

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00300

## 宫颈癌中 Foxq1 与 NF- $\kappa$ B p65 的表达及临床病理意义

张 甦,邢建明,钱 琤,邓再兴,程红玲

湖州市妇幼保健院,湖州 313000

**[摘要]** **目的:**通过基因芯片技术筛查与宫颈癌发生密切相关的转录因子,并在蛋白水平进行验证;初步探讨其在宫颈癌发生中的临床病理意义。**方法:**对新鲜宫颈癌、癌旁组织及正常宫颈组织各2例进行人表达谱芯片(Illumine Human-6 gene chip,含48 000个基因信息)检测,采用实时定量 RT-PCR 方法验证芯片结果,筛选出调控差异基因主要转录因子。并进一步对44例宫颈癌、22例宫颈内上皮瘤变及17例正常宫颈石蜡组织进行免疫组化检测,验证基因芯片筛选的主要转录因子表达情况,分析转录因子和宫颈癌临床病理学关系。**结果:**癌组织、癌旁组织与正常宫颈组织间比较共同上调基因67个,下调基因28个,RT-PCR验证了基因芯片结果。其中,NF- $\kappa$ B p65在癌旁组织和正常组织中低表达,在宫颈癌组织中高表达( $P < 0.05$ ),NF- $\kappa$ B p65与宫颈癌组织分级呈正相关( $P < 0.05$ ),与临床分期无关( $P > 0.05$ );Foxq1在癌旁和正常组织中高表达,在宫颈癌组织中阴性表达( $P < 0.05$ ),Foxq1表达与宫颈癌组织分级、临床分期均无关( $P > 0.05$ )。Foxq1与NF- $\kappa$ B p65表达无关( $P > 0.05$ )。**结论:**核因子NF- $\kappa$ B p65与Foxq1为宫颈癌发生相关转录因子,可能分别在宫颈癌的发生中起作用。

**[关键词]** 宫颈肿瘤;NF- $\kappa$ B p65;Foxq1;基因芯片;转录因子

**[中图分类号]** R 737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0300-05

### Expression of Foxq1 and NF- $\kappa$ B p65 in cervical cancer and its clinical pathological significance

ZHANG Su, XING Jian-ming, QIAN Cheng, DENG Zai-xing, CHENG Hong-ling

Maternity and Child Care Hospital of Huzhou, Huzhou 313000, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To screen for the transcription factor (TF) closely related to the development of cervical cancer tissue by microarray gene chip and to testify the results at protein level, so as to assess clinico-pathological significance of these TFs. **Methods:** The differential genes in 2 fresh cervical cancer specimens and their adjacent normal tissues and 2 normal cervical tissues were examined by Illumine Human-6 gene chip. The expression of the important TFs selected was verified by RT-PCR, and the major TFs regulating the differential genes were selected. The selected TFs were further investigated in 44 cervical cancer tissues, 22 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and 17 normal cervical tissues using immunohistochemical method. The relationship between the expression of major TFs in cervical cancer and the clinico-pathological characteristics was evaluated. **Results:** There were 67 upregulated genes and 28 downregulated genes in cervical cancer tissue and CIN when compared to normal tissue, these were testified by RT-PCR. Among these genes, the expression of NF- $\kappa$ B p65 in cervical cancer tissues was up-regulated compared with that in the CIN tissues and normal tissues ( $P < 0.05$ ). Expression of NF- $\kappa$ B p65 was positively correlated with the pathological grade of cervical cancer ( $P < 0.05$ ), and was not associated with FIGO stage ( $P > 0.05$ ). The expression of Foxq1 in cervical cancer was significantly lower than that in CIN and normal tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression was not correlated with FIGO stage, pathological grade, or NF- $\kappa$ B p65 expression ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** NF- $\kappa$ B p65 and Foxq1 are associated with the development of cervical cancer; they may play different roles in the oncogenesis of cervical cancer.

**[KEY WORDS]** cervix neoplasms; NF- $\kappa$ B p65; Foxq1; microarray chip; transcription factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3): 300-304]

宫颈癌为女性中仅次于乳腺癌的常见恶性肿瘤。现已从分子生物学水平对宫颈癌进行了大量研

究,如相关癌基因激活、抑癌基因失活、端粒酶活性高表达和机体免疫调节机制失衡等一系列病理改

**[收稿日期]** 2008-09-18 **[接受日期]** 2009-01-12

**[基金项目]** 浙江省湖州市自然科学基金(2005YZ14);浙江省医药卫生科学研究基金(2005A096)。Supported by Nature Science Foundation of Huzhou Zhejiang province(2005YZ14) and Medical Science Research Foundation of Zhejiang province(2005A096)。

**[作者简介]** 张 甦,主任医师。E-mail:qian75@263.net

变,引起细胞增殖与凋亡调节异常,导致组织癌变<sup>[1-4]</sup>。但宫颈癌发生、发展的具体信号通路和调控机制还有不明之处。本研究拟通过基因芯片筛查宫颈癌发生中重要转录因子,并在蛋白水平进行验证,分析其临床病理意义及其与宫颈癌发生的关系。

### 1 材料和方法

1.1 组织标本 新鲜宫颈癌组织、癌旁组织及宫颈正常组织各 2 例,取自我院 2007 年 1 月至 2007 年 5 月的手术病例,冻存于液氮。2 例癌组织术后病理证实均为鳞癌,2 例癌旁组织中 1 例可见宫颈内上皮样瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)。石蜡标本取自我院 2006 年 5 月至 2007 年 12 月的手术病例,其中正常组织 17 例,年龄 33~56 岁,平均(42.82±6.04)岁;CIN 组织 22 例,年龄 33~57 岁,平均(43.18±6.58)岁;宫颈癌(鳞癌)组织 44 例,年龄 33~61 岁,平均(43.11±5.52)岁。44 例癌组织病理分级 G1 级 4 例,G2 级 31 例,G3 级 9 例;临床分期按国际妇产科联合会 2000 年修订标准(FIGO2000),I a 期 3 例,I b 期 4 例,II a 期 6 例,II b 期 19 例,III a 期 7 例,III b 期 5 例。

1.2 基因芯片及试剂 Illumine Human-6 表达谱芯片(含 48 000 个基因信息)、标记试剂 I、标记试剂 II、标记试剂 III(上海博星基因芯片有限公司)。NF-κB p65 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。Foxq1 多克隆抗体(ABCOM 公司)。

#### 1.3 探针制备及杂交

1.3.1 探针制备 常规抽提癌组织、癌旁组织及正

常组织总 RNA 作为探针,每份取 4 μg mRNA,逆转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dCTP 标记癌旁组织及正常宫颈组织探针,用 Cy5-dCTP 标记癌组织探针。

1.3.2 芯片杂交及信号分析 (1)预杂交液 95℃变性 2 min;待预杂交的玻片 95℃水浴 30 s,置无水乙醇中 30 s,晾干;杂交箱内 42℃预杂交 5~6 h。(2)探针管中加 6.5 μl 杂交试剂 I,充分混匀;再加入 6.5 μl 杂交试剂 II。(3)探针 95℃变性 2 min,迅速置于冰上;95℃变性 30 s,浸于无水乙醇 30 s。(4)探针置于芯片上,盖玻片覆盖,石蜡膜密封,42℃杂交过夜(16~18 h);玻片漂洗 10 min。(5)每例样本片内重复 3 次。晾干后用 BeadStation 工作站进行芯片扫描。仪器自带软件分析 Cy3 和 Cy5 荧光信号强度,将所有数据的前景值与背景值相减,得出 Cy3 和 Cy5 标记的强度值,计算 Cy5/ Cy3 比值。

1.4 数据校正 使用 Cubic Spline 归一化法对数据进行校正。以判断芯片数据的整体质量。

1.5 筛选差异基因及芯片验证 用校正后的信号值计算比值,挑选比值大于 2 或小于 0.5 的基因为差异基因。按照基因在 2 种组织中的信号值大于 300、同时在癌组织和癌旁组织中都与正常组织差异超过 2 倍这两项条件挑选上下游共 10 个基因进行验证(表 1)。方法为实时 RT-PCR(反应体系为 10 μl;反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s,95℃ 15 s;对照基因为 β-actin)。

表 1 验证基因及探针序列

Tab 1 Probe sequence of verification genes

Gene symbol	Sense	Anti-sense
β-actin	5'-GAC TTA GTT GCG TTA CAC CCT TTC-3'	5'-TGC TGT CAC CTT CAC CGT TC-3'
ASIN2	5'-CTA TTG AAG ATG CTG CCT GTA TTT G-3'	5'-GAA GAA ACC ATG AAC GCA CTC C-3'
CCL8	5'-CTT TCA GCC CTC AGG GAC TTG-3'	5'-TTG GGA CAT TGG ATG TTG GTG-3'
CYR61	5'-TAC CAA TGA CAA CCC TGA GTG C-3'	5'-AAA CAT CCA GCG TAA GTA AAC CT-3'
GAS1	5'-GGA CAG ATA GAA GGG ATG GTT GG-3'	5'-CGG CAG ACG AGT TGG GAG TT-3'
SCGB3A1	5'-TCA TAG AGG GCT CCC AGA AGT-3'	5'-CCT CAG GTG TAG ATG CTC CAG T-3'
SFRP1	5'-CTG GGT CTT AGT TCT GGT TGA TTC-3'	5'-CAC CTG CTC TTC CGT ATT CTG T-3'
SFRP2	5'-CCC CAG CAT TTC CTG AGT TAT-3'	5'-CCA AGT CAC AGT TGC ACC TAT TC-3'
TRIM22	5'-TTT ATG GCT GTG CCT CCC TGT C-3'	5'-TTG TAG ATG AGT GCT CCG TGG T-3'
WNT7B	5'-CCT CCT CCC ATC ACC TCC T-3'	5'-GAC GCT CAG TCT CCT CAT CAC T-3'
ZIC2	5'-GCA GCG ACA GGA AGA AGC A-3'	5'-GCG TGG ACG ACT CAT AGC C-3'

1.6 转录因子分析 将癌组织与正常组织之间的差异基因、癌旁组织与正常组织之间的差异基因分别做转录因子分析。在 JASPAR 数据库(<http://>

[jaspar.genereg.net](http://jaspar.genereg.net))中分析与差异基因有调控关系的转录因子。对各样品间差异显著的前 10 位转录因子进行归类,并选取转录因子族中上、下调表达差

异最明显的转录因子作免疫组化测定。

1.7 免疫组化方法 石蜡组织采用 EnVision 二步法进行免疫组化检测,操作步骤按试剂盒说明书进行。用已知阳性片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。免疫组化结果判断标准:阳性细胞数 < 10% 为“-”;10%~25% 为“+”;25%~75% 为“++”;>75% 为“+++”。

1.8 统计学处理 使用 SAS 6.02 医学统计软件对数据进行统计学处理。计数、等级资料分别采用 Fisher 精确检验和 Kruskal-Wallis-H 非参数秩和检验;相关分析采用 Spearman 等级相关检验。计量资料相关分析采用直线相关分析。

## 2 结果

2.1 芯片数据校正 通过芯片图像分析软件对芯片灰度扫描图进行分析,得到芯片上每个基因点的原始信号值。经 Cubic Spline 的归一化方法对 6 张芯片原始数据校正,结果显示具有相似的分布(图 1)。

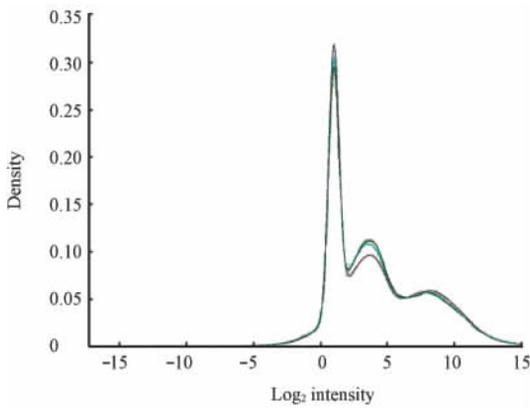


图 1 6 张芯片校正后信号值图

Fig 1 Density plot of 6 chips after adjusting

2.2 芯片验证结果 通过实时 RT-PCR 检验,无论是癌组织和正常组织还是癌旁组织和正常组织比

较,RT-PCR 结果和芯片结果基本一致(图 2)。其中癌组织和正常组织比较  $r=0.9399$ ,癌旁组织和正常组织比较  $r=0.9686$ 。

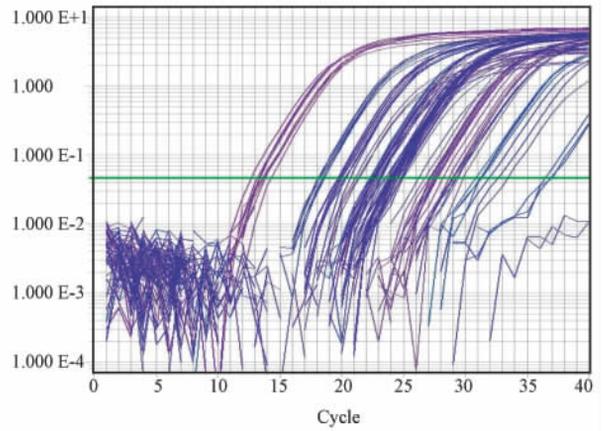


图 2 验证基因扩增熔解曲线

Fig 2 Melting curve of verification genes

2.3 筛选差异基因结果 分析结果显示癌组织与正常组织之间上调基因有 258 个,下调基因有 264 个;癌旁组织与正常组织之间上调基因有 850 个,下调基因有 413 个;癌组织、癌旁组织与正常组织之间共同上调基因有 67 个,下调基因有 28 个。

2.4 转录因子分析结果 癌组织与正常组织比较差异显著的前 10 位转录因子为 Foxf2、TBP、Foxl1、NF- $\kappa$ B p65、Foxd3、Hand1-Tcfe2a、Foxq1、c-Rel、Eip74EF、E2F1。癌组织和癌旁组织的比较差异显著的前 10 位转录因子为 Foxq1、SRF、Foxf2、Foxd3、SQUA、Foxa2、PEND、Broad-complex1、Broad-complex3、foxl1。这些转录因子多属于 Forkhead 和 Rel 家族,进一步表达趋势分析发现属于 Forkhead 家族的 Foxf2、Foxl1、Foxd3、Foxq1 均在癌组织中表达下降,其中 Foxq1 表达差异有显著性(DiffScore = -254.212),而 Rel 家族中 NF- $\kappa$ B p65 在癌组织中表达上调(表 2)。

表 2 Forkhead 及 Rel 家族转录因子在宫颈癌组织和癌旁组织表达趋势

Tab 2 Expression of Forkhead and Rel transcription factors in cervical cancer tissues and adjacent normal tissues

Symbol	Cervical cancer tissue			Adjacent normal tissues		
	Average signal	Detection P value	DiffScore	Average signal	Detection P value	DiffScore
c-Rel	62.247 6	0.003 336	-13.591 6	43.052 8	0.000 383	-16.259 6
NF- $\kappa$ B p65	180.324 2	0	2.470 212	124.432 4	0.002 635	-4.574 22
Foxd3	8.723	0.192 358	-0.678 36	-0.489 36	0.436 1	-2.744 95
Foxf2	7.3544 02	0.214 756	-0.637 28	5.257 469	0.246 377	-1.078 23
Foxl1	-9.986 64	0.886 693	-2.710 98	-1.171 66	0.462 451	-0.932 1
Foxq1	105.016 1	0.005 27	-254.212	4 268.144	0	58.190 6

2.5 NF- $\kappa$ B p65 和 Foxq1 蛋白表达 按照差异比

值选取上述两个转录因子家族中上调、下调最显著

的因子 NF-κB p65 和 Foxq1 做进一步的免疫组织化学测定。NF-κB p65 阳性表达为核内或胞质少量表达;Foxq1 阳性表达为核内表达,核内可见棕色颗粒。两蛋白在正常宫颈组织、CIN 组织、癌组织中表达情况及其与临床病理分期的关系见图 3 和表 3、表 4。NF-κB p65 在癌组织中高表达 ( $P < 0.05$ )。

在 G3 级中表达差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),表达与临床分期无关 ( $P > 0.05$ );Foxq1 在正常和癌组织中高表达,而在癌组织中低表达 ( $P < 0.05$ ),表达与临床、病理分期均无关 ( $P > 0.05$ )。NF-κB p65 与 Foxq1 Spearman 相关分析  $r_s = 0.3657$  ( $P > 0.05$ , 单侧)。

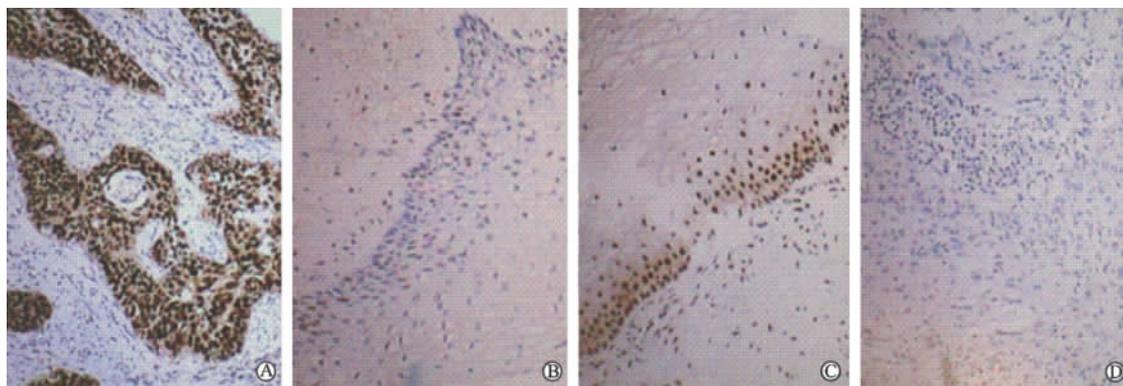


图 3 宫颈癌和正常宫颈组织中 NF-κB p65 和 Foxq1 蛋白表达

Fig 3 Expression of NF-κB p65 and Foxq1 in cervical cancer tissues and cervical normal tissues

A: Positive expression of NF-κB p65 in cervical cancer tissue; B: Negative expression of NF-κB p65 in normal tissue; C: Positive expression of Foxq1 in normal tissue; D: Negative expression of Foxq1 in cervical cancer tissue. Original magnification:  $\times 100$ . CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

表 3 NF-κB p65 和 Foxq1 在正常组织、CIN 和宫颈癌组织中表达情况

Tab 3 Expression of NF-κB p65 and Foxq1 in cervical normal tissue, CIN, and cervical cancer tissue

Tissue	N	NF-κB p65					Foxq1				
		-	+	++	+++	Positive rate(%)	-	+	++	+++	Positive rate(%)
Normal	17	15	2	0	0	11.76	0	5	10	2	100
CIN	22	15	5	2	0	31.82	0	3	15	4	100
Cancer	44	11	8	20	5	75.00*	30	7	7	0	18.67*

\*  $P < 0.05$  vs normal tissue. CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

表 4 NF-κB p65 和 Foxq1 与宫颈癌临床病理特征的关系

Tab 4 Relationship between expression of NF-κB p65, Foxq1 and clinico-pathological characteristics of cervical cancer patients

Item	N	NF-κB p65					P value	Foxq1				P value
		-	+	++	+++	-		+	++	+++		
Clinical stage												
I	7	3	2	2	0		0	2	5	0		
II	25	5	3	14	3		20	3	2	0		
III	12	3	3	4	2	0.061 0	10	2	0	0	0.671 1	
Tumor grade												
G1	4	3	0	1	0		1	2	1	0		
G2	31	8	4	16	3		21	4	6	0		
G3	9	0	4	3	2	0.046 3*	8	1	0	0	0.182 5	

\*  $P < 0.05$ , expression of NF-κB p65 in cancer tissue shows positive correlation with the clinico-pathological grade

### 3 讨论

有实验证明多种核因子如 E2F1、NF-κB 等均与宫颈癌发生密切相关<sup>[5-6]</sup>。本研究利用含 48 000 基

因信息的人基因组芯片对宫颈癌组织、癌旁组织、正常宫颈组织进行差异基因筛选并分析其中关键转录因子,发现在宫颈癌组织中 Forkhead 及 Rel 转录因子家族中多种因子参与宫颈癌的发生,进一步分析

这些转录因子表达趋势发现 Forkhead 家族中的 Foxq1 表达显著下调, Rel 家族中 NF- $\kappa$ B p65 表达明显上调,提示这两个转录因子在宫颈癌发生中起一定作用。

核因子(NF- $\kappa$ B)是 NF- $\kappa$ B/Rel 家族的一员,哺乳动物有 5 种 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白, p50(又称为 NF- $\kappa$ B1)和 p52(又称为 NF- $\kappa$ B2)由前体蛋白 p105 和 p100 水解产生(p105 和 p100 还分别产生 I $\kappa$ B $\gamma$  和 I $\kappa$ B $\delta$ ),而 RelA(p65)、RelB 和 c-Rel 并非由前体蛋白产生。NF- $\kappa$ B 是由 p50 和 RelA 组成的异源二聚体。NF- $\kappa$ B 是能调节多种生物学过程的一种重要的转录调节因子,易被病毒、氧化剂、炎症细胞因子等刺激剂激活,进而调控基因的表达。程大丽等<sup>[7]</sup>对 30 例宫颈鳞癌石蜡切片 NF- $\kappa$ B p65 进行测定,发现癌组织中 NF- $\kappa$ B p65 高表达,且与肿瘤组织分期、分级密切相关。本研究的基因芯片数据发现 NF- $\kappa$ B p65 在癌组织中高表达,在癌旁组织中低表达,通过进一步免疫组化验证发现 NF- $\kappa$ B p65 在正常组织和癌旁组织中低表达,而在宫颈癌组织中阳性表达率高达 75%,且与组织分级密切相关。这与上述报道基本一致。

Forkhead 家族是一个庞大而功能广泛的转录因子家族。Foxq1 为该家族中研究最早的因子之一,尽管在多种组织中发现其广泛表达,但目前比较明确的功能是调控毛发分化<sup>[8]</sup>,在体外也可见 Foxq1 抑制平滑肌分化基因<sup>[9]</sup>。文献<sup>[10]</sup>报道 Foxq1 作为前凋亡因子在黑素瘤中表达下调 64 倍,并随着肿瘤的发生、进展逐渐表达下调。另有文献<sup>[11]</sup>报道在体外实验中观察到其等位突变可以导致 NK 细胞功能缺失,CD4 T 细胞增殖能力降低。本研究观察到宫颈癌旁组织中 Foxq1 表达增高,而癌组织中表达降低显著,免疫组化进一步证明癌组织中该基因在宫颈癌组织中的阴性表达,且与肿瘤分期、分级无关。提示 Foxq1 在癌组织中表达沉默,与肿瘤发生有一定关系。

综上所述,本研究通过基因芯片筛查宫颈癌组织、癌旁组织、正常宫颈组织,发现在表达差异的基因中 Foxq1 及 NF- $\kappa$ B p65 转录因子为调控相关转录因子;并在基因和蛋白水平均证实了 NF- $\kappa$ B p65 与宫颈癌发生的关系,为宫颈癌靶向治疗设计靶点提供了实验依据。同时实验还发现了 Foxq1 在宫颈癌组织中的低表达,结合对 Foxq1 已知功能的分析,推测 Foxq1 调控的细胞免疫功能缺陷与宫颈癌发生有一定关系。另外 NF- $\kappa$ B 与 Foxq1 蛋白表达无明

确相关性,也提示这 2 个转录因子在宫颈癌发生中分别调控不同的信号通路。

(志谢 本研究在上海联合基因科技有限公司及第二军医大学长海医院病理科完成,特别感谢上海联合基因科技有限公司蒋泉锋博士在基因芯片工作方面提供的技术支持,以及长海医院病理科倪灿荣老师在免疫组化实验中给予的帮助!)

## [参考文献]

- [1] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human Papillomavirus: E6 and E7 oncogenes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:2006-2011.
- [2] Liu X, Clements A, Zhao K H, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 578-586.
- [3] Niu X Y, Peng Z L, Duan W Q, Wang H, Wang P. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16:743-751.
- [4] Fidan I, Bozdayi G, Rota S, Biri A, Gurelik F C, Yuksel S, et al. The relationship between cervical human papillomavirus infection and apoptosis[J]. *Clin Invest Med*, 2008, 31:168-175.
- [5] Wu L, Goodwin E C, Naeger L K, Vigo E, Galaktionov K, Helin K, et al. E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:7059-7067.
- [6] James M A, Lee J H, Klingelutz A J. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner[J]. *J Virol*, 2006, 80:5301-5307.
- [7] 程大丽,陈冬,陈浩阳,张淑兰. 核转录因子  $\kappa$ Bp65 在子宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. *中国医科大学学报*, 2005, 34: 140-142.
- [8] Hong H K, Noveroske J K, Headon D J, Liu T, Sy M S, Justice M J, et al. The winged helix/forkhead transcription factor Foxq1 regulates differentiation of hair in satin mice[J]. *Genesis*, 2001, 29:163-171.
- [9] Hoggatt A M, Kriegel A M, Smith A F, Herring B P. Hepatocyte nuclear factor-3 homologue 1 (HFH-1) represses transcription of smooth muscle-specific genes[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31162-31170.
- [10] Jensen E H, Lewis J M, McLoughlin J M, Alvarado M D, Daud A, Messina J, et al. Down-regulation of pro-apoptotic genes is an early event in the progression of malignant melanoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14: 1416-1423.
- [11] McGarry R C, Walker R, Roder J C. The cooperative effect of the satin and beige mutations in the suppression of NK and CTL activities in mice[J]. *Immunogenetics*, 1984, 20: 527-534.

[本文编辑] 孙岩