

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.07.007

易洛魁家族同源盒基因 IRX1 在胶质瘤中的表达研究 *

张鹏幸 曾伟涛 刘 辉 刘 楠 李 倩 徐小珊 祁 婧 涂艳阳[△]

(第四军医大学唐都医院实验外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨易洛魁家族同源盒基因 IRX1(Iroquois homeobox gene)在胶质瘤中的表达及其临床意义。**方法:**收集 4 位胶质瘤患者的胶质瘤组织和癌旁/正常组织各 1 例,收集 54 例胶质瘤组织(WHO I 级 5 例,II 级 16 例,III 级 14 例,IV 级 19 例),采用 PCR 方法检测 IRX1 基因在胶质瘤细胞(U87、U373、LN229 和 T98G)中的表达,Western Blot 检测 4 组同一患者来源的胶质瘤组织中 IRX1 的表达,免疫组织化学法(IHC)检测 IRX1 在胶质瘤组织中的表达及临床特征。**结果:**PCR 结果表明以正常脑组织为对照,IRX1 基因在多种胶质瘤细胞中均有表达($P < 0.05$);Western Blot 结果显示 IRX1 蛋白在胶质瘤组织中的表达显著高于癌旁组织或正常组织($P < 0.05$);IHC 结果显示 IRX1 蛋白在良性胶质瘤组织中主要定位于胞浆,而在恶性胶质瘤组织中定位于细胞核,且其表达量与胶质瘤的恶性程度相关,恶性程度越高,其在细胞核中的表达量越高($P < 0.05$)。**结论:**IRX1 可能参与调控恶性胶质瘤的发生发展过程,IRX1 的表达与胶质瘤的恶性程度有关,暗示了 IRX1 可作为判断胶质瘤预后以及肿瘤靶向分子治疗的指标。

关键词:IRX1 基因;胶质瘤;表达;临床意义

中图分类号:R739.41 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)07-1229-04

Study on Expression of Iroquois Homeobox Gene IRX1 in Human Glioma*

ZHANG Peng-xing, ZENG Wei-tao, LIU Hui, LIU Nan, LI Qian, XU Xiao-shan, QI Jing, TU Yan-yang[△]

(Departments of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of Iroquois homeobox gene IRX1 in human glioma.

Methods: 4 groups of glioma tissues and adjacent normal brain tissues from the same patient were collected, respectively. Another 54 glioma tissue samples were prepared too, of which 21 were classified as low-grade [5 pilocytic astrocytomas (WHO I) and 16 diffuse astrocytomas (WHO II)] and 33 were classified as high-grade gliomas [14 anaplasia astrocytomas (WHO III) and 19 primary glioblastomas (WHO IV)]. The expression of IRX1 gene in glioma cells (U87, U373, LN229 and T98G) was detected by PCR. And the expression of IRX1 protein in glioma tissues was verified by western blot and IHC. **Results:** IRX1 gene was expressed in U373, LN229 and T98G cells, but no expression in U87 cells and adjacent normal brain tissues. Furthermore, the results of western blot and IHC showed that the expression levels of IRX1 protein was higher in glioma tissues than in normal tissues ($P < 0.05$), and a high level of IRX1 expression was significantly more common in glioma tissues of more advanced grade than those of lower grade ($P < 0.05$). **Conclusion:** IRX1 might involve in the regulation of onset and progress of glioma, of which the expression was related to the grade of carcinoma, indicating that IRX1 might be used as an indicator for evaluation of prognosis and malignancy level as well as targeted molecular therapy of human malignant glioma.

Key words: IRX1 gene; Human glioma; Expressions; Clinical significance

Chinese Library Classification(CLC): R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)07-1229-04

前言

恶性胶质瘤伴随着不良预后为中枢神经系统恶性肿瘤的一种不可治愈形式,因其具有高侵袭性,在手术切除过程中肿瘤细胞是不可能被完全切除的,导致了复发的必然性^[1]。据统计,胶质瘤患者的五年总生存率低于 30%,WHO IV 级的恶性胶质瘤患者的生存期只有半年左右^[2]。因此,寻找和发现新的胶质瘤发生、发展及预后密切相关的基因对于胶质瘤的分子干预具有重要的意义。

IRX1 基因与无脊椎动物和脊椎动物的胚胎发育密切相关,并编码具有转录因子组合活性的家族蛋白参与神经系统的发育^[3],在多种肿瘤的发生发展过程中发挥着癌基因或者抑癌基因的重要作用,并且参与了骨肉瘤肺转移、胃癌中腹膜扩张和转移等的过程,还具有潜在的肿瘤早期诊断、治疗、转移或者作为检测肿瘤预后标志的重要作用^[4]。研究表明 IRX1 在头颈部鳞状细胞癌^[5]、肺发育过程^[6]及胃癌发生发展^[7-9]中是抑癌基因,在骨肉瘤中作为一种促转移基因^[10],而在原发性肝癌中发挥着癌基因的作用^[11]。但 IRX1 在胶质瘤中的表达及其作用尚

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272419;81572983);陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF027)

作者简介:张鹏幸(1987-),硕士,主要研究方向:胶质瘤的分子治疗研究,电话:029-84778169, E-mail: haopuxinzh@163.com

△ 通讯作者:涂艳阳(1976-),男,博士,硕士生导师,副教授,主要研究方向:胶质瘤的侵袭性研究, E-mail: tu.fmmu@gmail.com

(收稿日期:2016-09-21 接受日期:2016-10-12)

不清楚,本研究旨在探讨 IRX1 在胶质瘤中的表达及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 细胞及组织标本

胶质瘤细胞 U87、U373、LN229 和 T98G 均培养在高糖 DMEM 培养基(Invitrogen,USA)中,含有 10% FBS (GIBCO, USA) 和 1% 双抗 (Penicillin/Streptomycin, SIGMA ALDRICH, USA)。

本研究收集 2013-07/2015-06 在我院神经外科住院手术治疗的 4 例癌旁或正常脑组织,对应胶质瘤患者来源的胶质瘤组织 4 例,以及另外 54 例胶质瘤患者组织,其中:WHO I 级 5 例,II 级 16 例,III 级 14 例,IV 级 19 例。每例组织标本均由两位病理学专家判定 WHO 等级,患者临床特征见表 1。本研究经中国人民解放军第四军医大学唐都医院研究伦理协会批准(批准号:TDLL-2015172),所有涉及到的患者均对此研究知情同意。

表 1 54 例患者临床特征
Table 1 The clinical features of 54 patients

Features	Gender n (%)		Age n (%)		Total
	Male	Female	>55	≤ 55	
WHO I	3	2	4	1	5
WHO II	12	4	10	6	16
WHO III	10	4	9	5	14
WHO IV	9	10	12	7	19

1.2 主要试剂及仪器

RIPA 高效蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购于西安宝信生物技术公司;TRIzol、RNA 反转录试剂盒及 SYBR Green PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司;兔抗人 IRX1 单克隆抗体购自美国 Bioworld 生物工程公司(用于 IHC 实验)和 abcam 公司(用于 Western Blot 实验);鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自北京迈凯生物科技有限公司;ECL 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司;免疫组化试剂盒(SP)购自福州迈新生物技术公司,实时定量 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

TRIzol 法抽提胶质瘤细胞系 U87、U373、LN229、T98G 以及正常脑组织中的总 RNA 并定量;根据反转录试剂盒操作说明书进行反转录获取 cDNA 样本;以其为模板进行 PCR 检测,引物序列为:目的基因 IRX1-F:5'-CTCAGCCTCTTCTCGCAT-3',IRX1-R:5'-TCTTCCTGGTCCTTGCTGC-3';内参基因 GAPDH-F:5'-GCACCGTCAAGGCTG AGAAC-3',GAPDH-R:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3'^[12]。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 30 sec,55℃ 15 sec,68℃ 40 sec,30 个循环;68℃ 10 min;核酸凝胶电泳检测。

1.4 Western Blot 检测胶质瘤组织中 IRX1 的表达

取 4 组同一患者来源的组织适量置于无菌的匀浆器中,按照质粒体积比 1 mg:100 μ L 加入预冷的 RIPA 裂解液,在冰上反复研磨裂解至液体透明;4℃ 12000 rpm 高速离心 15 min,转移上清至无菌的离心管中,BCA 蛋白定量后,按比例加入 5 $\times$ 上样缓冲液,于 100℃ 水浴锅中煮沸 5 min 使蛋白变性;按照每孔 20 μ g 蛋白量进行蛋白电泳;300 mA、1 h 转至 PVDF 膜上;用 10%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h;经 IRX1(1:1500,abcam 公司)、 β -actin(1:2000)抗体孵育 4℃ 过夜;TBST 溶液洗涤 10 min $\times$ 3 次,含 HRP 标记的羊抗兔或者羊抗鼠二抗(1:2500)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次;加入 ELC 发光试剂进行发光拍照。

1.5 IHC 检测胶质瘤组织中 IRX1 的定位及表达情况

采用 SP 免疫组织化学法检测 54 例胶质瘤组织中 IRX1 的表达。操作步骤按照试剂盒说明书,以免抗人 IRX1 单克隆抗体(1:50,Bioworld 公司)为一抗。免疫组化结果由两位病理专家判定,蛋白染色强度可判为:不着色为阴性(-)、着浅棕色为弱阳性(+)、着棕色为中等阳性(++)、着棕褐色为强阳性(+++/++++)。

1.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析,采用 t 检验对数据进行分析,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤细胞中 IRX1 基因表达

核酸凝胶电泳结果显示,IRX1 未在正常脑组织和胶质瘤细胞 U87 中检测到,在胶质瘤细胞 U373、LN229、T98G 中均有表达,以 100 bp DNA Ladder Marker 指示,正常脑组织为对照,以 H₂O 为阴性对照(图 1)。

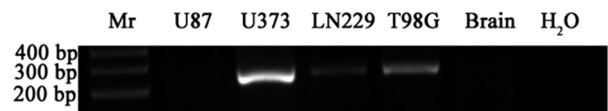


图 1 PCR 检测 IRX1 基因在胶质瘤细胞系与正常组织中的表达差异

Fig.1 The expression of IRX1 in glioma cell lines and normal tissues

analyzed by PCR

Mr: 100 bp DNA Ladder Marker

2.2 胶质瘤组织中 IRX1 蛋白的表达及定位

Western Blot 结果显示,IRX1 蛋白在癌旁或正常脑组织中不表达或低表达,在胶质瘤组织中高表达,每组表达差异显著(P<0.05)(图 2)。

IHC 结果(200 $\times$ 显微镜观测)显示,IRX1 蛋白主要表现为粗糙深染的棕黄色颗粒分散于细胞核、细胞质中。在 WHO I 胶质瘤组织中,IRX1 着色为弱阳性主要定位于细胞质;随着胶质

瘤恶性程度的升高,IRX1 染色阳性主要定位于细胞核;且随着胶质瘤恶性程度的升高,IRX1 蛋白在胶质瘤组织中的表达增加(图 3)。

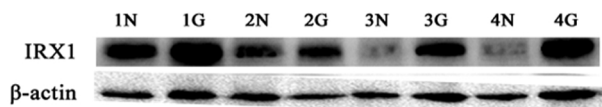


图 2 Western Blot 检测 IRX1 蛋白在胶质瘤患者组织中的表达差异 N 为非癌组织(Normal),G 为癌组织(Glioma),每组组织来自同一患者。

Fig. 2 The protein expression level of IRX1 in glioma tissues detected by Western blot analysis

N: Normal tissue, G: Glioma tissue. Tissues in the same group are from same patient.

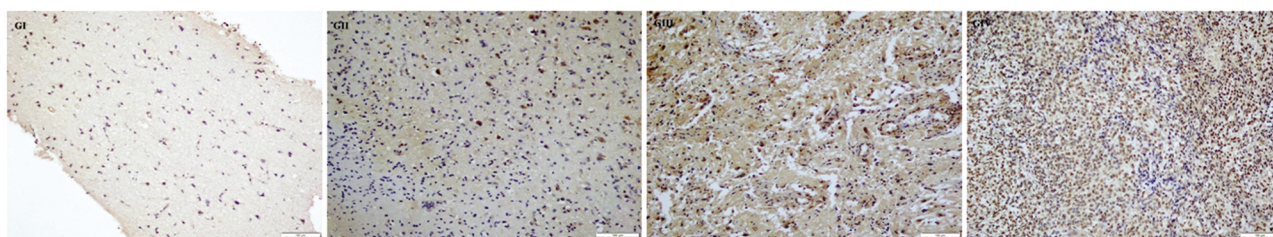


图 3 IHC 检测 IRX1 蛋白在胶质瘤组织中的表达

GI 为胶质瘤 WHO I 级(弱阳性),GII 为胶质瘤 WHO II 级(中等阳性),GIII 为胶质瘤 WHO III 级(强阳性),GIV 为胶质瘤 WHO IV(强阳性)。

Fig.3 The protein expression level of IRX1 in glioma tissues detected by IHC analysis

GI: Glioma WHO I (+), GII: Glioma WHO II (++), GIII: Glioma WHO III (+++), GIV: Glioma WHO IV(+++).

了胶质瘤的发生发展过程,与对照组相比,IRX1 在胶质瘤细胞和组织中的表达量升高。表明 IRX1 可能在胶质瘤发展过程中发挥着重要作用,具有作为判断胶质瘤预后、恶性程度以及分子治疗的靶标的潜能。

最近研究发现,IRX1 通过抑制 BDKRB2 依赖的下游分子 PAK1 影响胃癌新血管形成的扩散和转移^[8]。PAK1 是一个哺乳动物 Ser/Thr 蛋白激酶的同族体和血管舒缓激肽受体途径的效应分子,参与细胞增殖、细胞迁移、细胞骨架重排、细胞周期和凋亡等多个细胞内信号分子传导事件^[13,14];PAK1 激活或过表达参与肿瘤的发生过程^[15,16]。此外,在骨肉瘤中 IRX1 去甲基化可以激活 CXCL14/NF- κ B 信号通路促进骨肉瘤肺转移^[13],其中 CXCL14 是趋化因子 CXC 家族的一个新成员,与免疫细胞趋化、肿瘤迁移密切相关,并参与调控肿瘤相关的血管生成、肿瘤生长的自分泌调节、炎症免疫反应以及宿主对肿瘤特异免疫的激活等生物学过程,肿瘤中 CXCL14 蛋白的表达缺失与肿瘤的发生发展有关^[17]。核转录因子 NF- κ B 参与到免疫反应、胸腺发育、胚胎发生、炎症和急性反应、细胞增殖、细胞凋亡、病毒感染等多种病理过程^[18]。另外在白血病的发生发展过程中,IRX1 可通过直接靶向 HOXB4 基因及间接靶向 EGR 基因,激活两者的转录活性并从功能上抑制 MLL-AF4 阳性的急性淋巴细胞白血病,其中 HOXB4 通常作为 c-KIT、WNT 和 TPO 信号通路的下游靶基因,并对造血干细胞的维持和扩张是必不可少的;而 EGR 蛋白可控制 p21 蛋白依赖的沉默程序影响造血干细胞^[19]。

PAK1 是参与胶质瘤细胞增殖和凋亡过程的 MAPK 通路中的关键分子^[20],且 NF- κ B 通过介导肿瘤相关基因的异常表达来抑制胶质瘤细胞凋亡,促进胶质瘤血管形成和转移等,直接

3 讨论

本研究探讨了 IRX1 基因和蛋白在胶质瘤细胞和组织标本中的表达和定位,通过 PCR 的方法检测四种胶质瘤细胞 U373、LN229、T98G 和 U87 中 IRX1 的表达情况,发现 IRX1 在胶质瘤细胞中表达并与细胞种类有关(图 1);通过 Western Blot 检测 4 例胶质瘤组织中 IRX1 的表达均显著高于同一病人来源的癌旁/正常组织(图 2);通过 IHC 检测 54 例不同恶性程度的胶质瘤组织中 IRX1 的蛋白表达情况发现随着恶性程度的升高,IRX1 的表达亦增加,并且阳性定位由细胞质转移到细胞核(图 3),这可能与 IRX1 转录因子的作用方式以及参与的生物学过程密切相关。这些结果都暗示了 IRX1 基因可能参与

影响胶质瘤的发生和发展^[21]。WNT 信号通路可以调节胶质瘤细胞的形态变化、增殖、迁移、黏附和细胞凋亡^[22]。因此,我们推测 IRX1 可能是通过作用于 MAPK 信号通路、NF- κ B 通路、WNT 通路中的某个关键分子或其他的信号途径来参与胶质瘤的发生发展过程。

胶质瘤的发生是受到多因素、多阶段、多基因的共同影响的结果^[23],通过对肿瘤基因表达谱的深入研究,探索影响肿瘤发生发展的关键因子,对肿瘤的诊断、治疗、监测复发和预测预后具有重要的意义。IRX1 在胶质瘤组织的细胞核中的高表达表明,IRX1 可能参与了胶质瘤的增殖、转移及发生发展过程,尽管其调控机制尚不明确。关于 MAPK 通路、NF- κ B 通路、WNT 通路以及其他通路中的某个关键分子的激活是否影响了 IRX1 在胶质瘤形成过程中表达的增加还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Minniti G, Sanctis VD, Muni R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients [J]. Journal of Neuro-Oncology, 2008, 88(1): 97-103
- [2] Nakada M, Nakada S, Demuth T, et al. Molecular targets of glioma invasion[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64: 458-478
- [3] Burglin TR. Analysis of tale superclass homeobox genes (meis, pbx, knox, Iroquois, tgif) reveals a novel domain conserved between plants and animals[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(21): 4173-4180
- [4] Gómez-Skarmeta JL, Modolell J. Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development [J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(4): 403-408
- [5] Bennett KL, Karpenko M, Lin MT, et al. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Can-

- cer Res, 2008, 68(12): 4494-4499
- [6] Doi T, Lukosiūtė A, Ruttenstock E, et al. Expression of Iroquois genes is up-regulated during early lung development in the nitrofen-induced pulmonary hypoplasia[J]. J Pediatr Surg, 2011, 46(1): 62-66
- [7] Guo X, Liu W, Pan Y, et al. Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma[J]. Oncogene, 2010, 29(27): 3908-3920
- [8] Jiang J, Liu W, Guo X, et al. IRX1 influences peritoneal spreading and metastasis via inhibiting BDKRB2-dependent neovascularization on gastric cancer[J]. Oncogene, 2011, 30(44): 4498-4508
- [9] Wang T, Xu Y, Hou P. Identifying novel biomarkers of gastric cancer through integration analysis of single nucleotide polymorphisms and gene expression profile[J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(3): e321-326
- [10] Lu J, Song G, Tang Q, et al. IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF- κ B signaling[J]. J Clin Invest, 2015, 25(5): 1839-1856
- [11] 杨惠洁, 余爽, 王静, 等. IRX1 基因在肝癌中的表达及其临床意义[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(10): 1354-1357
Yang Hui-jie, Yu Shuang, Wang Jing, et al. Expression and clinical significance of Iroquois homeobox gene IRX1 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Chin J Biologicals, 2012, 25(10): 1354-1357
- [12] 张磊, 涂艳阳, 张鹏幸, 等. 转录因子 SOX9 基因对脑胶质瘤干细胞干性维持的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(18): 3430-3434, 3465
Zhang Lei, Tu Yan-yang, Zhang Peng-xing, et al. Knock-down SOX9 Gene Regulated the Stemness Maintenance of Glioma Stem Cell in Vitro [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15 (18): 3430-3434, 3465
- [13] Tang Y, Zhou H, Chen A, et al. The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (13): 9106-9109
- [14] Galan Moya EM, Le Guelte A, Gavard J. PAKing up to the endothelium[J]. Cell Signal, 2009, 21(12): 1727-1737
- [15] Kumar R, Vadlamudi RK. Emerging functions of p21- activated kinases in human cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(2): 133-144
- [16] Liu F, Li X, Wang C, et al. Downregulation of p21-activated kinase-1 inhibits the growth of gastric cancer cells involving cyclin B1[J]. Int J Cancer, 2009, 125(11): 2511-2519
- [17] 韩肖燕, 向阳. 趋化因子 CXCL14 与肿瘤[J]. 癌症进展, 2008, 6(3): 255-258, 249
Han Xiao-yan, Xiang Yang. Progress in the chemokine CXCL14 and cancer[J]. Oncology progress, 2008, 6(3): 255-258, 249
- [18] 朱妮. 核转录因子 NF- κ B 及其抑制剂的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(7): 869-872
Zhu Ni. Progress in research on NF- κ B and its inhibitor [J]. Chinese Journal of biologicals, 2011, 24(7): 869-872
- [19] Kühn A, Löscher D, Marschalek R. The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t(4;11)-specific cancer mechanism[J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 35341-35352
- [20] Zhang B, Wu T, Wang Z, et al. p38MAPK activation mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in glioma cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4): 3101-3107
- [21] Cahill KE, Morshed RA, Yamini B. Nuclear factor- κ B in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy [J]. Neuro Oncol, 2016, 18(3): 329-339
- [22] Suwala AK, Hanaford A, Kahlert UD, et al. Clipping the Wings of Glioblastoma: Modulation of WNT as a Novel Therapeutic Strategy [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2016, 75(5): 388-396
- [23] 刘楠, 涂艳阳, 张永生. MicroRNAs 在胶质瘤中生物学功能及基因治疗潜力研究进展[J]. 转化医学电子杂志, 2015, 2(2): 5-13
Liu Nan, Tu Yan-yang, Zhang Yong-sheng. A systematic review of microRNAs and the therapeutic potential in glioma [J]. E-J Transl Med, 2015, 2(2): 5-13
- (上接第 1219 页)
- [15] Yi J M, Qu Zhang, et al. The data analysis method of real time fluorescent quantitative [J]. PCR biological technology communication, 2015, 01: 140-145
- [16] Ji Dong, Xin S J. Development and data analysis of real time fluorescent quantitative[J]. PCR biotechnology newsletter, 2009, 04: 598-600
- [17] Liu Z X, Xu Yang, et al. Influence of different primers and data analysis methods on quantitative PCR results[J]. Journal of Nanjing Medical University (NATURAL SCIENCE EDITION), 2009, 08: 1112-1117