

永生化上皮细胞系及肺鳞癌细胞系基因组DNA拷贝数变异的比较研究

路丹 曹邦荣 冯林 郭素平 程书钧 高燕宁 张开泰

摘要 目的:通过分析比较支气管上皮永生化细胞系与肺鳞癌细胞系的拷贝数变异探讨肿瘤早期发展的分子机制。方法:用人类比较基因组杂交芯片(aCGH)分别测定支气管上皮细胞系Y-BE和肺鳞癌细胞系NCI-H2170的拷贝数,经数据校正,对拷贝数变异基因进行GO(Gene Ontology)富集分析。结果:永生化上皮细胞系早期Yp21仅出现了少量的DNA拷贝数变异,而在染色体20q11~12区段Yp21细胞与NCI-H2170细胞出现了相似的拷贝数变异结果;永生化上皮细胞系晚期Yp113具有类神经细胞黏附基因的拷贝数增加现象;整体来看,从永生化上皮细胞早期到晚代,再与肿瘤细胞比较,DNA拷贝数变异频率不断升高,基因组稳定性逐渐下降。结论:通过对永生化上皮细胞拷贝数变异的研究,成功建立了肺癌前模型的拷贝数变异谱,部分拷贝数变异可能代表了肿瘤发生发展早期的分子事件,预示了细胞的潜在恶性,这些发现可能为阐明肿瘤发生发展的分子机制提供了条件。

关键词 永生化上皮细胞 拷贝数变异 肺鳞癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.20.011

Comparative Studies between the Copy Number Variations in Genomic DNA of an Immortalized Epithelial Cell Line and the Lung Squamous Cell Carcinoma Cell Line

Dan LU, Bangrong CAO, Lin FENG; Suping GUO, Shujun CHENG, Yanning GAO, Kaitai ZHANG

Correspondence to: Shujun CHENG; E-mail: chengshj@263.net.cn

Section of Etiology and Cancer Research (Specialty of Oncology), Cancer Institute and Hospital of Beijing Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100021 China

Abstract Objective: This study aims to explore the molecular mechanisms in the progression of early-stage tumors by comparing and analyzing the copy number variation (CNV) in an immortalized epithelial cell line and the lung squamous cell carcinoma cell line. **Methods:** Human genome array-comparative genomic hybridization was used to measure the CNVs of the immortalized cell line Y-BE and the lung squamous cell carcinoma cell line NCI-H2170. An analysis of the Gene Ontology functional enrichment of the genes with abnormal copy numbers was conducted after data reconciliation. **Results:** Only a few variations occurred in the early passage of the Y-BE cell, Yp21. A large overlapping CNV region in 20q11-12 between the cell Yp21 and NCI-H2170 was found. The copy-number gain of neural cadherin-like cell adhesion genes occurred in the late passage of the Y-BE cell, Yp113. Compared with NCI-H2170, the CNV frequency of Yp113 increased, whereas the genome stability from the early passage Y-BE to the late passage one decreased. **Conclusion:** After studying CNVs in the immortalized epithelial cell line, the CNV spectrum of variation of the precancerous model for lung cancer was successfully built. Some of the CNVs represented an early molecular event of tumor progression, indicating the potential malignancy of the cells. The findings of this study may give clues clarifying the molecular mechanisms of tumorigenesis and progression.

Keywords Immortalized epithelial cell; Copy number variations; Squamous cell carcinoma of lung

肺癌是世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。在肺癌的多阶段演进过程中,癌前状态是恶性肿瘤发生或发展的限速阶段,其分子层面的异质性和特征改变影响肿瘤细胞的进化,决定恶性肿瘤形成和发展。因此,了解癌前状态,控制癌前状态的发展方向,对肿瘤防治具有重要意义。由于癌前组织获取困难,而永生化细胞具有肿瘤发展早期的部

分特征,且恶性程度较低^[2],本研究利用支气管上皮永生化细胞系Y-BE作为癌前细胞模型来研究肿瘤发生发展过程中可能的分子机理。对Y-BE细胞的早晚期和同样起源于支气管上皮的肺鳞癌细胞所发生的拷贝数变化进行对比研究,以探讨肿瘤细胞获得恶性能力的分子机制,寻找肿瘤早期分子标记物,并为肺癌的早期诊断及治疗提供理论依据。

作者单位:北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所病因及癌变研究室(北京市100021)

通信作者:程书钧 chengshj@263.net.cn

1 材料与方法

1.1 材料

人支气管上皮永生化细胞系 Y-BE 由本实验室前期建立,来源于女性非癌支气管上皮细胞,通过 SV40LT 转染获得永生化^[3]。选取人肺鳞状细胞癌细胞系 NCI-H2170(男性),Y-BE 早代(简称为 Yp21,表示 Y 细胞第 21 代)和晚代(简称为 Yp113,表示 Y 细胞第 113 代)。商品化人类基因组 DNA(男性/女性)购自 Promega 公司;人类全基因组 CGH 芯片(4×44 K)及配套试剂盒(基因组 DNA 标记试剂盒及 Oligo aCGH/ChIP-on-Chip 杂交试剂盒)购自 Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 NCI-H2170 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养,37℃、5% CO₂ 孵箱培养;Y-BE 细胞以无血清的 LHC-9 完全培养基培养,37℃、3.5%CO₂ 孵箱培养。收集对数生长期细胞用酚氯仿抽提法提取 DNA,DNA 要求 OD₂₆₀/280 值 ≥ 1.80,浓度 ≥ 100 ng/μL,总量 ≥ 1.5 μg。

1.2.2 DNA 处理及 aCGH 实验 根据细胞系来源患者性别选取对照 DNA,细胞系与对照 DNA 均经限制性酶片段化处理,对电泳观察符合质控标准的 DNA 进行荧光标记(Cy5 标记细胞系 DNA,Cy3 标记对照 DNA),纯化浓缩后测定浓度及荧光强度,并依照公式:荧光掺入率(pmol/μg)=1 000×荧光强度(pmol/μL)/DNA 浓度(ng/μL)计算标记效率,以 Cy3 和 Cy5 的掺入率分别为 35~55 pmol/μg、25~40 pmol/μg 为合格标准。将合格细胞系 DNA 与其对照 DNA 等体积混合,在 65℃、20 rpm 的条件下与 aCGH 芯片杂交 24 h,清洗芯片除去非特异性杂交信号后,用芯片扫描仪对芯片进行双色扫描,图像采用 Agilent® Feature Ex-

traction 软件进行探针数据提取。

1.3 数据处理和统计学分析

芯片数据处理及校正利用 R 软件的 DNAcopy 程序包完成,利用该程序包中的循环二元分割法整合计算可以得到 DNA 拷贝数变异片段^[4];以信号值 <-0.2 和 >0.2 作为相应片段拷贝数减少和增加的标准;以 <-1.5 为纯合缺失标准;使用 DAVID 网站在线进行 GO 富集分析。以 Benjamini 校正 P 值显著性水平 α=0.05 为标准,筛选富集基因功能类别。

2 结果

2.1 永生化上皮细胞系 Y-BE 的拷贝数变异情况

早代细胞 Yp21 与 NCI-H2170 细胞在染色体 20q11-12 区段有较大面积的扩增重合区域(图 1);Yp113 拷贝数增加基因通过 GO 富集获得细胞黏附相关基因功能类别(表 1),其中 20 个均属于原钙黏素(PCDH)基因家族,并且所有在列的 24 个基因所表达的均是与脑和神经器官发育密切相关的类神经钙黏素类蛋白。

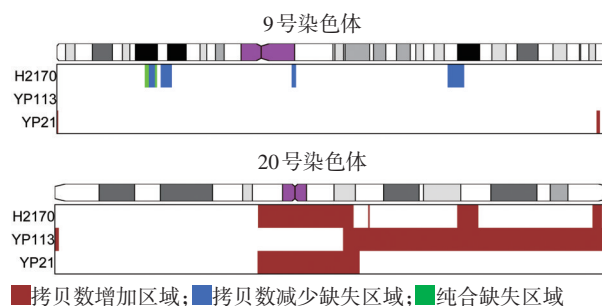


图 1 拷贝数变异在 9 号和 20 号染色体的分布情况

Figure 1 Distribution of copy number variations in No. 9 & No. 20 chromosome

表 1 Yp113 拷贝数增加基因的 GO 富集结果

Table 1 GO functional enrichment of Yp113 copy-number gain genes

GO 功能类别	基因	Benjamini
GO:0016339~calcium-dependent cell-cell adhesion	*PCDHGA1, CDH22, PCDHB13, PCDHB14, FAT2, PCDHA1, PCDHB11, PCDHB12, PCDH12, PTPRT	9.10E-07
GO:0007156~homophilic cell adhesion	PCDHB5, CDH4, PCDH1, PCDHB1, PCDHB6, PCDHB16, PCDHB3, PCDHB4, PCDHB15, PCDHB9, PCDHB10, PCDHB7, CDH26, PCDHB2	1.38E-05

*此类别的基因被完全包含在第二个类别中,因此这些基因是两个类别共有的

2.2 肺鳞癌细胞系 NCI-H2170 的拷贝数变异情况

肺鳞癌细胞系 NCI-H2170 在染色体区段 9p21 上有 3 个基因纯合缺失,分别是 CDKN2A(p16)、MTAP、CDKN2B(p15);NCI-H2170 拷贝数减少基因通过 GO 富集获得细胞黏附相关基因功能类别;拷贝数增加基因通过 GO 富集获得转录调控相关基因功能类别(表 2)。

2.3 细胞拷贝数变异的整体情况

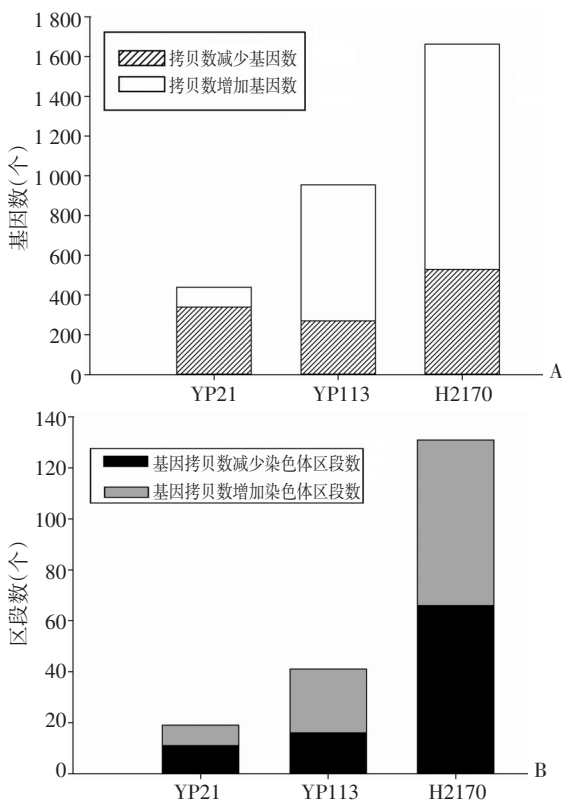
3 组细胞均存在不同程度的染色体变异,其中 Yp21 出现拷贝数减少基因 340 个,分布于 4 条染色体的 69 个染色体区段;拷贝数增加基因 100 个,分布于 3 条染色体的 26 个染色体区段。Yp113 出现拷贝数减少基因 270 个,分布于 4 条染色体的 51 个染色体区段;拷贝数增加基因 685 个,分布于 7 条染色体的 117 个染色体区段。NCI-H2170 出现拷贝数减少基因

529个(包括纯合缺失3个),分布于11条染色体的209个染色体区段;拷贝数增加基因134个,分布于15条染色体的221个染色体区段(图1,2)。

表2 NCI-H2170拷贝变异基因的GO富集结果

Table 2 GO functional enrichment of NCI-H2170 abnormal copy-number-genes

项目	GO功能类别	基因数(个)	Benjamini
拷贝数减少	GO:0007155 ~ cell adhesion	48	0.000 182 1
	GO:0022610 ~ biological adhesion	48	0.000 093 2
拷贝数增加	GO:0006350 ~ transcription	213	0.000 000 1
	GO:0045449 ~ regulation of transcription	244	0.000 001 4



A:发生拷贝数变异的基因总数;B:变异所在染色体区段总数

图2 发生拷贝数变异的基因总数及变异所在染色体区段总数在各细胞系间的情况

Figure 2 Numbers of copy-number-abnormal genes and chromosomal regions in different cell lines. (a) Numbers of copy-number-abnormal genes; (b) Numbers of chromosomal regions with copy-number-abnormal genes

3 讨论

Yp21与NCI-H2170的拷贝数增加区域出现了较大程度的重合,这可能是值得注意的肿瘤细胞发展早期分子事件。有报道^[5]提出,发生在染色体20q的扩增可能与经病毒转导的基因组不稳定性相关联,从而导致细胞永生化,而基因组的不稳定性是导致肿瘤最终发生的原因之一;20q的扩增发生在细胞致瘤转化的早期阶段,并可能具有恶性肿瘤起始的作用^[6]。在卵巢癌、结直肠癌和宫颈癌中均发现20q扩

增的现象^[7-9],但针对此区域的染色体变异鲜有关于肺癌的报道。在GO富集中得到的转录调控功能类别基因,如细胞周期调控基因E2F1和凋亡调控基因BCL2L1也出现在这一区域中(20q11.2),E2F1可以诱导休眠细胞进入细胞周期并合成DNA,而BCL2L1通过控制潜在凋亡诱导剂的释放调节细胞凋亡,因此其拷贝数增加可能引起细胞的异常增殖。该区域的扩增对肺癌的意义仍需进一步研究,而这可能对肺癌的早诊具有重要意义。

组织浸润或远端转移是肿瘤细胞进展重要标志^[10]。而细胞黏附分子出现异常表达,会导致其参与调节的分子网络失常,细胞形态改变并失去同相邻细胞或细胞外基质的接触,从而引起肿瘤发生和组织浸润等恶性事件^[11]。本研究中NCI-H2170拷贝数减少基因显著富集于细胞黏附功能类别中,暗示了其转移恶性。但细胞黏附相关基因在恶性肿瘤细胞中并不总是表达下调的,细胞迁移若发生在胚胎形成或炎症反应期间,与其相关的黏附基因往往会在浸润性癌细胞中表达上调。如在器官形成过程中神经元和间充质细胞中经常表达的神经钙黏素(N-cadherin)就在多种肿瘤细胞中表达上调^[12]。本研究中Yp113的拷贝数增加基因同样富集于细胞黏附功能类别中,该类别的大部分基因都表达可能在恶性肿瘤中获得上调的神经钙黏素,且与NCI-H2170拷贝数减少基因的富集结果并未重合,因此这样的结果也许预示了细胞获得浸润侵袭能力的潜能。

另一个值得注意的问题是,本研究中永生化上皮细胞早晚代之间并无太多相似之处,而对于同一细胞系来说,这样的差异也许是因为两株细胞来源于同一细胞株中两个不同的亚克隆。有关胰腺癌的报道指出,原发肿瘤和转移灶之间存在较大的遗传异质性,并且造成转移的突变也不包含于原发灶的突变中^[13-14]。这说明,即使原始肿瘤细胞只有一个克隆,在后期的发展中也会出现不同的亚型,因此,即使是同一肿瘤组织,不同细胞的基因差异仍然可能悬殊^[15]。而从同一细胞分离的永生化早代和晚代细胞间的差异,可能说明了肿瘤发展过程中存在不同变异的现象。

肺鳞癌有其相对特异的拷贝数特征,抑癌基因p16在肺鳞癌中存在较高的缺失频率^[16],而MTAP和p15因为处于距p16较近区域内,通常被发现与p16共同缺失。本研究中这3个基因在NCI-H2170细胞中的纯合缺失验证了这一点。基因组的不稳定性是肿瘤细胞的重要特征之一^[10],基因拷贝数出现变异以及变异所分布的区域,从永生化上皮早代到晚代,再到肿瘤,呈现了不断增多的趋势。这说明随着肿

瘤细胞的进展,细胞的基因组也变得更加不稳定。

综上所述,通过对永生化上皮细胞拷贝数变异的研究,本研究成功建立肺癌前模型的拷贝数变异谱,并发现部分拷贝数变异特征可能代表了肿瘤发生发展早期的分子特征,为阐明肿瘤发生发展的分子机制提供了条件。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- 2 An Q, Pacyna-Gengelbach M, Schlüns K, et al. Identification of differentially expressed genes in immortalized human bronchial epithelial cell line as a model for in vitro study of lung carcinogenesis[J]. Int J Cancer, 2003, 103(2): 194-204.
- 3 Lu YJ, Dong XY, Guo SP, et al. Integration of SV40 at 12q23 in SV40-immortalized human bronchial epithelial cells[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(9): 2089-2091.
- 4 Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, et al. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data[J]. Biostatistics, 2004, 5(4): 557-572.
- 5 Savelieva E, Belair CD, Newton MA, et al. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells[J]. Oncogene, 1997, 4(5): 551-550.
- 6 Tabach Y, Kogan-Sakin I, Buganim Y, et al. Amplification of the 20q chromosomal arm occurs early in tumorigenic transformation and may initiate cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14632.
- 7 Etemadmoghadam D, George J, Cowin PA, et al. Amplicon-dependent CCNE1 expression is critical for clonogenic survival after cisplatin treatment and is correlated with 20q11 gain in ovarian cancer[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15498.
- 8 Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, Beliën JA, et al. BCL2L1 has a functional role in colorectal cancer and its protein expression is associated with chromosome 20q gain[J]. J Pathol, 2012, 226(3): 442-450.
- 9 Bierkens M, Wilting SM, van Wieringen WN, et al. HPV type-related chromosomal profiles in high-grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. BMC Cancer, 2012, 24(12): 36.
- 10 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- 11 Okegawa T, Pong RC, Li Y, et al. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy[J]. Acta Biochim Pol, 2004, 51(2): 445-457.
- 12 Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a003129.
- 13 Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer[J]. Nature, 2010, 467(7319): 1109-1113.
- 14 Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer[J]. Nature, 2010, 467(7319): 1114-1117.
- 15 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges[J]. Nat Med, 2011, 17(3): 313-319.
- 16 Leversha MA, Fielding P, Watson S, et al. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 610-619.

(2012-04-13 收稿)

(2012-08-24 修回)

(本文编辑:邢颖)

《中国肿瘤临床》“新药临床研究”栏目介绍

《中国肿瘤临床》在“求精、求实、求快”办刊原则的指导下,重点建设具有临床特色与实用性的栏目,不断增强期刊学术影响力与吸引力。“新药临床研究”是本刊特色栏目之一,重点跟踪报道抗肿瘤新药的临床研究成果,以促进抗肿瘤药物临床评价规范化,推动肿瘤治疗新方案的临床应用。

本栏目欢迎临床肿瘤学科、药物临床试验和新药研发相关专业人员踊跃投稿,报道对现有标准(或最佳)治疗方法具有一定改善前景,或对临床实践有指导意义的研究内容,试验方案应符合《赫尔辛基宣言》的要求并获得相关医学伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书;临床试验样本量应符合统计学要求;注册临床试验样本量符合《新药注册管理办法》。要求文章以论著格式撰写。