

ATBF1 在结直肠癌中的表达及其与转移相关性研究

钟林, 陈飞, 李强, 邹兆伟, 郑伟, 黄宗海
(南方医科大学珠江医院普外科, 510280)

[摘要] **目的** 探讨 ATBF1 在结直肠癌中的表达, 分析其与结直肠癌转移相关性. **方法** 通过激光共聚焦检测 ATBF1 蛋白在转移性较强的 LOVO 细胞株及转移性相对较弱的 SW480 中的表达情况. 同时用免疫组织化学方法检测 146 例结直肠癌和癌旁组织中 ATBF1 的表达, 分析 ATBF1 蛋白在转移和非转移组中的表达情况. **结果** LOVO 细胞株中的 ATBF1 蛋白表达量明显低于 SW480 细胞株中 ATBF1 蛋白表达量. 癌组织中的 ATBF1 的阳性率为 52.16% 明显低于癌旁组织中的 ATBF1 阳性表达率 82.88%. 转移组中 ATBF1 蛋白表达率为 50%, 而非转移组中 ATBF1 蛋白表达率为 67.86%. **结论** ATBF1 在结直肠癌组织中呈低表达, 表现为抑癌基因, 与结直肠癌的转移相关.

[关键词] ATBF1; 结直肠癌; 转移

[中图分类号] R735.3*5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 06-0037-05

ATBF1 Expression and Correlation with Metastasis in Colorectal Cancer

ZHONG Lin, CHEN Fei, LI Qiang, ZOU Zhao-wei, ZHENG Wei, HUANG Zong-hai
(Dept. of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510280, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of ATBF1 in colorectal cancer, and analyze its correlation with metastasis of colorectal cancer. **Methods** With laser confocal microscope, we analyzed the differentially expressed proteins in two human colorectal carcinoma cell lines LOVO and SW480 with high and low metastatic potentials. At the same time, the expression of ATBF1 in colorectal cancer and adjacent tissues were visualized by S-P immunohistochemistry, we analyzed the differentially expressed proteins between the metastasis group and non-metastasis group. **Results** The expression of ATBF1 in LOVO is lower than in SW480. The rate of ATBF1 positive expression in tumor was 51.26%, respectively, which was significantly different from that in normal paraneoplastic colorectal tissues as 82.88%. The rate of ATBF1 positive expression in metastasis group was 50%, while the rate was 67.86% in non-metastasis group. **Conclusion** ATBF1 acts as a tumor suppressor gene in colorectal cancer, its expression is lower than the normal tissues, and is closely associated with colorectal metastasis.

[Key words] ATBF1; Colorectal cancer; Metastasis

ATBF1 (AT motif-binding factor 1) 基因是新发现具有抑制肿瘤细胞生长的抑癌基因, ATBF1 能抑制甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 基因的转录, 是目前发现的分子量最大的反式作用因子^[1].

目前研究发现, ATBF1 在神经系统、乳腺癌、胃癌、肝癌、前列腺癌、宫颈癌、头颈鳞状细胞癌等组织中呈现抑癌基因特征, 通过不同机制影响肿瘤的发生、发展^[2-10]. 但 ATBF1 蛋白在结直肠癌

[基金项目] 国家高技术发展研究计划 (863 计划) 基金资助项目 (2007AA021901); 广东省科技计划项目 (2005B31201009); 广东省教育部产学研结合项目 (2010B090400423)

[作者简介] 钟林 (1987-), 男, 四川巴中市人, 在读硕士研究生, 主要从事腹部外科临床工作.

[通讯作者] 黄宗海. E-mail: drhuangzh@163.com

中的表达情况及其与结直肠癌的转移性之间的关系并未有相关报道。为此,笔者检测了 ATBF1 蛋白在转移性较强的 LOVO 细胞株和转移性较弱的 SW480 细胞株中的表达情况。同时研究了 146 例结直肠癌患者的癌组织及癌旁组织中 ATBF1 的表达情况,研究了 ATBF1 蛋白在转移组与非转移组中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 一般资料

本实验所用的 LOVO、SW480 细胞株均来自南方医科大学病理教研室。收集南方医科大学南方医院及珠江医院 2012 年 2 月至 2013 年 5 月期间手术切除的结直肠癌组织标本 146 例,同时取距肿瘤原发灶 2 cm 的癌旁组织。所有纳入研究的患者术前均未进行放、化疗及生物治疗,所有标本资料完整,经过南方医科大学珠江医院病理组织学确诊。采用国际抗癌协会(UICC)2002 年第 6 版 TNM 分期系统进行临床诊断分期。

1.2 主要试剂

ATBF1 抗体购自美国 abcam 公司,货号 ab119909,兔单抗。SP 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司,DAB 显色液为 Maixin 产品,购自福州迈新生物公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司,Alexa Fluor 594 驴抗兔 IgG 二抗购自 invitrogen 公司,DAPI 荧光染料购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验方法

免疫组化检测:将收集的结直肠癌组织和癌旁组织标本脱水、浸钠包埋,切片 4 μm 后常规脱钠至水,室温下灭活内源性过氧化物酶,用 0.01 M 枸橼酸缓冲液热修复 5 min 后自然冷却,正常羊血清工作液封闭,滴加 1:75 ATBF1 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷室孵育过夜,PBS 冲洗 3 \times 5 min (用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照);滴加生物素标记二抗室温孵育 30 min,DAB/H₂O₂ 反应染色,苏木素复染,中性树胶封片。置显微镜下观察。

激光共聚焦实验检测:取对数生长细胞,消化制成单细胞悬液,接种于共聚焦皿中;待细胞接近长成单层后,PBS 漂洗 5 min,3 次;4%多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,PBS 漂洗 5 min,3 次;加入胎牛血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;甩去胎牛血清,加入 ATBF1 蛋白一抗,湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 漂洗 5 min,3 次;加入荧光二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,

PBS 漂洗 5 min,3 次(避光操作);加入 10 mg/mL DAPI,室温孵育 5 min,PBS 漂洗 5 min,3 次(避光操作);荧光显微镜下观察细胞出现红色荧光后,立即送至激光共聚焦成像。

1.4 结果判断

免疫组化反应结果显示 ATBF1 在细胞质和细胞核均有表达,但主要在细胞质中表达,随机选择 100 个细胞,在每部分 5 个典型的区域内随机选择 2 个实验组独立观察。采用半定量积分法判断,阳性 < 5% 为 0 分;6% ~ 25% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,> 75% 为 4 分。染色强度呈淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。阳性细胞比和染色强度两项积分相乘,0 分为 (-),1 ~ 4 分为 (+),5 ~ 8 分为 (++) ,9 ~ 12 分为 (+++)。对 Western-blot 结果进行灰度分析后进行比较。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件,秩和检验、 χ^2 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATBF1 在 LOVO、SW480 细胞系中的表达情况

ATBF1 在 LOVO 细胞系和 SW480 细胞系中表达情况存在明显差异:(1)转移性较强的 LOVO 细胞系细胞系中 ATBF1 蛋白表达量明显要低于较转移性较弱的 SW480 细胞系;(2)LOVO 细胞系中 ATBF1 蛋白主要在胞浆中表达,SW480 细胞系中 ATBF1 在胞浆、胞核中均有表达,见图 1。

2.2 临床病理特征

通过对 ATBF1 在 LOVO、SW480 细胞系中的表达情况可知,ATBF1 的表达情况与肿瘤细胞的转移性存在明显相关性。故将 146 例患者分为转移组和非转移组,其中包括 84 名未转移患者,62 名转移患者。所纳入患者在术前均未接受放、化疗及生物治疗。转移组和非转移组中患者年龄构成、性别构成、肿瘤位置、肿瘤大小差异无统计学意义($P > 0.05$)。转移组和非转移组中 T、N、Dukes 分期及分化程度差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 ATBF1 蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达情况

ATBF1 蛋白结直肠癌癌组织、癌旁组织中表达免疫组化检测结果显示:(1)ATBF1 蛋白在胞浆和胞核中均有表达;(2)ATBF1 在癌旁正常组织中的表达明显高于在结直肠癌组织中的表达,见图 2。

2.4 ATBF1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系

表 1 146 例结直肠癌患者的临床及病理特征 [n (%)]

Tab. 1 The clinical data of 146 colorectal cancer patients [n (%)]

特 征	未转移	转移
年龄 (岁)	59.71 ± 23.71	63.13 ± 24.17
性别		
男性	42(50)	32(51.6)
女性	42(50)	30(48.4)
肿瘤位置		
结肠	34(40.5)	30(48.4)
直肠	48(57.1)	32(51.6)
直乙	2(2.4)	0(0)
T 分期		
T1	12(14.3)*	2(3.2)
T2	48(57.1)*	22(35.5)
T3	24(28.6)*	32(51.6)
T4	0(0)*	6(9.7)
未知	0(0)	0(0)
N 分期		
N0	84(100)*	0(0)
N1	0(0)*	32(51.6)
N2	0(0)*	30(48.4)
NX	0(0)	0(0)
Dukes 分期		
A	56(66.7)*	0(0)
B	28(33.3)*	0(0)
C	0(0)*	56(90.3)
D	0(0)*	6(9.7)
放疗		
是	0(0)	0(0)
否	84(100)	62(100)
未知	0(0)	0(0)
化疗		
是	0(0.0)	0(0.0)
否	84(100.0)	62(100.0)
未知	0(0.0)	0(0.0)
分化程度		
低分化	0(0.0)	10(16.1)
中分化	72(85.7)	50(80.6)
高分化	12(14.3)	2(3.2)
肿瘤大小		
< 4 cm	50(59.5)	28(45.2)
≥ 4 cm	34(40.5)	34(54.8)

与转移比较, *P<0.05.

结直肠癌中 ATBF1 的表达情况与临床病理参数之间的关系通过免疫组化统计分析可知: (1) 癌组织与癌旁组织中 ATBF1 的表达差异有统计学意义, 癌旁组织中的 ATBF1 蛋白表达量 (阳性率 82.88%) 明显高于癌组织 (阳性率 56.16%); (2) 在转移组和非转移组中 ATBF1 的表达差异有统计学意义, 且转移组中 ATBF1 的表达量 (阳性率 50%) 低于非转移中 ATBF1 的表达量 (阳性率 67.86%), 见表 2.

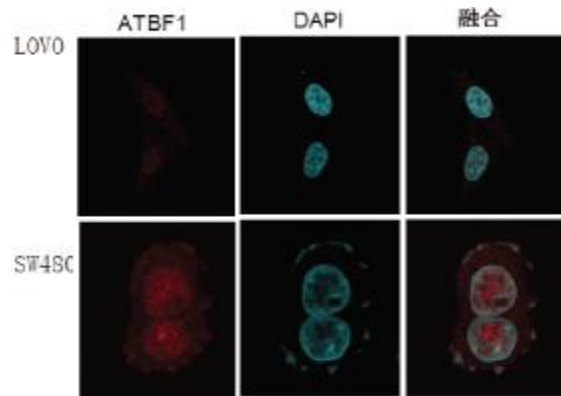


图 1 ATBF1 在 LOVO、SW480 细胞系中的表达情况

Fig. 1 Expression of AT-motif binding factor1(ATBF-1)protein in LOVO and SW480 colorectal cancer cell lines

表 2 结直肠癌组织 ATBF1 的表达与结直肠癌临床病理参数的关系 (n)

部 位	-	+	++	+++	P
癌	64	52	26	4	<0.001
癌旁	25	35	48	38	
转移情况					
转移	31	21	10	0	0.041
非转移	27	33	18	6	

注: P 值由卡方检验得到.

3 讨论

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率呈现逐年增高的趋势, 目前其发病率仅低于肺癌和乳腺癌, 结直肠癌起病较隐匿, 初诊时约有 50%~60% 患者属于晚期, 其中约有 20% 的患者出现明显的远处转移^[1], 结直肠癌患者一旦出现淋巴结转移, 其预后明显不良 (5 a 生存率自 65%~90% 降为 30%)^[2]. 为此, 研究结直肠癌

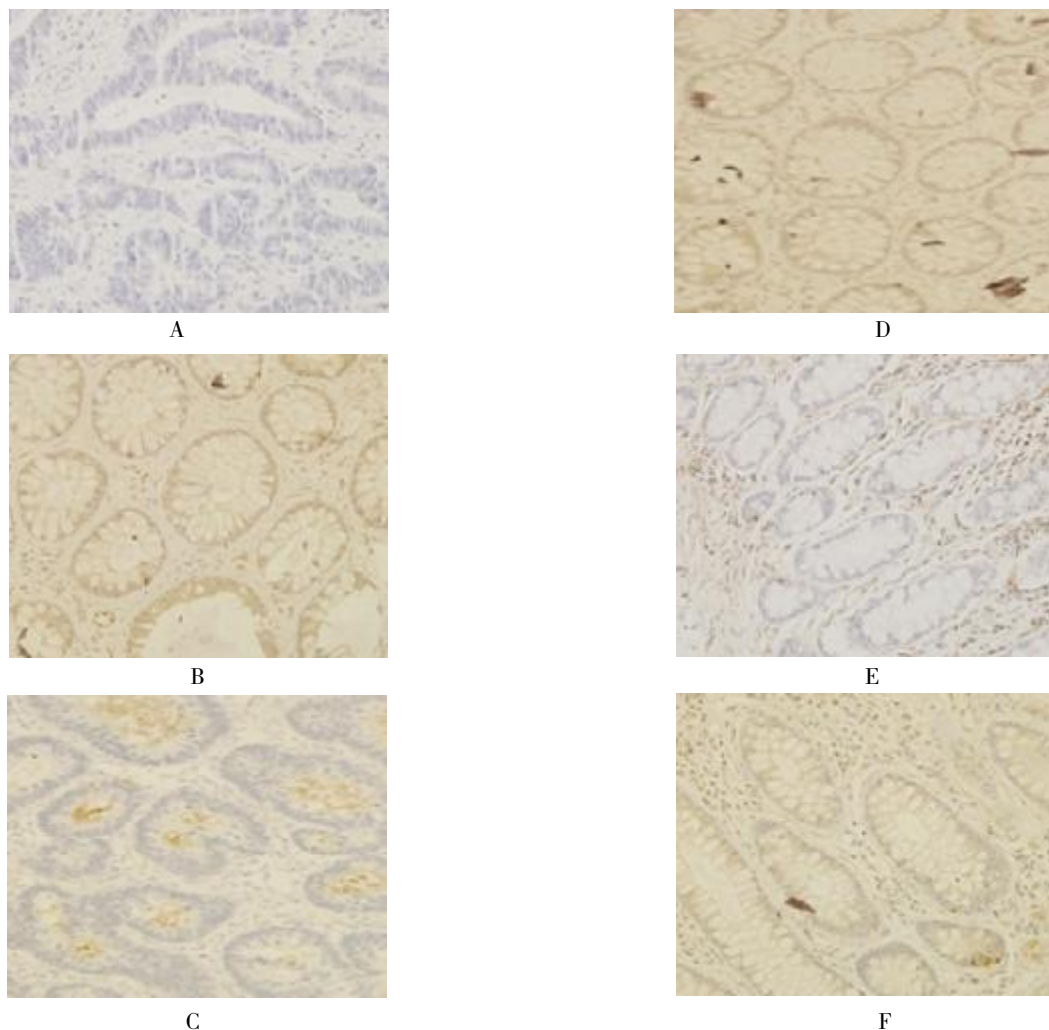


图 2 免疫组化检测癌组织及癌旁组织中 ATBF1 表达

Fig. 2 ATBF1 protein detected by immunohistochemical staining in primary tumors and adjacent tissues

A:低分化癌组织; B:低分化癌旁组织; C:中分化癌组织; D:中分化癌旁组织;
E:高分化癌组织; F:高分化癌旁组织 (SP×200) .

转移的机制、抑制转移将显著提高结直肠癌患者的生存率和生存质量。

ATBF1 最早是从肝细胞中分离得到, 后来被 Sun X 等认定为抑癌基因. 其编码的产物属于锌指蛋白家族成员 (ZFH3). ATBF1 蛋白的分子量达 404 kd, 作为目前发现的分子量最大的反式作用因子, 其在神经系统、乳腺癌、胃癌、肝癌、前列腺癌、皮肤癌^[3-10,13]等疾病中均有研究. ATBF1 在不同的肿瘤中通过不同机制影响肿瘤的发生、发展. 通过研究发现, 在乳腺癌患者中 ATBF1-A 的表达情况与乳腺癌患者的预后呈正相关, ATBF1-A mRNA 的表达水平可以作为淋巴结转移情况的检测指标^[3]. 目前为止 ATBF1 在结直肠癌中的表达情况及与结直肠癌转移相关性研究仍未有相关报道.

通过对 LOVO 细胞株、SW480 细胞株的检测

可以发现, ATBF1 的表达情况与结直肠癌细胞株的转移性密切相关, 转移性越强 ATBF1 蛋白的表达量越低. 而这一结果在对 146 例结直肠癌患者临床手术标本免疫组化染色分析中得到了印证, ATBF1 在癌旁组织中的表达量明显要高于在结直肠癌中的表达量, 在癌组织中 ATBF1 蛋白阳性检测率为 56.16%, 而癌旁组织中阳性率达 82.88%, 且在癌旁组织中 ATBF1 蛋白免疫组化阳性分级要明显高于癌组织. 同时非转移组的 ATBF1 蛋白表达量要高于转移组中的 ATBF1 蛋白表达量, 非转移组中 ATBF1 蛋白表达阳性率为 67.86%, 转移组中 ATBF1 蛋白表达阳性率为 50%, 非转移组中的免疫组化阳性分级明显要高于转移组. 这提示 ATBF1 的高表达可能对结直肠癌的转移起到了一定的抑制作用.

鉴于上述结果,笔者认为,ATBF1在结直肠癌中作为抑癌基因呈现,参与了结直肠癌的转移,对ATBF1蛋白的检测可以预测结直肠癌的转移情况,这为结直肠癌的基因治疗提供了新的靶点和思路.然而,ATBF1在结直肠癌的发生、发展过程中具体的作用机制还有待于我们进一步去研究证实.

[参考文献]

- [1] 李孟森,刘新华,李刚. ATBF1异构体的选择性表达及其抑癌作用的分子机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(1):1-5.
- [2] PEREA D,MOLOHON K,EDWARDS K,et al.Multiple roles of the gene zinc finger homeodomain-2 in the development of the drosophila wing [J]. Mech Dev, 2013,130(9-10):467-481.
- [3] IDO A,MIURA Y,TAMAOKI T. Activation of ATBF1, a multiple-homeodomain zinc-finger gene, during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma cells [J]. Dev Biol, 1994,163(1):184-187.
- [4] JUNG C G,UHM K O,MIURA Y,et al. Beta-amyloid increases the expression level of ATBF1 responsible for death in cultured cortical neurons[J]. Mol Neurodegener, 2011,27(6):47.
- [5] ZHANG Z,YAMASHITA H,TOYAMA T,et al. ATBF1-a messenger RNA expression is correlated with better prognosis in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005,11(1):193-198.
- [6] MABUCHI M,KATAOKA H,MIURA Y,et al. Tumor suppressor, AT motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in response to TGF-beta signal transduction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,398(2):321-325.
- [7] KIM C J,SONG J H,CHO Y G,et al. Down-regulation of ATBF1 is a major inactivating mechanism in hepatocellular carcinoma[J]. Histopathology, 2008,52(5):552-559.
- [8] XU J,SAUVAGEOT J,EWING C M,et al. Germline ATBF1 mutations and prostate cancer risk [J]. Prostate, 2006,66(10):1082-1085.
- [9] LI H,HUANG C J,CHOO K B. Expression of homeobox genes in cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2002,84(2):216-221.
- [10] SUN X,LI J,SICA G,et al. Interruption of nuclear localization of ATBF1 during the histopathologic progression of head and neck squamous cell carcinoma [J]. Head Neck, 2013,35(7):1007-1014.
- [11] JAIN V K,HAWKES E A,CUNNINGHAM D. Integration of biologic agents with cytotoxic chemotherapy in metastatic colorectal cancer [J]. Clin Colorectal Cancer, 2011,10(4):245-257.
- [12] 王天宝,石汉平,韩方海,等. 基质细胞衍生因子-1/CXCR4系统和结直肠癌转移的相关性研究进展[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2012,1(1):29-31.
- [13] NISHIO E,MIURA Y,KAWAGUCHI M,et al. Nuclear translocation of ATBF1 is a potential prognostic marker for skin cancer[J]. Acta Dermatovenereol Croat, 2012,20(4):239-245.

(201-04-14 收稿)