

胰腺导管腺癌中 BCLAF1 蛋白的表达

何俊飞 陈炯, 胡丕波 鄢高华 周海波

摘要 目的 探究 Bcl-2 相关转录因子-1 (BCLAF1) 蛋白在胰腺导管腺癌 (PDAC) 中的表达水平及临床意义。方法 通过免疫组织化学法分别检测 67 例配对的 PDAC 以及癌旁组织石蜡切片中 BCLAF1 蛋白的表达。用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 检测 8 例配对的 PDAC 以及癌旁组织中 BCLAF1 蛋白的表达水平。PDAC Panc-1 细胞中过表达 BCLAF1 后, 通过 Transwell 侵袭实验观察 PDAC 细胞侵袭迁移能力的变化, 采用 CCK-8 法检测各组 PDAC 细胞增殖情况。结果 免疫组化结果显示: BCLAF1 主要表达于 PDAC 导管细胞的细胞核中, PDAC 组 BCLAF1 阳性表达的有 54 例 (80.59%), 高于癌旁组织 (35.82%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 27.610, P < 0.001$)。Western blot 结果表明: PDAC 中 BCLAF1 蛋白含量高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。PDAC 细胞中过表达 BCLAF1 后明显增加胰腺细胞的侵袭迁移能力, 同时能促进癌细胞的增殖能力。BCLAF1 在 PDAC 癌组织中的表达水平与患者肿瘤的大小、TNM 分期、有无淋巴结转移以及临床分期和预后情况等临床生物学特征显著相关。Kaplan-Meier 生存分析显示 BCLAF1 高表达生存时间比 BCLAF1 低表达生存时间显著缩短, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.419, P < 0.01$)。COX 回归多因素分析显示 BCLAF1 和 TNM 分期是影响 PDAC 预后的独立因素。结论 BCLAF1 蛋白表达水平在 PDAC 中显著升高, 转染 pcDNA3.1-BCLAF1 质粒 Panc-1 细胞增殖速度, 侵袭能力得到提高, 其检测有助于对 PDAC 的早期诊断以及预后评估。

关键词 胰腺导管腺癌; BCLAF1; 免疫组化; Western blot; CCK-8

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)07-1076-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.015

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是一类致命的恶性肿瘤, 其预后较差。由于早期缺乏临床症状, 多数患者确诊后已进入晚期阶段, 放疗化疗效果不佳。具有针对性治疗方案甚

少, 早期确诊后根治性手术切除是提高患者生存期最有希望的一种治疗方法。CA199 是一种黏蛋白型糖类肿瘤标志物, 是目前临床上诊断 PDAC 应用最广泛血清肿瘤标志物, 但是急性胰腺炎、胆石症、急性肝炎、肝硬化等良性疾病患者中 CA199 的水平也会升高, 诊断效果较差。因此寻找适合的肿瘤标志物对 PDAC 的诊断预后具有重要意义。B 淋巴细胞瘤 2 蛋白家族 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 是调节细胞凋亡的一组蛋白, Bcl-2 相关转录因子 1 (Bcl-2 associated transcription factor 1, BCLAF1) 是其家族成员之一, 最初在筛选与腺病毒蛋白结合的相关蛋白中被鉴定出来^[1], 过度表达能诱导细胞凋亡。然而关于 BCLAF1 与 PDAC 的关系研究甚少。该研究探讨 BCLAF1 在 PDAC 中的表达情况并分析其两者的关系, 对研究 PDAC 的发生进展机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 研究选取安徽医科大学附属省立医院 2014 年 1 月~2017 年 12 月经根治性手术而且病理诊断确诊的 67 例 PDAC 患者的肿瘤组织石蜡切片作为实验组, 对照组为相应距离肿瘤组织边缘 >2 cm 的癌旁组织, 患者术前均未进行放疗化疗, 且临床资料完整。其中男 34 例, 女 33 例; 年龄 <60 岁 21 例, >60 岁 46 例; 胰头癌 47 例, 胰尾癌 20 例; 高分化 12 例, 中低分化 55 例; 直径 <20 mm 有 49 例, >20 mm 有 18 例; 神经侵犯 32 例, 未侵犯 35 例; 淋巴结转移 45 例, 未转移 22 例; TNM 分期 I 期 22 例, II 期 45 例。人胰腺癌细胞系 Panc-1 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RNA 逆转录试剂盒、ECL 超敏发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; BCLAF1 一抗 (稀释比 1:1000) 购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗和免疫组化通用型试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; pcDNA3.1-BCLAF1、pcDNA3.1-NC 对照质粒购自上海吉凯基因化学技术公司。

1.3 实验方法

2019-02-28 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1401045020)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 何俊飞, 男, 硕士研究生;

陈炯, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: ch_jiong@126.com

1.3.1 BCLAF1 细胞水平检测

1.3.1.1 细胞培养与转染处理 将胰腺腺癌细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期的 Panc-1 细胞并分为实验组和对照组,消化、离心后接种于 6 孔板;细胞融合达 60% ~ 70% 时更换培养液,实验组和对照组采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体试剂盒转染 pcDNA3.1-BCLAF1 及 pcDNA3.1-NC 对照质粒序列,转染后 24 h 进行后续实验。

1.3.1.2 细胞侵袭实验 Matrigel 胶 4 °C 过夜融化成液态后与 DMEM 培养基按 1 : 9 比例稀释,均匀涂布于 Transwell 小室滤膜的上表面,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内孵育 2 h。每室加入 50 μl DMEM 培养基孵育 1 h,吸弃培养液。取转染后培养 24 h 的细胞,胰酶消化并收集细胞,DMEM 培养液重悬细胞,计数调整细胞密度。将单细胞重悬液各取 200 μl 加入上室,下室中加入 600 μl 含 30% FBS 的 DMEM 培养液,于细胞培养箱内培养 72 h。取出小室,吸去上室的培养液,PBS 缓冲液洗 3 次,用消毒湿棉签轻轻擦净上室未侵袭细胞及 Matrigel 胶,95% 酒精固定 30 min,结晶紫染色 10 min,自来水冲洗 3 次以上,晾干。20 倍光学显微镜下观察,计数每个视野的侵袭细胞数,计算平均值。

1.3.1.3 CCK-8 法检测 Panc-1 转染细胞的增殖能力 将 PANC-1 细胞稀释至 1×10^7 个/ml,接种至 96 孔板 200 μl/孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内贴壁 3 h。将细胞分为 3 组:转染 BCLAF1 质粒组、nc 阴性对照组、con 未转染组,每组均设 6 个复孔。每 24 h 取出 96 孔板,于显微镜下观察,并加入 CCK-8 试剂,孵育 1 h;用酶标仪检测 A450 值,连续测定 6 d 并记录结果。

1.3.2 BCLAF1 组织水平检测

1.3.2.1 qRT-PCR 称取 PDAC 组织及癌旁正常组织各 50 mg,剪碎组织添加液氮研磨,将研磨后的组织中加入 1 ml TRIzol 后离心以去除杂物碎片组织。采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测,计算总 RNA 纯度并定量,电泳检测总 RNA 的完整性。以 1 μl 总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒说明书提供的流程进行反转录制备 cDNA,并以此为模板,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书配制 PCR 体系进行反应。反应条件:95 °C 变性 5 min;95 °C、5 s、60 °C、30 s,共 40 个循环。BCLAF1 引物序列上游为:5'-AAGGTCTGGTCTGGTTCTG-3',下游为:5'-GAGCATTCTGTGGTCCGATT-3',产物大小

122 bp;内参照为 GAPDH, F: 5'-GGGAAATCGT-GCGTGACATTAAGG-3', R: 5'-CAGGAAGGAAGGCT-GGAAGAGTG-3',产物大小 180 bp。

1.3.2.2 Western blot 取约 50 mg 组织标本,应用裂解液提取组织总蛋白。离心后收集上清液,加入上样缓冲液(按 1 份蛋白样品 : 5 份缓冲液比例进行),100 °C 加热 10 min。冷却后加样孔内,100 V 电泳约 1 h。取出凝胶,4 °C、40 V 电转印 2 h 至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h。加入 1 : 1 000 的稀释一抗体孵育过夜。加入 1 : 5 000 稀释的二抗,孵育 2 h;加入 ECL 曝光显影约 5 min,观察、成像。软件分析平均光密度值。

1.3.2.3 IHC 石蜡包埋 4 μm 连续切片后置于载玻片,在 pH 6 的环境中微波处理消除内源性过氧化物酶活性,再向切片上滴加 3% H₂O₂ 和山羊血清等待 20 min 以封闭非特异性蛋白并,然后滴加一抗稀释液(1 : 200) 4 °C 过夜,复温后加入二抗,显微镜下滴加 DAB 液显色,观察。最后苏木精复染,酒精脱水、甲醛透明封片。BCLAF1 主要定位于 PDAC 细胞的细胞核中,评估标准采用半定量。随机选取 5 个高倍镜视野下进行阳性百分比评分,无细胞着色计 0 分、1% ~ 10% 细胞着色计 1 分、11% ~ 50% 细胞着色计 2 分、> 50% 细胞着色计 3 分。根据染色程度棕黄色、黄色、淡黄色、未着色分别计为 3、2、1、0 分,所有切片由两名病理科医师分析,每张切片的最终得分为两项结果的乘积,≥ 4 分的为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用 student-t 检验,免疫组化中的 BCLAF1 阳性表达差异以及临床病理资料关系比较选用 χ^2 检验。生存率的计算使用 Kaplan-Meier 法,作 Log-Rank 检验并绘制生存曲线图,多因素分析选用 COX 比例风险模型 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Transwell 侵袭实验结果 Transwell 实验结果显示: Panc-1 细胞中 BCLAF1 的过表达明显增强了 PDAC 细胞的侵袭迁移能力。光学显微镜下观察未转染组细胞数(96.15 ± 9.91),空白质粒转染组细胞数(98.40 ± 5.94),BCLAF1-转染质粒组细胞数(159.80 ± 15.3)。见图 1。

2.2 Panc-1 转染 pcDNA3.1-BCLAF1 质粒的细胞增殖实验结果 由图 2 可知:此为 PANC-1 转染 pcDNA3.1-BCLAF1 质粒的细胞增殖实验,转染

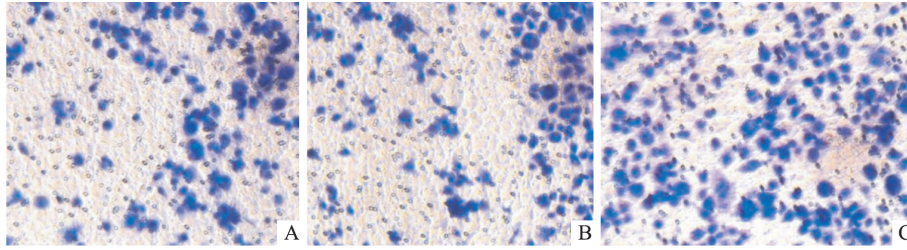


图1 Transwell 侵袭实验

A: PANC-1 细胞的未转染组; B: 空白质粒转染组; C: BCLAF1 转染质粒组

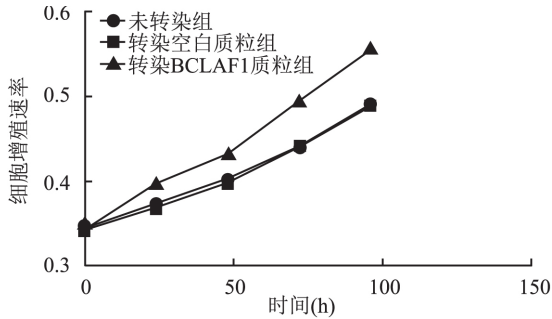


图2 CCK-8 细胞增殖实验

pcDNA3.1-BCLAF1 质粒的 PANC-1 细胞增殖曲线增高。

2.3 qRT-PCR 检测结果 检测 10 例配对的 PDAC 组织及癌旁组织中 BCLAF1 的 mRNA 表达, BCLAF1 mRNA 的平均表达量范围分别为 (0.41 ~ 1.94)、(0.09 ~ 1.00)。PDAC 组 BCLAF1 mRNA 的表达水平明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($t = 3.37, P = 0.0034$)。见图 3。

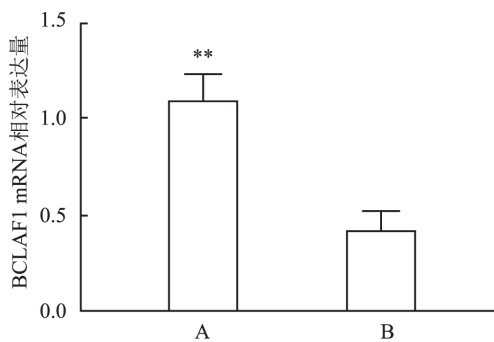


图3 PDAC 组、癌旁正常胰腺组中 BCLAF1 的 mRNA 表达水平
A: PDAC 组; B: 癌旁正常胰腺组; 与癌旁正常胰腺组比较: ** $P < 0.01$

2.4 Western blot 检测 BCLAF1 的表达情况 分别检测 PDAC 及癌旁组织各 10 例, 有 8 例 (80%) 癌组 BCLAF1 的表达明显高于癌旁组, 癌组 BCLAF1 平均灰度值为 (1.451 ± 0.068), 显著高于癌旁组 (0.757 ± 0.048), 差异有统计学意义 ($t = 8.323, P$

< 0.001)。见图 4。

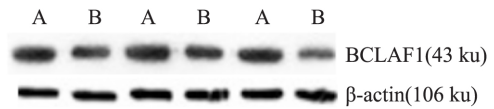


图4 PDAC 组、癌旁正常组中 BCLAF1 的表达水平
A: PDAC 组织; B: 癌旁正常胰腺组织

2.5 PDAC 以及癌旁组织中 BCLAF1 的表达 检测 67 例 PDAC 及相配对的癌旁组织, 结果显示 BCLAF1 主要表达于 PDAC 导管细胞的细胞核中, 正常胰腺组织中的阳性表达比例明显低于 BCLAF1 在 PDAC 中的阳性表达, PDAC 组 BCLAF1 阳性表达的有 47 例 (78.33%), 高于癌旁组织组 (35.82%), 差异统计学意义 ($\chi^2 = 27.610, P < 0.001$)。见表 1、图 5。

表1 BCLAF1 蛋白在 PDAC 组织和癌旁正常组织中的表达 (n)

组别	n	BCLAF1		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
PDAC	67	13	54	27.610	<0.001
癌旁组织	67	43	24		

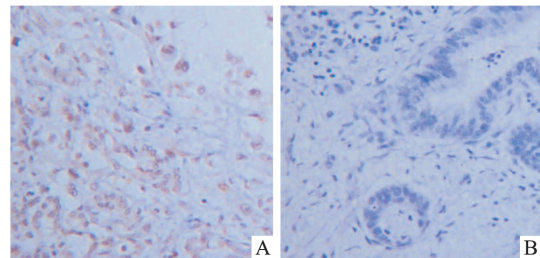


图5 BCLAF1 在 PDAC 组织和癌旁正常胰腺组织中的表达 × 400
A: PDAC 组织; B: 癌旁正常胰腺组织

2.6 BCLAF1 与 PDAC 患者临床病理资料间的关系 IHC 显示: BCLAF1 的表达与 PDAC 的淋巴结转移及 TNM 分期显著相关 ($P < 0.001$)。见表 2。

表2 BCLAF1 表达与 PDAC 临床病理特征的相关性(n)

变量	n	BCLAF1		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
年龄(岁)					
<60	21	5	16	0.380	0.538
≥60	46	8	38		
性别					
男	34	9	25	2.205	0.138
女	33	4	29		
部位					
头部	47	10	37	0.353	0.552
体尾部	20	3	17		
肿瘤直径(mm)					
<20	18	6	12	3.054	0.081
≥20	49	7	42		
分化程度					
中低	55	11	44	0.07	0.791
高	12	2	10		
神经侵犯					
阴性	32	7	25	0.239	0.625
阳性	35	6	29		
淋巴结转移					
阴性	22	11	11	19.609	<0.001
阳性	45	2	43		
TNM 分期					
I	22	11	11	19.609	<0.001
II	45	2	43		

2.7 BCLAF1 表达与患者预后关系 Kaplan-Meier 生存分析显示,随着时间推移生存率明显下降, BCLAF1 高表达的下降趋势比 BCLAF1 低表达更为显著。BCLAF1 高表达的总生存期(overall survival , OS) 和无病生存期(disease-free survival ,DFS) 都明显缩短,经 Log-Rank 检验显示: BCLAF1 高表达者与低表达者生存率相比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 6。单因素和多因素分析结果显示: BCLAF1 高低、淋巴结转移以及 TMN 分期为影响

PDAC 患者生存时间的独立因素。见表 3、4。

表3 PDAC 患者生存时间的单因素分析

变量	n	OS			DFS		
		中位生存期(月)	χ^2 值	P 值	中位生存期(月)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)							
<60	21	18.710	0.510	0.475	10.914	0.124	0.724
≥60	46	16.313			9.912		
性别							
男	34	19.161	3.058	0.080	12.159	3.349	0.067
女	33	15.385			8.516		
肿瘤部位							
头部	47	17.462	0.124	0.725	10.708	0.023	0.879
体尾部	20	16.780			9.575		
肿瘤直径(mm)							
<20	18	18.689	1.758	0.185	12.583	3.332	0.068
≥20	49	16.630			9.585		
分化程度							
中低	55	18.321	1.366	0.243	11.271	0.964	0.326
高	12	16.929			10.058		
神经侵犯							
阴性	32	18.143	1.152	0.283	11.225	1.604	0.205
阳性	35	15.953			9.146		
淋巴结转移							
阴性	22	22.750	18.274	<0.001	16.824	24.076	<0.001
阳性	45	14.132			6.839		
TNM 分期							
I	22	22.750	18.274	<0.001	16.824	24.076	<0.001
II	45	14.132			6.839		
BCLAF1							
低表达	20	26.238	17.419	<0.001	21.077	24.033	<0.001
高表达	47	15.040			7.440		

3 讨论

PDAC 是恶性程度最高的消化道肿瘤之一。近几年发病率迅速上升,因其早期症状不明显、诊断手段缺乏、肿瘤标志物特异性差,大部分患者就诊时已

表4 PDAC 患者生存时间的多因素分析

变量	OS			DFS		
	HR 值	95% CI	P 值	HR 值	95% CI	P 值
BCLAF1 表达(高/低)	3.552	1.100 ~ 11.474	0.034	5.868	1.675 ~ 20.536	0.006
淋巴结转移(阴/阳)	2.576	1.028 ~ 6.448	0.043	2.632	1.074 ~ 6.449	0.034
TMN 分期(I / II)	2.576	1.028 ~ 6.448	0.043	2.632	1.074 ~ 6.449	0.034
神经侵犯(阳性/阴性)	1.050	0.531 ~ 2.077	0.888	1.099	0.550 ~ 2.195	0.789
分化程度(中低/高)	0.491	0.226 ~ 1.0688	0.073	2.086	0.914 ~ 4.761	0.081
年龄(<60 岁 / ≥60 岁)	0.202	0.791 ~ 3.402	0.202	1.091	0.549 ~ 2.168	0.804
性别(男/女)	1.685	0.865 ~ 3.280	0.125	0.605	0.326 ~ 1.124	0.112
肿瘤部位(头部/体尾部)	0.683	0.351 ~ 1.328	0.261	1.597	0.848 ~ 3.007	0.147
肿瘤直径(<20 mm / ≥20 mm)	0.754	0.383 ~ 1.485	0.414	0.626	0.304 ~ 1.289	0.204

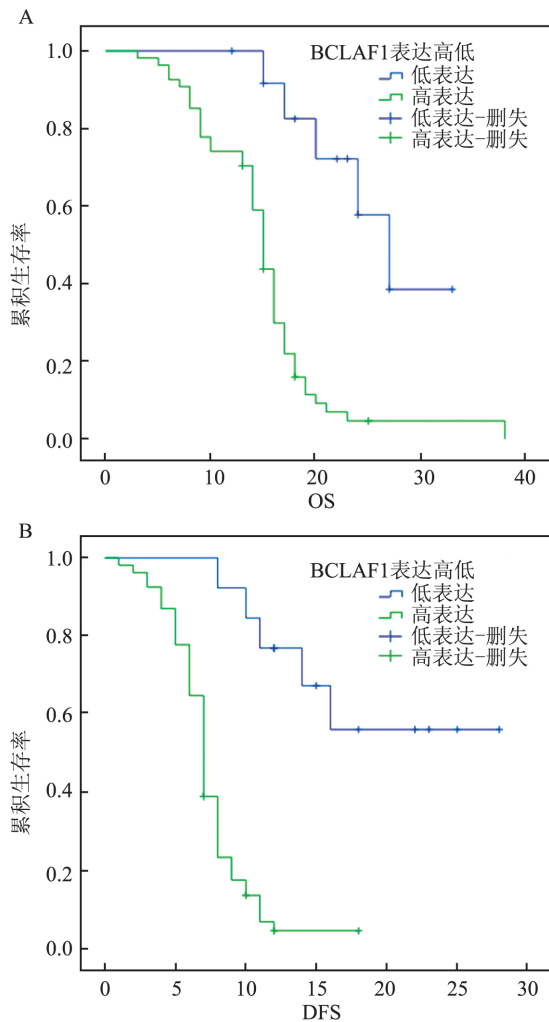


图6 PDAC中BCLAF1低表达、高表达患者生存曲线
A: OS ; B: DFS

出现局部侵袭甚至远处转移，失去了最佳的治疗时机，晚期对放化疗的敏感性较低。因此，探究调控PDAC发生发展以及侵袭转移的分子靶点，寻找有效的用于早期诊断及治疗的生物标志物是亟待解决的关键问题。

BCLAF1是一种富含精氨酸-丝氨酸的RS结构域的蛋白质^[2]，该蛋白基因位于染色体6q22-23的区域，该区域基因的缺失可能与癌症的发生有关。近年来由于对BCLAF1研究热度和深度的增加，文献报道细胞表面BCLAF1通过调控特定基因的转录和转录后加工参与调节细胞凋亡、DNA损伤应答、分化等过程，在个体发育、癌症及其他疾病发生中发挥重要作用。Zhou et al^[3]研究结肠癌组织发现BCLAF1可变剪接的转录物产生两种蛋白：全长型(L型)和截短型(T型)，不同蛋白亚型在结肠癌发生发展中的作用也不同，在结肠癌细胞系中普遍存

在L型。过表达BCLAF1-L可以在一定程度提高结肠癌细胞的克隆能力，进一步确证了其在结肠癌细胞中的促癌功能。Chen et al^[4]对72例II~II期食管鳞状细胞癌的患者实施同步化放疗，由于食管鳞状细胞癌的放化疗容易导致局部肿瘤复发。随后24个月内，有49例确诊为局部复发，PCR显示患者组织中BCLAF1上调，上调超过两倍的患者占84.2%，其多因素分析BCLAF1的上调与早期局部复发独立相关。本研究多因素分析结果显示BCLAF1高低、淋巴结转移以及TMN分期均为影响PDAC患者生存时间的独立因素，表明BCLAF1与PDAC预后密切相关。Shen et al^[5]通过GEO数据库分析发现BCLAF1与组蛋白甲基转移酶SMYD3相关。SMYD3的表达增加膀胱癌细胞BCLAF1水平，而SMYD3的敲低抑制癌细胞中BCLAF1的表达。体内测定显示77%膀胱癌组织中BCLAF1的表达水平比邻近正常对照组显著上调，BCLAF1是一种细胞自噬诱导因子，敲低膀胱癌细胞中BCLAF1可抑制SMYD3激活的细胞自噬，也抑制SMYD3诱导的细胞增殖和侵袭，对维持细胞内稳态及阻止恶性肿瘤进展有重要意义。骨髓瘤的研究^[6]表明，BCLAF1和caspase-10可能参与骨髓瘤细胞的共同调节途径。caspase-10敲低后BCLAF1诱导蛋白在数量上大于BCLAF1 mRNA，表明caspase-10可能在转录后控制BCLAF1。抑制caspase-10后，BCLAF1与Bcl-2结合增加，Bcl-2通过释放beclin-1引发骨髓瘤细胞自噬，表明BCLAF1可取代Beclin-1与Bcl-2结合，释放出更多的Beclin-1促进自噬。BCLAF1与各种肿瘤关系密切相关，其过表达可促进细胞增殖克隆，发挥促癌作用。但是国内外关于BCLAF1在PDAC细胞的定位以及病理生理功能报道不多。本研究结果显示BCLAF1表达显著高于癌旁组织。免疫组化结果显示BCLAF1在PDAC细胞核中强阳性表达，进一步分析其与患者临床资料的数据，发现与PDAC分化程度、TNM分期、淋巴转移、等病理相关因素有密切关系，与以上研究结果均发现BCLAF1蛋白在多数肿瘤的发生发展中起到正性上调作用。IHC切片检测有助于评估病情进展，有潜力成为早期PDAC筛查的肿瘤标志物。转染pcDNA3.1-BCLAF1质粒Panc-1细胞增殖速度，侵袭能力得到提高。这些都是与恶性肿瘤密切相关的常见表型，表明BCLAF1作为转录调控因子在PDAC中发挥着促癌作用。

BCLAF1与化疗药物对肿瘤的影响密切相关。

直肠癌的研究^[7]显示 BCLAF1 在直肠癌细胞中定位以核分布为主,少量在胞质,但正常的直肠黏膜中 BCLAF1 只定位于细胞核;同样本研究免疫组化结果显示 BCLAF1 在 PDAC 细胞核中强阳性,癌旁正常组织细胞核弱表达。接受新辅助疗法后直肠癌组织中细胞核和胞质中的 BCLAF1 表达显著上调,生存率提高,而 BCLAF1 表达阴性和弱表达与预后不良独立相关。本研究 Kaplan-Meier 生存分析发现 BCLAF1 高表达 OS 和 DFS 都明显缩短。这可能由于肿瘤细胞中 BCLAF1 低表达抑制细胞凋亡,同时也抑制细胞自噬所引起。Dell'Aversana et al^[8] 研究表明急性髓性白血病细胞 U937 中过表达 BCLAF1 则会加快细胞生长速度,并降低细胞对抗癌药组蛋白去乙酰化酶抑制剂(SAHA)的敏感。敲低 BCLAF1 增加细胞对 SAHA 的敏感,抑制细胞增殖。用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS275 处理增强 miR-194-5p 的表达后,导致 U937 细胞核内 BCLAF1 出核且诱导细胞分化。这表明不仅 BCLAF1 表达水平会影响药物对肿瘤的治疗效果,其细胞亚定位也影响着药物的疗效。Shao et al^[9] 研究用化疗药阿霉素处理乳腺癌及结肠癌细胞使癌细胞衰老,发现 BCLAF1 通过 NF- κ B 途径上调,放大衰老信号,导致肿瘤生长抑制。其在非药物处理组中敲低的 BCLAF1 对癌细胞生长同样有明显抑制,表明了 BCLAF1 对肿瘤的生长起到了一定的促进作用,但其机制与上调 BCLAF1 促进化疗药物对肿瘤的抑制作用不同。

本研究前期临床样本量规模较小,仅对 PDAC 组织中 BCLAF1 在 PDAC 中的作用做了初步探讨,结果表明 BCLAF1 异常与 PDAC 发展及预后密切相

关,可能参与了癌细胞的侵袭和转移,促进细胞增殖克隆,有利于肿瘤形成。后续将进一步扩大样本量研究,同时进行动物实验以及药物实验验证。

参考文献

- [1] Sarras H, Alizadeh Azami S. In search of a function for BCLAF1 [J]. *Sci World J* 2010, 10: 1450-61.
- [2] Vohhodina J, Barros E M, Savage A L, et al. The RNA processing factors THRAP3 and BCLAF1 promote the DNA damage response through selective mRNA splicing and nuclear export [J]. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(22): 12816-33.
- [3] Zhou X, Li X, Cheng Y, et al. BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells [J]. *Nat Commun* 2014, 5: 4581-91.
- [4] Chen Y, Wang Y, Song H, et al. Expression profile of apoptosis-related genes potentially explains early recurrence after definitive chemoradiation in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4339-46.
- [5] Shen B, Tan M, Mu X, et al. Upregulated SMYD3 promotes bladder cancer progression by targeting BCLAF1 and activating autophagy [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7371-81.
- [6] Lamy L, Ngo V N, Emre N C, et al. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma [J]. *Cancer Cell* 2013, 23(4): 435-49.
- [7] Brown G T, Cash B, Alnabulsi A, et al. The expression and prognostic significance of bcl-2-associated transcription factor 1 in rectal cancer following neoadjuvant therapy [J]. *Histopathology* 2016, 68(4): 556-66.
- [8] Dell'Aversana C, Giorgio C, D'Amato L, et al. miR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis [J]. *Leukemia*, 2017, 31(11): 2315-25.
- [9] Shao A W, Sun H, Geng Y, et al. Bclaf1 is an important NF- κ B signaling transducer and C/EBP β regulator in DNA damage-induced senescence [J]. *Cell Death Differ* 2016, 23(5): 865-75.

Expression of BCLAF1 protein in pancreatic ductal adenocarcinoma

He Junfei, Chen Jiong, Hu Pibo, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression level and clinical significance of Bcl-2 associated transcription factor 1 (BCLAF1) protein in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of BCLAF1 protein in 67 pairs of PDAC and paraffin sections of paracancerous tissues. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression levels of BCLAF1 protein in 8 matched PDACs and adjacent tissues. After overexpression of BCLAF1 in panc-1 cells of pancreatic cancer, the invasion and migration ability of pancreatic cancer cells were observed by Transwell invasion assay. The proliferation of pancreatic cancer cells in each group was detected by CCK-8 method. **Results** The results of immunohistochemistry showed that BCLAF1 was mainly expressed in the nucleus of PDAC catheter cells. 66 cases (80.59%) were positive for BCLAF1 in PDAC group, which was higher than that in adjacent tissues (35.82%).

非小细胞肺癌组织及细胞中 IL-35 的表达

张 玉¹ 张城城^{1,2} 董利菊¹ 沙 泉¹

摘要 目的 探讨白细胞介素 35(IL-35)在非小细胞肺癌组织和细胞中的表达及其对肺癌细胞生物学功能的影响。方法 免疫组化法检测 IL-35 在 74 例非小细胞肺癌组织中的表达,分析 IL-35 表达与非小细胞肺癌临床病理特征的相关性;RT-PCR 法检测 IL-35 在不同肺癌细胞中的表达水平;CCK-8 法、划痕试验和 Transwell 实验分别检测 IL-35 对细胞增殖和迁移侵袭能力的影响。结果 免疫组化和 RT-PCR 检测结果表明,IL-35 在非小细胞肺癌组织的表达水平明显上调($P < 0.05$),在肺癌细胞系中均有不同程度表达。IL-35 表达与肿瘤分期、淋巴结转移成正相关($P < 0.05$),与患者性别、年龄、组织类型、分化程度及远端转移等均无相关性($P > 0.05$)。外源性 IL-35 的刺激作用促进肺癌细胞的增殖和迁移侵袭。结论 IL-35 在非小细胞肺癌组织和细胞中高表达,并促进肺癌细胞的增殖与迁移侵袭,可以作为临床肺癌基因治疗的靶向指标。

关键词 非小细胞肺癌;白细胞介素-35;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)07-1082-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.016

随着恶性肿瘤发病率与死亡率的逐年增加,人类健康受到了严重威胁。肺癌已经成为男性发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。虽然肺癌的研究近年来已取得一定进展,但是非小细胞肺癌(non-small lung cancer, NSCLC)发现时多已处于中晚期,5 年生存率并未显著提高^[2]。白细胞介素 35(interleukin-35, IL-35)是新发现的白细胞介素 12(interleukin-12, IL-12)家族成员,由 EB 病毒诱导基因 3(epstein-barr virus-induced gene 3, EBV3)和 P35 组成的异源二聚体,主要在免疫细胞中表达^[3]。研究^[4-6]显示,IL-35 在肝癌、胰腺癌、结直肠癌等多种肿瘤组织中高表达,参与肿瘤的发生发展与转移。但 IL-35 在 NSCLC 中的表达情况知之甚少。该研究拟通过分析 IL-35 在 NSCLC 中的表达和与患者预后的关系,以及对肺癌细胞生物学功能的影响,阐明 IL-35 在 NSCLC 发生、发展中的可能作用,为肺癌的靶向治疗提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院普胸外科 2015 年 1~12 月的 74 例 NSCLC 患者石蜡包埋的肺癌组织,被研究者临床资料完整,手术前

Statistical significance was significant ($\chi^2 = 27.610, P < 0.001$). Western blot results showed that the content of BCLAF1 protein in PDAC was higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Overexpression of BCLAF1 in pancreatic cancer cells significantly increases the invasion and migration ability of pancreatic cells, and at the same time promotes the proliferation of cancer cells. The expression level of BCLAF1 in pancreatic ductal adenocarcinoma was significantly correlated with clinical tumor characteristics such as tumor size, TNM stage, lymph node metastasis, clinical stage and prognosis. Kaplan-Meier survival analysis showed that the high expression survival time of BCLAF1 was significantly lower than that of BCLAF1 ($\chi^2 = 17.419, P < 0.01$). Multivariate analysis of COX regression showed that BCLAF1 and TNM staging were independent factors influencing the prognosis of pancreatic cancer. **Conclusion** The expression level of BCLAF1 protein is significantly increased in PDAC, and the proliferation rate of PANC-1 cells transfected with pcDNA3.1-BCLAF1 plasmid is improved. Its detection contributes to the early diagnosis and prognosis assessment of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Key words pancreatic ductal adenocarcinoma; BCLAF1; immunohistochemistry; Western blot; CCK-8