

良恶性病变食管组织及其邻近组织中 HOXA5 蛋白和 mRNA 的表达

赵秋民^{1,2}

(1. 郑州大学第一附属医院病理科//河南省肿瘤病理重点实验室, 河南 郑州 450052;
2. 郑州大学学报医学版编辑部, 河南 郑州 450052)

摘要:【目的】探讨食管鳞癌组织中同源异型盒基因(HOX)HOXA5 蛋白和 mRNA 的表达情况,分析 HOXA5 表达与食管癌患者年龄、性别及其他临床病理学特征的关系。【方法】选择 31 例择期手术的食管癌患者,手术切除的标本均在离体 30 min 内分别于癌灶、癌旁 3 cm 以内及手术残端食管黏膜组织 3 处取材;对各部分标本作 HE 染色进行病理学诊断及分型,用免疫组织化学染色方法检测 HOXA5 蛋白的表达,用荧光定量 PCR 法检测 HOXA5 mRNA 的表达。【结果】①HE 病理组织学检测证实 31 例癌组织标本均为鳞癌,癌旁 3 cm 以内的标本呈中-重度不典型增生,手术残端食管黏膜组织均为正常鳞状上皮。②在正常食管黏膜组织、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中 HOXA5 蛋白阳性表达率分别为 32.3%、58.1%和 64.5%($P < 0.05$);HOXA5 mRNA 的含量分别为 0.97 ± 0.46 、 1.76 ± 1.03 和 2.37 ± 2.11 ($P < 0.05$);HOXA5 蛋白和 mRNA 均表现为癌组织及癌旁不典型增生组织的表达率/表达量明显高于正常食管黏膜组织。③HOXA5 蛋白阳性表达率 ($P < 0.05$)、HOXA5 mRNA 的含量 ($P < 0.05$)均与食管鳞癌组织的病理学分级有关,其在病理学Ⅲ级中的表达率明显高于病理学 I + II 级的;不支持 HOXA5 蛋白和 mRNA 的表达与患者的年龄、性别、浸润深度及有无淋巴结转移有关 (均 $P > 0.05$)。④HOXA5 蛋白表达与其 mRNA 的表达一致性程度良好(Kappa = 0.718, $P < 0.05$)。【结论】HOXA5 蛋白和 mRNA 的表达在癌旁不典型增生组织、食管鳞癌组织中明显升高,它可能是食管鳞癌发生过程中的早期事件。

关键词: 食管鳞癌; 癌旁不典型增生组织; HOXA5; 荧光定量 PCR

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)05-0507-05

Expression of HOXA5 Protein/mRNA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Tissue

ZHAO Qiu-min^{1,2}

(1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University//Henan Key Laboratory of Tumor Pathology;
2. Editorial Board of Journal of Medical Sciences of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of Homeobox gene 5 (HOXA5) protein/mRNA in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), adjacent dysplasia and its corresponding normal mucosa tissue, and analyze the relationship between HOXA5 expression and gender, age as well as parameters of clinical pathology in patients with ESCC. 【Methods】 31 cases of ESCC specimens were divided into two aliquots, one aliquot was fixed with 40 g/L paraformaldehyde, and another was stored at -80°C . HE and immunohistochemical staining was used to detect the expression of HOXA5 protein. Total RNA was extracted from 0.15 g freshly-frozen tissue, and FQ-PCR was used to detect the expression of HOXA5 mRNA. 【Results】 (1) HE staining confirmed that all 31 cancer specimens were ESCC, all specimens adjacent within 3 cm from cancer foci being precancerous atypical hyperplasia, and that all specimens obtained from the surgical stump of esophageal mucosa were corresponding normal mucosa. (2) Percentages of HOXA5 protein expression in normal esophageal mucosa, adjacent hyperplasia and ESCC were 32.3%, 58.1% and 64.5%, respectively ($P < 0.05$). The related levels of HOXA5 mRNA were 0.97 ± 0.46 , 1.76 ± 1.03 , and 2.37 ± 2.11 ($P < 0.05$).

收稿日期: 2009-01-13

基金项目: 河南省杰出青年科学基金(074100510009)

作者简介: 赵秋民, 博士, 编辑, E-mail: zhaqmq@zsu.edu.cn

2.11, respectively. Both HOXA5 protein and HOXA5 mRNA levels were determined to be statistical difference among 3 groups, showing that the levels in adjacent hyperplasia and ESCC were higher than those in normal esophageal mucosa ($P < 0.05$). (3) The percentages of HOXA5 protein expression and the levels of HOXA5 mRNA were detected to be significant difference according to ESCC pathological grade ($P < 0.05$), both showed to be higher in Grade III than in Grade (I + II) in pathological grading system. Moreover, our results didn't support that the expression of HOXA5 was related to gender, age and the depth of invasion or lymph node metastasis in ESCC ($P > 0.05$). (4) HOXA5 protein expression was consistent with HOXA5 mRNA expression ($Kappa = 0.718, P < 0.05$). [Conclusion] Expression of HOXA5 is upregulated in precancerous atypical hyperplasia and ESCC tissue, it may present an early event in the ESCC.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; adjacent dysplasia; HOXA5; FQ-PCR

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(5): 507-511]

我国是食管癌的高发国家, 有关食管鳞癌的发生机制还不清楚。近年的研究发现, 一些肿瘤的发生、发展与调控细胞发育的重要转录因子——同源异型盒基因(homeobox gene, HOX)家族的异常表达密切相关^[1-3]。在胚胎发育期, HOX 3' ~ 5' 端的 1 ~ 13 位点基因以时间先后, 在特定的空间位置依次表达/静默, 保证胚胎发育期的各组织细胞在正确的时间发育到正确的空间位置。如果 HOX 的时空共线性表达出现错乱, 则导致肿瘤发生, 且有学者在多种肿瘤^[4-7]组织中检测到了 HOX 的异常表达。为了解食管鳞癌组织中 HOXA5 基因的表达情况及其与食管鳞癌发生发展的关系, 作者进行了下面的研究, 并探讨了其在食管癌早期诊断中的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 标本来源及处理

选取 2006 年 2 月 26 日至 3 月 16 日河南省安阳市肿瘤医院择期手术的 31 例食管癌患者的手术切除标本。患者术前均无化疗、放疗及免疫治疗史, 其中男性 18 例, 女性 13 例, 年龄 38 ~ 75 (60.6 ± 9.5) 岁。标本均在离体 30 min 内分别于癌灶、癌旁 3 cm 以内及手术残端食管黏膜组织迅速取材, 分为 2 份, 1 份用 40 g/L 多聚甲醛固定, 后经常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度 3 ~ 5 μm, 分别用于 HE、免疫组织化学染色; 另 1 份置于 -80 °C 冰箱备用提取 RNA。

1.2 仪器和试剂

免疫组化 SP 染色试剂盒, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; HOXA5 抗体为羊抗人多克隆抗体 [HOXA5 (N-20): scv13199], 购自 Santa Cruz 公司; RNA 提取试剂盒及 Trizol 试剂, 购自 Sigma

公司; 荧光定量 PCR 系统, 购自 Bio-Rad 公司; AMV 逆转录系统, 购自美国 Promega 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒, 购自德国 Roche 诊断有限公司。

1.3 HOXA5 和 β-actin 引物的设计及合成

用 PRIMER 5.0 软件设计 HOXA5、β-actin 特异引物 (表 1), 通过搜索 dbEST 和 nr (the nonredundant set of GenBank, EMBL, DDBJ database sequences) 数据库中的基因序列, 确保被用作引物的核苷酸序列有特异性并且不存在 DNA 多态性。为了避免受污染的 DNA 序列的扩增, 两个引物中的一个被置于两个外显子之间或者两个引物被置于两个不同的外显子上。引物由北京奥科生物工程公司合成。

表 1 HOXA5 和 β-actin 引物序列及扩增片段大小

Table 1 The sequences of HOXA5, β-actin primer, and product size

Genes	Primer Sequences	Product Size (bp)
HOXA5	Sense 5'-ACTCCGGCAGGTACGGCTACG-3'	259
	Antisense 5'-CCGCTGGAGTTGCTTAGGGAG-3'	
β-actin	Sense 5'-CATCCTGCCTCTGGACCT-3'	480
	Antisense 5'-CCGCTGGAGTTGCTTAGGGAG-3'	

1.4 HOXA5 mRNA 的荧光定量 PCR 检测

1.4.1 总 RNA 的提取 取约 0.15 g 在 -80 °C 冻存的组织, 加入 1 mL 预冷的 Trizol 提取液, 在玻璃匀浆器中充分研磨, 其余步骤严格按 Trizol RNA 提取试剂盒说明书进行。采用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭对 RNA 纯度定量, 在紫外灯透射仪下可见 28 S、18 S 和 5 S 条带; 应用紫外分光光度计检测 RNA 含量, 结果符合要求。使用 AMV 逆转录试剂盒合成 cDNA。

1.4.2 HOXA5 和 β-actin 的荧光定量 PCR 扩增 反

应体积为 15 μL 。10 \times 缓冲液 1.5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTP 混合物 1.125 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 0.9 μL , Eva Green 0.75 μL , 荧光素 0.09 μL , 5'端引物、3'端引物(3 mmol/L)各 0.6 μL , *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.15 μL , 模板 5 μL , 加水至 15 μL ; β -actin 和 HOXA5 的 PCR 扩增反应条件分别为: 95 $^\circ\text{C}$ 3 min, 95 $^\circ\text{C}$ 20 s, 58 $^\circ\text{C}$ /57 $^\circ\text{C}$ 20 s, 然后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 86 $^\circ\text{C}$ /85 $^\circ\text{C}$ 15 s 采集荧光, 共 40 个循环, 最后在 72 $^\circ\text{C}$ 温度下延伸 7 min。实验均平行重复 3 次。

1.5 HOXA5 蛋白的免疫组化检测

采用免疫组化 SP 法测定 3 种组织中 HOXA5 蛋白的表达情况。参考文献[8]的方法进行操作。HOXA5 一抗的工作浓度为 1:50。

1.6 结果判断标准

1.6.1 HOXA5 蛋白表达 HOXA5 蛋白阳性表达颗粒主要位于细胞质内, 呈棕黄色。免疫组化结果判定标准参考文献[8]。

1.6.2 HOXA5 mRNA 表达 $\Delta\text{NCt}_{\text{HOXA5}} = (\text{Ct}_{\text{Normal HOXA5}} - \text{Ct}_{\text{Normal } \beta\text{-actin}})$, $\Delta\text{CCt}_{\text{HOXA5}} = (\text{Ct}_{\text{Cancer HOXA5}} - \text{Ct}_{\text{Cancer } \beta\text{-actin}})$, 以扩增倍数作为结果, 扩增倍数 = $2^{\Delta\text{Ct}}$ 。 $\Delta\text{Ct} \geq 2$ 为阳性, $\Delta\text{Ct} < 2$ 为阴性。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析、最小显著差(LSD)检验; 分类资料以 *n*(%)表示, 采用 χ^2 检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。在 SPSS 12.0 上完成统计学分析。

2 结果

2.1 31 例食管癌标本病理学检测的结果

病理组织学 HE 切片检测结果证实, 31 例癌组织标本均为鳞癌; 组织学分级: I 级 9 例, II 级 12 例, III 级 10 例; 有淋巴结转移 9 例, 无淋巴结转移 22 例; 肿瘤浸润至黏膜层、黏膜下层或浅肌层 6 例, 深肌层 10 例, 纤维膜 15 例。31 例癌旁 3 cm 以内的标本呈中-重度不典型增生。31 例手术残端食管黏膜组织均为正常鳞状上皮。

2.2 食管癌组织和癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织中 HOXA5 蛋白表达的分布

正常食管黏膜上皮细胞中 HOXA5 蛋白无表

达或弱表达, 但在部分基底细胞中有 HOXA5 蛋白的阳性表达。与之相比, 癌组织、癌旁不典型增生组织细胞质中 HOXA5 蛋白表达明显增高, 阳性表达颗粒呈浅黄色至深黄色, 在细胞质中弥漫分布, 部分以团状或簇状分布; 另外部分阳性细胞的胞膜或核旁胞质也出现有 HOXA5 表达的棕黄色颗粒(图1)。

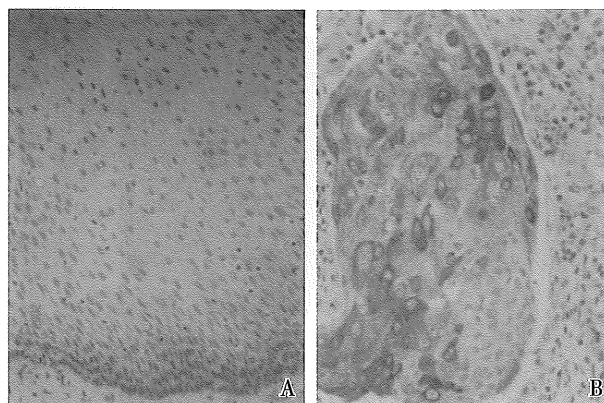


图1 食管组织 HOXA5 蛋白的表达
Fig.1 Expression of HOXA5 Protein in Esophageal Tissue

A: Normal esophageal epithelium tissue; B: Esophageal squamous cell carcinoma tissue; SP, $\times 400$

2.3 HOXA5 蛋白及 mRNA 的表达及其与临床指标的关系

正常食管黏膜组织、癌旁不典型增生组织、食管鳞癌组织中 HOXA5 蛋白的阳性表达率分别为 32.3%(10/31)、58.1%(18/31)和 64.5%(20/31), 3 者比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.233, P < 0.05$)。食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织中 HOXA5 蛋白的阳性表达均高于正常食管黏膜组织, 差异有统计学意义 ($\chi^2_{\text{鳞癌组织-正常食管黏膜组织}} = 6.458, \chi^2_{\text{癌旁不典型增生组织-正常食管黏膜组织}} = 4.168$; 均 $P < 0.05$)。

HOXA5 蛋白阳性表达与食管鳞癌患者的性别、年龄、浸润深度、淋巴结转移无关 (均 $P > 0.05$); 但与肿瘤病理学分级有关, 病理学 III 级的组织中 HOXA5 蛋白表达明显高于病理学 (I + II) 级组(确切概率法, $P < 0.05$)。

HOXA5 mRNA 含量在正常食管黏膜组织 (0.97 ± 0.46)、癌旁不典型增生组织 (1.76 ± 1.03)、食管鳞癌组织 (2.37 ± 2.11) 组间比较差异有统计学意义(图 2; $F = 8.000, P < 0.05$); 其在鳞癌组织和癌旁不典型增生组织中的表达均明显高于正常

食管黏膜组织。HOXA5 mRNA 的表达与食管鳞癌患者的性别、年龄、浸润深度、有无淋巴结转移无关(P 均 > 0.05);与肿瘤病理学分级有关($F = 3.600, P < 0.05$),病理学 III 级的组织中 HOXA5 mRNA 含量明显高于病理学 (I + II) 级组 ($P < 0.05$),详见表 2。

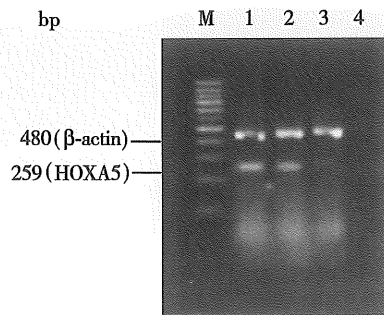


图 2 不同食管组织中 HOXA5 mRNA 的表达
Fig.2 Expression of HOXA5 mRNA in Different Esophageal Tissue

M: Marker; 1: Esophageal squamous cell carcinoma tissue; 2: Precancerous atypical hyperplasia tissue; 3: Normal esophageal mucosa tissue; 4: Negative control

2.4 食管癌组织中 HOXA5 蛋白及 mRNA 表达的一致性分析

HOXA5 蛋白表达率及 HOXA5 mRNA 表达率均为 64.5%(20/31),差异无统计学意义($P > 0.05$,表 3)。食管癌组织中 HOXA5 蛋白与其 mRNA 的表达一致性程度良好(Kappa = 0.718, $P < 0.05$)。

3 讨论

HOX 基因大家族共包含了 39 个亚基因簇,分别分布于人的第 7、12、17 和第 2 条染色体上(7p15.3, 17p21.3, 12q13.3 和 2q31),命名为 HOX-A、B、C 和 D^[8-9]。HOX 3 端位点基因在胚胎发育早期表达,促进细胞增殖和迁移;5 端基因位点在胚胎发育晚期表达,促进细胞分化和凋亡,这称为 HOX 基因的时空共线性,其时空共线性决定细胞增殖、迁移、分化、凋亡的时间和空间状况,保证胚胎发育期的各组织细胞在正确的时间发育到正确的空间位置。成年后,若 HOX 的时空共线性表达出现错乱,则会导致肿瘤发生,且在白血病、神经系统肿瘤、宫颈癌、结肠直肠癌等多种肿瘤组织中

表 2 HOXA5 蛋白和 mRNA 的表达及其与食管鳞癌患者临床指标的关系

Table 2 Expression of HOXA5 protein/mRNA in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship to clinical indicators

Item	Cases	HOXA5 protein positive (%)	HOXA5 mRNA
Gender			
Male	18	11(61.1)	2.32 ± 1.04
Female	13	8(61.5)	2.43 ± 1.12
Age/year			
≥ 60	17	11(64.7)	2.44 ± 1.12
< 60	14	9(64.3)	2.29 ± 1.08
Histological grade ¹⁾			
Grade I	9	4(44.4)	1.75 ± 1.15
Grade II	12	7(58.3)	2.20 ± 1.14
Grade III	10	9(90.0)	3.15 ± 1.23
Invasion depth			
Within mucosa, submucosa, or shallow layer	6	4(66.7)	2.31 ± 1.41
Deep muscle	10	6(60.0)	2.30 ± 1.11
Fiber membrane	15	10(66.7)	2.44 ± 1.34
Lymph node metastasis			
No	22	14(63.6)	2.34 ± 1.55
Yes	9	6(66.7)	2.44 ± 1.63

1) Both HOXA5 protein and mRNA, Grade I + II compared with Grade III, $P < 0.05$

表 3 食管癌组织中 HOXA5 蛋白及 mRNA 表达率比较
Table 3 Percentages of HOXA5 protein/mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma

		HOXA5 mRNA	
		+	-
HOXA5 protein	+	18	2
	-	2	9

Corrected $\chi^2 = 0.250, P > 0.05$

已检测到 HOX 的异常表达^[4-7]。

作者的前期研究^[8]结果显示,从正常食管黏膜上皮→癌旁不典型增生组织→食管鳞癌组织,HOXA5 蛋白表达依次升高,差异有统计学意义。但研究有一定的局限性:如未将 3 组织严格匹配和未研究 mRNA 的表达等。为此,作者将收集到的标本按照“正常食管黏膜上皮→癌旁不典型增生组织→食管鳞癌组织”一一匹配,进行了本研究。

本研究结果显示,正常食管黏膜上皮、癌旁不典型增生组织、食管鳞癌组织中 HOXA5 蛋白、mRNA 表达差异均有统计学意义。免疫组化结果显示:在正常食管黏膜上皮组织中 HOXA5 蛋白无表达或低表达,但在部分基底细胞中 HOXA5 蛋白阳性表达;与正常食管黏膜上皮中 HOXA5 蛋白的阳性表达相比较,在癌旁不典型增生组织和食管鳞癌组织中明显增高,其差异有统计学意义。HOXA5 mRNA 和蛋白的表达与食管鳞癌患者的性别、年龄、浸润深度、有无淋巴结转移无关,但与肿瘤病理学分级有关,病理学Ⅲ级的食管癌组织中 HOXA5 蛋白和 mRNA 表达均高于病理学(I+II)级的。且由本研究结果可知 HOXA5 蛋白及 mRNA 的表达呈正相关。

有学者^[10]用定量实时逆转录聚合酶链反应方法及免疫组化方法分析了 HOX 家族中 39 个 HOX 基因和 4 个 ParaHOX (cdx1、cdx2、cdx4 和 PBX1)基因在食管鳞癌和正常食管黏膜组织中的表达,发现共有 24 个 HOX 基因和 cdx1、cdx2、PBX1 在食管鳞癌中的表达高于正常黏膜组织。作者的结果与该报道的论点相一致。但他们的研究仅限于在食管鳞癌和正常食管黏膜组织中,对癌旁不典型增生组织未作研究,且研究样本量偏小。

另有学者报道^[11],在乳腺癌组织中 HOXA5 mRNA 和蛋白的表达比乳腺良性病变组织明显降低,提示 HOXA5 基因表达的减少可能与乳腺癌的发生有关,且 HOXA5 mRNA 和蛋白的表达与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、临床分期、组织学分型、浸润性导管癌分级无关,淋巴结转移阳性病例与转移阴性者相比,HOXA5 mRNA 和蛋白的表达明显降低,两者间差异有统计学意义。该结果与作者的研究不相符,其原因可能与 HOX 基因的时空共线性有关,即同一种基因在不同的组织和部位表达量不同。

综上所述,作者认为 HOXA5 的异常表达与食管鳞癌的发生、发展密切相关。且研究中作者发现 HOXA5 蛋白和 mRNA 在癌前病变期的不典型增生组织中即出现高表达,这一现象提示 HOXA5 基因可能是食管鳞癌发生过程中的早期事件。

致谢:感谢导师张云汉、李惠翔教授和郑州大学第一附属医院病理科陈奎生教授对本课题

的指导;感谢高冬玲、张岚老师和李晟磊、赵志华、刘宗文、张功员等同学对本实验的帮助!感谢安阳市肿瘤医院病理科在标本取材时的帮助!

参考文献:

- [1] Henderson GS, van Diest PJ, Burger H, et al. Expression pattern of a homeotic gene, HOXA5, in normal breast and in breast tumors [J]. *Cell Oncol*, 2006,28(5/6):305-313.
- [2] Strathdee G, Sim A, Soutar R, et al. HOXA5 is targeted by cell-type-specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia [J]. *Carcinogenesis*, 2007,28(2):299-309.
- [3] Duriseti S, Winnard PT Jr, Mironchik Y, et al. HOXA5 regulates hMLH1 expression in breast cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2006,8(4):250-258.
- [4] Abe M, Hamada J, Takahashi O, et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2006,15(4):797-802.
- [5] 杨朝华,田宇,卜丽莎,等.同源盒基因在胶质瘤细胞中的表达 [J]. *中国肿瘤临床*,2002,29(6):418-420.
- [6] Chen YX, Yan J, Keeshan K, et al. The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006;103(4):1018-1023.
- [7] Chen H, Chung S, Sukumar S. HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004,24(2):924-935.
- [8] 赵秋民,刘宗文,李晟磊,等.食管鳞状细胞癌组织中同源异型盒基因 A5 蛋白的表达 [J]. *郑州大学学报:医学版*,2007,42(6):1 030-1 033.
- [9] McGinnis N, Kuziora MA, McGinnis W. Human Hox-4.2 and Drosophila deformed encode similar regulatory specificities in Drosophila embryos and larvae [J]. *Cell*, 1990,63(5):969-976.
- [10] Takahashi O, Hamada J, Abe M, et al. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2007,17(4):753-760.
- [11] 曾郁,杨文涛,张瑰红,等.乳腺癌中同源异型盒基因(HOX) A5 表达的研究 [J]. *中华病理学杂志*, 2005,34(9):569-574.

(编辑 徐杰)