论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0910-04

赖氨酸特异性去甲基化酶1在食管鳞癌中的表达及其临床意义

于妍妍[1],雷增杰[1],郭 严[1],王 斌[1],刘海燕[1],沈晓春[1],孙文静[1],肖华亮[2],马 强[2],王 军[1],兰春慧[1],陈东风[1]
(400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:消化内科[1],病理科[2])

[摘要] **目的** 检测赖氨酸特异性去甲基化酶1(Lysine specific demethylase 1, LSD1)在食管鳞癌以及正常食管组织中的表达,并探讨LSD1与食管鳞癌临床特征、肿瘤增殖及凋亡等的关系。**方法** 免疫组化S-P染色法检测86例食管鳞癌组织及29例正常食管组织中LSD1、增殖相关抗原Ki67的表达情况,TUNEL检测食管鳞癌组织凋亡情况,并分析LSD1表达与患者临床资料、预后以及增殖和凋亡的关系。**结果** LSD1在食管鳞癌组织中阳性率(89.5%)明显高于正常组织(51.7%),且与患者淋巴结转移相关($P<0.05$),并能明显影响患者的预后($P<0.05$),LSD1的表达与肿瘤增殖有关,但与凋亡无关。**结论** LSD1在食管鳞癌中高表达且与患者预后相关,可能成为食管鳞癌中值得研究的治疗靶标。

[关键词] LSD1;食管鳞癌;细胞增殖;凋亡
[中图法分类号] R345; R730.23; R735.1 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of lysine specific demethylase 1 in human esophageal squamous cell carcinoma

Yu Yanyan[1], Lei Zengjie[1], Guo Yan[1], Wang Bin[1], Liu Haiyan[1], Shen Xiaochun[1], Sun Wenjing[1], Xiao Hualiang[2], Ma Qiang[2], Wang Jun[1], Lan Chunhui[1], Chen Dongfeng[1] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and normal esophageal tissues, and study the relationship of LSD1 with clinical features, esophageal cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** The expression of LSD1 and proliferation related antigen (Ki67) in 86 ESCC tissue samples and 29 normal esophageal tissue samples were detected by immunohistochemical assay. TUNEL was used to detect the apoptosis of esophageal cancer cells. The relationship of LSD1 expression with clinical data was analyzed. **Results** The expression of LSD1 was significantly higher in ESCC than that in normal tissue (89.5% *vs* 51.7%, $P<0.05$). It was related to lymph node metastasis and tumor mass growth ($P<0.05$), but not to tumor cell apoptosis. The expression of LSD1 was correlated with the prognosis of the patients ($P<0.05$). **Conclusion** The high expression of LSD1 in ESCC is correlated with the prognosis of the patients, and may be regarded as a therapeutic target for ESCC.

[**Key words**] lysine-specific demethylase 1; esophageal squamous cell carcinom; proliferation; apoptosis

Corresponding author: Chen Dongfeng, Tel: 86-23-68757741, E-mail: chendf1981@126.com

食管癌作为世界第8大肿瘤,发病人数约占世界肿瘤患者总数的4%,在亚洲地区尤其高发[1]。食管鳞癌患者早期手术治疗后5年生存率高于50%,但由于食管癌的早期检出率偏低且中晚期食管癌耐药率增高[2-3],严重影响了该病的治疗效果。前期研究发现,如同其他大部分恶性肿瘤一样,食管癌的发生和发展经历了遗传物质[4-5]及表观遗传修饰[6]的双重突变,而表观遗传修饰的可逆性也昭示着食管癌预防和有效治疗的可能性。

LSD1是第一个被发现的组蛋白去甲基化酶,属于黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotid, FAD)依赖性单胺氧化酶,可以特异性地催化单甲基化及二甲基化的组蛋白H3第4位赖氨酸(H3K4me1、H3K4me2)和第9位赖氨酸(H3K9me1、H3K9me2)去甲基化,从而调节下游基因的转录活性[7]。LSD1通过

[通信作者] 陈东风,电话:(023)68757741,E-mail:chendf1981@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0919.016.html(2013-03-25)

神经元限制性沉默元件共阻抑因子(co-repressor of the repressor element silencing transcription factor, CoREST)复合体与靶基因结合时,可以使 H3K4 去甲基化,该过程与染色质浓缩及转录抑制有关[8]。但 LSD1 与雄激素受体或者雌激素受体(androgen receptor or estrogen receptor, AR/ER)结合,特异性的催化 H3K9 的赖氨酸去甲基化后,此时 AR/ER 依赖的基因表达上调,LSD1 促进转录激活[9]。近年来多项功能研究发现 LSD1 通过调节靶基因的表达,在胚胎分化、细胞内 DNA 甲基化状态的合理维持、肿瘤的发生、异染色质的形成以及诱导多能干细胞形成[10]等多方面起到重要作用[11]。前期相关研究发现在前列腺癌[12]、乳腺癌[13]以及血液系统肿瘤[14]等方面,普遍发现 LSD1 的高表达,通过敲除 LSD1 或抑制 LSD1 作用后,可以明显抑制肿瘤细胞的增殖和转移[15-16]。

本研究检测食管鳞癌组织及正常食管组织中 LSD1 的表达水平,并分析了 LSD1 与食管鳞癌患者相关临床和病理特征间的关系,为食管鳞癌发生、发展机制的深入探讨以及临床诊断和治疗奠定基础。

1 资料与方法

1.1 标本及组织

收集 2002-2007 年在第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科行食管癌根治手术,并经病理学检查确诊为食管鳞癌的住院患者信息。电话回访患者食管癌相关治疗及术后生存情况,征得患者及其家属同意后,查找患者术后组织学蜡块标本。入组标准:患者术前未进行任何放化疗;术后经病理确认食管鳞癌诊断明确;患者回访信息完善;对本研究知情同意。排除标准:失访或回访信息不完善,患者或其家属不同意参与本研究。入组的 86 例患者,其中男性 69 例,女性 17 例,年龄 37~88 岁,平均 60.5 岁。

另外选取来本院进行健康体检的人员 29 例,其中男性 22 例,女性 7 例,年龄 40~75 岁,平均 67.3 岁。征得患者知情同意后,行无痛胃镜检查,明确无内镜下可见的食管、胃等部位异常增生、溃疡或其他病变。内镜下钳取食管黏膜组织,经病理学检查明确为正常食管黏膜,作为正常对照。

1.2 免疫组化

对上述组织样本进行免疫组化 S-P 法染色,枸橼酸盐高压高温修复,LSD1(Abcam, ab17721, 1∶400)、Ki67(北京金杉,即用型)染色,DAB 显色 4 min。由 2 位具有多年临床经验的病理科医师,按照免疫反应积分打分法(immunoreactivity score, IRS)[17]对染色结果分别进行评分,即:采用免疫反应染色强度(SI)和阳性细胞百分比(PP)的乘积作为免疫组化染色的评分。SI 分为 4 级:0 分为未见染色阳性的细胞;1 分为细胞染色最强处呈现弱阳性;2 分为阳性;3 分为强阳性;PP 分为 5 级:0 分为未见染色阳性区域;1 分为染色阳性区域≤10%;2 分为阳性区域>10%~50%;3 分为阳性区域>50%~80%;当染色阳性区域>80%时为 4 分。以最高评分的 1/3 为界,将最终结果区分为表达阴性、高表达与低表达 3 组:阴性即最终积分为 0,0<积分≤4 分为低表达,积分>4 分为高表达。

1.3 凋亡实验

使用脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL),按照实验指导手册(Roche Tunel 试剂盒),检测食管鳞癌石蜡切片组织中细胞凋亡情况,显色时间 10 min。

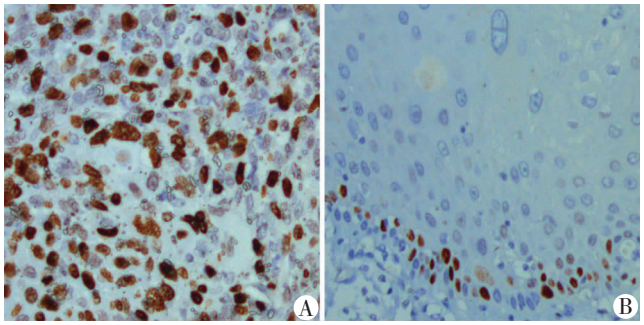
1.4 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计学软件对获得的数据进行分析,组间比较采取 χ^2 检验进行统计学处理,对 LSD1 和增殖以及凋亡的关系采用皮尔逊相关性分析,并使用 Graphpad Prism5.0 按照 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。

2 结果

2.1 LSD1 在食管鳞癌组织及正常食管黏膜中的表达

免疫组化检测 LSD1 在不同组织中的表达情况,结果显示:LSD1 在食管鳞癌中主要表达在肿瘤细胞的细胞核内,食管鳞癌组织切片中 LSD1 表达阳性率为 89.5%(77/86),且 40.7%(35/86)的食管鳞癌组织 LSD1 表达呈强阳性。正常食管鳞状上皮基底部细胞核内也可见 LSD1 表达,表达阳性率为 51.7%(15/29),均为弱阳性表达,见图 1。LSD1 在食管鳞癌组织中的表达明显高于正常食管鳞状上皮,该差异具有统计学意义($P<0.05$)。



A:食管鳞癌组织; B:正常食管鳞状上皮

图 1 LSD1 在食管鳞癌组织和正常食管鳞状上皮中的表达 (S-P ×200)

2.2 LSD1 的表达与患者临床资料间的关系

LSD1 的表达与患者性别、年龄等基本临床资料无相关性,与肿瘤的分化程度以及浸润深度等病理资料也无明显相关。但 LSD1 表达与食管鳞癌的淋巴结转移有关,发生淋巴结转移的食管鳞癌组织中 LSD1 表达阳性率明显高于未发生转移的食管鳞癌组织($P<0.05$)(表 1)。

2.3 LSD1 表达水平与患者预后相关

根据 LSD1 表达情况,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线(图 2)。从生存曲线可以看出,LSD1 表达水平不同的 3 组患者术后生存期不同:LSD1 表达阴性的 9 例患者术后 5 年生存率最高;LSD1 低表达组的患者($n=42$)早期生存情况与阴性组患者相似,但长期生存率依然明显差于 LSD1 阴性组;LSD1 高表达时,患者($n=35$)预后明显变差,5 年生存率最低。3 组患者的术后生存情况,两两之间均具有显著差异($P<0.05$)。

表1 LSD1表达与食管鳞癌患者临床资料间的关系

临床特征	LSD1表达		χ^2值	P值
	阴性或低表达	高表达		
性别				
男	41	28	0.002	0.96
女	10	7		
年龄				
≤60岁	28	16	0.701	0.40
>60岁	23	19		
分化				
高分化	26	20	2.906	0.23
中等分化	22	10		
低分化	3	5		
浸润深度				
T1~2	22	12	0.680	0.41
T3~4	29	23		
淋巴结转移				
阳性	15	18	4.255	0.04
阴性	36	17		
生存期				
≤5年	27	32	14.274	0.00
>5年	24	3		

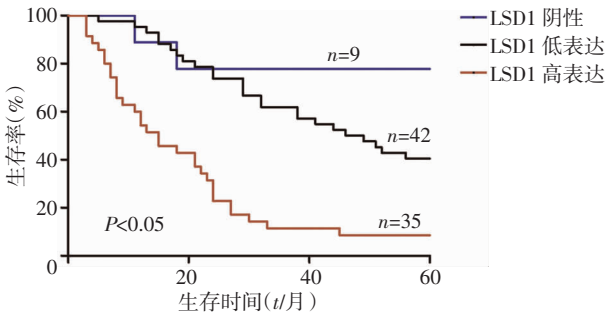


图2 LSD1表达量不同的3组患者生存曲线

2.4 LSD1表达水平与增殖以及凋亡的关系

相关性分析发现,在食管鳞癌组织中LSD1的表达与Ki67(图3)具有显著相关性($P<0.05$),LSD1高表达的35例食管鳞癌组织中,Ki67有48.6%(17/35)表达也呈强阳性,而LSD1阴性或低表达的51例食管鳞癌组织中,仅17.6%(9/51)的组织表现为Ki67强阳性。TUNEL实验(图4)发现LSD1表达与肿瘤细胞凋亡的关系并不密切($P>0.05$),无论LSD1表达高或者低均很少观察到凋亡细胞,在全部食管鳞癌组织切片中仅有5例出现TUNEL染色阳性,这与肿瘤细胞自身特性相符合。

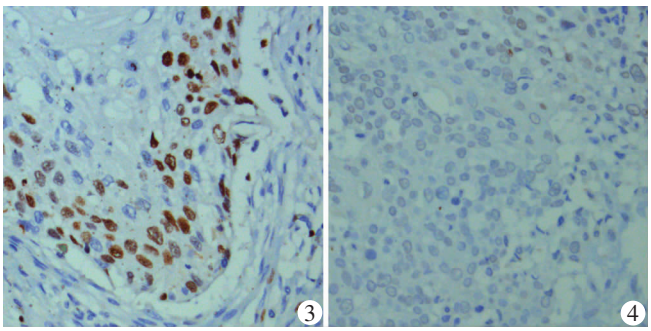


图3 Ki67在食管鳞癌组织中的表达 (S-P×200)

图4 食管鳞癌组织细胞凋亡检测 (TUNEL ×200)

3 讨论

LSD1又称为KDM1(human lysine demethylase 1),主要由3部分组成:N末端的SWIRM结构域(swi3p/rsc8p/moira domain,SWIRM);C末端呈两叶状的胺氧化酶样结构域(amine oxidaselike domain,AOL);以及位于AOL两叶之间呈茎状的塔形结构域[7]。SWIRM结构域作为蛋白-蛋白相互作用的基序可以与组蛋白H3的N末端相互作用,AOL结构域的两叶分别是FAD结合结构域和催化活性中心,塔形结构域可以与CoREST紧密结合以保证LSD1去甲基化功能的正常发挥。LSD1结构的研究为后续对LSD1作用方式、催化机制以及功能的研究提供了基础框架。研究发现LSD1在体内催化赖氨酸去甲基化时,首先通过CoREST复合物与底物核小体靠近,然后在FAD的参与下,以胺氧化反应的方式结合在赖氨酸的-CH基团上完成催化反应,同时形成一个亚胺中间产物以及去甲基化的赖氨酸残基。中间产物亚胺被水解生成不稳定的氯苯吡醇胺基团,并直接被降解后释放甲醛。因为中间产物亚胺的形成需要一个质子化的氮,而三甲基化的赖氨酸不含有质子化氮,因此LSD1在体内不能以三甲基化的赖氨酸作为底物[18]。

目前对于LSD1的功能研究主要集中在肿瘤领域。既往的研究表明,LSD1在多种肿瘤组织及细胞株内高表达且与肿瘤细胞的恶性行为相关,包括前列腺癌[12]、非小细胞肺癌[16]、乳腺癌[13]、神经母细胞瘤[19]等,但关于食管鳞癌组织中LSD1的表达及研究尚少见报道。Kahl等[20]指出LSD1的高表达与前列腺癌的预后不良及术后高复发率相关,并可能参与了去势抵抗性前列腺癌的发生和发展[12],因此LSD1可以作为预测前列腺癌预后的新指标之一。乳腺癌[13,21]相关研究中发现,LSD1在ER^-的乳腺癌细胞核中表达明显高于ER^+乳腺癌以及正常乳腺组织,并参与了肿瘤细胞的增殖及转移,其高表达可作为乳腺癌恶性倾向的生物学标志。类似的,LSD1在神经母细胞瘤[19]中表达也显著增加,且在低分化及预后不良的神经母细胞瘤中表达尤其上调,体内外实验均证实抑制LSD1可以使细胞重编程以抑制神经母细胞瘤细胞的生长。因此,Schulte等[19]提出LSD1也是维持神经母细胞瘤低分化的恶性表型的关键因子。另外,LSD1在膀胱癌[22]、肝癌[23]、血液系统肿瘤等众多肿瘤内的表达意义及作用机制也正在研究中,而且LSD1抑制剂已经作为极有潜力的抗肿瘤药物进入研究阶段。

本研究发现,LSD1在食管鳞癌组织中表达阳性率及阳性程度均高于正常食管鳞状上皮,且LSD1高表

达的食管鳞癌患者预后不良。本组临床资料显示,在已经发生淋巴结转移的食管鳞癌组织中 LSD1 的表达升高更加显著,该结果提示 LSD1 很可能参与到食管鳞癌的淋巴结转移过程,这与前期在其他肿瘤研究中发现的结果较一致。而 LSD1 的表达与食管鳞癌的分化程度和浸润深度无显著相关,虽然众多研究发现 LSD1 可以参与胚胎分化、诱导干细胞形成等改变细胞分化程度的生物学过程,但我们的研究发现食管鳞癌肿瘤组织中,LSD1 的表达与肿瘤细胞的分化并无关系。联系 LSD1 在其他肿瘤中的研究发现,我们推测 LSD1 可能也参与了食管鳞癌的增殖过程。免疫组化结果显示,在正常食管鳞状上皮中 LSD1 主要表达集中在具有较强增殖分裂能力的上皮基底部;经过对 LSD1 表达与细胞增殖的相关性研究证实,LSD1 表达增多的食管鳞癌组织中 Ki67 表达明显升高,肿瘤细胞分裂增殖确实较强。以上证据均提示,LSD1 与食管鳞癌的增殖能力有关。因此在食管鳞癌中,LSD1 影响患者的生存期可能是通过促使肿瘤增殖复发以及参与淋巴结转移来实现的。

总之,通过本研究我们发现 LSD1 在食管鳞癌组织表达上调并与食管鳞癌的淋巴结转移和增殖相关,进而影响患者的预后。LSD1 的高表达与食管鳞癌的恶性行为具有一定相关性,可以作为一个潜在的观测指标用于判断食管鳞癌患者的转移与预后,为食管鳞癌患者治疗新靶点的研究和复发检测奠定实验基础。但 LSD1 在食管鳞癌内确切的作用通路及下游基因等机制研究,需要进一步的体内外实验给予明确。

参考文献:

[1] Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard A R, *et al*. Five common cancers in Iran[J]. Arch Iran Med, 2010, 13(2): 143 - 146.

[2] 王延明, 王爱民, 蒋仁述, 等. 多药耐药相关蛋白基因表达与食管癌病理特征关系的临床研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 262 - 264.

[3] Xu Y, Chen Q, Yu X, *et al*. Factors influencing the risk of recurrence in patients with esophageal carcinoma treated with surgery: A single institution analysis consisting of 1002 cases[J]. Oncol Lett, 2013, 5(1): 185 - 190.

[4] Fang Y, Xiao F, An Z, *et al*. Systematic review on the relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and esophageal squamous cell carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(7): 1861 - 1866.

[5] 王明荣, 王海东, 熊刚, 等. 食管癌 APC/MCC 基因杂合缺失的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(7): 653 - 655.

[6] Kaz A M, Grady W M. Epigenetic biomarkers in esophageal cancer [J]. Cancer Lett, 2012, [Epub ahead of print].

[7] Shi Y, Lan F, Matson C, *et al*. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. Cell, 2004, 119(7): 941 - 953.

[8] Shi Y J, Matson C, Lan F, *et al*. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors[J]. Mol Cell, 2005, 19(6): 857 - 864.

[9] Metzger E, Imhof A, Patel D, *et al*. Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4[J]. Nature, 2010, 464(7289): 792 - 796.

[10] Wang Q, Xu X, Li J, *et al*. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Res, 2011, 21(10): 1424 - 1435.

[11] 邵根宝, 黄晓佳, 龚爱华, 等. 组蛋白去甲基化酶 LSD1 及其生物学功能[J]. 遗传, 2010, 32(4): 331 - 338.

[12] Gao L, Alumkal J. Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer[J]. Epigenetics, 2010, 5(2): 100 - 104.

[13] Lim S, Janzer A, Becker A, *et al*. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 512 - 520.

[14] Hu X, Li X, Valverde K, *et al*. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(25): 10141 - 10146.

[15] Ferrari-Amorotti G, Fragliasso V, Esteki R, *et al*. Inhibiting interactions of lysine demethylase LSD1 with snail/slug blocks cancer cell invasion[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 235 - 245.

[16] Lv T, Yuan D, Miao X, *et al*. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35065.

[17] Remmele W, Hildebrand U, Hienz H A, *et al*. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer[J]. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1986, 409(2): 127 - 147.

[18] Forneris F, Binda C, Dall'Aglio A, *et al*. A highly specific mechanism of histone H3-K4 recognition by histone demethylase LSD1[J]. J Biol Chem, 2006, 281(46): 35289 - 35295.

[19] Schulte J H, Lim S, Schramm A, *et al*. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy[J]. Cancer Res, 2009, 69(5): 2065 - 2071.

[20] Kahl P, Gullotti L, Heukamp L C, *et al*. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence[J]. Cancer Res, 2006, 66(23): 11341 - 11347.

[21] Wang Y, Zhang H, Chen Y, *et al*. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer[J]. Cell, 2009, 138(4): 660 - 672.

[22] Hayami S, Kelly J D, Cho H S, *et al*. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers[J]. Int J Cance, 2011, 128 (3): 574 - 586.

[23] Zhao Z K, Dong P, Gu J, *et al*. Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma[J]. Tumour Biol, 2013, 34(1): 173 - 180.

(**收稿**:2013-02-17;**修回**:2013-03-16)

(编辑 王 红)