

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0821-04

食管癌基因表达谱及其与细胞分化的相关性研究

李沛¹, 凌志强², 杨洪艳¹, 黄幼田¹, 赵继敏¹, 董子明¹(¹ 郑州大学基础医学院病理生理学教研室, 河南 郑州 450052; ² 浙江省医学科学院生物工程研究所, 浙江 杭州 310013)

Study on gene expression profiles and their relation to cell differentiation in human esophageal squamous cell carcinoma

LI Pei¹, LING Zhi-Qiang², YANG Hong-Yan¹, HUANG You-Tian¹, ZHAO Ji-Min¹, DONG Zi-Ming¹¹Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China, ²Institute of Bioengineering, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

【Abstract】 AIM: To investigate the gene expression profiles and to screen the genes related to cell differentiation in primary esophageal cancer, which is helpful to search and locate cell differentiation-associated genes and deepen the understanding of the molecular mechanism of its tumourgenesis. **METHODS:** cDNA microarray was used to detect the mRNA from both the primary carcinoma and the corresponding esophageal epithelium in 15 cases of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The results were analyzed by bioinformatics. **RESULTS:** Among the 886 target genes, 110 (12.42%) genes were differentially expressed commonly at least twice in all 15 samples. There was a correlation between 16 (1.81%) genes and cell differentiation, of which 9 (1.02%) were up-regulated and 7 (0.79%) down-regulated. **CONCLUSION:** Many ESCC-associated genes were screened by high-throughput gene chip method; validating their cellular functions will help to identify the key genes or pathway responsible for ESCC, which might be used as diagnostic markers and therapeutic targets for ESCC.

【Keywords】 esophageal neoplasms; cDNA microarray; gene expression profile; cell differentiation

【摘要】 目的: 研究原发性食管癌基因表达谱, 筛选与肿瘤细胞分化相关的基因, 旨在寻找或定位食管癌分化相关基因, 加深对其癌变分子机制的了解。方法: 应用基因芯片技术对 15 例 ESCC 癌组织和正常组织的 mRNA 进行检测, 并用生物

信息学对检测结果进行分析。结果: 在 886 条目的基因中有 110 (12.42%) 条至少 2 次出现差异表达, 与肿瘤分化直接相关的基因有 16 条 (1.81%), 其中表达上调的 9 条 (1.02%), 表达下调的 7 条 (0.79%)。结论: 高通量的基因芯片技术筛选出大量的 ESCC 相关基因, 从中可分析出与肿瘤分化相关的基因。对这些相关基因功能的验证将有助于找到 ESCC 发生、发展的关键基因或通路, 并可作为 ESCC 诊断的指标和治疗的靶点。

【关键词】 食管肿瘤; 基因芯片; 基因表达谱; 细胞分化

【中图分类号】 R735.1 **【文献标识码】** A

0 引言

食管癌(esophageal carcinoma)是人类常见的恶性肿瘤之一。全世界每年约 30 万死于食管癌, 其中 50% 在我国, 每年因食管癌死亡的人数约占我国全部恶性肿瘤死亡总数的 1/4, 严重危害人类健康^[1]。食管癌按病理学类型主要分为鳞状细胞癌和腺癌。两者在病因学与病理学特征上存在明显差异, 在中国主要以鳞状细胞癌为主。细胞分化异常导致上皮细胞发生恶性转化, 是食管鳞癌发生的重要机制之一^[1]。随着细胞分子肿瘤学的发展, 食管鳞癌分化相关基因的筛选验证、基因表达调控机制的探讨已成为肿瘤领域的研究热点。本课题利用基因芯片技术对原发性食管癌基因表达谱进行筛选, 并探讨差异基因与食管癌细胞分化的相关性, 旨在寻找或定位食管癌分化相关基因, 加深对其癌变分子机制的了解。

1 材料和方法

1.1 组织样本来源 2003-01/2004-06 郑州大学医学院附属医院普外科原发性食管癌患者 15 (男 10, 女 5) 例, 中位年龄 53 岁, 均经影像学、组织病理学和血清学检查, 符合 1990 年《中国常见恶性肿瘤诊治规范》原发性食管癌诊断标准。临床病理资料完整, 15 例中高分化鳞癌 4 例, 中分化鳞癌 5 例, 低分化鳞癌 6 例, 无淋巴结转移。临床 I/II 期患者 7 例, 有淋巴结转移、临床 III/IV 期患者 8 例。术前未接受任何放、化学治疗。手术切除后立即取食管癌组织及相应远端正常食管上皮组织在 20~30 min 内快速冷冻在液

收稿日期 2006-02-20; 接受日期 2006-03-10

基金项目 河南省 2004 年度普通科技攻关项目(0424410109)

作者简介 李沛, 讲师, 博士生(导师董子明)。Tel (0371) 66658199

Email lipeifreemai@hotmail.com

氮罐中,此后保存在 -80°C 的冰箱中。剩余组织标本做病理切片,并经3个病理医师分别诊断,得出共同的病理诊断报告,同时确证远端食管上皮均正常。

1.2 实验方法

1.2.1 激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM) $8\ \mu\text{m}$ 厚连续冷冻切片,行HE染色。将第一张封片镜下明确病理诊断,其余切片不封片,采用PixCell LCM 200型系统(Acturus Engineering, Mountain View, California),分别获取正常食管上皮、原发灶癌细胞,每份标本各发射500次激光脉冲,大约捕获 $1\sim 2\times 10^4$ 细胞。

1.2.2 mRNA提取和质量分析 用改进的Gibco公司Trizol试剂一步法抽提细胞总RNA,用DNase I消化去除基因组DNA。用Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen公司)纯化mRNA,分光光度计测浓度和纯度,PCR检测有无DNA污染。

1.2.3 RNA扩增 T7 RNA多聚酶启动子序列加上oligo(dT)₂₄-T7(5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCTACTATAGGGAGGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')作为引物,利用Superscript II逆转录酶(Gibco BRL)合成双链cDNA。用Qiaquick kit(Qiagen)将双链cDNA纯化,体外转录用T7 RNA多聚酶(MEGAscript *in vitro* Transcription Kit, Ambion, Austin, Tex),然后用RNEASY QIAGEN kit将cRNA纯化。用GeneQuant pro RNA/DNA Calculator(Amersham-biotech)检测纯化后的cRNA纯度及含量。

1.2.4 表达谱探针制备 使用RNA荧光标记试剂盒(TaKaRa Shuzo, 日本)进行探针标记,按说明书操作,在 $10\ \mu\text{L}$ 逆转录反应体系中加入 $3\ \mu\text{g}$ cRNA,用Cy3-dUTP/Cy5-dUTP(Amersham Pharmacia Biotech)分别标记食管癌肿瘤组织cRNA和正常食管上皮组织cRNA,逆转录标记及纯化后,使用乙醇沉淀,并将两种标记的探针混合溶解在 $10\ \mu\text{L}$ 杂交液($6\times\text{SSC}$, $2\ \text{g/L}$ SDS, $5\times\text{Denhardt's solution}$, $0.1\ \text{mg/mL}$ salmon sperm solution)中。

1.2.5 杂交 采用TaKaRa公司的Human Cancer Chip version 4.0(IntelliGene™)进行表达谱分析。相关信息可以在其公司网站(URL: <http://www.takara-bio.co.jp/>)查询。芯片杂交及洗涤按公司提供的标准操作手册进行。

1.2.6 荧光扫描和结果分析 使用Affymetrix 428 array scanner扫描芯片,观察杂交结果,用ImaGene 3.0 software(BioDiscovery)分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。判断基因差异表达的标准:①上调基因: $\text{Cy3}/\text{Cy5} > 2.0$, $\text{Cy5} > 500$;②下调基因:

$\text{Cy3}/\text{Cy5} < 0.5$, $\text{Cy3} > 500$ 。

1.2.7 考察RNA扩增对基因表达的影响 为检验T7 RNA聚合酶扩增后是否影响基因表达,我们同时使用食管癌细胞株Eca109 mRNA进行扩增有无基因表达谱对比分析实验。

统计学处理:所得数据进行线性相关与回归分析。

2 结果

2.1 总RNA抽提及mRNA纯化结果 食管癌与正常食管上皮组织抽提的总RNA中 A_{260}/A_{280} 值为 $1.843\sim 1.951$,电泳检测可见明显的18S、28S rRNA条带,证实RNA无降解。纯化后mRNA的 A_{260}/A_{280} 值为 $1.90\sim 2.0$ 之间。

2.2 考察RNA扩增对基因表达的影响 无扩增样品的基因芯片表达谱对比分析显示,两次检测结果的相关系数 $r=0.8638$,回归方程 $y=0.857x$ (其中 x, y 分别为有无扩增样品的实验ratio值),表现为较好的吻合性(图1)。

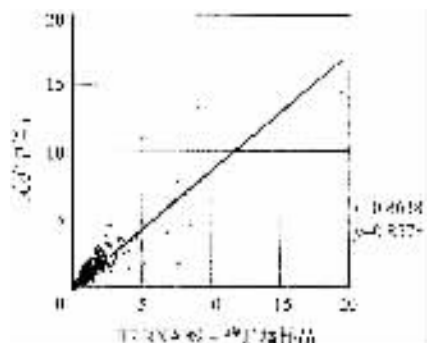


图1 样品有无扩增的cDNA芯片结果

2.3 差异表达基因筛选结果 在15次芯片杂交中,共有2038条基因发生了次数不等的(1~15)的差异表达,至少两次出现一致性显著异常表达的基因有110条(12.42%),其中基因表达上调的56(6.32%)条,主要集中在:①生长因子类基因,如HGF, MET;②细胞周期相关基因,如CCND1, PCNA;③粘附分子相关基因,如COL8A, KRT8;④线粒体相关蛋白,如PPARG;⑤细胞凋亡抑制基因,如MAPK6, IFNGR2;⑥DNA合成类相关基因,如RFC4;⑦肿瘤转移相关基因,如MMP1, PLAT。基因表达下调的有54(6.09%)条,主要集中于:①信号传递基因,如PT-PN2;②细胞周期相关基因,如CCND2;③粘附分子相关基因,如LAMC1;④TGF相关基因,如TGF- β ;⑤抑癌基因,如APC;⑥细胞骨架蛋白类基因,如KRT1;⑦细胞凋亡类基因,如CASP1;⑧生长因子类基因,如

FGF7.

2.4 基因表达谱与食管癌分化程度的关系 在筛选差异表达谱的基础上,进一步根据食管癌的分化程度进行了分组分析.高分化组4例病例中有3例出现一致性显著异常表达的基因有5条,中分化组5例病例中有4例出现一致性显著表达的基因有9条,低分化组6例病例中有4例出现一致性显著性差异的基因有13条.这27条次、16条基因与食管癌分化直接相关(表1).

表1 15例原发性食管癌基因表达谱中与分化相关的基因

高分化组($n=4$)

上调基因 肝细胞生长因子受体(285754)

EGFR 上皮生长因子受体(成红细胞白血病病毒癌基因同族体(v-erb-b)鸟类)(EGFR X 77432)
C-src 酪氨酸激酶(C-Tk X 77793)

下调基因 角蛋白4(3235)

角蛋白13(74070)

中分化组($n=5$)

上调基因 肝细胞生长因子受体(MET X 285754)

细胞周期蛋白D1(PRAD1:副甲状腺瘤病1)(CCND1)(82932)

细胞膜锚定蛋白受体(EPHA2 X 171596)

癌胚抗原相关的细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白 X CEA-CAM1 X 50964)热休克蛋白70-相互作用蛋白(HSP70-IAP X 53066)

下调基因 早期生长应答因子1(EGR1 X 326035)

角蛋白4(KRT4 X 3235)

角蛋白13(KRT13 X 74070)

PTPN2 蛋白酪氨酸磷酸酯酶,非受体型2(X PTPNR2)(82829)

低分化组($n=6$)

上调基因 细胞周期蛋白依赖激酶抑制子1B(p27, Kip1)(CDKN1B X 238990)

细胞周期蛋白D1(PRAD1:副甲状腺瘤病1)(CCMP1 X 82932)

热休克蛋白70-相互作用蛋白(HSP70-IAP X 53066)

细胞膜锚定蛋白受体(EPHA2 X 171596)

癌胚抗原相关的细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白 X CEA-CAM1 X 50964)

连环蛋白(钙粘素相关蛋白),alpha 1(CTM1)(178452)

下调基因 早期生长应答因子1(EGF1 X 326035)

角蛋白4(KRT4 X 3235)

角蛋白13(KRT13 X 74070)

BCL2-类似蛋白2(BCL2-L X 75244)

钙粘素1 E-钙粘素(上皮型)(CDH1 X 194657)

粘附分子整合素跨膜硫酸蛋白多聚糖1(syndecan 1)(82109)

蛋白酪氨酸磷酸酯酶,非受体型2(PTPN2 X 82829)

注:括号内为基因库中编号.

3 讨论

食管鳞状细胞癌(ESCC)是一种典型的分化缺陷性疾病,正常鳞状细胞分化的破坏导致上皮细胞发生恶性转化,是其发生的重要机制之一^[2].近来有关细胞分化在食管鳞癌的发生、发展及治疗中的应用成为肿瘤研究领域的新热点.我们利用cDNA微阵列基因芯片技术筛选出了110(12.42%)条差异表达基因,其中基因表达上调的56(6.32%)条,基因表达下调的有54(6.09%)条.这些与正常组织表达有差异的基因往往涉及细胞信号传导、细胞周期、凋亡等生物过程,表明ESCC的发生过程与细胞增殖、分化、细胞凋亡等密切相关.

PTPN2基因参与多种激素介导的信号调控、能量代谢、细胞增殖和促进MHC1类抗原表达.其活性降低会降低细胞表面MHC1类抗原表达,使恶性细胞逃离免疫系统的监控^[3].本研究结果显示PTPN2基因与ESCC细胞分化程度显著正相关,其表达下调提示这些病例正处于食管癌进展中.EphA2是受体酪氨酸激酶Eph家族成员之一,可以作为ephrins与细胞结合配体相互作用^[4].本结果表明,EphA2过表达与食管鳞癌的低分化以及淋巴结转移有关.原癌基因/抑癌基因在细胞的增殖、分化过程中起重要的调控作用.MET基因在12例所检标本中均为高表达,其表达水平与ESCC分化正相关,与相关研究一致^[5].c-src基因的激活及上调与食管鳞癌的起始和发生有关,并且在肿瘤发展过程中其表达水平与分化程度呈正相关^[6].而抑癌基因,如APC的表达下调与ESCC发生、发展也有直接关联^[7].

上皮分化过程与细胞周期相关蛋白密切相关.Cyclin D1是周期素中的一种,在G1期合成,与CDK2,CDK4和CDK5形成复合物,与细胞周期的控制密切相关.本研究证实Cyclin D1 mRNA在食管癌组织中高表达,且以低分化鳞癌中表达较高,其表达与肿瘤分化程度呈负相关,这可能是食管鳞癌中细胞周期调控机制异常,特别是主要元件表达异常,直接影响细胞分化正常运行,这也许是低分化鳞癌恶性程度较高的原因之一^[8].CDKN1B在低分化鳞癌中高表达,与病理分级参数相关,可能参与食管鳞癌的进展与预后^[8].细胞分化与细胞增殖、凋亡等生命活动密切相关,其异常在肿瘤发病过程中发挥重要作用.表达谱显示有大量细胞凋亡类基因表达下调,凋亡抑制基因表达增高,这表明ESCC发生、发展与细胞增殖及凋亡的动态失衡有关,其细胞程序性死亡途径受阻、细胞异常增殖分化在食管癌的发生中具有重要地位^[9].我们的结果提示细胞凋亡的调控因子之一的

Bcl-2 家族可能直接参与食管癌的异常分化。

本研究中食管鳞癌中 EGFR, EGR-1 的表达水平与分化程度明显呈正相关。其与肿瘤的发生发展有一定关系。肿瘤提示转移类基因,如整合素及基质金属蛋白酶类在 ESCC 组织中也有异常表达,表明 ESCC 细胞较正常细胞分化程度低,易从原发灶中分离脱落,破坏基底膜,侵犯血管,发生浸润和转移。一些与癌细胞浸润、转移有关粘连蛋白类基因,如胶原蛋白、钙粘蛋白等表达上调也预示食管癌的进一步转移和发展^[10]。E-cadherin 是一种细胞膜表面分子,介导正常上皮细胞-细胞间的粘附^[9]。本结果显示 E-cadherin 表达水平与肿瘤分化程度呈显著正相关。Syndecan-1 是膜表面粘附分子硫酸乙酰肝素粘蛋白,其表达水平也与肿瘤细胞分化级别、肿瘤恶性潜能密切相关^[11]。而 α -catenin 的表达水平则与肿瘤分化呈显著负相关。此外, Keratin 4, Keratin 13 是转谷氨酰胺酶(TG β)的底物,在食管鳞癌(各分化组)中普遍表达下调或缺失,可能是食管癌细胞去分化和恶性增生的原因之一^[12]。热休克蛋白(heat shock protein, hsp)是由各种生理应激或病理状态等环境因素的刺激下在细胞内诱发产生的^[13]。本结果发现 hsp70 在不同分化程度的食管鳞癌中其表达水平有所不同,疑与分化有关。CEA 表达水平与肿瘤细胞分化也疑相关。

本研究提示基因异常与疾病的病理分级有关,肿瘤分化程度越差,则基因改变累积越多。不同分化阶段关键基因的确认将有助于从分子水平阐明 ESCC 癌变机制,为其临床诊治提供分子标记和靶基因,为最终实现 ESCC 个体化分化诱导治疗提供可能。

【参考文献】

- [1] Zhang H, Chen SH, Li YM. Epidemiological investigation of esophageal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(12): 1834-1835.
- [2] Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus[J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2001, 29: 7-15.
- [3] Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, et al. Microarray-based classifi-

cation of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Eur J Haematol, 2005, 74(6): 453-465.

- [4] Xu F, Zhong W, Li J, et al. Predictive value of EphA2 and EphrinA-1 expression in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2005, 25(4): 2943-2950.
- [5] Miller CT, Lin L, Casper AM, et al. Genomic amplification of MET pathways in esophageal adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2006, 25(3): 409-418.
- [6] Irvani S, Zhang HQ, Yuan ZQ, et al. Modification of insulin-like growth factor 1 receptor, c-Src, and Bcl-XL protein expression during the progression of Barrett's neoplasia[J]. Hum Pathol, 2003, 34(10): 975-982.
- [7] Ziegler S, Rohrs S, Tickenbrock L, et al. Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation[J]. FEBS J, 2005, 272(7): 1600-1615.
- [8] Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, et al. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(2): 111-119.
- [9] Chang MS, Lee HS, Lee BL, et al. Differential protein expression between esophageal squamous cell carcinoma and dysplasia, and prognostic significance of protein markers[J]. Pathol Res Pract, 2005, 201(6): 417-425.
- [10] Teraishi F, Kagawa S, Watanabe T, et al. ZD1839 (Gefitinib, Iressa), an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, enhances the anti-cancer effects of TRAIL in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. FEBS Lett, 2005, 579(19): 4069-4075.
- [11] Lovell R, Dunn JA, Begum G, et al. Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival[J]. Br J Haematol, 2005, 130(4): 542-548.
- [12] Iwaya T, Maesawa C, Kimura T, et al. Infrequent mutation of the human envoplakin gene is closely linked to the tylosis oesophageal cancer locus in sporadic oesophageal squamous cell carcinomas[J]. Oncol Rep, 2005, 13(4): 703-707.
- [13] Miyazaki T, Kato H, Faried A, et al. Predictors of response to chemo-radiotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2005, 25(4): 2749-2755.

编辑 许福明