

[文章编号] 1000-2200(2018)05-0614-04

· 临床医学 ·

结直肠癌组织中 BRMS1 mRNA 的表达及意义

年 峰¹,袁 圆²,王海涛³,芦华丽⁴

[摘要]目的:探讨乳腺癌转移抑制基因 1(BRMS1)mRNA 在结直肠癌组织中的表达及临床意义。方法:采用 RT-PCR 法分别检测 40 例结直肠癌组织和 20 例正常结直肠组织中 BRMS1 mRNA 的表达,并分析其与各临床病理特征之间的关系。结果:BRMS1 mRNA 在结直肠癌组织中低表达 0.420 ± 0.133 ,在正常结直肠组织中高表达 0.836 ± 0.102 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结直肠癌组织中 BRMS1 mRNA 的表达水平与病人年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤分化程度及浸润深度无关($P > 0.05$),而与淋巴结转移呈负相关关系($P < 0.01$)。结论:BRMS1 mRNA 在结直肠癌组织中呈低表达,并有可能成为反映结直肠癌转移潜能的参考指标之一。

[关键词] 结直肠肿瘤;转移抑制基因;BRMS1;逆转录聚合酶链式反应

[中图分类号] R 735.3

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.015

Expression of BRMS1 mRNA in colorectal carcinoma and its clinical significance

NIAN Feng¹,YUAN Yuan²,WANG Hai-tao³,LU Hua-li⁴

(1. Department of Oncology,3. Department of General Surgery,4. Department of Pathology,Bengbu Central Hospital, Bengbu Anhui 233000;2. Department of Anatomy,Bengbu Medical College,Bengbu Anhui 233030,China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) mRNA in colorectal carcinoma, and its clinical significance. **Methods:** The expression of BRMS1 mRNA in 40 colorectal carcinoma tissue specimens and 20 normal colorectum tissue specimens were detected using RT-PCR method, and the correlation of which with clinicopathologic features was analyzed. **Results:** The expression level of BRMS1 mRNA in colorectal carcinoma tissue (0.420 ± 0.133) was lower than that in normal colorectum tissue (0.836 ± 0.102) ($P < 0.01$). The expression level of BRMS1 mRNA in colorectal carcinoma was not associated with age, sex, degree of differentiation and infiltrative depth ($P > 0.05$), and was associated with lymph node metastasis ($P < 0.01$). **Conclusions:** The expression level of BRMS1 mRNA in colorectal carcinoma tissue is low, which may be related to the lymph node metastasis of colorectal carcinoma.

[Key words] colorectal neoplasms; metastasis suppressor gene; breast cancer metastasis suppressor 1; reverse transcription polymerase chain reaction

乳腺癌转移抑制基因 1 (breast cancer metastasis suppressor 1, BRMS1) 是 SERAJ 等^[1]于 2000 年首先在人乳腺癌细胞中发现的一种肿瘤转移抑制基因,定位于人染色体的 11q13.1 ~ q13.2,其 cDNA 长度约为 1 485 kb,含有一个由 9 个内含子和 10 个外显子构成的长约 741 kb 的开放阅读框架,它所编码的蛋白质包含 264 个氨基酸。随着对 BRMS1 研究的不断深入,人们发现该基因并不影响肿瘤本身的发生和生长,但却具有降低肿瘤细胞转移潜能的生物学作用。除乳腺癌外,在诸如黑素瘤、喉癌、膀胱癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、子宫内膜癌等恶性肿瘤中均发现了 BRMS1 的异常表达^[2-7],近年来又有研究证

明 BRMS1 对口腔鳞癌、食管鳞癌、肝癌、胆囊癌、胃癌等消化系统肿瘤的转移同样可以起到抑制作用^[8-12]。但目前尚少见有关 BRMS1 和结直肠癌相关性的报道,本研究采用 RT-PCR 法检测结直肠癌组织及正常结直肠组织中 BRMS1 mRNA 的表达,并分析其与各临床病理特征之间的关系。现作报道。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集蚌埠市中心医院 2015 - 2016 年外科手术切除并经病理证实的结直肠癌新鲜标本 40 例,另取距肿瘤边缘 5 cm 以上正常结直肠组织 20 例(术后病理未发现癌细胞浸润)作为对照。所有病例术前均未行放疗,并且临床资料完整。其中男 21 例,女 19 例;年龄 41 ~ 81 岁;浸润至黏膜下层或肌层者 18 例、浸润至外膜者 22 例;伴淋巴结转移者 18 例、不伴淋巴结转移者 22 例。

1.2 实验方法 RT-PCR 法检测 BRMS1 mRNA。

[收稿日期] 2017-09-13 [修回日期] 2018-03-23

[作者单位] 安徽省蚌埠市中心医院 1. 肿瘤内科,3. 肿瘤外科,4. 病理科,233000;2. 蚌埠医学院 解剖学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 年 峰(1974 -),男,硕士,主治医师。

1.2.1 标本采集与处理 组织均为离体后 30 min 内取材,无菌条件下使用刀片切取直径 0.2 ~ 0.5 cm 的肿瘤组织 2 块,更换器具后以相同方法切取正常结肠组织,随后迅速将组织分别放入标有记号的经 DEPC 处理过的 EP 管中,旋紧盖子后将 EP 管沉入液氮,并转入 -80 °C 冰箱保存待测。

1.2.2 组织总 RNA 提取 分别称取约 0.1 g 结肠直肠癌组织和正常结肠组织放入不同研钵中,加入液氮研磨,组织磨碎后加 1 mL Trizol 继续研磨成粉状,移至 DEPC 水处理过的 1.5 mL 离心管中,其余步骤严格按照 Trizol RNA 提取试剂说明书进行,所得 RNA 溶解于 30 μ L 的 DEPC 处理水中。

1.2.3 总 RNA 的鉴定 琼脂糖凝胶显示 5S、18S 及 28S 三条清晰条带,再用紫外分光光度仪测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A)值,取 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间者用于逆转录反应。

1.2.4 RT-PCR 扩增 逆转录总体积共 20 μ L,严格按照试剂盒说明书合成 cDNA。并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。根据电脑软件 Premier5.0 版设计引物,并由上海博尚生物工程公司合成,BRMS1 上游引物:5'-TGA TGA GGA CTA TGA GCG ACG-3',下游引物:5'-ATA GAG CAG CAG CTT CTC GC-3',扩增片断为 316 bp。以 GAP2DH 作为内参,上游引物:5'-TCC TCC TGA GCG AAG TAC TCT-3',下游引物:5'-GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG A-3',扩增片断 152 bp。PCR 扩增反应步骤如下:反应体积为 50 μ L,94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s;经 30 个循环周期后,72 °C 延伸 8 min,4 °C 贮存备用。取 10 μ L PCR 产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,于紫外透射仪下观察结果,并在凝胶成像仪上拍照。以 DNA MixMarker(上海生工生物工程股份有限公司)为标准,在约 316 bp 位置出现条带为 BRMS1 表达阳性,GAPDH 在 152 bp 位置上出现条带为表达阳性。最后对 BRMS1 扩增产物进行扫描和半定量分析,使用天能 Gis2000 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)检测图像灰度值。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 BRMS1 mRNA 的表达结果 BRMS1 mRNA 在结肠直肠癌组织中低表达 0.420 ± 0.133 ,在正常结肠组织中高表达 0.836 ± 0.102 ,两者差异有统计学意义($P < 0.01$) (见表 1)。RT-PCR 产物电泳结果

见图 1。

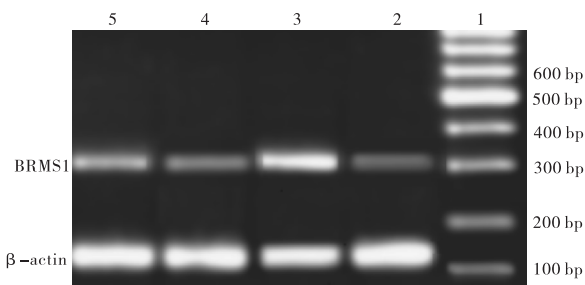


图1 β -actin及BRMS1在结肠直肠癌组织和癌旁正常组织的电泳结果

2.2 BRMS1 mRNA 表达与结肠直肠癌各临床病理特征的关系 BRMS1 mRNA 在结肠直肠癌组织中的表达与病人年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤分化程度及浸润深度无关($P > 0.05$),但与肿瘤的淋巴结转移呈负相关关系($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 结肠直肠癌组织中 BRMS1 mRNA 的表达与各临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	BRMS1 mRNA 的表达	<i>t</i>	<i>P</i>
组织				
正常结肠组织	20	0.836 ± 0.102	11.10	<0.01
结肠癌组织	40	0.420 ± 0.133		
性别				
男	21	0.453 ± 0.119	1.62	>0.05
女	19	0.388 ± 0.134		
年龄				
≤67 岁	18	0.442 ± 0.120	0.92	>0.05
>67 岁	22	0.404 ± 0.137		
浸润深度				
T ₁ + T ₂	18	0.427 ± 0.125	0.24	>0.05
T ₃ + T ₄	22	0.417 ± 0.136		
淋巴结转移				
N0	22	0.489 ± 0.112	4.60	<0.01
N+	18	0.337 ± 0.097		
肿瘤部位				
直肠	24	0.401 ± 0.122	1.20	>0.05
结肠	16	0.451 ± 0.138		

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭和转移已成为恶性肿瘤治疗失败的最主要原因,而肿瘤细胞的转移过程是在多种基因的共同调控下完成的,可分为肿瘤转移促进基因和肿瘤转移抑制基因。其中肿瘤转移抑制基因的作用尤为重要,它可以有效地遏制肿瘤转移从而影响肿瘤生物学进程。BRMS1 作为新发现的一个肿瘤转移抑制基因,已逐渐成为肿瘤领域的研究热点,

目前对它的研究已从蛋白水平逐渐转至 mRNA 和 DNA 水平。

BRMS1 是首先作为乳腺癌转移抑制因子而被发现的,显然它对乳腺癌的转移抑制作用是明确的。但随着研究的深入和扩展,人们发现 BRMS1 基因在其他恶性肿瘤的转移过程中也同样可以发挥抑制作用,具体表现为随肿瘤细胞转移能力的增加,其表达呈现下降或缺失。SHEVDE 等^[13]将转染 BRMS1 的人黑素瘤细胞接种裸鼠后发现,转染虽然对移植瘤的生长并无影响,但却使其转移减少。GUO 等^[13]使用免疫组织化学法检测 BRMS1 蛋白在声门上型喉癌组织和癌旁正常喉黏膜组织中的表达,结果发现在喉癌组织中,BRMS1 蛋白的表达下降,BRMS1 的表达与喉癌的临床分期、病理分化以及颈部淋巴结转移有关。SMITH 等^[14]研究显示 BRMS1 mRNA 和蛋白水平在非小细胞肺癌中的表达与邻近正常肺组织相比均显著降低,并证明了 BRMS1 mRNA 可以抑制非小细胞肺癌的肺内和肝脏转移,但却不影响原发肿瘤生长。

目前有关 BRMS1 抑制肿瘤转移的具体机制虽已有部分发现,但仍不完全清楚,BRMS1 的转移抑制作用可能与恢复间隙连接通道的细胞间连接通讯有关。KAPOOR 等^[15]研究发现,导入 BRMS1 基因后,乳腺癌细胞恢复了同型缝隙连接,缝隙连接蛋白 Cx43 的表达上调,同时 Cx32 的表达下调,增强了癌细胞与正常组织细胞异质性缝隙连接的信号转导,有效抑制癌细胞脱离原发灶而发生转移。DEWALD 等^[16]发现 BRMS1 可以通过降低磷酸肌醇信号转导而抑制癌细胞转移。另外, METGE 等^[17]分析了 BRMS1 启动子区域的甲基化状态,发现了一个超甲基化的 CpG 岛,同时对 20 例临床病例样本进行检测,发现 45% 的原发癌及 60% 的淋巴结转移样本具有超甲基化的 BRMS1 启动子,提示我们 BRMS1 表达的缺失可能与其启动子区域的异常甲基化有关。已有的研究表明,BRMS1 基因抑制肿瘤转移的机制具有多样性、复杂性和非典型性,还需进一步的探索和证实。由于转移等恶性表型的获得是多基因、多步骤、多通路联合作用的遗传学结果,所以有必要在不同组织、不同部位肿瘤中探测该基因的表达差异,必要时也可以将 BRMS1 基因与其他基因进行同步检测和分析,从而能更加准确地反映该基因与恶性肿瘤转移等生物学行为之间的关系。

本研究采用 RT-PCR 法检测 40 例结直肠癌组织及 20 例正常结直肠组织中 BRMS1 mRNA 的表

达,结果显示,BRMS1 mRNA 在结直肠癌组织中的表达水平显著低于正常结直肠组织($P < 0.01$),而且与淋巴结转移呈负相关,表现为随结直肠癌淋巴结转移的发生,BRMS1 mRNA 的表达出现下调或缺失($P < 0.01$),这提示 BRMS1 mRNA 表达下降能够促进结直肠癌发生淋巴结转移,有可能成为临床预测结直肠癌是否已经发生转移的参考指标之一。

[参 考 文 献]

- [1] SERAJ MJ, SAMANT RS, VERDERAME MF, *et al.* Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11):2764.
- [2] LI J, CHENG Y, TAI D, *et al.* Prognostic significance of BRMS1 expression in human melanoma and its role in tumor angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2010, 30(8):896.
- [3] 郭星, 李晓瑜, 李福才, 等. 乳腺癌转移抑制基因和 CD44v6 在声门上型喉癌中的表达及临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 23(6):249.
- [4] SERAJ MJ, HARDING MA, GILDEA JJ, *et al.* The relationship of BRMS1 and RhoGD12 gene expression to metastatic in lineage related human bladder cancer cell lines [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000, 18(6):519.
- [5] SHENG XJ, ZHOU YQ, SONG QY, *et al.* Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 promotes ovarian cancer cell metastasis by increasing chemokine receptor 4 expression [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4):1011.
- [6] NAGJI AS, LIU Y, STELOW EB, *et al.* BRMS1 transcriptional repression correlates with CpG island methylation and advanced pathological stage in non-small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2010, 221(2):229.
- [7] 余德荣, 游力, 许晓群, 等. BRMS1 mRNA 和 CD44V6 mRNA 在子宫内膜癌组织中的表达及意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(4):287.
- [8] 王旭霞, 赵作勤, 张君, 等. 肿瘤转移抑制基因 BRMS1 mRNA 在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2007, 17(4):312.
- [9] 年峰. BRMS1 基因在食管鳞癌组织中的表达及意义[J]. *淮海医药*, 2012, 30(3):234.
- [10] WU Y, JIANG W, WANG Y, *et al.* Breast cancer metastasis suppressor 1 regulates hepatocellular carcinoma cell apoptosis via suppressing osteopontin expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42976.
- [11] 苗雄鹰, 杨智, 姜宋, 等. 胆囊良恶性病变组织中 ABCG2、SFRP2、BRMS1 和 HPA 的表达及临床病理意义[J]. *中华普通外科杂志*, 2011, 26(9):743.
- [12] 彭海, 周文学, 周昊昕, 等. BRMS1 在胃癌组织中的表达与淋巴结转移的关系[J]. *中国现代普通外科进展*, 2007, 10:497.
- [13] SHEVDE LA, SAMANT RS, GOLDBERG SF, *et al.* Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene BRMS1 [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 73(2):229.

变化,这种心率的规则性变化即被称为 HRV。心肌梗死病人 HRV 降低与病人死亡率及严重心律失常的发生密切相关^[14]。心率的即刻变化是由迷走神经进行调节,但交感神经需要大约 20 s 时间才能够改变心率,因此迷走神经对 HRV 起到了决定性的作用,当机体迷走神经功能较好时,HRV 则处于较高水平,而当迷走神经功能较差时,HRV 水平会出现显著降低。目前,临床中对于 HRV 的评估指标主要包括频域与时域两种,其中时域指标是以 R-R 间期变异为基础进行分析,常见时域指标包括 SDNN、SDANN、ASDNN 等。已有研究^[15]表明,在 CHD 病人中 HRV 时域指标手术前后均出现一定程度降低,且降低幅度与病人有无心律失常发生及术后心功能状况等有关。由于目前临床中对于 HRV 频域指标研究较少,本研究通过时域指标进行了分析,结果显示,PDA 组患儿术后 SDANN 高于术前,ASD、VSD 组患儿术后 SDNN、SDANN、R-R 均高于术前,研究结果提示 3 组患儿术后 HRV 时域指标均较术前有明显好转。同时,本研究显示患儿 R-R、SDNN、SDANN、ASDNN、rMSSD、PNN 50% 与心功能分级呈显著正相关关系,心功能越好,患儿 HRV 时域指标改善效果越明显。不过部分研究^[16]指出,CHD 病人心脏外科手术治疗后 HRV 水平会进一步降低,本研究结果与之不同。分析其原因可能与介入封堵术对患儿创伤较小,对血流动力学改善效果明显,封堵器放置对窦房结刺激等因素有关。由此可以看出,对于 PDA、ASD、VSD 类型的 CHD 患儿,介入封堵术相对外科手术治疗具有一定优势,而且血流动力学改善有助于促进患儿自主神经功能恢复。

综上所述,CHD 患儿介入治疗后会出现新发心律失常,治疗后 HRV 出现不同升高,且与患儿心功能相关,值得临床重视。本研究样本量较少,在随后的研究中可扩大样本量进一步研究证实。

[参 考 文 献]

[1] LIN Y, DING C, ZHANG K, *et al.* Evaluation of regulatory genetic

variants in POU5F1 and risk of congenital heart disease in Han Chinese [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15860.

[2] 顾君, 何国平, 李勇. 先天性心脏病介入治疗临床效果分析 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2014, 22(3): 54.

[3] 陈章强, 姚慧, 洪浪, 等. 国产封堵器治疗膜部室间隔缺损并发心律失常的分析及两种防治措施对心律失常转归的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2015, 31(3): 279.

[4] 杨雪峰, 蔡本志. 心律失常发病机制研究进展 [J]. *国际药理学研究杂志*, 2010, 37(2): 81.

[5] 葛郁芝, 熊力娟, 王云霞, 等. 心率变异性对器质性心脏病患者室性心律失常的预测价值 [J]. *中华老年医学杂志*, 2014, 33(11): 1161.

[6] 孔祥清. 先天性心脏病介入治疗 [M]. 江苏: 江苏科学技术出版社, 2003: 210.

[7] 付松, 封志纯. 经导管封堵膜周部室间隔缺损术后早期房室传导阻滞发生的危险因素 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2014, 28(12): 1200.

[8] ROTEN L, LUKAC P, DE GROOT N, *et al.* Catheter ablation of arrhythmias in ebstein's anomaly: a multicenter study [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011, 22(12): 1391.

[9] MAT DY, ALEXANDER ME, CECCHIN F, *et al.* Theelectroanatomic mechanisms of atrial tachycardia in patients with tetralogy of Fallot and double outlet right ventricle [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011, 22(9): 1013.

[10] 谭贺怡. 先天性心脏病不同术式对心律失常的影响 [J]. 2011, 6(21): 107.

[11] 李伟, 张丽, 汪周平, 等. 儿童继发孔房间隔缺损介入封堵术后心律失常分析及中期随访 [J]. *广东医学*, 2013, 34(23): 3595.

[12] 马丽, 黄园琴, 骆琼, 等. 房间隔缺损术后心律失常分析 [J]. *现代医学*, 2014, 42(1): 85.

[13] 龚霄雷, 张明杰, 朱丽敏, 等. 先天性心脏病术后早期心律失常 27 例分析 [J]. *中国小儿急救医学*, 2014, 21(4): 236.

[14] 李奋. 先天性心脏病术后难治性心律失常临床处理 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2013, 28(12): 897.

[15] 胡孝贞, 刘乐斌, 禹岳华, 等. 超声心动图评价室间隔缺损封堵术前后心功能 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(31): 6086.

[16] ELIK M, ALDUDAK B, AKAR M, *et al.* Problems of the neonates with congenital heart disease requiring early interventions: a regional report [J]. *Turk Pediatri Ars*, 2015, 50(3): 158.

(本文编辑 刘梦楠)

(上接第 616 页)

[14] SMITH PW, LIU Y, SIEFERT SA, *et al.* Breast cancer metastasis suppressor1 (BRMS1) suppresses metastasis and correlates with improved patient survival in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2009, 276(2): 196.

[15] KAPOOR P, SAUNDERS MM, LI Z, *et al.* Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells [J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(5):

693.

[16] DEWALD DB, TORABINEJAD J, SAMANT RS, *et al.* Metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1 involves reduction of phosphoinositide signaling in MDA-MB-435 breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 713.

[17] METGE BJ, FROST AR, KING JA, *et al.* Epigenetic silencing contributes to the loss of BRMS1 expression in breast cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(7): 753.

(本文编辑 刘璐)