基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0666-04

相较正常结肠黏膜,Hath1 在非粘液性结肠腺癌中的表达下调

朱代华[1],龚建平[2],任 柯[2],孙建明[2],魏思东[2]
(重庆医科大学附属第二医院 1. 普通外科;2. 肝胆外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 Hath1 基因在非粘液性结肠癌中的表达。方法:从 48 例非粘液性结肠腺癌患者的标本中取材,石蜡包埋切片,H&E 染色,观察正常结肠黏膜、癌旁黏膜和结肠癌组织中杯状细胞数量的变化。用定量实时 RT-PCR 和 Western blot 的方法,检测这 3 种组织中 Hath1 蛋白和 Muc2 蛋白的表达。结果:在结肠癌组织中未发现杯状细胞;结肠癌组织中 Hath1 mRNA、Hath1 蛋白、Muc2 mRNA 和 Muc2 蛋白的表达均显著下调。结论:Hath1 基因的表达下调,可能与非粘液性结肠腺癌的发生有关。

【关键词】结肠癌;Hath1 基因;病因学
【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-30

Hath1 expression is down-regulated in colon non-mucinous adenocarcinomas compared with the expression in normal colon mucosa

ZHU Dai-hua, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the Hath1 expression in colon non-mucinous adenocarcinomas. *Methods*: Sections of paraffin-embedded tissues were used to investigate the goblet cell population of normal colon mucosa, mucosa adjacent colon cancer and colon cancer samples which came from 48 patients with colon non-mucinous adenocarcinoma. Hath1 and Muc2 expression in these samples were tested by immunohistochemistry, quantitative real-time reverse transcription-PCR and Western blot. *Results*: There were not any goblet cell to be found in colon cancr. The levels of Hath1 mRNA and Hath1, Muc2 mRNA and Muc2 were significantly down-regulated in colon cancer. *Conclusion*: The down-regulation of Hath1 expression may correlate with colon carcinogenesis.

【Key words】Colon carcinoma; Hath1 gene; Etiology

作者介绍:朱代华(1966-),男,副教授,
研究方向:大肠癌的基础研究。
通讯作者:龚建平,男,教授,E-mail:gongjianping11@126.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB5262)。

参 考 文 献

[1] Zampetaki A, Kirton J P, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells[J].Cardiovasc Res, 2008, 78(3): 413-421.

[2] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al.VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J].Embo J, 1999, 18(14): 3964-3972.

[3] Park K, Ahn K Y, Kim M K, et al.Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor improves erectile function in aged rats[J].Eur Urol, 2004, 46(3): 403-407.

[4] Dall'Era J E, Meacham R B, Mills J N, et al.Vascular endothelial growth factor(VEGF) gene therapy using a nonviral gene delivery system improves erectile function in a diabetic rat model[J].Int J Impot Res, 2008, 20(3): 307-314.

[5] Leung D W, Cachianes G, Kuang W J, et al.Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J].Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.

[6] Koransky M L, Robbins R C, Blau H M.VEGF gene delivery for treatment of ischemic cardiovascular disease[J].Trends CardioVasc Med, 2002, 12(3): 108-114.

[7] Staria C, Patel M, Kate B, et al.Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib(macugen)in diabetic retinopathy[J].Dev Ophthalmol, 2007, 39(1): 122-148.

[8] Asahara T, Mnrohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J].Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[9] Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, et al.Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing[J].J Cell Physiol, 2008, 215(1): 234-242.

[10] Au P, Daheron L M, Duda D G, et al.Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels[J].Blood, 2008, 111(3): 1302-1305.

[11] Cherqui S, Kurian S M, Schussler O, et al.Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver[J].Stem Cells, 2006, 24(1): 44-54.

[12] Martinez-Estrada O M, Munoz-Santos Y, Julve J, et al.Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion[J].Cardiovasc Res, 2005, 65(2): 328-333.

[13] Wang Q R, Wang B H, Huang Y H, et al.Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells [J].J Cell Biochem, 2008, 103 (1): 21-29.

(责任编辑:关蕴良)

近年的研究表明,人 Hath1 基因的同源基因——鼠 Math1 基因促进杯状细胞分化并诱导杯状细胞分化标志物 Muc2 的表达。另一方面,大多数结肠癌含很少的杯状细胞和粘蛋白。因此我们推测 Hath1 基因的表达下调可能与结肠癌的发病有关。本研究通过比较正常结肠黏膜、癌旁黏膜和结肠非粘液性腺癌中 Hath1 和 Muc2 的表达来验证这一假说。

1 材料和方法

1.1 临床标本

所有临床标本均来自于本院的结肠腺癌患者(不包括粘液腺癌和印戒细胞癌)。在手术标本取出后,立即取 1 cm × 1 cm 大小的癌组织,然后在距肿瘤边缘 1 cm 内垂直于结肠长轴取 0.5 cm × 2 cm 癌旁黏膜,在距肿瘤边缘 10 cm 垂直于结肠长轴取 0.5 cm × 2 cm 正常结肠黏膜组织,随即将标本置于液氮中保存。

1.2 PCR 引物

委托 TaKaRa 公司设计和合成 PCR 引物。Hath1 基因的上游引物为 5'-TCCCACTTTGCAGGGCATC-3',下游引物为 5'-CAGCTGTTCCCGCACTTTCA-3'。Muc2 基因的上游引物为 5'-TGTGTTCACGGGAATGCTGAG-3',下游引物为 5'-TGCAGGCGATGACGTTGAG-3'。Beta Actin 基因的上游引物为 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCT AGAAGCA-3'。

1.3 试剂

小量柱离心式组织 / 细胞总 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。SYBR® ExScript™RT-PCR 试剂盒、DEPC、DMSO、琼脂糖购自 TaKaRa 公司,兔抗人 Muc2 单克隆抗体、链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化酶免疫组化染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。兔抗人 Hath1 多克隆抗体购自 Chemicon 公司。兔抗人 GAPDH 抗体购自 Abcam 公司。辣根过氧化酶共轭羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司。增强化学发光检测试剂盒购自 Pierce 公司。放射自显影薄膜购自 Kodak 公司。

1.4 定量实时 RT-PCR 实验

依照 RNA 抽提试剂盒使用说明,从结肠组织标本中提取总 RNA。再按 SYBR® ExScript™ RT-PCR 试剂盒使用说明,采用 2 步法行定量实时 RT-PCR 实验。所用荧光试剂 SYBR Green Ⅰ是一种能够结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟区域的,具有绿色激发波长的染料,它与 PCR 合成的双链 DNA 结合,在激发光照射下产生荧光,通过荧光强度的检测,可以实时检测 PCR 扩增的产物量。在进行定量实时 PCR 反应时,分别测定目的基因和参比基因 Beta actin 的量,用 Beta actin 的量来校正由于样本间起始模板数量不一致造成的偏倚。

1.5 组织化学和免疫组织化学

将 48 例结肠癌患者的正常黏膜、癌旁黏膜和癌组织标本分别石腊包埋切片,H·E 染色,在显微镜下放大 100 倍并计数 5 个视野中的杯状细胞数量取平均值。然后按链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化酶免疫组化染色试剂盒说明行 Muc2 和 Hath1 的免疫组织化学检测。Hath1 阳性表现为细胞核和/或细胞浆棕黄色颗粒,Muc2 阳性表现为细胞浆棕黄色颗粒。用北航医学图像分析管理系统软件采集阳性染色的面密度值,每张切片取 10 个视野并取平均值。

1.6 Western Blot

通过该实验检测不同结肠组织标本中 Hath1 和 Muc2 的表达。用含 20 mmol HEPES、25%甘油、0.42 mmol NaCl、15 mmol $MgCl_2$、0.2 mmol EDTA、0.5 mmol PMSF 和二硫苏糖醇的细胞裂解液萃取蛋白。12 000 × g、15 min 离心 2 次。用 Bradford Assay 试剂盒检测蛋白浓度。以 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转移至 PVDF 膜上。将膜用 0.1% Tween20-PBS 冲洗后,在含 5%脱脂奶粉的 0.1% Tween20-PBS 中孵化 1 h,然后用兔抗人 Hath1 多克隆抗体(1:500)或兔抗人 Muc2 单克隆抗体(1: 500)和辣根过氧化酶共轭羊抗兔 IgG(1: 5 000)孵化 1 h。最后,用增强化学发光检测试剂盒显影免疫复合物,立即将膜用放射自显影薄膜显影。Hath1、Muc2 的相对含量用图形分析系统(Bio-Rad Gel Doc 2000, USA)确定条带的相对光密度。兔抗人 GAPDH 抗体(1:1000)检测 GAPDH 来校正每个条带的蛋白水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件,以 q 检验方法进行统计分析。当 $P \leq 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结 果

结肠组织的石腊切片 H&E 染色表明,正常结肠黏膜和癌旁黏膜的隐窝中有丰富的杯状细胞,而结肠癌组织中杯状细胞很少或消失(每个视野中杯状细胞数:正常黏膜为(1019.80 ± 124.93)个,癌旁黏膜为(275.6 ± 64.65)个,结肠癌组织为 0,两两比较 $P<0.01$,见图 1)。

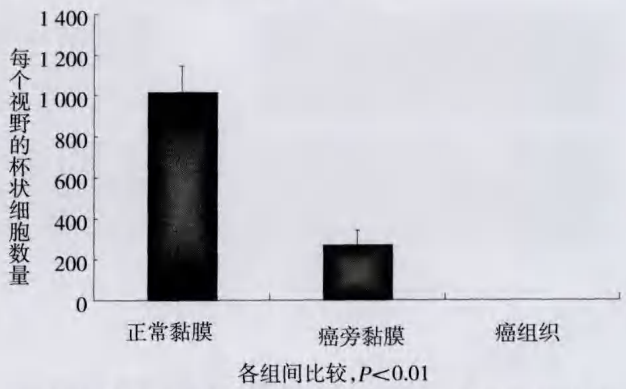


图 1 不同结肠组织中每个视野(放大 100 倍)杯状细胞数量

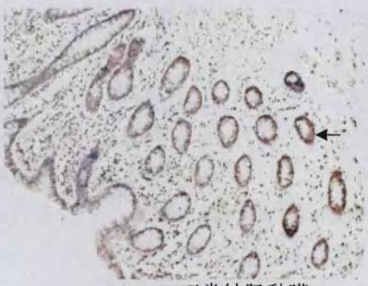
定量实时 RT-PCR 结果显示,正常结肠黏膜、癌旁黏膜、结肠癌组织中 Hath1 mRNA 和 Muc2 mRNA 的表达逐渐下调,它们之间的差异均具有显著意义($P<0.01$),尤其在结肠癌组织中,这 2 个指标呈几何数级的下调(表 1)。

免疫组织化学检测显示，正常结肠黏膜和癌旁黏膜中，Muc2 和 Hath1 都有高表达，Muc2 在隐窝表层细胞表达最为强烈，而 Hath1 在隐窝基底部表达最为强烈，而在结肠癌组织中，这两种蛋白的表达都明显减少（图 2）。使用北航医学图像分析系统中的体视学图像分析功能，采集阳性表达的面密度值。Muc2 在正常黏膜、癌旁黏膜和结肠癌中的表达值分别为 0.163 4 ± 0.051 5，0.161 1 ± 0.075 3，0.065 2 ± 0.025 9，两两比较 $P<0.05$；Hath1 在正常黏膜、癌旁黏膜和结肠癌中的表达值分别为 0.171 6 ± 0.076 1，0.158 5 ± 0.096 1，0.059 8 ± 0.016 2，两两比较 $P<0.05$（图 2）。

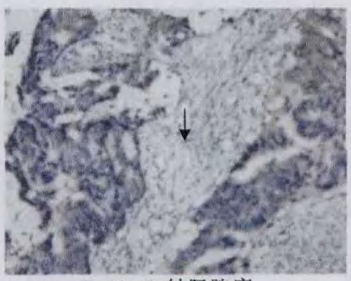
Western blot 检测结果同样显示，在结肠腺癌组织中，这两种蛋白的表达都明显减少（图 3）。Muc2 在正常黏膜、癌旁粘膜和结肠癌中的表达值分别为 2.543 3 ± 0.156 8，2.035 ± 0.112 9，1.151 7 ± 0.144 3，两两比较 $P<0.05$；Hath1 在正常黏膜、癌旁黏膜和结肠癌中的表达值分别为 1.205 0 ± 0.095 7，1.016 7 ± 0.094 4，0.361 7 ± 0.074 7，两两比较 $P<0.05$（图 3）。

3　讨　论

在结肠癌发生的渐进累积过程中，杯状细胞的变化贯穿了始终。结肠癌形成过程中，最早的病理变化是异常隐窝病灶的形成，此时病灶内杯状细胞数量已开始出现减少，发展至结肠腺瘤阶段，杯状细胞进一步减少。结肠癌中，杯状细胞很少（高分化腺癌）或消失（低分化腺癌）[1-3]。这与结肠癌发生的一般规律相符，即正常情况下，位于隐窝基底部的肠黏膜干细胞分裂增殖并向粘膜表面推移，逐渐分化成熟为杯状细



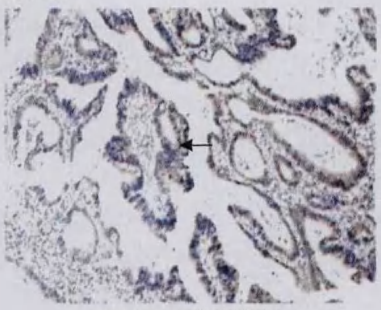
A. Muc2，正常结肠黏膜



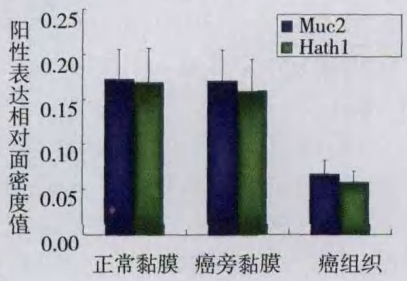
B. Muc2，结肠腺癌



C. Hath1，正常结肠黏膜

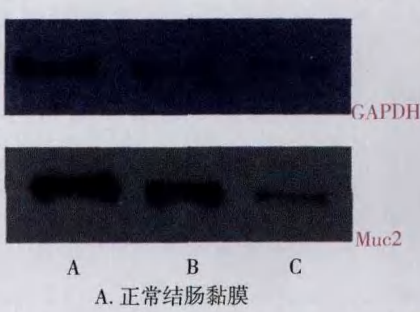


D. Hath1，结肠腺癌

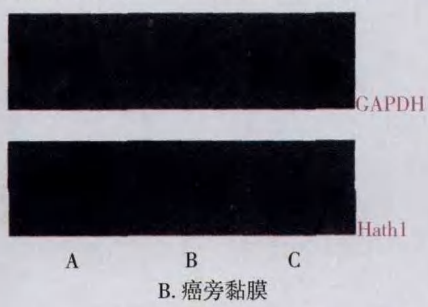


各组间比较，$P<0.05$

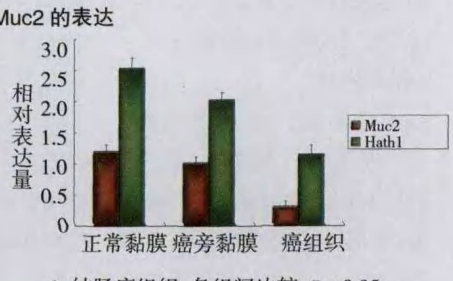
图 2　免疫组织化学检测不同结肠组织标本中 Hath1、Muc2 的表达



A. 正常结肠黏膜



B. 癌旁黏膜



C. 结肠癌组织，各组间比较，$P<0.05$

图 3　Western blot 检测不同结肠组织标本中 Muc2、Hath1 的表达

表 1　结肠标本中 Hath1 mRNA 和 Muc2 mRNA 的表达（$n=48$，$\bar{x} \pm s$）

分组	Hath1 mRNA 的相对表达量	Muc2 mRNA 的相对表达量
正常结肠黏膜	$6.34 \pm 1.87^{*}$	$2.37 \times 10^{5} \pm 7.84 \times 10^{4*}$
癌旁黏膜 r	$3.32 \pm 1.25^{*}$	$5.22 \times 10^{4} \pm 6.13 \times 10^{3*}$
结肠腺癌	$0.36 \pm 0.13^{*}$	$8.31 \pm 0.85^{*}$

* 各组间比较，$P<0.01$

胞、柱状细胞来取代死亡的结肠黏膜细胞。在致癌因素的作用下，肠黏膜干细胞的分化和凋亡出现障碍时，肠黏膜干细胞不断增生、堆积，隐窝增生区扩大、上移，逐渐形成向肠腔突出的腺瘤性息肉，从而启动大肠癌的发生[4]。

结肠杯状细胞分泌的粘蛋白的主要成分是 Muc2，随着结肠癌发生进程中杯状细胞数量的减少，Muc2 的表达量随之减少[1,2]。大多数结肠癌中 Muc2 的表达很少，但粘液腺癌和印戒细胞癌例外，这两种类型的结肠癌虽然没有分化良好的杯状细胞，但由肿瘤细胞分泌丰富的粘蛋白[5]。

Muc2 基因是否与结肠癌的发生有关，目前还没有直接的证据，但有些研究已提示 Muc2 基因与结肠癌之间的关系。有报道显示，当敲除鼠的 Muc2 基因，可诱导鼠肠腺瘤的发生[6]。另外，Muc2 基因的表达受到 Wnt/β-catenin 信号通路的调节[7]，而在结肠癌的发生过程中，由于 APC 基因的异常，导致 Wnt/β-catenin 信号通路的过度激活，使隐窝细胞分化和凋亡障碍，是启动结肠癌发生的一个重要机制[1]，提示 Muc2 基因可能和结肠癌的发生相关。

同 Wnt 基因一样，Hath1 基因也参与干细胞的分化过程。现有的资料表明，Hath1 基因是果蝇属 atonal 基因和鼠 Math1 基因的同源基因，定位于人染色体 4q22，mRNA 长1065 bp，编码蛋白 Hath1(38 kD)。Hath1 是 1 个具有碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix，bHLH)结构的转录因子[8]，与靶基因结合后能促进干细胞终末分化为多种细胞。在对脑和内耳发育的实验中，若敲除 Math1 基因或抑制其表达，则鼠小脑颗粒神经元和内耳毛细胞不能分化[9,10]。在已出生或已成熟的实验鼠中高表达 Math1 基因，可诱导内耳毛细胞的终末分化[11]。而且，Math1 基因的定向缺失造成实验鼠肠分泌细胞包括杯状细胞不能分化[12-14]，Math1 基因还能诱导 Muc2 蛋白的表达，是 Muc2 基因的上游基因[15]。因此提示 Hath1 基因表达下调可能与结肠癌的发生有关。

本实验的结果表明，在人正常结肠黏膜中 Muc2 mRNA 和 Hath1 mRNA 的表达高于癌旁组织、癌组织，具有显著性差异($P<0.01$)；人正常结肠黏膜中 Muc2 和 Hath1 的表达也高于癌旁组织、癌组织，具有显著性差异($P<0.05$)。也就是说，结肠癌中杯状细胞减少或消失，伴随 Hath1 基因和 Muc2 基因表达的下调。这一结果与以往有关 Muc2 基因是 Hath1 基因的下游基因，以及 Hath1 基因参与了杯状细胞分化成熟的研究结果相符。

综上所述，Hath1 基因的表达下调与杯状细胞的减少或缺失、Muc2 的表达下调同步，结合 Math1 基因的定向缺失造成实验鼠的肠分泌细胞包括杯状细胞不能分化、Hath1 基因能诱导 Muc2 蛋白的表达、以及当敲除鼠的 Muc2 基因，可诱导鼠肠腺瘤的发生等研究成果，我们可以得出这样的结论：Hath1 基因的表达下调与杯状细胞的分化障碍和非粘液性结肠腺癌的发生有关。但是，Hath1 基因在非粘液性结肠癌的发生过程中的具体作用机制尚不清楚，在粘液性结肠腺癌发生中的作用也不清楚，这些都需要在以后的研究中去阐明。

参 考 文 献

[1] Grady W M.Genomic instability and colon cancer[J].Cancer Metastasis Rev,2004,23(1-2):11-27.

[2] Pinto D,Gregorieff A,Begthel H,et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium[J].Genes Dev,2003,17(14):1709-1713.

[3] Ponz de Leon M,Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer [J]. Dig Liver Dis,2001,33(4): 372-388.

[4] Rubio C A.Neoplasias of the colorectal crypts[J]. Anticancer Res. 2005,25(6):4551-4558.

[5] Chu P G,Weiss L M.Immunohistochemical characterization of signet-ring cell carcinomas of the stomach,breast,and colon [J].Am J Clin Pathol, 2004,121(6): 884-892.

[6] Yang W,Velcich A,Lozonschi I,et al. Inactivation of p21WAF1/cip1 enhances intestinal tumor formation in Muc2-/-mice[J].Am J Pathol,2005, 166(4):1239-1246.

[7] Yang Q,Bermingham N A,Finegold M J,et al. Requirement of Math1 for secre- tory cell lineage commitment in the mouse intestine[J].Science, 2001,294(5549): 2155-2158.

[8] Akazawa C,Ishibashi M,Shimizu C,et al.A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of Drosophila proneural gene atonal is a positive transcripttional regulator expressed in the developing nervous system[J].J Biol Chem,1995,270(15):8730- 8738.

[9] Jones J M, Montcouquiol M,Dabdoub A,et al. Inhibitors of differentiation and DNA binding (Ids) regulate Math1 and hair cell formation during the development of the organ of Corti[J].J Neurosci,2006,26(2): 550-558.

[10] Fritzsch B,Matei V A, Nichols D H,et al. Atoh1 null mice show directed afferent fiber growth to undifferentiated ear sensory epithelia followed by incomplete fiber retention[J].Dev Dyn,2005,33(2):570-583.

[11] Shou J, Zheng J L, Gao W Q. Robust generation of new hair cells in the mature mammalian inner ear by adenoviral expression of Hath1[J]. Mol Cell Neurosci,2003,23(2):169-179.

[12] Yang Q,Bermingham N A,Finegold M J,et al.Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine[J]. Science,2001,294(5549): 2155-2158.

[13] Shroyer N F,Helmrath M A,Wang V Y,et al. Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis[J].Gastroenterology,2007,132:2478-2488.

[14] Gregorieff A,Stange D E,Kujala P,et al.The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium[J].Gastroenterology,2009,137:1333-1345.

[15] van de Wetering M,Sancho E,Verweij C,et al. The β-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells [J]. Cell,002,111(2):241-250.

(责任编辑：冉明会)