

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.008

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.008>

支链氨基酸转氨酶 1 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义

李丹, 吴文

(华中科技大学同济医学院附属协和医院西院妇产科, 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)患者癌组织中支链氨基酸转氨酶 1(branched-chain amino-acid transaminase 1, BCAT1)的表达及临床意义。方法: 采用免疫组织化学法检测133例EOC癌组织中BCAT1表达情况, 根据免疫组织化学评分分为BCAT1高表达组($n=41$)及低表达组($n=92$), 卡方检验分析BCAT1的表达与临床病理因素间的关系, Kaplan-Meier生存曲线和对数秩检验比较BCAT1高、低表达组患者无瘤生存率及总生存率的差异, Cox比例风险模型分析影响EOC患者预后的因素。结果: BCAT1表达与宫颈癌国际妇产科联盟(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期($P=0.004$)、淋巴结转移($P=0.001$)显著相关, 与糖类抗原125(CA125)水平($P=0.538$)、组织学类型($P=0.306$)、年龄($P=0.524$)、肿瘤大小($P=0.632$)、腹水($P=0.178$)无显著相关性($P>0.05$)。BCAT1高表达组患者1年、3年无瘤生存率及总生存率显著低于BCAT1低表达组($P<0.001$)。单因素分析示CA125($P<0.001$)、肿瘤大小($P=0.003$)、组织学类型($P=0.004$)、淋巴结转移($P<0.001$)、FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P<0.001$)是影响EOC患者无瘤生存率的危险因素。多因素分析示FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P=0.013$)是影响EOC患者无瘤生存率的独立危险因素。单因素分析示FIGO分期($P=0.022$)、BCAT1表达($P=0.004$)及淋巴结转移($P=0.046$)是影响EOC患者总生存率的危险因素; 多因素分析示FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P=0.025$)是影响EOC患者总生存率的独立危险因素。结论: EOC癌组织中BCAT1高表达, 且与FIGO分期、淋巴结转移和预后显著相关, 是影响EOC患者预后的分子标志物。

[关键词] 上皮性卵巢癌; 支链氨基酸转氨酶1; 临床意义

Expression of branched-chain amino-acid transaminase I in epithelial ovarian cancer and its clinical significance

LI Dan, WU Wen

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of branched-chain amino-acid transaminase 1 (BCAT1) in cancer tissues of patients with epithelial ovarian cancer and its clinical significance. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the expression of BCAT1 in 133 cases of epithelial ovarian cancer. The epithelial ovarian cancer

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-27

通信作者 (Corresponding author): 吴文, Email: wuwen783@sohu.com

was divided into 2 groups according to the immunohistochemical score (high expression of BCAT1: $n=41$; low expression of BCAT1: $n=92$). Chi-square test was used to analyze the relationship between BCAT1 expression and clinicopathological factors. Kaplan-Meier survival curve and logarithmic rank test were used to compare the difference of disease-free survival rate and overall survival rate between high and low BCAT1 expression groups. Cox proportional hazard model was used to analyze the prognostic factors of EOC patients. **Results:** BCAT1 expression was significantly correlated with FIGO stage ($P=0.004$), lymph node metastasis ($P=0.001$), but not with CA125 level ($P=0.538$), histological type ($P=0.306$), age ($P=0.524$), tumor size ($P=0.632$), and ascites ($P=0.178$). The 1-year and 3-year disease-free survival rate and overall survival rate of BCAT1 high expression group were significantly lower than those of BCAT1 low expression group ($P<0.001$). Univariate analysis showed that CA125 ($P<0.001$), tumor size ($P=0.003$), histological type ($P=0.004$), lymph node metastasis ($P<0.001$), FIGO staging ($P<0.001$) and BCAT1 expression ($P<0.001$) were risk factors for the survival rate of EOC patients. Multivariate analysis showed that FIGO staging ($P<0.001$) and BCAT1 expression ($P=0.013$) were independent risk factors for EOC patients' disease-free survival. Univariate analysis showed that FIGO staging ($P=0.022$), BCAT1 expression ($P=0.004$) and lymph node metastasis ($P=0.046$) were risk factors affecting the overall survival rate of EOC patients. Multivariate analysis showed that FIGO staging ($P<0.001$) and BCAT1 expression ($P=0.025$) were independent risk factors for the overall survival rate of EOC patients. **Conclusion:** BCAT1 is highly expressed in EOC cancer tissues, which is significantly correlated with FIGO staging, lymph node metastasis and prognosis. BCAT1 is a molecular marker affecting the prognosis of EOC patients.

Keywords epithelial ovarian cancer; branched-chain amino-acid transaminase 1; clinical significance

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是常见的妇科恶性肿瘤,是女性癌症相关死亡的主要原因^[1]。EOC患者5年生存率约40%^[2]。肿瘤复发和转移是导致临床结果不佳和卵巢癌相关死亡的主要原因^[3]。支链氨基酸转氨酶1(branched-chain amino-acid transaminase 1, BCAT1),是支链氨基酸转氨酶的其中一种,其编码基因位于染色体12p12.1,编码蛋白可参与细胞增殖、分化等细胞生物学行为和氨基酸代谢过程^[4-5]。BCAT1表达水平与乳腺癌^[6]和肝细胞癌^[7]预后密切相关。尽管如此,BCAT1在EOC癌组织中表达情况和临床意义尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 患者及临床组织样本

本研究纳入华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科自2010年1月至2013年1月收治的133例行卵巢癌切除术患者的组织标本,年龄31~78(中位53)岁,依据宫颈癌国际妇产科联盟(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期标准^[8]进行分期, I期15例, II期16例, III期100例, IV期2例,所有患者按卵巢癌FIGO分期治疗原则治疗。纳入标准:

1)经卵巢癌切除术后病理诊断为卵巢癌者;2)患者临床及随访资料齐全者。排除标准:1)临床及随访资料不完整者;2)不符合纳入标准者。本研究所用标本已获得华中科技大学同济医学院附属协和医院医学伦理委员会审批。

1.2 免疫组织化学染色

将卵巢癌标本石蜡包埋并用10%中性甲醛固定,然后将样品切成3 μm 厚的切片用于免疫组织化学染色。将组织切片在二甲苯中脱石蜡,并使用标准程序以一系列浓度梯度的乙醇再水合。用3%过氧化氢(H_2O_2)孵育切片10 min阻断内源性过氧化物酶活性。然后将所有脱石蜡切片浸入0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中并在微波炉中加热(95 $^{\circ}\text{C}$)8 min。通过将切片与10%山羊血清孵育30 min阻断非特异性免疫球蛋白结合。随后兔多克隆抗体BCAT1(1:100,美国Abcam公司)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理每个切片过夜。将切片用PBS洗涤后,将其与二抗(中山生物技术有限公司)一起温育,然后用辣根过氧化物酶偶联的链霉抗生物素蛋白在37 $^{\circ}\text{C}$ 处理30 min。将载玻片用苏木精复染30~60 s,并固定在水性封固剂中。IHC根据制造商说明书步骤进行。用缓冲液作阴性对照,以乳腺癌组织化学切片作为阳性对照。

1.3 免疫组织化学评分

染色切片由2名不知临床数据的病理医师采用盲法独立评估。上皮细胞通常表现出不同的细胞质染色模式: BCAT1蛋白的阳性染色在细胞质中表现为棕色颗粒。染色的细胞评分如下: 1分, $\leq 10\%$; 2分, 11%~50%; 3分, 51%~80%; 4分, $\geq 81\%$ 。染色强度: 1分代表弱染色, 2分代表中度染色, 3分代表强染色。将获得的两个值相乘, 计算总得分(最大值12)。 ≤ 6 分定义为BCAT1低表达组, >6 分为BCAT1高表达组。

1.4 随访

患者均采用电话或门诊的方式随访, 每半年随访1次, 随访行彩超、X线及抽血检查, 随访内容包括肿瘤复发及生存情况。随访截止时间至2019年1月, 最长随访时间72个月。无瘤生存期(disease free survival, DFS)定义为从初次手术日期到疾病复发日期的时间间隔, 总生存期(overall survival, OS)定义为从初次手术日期到死亡日期或最后一次随访日期的时间。

1.5 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析。卡方检验用于分析BCAT1表达与临床病理参数间的关系, Kaplan-Meier曲线评估BCAT1表达与OS和DFS的关系。Cox比例风险模型用于评估影响卵巢癌预后的因素, 只有单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量才纳入

多变量模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织中 BCAT1 的表达

免疫组织化学染色示: BCAT1染色主要定位于癌细胞细胞质中。BCAT1高表达有41例(41/133, 30.8%), BCAT1低表达有92例(92/133, 69.2%), EOC患者癌组织中典型免疫组织化学染色见图1。

2.2 EOC 患者 BCAT1 表达与临床病理参数的关系

在EOC组织中, BCAT1表达与FIGO分期($P = 0.004$)、淋巴结转移($P = 0.001$)显著相关, 与糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)水平($P = 0.538$)、组织学类型($P = 0.306$)、年龄($P = 0.524$)、肿瘤大小($P = 0.632$)、腹水($P = 0.178$)无显著相关性($P > 0.05$, 表1)。

2.3 EOC 患者 BCAT1 表达与患者预后间的关系

Kaplan-Meier生存曲线示: BCAT1高表达组患者1年无瘤生存率为87.2%, 3年无瘤生存率为37.5%; BCAT1高表达组患者1年总生存率为91.2%, 3年总生存率为46.8%; BCAT1低表达组1年无瘤生存率为90.3%, 3年无瘤生存率为66.8%; BCAT1低表达组1年总生存率为91.6%, 3年总生存率为71.6%, BCAT1高表达组患者无瘤生存率及总生存率显著低于BCAT1低表达组($P < 0.001$, 图2)。

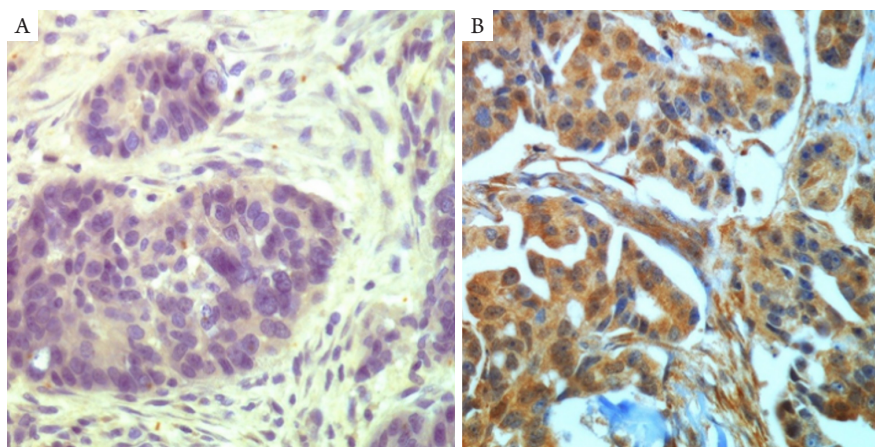


图1 EOC癌组织BCAT1免疫组织化学染色($\times 200$)

Figure 1 Immunohistochemical staining of BCAT1 in epithelial ovarian carcinoma tissues ($\times 200$)

(A)EOC癌组织BCAT1呈低表达;(B)EOC癌组织BCAT1呈高表达。

(A) Low expression of BCAT1 in ovarian carcinoma tissues; (B) High expression of BCAT1 in ovarian carcinoma tissues.

表1 EOC患者 BCAT1表达与临床病理因素间的关系

Table 1 Association between BCAT1 expression and the clinicopathological characteristics of EOC patients

因素	n	BCAT1低表达/例	BCAT1高表达/例	χ^2	P
年龄/岁				0.406	0.524
<55	80	57	23		
≥ 55	53	35	18		
组织学类型				1.047	0.306
浆液型	89	59	30		
非浆液型	44	33	11		
肿瘤大小/cm				0.230	0.632
<2	65	43	22		
≥ 2	68	49	19		
FIGO分期				8.190	0.004
I~II	31	15	16		
III~IV	102	77	25		
淋巴结转移				12.060	0.001
无	74	42	32		
有	59	50	9		
腹水/mL				1.812	0.178
<500	70	52	18		
≥ 500	63	40	23		
CA125/(U·mL ⁻¹)				0.380	0.538
<35	16	10	6		
≥ 35	117	82	35		

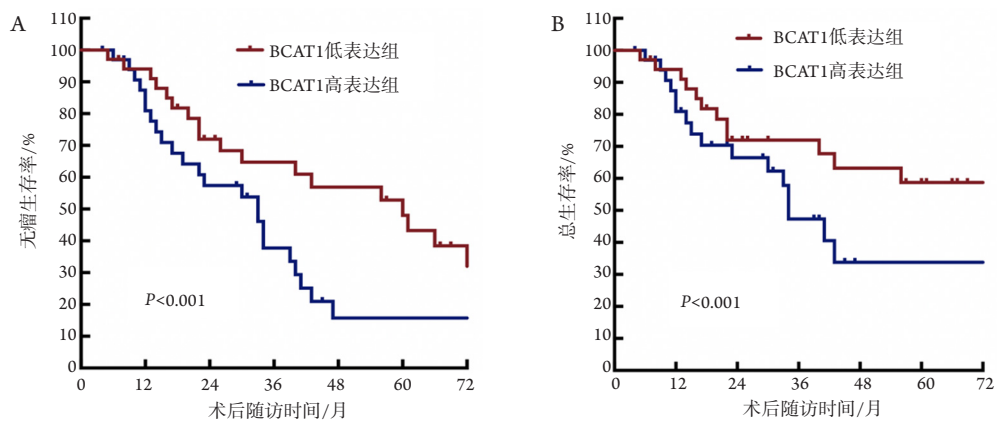


图2 BCAT1高、低表达组患者无瘤生存(A)和总生存(B)曲线比较

Figure 2 Comparison of disease-free survival (A) and overall survival (B) curve in patients with high and low BCAT1 expression group

2.4 影响 EOC 患者无瘤生存率的单因素和多因素分析

单因素分析示: CA125 ($P<0.001$)、肿瘤大小($P=0.003$)、组织学类型($P=0.004$)、淋巴结转移($P<0.001$)、FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P<0.001$)是影响EOC患者无瘤生存率的危险因素;多因素分析示FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P=0.013$)是影响EOC患者无瘤生存率的独立危

险因素(表2)。

2.5 影响 EOC 患者总生存率的单因素和多因素分析

单因素分析示: FIGO分期($P=0.022$)、BCAT1表达($P=0.004$)及淋巴结转移($P=0.046$)是影响EOC患者总生存率的危险因素;多因素分析示FIGO分期($P<0.001$)和BCAT1表达($P=0.025$)是影响EOC患者总生存率的独立危险因素(表3)。

表2 影响EOC患者无瘤生存率的单因素和多因素分析

Table 2 Univariate and multivariate analyses of factors affecting DFS in patients with ovarian carcinoma

因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
年龄(<54岁 vs \geq 54岁)	1.14	0.777~1.673	0.503	—	—	—
组织学类型(非浆液型 vs 浆液型)	0.544	0.359~0.825	0.004	1.016	0.616~1.674	0.951
肿瘤大小(\geq 2 vs <2 cm)	1.763	1.206~2.577	0.003	1.341	0.891~2.019	0.159
FIGO分期(III~IV vs I~II)	8.54	4.360~16.724	<0.001	5.967	2.848~12.502	<0.001
淋巴结转移(阴性 vs 阳性)	0.416	0.282~0.614	<0.001	0.882	0.583~1.336	0.555
腹水(<500 vs \geq 500 mL)	1.294	0.892~1.879	0.170	—	—	—
CA125浓度(<35 vs \geq 35 U/mL)	0.177	0.071~0.437	<0.001	1.596	0.722~3.562	0.248
BCAT1表达(高 vs 低)	1.704	1.111~2.614	<0.001	1.130	1.305~2.810	0.013

表3 影响EOC患者总生存率的单因素和多因素分析

Table 3 Univariate and multivariate analyses of factors affecting OS in patients with ovarian carcinoma

因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
年龄(<54岁 vs \geq 54岁)	0.943	0.495~1.798	0.859	—	—	—
组织学类型(非浆液型 vs 浆液型)	0.793	0.395~1.593	0.515	—	—	—
肿瘤大小(\geq 2 vs <2 cm)	1.255	0.666~2.364	0.483	—	—	—
FIGO分期(III~IV vs I~II)	33.569	1.655~680.88	0.022	15.163	3.723~61.763	<0.001
淋巴结转移(阴性 vs 阳性)	0.624	0.330~1.178	0.046	0.608	0.305~1.209	0.156
腹水(<500 vs \geq 500 mL)	1.360	0.725~2.554	0.338	—	—	—
CA125浓度(<35 vs \geq 35 U/mL)	0.040	0.001~2.087	0.110	—	—	—
BCAT1表达(高 vs 低)	3.395	1.407~8.191	0.004	2.857	1.144~7.139	0.025

3 讨论

EOC是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌,其主要病理类

型为EOC。EOC病死率占各类妇科肿瘤的首位,由于其解剖位置和症状隐匿,约70%的EOC在诊断时属于FIGO III期或IV期。对女性生命造成严重威胁^[9-10]。

支链氨基酸转氨酶(branched-chain amino-acid transaminase, BCAT)是细胞内三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和氧化磷酸化级联代谢反应的重要调节剂。BCAT有2种同种型: BCAT1为细胞溶质型, 而BCAT2为线粒体型, 两者主要功能是调节BCAAs降解, 对细胞代谢和生长至关重要^[11]。BCAT1在肿瘤中可影响癌细胞增殖、细胞周期进程、分化和凋亡^[4-7], 其在EOC中的作用尚不清楚。

本研究发现BCAT1染色主要定位于EOC癌细胞细胞质, BCAT1高表达者有41例(41/133, 30.8%), BCAT1低表达者有92例(92/133, 69.2%)。研究^[7]发现: 在肝细胞癌中, 以BCAT1 mRNA表达中位值为界, BCAT1高表达者119例(63.9%), 低表达者67例(36.1%), 在肝细胞癌和EOC患者中BCAT1表达比例不一致, 提示不同肿瘤BCAT1表达存在差异。本研究发现EOC组织中BCAT1高表达和FIGO晚期阶段及淋巴结转移呈显著相关性。EOC组织中BCAT1的表达与术前CA125水平、组织学类型、年龄、腹水或残留肿瘤差异无统计学意义。在EOC患者中, FIGO分期越高, 疾病越处于晚期, 且患者预后不佳; 淋巴结转移可部分反映出肿瘤侵袭能力, 提示BCAT1高表达患者可能癌组织中肿瘤细胞具有更强的侵袭性。通过检测乳腺癌组织中BCAT1 mRNA表达和体外乳腺癌细胞系中BCAT1 mRNA表达情况, 均可发现BCAT1表达增加可促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 提示其高表达可促进乳腺癌肿瘤细胞转移^[6]。

本研究结果显示: BCAT1高表达组患者的无瘤生存率和总生存率显著低于BCAT1低表达组患者, 提示BCAT1表达与EOC患者预后相关, 是潜在的预后标志物。Cox比例风险模型的单因素和多因素分析均显示BCAT1表达是预测EOC患者无瘤生存率和总生存率独立危险因素。EOC是常见妇科肿瘤, 早期诊断困难, 早期症状缺乏特异性, 诊断时极可能存在腹膜转移, 且手术后易复发, 对各种化疗药物易产生耐药性, 以上居多不利因素均降低了EOC患者生存率^[12-13]。另一方面, Wang等^[14]研究报道: 在卵巢癌细胞系中, 敲低BCAT1表达, 可抑制卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭, 并抑制细胞周期进程。在动物模型中, 敲低BCAT1表达显著延长了移植瘤模型鼠生存时间。这可能解释了BCAT1高表达组患者预后较BCAT1低表达组患者差的原因。

本研究尚存在以下不足: 本研究为单中心回

顾性研究, 纳入病例数较少, 需要多中心大样本研究来证实本研究结论; 其次, 本研究并未探讨EOC患者癌组织中BCAT1表达差异的分子机制及其作为预后标志物的可能分子机制, 尚需要进一步研究。

综上, EOC患者癌组织中BCAT1呈差异性表达, BCAT1高表达与患者FIGO晚期及淋巴结转移密切相关, BCAT1高表达患者无瘤生存率和总生存率均低于BCAT1低表达患者, 提示BCAT1可能是EOC患者预后新的分子标志物。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4): 284-296.
3. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, et al. Advances in ovarian cancer therapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 81(1): 17-38.
4. Zhou W, Feng X, Ren C, et al. Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 53.
5. Xu M, Liu Q, Jia Y, et al. BCAT1 promotes tumor cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2648-2656.
6. Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, et al. DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines[J]. *Biochimie*, 2016, 123: 20-31.
7. Zheng YH, Hu WJ, Chen BC, et al. BCAT 1, a key prognostic predictor of hepatocellular carcinoma, promotes cell proliferation and induces chemoresistance to cisplatin[J]. *Liver Int*, 2016, 36(12): 1836-1847.
8. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication[J]. *J Gynecol Oncol*, 2015, 26(2): 87-89.
9. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, et al. Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage[J]. *JNCI*, 2018, 111(1): 60-68.
10. Lee JY, Kim S, Kim YT, et al. Changes in ovarian cancer survival during the 20 years before the era of targeted therapy[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 601.
11. Papathanassiou AE, Ko JH, Imprialou M, et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16040.

12. Scaletta G, Plotti F, Luvero D, et al. The role of novel biomarker HE4 in the diagnosis, prognosis and follow-up of ovarian cancer: a systematic review[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 17(9): 827-839.
13. Zhang F, Zhang Y, Ke C, et al. Predicting ovarian cancer recurrence by plasma metabolic profiles before and after surgery[J]. *Metabolomics*, 2018, 14(5): 65.
14. Wang ZQ, Faddaoui A, Bachvarova M, et al. BCAT1 expression associates with ovarian cancer progression: possible implications in altered disease metabolism[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31522-31543.

本文引用: 李丹, 吴文. 支链氨基酸转氨酶1在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1681-1687. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.008

Cite this article as: LI Dan, WU Wen. Expression of branched-chain amino-acid transaminase 1 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1681-1687. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.008