 Tfr1 mRNA 与腮腺黏液表皮样癌患者临床病理及预后的关系。采用 SPSS 19.0 软件包对数据进行统计学处理。结果:腮腺黏液表皮样癌组织 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量显著高于癌旁组织($P<0.05$)。mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量与肿瘤浸润深度、肿瘤级别、临床分期及淋巴结转移相关 ($P<0.05$)。预后良好组患者,mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量显著低于预后不良组患者($P<0.05$)。mTOR mRNA 评估患者预后不良的 AUC 为 0.815,高于 Tfr1 mRNA 的 AUC(0.813),两者联合检测评估患者预后不良的 AUC 为 0.922,高于两者单独检测。Cox 单因素及多因素分析显示,分化程度、TNM 分期、mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 与腮腺黏液表皮样癌患者预后不良关系密切。结论:腮腺黏液表皮样癌患者 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 相对表达量是否显著升高,可用于评估患者预后。

[关键词] 雷帕霉素靶蛋白 mRNA;转铁蛋白受体 1 mRNA;腮腺黏液表皮样癌;预后;相对表达量

[中图分类号] R739.8

[文献标志码] A

DOI: 10.19439/j.sjos.2019.05.010

Expression of mTOR mRNA and Tfr1 mRNA in mucoepidermoid carcinoma of parotid gland and their relationship with prognosis CHANG Pan-hui¹, AKBEL Turgesjon², LI Wei-wei³. (1.Department of General Dentistry, Beijing Stomatological Hospital affiliated to Capital Medical University, Beijing 100006;2. Department of Stomatology, Hotan People's Hospital, Hotan 848000, Xinjiang Uygur Autonomous Region;3. Department of Stomatology, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China)

[Abstract] **PURPOSE:** To investigate the expression of rapamycin target protein (mTOR) mRNA and transferrin receptor 1 (Tfr1) mRNA in mucoepidermoid carcinoma of parotid gland and its relationship with prognosis. **METHODS:** From June 2013 to July 2015 in Tangshan Workers' Hospital, 35 patients with mucoepidermoid carcinoma of parotid gland were selected. The relative expression of mTOR and Tfr1 mRNA in mucoepidermoid carcinoma of parotid gland was detected. The relationship between mTOR mRNA, Tfr1 mRNA and the clinicopathology and prognosis of mucoepidermoid carcinoma of parotid gland was analyzed using SPSS19.0 software package. **RESULTS:** The relative expression levels of mTOR mRNA and Tfr1 mRNA in mucoepidermoid carcinoma of parotid gland were significantly higher than those in adjacent tissues($P<0.05$). The relative expression of mTOR mRNA and Tfr1 mRNA was correlated with invasion depth, tumor grade, TNM stage and cervical lymphatic metastasis ($P<0.05$). The relative expressions of mTOR and Tfr1 in patients with good prognosis were significantly lower than those in patients with poor prognosis ($P<0.05$). The AUC of mTOR mRNA was 0.815, higher than that of Tfr1 mRNA (0.813). The AUC of mTOR mRNA combined with Tfr1 mRNA was 0.922, higher than that of mTOR mRNA and Tfr1 mRNA alone. Cox univariate and multivariate analysis showed that differentiation, TNM stage, mTOR mRNA and Tfr1 mRNA were closely related to poor prognosis of mucoepidermoid carcinoma of parotid

[收稿日期] 2019-01-16;[修回日期] 2019-05-10

[基金项目] 北京市科技新星计划(Z151100000315045)

[作者简介] 常攀辉(1978-),女,硕士,副主任医师

[通信作者] 常攀辉,E-mail:jxwtwq@163.com

©2019 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

gland. **CONCLUSIONS:** The relative expression of mTOR mRNA and Tfr1 mRNA in patients with mucoepidermoid carcinoma of parotid gland was significantly increased, which can be used to evaluate the prognosis of patients.

[Key words] Rapamycin target protein mRNA; Transferrin receptor 1 mRNA; Mucoepidermoid carcinoma of parotid gland; Prognosis; Relative expression

Shanghai J Stomatol, 2019, 28(5): 499-503.

腮腺黏液表皮样癌是腮腺常见的恶性肿瘤,近年来发病率呈逐年上升趋势^[1]。相关研究^[2]指出,腮腺黏液表皮样癌治疗后约有 20%~60% 的患者复发,严重影响预后。因此,早期了解患者预后情况对合理制定治疗方案,改善患者预后具有重要意义。但目前临床上缺乏灵敏、准确的标志物用于评估预后。雷帕霉素靶蛋白(rapamycin target protein, mTOR) mRNA 为调控自噬的重要因子^[3],转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, Tfr1) mRNA 为调控细胞铁运输的重要因子^[4]。有报道^[5-6]证实, mTOR 及 Tfr1 mRNA 在肺癌、甲状腺癌等组织中高表达,并与肿瘤预后关系密切,但关于两者与腮腺黏液表皮样癌预后的关系尚少见报道。本研究通过检测腮腺黏液表皮样癌组织中 mTOR 及 Tfr1 mRNA 的相对表达量,探讨其与腮腺黏液表皮样癌患者预后的关系,以期为临床提供参考。

1 病例与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 6 月—2015 年 7 月唐山市工人医院口腔科收治的 35 例腮腺黏液表皮样癌患者为研究对象,均经病理学诊断确诊。排除标准:①合并其他口腔疾病;②术前发生远处转移;③合并其他恶性肿瘤。其中,男 20 例,女 15 例,平均年龄(52.63±5.82)岁。所有患者均对本研究知情同意并签署知情同意书。本研究获得医院医学伦理委员会批准同意。

1.2 实时定量 PCR 检测腮腺组织中 mTOR 及 Tfr1 mRNA 的相对表达量

取腮腺组织,用液氮研磨,加入 Trizol 溶液,提取总 RNA。采用核酸蛋白仪和琼脂糖电泳对提取的 RNA 进行分析。取总 RNA 4 μL, 82 °C 水浴 5 min,加入反转录反应液,44 °C 孵育 60 min,终止,留取产物待用。扩增参数,95 °C、10 min,60 °C、50 s,72 °C 延伸 50 s,72 °C 最终延伸 10 min,10 °C 最终保存。以 GAPDH 为内参,采用公式 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH})$ 及 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物
mTOR	上游:5'-CACACCACGCCAGTCAAA-3'
	下游:5'-AATCTACAGCACCAAGAGC-3'
Tfr1	上游:5'-GATAACCTGGCTGACCCGATFC-3'
	下游:5'-CTCTAGATTA'ITCCAAGTTG-3'
GAPDH	上游:5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'
	下游:5'-CCTGGAAGATGCTGATGGGATT-3'

1.3 随访

采用电话随访对腮腺黏液表皮样癌患者进行 3 年随访,了解患者预后情况。随访起始时间为 2013 年 6 月 10 日,截止时间为 2018 年 7 月 3 日。死亡及复发为预后不良。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件包对数据进行统计学处理,服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,配对资料采用配对样本 *t* 检验;计数资料用 *n*(%) 表示,采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 mTOR 及 Tfr1 mRNA 评估腮腺黏液表皮样癌患者预后的效能,采用 Cox 单因素及多因素回归分析影响腮腺黏液表皮样癌患者生存预后的相关因素。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同腮腺组织中 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量比较

腮腺黏液表皮样癌组织中 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量均显著高于癌旁组织(*P*<0.05,表 2)。

表 2 不同腮腺组织中 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
 Table 2 Comparison of relative expression of mTOR, Tfr1 mRNA in different parotid tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mTOR mRNA	Tfr1 mRNA
腮腺黏液表皮样癌	35	2.23±0.42	0.06±0.01
癌旁组织	35	1.44±0.51	0.02±0.01
<i>t</i>		7.074	16.733
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 mTOR 及 Tfr1 mRNA 与腮腺黏液表皮样癌患

者临床病理的关系

根据 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 相对表达量的中位数,将患者分为 mTOR mRNA 高表达、低表达组及 Tfr1 mRNA 高表达、低表达组。mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 表达与浸润深度、肿瘤级别、临床分期相关($P<0.05$),而与年龄、性别、肿瘤位置、面神经麻痹无关($P>0.05$,表 3)。

2.3 腮腺黏液表皮样癌患者随访结果

对 35 例患者进行为期 3 年的电话随访,随访期间 6 例(17.14%)患者预后不良,其中 2 例(5.71%)治疗后复发,4 例(11.43%)死亡,29 例(82.86%)预后良好。

2.4 预后良好及预后不良患者 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量比较

结果见表 4。由表 4 可见,预后不良组患者 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量均显著高于预后良好组($P<0.05$)。

2.5 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 及联合检测评价腮腺黏液表皮样癌患者预后不良的价值

单指标诊断,mTOR mRNA 诊断效能高于 Tfr1 mRNA,但差异无统计学意义($Z=0.149,P=0.988$)。

表 4 预后良好及预后不良患者 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of relative expression of mTOR, Tfr1 in patients with good and poor prognosis ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	mTOR mRNA	Tfr1 mRNA
预后良好组	29	2.05±0.42	0.05±0.02
预后不良组	6	3.10±0.53	0.08±0.03
t 值		4.565	3.035
P		<0.001	0.002

mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 联合检测诊断腮腺黏液表皮样癌患者预后不良的 Logistic 回归方程为 $F=-18.634+0.128\times\text{mTOR mRNA}-0.158\times\text{Tfr1 mRNA}$,其诊断腮腺黏液表皮样癌患者预后不良的效能高于 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 单指标诊断 ($Z=2.134,P=0.033;Z=1.557,P=0.120$),详见图 1、表 5。

2.6 影响腮腺黏液表皮样癌预后不良的相关因素

将年龄、性别、肿瘤位置、浸润深度、分化程度、TNM 分期、面部神经麻痹、mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 纳入 Cox 单因素分析,结果显示,浸润深度、分化程度、TNM 分期、mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 与患者预后不良有关。进一步 Cox 多因素回归分析显示,分化

表 3 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 与腮腺黏液表皮样癌患者临床病理的关系[n(%)]

Table 3 Relationship between mTOR, Tfr1 mRNA and clinicopathology of mucoepidermoid carcinoma of parotid gland [n(%)]

项目	n	mTOR mRNA		t/F 值	P 值	Tfr1 mRNA		t/F 值	P 值
		高表达(n=27)	低表达(n=8)			高表达(n=30)	低表达(n=5)		
年龄(岁)				0.062	0.803			0.172	0.679
>60	17	13(76.47)	4(23.53)			15(88.23)	2(11.77)		
≤60	18	14(77.78)	4(22.22)			15(83.33)	3(16.67)		
性别				1.634	0.201			1.244	0.265
男	20	17(85.00)	3(15.00)			16(80.00)	4(20.00)		
女	15	10(66.67)	5(33.33)			14(93.33)	1(6.76)		
位置				1.793	0.181			0.480	0.489
左侧	16	14(73.68)	2(26.32)			13(81.25)	3(18.75)		
右侧	19	13(68.42)	6(31.58)			17(89.47)	2(10.53)		
浸润深度				7.630	0.006			5.411	0.020
深层	23	21(91.30)	2(8.70)			22(95.65)	1(4.35)		
表层	12	6(50.00)	6(50.00)			8(66.67)	4(33.33)		
分化程度				12.280	0.002			7.636	0.022
高分化	7	2(28.57)	5(71.43)			4(57.14)	3(42.06)		
中分化	11	9(81.82)	2(18.18)			9(81.82)	2(18.18)		
低分化	17	16(94.12)	1(5.88)			17(100.00)	0(0.00)		
TNM 分期				9.243	0.002			18.802	0.001
I~II 期	8	3(37.50)	5(62.50)			4(50.00)	4(50.00)		
III~IV 期	27	24(88.89)	3(11.11)			26(96.30)	1(3.70)		
面神经麻痹				0.397	0.529			5.411	0.020
是	23	17(73.91)	6(26.09)			22(95.65)	1(4.35)		
否	12	10(83.33)	2(16.37)			8(66.67)	4(33.33)		

表 5 mTOR 及 Tfr1 mRNA 评价腮腺黏液表皮样癌患者预后不良后的效能

Table 5 Efficacy of mTOR, Tfr1 mRNA to evaluate poor prognosis in patients with mucoepidermoid carcinoma of parotid gland

指标	AUC	95%CI	敏感度(%)	特异度(%)	约登指数	截断点
mTOR mRNA	0.815	0.650~0.924	90.91	64.29	0.552	2.32
Tfr1 mRNA	0.813	0.649~0.923	68.18	92.86	0.610	0.06
mTOR mRNA+Tfr1 mRNA	0.922	0.783~0.985	95.45	78.57	0.740	—

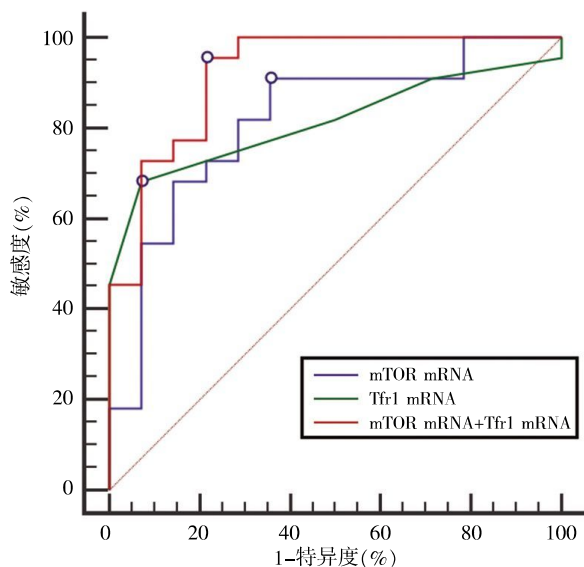


图 1 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 评价腮腺黏液表皮样癌患者预后不良的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of mTO, Tfr1 mRNA in evaluating poor prognosis of mucoepidermoid carcinoma of parotid gland

程度、TNM 分期、mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 为影响腮腺黏液表皮样癌患者预后不良的独立因素(表 6)。

3 讨论

腮腺黏液表皮样癌为临床上常见的恶性肿瘤,由

表 6 影响腮腺黏液表皮样癌预后不良的因素分析

Table 6 Analysis of factors affecting poor prognosis in patients with mucoepidermoid carcinoma of parotid gland

项目	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄(>60/≤60 岁)	0.962	0.468~1.113	0.185	—	—	—
性别(男/女)	0.815	0.440~1.024	0.253	—	—	—
位置(左侧/右侧)	0.904	0.512~1.206	0.406	—	—	—
浸润深度(深层/浅表)	1.605	0.947~1.832	0.024	1.104	0.603~1.649	0.093
分化程度(低分化/高分化、中分化)	1.924	1.344~2.940	0.013	1.793	1.137~2.401	0.037
TNM 分期(III~IV/I~II 期)	2.439	1.603~3.469	0.005	2.004	1.205~3.117	0.014
面神经麻痹(是/否)	1.004	0.563~1.595	0.157	—	—	—
mTOR mRNA(≥2.32/<2.32)	2.337	1.268~3.483	0.007	2.239	1.483~3.427	0.008
Tfr1 mRNA(≥0.06/<0.06)	2.559	1.682~3.650	0.001	2.119	1.441~3.140	0.010

注:年龄(>60 岁为 1, ≤60 岁为 0);性别(男为 1, 女为 0);位置(左侧为 1, 右侧为 0);浸润深度(深层为 1, 浅表为 0);分化程度(低分化为 1, 高分化、中分化为 0);TNM 分期(III~IV 期为 1, I~II 期为 0);mTOR mRNA(≥2.32 为 1, <2.32 为 0);Tfr1 mRNA(≥0.06 为 1, <0.06 为 0)

于其解剖位置特殊,病理类型较多,患者术后常出现肿瘤复发及转移,严重威胁患者的生命健康^[7-8]。腮腺黏液表皮样癌的发生、发展是一个复杂的病理过程,多种因子参与其调控。大量研究^[9]表明,mTOR 及 Tfr1 mRNA 参与多种肿瘤的发生、发展,并与患者预后密切相关,但关于两者与腮腺黏液表皮样癌患者预后的关系尚少见报道。本研究通过分析 mTOR 及 Tfr1 mRNA 在腮腺黏液表皮样癌组织中的表达情况,探讨其与腮腺黏液表皮样癌患者预后的关系。

Tfr 为广泛存在于人体细胞中的 II 型跨膜糖蛋白,由 2 个同源的二聚体交联而成。Tfr 的主要功能是介导铁元素转移,可根据体内环境改变,影响铁的吸收,进而促进细胞凋亡^[10]。目前有研究^[11-12]指出,Tfr1 mRNA 在某些肿瘤中的表达增加,如慢性淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤等。mTOR mRNA 为介导自噬的重要信号分子,其在体内功能的平衡失调与肿瘤形成密切相关^[13]。本研究显示,腮腺黏液表皮样癌 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量显著高于癌旁组织,提示两者可能与肿瘤的发生相关。结合临床病理特征研究发现,mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 的表达与浸润深度、肿瘤级别、TNM 分期相关,提示 mTOR

mRNA、Tfr1 mRNA 可能参与腮腺黏液表皮样癌的进展。本研究通过对患者进行随访,了解患者预后情况,并比较不同预后患者 mTOR 及 Tfr1 mRNA 的相对表达量,结果显示,预后不良患者 mTOR 及 Tfr1 mRNA 相对表达量均高于预后良好患者,提示 mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 可能与腮腺黏液表皮样癌患者预后密切相关,或可作为评估患者预后的标志物。进一步利用 ROC 曲线分析 mTOR 及 Tfr1 mRNA 评估患者预后不良的价值,结果显示,mTOR 及 Tfr1 mRNA 评估患者预后不良的价值均较高。为提高预测的准确性,减少误诊及漏诊率,将两者联合检测用于评估患者预后,结果发现,联合检测的效能高于单指标检测。同时,本研究对影响患者预后不良的因素进行分析,发现分化程度、TNM 分期与腮腺黏液表皮样癌患者不良预后密切相关,与既往研究结果^[14-15]一致。而 mTOR 及 Tfr1 mRNA 高表达表明两者的平衡被打破,造成肿瘤组织新生血管增加,肿瘤发展迅速,危及患者生命健康,因此对此类患者应给予密切关注。

综上所述,mTOR mRNA、Tfr1 mRNA 均与腮腺黏液表皮样癌的发生、发展密切相关,可作为腮腺黏液表皮样癌患者预后的指标。课题组后续将扩大样本量、进行多中心研究,进一步验证上述研究结论。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:常攀辉负责选题、实验设计、数据分析及论文撰写;艾克白尔·吐日洪参与部分实验和数据整理;李崑崑负责病例收集、标本检测和论文修改。

[参考文献]

- [1] 童国勇, 余周庆, 戈春城. 彩超引导下的粗针穿刺活检术在腮腺肿瘤诊断中的应用[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(3):108-110.
- [2] Rajasekaran K, Stubbs V, Chen J, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: a national cancer database study[J]. Am J Otolaryngol, 2018, 39(3):321-326.
- [3] Kissing S, Rudnik S, Damme M, et al. Disruption of the vacuolar-type H⁺-ATPase complex in liver causes Mtorc1-independent accumulation of autophagic vacuoles and lysosomes[J]. Autophagy, 2017, 13(4):670-685.
- [4] Li H, Choesang T, Bao W, et al. Decreasing Tfr1 expression reverses anemia and hepcidin suppression in 2-thalassemic mice[J]. Blood, 2017, 129(11):1514-1526.
- [5] Peng L, Song L, Liu C, et al. piR-55490, inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling [J]. Tumor Biol, 2016, 37(2):2749-2756.
- [6] Magro G, Cataldo I, Amico P, et al. Aberrant expression of Tfr1/CD71 in thyroid carcinomas identifies a novel potential diagnostic marker and therapeutic target[J]. Thyroid, 2011, 21(3):267-277.
- [7] Vasudevan G, Bishnu A, Bmk S, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: limitations and pitfalls on FNA [J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(5):ER04-ER06.
- [8] Sobral APV, Loduca SVL, Kowalski LP, et al. Immunohistochemical distinction of high-grade mucoepidermoid carcinoma and epidermoid carcinoma of the parotid region [J]. Oral Oncol, 2002, 38(5):437-440.
- [9] Matthew EM, Hart LS, Astrinidis A, et al. The p53 target Plk2 interacts with TSC proteins impacting mTOR signaling, tumor growth, and chemosensitivity under hypoxic conditions [J]. Cell Cycle, 2009, 8(24):4168-4175.
- [10] Kawabata H, Tong X, Kawanami T, et al. Analyses for binding of the transferrin family of proteins to the transferrin receptor 2[J]. Br J Haematol, 2015, 127(4):464-473.
- [11] Smilevska T, Stamatopoulos K, Samara M, et al. Transferrin receptor-1 and 2 expression in chronic lymphocytic leukemia[J]. Leuk Res, 2006, 30(2):183-189.
- [12] Nakamura Y, Nakamichi N, Takarada T, et al. Transferrin receptor -1 suppresses neurite outgrowth in neuroblastoma Neuro2A cells[J]. Neurochem Int, 2012, 60(5):448-457.
- [13] 陈柯君, 程辉, 王健民, 等. mTOR 通路下游核心分子的 mRNA 表达水平与初发 AML 患者临床特征的关系[J]. 中国临床医学, 2016, 23(1):17-21.
- [14] Hicks MJ, El-Naggar AK, Flaitz CM, et al. Histocytologic grading of mucoepidermoid carcinoma of major salivary glands in prognosis and survival: a clinicopathologic and flow cytometric investigation[J]. Head Neck, 2010, 17(2):89-95.
- [15] Shi L, Chen XM, Wang L, et al. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome[J]. Cancer, 2007, 109(8):1523-1531.