

# Expression of MARCH2 and DLG1 in Esophagus Cancer and Their Clinical Significance

Dan Xia

Pathology Department of Shandong Medical College, Linyi Shandong  
Email: mary3515813@163.com

Received: Apr. 16<sup>th</sup>, 2019; accepted: May 2<sup>nd</sup>, 2019; published: May 9<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Aims:** This study aimed to investigate whether the expressions of MARCH2 and DLG1 in esophagus carcinomas were associated with clinicopathological parameters. **Methods:** The expressions of MARCH2 and DLG1 were examined in 50 cases of esophagus carcinomas and 20 normal esophagus tissues using immunohistochemical staining. **Results:** The positive rates of MARCH2 and DLG1 expressions in 50 cases of esophagus carcinoma were 84% and 18% respectively, whereas the positive expression rates of MARCH2 and DLG1 in non-tumor intestinal tissues were 25% and 85% respectively. The positive expressions of MARCH2 were closely related to larger tumor, poor differentiation, deeper invasion, lymphnode metastasis and advanced TNM stage. In addition, loss of expression of DLG1 was significantly associated with poor differentiation, deeper invasion, lymphnode metastasis and advanced TNM stage. Furthermore, there were significant negative correlations between MARCH2 and DLG1 expression. **Conclusions:** The overexpression of MARCH2 and loss of expression of DLG1 were possibly involved in the development of esophagus carcinomas, and had correlations with low differentiation degree and bad prognosis. MARCH2 antagonized DLG1 to promote invasion and metastasis of esophagus cancer.

## Keywords

Esophagus Cancer, MARCH2, DLG1, Immunohistochemistry

# 食管癌中MARCH2和DLG1的表达及其临床意义

夏丹

山东医学高等专科学校病理教研室, 山东 临沂  
Email: mary3515813@163.com

## 摘要

目的：检测食管癌组织中膜相关环指蛋白2 (MARCH2)和肿瘤抑制蛋白(DLG1)的蛋白表达水平并分析其与临床病理参数的关系及两者的相关性。方法：用免疫组织化学方法检测50例食管癌及20例正常食管组织中MARCH2和DLG1的蛋白表达水平。结果：MARCH2和DLG1在50例食管癌组织中的阳性表达率分别为84%和18%，而MARCH2和DLG1在非肿瘤肠组织中的阳性表达率分别为25%和85%。MARCH2的阳性表达与更大肿瘤直径、不良分化、深度浸润、淋巴结转移和更高的TNM分期密切相关。DLG1表达的缺失与不良分化、深度浸润、淋巴结转移和更高的TNM分期密切相关。而且，MARCH2和DLG1的表达呈显著负相关。结论：MARCH2的高表达和DLG1表达的缺失可能促进食管癌的发生发展，并且与低分化和预后不良有关。MARCH2拮抗DLG1以促进食管癌的侵袭和转移。

## 关键词

食管肿瘤，MARCH2，DLG1，免疫组织化学

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

食管癌是最具侵袭性的癌症之一，是世界范围内癌症致死的第六大原因。全球大约 70%的食管癌发生在中国。目前，食管癌的早期诊断和治疗方法有限，导致患者五年生存率只有 10% [1]。

MARCH2 (Membrane-associated RING-CH protein 2)是 MARCH 家族成员之一(MARCH1-11)，含有 RING 结构域、两个跨膜区和 PDZ 结构域[2]。MARCH2 最初被认为是与病毒免疫逃逸蛋白相关的泛素连接酶家族成员之一[2]。功能性研究显示 MARCH2 能减低细胞表面受体如转铁蛋白受体和共刺激分子 B7.2 [2]。Nakamura 研究团队发现 MARCH2 可以直接特异性结合 STX6，参与内体到高尔基体的运输[3]。Guggino 的研究显示 MARCH2 可以结合 CAL 和 STX6，促进 CFTR 的泛素化和降解[4]。Shenoy 报道 MARCH2 与  $\beta$ 2AR 相互结合可以促进  $\beta$ 2AR 的泛素化，调节  $\beta$ 2AR 在细胞表面的水平[5]。近来，Xavier 课题组证实 MARCH2 通过 PDZ 膜序与 DLG1 相互作用，促进 DLG1 泛素化并减低 DLG1 在细胞链接处的表达水平，干扰细胞的极性[6]。另有报道称 DLG1 在人类肿瘤中发挥重要作用[7]。

DLG1 (Human Discs large tumour suppressor)是膜相关的鸟苷酸激酶家族一员，包含多个 PDZ 结构域 (PSD, DLG1, ZO-1)，每个 PDZ 由 90 个氨基酸左右组成，能够通过特异性识别配体蛋白 C 末端的氨基酸残基介导蛋白质之间的相互作用，属于分子脚手架蛋白。DLG1 是 Scribble 极性复合体的一个组成部分，参与调节细胞极性和增殖，在上皮组织和细胞生长调控之间发挥重要的连接作用[8] [9]。有文献报道，在几种不同类型肿瘤中，DLG1 的表达缺失与恶性进展的晚期时细胞极性和组织架构的完全缺失密切相关，因此定义 DLG1 为潜在的肿瘤抑制因子[10] [11]。此外，DLG1 在人类发挥肿瘤抑制活性的最令人信服的依据是 DLG1 被鉴定为几种病毒癌基因蛋白的靶标，如人乳头状瘤病毒(HPV) E6，人 T 细胞白血病病毒类型 1Tax 和腺病毒类型 9 E4-ORF1 [12]。然而，近来的研究显示 DLG1 在一些特异的环境中可以获得癌

基因属性, DLG1 表达减低在人类肿瘤生成中发挥重要的作用[9]。

在本研究中, 我们应用免疫组织化学染色的方法检测了 50 例食管癌组织中 MARCH2 和 DLG1 的表达情况, 并对 MARCH2 和 DLG1 表达之间相关性以及二者与临床病理参数之间的相关性进行了分析。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 临床食管癌标本

回顾性分析 2004 年 3 月~2014 年 10 月在山东医学高等专科学校附属医院进行手术治疗的 50 例食管癌患者的临床资料, 选取癌旁正常食管组织 20 例作为对照。所有患者均经 2 名病理医师确诊为食管癌。所选病例临床资料完整。该研究已获得相应的伦理许可。

### 2.2. 试剂及抗体

多克隆兔抗人 MARCH2 抗体购自美国 Abcam 公司; 多克隆兔抗人 DLG1 抗体购自美国 Abclonal 公司, 免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥公司。

### 2.3. 检测方法

应用免疫组化 SP 法进行指标检测。所有采集的标本均制成蜡块, 连续切片, 厚 4  $\mu\text{m}$ , 脱蜡、水化, 3%过氧化氢甲醇溶液去除内源性过氧化物酶, PBS 缓冲液冲洗, EDTA (pH = 9.0) 高压热修复, 滴入 1:100 稀释的一抗 MARCH2 或 1:100 稀释的一抗 DLG1, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 滴入二抗, 室温 1 小时, DAB 显色。用已知 MARCH2 和 DLG1 阳性切片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

### 2.4. 结果评估

每张切片随机选取有代表意义的 5 个高倍视野, 每高倍视野需计数 200 个细胞, 应用 IRS 免疫反应评分(immunoreactivity score) [13], 把着色细胞数的比例和着色的强度结合起来。① 按着色细胞占计数细胞百分比计分: 0 分(阴性), 1 分(<10%), 2 分(11%~50%), 3 分(51%~80%), 4 分(>80%)。② 按着色的强度计分: 0 分(无着色), 1 分(淡黄色), 2 分(黄色), 3 分(棕黄色)。总分 = ①  $\times$  ②: 0 分(阴性, -); 1~3 分(弱阳性, +); 4~7 分(中等阳性, ++); 8~12 分(强阳性, +++).

### 2.5. 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 两变量间的相关性采用 Spearman 等级相关性分析,  $P < 0.05$  的差异具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. MARCH2 和 DLG1 的检测结果

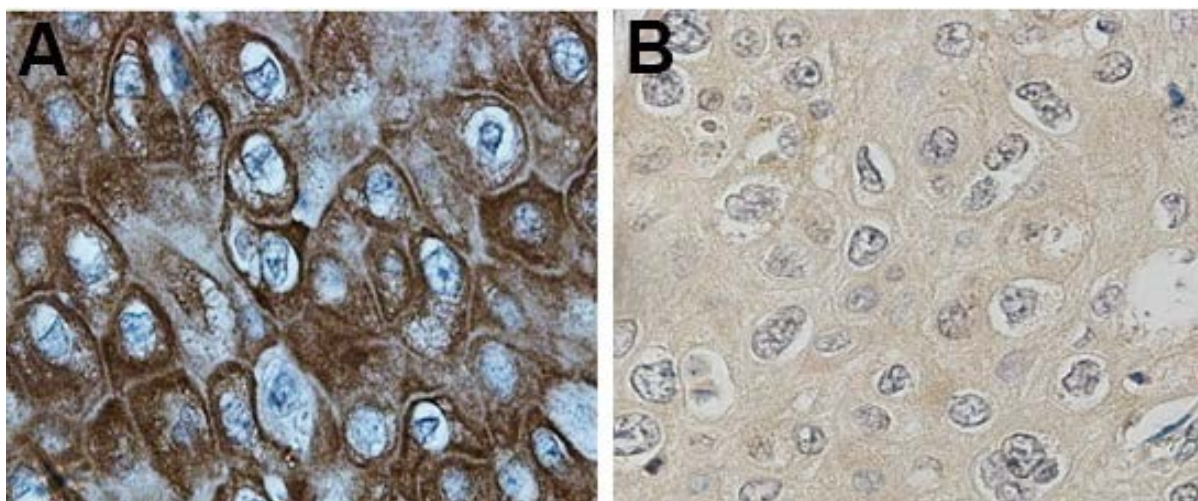
MARCH2 呈弥漫的棕色细颗粒状表达, 染色主要位于肿瘤细胞的细胞质, 部分位于细胞核(图 1 A)。MARCH2 在 50 例食管癌组织中, 呈现阴性表达的有 8 例, 呈现弱阳性表达的有 9 例, 呈现中度阳性表达的有 21 例, 呈现强阳性表达的有 12 例。MARCH2 在食管癌组织中的阳性表达率为 84% (42/50)。在 20 例非肿瘤食管组织中, 有 15 例呈现阴性表达, 5 例呈现弱阳性表达。MARCH2 在非肿瘤食管组织中阳性表达率为 25% (5/20)。MARCH2 在食管癌组织中的阳性表达率 84% (42/50) 明显高于非肿瘤食管组织 6.7% (2/30), 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 表 1, 图 1 A)。

DLG1 染色主要位于肿瘤细胞的细胞质和(或)细胞膜(图 1 B)。在 50 例食管癌组织中, DLG1 的阳性

表达率为 18% (9/50)。在 20 例非肿瘤食管组织中, 有 3 例为阴性表达, 3 例为弱阳性表达, 10 例呈现中度阳性表达, 4 例呈现强阳性表达。DLG1 在非肿瘤食管组织中阳性表达率为 85.0% (17/20)。DLG1 在食管癌组织中的阳性表达率 18% (9/50) 明显低于非肿瘤食管组织 85% (17/20), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 1, 图 1 B)。

**Table 1.** Expression of MARCH2 and DLG1 in esophagus carcinomas and non-tumor esophagus tissues  
**表 1.** MARCH2 和 DLG1 在食管癌及非肿瘤食管组织中的表达

免疫染色	标本类型	
MARCH2	非肿瘤食管组织	食管癌组织
-	15	8
+	5	9
++	0	21
+++	0	12
标本总数	20	50
阳性率(%)	25.0%	84.0%
DLG1	非肿瘤食管组织	食管癌组织
-	3	41
+	3	9
++	10	0
+++	4	0
标本总数	20	50
阳性率(%)	85.0%	18.0%



**Figure 1.** Immunohistochemical staining for MARCH2 and DLG1 in human esophagus cancer tissues. (A) Positive expression of MARCH2 was detected by immunohistochemical staining (SP,  $\times 400$ ); (B) Positive expression of DLG1 was detected by immunohistochemical staining (SP,  $\times 400$ )

**图 1.** MARCH2 和 DLG1 在食管癌组织中的免疫组织化学染色; (A) MARCH2 在食管癌组织中的阳性表达 (SP,  $\times 400$ ); (B) DLG1 在食管癌组织中的阳性表达 (SP,  $\times 400$ )

### 3.2. MARCH2 和 DLG1 的表达与患者临床病理特征的关系

根据免疫组织化学染色的 IRS 评分, 我们分析了 MARCH2 和 DLG1 表达与食管癌患者的临床病理特征的关系。如表 2 所示, MARCH2 的阳性表达与食管癌更大的肿瘤直径( $P < 0.05$ )、更差的分化程度( $P < 0.01$ )、更深的浸润深度( $P < 0.01$ )、淋巴结转移( $P < 0.05$ )和更高的 TNM 分期密切相关( $P < 0.01$ )。MARCH2 的阳性表达与年龄和性别没有明显的相关性。DLG1 的阳性表达与食管癌患者的更差的分化程度( $P < 0.05$ )、更深的浸润深度( $P < 0.05$ )、淋巴结转移( $P < 0.01$ )和更高的 TNM 分期( $P < 0.01$ )密切相关。DLG1 的阳性表达与性别、年龄和肿瘤大小没有明显的相关性。

**Table 2.** Association of MARCH2 and DLG1 staining with clinicopathological characteristics

**表 2.** MARCH2 和 DLG1 表达与食管癌临床病理特征的关系

临床病理特征	MARCH2		$\chi^2$	P 值	DLG1		$\chi^2$	P 值
	-	+~+++			-	+~+++		
性别								
男	3	21	0.42	>0.05	21	5	0.06	>0.05
女	5	21			20	4		
年龄(岁)								
<60	5	20	0.06	>0.05	22	4	0.28	>0.05
$\geq 60$	3	22			19	5		
肿瘤直径(cm)								
$\leq 5$ cm	6	14	5.36	<0.05	23	6	0.36	>0.05
>5 cm	2	28			18	3		
分化程度								
高+中	6	8	14.88	<0.01	16	7	5.28	<0.05
低	2	34			25	2		
浸润深度								
T1 + T2	6	12	7.19	<0.01	13	6	4.55	<0.05
T3 + T4	2	30			28	3		
淋巴结转移								
有	4	35	4.35	<0.05	34	2	13.0	<0.01
无	4	7			7	7		
TNM stage								
I + II	5	9	6.21	<0.01	6	6	14.9	<0.01
III + IV	3	33			35	3		

### 3.3. MARCH2 和 DLG1 之间的相关性

如表 3 所示, MARCH2 表达与 DLG1 表达呈现显著的负相关( $P < 0.001$ )。

**Table 3.** Correlation between MARCH2 and DLG1 in esophagus cancer tissues  
**表 3.** 食管癌组织中 MARCH2 和 DLG1 之间的相关性

	病例数	MARCH2 表达	
		+	P 值
DLG1 表达			
-	41	39 (95.1%)	<0.001
+	9	3 (33.3%)	

#### 4. 讨论

MARCH2 是由 N 端 RING 结构域、跨膜区以及 C 端的 PDZ 结构域组成的二次跨膜蛋白[2]。Xavier 科研团队证实 MARCH2 能够定位于 HEK293T 细胞的细胞膜[6]。作为 E3 泛素连接酶, MARCH2 在细胞的连接处促进 DLG1 的泛素化和降解, 干扰细胞极性。已有研究表明 DLG1 在人类肿瘤中发挥着重要的作用[7], 而 MARCH2 在肿瘤中的作用却鲜有报道。Suqihara [13]研究小组报道细胞极性决定因素 DLG1 的缺失是子宫内膜癌淋巴结转移和不良预后的新分子标志物。DLG1 位于正常子宫内膜组织的细胞膜。DLG1 缺失常出现在较晚临床分期、高级别组织学分级、淋巴结转移、深部子宫肌层浸润和阴性雌激素/孕激素受体的患者。DLG1 缺失的患者总生存率较低。体外实验表明在子宫内膜癌细胞中敲减 DLG1 导致肿瘤迁移和侵袭加速[11]。Daniela [14]课题组报道 DLG1 极性蛋白表达与低级别宫颈上皮内瘤变的疾病进展相关。他们的数据表明 DLG1 染色样式与正常组织相似的低度病变患者更有可能倒退(n = 23, Pattern I), 所有的弥漫的强 DLG1 染色的低度病变标本可能向高级别病变进展(n = 4, Pattern II)。最后, 所有持久稳固的低度病变的分析显示未确定的 DLG1 染色(弥漫分布且无高强度的染色) (n = 3, Pattern III)。他们发现 DLG1 表达样式和病变的进展呈显著相关性。因而, 我们提出一个假设, MARCH2 有可能是通过 DLG1 来参与肿瘤的发生及进展。

在本研究中, 我们用免疫组织化学染色的方法检测了食管癌组织中 MARCH2 和 DLG1 的表达情况, 并且分析了二者之间的相关性以及与临床病理特征的相关性。我们发现 MARCH2 在食管癌组织中的表达比在非肿瘤食管组织显著升高, 提示 MARCH2 可能参与了肿瘤的发生。尤其是, 我们的结果显示 MARCH2 的阳性染色更多出现在肿瘤直径更大、不良分化、浸润更深、有淋巴结转移和更高 TNM 分期的肿瘤, 提示 MARCH2 可能在肿瘤的进展中发挥作用。相反, 食管癌组织中 DLG1 的表达比在非肿瘤食管组织中有明显降低, 而且 DLG1 的表达缺失与不良分化、浸润更深、淋巴结转移和更高的 TNM 分期密切相关。此外, MARCH2 表达与 DLG1 呈负性相关。这些结果提示 MARCH2 过表达和 DLG1 低表达参与了食管癌的发生及进展。MARCH2 和 DLG1 的联合检测可能为食管癌的诊断、治疗和预后提供依据。

#### 基金项目

本研究由国家自然科学基金项目(81702776); 山东省高等学校科技计划项目(J17KA238); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0569)资助。

#### 参考文献

- [1] Song, Y., *et al.* (2014) Identification of Genomic Alterations in Oesophageal Squamous Cell Cancer. *Nature*, **509**, 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature13176>
- [2] Bartee, E., Mansouri, M., Hovey, N.B., Gouveia, K. and Fruh, K. (2004) Downregulation of Major Histocompatibility

- Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. *Journal of Virology*, **78**, 1109-1120. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1109-1120.2004>
- [3] Nakamura, N., Fukuda, H., Kato, A. and Hirose, S. (2005) MARCH-II Is a Syntaxin-6-Binding Protein Involved in Endosomal Trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 1696-1710. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0216>
- [4] Cheng, J. and Guggino, W. (2013) Ubiquitination and Degradation of CFTR by the E3 Ubiquitin Ligase MARCH2 through Its Association with Adaptor Proteins CAL and STX6. *PLoS ONE*, **8**, e68001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068001>
- [5] Han, S.O., *et al.* (2012) MARCH2 Promotes Endocytosis and Lysosomal Sorting of Carvedilol-Bound Beta(2)-Adrenergic Receptors. *The Journal of Cell Biology*, **199**, 817-830. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208192>
- [6] Cao, Z., Huett, A., Kuballa, P., Giallourakis, C. and Xavier, R.J. (2008) DLG1 Is an Anchor for the E3 Ligase MARCH2 at Sites of Cell-Cell Contact. *Cell Signal*, **20**, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.019>
- [7] Sandoval, G.J., *et al.* (2013) Novel Mechanism of Tumor Suppression by Polarity Gene Discs Large 1 (DLG1) Revealed in a Murine Model of Pediatric B-ALL. *Cancer Immunology Research*, **1**, 426-437. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0065>
- [8] Assemat, E., Bazellieres, E., Palesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008) Polarity Complex Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1778**, 614-630. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.029>
- [9] Roberts, S., Delury, C. and Marsh, E. (2012) The PDZ Protein Discs-Large (DLG): The “Jekyll and Hyde” of the Epithelial Polarity Proteins. *The FEBS Journal*, **279**, 3549-3558. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08729.x>
- [10] Facciuto, F., Cavatorta, A.L., Valdano, M.B., Marziali, F. and Gardiol, D. (2012) Differential Expression of PDZ Domain-Containing Proteins in Human Diseases-Challenging Topics and Novel Issues. *The FEBS Journal*, **279**, 3538-3548. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08699.x>
- [11] Sugihara, T., *et al.* (2016) Loss of the Cell Polarity Determinant Human Discs-Large Is a Novel Molecular Marker of Nodal Involvement and Poor Prognosis in Endometrial Cancer. *British Journal of Cancer*, **114**, 1012-1018. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.24>
- [12] James, C.D. and Roberts, S. (2016) Viral Interactions with PDZ Domain-Containing Proteins—An Oncogenic Trait? *Pathogens*, **5**, pii: E8. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010008>
- [13] Metindir, J., *et al.* (2008) Staining Characterization by Immunohistochemistry of Tumor Cancer Antigen in Patients with Endometrial Cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, **29**, 489-492.
- [14] Cavatorta, A.L., *et al.* (2017) DLG1 Polarity Protein Expression Associates with the Disease Progress of Low-Grade Cervical Intraepithelial Lesions. *Experimental and Molecular Pathology*, **102**, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.12.008>

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [acm@hanspub.org](mailto:acm@hanspub.org)