



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3848.shtml

· 基础研究 ·

LSD1、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白在结肠癌中的表达及其意义

丁杰¹, 廖国庆², 张忠民¹, 徐开盛¹, 刘盛², 张易², 晏仲舒²

(1. 贵州省人民医院 胃肠外科, 贵州 贵阳 550002; 2. 中南大学湘雅医院 胃肠外科, 湖南 长沙 410008)

摘要

目的: 探讨赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1(LSD1)、E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)在结肠癌组织中的表达及其临床意义。

方法: 收集2006年2月—2008年12月于中南大学湘雅医院行手术切除的结肠癌标本108例, 采用免疫组化技术检测结肠癌组织中LSD1、E-cad、N-cad的表达, 并分析其与患者临床病理特征及预后的关系。

结果: 全组LSD1、E-cad、N-cad的阳性表达率分别为66.7%(72/108), 85.2%例(92/108)、41.7%(45/108)。LSD1在较晚TNM分期、远处转移的结肠癌组织中的表达率明显增高, 而E-cad则相反(均 $P<0.05$), N-cad的表达在各项临床病理因素分组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。LSD1与E-cad在结肠癌组织中的表达呈明显负相关($r=-0.318$, $P=0.001$), 与N-cad的表达无明显相关性($r=0.182$, $P=0.06$)。LSD1的阳性表达组和E-cad的阴性表达组患者总生存率明显低于各自的阴性表达组与阳性表达组(均 $P<0.05$), N-cad表达与否与患者总生存率无明显关系($P=0.410$)。

结论: LSD1和E-cad的表达与结肠癌的转移有密切关系, 阳性表达LSD1和阴性表达E-cad的结肠癌预示预后不良。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(4):462-467]

关键词

结肠肿瘤; 赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1; 钙黏着糖蛋白类; 肿瘤转移

中图分类号: R735.3

Expressions of LSD1, E-cadherin and N-cadherin in colon cancer and their significance

DING Jie¹, LIAO Guoqing², ZHANG Zhongmin¹, XU Kaisheng¹, LIU Sheng², ZHANG Yi², YAN Zhongshu²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Corresponding author: DING Jie, Email: dingjieboy@126.com.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate the expressions of lysine-specific demethylase 1 (LSD1), E-cadherin (E-cad) and N-cadherin (N-cad) in colon cancer and their clinical significance.

Methods: Cancer tissue specimens from 108 cases of colon cancer who underwent operation at Xiangya hospital

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81302169; 81360366); 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字[2013]2178号)。

收稿日期: 2013-04-19; **修订日期:** 2014-03-05。

作者简介: 丁杰, 贵州省人民医院副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 丁杰, Email: dingjieboy@126.com.cn

from February 2006 to December 2008 were collected. The expressions of LSD1, E-cad and N-cad in these colon cancer tissues were determined by immunohistochemical staining, and their relations with clinicopathologic characteristics and prognosis of the patients were analyzed.

Results: In the entire group, the positive expression rate of LSD1, E-cad and N-cad in colon was 66.7% (72/108), 85.2% (92/108) and 41.7% (45/108), respectively. Positive LSD1 expression rate was significantly increased in tumors with advanced TNM stage and distant metastasis, which for E-cad was the opposite (all $P < 0.05$), while there were no statistical differences in N-cad expression among the groups divided according to clinicopathologic factors (all $P > 0.05$). In colon cancer tissues, the LSD1 expression was negatively correlated with E-cad expression ($r = -0.318, P = 0.001$), but showed no significant correlation with N-cad expression ($r = 0.182, P = 0.06$). The overall survival rate in LSD1 positive expression group and E-cad negative expression group was significantly lower than that in their respective negative expression group and positive expression group (both $P < 0.05$), while positive or negative N-cad expression yielded no significant relation with the overall survival of the patients ($P = 0.410$).

Conclusion: LSD1 and E-cad expressions are closely related to colon cancer metastasis, and colon cancer with positive LSD1 and negative E-cad expression may herald a poor prognosis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):462-467]

KEYWORDS Colonic Neoplasms; Lysine-Specific Demethylase 1; Cadherins; Neoplasm Metastasis

CLC number: R735.3

结肠癌的发病率整体呈上升趋势, 目前已经成第三常见的恶性肿瘤, 病死率居世界第4位^[1], 复发和转移是导致死亡的主要原因。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)被认为在癌症转移的起始中发挥重要作用, 在此过程中, 上皮细胞获得成纤维细胞样特性, 细胞极性消失, 细胞间黏附减退, 侵袭和运动能力增强。赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1(lysine-specific demethylase 1, LSD1)在转录因子Snail介导的上皮间质转化过程中不可或缺, 没有LSD1的参与, Snail将不能有效抑制E-钙黏蛋白的表达^[2]。LSD1是第一个被发现的组蛋白特异性去甲基化酶, 过表达LSD1能促进多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[3-4], 但其是否与结肠癌的转移相关尚待检验。本研究利用免疫组织化学技术检测结肠癌组织中LSD1、E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)的表达, 探讨LSD1与结肠癌转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2006年2月—2008年12月于中南大学湘雅医院行手术切除的结肠癌标本108例, 患者男65例, 女43例; 年龄27~79岁, 中位年龄54岁。

其中盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠来源的结肠癌分别有29、21、8、20、30例。8例发生了远处转移, 转移部位包括: 肝脏5例、肺1例、盆腔脏器2例。单发转移6例, 多发转移2例。按国际抗癌联盟(UICC)的TNM标准, I期19例, II期34例, III期49例, IV期6例(表1)。患者术前未实施新辅助化疗, 均签署了知情同意书, 本研究得到了湘雅医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

手术切除结肠癌组织标本, 10%甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm连续切片5张, 3张用于免疫组化SP法检测LSD1、E-cad、N-cad, 1张HE染色, 1张用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。兔抗人LSD1单克隆抗体, 兔抗人E-cad单克隆抗体和兔抗人N-cad单克隆抗体购自美国R&D生物技术公司, SP免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉生物技术开发公司。光学显微镜下采用二级计分法结果判断^[5]。(1)阳性细胞百分率计分: 随机选择5个视野(×400), 计算阳性细胞百分比, 无阳性细胞为0分, <10%为1分, 10%~50%为2分, >50%为3分。(2)染色强度计分: 阳性颗粒为淡黄色计1分, 黄色或深黄色计2分, 黄褐色计3分。1、2项评分相乘, 0分计为阴性“-”, 1~2分计为弱阳性“+”, 3~4分计为中度阳性“++”, ≥5分时计为强阳性“+++”。

表1 LSD1、E-cad、N-cad的表达与结肠癌患者临床病理特征的关系 [n (%)]

项目	n	LSD1 (+)	χ^2	P	E-cad (+)	χ^2	P	N-cad (+)	χ^2	P
性别										
男	65	42 (72.3)	0.31	0.578	53 (81.5)	1.72	0.190	24 (36.9)	1.51	0.219
女	43	30 (81.4)			39 (90.7)			21 (48.8)		
年龄 (岁)										
< 50	37	26 (83.8)	0.33	0.566	32 (80.5)	0.08	0.784	19 (51.4)	2.17	—
≥ 50	71	46 (71.8)			60 (84.5)			26 (36.6)		
部位										
盲肠	29	19 (65.5)	5.72	0.221	26 (89.7)	1.14	0.89	13 (44.8)	0.69	0.952
升结肠	21	13 (61.9)			18 (85.7)			9 (42.9)		
横结肠	8	3 (37.5)			7 (87.5)			4 (50.0)		
降结肠	20	13 (65.0)			17 (85.0)			8 (40.0)		
乙状结肠	30	24 (80.0)			24 (80.0)			11 (36.7)		
TNM 分期										
I 期	19	7 (36.8)	12.3	0.006	18 (94.7)	10.4	0.016	4 (21.1)	7.65	0.054
II 期	34	23 (67.6)			31 (91.2)			13 (38.2)		
III 期	47	34 (72.3)			39 (83.0)			22 (46.8)		
IV 期	8	8 (100.0)			4 (50.0)			6 (75.0)		
Broders 分级										
I 级	18	8 (44.4)	5.25	0.154	15 (83.3)	6.86	0.077	4 (22.2)	3.54	0.315
II 级	58	41 (70.7)			52 (89.7)			27 (46.6)		
III 级	26	18 (69.2)			22 (84.6)			11 (42.3)		
IV 级	6	5 (83.3)			3 (50.0)			3 (50.0)		
远处转移										
是	8	8 (100.0)	4.32	0.038	4 (50.0)	8.48	0.004	6 (75.0)	0.07	0.054
否	100	64 (64.0)			88 (88.0)			39 (39.0)		

1.3 随访

采用门诊、电话或信件等方式随访。随访起始时间为术后第1天，随访截止日期为病死日期或2012年12月31日，最长随访时间83个月，最短随访时间16个月，中位生存期61个月，失访13例，随访率为88.0%。

1.4 统计学处理

使用SPSS 17.0软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验，3种蛋白之间的相关性采用Spearman等级相关分析，总体生存率用Kaplan-Meier方法计算， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LSD1、E-cad、N-cad在结肠癌中的表达

LSD1在结肠癌细胞中为细胞核染色(图1A)；E-cad在结肠癌细胞中主要为细胞膜和细胞质染色(图1B)；N-cad主要为细胞质染色，少数有细胞膜染色(图1C)。LSD1、E-cad、N-cad在结肠癌组织中的阳性率依次为66.7% (72/108)，85.2% (92/108)和41.7% (45/108)。

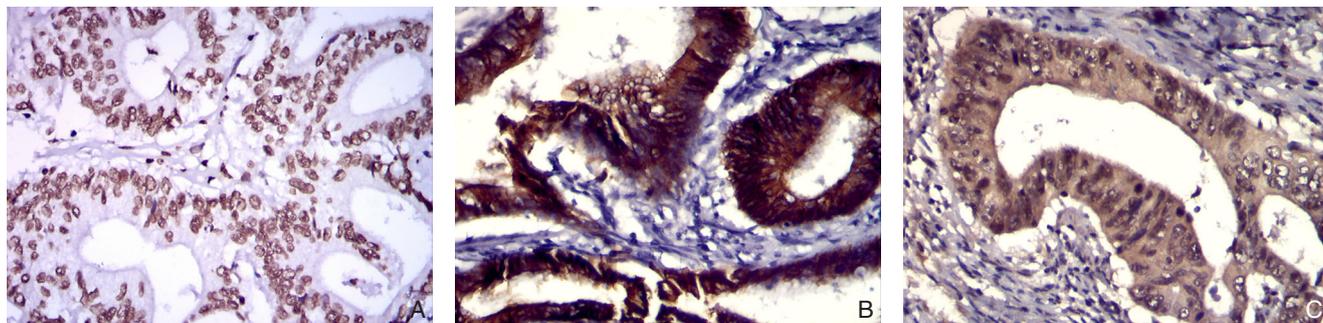


图1 免疫组化检测LSD1、E-cad、N-cad在结肠癌中的表达(×400) A: LSD1阳性表达; B: E-cad阳性表达; C: N-cad阳性表达

Figure 1 Immunohistochemical staining for expressions of LSD1, E-cad and N-cad in colon cancer (×400) A: Positive LSD1 expression; B: Positive E-cad expression; C: Positive N-cad expression

2.2 LSD1、E-cad、N-cad 的表达与结肠癌临床病理特征的关系

LSD1 在不同性别、年龄、部位、Broders 分级的结肠癌组织中的表达差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)，而在不同 TNM 分期、是否有远处转移分组间的差异有统计学意义，较晚 TNM 分期、发生远处转移的结肠癌组织中 LSD1 表达率明显更高 (均 $P<0.05$) (表 1)。进一步分析发现，LSD1 的表达与肿瘤浸润深度无关 ($P>0.05$)，但与淋巴

结转移和远处转移有关 ($P<0.05$) (表 2)。

E-cad 在不同性别、年龄、部位、Broders 分级的结肠癌组织中的表达差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)，而在较晚 TNM 分期及发生远处转移的结肠癌组织中 E-cad 表达率明显较低 (均 $P<0.05$) (表 1)。N-cad 在不同性别、年龄、部位、TNM 分期、Broders 分级、是否远处转移的结肠癌组织中的表达差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 1)。

表 2 LSD1 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移的关系

Table 2 Relations of LSD1 expression with depth of tumor invasion, lymph node metastasis, and distant metastasis

LSD1	n	浸润深度				χ^2	P	淋巴结转移			χ^2	P	远处转移		χ^2	P
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄			N ₀	N ₁	N ₂			有	无		
(+)	72	1	15	40	16	2.00	0.572	28	25	19	7.55	0.023	8	64	4.32	0.038
(-)	36	2	9	17	8			24	6	6			0	36		

2.3 LSD1 与 E-cad、N-cad 在结肠癌中表达的相关性

LSD1 与 E-cad 在结肠癌中的表达呈负相关

($r=-0.318$, $P=0.001$) (表 3)，与 N-cad 的表达无明显相关性 ($r=0.182$, $P=0.06$) (表 4)。

表 3 LSD1 与 E-cad 在结肠癌中表达的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between LSD1 and E-cadherin expression in colon cancer

LSD1	E-cad				合计	r	P
	(+++)	(++)	(+)	(-)			
(+++)	2	2	1	7	12	-0.318	0.001
(++)	3	4	7	7	21		
(+)	4	28	5	2	39		
(-)	12	9	15	0	36		
合计	21	43	28	16	108		

表 4 LSD1 与 N-cad 在结肠癌中表达的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between LSD1 and N-cadherin expression in colon cancer

LSD1	E-cad				合计	r	P
	(+++)	(++)	(+)	(-)			
(+++)	1	0	10	1	12	0.182	0.06
(++)	0	1	9	11	21		
(+)	1	4	6	28	39		
(-)	1	5	7	23	36		
合计	3	10	22	63	108		

2.4 LSD1、E-cad、N-cad 的表达与结肠癌的预后

Kaplan-Meier 分析的结果显示：结肠癌组织中 LSD1 的阳性表达组总体生存率低于其阴性表达

组 ($P=0.038$)，而 E-cad 的阳性表达组总体生存高于其阴性表达组 ($P<0.01$)；N-cad 是否阳性表达与总体生存率无明显关系 ($P=0.410$) (图 2)。

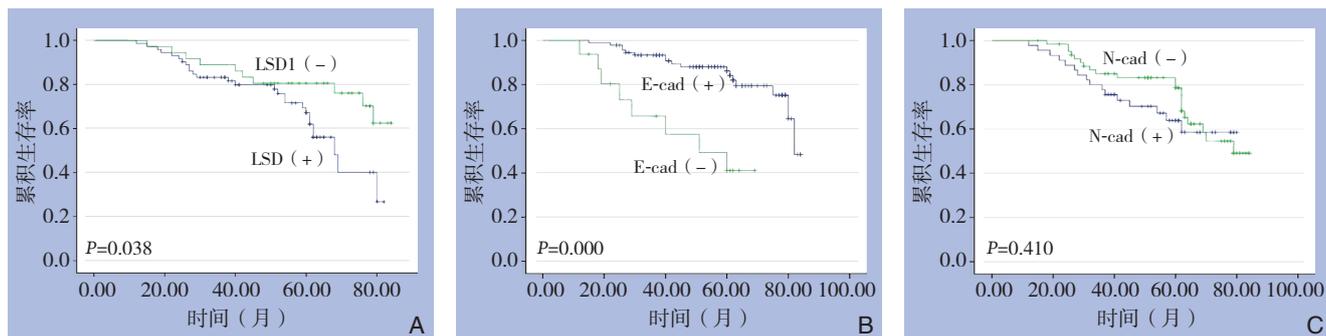


图 2 不同分组结肠癌患者的生存曲线 A: LSD1 的阳性表达组与阴性表达组; B: E-cad 的阳性表达组与阴性表达组; C: N-cad 阳性表达组与阴性表达组

Figure 2 Survival curves of differently grouped colon cancer patients A: LSD1 positive expression group vs. LSD1 negative expression group; B: E-cad positive expression group vs. E-cad negative expression group; C: N-cad positive expression group vs. N-cad negative expression group

3 讨论

表观遗传是一种不基于 DNA 序列差异的核酸遗传,其能对基因产生可逆化修饰而激活或阻断基因的转录与翻译,在肿瘤的发生、增殖、侵袭转移,甚至耐药的过程中发挥重要作用。组蛋白赖氨酸甲基化是一种重要的表观遗传修饰,其过去曾被认为是不可逆的,直到第 1 个赖氨酸特异性脱甲基酶 LSD1 的发现,才使这种观点得到改变^[6]。

LSD1 又名 AOF2、BHC110、KIAA0601、KDM1、p110b 和 NPAO,属于胺氧化酶家族成员,从酵母到人类均十分保守。其晶体结构包含 N 端的 SWIRM 结构域, Tower 结构域和 C 端的胺氧化酶结构。LSD1 可以特异去除组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸 (H3K4) 和组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸 (H3K9) 的二甲基和一甲基修饰,调控靶基因的表达^[7]。本研究显示: LSD1 在 66.7% 的结肠癌中有阳性表达,并且在较晚 TNM 分期的结肠癌中表达率增高,进一步分析发现 LSD1 与淋巴结转移和远处转移有关 ($P < 0.05$)。因此,推测 LSD1 可能在结肠癌的转移中发挥重要作用。事实上, LSD1 在其它上皮来源的肿瘤如乳腺癌、肺癌、肝癌、膀胱癌,甚至间叶源性肿瘤中的表达也明显增强^[8-9]。LSD1 能够通过染色体重构诱导肿瘤形成^[8],催化 p53 Lys-370 部位脱甲基而抑制 p53 介导的肿瘤细胞凋亡^[10],促进肿瘤细胞增殖^[11],并能通过下调 E-cad 基因启动子区域二甲基化的 H3K4 (H3K4m2) 水平促进肿瘤的侵袭转移^[2]。

上皮间质转化能被与 E-box 序列结合的转录

抑制因子如 Snail 和 Slug 调节,在肿瘤细胞转移的起始中发挥重要作用^[12-13]。LSD1 在 Snail 和 Slug 介导的 EMT 过程中必不可少,在 LSD1 缺失的情况下,转录因子不能有效抑制 E-cad 的表达^[2]。研究显示在靶向沉默 E-cad 的癌细胞中,敲除 LSD1 基因将导致上皮表型的部分恢复,与此同时 E-cad 启动子区域 H3K4m2 水平的上调,充分说明 LSD1 在 Snail/Slug 依赖的上皮表型转录抑制中发挥关键作用^[2]。

LSD1 可能成为抑制肿瘤转移的潜在治疗靶点,使用特异性 LSD1 抑制剂有可能成为新的癌症治疗策略。由于 LSD1 与胺氧化酶之间结构和功能的高度相似性,单胺氧化酶抑制剂如 pargyline, tranlycypromine, polyamine analogues 等已被用来进行体外实验,并被证实能有效抑制 LSD1 的酶活性,使多种异常沉默的基因重新表达^[14]。Lv 等^[4]甚至报道,通过小干扰 RNA 或者 pargyline 阻断 LSD1 的活性能有效抑制非小细胞肺癌的增殖、侵袭和转移。尽管 LSD1 在基础领域取得了一些不错的研究成果,其临床应用价值还有待于进一步确认。

相关性分析显示 LSD1 的表达与 E-钙黏蛋白呈负相关 ($r = -0.318$, $P = 0.001$),与 N-cad 无明显关联 ($P = 0.06$)。如上所述, LSD1 能够被 Snail 招募到 E-cad 的启动子区域并下调启动子区域 H3K4m2 的水平,抑制 E-cad 的转录^[2]。在此过程中, Snail 的 SNAG 结构域扮演了“分子挂钩”的角色,招募 LSD1 并与 CoREST 协同作用于 Snail 的靶基因^[15]。Snail、LSD1、CoREST 三者协同抑制 E-cad 的表达并促成细胞的侵袭和转移^[15]。但是,

LSD1 能否直接作用于 N-钙黏蛋白并调节其表达尚不得而知,这有待于体外实验的进一步证实。

既然 LSD1 和 E-cad 与结肠癌的转移密切相关,但其是否能够成为评估结肠癌预后的分子生物标记呢。本研究显示 LSD1 的阳性表达与更低的总体生存率有关 ($P=0.038$), 阳性表达 LSD1 且阴性表达 E-cad 的结肠癌往往预示着更差的预后。不妨将这部分患者归类为高度复发风险的病例,可能需要通过新的治疗策略(如 LSD1 抑制剂)来强化目前的治疗。

综上所述, LSD1 在较晚 TNM 分期、远处转移的结肠癌组织中的表达率明显增高,而 E-cad 的表达率则明显降低。阳性表达 LSD1 且阴性表达 E-cad 的结肠癌预示着更差的预后。LSD1 可能通过下调 E-cad 启动子区域 H3K4m2 水平的途径抑制 E-cad 的转录,这有待于体外实验和动物实验的进一步证实。

参考文献

- [1] Cui R, Okada Y, Jang SG, et al. Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population[J]. *Gut*, 2011, 60(6):799-805.
- [2] Lin T, Ponn A, Hu X, et al. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncogene*, 2010, 29(35):4896-4904.
- [3] Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, et al. Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3):655-660.
- [4] 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.
- [5] Nenutil R, Smardova J, Pavlova S, et al. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumors by p53 and MDM2 immunohistochemistry[J]. *J Pathol*, 2005, 207(3):251-259.
- [6] 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.
- [7] Lee MG, Wynder C, Cooch N, et al. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation[J]. *Nature*, 2005, 437(7057):432-435.
- [8] Hayami S, Kelly JD, Cho HS, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3):574-586.
- [9] Bennani-Baiti IM, Machado I, Llombart-Bosch A, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(8):1300-1307.
- [10] Huang J, Sengupta R, Espejo AB, et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1[J]. *Nature*, 2007, 449(7158):105-108.
- [11] Schulte JH, 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.
- [12] 刘志容, 吴诚义. 上皮-间质转化及其调控基因 Snail 在肿瘤侵袭转移中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(8):916-920.
- [13] 李森, 孔永和, 赵成茂, 等. E-cadherin 和 Slug 在胃癌组织中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(4):463-468.
- [14] Huang Y, Greene E, Murray Stewart T, et al. Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(19):8023-8028.
- [15] Lin Y, Wu Y, Li J, et al. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1[J]. *EMBO J*, 2010, 29(11):1803-1816.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 丁杰, 廖国庆, 张忠民, 等. LSD1、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白在结肠癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(4):462-467. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.012
 Cite this article as: DING J, LIAO GQ, ZHANG ZM, et al. Expressions of LSD1, E-cadherin and N-cadherin in colon cancer and their significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(4):462-467. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.012