

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0500-04

人舌鳞癌及正常黏膜中同源异型盒基因表达差异的分析

黄元丁¹, 黄业翔², 李龙江¹, 夏辉¹, 温玉明¹

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.甘肃省第二人民医院 口腔科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的 研究人舌鳞癌及正常黏膜中同源异型盒基因(Homeobox gene)的表达差异, 认识该基因与舌鳞癌发生发展的关系。方法 设立7组舌癌/癌旁组织标本, 采用定制的含232条人类Homeobox基因探针的Oligo芯片进行分析, Agilent扫描仪扫描芯片结果, 归纳两组间差异基因信息。结果 在舌癌/癌旁组织中共同上调同源异型盒基因为NANOG基因, 且同时出现在5张芯片中; 共同下调的同源异型盒基因中, 出现在7张芯片中的为PHTF2基因, 出现在5张芯片中的分别为CRX、PITX1和OTEX。结论 同源异型盒基因是细胞正常增殖和分化的关键基因, 与肿瘤发生、发展密切相关。

[关键词] 鳞状细胞癌; 同源异型盒基因; 基因芯片

[中图分类号] R739.8 [文献标识码] A

Analyses of differential expression of Homeobox genes between lingual squamous cell carcinoma and normal mucosa HUANG Yuan-ding¹, HUANG Ye-xiang², LI Long-jiang¹, XIA Hui¹, WEN Yu-ming¹. (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Stomatology, The Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] Objective To investigate the differently expressed Homeobox genes between lingual squamous cell carcinoma and normal mucosa. Methods Seven paired specimens including lingual squamous cell carcinoma and its surrounding normal tissue were obtained from 7 patients. Customized Oligo microarray which contains numerous probes of 232 human Homeobox genes was used to analyse the results. All datas were scanned by Agilent scanner and differentially expressed genes were sorted out. Results Homeobox gene NANOG was found up-regulated in 5 samples. PHTF2 was found down-regulated in 7 samples, and CRX, PITX1, OTEX was found down-regulated in 5 samples. Conclusion As the key gene to cellular proliferation and differentiation, Homeobox genes is closely releverant to the oncogenesis of lingual squamous cell carcinoma.

[Key words] squamous cell carcinoma; Homeobox gene; gene microarray

肿瘤发生与细胞的增殖和分化失控有着密切关系, 同源异型盒基因(Homeobox gene)作为细胞正常增殖和分化的关键基因, 控制着细胞的发展方向, 与细胞恶性转化及恶性增殖密切相关。本研究通过定制表达谱芯片对舌鳞癌及正常黏膜标本进行基因表达差异的对比研究, 发现和认识舌鳞癌组织内同源异型盒基因表达变化规律与疾病本身的相关性。

1 材料和方法

1.1 病例及样本采集

四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科舌鳞癌住院患者7例, 男性5例, 女性2例, 年龄28~77岁, 平均年龄50.2岁。依UICC(2002年)^[1] TNM分期, T₂期2例, T₃期3例, T₄期2例。所有患者均经活检确诊, 且术前未接受任何治疗。舌原发灶切除后, 于病灶中心区切取5 mm×5 mm×5 mm组织块, 剔去多余组织; 同时于病灶外2 cm处切取约5 mm×10 mm的正常黏膜(征得患者知情同意), 剔除肌层, 仅保留黏膜及黏膜下层。以DEPC液清洗血迹, 无菌纱布轻拭水迹。将各标本均分为两份, 一份行体积分数为

[收稿日期] 2007-01-11; [修回日期] 2007-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471903)

[作者简介] 黄元丁(1979-), 男, 重庆人, 讲师, 博士

[通讯作者] 李龙江, Tel: 028-85501440

10%甲醛固定，石蜡切片，病理学常规苏木精-伊红染色检查；另一份放入DEPC液预处理的冻存管内，并立即投入液氮中，以备RNA提取。样本采集过程于10 min内在无菌下完成。7例舌癌患者共收集标本舌癌组织(实验组)和癌旁正常黏膜(对照组)20例样本。

1.2 总RNA的抽提、纯化及质检

将组织块标本称重后，首先在液氮中研碎，在组织匀浆机上充分匀浆，移至15 mL无RNase离心管中离心，去上清液，加入预冷的总RNA提取液Trizol(Invitrogen公司，美国，每100 mg组织加入1 mL Trizol)。然后转入1.5 mL的新鲜EP管内，氯仿提取，异丙醇沉淀，沉淀溶解于生物级纯水中备用。为了更好的去除基因组DNA的污染，采用无RNase的DNA酶处理，从而提高样品纯度。应用分光光度仪检测总RNA的质量和浓度，采用Oligo-dT亲和纯化法纯化样品总RNA，质量分数为1%琼脂凝胶电泳质检(正常电泳图谱有清晰的28、18、5 S条带)。RNA总量不足的标本进行平行的线性放大，以便进行后续检测。

1.3 定制同源异型盒基因表达谱芯片

利用美国国立生物技术信息中心网站上的人类基因组数据库，以Homeobox为检索词检索得到同源异型盒基因各成员，依相关生物学软件设计寡核苷酸芯片探针共232条。定制芯片使用进口Oligo芯片，点样仪采用GeneMachine公司的OmniGrid 100，总共点制22张芯片。阳性点14个，阴性点1个，芯片内每个矩阵的第一列和第二列的前面7个点为质控点，各矩阵的质控点都相同，每个基因在同一芯片内重复4次实验。

1.4 芯片杂交

应用cDNA直接标记法，其中实验组RNA采用Cy3荧光标记，对照组RNA采用荧光Cy5标记。标记后利用等量的探针进行杂交。扫描杂交芯片，读取数据，计算ratio值(Cy3/Cy5比值)，判定结果。ratio值在0.5-2.0范围内的基因不存在表达差异，ratio > 2为上调基因，ratio < 0.5为下调基因。同时对结果使用Cluster 3.0版分析软件进行聚类分析。

2 结果

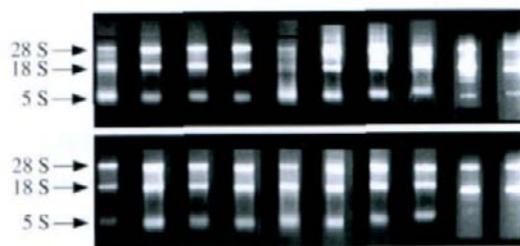
2.1 临床标本病理结果

标本组织学切片行苏木精-伊红染色，病理诊断证实为舌鳞癌，癌旁组织为正常黏膜组织。

2.2 RNA质检结果

分别将20例样本提取的总RNA进行1%琼脂糖凝胶电泳，可见清晰的28、18、5 S三条区带(图1)，

质检合格。



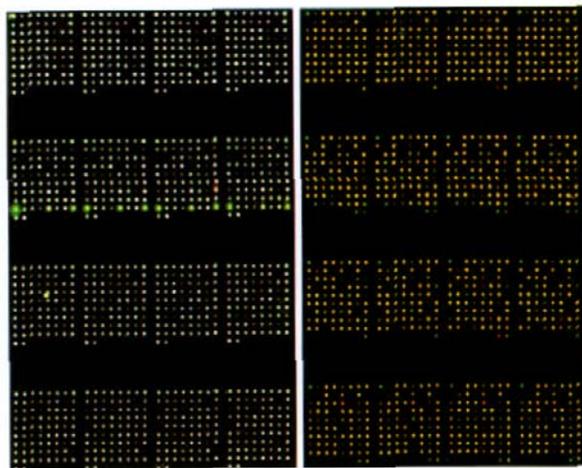
上：人舌鳞癌；下：人舌正常黏膜

图1 20例样本总RNA电泳图

Fig 1 Electrophoregram of total RNA examples of 20 specimens

2.3 定制芯片杂交、扫描及信号分析

芯片杂交前扫描图像及各组实验杂交后扫描图像见图2。可见芯片信号强度高，片内信号均一，同一样品两张芯片两个重复点相关系数均高于80%，同一芯片内部质控阳性点信号的差异系数大于0.33的不超过30%，各项指标均达到标准。



左：定制芯片杂交前；右：定制芯片杂交后

图2 定制芯片杂交、扫描及信号结果

Fig 2 The results of hybridization, scanning and signal of the performed gene expression microarray

2.4 共同差异基因的筛选

将7张杂交芯片数据文件导入Excel软件，以升序排列ratio值。筛除差异表达倍数小于等于2或P > 0.05数据，分别筛选出芯片中实验组出现上、下调的Homeobox基因并存档。对照7张芯片的差异表达基因，统计各差异表达Homeobox基因在各组样本中出现频数(frequency, F)，F值较高共同差异表达基因见表1，统计结果显示：7组样本的实验组出现上调的Homeobox基因15条，同时在5组样本的舌癌标本中出现上调基因1条(NANOG)。实验组下调的Homeobox基因数量较多，累计共79条，出现在7张芯片中的下调基因1条(PHTF2)，出现在5张芯片中的下调基因3条(PITX1、OTEX、CRX)。

2.5 聚类分析

分析7张芯片的聚类结果，将结果导入图像聚

类分析软件Tree View并以图形显示。聚类分析结果表明：19条成簇的下调基因在第7、8号芯片中有集体下调趋势，42条成簇的上调基因在第6、7、8号芯片中有集体上调趋势。

表 1 舌癌/癌旁正常组织间主要差异表达基因

Tab 1 General Homeobox genes with differential expression between lingual squamous cell carcinoma and surrounding tissues

差异表达基因	频数	比率(mean)
高表达		
C3/Cy5 2.0		
NANOG	5	2.367
POU3F2	2	2.192
TPRX	2	2.201
低表达		
C3/Cy5 0.5		
PHTF2	7	0.347
OTEX	5	0.197
PITX1	5	0.297
CRX	5	0.461
DUX4c	4	0.305
BARX1	4	0.316
ARGFXP1	4	0.357
POU2F3	4	0.373
PAX3	4	0.403
DUXA	4	0.414
HOXC9	4	0.446

3 讨论

本研究利用定制表达谱芯片在7组患者“舌癌/癌旁组织”间发现差异表达基因共94条，进一步研究发现，1)舌癌标本中的共同上调Homeobox基因仅1条(F 4)，为NANOG基因，且同时出现在5张芯片中。2)舌癌标本中的共同下调的Homeobox基因共11条(F 4)，其中出现在7张芯片中的1条，为PHTF2基因；出现在5张芯片中的3条，分别为CRX、PITX1和OTEX。筛选出的共同差异表达基因与人类肿瘤发生及细胞增殖、分化、凋亡密切相关，表明可能与舌黏膜恶变及其恶性进程有密切关系。

1)NANOG(NANOG Homeobox)在5张芯片中表现为舌癌组上调基因，其编码Homeobox基因中一个关键的多能分化因子。Mitsui等^[2]和Chambers等^[3]研究表明，该因子负责维持胚胎干细胞的多能分化潜力和自我更新能力，在保持未分化的胚胎干细胞中表达较高，而在胚胎干细胞开始分化时基因会发生下调，随之带来的是多能分化潜力的丢失。Hoei-

Hansen等^[4]对人类全基因组的基因表达谱研究表明，NANOG基因在精原细胞瘤和胚胎干细胞中高表达。2)PHTF2(putative homeodomain transcription factor 2)在7张芯片中均表现为舌癌组下调基因。它是位于人类基因组7号染色体q11.23- q21上的一条Homeobox基因，它的同源基因PHTF1位于1号染色体p11- p13。Manuel等^[5]报道PHTF2主要表达于肌肉组织，它的同源基因PHTF1主要在睾丸中表达。但查阅文献未见其与人类肿瘤相关报道。3)PITX1(paired-like homeodomain transcription factor 1)在5张芯片中表现为舌癌组下调基因。该基因编码的蛋白是RIEG/PITX Homeobox家族的成员之一，该家族的成员参与器官的发育。有研究发现PITX1蛋白还作为转录调控子参与了泌乳素活性的基础和激素调节。Lord等^[6]报道PITX1在与Barrett s食道炎综合征相关联的食管癌标本中发现的mRNA平均水平远远低于Barrett s食道炎综合征以及正常食道标本，表明PITX1可能在食道Barrett' s化生—发育异常—腺癌的发生演变过程中扮演重要角色。4)CRX(cone- rod Homeobox)在5张芯片中表现为舌癌组下调基因。该基因编码的蛋白是一种光感受器特异性转录因子，在感光细胞的分化中发挥一定作用，对于维持正常锥、杆细胞的功能必不可少。研究发现^[7]，这一基因的变异与感光细胞发生退化的一些疾病有一定联系，如Leber先天性全盲(型)常染色体显性遗传的锥-杆细胞营养不良症，然而尚没有证据表明CRX与人类肿瘤有联系。5)OTEX(paired-like Homeobox protein)在5张芯片中表现为舌癌组下调基因。它编码在X染色体，有3个内含子，是新发现的Homeobox基因。种系发生学分析表明，OTEX隶属配对Homeobox基因中PEPP亚家族的一员。现阶段研究^[8]发现，除了在卵巢、睾丸、附睾中检测到该基因的转录外，在前列腺、乳腺中也有发现。Geserick等^[9]认为OTEX表达受到雄激素的调节而升高，可能与人类的生殖功能具有极为重要的关系。目前虽未发现有关于OTEX与人类肿瘤发生的报道，但有趣的是OTEX在其他两组对照芯片的舌癌样本中表现为明显的上调。

另外，POU2F3(POU domain, class 2, transcription factor 3)在4张芯片中表现为舌癌组下调基因。该基因位于11号染色体q23.3区段，值得注意的是，有研究发现该基因的产物与角化上皮细胞的终末分化有关。Enomoto等^[10]报道POU2F3能特异性地促进角化细胞的增殖和分化，当将其导入分化受阻Hella细胞株后，可发现宫颈癌细胞的生长受到抑制，说明POU2F3能通过恢复细胞分化通路，逐步抑制细胞复制、凋亡，从而达到抑制癌细胞生长的作用。

以上大部分Homeobox基因具有一个共同的特点,即均在多数或全部的舌癌标本中下调,仅有NANOG出现明显的上调。Homeobox基因的产物均为携带与DNA结合的同源异形域的转录因子蛋白,Homeobox基因在肿瘤中的普遍下调,暗示该转录因子功能可能直接或间接参与了与抑制/促进细胞分化、凋亡相关的其他因子的正向/反向调节。据初步统计在文献中报道与肿瘤相关的差异表达基因有40余条,而在本实验中得到频数大于等于4的共同差异基因仅12条,且多数无法在文献中得到验证。

本研究使用Cluster分析软件进行聚类分析,将结果导入图像聚类分析软件Tree View并以图形显示,归为一个簇的基因在功能上可能相似或关联。结果发现,下调基因在第7、8号芯片中有集体下调趋势,上调基因在第6、7、8号芯片中有集体上调趋势。对照临床资料,发现6、7、8号芯片的标本均来自于颈淋巴结转移阳性的患者,而其余3张芯片则来自于转移阴性患者。这提示在第6、7、8号芯片中出现的共同上调基因和在第7、8号芯片中出现共同下调的基因里,可能存在与鳞癌转移相关的因子,这一结果需要采用全基因组芯片对更大规模的样本进行分析研究。

[参考文献]

[1] Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours[M]. 6th ed. New York: Wiley Liss, 2002:184-187.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第499页)

novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2):309-319.

[3] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin(OPGL) directly activates mature osteoclasts[J]. J Cell Biol, 1999, 145(3):527-538.

[4] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1):2-12.

[5] Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, et al. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition[J]. J Dent Res, 2001, 80(3):887-891.

[6] Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, et al. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice[J]. Anat Rec, 2002, 266(4):218-225.

[7] Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NFkappaB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars[J]. J Electron Microsc, 2001, 50(4):365-369.

[8] Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced

[2] Mitsui K, Itoh H. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. Cell, 2003, 113(5):631-642.

[3] Chambers I, Robertson M. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cell[J]. Cell, 2003, 113(5):643-655.

[4] Høi-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, et al. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours[J]. Histopathology, 2005, 47(1):48-56.

[5] Manuel A, Beaupain D, Romeo PH, et al. Molecular characterization of a novel gene family(PHTF) conserved from Drosophila to mammals[J]. Genomics, 2000, 64(2):216-220.

[6] Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma[J]. Surgery, 2005, 138(5):924-931.

[7] Gregory-Evans K, Kelsell RE, Gregory-Evans CY, et al. Autosomal dominant cone-rod retinal dystrophy(CORD6) from heterozygous mutation of GUCY2D, which encodes retinal guanylate cyclase[J]. Ophthalmology, 2000, 107(1):55-61.

[8] Maclean JA, Chen MA, Wayne CM, et al. Rhox: A novel homeobox gene cluster[J]. Cell, 2005, 120(3):369-382.

[9] Geserick C, Weiss B, Haendler B, et al. OTEX, an androgen-regulated human member of the paired-like class of homeobox genes[J]. Biochem J, 2002, 366(1):367-375.

[10] Enomoto Y, Enomoto K, Kitamura T, et al. Keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a represses the growth of cervical cancer cell lines[J]. Oncogene, 2004, 23(29):5014-5022.

osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(10):1924-1934.

[9] Liu D, Xu JK, Figliomeni L. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction[J]. Int J Mol Med, 2003, 11(1):17-21.

[10] Choi Y, Woo KM, Ko SH, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(7):2179-2188.

[11] Shiotani A, Takami M, Itoh K, et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin[J]. Anat Rec, 2002, 268(2):137-146.

[12] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction[J]. J Exp Med, 2000, 191(2):275-286.

[13] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periosteal osteolysis[J]. J Orthop Res, 2003, 21(1):73.

(本文编辑 汤亚玲)