

内皮特异性分子 1 在头颈鳞癌中的表达及临床意义

李群 周重昌 裘世杰 叶栋 邓红霞 沈毅 沈志森

【摘要】 目的 探讨内皮特异性分子 1 (ESM1) 在头颈鳞癌中的表达及临床意义。方法 利用肿瘤基因组计划 (TCGA) 筛选头颈鳞癌差异表达基因, 分析 ESM1 表达与患者预后的关系; 利用基因表达谱动态分析 (GEPIA) 数据库分析 ESM1 在头颈鳞癌组织中的表达及其与临床分期的关系。收集 49 例患者的头颈鳞癌组织及其对应的癌旁正常组织标本, 采用 RT-PCR 法检测 ESM1 mRNA 表达水平。应用 GSEA 软件分析 ESM1 参与头颈鳞癌进展的潜在信号通路。绘制 ROC 曲线分析 ESM1 表达检测对头颈鳞癌的诊断效能。结果 通过分析 TCGA 数据库, 共筛选 928 个低表达基因, 1 304 个高表达基因, 其中 ESM1 表达差异最明显。49 对头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。不同临床分期患者头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ESM1 高表达组无病生存期高于 ESM1 低表达组 ($P < 0.05$), ESM1 高、低表达组总生存期比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ESM1 高表达的头颈鳞癌标本主要富集在 MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路等。ESM1 水平检测诊断头颈鳞癌的 AUC 为 0.96, 灵敏度为 0.918, 特异度为 0.939。结论 头颈鳞癌组织中 ESM1 表达水平明显升高, ESM1 表达可作为头颈鳞癌的潜在分子诊断标志物, 且有助于预测患者的预后。

【关键词】 头颈鳞癌 内皮特异性分子 1 分子标志物

Expression level and clinical significance of ESM1 in head and neck squamous cell carcinoma LI Qun, ZHOU Chongchang, QIU Shijie, et al. Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Ningbo Medical Center Lihuli Hospital, Ningbo 315040, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of endothelial specific molecule 1 (ESM1) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its clinical significance. Methods The genomic expression data from the cancer genome atlas (TCGA) was analyzed to obtain differential expressed genes and the prognosis value of ESM1 expression in HNSCC. The fluorescence quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was applied to assess the expression of ESM1 in cancer tissue and pericancerous tissue samples of 49 patients with HNSCC. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed to identify the potential signaling pathway of ESM1 involving in the carcinogenesis of HNSCC. Results A total of 2232 differential expressed genes (including 928 low-expressed genes and 1304 high-expressed genes) were identified, among which ESM1 was the significantly higher expressed gene in HNSCC. The expression of ESM1 was up-regulated in 49 HNSCC samples compared with normal controls ($P < 0.05$). Besides, high expression of ESM1 was associated with disease free survival in HNSCC, and ESM1 expression was associated with clinical stages of HNSCC. The disease-free survival in patients with high ESM1 expression was longer than that in patients with low ESM1 expression ($P < 0.05$). There was no significant difference in the overall survival between patients with high and low ESM1 expression ($P > 0.05$). HNSCC with high expression of ESM1 were mainly enriched in MAPK signaling pathway and TGF- β signaling pathway. Subsequent ROC analysis indicated that the area under curve (AUC) of ESM1 expression for the diagnosis of HNSCC was 0.96, with sensitivity and specificity of 0.918 and 0.939, respectively. Conclusion The expression of ESM1 is significantly increased in HNSCC. ESM1 gene might serve as a biomarker for early diagnosis and prognosis of HNSCC.

【Key words】 HNSCC Endothelial specific molecule 1 Biomarker

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.23.2019-2515

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LY19H160014); 宁波市医疗卫生品牌学科建设项目 (PPXK2018-02)

作者单位: 315040 宁波市医疗中心李惠利医院耳鼻咽喉科头颈外科

通信作者: 沈志森, E-mail: szs7216@163.com

头颈部肿瘤最常见的病理类型为鳞状细胞癌^[1],其发生率和死亡率在全球范围内逐年升高^[2]。由于头颈鳞癌早期临床症状不典型,大部分患者诊断时已发生淋巴结转移并成为进展期恶性肿瘤。因此,寻找一种能早期筛查或诊断头颈鳞癌的分子标志物是提高患者远期生存的关键。内皮特异性分子 1 (endothelial specific molecule 1, ESM1) 属于蛋白聚糖家族,在内皮细胞中广泛表达。研究表明,ESM1 能促进内皮细胞迁移,从而促进新血管生成^[3]。亦有研究表明,ESM1 在肿瘤生长、发育和血管形成中发挥着重要作用^[4]。目前已有研究表明,ESM1 表达会影响结直肠癌、胃癌、鼻咽癌、肝细胞癌的增殖和转移^[5-8]。但关于 ESM1 在头颈鳞癌中的作用尚未阐明。因此,本研究充分利用公共数据库探索 ESM1 在头颈鳞癌中的临床应用价值,并结合患者生存数据分析 ESM1 表达对头颈鳞癌患者预后的影响,同时探讨 ESM1 在辅助诊断头颈鳞癌中的价值,现将结果报道如下。

1 资料和方法

1.1 组织标本收集 选取 2017 年 5 月至 2018 年 6 月在本院接受手术治疗的头颈鳞癌患者 49 例,均经组织病理学确诊,术前均未接受放化疗。取 49 例头颈鳞癌组织及癌旁正常组织,立即存入液氮,并及时转入 -80°C 冰箱保存。本研究经医院医学伦理委员会审查通过,所有患者签署知情同意书。

1.2 ESM1 mRNA 表达水平检测 (1)RNA 提取和逆转录:应用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取 49 对头颈鳞癌组织及癌旁正常组织标本的总 RNA。应用 Go-Script 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)对总 RNA 进行逆转录反应,获得 cDNA。(2)RT-PCR:使用 Roche 公司 RT-PCR 仪(Light Cycler480),反应体系由 2 \times SYBR Green 荧光染料、DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、上下游引物和模板 cDNA 构成。以人 GAPDH 管家基因为内参基因,标准化目标 cDNA 的量。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5min,循环 42 次。引物信息如下:ESM1 正义 5'-GGTGGACTGCC-CTCAACT-3',反义 5'-AAGGTGCCGTAGGGACAG-TCT-3';GAPDH 正义 5'-GGGAAGGT-GAAGTCG-GAGT-3',反义 5'-GGGGTCATTGATGGCAACA-3'^[9]。每个样本针对 ESM1 和 GAPDH 检测均重复 3 次。样本 ESM1 mRNA 相对表达量 = $2^{-(\alpha_{\text{样本}} - \alpha_{\text{内参}})}$ 。

1.3 生物信息资源及分析 从肿瘤基因组计划(TCGA)数据库下载 111 例头颈鳞癌组织及 12 例对照组

组织的全基因组表达数据(HTSeq-FPKM level 3)。应用 R 软件 limma 模块分析头颈鳞癌中差异表达基因(差值 ≥ 2 或 ≤ -2 且错误发现率 < 0.05),最终确定差值最显著的 ESM1 为研究目的基因。从基因表达谱动态分析(GEPIA)数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn>)下载 519 例头颈鳞癌组织及 44 例正常组织的 ESM1 表达、临床分期及生存的数据,分析 ESM1 在头颈鳞癌组织中的表达及其与患者预后的关系^[10]。

1.4 基因富集分析 根据 TCGA 数据库头颈鳞癌样本 ESM1 表达的中位数分为 ESM1 高、低表达组。应用 GSEA 软件分析 ESM1 参与头颈鳞癌进展的潜在信号通路。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件。头颈鳞癌组织与其对应的癌旁正常组织 ESM1 表达水平比较采用配对样本 *t* 检验;不同临床分期患者头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平比较采用单因素方差分析。利用 Kaplan-Meier 法绘制 ESM1 高、低表达的头颈鳞癌患者总生存期及无病生存期的生存曲线,采用 log-rank 法比较生存率。绘制 ROC 曲线分析 ESM1 表达检测对头颈鳞癌的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA 数据库头颈鳞癌差异表达基因的情况 对 TCGA 数据库中 111 例头颈鳞癌组织及 12 例对照组织的 HTSeq-FPKM level 3 全基因组数据进行差异表达基因分析,结果显示头颈鳞癌中有 928 个基因表达水平明显低于对照组织,1 304 个基因表达水平明显高于对照组织,其中 ESM1 的表达差异最明显,见图 1(插页)。

2.2 头颈鳞癌组织与癌旁正常组织 ESM1 表达水平比较 对 GEPIA 数据库 519 例头颈鳞癌组织与 44 例癌旁正常组织中的 ESM1 表达水平进行比较,结果发现 ESM1 在头颈鳞癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$),见图 2a。为进一步验证结果,笔者收集并检测了 49 对头颈鳞癌组织及其癌旁正常组织的 ESM1 表达水平,结果证实 ESM1 在头颈鳞癌组织中的表达水平明显高于其对应的癌旁正常组织($P < 0.05$),见图 2b。

2.3 不同临床分期患者头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平比较 对 GEPIA 数据库 519 例不同临床分期患者头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平进行比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

2.4 ESM1 高、低表达头颈鳞癌患者总生存期和无病生存期比较 根据 ESM1 表达的中位数,将 GEPIA 数据库头颈鳞癌组织样本分为 ESM1 高表达组 256 例与

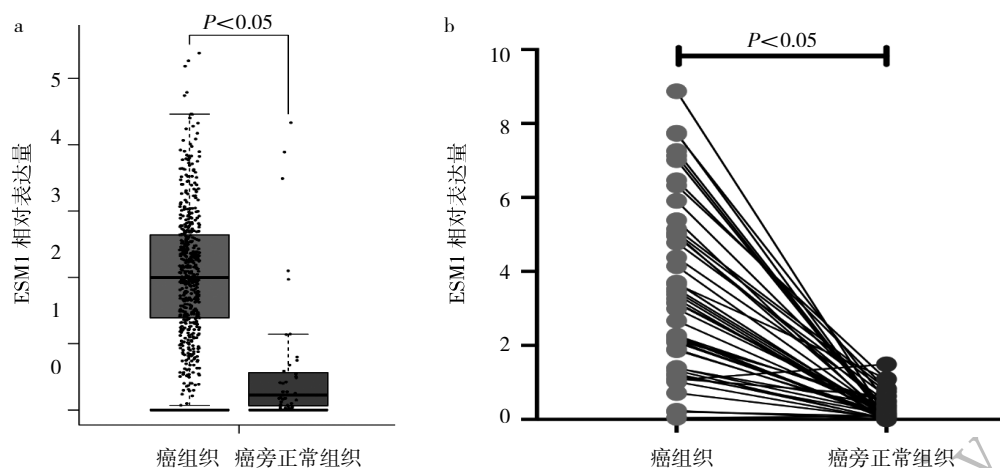


图 2 头颈鳞癌组织与癌旁正常组织 ESM1 表达水平比较

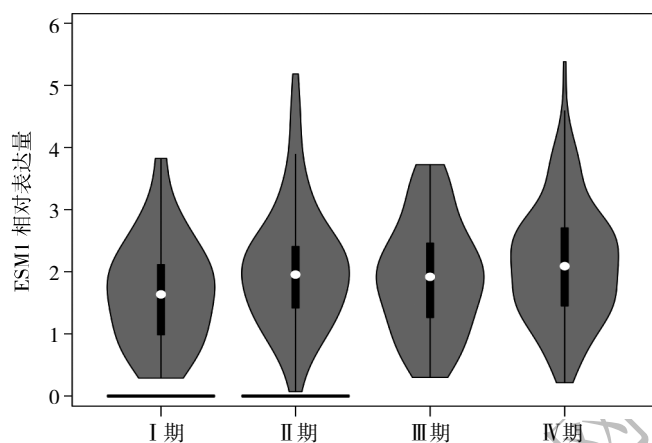


图 3 不同临床分期患者头颈鳞癌组织 ESM1 表达水平比较

ESM1 低表达组 259 例,绘制 ESM1 高、低表达头颈鳞癌患者总生存期及无病生存期的生存曲线,结果发现 ESM1 高表达组无病生存期高于 ESM1 低表达组($P < 0.05$),ESM1 高、低表达组总生存期比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。

2.5 ESM1 高表达在头颈鳞癌中的基因富集分析 在明确 ESM1 与头颈鳞癌预后有关后,进一步分析 ESM1 促进头颈鳞癌发生、发展的可能机制。以 KEGG 参考基因集作为参考基因,对 ESM1 进行 GSEA 分析,结果显示 ESM1 高表达的头颈鳞癌样本主要富集在 MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路等,提示 ESM1 可能通过上述信号通路参与头颈鳞癌的发生、发展,见图 5(插页)。

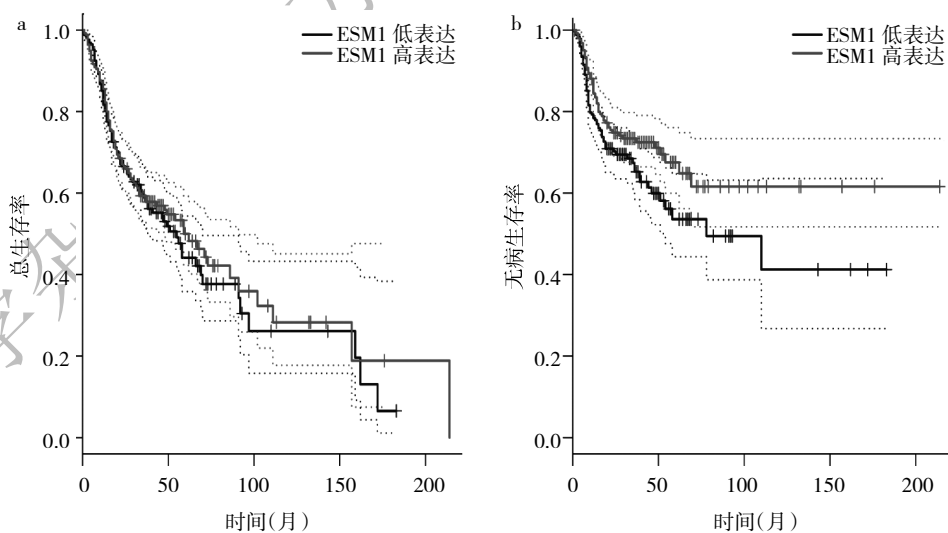


图 4 ESM1 高、低表达头颈鳞癌患者总生存期和无病生存期比较 (a:总生存期;b:无病生存期)

2.6 ESM1 表达检测对头颈鳞癌的诊断效能 49 对头颈鳞癌验证样本中,ESM1 表达检测诊断头颈鳞癌的 AUC 为 0.96,灵敏度为 0.918,特异度为 0.939,见图 6。提示 ESM1 可成为辅助诊断头颈鳞癌的分子标志物。

3 讨论

肿瘤的发生、发展和转移是涉及多步骤、多基因的复杂过程。从基因水平研究肿瘤发生、发展和转移等过

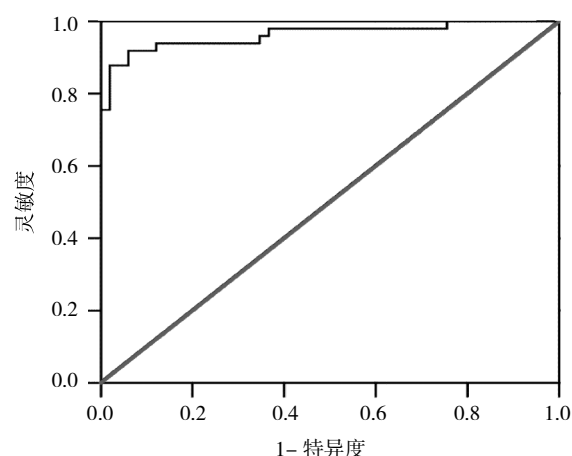


图 6 头颈鳞癌患者 ESM1 表达检测诊断的 ROC 曲线

程中基因谱变化,能为肿瘤早期诊断、治疗方案的确 定及预后判断提供帮助。随着肿瘤分子机制研究的不断深入,目前已证实血管内皮细胞在上述变化过程中发生着功能和结构的变化。血管内皮细胞能被多种由肿瘤细胞分泌的细胞因子激活,形成癌栓;亦可被肿瘤细胞分泌的蛋白溶解酶破坏内皮结构,从而导致肿瘤细胞浸润利于转移;肿瘤细胞侵入继发器官后,肿瘤细胞为持续增殖而刺激周边形成新生血管,最终形成转移灶。因此,对内皮细胞中各组分进行深入研究是了解肿瘤发生、发展和转移机制的重要研究方向。ESM1 是在 1996 年由法国科学家首先从人脐静脉内皮细胞 cDNA 基因库中克隆而来^[11]。它是大小约 50kDa 的可溶性蛋白多糖,其成熟多肽包含 165 个氨基酸,在第 137 位丝氨酸残端共价连接单一硫酸皮肤素链^[11-12]。随后,ESM1 又被证实为硫酸皮肤素蛋白多糖^[13]。它主要在人肺内皮细胞和肾内皮细胞中少量表达,后发现在多种内皮细胞中均有表达^[11,13-14],特别是炎症内皮细胞。因此,ESM1 被认为在心血管、炎症和内皮功能障碍中发挥着作用。一项包含 15 项研究的荟萃分析发现,血浆中 ESM1 表达水平与患者罹患高血压、冠心病等重大心血管疾病的风险密切相关^[15]。此外,ESM1 亦能与白细胞整合素(LFA-1)结合,阻止 LFA-1 与其特异性结合位点细胞间黏附分子-1(ICAM-1)相结合,从而影响炎症部位对淋巴细胞的招募^[16]。

近期研究者们对 ESM1 在人类肿瘤发生、发展过程中的作用进行研究,结果发现在肾癌、乳腺癌、子宫内膜癌、胃及肠癌等多种人类肿瘤中,ESM1 表达水平均明显上调^[17]。亦有研究表明,ESM1 表达是肺癌等多种恶性肿瘤预后不佳的重要分子标志物之一^[18-20]。本文对 ESM1 在头颈鳞癌中的表达及临床意义作一探讨,以期

为头颈鳞癌的临床诊治提供新的方向。本研究通过分析公共数据库中头颈鳞癌全基因组表达数据,获得差异表达基因 2 234 个,其中 ESM1 的表达差异最明显。随后在临床收集的样本中也证实了 ESM1 在头颈鳞癌组织中的表达水平明显高于其对应的癌旁正常组织。同时发现 ESM1 表达检测诊断头颈鳞癌的 AUC 为 0.96,灵敏度为 0.918,特异度为 0.939。故笔者认为 ESM1 表达检测具有简便、灵敏度和特异度均较高的优势,是辅助诊断头颈鳞癌较为理想的指标。利用公共数据库分析发现,不同临床分期的头颈鳞癌患者 ESM1 表达水平比较差异有统计学意义。随后,根据 ESM1 表达的中位数将头颈鳞癌患者分成 ESM1 高、低表达组,绘制生存曲线发现 ESM1 高表达组头颈鳞癌患者无病生存期明显高于低表达组,而两组患者总生存期比较差异无统计学意义。待明确 ESM1 与头颈鳞癌预后有关后,进一步分析 ESM1 促进头颈鳞癌发生、发展的可能机制,结果显示 ESM1 高表达能激活多种肿瘤相关信号通路,如 MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路等。

综上所述,本研究证实头颈鳞癌组织中 ESM1 表达水平明显升高,ESM1 表达可作为头颈鳞癌的潜在分子诊断标志物,且有助于预测头颈鳞癌的预后。

4 参考文献

- [1] Jenckel F, Knecht R. State of the art in the treatment of laryngeal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(11): 4701-4710.
- [2] Lyhne NM, Johansen J, Kristensen CA, et al. Incidence of and survival after glottic squamous cell carcinoma in Denmark from 1971 to 2011—A report from the Danish Head and Neck Cancer Group[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 59:46-56. DOI:10.1016/j.ejca.2016.01.020.
- [3] Roudnicky F, Poyet C, Wild P, et al. Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3):1097-1106. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-1855.
- [4] Bechard D, Gentina T, Delehedde M, et al. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 48341-48349. DOI:10.1074/jbc.M108395200.
- [5] Kang YH, Ji NY, Han SR, et al. ESM-1 regulates cell growth and metastatic process through activation of NF- κ B in colorectal cancer[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(10):1940-1949. DOI:10.1016/j.cellsig.2012.06.004.
- [6] Kang YH, Ji NY, Lee CI, et al. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma[J]. *Amino Acids*, 2011, 40(3):

(下转第 2524 页)