

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.033

AEBP1 在结直肠癌中的表达及其意义

孙 坚¹ 邓 杰¹ 毕 胜¹ 杨海波² 李 著^{1△}

(1 中国人民解放军第一六九医院普外科 湖南 衡阳 421002; 2 中国人民解放军 91878 部队医院 广东 湛江 524000)

摘要 目的:研究脂肪细胞增强结合蛋白 1(AEBP1)在结直肠癌组织中的表达情况,以探索其临床意义。**方法:**运用免疫组织化学和实时定量 PCR 技术,对 AEBP1 在结直肠癌中的表达情况进行检测,并分析其表达量与患者临床病理特征的关系。**结果:**AEBP1 在结直肠正常组织、腺瘤和癌组织中的免疫评分有明显差异($P<0.05$),而且 AEBP1 的阳性表达与肿瘤的分期和浸润深度明显相关。基因水平 AEBP1 的表达在肿瘤组织中明显高于正常组织。**结论:**AEBP1 在结直肠癌组织中存在异常表达,并且可能是结直肠癌早期诊断和浸润深度的肿瘤标志物。

关键词: 结直肠肿瘤;脂肪细胞增强结合蛋白 1;病理学;临床

中图分类号: Q-93-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)29-5727-04

Expression of AEBP1 in Colorectal Adenocarcinoma and its Clinical Significance

SUN Jian¹, DENG Jie¹, BI Sheng¹, YANG Hai-bo², LI Zhu[△]

(General Surgery Department, The 169TH Hospital of P.L.A., Hengyang, Hunan, 421002, China

2 2 Hospital of 91878 Military Troops, Zhanjiang, Guangdong, 524000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the association between the expression of Adipocyte enhancer-binding protein 1 (AEBP1) and the clinicopathological characteristics of CRC patients in order to find out the clinical significance of this protein. **Methods:** The AEBP1 expression levels were determined by immunohistochemistry and qPCR. The relationship of the expression of AEBP1 and clinicopathological characteristics was analyzed. **Results:** There were significant difference of the AEBP1 expression in CRC tissues and Adenoma tissues compared with Normal tissues ($P<0.05$); the expression of AEBP1 was correlated with TNM staging and tumor invasion. Moreover, AEBP1 mRNA expression levels were also significantly different between CRC tissues and their corresponding normal tissues. **Conclusion:** Our results indicate that AEBP1 protein expression is aberrantly detected in CRC tissues, and has potential value of biomarker for CRC early detection and tumor invasion.

Key words: Colorectal neoplasms; Adipocyte enhancer-binding protein 1; Pathology; Clinical

Chinese Library Classification: Q-93-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5727-04

前言

结直肠癌是世界上最常见的三大恶性肿瘤之一,占肿瘤导致患者死亡人数的第三位^[1]。人们对结直肠癌的发病机制仍然没有研究清楚,因此,早期诊断仍然是提高患者预后的有效手段^[2-4]。目前有很多蛋白标志物,比如癌胚抗原,CA19-9等,用于结直肠癌的诊断^[5-6]。但是,这些肿瘤标志物对于肠癌诊断,尤其是早期诊断的敏感性和特异性不够^[7,8],CEA在临床上一般用于观察患者的治疗效果以及检测肿瘤复发,而对患者早期诊断意义不大,因此,寻找新的可用于结直肠癌早期诊断的肿瘤标志物具有重要意义。

脂肪细胞增强结合蛋白 1(AEBP1)是一个新型的炎症调

节因子^[9],在很多组织中存在表达^[10],研究证明 AEBP1 可以通过抑制 IKBa 来促进 NF- κ B 的活性^[11-13],关于 AEBP1 在结直肠癌中的研究尚未有报道,本文应用免疫组化和实时定量 PCR 技术对 AEBP1 在结直肠癌中的表达情况进行分析,并对其临床意义进行探讨。

1 材料和方法

1.1 组织标本

本次研究中,我们应用 176 个蜡块,其中 156 个为肿瘤和正常组织的配对蜡块,20 个为息肉蜡块,另外我们还选用了 70 个配对的新鲜组织。所有的标本都来自中国人民解放军第一六九医院普外科,标本的病理特征见表 2,本实验采用 TNM 分期法进行病理分期。本实验通过了医院伦理委员会,每位患者都签订了知情同意书。

1.2 免疫组化及组织芯片

所选用的 156 个蜡块制成两张组织芯片用于免疫组化实

作者简介:孙坚(1976-),男,学士学位,主治医师,

电话:13875661250, E-mail: ssjj169@sohu.com

△通讯作者:李著, E-mail: tufeil@163.com

(收稿日期:2013-11-21 接受日期:2013-12-19)

免疫组织化学实验采用 SP 法,操作过程严格参照说明书进行,一抗购自上海市长岛生物科技有限公司,阳性对照使用由既往实验证实的阳性组织,阴性对照使用 PBS 代替一抗。结果分析:阳性信号为棕黄色颗粒,根据染色强弱,染色强度评分为 0 分(阴性)、1 分(弱阳性)、2 分(阳性)以及 3 分(强阳性);根据染色百分比,染色百分比评分为 1 分(< 25%细胞染色),2 分(25-50%细胞染色),3 分(51-75%细胞染色),以及 4 分(> 75%细胞染色),最后的免疫评分(IRS)为细胞染色强度评分和染色百分比评分的乘积。IRS=0 为阴性,IRS=1-7 为弱阳性,IRS=8-12 为阳性。

1.3 总 RNA 的提取及 RT-PCR

提取 70 个配对组织的总 RNA,用 TaKaRa 试剂盒进行反转录和定量 PCR, AEBP1 上游引物为:5' - catctaccacacacgtg-gaa -3';下游引物为:5' - cactctcggtcaccacatt -3', Actin 选作内参,引物由生工公司合成,采用相对表达量衡量基因表达水平,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件,计数资料用 t 检验分析,计数资料用卡方检验分析,计量资料用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

免疫组化结果如图 1 所示, AEBP1 阳性染色主要集中在肿瘤细胞质内。在 156 个正常组织中, 83% (131/156) 阴性染色, 16% (25/156) 为弱阳性染色, 无阳性染色, 其中 IRS=0 的占 84% (131/156), IRS=2 的占 0.6% (1/156), IRS=3 的占 6.4% (10/156), IRS=4 的占 9% (14/156); 在 20 个息肉组织中, 无阴性染色, 90% (18/20) 为弱阳性染色, 10% (2/20) 为阳性染色, 其中 IRS=2, 4, 6, 8 的分别占 30% (6/20), 40% (8/20), 20% (4/20), 10% (2/20); 在所有的肿瘤标本中, 无阴性染色, 21% (33/156) 为弱阳性染色, 60% (94/156) 为阳性染色, 19% (29/156) 为强阳性染色, 其中 IRS=2, 3, 4, 6, 8, 9, 12 的分别占 3.2% (5/156), 3.2% (5/156), 14.7% (23/156), 30.8% (48/156), 29.5% (46/156), 6.4% (10/156), 12.2% (19/156), AEBP1 的表达量在肿瘤、腺瘤和正常组织中有明显的差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

进一步分析, 正常组织、腺瘤、肿瘤组织 IRS 的均值分别为 0.56 ± 1.316 , 4.2 ± 1.936 , 6.99 ± 2.567 , 从数据可以看出随着疾病的进展, AEBP1 蛋白的表达量有一个明显的递增趋势, 如图 2 所示。

接下来对 AEBP1 蛋白表达与临床病例特征的关系进行分析, 结果如表 2 所示, AEBP1 蛋白表达的阳性率与结直肠癌临床分期、浸润深度以及生长部位相关, 而与性别、年龄、肿瘤直径、分化程度、淋巴转移、远处转移等其他临床特征无关, 表现为 I 期、II 期患者中的阳性表达率明显高于 III 期、IV 期患者 ($56.4\% \text{ vs } 43.6\%$, $P < 0.05$); 按浸润深度分组, 浸润至黏膜层以及肌层的为 (T1+T2) 组, 浸润至浆膜层及以外者为 (T3+T4) 组, 结果发现 AEBP1 在 (T1+T2) 组的免疫评分和阳性表达率明显高于 (T3+T4) 组, 如图 3 所示。

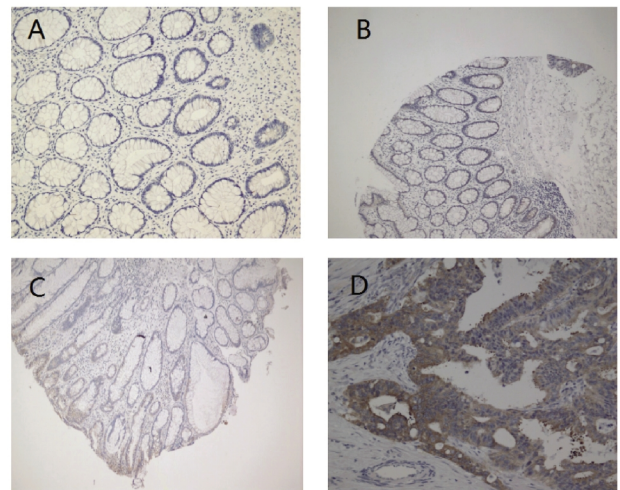


图 1 AEBP1 的免疫组化结果。A: 正常细胞的阴性染色; B: 正常的弱阳性染色; C: 腺瘤的弱阳性染色; D: 肿瘤细胞的阳性染色。放大倍数为 100 倍

Fig. 1 Representative immunohistochemical staining for AEBP1 expression. A, Negative staining (scoring=0) in normal tissues. B, Weakly positive staining (scoring=2) in normal tissues. C, Weakly positive staining in adenoma tissues (scoring=2). D, positive staining in CRC tissues (scoring=12). Magnification, $\times 100$

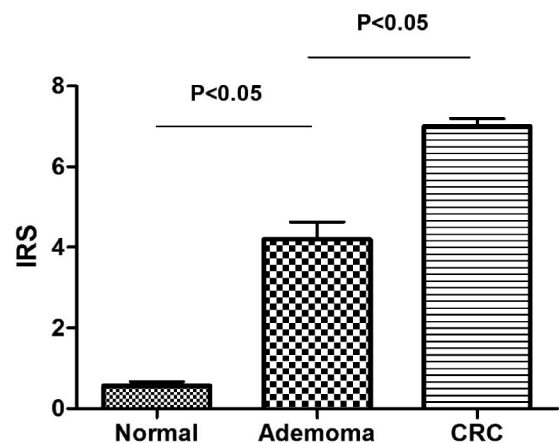


图 2 正常组织、腺瘤和肿瘤组织的免疫评分

Fig. 2 The IRS of AEBP1 protein expression in the CRC tissues, their corresponding normal tissue and the adenoma tissues

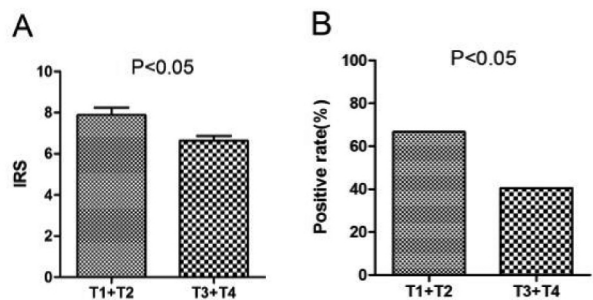


图 3 (T1+T2) 组以及 (T3+T4) 组中 AEBP1 的表达情况

A: 两组间免疫评分的差异; B: 两组间阳性表达率的差异

Fig. 3 The IRS (A) and rates (B) of AEBP1 protein expression in T1+T2 group and T3+T4 group

表 1 正常组织、腺瘤和结直肠癌组织中 AEBP1 的免疫评分

Table 1 Classification of AEBP1 protein immunoreactivity in the CRC tissues, their corresponding normal tissue and the adenoma tissues

Group	N	IRS(%)					P value	
		0	1-4	5-8	9-12	All positive	vs. Normal	vs. Adenoma
Normal	156	131(84%)	25(16%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)		
Adenoma	20	0(0%)	14(70%)	6(30%)	0(0%)	2(10%)	<0.001	
CRC	156	0(0%)	33(21%)	94(60%)	29(19%)	75(48%)	<0.001	<0.001

Note: CRC, colorectal cancer; IRS, immunoreactive score.

表 2 AEBP1 的阳性表达与临床特征的关系

Table 2 Correlation of AEBP1 protein expression with CRC patients' pathological features

Clinical features		Cases	AEBP1 positive	P value
Gender		156		0.164
	Male	88	38(43.2%)	
	Femal	68	37(54.4%)	
Age(year)		156		0.182
	≤ 60	54	22(60.7%)	
	> 60	102	53(52.0%)	
Lesion sites		156		0.113
	Colon	75	41(54.7%)	
	Rectum	81	34(42.0%)	
Gross pathology		156		0.471
	Exophytic	43	29(67.4%)	
	Exophytic & Ulceration	6	3(50.0%)	
	Ulceration	97	68(70.1%)	

另外,我们也进行了定量 PCR 实验,结果发现在基因水平上,AEBP1 在肿瘤组织中的表达量也明显高于正常组织 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前,结直肠癌是人类常见的恶性肿瘤之一,目前其致病机制仍没有研究清楚,慢性炎症通常可以破坏导管上皮细胞和其间质细胞之间的正常联系,从而诱导肿瘤的发生^[14,15]。脂肪细胞增强结合蛋白 1(AEBP1)是一个重要的炎症调节因子^[16],在以前的实验中,有人在体内实验中发现 AEBP1 在动脉粥样硬化的发病中起到关键作用,并证明其可以作为动脉粥样硬化预防和治疗的靶点^[17];有文章研究发现 AEBP1 可能通过结合 IK-BA 参与调控 NF-κB 信号通路,证实 AEBP1 可能是一个炎症治疗的新靶点^[16,18];关于它在肿瘤发生发展中的作用,有人运用 q-PCR 和 ChIP-PCR 技术发现 AEBP1 在胶质瘤细胞的增殖和生存能力方面起到重要作用^[19];Ryan W. Holloway 等人发现 AEBP1 参与到上皮细胞和细胞基质之间的信号通路中,从而促进炎症组织向肿瘤方向发展^[20]。

而关于 AEBP1 在结直肠癌中的表达情况未见相关报道,我们免疫组化实验的结果证实,大部分正常组织(83%, 131/156)中没有检测到 AEBP1 的表达,在 90%(18/20)的腺瘤组织中检测出 AEBP1 的弱阳性表达,而有 79%(123/156)的肿瘤组织表现出 AEBP1 的阳性表达,正常组织、腺瘤、肿瘤组织 ISR 的均值分别为 0.56 ± 1.316 、 4.2 ± 1.936 、 6.99 ± 2.567 ,可见,随着疾病的进展 AEBP1 的表达量有一个明显的递增趋势,AEBP1 蛋白的这种差异性表达表明 AEBP1 参与了结直肠癌

的发生发展,并且由于在腺瘤和早期肠癌患者中即可检测到表达,因此 AEBP1 很可能是肠癌的一个早期事件。

进一步将 AEBP1 蛋白表达与临床病例特征的关系进行分析,我们发现 AEBP1 的表达与患者临床分期和浸润深度密切相关,主要表现在 I 期患者中的表达量高于 II、III、IV 患者,临床上区分 I、II 期患者的标志是肿瘤是否浸润至浆膜层,因此,本实验进一步分析了 AEBP1 表达与肿瘤浸润深度关系,发现 AEBP1 与肿瘤的浸润深度密切相关,表现为在 T1 和 T2 组患者中的表达量明显高于 T3 和 T4 组患者,这也解释了 AEBP1 在 I 期患者中的表达量高于 II、III、IV 患者,这种差异性表达表明 AEBP1 也可以作为监测结直肠癌患者疾病进展的指标。

通过本次实验,我们发现 AEBP1 在结直肠癌组织中存在异常表达,并证明了 AEBP1 可能是结直肠癌早期诊断或者浸润深度的肿瘤标志物,但是,关于 AEBP1 在结直肠癌发生发展中的具体功能以及相关的机制,有待于细胞实验的进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians, 2012, 62: 10-29
- [2] Ross JS. Biomarker update for breast, colorectal and non-small cell lung cancer[J]. Drug News Perspect, 2010, 23: 82-88
- [3] Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology [J]. Journal of Clinical Oncology, 2001, 19: 1865-1878
- [4] Duffy M, Van Dalen A, Haglund C, et al. Tumour markers in

- colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use[J]. *European Journal of Cancer*, 2007, 43: 1348-1360
- [5] Wang Q, Zhang Y-N, Lin G-L, et al. S100P, a potential novel prognostic marker in colorectal cancer [J]. *Oncology reports*, 2012, 28: 303-310
- [6] Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, et al. Expression of histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer[J]. *Oncology reports*, 2011, 26: 343-348
- [7] Walther A, Johnstone E, Swanton C, et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9: 489-499
- [8] Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor targeted therapy in metastatic colorectal cancer [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009, 101: 1308-1324
- [9] Majdalawieh A, Zhang L, Fuki IV, et al. Adipocyte enhancer-binding protein 1 is a potential novel atherogenic factor involved in macrophage cholesterol homeostasis and inflammation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 2346-2351
- [10] Kim S-W, Muise AM, Lyons PJ, et al. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 10199-10206
- [11] Majdalawieh A, Zhang L, Ro H-S. Adipocyte enhancer-binding protein-1 promotes macrophage inflammatory responsiveness by up-regulating NF- κ B via I κ B α negative regulation[J]. *Molecular biology of the cell*, 2007, 18: 930-942
- [12] Ro H-S, Kim S-W, Wu D, et al. Gene structure and expression of the mouse adipocyte enhancer-binding protein[J]. *Gene*, 2001, 280: 123-133
- [13] Majdalawieh A, Ro H-S. LPS-induced suppression of macrophage cholesterol efflux is mediated by adipocyte enhancer-binding protein 1[J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2009, 41: 1518-1525
- [14] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420: 860-867
- [15] Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer[J]. *Cell*, 2004, 118: 671-674
- [16] Majdalawieh A, Ro H-S. Regulation of I Mediators of inflammation, 2010, 2010
- [17] Bogachev O, Majdalawieh A, Pan X, et al. Adipocyte Enhancer-Binding Protein 1 (AEBP1)(a Novel Macrophage Proinflammatory Mediator) Overexpression Promotes and Ablation Attenuates Atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} Mice[J]. *Molecular Medicine*, 2011, 17: 1056
- [18] Ryan J. Isolated AEBP1 genomic polynucleotide fragments from chromosome 7 and their uses. In: Google Patents, 2012
- [19] Ladha J, Sinha S, Bhat V, et al. Identification of genomic targets of transcription factor AEBP1 and its role in survival of glioma cells[J]. *Molecular Cancer Research*, 2012, 10: 1039-1051
- [20] Holloway RW, Bogachev O, Bharadwaj AG, et al. Stromal Adipocyte Enhancer-binding Protein (AEBP1) Promotes Mammary Epithelial Cell Hyperplasia via Proinflammatory and Hedgehog Signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287: 39171-39181

(上接第 5715 页)

- [12] Shokeir TA, Fawzy M, Tatongy M. The nature of intrauterine adhesions following reproductive hysteroscopic surgery as determined by early and late follow-up hysteroscopy:clinical implications [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2008, 277(5): 423-427
- [13] Al-Inany H. Intrauterine adhesions [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001, 80: 986-993
- [14] Lin JC, Chen YO, Chang CC, et al. Novel adjunctive treatment for cervical adhesion with cross-type nelaton catheter: a preliminary report and literature review.Taiwan [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 46(1): 38-42
- [15] Agostini A, Cravello L, Desbrière R, et al. Hemorrhage risk during operative hysteroscopy[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2002, 81(9): 878-881
- [16] Orhue AAE, Aziken ME, Igbefoh JO. A comparison of two adjunctive treatments for intrauterine adhesions following lysis[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003, 82(1): 49-56
- [17] Zikopoulos KA, Kolibianakis EM, Platteau P, et al. Live delivery rates in subfertile women with Asherman's syndrome after hysteroscopic adhesiolysis using the resectoscope or the Versapoint system[J]. *RBM Online*, 2004, 8(6): 720-725
- [18] Preutthipan S, Linasmita V. Reproductive outcome following hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions: a result of 65 cases at Ramathibodi Hospital[J]. *Med Assoc Thai*, 2000, 83(1): 42-46
- [19] Kodaman PH, Arici A. Intrauterine Adhesions and Fertility Outcome: How to Optimize Success?[J]. *Postgraduate Obstetrics & Gynecology*, 2007, 27: 1-8
- [20] March CM. Intrauterine adhesions [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1995, 22(3): 491-505
- [21] 陶址, 段华. 宫腔镜粘连分离术后创面渗液中粘连相关细胞因子浓度的动态分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(10): 734-737
- Tao Zhi, Duan Hua. Dynamic analysis of adhesion in exudate correlated cytokine concentrations of hysteroscopic adhesiotomy [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2012, 47(10): 734-737
- [22] A.A.E. Orhue, M.E. Aziken, J.O.Igbefoh. A comparison of two adjunctive treatments for intrauterine adhesions following lysis [J]. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2003, 82 (1): 49-56