临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001447

BCL11A在宫颈癌中的表达及其临床意义

白　鑫，张寒韬，李海玉，曾　帆，伍家燕，刘革力，宋方洲
（重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：深入研究 BCL11A 在宫颈癌组织及癌旁正常组织中的表达情况及其与临床病理因素的相关性。**方法**：收集 62 例宫颈癌组织及相对应的癌旁正常组织，制作成石蜡切片，并通过免疫组织化学法检测 BCL11A 蛋白在宫颈癌组织和癌旁正常组织中的表达，并结合患者资料，采用卡方检验分析 BCL11A 的表达与患者年龄、肿瘤大小、淋巴结受累等临床病理因素之间的关系。**结果**：①免疫组化结果显示，相比癌旁宫颈正常组织，BCL11A 在癌组织中表达显著升高，并且具有统计学意义（$P<0.01$）。②BCL11A 在宫颈癌组织中的表达定位也具有差异性，BCL11A 在宫颈癌组织中的表达主要定位于细胞核，而在癌旁正常组织中 BCL11A 的表达主要定位于细胞质。③BCL11A 的表达与患者的年龄（$P=0.436$）、临床分级（$P=0.683$）、肿瘤大小（$P=0.734$）以及淋巴结转移数目（$P=0.439$）无关，但与淋巴结受累情况有关，出现淋巴结转移（N1-3）的患者中 BCL11A 蛋白的表达水平高于未出现淋巴结转移（N0）的患者（$P=0.043$）。**结论**：BCL11A 在宫颈癌组织中高表达，在癌旁正常组织中表达较低；BCL11A 的表达与宫颈癌患者的淋巴结转移情况相关，即出现淋巴结转移的患者 BCL11A 的表达较高；在宫颈癌组织中 BCL11A 的表达主要定位于在细胞核中，而在癌旁正常组织中，BCL11A 的表达主要定位于细胞质中。BCL11A 可能在宫颈癌的发生发展中起着重要作用。

【关键词】BCL11A；宫颈癌；免疫组化；淋巴结转移
【中图分类号】R737.33　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-03-23

Expression and clinical significance of BCL11A in human cervical cancer

Bai Xin, Zhang Hantao, Li Haiyu, Zeng Fan, Wu Jiayan, Liu Geli, Song Fangzhou
(*Molecular Medicine and Tumor Research Center of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of BCL11A in cervical cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues, then to analyze the clinical significance underlying the differential expression of BCL11A. ***Methods***: Clinical specimens, including cervical cancer tissues and paired adjacent non-cancerous tissues, were obtained from 62 patients. The differential expressions of BCL11A in paraffin embedded and sliced tissues were evaluated via immunohistochemistry. The correlation between BCL11A expression and clinical features, such as patients' age, tumor size and lymph node involvement were analyzed using chi-square test.. ***Results***: ① Immunohistochemistry showed that the expression of BCL11A was significantly increased in cervical cancer tissues than in adjacent non-cancerous tissues ($P<0.01$). ②BCL11A expression was mainly located in cell nucleus in cervical cancer tissues and in cytoplasm in adjacent non-cancerous tissues. ③No correlations between BCL11A expression and age ($P=0.436$) or clinical stage ($P=0.68$) or tumor size ($P=0.734$) or amounts of lymphocyte ($P=0.439$) was found. However, compared with that of patients without lympho node metastasis (N0), the expression of BCL11A was increased in patients with lympho node metastasis (N1-3), $P=0.043$. ***Conclusion***: The expression of BCL11A is increased in cervical cancer tissues than in adjacent non-cancerous tissues. The expression of BCL11A is related to the lympho node involvement; patients with lympho node metastasis show high expression of BCL11A. BCL11A expression is mainly located in cell nucleus in cervical cancer tissues and in cytoplasm in adjacent non-cancerous tissues. BCL11A plays an important role in tumorigenesis and development of cervical cancer.

【Key words】BCL11A; cervical carcinoma; immunohistochemistry; lymph node status

宫颈癌是一种由 HPV 病毒引起的女性常见肿瘤，近年来其发病率及死亡率在全球范围内呈上升趋势。虽然人类在宫颈癌 HPV 疫苗的研发中已有重大突破，但是全球范围内，宫颈癌患者的死亡率处于第二位，仅次于乳腺癌患者。其中 80%的宫颈癌患者在发展中国家。在中国，年轻化是宫颈癌发展的又一特征。由于缺少特异性的肿瘤标志物，大规模宫颈癌筛查受到限制，需要更加精确的诊断标准以及科学合理的治疗方案，为诊断和治疗宫颈癌

作者介绍：白　鑫，Email：xinbaicq@163.com，
研究方向：从事肿瘤相关基因功能的研究。
通信作者：宋方洲，Email：fzsongcq@163.com。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1749.078.html
（2017-11-28）

提供新的方向。

BCL11A 基因位于染色体 2p16.1，编码一个分子量 91 kD 的 C2H2 型锌指结构的转录调节因子，BCL11A 基因编码蛋白有 3 种异构体：BCL11A-XL、BCL11A-L 和 BCL11A-S。3 种异构体都含有外显子 1 和外显子 2，以及外显子 4 的部分基因。BCL11A 最初发现于急性骨髓性白血病 BXH-2 小鼠中，是逆转录病毒的结合位点以及潜在的小鼠白血病致病基因[1]。在非霍奇金淋巴瘤以及白血病等血液疾病中，BCL11A 发挥着重要作用[2-3]。最近有研究表明，在某些实体瘤中，BCL11A 同样发挥着重要作用。BCL11A 在三阴性乳腺癌中的异常表达提示其可能是新的乳腺癌致病基因[4]。在非小细胞肺癌中，BCL11A 同样被认为可能是一种新的诊断以及与预后相关的重要基因[5-6]。目前尚未有研究探讨BCL11A 在宫颈癌中的表达及其机制，因此，本课题组通过免疫组织化学法（immunohistochemical，IHC）检测BCL11A 在宫颈癌中的表达情况，并探讨 BCL11A在宫颈癌组织及癌旁正常组织中的表达差异与临床病理因素之间是否有关系以及其中的意义，以此作为 BCL11A 在宫颈癌中的机制研究的前期实验依据。

1 材料及方法

1.1 实验材料及试剂

1.1.1 标本来源 收取重庆医科大学第一附属医院病理科 2013 至 2015 年宫颈癌手术标本 62 例，所有标本病理诊断明确，边缘均大于 1 cm，且患者并未接受术前放疗、化疗、生物治疗等其他治疗和辅助治疗。临床资料完整，详细资料见表 1。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 BCL11A 多克隆抗体（工作浓度 1:50，BS7586，Bioworld Technology 公司）；过氧化物酶标记的链霉卵白素检测试剂盒（SP-9000，北京中杉金桥生物技术有限公司）；浓缩型 DAB 试剂盒（ZLI-9018，北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 将收取的宫颈癌组织及癌旁组织固定、脱水、透明、包埋至石蜡凝固。将包裹组织的蜡块切成 4 μm 厚的切片，并置于载玻片上。进行免疫组化实验之前先在 60 ℃烘箱放置 3 h，然后进行脱蜡及水化，将柠檬酸钠抗原修复液加热并保持在 94 ℃，将石蜡切片置于其中进行抗原修复。使用 SP-9000 试剂盒中 3%H_2O_2 去离子水孵育 15 min，PBS 洗净；使用山羊血清工作液室温孵育封闭 15 min；滴加一抗（BCL11A 抗体，1:50 稀释），4 ℃孵育过夜，PBS 洗净；滴加二抗工作液，37 ℃孵育 15 min，PBS 洗去二抗工作液；滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，37 ℃孵育 15 min，PBS 洗去工作液；使用 DAB 试剂盒显色后封片。

表 1 BCL11A 在宫颈癌组织及癌旁组织中的表达情况[n（%）]

Tab.1 *Clinicopathologic characteristics of 62 patients and expression of BCL11A*[n（%）]

分组	表达情况
年龄（岁）	
≥50	23（38.9）
<50	36（61.1）
淋巴结转移数目（个）	
≥25	9（22.5）
<25	31（77.5）
淋巴转移	
N0	22（36.7）
N1	38（63.3）
肿瘤类型	
宫颈癌鳞状细胞癌	62
肿瘤大小（cm）	
<3	18（30.5）
≥3	41（69.5）
临床分级	
Ⅰ	4（6.4）
Ⅱ	22（35.7）
Ⅲ	36（57.9）
BCL11A 的表达	
阴性	12（19.3）
阳性	50（80.7）

1.2.2 结果判定 由 2 位病理学医师进行盲评。评判标准：显微镜下观测 BCL11A 的表达，阳性表达呈棕褐（黄）色，采用染色与阳性细胞数加和的方式，无色 0 分，淡黄色 1 分，棕黄色 2 分，棕褐色 3 分；阳性细胞数目计数<5%为 0 分，6%~25%为 1 分，26%~50%为 2 分，51%~75%为 3 分，>75%为 4 分；评分之和<4 分记为阴性表达，≥4 分记为阳性表达。

1.3 收集并整理病人资料

年龄大于等于 50 岁的患者有 23 人（38.9%），小于 50 岁的患者有 36 人（61.1%）；临床一期的患者有 4 人（6.4%），临床二期的患者有 22 人（35.7%），临床三期的患者有 36 人（57.9%）；未出现淋巴结转移的患者有 22 人（36.7%），出现淋巴结转移的患者有 38 人（63.3%）；肿瘤组织大小大于等于 3 cm 的患者有 41 人（69.5%），小于 3 cm 的患者有 18 人（30.5%）；在所有患者中，出现 BCL11A 蛋白高表达的有 50 人（80.7%），BCL11A 蛋白低表达的有 12 人（19.3%）。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析，数据用阳性及阴性例数表示，两组之间采用卡方检验比较 BCL11A 表达差异性，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 BCL11A 在宫颈癌组织及癌旁正常组织中的表达及定位分析

在 62 例宫颈癌组织样本及其癌旁正常组织中均检测到了 BCL11A 的表达，BCL11A 在宫颈癌中高表达，如图 1 所示。BCL11A 在宫颈癌组织中的阳性率为 80.7%，在正常组织中阳性率为 21%。BCL11A 在宫颈癌组织和癌旁正常组织中

的差异性表达有统计学意义（$P<0.01$），见表 2。BCL11A 蛋白主要定位于癌细胞的细胞核，少量位于细胞质和（或）细胞膜，镜下呈棕褐（黄）色，而在宫颈正常细胞中其表达大多位于细胞质，如图 2 所示，箭头所示为宫颈癌组织中阳性细胞信号位置。

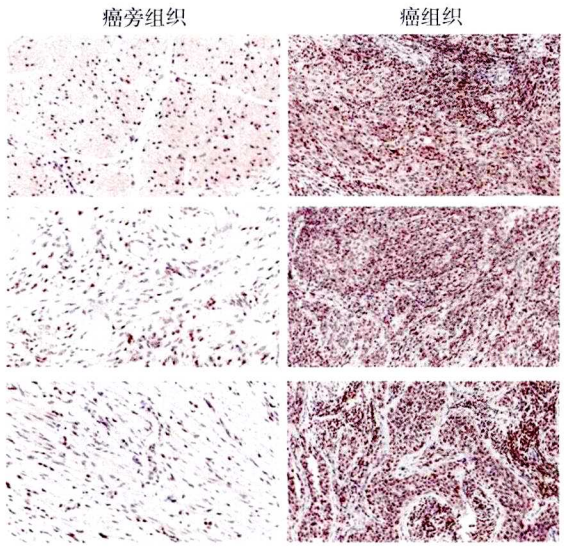


图 1 BCL11A 在宫颈癌组织及癌旁正常组织中的表达（200×）。

Fig.1 BCL11A protein expression detected by immunohistochemistry（200×）

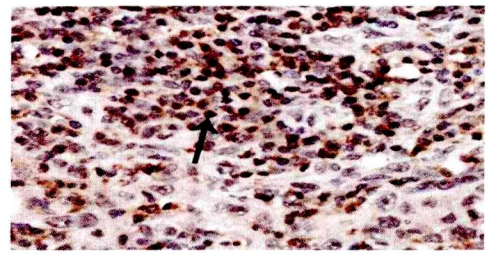
表 2 BCL11A 表达与临床病理特征的关系[n（%）]

Tab.2 Correlation between the clinicopathologic features and expression of BCL11A protein[n（%）]

分组	阳性表达例数(百分比)	阴性表达例数(百分比)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)			0.682	0.436
≥50	18(78.3)	5(21.7)		
<50	30(83.3)	6(16.7)		
淋巴结转移数（个）			0.368	0.439
≥25	8(88.9)	1(11.1)		
<25	27(87.1)	4(12.9)		
淋巴转移			0.624	0.043
N0	21(95.5)	1(0.45)		
N1-3	28(73.7)	10(26.3)		
组织来源			23.388	0.001
癌症组织	50(80.6)	12(19.4)		
正常癌旁组织	13(21.0)	49(79.0)		
肿瘤大小(cm)			1.824	0.734
<3	17(85.0)	3(15.0)		
≥3	32(78.0)	9(22.0)		
临床分级			0.630	0.683
Ⅰ	3(75.0)	1(25.0)		
Ⅱ	19(86.4)	3(13.6)		
Ⅲ	28(77.8)	8(22.2)		

2.2 BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与临床病理因素之间的关系

根据 2 位病理医师独立判读的结果，对 BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与临床病理之间的关系分析如下：在宫颈癌组织中，肿瘤大小<3 cm 组和肿瘤大小≥3 cm 组表达无统计学意义（$P=0.734$），表明 BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与肿瘤大小无关；患者年龄<50 岁组和年龄≥50 岁组表达无统计学意义（$P=0.436$），表明 BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与年龄无关；淋巴结转移数目个数<25 组和淋巴结转移数目个数≥25 组表达无统计学意义（$P=0.439$），表明BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与淋巴结数目无关；在临床分级差异组中，BCL11A 的表达也无统计学意义，表明 BCL11A 的表达与临床分级无关；但是，在区域淋巴结转移组 N0 与 N1 组中的表达有统计学意义（$P=0.043$），表明 BCL11A 在宫颈癌组织中的表达与区域淋巴结转移情况有相关性。



图中箭头所示为阳性信号位置

图 2 局部放大倍数显示 BCL11A 的亚细胞定位

Fig.2 A zoom in view of BCL11A expression in cervical cancer cells

3 讨 论

宫颈癌对女性健康造成了巨大伤害，作为世界上常见的恶性肿瘤，其发病率迅速上升且发病趋向年轻化，但是仍然没有较好的诊断标志物[7]。

BCL11A 最初发现于 BXH-2 小鼠急性白血病中，已有大量研究证实其在血液疾病，例如急性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病中发挥重要作用[8-10]，BCL11A 还能调节胎血红蛋白的表达[11-14]。但是 BCL11A 在实体瘤中的作用及其机制研究较少。已经有实验证实在非小细胞肺癌中，BCL11A 在 mRNA 水平和蛋白水平都是高表达，且 BCL11A 的表达与患者淋巴结状态、疾病分期以及预后相关。对于早期鳞状细胞癌患者，BCL11A 可以作为预后无病生存率和总生存率的标志物，并且检测到BCL11A 基因拷贝数增加，miR-30a 可能通过与 BCL11A 的 3'UTR 区结合调控 BCL11A 的表达[5]。也有研究表明，BCL11A 在三阴性乳腺癌中高表达且与组织学分级有关，检测到 BCL11A 表达增高和（或）BCL11A 拷贝数增加的患者的生存率降低，在三阴性乳腺癌细胞中，敲降 BCL11A 降低了肿瘤细胞的克隆形成能力以及肿瘤形成[4]。通过统计学方法分析 BCL11A 在宫颈癌中的表达与临床病理特征之间的关系，本研究发现 BCL11A 的表达与患者年龄、临床病理分

级以及肿瘤大小等无关，但是 BCL11A 在宫颈癌鳞状细胞癌中的表达与淋巴结状态有关。三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌鳞状细胞癌以及宫颈癌鳞状细胞癌的侵袭能力强，在肺癌鳞状细胞癌中也检测到 BCL11A 表达与淋巴结状态有关，并且 BCL11A 已被证实与淋巴结组织生成有关[8-10]，所以推测BCL11A 在宫颈癌淋巴转移过程中也起着一定的作用。

在本研究中，通过免疫组织化学法检测了 BCL11A 在宫颈癌组织和正常组织中的蛋白表达，发现与正常组织相比，BCL11A 在宫颈癌组织中的蛋白表达明显上升，鉴于 BCL11A 在非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌以及宫颈癌中均表达异常，提示 BCL11A 与癌症的发生发展有关联。

在 B 细胞淋巴瘤中，BCL11A 表达增加，BCL11A (XL)出现核聚集的现象[15-16]。在本研究中，同样发现在癌组织中 BCL11A 的表达集中在核内，但是在正常组织中集中在细胞质和(或)细胞膜上，由此推测在宫颈癌中，BCL11A 作为转录因子进入细胞核发挥作用，影响宫颈癌的发生发展，但是 BCL11A 在宫颈癌中表达异常的具体机制以及 BCL11A 作用的下游底物尚不明确。已有研究表明，在红细胞中，KLF1 能够影响 BCL11A 的表达[11]，在白血病中，BCL11A 通过直接调节 SIRT1 影响 P21 的转录[17-19]。在 B 细胞中，BCL11A 诱导 P53 的负调节蛋白 MDM2 表达[20-21]。但由于缺少足够的样本，BCL11A 的作用机制仍不清楚，在接下来的试验中，会进行细胞水平相关实验，并进一步阐明 BCL11A 在宫颈癌中的作用及作用机制。

参 考 文 献

[1] Nakamura T, Yamazaki Y, Saiki Y, et al. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3178-3186.

[2] Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies[J]. Blood, 2001, 98(12): 3413-3420.

[3] Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma[J]. Blood, 2002, 99(4): 1474-1477.

[4] Khaled WT, Choon Lee S, Stingl J, et al. BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells[J]. Nat Commun, 2015, 6: 5987.

[5] Jiang BY, Zhang XC, Su J, et al. BCL11A overexpression predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer and is modulated by microRNA-30a and gene amplification[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 61.

[6] Zhang N, Jiang BY, Zhang XC, et al. The BCL11A-XL expression predicts relapse in squamous cell carcinoma and large cell carcinoma [J]. J Thorac Dis, 2015, 7(9): 1630-1636.

[7] Zeng F, Liao K, Wu J, et al. ALEX1 may be a novel biomarker for human cervical squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 9434-9439.

[8] Tao H, Ma X, Su G, et al. BCL11A expression in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2016, 41: 71-75.

[9] Liu P, Keller JR, Ortiz M, et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development[J]. Nat Immunol, 2003, 4(6): 525-532.

[10] Yu Y, Wang J, Khaled W, et al. Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53[J]. J Exp Med, 2012, 209(13): 2467-2483.

[11] Vinjamur DS, Alhashem YN, Mohamad SF, et al. Krüppel-like transcription factor KLF1 is required for optimal γ- and β-globin expression in human fetal erythroblasts[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0146802.

[12] Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A[J]. Science, 2008, 322(5909): 1839-1842.

[13] Liu L, Pertsemlidis A, Ding LH, et al. Original research: a case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(7): 706-718.

[14] Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5): 1620-1625.

[15] Weniger MA, Pulford K, Gesk S, et al. Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma[J]. Leukemia, 2006, 20(10): 1880-1882.

[16] Liu H, Ippolito GC, Wall JK, et al. Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 18.

[17] Senawong T, Peterson VJ, Leid M. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression[J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 434(2): 316-325.

[18] Zhu X, Morales FC, Agarwal NK, et al. Moesin is a glioma progression marker that induces proliferation and Wnt/β-catenin pathway activation via interaction with CD44[J]. Cancer Res, 2013, 73(3): 1142-1155.

[19] Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with beta-hemoglobinopathies[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 41(3): 255-258.

[20] Gao Y, Wu H, He D, et al. Downregulation of BCL11A by siRNA induces apoptosis in B lymphoma cell lines[J]. Biomed Rep, 2013, 1(1): 47-52.

[21] Mai L, Yi F, Gou X, et al. The overexpression of MCPH1 inhibits cell growth through regulating cell cycle-related proteins and activating cytochrome c-caspase 3 signaling in cervical cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 392(1-2): 95-107.

（责任编辑：方 济）