

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.11.037

◇临床医学◇

同源盒 A9 和前 B 细胞白血病同源盒基因 在结肠癌中的表达及意义

王鹏, 王胜文, 宋晓红

作者单位: 南阳市第一人民医院肛肠科, 河南 南阳 473000

摘要:目的 观察同源盒 A9(HOXA9)和前 B 细胞白血病同源盒基因(PBX3)在结肠癌组织及其癌旁组织中的表达,探讨二者与结肠癌临床病理参数的关系及其对结肠癌 3 年预后的影响。**方法** 选取 2014 年 8 月至 2016 年 5 月于南阳市第一人民医院进行手术治疗的结肠癌病人 77 例,取其癌组织及相应癌旁组织,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测结肠癌及其癌旁组织 HOXA9 mRNA、PBX3 mRNA 表达情况,免疫组织化学法检测其癌组织及癌旁组织标本中 HOXA9P 与 PBX3 蛋白表达,分析 HOXA9P、PBX3 表达与临床病理特征的关系,运用 Spearman 法分析 HOXA9P 与 PBX3 表达相关性,通过 Kaplan-Meier 法对结肠癌病人 3 年内存活情况进行分析。**结果** 与癌旁组相比,结肠癌组 HOXA9 mRNA $[(3.09 \pm 0.55)$ 比 $(1.02 \pm 0.15)]$ 、PBX3 mRNA 表达水平 $[(2.51 \pm 0.47)$ 比 $(0.98 \pm 0.11)]$ 、HOXA9、PBX3 蛋白阳性表达率显著升高 ($P < 0.05$);HOXA9、PBX3 表达均与结肠癌病人分化程度、TNM 分期有关 ($P < 0.05$);Spearman 相关性分析结果显示结肠癌组织中 HOXA9 与 PBX3 mRNA 表达呈正相关 ($r_s = 0.643, P < 0.05$);Kaplan-Meier 法分析显示 HOXA9、PBX3 阳性表达组 3 年内总生存率(OS)显著低于阴性表达组 (41.2% VS 84.6%, 43.6% VS 86.4%)。**结论** 结肠癌组织中 HOXA9、PBX3 均高表达,二者呈正相关,均与结肠癌分化程度、TNM 分期及预后相关,可能共同参与结肠癌的发生发展。

关键词:结肠肿瘤; 前体 B 细胞淋巴瘤母细胞白血病淋巴瘤; 基因,同源盒; 同源盒 A9; 前 B 细胞白血病同源盒基因 3; 预后

Expressions and significances of transcription factors HOXA9 and PBX3 in colon cancer

WANG Peng, WANG Shengwen, SONG Xiaohong

Author Affiliation: Department of Anorectal, Nanyang First People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: Objective To observe the expressions of homologous box A9 (HOXA9) and pre-B-cell leukemia homologous box 3 (PBX3) in colon cancer and its adjacent tissues, and to explore their relationships with clinicopathological parameters of colon cancer and their effects on three-year prognosis of colon cancer. **Methods** 77 patients with colon cancer who underwent surgical treatment in Nanyang First People's Hospital from August 2014 to May 2016 were selected, cancer tissues and corresponding adjacent tissues were taken, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expressions of HOXA9 mRNA and PBX3 mRNA in colon cancer and adjacent tissues, the expressions of HOXA9P and PBX3 were detected by immunohistochemistry, the relationships between the expressions of HOXA9P and PBX3 and clinicopathological features were analyzed, Spearman method was used to analyze the correlation between HOXA9P and PBX3 expressions, the 3-year survival of patients with colon cancer was analyzed by Kaplan-Meier method. **Results** Compared with the adjacent group, the expression levels of HOXA9 mRNA $[(3.09 \pm 0.55)$ vs. $(1.02 \pm 0.15)]$, PBX3 mRNA $[(2.51 \pm 0.47)$ vs. $(0.98 \pm 0.11)]$, HOXA9 and PBX3 proteins were significantly higher in colon cancer group ($P < 0.05$). The expressions of HOXA9 and PBX3 were related to the differentiation degree and TNM stage of colon cancer patients ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that HOXA9 was positively correlated with PBX3 mRNA expressions in colon cancer ($r_s = 0.643, P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that the 3-year overall survival (OS) rate of HOXA9 and PBX3 positive expression group was significantly lower than that of negative expression group (41.2% vs. 84.6%, 43.6% vs. 86.4%). **Conclusion** HOXA9 and PBX3 are highly expressed in colon cancer tissues, there is a positive correlation between them, and they are correlated with the degree of differentiation, TNM stage and prognosis of colon cancer, and may participate in the occurrence and development of colon cancer.

Key words: Colonic neoplasms; Precursor B-cell lymphoblastic leukemia-lymphoma; Genes, homeobox; Homologous box A9; Homologous box gene 3 of pre-B-cell leukemia; Prognosis

结肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,发病率占胃肠道肿瘤的第 3 位,近年来结肠癌发生率随饮食结

构、生活习惯变化而增加^[1-3]。结肠癌的发生是多种癌基因、抑癌基因共同参与调控的疾病,其病理机制

尚未完全阐明。同源盒 A9(homeobox gene, HOXA9) 是 HOX 基因 A 簇中的成员之一, 研究显示其在结肠癌组织中异常表达^[4]。前 B 细胞白血病同源盒基因(Pre-B-cell Leukemia Homeobox Gene 3, PBX3) 可以调节肿瘤生长增殖等生物学行为, 但其在结肠癌中报道较少, 其作用与分子机制尚不清晰^[5]。研究显示, PBX 与 HOX 编码蛋白可相互结合, 促进 HOX 编码蛋白与下游靶基因结合调控癌症进程^[6], 但二者在结肠癌中表达关系研究较少, 因此本研究采用免疫组化法检测 HOXA9 和 PBX3 在结肠癌组织及其癌旁组织中的表达情况, 分析其与结肠癌临床病理参数及预后的关系, 同时对二者相关性进行分析, 以期对结肠癌的诊断与治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 8 月至 2016 年 5 月于南阳市第一人民医院进行手术治疗的 77 例结肠癌病人, 取其癌组织及相应癌旁组织(其部位与肿瘤边缘间至少距离 2 cm) 分别作为结肠癌组与癌旁组, 所有病人均经病理证实为结肠癌。其中男 34 例, 女 43 例, 年龄范围为 49~70 岁, 年龄(59.51±8.17) 岁。收集临床病理资料, 按照国际抗癌联盟制定的结肠癌分期标准^[4]分为 I 期 20 例、II 期 19 例、III 期 19 例、IV 期 19 例; 高分化 12 例、中分化 17 例、低分化 48 例。纳入标准: 结肠癌病人均经手术病理证实; 术前未进行化疗、放疗及激素治疗者; 病灶无明显坏死区。排除标准: 临床资料不完整者; 合并自身免疫性疾病者; 具有明显炎症细胞浸润癌旁组织; 合并其他恶性肿瘤者。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求, 所有研究对象对本研究知情同意且签署知情同意书。

1.2 方法 应用 TRI 试剂提取结肠癌组织及其癌旁组织标本中 RNA, 应用 Bio Rad 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 采用 2×SYBR Green PCR MAsterMix, 以 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 检测, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 见表 1。PCR 反应条件: 95 ℃ 10 min; (95 ℃ 15 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s)×40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 算法^[7] 计算 HOXA9 mRNA、PBX3 mRNA 相对表达量, 均以 GAPDH 为内参基因。试验重复 3 次, 取平均值。

表 1 引物设计

基因	正向引物 5'—3'	反向引物 5'—3'
HOXA9	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
PBX3	CCTAATGTACAGTATGGTGG	CTATGCATCACCTCACATAG
GAPDH	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTC

1.3 免疫组化染色 取冻存的结肠癌组织及其癌

旁组织进行切片, 厚度 4 μm, 脱蜡处理后使用 3% 过氧化氢灭活, 切片用 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 清洗后滴加 Ultra V Block, 室温条件下孵育 5 min 封闭, 滴加一抗工作液, 4 ℃ 孵育过夜, PBS 冲洗, 滴加生物素标记的二抗工作液, 37 ℃ 孵育 30 min 后经 DAB 显色剂显色, 蒸馏水充分冲洗后苏木素复染, 并将其在不同梯度乙醇中脱水、封片。在 400 倍光镜下观察结果并从每个切片中选取 10 个高倍视野中随机挑选并对阳性染色细胞数量进行统计。观察记录指标并采用半定量积分法判定结果: 阳性细胞百分比与染色程度。按照染色程度: 无色 0 分; 淡黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分, 按照阳性细胞占同类观察细胞总数的百分比: <5% 记为 0 分; 5%~25% 记为 1 分; 26%~50% 记为 2 分; >50% 记为 3 分。取两组积分之乘积: ≤2 分为阴性, ≥2 分为阳性。

1.4 统计学方法 采用统计学软件 SPSS17.0 对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用例(%)表示, 采用 χ^2 检验; 采用 Spearman 法进行相关性分析。各组数据均以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织及其癌旁组织中 HOXA9 mRNA、PBX3 mRNA 表达情况 与癌旁组相比, 结肠癌组 HOXA9 mRNA、PBX3 mRNA 表达水平显著升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 结肠癌 77 例癌组织及癌旁组织 HOXA9 mRNA、PBX3 mRNA 表达水平的检测结果

组别	例数	HOXA9/GAPDH/ $\bar{x} \pm s$	PBX3/GAPDH/ $\bar{x} \pm s$
癌旁组	77	1.02±0.15	0.98±0.11
结肠癌组	77	3.09±0.55	2.51±0.47
<i>t</i> 值		31.862	27.814
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 结肠癌组织及其癌旁组织中 HOXA9、PBX3 蛋白表达情况 免疫组化结果显示 HOXA9 位于细胞质中, 染色呈浅黄色、棕黄色颗粒。PBX3 位于细胞质及细胞膜中, 染色呈浅黄色、棕黄色颗粒。见图 1。与癌旁组相比, 结肠癌组 HOXA9、PBX3 蛋白阳性表达率均显著升高(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 结肠癌组织及癌旁组织中 HOXA9、PBX3 蛋白表达(*n*=77)

组别	HOXA9			PBX3		
	阴性/例	阳性/例	阳性率/%	阴性/例	阳性/例	阳性率/%
癌旁组	58	19	24.67	54	23	29.87
结肠癌组	26	51	66.23	22	55	71.43
χ^2 值			26.819			27.266
<i>P</i> 值			<0.001			<0.001

2.3 HOXA9、PBX3蛋白表达与结肠癌临床病理参数的关系 根据HOXA9表达情况分为HOXA9阴性26例,阳性51例,根据PBX3表达情况分为PBX3阴性22例,PBX3阳性55例。分化程度低、TNM分期Ⅲ~Ⅳ期病人HOXA9阳性表达、PBX3阳性表达比例均显著高于分化程度中高、TNM分期Ⅰ~Ⅱ($P < 0.05$),在不同性别、年龄、肿瘤部位、结肠癌类型、肿瘤大小病人中比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表4。

表4 结肠癌77例HOXA9、PBX3表达与结肠癌临床病理参数关系/例

临床病理特征	例数	HOXA9		χ^2 值, P值	PBX3		χ^2 值, P值
		阴性 (26)	阳性 (51)		阴性 (22)	阳性 (55)	
性别							
男	34	12	22	0.064, 0.801	11	23	0.427, 0.514
女	43	14	29		11	32	
年龄							
< 50岁	37	13	24	0.083, 0.773	10	27	0.083, 0.773
≥50岁	40	13	27		12	28	
肿瘤部位							
左	41	14	27	0.060, 0.807	12	29	0.021, 0.885
右	36	12	24		10	26	
肿瘤大小							
≤5 cm	43	16	27	0.516, 0.472	13	30	0.132, 0.717
> 5 cm	34	10	24		9	25	
分化程度							
高、中分化	29	15	14	6.708, 0.010	13	16	6.024, 0.014
低分化	48	11	37		9	39	
TNM分期							
Ⅰ~Ⅱ	39	21	18	22.904, < 0.001	20	19	19.972, < 0.001
Ⅲ~Ⅳ	38	5	33		2	36	
类型							
腺癌	35	15	20	2.371, < 0.001	8	27	1.027, 0.311
黏液腺癌	42	11	31		14	28	

2.4 结肠癌组织中HOXA9、PBX3表达关系 HOXA9、PBX3在结肠癌组织中同阳性表达率为61.03%(47/77),同阴性表达率为23.38%(18/77)。Spearman相关性分析结果显示结肠癌组织中

HOXA9与PBX3表达呈正相关($r_s = 0.643$, $P < 0.05$)。见表5。

表5 结肠癌组织中HOXA9、PBX3表达关系/例

组别	例数	HOXA9阴性	HOXA9阳性
PBX3 阴性	22	18	4
PBX3 阳性	55	8	47

2.5 结肠癌组织中HOXA9、PBX3蛋白表达与预后的关系 Kaplan-Meier法分析显示HOXA9阳性表达组3年内总生存率(Overall survival, OS)显著低于阴性表达组(41.2%比84.6%)($\chi^2 = 40.358$, $P = 0.000$)。PBX3阳性表达组病人3年内OS显著低于阴性病人(43.6%比86.4%)($\chi^2 = 40.260$, $P = 0.000$)。见图2。

3 讨论

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,好发于直肠与乙状结肠交界处,对人类生命健康具有极大威胁。早期症状不明显,中期也仅表现为腹胀、消化不良,待发生腹痛、黏液便时已为中晚期,且伴随病灶转移,贻误最佳治疗时期,因此提高结肠癌早期诊断率、寻找新的分子靶向治疗及转移、复发预警指标等成为结肠癌研究中需解决的重大问题。

结肠癌是多基因参与的过程,目前已发现多种促癌、抑癌基因参与结肠癌的癌变进程。研究显示,HOXA9在结肠癌中异常表达,HOX基因在调控结肠癌细胞增殖与分化中发挥重要作用^[4]。HOXA9位于人类7p15-p14,是同源盒HOX基因A簇中一员,在控制细胞增殖、分化以及疾病进展中发挥重要作用^[7]。Bhatlekar等^[8]研究表明,HOXA9在结肠癌组织中呈上调表达。本研究中qRT-PCR结果显示结肠癌组织HOXA9 mRNA表达水平显著高于其癌旁组织,同时免疫组化法显示结肠癌组织HOXA9蛋白阳性率显著高于其癌旁组织,基因、蛋白水平均显示结肠癌中HOXA9表达水平上调,提示HOXA9可能与结肠癌的发病有关,是潜在的促肿瘤因子。进一步研究显示HOXA9与淋巴结转

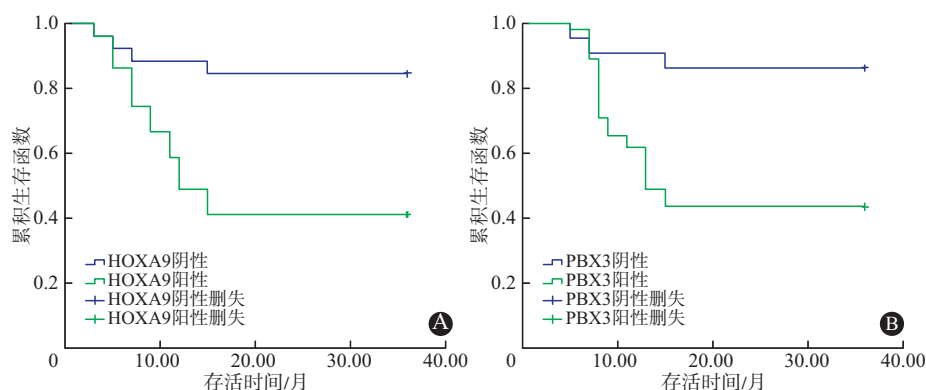


图2 结肠癌77例生存曲线图:A为HOXA9,B为PBX3

移、临床分期、组织分化程度、浸润深度显著相关,提示 HOXA9 可能促进结肠癌恶性转变过程,与 Bhatlekar 等研究一致。同时本研究结果显示 HOXA9 阳性表达组 3 年内 OS 显著低于阴性表达组,提示 HOXA9 阳性表达不利于结肠癌病人预后,为结肠癌病人术后随访提供了观测指标。

PBX3 是同源盒 PBX 基因家族成员,编码的蛋白为转录因子 PBX3,在多种组织中广泛表达,在多种恶性肿瘤中均高水平表达,如胃癌、宫颈癌以及子宫内膜癌^[9-12]。研究表明转录因子 PBX3 可诱导上皮间质转化的发生,正常生理状态下 PBX3 处于“沉默”状态,当发生癌症时被激活^[13]。Han 等^[14]研究表明,结直肠癌组织中 PBX3 表达高于正常结直肠组织,且其表达与结直肠癌病人预后相关。PBX3 的高表达导致 E-cadherin 介导的细胞黏附丢失、诱导间充质标志物活化,增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力,促进结直肠癌的浸润与转移^[15]。本研究 qRT-PCR 与免疫组化结果显示,结肠癌组织 PBX3 mRNA、蛋白阳性表达率显著高于其癌旁组织,与临床病理参数的关系研究表明, PBX3 与结肠癌临床分期、分化程度均显著相关,提示 PBX3 可能促进结肠癌的进展过程。Lamprecht 等^[16]通过细胞学研究证实, PBX3 在具有低分化结直肠癌细胞株中高表达,而在人结肠癌高分化细胞株中表达水平则较低,提示 PBX3 可能与细胞的分化程度及转移潜能密切相关。与此一致,本研究也发现低分化结肠癌组织中 PBX3 蛋白阳性表达率显著高于中高分化癌组织。本研究还显示 PBX3 阳性表达组病人 3 年内 OS 显著低于阴性病人,提示 PBX3 阳性表达与结肠癌病人的不良预后密切相关,需加强术后随访,并采取方案改善病人预后,延长生命。研究表明, PBX 基因编码的蛋白与 HOX 基因编码的蛋白可相互结合,增强 HOX 蛋白与 DNA 的结合能力,促进下游分子转录激活,进而促进肿瘤的发展^[17]。本研究 Spearman 分析表明 HOXA9、PBX3 蛋白表达在结肠癌组织中正相关,二者又均与结肠癌临床病理特征密切相关,推测结肠癌的发生发展可能涉及 HOXA9、PBX3 共同作用,但二者之间的相互作用还有待进一步研究。

综上所述,结肠癌组织中 HOXA9、PBX3 蛋白高表达,两者均与结肠癌临床病理特征及预后相关,可能共同参与结肠癌的发生发展。本研究存在一定不足之处,研究样本较少可能会对结果造成偏倚,将扩大样本量,另外对 HOXA9、PBX3 共同参与结肠癌的关系也有待进一步研究。

(本文图 1 见插图 11-1)

参考文献

- [1] 沈胤晨,石远凯,韩晓红.结直肠癌靶向治疗研究进展[J].中华病理学杂志,2015,44(6):430-433.
- [2] 李新峰,侯臣芳.腹腔镜结肠癌根治术与开腹结肠癌根治术的近、远期疗效对比[J].现代肿瘤医学,2017,25(4):584-587.
- [3] 宋华琛,唐晓楠,张海婧,等.结肠炎相关结肠癌机制研究进展[J].基础医学与临床,2018,38(4):568-572.
- [4] WATANABE Y, SAITO M, SAITO K, et al. Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):2756-2762.
- [5] LI Z, CHEN P, SU R, et al. PBX3 and MEIS1 cooperate in hematopoietic cells to drive acute myeloid leukemias characterized by a core transcriptome of the MLL-rearranged disease[J]. Cancer Res, 2016, 76(3):619-629.
- [6] ALHARBI R A, PANDHA H S, SIMPSON G R, et al. Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(52):89566-89579.
- [7] 葛元勋,巩丽,张伟. HOXA9 基因与恶性肿瘤关系的研究进展[J].现代肿瘤医学,2017,25(2):296-299.
- [8] BHATLEKAR S, VISWANATHAN V, FIELDS JZ, et al. Overexpression of HOXA4 and HOXA9 genes promotes self-renewal and contributes to colon cancer stem cell overpopulation [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2):727-735.
- [9] WANG SH, LI CL, WANG WB, et al. PBX3 promotes gastric cancer invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5):3485-3491.
- [10] HAN S Y, HAN H B, TIAN X Y, et al. MicroRNA-33a-3p suppresses cell migration and invasion by directly targeting PBX3 in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7 (27):42461-42473.
- [11] 杜昌宇. PBX3 在宫颈癌中的表达及与临床病理参数和预后关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(10):904-908. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8189.2018.10.004. [万方链接]
- [12] 丁文清,袁迎九,后建丽,等. PBX3 基因通过 p38 信号通路对子宫内膜癌细胞生物学特性的影响研究[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(10):741-744.
- [13] LAMPRECHT S, KALLER M, SCHMIDT E M, et al. PBX3 is part of an EMT regulatory network and indicates poor outcome in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(8):1974-1986.
- [14] HAN HB, GU J, ZUO HJ, et al. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer [J]. J Pathol, 2012, 226(3):544-555.
- [15] HAN H B, GU J, JI D B, et al. PBX3 promotes migration and invasion of colorectal cancer cells via activation of MAPK/ERK signaling pathway[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(48):18260-18270.
- [16] FENG Y, XU X, ZHANG Y, et al. HPIP is upregulated in colorectal cancer and regulates colorectal cancer cell proliferation, apoptosis and invasion[J]. Sci Rep, 2015, 5(1):9429.
- [17] ALHARBI RA, PANDHA HS, SIMPSON GR, et al. Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(52):89566-89579.

(收稿日期:2019-07-25,修回日期:2019-09-12)