

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-04-003

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

HOXA5、E-cadherin、 β -catenin 在宫颈癌中的表达及意义^①

田 佳^{1②}, 林恒洁², 耿通会², 杨柳丹², 黄艳芳², 周英琼^{1③}

(1. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院临床医学院, 广西 桂林 541199)

摘要 目的: 探讨同源异型盒基因 A5 (HOXA5)、E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) 和 β -环连蛋白 (β -catenin) 的表达与宫颈癌临床病理学特征之间的关系。方法: 选取宫颈癌及非癌宫颈的石蜡包埋组织各 110 例, 制成组织芯片, 用免疫组织化学法检测 HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 的表达, 并分析他们之间的关联。结果: ①HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 的阳性表达率在宫颈癌组中分别为 56.4%、62.7% 和 72.7%, 在非癌宫颈组中分别为 87.3%、86.4% 和 89.1%, 3 种蛋白在宫颈癌组的表达均低于非癌宫颈组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。②HOXA5 和 β -catenin 的阳性表达与宫颈癌肌层浸润和 FIGO 分期相关 ($P < 0.05$)。③在宫颈癌中, HOXA5 与 β -catenin 的表达呈正相关 ($r = 0.202, P < 0.05$)。结论: HOXA5、E-cadherin 及 β -catenin 在宫颈癌中表达降低, HOXA5 和 β -catenin 表达与宫颈癌的肌层浸润和 FIGO 分期相关。

关键词: 同源异型盒基因 A5; E-钙黏附蛋白; β -环连蛋白; 宫颈鳞状细胞癌

中图分类号: R737.33

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)04-0020-07

Expressions and significance of HOXA5, E-cadherin and β -catenin in cervical cancer^①

TIAN Jia^{1②}, LIN Hengjie², GENG Tonghui², YANG Liudan², HUANG Yanfang², ZHOU Yingqiong^{1③}

(1. Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001;

2. School of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective: To investigate the relationship between the expression of homologous box gene A5 (HOXA5), E-cadherin, β -catenin and the clinicopathological features of cervical squamous cell carcinoma (CSCC). Methods: Paraffin-embedded sections were made from 110 cases of cervical cancer tissues and 110 cases of chronic cervicitis non-cancerous tissues, and then tissue chips were made. The

① 基金项目: 国家大学生创新创业训练计划项目 (202010601001); 广西自然科学基金项目 (2018GXNSFAA050049)。

② 第一作者简介: 田佳, 硕士, 主治医师, 研究方向为乳腺及女性生殖系统肿瘤。

③ 通信作者: 周英琼, E-mail: 631375867@qq.com。

expressions of HOXA5, E-cadherin and β -catenin in tissue samples were detected by immunohistochemistry and their relationships were analyzed. Results: ① The positive expression rates of HOXA5, E-cadherin and β -catenin in CSCC were 56.4%, 62.7% and 72.7% respectively, 87.3%, 86.4% and 89.1% in normal tissues respectively. The expressions of the three kinds of proteins in CSCC tissues were lower than those in normal tissues, with statistical differences ($P < 0.05$). ② The positive expression of HOXA5 and β -catenin in CSCC were related to the myometrium infiltrated and the stage of FIGO ($P < 0.05$). ③ The expression of HOXA5 was positively correlated with β -catenin in cervical cancer ($r = 0.202$, $P < 0.05$). Conclusion: The expression levels of HOXA5, E-cadherin and β -catenin in CSCC were decreased, and the expressions of HOXA5 and β -catenin were related to the myometrium infiltration and the stage of FIGO.

Keywords: homologous box gene A5; E-cadherin; β -catenin; cervical squamous cell carcinoma

宫颈癌是影响全球女性健康的第4位高发癌症,也是影响我国女性健康的第6位高发癌症。2020年,全球新发宫颈癌604 127例,死亡人数为341 831例,分别占女性癌症发病和死亡总数的6.5%和7.7%^[1-2]。目前,防治宫颈癌的对策主要从早期筛查及晚期治疗两方面着手。宫颈癌的防控已取得一些成效,已有4种人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)疫苗获批上市,多种宫颈癌筛查技术与筛查方案已基本成熟^[3]。然而,当宫颈癌发展到晚期阶段,手术切除癌变组织结合放化疗的治疗效果并不理想,转移和复发率较高。因此,提高晚期宫颈癌患者的治疗效果是临床工作的重点和难点,探索晚期宫颈癌新的临床治疗方法和标志物具有十分重要的意义。

HOXA5是HOX基因家族的成员之一,是重要的转录调节因子,定位于7号染色体(7q15.2),编码一种DNA结合转录因子,这种转录因子抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抗血管生成、抑制肿瘤细胞转移和侵袭,改变细胞结构^[4]。HOXA5编码270个氨基酸的ANTP级同源结构域蛋白,广泛参与乳腺、卵巢等组织的生长发育,在细胞生长和分化中处于关键位置^[5]。

β -连环蛋白(β -catenin)与E-钙黏附蛋白(E-cadherin)是Wnt信号通路中的两个重要成员, β -catenin作为Wnt信号通路的关键调节因子,兼有细

胞间连接和信号传导的功能;E-cadherin作为重要的细胞连接因子,参与维持细胞的形态和细胞间的连接^[6]。

本研究使用免疫组织化学染色方法检测宫颈鳞癌和非癌宫颈石蜡包埋组织中HOXA5、E-cadherin和 β -catenin的表达,探讨宫颈鳞癌及非癌宫颈组织中HOXA5、E-cadherin和 β -catenin的蛋白表达情况,并分析其与临床病理学参数间的关系,为宫颈癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集桂林医学院附属医院病理科2011年1月至2018年12月手术切除的110例宫颈鳞癌组织蜡块作为观察对象,另取同期非癌宫颈组织蜡块(子宫肌瘤、子宫脱垂等疾病切除的宫颈组织)110例作为对照。所有患者术前均没有经过临床的化学治疗及生物治疗。患者年龄30~70岁,中位年龄48岁,其中年龄<49岁的61例, ≥ 49 岁的49例。组织学分级:高分化鳞癌21例,中分化鳞癌59例,低分化鳞癌30例;临床分期(FIGO, 2018): I期12例, II期86例, III~IV期12例;伴有淋巴结转移者11例。所有病例均经病理学诊断证实,并由1名主任医师和1名主治医师复核。

1.2 主要试剂

兔源性 HOXA5 多克隆抗体购自 Abcam 公司,工作浓度为 1:300;鼠源性 E-cadherin、 β -catenin 单克隆抗体(均为即用型工作液)、DAB 显色试剂盒(20 \times)购自福州迈新生物技术开发有限公司;兔抗人 Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 均购自 Affinity 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 组织芯片制作 ①组织芯片供体蜡块的选择:本研究收集桂林医学院附属医院病理科 2011 年 1 月至 2018 年 12 月保存的 110 例宫颈鳞癌和 110 例同期非癌宫颈组织的病理组织蜡块,通过 HE 切片挑选打孔区域,避开出血、坏死区域,并在蜡块的相应位置进行标记。②组织芯片蜡块的制备:选择 10 \times 9 点的受体蜡块,在供体蜡块上标记的组织部位打孔,采集组织芯,每个标本选取两个位置打孔,将取得的组织芯移入受体蜡块中,并标记组织方位,顺序为每放两个宫颈癌组织再放两个非癌宫颈组织,并空出最后 1 个点以对组织芯片进行定位。将制备好的受体蜡块放入 68 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温烤箱 15 min,室温下冷却 25 min,循环 4 次,然后用已融化的 75 $^{\circ}\text{C}$ 液态蜡覆盖组织芯片蜡块,放入包埋盒,75 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 min,待组织与受体蜡块充分融合后,自然冷却至蜡块凝固,用蜡块修整仪将芯片蜡块表面处理平整。

1.3.2 免疫组织化学染色 将制作好的组织芯片蜡块置于冰块冷却 18 min,再放入冰箱冷冻 5 min,进行厚度为 4.0 μm 的连续切片,常规脱蜡至水后,高压修复抗原,蒸馏水冲洗。然后进行检查,①阻断内源性过氧化物酶,PBS 冲洗 3 次,3 min/次。②滴加一抗,室温 60 min,PBS 冲洗 3 次,3 min/次;滴加二

抗,室温放置 15 min,PBS 冲洗 3 次,3 min/次。③DAB 显色 4 min。④苏木精复染。⑤中性树胶封片。

1.4 结果判断标准

HOXA5 蛋白主要表达于细胞质,出现棕黄色或黄色颗粒为阳性表达。E-cadherin 及 β -catenin 蛋白表达于细胞膜,出现棕黄色或黄色颗粒为阳性表达,仅有细胞质及胞核染色为异常。每个病例在光镜下随机选取 5 个视野,每个视野记数 100 个细胞。①按阳性着色程度评分:0 分为无着色,与背景色一致;1 分为稍浅黄色,比背景颜色略深;2 分为棕黄色,明显比背景色深;3 分为棕褐色。②按阳性细胞所占比例评分:0 分为阴性;1 分为 10% 以下;2 分为 11%~50%;3 分为 51%~75%;4 分为 75% 以上。③每个病例以两者乘积判定阳性结果:0~2 分为阴性(-);3~4 分为弱阳性(+);5~8 分为中度阳性(++);9~12 分为强阳性(+++),将 ≥ 3 分定为阳性结果, < 3 分定为阴性结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,计数资料用 n 、% 表示,采用 χ^2 检验或 Fishers 精确法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 的蛋白表达

宫颈癌组织中,HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 阳性表达率分别为 56.4%、62.7% 和 72.7%,非癌宫颈组织中,HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 阳性表达率分别为 87.3%、86.4% 和 89.1%,HOXA5、E-cadherin、 β -catenin 在宫颈癌组织的表达低于非癌宫颈组织,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

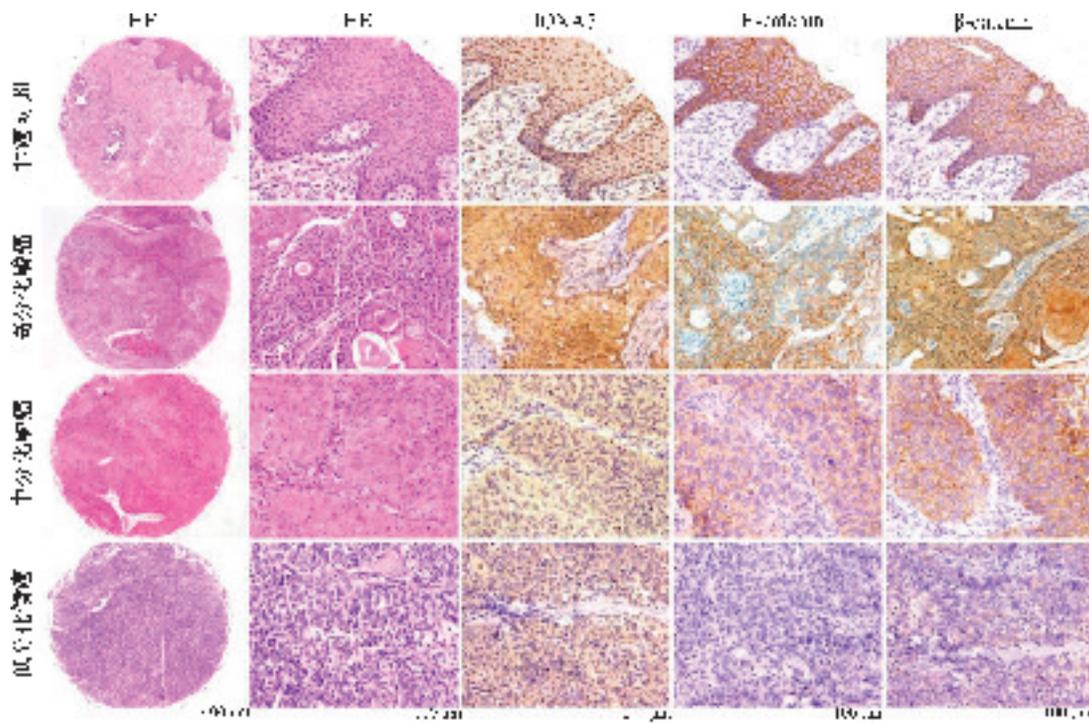


图 1 免疫组织化学检测 HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 在宫颈癌及非癌宫颈组织中的表达

2.2 HOXA5、E-cadherin 和 β -catenin 的表达与临床病理特征的关系

HOXA5、 β -catenin 的表达与肿瘤浸润肌层、临床分期具有相关性 ($P < 0.05$), 与患者年龄、肿瘤大

小、分化程度、淋巴结转移、预后无明显关联 ($P > 0.05$); E-cadherin 的表达与年龄、肿瘤大小、分化程度、肌层浸润、淋巴结转移、临床分期均无相关性 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 宫颈癌组织中 HOXA5、E-cadherin、 β -catenin 的表达及其与非癌宫颈组织相关指标的关系

类别	n	HOXA5		E-cadherin		β -catenin	
		阳性(n, %)	P	阳性(n, %)	P	阳性(n, %)	P
年龄(岁)							
<49	61	34(55.7)	>0.05	37(61.7)	>0.05	44(73.3)	>0.05
≥ 49	49	28(57.1)		32(64.0)		36(72.0)	
肿瘤大小(cm)							
<0.7	3	2(66.7)	>0.05	3(100)	>0.05	3(100)	>0.05
≥ 0.7	107	60(56.1)		66(61.7)		77(72.0)	
组织学分级							
高分化	21	14(66.7)	>0.05	16(76.2)	>0.05	18(85.7)	>0.05
中分化	59	31(52.5)		36(61.0)		42(71.2)	
低分化	30	17(56.7)		17(56.7)		20(66.7)	
浸润肌层							
已浸润	95	58(61.1)	<0.05	63(66.3)	>0.05	73(76.8)	<0.05
未浸润	15	4(26.7)		6(40.0)		7(46.7)	

续表

类别	n	HOXA5		E-cadherin		β-catenin	
		阳性(n,%)	P	阳性(n,%)	P	阳性(n,%)	P
淋巴结转移							
已转移	11	5(45.5)	>0.05	8(72.7)	>0.05	10(90.9)	>0.05
未转移	99	58(58.6)		61(61.6)		70(70.7)	
FIGO 分期							
I A	12	2(16.7)	<0.05	4(33.3)	>0.05	5(41.7)	<0.05
I B	86	55(64.0)		57(66.3)		64(74.4)	
II-IV	12	5(41.7)		8(66.7)		11(91.7)	
存活时间							
存活<5年	13	6(46.2)	>0.05	8(61.5)	>0.05	9(69.2)	>0.05
存活≥5年	57	33(57.9)		38(66.7)		44(77.2)	

2.3 HOXA5、E-cadherin 和 β-catenin 在宫颈癌中的关联

宫颈癌组织中,HOXA5 的表达与 β-catenin 的表达呈正相关($r=0.202, P<0.05$),与 E-cadherin 表达不相关($r=0.156, P>0.05$),见表 2。

表 2 HOXA5、E-cadherin 和 β-catenin 在宫颈癌中的表达及其相关性分析(n)

组别	HOXA5 表达		r	P
	阳性(n=62)	阴性(n=48)		
E-cadherin				
阳性	43	26	0.156	>0.05
阴性	19	22		
β-catenin				
阳性	50	30	0.202	<0.05
阴性	12	18		

3 讨论

HOXA5 是同源异型盒(HOX)基因家族的成员之一,在控制胚胎细胞生长和器官发育中占有关键地位,参与多种遗传疾病和肿瘤的发生与发展^[7]。在肺腺癌组织中,HOXA5 的表达低于正常组织,HOXA5 高表达肺癌患者的总生存率高于 HOXA5 低表达的肺癌患者,HOXA5 可能通过抑制肺腺癌细胞

的增殖、转移和侵袭延缓肺腺癌的发展^[8]。胃癌组织中 HOXA5 的表达与肿瘤大小和 TNM 分期相关,高表达 HOXA5 的胃癌患者总生存期和无病生存期更长^[9]。但在侵袭性胶质瘤^[5]和乳腺癌^[10]中,HOXA5 的表达高于正常组织,通过影响细胞周期,促进肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡,加速肿瘤的进展。

E-cadherin 在组织的稳态和功能中起重要作用。E-cadherin 是一种肿瘤抑制因子,其表达丢失与肿瘤的发展和较差的预后有关^[11]。研究表明,激活 E-cadherin 黏附在细胞表面的单克隆抗体可抑制乳腺癌的转移^[12]。

Wnt 信号通路参与了宫颈癌的发生、发展、侵袭和耐药等多个病理过程^[13]。研究表明,β-catenin 在宫颈癌中的表达增加,且高于正常宫颈组织,其高表达与宫颈癌的低分化和晚期 FIGO 分期呈正相关^[14],而 E-cadherin 是体内 Wnt/β-catenin 途径增强激活所必需的分子^[15]。Wnt1 作为宫颈鳞癌的促进因子,可通过 Wnt/β-catenin 途径促进宫颈鳞癌细胞的增殖和侵袭^[16]。

本研究将 HOXA5 与 β-catenin、E-cadherin 作为一个整体进行研究,探讨三者在宫颈癌组织中的表达,并分析他们之间的相关性。结果显示,HOXA5 在宫颈鳞癌组织中的蛋白表达水平明显低于非癌宫

颈组织对照,这与 Wang 等^[17]研究的结果相类似,但本研究发现 HOXA5 的表达与肿瘤肌层浸润、临床分期相关,而与肿瘤大小、分化程度、5 年生存率无明显关联。说明 HOXA5 在宫颈癌组织中表达下调可能与宫颈癌细胞的侵袭和转移有关,而与宫颈癌细胞的增殖、分化和宫颈癌患者的预后无关,具体机制还有待进一步深入研究。

本研究结果显示,E-cadherin、 β -catenin 在宫颈癌组织中的蛋白表达水平低于非癌宫颈组织,这与 Jiang 等^[18]研究的结果相似。但 E-cadherin 的表达与年龄、肿瘤大小、分化程度、肌层浸润、淋巴结转移和临床分期均无相关性,这与王丽等^[19]研究的结果 E-cadherin 蛋白表达与患者的病理分级及淋巴结转移关系密切有出入,这可能与本研究病例组织的蜡块因存放时间过长,部分抗原丢失有关。

本研究结果显示,HOXA5 与 β -catenin 在宫颈癌中的表达呈正相关,而 Ma 等^[20]指出,HOXA5 通过抑制 Wnt/ β -catenin 途径抑制宫颈癌的生长,这与本研究结果相左,其原因可能与样本量少有关。

本实验结果表明,HOXA5、E-cadherin 及 β -catenin 在宫颈癌组织中的蛋白表达水平降低,HOXA5 与 β -catenin 在宫颈癌中的表达呈正相关,HOXA5、 β -catenin 的表达与宫颈癌的肌层浸润、临床分期具有相关性,提示 HOXA5、 β -catenin 与宫颈癌的发生发展有关,但两者在宫颈癌中的作用及机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 曹毛毛,陈万青.GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J].中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(3):63-69.
- [2] 刘宗超,李哲轩,张阳,等.2020 全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-14.
- [3] 张韶凯,赵方辉,乔友林.中国宫颈癌防治研究 20 年历程与成就[J].中华流行病学杂志,2020,41(6):809-812.
- [4] FAN F, MO H Y, ZHANG H, et al. HOXA5: a crucial transcriptional factor in cancer and a potential therapeutic target[J].Biomed Pharmacother 2022,155:113800.
- [5] DING F Q, CHEN P, BIE P F, et al. HOXA5 is recognized as a prognostic-related biomarker and promotes glioma progression through affecting cell cycle [J]. Front Oncol, 2021,11:633430.
- [6] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer[J]. Oncogene, 2017,36(11):1461-1473.
- [7] JEANNOTTE L, GOTTI F, LANDRY-TRUCHON K. Hoxa5: a key player in development and disease [J]. J Dev Biol, 2016,4(2):13.
- [8] GAO L, HE R Q, HUANG Z G, et al. Expression landscape and functional roles of HOXA4 and HOXA5 in lung adenocarcinoma[J]. Int J Med Sci, 2022,19(3):572-587.
- [9] WU Y X, ZHOU T, TANG Q, et al. HOXA5 inhibits tumor growth of gastric cancer under the regulation of microRNA-196a[J]. Gene, 2019,681:62-68.
- [10] HUSSAIN I, DEB P, CHINI A, et al. HOXA5 expression is elevated in breast cancer and is transcriptionally regulated by estradiol[J]. Front Genet, 2020,11:592436.
- [11] KASZAK I, WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ O, NIEWIADOMSKA Z, et al. Role of cadherins in cancer-a review[J]. Int J Mol Sci, 2020,21(20):7624.
- [12] NA T Y, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020,117(11):5931-5937.
- [13] YANG M, WANG M, LI X P, et al. Wnt signaling in cervical cancer? [J]. J Cancer, 2018,9(7):1277-1286.
- [14] LAN C, HUAN D W, NIE X C, et al. Association of C8orf4 expression with its methylation status, aberrant β -catenin expression, and the development of cervical squamous cell carcinoma [J]. Medicine, 2019, 98(31):e16715.
- [15] HOWARD S, DEROO T, FUJITA Y, et al. A positive role of cadherin in Wnt/ β -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition [J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23899.
- [16] LI B H, GUO X D, LI N, et al. WNT1, a target of miR-34a, promotes cervical squamous cell carcinoma proliferation and invasion by induction of an E-P cadherin switch via the WNT/ β -catenin pathway[J]. Cell Oncol (Dordr),

- 2020, 43(3):489-503.
- [17] WANG Z F, YU C Z, WANG H. HOXA5 inhibits the proliferation and induces the apoptosis of cervical cancer cells via regulation of protein kinase B and p27[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2):1122-1130.
- [18] JIANG J, LI X L, YIN X M, et al. Association of low expression of E-cadherin and β -catenin with the progression of early stage human squamous cervical cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6):5729-5739.
- [19] 王丽,朱莉.Gli1 蛋白及 E-cadherin 蛋白在宫颈癌中的表达及临床意义[J].*现代肿瘤医学*,2017,25(19):3117-3119.
- [20] MA H M, CUI N, ZHENG P S. HOXA5 inhibits the proliferation and neoplasia of cervical cancer cells via down-regulating the activity of theWnt/ β -catenin pathway and transactivating TP53[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6):420.

[收稿日期:2023-02-06]

[责任编辑:涂 剑,向 秋 英文编辑:阳雨君]