基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0557-04

食管鳞癌组织中 RHAMM 和 TPX2 基因的表达及临床意义的研究

毛 宁[1],向小勇[1],陈 力[2],沈学远[2],洪 斌[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院心胸外科,重庆 400016;2. 重庆市第二人民医院心胸外科,重庆 400020)

【摘 要】目的:探讨透明质酸介导的细胞游走受体(Receptor for hyaluronan-mediated motility,RHAMM)和 Xklp2 靶蛋白(Targeting protein for Xklp2,TPX2)基因在食管鳞癌中的表达及其与临床病理因素的关系。方法:采用逆转录聚合酶链反应技术,检测 40 例食管鳞癌肿瘤组织、癌旁组织、相应食管正常黏膜组织中 RHAMM 和 TPX2 基因的表达。结果:RHAMM mRNA 在食管鳞癌组织中的表达(65.0%)显著高于癌旁组织(37.5%)及正常黏膜组织(22.5%),且与是否发生淋巴结转移有关($P<0.01$);TPX2 mRNA 在食管鳞癌组织中的表达(75.0%)也显著高于癌旁组织(47.5%)及正常黏膜组织(40.0%),与是否发生淋巴结转移及分化程度有关($P<0.05$);RHAMM mRNA 及 TPX2 mRNA 在食管鳞癌组织中的阳性表达具有相关性($P<0.01$,$r=0.39$)。结论:RHAMM 及 TPX2 基因可能共同参与了食管鳞癌的发生、进展及转移。

【关键词】RHAMM 基因;TPX2 基因;食管鳞癌;RT-PCR

【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Expression of RHAMM gene and TPX2 gene in esophageal squamous carcinoma and its clinical significance

MAO Ning, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of RHAMM gene and TPX2 gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and their relationships with clinicopathological factors. *Methods*: The expression of RHAMM gene and TPX2 gene were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in ESCC tissues, para-cancer tissues, and matched esophageal normal mucosa tissues of 40 patients. *Results*: The positive expressions of RHAMM mRNA in ESCC tissues (65.0%) were significantly higher than those in para-cancer tissues (37.5%) and esophageal normal mucosa tissues (22.5%). Significant relationship was observed between positive expression of RHAMM mRNA and lymphnode metastasis ($P<0.01$). The positive expressions of TPX2 mRNA in ESCC tissues (75.0%) were also significantly higher than those in para-cancer tissues (47.5%) and esophageal normal mucosa tissues (40.0%). Significant relationship was observed between positive expression of TPX2 mRNA and lymphnode metastasis or degrees of differentiation ($P<0.05$). A significant association was found between the mRNA expression of TPX2 and RHAMM ($P<0.01$, $r=0.39$). *Conclusion*: High expression of RHAMM gene together with TPX2 gene might play important roles in the tumorigenesis and metastasis of ESCC.

【Key words】RHAMM gene; TPX2 gene; Esophageal squamous carcinoma; RT-PCR

透明质酸介导的细胞游走受体(Receptor for hyaluronan-mediated motility, RHAMM)是一种可溶性的透明质酸结合蛋白,分布于细胞膜表面、细胞浆以及细胞核,参与细胞分裂周期的调节、细胞的生长增殖、细胞迁移运动、细胞骨架的组装以及维持中心体和纺锤体极结构的完整性,具有癌基因特性,可以使细胞转化[1,2]。Xklp2 靶蛋白(Targeting protein for Xklp2,TPX2)是一种受细胞周期严格调控的核增殖相关蛋白,对细胞有丝分裂纺锤体的稳定具有重要作用,有研究显示其过表达可导致中心体扩增[3],出现 DNA 异倍体及多倍体,提示其异常表达可能与癌变和恶性肿瘤的进展有关。我国是食管癌高发生率地区,但迄今为止,对食管癌组织中 RHAMM 及 TPX2 基因的研究尚未见报道,本研究通过逆转录聚合酶链反应法,检测食管鳞癌中 RHAMM 和 TPX2 基因的表达,并探讨两者与临床病理因素的关系及相关性,为进一步研究食管鳞癌的发生发展机制提供理论依据。

作者介绍:毛 宁(1984-),男,硕士,

研究方向:心胸外科。

通讯作者:向小勇,男,教授,E-mail:Charliexiang@sina.com。

1　材料和方法

1.1　研究对象

选自 2009 年 3 月至 8 月在重庆医科大学附属第一医院和重庆市第二人民医院心胸外科就诊的食管鳞癌患者 40 例，所有病例术前未行放、化疗及免疫治疗，术后均经病理证实，并收集同一患者的癌旁组织（距肿瘤临床边界 < 2cm）及正常黏膜组织（距肿瘤临床边界 >5 cm）做对照。全部标本均在手术中收集，并立即置于液氮中，随后于 -80℃低温冰箱保存备用。

1.2　试剂和仪器

RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒（ReverTra Ace-α-）、2 × Taq PCR MasterMix（含染料）、琼脂糖等相关试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司，PCR 仪（美国 Bio-Rad）、凝胶成像仪（美国 Bio-Rad）等仪器均由眼科学重庆市市级重点实验室提供，PCR 引物均由上海生工合成。

1.3　实验方法

严格按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取组织中的总 RNA，常规琼脂糖凝胶证实 RNA 完整性，然后按照 cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应合成 cDNA，并以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物：①RHAMM 引物，上游：5'-CACCTCATTCTGAACCCTT-3'；下游：5'-GGAGCCTAAGAACCTGTAAAT-3'，扩增产物 349 bp。②TPX2 引物：上游：5'-CGAGTGACTAAGGGATG-3'；下游：5'-AGATTTGGAGGGTAACAG-3'，扩增产物 189 bp。③内参照 GAPDH 引物，上游：5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'；下游：5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3'，扩增产物 532 bp。PCR 反应体系 25 μl，反应条件：94℃变性 3 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共进行 35 个循环，再 72℃延伸 5 min。取 5 μl 反应产物琼脂糖凝胶电泳，紫外透射反射仪下观察结果，并在凝胶成像仪上照相。

1.4　结果判断

以 PCR-Marker 为标准，阴性结果只有 532 bp 位置的 GAPDH 内标带出现，除内标带外尚有 RHAMM 基因 349 bp 的目的条带为 RHAMM 表达阳性，有 TPX2 基因 189 bp 的目的条带为 TPX2 表达阳性。

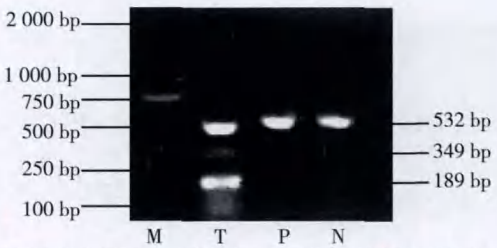
1.5　统计处理

采用 SPSS13.0 软件进行分析。组间比较采用多个样本率间的多重比较，探讨食管鳞癌组织中 RHAMM 和 TPX2 基因的表达与临床病理特征的关系采用四格表资料的 χ^2 检验及 Fisher 精确概率检验法，RHAMM 和 TPX2 基因表达的相关性分析采用配对四格表资料的关联性分析，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　RHAMM mRNA 及 TPX2 mRNA 的表达状况

40 例食管鳞癌组织中 RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 的表达阳性率分别为 65.0%（26 例）和 75.0%（30 例），与癌旁组织的 37.5%（15 例）和 47.5%（19 例）以及正常黏膜组织的 22.5%（9 例）和 40.0%（16 例）均呈明显的递减趋势，经多个样本率的比较，RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 在 3 组中的总体阳性率有差别。进一步进行两两比较显示，食管鳞癌组织与癌旁组织、正常黏膜组织比较差异均具有统计学意义，癌旁组织和正常黏膜组织比较差异均无统计学意义，见图 1，表 1。



T 食管癌组织；P 癌旁组织；N 正常黏膜组织；M Marker

图 1　RT-PCR 检测食管癌患者不同组织中 RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 的表达

2.2　食管鳞癌组织中 RHAMM mRNA 及 TPX2 mRNA 的表达与临床病理特征的关系

食管鳞癌组织中 RHAMM 基因的阳性表达与患者的性别、年龄、分化程度及浸润深度等无关（$P>0.05$），但与患者是否存在淋巴结转移显著相关（$P<0.01$），有淋巴结转移的食管癌组织内 RHAMM mRNA 的阳性表达率为 100%，而无淋巴结转移者为 33.3%。TPX2 基因的阳性表达与患者的性别、年龄及癌组织的浸润深度等无关（$P>0.05$），与患者是否存在淋巴结转移及癌组织的分化程度存在相关性（$P<0.05$），见表 2。

2.3　RHAMM mRNA 与 TPX2 mRNA 表达的相关性分析

RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 同时阳性表达的例数为 23 例，经过配对四格表资料的关联性分析发现两者表达显著相关（$P<0.01$），Pearson 列联系数 $r=0.39$，见表 3。

表 1　食管癌患者不同组织中 RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 的表达

组别	例数	RHAMM mRNA		TPX2 mRNA	
		阳性表达	*P*	阳性表达	*P*
食管癌组织（T）	40	26(65.0%)	*P=0.014(T/P)	30(75.0%)	*P=0.012(T/P)
癌旁组织（P）	40	15(37.5%)	*P=0.000(T/N)	19(47.5%)	*P=0.002(T/N)
正常组织（N）	40	9(22.5%)	P=0.143(P/N)	16(40.0%)	P=0.499(P/N)

注：*. 经 Bonferroni 法对检验水准进行调整，差异具有统计学意义

表 2 RHAMM mRNA 及 TPX2 mRNA 的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

		例数	RHAMM mRNA		TPX2 mRNA	
			阳性表达	P	阳性表达	P
性别	男	29	18(62.1%)	0.715*	22(75.9%)	1.000
	女	11	8(72.7%)		8(72.7%)	
年龄	>60 岁	22	14(63.6%)	0.842	17(77.3%)	0.731*
	<60 岁	18	12(66.7%)		13(72.2%)	
分化程度	高分化	23	13(56.5%)	0.191	14(60.9%)	0.026
	中、低分化	17	13(76.5%)		16(94.1%)	
淋巴结转移	有	19	19(100%)	0.000	18(94.7%)	0.009*
	无	21	7(33.3%)		12(57.1%)	
浸润程度	T_1+T_2	26	15(57.7%)	0.299*	18(69.2%)	0.446*
	T_3+T_4	14	11(78.6%)		12(85.7)	

注:*. Fisher 确切概率法

表 3 RHAMM mRNA 和 TPX2 mRNA 表达的相关性

		TPX2 mRNA		χ^2	P	r
		+	-			
RHAMM mRNA	+	23	3	7.18	0.007	0.39
	-	7	7			

注:+ 代表阳性;- 代表阴性

3 讨 论

食管癌是人类常见的恶性肿瘤,绝大多数为鳞状上皮癌,占 95%以上,其治疗原则是以手术为主的综合性治疗。食管鳞癌患者就诊时多为中晚期,手术后 5 年生存率 30%左右,预后较差主要与其发生浸润转移有关。探索食管癌发生发展机制,对提高食管癌的防治水平,改善预后,有极为重要的意义。

3.1 RHAMM 基因与食管癌的关系

RHAMM 基因定位于人染色体 5q33.2-qter,以膜型 RHAMM 和 IHAPB 两种形式分布于细胞膜表面、细胞浆以及细胞核。其主要生物学行为包括:①作为微管相关蛋白,可以与微管、微丝以及钙调蛋白结合,影响细胞骨架的组装和细胞运动[4,5];②作为细胞周期调节蛋白,调节细胞分裂通过 G_2/M 期[6,7];③作为中心体蛋白和分裂期纺锤体结合蛋白,维持中心体结构的完整性以及维持纺锤体极的数量和结构的完整性[4,8,9]。其在正常细胞内呈低水平表达,在转化细胞以及多种肿瘤细胞内表达明显增高。所有这些生物学特性都与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。

本研究结果中,食管鳞癌组织中 RHAMM mRNA 阳性表达率为 65.0%,而癌旁组织及正常黏膜组织分别为 37.5%及 22.5%,显示 RHAMM 主要过表达于肿瘤组织,而在正常组织中低表达,提示 RHAMM mRNA 过度表达可能作为诊断食管癌的指标之一。进一步分析 RHAMM mRNA 阳性表达与临床病理特征的关系发现,RHAMM 基因的阳性表达与患者是否存在淋巴结转移显著相关($P<0.01$),说明 RHAMM 的过度表达与食管癌的浸润和转移密切相关。这与 Rein 等[10]的结论基本一致,他们在运用免疫组化分析子宫内膜癌组织中的RHAMM 的表达时发现,在有淋巴结转移的内膜癌组织内 RHAMM 的表达率为 100%,而无淋巴结转移者仅为 50.7%。这可能与 RHAMM 与细胞外基质中的透明质酸(HA)结合,从而使肿瘤细胞在含有 HA 的基质中迁移有关。

3.2 TPX2 基因与食管癌的关系

TPX2 基因定位于人染色体 20q11.2,是一种微管相关蛋白,受细胞周期的严格调控:出现于细胞周期的 G_1 至 S 交界期,消失于胞质分裂完成后[11],对细胞有丝分裂纺锤体的稳定具有重要作用。体内、外实验均表明 TPX2 过表达导致细胞中心体扩增[3],出现 DNA 异倍体及多倍体,提示过量的 TPX2 可能抑制正常核分裂的完成并干扰其自身激活的生理途径,因而可以推断,TPX2 的异常表达可能在恶性肿瘤的发生、发展及转归中起着重要作用。

本次研究中,TPX2 mRNA 在食管鳞癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织及正常黏膜组织,癌旁组织与正常组织间统计学无差异,说明 TPX2 的过度表达主要位于肿瘤细胞中,提示 TPX2 基因的过表达可作为诊断食管癌的指标之一。本研究还显示,存在淋巴结转移或中、低分化的食管癌组织中 TPX2 基因的阳性表达率高于无淋巴结转移或高分化者($P<0.05$),提示 TPX2 基因的过表达可能预示食管癌的高侵袭性。其可能原因为 TPX2 与恶性肿瘤异倍体之间存在明显相关性,而具有异倍体的恶性肿瘤一般比具二倍体的恶性肿瘤更具侵袭性。因此,TPX2 基因的表达上调或可作为食管

癌侵袭和转移的指标。

3.3 RHAMM 基因及 TPX2 基因表达相关性与食管癌的关系

近年来,RHAMM 和 TPX2 在肿瘤发生、进展及转移中的协同作用逐渐引起人们的重视。RHAMM 的 C 端有一个碱性亮氨酸拉链结构,通过其与 TPX2 和 Dynein 马达复合物结合而定位于中心体和纺锤体极。最近研究发现,RHAMM 与 BRCA1、TPX2 和 NuMA 形成复合体参与分裂期纺锤体的组装,进而促进染色体的稳定性[12]。中心体异常改变和纺锤体失去双极性将导致异常有丝分裂的发生,从而致使基因组不稳定,增加了细胞获得增殖基因以及失去肿瘤抑癌基因的危险性,促进肿瘤的发生。本研究通过 RT-PCR 法检测 RHAMM 基因和 TPX2 基因在食管癌组织中的表达并对它们之间的相互关系进行了分析,结果显示两者表达显著相关($P<0.01$,$r=0.39$)。因此,两者同时过表达可能提示肿瘤细胞增殖异常活跃,导致恶性肿瘤的发生。联合检测 RHAMM 及 TPX2 基因的表达可能为食管癌的早期诊断、指导治疗及判断预后提供新的理论依据。

综上所述,RHAMM 及 TPX2 基因可能共同参与了食管鳞癌的发生、进展及转移。相信对它们研究的进一步深入,以及对其参与生理、病理活动的具体过程和机制的进一步阐明,不仅有助于肿瘤的早期诊断和预后判断,而且有可能为肿瘤的基因治疗提供一条新的思路和线索。

参 考 文 献

[1] Hall C L, Yang S, Yang X, et al. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras Transformation [J]. Cell, 1995, 82(1): 19-28.

[2] Assmann V, Marshall J F, Fieber C, et al.The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells [J]. J Cell Sci, 1998, 111(pt12): 1685-1694.

[3] Heidebrecht H J, Buck F, Steinmann J, et al.P100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G_2, and M [J]. Blood, 1997, 90(1): 226-233.

[4] Wang C, Thor A D, Moore D H, et al.The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression[J].Clin Cancer Res, 1998, 4(3): 567-576.

[5] Kuwabara H, Yoneda M, Hayasaki H, et al. Glucose regulated proteins 78 and 75 bind to the receptor for hyaluronan mediated motility in interphase microtubules[J].Biochem Biophs Res Com, 2006, 339(3): 971-976.

[6] Assmann V, Jenkinson D, Marshall J F, et al. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actinfilaments [J]. J Cell Sci, 1999, 112(pt22): 3943-3954.

[7] Mohapatra S, Yang X, Wright J A, et al. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression[J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1663-1668.

[8] Maxwell C A, Keats J J, Belch A R, et al. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiplemyeloma and maintainsmitotic integrity [J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 850-860.

[9] Maxwell C A, Keats J J, Crainie M, et al. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindlepole stability [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(6): 2262-2276.

[10] Rein D T, Roehrig K, Schondorf T, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis[J].J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(3): 161-164.

[11] Tonon G, Wong K K, Maulik G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(27): 9625-9630.

[12] Joukov V, Groen A C, Prokhorova T, et al.The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly [J].Cell, 2006, 127(3): 539-552.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127