

异染色质蛋白 1 结合蛋白 3 在结直肠癌中的表达及意义

朱金鑫, 杜杨斌, 力海伦, 付志强, 王 焱, 王丛阳, 郭文文, 何震宇

(南京医科大学第二附属医院, 江苏 南京 210011)

摘要: [目的] 探讨异染色质蛋白 1 结合蛋白 3 (heterochromatin protein 1 binding protein 3, HP1BP3) 在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 中的表达及意义。[方法] 通过外源性 RNA 干扰技术结合细胞增殖、侵袭和迁移体外实验探讨 HP1BP3 的肿瘤生物学效应。免疫组织化学技术分析 313 例结直肠癌中 HP1BP3 的表达, 并探讨其表达与患者临床病理特征的相关性。[结果] 外源性敲低 HP1BP3 表达与 SW480 细胞增殖、侵袭和转移抑制相关。313 例结直肠癌中, HP1BP3 高表达 104 例, 低表达 209 例, HP1BP3 表达与患者年龄、性别、肿瘤原发部位及病理分期均无明显相关性 (P 均 < 0.05), 与淋巴结转移情况密切相关 ($P = 0.001$)。[结论] HP1BP3 低表达与结直肠肿瘤细胞发生发展抑制相关, 其高表达与结直肠癌淋巴结转移相关, 提示进展的结直肠癌中可能存在异常的染色质重塑。

关键词: 结直肠癌; 异染色质蛋白 1 结合蛋白 3; 淋巴结转移

中图分类号: R735.3⁵; R735.3⁷ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)12-1026-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.12.B009

The Expression of Heterochromatin 1 Binding Protein 3 in Colorectal Cancer and Its Significance

ZHU Jin-xin, DU Yang-bin, LI Hai-lun, FU Zhi-qiang, WANG Yan, WANG Cong-yang, GUO Wen-wen, HE Zhen-yu

(The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China)

Abstract: [objective] To investigate the expression of heterochromatin protein 1 binding protein 3 (HP1BP3) in colorectal cancer (CRC) and its significance. [Methods] The biological effects of HP1BP3 on tumor were investigated by exogenous RNA interference technique combined with cell proliferation, invasion and migration in vitro. The expression of HP1BP3 in 313 cases with colorectal cancer were analyzed by immunohistochemical technique (IHC), and the relationship between the HP1BP3 expression and the clinicopathological features of colorectal cancer was analyzed. [Results] In SW480 cells, non-coding RNA silencing resulted in the decrease of HP1BP3 expression, and the exogenous HP1BP3 knockdown was associated with the inhibition of proliferation, invasion and metastasis. Among the 313 colorectal cancers, 104 cases had high expression of HP1BP3 and 209 cases had low expression. The expression of HP1BP3 was not significantly correlated with the age, gender, primary tumor site and pathological stage of the patients (all $P < 0.05$), but closely correlated with lymph node metastasis ($P = 0.001$). [Conclusion] The low expression of HP1BP3 is associated with the inhibition of colorectal cancer cell development, and its high expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer, suggesting that abnormal chromatin remodeling be presented in advanced CRC.

Subject words: colorectal cancer; heterochromatin protein 1 binding protein 3; lymph node metastasis

结直肠癌是全世界第三常见的恶性肿瘤, 全球每年新增病例约 190 万^[1]。近年来, 随着疾病筛查、外科手术以及术后辅助治疗等方面的不断进步, 结直肠癌的综合治疗已经取得了明显进展, 然而其死

亡率仍呈逐年上升趋势, 我国每年约有 28 万例患者死于结直肠癌^[2]。结直肠癌的预后与局部或远处转移等临床特征密切相关^[3], 出现局部或者远处转移往往预示患者较差的预后, 其中淋巴结转移是结直肠癌转移的最主要途径, 与结直肠癌患者 5 年生存率密切相关^[4]。在结直肠癌淋巴结转移的研究中, 报道发现存在多种与结直肠癌淋巴结转移相关的

基金项目: 南京科技发展计划项目 (2018SC512012)

通信作者: 何震宇, E-mail: hezhenyu1968@163.com

收稿日期: 2022-04-10; **修回日期:** 2022-07-15

基因^[5-7],但其具体功能及机制尚不明确,也未见具有显著临床应用价值的生物学靶标。

异染色质蛋白 1 结合蛋白 3(heterochromatin protein 1 binding protein 3,HP1BP3)是一种核蛋白,属于 H1 组蛋白家族,最初作为异染色质蛋白 1 (HP1)的结合蛋白被发现,在细胞增殖中起重要作用^[8]。现有研究表明,HP1BP3 可以在多个方面促进肿瘤细胞的生长和侵袭,在控制肿瘤细胞活力和增殖以及改变基因表达方面发挥重要作用^[9],但 HP1BP3 与结直肠癌发生进展的关系仍不明确。为探索 HP1BP3 在结直肠癌中的作用,本研究通过外源性 RNA 干扰技术构建 HP1BP3 低表达组和对照组结直肠癌细胞,利用细胞增殖实验、划痕实验验证 HP1BP3 对结直肠癌细胞的生物学调控作用,并经 IHC 和临床特征关联性分析证实了 HP1BP3 基因是结直肠癌淋巴结转移的一个生物学靶标,具有重要临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 组织样本

本研究获南京医科大学第二附属医院伦理委员会的批准(2021-KY-017-01)。研究中所有石蜡组织均按照伦理规范获取、利用。本研究共获取了 2016—2019 年在南京医科大学第二附属医院接受手术治疗的 313 例结直肠癌患者的石蜡组织样本。统计患者临床信息包括年龄、性别、肿瘤原发部位、病理分期及淋巴结转移等。313 例患者中,男性 180 例,女性 133 例;年龄 39~88 岁(平均年龄 62 岁)。

1.2 结直肠癌细胞株基因沉默

结直肠癌细胞系(SW480)购自上海中科院细胞库,培养于 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。细胞培养板中接种细胞至对数生长期时,将商品化 siRNA 采用 lipo3000 试剂转染至 SW480 细胞中,转染 72 h 收获细胞,进行总蛋白抽提处理,用于靶基因表达检测。

1.3 免疫印记杂交实验

将靶基因沉默组和对照组细胞裂解、变性,上样 30 μ g 蛋白,于 10% SDS-PAGE 进行电泳后,常规 0.45 μ m PVDF 转膜;封闭液(2.5%脱脂牛奶/0.25% BSA)封闭,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜:即抗 GAPDH 抗体

(Abart),稀释比例 1:5 000;抗 HP1BP3 抗体(Bioss),稀释比例 1:4 000。相应二抗(1:3 000)室温孵育 120 min,PBST 漂洗 3 次,行显影分析。

1.4 细胞增殖和划痕实验

克隆形成实验,将 2×10^3 个 siRNA 转染细胞和对照细胞培养 7 d,4%多聚甲醛固定 10 min,洗涤后用结晶紫染色,洗净晾干后拍照分析;划痕实验,分别取 2×10^4 个 siRNA 转染细胞和对照细胞,待贴壁生长后分别均匀划痕,记录 24 h、48 h、72 h 细胞生长情况并拍照测量比较。

1.5 免疫组织化学(IHC)

常规二甲苯脱蜡, H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶活性;于高温高压 EDTA 缓冲液中抗原修复后,4 $^{\circ}$ C 抗 HP1BP3 抗体(1:150)孵育过夜。PBS 洗涤玻片 3 次后加入 HRP 标记通用二抗,室温孵育 40 min,进行 DAB 显色和苏木素复染;中性树脂封片,进行目标蛋白表达评估和图像采集。评估标准为:阴性(0):无着色;弱阳性(+):10%以下细胞呈现弱、不均匀棕黄着色;中等强度阳性(++): $\geq 10\%$ 的细胞呈现中等强度或不均匀的棕黄着色;强阳性(+++): $\geq 10\%$ 细胞呈现强的棕褐色着色。将 0/+定义为 HP1BP3 低表达,++/+++定义为 HP1BP3 高表达。

1.6 统计学处理

所有统计检验均使用 SPSS21.0 软件包进行。数据以均值 $\pm$ 标准差或 n(%)表示,连续数据采用 Student's *t* 检验,计数资料采用卡方检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HP1BP3 低表达抑制了结直肠癌细胞增殖和侵袭转移能力

蛋白表达结果表明,与对照组细胞相比,结直肠癌细胞 SW480 中 siRNA 沉默后,HP1BP3 蛋白表达水平显著下降(Figure 1A~1B)。克隆形成实验和划痕实验研究结果表明,与对照组相比,HP1BP3 表达降低与细胞增殖和侵袭转移能力显著降低显著相关(Figure 1C~1D)。

2.2 HP1BP3 表达与结直肠癌临床病理特征的关系

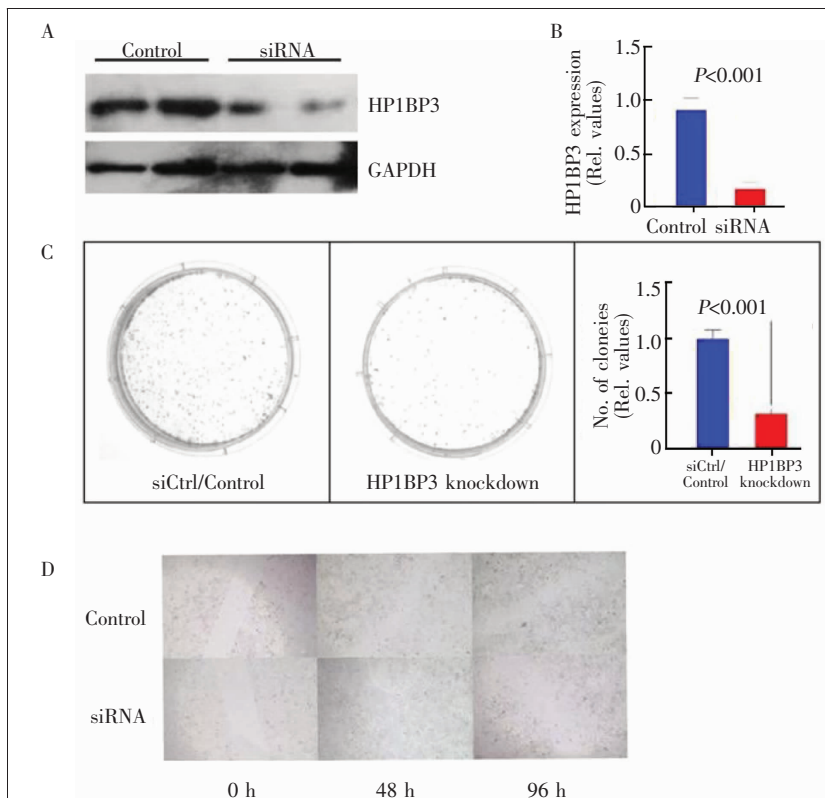
313 例结直肠癌中,HP1BP3 高表达 104 例,低表达 209 例(Figure 2)。根据患者临床病理信息进行

比较分析,结果显示:HP1BP3表达与患者年龄、性别、肿瘤原发部位及病理分期均无明显相关性($P>0.05$),而与患者淋巴结转移情况密切相关(Table 1)。

103例HP1BP3高表达组中,65例(62.5%)发生淋巴结转移,其余39例(37.5%)未发生淋巴结转移。209例HP1BP3低表达组中,89例(42.58%)发生淋巴结转移,120例(57.42%)未发生淋巴结转移。相比于HP1BP3低表达组,其高表达组具有更高水平的淋巴结转移发生率(42.58% vs 62.5%, $P<0.05$)。此外,HP1BP3高、低表达组中,MGMT、EGFR、Her-2、Ki-67、VEGF、VEGFR2、MSH2、MSH6、PMS2、MLH1等标志物表达均无显著差异性($P>0.05$)(Table 1)。

3 讨论

结直肠癌是消化系统常见恶性肿瘤之一。2021年全球肿瘤数据显示,目前结直肠癌在各类恶性肿瘤中发病率和死亡率分别位列第3和第4位^[10]。全球范围内,尤其在中低收入国家中其发病率及死亡率急剧上升,造成了巨大的社会负担^[11]。尽管近年来我国在疾病筛查、外科手术以及个体化治疗等肿瘤综合治疗方面取得了较大进步,但因人口基数大,且其发病机制及危险因素复杂多样,每年仍有约28万例患者死于结直肠癌^[4]。研究证实,肿瘤细胞的播散及转移是结直肠癌患者治疗失败和死亡的主要原因^[12]。其中淋巴结转移是结直肠癌转移的最主要途径,其显著降低了结直肠癌患者的5年生存率^[13]。截至目



Notes: A: results of hybridization of HP1BP3 expression immunized by siRNA interference; B: Quantification results of imprinting hybridization with siRNA interfering with HP1BP3 expression, three independent replicates; C: representative results of clone formation experiment showing the growth of two groups; D: analysis of scratch results showed that compared with control group, the migration ability of cells in siRNA interference group decreased after 48 h and 96 h of scratch

Figure 1 HP1BP3 expression associated with changes in SW480 cytological behavior

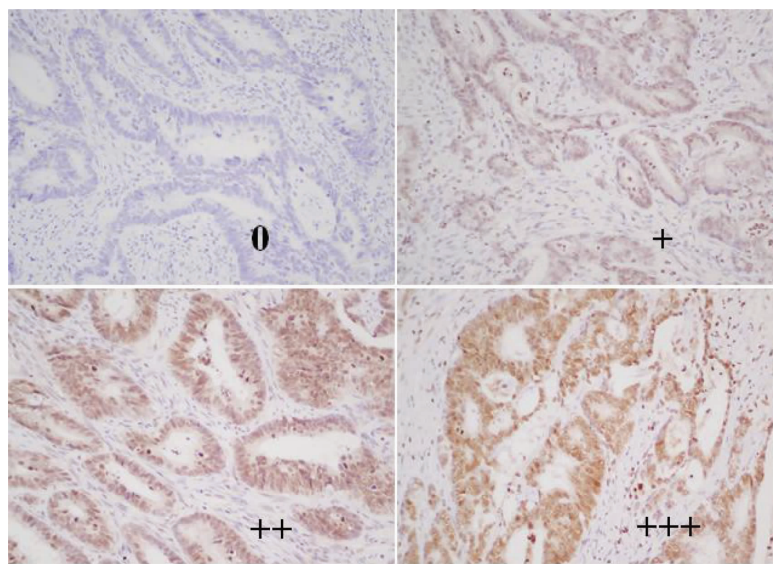


Figure 2 Expression of HP1BP3 in colorectal cancer (IHC×200)

Table 1 Relationship between HP1BP3 expression and clinicopathological features in colorectal patients[n(%)]

Characteristic	HP1BP3 expression		χ^2	P
	Low(n=209)	High(n=104)		
Age(years old)				
≥62	124(59.33)	64(61.54)	0.141	0.707
<62	85(40.67)	40(38.46)		
Gender				
Female	84(40.19)	49(47.12)	1.362	0.243
Male	125(59.81)	55(52.88)		
Tumor site				
Colon	154(73.6)	79(76.00)	0.189	0.663
Rectum	55(26.3)	25(24.0)		
Pathological staging				
I	23(11.00)	8(7.69)	3.431	0.330
II	81(38.76)	33(31.73)		
III	96(45.93)	55(52.88)		
IV	10(4.78)	8(7.69)		
Lymph node metastases				
Positive	89(42.58)	65(62.50)	11.021	0.001
Negative	120(57.42)	39(37.50)		
MGMT*				
+	78(85.71)	50(89.29)	0.393	0.531
-	13(14.29)	6(10.72)		
EGFR*				
+	53(57.61)	34(59.65)	0.060	0.807
-	39(42.39)	23(40.35)		
Her-2*				
+	21(22.83)	12(21.43)	0.039	0.843
-	71(77.17)	44(78.57)		
Ki-67*(%)				
>60	54(58.06)	35(62.50)	0.286	0.593
≤60	39(41.94)	21(37.50)		
VEGF*				
+	89(96.74)	54(96.43)	0.010	0.920
-	3(3.26)	2(3.57)		
VEGFR2*				
+	62(67.39)	35(61.40)	0.555	0.456
-	30(32.61)	22(38.60)		
MSH2*				
+	87(95.60)	54(94.74)	0.059	0.808
-	4(4.40)	3(5.26)		
MSH6*				
+	87(95.60)	53(92.98)	0.471	0.492
-	4(4.40)	4(7.02)		
PMS2*				
+	90(97.83)	53(94.64)	1.081	0.298
-	2(2.17)	3(5.36)		
mLH1*				
+	90(97.83)	53(94.64)	1.081	0.298
-	2(2.17)	3(5.36)		

Notes: pathological staging was performed by pathologists according to AJCC 8. *:the data were missing, and the actual data can be used for statistical analysis

前,已有报道发现了多种与结直肠癌淋巴转移相关的基因,但其具体功能及机制尚未完全明确,也未见具有临床运用价值的相关基因^[5-7,14]。

HP1BP3 是一种组蛋白 H1 相关蛋白,其与核小体结合,保护接头 DNA 不被核酸酶降解^[12]。研究发现,HP1BP3 并不是典型的 H1 变异体,而是具有特定的 pri-miRNA 结合活性,可促进细胞中共转录 miRNA 的加工,介导连接组蛋白功能的多样性^[15]。肿瘤细胞中,HP1BP3 可根据局部微环境中的氧含量水平改变与细胞外基质的相互作用介导异染色质发生,导致基因重编程增强肿瘤细胞迁移能力^[16];HP1BP3 也可作为表观遗传抑制因子发生生物学效应^[16],Shang 等^[17]开展的体外实验结果表明,HP1BP3 可以介导 miRNA 靶向调控食管鳞状细胞癌的生长与转移;Shi 等^[18]的研究结果表明,端粒酶阳性细胞可通过同源重组的端粒替代延长 (lengthening of telomeres,ALT)导致细胞失控性生长,而 HP1BP3 蛋白则显著富集在 ALT 细胞端粒上,其结果提示,HP1BP3 可能参与了 ALT 端粒染色质维持,参与了 ALT 细胞增殖机制。另有研究发现,HP1BP3 高表达与结直肠癌细胞 5-氟尿嘧啶耐药有关,HP1BP3 的减少降低了缺氧条件下的肿瘤细胞增殖活力,与治疗耐药性和干细胞性呈负相关^[19],这些结果提示 HP1BP3 表达可能与结直肠癌的演化、进展有关。

在本研究中,从细胞和组织层面上探索了 HP1BP3 在结直肠癌中的作用。通过 313 例结直肠癌标本的免疫组化分析表明,HP1BP3 高表达与结直肠癌淋巴结转移显著相关。体外研究结果也证实了 SW480 细胞中 HP1BP3 表达的降低与结直肠癌细胞的侵袭转移能力下降相关。但仍缺少相关动物体内实验,实验结论仍需要大样本量、多中心的随机对照研究加以证实。

综上所述,本研究结果表明 HP1BP3 在高侵袭性结直肠癌中表达增多,与结直肠癌淋巴结转移密切相关,提示高水平 HP1BP3 表达可作为结直肠癌患者潜在的预后指标,对于探索结直肠癌筛查、诊断开发具有现实指导意义。

参考文献:

- [1] Sung H,Ferlay J,Siegel RL,et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J

- Clin, 2021, 71(3):209–249.
- [2] 郑莹, 王泽洲. 全球结直肠癌流行数据解读[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(1): 149–152.
Zheng Y, Wang ZZ. Data interpretation of global colorectal cancer prevalence [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2021, 42(1): 149–152.
- [3] Chiba N, Abe Y, et al. Efficacy of the Milan criteria as a prognostic factor in patients with colorectal liver metastases[J]. Langenbecks Arch Surg, 2021, 406 (4): 1129 – 1138.
- [4] Fang H, Zhang Z, Zhou Y, et al. A greedy approach for mutual exclusivity analysis in cancer study [J]. Biostatistics, 2022, 23(3): 910–925.
- [5] Li Y, Wu G, Zhang Y, et al. Log odds of positive lymph nodes as a novel prognostic predictor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 290.
- [6] Kurosawa T, Murakami T, Yamashiro Y, et al. Mucin phenotypes and clinicopathological features of colorectal adenocarcinomas: correlation with colorectal adenocarcinoma with enteroblastic differentiation [J]. Pathol Res Pract, 2022, 232: 153840.
- [7] Takamatsu M, Yamamoto N, Kawachi H, et al. Prediction of lymph node metastasis in early colorectal cancer based on histologic images by artificial intelligence[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 2963.
- [8] Garfinkel BP, Melamed-Book N, Anuka E, et al. HP1BP3 is a novel histone H1 related protein with essential roles in viability and growth[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(4): 2074–2090.
- [9] Oshikawa K, Matsumoto M, Kodama M, et al. A fail-safe system to prevent oncogenesis by senescence is targeted by SV40 small T antigen [J]. Oncogene, 2020, 39 (10): 2170–2186.
- [10] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7–33.
- [11] Mueller M, Schneider MA, Deplazes B, et al. Colorectal cancer of the young displays distinct features of aggressive tumor biology: a single-center cohort study [J]. World J Gastrointest Surg, 2021, 13(2): 164–175.
- [12] Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, et al. Systems biology of cancer metastasis[J]. Cell Syst, 2019, 9(2): 109–127.
- [13] Jin M, Frankel WL. Lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2018, 27(2): 401–412.
- [14] He ZY, Wen H, Shi CB, et al. Up-regulation of hnRNP A1, Ezrin, tubulin β -2C and Annexin A1 in sentinel lymph nodes of colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(37): 4670–4676.
- [15] Liu H, Liang C, Kollipara RK, et al. HP1BP3, a chromatin retention factor for co-transcriptional microRNA processing[J]. Mol Cell, 2016, 63(3): 420–432.
- [16] Dutta B, Yan R, Lim SK, et al. Quantitative profiling of chromatinome dynamics reveals a novel role for HP1BP3 in hypoxia-induced oncogenesis [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(12): 3236–3249.
- [17] Shang M, Weng L, Wu S, et al. HP1BP3 promotes tumor growth and metastasis by upregulating miR-23a to target TRAF5 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(6): 2928–2943.
- [18] Shi G, Hu Y, Zhu X, et al. A critical role of telomere chromatin compaction in ALT tumor cell growth [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(11): 6019–6031.
- [19] Hadac JN, Miller DD, Grimes IC, et al. Heterochromatin protein 1 binding protein 3 expression as a candidate marker of intrinsic 5-fluorouracil resistance[J]. Anticancer Res, 2016, 36(3): 845–852.