

· 论 著 ·

新基因 HA117 在肠腺癌中的表达及意义*

李昆昆, 金先庆[△], 赵利华, 丁雄辉, 陈建飞, 孙艳辉, 牟廷刚, 王士奇
(重庆医科大学附属儿童医院普外科 400014)

摘要:目的 研究新基因 HA117 在肠腺癌细胞中的表达位置和分布情况, 了解其与肠腺癌各临床病例特征的关系。方法 应用免疫组化 SP 法, 检测 20 例肠腺癌和 10 例结肠正常组织中 HA117 的表达。结果 HA117 在肠腺癌中的表达阳性率为 75%, 在正常结肠组织中的表达阳性率为 10%, 其结果差异有统计学意义($P=0.001$); 结肠癌组织中的阳性表达率显著高于直肠癌组织和正常结肠组织($P=0.002$)。在 III~IV 期组织中的表达阳性率比 I~II 期高, 有淋巴结转移组的表达阳性率比无淋巴结转移组高, 低分化组的表达阳性率比中高分化组高, 但其结果差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 HA117 在肠腺癌中有着广泛的分布, 从而提示实体肿瘤对化疗药物的耐受性同样受 HA117 基因的影响。

关键词: 基因; 免疫组织化学; HA117; 肠腺癌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)14-1358-03

Study on expression and significance of novel gene HA117 in colorectal adenocarcinoma*

Li Kunkun, Jin Xianqing[△], Zhao Lihua, Ding Xionghui, Chen Jianfei, Sun Yanhui, Mu Tinggang, Wang Shiqi
(Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To study the specific position and the distribution of the novel gene HA117 and to realize the relationship between HA117 and colorectal adenocarcinoma clinicopathologic features. **Methods** HA117 was detected in 20 cases of colorectal adenocarcinoma and 10 cases of normal colon with immunohistochemistry method. **Results** The positive expression rate of HA117 in colorectal adenocarcinoma and normal colon was 75% and 10%, with statistical significance ($P=0.001$); HA117 positive expression rate in colon carcinoma was significantly higher compared with rectum carcinoma and the normal colonic structure ($P=0.002$). HA117 positive expression rate in III-IV stages was higher than that in I-II stages; the rate was higher in the lymph node metastasis group compared with no lymph node metastasis group; the rate was higher in the poor differentiated group compared with well-differentiated group; but these results had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The distribution of HA117 in colorectal adenocarcinoma is extensive, which suggests that the tolerance toward chemotherapeutics would also be affected by gene HA117.

Key words: genes; immunohistochemistry; HA117; colorectal adenocarcinoma

全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)的抗肿瘤作用的证实被誉为 90 年代国际抗癌药物的三大发现之一^[1]。但 ATRA 使用后肿瘤细胞迅速出现耐药现象, 严重影响了 ATRA 诱导分化治疗的疗效^[2], 因此 ATRA 的耐药问题也成为临床上非常棘手的问题。为了探讨 ATRA 的耐药机制, 在前期研究中本课题组以人急性髓细胞白血病细胞系 HL-60 诱导建立了多药耐药细胞株 HL-60/ATRA^[3], 在抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)建立 HL-60/ATRA 抑制消减杂交文库中, 发现了 433 个与野生型 HL-60 有差异表达的基因克隆, 在此基础上以基因芯片及基因差异表达分析的方法筛选出了 12 个耐药基因克隆, 经过序列同源性分析, 发现了新基因 HA117(基因库登录号为 AY23015), 主要表达于儿童恶性肿瘤如白血病细胞中^[4], 进一步的研究发现它可以使肿瘤细胞对化疗药物耐受性增强^[5-6]。

为进一步了解 HA117 与消化道肿瘤的关系, 本文采用免疫组化的方法检测 HA117 在结肠癌和正常结肠组织中的表达情况, 并分析其表达与临床病理因素之间的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 实验组: 收集 2009~2010 年重庆市肿瘤医院肠腺癌患者的手术切除组织; 结肠癌 20 例, 其中男性 13 例, 女性 7 例, 年龄 38~85 岁。对照组: 本科巨结肠手术切除扩张

段近切口缘的正常结肠组织 10 例, 其中男性 9 例, 女性 1 例, 年龄 40 d 至 10 岁。

1.1.2 实验材料 HA117 多克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司); KIT-9921 即用型免疫组化, EliVision TM Super 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司); PBS 液代替一抗作为空白对照。

1.1.3 实验设备 组织包埋机, 组织切片机, 微波炉, 4℃ 冰箱, 显微镜等。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测方法 所有标本均用 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片(厚 5 μm), 贴附于经多聚赖氨酸处理的切片, 之后 60℃ 烤片 18 h。切片经脱蜡水化, 用 0.01 mol 柠檬酸缓冲液(pH=6.0)进行微波加热抗原修复, 3% 过氧化氢溶液灭活过氧化物酶, BSA 封闭抗原, 以 1:100 比例稀释浓缩型一抗体, 滴加 40 μL 一抗后 4℃ 冰箱过夜。PBS 冲洗后分别滴加生物素标记的二抗和 SP 复合物放大效应, DAB 显色, 镜下控制显色时间并中止反应, 苏木素复染, 脱水透明、封片。

1.2.2 结果判断 HA117 以细胞质为表达部位, 呈棕黄色或棕褐色为阳性, 每片观察 5 个 40 倍光镜下视野, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算阳性细胞数, 根据试剂公司提供的判断标准: 阳性细胞数少于 10% 肿瘤细胞的胞质呈棕黄色为阴性表

达(-),10%~<25%为低度表达(+),25%~75%为中度表达(++),>75%为高度表达(+++),中高度表达为强阳性表达,表示肿瘤对该耐药基因所介导的药物具有耐受性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,用 χ^2 检验统计计数资料, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HA117 表达 20 例肠腺癌中 15 例(占 75%)HA117 阳性表达;主要在间质细胞的胞质中,呈棕黄色或棕褐色,正常的肠腺体细胞阳性表达数较少,阳性细胞数小于 1%。10 例正常结肠组织中 HA117 阳性表达 1 例(阳性细胞数 11.2%,占 10%);其余均无阳性表达。二者差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1 和图 1~4。

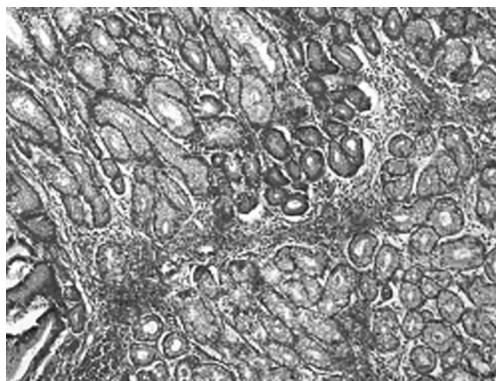


图 1 结肠癌组织的 HE 染色(×400)

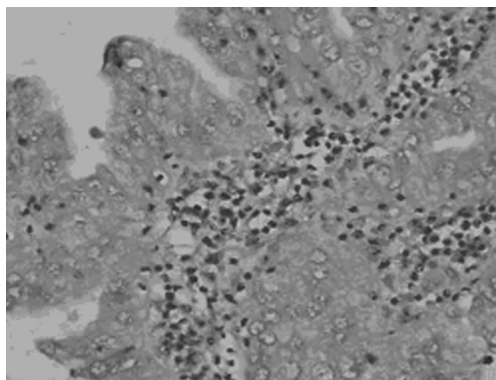


图 2 结肠腺癌的 HA117 表达情况(×400)

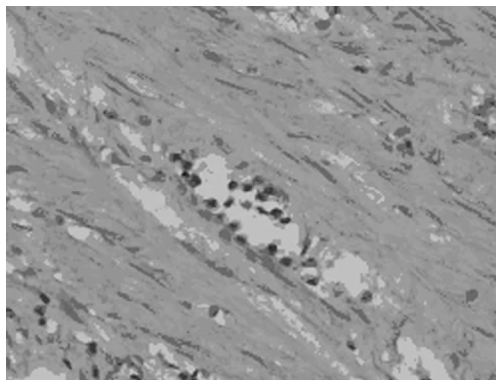


图 3 正常结肠组织未见 HA117 的表达(×400)

2.2 HA117 表达与肠腺癌临床特征的关系

2.2.1 HA117 的表达与肠腺癌分期的关系 根据 UICC 公布的肠癌分期 TMN 分期法: I 期为 $T_{1-2}N_0M_0$; II 期为 $T_{3-5}N_0M_0$; III 期为 $T_{1-5}N_1M_0$; IV 期为 $T_{1-5}N_{0-1}M_0$; 20 例肠腺癌中, I 期 4 例, II 期 12 例, III 期 3 例, IV 期 1 例,其 HA117 阳性

表达者分别为 2(50%)、9(75%)、3(100%)、1(100%),其结果差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 HA117 的表达

组别	总数(n)	阳性(n)	阴性(n)	百分比(%)
肠腺癌组	20	15	5	75
正常结肠组织	10	1	9	10

$\chi^2 = 11.317, P = 0.001$

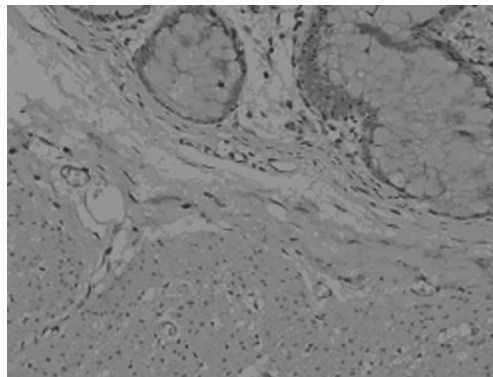


图 4 直肠腺癌的 HA117 表达情况(×400)

表 2 HA117 的表达与肠腺癌分期的关系

	分期			
	I	II	III	IV
总数	4	12	3	1
+	2	9	3	1
-	2	3	0	0

$\chi^2 = 2.533, P = 0.469$

2.2.2 HA117 表达与淋巴结转移的关系 20 例肠腺癌中淋巴结转移 8 例,占 40%;其中表达阳性 7 例(88%),无淋巴结转移 12 例(60%),其中 HA117 表达阳性 8 例,占 67%。二者差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 HA117 的表达与淋巴结转移的关系

淋巴结转移	总数(n)	阳性(n)	阴性(n)	百分比(%)
有转移	8	7	1	88
无转移	12	8	4	67

$\chi^2 = 1.111, P = 0.292$

2.2.3 HA117 表达与肿瘤分化程度的关系 20 例肠腺癌中高分化腺癌 19 例,HA117 表达阳性 14 例,占 73.7%;低分化腺癌 1 例,HA117 表达阳性 1 例,占 100%;而在正常分化 10 例结肠组织中,HA117 表达阳性 1 例,占 10%;HA117 的表达与肿瘤的分化差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 HA117 表达与肿瘤分化程度的关系

分化程度	总数(n)	阳性(n)	阴性(n)	百分比(%)
正常组织	10	1	9	10.0
中高分化	19	14	5	73.7
低分化	1	1	0	100.0

$\chi^2 = 1.304, P = 0.521$

2.2.4 HA117 表达与组织类型的关系 20 例肠腺癌中有结肠癌 6 例,HA117 阳性表达 6 例;直肠癌 14 例,HA117 阳性表

达 9 例;10 例正常结肠组织中阳性表达 1 例;其差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 5。

表 5 HA117 表达与组织类型的关系

组织类型	总数(n)	阳性(n)	阴性(n)	百分比(%)
正常组织	10	1	9	10.0
结肠癌	6	6	0	100.0
直肠癌	14	9	5	64.2

$$\chi^2 = 12.429, P = 0.002$$

3 讨论

3.1 ATRA 耐药现象与耐药基因 HA117 ATRA 是目前国内治疗急性早幼粒细胞白血病、骨髓异常增生的临床首选药物,具有很强的诱导分化肿瘤细胞的作用^[7],同时对各种消化道实体肿瘤也具有抑制增殖和诱导分化的作用^[8],是重要的辅助化疗药物,但 ATRA 诱导瘤细胞产生对 ATRA 及其他化疗药物的耐受,该现象也引起了国内外学者的广泛关注^[9]。

肿瘤细胞多药耐药的产生是多基因参与调控的复杂过程,如经典的多药耐药基因 *mdr1*^[10]、乳腺癌多药耐药相关基因 *bcrp*^[11]、抗凋亡基因 *survivin* 等^[12] 均参与调控肿瘤细胞多药耐药的产生。但这些基因并不足以完全阐明肿瘤细胞多药耐药的机制。新基因 HA117 的发现,完善了肿瘤多药耐药机制的基因谱,进一步的研究发现,该基因定位于 14 号染色体上^[13],并编码一由 365 个氨基酸组成的碱性蛋白,该蛋白含有 4 个与蛋白激酶磷酸化有关的功能位点,其功能结构域与新近发现的参与调控细胞凋亡的重要基序——“PYRIN”同源^[14-15],通过电子表达谱分析已经获知新基因 HA117 主要表达于各种肿瘤组织^[5],并具有使肿瘤细胞对化疗药物耐受性增强的功能。

3.2 HA117 在肠腺癌中的表达特点 本研究结果提示 HA117 在肠腺癌中具有特异性的表达,其表达总阳性率为 75%,提示 HA117 在肠腺癌中有着广泛的分布,从而提示实体肿瘤对化疗药物的耐受性同样受 HA117 基因的影响;而且 HA117 的表达具有明显的组织特异性,结肠癌组织中的阳性表达率显著高于直肠癌组织和正常结肠组织。研究表明,肠腺癌在 III~IV 期、有淋巴结转移组及低分化组的阳性表达较高,但由于观察例数有限,其结果未显示有统计学意义。随着研究的深入,样本量的扩大,相信晚期及低分化的肠腺癌中 HA117 的表达会呈现显著性的改变。

3.3 意义 一方面 HA117 在肠腺癌的显著性表达说明 HA117 参与了肿瘤的耐药产生机制,通过检测患者 HA117 表达情况可以评价患者癌组织的耐药情况,为临床化疗个体化用药提供相应的指导,也许经过深入的研究,HA117 可作为肿瘤在使用 ATRA 化疗前进行评估的重要指标。另一方面本实验的结果有助于探索化疗药物对消化道肿瘤治疗和防复发的新途径,为进一步探索提供理论基础。

(感谢重庆市肿瘤医院病理科李进主任及全体工作人员的支持!)

参考文献:

[1] De Stefano V, Teofili L, Sica S, et al. Effect of all-trans retinoic acid on procoagulant and fibrinolytic activities of cultured blast cells from patients with acute promyelocytic leukemia[J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3535-3541.

[2] Candoni A, Damiani D, Michelutti A, et al. Clinical charac-

teristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia[J]. *Eur J Haematol*, 2003, 71(1): 1-8.

- [3] Komura N, Ikeda Y, Masuda N, et al. Designed ATRA analogue active against ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells having a single nucleotide substitution in their retinoic acid receptor[J]. *Leuk Res*, 2007, 31(3): 301-313.
- [4] Che Y, Xu YH, Zheng GH, et al. Clinical significance of HA117 expression in children with acute leukemia[J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao: Yi Xue Ban*, 2009, 40(5): 873-876.
- [5] Guo YX, Luo Q, Xu YH. Cloning of human HA117 gene and preparation of its recombinant adenovirus vector[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2008, 33(6): 641-644.
- [6] Zheng GH, Jin XQ, Guo YX, et al. Study on the related function of a novel gene HA117 in the multi-drug resistance of lymphoma Raji cell[J]. *Tumor*, 2009, 29(4): 315-318.
- [7] Tsai WH, Hsu HC, Lin CC, et al. Role of interleukin-8 and growth-regulated oncogene-alpha in the chemotactic migration of all-trans retinoic acid-treated promyelocytic leukemic cells toward alveolar epithelial cells[J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(3): 879-885.
- [8] Dokmanovic M, Chang BD, Fang J, et al. Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes[J]. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1(1): 24-27.
- [9] Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Retinoids in cancer chemoprevention[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(3): 285-288.
- [10] Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target[J]. *Mol Interv*, 2001, 1(2): 117-125.
- [11] Allen JD, Schinkel AH. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)[J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(6): 427-434.
- [12] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1133-1139.
- [13] Zheng GH, Fu JR, Xu YH, et al. Screening and cloning of multi-drug resistant genes in HL-60/MDR cells[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(8): 1120-1123.
- [14] Manji GA, Wang L, Geddes BJ, et al. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 11570-11575.
- [15] Wu GQ, Liao YJ, Qin ZQ, et al. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma[J]. *Plasmid*, 2010, 64(1): 41-50.