

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.022

Bcl-6 共抑制因子样蛋白及 E 钙黏蛋白在胃癌中的表达及相关性分析

王金泗,陈晓耕,林孟波
(福建省立医院肿瘤外科,福州 350001)

摘要:目的 检测 Bcl-6 共抑制因子样蛋白 1(BCORL1)及 E 钙黏蛋白(E-cadherin)在胃癌及对应的癌旁组织中的表达情况,分析二者表达的相关性。**方法** 收集 58 例胃癌及对应癌旁组织,运用免疫组织化学技术检测 BCORL1 及 E-cadherin 的表达情况,分析二者表达的相关性。**结果** BCORL1 在胃癌组织中的表达显著高于对应的癌旁组织(60.3% vs. 17.2%, $P=0.000$),而 E-cadherin 在胃癌组织中的表达显著低于对应的癌旁组织(27.6% vs. 63.8%, $P=0.000$);BCORL1 及 E-cadherin 表达与肿瘤组织病理分化、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期相关($P<0.05$);胃癌组织中 BCORL1 与 E-cadherin 表达呈负相关($r=-0.571$, $P=0.002$)。**结论** 胃癌组织中 BCORL1 高表达与恶性临床病理参数相关,并与 E-cadherin 表达呈负相关,提示 BCORL1 可能通过转录抑制 E-cadherin,促进胃癌进展和转移。

关键词:胃肿瘤;Bcl-6 共抑制因子样蛋白 1;E 钙黏蛋白;侵袭转移;临床意义
中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)20-2603-03

The expression of BCORL1 and E-cadherin in gastric carcinoma and their correlation analysis

Wang Jinsi, Chen Xiaogeng, Lin Mengbo

(Department of Surgical Oncology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of BCORL1 and E-cadherin and their correlation analysis in gastric carcinoma. **Methods** We freshly collected 58 samples of surgically resected paired gastric carcinoma and normal tumor-adjacent tissues and detected BCORL1 and E-cadherin expression in the samples using immunohistochemical staining. The correlation between BCORL1 and E-cadherin protein expression was analysed. **Results** The protein expression of BCORL1 in gastric carcinoma tissues was significantly upregulated compared to those of the normal tumor-adjacent tissues(60.3% vs. 17.2%, $P=0.000$), but expression of E-cadherin in gastric carcinoma tissues was significantly lower than those in the normal tumor-adjacent tissues(27.6% vs. 63.8%, $P=0.000$). Clinicopathological analysis suggested that EphA2 and E-cadherin protein expression were associated with histopathological differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and TNM stage($P<0.05$). BCORL1 was significantly negative correlated with E-cadherin protein in gastric carcinoma($r=-0.571$, $P=0.002$). **Conclusion** The high-expression of BCORL1 is correlated with malignant clinicopathological characteristics, and BCORL1 is negative associated with E-cadherin, suggesting that BCORL1 promotes tumor progression and metastasis through transcriptional regulating E-cadherin in gastric carcinoma.

Key words: gastric neoplasms; BCL6 corepressor-like 1; E-cadherin; invasion and metastasis; clinicopathological feature

肿瘤生物学研究显示恶性肿瘤的发生是一个多步骤的过程并涉及许多基因修饰,细胞与细胞之间黏附缺失与肿瘤进展和侵袭转移相关,该过程涉及包括小窝蛋白(caveolin-1)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)和 β 连环蛋白(β -catenin)在内的许多细胞膜分子和基因^[1-4]。E-cadherin 主要参与调节上皮细胞与细胞之间黏附,与肿瘤的侵袭转移能力密切相关,在胃癌和卵巢癌等许多恶性肿瘤中,E-cadherin 表达下调或缺失是侵袭性肿瘤的重要特征,并与患者不良预后相关^[5]。Bcl-6 共抑制因子样蛋白 1(BCL6 corepressor-like 1, BCORL1)是近期研究证实的一种转录共抑制因子,其与组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)活性相关,BCORL1 通过与 C-末端结合蛋白(CtBP)协同或单独与 E-cadherin 启动子结合,从而抑制 E-cadherin 基因转录^[6]。本课题拟通过免疫组织化学染色技术检测 BCORL1 和 E-cadherin 在胃癌及对应癌旁组织中的表达,分析其与胃癌临床病理参数的相关性及两者表达的相关性,初步探讨 BCORL1 及 E-cadherin 在胃癌发生发展、侵袭转移中的作用,为胃癌治疗提供新

的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 58 例胃癌及对应癌旁组织来源于 2007 年 1 月至 2009 年 10 月本院病理科保存的手术切除标本,其中男 49 例,女 9 例,年龄 29~78 岁,平均(59.6 \pm 10.4)岁。中分化管状腺癌和黏液癌归为分化型肿瘤,实体低分化腺癌、非实体低分化腺癌及印戒细胞癌归为未分化癌,组织病理学诊断:分化型腺癌 14 例,低分化腺癌 42 例,未分化癌 2 例。TNM 分期参考国际抗癌联盟(UICC)分类(6 版):Ⅰ期 9 例,Ⅱ期 7 例,Ⅲ期 17 例,Ⅳ期 25 例。浸润深度分为黏膜、黏膜下、肌层和浆膜下层。所有患者术前均未行放射、化疗及免疫治疗,本研究通过本院伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色技术检测组织中 BCORL1 及 E-cadherin 表达 采用标准生物素-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法对 4 μ m 石蜡切片进行染色。切片二甲苯脱蜡及

梯度乙醇再水化之后,在 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中煮沸 20 min 进行抗原修复,3%双氧水封闭内源性过氧化物酶,3%牛血清清蛋白封闭 1 h 之后,将 1:100 稀释的兔抗人 BCORL1 多克隆抗体(HPA031775,美国 Sigma)和兔抗人 E-cadherin 单克隆抗体(#3195,美国 Cell Signaling)加于标本后,置于湿盒内 4 ℃过夜。滴加生物素标记的二抗工作液,37 ℃温箱孵育 20 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,孵育 30 min。滴加 DAB 显色,苏木素轻度复染,盐酸乙醇脱色,稀氨水反蓝,梯度乙醇脱水至透明。显微镜下观察、成像系统拍照,统计分析实验结果。

1.2.2 免疫组织化学染色评估 所有切片由两位病理科医生独立进行半定量评分,用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分,染色强度分为 4 等级:阴性 0 分;弱阳性 1 分;中度 2 分;强阳性 3 分;阳性细胞百分比分级如下:阳性细胞小于或等于 5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51~75%为

3 分,>75%为 4 分。染色强度和阳性细胞百分比评分相乘大于或等于 1 分则认为 BCORL1 或 E-cadherin 阳性表达^[7]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验分析,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胃癌及对应癌旁组织中 BCORL1 和 E-cadherin 的表达

对收集的 58 例胃癌及对应癌旁组织进行 BCORL1 和 E-cadherin 免疫组织化学染色,阳性染色为棕黄色或棕褐色,BCORL1 表达主要定位在胞质和胞膜,E-cadherin 表达主要定位于胞膜,见图 1。BCORL1 和 E-cadherin 在胃癌组织中的阳性表达率分别为 60.3%(35/58)和 27.6%(16/58),而在对应癌旁组织 BCORL1 和 E-cadherin 的阳性表达率分别为 17.2%(10/58)和 63.8%(37/58),两组差异有统计学意义($\chi^2=22.692,P=0.000;\chi^2=15.321,P=0.000$)。

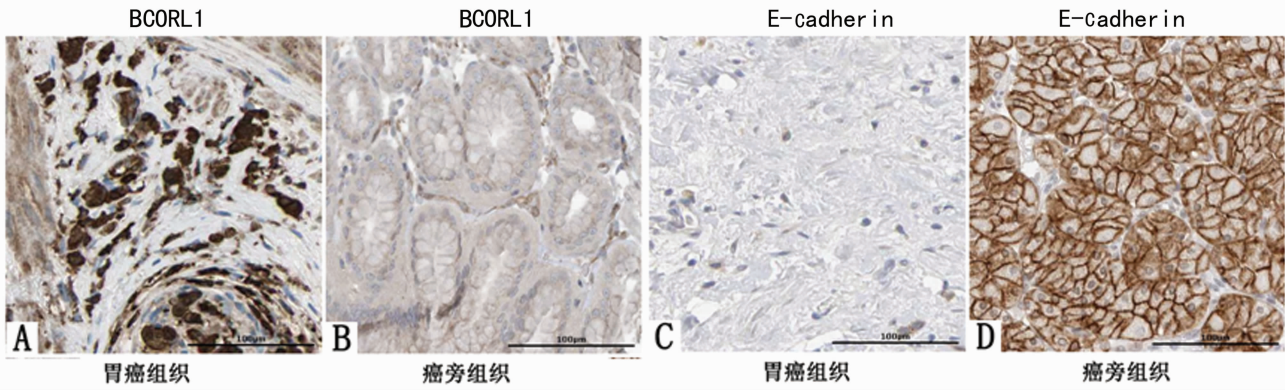


图 1 BCORL1 和 E-cadherin 在胃癌及癌旁组织中的表达(SP×400)

2.2 BCORL1 和 E-cadherin 表达与胃癌临床病理参数的关系

BCORL1 及 E-cadherin 表达与胃癌临床病理参数的相关性分析结果见表 1。BCORL1 和 E-cadherin 表达与肿瘤组织病

理分化、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有关($P<0.05$),与性别、年龄和肿瘤大小无关。

表 1 BCORL1 和 E-cadherin 表达水平与胃癌临床病理参数的关系(n)

项目		n	BCORL1		χ^2	P	E-cadherin		χ^2	P
			阳性	阴性			阳性	阴性		
年龄(岁)	<60	25	17	8	1.076	0.300	8	17	0.429	0.513
	≥60	33	18	15			8	25		
性别	男	49	29	20	0.003	0.959	12	37	0.681	0.409
	女	9	6	3			4	5		
肿瘤大小(cm)	<5	21	15	6	1.690	0.194	7	14	0.544	0.461
	≥5	37	20	17			9	28		
组织病理分化	分化	14	5	9	4.679	0.031	8	6	6.238	0.013
	未分化	44	30	14			8	36		
浸润深度	T1+T2	17	6	11	6.307	0.012	9	8	6.048	0.014
	T3+T4	41	29	12			7	34		
淋巴结转移	无	16	6	10	4.819	0.028	9	7	9.088	0.003
	有	42	29	13			7	35		
TNM 分期	I + II	16	5	11	7.816	0.005	8	8	4.115	0.042
	III + IV	42	30	12			8	34		

2.3 胃癌组织中 BCORL1 与 E-cadherin 表达的相关性 应用免疫组织化学染色评分半定量 BCORL1 和 E-cadherin 表达, Spearman 等级相关分析结果显示在胃癌组织中的 BCORL1 与 E-cadherin 表达呈负相关($r = -0.571$, $P = 0.002$)。

3 讨 论

BCORL1 基因定位于 X 染色体, 是一个转录共抑制因子, 功能研究发现其可以与 II 类组蛋白脱乙酰基酶(HDAC4、HDAC5 和 HDAC7)结合, 与 CTBP1 共抑制因子相互作用抑制 E-cadherin 表达^[8-10]。在多数正常组织中 BCORL1 低表达, 而在睾丸和前列腺组织中高表达, 有研究通过测序分析肝细胞癌的特征, 发现在肝细胞癌中 BCORL1 与 EFL1 形成融合基因, 其 mRNA 表达水平比正常癌旁组织高出 6 倍多, 提示 BCORL1 是一个肿瘤相关基因^[11]。但是在 6% 的急性髓性白血病(AML)患者以及 21% 的 AML 细胞系中的存在 BCORL1 基因突变, 提示 BCORL1 是一个新的候选肿瘤促进基因^[9]。本研究发现胃癌组织中 BCORL1 蛋白阳性表达率显著高于对应癌旁组织, 其在未分化、浸润较深、淋巴结转移和高 TNM 分期肿瘤中阳性表达率显著升高, 提示 BCORL1 可能作为癌基因发挥相应功能。E-cadherin 低表达或缺失与胃癌侵袭转移密切相关, 细胞学研究发现下调 E-cadherin 可减弱细胞与细胞黏附能力, 导致肿瘤细胞更容易浸润和转移。本研究发现 E-cadherin 在胃癌组织中的阳性表达率显著低于对应癌旁组织, 其在未分化、浸润较深、淋巴结转移和高 TNM 分期肿瘤中阳性表达率显著降低, 提示 E-cadherin 表达减少促进胃癌进展。

从基因表达达到运输以及细胞表面蛋白质转换, E-cadherin 的表达在多个水平被调控, 许多转录抑制因子被报道能与 E-cadherin 启动子区域的 E-box 序列结合诱导其表达下调, 如锌指蛋白 Snail/Slug 超家族以及 ZEB1 和 ZEB2^[12-13]。另外一个导致 E-cadherin 沉默的相关机制是启动子超甲基化^[14]。在胃癌形成中 E-cadherin 是一个标准的肿瘤抑制基因, 与散在和遗传类型胃癌的发生发展相关, 而 E-cadherin 遗传种系突变是导致遗传性弥漫型胃癌的重要原因^[15]。本研究分析了 BCORL1 及 E-cadherin 在胃癌组织中表达的相关性, 发现 BCORL1 与 E-cadherin 蛋白表达显著负相关, 提示 BCORL1 在胃癌中可能也通过转录抑制 E-cadherin 表达, 从而促进肿瘤侵袭转移。目前 BCORL1 在恶性肿瘤中的研究相对较少, 本研究通过检测其在胃癌及癌旁组织中的表达以及其与经典抑癌基因 E-cadherin 的相关性, 初步推测其在胃癌中可能是一个癌基因, 通过转录抑制 E-cadherin 发挥促癌功能, 但具体的功能及精确的分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Sun GY, Wu JX, Wu JS, et al. Caveolin-1, E-cadherin and β -catenin in gastric carcinoma, precancerous tissues and chronic non-atrophic gastritis[J]. Chin J Cancer Res, 2012, 24(1): 23-28.
- [2] Zheng X, Yao Y, Xu Q, et al. Evaluation of glioma-associated oncogene 1 expression and its correlation with the

expression of sonic hedgehog, E-cadherin and S100a4 in human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2011, 3(6): 965-970.

- [3] 李超, 涂康生, 郑鑫, 等. MicroRNA-218 在肝细胞癌中的表达及功能[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(8): 1127-1131.
- [4] 宋隆明. SOX7 对胃癌 MKN45 细胞株体外迁移侵袭的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(24): 2504-2505, 2509.
- [5] 陈晓燕, 袁瑞. 卵巢癌组织中 HMGB1 和 E-cadherin 的表达及其意义[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(7): 614-617.
- [6] Pagan JK, Arnold J, Hanchard KJ, et al. A novel corepressor, BCOR-L1, represses transcription through an interaction with CtBP[J]. J Biol Chem, 2007, 282(20): 15248-15257.
- [7] 靳文剑, 张焜和, 陈火国, 等. EphA2 在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2013, 42(20): 2361-2363.
- [8] Tiacci E, Grossmann V, Martelli MP, et al. The corepressors BCOR and BCORL1: two novel players in acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2012, 97(1): 3-5.
- [9] Li M, Collins R, Jiao Y, et al. Somatic mutations in the transcriptional corepressor gene BCORL1 in adult acute myelogenous leukemia[J]. Blood, 2011, 118(22): 5914-5917.
- [10] Lose F, Arnold J, Young DB, et al. BCoR-L1 variation and breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(4): R54.
- [11] Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, et al. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome[J]. Nat Genet, 2011, 43(5): 464-469.
- [12] Ohama T, Wang L, Griner EM, et al. Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14(1): 42.
- [13] Carneiro P, Fernandes MS, Figueiredo J, et al. E-cadherin dysfunction in gastric cancer—cellular consequences, clinical applications and open questions[J]. FEBS Lett, 2012, 586(18): 2981-2989.
- [14] Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, et al. Histone deacetylase inhibition modulates E-cadherin expression and suppresses migration and invasion of anaplastic thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(7): E1150-E1159.
- [15] Chen Y, Kingham K, Ford JM, et al. A prospective study of total gastrectomy for CDH1-positive hereditary diffuse gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(9): 2594-2598.