

食管鳞癌与腺癌差异基因表达的对比分析*

齐天伟¹ 张超² 孙学峰¹

(1 深圳市人民医院 广东 深圳 518020 2 深圳北京大学香港科技大学医学中心 广东 深圳 518036)

摘要 目的 研究食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)与食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)的基因差异表达,探讨 ESCC 与 EAC 发生发展的基因学基础。方法 选取 8 例 ESCC 和 8 例 EAC 组织抽提 mRNA,应用 cDNA 芯片技术通过芯片杂交、生物信息学处理,找出两者间差异表达基因。结果 采用 BioStarH-40 芯片发现差异表达基因 541 条,差异表达基因占 13.8%,其中表达增强 309 条(显著增强 73 条),表达降低 232 条(显著降低 61 条)。结论 ESCC 与 EAC 基因表达比较,差异有统计学意义,这些差异可能在两类肿瘤不同的生物学行为中起重要作用。

关键词 食管鳞癌 食管腺癌 基因表达 基因芯片分析

中图分类号 R735.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)17-3293-03

Differences of Gene Expression Profile between Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Esophageal Adenocarcinoma*

QI Tian-wei¹△, ZHANG Chao², SUN Xue-feng¹

(1 Dept. of thoracic surgery, Shenzhen People's Hospital, 518020, Shenzhen, Guangdong, China;

2 Shenzhen PKU-HKUST Medical Center, 518036, Shenzhen, Guangdong, China)

ABSTRACT Objective: To determine the difference in the gene expression between human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and esophageal adenocarcinoma (EAC). **Methods:** cDNA chip was used to detect the mRNA of cancer tissue from 8 ESCCs and 8 EACs. After profile blotted and handled by bioinformation, the gene expression of these two kinds of lesions was examined. **Results:** Using the BioStarH-40 profile, 541 different expression of genes was found. The rate of different genes was 13.8%, of which the expression of 309 genes increased (73 genes significantly increased) and 232 genes decreased (61 genes significantly decreased) in ESCC tissue than that in EAC. **Conclusions:** The gene expression of ESCC and EAC was different, which may contribute to the different biological behavior of these two kinds of esophageal cancer.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Esophageal adenocarcinoma; Gene expression; Gene chip analysis

Chinese Library Classification: R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3293-03

前言

食管癌是常见的恶性肿瘤,发病有一定的区域性。中国是食管癌高发国家,约占全身恶性肿瘤的 1.9%~3.4%左右,其中食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)的发病率占据食管颌面癌的第一、二位^[1-2]。85%以上的食管癌为鳞状细胞癌,即使经过合理的治疗,大概有 1/3 的患者会复发。化疗和放疗难以治愈的食管癌患者复发后生存期预期仅数月,因此迫切需要更有效的治疗方法^[3-4]。

近年来有较快发展的基因治疗对癌细胞具有靶向性,对正常组织几乎没有影响,在理论上可以达到针对性杀伤肿瘤细胞的目的,是肿瘤治疗研究的热点之一^[5-6]。食管癌病灶与口咽部相通,非常适宜应用内窥镜直接注射基因治疗。目前研究的用于治疗食管癌的基因疗法包括添加抑癌基因--基因添加疗法(gene addition therapy)和去除缺陷肿瘤基因--基因去除疗法

(gene excision therapy)等等^[5]。由于多种基因表达异常与食管癌的发生发展密切相关,本研究为全面分析食管鳞癌与食管腺癌的基因学差异,利用基因芯片技术检测 ESCC 与 EAC 差异表达基因,寻找两类肿瘤临床生物学差异,为今后基因治疗的应用提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 食管癌样本和试剂

取深圳市人民医院胸外科术中切除标本 ESCC 及 EAC 各 8 份,标本体积约 1.2~2.5cm³,外科手术中取得后投入液氮,后转移至 -80℃ 冰箱保存。

TRIZOL 试剂(Gibco BRL, United States), Taq 酶(Promega, United States), 反转录酶(MMLV, Promega, United States), dNTP (Promega, United States), BiostarH-40ScDNA 芯片(上海博星), ScanArray4000 标准生物芯片扫描系统(Packard Biochip Technologies), 分析软件 GenePix3.0(Pacard 生物芯片技术公司)。

* 基金项目 深圳市基础研究计划(JC201005260215A)

作者简介 齐天伟(1970),男,医学硕士,主治医师,主要研究方向 胸外科疾病

电话:13528842596, E-mail: qitianweitj@hotmail.com

(收稿日期 2011-05-07 接受日期 2011-05-31)

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 食管癌组织总 RNA 的提取与逆转录 按照 TRIZOL Reagent(Gibco BRL)的使用说明在 ESCC 和 EAC 组织样本中提取总 RNA。按照 MMLV 逆转录酶(Promega) 的说明书操作将所得到的 mRNA 逆转录为 cDNA。逆转录反应体系包含：1μ g 总 RNA 样本、50 nM 特异性逆转录引物、1× RT buffer、0.25 mM dNTPs, 3.33U/μ l MMLV 逆转录酶和 0.25 U/μ l Rnase 抑制剂 逆转录反应条件为 :16℃ 30 min ;42℃ ,30 min ; 85℃ ,5 min。

1.2.2 探针标记与杂交 cy3-dCTP 标记 ESCC 的 cDNA, cy5-dCTP 标记 EAC 的 cDNA,S-200DNA 纯化柱纯化 cDNA。按照基因芯片的使用说明,让芯片 42℃杂交箱内杂交 24 h。洗涤、染色、扫描。

1.2.3 差异基因检测与分析 生物信息学分析 Cy3、Cy5 荧光强度，计算 Cy5/Cy3 值。Cy5/Cy3>2 计为基因表达增高，Cy5/Cy3<0.5 计为基因表达降低 ;Cy5/Cy3>4 计为基因表达显著增高,Cy5/Cy3<0.25 计为基因表达显著降低。对差异表达基因进行网上查询,且进行基因功能分类。

2 结果

2.1 总 RNA 抽提质量

1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 带,如图 1 所示,28S、18S、5S 条带清晰 紫外分光光度计检测 A260/A280=1.8~2.0。表明 RNA 质量较好,纯度较高。

2.2 芯片杂交

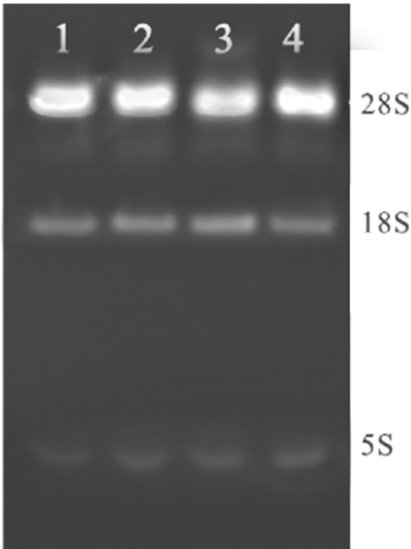


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测抽提所得的总 RNA (第 1、2 道 ESCC 样本；第 3、4 道 EAC 样本)

Fig. 1 Total RNA detection using agarose gel electrophoresis (Lane1, 2: ESCC samples; Lane3, 4: EAC samples)

ESCC/EAC 差异表达基因名称及数量如表 1 所示。8 张芯片差异表达基因为 351~832 条。在 3900 基因中筛选出差异常表达基因最小数目的匹配组中 (342 条), 差异基因占 8.8% ;表达增加基因 188 个,占 55.0% (显著增强 45 个,占总差异基因的 13.2%) ;表达降低 154 个,占 45.0% (显著降低 39 个,占总差异基因的 11.4%) 。

表 1 芯片检测 ESCC 及 EAC 后表达差异基因类别名称及数量
Table 1 Chip detection of gene expression profile differences between ESCC and EAC

Gene classification	Cy5/Cy3				Increases	Decreases
	<0.25	0.25~ 0.5	2~4	>4		
Oncogene and anti-oncogene	7	31	15	6	38	21
Ion channel and transporting protein	0	3	2	0	3	0
Cell cycle proteins	4	9	9	3	13	12
Stress response protein	0	2	3	0	2	3
Cytoskeleton and mobile protein	8	21	13	6	29	19
Cell apoptosis-related genes	3	14	16	7	17	23
DNA synthesis and repair gene	2	16	12	2	18	14
DNA binding proteins	7	14	17	8	21	25
Cell surface receptors	2	17	14	2	19	16
Immune-related	9	24	17	4	33	21
Cell signalling molecules	13	34	28	9	47	37
Metabolism-related	8	20	8	6	28	14
Protein synthesis and translation	2	7	3	1	9	4
Development-related genes	1	4	4	0	5	4
Other genes	7	20	10	7	27	17
Total	73	236	171	61	309	232

3 讨论

食管腺癌和食管鳞癌作为国内发病率最高的两种食管肿瘤,常存在手术治疗后复发率高、有淋巴结转移后五年生存率低等问题^[7-8]。针对食管腺癌和食管鳞癌和普通治疗存在诸多缺陷,因此基因治疗方法具有非常广阔的应用前景。不同病理类型的食管癌基因表达谱必然存在差异^[9-10],采用微阵列方法研究不同组织来源食管肿瘤基因表达的差异将为针对食管肿瘤的基因治疗提供必要的实验依据^[11-12]。

为高通量地进行各类食管癌基因表达差异分析,增加检测的特异性和有效性,本研究使用 cDNA 表达谱芯片对 ESCC 及 EAC 检测,通过对两者基因表达差异分析,寻找相关差异表达基因。在 3900 条基因中筛选出相关的差异表达基因 541 条,其中表达显著基因有 134 条(显著上调 73 条,显著下调 61 条)。这些基因的功能涉及细胞生命各方面。记过分析后的基因差异列表显示,数百个基因参与了 ESCC 和 EAC 癌变过程及其调节,表达上调和下调的基因相互作用,共同协调功能未详的基因也参与了这一进程。而差异表达显著的基因(Cy5/Cy3<0.25 或 >4)可能在调控 ESCC 与 EAC 的不同临床生物学行为方面起主导作用。如 SLP-2 (stomatin-like protein-2,又名 STOML2) 基因,定位于 9p13.1,编码的 stomatin (EPB72)-like 2 蛋白,又称 SLP-2 蛋白,是一种葡萄糖转运载体。有文献报道该蛋白与恶性肿瘤远处转移和预后有相关性^[13-14]。SLC2A3 基因在 ESCC 与 EAC 的差异表达极其显著(达 9 倍),说明其在两者中功能活跃,而且在 ESCC 中更为明显,但其机制有待深入研究。PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 基因定位于 20pter-p12,编码的 PCNA 蛋白主要在核内表达,可以与 DNA 聚合酶 delta 协同作用。在恶性肿瘤发生过程中,PCNA 可以与 VEGF 或 Ki67 协同作用影响肿瘤细胞的增殖和血管生成过程^[15-16]。本研究表明,PCNA 基因在 ESCC 中较 EAC 显著减弱。由此推测,从 PCNA 层面观察^[17-18],ESCC 的分化程度及生物学行为整体上较 EAC 好,预后相对较好。

总体来说,运用高通量的基因芯片技术可以一次性得到较多的基因表达差异结果,为寻找基因靶向治疗靶点提供了大量的信息和依据。然而差异基因的表达还要通过其他方法如免疫组化和免疫印迹等方法进行检测以确定^[19-20],差异基因的功能也有待进一步研究以寻找合适的基因治疗靶向位点。

参考文献(References)

- [1] Shahbaz Sarwar CM, Luketich JD, Landreneau RJ, Abbas G. Esophageal cancer: an update[J]. Int J Surg, 2010, 8: 417-22
- [2] Vakili N, Affi A. Esophageal cancer [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2002,18: 486-9
- [3] Dubecz A, Molena D, Peters JH. Modern surgery for esophageal cancer [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2008,37: 965-87
- [4] Liu W, Zhang X, Sun W. Developments in treatment of esophageal/gastric cancer [J]. Curr Treat Options Oncol, 2008,9:

375-87

- [5] Shimada H, Matsushita K, Tagawa M. Recent advances in esophageal cancer gene therapy[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2008,14: 3-8.
- [6] Shimada H, Ochiai T. [Gene therapy for esophageal cancer] [J]. Nippon Rinsho, 2005,63 Suppl 12: 517-21
- [7] Gonzalez Ortiz DI, Toro DH. Esophageal cancer subtypes and survival rates at the VA Caribbean Healthcare System: a 10-year experience [J]. Bol Asoc Med P R, 2009,101: 14-7.
- [8] D'Amico TA. Outcomes after surgery for esophageal cancer [J]. Gastrointest Cancer Res, 2007,1: 188-96
- [9] Wang HT, Kong JP, Ding F et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 392-8
- [10] Maher SG, Gillham CM, Duggan SP et al. Gene expression analysis of diagnostic biopsies predicts pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy of esophageal cancer [J]. Ann Surg, 2009, 250: 729-37
- [11] Shimada Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G, Tsukada K. cDNA microarray analysis of esophageal cancer: discoveries and prospects[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 57: 347-56
- [12] Daigo Y, Nakamura Y. From cancer genomics to thoracic oncology: discovery of new biomarkers and therapeutic targets for lung and esophageal carcinoma [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 56: 43-53
- [13] Cao W, Zhang B, Liu Y, et al. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128: 430-6
- [14] Chang D, Ma K, Gong M, et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma[J]. Biomarkers, 2010, 15: 104-10
- [15] Stroeescu C, Dragnea A, Ivanov B, et al. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2008, 17: 411-7
- [16] Dirim A, Haberal AN, Goren MR, et al. VEGF, COX-2, and PCNA expression in renal cell carcinoma subtypes and their prognostic value [J]. Int Urol Nephrol, 2008, 40: 861-8
- [17] Dabrowski A, Szumilo J, Braterski G et al. Proliferating nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor of squamous cell carcinoma of the oesophagus [J]. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med, 2001, 56: 59-67
- [18] Cheng J, Li C, Shen Z. [Correlation study of spontaneous apoptosis, PCNA, and p53 in esophageal squamous-cell carcinoma] [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 1998, 20: 415-7
- [19] Itoh F, Yamamoto H, Imai K. [Clinical application of DNA array system in human gastrointestinal cancer] [J]. Hokkaido Igaku Zasshi, 2002, 77: 143-4
- [20] Mohr S, Leikauf GD, Keith G et al. Microarrays as cancer keys: an array of possibilities[J]. J Clin Oncol, 2002, 20: 3165-75