

颊粘膜癌与舌癌差异基因表达的对比分析*

陈 双¹ 甘冠华² 楚凤婷³ 冯齐平³(1 上海市田林街道社区卫生服务中心口腔科 上海 200233 2 浙江省嘉善县魏塘甘冠华口腔诊所 浙江 嘉善 314100 ;
3 上海市第九人民医院口腔正畸科 上海 200011)

摘要 目的:研究颊粘膜癌(Buccal Mucosa Cancer, BMC)与舌癌(Tongue Cancer, TC)的基因差异表达,探讨 BMC 与 TC 发生发展的基因学基础。方法:应用 cDNA 芯片技术对 5 例 BMC 和 5 例 TC 组织 mRNA 检测,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:BioStarH-40 芯片发现差异表达基因 503 条,差异表达基因占 12.9%,其中表达增强 274 条(显著增强 69 条),表达降低 229 条(显著降低 54 条)。结论:MBC 与 TC 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 颊粘膜癌;舌癌;基因表达

中图分类号:R739.85 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)16-3144-03

Differences of Gene Expression Profile between Buccal Mucosa Cancer and Tongue Cancer*

CHEN Shuang¹, GAN Guan-hua², CHU Feng-ting³, FENG Qi-ping³

(1 Dept. of Oral Health, Community medical service centre of Tianlin Rd. District 200233, Shanghai, China;

2 Guanhua Dental Clinic, 314112, Jiashan, Zhejiang China;

3 Dept. of Orthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Jiaotong University, 200011, Shanghai, China)

ABSTRACT Objective: To determine the difference in the gene expression between human buccal mucosa cancer (BMC) and tongue cancer (TC). **Methods:** cDNA chip was used to detect the mRNA of cancer tissue from 5 BMCs and 5 TCs. After profile blotted and handled by bioinformation, the gene expression of these two kinds of lesions was examined. **Results:** Using the BioStarH-40 profile, 503 different expression of genes were found. The rate of different genes was 12.9%, of which the expression of 274 genes increased (69 genes significantly increased) and 229 genes decreased (54 genes significantly decreased) in BMC tissue than that in TC. **Conclusions:** The gene expression of BMC and TC was different, which may contribute to the different biological behavior of these two kinds of lesions.

Key words: Buccal mucosa cancer; Tongue cancer; Gene expression

Chinese Library Classification: R739.85 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)16-3144-03

前言

近年来我国口腔肿瘤发病率持续上升,已占全身恶性肿瘤的 1.9~3.5%,占头颈部恶性肿瘤的 4.7~20.3%,其中舌癌和颊粘膜癌的发病率占据口腔颌面癌的第一、二位^[1]。95%的舌癌和颊粘膜癌为鳞状细胞癌,即使经过合理的治疗,大概有 1/3 的患者会复发^[2]。化疗和放疗难以治愈的口腔肿瘤患者复发后生存期预期仅数月^[3],因此迫切需要更有效的治疗方法。

近年来提出的基因治疗对癌细胞具有潜在的靶向性而对正常组织没有影响,理论上可以达到治愈肿瘤的目的,是肿瘤治疗研究的热点之一^[4,5]。口腔癌大多数原发和复发病灶表浅,非常适宜局部直接注射基因治疗。目前研究的用于治疗口腔癌的方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^[4]。由于多种基因表达异常与口腔肿瘤的发生发

展密切相关,本研究为全面分析颊粘膜癌与舌癌的基因学差异,利用基因芯片技术检测 BMC 与 TC 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 肿瘤样本和试剂

取上海第九人民医院口腔颌面外科手术标本 BMC 及 TC 各 5 份,标本体积约 1-2cm³,外科手术中取得后投入液氮,后转移至 -86℃ 冰箱保存。

TRIZOL 试剂(Gibco BRL,美国),Taq 酶(Promega,美国),反转录酶(MMLV, Promega, 美国),dNTP (Promega, 美国),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(Packard 生物芯片技术公司)。

* 基金项目 2010 年上海基础研究计划(10ZR1432199)

作者简介 陈双(1974-),女,口腔医学学士,主治医师,主要研究方向:口腔疾病

电话:021-64750588-8155 E-mail: jennychensh@sina.com

(收稿日期:2011-10-23 接受日期:2011-11-17)

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 肿瘤组织总 RNA 的提取与逆转录 按照 TRIZOL Reagent(Gibco BRL)的使用说明在癌组织样本中提取总 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 :1μg 总 RNA 样本、50 nM 特异性逆转录引物、1× RT buffer、0.25 mM dNTPs, 3.33 U/μl MMLV 逆转录酶和 0.25 U/μl 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 BMC 的 cDNA , cy5-dCTP 标记 TC 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

差异表达基因名称及数量见表 1。5 张芯片差异表达基

因为 343~802 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(343 条) ,差异基因占 9.5% ;表达增加基因 191 个 ,占 55.7%(显著增强 48 个 ,占总差异基因的 15.1%) ,表达降低 152 个 ,占 46.1%。

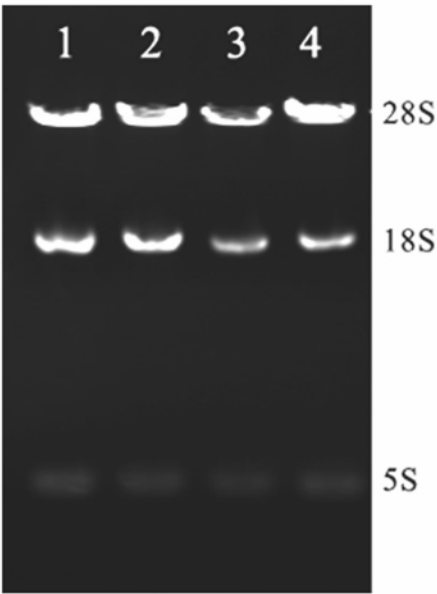


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测抽提所得的总 RNA(第 1、2 道 :BMC 样本 ;第 3、4 道 :TC 样本)

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

表 1 芯片检测 BMC 及 TC 后表达差异基因类别名称及数量

Table 1 Chip detection of gene expression profile differences between BMC and TC

Gene classification	Cy5/Cy3				Decreases	Increases
	<0.25	0.25~ 0.5	2~4	>4		
Oncogene and anti-oncogene	8	25	18	7	33	25
Ion channel and transporting protein	0	2	1	0	2	1
Cell cycle proteins	3	8	14	5	11	19
Stress response protein	0	3	1	0	3	1
Cytoskeleton and mobile protein	7	17	14	5	24	19
Cell apoptosis-related genes	3	12	13	4	15	17
DNA synthesis and repair gene	3	11	14	0	14	14
DNA binding proteins	6	20	17	8	26	25
Cell surface receptors	1	8	9	2	9	11
Immune-related	9	25	18	4	34	22
Cell signalling molecules	13	31	22	10	44	32
Metabolism-related	8	22	16	4	30	20
Protein synthesis and translation	2	5	0	1	7	1
Development-related genes	1	2	3	0	3	3
Other genes	5	14	15	4	19	19
Total	69	205	175	54	274	229

3 讨论

舌癌和颊粘膜癌作为国内发病率最高的两种口腔肿瘤,都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^[6,7]。针对舌癌和颊粘膜癌的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^[5]。不同类型的肿瘤基因表达谱存在很多差异,采用微阵列方法研究不同组织来源口腔肿瘤基因表达的差异将为针对口腔肿瘤的基因治疗提供必要的实验依据^[8]。

口腔肿瘤组织来源和病理类型差异较大,为更深入地进行各类口腔肿瘤基因差异分析的研究以增强基因治疗的特异性和有效性,本研究利用高通量 cDNA 表达谱芯片对 BMC 及 TC 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 503 条,其中表达显著基因有 123 条(显著上调 69 条,显著下调 54 条)。这些基因的功能涉及细胞生命各方面。基因列表显示,数百个基因参与了 BMC 和 TC 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 BMC 与 TC 的不同临床生物学行为方面起主导作用。如 SLC2A3 (solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3) 基因,定位于 12p13.3,长 202910,编码的 SLC2A3 蛋白,又称 GLUT3 蛋白,是一种葡萄糖转运载体。有文献报道该蛋白与口腔肿瘤预后具有相关性^[9,10]。SLC2A3 基因在 BMC 与 TC 的差异表达极其显著(达 12 倍),说明其在两者中功能活跃,而且在 BMC 中更为明显,但其机制有待深入研究。

Fos 为转录因子类原癌基因,它在细胞生长静止期基本不表达,在人乳腺癌、结肠癌、胃癌和鼠肝癌及癌前病变中过度表达^[11-13]。口咽部鳞癌 c-fos 表达较弱,γ-fos 在正常口腔黏膜不表达,口腔鳞癌及癌旁黏膜表达较强,该基因与癌分化程度有关,并可作为口腔黏膜早期癌变和口腔鳞癌的生物标记物^[14-16]。本研究显示,γ-fos 基因在 BMC 中较 TC 显著减弱。由此推测,从 c-fos 层面观察, BMC 的分化程度及生物学行为整体上较 TC 好。另外 32 条基因功能不明,在两者间起何种作用有待深入研究。BMC 和 TC 基因表达差异明显,这些差异可能是两者间临床生物学行为差异的基因学基础。差异基因的功能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] 黄洪章. 重视防治口腔癌[J]. 老年健康, 2005, 11: 9-10

Huang HZ. Attach importance to prevention and therapy of oral cancer [J]. Health of Elders, 2005, 11: 9-10

- [2] Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, et al. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Head Neck, 2000, 22:34-41
- [3] Rennemo E, Zatterstrom U, Boysen M. Outcome of local failures after oral cancer - recurrence vs. second primary [J]. J Oral Pathol Med, 2010, Epub before print
- [4] Mucke T, Wagenpfeil S, Kesting MR, et al. Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer[J]. Oral Oncol, 2009, 45(8): 687-691
- [5] Ayllon Barbellido S, Campo Trapero J, Cano Sanchez J, et al. Gene therapy in the management of oral cancer: review of the literature[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008, 13(1):E15-21
- [6] Ladeinde AL, Ogunlewe MO, Adeyemo WL, et al. Gene therapy in the management of oral cancer: a review of recent developments[J]. Niger Postgrad Med J, 2005, 12(1):18-22
- [7] Jerjes W, Upile T, Petrie A, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients[J]. Head Neck Oncol, 2010, 2:9
- [8] Kirsch C. Oral cavity cancer [J]. Top Magn Reson Imaging, 2007, 18 (4):269-280
- [9] Kuo WP, Whipple ME, Sonis ST, et al. Gene expression profiling by DNA microarrays and its application to dental research[J]. Oral Oncol, 2002, 38(7):650-656
- [10] Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC, et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. Molecules, 2010, 15(4):2374-2387
- [11] Estilo CL, P Oc, Talbot S, et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis[J]. BMC Cancer, 2009, 9:11
- [12] Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(16):2449-2461
- [13] Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation [J]. Histol Histopathol, 2000, 15 (3): 921-928
- [14] Van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun: ATF dimers in oncogenesis[J]. Oncogene, 2001, 20 (19):2453-2464
- [15] Mishra A, Bharti AC, Saluja D, et al. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 126(4):819-829
- [16] Sachdev R, Mandal AK, Singh I, et al. Progressive rise of c-fos expression from premalignant to malignant lesions of oral cavity [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008, 13 (11):E683-686
- [17] Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhaes MH, et al. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions [J]. J Oral Sci, 2005, 47 (2):71-76