

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.016

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190114.1031.008.html(2019-01-14)

FBXO31 与细胞周期蛋白 D1 在结直肠腺癌中的表达及临床意义*

王杰¹, 向德兵², 唐瑶², 孙贵银^{1△}

(1. 西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000; 2. 重庆市江津区中心医院肿瘤科 402260)

[摘要] **目的** 研究结直肠腺癌组织中 FBXO31 及细胞周期蛋白(Cyclin)D1 的表达和临床意义。

方法 收集 146 例结直肠腺癌及癌旁组织标本, 采用免疫组织化学法检测所有标本中 FBXO31 及 Cyclin D1 的表达情况。**结果** 结直肠腺癌组织中 FBXO31 和 Cyclin D1 表达阳性率分别为 36.99% 和 69.86%, 与癌旁组织中 FBXO31 和 Cyclin D1 的表达(76.71% 和 16.44%)比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。FBXO31 和 Cyclin D1 的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位及大小无关($P > 0.05$), 与浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期相关($P < 0.05$); Cyclin D1 的表达也与肿瘤分化程度相关($P < 0.05$)。FBXO31 与 Cyclin D1 的表达呈负相关($r = -0.641, P < 0.05$)。**结论** 在结直肠腺癌的发生、发展、侵袭和转移过程中, FBXO31 和 Cyclin D1 的异常表达可能发挥了重要的作用。

[关键词] 结直肠肿瘤; 腺癌; FBXO31; Cyclin D1; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)03-0420-03

Expression and clinical significance of FBXO31 and Cyclin D1 in colorectal adenocarcinoma*

WANG Jie¹, XIANG Debing², TANG Yao², SUN Guiyin^{1△}

(1. Clinical Medical College, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Oncology, Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of FBXO31 and Cyclin D1 in colorectal adenocarcinoma tissue and its clinical meaning.

Methods One hundred and forty-six cases of colorectal adenocarcinoma tissue sample and paracancerous tissue sample were collected for detecting the expression levels of FBXO31 and Cyclin D1 by adopting the immunohistochemical method. **Results** The positive rates of FBXO31 and Cyclin D1 in colorectal adenocarcinoma tissue were 36.99% and 69.86% respectively, which were 76.71% and 16.44% in paracancerous tissue respectively, the difference between them was statistically different ($P < 0.05$). The expression levels of FBXO31 and Cyclin D1 had no correlation with the gender, age, tumor site and size ($P > 0.05$), and were correlated with tumor infiltration depth, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$). Moreover, the expression level of Cyclin D1 was correlated to the degree of tumor differentiation ($P < 0.05$). The expression of FBXO31 was negatively correlated with the expression of Cyclin D1 ($r = -0.641, P < 0.05$). **Conclusion** Abnormal expression of FBXO31 and Cyclin D1 might play an important role in the occurrence, development, invasion and metastasis of colorectal adenocarcinoma.

[Key words] colorectal neoplasms; adenoma; FBXO31; Cyclin D1; immunohistochemistry

结直肠癌是全球第三大高发恶性肿瘤, 其发病率和病死率在我国居恶性肿瘤第 5 位^[1]。据以往研究, 在肿瘤的形成和进展过程中, 细胞周期相关调控分子的异常表达发挥了重要作用, 细胞周期蛋白(Cyclin)D1 通过调控 G₁ 和 S 期转化影响细胞周期进程, 在多种恶性肿瘤中异常表达^[2]。泛素蛋白酶体系(UPS)是生物体内重要的蛋白翻译后修饰体系, 参与

诸多病理生理过程。FBXO31 是泛素连接酶 SCF 复合体中的关键组分, 负责底物的识别与招募, 研究发现 FBXO31 通过泛素化作用于不同基质, 发挥不同作用, 它通过对 Cyclin D1 的调节来影响细胞周期, 进而影响肿瘤的发生、发展^[3]。目前对 FBXO31 及 Cyclin D1 在黑色素瘤、胃癌、乳腺癌中的作用均有报道^[4-6], 但结直肠癌中 FBXO31 的表达情况及其与 Cyclin D1

* 基金项目: 重庆市卫生局重点项目(2012-1-106)。 作者简介: 王杰(1990—), 在读硕士, 主要从事大肠癌防治方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: sunriseok@126.com。

的关系尚不明确,本研究采用免疫组织化学的方法研究结直肠癌中 FBXO31 与 Cyclin D1 的表达情况,并分析二者相关性及其临床病理意义,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2014 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日收治的病理确诊、临床资料完整的 146 例结直肠癌及癌旁组织标本,术前均未行任何抗肿瘤治疗。

1.2 方法

1.2.1 IHC 染色法 蜡块切片脱蜡至水,柠檬酸钠缓冲液高压修复,免疫组织化学染色采用 SP 法,二氨基联苯胺(DAB)显色,复染、封片、镜检,操作步骤按试剂盒说明书进行,一抗浓度 FBXO31 为 1 : 200, Cyclin D1 为工作液。已知阳性切片作为阳性对照,阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。兔抗 Cyclin D1 单克隆抗体购自北京中杉金桥公司,兔抗 FBXO31 多克隆抗体购自美国 Origene 公司。

1.2.2 结果判定 由本院工作经验丰富的病理科医师双盲阅片,低倍镜下($\times 100$)阅览整张切片显色情况后选取高表达区于高倍镜($\times 400$)下进一步观察,取 5 个视野评分。按染色强度评分:不着色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;按阳性细胞比例评分:未染色计 0 分, $<25\%$ 计 1 分, $25\% \sim 50\%$ 计 2 分, $>50\% \sim 75\%$ 计 3 分, $>75\%$ 计 4 分。两项计分相乘确定: ≤ 2 分为阴性, > 2 分为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计数资料用百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

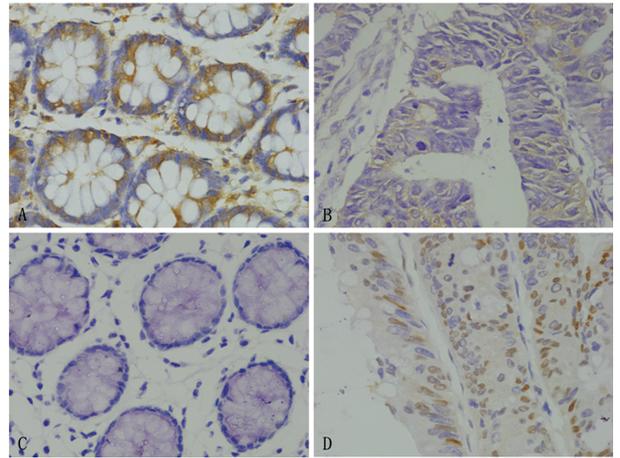
2.1 FBXO31、Cyclin D1 的表达情况 FBXO31 主要表达于细胞质,偶见细胞核表达,呈棕黄色,癌旁组织、腺癌组织表达阳性率分别为 76.71%(112/146)、36.99%(54/146),两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。Cyclin D1 表达于细胞核,呈棕黄色,细胞膜及细胞质未见表达,癌旁组织与腺癌组织表达阳性率分别为 16.44%(24/146)、69.86%(102/146),两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1、表 1。

表 1 FBXO31、Cyclin D1 在癌旁、腺癌组织的表达情况

组织	n	FBXO31		χ^2	P	Cyclin D1		χ^2	P
		+	-			+	-		
癌旁	146	112	34	46.96	<0.01	24	122	84.94	<0.01
腺癌	146	54	92			102	44		

2.2 FBXO31、Cyclin D1 水平与结直肠癌患者临

床病理特征的关系 FBXO31 和 Cyclin D1 水平与结直肠腺癌浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期相关($P < 0.05$),另外,Cyclin D1 水平与肿瘤分化程度也相关($P < 0.05$)。FBXO31 和 Cyclin D1 水平与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小无关($P > 0.05$),见表 2。



A: FBXO31 在癌旁组织高表达; B: FBXO31 在癌组织低表达; C: Cyclin D1 在癌旁组织低表达; D: Cyclin D1 在癌组织高表达

图 1 FBXO31、Cyclin D1 在结直肠癌旁、腺癌组织的表达情况(IHC, $\times 400$)

2.3 FBXO31 和 Cyclin D1 在结直肠腺癌中表达的关系 在 146 例结直肠腺癌中,17 例 FBXO31 和 Cyclin D1 均被检测到,7 例二者均未检测到。FBXO31 与 Cyclin D1 的表达呈负相关($P < 0.01$),见表 3。

表 2 FBXO31、Cyclin D1 蛋白表达与结直肠腺癌患者临床病理特征的关系

项目	n	FBXO31		P	Cyclin D1		P
		+	-		+	-	
性别				0.711			0.038
男	84	30	54		53	31	
女	62	24	38		49	13	
年龄(岁)				0.185			0.976
≥ 60	86	28	58		60	26	
< 60	60	26	34		42	18	
肿瘤部位				0.447			0.992
结肠	53	18	35		37	16	
直肠	93	26	67		65	28	
肿瘤大小(cm)				0.200			0.097
< 5	71	30	41		45	26	
≥ 5	75	24	51		57	18	
分化程度				0.385			0.020
高、中	122	47	75		90	32	
低	24	7	17		12	12	

续表 2 FBXO31、Cyclin D1 蛋白表达与结直肠腺癌患者
临床病理特征的关系

项目	n	FBXO31		P	Cyclin D1		P
		+	-		+	-	
浸润深度				0.001			0.001
T1+T2	39	23	16		19	20	
T3+T4	107	31	76		83	24	
淋巴结转移				<0.01			0.013
有	66	12	54		53	13	
无	80	42	38		49	31	
TNM分期				0.010			0.005
I+II	74	35	39		44	30	
III+IV	72	19	53		58	14	

表 3 FBXO31 与 Cyclin D1 在结直肠腺癌中表达的相关性

FBXO31	Cyclin D1		r	P
	阳性	阴性		
阳性	17	37	-0.641	<0.01
阴性	85	7		

3 讨 论

近年来,大量基因层面与蛋白质层面的研究深入探讨了肿瘤发生、发展的机制,为肿瘤的防治工作做了大量铺垫。蛋白质的合成与分解是细胞的基本生命活动,UPS 是生物体内重要的蛋白翻译后修饰体系,它具有高度选择性,在细胞周期、基因转录及细胞信号转导等多种生物学过程中发挥调控作用,主要由泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2、泛素连接酶 E3 及 26S 蛋白酶体共同参与,是一个精密有序的级联反应过程,其中泛素连接酶 E3 是 UPS 选择性的关键,负责底物的特异性识别和招募^[3]。FBXO31 是位于 16q24.3 的衰老基因,是 F-box 蛋白家族的一员,参与构成 SCF 复合体(隶属于泛素连接酶 E3 中的 RING-finger 家族),KUMAR 等^[6]通过免疫共沉淀实验研究证实,FBXO31 是以 SCF^{FBXO31}复合体的形式在乳腺癌中发挥抑癌作用的,其多种生物学功能通过特异性识别和招募底物并介导底物蛋白的泛素化降解来实现,通过作用于不同靶蛋白,FBXO31 参与了肿瘤形成、神经元发育^[7]及 DNA 损伤应答^[8]等多种病理生理过程。已有研究证实 FBXO31 在乳腺癌^[6,9]、肝癌^[10]、胃癌^[5,11]、黑色素瘤^[4]中可能发挥抑癌作用,在肺癌、食管癌^[12-13]中表达上调,是可能的致癌因子。FBXO31 的抑癌作用与其介导泛素化降解 Cyclin D1、Cdc10 依赖性转录因子(Cdt1)、Slug、鼠双微体 2 (MDM2)、叉头盒蛋白质 M1 (FOX M1) 等基质有

关^[3],而致癌机制目前尚不太明确。本研究结果表明,FBXO31 在结直肠腺癌中表达降低,且浸润越深,TNM 分期越高,其表达率越低,有淋巴结转移患者较无淋巴结转移患者阳性率低,提示其低表达可能与结直肠癌的发生、发展、浸润、转移有关。

细胞周期是所有真核细胞生命活动的基石,一个完整的细胞周期包含了 G₁、S、G₂ 和 M 共 4 个时期,它的转换受 Cyclin 和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)驱动。Cyclin D1 在 CDK4、CDK6 的协同作用下推动细胞周期由 G₁ 期向 S 期转变,Cyclin D1 的过表达可使细胞周期阻滞和促凋亡功能丧失,细胞快速生长,研究发现,Cyclin D1 在多数恶性肿瘤中过表达^[2]。以往研究表明,Cyclin D1 在结直肠腺癌中高表达,并可能参与了结直肠癌的发生、发展、侵袭和转移^[14]。本研究证实,Cyclin D1 在结直肠腺癌中的阳性表达率较癌旁组织明显升高,且分化程度越低,浸润深度越深,TNM 分期越高,其阳性表达率越高,有淋巴结转移患者较无淋巴结转移患者阳性表达率明显升高,这与前人研究^[2,14]结果一致。

FBXO31 是一个具有细胞监视功能的蛋白,可以迅速应答 DNA 损伤,它通过识别并结合 Cyclin D1 的 C 末端,介导其泛素化降解,使细胞阻滞在 G₁ 期,从而阻止 DNA 损伤细胞的继续生长,发挥潜在的抑癌作用^[15]。SANTRA^[4]等研究发现,不同的 DNA 损伤剂都可以诱导 FBXO31 水平大幅增加。本研究结果显示,在结直肠腺癌中,FBXO31 呈低表达,Cyclin D1 呈过表达,且二者表达呈明显负相关性,与上述研究结果一致。

综上所述,FBXO31 的低表达可能使结直肠癌细胞逃脱 DNA 损伤监视,继发性引起 Cyclin D1 的表达升高,从而参与了结直肠癌形成和发展的整个过程,了解二者的表达情况有助于评估结直肠腺癌的转归及预后情况,且二者有望成为结直肠腺癌治疗的新靶点,本研究也为进一步深入探索 FBXO31 在结直肠癌中的作用机制提供了基础。

参考文献

- [1] 李道娟,李倩,贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(3):305-310.
- [2] QIE S, DIEHL J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. J Mol Med (Berl), 2016,94(12):1313-1326.
- [3] TAN Y Y, LIU D L, GONG J, et al. The role of F-box only protein 31 in cancer[J]. Oncol Lett, 2018,15(4):4047-4052.
- [4] SANTRA M K, WAJAJPEYEE N, GREEN M R. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation (下转第 427 页)

- [4] 桂晓钟,陈涌,赵军,等. 变应性鼻炎皮下注射和舌下含服特异性免疫治疗依从性对比[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(12): 631-633.
- [5] 田媛,刘慧峰,王效军,等. 舌下脱敏治疗对变应性鼻炎患者 Th17/Treg 免疫平衡的影响[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2016, 23(6): 341-344.
- [6] WEI P, HU G H, KANG H Y, et al. An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients[J]. *Lab Invest*, 2014, 94(5): 528-535.
- [7] BOZEK A, KOLODZIEJCZYK K, KOZLOWSKA R, et al. Evidence of the efficacy and safety of house dust mite subcutaneous immunotherapy in elderly allergic rhinitis patients: a randomized, double-blind placebo-controlled trial[J]. *Clin Transl Allergy*, 2017(7): 43.
- [8] 朱亮,陆纪红,谢青,等. 皮下免疫和舌下免疫治疗尘螨变应性鼻炎的安全性及依从性分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 45(6): 444-449.
- [9] Berker M, Frank L J, Gessner A L, et al. Allergies-A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm[J]. *Clin Immunol*, 2017(174): 73-83.
- [10] 谭倩,刘志丹,李晓燕,等. Th17/Treg 细胞失衡在变应性鼻炎中的作用研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 638-640.
- [11] GU Z W, WANG Y X, CAO Z W. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by down-regulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 22361-22369.
- [12] NI K, ZHAO L, WU J, et al. Th17/Treg balance in children with obstructive sleep apnea syndrome and the relationship with allergic rhinitis[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2015, 79(9): 1448-1454.
- [13] NIEMINEN K, VALOVRTA E, SAVOLAINEN J. Clinical outcome and IL-17, IL-23, IL-27 and FOXP3 expression in peripheral blood mononuclear cells of pollen-allergic children during sublingual immunotherapy[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010, 21(1 Pt 2): e174-184.
- [14] SHEN Y, YUAN X D, HU D, et al. Association between interleukin-27 gene polymorphisms and susceptibility to allergic rhinitis[J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(9): 991-995.
- [15] 黄雪琨,杨钦泰,陈玉莲,等. 变应性鼻炎患者外周血中 IL-27 和 Treg 细胞的相关性分析[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013, 22(5): 391-395.
- [16] QIU S L, DUAN M C, LIANG Y, et al. Cigarette smoke induction of interleukin-27/WSX-1 regulates the differentiation of Th1 and Th17 cells in a smoking mouse model of emphysema[J]. *Front Immunol*, 2016(7): 553.

(收稿日期: 2018-07-11 修回日期: 2018-10-05)

(上接第 422 页)

- to induce G1 arrest after DNA damage[J]. *Nature*, 2009, 459(7247): 722-725.
- [5] ZHANG X C, KONG Y, XU X, et al. F-box protein FBXO31 is down-regulated in gastric cancer and negatively regulated by miR-17 and miR-20a[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 6178-6190.
- [6] KUMAR R, NEILSEN P M, CRAWFORD J, et al. FBXO31 is the chromosome 16q24. 3 senescence gene, a candidate breast tumor suppressor, and a component of an SCF complex[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11304-11313.
- [7] VADHVANI M, SCHWEDHELM-DOMEYER N, MUKHERJEE C, et al. The centrosomal E3 ubiquitin ligase FBXO31-SCF regulates neuronal morphogenesis and migration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57530.
- [8] MALONIA S K, DUTTA P, SANTRA M K, et al. F-box protein FBXO31 directs degradation of MDM2 to facilitate p53-mediated growth arrest following genotoxic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(28): 8632-8637.
- [9] LIU D Y, XIA H M, WANG F, et al. MicroRNA-210 interacts with FBXO31 to regulate cancer proliferation cell cycle and migration in human breast cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(9): 5245-5255.
- [10] HUANG H L, ZHENG W L, ZHAO R, et al. FBXO31 is down-regulated and may function as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(3): 715-720.
- [11] ZOU S Y, MA C Y, YANG F H, et al. FBXO31 suppresses gastric cancer EMT by targeting snail1 for proteasomal degradation[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(2): 286-295.
- [12] HUANG H L, JIANG Y, WANG Y H, et al. FBXO31 promotes cell proliferation, metastasis and invasion in lung cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(5): 1814-1822.
- [13] LIU J, LV L, GONG J, et al. Overexpression of F-box only protein 31 predicts poor prognosis and deregulates p38 α and JNK-mediated apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Inter J Cancer*, 2018, 142(1): 145-155.
- [14] 顾磊. NKD1, β -catenin 和 Cyclin D1 在结直肠癌中的表达及意义[J]. 中国医药导报, 2016, 13(35): 115-118.
- [15] LI Y F, JIN K, B K E, et al. Structural basis of the phosphorylation-independent recognition of cyclin D1 by the SCFFBXO31 ubiquitin ligase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(2): 319-324.

(收稿日期: 2018-07-06 修回日期: 2018-10-06)