

同源盒基因 MEOX2 在结直肠癌中的表达情况

陈超, 丁佩剑*

承德医学院附属医院, 河北承德 067000

摘要 : 目的 研究结直肠癌中 MEOX2 的表达水平。方法 纳入 2022 年 4 月 -6 月于承德医学院附属医院胃肠外科接受结直肠癌切除术的患者 30 例, Western blot 及免疫组化检测癌组织及邻近癌旁组织中 MEOX2 蛋白的表达水平。结果 MEOX2 主要在细胞核表达, 在结直肠癌中阳性表达率为 93% (28/30), 而癌旁组织中表达 MEOX2 的比例为 13% (4/30) ($P < 0.01$)。Western blot 结果也显示 MEOX2 蛋白在结直肠癌组织中高表达 ($P < 0.05$)。结论 MEOX2 在结直肠癌患者癌组织中表达升高, 可能与结直肠癌发生发展相关; 为探索结直肠癌新的诊断性生物标志物提供新的方向。

关键词 : 结直肠癌; 间充质同源盒; MEOX2

The expression of the homeobox gene MEOX2 in colorectal cancer

Chen Chao, Ding Peijian*

Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000

Abstract : Objective To study the expression level of MEOX2 in colorectal cancer. Methods: Thirty patients who underwent colorectal cancer resection in the Department of Gastrointestinal Surgery of the Affiliated Hospital of Chengde Medical University from April to June 2022 were included. The expression level of MEOX2 protein in cancer tissues and adjacent tissues was detected by Western blot and immunohistochemistry. The results showed that MEOX2 was mainly expressed in the cell nucleus. The positive expression rate of MEOX2 in colorectal cancer was 93% (28/30), while the proportion of MEOX2 expression in adjacent tissues was 13% (4/30) ($P < 0.01$). The Western blot results also showed that the MEOX2 protein was highly expressed in colorectal cancer tissues ($P < 0.05$). Conclusion: The expression of MEOX2 is elevated in the cancer tissues of patients with colorectal cancer, which may be related to the occurrence and development of colorectal cancer. It provides a new direction for exploring new diagnostic biomarkers of colorectal cancer.

Keywords : colorectal cancer; mesenchymal homologous box; MEOX2

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 发病率及死亡率不断上升, 给社会造成了严重影响。2020 年, 全球范围内, 结直肠癌新发病例数达到 188 万, 成为世界上第三大常见的恶性肿瘤 [1]。早期结直肠癌无明显症状, 确诊时常常已达中晚期, 是导致患者预后不良的主要原因。筛查结直肠癌的金标准是结肠镜检查, 然而, 其侵入性操作和过高的成本会导致广泛应用受限。因此, 探索新的预测基因及治疗靶点对提高结直肠癌早期诊断率, 改善患者预后具有重要意义。

同源盒基因已被证明在参与胚胎发育及疾病进展过程中调控细胞增殖分化 [2]。同源盒基因家族中一员, 间充质同源盒 MEOX2 (也称为 GAX), 其编码的转录因子具有同源结构域, 广泛表达于内皮细胞、血管平滑肌细胞和癌细胞中 [3-5]。MEOX2 是血管生成的负调控因子, 可能机制是在生长因子刺激或管腔形成过程中, 通过激活细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21WAF1/CIP1 表达和 NF - κ B 依赖的基因表达, 抑制内皮细胞活化 [6]。同时, 有研究表明 A549 肺癌细胞中, MEOX2 过表达可能促进细胞凋亡, 对细胞增殖产生抑制作用 [7]。近些年, 越来越多的研究报道 MEOX2 基因在肝癌、肺癌、乳腺癌中呈现低表达, 且与预后不良相关, 而在胶质母细胞瘤中过表达, 这可能通过调节代谢基因而影响细胞生长。一项基于生物信息学研究揭示了 MEOX2 作为结直肠癌微环境相关的预后基因, 它与免疫应答、细胞因子 - 细胞因子受体相互作用和趋化因子信号通路有着密切联系 [8]。这项研究提示我们 MEOX2 基因可能与结直肠癌发生发展也相关。但是, 我们对于 MEOX2 基因在结直肠癌中的表达及临床特征相关性还知之甚少。因此, 我们采用 Western blot 和免疫组化两种实验方法验证 MEOX2 表达与结直肠癌的关系。

作者简介: 陈超: 1998 年 12 月, 女, 辽宁凌源, 蒙古族, 硕士, 医师, 从事肠道疾病研究。

通讯作者: 丁佩剑: 1976 年 5 月, 女, 河北承德, 回族, 博士, 主任医师, 从事胃肠道疾病的临床研究

一、材料和方法

(一) 收集临床样本

选取2022年4月至2022年6月在承德医学院附属医院胃肠外科接受结肠直肠癌手术治疗患者30例,获得30例结肠直肠癌及邻近癌旁组织(距离癌组织>5cm处),所有患者均经病理确诊为结肠直肠癌且术前未实施化疗。将标记好的组织样本立即放入液氮罐中储存,直至提取蛋白。本研究已经获得知情同意及本院伦理委员会审批。

(二) Western blot

按照说明书,用RIPA裂解液提取约30mg结肠直肠癌组织和癌旁组织中的蛋白,选择BCA定量法将待测蛋白浓度归一化,100℃ 10min加热样本变性后进行SDS-PAGE凝胶电泳,电压120V 30min,80V 90min转移至PVDF膜;用5%脱脂牛奶封闭2h;1×TBST冲洗,用鼠抗人MEOX2抗体(1:1000)4℃孵育过夜,内参GAPDH(1:10000)。次日用1×TBST洗涤PVDF膜3次,共30min;用山羊抗兔(1:10000)和山羊抗鼠(1:10000)抗体室温摇床孵育1h。使用ECL化学发光系统曝光。Image J软件对目标蛋白灰度值结果进行统计分析。

(三) 免疫组织化学染色及结果分析

所有标本均用4%甲醛固定、脱蜡、包埋处理,以4mm连续切片。使用枸橼酸缓冲液进行抗原修复;滴加适量内源性过氧化物酶抑制剂,室温静置10min;鼠抗人MEOX2抗体4℃孵育过夜,并设置阴性对照(磷酸盐缓冲液PBS)。孵育16-24h之间取出切片室温下复温45min,滴加适量二抗,37℃温箱孵育20min;DAB染色约2min。最后,将切片进行苏木素复染4s,脱水透明,封片。两位资深病理医师在光镜下对所有切片用盲法独立评分。将所有免疫染色切片置于光学显微镜下进行半定量评估,每张切片随机观察5个40X物镜视野;MEOX2在结肠直肠癌细胞核中检测到着色为阳性。最终评估MEOX2免疫组化染色结果是通过计算阳性细胞染色强度与阳性细胞百分比的评分乘积。细胞染色强度评分:以五个随机视野下得分的平均分作为最终结果:无阳性着色(0分)、淡黄色(1分)、棕黄色(2分)和棕褐色(3分)。阳性细胞百分比评分:针对每个视野中100个肿瘤细胞,按照每个视野平均阳性细胞百分比计分;阳性细胞表达数<5%计0分,5%~25%计1分,25%~50%计2分,50%~75%计3分,>75%计4分。两项评分相乘得出最终结果,0~4分为低表达,5~12分为高表达[9]。

(四) 统计学分析

采用 χ^2 检验分析癌组织、癌旁组织中MEOX2蛋白表达。使用GraphPad Prism7.0、Image J软件进行数据分析及绘图。对于非正态分布的资料,采用中位数(上四分位数,下四分位数)进行描述,使用符号秩检(组内对比)进行差异性分析,认为 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

二、结果

(一) MEOX2在结肠直肠癌临床组织中表达上调

研究共纳入30例结肠直肠癌患者,分析30对结肠直肠癌及癌旁组织中MEOX2蛋白的表达情况。Western blot分析显示,与癌旁组织相比,MEOX2蛋白在结肠直肠癌组织中表达水平上调,且差异具有统计学意义($P < 0.05$) (图1)。另外,对30对结肠直肠癌及癌旁组织做蜡块包埋后进行免疫组化染色进一步证实MEOX2在结肠直肠癌的表达情况;结果显示MEOX2蛋白在结肠直肠癌患者癌组织中呈阳性表达,阳性染色表现为黄色颗粒,主要定位于细胞核(图2)。根据免疫组化染色评分结果,发现MEOX2在结肠直肠癌组织中表达明显高于癌旁组织($P < 0.001$) (表1)。

表1 结肠直肠癌组织及癌旁组织中MEOX2表达比较

组织类型	总数(n)	MEOX2表达	
		阳性	阴性
癌组织	30	28	2
癌旁组织	30	4	26
P值	< 0.001		

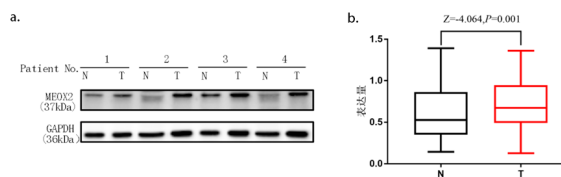


图1 结肠直肠癌和癌旁组织中MEOX2表达水平

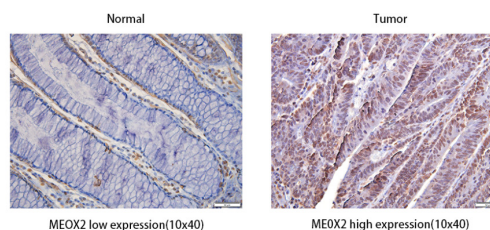


图2 结肠直肠癌组织及癌旁组织MEOX2免疫组化染色

三、讨论

间充质同源盒MEOX2 (mesenchyme homeobox 2 Gene) 编码一种抑制性转录因子,参与器官形成、胚胎发育等过程。MEOX2基因对于调控血管平滑肌细胞、内皮细胞以及癌细胞的增殖与分化过程具有重要作用。近几年研究报道MEOX2在人类癌症进展中起关键作用,但是其在癌症中的调控作用具有多样性,不同癌症中作用不同。既往研究表明,MEOX2基因过表达诱导癌细胞凋亡,抑制癌细胞增殖,因此大家认为其有望作为肿瘤诊疗的生物标志物。但是,近几年的研究发现MEOX2基因在癌症中相反的作用,Armas-López等研究阐述MEOX2-GLI1轴参与癌细胞迁移和增殖,可能通过MEOX2上调GLI1表达而促进非小细胞肺癌耐药、进展[10]。在神经胶质瘤的研究中,通过数据库筛选发现MEOX2基因可作为预测神经胶质瘤预后的生物标

志物之一 [11]；研究者 Tachon 等人 [12] 的研究成果表明，在神经胶质瘤患者中，MEOX2 高表达与预后不良相关。目前，MEOX2 与结直肠癌的关系少有报道。一项基于生物信息学研究发现 MEOX2 可能是结直肠癌微环境相关的预后基因，可能通过一些信号通路发挥作用。本研究初步探索 MEOX2 在结直肠癌中的表达情况，发现 MEOX2 蛋白主要表达在癌细胞核中，结直肠癌

组织中 MEOX2 的蛋白表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。综上所述，研究表明 MEOX2 高表达可能参与结直肠癌发生发展，这为探索 CRC 新的诊断生物标志物及预后治疗提供新靶标，有关 MEOX2 基因如何调控结直肠癌发生发展的分子机制还需要进一步研究。我们相信，随着对 MEOX2 基因的深入了解，其有望成为癌症治疗的潜在新靶点。

参考文献

- [1] Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*.2023, 5, 73(3):233-254.
- [2] Gorski DH, Walsh K. Control of vascular cell differentiation by homeobox transcription factors[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 8, 13(6):213-20.
- [3] Gorski DH, LePage DF, Patel CV, et al. Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(6):3722 - 33.
- [4] Gorski DH, Leal AJ. Inhibition of endothelial cell activation by the homeobox gene GAX[J]. *J Surg Res*, 2003, 5, 1;111:91 - 9.
- [5] 夏世金, 钱桂生, 胡明冬等. Gax 基因转染对 A549 细胞增殖及原癌基因表达的影响 [J]. *中国肺癌杂志*, 2006(03):221-225.
- [6] Chen Y, Leal AD, Patel S, et al. The homeobox gene GAX activates p21WAF1/CIP1 expression in vascular endothelial cells through direct interaction with upstream AT-rich sequences[J]. *J Biol Chem*, 2007, 1, 5;282(1):507-17.
- [7] 夏世金, 邵先桃, 董竞成等. Ad-Gax 转染诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡及其机制 [J]. *中国肺癌杂志*, 2007(04):269-274.
- [8] Liu Y, Cheng L, Li C, et al. Identification of tumor microenvironment-related prognostic genes in colorectal cancer based on bioinformatic methods[J]. *Sci Rep*, 2021, 7, 22;11(1):15040.
- [9] 司婧, 郭志琴, 左志博等. 同源盒基因 MEOX2 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2021, 27(07):531-535.
- [10] Armas-López L, Piña-Sánchez P, Arrieta O, et al. Epigenomic study identifies a novel mesenchyme homeobox2-GLI1 transcription axis involved in cancer drug resistance, overall survival and therapy prognosis in lung cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 5, 9;8(40):67056-67081.
- [11] Cheng Q, Huang C, Cao H, et al. A Novel Prognostic Signature of Transcription Factors for the Prediction in Patients With GBM[J]. *Front Genet*, 2019, 10, 1;10:906.
- [12] Tachon G, Masliantsev K, Rivet P, et al. Prognostic significance of MEOX2 in gliomas[J]. *Mod Pathol*, 2019, 6, 32(6):774-786.