

结直肠癌组织中同源异型盒基因 B7 蛋白的表达及临床意义

罗云春, 易文, 姚宇宙, 朱妮, 覃鹏飞
(湖北省宜昌市中心人民医院 443000)

[摘要] **目的** 探讨同源异型盒基因 B7(HOXB7)蛋白在结直肠癌中的表达及其与患者临床病理因素和预后的关系。**方法** 回顾性分析结直肠癌患者 87 例,采用 RT-PCR 法和免疫组织化学法分别检测结直肠癌组织中 HOXB7 mRNA 和 HOXB7 蛋白的表达,分析其表达与患者临床病理参数和预后的相关性。**结果** HOXB7 mRNA 在结直肠癌组织中的相对表达量为 (42.4 ± 16.3) ,显著高于癌旁正常组织的 (19.4 ± 7.6) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);HOXB7 蛋白在结直肠癌组织中表达的阳性率为 73.9%,显著高于癌旁正常组织的 10.3% ($P < 0.05$);HOXB7 蛋白表达与患者 TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有显著相关性 ($P < 0.05$),且 HOXB7 蛋白阳性表达的患者具有更差的预后。**结论** HOXB7 蛋白在结直肠癌组织中表达上调,其高表达与结直肠癌患者的临床病理因素和预后相关。

[关键词] 结直肠肿瘤;同源盒结构域蛋白质类;肿瘤转移;预后

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)01-0060-03

Expression of HOXB7 protein in colorectal cancer and its clinical significance

LUO Yunchun, YI Wen, YAO Yuzhou, ZHU Ni, QIN Pengfei

(People's Hospital of Yichang Center, Yichang, Hubei 443000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of HOXB7 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological factors and prognosis. **Methods** Eighty-seven patients with colorectal cancer were retrospectively analyzed. The expression of HOXB7 mRNA and protein in colorectal cancer tissues was detected by RT-PCR and immunohistochemical methods. Their correlation with clinicopathological parameters and prognosis was analyzed. **Results** The relative expression level of HOXB7 mRNA in colorectal cancer tissue was (42.4 ± 16.3) , which was significantly higher than (19.4 ± 7.6) in the paracancerous normal tissue ($P < 0.05$). The positive expression rate of HOXB7 protein in colorectal cancer tissues was 73.9%, which was obviously higher than 10.3% in the paracancerous normal tissue ($P < 0.05$); expression of HOXB7 protein was significantly correlated with the TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$), moreover the patients with HOXB7 positive expression had poorer prognosis. **Conclusion** HOXB7 protein expression is up-regulated in colorectal cancer tissue, and its high expression is correlated with the clinicopathological factors and prognosis in the patients with colorectal cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; homeodomain proteins; neoplasm metastasis; prognosis

结直肠癌是人类最常见的肿瘤之一,其发病率和病死率分别居第 3 位和第 4 位,患者 5 年生存率仅为 50% 左右,预后较差^[1]。同源异型盒基因 B7(homeobox B7, HOXB7)是同源盒基因家族(HOX)中的一员,主要负责细胞的正常分化和发育等过程,近年来研究发现,其参与了多种肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移及耐药性等过程^[2]。研究表明,在胰腺癌、肺癌和乳腺癌中,HOXB7 蛋白高表达,且其表达量与肿瘤的转移、预后相关^[3]。本研究对本院收治的结直肠癌患者临床病理资料进行回顾性分析,探讨 HOXB7 蛋白表达在结直肠癌诊治中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2009 年 4 月至 2010 年 12 月本院就诊并经确诊的结直肠癌患者 87 例,其中男 52 例,女 35 例;年龄 37~67 岁,平均 (54.2 ± 4.1) 岁,所有患者均行结直肠癌根治性手术,手术切除获取结直肠原发肿瘤组织和癌旁正常组织(距离癌灶组织边缘大于 10 cm)标本,并保持随访。所有患者的临床资料及随访资料均保存完整,且术前均未进行任何化疗和放疗。末次随访时间截止于 2015 年 12 月,采用门诊和电话的方式,中位随访时间为 49.7 个月,随访 5~72 个月。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司,SP 免疫组织化学试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,蛋白提取试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗人 HOXB7 蛋白单克隆抗体及羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2.2 RT-PCR 检测组织中 HOXB7 mRNA 水平 利用总 RNA 提取试剂盒提取新鲜冰冻组织中总 RNA,采用反转录方法 PrimeScript RT 试剂盒反转录合成 cDNA,对 HOXB7 mRNA 及内参基因 β -actin 的引物进行 PCR 检测,HOXB7 mRNA 引物序列:正向:5'-GAG CCT TGA CAT TCA ACA T'-;反向:5'-TCT GGT ACG TGC AGG TC-3';内参引物序列:正向:5'-CTG GAC GGT ACC TGC GAA-3';反向:5'-AAG GAG GCT GCA AGC GTG C-3';反应参数为 95 °C 1 min 预变性,95 °C 5 s,60 °C 20 s,荧光检测 1 次,共 40 个循环。记录每个反应管中荧光信号达到设定域值时所经历的循环数。所有反应设 3 个重复,采用 $\Delta\Delta$ Ct 法计算样品中目的基因表达量。

1.2.3 免疫组织化学法检测组织中 HOXB7 蛋白水平 将收集到的样本经 10% 中性甲醛固定,常规组织脱水处理,石蜡包埋,制作 4 μ m 连续切片,二甲苯脱蜡,水化后采用枸橼酸盐缓

冲液加热修复抗原 10 min,再用 H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性 10 min。以已知阳性的结直肠癌切片作为阳性对照,以磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗作阴性对照,操作过程严格按照 SP 免疫组化试剂盒说明书进行。兔抗人 HOXB7 蛋白工作浓度为 1:200,DAB 显色。

1.2.4 结果判定 染色结果由 2 名有经验的病理科医师判定。HOXB7 蛋白以胞质内特异性染色深浅和细胞阳性百分率得分的乘积来进行判定,采用盲法进行观测,每张切片于 400 倍光镜下随机选择 5 个视野测定阳性肿瘤细胞百分率,≤5%为 0 分、>5%~15%为 1 分、>15%~55%为 2 分、>55%~80%为 3 分、>80%为 4 分。染色强度评分:0 分为无色、1 分为淡黄色、2 分为棕黄色、3 分为棕褐色。将每张切片阳性肿瘤细胞百分率的得分与平均染色强度得分的乘积,即为该例免疫组化的最终得分:<4 分为阴性,≥4 分为阳性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或 Fisher 确切概率法分析,采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 HOXB7 mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,HOXB7 mRNA 在结直肠癌组织中的相对表达量(42.4±16.3)显著高于癌旁正常组织(19.4±7.6),差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1。

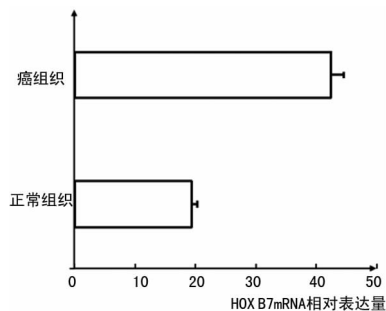
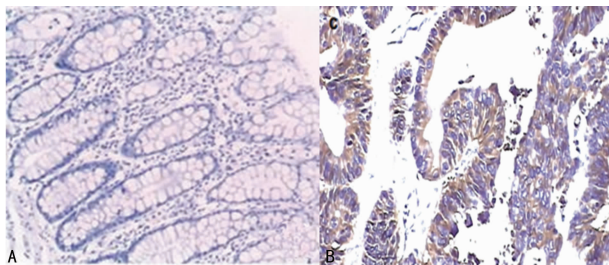


图 1 HOXB7 mRNA 在结直肠组织及癌旁正常组织中表达情况

2.2 HOXB7 蛋白在直肠癌组织中的表达 HOXB7 蛋白的表达位于组织细胞的细胞质和细胞核,以细胞质为主,结直肠癌组织中 HOXB7 蛋白的阳性表达呈棕色或棕褐色颗粒。结果显示,HOXB7 蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率为 79.3%(69/87),而癌旁正常组织的阳性率为 10.3%(9/87),差异有统计学意义(*P*<0.05)。



A: 癌旁正常组织中 HOXB7 蛋白的表达; B: 结直肠癌组织中 HOXB7 蛋白的表达

图 2 HOXB7 蛋白在结直肠癌组织及癌旁正常组织中表达情况

2.3 HOXB7 蛋白表达与患者临床病理因素的关系 HOXB7

蛋白阳性表达率与患者性别、年龄、肿瘤浸润程度和分化程度差异统计学意义(*P*>0.05),而与患者 TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有显著相关性,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

表 1 HOXB7 蛋白表达阳性率与结直肠癌患者临床病理参数关系[n(%)]

临床病理参数	n	HOXB7 蛋白阳性表达	χ^2	P
年龄(岁)			1.047	>0.05
<60	61	47(77.0)		
≥60	26	22(84.6)		
性别			0.944	>0.05
男	52	43(82.7)		
女	35	26(74.3)		
TNM 分期			6.331	<0.05
I~II	40	26(65.0)		
III~IV	47	43(91.5)		
肿瘤浸润深度			0.774	>0.05
T1~T2 期	17	12(70.6)		
T3~T4 期	70	57(81.4)		
淋巴结转移			7.671	<0.05
有	58	54(93.1)		
无	29	15(51.7)		
分化程度				>0.05*
低分化	19	14(73.7)		
中分化	45	36(80.0)		
高分化	23	17(74.0)		
远处转移			6.922	<0.05
M0 期	57	41(72.0)		
M1 期	30	28(93.3)		

*: 采用 Fisher 确切概率法

2.4 结直肠癌组织中 HOXB7 蛋白的表达与患者预后的关系

随访 87 例结直肠癌患者,采用 Kaplan-Meier 生存曲线进行分析,HOXB7 蛋白阳性表达的结直肠癌患者中位生存时间为 41 个月,5 年生存率为 11.2%,HOXB7 蛋白阴性表达的结直肠癌患者中位生存时间为 64 个月,5 年生存率为 72.2%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=24.361, P<0.05$)。

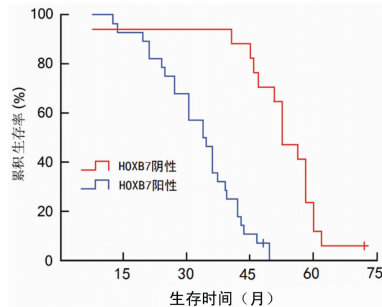


图 3 HOXB7 蛋白的表达与结直肠癌患者生存曲线关系

3 讨论

HOX 家族基因是一类高度保守的基因序列,可编码 60 个氨基酸单位的 DNA 结构域,由于此结构域可与 DNA 特异性结合,因此又称为同源异型结构域^[4-5]。HOXB7 mRNA 是一种 HOX 基因家族的转录因子,位于人第 17 号染色体上,其同源结构域的序列由第 2 个外显子的编码序列所编码^[6]。近年来研究发现,HOXB7 蛋白参与了多种恶性肿瘤的增殖、血管生成和转移等过程^[7]。WU 等^[8]采用 RT-PCR 及基因芯片的

技术对早期乳腺癌组织中 HOXB7 蛋白表达进行了检测,发现其在癌组织中的表达水平显著高于正常乳腺上皮组织。另外, YUAN 等^[9]检测了 224 例结直肠癌样本中 HOXB7 蛋白水平,发现其表达水平与患者的 TNM 分期、Dukes 分期及 5 年生存率明显相关。

目前关于 HOXB7 蛋白对肿瘤发生、发展过程的影响主要包括促进肿瘤细胞增殖,促进肿瘤血管生成,促进肿瘤的侵袭和转移,以及参与 DNA 损伤的修复和细胞周期的调控^[10]。BHATLEKAR 等^[11]发现,HOXB7 蛋白高表达可提高前列腺癌细胞的增殖能力。同时,采用 siRNA 技术抑制 HOXB7 蛋白的表达时,可抑制乳腺癌、肺癌细胞的增殖^[12]。根据肿瘤类型的不同,HOXB7 蛋白对肿瘤侵袭和转移过程的影响不同,例如 HOXB7 蛋白高表达对结直肠癌发生上皮-间质转化现象具有促进作用;而在宫颈癌细胞系中,抑制 HOXB7 蛋白的表达可观察到宫颈癌细胞的侵袭能力显著降低^[13]。

本研究显示,HOXB7 蛋白在结直肠癌组织中表达上调显著高于癌旁正常组织,且 HOXB7 mRNA 在结直肠癌组织中表达水平显著高于癌旁正常组织($P < 0.05$),提示在结直肠癌诊断中 HOXB7 蛋白可能作为一种潜在的分子标志物。通过对 HOXB7 蛋白表达与结直肠癌患者临床病理参数分析,结果表明,HOXB7 蛋白阳性表达与患者 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移有显著相关性($P < 0.05$),提示 HOXB7 蛋白可能参与了结直肠癌的转移过程。随访结果显示,HOXB7 蛋白表达阳性的结直肠癌患者相比于表达阴性的患者具有更差的预后,这提示了 HOXB7 蛋白可能是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素,对 HOXB7 蛋白的检测,可成为判断结直肠癌患者预后的手段之一。

综上所述,在结直肠癌中 HOXB7 蛋白表达显著上调,且其表达与结直肠癌的发生、发展、转移和预后具有相关性,检测 HOXB7 蛋白水平有助于对结直肠癌患者进行准确诊治和预后判断。

参考文献

- [1] 王欣,傅仲学. 结直肠癌的分子生物学研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2010,19(4):426-429.
- [2] 牛苗苗,战军,张宏权. HOX 基因在肿瘤发生发展过程中

的作用[J]. 解剖学报,2014,3(3):430-436.

- [3] 原薇薇,谭艳,杜敏,等. HOXB7 基因在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2014,19(11):987-991.
- [4] 张利飞. 结直肠癌预后预测研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2015,24(4):581-588.
- [5] 朱发霞,马瑞,林从尧. 同源异型盒基因 HOXB7 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. 武汉大学学报(医学版),2015,36(1):58-61.
- [6] 郭贞,焦锋,金子良,等. 转录因子 HOXB7 在肿瘤及相关信号通路中的作用[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(2):200-203.
- [7] 林飞燕,吴爱华,张培丽,等. HoxB8 对结直肠癌细胞生长迁移的影响[J]. 温州医科大学学报,2015,45(11):785-790.
- [8] WU X Y, CHEN H X, PARKER B, et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2006,66(19):9527-9534.
- [9] YUAN W W, ZHANG X L, XU Y, et al. Role of HOXB7 in regulation of progression and metastasis of human lung adenocarcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2014,53(1):49-57.
- [10] 齐鲁,丁彦青. HOXB7 调控 NKX3-1 促进大肠癌转移机制分析[J]. 上海交通大学学报(医学版),2014,3(3):323-328.
- [11] BHATLEKAR S, FIELDS J Z, BOMAN B M. HOX genes and their role in the development of human cancers [J]. *JMM*, 2014,92(8):811-823.
- [12] 刘逸,陈名华,陈德鑫,等. 结直肠癌中同源盒基因 B9 的表达及临床意义[J]. 中国热带医学,2014,14(4):396-400.
- [13] 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.

(收稿日期:2017-06-23 修回日期:2017-09-12)

(上接第 59 页)

- neurological deficit and stroke outcome[J]. *Clin Biochem*, 2008,41(16):1330-1334.
- [13] NAYAK A R, KASHYAP R S, PUROHIT H J, et al. Evaluation of the inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of IL-2 and IL-10[J]. *Inflamm Res*, 2009,58(10):687-691.
 - [14] MORIYAMA M, NAKAMURA S. Th1/Th2 immune balance and other T helper subsets in IgG4-Related disease [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017,401:75-83.
 - [15] MALAIYAN J, RAMANAN P V, SUBRAMANIAM D, et al. Analysis of serum Th1/Th2 cytokine levels in patients with acute mumps infection[J]. *J Glob Infect Dis*, 2016,8(2):87-92.
 - [16] NILANONT Y, PHATTHARAYUTTAWAT S, CHIE-

WIT P, et al. Establishment of the Thai version of National Institute of Health Stroke Scale(NIHSS) and a validation study[J]. *J Med Assoc Thai*, 2010,93(1):S171-S178.

- [17] JENKINS B J. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014,34(10):750-758.
- [18] SZABO S J, SULLIVAN B M, STEMMANN C, et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells[J]. *Science*, 2002,295(5553):338-342.

(收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-09-21)