

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1380-03

应用 RT-PCR 分析食管癌组织中 *lrig1* 基因的表达闫尧<sup>1</sup>, 马军<sup>1</sup>, 唐芙爱<sup>1</sup>, 达嘎<sup>2</sup>, 祁秋干<sup>2</sup>, 李印<sup>3</sup> (<sup>1</sup> 郑州大学第二附属医院消化内科, 河南 郑州 450014, <sup>2</sup> 青海大学附属医院胸心外科, 青海 西宁 810008, <sup>3</sup> 河南省肿瘤医院胸外科, 河南 郑州 450008)Expression of *lrig1* gene in esophageal squamous cancer tissues by RT-PCRYAN Yao<sup>1</sup>, MA Jun<sup>1</sup>, TANG Fu-Ai<sup>1</sup>, DA Ga<sup>2</sup>, QI Qiu-Gan<sup>2</sup>, LI Yin<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 4500014, China, <sup>2</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital, Qinghai University, Xining 810008, China, <sup>3</sup>Department of Thoracic Surgery, Tumor Hospital of Henan, Zhengzhou 450008, China

**【Abstract】** AIM: To study the expression of *lrig1* gene in esophageal squamous cancer and its significance. **METHODS:** The expression of *lrig1* gene was detected by RT-PCR in cancer tissues, matched para-cancer tissues and tissues far away from tumor in 36 cases of esophageal squamous cancer. PCR products were tested by gel electrophoresis. The expressions of *lrig1* gene in the three kinds of tissues were semi-quantified by calculating the ratio of the gray value of *lrig1* bands and those of GAPDH bands respectively. **RESULTS:** The positive expression rate of *lrig1* mRNA in 36 cases of esophageal carcinoma was 41.7% (15/36). The positive rate was lower than that in tumor-adjacent tissues (91.7%) or esophageal mucosa far away from tumor (100.0%) respectively ( $P < 0.05$ ). Semi-quantified analysis showed that the level of *lrig1* mRNA expression in esophageal cancer tissues ( $0.76 \pm 0.22$ ) was lower than that in tumor-adjacent tissues ( $0.89 \pm 0.33$ ) and esophageal mucosa far away from tumor ( $1.13 \pm 0.40$ ). The higher positive expression rate of *lrig1* mRNA was correlated with higher differentiation grades in cancerous tissues ( $P < 0.05$ ). While the expression of *lrig1* mRNA had no relationship with TNM stages, lymph node metastasis or histologic types in esophageal cancer ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** The expression of *lrig1* mRNA is lost or reduced in esophageal cancer tissues, which indicates that the *lrig1* gene may play an important role in suppressing the tumorigenesis and development in esophageal cancer.

**【Keywords】** *lrig1* gene; esophageal neoplasms; mRNA; RT-PCR

收稿日期 2007-01-09; 接受日期 2007-02-11

基金项目 河南省医学科技创新人才工程项目(豫财社 2005 1158 号)

通讯作者 李印. Tel (0371) 65587030 Email liyin825@yahoo.com

作者简介 闫尧. 硕士, 住院医师. Tel (0371) 63939084 Email yemoneyanyao@sina.com

**【摘要】**目的: 观察 *lrig1* 基因在食管鳞癌中的表达及意义。方法: 采用 RT-PCR 检测 36 例食管鳞状细胞癌组织、相应的癌旁组织和远癌组织中 *lrig1* mRNA 的表达情况。PCR 产物经凝胶电泳, 比较 3 种组织中 *lrig1* 与 GAPDH 条带的灰度值之比, 半定量分析 *lrig1* mRNA 的表达水平。结果: 36 例食管癌组织中有 15 例(42%) *lrig1* mRNA 检测到阳性表达, 21 例(58%) *lrig1* mRNA 表达缺失, 其阳性表达率低于相应的癌旁组织(92%)和远癌组织(100.0%,  $P < 0.05$ ); 癌组织中 *lrig1* mRNA 表达水平( $0.76 \pm 0.22$ )低于相应的癌旁组织( $0.89 \pm 0.33$ )和远癌组织( $1.13 \pm 0.40$ ); 随着肿瘤分化程度的升高, *lrig1* mRNA 在癌组织中的阳性表达率也增加( $P < 0.05$ ), 但 *lrig1* mRNA 表达缺失与食管癌临床分期(TNM)、淋巴结有无转移和病理类型均无统计学差异( $P > 0.05$ )。结论: *lrig1* mRNA 在食管癌组织中存在表达缺失和低表达, 提示 *lrig1* 基因在食管癌的发生发展中可能具有抑癌基因的作用。

**【关键词】** *lrig1* 基因; 食管肿瘤 mRNA; 逆转录聚合酶链反应  
【中图分类号】R735.1 【文献标识码】A

## 0 引言

人类 *lrig1* 基因, 其位于人类染色体 3p14.3, 目前已有文献表明 *lrig1* 基因是一个候选的抑癌基因, 对其机制也有了初步的探索<sup>[1-6]</sup>。我国是食管癌高发地区, 对食管癌组织中 *lrig1* 基因的研究少见文献报道。鉴于此, 我们应用 RT-PCR 检测 *lrig1* 基因在食管癌中的表达情况, 并探讨 *lrig1* 基因在食管癌发生、发展中的意义。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 河南省肿瘤医院胸外科 2006-03/2006-08 行手术切除的食管癌住院患者 36(男 26, 女 10)例, 年龄  $62.17 \pm 7.2$  (40 ~ 75) 岁; 术前均未接受化、放疗, 肿瘤组织经病理学检查证实均为鳞状上皮细胞癌。临床分型: 溃疡型 21 例(58%), 髓质型 9 例(25%), 蕈伞型 5 例(14%), 缩窄型 1 例(3%); 分化程度: 高分化 4 例(11%), 中分化 8 例(22%), 低分化 24 例(67%); 肿瘤临床分期: 按国际 TNM 分期(UICC, 1997 年), I 期 4 例(11%), II 期 15 例(42%), III 期 17 例(47%), IV 期 0 例; 有淋巴结转移 19 例(53%), 无淋巴结转移 17 例(47%)。TRIzol 总

RNA 提取试剂及 PCR 试剂盒(北京 TIANGEN 公司);反转录试剂盒(丹麦 Fermentas 公司);PCR 扩增仪(德国 Eppendoff 公司);高速台式冷冻离心机(德国 Eppendoff 公司);水平电泳仪(美国 BioRad 公司);DBT-08 型凝胶成像分析仪(美国 UVITEC 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 标本收集 于手术中收集标本,取材后速冻于液氮中,后于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中贮存备用。标本取材大小均约  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ 。癌组织均在原发灶取材,避开坏死、炎症区域,癌旁组织取自相应肿块旁  $2\text{ cm}$  的食管黏膜组织,远癌组织均取自距肿块边缘  $5\text{ cm}$  以上的食管黏膜组织。

1.2.2 引物设计 *lrig1* 基因引物用 Oligo6.0 软件设计,序列如下:上游  $5'$ -CAG TGC ATA GCT GGA GGG AGT C- $3'$ ;下游  $5'$ -TAC AAT GAT GAG AAG CTG ATT GGC TGC A- $3'$ ,扩增产物片段长度  $140\text{ bp}$ 。做为内参照的 GAPDH 基因引物根据 Fort 等<sup>[7]</sup>报道的序列设计:上游  $5'$ -CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG- $3'$ ,下游  $5'$ -TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG- $3'$ ,扩增产物片段长度  $443\text{ bp}$ 。以上引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

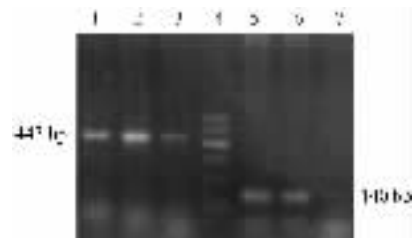
1.2.3 组织中总 RNA 的提取 采用 TRIzol 试剂,按常规步骤提取总 RNA。总 RNA 以  $50\text{ }\mu\text{L}$  DEPC 水溶解。琼脂糖凝胶示  $5, 18, 28\text{ s}$  的 3 条清晰条带,再经紫外分光光度仪测定  $260\text{ nm}$  和  $280\text{ nm}$  的  $A$  值,取  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  比值为  $1.8 \sim 2.0$  者用于反转录反应。

1.2.4 RT-PCR 扩增 以提取的总 RNA 为模板,按试剂盒说明书进行操作。反转录步骤如下:总 RNA  $8\text{ }\mu\text{L}$ , oligo-(dT)  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 无 RNase 水  $3\text{ }\mu\text{L}$ , 混匀,离心。 $70^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ,立即置于冰浴  $2\text{ min}$ 。加入  $5 \times$  Buffer  $4\text{ }\mu\text{L}$ , RNase 抑制剂  $1\text{ }\mu\text{L}$ , dNTP  $2\text{ }\mu\text{L}$ ,混匀, $37^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ,加入反转录酶  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$   $60\text{ min}$ ;  $70^{\circ}\text{C}$   $10\text{ min}$ ;立即置于冰浴,合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。我们选择扩增的是 *lrig1* 基因及内参照 GAPDH 基因,引物序列见 1.2.2。PCR 扩增反应步骤如下:反应体积为  $25\text{ }\mu\text{L}$ ,  $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $60\text{ s}$ , 经 36 个循环周期后,  $72^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ,取出  $4^{\circ}\text{C}$  贮存备用。PCR 产物经  $20\text{ g/L}$  琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色)后,紫外透射反射仪下观察结果,并在凝胶成像仪上照相,扫描所得灰度值进行统计学分析。以  $100\text{ bp}$  DNA-Marker 为标准,在  $140\text{ bp}$  位置出现条带为 *lrig1* 表达阳性;GAPDH 在  $443\text{ bp}$  位置上出现条带为表达阳性。

统计学处理:*lrig1* mRNA 的表达水平以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 统计分析软件分析,根据资料类型采用 ANOVA, Newman-Keuls 检验,  $\chi^2$  检验及 Fisher's Exact Test。取  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

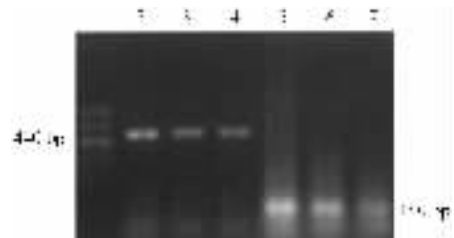
## 2 结果

2.1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳 *lrig1* 及内参 GAPDH 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,其大小与预先设计引物大小一致(图 1, 2)。36 例食管远癌组织中均有 *lrig1* mRNA 阳性表达,癌旁组织中有 33 例(92%) *lrig1* mRNA 阳性表达,而食管肿瘤组织中有 21 例(58%) *lrig1* mRNA 表达缺失(图 1);15 例(42%) *lrig1* mRNA 检测到阳性表达(图 2)。



1~3 GAPDH 在远癌、癌旁及癌组织中的表达  $\neq 100\text{ bp}$  DNA-Marker; 5~7 *lrig1* 在远癌、癌旁及癌组织中的表达。

图 1 RT-PCR 分析 *lrig1* 基因阴性表达



1  $100\text{ bp}$  DNA-Marker 2~4 GAPDH 在远癌、癌旁及癌组织中的表达; 5~7 *lrig1* 在远癌、癌旁及癌组织中的表达。

图 2 RT-PCR 分析 *lrig1* 基因阳性表达

### 2.2 *lrig1* mRNA 在食管癌各组织中的表达情况

食管癌组织中 *lrig1* mRNA 阳性表达率为 42%,而癌旁组织、远癌组织中分别为 92%, 100%。经统计学分析,食管癌组织中 *lrig1* mRNA 的阳性表达率低于癌旁组织( $\chi^2 = 20.25$ ,  $P < 0.05$ )和远癌组织(Fisher's Exact Test  $P = 0.001$ ),而癌旁组织和远癌组织之间 *lrig1* mRNA 的阳性表达率无统计学差异(Fisher's Exact Test  $P = 0.12$ );应用灰度扫描半定量分析, *lrig1* mRNA 在食管癌组织、癌旁组织及远癌组织中阳性表达水平分别是  $0.76 \pm 0.22$ ,  $0.89 \pm 0.33$  及  $1.13 \pm 0.40$ 。经统计学分析, *lrig1* mRNA 在食管癌组织的阳性表达水平低于在癌旁组织( $q = 5.04$ ,  $P < 0.05$ )和在远癌组织( $q = 9.38$ ,  $P < 0.05$ )中的表达;且在癌

旁组织中的表达也低于在远癌组织中的表达( $q = 7.15, P < 0.05$ ).

**2.3 *lrig1* mRNA 表达与食管癌临床病理特征之间的关系** *lrig1* mRNA 在癌组织中阳性表达率为 I 期 50%(2/4); II 期 33%(5/15), III 期 47%(8/17), IV 期 0%(0/0); 低分化 12%(3/24), 中分化 100%(8/8), 高分化 100%(4/4); 溃疡型 43%(9/21), 髓质型 33%(3/9), 蕈伞型 60% (3/5), 缩窄型 0%(0/1); 有淋巴结转移组 42%(8/19), 无淋巴结转移 41%(7/17). 统计学分析表明 随着肿瘤细胞分化程度的升高 *lrig1* mRNA 在食管癌组织中的阳性表达率也逐渐增加, 低分化组与中、高分化组比较有统计学差异 (Fisher's Exact Test,  $P_{低vs中} = 0.001$ ;  $P_{低vs高} = 0.001$ ), 而中、高分化组之间比较无统计学差异 (Fisher's Exact Test,  $P_{中vs高} = 1.00$ ); 癌组织中 *lrig1* mRNA 阳性表达率与食管癌病理类型、临床分期及有、无淋巴结转移均无统计学差异 ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

我们的研究表明 *lrig1* mRNA 在 36 例食管癌标本中仅有 15 例在癌组织中存在阳性表达, 其阳性表达率显著低于癌旁组织及远癌组织 ( $P < 0.05$ ), 而后两者间的阳性表达率无统计学差异 ( $P < 0.05$ ). 通过半定量分析表明 *lrig1* mRNA 在肿瘤组织中的表达水平低于在癌旁组织及远癌组织 ( $P < 0.05$ ), 而且在远癌组织中的表达水平低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); 另外, 通过比较分析 *lrig1* mRNA 低表达或表达缺失, 与食管癌细胞分化程度有显著性差异 ( $P < 0.05$ ). 分化程度越高 *lrig1* mRNA 的阳性表达率逐也越高, 可能在食管癌的发生过程中与 *lrig1* 基因抑癌作用逐渐失活有关, 而与食管癌临床病理分期、淋巴结有无转移和病理类型均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). 因此, *lrig1* 基因在食管癌组织中表达率减低和部分表达缺失, 说明 *lrig1* 基因在食管癌发生发展中可能具有抑癌基因的作用, 是可能的抑癌候选基因分子之一. 其抑癌作用机制尚不清楚, 目前有学者<sup>[8-9]</sup>通过研究 *lrig1* 诱导神经胶质瘤细胞系 H4 的凋亡作用, 认为 *lrig1* 是一个候选抑癌基因, 并对其作用机制作了初步的探讨. 他们认为 *lrig1* 通过参与形成 EGFR 的负反馈环抑制肿瘤生长. 但此看法仍处于假说阶段, 须

进一步的研究.

在肿瘤组织中表达下调的基因一般被认为是潜在的抑癌基因, 表达上调的基因可能对肿瘤发生、发展起促进作用. 而我们的实验提示 *lrig1* mRNA 在食管癌组织中表达率减低和部分表达缺失, 说明在食管癌发生发展中可能是由于 *lrig1* 基因失活而不能发挥抑制肿瘤的作用, 进一步证实 *lrig1* 基因在食管癌中可能是候选的抑癌基因. 迄今为止, 人们对 *lrig1* 基因的了解十分有限, 它的诸多功能、作用机制以及与相关基因的相互关系等许多方面还不十分清楚, 有待于进一步深入研究.

### 【参考文献】

- [1] Hedman H, Nilsson J, Guo D, et al. Is *lrig1* a tumor suppressor gene at chromosome 3p14.3? [J]. Acta Oncol, 2002, 41(4): 352-354.
- [2] Suzuki Y, Miura H, Tanemura A, et al. Targeted disruption of *LIG-1* gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia [J]. FEBS Lett, 2002, 521(1-3): 67-71.
- [3] Thomasson M, Hedman H, Guo D, et al. *lrig1* and epidermal growth factor receptor in renal cell carcinoma: A quantitative RT-PCR and immunohistochemical analysis [J]. Br J Cancer, 2003, 89(7): 1285-1289.
- [4] Holmlund C, Nilsson J, Guo D, et al. Characterization and tissue-specific expression of human *lrig2* [J]. Gene, 2004, 332(5): 35-43.
- [5] Guo D, Holmlund C, Henriksson R, et al. The *lrig1* gene family has three vertebrate paralogs widely expressed in human and mouse tissues and a homolog in Ascidiacea [J]. Genomics, 2004, 84(1): 157-165.
- [6] Tanemura A, Nagasawa T, Inui S, et al. *lrig-1* provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases [J]. Dermatol Surg, 2005, 31(4): 423-430.
- [7] Fort P, Marty L, Piechaczyk M. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13(5): 1431-1442.
- [8] 叶飞, 郭东升, 牛洪泉, 等. *lrig1* cDNA 诱导人胶质瘤细胞系 H4 凋亡的分子机制 [J]. 癌症, 2004, 23(10): 1149-1154.
- [9] Xiong Z, Cao Y, Guo D, et al. Expression of EGFR and *lrig-1* in human trigeminal neurinoma [J]. 华中科技大学学报医学版, 2006, 26(1): 86-88.

编辑 井晓梅