

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.004
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190423.1206.020.html(2019-04-24)

Tiam1 持续过表达促进多脏器细胞增殖能力的体内研究

于莉娜^{1,2}, 田 燕^{1,2}, 翁雅倩¹, 吴晶晶¹, 布威阿丽耶^{1,2}, 杨敏慧^{1,2}
(南方医科大学:1. 南方医院病理科;2. 基础医学院病理学系, 广州 510515)

[摘要] **目的** 以 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1(Tiam1)转基因小鼠及裸鼠为实验载体,探讨 Tiam1 过表达在细胞增殖中的功能及作用。**方法** 将 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠及野生型 ICR 小鼠多器官组织取材、包埋、制片并进行病理形态学观察,免疫组织化学检测增殖标志物 Ki-67 的表达;利用裸鼠皮下成瘤实验观察 Tiam1 过表达对结直肠癌细胞株 HT29 的体内增殖能力的影响。**结果** Tiam1^{+/+} 转基因小鼠的结直肠、胃、肺、肾脏以及睾丸组织均较野生型小鼠表现出更为旺盛的增殖能力;Tiam1 稳定过表达能够显著促进结直肠癌细胞株 HT29 裸鼠皮下肿瘤增殖能力,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** Tiam1 持续过表达能够在体内水平促进小鼠多脏器细胞及结直肠癌细胞的增殖能力。

[关键词] T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1;增殖;转基因小鼠;裸鼠
[中图法分类号] R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1813-04

In vivo study on Tiam1 continuous overexpression for promoting cell proliferation of multiple organs

YU Lina^{1,2}, TIAN Yan^{1,2}, WENG Yaqian¹, WU Jingjing¹, Buwei Aliye^{1,2}, YANG Minhui^{1,2}
(1. Department of Pathology, Nanfang Hospital; 2. Faculty of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the playing function and effect of Tiam1 in cell proliferation with Tiam1 transgenic mice and nude mice as the experimental vectors. **Methods** The multiple organs tissues of Tiam1^{+/+} transgenic mice and wild ICR mice conducted sampling, embedding, preparing section and pathologic morphologic observation. The cell proliferation ability was detected by combining proliferation marker Ki-67 immunohistochemistry. The influence of Tiam1 overexpression on the in vivo proliferation ability of colorectal cancer cell line HT29 was observed by using the nude mice subcutaneous tumor formation experiment. **Results** The tissues of colorectum, stomach, lung, kidney and testis of Tiam1 transgenic mice showed more vigorous proliferation ability compared with the wild mice. The Tiam1 stable overexpression of colorectal cancer cell line HT29 could significantly promote the ability of nude mice subcutaneous tumor proliferation, and the difference was statistically significant($P<0.01$). **Conclusion** Continuous overexpression of Tiam1 can promote in vivo proliferation ability of mice multiple organs cells and colorectal cancer cells, which provides the new target point and direct and powerful theoretical basis for the deep mechanism of cellular proliferation and tumor progression.

[Key words] Tiam1; proliferation; transgenic mice; nude mice

肿瘤的发生发展是一个长期的、多因素、多步骤的综合调控过程,细胞增殖活性改变是其重要环节,通过检测细胞增殖活性来评价肿瘤恶性度和预后已成为一种趋势^[1]。T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1(T lymphoma invasion and metastasis, Tiam1)是目前最受重视的一种鸟嘌呤核苷酸转换因子之一,参与细胞的多种生物学功能^[2],是一种重要的促癌基因^[3]。本研究以 Tiam1 转基因小鼠及裸鼠为实验载体,探讨活体状态下 Tiam1 在增殖中的功能及作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠为南方医科大学病理学系自建并保种,ICR 小鼠及 SPF 级

4~6 周龄裸鼠购自南方医科大学实验动物中心。实验用小鼠均饲养于标准屏障动物房,保持环境温度 22 ℃,湿度 55%,给予标准颗粒鼠饲料和无菌饮水。稳定过表达 Tiam1 的人结直肠癌细胞株 HT29-Tiam1 及阴性对照细胞株 HT29-Vector 均为南方医科大学病理学系自建并冻存。

1.2 主要试剂 兔抗鼠 Ki-67 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,免疫组化 EnVision 两步法试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司,常规细胞培养相关试剂均购自广州一科科技有限公司。

1.3 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠多脏器组织病理形态学观

作者简介:于莉娜(1977—),副教授,博士,主要从事肿瘤病理方面的研究。

察 以颈椎脱臼法随机处死 6 只 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠及 6 只野生型 ICR 小鼠,解剖取材全身各脏器,组织块经 10% 中性甲醛固定过夜后,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,苏木素-伊红染色,中性树脂封片。对比观察体内持续过表达 Tiam1 对小鼠各脏器组织细胞增殖能力的影响。

1.4 免疫组化检测小鼠 Ki-67 蛋白表达 免疫组化两步法检测小鼠多器官组织中 Ki-67 蛋白表达情况。石蜡标本常规脱蜡至水、抗原修复,3% H₂O₂ 孵育阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,Ki-67 抗体以 1 : 500 于 4 ℃ 冰箱孵育过夜,PBS 洗涤后滴加二抗室温孵育 30 min,DAB 显色,水洗;苏木素衬染,脱水,封片,镜检。免疫组化结果判断标准:Ki-67 阳性染色定位于细胞核,呈黄褐色,背景清晰,每张玻片于高倍镜下计数 5 个视野,随机计数 1 000 个细胞,其中无阳性着色视为阴性(-),阳性细胞数小于 25% 为+,阳性细胞数 25% ~ <50% 为++,阳性细胞数 50% ~ <75% 为+++,阳性细胞数大于或等于 75% 为++++。

1.5 细胞培养及皮下成瘤实验 人结直肠癌细胞 HT29-Tiam1 及 HT29-Vector 均用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基常规培养于 37 ℃、5% CO₂ 培

养箱,取处于对数生长期的细胞胰酶消化制成单细胞悬液并计数。取裸鼠 6 只,分别将两种细胞悬液取 5×10⁶ 个细胞注射于裸鼠右背侧皮下,5 d 后每日测量并记录肿瘤体积,计算体积公式^[4]为 V=L×W×H/2 (V 表示体积;L 表示长;W 表示宽;H 表示高)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠多脏器病理形态学观察 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠和野生型 ICR 小鼠经解剖后,多组织器官 HE 切片观察发现,Tiam1^{+/+} 转基因小鼠的结直肠、胃、肺、肾脏以及睾丸均较对照组表现出更显著的增殖能力(图 1)。与野生型小鼠相比,Tiam1^{+/+} 转基因小鼠的结直肠及胃黏膜均显著增厚,固有层腺体层次增多,排列拥挤,上皮细胞核大、深染,部分区域细胞核上移;肺脏中支气管上皮增生,被覆的纤毛柱状上皮由假复层转变为复层,细胞密集深染,局部纤毛消失,部分区域肺泡间隔增宽;肾脏中近曲小管数量增多,排列拥挤,细胞核增大,染色质增粗;睾丸的曲精管密集排列,间质受压,各级生精细胞显著增生,管腔充盈。

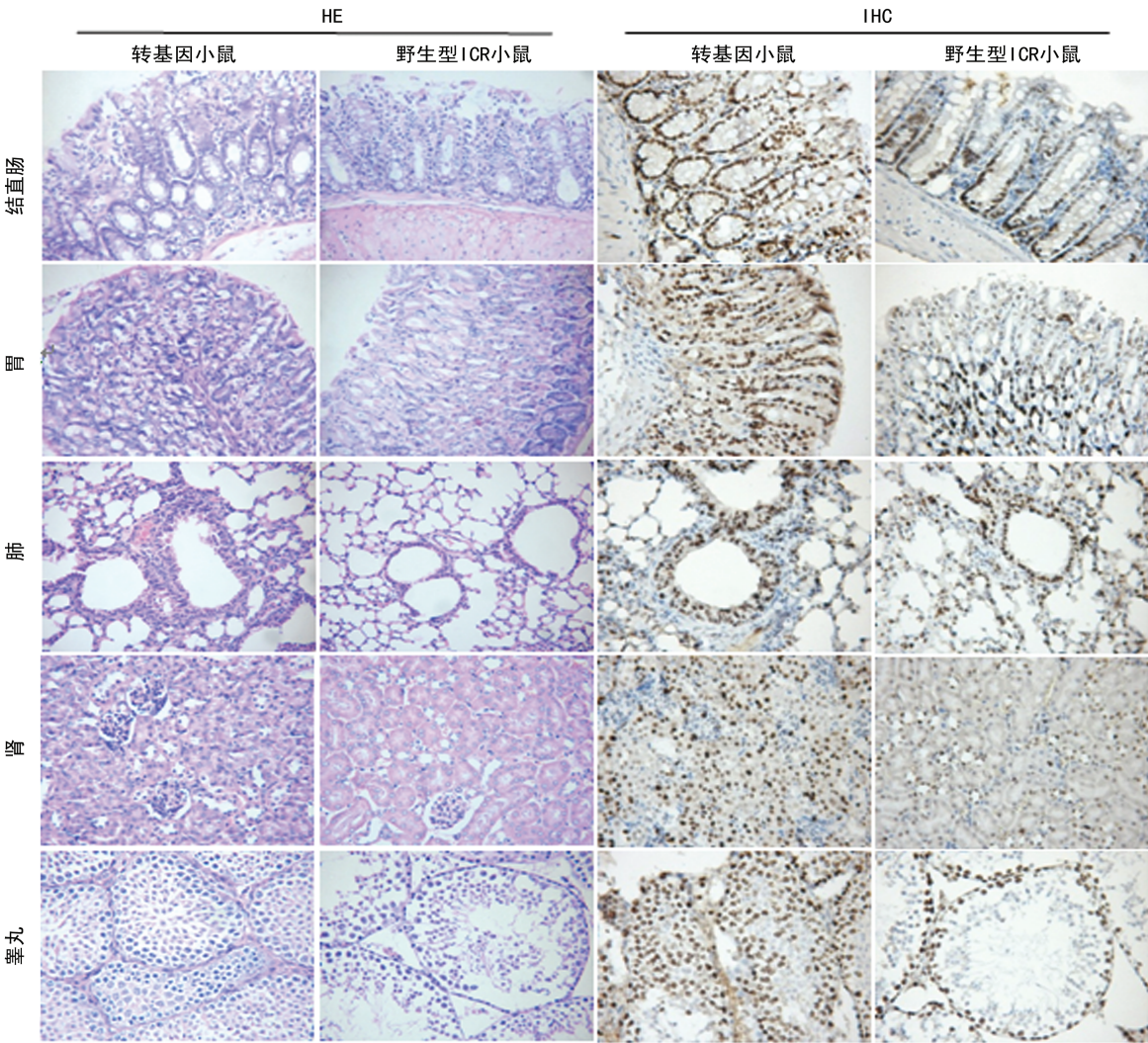
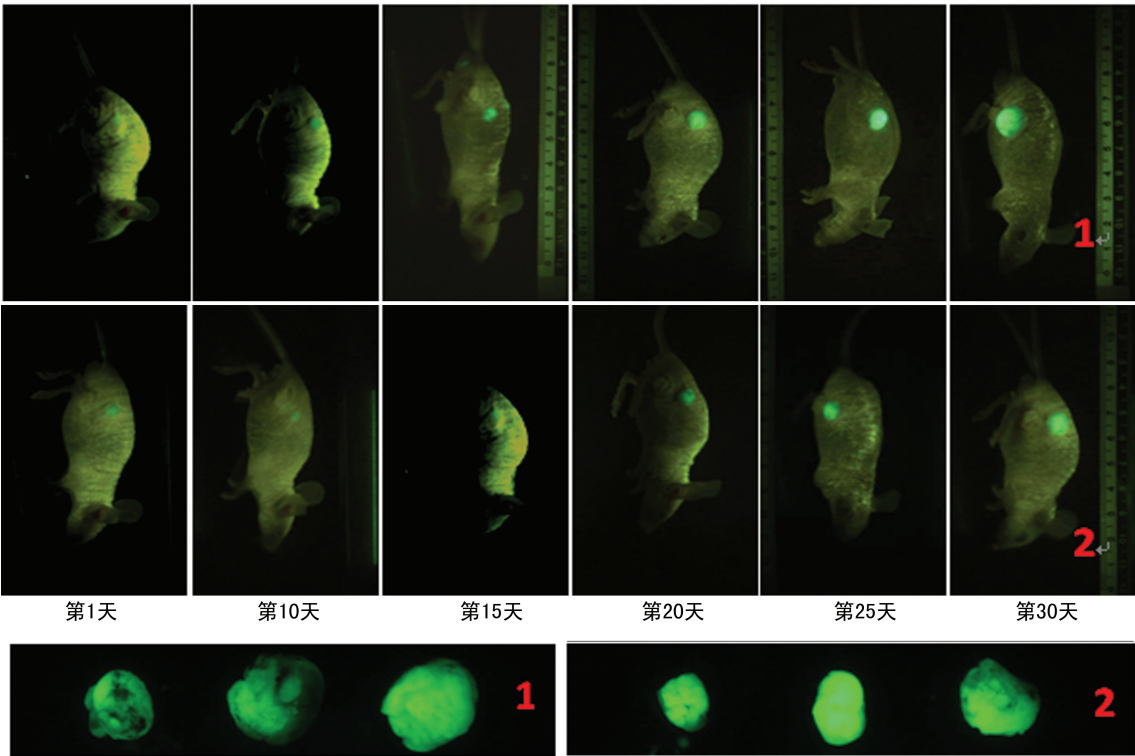


图 1 通过组织形态学及 Ki-67 免疫组化检测 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠与野生型小鼠多脏器细胞增殖情况

表 1 HT29-Tiam1 和 HT29-Vector 细胞裸鼠皮下移植瘤增殖能力的比较($\bar{x}\pm s$)										
组别	<i>n</i>	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d	Sum	<i>F</i>	<i>P</i>
HT29-Tiam1	3	2.542±0.564	5.688±1.033	14.083±1.876	42.917±2.173	101.167±8.148	262.167±29.310	71.427±94.922	220.618	0.000
HT29-Vector	3	2.917±0.361	5.313±0.541	9.917±1.010	19.167±1.443	46.063±2.479	116.667±18.215	33.340±41.572	184.865	0.000
Sum		2.729±0.470	5.500±0.765	12.000±2.650	31.042±13.113	73.615±30.659	189.417±82.628	52.384±74.758	71.189*	0.001*
<i>t</i>		0.970	0.557	3.386	15.767	11.206	7.303	342.665*		53.040
<i>P</i>		0.387	0.607	0.028	0.000	0.000	0.002	0.000*		0.002#

*:主效应的 F 统计量和 P 值;#:交互效应的 F 统计量和 P 值



1:皮下注射 HT29-Tiam1 组裸鼠;2:皮下注射 HT29-Vector 组裸鼠

图 2 体式荧光显微镜实时观测 HT29-Tiam1^{+/+} 和 HT29-Vector 组裸鼠皮下成瘤情况

2.2 小鼠多脏器 Ki-67 蛋白表达检测 Tiam1^{+/+} 转基因小鼠和野生型小鼠多组织器官中 Ki-67 均有不同程度的表达,但是在结直肠、胃、肺、肾脏以及睾丸中, Tiam1^{+/+} 转基因小鼠的 Ki-67 蛋白表达水平明显高于野生型小鼠对应组织(图 1)。结果显示,转基因小鼠的结直肠及胃黏膜 Ki-67 蛋白表达散布于上皮细胞全层,而野生型小鼠主要位于黏膜基底部;转基因小鼠的肺支气管及肾近曲小管上皮细胞 Ki-67 均呈广泛表达,而野生型小鼠的表达量及表达范围均显著减少;转基因小鼠的睾丸的初级精母细胞、次级精母细胞均表达 Ki-67,而野生型小鼠仅基底部的初级精母细胞呈 Ki-67 表达阳性。

2.3 Tiam1 过表达对裸鼠皮下成瘤能力的影响 裸鼠体内成瘤实验结果显示,HT29-Tiam1 细胞株在裸鼠皮下增殖能力显著强于 HT29-Vector 细胞株,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 1、图 2。

3 讨 论

细胞增殖是生命的重要特征,是所有细胞延续生命的主要形式,是在转录、翻译、翻译后修饰等多层面、多种蛋白质参与的精细调控过程。肿瘤细胞异常增殖的根本原因在于基因水平上失去了对增殖的正常调控,因此对细胞增殖的研究一直是肿瘤学研究领

域的热点^[1]。已有研究表明,Tiam1 是多种肿瘤的促癌基因^[4],与淋巴瘤、结直肠癌^[5]、肺癌^[6]、乳腺癌^[7]等肿瘤细胞的发生发展密切相关^[8]。但是体外基因功能研究往往不能完全模拟基因在体作用形式和机制,Tiam1 转基因小鼠模型的引入能够在活体内接近“真实”地再现 Tiam1 过表达所导致的直接后果,把复杂系统简化,为 Tiam1 的体内功能研究提供了有力的工具。

本研究结果显示,Timal 基因持续过表达能够促进小鼠体内多组织器官的细胞增殖能力。Tiam1^{+/+} 转基因小鼠的结直肠及胃黏膜上皮、支气管上皮及肺泡上皮、肾小管上皮以及睾丸各级生精细胞均呈现显著的增殖过度,表现为细胞排列密集、细胞核大、深染等。Ki-67 免疫组化进一步验证了本研究的结果,Ti-am1^{+/+} 转基因小鼠的 Ki-67 阳性率均显著高于野生型小鼠。由于细胞的持续增殖状态是肿瘤早期发生的始动环节,因此提示 Tiam1 在肿瘤发生的启动过程中可能发挥较为重要的作用。目前在人结直肠癌^[9]、胃癌^[10]、肺癌^[11]、肾透明细胞癌^[12]及睾丸精原细胞瘤中均有 Tiam1 促进肿瘤发生的相关报道,与本研究结果较一致。

为了进一步探讨 Timal 与肿瘤细胞增殖的相关

性,本研究选取了本室自建并保存的结直肠癌细胞株 HT29-Tiam1 和 HT29-Vector 进行了裸鼠皮下成瘤实验,结果显示 Tiam1 基因同样能够显著促进结直肠癌细胞在裸鼠体内的增殖。因此笔者推测,Tiam1 作为增殖调控基因,Tiam1 在正常细胞→过度增殖→恶性转化→肿瘤进展这一演进过程中担任重要的角色。目前已有研究表明,Tiam1 可能通过以下机制发挥其促癌作用:(1)特异性的激活 β -cat 信号转导通路促进细胞的增殖及诱导肿瘤的发生^[13];(2)通过参与 Tiam1-Rac 信号转导通路增强抗凋亡蛋白的合成,从而促进细胞的存活^[14];(3)抑制转录因子 c-myc 的表达,促进细胞增殖,抑制凋亡^[15]。

综上所述,本研究以 Tiam1 转基因小鼠及裸鼠为载体在活体内整体水平探讨了 Tiam1 在细胞增殖调控中的重要作用,具有更高的“真实性”,为细胞增殖研究提供了新的靶点和直接有力的理论依据。随着肿瘤增殖动力学研究的不断深入,Tiam1 对细胞增殖及肿瘤发生发展的相关调控机制必将逐渐被阐明。同时,Tiam1 转基因小鼠作为具有自发高增殖活性的模式动物,能够为细胞增殖与肿瘤演进的深层机制研究提供新的理想平台,推动相关领域的研究进展。

参考文献

- [1] EVAN G I,VOUSDEN K H. Proliferation,cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*,2001,411(6835):342-348.
- [2] MINARD M E,KIM L S,PRICE J E,et al. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration,invasion,adhesion and tumor progression [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2004,84(1):21-32.
- [3] MICHIELS F,HABETS G G,STAM J C,et al. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion [J]. *Nature*,1995(375):338-340.
- [4] RYGIEL T P,MERTENS A E,STRUMANE K,et al. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation [J]. *J Cell Sci*,2008(121):1183-1192.

(上接第 1812 页)

- [7] JONES J P,ENGLEMAN E P,NAJARIAN J S. Systemic fat embolism after renal homotransplantation and treatment with corticosteroids[J]. *N Engl J Med*,1965,273(27):1453-1458.
- [8] KAWAI K,MARUNO H,WATANABE Y,et al. Fat necrosis of osteocytes as a causative factor in idiopathic osteonecrosis in heritable hyperlipemic rabbits[J]. *Clin Orthop Relat Res*,1980(153):273-282.
- [9] HU C G,LIU Q,CHEN J C,et al. Cytological changes of femoral head necrosis induced by glucocorticoid[J]. *Chinese J Rehabil*,2006,10(1):97-99.
- [10] HONG D,CHEN H X,GE R S,et al. The biological roles of extracellular and intracytoplasmic glucocorticoids in skeletal cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2008,111(3/5):164-170.

- [5] YU L N,ZHANG Q L,LI X,et al. Tiam1 transgenic mice display increased tumor invasive and metastatic potential of colorectal cancer after 1,2-dimethylhydrazine treatment [J]. *PLoS One*,2013,8(9):e73077.
- [6] HUANG Z,SUN S,YANG C,et al. TIAM1 inhibits lung fibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. *Exp Ther Med*,2017,14(5):4254-4262.
- [7] XU K,TIAN X,OH S Y,et al. The fibroblast Tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis [J]. *Breast Cancer Res*,2016,18(1):14.
- [8] BOISSIER P,HUYNH D U. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling[J]. *Cell Signal*,2014,26(3):483-491.
- [9] WANG B,LI W,LIU H,et al. miR-29b suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer via down regulating Tiam1 expression and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Death Dis*,2014(5):1335.
- [10] LI Z,YU X,WANG Y,et al. By down regulating TIAM1 expression,microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth[J]. *Oncotarget*,2015,6(19):17559-17569.
- [11] 雷淑慧,周梅,胡兴胜. Tiam1 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *重庆医学*,2011,31(27):2776-2778.
- [12] 孟庆泽,乔保平,宫珊珊,等. 肾透明细胞癌组织中 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2012,47(1):66-69.
- [13] 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):532-540.
- [14] ZHOU H,KANN M G,MALLORY E K,et al. Recruitment of Tiam1 to semaphoring 4D activates rac and enhances proliferation,invasion,and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Neoplasia*,2017,19(2):65-74.
- [15] HOFBAUER S W,KRENN P W,GANGHAMMER S,et al. Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance,but not motility,of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*,2014,123(14):2181-2188.

(收稿日期:2018-12-03 修回日期:2019-02-19)

- [11] ALAM I,OAKES D K,REILLY A M,et al. Overexpression of WNT16 does not prevent cortical bone loss due to glucocorticoid treatment in mice[J]. *JBM R Plus*,2018,3(4):e10084.
- [12] JIN Q H,ZHANG F,YAN T G,et al. C/EBPalpha regulates SIRT1 expression during adipogenesis[J]. *Cell Res*,2010,20(4):470-479.
- [13] AHMAD F,SOELAIMAN I N,RAMLI E S,et al. Histomorphometric changes in the perirenal adipocytes of adrenalectomized rats treated with dexamethasone[J]. *Clinics (Sao Paulo)*,2011,66(5):849-853.
- [14] CHOI C I. Astaxanthin as a Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) modulator: Its therapeutic implications[J]. *Mar Drugs*,2019,17(4):E242.

(收稿日期:2018-11-27 修回日期:2019-02-09)