

BRG1在结肠癌组织中的表达及其临床意义

苗永昌*, 邱磊, 邵华, 邓建武

连云港市第二人民医院胃肠外科, 江苏 连云港 222006

[摘要] 目的:研究BRG1(Brahma-related gene1)在结肠癌组织中的表达;探讨其表达水平与结肠癌的临床病理特征及患者预后的关系。方法:采用组织芯片和免疫组化技术对100例结肠癌组织中的BRG1进行染色分析,结合随访资料分析结肠癌组织中BRG1表达及其与患者预后的关系。结果:结肠癌癌细胞表达BRG1阳性率明显高于癌旁组织($\chi^2=79.962, P < 0.001$);BRG1的表达与病理分级、TNM分期、T分期有显著相关性($\chi^2=6.753, P=0.009$; $\chi^2=5.069, P=0.024$; $\chi^2=10.827, P=0.001$),而与年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结是否转移无明显相关性($P > 0.05$);Cox回归模型证实,BRG1表达是结肠癌的独立预后因素($HR=2.283, P=0.001$);结肠癌癌细胞BRG1高表达组较低表达的病例预后差($\chi^2=17.636, P < 0.001$)。结论:高表达的BRG1与结肠癌的不良预后密切相关;结肠癌癌细胞BRG1的阳性表达可能成为判断结肠癌预后的一个重要标记物。

[关键词] 结肠癌;BRG1;组织芯片;免疫组化

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0063-04

doi:10.7655/NYDXBNS20180114

BRG1(Brahma-related gene1)是近年来新发现的基因,是哺乳动物SWI/SNF家族的重要组成成分,在基因转录过程中起着至关重要的作用。BRG1主要通过水解三磷酸腺苷(ATP)提供动力实现染色体重组,使得一些特异性的基因不能表达和抑制^[1-2]。本研究通过制备好的结肠癌组织芯片,利用免疫组化技术,分析结肠癌组织中BRG1表达及其对结肠癌患者临床预后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

附有相关临床病理及术后随访资料的孔径1.5 mm的结肠癌组织芯片1张。组织芯片标本来源于连云港第二人民医院2005—2012年期间行结肠癌根治术的患者100例。术前均未行放化疗及其他辅助治疗。80例癌/癌旁各1点,20例癌1点;男67例,女33例;年龄30~72岁(中位年龄62岁),其中<62岁53例,≥62岁47例;TNM分期I/II期35例,III/IV期65例;T1/T2期51例,T3/T4期49例;根据淋巴结转移情况分:有淋巴结转移79例,无淋巴结转移21例;病理分级I级+I~II级+II级29例,II~III级+III级71例,按肿瘤大小(肿瘤最大径中位

[基金项目] 连云港市卫生局(局1413);连云港市“521工程”资助项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lygmiao@sina.com

数8 cm)分:<8 cm 51例,≥8 cm 49例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法检测结肠癌细胞BRG1的表达

采用免疫组化SP法,按照试剂盒说明书操作,兔抗人BRG1单克隆抗体为一抗,结肠癌组织芯片经DAB显色,苏木精复染,最后光镜观察。通过双盲法由2位病理学专家进行结果判读。兔抗人BRG1单克隆抗体购自美国Abcam公司,DAB显色试剂盒及SP试剂盒购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

BRG1染色阳性细胞为胞核呈棕黄色至深褐色,部分胞质可同时为淡黄色和(或)黄色,若只有胞质染色则视为阴性。采用二级计分法,按阳性细胞占计数肿瘤细胞的百分比评分:1分(0~25%),阴性表达(-);2分(26%~50%),低度表达(+);3分(51%~75%),中度表达(++);4分(76%~100%),高表达(+++)。按染色强度评分:0分(阴性),1分(弱阳性),2分(中度阳性),3分(强阳性)。两者计分相乘,低表达组为0~4分,高表达组为6~12分。

1.2.2 随访

采取信访、电话随访、患者所在地公安局人口处进行检索查询等方式随访,随访截止时间2015年6月,中位随访生存时间22个月。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0软件进行统计学处理,定性资料

采用 χ^2 检验,生存分析采用Cox比例风险模型,并将单因素分析中差别具有统计学意义的指标纳入多因素Cox生存分析,累计生存时间和累计生存率计算采用K-M法,生存检验采用log-rank检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组癌细胞BRG1表达分析

结肠癌细胞、癌旁组织BRG1阳性表达率分别为82%、15%,结肠癌细胞阳性表达率明显高于癌旁组织($\chi^2=79.962, P < 0.001$)。癌细胞BRG1的表达情况见图1,其与病理分级、TNM分期、T分期有显著相关性($\chi^2=6.753, P=0.009$; $\chi^2=5.069, P=0.024$; $\chi^2=10.827, P=0.001$),而与年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结是否转移无明显相关性($P > 0.05$,表1)。

2.2 预后因素分析

通过单因素Cox生存分析显示:肿瘤病理分级越低(HR=1.670, $P=0.043$)、肿瘤越大(HR=1.914, $P=0.003$)、有淋巴结侵犯(HR=5.121, $P < 0.001$)、TNM分期越高(HR=3.712, $P < 0.001$)以及癌细胞BRG1表达水平越高(HR=2.478, $P < 0.001$)预后越差(表2)。将单因素分析中差异具有统计学意义的指标纳入多因素Cox生存分析,发现是否侵犯淋巴结(HR=3.215, $P=0.004$)、TNM分期(HR=2.050, $P=0.010$)以及癌细胞BRG1表达水平(HR=2.283, $P=0.001$)是影响结肠癌预后的独立预测因素(表3)。BRG1在结肠癌细胞中高表达组预后较低表达组预后差($\chi^2=17.636, P < 0.001$,图2A);TNM分期III+IV期组预后较I+II期组预后差($\chi^2=31.177, P < 0.001$,图2B);病理分级中中低分化组预后较高分化组预后差($\chi^2=4.319, P=0.038$,图2C)。

3 讨论

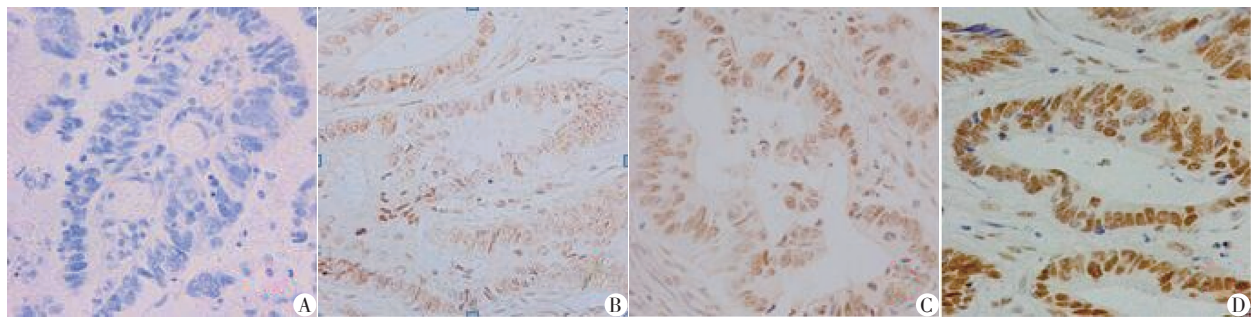
BRG1基因是SWI/SNF家族的重要组成成分,该

表1 各组BRG1表达分析

临床指标	肿瘤组织BRG1的表达[n(%)]		χ^2 值	P值
	低表达	高表达		
年龄			0.499	0.480
<62岁	24(45.3)	29(54.7)		
≥ 62 岁	18(39.6)	29(60.4)		
性别			1.519	0.218
男	31(46.3)	36(53.7)		
女	11(30.4)	22(69.6)		
病理分级			6.753	0.009
I+I~II+II	18(62.1)	11(37.9)		
II~III+III	24(35.1)	47(64.9)		
肿瘤大小			3.446	0.063
<8 cm	26(51.0)	25(49.0)		
≥ 8 cm	16(34.5)	33(65.5)		
T分期			10.827	0.001
T1+T2	29(56.9)	22(43.1)		
T3+T4	12(24.5)	37(75.5)		
是否侵犯淋巴结			2.502	0.114
是	30(57.1)	49(42.9)		
否	12(38.8)	9(61.2)		
TNM分期			5.069	0.024
I+II	20(57.1)	15(42.9)		
III+IV	22(39.5)	43(60.5)		

复合体由ATP酶亚单位中一个BRG1和BRM加上另外一个称为BRM/BRG1相关因子构成。BRG1基因定位于人类染色体19P上,其mRNA长约5 247 bp,共由34个内含子和35个外显子构成,基因编码的蛋白质相对分子量为20 500 Da, BRG1含有一个DNA依赖的具有ATP酶活性的类解旋酶亚基,通过水解ATP产生的动力而实现染色体的重组。在基因表达调节、细胞周期调控及肿瘤的发生发展中, BRG1已被证实具有重要作用^[3-5]。

研究发现,在胰腺癌、部分原发性非小细胞肺癌



A: 阴性表达; B: 低度表达; C: 中度表达; D: 高度表达。

图1 BRG1在结肠癌组织中免疫组化染色结果(x400)

表2 单因素Cox生存分析

变量	总生存率		
	HR	95% CI	P值
年龄(<62岁 vs. ≥62岁)	1.354	0.888~2.066	0.159
性别(男 vs. 女)	1.048	0.673~1.631	0.836
病理分级(I+I~II+II vs. II~III+III)	1.670	1.017~2.744	0.043
肿瘤大小(<8 cm vs. ≥8 cm)	1.914	1.250~2.931	0.003
T分期(T1+T2 vs. T3+T4)	1.234	0.810~1.879	0.329
是否侵犯淋巴结(否 vs. 是)	5.121	2.581~10.162	<0.001
TNM分期(I+II vs. III+IV)	3.712	2.263~6.089	<0.001
BRG1表达(低表达 vs. 高表达)	2.478	1.590~3.861	<0.001

表3 多因素Cox生存分析

变量	总生存率		
	HR	95%CI	P
病理分级(I+I~II+II vs. II~III+III)	0.873	0.511~1.490	0.618
肿瘤大小(<8 cm vs. ≥8 cm)	1.284	0.823~2.003	0.271
是否侵犯淋巴结(否 vs. 是)	3.215	1.439~7.183	0.004
TNM分期(I+II vs. III+IV)	2.050	1.188~3.539	0.010
BRG1表达(低表达 vs. 高表达)	2.283	1.415~3.684	0.001

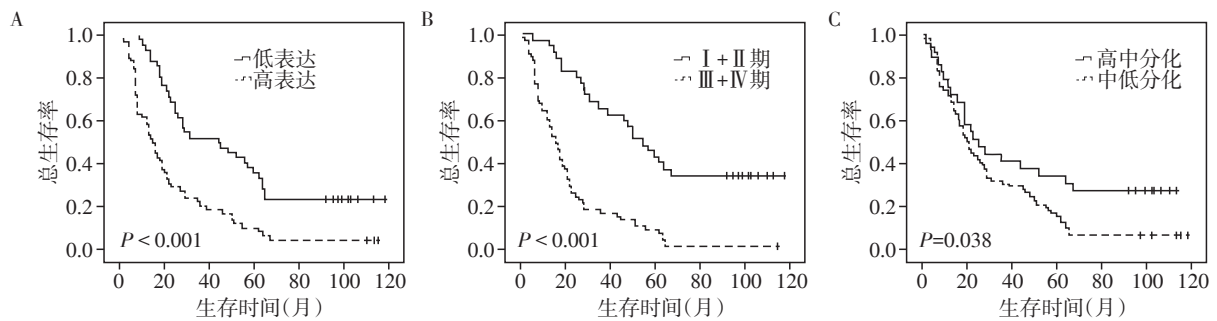


图2 BRG1在结肠癌细胞中低表达组和高表达组的生存曲线比较
A: 高表达组与低表达组的生存曲线比较($\chi^2=17.636, P < 0.001$); B: 临床病理分期(TNM) I+II期与III+IV期的生存曲线比较($\chi^2=31.177, P < 0.001$); C: 病理分级高中分化组与中低分化组生存曲线比较($\chi^2=4.319, P=0.038$)。

图2 BRG1在结肠癌细胞中低表达组和高表达组的生存曲线比较

癌细胞中,由于BRG1缺失或者突变样表达,提示较差的临床预后,进而表明BRG1是一种抑癌基因^[6-7]。其可能是BRG1通过与多种肿瘤抑制因子结合,上调相关细胞周期蛋白从而抑制癌细胞增殖。但是近年来发现BRG1在前列腺癌、宫颈癌、黑色素瘤和神经胶质瘤中表达上调,并且参与了肿瘤的形成和发展^[8-11]。这与BRG1是抑癌基因的结论相矛盾,很难界定BRG1究竟是癌基因还是抑癌基因,提示BRG1在不同的肿瘤细胞和组织类型中可能发挥不同的作用。

本研究结果显示,结肠腺癌中癌细胞BRG1总阳性率为82%,癌旁组织BRG1阳性率为15%,癌细胞BRG1阳性表达率明显高于癌旁细胞,差异有统计学意义($P < 0.001$)。Watanabe等^[12]报道了BRG1

在结直肠癌正常组织、腺瘤组织、癌组织中表达强度依次升高;敲除了BRG1基因的结肠癌细胞,因为发生了形态学上的改变,肿瘤侵犯增殖能力亦明显下降,与国内报道相一致^[13]。这表明随着由正常组织至良性病变组织最后到癌变的发生、发展过程中,BRG1均可能做为重要因素发挥了积极作用。但Lin等^[10]报道BRG1在发育不良痣中的表达与原发性和转移性黑色素瘤的表达情况,差异有统计学意义,但原发性黑色素瘤和转移性黑色素瘤中BRG1的表达情况,差异无统计学意义。表明BRG1在肿瘤癌变过程中发挥重要作用,但在肿瘤进展过程中发挥的作用仍不确切,可能因为不同的信号通路或者因细胞或组织类型的不同表现出一定的特异性。

有研究发现在前列腺癌、宫颈癌、胃癌等肿瘤组织中BRG1高表达与肿瘤分级、临床分期、浸润深度、淋巴结有无转移等临床病理因素密切相关^[8-9,14]。本研究发现BRG1的表达与病理分级、TNM分期、T分期有显著相关性($\chi^2=6.753, P=0.009$; $\chi^2=5.069, P=0.024$; $\chi^2=10.827, P=0.001$), 而与年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结是否转移无明显相关性($P > 0.05$)。肿瘤TNM分期、T分期、病理分级越高, BRG1阳性表达率越高。本研究经COX比例风险模型进一步证实BRG1高表达与结肠癌不良预后密切相关, BRG1高表达是结肠癌一个重要的危险预后因素($HR=2.283, P=0.001$)。K-M生存曲线进一步分析结肠癌癌细胞中BRG1低表达组病例预后较高表达组预后好($\chi^2=17.636, P < 0.001$); 临床病理分期(TNM) I + II期组预后较III + IV期组预后好($\chi^2=31.177, P < 0.001$); 病理分级中高中分化组预后较中低分化组预后好($\chi^2=4.319, P=0.038$); 与国内相关报道基本一致^[15]。进一步证明了BRG1可能在结肠腺癌的发生、发展和转移过程中发挥重要作用。目前已经证实抑癌基因PTEN的缺失和AKT磷酸化在结肠癌的发生发展中具有重要意义。结肠癌中BRG1的高表达抑制了抑癌基因PTEN在mRNA和蛋白水平的表达, 进而诱导PI3K-AKT信号通路激活导致细胞周期蛋白D1(cyclin D1)表达上调, 促进肿瘤细胞增殖^[12]。但亦有报道低水平表达的结直肠癌BRG1通过调节STAT3/VEGFC信号表达, 促进了肿瘤淋巴结的转移, 进而促进了肿瘤的广泛转移^[16]。因此, 目前BRG1在结肠癌中的作用机制尚不明确, 有待进一步研究。

本实验研究了BRG1在结肠癌中的表达情况以及预后的关系。证实了其于结肠癌的发生、发展具有一定相关性。BRG1可以作为预测肿瘤病理分级、判断预后的重要指标之一。BRG1有可能成为治疗结肠癌的新靶点。

[参考文献]

- [1] Wong AK, Shanahan F, Chen Y, et al. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6171-6177
- [2] Asp P, Wihlborg M, Karlén M, et al. Expression of BRG1, a human SWI/SNF component, affects the organisation of actin filaments through the RhoA signalling pathway [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 13): 2735-2746
- [3] Ansam CG, Thom CS. Oncogenesis caused by loss of the SNF5 tumor suppressor is dependent on activity of BRG1, the ATPase of the SWI/SNF chromatin remodeling complex [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 8094-8101
- [4] Naidu SR, Love IM, Imbalzano AN, et al. The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(27): 2492-2501
- [5] Lee RS, Roberts CW. Linking the SWI/SNF complex to prostate cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(11): 1268-1269
- [6] Fukuoka J, Fujii T, Shih JH, et al. Chromatin remodeling factors and BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(13): 4314-4324
- [7] Dal Molin M, Hong SM, Hebbar S, et al. Loss of expression of the SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1/SMARCA4 is frequently observed in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(4): 585-591
- [8] Sun A, Tawfik O, Gayed B, et al. Aberrant expression of SWI/SNF catalytic subunits BRG1/BRM is associated with tumor development and increased invasiveness in prostate cancers [J]. *Prostate*, 2007, 67(2): 203-213
- [9] 王秀明, 何莲芝. Brg1基因在宫颈癌中的表达 [J]. *安徽医学*, 2010, 31(5): 446-448
- [10] Lin H, Wong RP, Martinka M, et al. BRG1 expression is increased in human cutaneous melanoma [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 163(3): 502-510
- [11] Bai J, Mei PJ, Liu H, et al. BRG1 expression is increased in human glioma and controls glioma cell proliferation, migration and invasion *in vitro* [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(6): 991-998
- [12] Watanabe T, Semba S, Yokozaki H. Regulation of PTEN expression by the SWI/SNF chromatin-remodelling protein BRG1 in human colorectal carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(1): 146-154
- [13] 李丹, 鄢文海, 李国栋. Brg1在结肠癌中的表达研究 [J]. *胃肠病学*, 2012, 17(9): 562-563
- [14] Sentani K, Oue N, Kondo H, et al. Increased expression but not genetic alteration of BRG1, a component of the SWI/SNF complex, is associated with the advanced stage of human gastric carcinomas [J]. *Pathobiology*, 2001, 69(6): 315-320
- [15] 徐溢新, 刘佳, 宋军, 等. BRG1基因在II期结肠癌中的表达及其对预后的影响 [J]. *徐州医学院学报*, 2015, 35(10): 654-656
- [16] Zhu X, Sun L, Lan J, et al. BRG1 targeting STAT3/VEGFC signaling regulates lymphangiogenesis in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36501-36509

[收稿日期] 2016-12-02