

BORIS 在结直肠癌中的表达及其临床意义

蔡育志¹, 廖海华¹, 韩靖², 高剑¹, 刘丁一¹, 张彤¹

1.广州市番禺区中心医院消化中心, 广东 广州 511400

2.广州市番禺区中心医院病理科, 广东 广州 511400

【摘要】 目的 探讨分析印痕位点调节因子样(brother of regulator of imprinted sites, BORIS)蛋白在结直肠癌中的表达情况及其预后意义。方法 通过免疫组织化学的方法分析 BORIS 蛋白在 77 例结直肠癌组织和 20 例癌旁正常组织中的表达, 并分析 BORIS 的表达状态与结直肠癌患者的临床病理特点与患者预后的关系。结果 在癌旁正常组织中无 BORIS 蛋白表达, 而在结直肠癌患者中 BORIS 的阳性率为 66.2%。BORIS 阳性更多见于以下患者: 肿瘤直径较大、组织分化较差、进展期 T 分期、淋巴结转移和进展期 TNM 分期。BORIS 阴性组的患者总体生存预后明显优于 BORIS 阳性组的患者, 两组患者的 5 年生存率分别为 73.1% 和 29.2%。多因素 Cox 回归分析的结果显示组织分化类型、T 分期、远处转移和 BORIS 表达状态是影响本组结直肠癌患者的独立预后因素。结论 BORIS 在结直肠组织中呈过表达状态, 并与进展期 TNM 密切相关。BORIS 可能可以作为结直肠患者的潜在预后预测指标。

【关键词】 BORIS; 结直肠癌; 临床病理特点; 预后

Clinical and prognostic significance of BORIS in colorectal cancer

CAI Yu-zhi¹, LIAO Hai-hua¹, HAN Jing², GAO Jian¹, LIU Ding-yi¹, ZHANG Tong¹

1. Department of digestive center, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China

2. Department of pathology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression and prognostic value of brother of regulator of imprinted sites (BORIS) in colorectal cancer. **Methods** The expression of BORIS protein were analyzed by immunohistochemistry in 77 cases of colorectal cancer specimens and 20 cases of adjacent normal tissue of the patients with colorectal cancer. The correlation of BORIS expression with clinicopathologic factors and survival outcome of colorectal cancer patients were retrospectively evaluated. **Results** No BORIS positive cases in the adjacent normal tissues and the BORIS positive rate of colorectal cancer tissues was 66.2%. The positive expression of BORIS was more likely to be found in patients with larger tumor size, poorly differentiated histological type, advanced T stage, lymph node metastasis and late TNM stage. The overall survival rate was significantly higher in the patients with BORIS negative group than the ones with BORIS positive group (5-year survival rate of BORIS negative and positive group was 73.1% and 29.2% respectively). Multivariate Cox regression analysis showed histological degree, T stage, distant metastasis and BORIS expression were the independent prognostic factors for colorectal patients in this study. **Conclusion** BORIS was highly elevated in colorectal cancer tissues and it was associated with advanced TNM stage. BORIS was a potentially prognostic biomarker in colorectal cancer.

【Key words】 BORIS; Colorectal cancer; Clinicopathological feature; Prognosis

根据最新的 Globocan 的研究数据分析结果显示, 全球结直肠癌新发病例数约 180 万, 高居所有恶性肿瘤的第三位^[1]。尽管结直肠癌的研究及治

疗都取得长足进展, 结直肠癌的治疗效果仍然不佳, 患者仍因术后复发转移而死亡, 因此全球结直肠癌的死亡例数约为 86 万, 高居恶性肿瘤的第二位。因此寻找一种能够用于预测结直肠癌术后生存情况的生物标记物至关重要。印记位点调节因子 (Brother of regulator of imprinted sites, BORIS)

作者简介: 蔡育志, 副主任医师, E-mail: Cai529@163.com;

通讯作者: 张彤, 主任医师, E-mail: zhangtong1564@163.com

是新近发现的常染色体遗传的 CCCTC 结合因子家族成员^[2],在乳腺癌^[3]、子宫内膜癌^[4]中呈异常高表达状态,并促进肿瘤的发生发展。本研究拟在结直肠癌标本中通过免疫组织化学的方法探讨 BORIS 的表达情况,通过分析其与结直肠癌患者的临床病理特征和预后的关系,探讨 BORIS 的临床相关性,从而为结直肠癌的早期诊断及生物标记物预测提供理论依据。

1 方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月间广州市番禺区人民医院普外科收治的结直肠癌并行结直肠癌根治术的患者 74 例,入组标准包括:1)接受根治性手术,术后病理证实为腺癌;2)未行新辅助化疗、放疗或放化疗;3)临床及病理资料完整,有完整的随访资料。共入组患者 77 例。回顾性将该 77 例结直肠癌标本及随机选取 20 例癌旁正常结直肠组织(距肿瘤病灶 5 cm)进行切片分析。

1.2 主要试剂 兔抗人 BORIS 购于 Abcam 公司。SP 超敏二步免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学实验方法 免疫组化的步骤采用 SP 超敏二步法,严格按照试剂盒说明书上的内容进行操作。将制好的组织切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水、阻断内源性过氧化物酶活性后,一抗(BORIS 1:250 稀释),4℃孵育过夜。PBS 代替一抗作为阴性参照。滴加 NRP 标记二抗孵育后。分别经 DAB 显色、苏木素复染及封片。免疫组织化学染色结果判断以出现淡黄色至棕褐色为阳性表达,每张玻片随机选取 5 个高倍镜视野,按照高倍镜视野下阳性细胞的数和染色强度进行半定量评分从而进行 BORIS 免疫组化染色结果评定。阳性细胞的染色强度评分根据如下:无着色者 0 分,淡黄色者 1 分,棕黄色者 2 分,棕褐色者 3 分。阳性

细胞的数量评分根据如下:阴性者 0 分,阳性细胞数占 1%~25%者 1 分,25%~50%者 2 分,50%~75%者 3 分,两得分相乘后,如分值超过 3 分则判定为 BORIS 阳性表达,分值<3 分则判定为 BORIS 阴性表达^[5]。

1.4 统计学分析 本组资料采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数(百分比)的形式表示,计数资料间的资料比较采用 χ^2 检验或精确 Fisher's 法检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 Log-rank 法进行生存差异比较,采用 Life-Table 法进行生存率估算,影响因素分析采用 Cox 回归比例风险模型。定义 $P<0.05$ 为差异具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 BORIS 在结直肠癌组织和癌旁组织的表达 通过免疫组织化学的方法对切片进行染色,发现 BORIS 主要表达于细胞质中,在结直肠癌组织中主要以 BORIS 阳性表达为主(66.2%),77 例研究对象中有 51 例结直肠癌组织呈阳性表达,在癌旁正常结直肠组织全以 BORIS 阴性表达,无 1 例阳性表达。BORIS 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达图片详见图 1。

2.2 BORIS 表达与结直肠癌临床病理特征的关系 在本组患者中,BORIS 表达与结直肠癌临床病理特征的关系详见表 1。如表 1 所述,结直肠癌组织中 BORIS 的表达水平与患者的年龄、性别、肿瘤部位和远处转移无明显关系,差异无显著的统计学意义($P>0.05$)。其中肿瘤直径较小者(≤ 5 cm)的 BORIS 阳性率明显低于肿瘤直径较大(>5 cm)的结直肠癌患者($P<0.05$),低分化患者明显高于高中分化的患者($P<0.05$),T3+T4 期的患者明显高于 T1+T2 期的患者($P<0.05$),淋巴转移的患者明显高于无淋巴转移的患者($P<0.05$),TNM III期+IV 期的患者明显高于 I 期+II 期的患者($P<0.05$)。

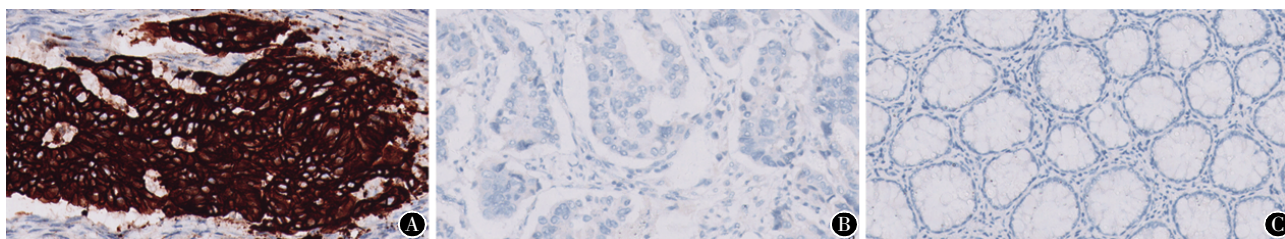


图 1 BORIS 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中的表达图($\times 400$)。图 1A 结直肠癌 BORIS 阳性;B. 结直肠癌 BORIS 阴性;C. 癌旁结直肠组织 BORIS 阴性

表 1 BORIS 表达与可根治结直肠癌患者临床病理特征的关系

项目	例数	BORIS 阴性	BORIS 阳性	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				1.152	0.283
≤ 60	32	13(50.0%)	19(37.3%)		
>60	45	13(50.0%)	32(62.7%)		
性别				0.052	0.820
男	49	17(65.4%)	32(62.7%)		
女	28	9(34.6%)	19(37.3%)		
肿瘤大小(cm)				4.960	0.026
≤ 5	31	15(57.7%)	16(31.4%)		
>5	46	11(42.3%)	35(68.6%)		
肿瘤部位				1.887	0.170
结肠	36	15(57.7%)	21(41.2%)		
直肠	41	11(42.3%)	30(58.8%)		
分化级别				4.697	0.030
高、中分化	40	18(69.2%)	22(43.1%)		
低分化	37	8(30.8%)	29(56.9%)		
T 分期				4.969	0.026
T ₁ +T ₂	23	12(46.2%)	11(21.6%)		
T ₃ +T ₄	54	14(53.8%)	40(78.4%)		
淋巴转移				13.063	<0.001
否	40	21(80.8%)	19(37.3%)		
是	37	5(19.2%)	32(62.7%)		
远处转移				0.974	0.324
否	67	24(92.4%)	43(84.3%)		
是	10	2(7.7%)	8(15.7%)		
TNM 分期				11.149	0.001
I+II	33	18(69.2%)	15(29.4%)		
III+IV	44	8(30.8%)	36(70.6%)		

2.3 BORIS 表达水平与结直肠癌患者生存预后的关系 将本组 77 例结直肠癌患者根据 BORIS 免疫组化结果的表达差异分为 BORIS 阳性组及 BORIS 阴性组。结果显示 BORIS 阳性组及 BORIS 阴性组患者的 5 年生存率分别为 73.1% 及 29.2%。

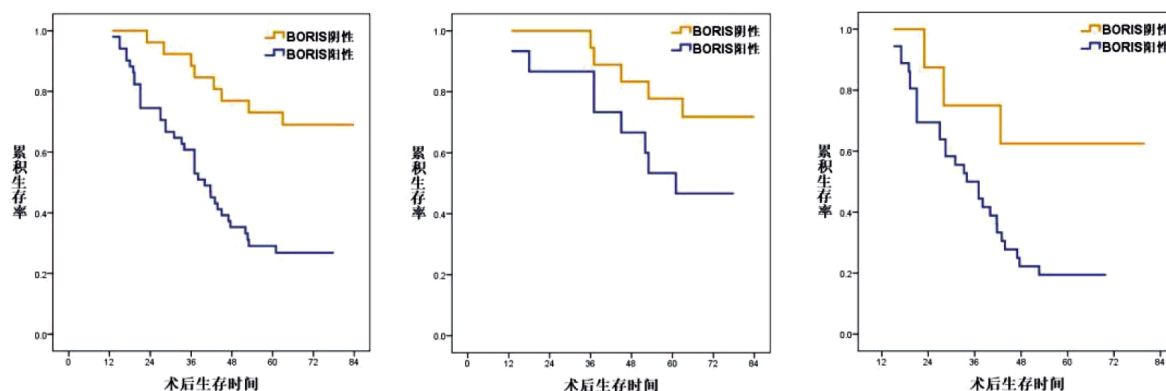


图 2 BORIS 表达水平与本组结直肠癌患者总体预后的关系。A. 总体生存率比较; B. TNM I 期和 II 期; C. TNM III 期和 IV 期

对两组患者采用 Kaplan-Meier 法进行生存曲线绘制如图 2 所示, 后采用 Log-rank 法进行生存率比较, 结果显示 BORIS 阴性组的术后生存率明显高于 BORIS 阳性组的患者($\chi^2=12.802, P<0.001$)。对 TNM 分期进行亚组分析, 结果显示在 I/II 期的患者中, BORIS 阳性的患者与 BORIS 阴性组比较无明显的生存差异($\chi^2=2.574, P=0.109$), 两组患者的 5 年生存率分别为 77.7% 和 53.3% (见图 2B)。然而在 III/IV 期的患者中, BORIS 阳性表达组的患者总体生存率明显差于 BORIS 阴性组的患者, 差异具有显著的统计学差异($\chi^2=4.233, P=0.040$), 两组患者的 5 年生存率分别为 19.4% 和 62.5% (见图 2C)。

将本组的临床病理资料纳入 Cox 回归分析, 单因素分析结果显示组织分化级别、肿瘤大小、T 分期、淋巴转移、远处转移、TNM 分期、BORIS 蛋白的表达状态是影响本组患者总体预后的因素 ($P<0.05$)。将单因素分析结果有统计学意义的量纳入多因素 Cox 回归分析, 结果显示本组结直肠癌患者的独立预后因素包括组织分化级别、T 分期、远处转移及 BORIS 表达 (P 均 <0.05)。

3 讨论

BORIS 具有 11 个锌指结构的特殊结构, 是转录因子 CCCTC 结合因子 (CCCTC-binding factor, CTCF) 的同源衍生物, 但两者 N 端和 C 端的氨基酸序列不同, 同源性不超过 18%, 因此 BORIS 又被称为 CTCF 样蛋白 (CCCTC-binding-like protein, CTCFL)^[6]。然而与 CTCF 广泛表达于体细胞和生殖细胞不同, BORIS 在健康人体中仅在胚胎细胞和生殖细胞中表达, 而在其他正常组织中不表达,

表2 影响结直肠癌患者生存时间的单因素及多因素分析

临床病理特征	单因素分析				多因素分析			
	χ^2 值	95%CI		P 值	χ^2 值	95%CI		P 值
		下限	上限			下限	上限	
年龄	1.176	-	-	0.278				
性别	0.023	-	-	0.880				
肿瘤部位	1.293	-	-	0.255				
分化级别	11.746	1.575	5.301	0.001	9.624	1.442	5.068	0.002
肿瘤大小	4.458	1.049	3.655	0.035				
T 分期	5.431	1.149	4.989	0.020	5.140	1.125	5.047	0.023
淋巴转移	7.974	1.303	4.327	0.005				
远处转移	7.830	1.393	6.549	0.005	10.381	1.705	8.952	0.001
TNM 分期	10.499	1.528	5.594	0.001				
BORIS 表达	11.005	1.704	7.937	0.001	6.617	1.281	6.242	0.010

因此 BORIS 也是肿瘤睾丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA) 的一种^[7], 并作为潜在的分子标记物参与肿瘤的免疫治疗^[8]。然而越来越多的证据显示 BORIS 在多种恶性肿瘤细胞中也呈异常高表达状态, 并影响细胞的增殖状态。如在乳腺癌中^[9], 通过 siRNA 的方法沉默 BORIS 基因后乳腺癌细胞 caspase 3/7 通路活化, 增殖能力也随之被抑制, 提示 BORIS 可能是通过抑制肿瘤细胞凋亡而发挥癌基因的作用。Zhang^[10]的研究结果显示沉默 BORIS 后可诱导活性氧簇分子 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 然而当 BORIS 过表达时可抑制结直肠癌的凋亡, 提示 BORIS 基因可能在结直肠癌中发挥重要的抗凋亡作用。

Ghochikyan 的研究结果显示^[11]BORIS 蛋白仅在胰腺癌细胞中表达, 而在正常胰腺组织中不表达。D'Arcy 在乳腺癌组织中也有类似的发现^[12], BORIS 蛋白在乳腺癌组织中不表达, 而在乳腺癌组织中呈高表达状态。同样 BORIS 的“癌组织高表达”的特征在原发性肝癌^[13]、黑色素瘤^[14]中亦有类似发现。在本研究中我们回顾性分析结直肠癌组织标本也有相似的结果, 本研究的结果显示癌旁正常组织中无 BORIS 的阳性表达, 而结直肠癌组织中 BORIS 蛋白的阳性率高达 66.2%。在肺癌患者中发现 BORIS 表达与肺癌的分期和淋巴转移显著相关^[15]; Zhao 的研究显示 BORIS 的表达与肝癌大小、分化程度及 TNM 分期显著相关^[13]。本研究的结果同样显示 BORIS 的异常高表达提示肠癌肿瘤较大、浸润深度较深、淋巴转移, 并与 TNM 分期密切相关。从本研究的单因素回归分析结果显示, 肿瘤大小、浸润深度、淋巴转移及 TNM 分期均

为影响本组肠癌患者预后的因素, 这也能解释为何 BORIS 可作为本组肠癌患者预后的预后指标。He^[16]的研究结果提示 BORIS 去甲基化状态是肝癌患者总体生存预后不佳的独立危险因素。食管癌的研究^[17]也有类似的结果。我们除了关注 BORIS 的阳性表达率、与临床病理特征的关系外, 我们亦非常关注 BORIS 表达与结直肠癌患者预后的关系。不少研究的结果显示 BORIS 是多种恶性肿瘤的预后预测因子。如在卵巢癌患者中^[18], BORIS/CTCF 的高表达率与肿瘤分期晚、无复发生存率低呈正相关, 提示 BORIS 替换 CTCF 后可能导致肿瘤细胞的增殖。

Kaplan-Meier 生存分析结果显示 BORIS 阳性组的结直肠癌患者总体预后明显差于 BORIS 阴性组, 提示 BORIS 表达与结直肠癌肿瘤生物学差密切相关, 并可能在肿瘤发展中发挥关键作用。因此 BORIS 可能作为结直肠癌的预后预测生物标记物, 抑制 BORIS 表达可能是结直肠癌治疗的潜在靶点之一。

总而言之, 我们的研究结果显示 BORIS 在结直肠癌组织中高表达, BORIS 阳性与结直肠癌患者预后不佳密切相关。然而受限于本研究是回顾性分析, 样本量不算大, 本结果尚待更多的研究验证。而且本研究的样本无涉及体外实验, 无法探讨及了解 BORIS 通过何种信号通路或机制调控结直肠癌, 这也是本课题组下一步的研究方向。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J

- Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Ogunkolade BW, Jones TA, Aarum J, et al. BORIS/CTCF is an RNA-binding protein that associates with polysomes [J]. BMC Cell Biol, 2013, 14: 52.
- [3] Joosse SA, Müller V, Steinbach B, et al. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7 b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases [J]. Br J Cancer, 2014, 111(5): 909 - 917.
- [4] Vanderstraeten A, Tuyaerts S, Everaert T, et al. In Vitro Assessment of the Expression and T Cell Immunogenicity of the Tumor-Associated Antigens BORIS, MUC1, hTERT, MAGE-A3 and Sp17 in Uterine Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): pii: E1525.
- [5] 云文耀, 湛文龙, 吴礼武, 等. 星形细胞上调基因-1 与结肠癌临床病理及预后的相关性研究. 消化肿瘤杂志(电子版). 2017. 9(3): 182-185.
- [6] Hore TA, Deakin JE, Marshall Graves JA. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes [J]. PLoS genetics, 2008, 4(8):e1000169.
- [7] Soltanian S, Dehghani H. BORIS: a key regulator of cancer stemness [J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 154.
- [8] Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy [J]. Oncotarget, 2016, 7(10): 11223-11237.
- [9] Dougherty, C. J, Ichim T. E, Liu Liping, et al. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2008, 370(1):109-112.
- [10] Zhang Y, Fang M, Song Y, et al. Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) suppresses apoptosis in colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40786.
- [11] Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Loukinov D, et al. Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites [J]. J Immunol, 2007, 178(1): 566-573.
- [12] D'Arcy V, Pore N, Docquier F, et al. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours [J]. Br J Cancer, 2008, 98(3):571-579.
- [13] Rongce Zhao, Kefei Chen, Jing Zhou, et al. The prognostic role of BORIS and SOCS3 in human hepatocellular carcinoma [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(12): e6420.
- [14] Kholmanskikh O, Loriot A, Brasseur F, et al. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation [J]. Int J Cancer, 2008, 122(4):777-784.
- [15] Hae Young Lee, Jong In Kim, Sung Ho Cho, et al. Expression of the Brother of the Regulator of Imprinted Sites Gene in the Sputum of Patients with Lung Cancer [J]. Korean J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 47(4): 378-383.
- [16] He J, Huang Y, Liu Z, et al. Hypomethylation of BORIS is a promising prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. [J]. Gene, 2017, 629:29-34.
- [17] Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, et al. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer [J]. Cancer Sci, 2012, 103(9):1617-24.
- [18] Woloszynska-Read A, Zhang W, Yu J, et al. Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8):2170-2180.