

肠型胃癌中 HDAC1 与 Oct4 表达的相关性研究

张永杰 秦叔逵 王杰军 王喜 于观贞 陈颖

【摘要】 目的 研究肠型胃癌中 HDAC1 与 Oct4 表达的关系。方法 采用免疫组化方法检测临床资料完整的 661 例肠型胃癌及其对应癌旁正常胃组织标本中 HDAC1 与 Oct4 的表达, 结合临床病理资料对实验结果进行统计分析; 生存分析研究其预后价值。结果 Oct4 的阳性表达与肿瘤大小、区域淋巴结转移、细胞分化、HDAC1 表达 ($P < 0.001$)、浸润深度 ($P = 0.003$) 均显著相关; 在 Oct4 阳性表达和阴性表达的组织标本中, HDAC1 的高表达率分别是 66.0% 和 34.0%, 两者呈正相关 ($P < 0.001$); 生存分析显示: Oct4 阴性表达患者的总生存显著高于 Oct4 阳性表达患者 ($P < 0.001$), Oct4 阴性/HDAC1 低表达患者的总生存显著高于其他组合 ($P < 0.001$)。结论 肠型胃癌中, Oct4 与 HDAC1 的表达呈正相关, 采用 Oct4 和 HDAC1 双靶向抑制治疗可能有更长的总生存。

【关键词】 肠型胃癌; Oct4; HDAC1; 生存分析

Study on the relationship between the expression of HDAC1 and Oct4 in intestinal-type gastric cancer ZHANG Yong-jie*, QIN Shu-kui, WANG Jie-jun, WANG Xi, YU Guan-zhen, CHEN Ying.**Department of Oncology, Huai'an Second People's Hospital, Huai'an 223202, China*
Corresponding author: QIN Shu-kui, Email: zhangyj0818@126.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between the expression of HDAC1 and Oct4. **Methods** A statistical analysis of 661 intestinal-type gastric cancer (ITGC) specimens and the corresponding non-cancerous tissues was performed on the basis of immunohistochemistry results. Overall survival was assessed by survival analysis. **Results** The immunohistochemistry results showed that Oct4 expression was significantly related to tumor size, regional node metastasis, cell differentiation, HDAC1 expression ($P < 0.001$) and invasion depth ($P = 0.003$). The high expression rate of HDAC1 in Oct4-positive and negative tumor samples was 66.0% and 34.0% respectively, there was a significantly positive correlation between the expression of HDAC1 and Oct4 ($P < 0.001$). Survival analysis showed that the overall survival (OS) of patients with negative Oct4 expression was significantly better than patients with positive Oct4 expression in ITGC ($P < 0.001$), OS of patients with negative Oct4/low HDAC1 expression was significantly better than other combinations ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of Oct4 and HDAC1 have a significantly positive correlation in ITGC. Targeted inhibition of both Oct4 and HDAC1 is promising to lead to longer overall survival.

【Key words】 Intestinal-type gastric cancer; Oct4; HDAC1; Survival analysis.

胃癌是危害人类健康的最常见的恶性肿瘤之一, 发病率在全世界恶性肿瘤中排名第 4 位。我国为胃癌高发地区。每年新确诊患者达 30 万多, 约占全球的 1/3。随着肿瘤发生、发展和转移过程中分子生物学、分子病理学研究的深入发展, 分子靶向治疗成为继手术、化疗、放疗后的一种新的治疗手段。深入探讨胃癌的分子调控机制, 对胃癌分子靶向药物的研发和转化医学的临床应用具有重要意义。

早在 20 世纪中叶, 病理学家就发现胚胎组织和肿瘤具有相似性。对不同器官肿瘤细胞起源的分析发现正常组织自我更新的干细胞很可能是肿瘤的起源细胞, 同时, 胚胎细胞和肿瘤细胞的部分信号通路相同也表明两者之间的相关性。另外, 也有研究者认为肿瘤细胞起源于去分化的体细胞。而不管肿瘤细胞起源如何, 干细胞样状态对于肿瘤的发生是必不可少的。因为包括胃癌在内的不同肿瘤的肿瘤干细胞的精确定义和标志物尚不明确^[1-2], 所以人们把在肿瘤的发生发展中起主要作用的细胞定义为肿瘤干细胞样细胞, 有研究已经从 VCR 预处理的 SGC7901 细胞中分离出胃癌的肿瘤干细胞样细胞^[3]。细胞因表达 Oct4 而具有干细胞的特性, 因而 Oct4 被视为肿瘤干细胞样细胞重要

DOI: 10. 3877/cma. j. issn. 1674-0785. 2013. 14. 041

作者单位: 223202 江苏省淮安市第二人民医院肿瘤科(张永杰); 南京八一医院全军肿瘤中心(秦叔逵); 上海长征医院肿瘤科(王杰军、王喜、于观贞); 上海长海医院病理科(陈颖)

通讯作者: 秦叔逵, Email: zhangyj0818@126.com

的标志物。因为肿瘤干细胞是肿瘤转移和复发的根源,因此深入探讨 Oct4 分子调控机制,采取针对性的靶向抑制治疗,对肿瘤患者获得长期生存具有重要意义。

组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 参与组蛋白和非组蛋白的去乙酰化。研究发现 HDAC1^{-/-}小鼠可因严重的生长迟缓而在胚胎期死亡^[4-5]。而且,维 A 酸诱导的去分化的胚胎干细胞不仅 Oct4 和 Sox2 表达降低, HDAC1 表达也下调。抑制 HDAC1 可促进胚胎干细胞的分化^[6]。进一步研究表明 HDAC 抑制剂 apicidin 在人类胚胎癌细胞 NCCIT 中下调 Oct4 的表达^[7]。以上这些研究表明 HDAC, 特别是 HDAC1 在表观遗传学调节包括 Oct4 和 Sox2 在内的干性基因中的重要性。因为胚胎干细胞和肿瘤细胞有共同的信号通路,本研究前期实验已证实:慢病毒介导的 LDH-AsiRNA 下调肠型胃癌细胞中 HDAC1 和 Oct4 的表达^[8],由此我们推断 HDAC1 与 Oct4 在恶性肿瘤中的表达可能相关,目前在实体瘤中关于 Oct4 与 HDAC1 表达相关性的研究尚未见报道。本实验通过免疫组化方法分别检测 HDAC1 在肠型胃癌组织和癌旁正常组织的表达,结合病理参数和生存分析探讨 Oct4 与 HDAC1 的表达是否存在相关性。

资料与方法

一、组织芯片标本

收集 2001 至 2005 年第二军医大学附属长海医院胃肠外科手术切除的胃癌组织石蜡标本共 661 例(平均年龄 59 岁,男 479 例;女 182 例),手术切除病灶后迅速切取原发病灶和癌旁正常组织,并立刻放置于液氮罐中保存,取材时间控制在 10 min 以内。所有取标本用的器械和冻存管均经 0.1% DEPC 水隔夜浸泡并高温消毒。所有病例均有完整的临床资料,并经两名病理医生分别阅片,按 Lauren 分型标准确诊为肠型胃癌,所有病例术前未经新辅助化疗。其中 417 例有明确的随访资料,随访截止期是 2010 年 3 月。所有组织标本的获取都征得患者同意,并经长海医院研究委员会授权。

二、芯片的构建

所有组织标本应用组织芯片仪构建组织芯片,简单概述如下:模具蜡块构建好后,用打孔针在模具蜡块打孔,用取样针从样本蜡块中取出所需样本依次放于模具蜡块孔内。最后构建成 45×20 mm 组织芯片。

三、结果判定

由两位病理医师在未知任何病理资料和临床资料的情况下对免疫组化结果进行评估,显微镜放大 400

倍下,随机选取 3 个视野,每个视野>200 个细胞。根据阳性细胞数(P)和染色强度(I)计算 Q(Q=P×I,最大 300)对结果进行评分。对 HDAC1, Q>100 是高表达, Q≤100 为低表达;对于 Oct4, Q>25 是阳性表达, Q≤25 为阴性表达。

四、统计学分析

应用 SPSS16.0 对结果进行统计学分析,组内变量采用卡方检验, Pearson's 等级相关分析;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier, 多因素生存分析采用 Cox 风险模型; P<0.05 有统计学意义。

结果

1. Oct4 与病理参数的关系: Oct4 表达于细胞核。在 661 例肠型胃癌组织标本中, Oct4 的表达与肿瘤大小, 细胞分化和区域淋巴结转移 (P<0.001)、浸润深度 (P=0.003) 相关, 而与肿瘤原发部位、远处转移、TNM 分期无关。见表 1。

表 1 Oct4 表达与临床病理参数、HDAC1 表达的相关性

临床病理参数	Oct4 表达		χ ² 值	P 值
	阴性 (%)	阳性 (%)		
肿瘤原发位置			1.398	0.706
贲门和胃底	50 (43.5)	65 (56.5)		
胃窦	96 (45.3)	116 (56.7)		
胃体	134 (43.6)	173 (56.4)		
全胃	9 (33.3)	18 (66.7)		
大小			25.953	<0.001
<3 cm	120 (55.8)	95 (44.2)		
3~6 cm	132 (41.9)	183 (58.1)		
≥6 cm	37 (28.2)	94 (71.1)		
浸润深度			8.993	0.003
T1+T2	111 (52.1)	102 (47.9)		
T3+T4	178 (39.7)	270 (60.3)		
区域淋巴结			23.181	<0.001
N0	127 (56.7)	97 (43.3)		
N1~3	162 (37.1)	275 (62.9)		
远处转移			3.819	0.051
无	280 (44.6)	348 (55.4)		
有	9 (27.3)	24 (72.7)		
TNM 分期			0.205	0.651
I+II	264 (44.0)	336 (56.0)		
III+IV	25 (41.0)	36 (59.0)		
分化			78.487	<0.001
高分化	52 (65.0)	28 (35.0)		
中分化	188 (54.0)	160 (46.0)		
低分化	49 (21.0)	184 (79.0)		
HDAC1			19.883	<0.001
低表达	190 (51.4)	180 (48.6)		
高表达	99 (34.0)	192 (66.0)		

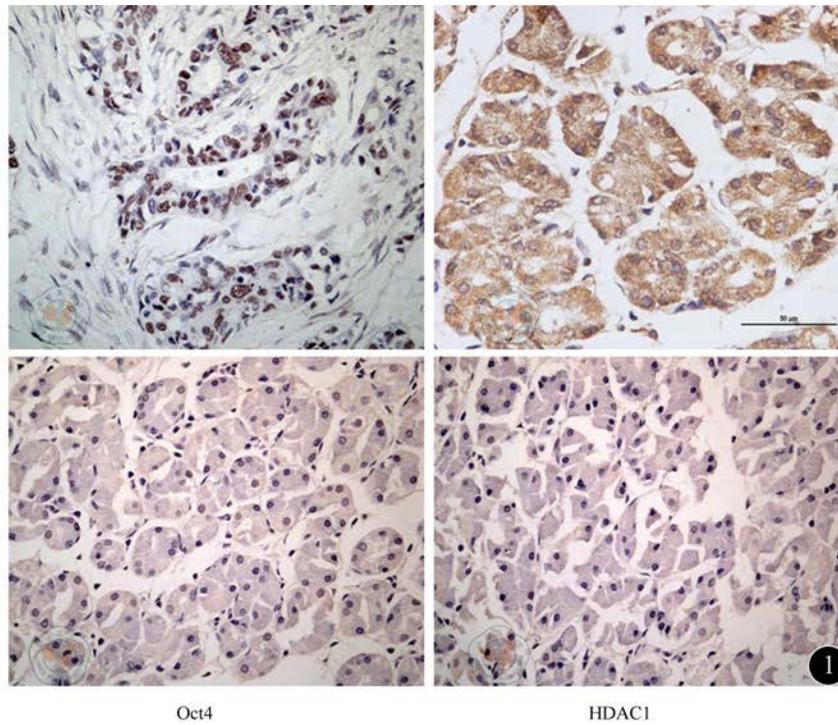


图1 免疫组化证实: 相对于癌旁正常组织(下), Oct4和HDAC1蛋白的表达在肠型胃癌组织(上)中显著上调(×400)

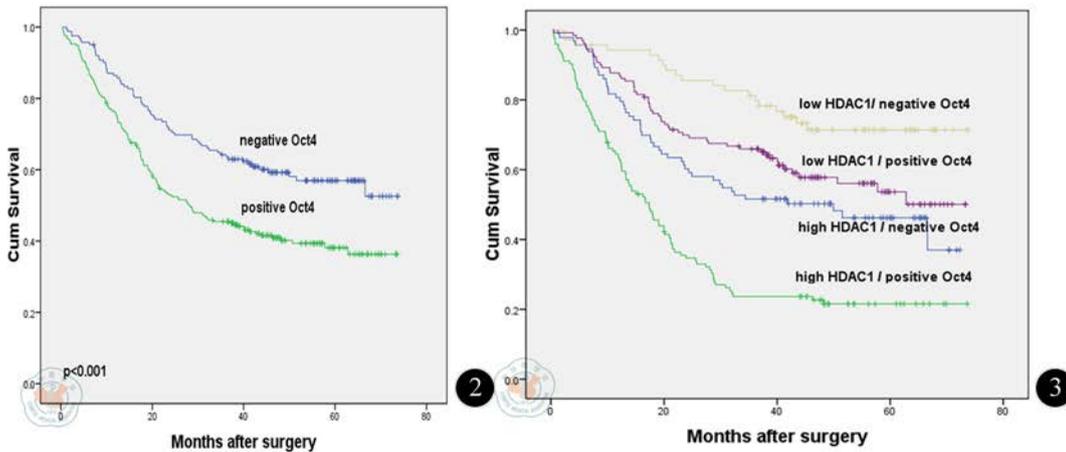


图2 生存分析: Oct4阴性表达的总生存显著高于Oct4阳性表达者 图3 生存分析: Oct4阴性/HDAC1低表达患者的总生存显著高于其他组合

2. HDAC1 与 Oct4 表达的相关性: Oct4 表达于细胞核, 在 661 例肠型胃癌组织标本中, 372 例呈 Oct4 阳性表达 (56.3%), 而在 661 例癌旁正常组织中, 仅有 106 例呈阳性表达 (16.0%), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), HDAC1 主要表达于细胞质, 在 661 例肠型胃癌组织标本中, 339 例呈 HDAC1 高表达 (51.3%), 在 661 例癌旁正常组织中, 仅有 102 例呈高表达 (15.4%), 两者有统计学差异 ($P < 0.01$)。见图 1。在 Oct4 阳性表达和阴性表达的组织标本中, HDAC1 的高表达率分别是 66.0% 和 34.0%, 两者呈正相关 ($P < 0.001$)。生存分析显示: Oct4 阴性表达组生存率明显高于 Oct4 阳性高表达组, 见图 2。Oct4 阴性/HDAC1 低表达患者的总生存显著高于其他组合, 见图 3。

讨 论

2006 年 Yamanaka 等通过逆转录酶病毒向分化的体细胞导入 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 诱导产生 iPS (induced pluripotent stem) 细胞, 目前将 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 称为 Yamanaka 因子。1 年后 YU 等^[9]通过转导 Oct4、Sox2、NANOG 与 LIN28 诱导产生 iPS 细胞。目前利用 Yamanaka 因子已从多种不同的小鼠和人类分化的细胞中诱导产生 iPS 细胞。但是, c-Myc^[10]和 Klf4^[11]在特定的培养条件下对 iPS 的诱导是不必要的。Oct4/Sox2 构成人类胚胎干细胞的调节网络核心。实际上, Oct4 是诱导 iPS 细胞唯一不可缺少的基因^[12], Sox2 通过直接或间接的方式调节 Oct4^[13]。

曾一度被认为与胚胎细胞无法区别的 iPS 细胞现在研究证实只是与胚胎细胞相似,把 iPS 细胞注射到裸鼠体内,同样可以诱发肿瘤。iPS 细胞兼有胚胎性和成瘤性从侧面反映了肿瘤起源细胞的干性特征。Oct4 作为胚胎干细胞的核心基因,同样是肿瘤干细胞样细胞重要的标志物。Oct4 的持续表达以与在胚胎细胞中相似的去分化方式促进上皮组织转化为不典型增生^[14]。Oct4 的小干扰 RNA 通过 Oct4/Tcl1/Akt1 信号通路促进小鼠 Lewis 肺癌 3LL 细胞和人乳腺癌 MCF7 细胞株的肿瘤干细胞样细胞的凋亡^[15],提示 Oct4 在肿瘤的发生中起着重要作用,但是有关恶性肿瘤中 Oct4 表达的调节蛋白的研究有限,对于胃癌的相关研究更少,尽管有研究发现 Oct4 表达可能是胃癌发生发展的标志物^[16]。

HDAC1 是多种蛋白质复合物的催化亚单位,参与组蛋白和非组蛋白的蛋白质去乙酰化,是哺乳动物基因转录的关键调节子,与有丝分裂和调节细胞增殖、分化以及细胞周期的转录因子均有直接关系,所以它的失活直接影响细胞增殖和分化相关基因的转录以及细胞周期进程。近年研究表明其高表达与恶性肿瘤的发生、发展和侵袭密切相关,已成为肿瘤研究和治疗的新靶点。研究还发现 HDAC1 在胚胎干细胞中位于包括 Yamanaka 因子在内的多能性相关基因的启动子上,并通过表观遗传学修饰这些基因来调控多能性^[17]。不同的 HDAC 抑制剂可导致 iPS 细胞的生成增加或减少^[18-19],说明 HDAC 在 iPS 细胞的生成中起着重要作用。

HDAC1 通过调节 Oct4 的表达在维持胚胎干细胞和 iPS 细胞的干性特和多能性上起着重要作用,由于肿瘤干细胞与胚胎干细胞和 iPS 细胞在重要信号通路的重叠性,我们推测在实体肿瘤中,HDAC1 通过调节 Oct4 的表达来维持肿瘤的恶性特征,我们实验结果发现:在肠型胃癌组织标本中,Oct4 与 HDAC1 的表达均显著上调,两者表达呈正相关;Oct4 阴性表达患者的总生存显著高于 Oct4 阳性表达者;Oct4 阴性/HDAC1 低表达患者的总生存显著高于其他组合。首次从大样本临床组织标本证实了 Oct4 和 HDAC1 的正协同作用。

总之,在前期实验中发现的慢病毒介导的 LDH-AsiRNA 同步下调肠型胃癌细胞中 HDAC1 和 Oct4 的表达的基础上,本实验通过 661 例肠型胃癌组织标本免疫组化分析验证了 HDAC1 和 Oct4 的表达存在正相关。为肠型胃癌中二者的联合靶向抑制提供临床依据。至于在恶性肿瘤中,HDAC1 是否像在胚胎细胞中位于 Oct4

启动子上,通过表观遗传学修饰来调控肿瘤干细胞样细胞的增殖和分化,以及 Oct4 对 HDAC1 的表达是否存在正反馈调节及机制等问题,将在我们今后的工作中进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gumucio DL, Fagoonee S, Qiao XT, et al. Tissue stem cells and cancer stem cells: implications for gastric cancer. *Panminerva Med*, 2008, 50: 65-71.
- [2] Rocco A, Liguori E, Pirozzi G, et al. CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors. *J Cell Physiol*, 2011, 227: 1-26.
- [3] Xue Z, Yan H, Li J, Liang S, et al. Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 302-312.
- [4] Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, et al. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol Biol*, 2004, 5: 11.
- [5] Jacobs AM, Nicol SM, Hislop RG, et al. SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene*, 2007, 26: 5866-5876.
- [6] Dovey OM, Foster CT, Cowley SM. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 8242-8247.
- [7] You JS, Kang JK, Seo DW, et al. Depletion of embryonic stem cell signature by histone deacetylase inhibitor in NCCIT cells: involvement of Nanog suppression. *Cancer Res*, 2009, 69: 5716-5725.
- [8] Zhang Y, Zhang X, Wang X, et al. Inhibition of LDH-A by lentivirus-mediated small interfering RNA suppresses intestinal-type gastric cancer tumorigenicity through the downregulation of Oct4. *Cancer Lett*, 2012, 321: 45-54.
- [9] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.
- [10] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 101-106.
- [11] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 1269-1275.
- [12] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454: 646-650.
- [13] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 625-635.
- [14] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*, 2005, 121: 465-477.
- [15] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res*, 2008, 68: 6533-6540.
- [16] Chen Z, Xu WR, Qian H, et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol*, 2009, 99: 414-419.
- [17] Kidder BL, Palmer S. HDAC1 regulates pluripotency and lineage specific transcriptional networks in embryonic and trophoblast stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2011, 40: 1-15.
- [18] Maalouf WE, Liu Z, Brochard V, et al. Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev Biol*, 2009, 9: 11.
- [19] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 795-797.

(收稿日期: 2013-07-02)

(本文编辑: 马超)