

# 肿瘤睾丸抗原 BORIS 研究进展

宋勇飞 方梦蝶 任娟 张衍梅

**摘要** 在世界卫生组织疾病统计中,肿瘤的发生率和病死率均很高,肿瘤的诊断和治疗已成为当今医学研究的热点和难点。肿瘤细胞中特异和异常表达的因子是肿瘤诊疗的潜在靶标。肿瘤睾丸抗原(cancer-testis antigen,CTA)印记位点调节物兄弟因子(the brother of the regulator of imprinted sites,BORIS)在多种肿瘤组织中特异性高表达,与肿瘤发生、发展以及恶性程度密切相关。BORIS通过调节启动子区域的甲基化水平影响原癌基因cMYC、乳腺癌基因BRCA1等下游靶基因的表达,改变肿瘤细胞生物学活性和分化干性,促进肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭。本文综述了BORIS在癌症发生、发展中的作用,阐述了BORIS在癌症诊疗中的研究价值和应用前景。

**关键词** BORIS CTA 肿瘤靶标 诊断 治疗

**中图分类号** R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.002

肿瘤在世界范围内极大地影响人类健康和生存。据推测,2017年,美国新增肿瘤患者1688780例,死亡600920例,其中男性发生率和病死率比女性高2倍和4倍<sup>[1]</sup>。2016年中国恶性肿瘤发生率为273.36/10万,恶性肿瘤病死率为164.73/10万<sup>[2]</sup>。早期发现和干预已成为肿瘤临床治疗的共识,肿瘤特异性标志物在诊断、预后及靶向治疗中的应用是延长肿瘤患者生存期的有效方法。目前在国内外临床上已得到应用的肿瘤靶标或标志物包括:表皮生长因子受体(EGFR),急性淋巴细胞白血病融合基因(BCR-ABL)和前列腺癌融合基因(TMPS2-ERG)等。然而,有限的标志物无法应对多种且复杂的肿瘤诊疗问题。近年来研究发现,肿瘤睾丸抗原(cancer-testis Antigen,CTA)印记位点调节因子(BORIS)在癌症组织中特异高表达,而在健康人的正常组织中BORIS仅在男性睾丸中高表达,它作为上游调控基因影响众多CTA因子如纽约食管鳞状上皮癌抗原NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1)、黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigen,MAGEA)家族因子等基因的表达<sup>[3]</sup>。由于BORIS具有良好的肿瘤特异性,这使其成为肿瘤诊疗的潜在靶标因子提供了可靠的基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301782);浙江省卫生科技计划项目(2017KY308);浙江省科技计划项目(2016F10009);浙江省医学科学院青年基金资助项目(AF1503Q)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院分子医学中心

通讯作者:张衍梅,副研究员,电子信箱:yanmeizhang81@yahoo.

com

## 一、BORIS与肿瘤的发生、发展密切相关

1. BORIS具有组织表达特异性: BORIS在众多肿瘤组织如乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、宫颈癌、黑色素瘤、白血病等组织中高表达,而相应癌旁组织中无BORIS或BORIS表达值很低。在部分报道中,Western blot法检测癌和癌旁组织时,BORIS在癌旁或正常组织中无表达,而组织免疫法显示癌旁或正常组织中信号值显著降低<sup>[4]</sup>。在健康人的组织中,BORIS在睾丸中表达丰富、而在卵巢和皮肤组织中仅有微量表达。外周血中BORIS自身抗体的出现与肿瘤发生密切相关,由于血睾屏障存在,睾丸中高表达的BORIS不会导致外周血中出现BORIS的自身抗体,这提示BORIS可用于肿瘤的无创诊断。

2. BORIS抑制癌细胞凋亡促进肿瘤干细胞发生: BORIS的高表达和亚细胞定位影响肿瘤的增殖、凋亡。BORIS抑制乳腺癌细胞凋亡促进癌细胞增殖。笔者前期研究也表明在结直肠癌细胞中干扰BORIS导致caspase-3/7活性上调,诱导癌细胞凋亡,同时BORIS定位在细胞质中可以抵抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的细胞凋亡<sup>[5,6]</sup>。

肿瘤干细胞是一类兼具干细胞特性的肿瘤细胞。它可以分化成各种类型的细胞并拥有自我更新的能力,对肿瘤的发生、发展、转移、侵袭产生重要影响。这类干细胞具有多种标志物,其中CD133、CD44、CD24、EpCAM、THY1、ABC5和CD200最为常见。Yamada等报道BORIS在肿瘤干细胞存在表达上调的情况。2015年,在宫颈癌、结直肠癌和侵袭性乳腺癌中发现,BORIS上调干细胞标志物基因(NANOG、

OCT4、SOX2 和 BMI1) 和肿瘤干细胞标志物基因 (ABCG2、CD44 和 ALDH1) 表达。Garikapati 等发现在以 CD133 和 CD44 为分类依据的 IMR-32 侧群细胞中, 敲除 BORIS 有利于上调 E-Cad(细胞上皮转间质样标志物), 同时下调 N-CAD、vimentin、SNAIL 等细胞间质转上皮样标志物。同时抑制 WNT 信号通路相关蛋白表达, 例如  $\beta$ -catenin、WNT3a/5a、CD44、MYC 等。其研究还发现 BMI1 的表达量与 BORIS 的水平呈正相关。在 BORIS 转基因小鼠中, 发现小鼠有胚胎发育异常, 眼睛发育阻滞, 血管缺损和死亡等症状, 这是由于小鼠胚胎干细胞中 BORIS 基因表达影响了转化生长因子 TGFB 通路的 14 种相关基因表达。

3. 肿瘤组织中 BORIS 转录和表达异常的分子机制: BORIS 基因又称为 CTCFL、CT27、CTCF-T、HMGB1L1 和 dJ579F20.2, 有 3 个启动子 A、B、C 分别位于 -2071 ~ -1276nt、-1106 ~ -996nt 和 -821 ~ -622nt 处, 3 个转录起始位点分别位于翻译起始位点 ATG 上游 -1447、-899 和 -658nt 处。启动子 A、B、C 的使用频率在不同肿瘤细胞系中有偏好。文献报道, 被检测的 30 个肿瘤细胞系中, 启动子 A/启动子 C 使用频率高达 84%。BORIS 的可变剪切可形成 23 个转录本和 17 个蛋白亚型。此外在基因组上, BORIS 基因还含有多种转录调控元件, 例如 CpG 岛、微卫星序列和 GATA/CCAAT 盒子, 在 Yoon 等<sup>[7,8]</sup>的研究中, 微卫星多态性序列 MS1 和 MS2 被鉴定在 BORIS 基因 ATG 上游 -5936 ~ -5734bp 和 -2586 ~ -1812bp 处。微卫星序列罕见等位基因 BORIS-MS2(包含 10 和 13 个重复序列) 与肺癌及乳腺癌的风险相关性显著( $P < 0.038$ )。BORIS 基因的转录还受到甲基化调控, 研究显示 BORIS 表达水平与其启动子区的甲基化水平呈正相关。在 DNMT 甲基转移酶缺失的肿瘤细胞系中, BORIS 高表达。此外, 研究发现辐射损伤可以诱导 RFX1 第 8 个内含子表达的 miRNA-709 上调, 抑制 BORIS 表达。Van Tongelen<sup>[9]</sup>报道低甲基化水平和 BORIS 的高表达与肿瘤的永生化和密切相关。

## 二、BORIS 在肿瘤发生、发展中的重要功能

1. BORIS 与甲基化: BORIS 通过增加启动子区组蛋白甲基化调控肿瘤相关基因的表达。BRCA1 和 C-MYC 基因的异常激活在乳腺癌和肠癌发生和发展中起了重要作用。研究表明, 在结直肠癌 HCT116 细胞系中, BORIS 结合 BAT3 (HLA-B associated

transcript 3) 蛋白募集 SET1A 甲基转移酶, 导致下游基因 MYC 和 BRCA1 启动子区组蛋白 H3K4 二甲基化, 激活 BRCA1 和 C-MYC 基因的表达, 诱导肿瘤发生。BAG-1 (BAG family molecular chaperone regulator 1) 是一类抗凋亡蛋白, 它可以与白血病 2 号基因 BCL2 结合诱导 BCL2 表达上调, Sun 等<sup>[10]</sup>研究发现, 干扰 BORIS 表达可以减少 BAG-1 启动子区组蛋白 H3K4 甲基化水平, 抑制 BAG-1 基因表达。

BORIS 通过减少启动子甲基化水平调控肿瘤相关基因的表达。肿瘤睾丸抗原 CTA 是一类睾丸组织和肿瘤组织特异表达的蛋白, 其中包括最早发现的 MAGEA 家族和 NY-ESO-1 抗原, 这两类蛋白在各种肿瘤组织中都有表达, 包括肝癌、结直肠癌、肺癌、黑色素瘤、乳腺癌等。研究发现, MAGEA 家族和 NY-ESO-1 蛋白与肝癌、乳腺癌的预后和分期相关, 可作为免疫治疗的一个靶点。BORIS 作为一个上游调控因子可以调控 MAGEA 和 NY-ESO-1 的表达。在肺癌细胞系 H1299 中, BORIS 富集在 MAGEA3 的启动子区域, 使 MAGEA3 启动子去甲基化, 上调 MAGEA3 的表达<sup>[11]</sup>。在 MCF-7 和 BCM1 细胞系中, BORIS 激活并去甲基化 MAGEA1 的启动子区, 上调 MAGEA1 的表达。NY-ESO-1 作为最新发现的睾丸相关癌抗原, 受到 BORIS 两方面的调控: 一方面, BORIS 可以直接结合在 NY-ESO-1 的启动子区, 影响其甲基化水平和表达; 另一方面, BORIS 可以募集 SP1 (specificity protein 1) 蛋白入核, 增加 NY-ESO-1 转录。

此外, BORIS 还调控肿瘤发生相关的其他众多因子。在结直肠癌中, FerT 是酪氨酸激酶 Fer 的一个特异的转录本。BORIS 结合 Fer 的第 10 号内含子上的启动子上调 FerT 的表达<sup>[12]</sup>。在 BORIS 阳性细胞系中, BORIS 也可以结合 TSP50 的启动子区, 上调其表达<sup>[13]</sup>。在 HNP1 和 HEK293T 细胞中, BORIS 可以直接结合 APC、TCF、LPD5/6、WNT5A 和 FZD5/10 转录本, 激活  $\beta$ -catenin 依赖的 WNT 信号通路。

2. BORIS 与 CTCF 竞争结合基因组 DNA 促进肿瘤发生: BORIS 蛋白是一类含有 11 个锌指结构域的转录因子, 与染色体活化, 肿瘤发生有关, BORIS 由 663 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 75.7kDa。其中, 259 ~ 568aa 为锌指结构域, 1 ~ 258aa 为 N 端, 569 ~ 663aa 为 C 端。据推测, BORIS 中间的锌指结构域可以结合靶基因的启动子区, 调控下游基因的转录。BORIS 蛋白的 C 端和 N 端可能参与调控 BORIS

的功能。笔者前期研究表明,结直肠癌细胞系中,ZF区域缺失导致BORIS定位于细胞质。虽然BORIS是CTCF(CCCTC结合因子)的唯一同源蛋白,但两者结合基因组的区域不尽相同。在K562细胞中,CTCF结合一些相对保守的DNA区域,例如ALU序列、ALR序列以及LTR序列;而BORIS更偏向于结合进化更新的简单串联重复序列如SVA转座子VNTR(variable number of tandem repeats)区域,抑制SVA-A、SVA-B、SVA-C和SVA-D表达,上调SVA-F1的表达<sup>[14]</sup>。细胞核内的BORIS可能与CTCF协同调控基因转录有关。

BORIS通过竞争性结合基因组DNA阻断CTCF的抑癌作用。在正常细胞中,CTCF结合在端粒酶hTERT亚基前两个外显子上,抑制hTERT的转录,而在睾丸癌和乳腺癌细胞中,BORIS竞争性结合在hTERT第1个外显子上,激活hTERT的转录,使基因组DNA修复功能增强,抑制细胞衰老,赋予肿瘤细胞无限增殖能力<sup>[15]</sup>。

RB2/P130是一种较为经典的抑癌蛋白,在正常人肺纤维组织中,CTCF结合在RB2/P130(retinoblastoma-like protein 2)的启动子区域,激活其表达。但在肺癌细胞中,BORIS竞争性结合在RB2/P130的启动子区域,改变RB2/P130的染色体结构,抑制它的表达<sup>[16]</sup>。此外,BORIS竞争性结合在T细胞急性淋巴细胞白血病细胞系的(locus notch homolog protein 3)NOTCH3启动子区域并增加H3K4me3的水平,上调NOTCH3基因的表达,影响NOTCH3信号通路,诱导肿瘤发生<sup>[17]</sup>。

印记基因异常与肿瘤发生、发展密切相关,H19和IGF就是其中的一类,在正常体细胞中,母源的H19上游DMR区域为去甲基化状态,CTCF可以结合在DMR区域形成绝缘子,阻止染色体成环,抑制IGF2的表达。而BORIS则可以通过结合PRMT7来增加H2A和H4的甲基化水平同时诱导H19印记控制区的甲基化水平。Nguyen等发现BORIS偏爱结合在高度甲基化的父系H19DMR区域并且敲除CTCF可以增加BORIS结合在H19DMR区域的含量。在很多肿瘤细胞系中,存在BORIS和IGF2发生高表达的情况,这可以提示BORIS在一定程度上影响了CTCF对DMR的调控,促进了肿瘤的发生。

### 三、BORIS在肿瘤诊断治疗中研究和应用价值

1. BORIS是潜在的肿瘤诊断标志物;BORIS蛋白在肿瘤细胞中异常高表达是其作为肿瘤标志因子的

基础。在乳腺癌细胞中,BORIS的含量高于正常细胞,而且BORIS高表达与孕激素受体(PR)和雌激素受体(ER)的表达显著相关。在子宫癌临床样本中,BORIS的检出率为77%以上。前列腺癌中BORIS表达量和亚细胞定位与恶性前列腺癌相关,同时BORIS的表达与前列腺癌分期和AR表达显著相关<sup>[18]</sup>。笔者前期研究发现在结直肠癌临床组织样本中,癌组织中BORIS的表达显著高于癌旁组织。Zhao等<sup>[19]</sup>发现在肝癌组织中,BORIS的表达也明显比正常组织高,而且其与肿瘤大小,分化程度都有显著关系。上述研究均表明BORIS与肿瘤发生、发展密切相关,且是良好的肿瘤靶标因子。

BORIS的表达量与预后显著相关。在原发性的黑色素瘤患者中,可以检测到16%的组织表达BORIS,而其侵袭性黑色素瘤患者中,表达BORIS的组织样本高达34%。在恶性胶质瘤中,BORIS联合ACTL8、OIP5、XAGE3作为生存曲线的分类依据,具有很好的相关性( $P=0.017$ )<sup>[20]</sup>。恶性乳腺癌临床样本中,BORIS和MAGE-A、microRNA let-7b含量明显增加,严重影响患者生存。在食管癌临床样本中,BORIS的表达与淋巴结转移相关,同时BORIS表达阳性食管癌患者生存时间明显低于BORIS阴性患者<sup>[21, 22]</sup>。

2. BORIS在肿瘤防治中具有重要意义:2008年,Dougherty等发现BORIS的表达干扰抑制乳腺癌细胞增殖。笔者前期研究也表明高表达BORIS的结直肠癌细胞HCT116中BORIS的表达干扰导致HCT116癌细胞迅速死亡;而在BORIS表达相对较低的结肠腺癌细胞CACO<sub>2</sub>中,BORIS表达干扰抑制CACO<sub>2</sub>细胞增殖,可降低5-氟尿嘧啶的使用剂量。表明BORIS可能为肿瘤治疗的靶标基因。

近年来,肿瘤治疗的策略之一是研究新型肿瘤疫苗。2008年,Mkrtichyan等在不同小鼠中注射去除ZF区域的BORIS DNA和BORIS重组蛋白,发现这两种免疫手段都能有效抑制肿瘤细胞生长,但以BORIS DNA为免疫原的小鼠,免疫治疗的效果更佳。2011年,Mkrtichyan等又以树突状DC细胞作为BORIS免疫对象,在4T1移植的小鼠肿瘤模型中,过继经BORIS免疫的DC细胞,发现18.75%的小鼠体内肿瘤清除,50%小鼠肿瘤无转移。几乎所有模型小鼠体内都能产生高效应的CD4和CD8 T细胞,同时骨髓来源的免疫抑制细胞(MDSC)大幅度减少。此外,有文献报道,在BORIS的23个转录本中,第6类蛋白亚型

(isoform 6 SF6)的 C34 区域含有 HLA - A2 相关参考结合域,在小鼠子宫肿瘤模型中过表达这一肽段可诱导产生细胞毒性 T 细胞,并激活相关免疫反应<sup>[23]</sup>。在人体肺癌组织和肿瘤干细胞中,SF6 表达能诱导产生 CTL 参与的免疫反应<sup>[24]</sup>。

#### 四、展 望

综上所述,在肿瘤细胞中,BORIS 主要通过甲基化作用或竞争性抑制抑癌因子 CTCF 来实现其生物学功能:一方面,BORIS 调控下游肿瘤相关基因的表达,抑制癌细胞凋亡;另一方面,BORIS 调控 EMT 相关因子的表达,影响肿瘤细胞干性,对肿瘤的发生、发展必须。前文证据提示,肿瘤发生早期,BORIS 可能促进肿瘤干细胞的形成,而在肿瘤发生后,BORIS 高表达可能影响肿瘤的增殖和侵袭,与肿瘤的发生、发展相关,因此 BORIS 可作为肿瘤诊断和预后的标志因子,在临床肿瘤的诊疗中具有潜在的应用价值。近年来科研工作者在乳腺癌、宫颈癌等癌症中进行了一系列以 BORIS 为靶标的肿瘤治疗研究,发现 BORIS 的功能抑制或消除,对化疗药物的敏感度有很大提升,这提示在目前临床肿瘤药物耐受频发的形势下,BORIS 将可能成为新的药物或免疫治疗的靶点。笔者希望对 BORIS 因子的功能和机制进一步的研究积累,推进 BORIS 作为肿瘤诊断治疗靶点的临床应用。

#### 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017,67(1):7-30
- 2 王维琼. 2016 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017,4(19):3604
- 3 Schwarzenbach H, Eichelsler C, Steinbach B, *et al.* Differential regulation of MAGE - A1 promoter activity by BORIS and Sp1, both interacting with the TATA binding protein [J]. *BMC Cancer*, 2014,14(1):796
- 4 Martin - Kleiner I. BORIS in human cancers - a review [J]. *Eur J Cancer*, 2012,48(6):929-935
- 5 Zhang Y, Fang M, Song Y, *et al.* Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) suppresses apoptosis in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017,7:40786
- 6 宋勇飞, 张衍梅, 方梦蝶, 等. 蛋白亚细胞定位与肿瘤关系的研究进展[J]. *肿瘤*, 2017,6:657-662
- 7 Yoon SL, Roh YG, Chu IS, *et al.* A polymorphic minisatellite region of BORIS regulates gene expression and its rare variants correlate with lung cancer susceptibility [J]. *Exp Mol Med*, 2016,48(7):e246
- 8 Yoon SL, Roh YG, Lee SH, *et al.* Analysis of promoter methylation and polymorphic minisatellites of BORIS and lack of association with gastric cancer [J]. *DNA Cell Biol*, 2011,30(9):691-698
- 9 Van Tongelen A, Loriot A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer - germline genes [J]. *Cancer Lett*, 2017,396:130-137
- 10 Sun L, Huang L, Nguyen P, *et al.* DNA methyltransferase 1 and 3B

- activate BAG - 1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation [J]. *Cancer Res*, 2008,68(8):2726-2735
- 11 Bhan S, Negi SS, Shao C, *et al.* BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011,17(13):4267-4276
- 12 Makovski A, Yaffe E, Shpungin S, *et al.* Intronic promoter drives the BORIS - regulated expression of FerT in colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2012,287(9):6100-6112
- 13 Kosaka - Suzuki N, Suzuki T, Pugacheva E M, *et al.* Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer - testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter [J]. *J Biol Chem*, 2011,286(31):27378-27388
- 14 Pugacheva E M, Teplyakov E, Wu Q, *et al.* The cancer - associated CTCFL/BORIS protein targets multiple classes of genomic repeats, with a distinct binding and functional preference for humanoid - specific SVA transposable elements [J]. *Epigene Chrom*, 2016,9(1):35
- 15 Renaud S, Loukinov D, Alberti L, *et al.* BORIS/CTCF - mediated transcriptional regulation of the hTERT telomerase gene in testicular and ovarian tumor cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011,39(3):862-873
- 16 Fiorentino FP, Macaluso M, Miranda F, *et al.* CTCF and BORIS regulate Rb2/p130 gene transcription; a novel mechanism and a new paradigm for understanding the biology of lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2011,9(2):225-233
- 17 Zampieri M, Ciccarone F, Palermo R, *et al.* The epigenetic factor BORIS/CTCF regulates the NOTCH3 gene expression in cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014,1839(9):813-825
- 18 Cheema Z, Hari - Gupta Y, Kita GX, *et al.* Expression of the cancer - testis antigen BORIS correlates with prostate cancer [J]. *Prostate*, 2014,74(2):164-176
- 19 Zhao R, Chen K, Zhou J, *et al.* The prognostic role of BORIS and SOCS3 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Medicine: Baltimore*, 2017,96(12):e6420
- 20 Freitas M, Malheiros S, Stavale J N, *et al.* Expression of cancer/testis antigens is correlated with improved survival in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2013,4(4):636-646
- 21 Joosse SA, Muller V, Steinbach B, *et al.* Circulating cell - free cancer - testis MAGE - A RNA, BORIS RNA, let - 7b and miR - 202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases [J]. *Br J Cancer*, 2014,111(5):909-917
- 22 Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, *et al.* Cancer - testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2012,103(9):1617-1624
- 23 Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, *et al.* Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016,7(10):11223-11237
- 24 Horibe R, Hirohashi Y, Asano T, *et al.* Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is a novel target of lung cancer stem - like cell immunotherapy [J]. *PLoS One*, 2017,12(3):e171460

(收稿日期:2017-09-21)

(修回日期:2017-10-12)