

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.006

SETDB1在胃癌中的表达及其临床意义

李金梅¹, 陈红¹, 杜强², 王旭¹, 马秋双¹, 李小莉³, 张金库¹

(1. 保定市第一中心医院病理科, 河北 保定 071000; 2. 新疆生产建设兵团第二师库尔勒医院病理科, 新疆 库尔勒 841000; 3. 临沂市人民医院病理科, 山东 临沂 276000)

[摘要] 目的: 探讨SETDB1在胃癌组织中的不同亚细胞定位表达及临床意义。方法: 用SP免疫组织化学法检测161例胃癌和161例癌旁正常胃组织标本中SETDB1的表达情况。结果: 在胃癌组织中SETDB1阳性表达定位于细胞质和细胞质伴细胞核, 77例在细胞质阳性表达, 其中45例伴有细胞核表达; 在癌旁正常胃组织中, SETDB1阳性表达定位于细胞质; SETDB1的细胞质表达与临床病理特征不相关($P>0.05$); SETDB1的细胞核表达与胃癌浸润深度、淋巴结转移和pTNM分期相关($P<0.05$), 与其他病理特征无关。生存和预后分析结果显示: SETDB1细胞核阳性表达组患者术后生存时间低于SETDB1阴性表达组($P<0.05$), 胃癌浸润深度、淋巴结转移、pTNM分期和SETDB1细胞核阳性表达均是影响胃癌患者预后的重要因素, 但只有pTNM分期是胃癌患者预后的独立影响因素。结论: 胃癌细胞核中的SETDB1异常表达可能参与了胃癌的发生发展, 其高表达可能和胃癌的恶性生物学行为及预后评估相关。

[关键词] 胃癌; SETDB1; 预后; 亚细胞定位

Expression and significance of the SETDB1 in gastric cancer

LI Jinmei¹, CHEN Hong¹, DU Qiang², WANG Xu¹, MA Qiushuang¹, LI Xiaoli³, ZHANG Jinku¹

(1. Department of Pathology, First Central Hospital, Baoding Hebei 071000; 2. Department of Pathology, Second Hospital of Korla of Xinjiang Production and Construction Corps, Korla Xinjiang 841000; 3. Department of Pathology, Linyi Peoples' Hospital, Linyi Shandong 276000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the significance of SETDB1 protein located at different sites of cells in gastric cancer and adjacent normal tissues. **Methods:** SP immunohistochemical stain (IHC) was used to examine the expression of SETDB1 in 161 cases of gastric cancer and adjacent tissues. **Results:** The SETDB1 cytoplasmic positivity was observed in 77 cases, whereas 45 of them accompanied with nuclear expression. SETDB1 cytoplasmic positive expression was not correlated with clinicopathological features of gastric adenocarcinoma. But the SETDB1 nuclear positivity was correlated with the depth of tumor infiltration, pTNM staging, lymph node metastasis. Kaplan-Meier single factor and Log-rank analysis showed that the SETDB1 nuclear positivity, lymph

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-03

通信作者 (Corresponding author): 张金库, Email: 2286917939@qq.com; 李小莉, Email: lixiaoli@163.com

基金项目 (Foundation item): 保定市科技局计划内项目 (17ZF220); 河北省重点研发计划健康医疗与生物医药专项项目 (18277732D)。This work was supported by Projects Planned by Baoding Science and Technology Bureau (17ZF220) and Key R&D Program of Special Projects of Health Care and Biomedicine of Hebei Province (18277732D), China.

node metastasis, depth of cancer invasion and pTNM staging were all the important prognostic factors for patients with gastric cancer, the survival time of patients with SETDB1 nuclear positivity was lower than that of SETDB1 nuclear negativity ($P < 0.05$); COX regression model analysis showed that pTNM staging was important independent prognostic factors. **Conclusion:** The abnormal expression of SETDB1 in the cell nucleus may be involved in the development of gastric cancer, and its high expression may be related to the malignant biological behavior and poor prognosis of gastric cancer.

Keywords gastric cancer; SETDB1; subcellular localization; prognosis

胃癌是世界上常见的恶性肿瘤之一, 病死率高, 严重威胁人类健康。国际癌症研究机构的最新数据^[1]表明: 全球胃癌病死率占恶性肿瘤第3位, 发病率占第5位; 在全球183个国家中, 我国胃癌发病和死亡人数约占世界总数的一半, 位于发病率第5位、病死率第6位。我国《2017中国肿瘤登记年报》数据^[2]显示: 虽然胃癌的发病率有降低趋势, 但城市人口中, 胃癌仍居男性癌症发病率的第2位, 女性居第4位。因此, 胃癌不仅严重危害人民的生命健康, 更引发了沉重的家庭和社会经济负担^[3]。表观遗传学是一门遗传学分支学科, 指DNA序列不发生改变的情况下, 基因表达水平发生的可遗传变化, 其机制为: 组蛋白修饰(histone modification)、DNA的甲基化(DNA methylation)和非编码RNA(ncRNA)的调控等^[4]。将表观遗传修饰作用的蛋白质和酶作为靶点, 逆转组蛋白异常修饰和DNA甲基化等机制, 已成为肿瘤领域研究的热点^[5]。

SETDB1是H3K9特异性甲基转移酶, 位于人染色体1q21(20), 通过对H3的赖氨酸9位点三甲基化, 可以调控基因转录过程^[6]。文献^[6]报道SETDB1异常表达与多种肿瘤的发生和预后密切相关, 然而SETDB1在胃癌中的表达及其与预后的关系国内外尚无研究。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2014年1月至2017年10月期间保定市第一中心医院病理科手术切除后的胃癌病历资料和石蜡标本共161例, 其中女45例, 男116例, 中位年龄64岁; 正常胃组织黏膜患者161例(距瘤缘 ≥ 5 cm)为对照组。所有胃癌患者术前未经任何治疗。所有标本均为术后立即取材, 固定于10%的中性甲醛溶液中, 石蜡包埋。本实验已通过保定市

第一中心医院医学伦理委员会的审批。

1.2 试剂

SETDB1(兔抗人单克隆抗体, 货号: PAB14666)购自美国Abnova公司, 通用型SP免疫组织化学试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 免疫组织化学

采用SP方法, 操作步骤主要参照试剂盒说明书进行。阳性对照参照试剂说明书, 阴性对照以PBS液代替一抗。

1.4 免疫组织化学结果判读

由两位病理学专家采用双盲法阅片以判定结果。SETDB1阳性表达部位为细胞质和细胞质伴细胞核, 着棕黄色颗粒。在病变处随即选取10个高倍镜视野($\times 400$), 每个视野计数100个细胞数。评分标准: 按着色癌细胞占所观察癌细胞的百分比, $< 5\%$ 为0分, $5\% \sim 50\%$ 为1分, $> 50\%$ 是2分^[6], 0~1分为阴性, 2分为阳性。

1.5 随访

随访采用打电话的方式, 随访时间为1~48个月, 155例胃癌患者有完整的随访资料, 生存79例, 死亡76例, 总生存期为自手术日期至死亡或随访结束日期。

1.6 统计学处理

应用SPSS 12.0统计软件进行数据分析。SETDB1与临床病理特征的关系用 χ^2 检验, 影响预后的单因素分析和生存分析用Kaplan-Meier单因素分析并绘制生存曲线图, 用Log-rank法检验差异性; 影响预后的多因素分析用Cox回归模型; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SETDB1 在胃癌组织和癌旁正常黏膜中表达差异比较

在胃癌组织中SETDB1阳性表达部位为细胞质和细胞核伴细胞核, SETDB1在77例胃癌中阳性表达, 细胞质定位77例, 其中45例伴细胞核定位; 在癌旁正常胃组织中, 72例呈阳性表达, 均位于细胞质(图1)。细胞质SETDB1阳性表达在胃癌和癌旁正常黏膜中的差异无统计学意义($\chi^2=0.312$, $P=0.576$), 但细胞核阳性定位表达在两组中差异

具有统计学意义($\chi^2=52.310$, $P<0.001$, 表1)。

2.2 SETDB1 亚细胞阳性定位表达与胃癌临床病理特征的关系

SETDB1细胞质阳性表达77例, 细胞质阳性表达与胃癌患者年龄、性别、浸润深度、pTNM分期和淋巴结转移不相关($P>0.05$, 表2)。

SETDB1细胞核阳性表达45例, 其高表达与胃癌患者年龄和性别无关, 但与胃癌浸润深度、pTNM分期和淋巴结转移相关($P<0.05$, 表2)。

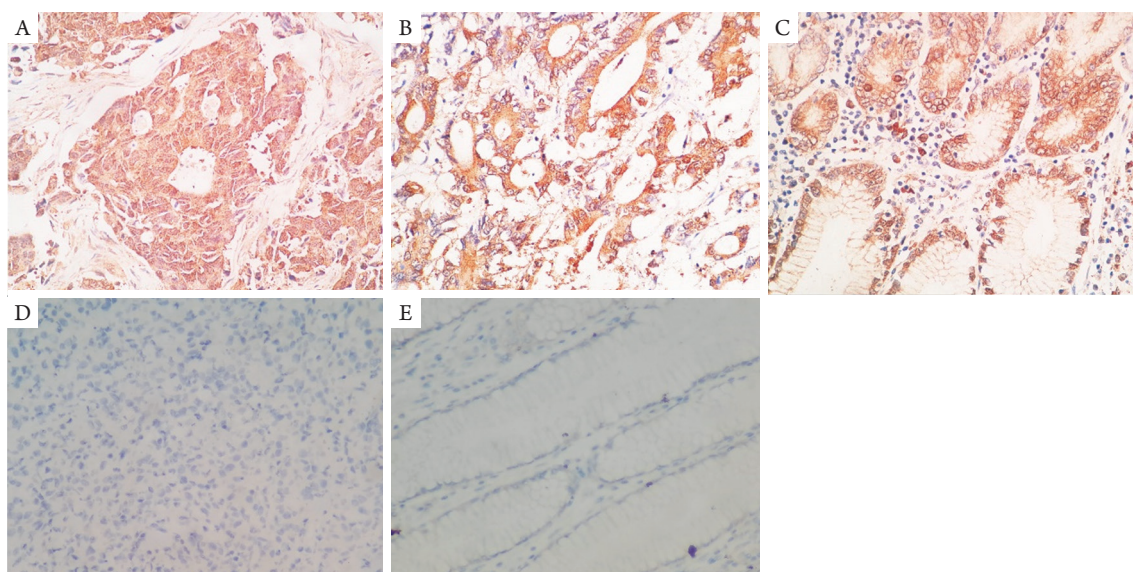


图1 SETDB1 在胃癌和癌旁正常粘膜的亚细胞阳性定位表达(SP, $\times 400$)

Figure 1 Differential expression of SETDB1 protein subcellular localization in gastric cancer and adjacent normal mucosa (SP, $\times 400$)

(A) SETDB1在胃癌细胞质和细胞核的阳性表达; (B) SETDB1在胃癌细胞细胞质阳性表达; (C) SETDB1在癌旁正常黏膜中的细胞质阳性表达; (D) SETDB1在胃癌细胞中的阴性表达; (E) SETDB1在在癌旁正常黏膜中的阴性表达。

(A) Positive expression of SETDB1 in cytoplasm and nucleus of gastric cancer; (B) Positive expression of SETDB1 in cytoplasm of gastric cancer; (C) Positive expression of SETDB1 in cytoplasm of adjacent normal mucosa; (D) Negative expression of SETDB1 in gastric cancer; (E) Negative expression of SETDB1 in adjacent normal mucosa.

表1 SETDB1蛋白亚细胞阳性定位表达在胃癌和癌旁正常黏膜中差异分析($n=161$)

Table 1 Differential expression of SETDB1 protein subcellular localization in gastric cancer and adjacent normal mucosa ($n=161$)

组别	SETDB1高表达亚细胞定位/[例(%)]			
	细胞核		细胞质	
	-	+	-	+
胃癌组	116 (72.0)	45 (28.0) [#]	84 (52.2)	77 (47.8)
正常黏膜组	161 (100.0)	0 (0)	89 (55.3)	72 (44.7)

与正常黏膜组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

Compared with the normal mucosa group, $^{\#}P<0.05$.

2.3 胃癌组织中 SETDB1 表达与生存时间的关系

SETDB1 细胞核阳性表达胃癌患者术后中位生存时间为 25 个月, SETDB1 细胞核阴性表达患者术后中位生存时间为 36 个月, log-rank 法分析二者差异具有统计学意义 ($\chi^2=5.505$, $P=0.019$; 图2)。

SETDB1 细胞质阳性表达的胃癌患者术后生存时间为 28 个月, SETDB1 细胞质阴性表达的患者

术后生存时间为 29 个月, 两组差异无统计学意义 ($\chi^2=0.081$, $P=0.776$; 图3)。

Log-rank 法单因素分析结果显示: 胃癌患者淋巴结转移情况、pTNM 分期和 SETDB1 细胞核表达均是影响术后总生存率的重要因素, 性别、年龄与术后生存时间无关(表3); 多因素 COX 回归模型分析显示: 只有 pTNM 分期是胃癌患者预后的独立影响因素(表4)。

表2 SETDB1 亚细胞定位表达与胃癌临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between SETDB1 subcellular localization and clinicopathological features of gastric cancer

临床病理参数	n	SETDB1 胞核阳性 表达/[例(%)]	χ^2	P	SETDB1 胞质阳性 表达/[例(%)]	χ^2	P
性别			1.018	0.313		1.533	0.216
男	116	35 (30.2)			59 (50.9)		
女	45	10 (22.2)			18 (40.0)		
年龄/岁			0.839	0.360		3.721	0.054
≤64	88	22 (25.0)			36 (40.9)		
>64	73	23 (31.5)			41 (56.2)		
浸润深度			4.734	0.030		0.266	0.606
T1~2	32	4 (12.5)			14 (43.8)		
T3~4	129	41 (31.8)			63 (48.8)		
淋巴结转移			12.822	<0.001		1.450	0.703
N0	52	5 (9.6)			26 (50.0)		
N1~3	109	40 (36.7)			51 (46.8)		
pTNM			24.165	<0.001		3.446	0.063
I~II	75	7 (9.3)			30 (40.0)		
III	86	38 (44.2)			47 (54.7)		

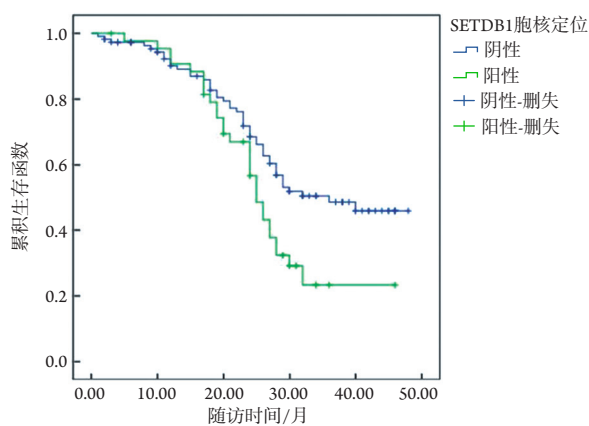


图2 胃癌组织中 SETDB1 细胞核表达与生存时间的关系

Figure 2 Relationship between SETDB1 nuclear localization and survival time in patients with gastric cancer

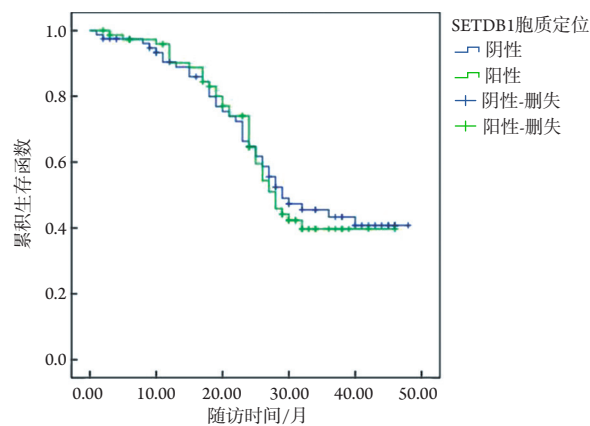


图3 胃癌组织中 SETDB1 细胞质表达与生存时间的关系

Figure 3 Relationship between SETDB1 cytoplasmic localization and survival time in patients with gastric cancer

表3 影响胃癌患者预后的单因素分析结果(Log-rank法)
Table 3 Univariate analysis on the factors affecting prognosis of patients (Log-rank analysis)

因素	χ^2	P
年龄	0.16	0.900
性别	0.355	0.552
淋巴结转移	28.640	<0.001
pTNM	48.257	<0.001
浸润深度	11.855	0.001
SETDB1细胞核表达	5.505	0.019
SETDB1细胞质表达	0.081	0.776

表4 影响胃癌患者预后的多因素COX回归分析
Table 4 Multivariate COX regression analysis of prognostic factors in patients with gastric cancer

因素	总体生存率	
	HR (95%CI)	P
SETDB1胞核定位表达	0.765 (0.464~1.259)	0.292
淋巴结转移	1.664 (0.631~4.387)	0.303
TNM分期	4.091 (1.717~9.749)	0.001
浸润深度	1.432 (0.508~4.042)	0.497

3 讨论

表观遗传学对肿瘤的生长调控是目前的研究热门。众多报道^[5]表明：组蛋白的甲基化在肿瘤的发生、发展过程中扮演关键的角色。因此，组蛋白甲基化转移酶的功能和作用机制引起了人们的高度关注。

SETDB1是甲基酶中的一员，它主要参与H3K9me3的甲基化，通常引起转录抑制和基因沉默，其表达异常参与了多种肿瘤的发生和发展，如结直肠癌^[7]、肺癌^[8]、肝癌^[9]、乳腺癌^[10]、恶性黑色素瘤^[11]、神经母细胞瘤^[12]和肾细胞癌^[13]等，并与多种肿瘤不良预后相关。SETDB1在恶性肿瘤中的作用主要包括：1)促进肿瘤增殖和迁徙，抑制凋亡，具体作用机制包括抑制TP53和Bax的表达^[8,13-14]、激活WNT通路^[8]和降低HoxA基因的表达^[6]等。2)免疫逃逸。Robbez-Masson等^[15]研究发现：在急性髓系白血病患者中，SETDB1能沉默其逆转座子，逃避先天免疫。3)促进上皮间质转

化。在生理条件下，SETDB1抑制EMT^[16]，然而在乳腺癌中SETDB1异常表达，促进上皮间质转化和癌细胞转移^[6]。

本研究结果显示：SETDB1在正常胃黏膜阳性表达定位于细胞质，在胃癌组织中SETDB1阳性表达定位于细胞质和细胞质伴细胞核；细胞质定位阳性表达在胃癌和癌旁正常黏膜中的差异无统计学意义，但两组SETDB1细胞核阳性定位表达差异具有统计学意义。SETDB1在胃癌中的研究极少。有研究^[7]采用免疫组织化学的方法检测了6例胃癌和8例癌旁正常胃黏膜中SETDB1的表达，未发现明显表达差异。此报道与本研究结果不一致，可能与样本数及SETDB1表达分析方法不同有关。

SETDB1的蛋白定位尚有争议，目前主要是细胞质、细胞核、细胞质伴细胞核等3种定位，如在恶性黑色素瘤^[11]中定位于细胞质和细胞核；在肺癌^[8]和乳腺癌^[17]中定位于细胞核；而在结直肠癌中，这3种定位情况均有报道^[7,14,18]。用免疫标记的方法，从表位标记了组蛋白H3的HeLa S3细胞核和细胞质提取物中均检测到SETDB1^[19]。SETDB1阳性亚细胞定位改变是其在细胞核和细胞质之间运动的结果，此运动受到两个核输出信号(nuclear export signals, NESs)和两个核定位信号(nuclear localization signals, NLSs)的紧密调控^[6]。

本研究结果显示：SETDB1细胞核定位阳性表达与胃癌患者年龄和性别无关；但与胃癌浸润深度、pTNM分期和淋巴结转移相关；而SETDB1细胞质定位与临床病理特征均无关。生存和预后影响因素分析显示，SETDB1细胞核阳性表达患者术后生存时间高于细胞核阴性表达患者，是胃癌患者预后的重要影响因素，但只有pTNM分期是影响胃癌患者预后的独立因素。Kostaki等^[11]报道：在57例黑色素瘤中，47例SETDB1定位在细胞核，27例定位在细胞质，细胞质定位与P16^{INK4A}高频率甲基化相关，细胞核定位与高增殖活性相关。因此推测SETDB1的亚细胞定位可能和功能相关，细胞核中SETDB1的异常表达可能参与了胃癌的发生发展，并且可能和胃癌的恶性生物学行为及预后评估相关，其具体机制仍需进一步研究。

参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in

- GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
2. 赫捷, 陈万青. 2017年中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
HE Jie, CHEN Wanqing. China cancer registry annual report[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
 3. 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.
ZUO Tingting, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 44(1): 52-58.
 4. 魏民. SETDB1在前列腺癌发生发展中的作用机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
WEI Min. The role of SETDB1 in the Prostate Carcinogenesis[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2012.
 5. 周葵, 王俊杰. CDH13在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30(3): 267-275.
ZHOU Wu, WANG Junjie. Research progress of CDH13 in malignant tumors[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(3): 267-275.
 6. Karanth AV, Maniswami RR, Prashanth S, et al. Emerging role of SETDB1 as a therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(3): 319-331.
 7. Ho YJ, Lin YM, Huang YC, et al. Significance of histone methyltransferase SETDB1 expression in colon adenocarcinoma[J]. *APMIS*, 2017, 125(11): 985-995.
 8. Sun QY, Ding LW, Xiao JF, et al. SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signaling pathway[J]. *J Pathol*, 2015, 235(4): 559-750.
 9. Wong CM, Wei L, Law CT, et al. Up-regulation of histone methyltransferase SETDB1 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes cancer metastasis[J]. *Hepatology*, 2016, 63(2): 474-487.
 10. Regina C, Compagnone M, Peschiaroli A, et al. Setdb1, a novel interactor of ΔNp63, is involved in breast tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 28836-28848.
 11. Kostaki M, Manona AD, Stavrika I, et al. High-frequency p16(INK) (4A) promoter methylation is associated with histone methyltransferase SETDB1 expression in sporadic cutaneous melanoma[J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(5): 332-338.
 12. 祝顺琴. 组蛋白H3K9甲基化转移酶SETDB1对神经母细胞瘤增殖与分化的调控研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2014: 1-111.
ZHU Shunqin. The role of H3K9 methyltransferase SETDB1 in regulation of proliferation and differentiation in neuroblastoma[D]. Chongqing: Chongqing University, 2014: 1-111.
 13. 周颖, 陈萱. 沉默SETDB1对肾癌细胞生长的影响及分子机制研究[J]. *中国临床研究*, 2016, 29(7): 896-903.
ZHOU Ying, CHEN Xuan. The effect of SETDB1 silence on growth of human renal carcinoma cells and its molecular mechanism[J]. *Chinese Journal of Clinical Research*, 2016, 29(7): 896-903.
 14. Chen K, Zhang F, Ding J, et al. Histone methyltransferase SETDB1 promotes the progression of colorectal cancer by inhibiting the expression of TP53[J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3318-3330.
 15. Robbez-Masson L, Tie CHC, Rowe HM. Cancer cells, on your histone marks, get SETDB1, silence retrotransposons, and go![J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(11): 3429-3431.
 16. Du D, Katsuno Y, Meyer D, et al. Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls Snail expression and epithelial-mesenchymal transition[J]. *EMBO Rep*, 2017, 19(1): 135-155.
 17. 王小利, 许德英, 刘刚, 等. SETDB1在乳腺癌中的表达及对癌细胞增殖和迁移能力的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(8): 1081-1087.
WANG Xiaoli, XU Deying, LIU Gang, et al. SETDB1 expression in breast cancer and the effect on the proliferation and migration ability of cancer cells[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2016, 51(8): 1081-1087.
 18. 寇玉玲. SETDB1在结直肠癌增殖和凋亡中的作用研究[D]. 四川: 西南医科大学, 2017.
KOU Yuling. The role of SETDB1 in the proliferation and apoptosis of colorecta[D]. Sichuan: Southwest Medical University, 2017.
 19. Loyola A, Bonaldi T, Roche D, et al. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic stage[J]. *Mol Cell*, 2006, 24(2): 309-316.

本文引用: 李金梅, 陈红, 杜强, 王旭, 马秋双, 李小莉, 张金库. SETDB1在胃癌中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(4): 728-733. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.006

Cite this article as: LI Jinmei, CHEN Hong, DU Qiang, WANG Xu, MA Qiushuang, LI Xiaoli, ZHANG Jinku. Expression and significance of the SETDB1 in gastric cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(4): 728-733. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.006