

论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0468-04

HOXA10 在肺腺癌中的过表达及其临床意义

张雪淋,原薇薇,傅 华,刘小军,胡义德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所)

[摘要] 目的 研究肺腺癌组织和细胞系中 HOXA10 的表达及其临床意义。方法 运用免疫组织化学方法检测 75 例肺腺癌及其癌旁组织中 HOXA10 的表达情况,并分析 HOXA10 的表达与患者的临床特征及 5 年生存率的相关性。此外利用反转录 PCR、Western blot 及免疫荧光染色检测正常肺支气管上皮细胞系 HBE 以及 4 种肺腺癌细胞系 H322、H1650、A549、H1975 中 HOXA10 的表达情况。结果 HOXA10 主要表达于胞浆中,且于 75 例肺腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织($P < 0.01$),并与肿瘤的浸润深度($P < 0.05$)及淋巴结转移($P < 0.01$)有关。而 HOXA10 高表达与低表达的肺腺癌患者的 5 年生存率没有显著差异($P > 0.05$)。反转录 PCR、Western blot 及免疫荧光染色的结果显示 HOXA10 在肺腺癌细胞系中的表达明显高于正常肺支气管上皮细胞系。结论 HOXA10 高表达于肺腺癌及肺腺癌细胞系中,这可能与肺腺癌的侵袭和恶性淋巴结转移的程度密切相关。

[关键词] 肺腺癌;HOXA10;表达;临床意义

[中图分类号] R394.2; R730.23; R734.2

[文献标志码] A

Over-expression and clinical significance of HOXA10 in human lung adenocarcinoma

Zhang Xuelin, Yuan Weiwei, Fu Hua, Liu Xiaojun, Hu Yide (Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression of homeobox 10 (HOXA10) in lung adenocarcinoma and lung adenocarcinoma cell lines and to observe its clinical significance in lung adenocarcinoma. **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detect the HOXA10 expression in lung tissue samples from 75 cases of lung adenocarcinoma and corresponding normal lung tissues. The correlation between the expression and the clinical feature or 5-year survival rate in these patients was analyzed. RT-PCR, Western blot analysis and immunofluorescence assay were used to detect the expression of HOXA10 in H322, H1650 A549 and H1975 lung adenocarcinoma cell lines and HBE human bronchial epithelial cell line. **Results** In 75 cases of lung adenocarcinoma, the expression of HOXA10, which was in the cytoplasm, was significantly higher than that in normal lung tissues ($P < 0.01$), and the high expression of HOXA10 was correlated with tumor invasion ($P < 0.05$) and lymphatic metastasis ($P < 0.01$), but not with the 5-year survival rates of these patients ($P > 0.05$). In addition, the expression of HOXA10 at mRNA and protein levels was very strong in lung adenocarcinoma cell lines, and significantly higher than in human bronchial epithelial cells. **Conclusion** HOXA10 is strongly expressed in lung adenocarcinoma and lung adenocarcinoma cell lines, and may be involved in the invasion and lymphatic metastasis degrees of lung adenocarcinoma.

[Key words] lung adenocarcinoma; HOXA10; expression; clinic significance

Corresponding author: Hu Yide, Tel: 86-23-68774484, E-mail: huyide_mit@yahoo.com

肺腺癌是一种非小细胞肺癌,在早期不易被诊断且易发生血道转移。因此,提高肺腺癌诊断的特异性和灵敏性显得尤为重要,而这又依赖于阐明肿瘤发生的分子机制及发现特异的肿瘤相关分子^[1]。然而肺腺癌发生、发展的具体环节和相关机制尚未完全清楚。

HOXA10 为同源盒(homeobox, HOX)基因家族中的一员,在调节胚胎发育和分化中发挥着重要作用。目前越来越多的研究表明 HOXA10 的异常表达与肿瘤的发生、发展、组织分型密切相关^[2-7]。在 HOXA10 与肺腺癌的研究中,Plowright 等^[8]和 Roser 等^[9]分别发现 HOXA10 mRNA 在肺腺癌细胞系 A549 和 H322 中表达上调。也有研究表明 HOXA10 的高度甲基化与周围型肺腺癌的侵袭程度相关^[10]。更有研究^[7]发现 HOXA10 在肺腺癌中高表达。但是目前对于

[通信作者] 胡义德,电话:(023)68774484, E-mail:huyide_mit@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.005.html> (2012-12-11)

HOXA10 在肺腺癌组织中的表达的临床意义以及在其他肺腺癌细胞系中的表达情况的研究尚少见报道。因此本研究初步阐明 HOXA10 在肺腺癌及癌旁组织中的表达情况及其与肺腺癌的临床病理特征的相关性,并检测 HOXA10 在肺腺癌细胞系及正常肺支气管上皮细胞系中的表达,为进一步研究肺腺癌的发生、发展及影响肺腺癌病人临床预后的分子靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床病例 肺腺癌和相应的癌旁组织的组合芯片购自上海芯超生物技术有限公司,肺腺癌的 TNM 分期、分级和病理诊断由公司提供。未经放、化疗处理的原发性肺腺癌组织 75 例,其中男性 45 例,女性 30 例,年龄 37~54 岁,平均 61 岁。根据组织分化程度分组:高分化组 4 例,中分化组 33 例,低分化组 38 例。按照 AJCC 癌症分期手册的最新分期标准进行分期: I 期 27 例, II 期 16 例, III 期 27 例, IV 期 5 例。以上组织均来自经过患者知情同意的组织芯片库。以上病例是通过收集门诊复查病历以及电话进行随访,随访至患者死亡或截止日期为 2008 年 12 月。

1.1.2 细胞系 HBE 细胞购于中国科学院上海生科院细胞资源中心,肺腺癌细胞系 H322、H1650、H1975 细胞获赠于中山医科大学,肺腺癌细胞系 A549 购买于 ATCC。

1.1.3 主要试剂及仪器 Trizol (Invitrogen), 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒 (TIANGEN), RIPA 裂解液、BCA 试剂盒 (碧云天), 脱脂蛋白封闭干粉 (武汉博士德), 显色液 (Thermo), 荧光显微镜 (Nikon), 酶标仪、电泳仪、转膜仪 (Bio-Rad), 扫描仪 (GS-800), 紫外分光光度计 (BeckMan), PCR 仪、核酸电泳仪、凝胶成像仪 (Bio-Rad)。山羊抗 HOXA10 多克隆抗体、兔抗 β -actin 多克隆抗体 (Santa Cruz), Cy3 标记的驴抗山羊 IgG (H+L)、辣根过氧化物酶标记的驴抗山羊 IgG (H+L)、DAPI (碧云天), DAB 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 用 Trizol 一步法提取细胞的总 RNA,以 1 μ g RNA 为模板做逆转录,实验条件参照 Toyobo 公司的试剂盒说明书。以 1 μ g cDNA 为模板做 PCR 检测 HOXA10 及 GAPDH 的表达,反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,于凝胶成像仪获取图像。引物序列: GAPDH: 正义链 5'-CTGTTGAAGTCAGAGGAGACCAC-3', 反义链 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3', 产物长度 323 bp; HOXA10: 正义链 5'-CTTCAGTTTCATCTCGCGTTC-3', 反义链 5'-CCTACACGAAGCACCAGACACT-3', 产物长度 152 bp。

1.2.2 Western blot 收集细胞,按照碧云天裂解方案于冰上充分裂解细胞,12 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 后取上清。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后热变性,上样 25 μ g 后电泳、转膜, TBST 漂洗后用 5% 蛋白封闭液室温摇床封闭 1 h,加一抗 (以 1:200 稀释)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 15 min \times 5 次后于 37 $^{\circ}$ C 温育二抗 1 h, TBST 再洗 15 min \times 5 次后显色、成像。

1.2.3 免疫细胞荧光技术及免疫组织化学技术 具体的步骤

参照 Liao 等^[11]方法。对免疫组织化学结果分析,以细胞出现棕黄色颗粒为阳性。结果以染色强度评分,具体方法参见文献[12]。

1.3 统计学方法

利用 SPSS 16.0 统计学软件,采用非参数检验 Mann-Whitney's *U* 检验和 Jonckheere-Terpstra 检验分析 HOXA10 的表达情况与临床特征之间的关联,采用 Log-rank 统计分析 HOXA10 的表达情况与肺腺癌患者的 5 年生存率之间的关联。

2 结果

2.1 HOXA10 在肺腺癌组织中的表达

免疫组织化学检测 HOXA10 在肺腺癌组织和癌旁组织中的表达,结果发现 75 例肺腺癌组织中有 56 例 (74.6%) 高表达 HOXA10,而在癌旁组织中只有 7 例 (9.3%) 高表达,两者有显著性差异 ($P < 0.01$)。然而 HOXA10 却主要表达于细胞质中。统计学分析 HOXA10 的蛋白表达与临床特征之间的关系。结果显示 HOXA10 蛋白表达的高低与性别、年龄、分化程度、远处转移和临床分期无关 ($P > 0.05$),而与浸润深度 ($P < 0.05$) 及淋巴结转移 ($P < 0.01$) 有关,即与肺腺癌的体积和邻近组织受累范围以及淋巴结受累程度和范围相关。见图 1、表 1。

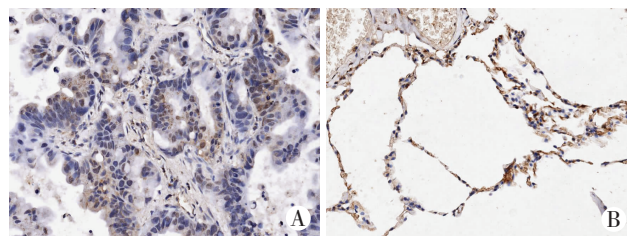


图 1 免疫组织化学检测 HOXA10 在肺腺癌 (A) 及癌旁组织 (B) 中的表达 ($\times 100$)

表 1 肺腺癌中 HOXA10 的表达与临床特征之间的关系 (例)

临床资料	<i>n</i>	高表达	低表达	<i>P</i> 值
肺腺癌组织	75	56	19	<0.01
癌旁组织	75	7	68	
年龄 (岁)				0.602
<60	30	21	9	
≥ 60	45	35	10	
性别				0.079
男	45	31	14	
女	30	26	4	
分化程度				0.685
高分化	4	1	3	
中分化	33	29	4	
低分化	38	27	11	
浸润深度				0.047
T1	9	4	5	
T2	46	35	11	
T3	14	12	2	
T4	6	5	1	
淋巴结转移				<0.01
N0~N2	70	52	18	
N3	5	5	0	
远处转移				0.830
无	70	53	17	
有	5	4	1	
临床分期				0.132
I	27	18	9	
II	16	12	4	
III	27	23	4	
IV	5	4	1	

2.2 HOXA10 的表达与肺腺癌生存的关系

HOXA10 高表达、低表达患者的5年生存率分别为35.47%、67.73%，经Log-rank 统计分析，结果表明HOXA10 在肺腺癌患者中表达的高低与肺腺癌生存无显著的相关性($P>0.05$)，见图2。

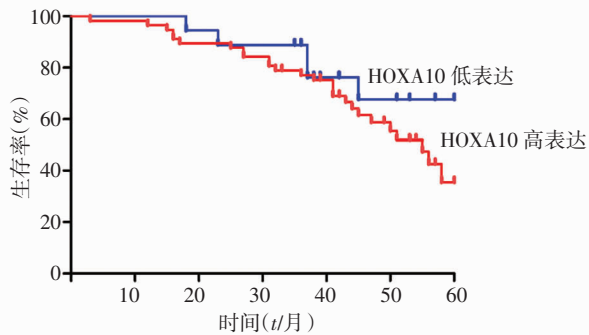
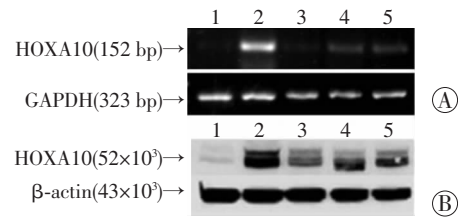


图2 HOXA10 高表达和低表达患者的生存曲线

2.3 HOXA10 在肺腺癌细胞系中的表达

随后我们进一步检测了肺腺癌细胞系中HOXA10 的表达情况。经反转录PCR 技术检测HOXA10 在4种肺腺癌细胞系及对照组HBE 中mRNA 水平的表达情况。从图3A 可知，HOXA10 在肺腺癌细胞系H322、H1650、A549、H1975 细胞中mRNA 表达都高于正常肺支气管上皮细胞系HBE，其中H322 中HOXA10 mRNA 在4种肺腺癌细胞系中表达最高。利用Western blot 检测了HOXA10 蛋白在肺腺癌细胞系中的表达，结果发现图3B 中HOXA10 蛋白在肺癌细胞系H322、H1650、A549、H1975 中的表

达明显强于正常肺支气管上皮细胞系HBE 中的表达，在肺腺癌细胞系中HOXA10 蛋白在H322 细胞中的表达最高，而在肺腺癌细胞系H1650 中的表达相较其他组腺癌细胞系低。



1:HBE; 2: H32; 3: H1650; 4: A549; 5: H1975; A: 逆转录PCR 检测HOXA10 mRNA 的表达; B: Western blot 检测HOXA10 蛋白的表达

图3 HOXA10 mRNA 及蛋白在HBE、H322、H1650、A549、H1975 细胞系中的表达

2.4 HOXA10 蛋白在肺腺癌细胞系中的定位

最后利用免疫荧光技术检测了HOXA10 蛋白在5种肺腺癌细胞系中的定位表达情况(图4)。结果显示肺癌细胞系H322 的、H1650、A549、H1975 中HOXA10 蛋白的表达明显强于正常肺支气管上皮细胞系中的表达，且定位于细胞质中并出现核周浓聚现象。

3 讨论

HOX 基因是由183 个核苷酸序列组成的共同结构域的基因家族，分为A、B、C、D 族，在机体的胚胎发育和分化中意义重大。而很多参与正常生命过程的信

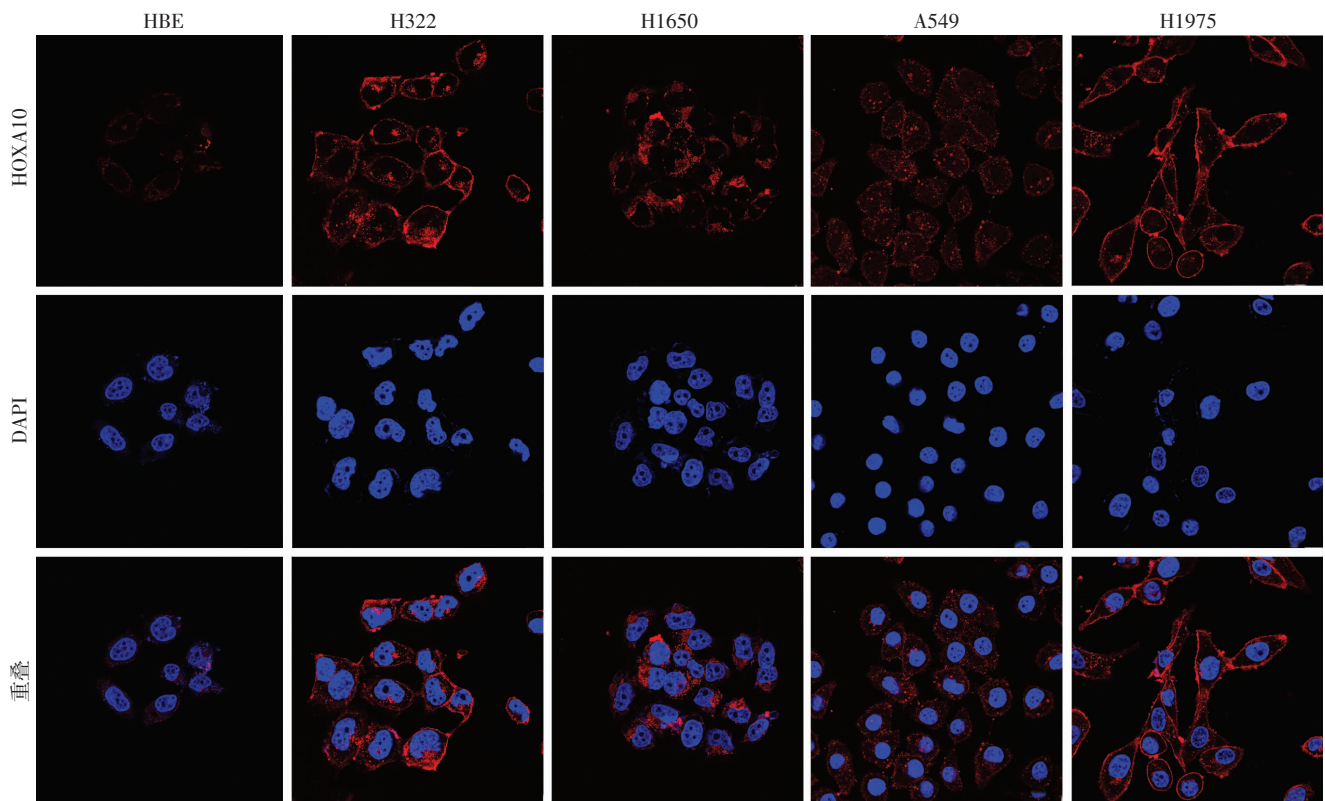


图4 免疫荧光检测肺腺癌细胞系中HOXA10 的表达 (DAPI $\times 400$)

号通路在肿瘤的发生过程中发生异常,那么 HOX 蛋白也可能调控肿瘤的发生、发展。近年研究发现 HOX 基因在白血病、乳腺癌、肺癌等肿瘤的发生和发展中发挥了重要作用^[8, 12-13]。HOXA10 作为 HOX 家族中的重要成员,目前已经被发现参与调控白血病、肺癌等肿瘤。但是在肺腺癌中的表达及作用目前的研究尚未清楚,而最近在肺腺癌细胞系 A549 和 H322 中的高表达的研究提示 HOXA10 可能与肺腺癌相关^[8-9]。

本研究发现在 75 例肺腺癌组织中 HOXA10 蛋白明显高表达于癌旁组织,提示 HOXA10 可作为诊断肺腺癌的分子标记物,并且可能促进肺腺癌发生发展。然而 HOXA10 定位于细胞质而非细胞核中,表明 HOXA10 在肺腺癌中并非发挥调控转录因子的功能。与本结果相似的是,研究报道 HOXA10 在肺腺癌细胞质中表达^[7]。此外,研究表明 HOX 蛋白能与 CREB 结合蛋白结合并阻断 CREB 转录活性,从而影响 CREB 下游靶基因 P21 调控细胞周期功能^[14]。因此 HOXA10 在肺腺癌中可能是通过阻断抑癌转录因子活性参与肺腺癌的恶化。统计学分析进一步发现 HOXA10 的表达强度与肺腺癌的浸润强度成正相关 ($P < 0.05$),与淋巴结的晚期转移相关 ($P < 0.01$),这与 HOXA10 在卵巢癌等其他癌组织中的结论相一致^[2, 5]。这些结果表明 HOXA10 有可能作为肺腺癌的诊断治疗的靶点。然而高表达和低表达 HOXA10 的患者的 5 年生存率无显著差异,提示 HOXA10 与肺腺癌病人的预后可能无显著的关联。为探讨 HOXA10 的分子机制,随后我们进一步研究了 HOXA10 在几种肺腺癌细胞系中的表达情况,验证了 HOXA10 在肺腺癌细胞系 A549 及其他 3 种肺腺癌细胞系中高表达,与 HOXA10 在肺腺癌组织中的表达相一致,可作为进一步研究 HOXA10 参与肺腺癌发生发展的细胞模型。

HOXA10 参与肿瘤形成已经为越来越多的研究所证明。目前 HOXA10 参与肿瘤的恶性过程已经在白血病中得到了很好的证明^[15-17]。也有研究表明 HOXA10 在实体癌中参与肿瘤的浸润可能与 E-cadherin 相关^[3],因此 HOXA10 在肺腺癌中高表达可能通过降低 E-cadherin 的表达来增强细胞之间的侵袭和转移能力,但是具体机制仍需进一步研究以期能找到更好的诊治肺腺癌的方法。

参考文献:

[1] Severino P, Alvares A M, Michaluart P Jr, et al. Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites[J]. BMC Res Notes, 2008(1): 113.
[2] Chu M C, Selam F B, Taylor H S. HOXA10 regulates p53 expression

and matrigel invasion in human breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(6): 568-572.
[3] Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, et al. Dereglulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 889-897.
[4] Li B, Jin H, Yu Y, et al. HOXA10 is overexpressed in human ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with poor survival[J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19(8): 1347-1352.
[5] Yasui W, Oue N, Sentani K, et al. Transcriptome dissection of gastric cancer: identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens[J]. Pathol Int, 2009, 59(3): 121-136.
[6] Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano Y, et al. State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1): 61-67.
[7] 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.
[8] Plowright L, Harrington K J, Pandha H S, et al. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer) [J]. Br J Cancer, 2009, 100(3): 470-475.
[9] Calvo R, West J, Franklin W, et al. Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(23): 12776-12781.
[10] Chung J H, Lee H J, Kim B H, et al. DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas [J]. Virchows Arch, 2011, 459(2): 201-211.
[11] Liao W T, Jiang D, Yuan J, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(11): 3569-3578.
[12] Morgan R, Boxall A, Harrington K J, et al. Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(2): 389-398.
[13] Shah C A, Bei L, Wang H, et al. HoxA10 protein regulates transcription of gene encoding fibroblast growth factor 2 (FGF2) in myeloid cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(22): 18230-18248.
[14] Shen W, Chrobak D, Krishnan K, et al. HOXB6 protein is bound to CREB-binding protein and represses globin expression in a DNA binding-dependent, PBX interaction-independent process [J]. J Biol Chem, 2004, 279(38): 39895-39904.
[15] Wang H, Bei L, Shah C A, et al. HoxA10 influences protein ubiquitination by activating transcription of ARIH2, the gene encoding Triad1[J]. J Biol Chem, 2011, 286(19): 16832-16845.
[16] Orlovsky K, Kalinkovich A, Rozovskaia T, et al. Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(19): 7956-7961.
[17] Nagel S, Venturini L, Meyer C, et al. Transcriptional deregulation of oncogenic myocyte enhancer factor 2C in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52(2): 290-297.

(收稿:2012-10-11;修回:2012-11-06)

(编辑 汪勤俭)