

BRAP 在喉鳞状细胞癌中的表达及其 与预后的相关性*

殷文娟¹ 李灵敏¹ 王丽¹ 黄安² 乔爱秀¹ 贾宇婷³ 冯彦³

[摘要] 目的:检测 BRAP 在喉鳞状细胞癌(LSCC)组织中的表达,探讨其与临床病理特征及患者预后的相关性。方法:应用免疫组织化学和 Western blot 方法检测 LSCC 组织及癌旁正常组织中 BRAP 表达,统计学分析其与 LSCC 临床病理特征及预后的关系。结果:BRAP 在 LSCC 组织中的表达显著高于癌旁正常组织($P < 0.05$)。BRAP 表达与 LSCC 患者的 TNM 分期、淋巴结转移密切相关(均 $P < 0.05$);Kaplan-Meier 分析显示 BRAP 高表达患者生存率明显低于 BRAP 低表达患者($P < 0.01$);多因素 Cox 回归分析提示 BRAP 是影响 LSCC 患者预后的独立危险因素。结论:BRAP 与 LSCC 患者肿瘤进展和预后密切相关,BRAP 有望成为 LSCC 评估预后的指标。

[关键词] 喉肿瘤;鳞状细胞癌;BRAP;免疫组织化学

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.11.018

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

Correlation between BRAP expression and prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma

YIN Wenjuan¹ LI Lingmin¹ WANG Li¹ HUANG An²
QIAO Aixiu¹ JIA Yuting³ FENG Yan³

(¹Department of Pathology, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China; ²Department of Otorhinolaryngology, the First People's Hospital of Jinzhong; ³Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Hospital of Shanxi Medical University)

Corresponding author: FENG Yan, E-mail: fengyan@sxmu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the expression of BRCA1 associated protein(BRAP) and its correlations with clinicopathological features and prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC). **Method:** The protein expression of BRAP in LSCC tissues and normal laryngeal tissues were assessed by immunohistochemistry and Western blot, and their correlations with clinicopathological features and prognosis were statistically analyzed. **Result:** The expression of BRAP in LSCC was significantly higher than that in normal laryngeal tissues ($P < 0.05$). BRAP expression was significantly correlated with the TNM stage and lymph node metastasis($P < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that LSCC patients with high BRAP expression had worse overall survival than those with low BRAP expression($P < 0.01$). Multivariate Cox proportional-hazards analysis showed that the high expression of BRAP protein was an important poor prognostic indicator of the patients. **Conclusion:** BRAP is related with the development of LSCC, and it may be used as an important prognostic biomarker for LSCC patients.

Key words laryngeal neoplasms; squamous cell carcinoma; BRAP; immunohistochemistry

喉癌是最常见的头颈部恶性肿瘤之一,占所有人类恶性肿瘤的 5%。喉癌的组织学类型主要为鳞状细胞癌和腺癌,其中 85%~90%为鳞状细胞癌^[1]。虽然近年来诊断和治疗方面取得了很大进展,但是喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)患者的预后尚未令人满意,5 年生存率仅为 60%左右^[2]。LSCC 患者预后不良与

肿瘤的局部侵袭和淋巴结转移密切相关^[3]。因此探索与 LSCC 侵袭转移相关的分子机制,寻找预后评估的有效标志物具有重要意义。

BRAP 最初被发现其能识别 BRCA1 的信号肽,因此被称为 BRCA1 相关蛋白(BRCA1 associated protein)^[4]。BRAP 参与调控细胞的生长、分化和迁移^[5-6]。有研究显示它与包括结直肠癌等多种肿瘤的发病密切相关^[7]。Zhao 等^[8]近期也发现 BRAP 在人食管鳞状细胞癌组织中高表达,其促进肿瘤细胞的侵袭迁移,与患者的预后密切相关。然而 BRAP 在 LSCC 组织中的表达及临床意义尚未见报道。因此,本研究旨在通过免疫组织化学和 Western blot 技术检测 BRAP 在人 LSCC 组织中

*基金项目:中国博士后科学基金(No:2016M591413);山西医科大学大学生创新创业校级项目(No:20170327)

¹山西医科大学基础医学院病理教研室(太原,030001)

²晋中市第一人民医院耳鼻咽喉科(晋中,030600)

³山西医科大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科(太原,030001)
通信作者:冯彦, E-mail: fengyan@sxmu.edu.cn

的表达情况,分析其与临床病理特征的关系,探讨 BRAP 的临床意义。

1 资料与方法

1.1 组织标本及临床资料收集

收集山西省肿瘤医院 2011-01—2013-12 期间手术切除的 106 例 LSCC 组织及 13 例距肿瘤外缘 0.5 cm 外癌旁正常组织。106 例患者中,男 102 例,女 4 例,年龄 38~79 岁。有吸烟史 20 例,饮酒史 68 例。高分化 13 例,中分化 71 例,低分化 22 例。TNM 分期 I+II 期 32 例,III+IV 期 74 例。有淋巴结转移 31 例。所有病例临床资料完整,患者术前均未接受放、化疗,且病理诊断均由 2 位以上病理科医师证实。随访日期截止到术后 5 年或死亡发生。所有组织标本采用免疫组织化学染色检测 BRAP 的表达。

另收集 10 例 LSCC 患者新鲜肿瘤组织和癌旁组织,Western blot 检测 BRAP 蛋白表达。10 例患者均为男性,4 例为 II 期,5 例为 III 期,1 例为 IV 期。所有患者均签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学检测 BRAP 表达

106 例 LSCC 组织及 13 例癌旁正常组织制成石蜡切片,应用即用型快速免疫组织化学 MaxVision™ 试剂盒(KIT-5020,迈新公司)进行 BRAP 表达检测。BRAP 抗体为兔抗人多克隆抗体,购自 Proteintech 公司。根据说明书设置阳性对照和阴性对照。

BRAP 的表达以 SI(staining index)进行判定^[9]。每张切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野进行染色强度评分和阳性细胞计数。胞质内有棕黄色颗粒出现视为阳性,染色强度评分标准:0 分(无着色),1 分(弱阳性),2 分(中阳性),3 分(强阳性)。阳性细胞计数以阳性细胞占肿瘤细胞的百分比表示:1 分($\leq 25\%$ 阳性细胞),2 分($26\% \sim 50\%$

阳性细胞),3 分($\geq 51\%$ 阳性细胞)。染色强度和阳性细胞计数得分相加即为该切片的 SI。SI ≤ 3 为低表达, >3 为高表达。

1.3 Western blot 检测 BRAP 的表达

采用 RIPA 裂解液提取组织中总蛋白。BCA 蛋白定量分析试剂盒(Thermo 公司)检测蛋白溶液浓度。总蛋白用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,之后转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭,BRAP 兔抗人多克隆抗体(1:500,Proteintech 公司)和 β -actin 鼠单克隆抗体(1:2000,康为世纪公司)4℃ 过夜。洗膜后放入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠二抗室温孵育,再洗膜后 ECL 发光液显影,凝胶电泳成像仪拍照保存。Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以 BRAP 条带灰度与 β -actin 的灰度比值表示 BRAP 蛋白的表达水平。

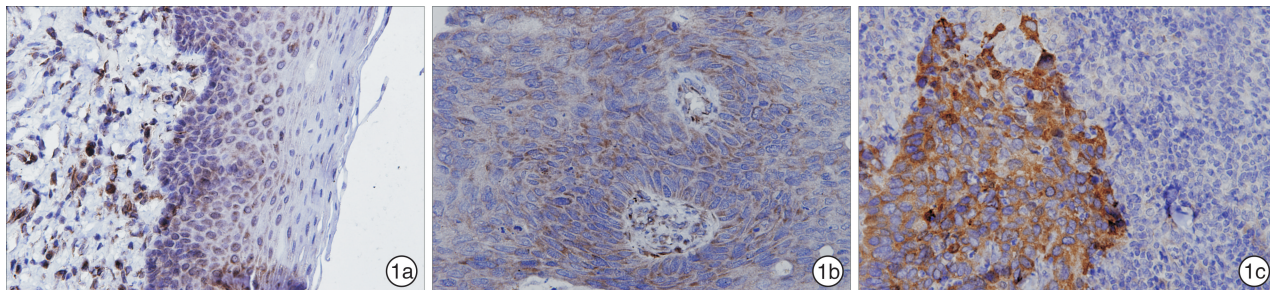
1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。卡方检验分析免疫组织化学中 BRAP 的表达情况及 BRAP 表达与患者临床病理因素的相关性;配对 t 检验分析 Western blot 中 BRAP 的表达;Kaplan-Meier 法对 BRAP 高低表达组患者进行生存分析,组间差异比较用 log-rank 检验;单因素和多因素 Cox 回归模型分析 LSCC 患者不良预后的危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BRAP 免疫组织化学检测结果

对 106 例 LSCC 组织和 13 例癌旁组织行免疫组织化学染色,结果显示 BRAP 主要定位于细胞质。BRAP 在 13 例癌旁组织中仅有 4 例呈高表达,高表达率为 30.8%;而在 LSCC 组织中,BRAP 高表达者 66 例,占 62.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



1a:癌旁组织;1b:LSCC 组织 BRAP 低表达;1c:LSCC 组织 BRAP 高表达。

图 1 免疫组织化学法检测 LSCC 组织和癌旁组织中 BRAP 的表达($\times 400$)

2.2 BRAP Western blot 检测结果

将 10 对新鲜 LSCC 组织和配对的癌旁组织行 Western blot 检测,LSCC 组织中 BRAP 表达为

0.44 ± 0.147 ,癌旁组织为 0.29 ± 0.071 。LSCC 组织中 BRAP 表达明显高于癌旁组织($P < 0.05$),见图 2。

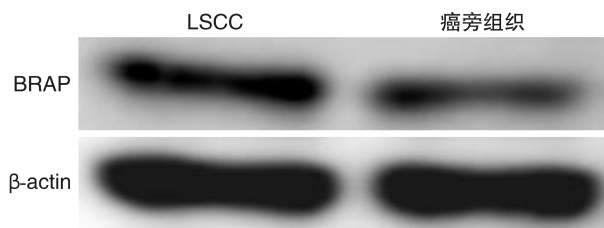


图 2 Western blot 检测 LSCC 组织和癌旁组织中 BRAP 的表达

2.3 BRAP 表达与 LSCC 患者临床病理特征的关系

统计学分析结果显示, BRAP 表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移有显著相关性, TNM 分期 III + IV 期(晚期)、有淋巴结转移的患者癌组织中 BRAP 表达较高($P < 0.05$); 但是 BRAP 表达与患者的年龄、性别、吸烟、饮酒及分化程度无关, 见表 1。

表 1 LSCC 组织 BRAP 表达与临床病理特征的相关性分析

临床病理特征	例数	BRAP		χ^2	P
		低($n=40$)	高($n=66$)		
年龄/岁				1.734	0.188
<60	63	27	36		
≥60	43	13	30		
性别				0.287	1.000
男	102	39	63		
女	4	1	3		
吸烟				0.628	0.428
否	86	34	52		
是	20	6	14		
饮酒				0.956	0.328
否	38	12	26		
是	68	28	40		
分化				0.723	0.697
高	13	6	7		
中	71	27	44		
低	22	7	15		
TNM 分期				6.687	0.01
I + II	32	18	14		
III + IV	74	22	52		
淋巴结转移				4.283	0.038
N0	75	33	42		
N1~3	31	7	24		

2.4 BRAP 表达与 LSCC 患者的预后分析

应用 Kaplan-Meier 方法分析 BRAP 不同表达组 LSCC 患者术后 5 年的生存情况。结果显示 BRAP 高表达患者的 5 年生存率明显低于 BRAP 低表达的患者($P < 0.01$), 见图 3。提示 BRAP 高表达的 LSCC 患者预后更差。

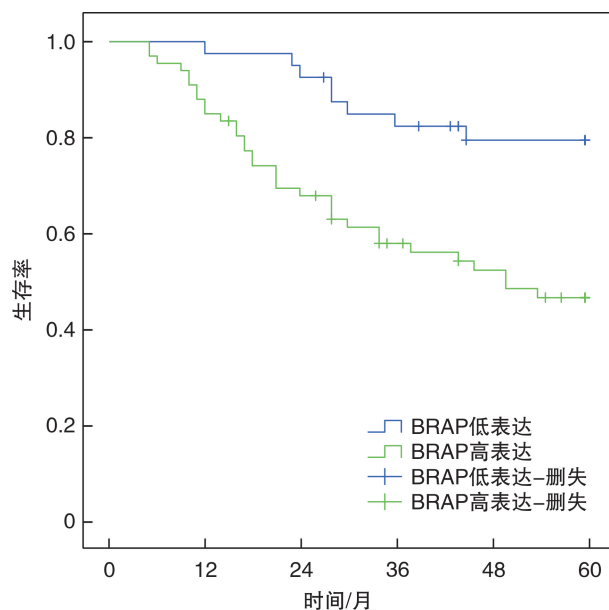


图 3 Kaplan-Meier 生存曲线

2.5 LSCC 患者预后不良的主要危险因素回归分析

对 LSCC 患者的临床病理特征及 BRAP 表达进行回归分析, 单因素 Cox 回归分析提示 BRAP 表达、LSCC 患者的 TNM 分期、淋巴结转移均为影响患者预后的危险因素($P < 0.01$); 进一步多因素 Cox 回归分析显示 BRAP 高表达及淋巴结转移是患者预后不良的独立危险因素($P < 0.05$), 见表 2。

3 讨论

BRAP 基因位于人染色体 12q24 区域, 其编码 592 个氨基酸, 蛋白大小约为 67 kDa。BRAP 蛋白含有 2 个具有生物学活性的结构域, 一个位于 N 端, 发挥泛素连接酶活性; 一个位于 C 端, 调控蛋白质核转运^[10]。BRAP 蛋白通过调控 p21、NF- κ B 及 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路, 在细胞的生长、迁移和分化过程中发挥重要作用^[5-6, 11]。对 BRAP 的研究大多集中在心血管疾病和炎症^[12-15], 而在肿瘤方面较少。Schumacher 等^[7]发现 BRAP 的基因多态性与结直肠癌发病风险密切相关。Zhao 等^[8]通过 Western blot 方法检测出食管癌组织中 BRAP 的表达增加, 分析转录组测序的数据发现 BRAP 高表达影响食管癌患者的生存时间。这些结果提示 BRAP 在肿瘤的发展过程中可能发挥重要作用。

TCGA 数据库中数据显示 BRAP 基因在头颈部鳞状细胞癌中高表达。本课题组通过免疫组织化学和 Western blot 技术检测 LSCC 组织及相应癌旁正常组织中 BRAP 的表达水平。免疫组织化学结果显示 LSCC 组织中 BRAP 高表达率较癌旁组织有明显升高; Western blot 结果也显示 LSCC 组织中 BRAP 高表达。我们的结果与 TCGA 数据库显示了同样的趋势, 而其在 LSCC 中高表达的分子机制尚需要深入研究。

表 2 LSCC 患者预后的 Cox 回归单-多因素分析

变量	单因素分析			多因素分析		
	危险率	95%置信区间	P 值	危险率	95%置信区间	P 值
年龄/岁	1.816	0.981~3.359	0.057	—	—	—
性别	2.613	0.803~8.501	0.111	—	—	—
吸烟	0.851	0.377~1.922	0.698	—	—	—
饮酒	0.814	0.436~1.517	0.516	—	—	—
分化	1.520	0.887~2.604	0.127	—	—	—
TNM 分期	3.843	1.505~9.811	0.005	2.292	0.832~6.313	0.109
淋巴结转移	2.945	1.595~5.440	0.001	1.952	1.009~3.776	0.047
BRAP 表达	3.362	1.550~7.289	0.002	2.658	1.213~5.827	0.015

结合临床随访资料进行统计分析,发现 BRAP 在 LSCC 组织的表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移具有显著相关性。Kaplan-Meier 生存分析显示 BRAP 高表达的 LSCC 患者生存期相比低表达组显著降低,Cox 多因素回归分析也发现 BRAP 高表达是 LSCC 患者预后不良的独立危险因素。这些结果均提示 BRAP 可能促进 LSCC 的进展和转移。关于 BRAP 促进肿瘤恶性发展的分子机制,基于 Zhao 等^[8] 在食管鳞状细胞癌中的研究,我们推测 BRAP 极有可能通过募集蛋白激酶,促进 IKK 发生磷酸化,从而激活 NF- κ B 信号通路,调控下游靶基因 MMP9 和 VEGFC 的表达,最终加速 LSCC 的侵袭转移。

综上所述,本研究显示 BRAP 在 LSCC 组织中高表达,证实了 BRAP 高表达与 LSCC 患者临床预后不良密切相关,提示其可能在 LSCC 侵袭与转移中起重要作用。BRAP 有望成为 LSCC 评估预后的重要指标。

参考文献

- [1] LI Y, TAO C, DAI L, et al. MicroRNA-625 inhibits cell invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting SOX4 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Biosci Rep, 2019, 39: BSR20181882.
- [2] STEUER C E, EL-DEIRY M, PARKS J R, et al. An update on larynx cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67: 31—50.
- [3] GAO W, WU Y, HE X, et al. MicroRNA-204-5p inhibits invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing forkhead box C1 [J]. J Cancer, 2017, 8: 2356—2368.
- [4] LI S, KU C Y, FARMER A A, et al. Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 6183—6189.
- [5] ASADA M, OHMI K, DELIA D, et al. Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24: 8236—8243.
- [6] MATHENY S A, CHEN C, KORTUM R L, et al. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP [J]. Nature, 2004, 427: 256—260.
- [7] SCHUMACHER F R, SCHMIT S L, JIAO S, et al. Genome-wide association study of colorectal cancer identifies six new susceptibility loci [J]. Nat Commun, 2015, 6: 7138.
- [8] ZHAO Y, WEI L, SHAO M, et al. BRCA1-Associated Protein Increases Invasiveness of Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. Gastroenterology, 2017, 153: 1304—1319.
- [9] LIU Y, SU Z, LI G, et al. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2013, 133: 671—679.
- [10] FATIMA S, WAGSTAFF K M, LOVELAND K L, et al. Interactome of the negative regulator of nuclear import BRCA1-binding protein2 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9459.
- [11] OZAKI K, SATO H, NOUE K, et al. SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations [J]. Nat Genet, 2009, 41: 329—333.
- [12] CHIDA-NAGAI A, SHINTANI M, SATO H, et al. Role of BRCA1-associated protein (BRAP) variant in childhood pulmonary arterial hypertension [J]. PLoS One, 2019, 4: e0211450.
- [13] LIAO Y C, WANG Y S, GUO Y C, et al. BRAP Activates Inflammatory Cascades and Increases the Risk for Carotid Atherosclerosis [J]. Mol Med, 2011, 17: 1065—1074.
- [14] 吕朵, 朱益民. BRAP 基因与心脑血管疾病和代谢综合征研究进展 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2014, 43 (5): 602—606.
- [15] LIAO Y C, LIN H F, GUO Y C, et al. Lack of association between a functional variant of the BRCA-1 related associated protein (BRAP) gene and ischemic stroke [J]. BMC Med Genet, 2013, 14: 17—17.

(收稿日期: 2019-04-17)