

B3GNT6 在结直肠癌中的临床特征与生存预后分析

徐铭泽, 叶锦宁, 袁凯涛, 陈创奇, 蔡世荣, 马晋平*

中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 回顾性研究 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 6(B3GNT6)在结直肠癌患者临床样本中表达的临床意义。方法 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月中山市附属第一医院诊治的 154 例结直肠癌患者的临床病理资料及随访资料。应用免疫组织化学法检测 B3GNT6 蛋白在肿瘤组织中的表达情况, 经过病理玻片扫描仪数字化处理后, 借助 Qupath 软件对阳性区域进行评分, 并用 X-tile 软件选择合适的截断值, 应用卡方检验分析 B3GNT6 蛋白表达差异与临床病理参数的相关性, Kaplan-Meier 法分析 B3GNT6 蛋白表达与患者预后的相关性。结果 154 例患者年龄 (59.8 ± 12.8) 岁, 男女比例为 1.26:1.00。Qupath 软件对癌组织进行 H-score 评分后, X-tile 软件计算出 H-score 最佳截断值为 57.44, 根据 B3GNT6 表达情况将所有患者分为 B3GNT6 低表达组(104 例)和高表达组(50 例)。B3GNT6 低表达与淋巴结转移 ($P=0.012$)、TNM 分期 ($P=0.012$) 有关。Kaplan-Meier 法分析发现 B3GNT6 高表达组患者预后较好 ($P=0.0026$); 单因素及多因素 Cox 回归分析提示 B3GNT6 表达是评价结直肠癌患者预后的独立危险因素 ($HR=0.295, 95\%CI: 0.137 \sim 0.634, P=0.002$)。结论 B3GNT6 可能作为结直肠癌患者预后评估的生物标志物。

【关键词】 B3GNT6; 结直肠癌; 免疫组织化学; 预后

Pathological characteristics and survival prognosis of B3GNT6 in colorectal cancer

Xu Mingze¹, Ye Jingning¹, Yuan Kaitao¹, Chen Chuangqi¹, Cai Shirong¹, Ma Jinping^{1*}

Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangzhou, China

Corresponding author: Ma Jinping, E-mail: majp@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze retrospectively the clinicopathological features and survival analysis of β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (B3GNT6) in patients with colorectal cancer. **Method** In this study, a total of 154 patients who were diagnosed with colorectal cancer and completed follow-up in the Gastrointestinal Surgery Center in our hospital from January 2012 to December 2014 were selected. The expression of B3GNT6 protein in tumor tissue was detected by immunohistochemistry. After digital processing by pathological slide scanner, the positive area was scored by the H-score scoring system of Qupath software, and the appropriate cut-off value was selected by X-tile software. Finally, we analyzed the relationship between B3GNT6 and pathological characteristics and survival prognosis. **Result** The mean age of the 154 patients was (59.8 ± 12.8) years, and the male-to-female ratio was 1.26:1. After the H-Score of cancer tissue was scored by Qupath software, the best cut-off value of H-Score which was calculated by X-tile software was 57.44, so there were 104 patients with low expression of B3GNT6 and 50 patients with high expression of B3GNT6. Low expression of B3GNT6 was associated with lymph node metastasis ($P=0.012$) and TNM stage ($P=0.012$). No statistically significant correlation was found between the expression of B3GNT6 and patients' gender, age, tumor infiltration degree, tumor length, pathological type, tumor differentiation and distant metastasis ($P>0.05$). The survival curve showed that B3GNT6 was significantly correlated with tumor prognosis ($P=0.0026$); univariate and multivariate Cox regression indicated that B3GNT6 expression was

基金项目:广州市科技计划项目(202002020048)

*通信作者:马晋平, E-mail: majp@mail.sysu.edu.cn

correlated with patient survival and prognosis. **Conclusion** Compared with normal intestinal mucosa, B3GNT6 is relatively low-expressed in colorectal cancer; In colorectal cancer patients, the high-expression group has a longer survival time than the low-expression group, indicating that B3GNT6 can be used as an independent prognostic factor in tumors.

【Key words】 B3GNT6; Colorectal cancer; Immunohistochemistry; Survival prognosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国高发的恶性肿瘤之一,其发病机制尚不明确,预后较差,治疗效果欠佳^[1]。90%以上的CRC由息肉发展而来,早期干预后可阻断其癌变可能。由于大规模肠镜筛查在我国难以开展,大多数CRC确诊患者仍以中晚期较为常见^[2],因此,寻找对预后和不良结局有预测作用的分子标志物显得尤为重要。黏蛋白(mucins, MUC)是黏膜分泌黏液中的主要成分,在肿瘤的发生发展中起到重要作用;但目前对于合成黏蛋白的关键酶 β -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶6(β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6, B3GNT6)的研究较少。本研究主要通过检测B3GNT6在CRC组织中的表达情况,探究其与CRC患者临床参数及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性选取2012年1月至2020年12月中山大学附属第一医院胃肠外科中心就诊的CRC患者154例。纳入标准:①患者病历信息完整,至少配合完成5年以上的随访;②手术前未进行新辅助化疗;③手术中肿瘤组织整块切除且手术切缘未见肿瘤细胞;④手术后进行肿瘤病理学检查诊断为结直肠癌;⑤患者半年内无肿瘤复发。排除标准:①患者半年内因肿瘤复发或其他基础疾病去世以及失访;②标本蜡块无法获取。研究对象的年龄为(59.8±12.8)岁,男女比例为1.26:1.00。肿瘤中高分化有135例,低分化19例;肿瘤长径≤5 cm为66例,肿瘤长径>5 cm为88例;淋巴结清扫术后转移阴性者102例,阳性52例;确诊时135例患者未出现远处转移,19例发生远处转移。

1.2 主要试剂和仪器 抗B3GNT6抗体(21291-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司,TRIS-EDTA抗原修复液(pH 9.0)购自合肥白鲨生物科技有限公司,免疫显色试剂购自基因科技(上海)股份有限公司。病理玻片扫描仪购自宁波江丰生物信息技术有限公司(KFBIO)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学 患者的病理组织取自于中山大学附属第一医院病理科,组织切片厚度约为5 μ m;同时取10份正常结直肠黏膜组织作为阳性对照。免疫组织化学需经65 $^{\circ}$ C预烤组织切片2 h,再经二甲苯、酒精脱蜡和脱水,并用双蒸水和磷酸盐缓冲盐水清洗。使用TRIS-EDTA抗原修复液(pH 9.0)进行高压热力抗原修复后用3%过氧化氢溶液中和过氧化物酶。组织经封闭30 min、一抗4 $^{\circ}$ C过夜孵育和二抗常温孵育30 min后,用DAB进行免疫显色、复染、返蓝、透明、风干和中性树脂封片。

1.3.2 免疫组织化学评分 将染色完成的切片用玻片扫描仪进行数字化格式存储,免疫组织化学评分前需将文件格式转化成后缀为“.svs”。使用Qupath(version 0.31)进行免疫组织化学评分,每张组织化学切片需先选定阳性表达最强,兼空白背景和蓝色背景的区域校正。用阳性细胞个数对癌组织进行评分,参数调整如下。①阳性参数调整:弱染色(1+)0.1,中度染色(2+)0.2,强染色(3+)0.3;②将像素单位调整为实际像素大小,文件像素大小为0.2454 μ m;③肿瘤组织染色的亚细胞定位为细胞质。调整参数后随机选定5个不同的区域计算阳性细胞个数,计算出H-score,每例患者的组织需随机选取相同面积的阳性区域进行计算,并计算出平均值;H-score计算公式为H-score=1×%弱染色+2×%中度染色+3×%强染色,分数范围为0~300分。

1.3.3 截断值计算 将每例患者的生存资料和H-score输入到X-tile软件中,计算出生存曲线最佳的截断值(cutoff)。

1.4 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件进行统计分析,计数资料比较采用卡方检验,计量资料用均数±标准差(\bar{x} ±s)和中位数表示,单因素和多因素Cox回归分析研究影响结直肠癌的预后因素,其中多因素Cox回归采用最大似然估计的似然比检验对变量进行筛选;生存曲线由GraphPad8.0

中的 Kaplan-Meier 检验并绘制。本研究检验水准为 $\alpha=0.10$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B3GNT6 在正常组织和结直肠癌中的表达情况 B3GNT6 在正常大肠黏膜中为高表达(图 1), 主要表达于细胞质和细胞膜, 可见细胞间质内表达。在结直肠癌组织中为低表达(图 1), 主要见于细胞质中, 偶见细胞膜和细胞间质着色。154 例患者中 H-score 最低分为 0 分, 最高分为 195.63 分, 最低分为 0 分, 中位数为 25.51 分。Qupath 软件对癌组织进行 H-score 评分后, X-tile 软件计算出 H-score 最佳截断值为 57.44, 此时生存预后曲线差异显著。以此划分 B3GNT6 低表达组患者共 104 例, 中位数为 10.08; 高表达组患者 50 例, 中位数为 78.21。

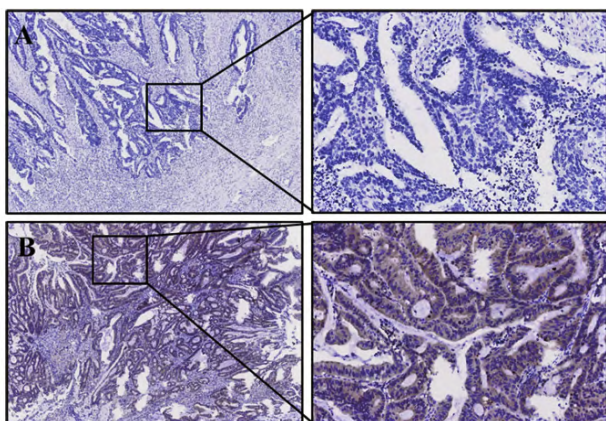


图 1 B3GNT6 的在结肠癌组织的表达情况

注: A, B3GNT6 在结肠癌组织的低表达(HRP-DAB 法, 左 $\times 4$, 右 $\times 40$); B, B3GNT6 在结肠癌组织的高表达(HRP-DAB 法, 左 $\times 4$, 右 $\times 40$)

2.2 B3GNT6 表达和临床特征的关系 不同性别、年龄、肿瘤浸润程度、肿瘤长径、病理分型、肿瘤分化程度和远处转移患者间 B3GNT6 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。不同淋巴结转移($P=0.012$)和 TNM 分期($P=0.012$)患者间 B3GNT6 表达差异有统计学意义。见表 1。

2.3 B3GNT6 表达与结直肠癌患者长期预后的相关性 154 例患者的随访时间为 (2071 ± 827) d, 最短随访时间为 110 d, 最长随访时间为 3207 d, 术后 1、2、3 年的累积生存率为 95.62%、88.96%、85.06%。生存曲线显示 B3GNT6 与生存预后显著相关(图 2), 高表达组患者生存时间长于低表达组,

表 1 B3GNT6 的表达情况与临床资料分析(例)

临床变量	例数	B3GNT6		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄				0.216	0.642
<60 岁	78	27	52		
>60 岁	76	23	52		
性别				0.519	0.471
男	86	30	56		
女	68	20	48		
肿瘤浸润程度				3.199	0.074
无	20	3	17		
有	134	47	87		
肿瘤长径				3.754	0.053
≤ 5 cm	66	27	39		
>5 cm	88	23	65		
病理分型				0.392	0.822
绒毛状腺癌	6	2	4		
管状腺癌	130	41	89		
黏液腺癌	18	7	11		
肿瘤分化程度				1.288	0.256
中分化和高分化	135	46	89		
低分化	19	4	15		
远处转移				0.374	0.541
否	135	45	90		
是	19	5	14		
淋巴结转移				6.274	0.012
阴性	102	40	62		
阳性	52	10	42		
TNM 分期				5.886	0.015
期和 期	96	38	58		
期和 期	58	12	46		
癌胚抗原				0.157	0.692
<5 $\mu\text{g/L}$	92	31	61		
≥ 5 $\mu\text{g/L}$	62	19	31		

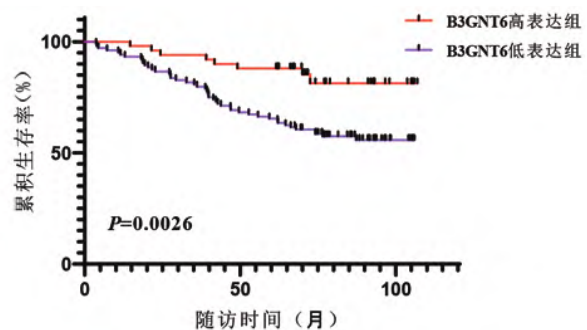


图 2 Kaplan-Meier 法绘制 B3GNT6 高表达组和低表达组的总体生存情况

差异有统计学意义($P=0.0026$)。单因素 Cox 回归分析中, B3GNT6 表达($P=0.003$)、肿瘤分化程度($P=0.009$)、远处转移($P<0.001$)、淋巴结转移($P=0.004$)和 TNM 分期($P=0.002$)与生存预后相关(表 2)。在

表2 单因素和多因素 Cox 回归法分析影响结直肠癌患者预后的影响因素

临床变量	单因素 Cox 回归分析		多因素 Cox 回归分析	
	HR 值(95%CI)	P 值	HR 值(95%CI)	P 值
B3GNT6 表达情况(低/高表达)	3.011(1.418~6.393)	0.003	0.295(0.137~0.634)	0.002
年龄(≤60岁/>60岁)	0.650(0.376~1.123)	0.122	1.783(1.015~3.130)	0.044
性别(男/女)	1.087(0.630~1.878)	0.764	-	0.591
肿瘤浸润程度(无/有)	0.433(0.156~1.202)	0.108	-	0.089
肿瘤长径(≤5 cm/>5 cm)	0.791(0.454~1.379)	0.409	-	0.934
病理分型(绒毛状腺癌/管状腺癌/黏液腺癌)	-	0.985	-	0.395
绒毛状腺癌	-	-	-	-
管状腺癌	0.955(0.193~4.731)	0.955	-	-
黏液腺癌	1.053(0.449~2.468)	0.906	-	-
肿瘤分化程度(中高/低分化)	2.433(1.251~4.730)	0.009	2.384(1.220~4.659)	0.011
远处转移(否/是)	0.306(0.161~0.584)	<0.001	4.526(2.290~8.944)	<0.001
淋巴结转移(阴性/阳性)	0.443(0.258~0.761)	0.004	-	0.106
TNM 分期(和 / 和)	0.417(0.243~0.716)	0.002	-	0.138
癌胚抗原(<5 μg/L/≥5 μg/L)	1.641(0.957~2.812)	0.072	-	0.797

多因素 Cox 回归分析中,用最大偏似然估计的似然比检验共筛选出4个相关因素:B3GNT6 表达、年龄、远处转移和淋巴结转移。单因素及多因素 Cox 回归提示 B3GNT6 表达情况与患者生存预后相关。

3 讨论

CRC 是最常见的消化系统肿瘤之一,2020 年的数据显示,全球共新发 CRC 约 196 万例;其中我国新发病例 55.5 万例,占全球 28.8%,死亡病例 28.6 万例,占 30.6%^[3]。临床工作中约 1/3 的 CRC 患者死于远处转移^[2],转移是影响预后最为显著的因素。消化道黏膜及黏液包含丰富的黏蛋白,以往的研究证实了黏蛋白具有广泛的致病机制,例如干燥综合征中唾液腺细胞向其细胞外基质异常分泌黏蛋白会激发促炎反应,激活下游的炎症通路^[4];黏蛋白可以为多种恶性肿瘤的“干性”提供条件,如 MUC16(CA125)可以通过 JAK 通路维持胰腺癌细胞的特性^[5];MUC1 蛋白在结直肠癌中的表达与预后显著相关,高表达的患者提示预后不良^[6]。

结肠黏膜中 MUC 主要为核心 1(core 1)和核心 3(core 3)结构所衍生的黏蛋白,共同维持结肠黏液屏障^[7]。结肠癌组织和结肠癌细胞系中,core 3 合酶的表达下调^[8],core 3 结构可由 B3GNT6 翻译后的产物——core 3 合酶合成和调节。本次研究中,B3GNT6 表达与患者性别、年龄、肿瘤浸润程度、肿瘤长径、病理分型、肿瘤分化程度和远处转

移等无统计学意义($P>0.05$)。B3GNT6 表达与淋巴结转移($P=0.012$)和 TNM 分期($P=0.012$)相关。

B3GNT6 的产物 core 3 合酶具有 O-GlcNAc 糖基转移酶(O-GlcNAc transferase,OGT)活性,与 core 1 合酶合成黏蛋白表面的 O-型糖链,其表达受损会破坏结肠黏液屏障,激活半胱天冬酶 1 依赖性炎症小体,导致结肠炎和结肠癌发生^[9]。蛋白质上存在大量的糖基化修饰,O 型糖基化的异常修饰除了会导致糖尿病、心血管疾病、阿尔茨海默病等良性疾病的发生,还与肿瘤增殖和转移密切相关^[10]。在前列腺癌中,与正常组织相比,癌旁组织、原位癌和转移灶中的 O 型糖基化程度和恶性程度相关^[11];在结肠癌中,结肠癌中 O 型糖基化水平表达水平显著高于癌旁组织^[12]。此外,Hyeon 等^[13]证实了 X-染色体连锁的凋亡抑制蛋白(XIAP)发生 O 型糖基化修饰后抑制结肠癌细胞的生长和侵袭。以往的研究 O-GlcNAc 修饰的研究主要聚焦于 OGT 和 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(O-GlcNAcase,OGA)的相互作用,较少关注其他具有 O-GlcNAc 糖基转移酶活性蛋白的调节机制。

此外,以往的研究证实 B3GNT6 会通过调控 MUC1/p53/miR-200c 来抑制上皮间质转化来达到抑癌的效果^[14]。本研究中证实 B3GNT6 可作为结直肠癌中独立的预后因素,高表达预示着预后良好,低表达提示预后不良,多因素 Cox 回归证实了高表达有较低的淋巴结和远处转移的风险,提示 B3GNT6 能抑制肿瘤进展和转移,此次结果为后续深入探讨 B3GNT6 在结直肠癌中的具体机制提供了思路。

参考文献

- [1] 高雅娟, 贾漪涛. 肿瘤干细胞在结直肠癌中的研究进展[J/CD]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2020, 12(3): 176-180.
- [2] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. Gut, 2017, 66(4): 683-691.
- [3] CAO W, CHEN HD, YU YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [4] BARRERA M-J, SÁNCHEZ M, AGUILERA S, et al. Aberrant localization of fusion receptors involved in regulated exocytosis in salivary glands of Sjögren's syndrome patients is linked to ectopic mucin secretion [J]. J Autoimmun, 2012, 39(1-2): 83-92.
- [5] NALLANTHIGAL S, HEISERMAN J P, CHEON D-J. The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 86.
- [6] 胡欣, 王昆华, 包维民. 粘蛋白表达与结直肠癌诊治及预后关系的研究概况 [J/CD]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2009, 1(1): 68-70.
- [7] BERGSTROM K, FU J, JOHANSSON M E V, et al. Core 1- and 3-derived O-glycans collectively maintain the colonic mucus barrier and protect against spontaneous colitis in mice [J]. Mucosal Immunol, 2017, 10(1): 91-103.
- [8] BROCKHAUSEN I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1999, 1473(1): 67-95.
- [9] BERGSTROM K, LIU X, ZHAO Y, et al. Defective Intestinal Mucin-Type O-Glycosylation Causes Spontaneous Colitis-Associated Cancer in Mice [J]. Gastroenterology, 2016, 151(1): 152-164.
- [10] ZHU Q, ZHOU L, YANG Z, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation [J]. Medical Oncology (Northwood, London, England), 2012, 29(2): 985-993.
- [11] LYNCH T P, FERRER C M, JACKSON S R, et al. Critical role of O-Linked β -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 11070-11081.
- [12] MI W, GU Y, HAN C, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2011, 1812(4): 514-519.
- [13] SEO H G, KIM H B, YOON J Y, et al. Mutual regulation between OGT and XIAP to control colon cancer cell growth and invasion [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 815.
- [14] YE J, WEI X, SHANG Y, et al. Core 3 mucin-type O-glycan restoration in colorectal cancer cells promotes MUC1/p53/miR-200c-dependent epithelial identity [J]. Oncogene, 2017, 36(46): 6391-6407.

·读者·作者·编者·

本刊对视频投稿的要求

为了促进同行之间的技术交流、强化继续教育,本刊特开辟的视频之窗栏目,为此提供一个极佳的交流平台。本刊视频发表要求如下:可采用 AVI、MPEG 和 RAM 等常用格式。视频文件的压缩格式需计算机常用操作系统支持。视频文件的音频和视频图像要同步。窗口尺寸要能够清晰显示图像细节,不低于 352×288 像素。字幕工整、清晰、易于辨认。字幕出现时间应与配音或者内容相协调一致。视频时长 20 min 左右为宜。需要有对该手术进行文字说明和简要的步骤说明,此外需附上个人照片和简介,包括目前任职情况、主攻方向、已经发表的文章情况,以及主持的科研项目等。来稿请发送至本刊编辑部 E-mail: digestiveoncology@163.com 或通过我刊网上投稿系统投稿。此栏目不收取任何费用,欢迎各位作者踊跃投稿。