

• 论 著 •

散发和具家族史食管鳞状细胞癌患者癌及癌旁组织表达相同差异基因*

姜玉章

(南京医科大学附属淮安市第一人民医院检验科 223300)

摘要:目的 探讨散发和具家族史食管鳞癌患者癌组织相同差异基因表达谱。方法 分别将散发食管鳞癌组(I组)和具家族史食管鳞癌组(II组)癌及癌旁组织对应等量混合,抽提 RNA 合成相应 cDNA,以 Cy5 和 Cy3 标志为探针,在 BiostarH-140s 上杂交分析。结果 I 组和 II 组的差异基因分别为 1 855 个和 613 个。两组表达相同差异基因 60 个(含表达序列标签 30 个)。30 个基因中仅 4 个已有报道与食管癌相关。结论 基因芯片法可高通量筛选食管鳞癌组织中异常表达的基因谱。

关键词:食管肿瘤; 基因表达谱; 寡核苷酸序列分析; 家族史

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0154-02

Same Gene in Expression Profiles of Both Squamous Esophageal Cancer Tissues and Adjacent Normal Tissues Related to With and Without Family History

Jiang Yuzhang

(Department of Medical Laboratory, the Affiliated Huai'an First Hospital of NJMU, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To investigate the same in gene expression profiles of both squamous esophageal cancer carcinoma(ESCC) and their adjacent almost normal tissues related to both with and without family history. **Methods** The cDNA retro-transcribed from mRNA from both 3 cases(I group)and 6 cases(II group), which consisted of equal quantity of both squamous esophageal cancer tissues and adjacent almost normal tissues related to both with and without family history, respectively, were labeled with Cy5 and Cy3 fluorescence as a probes. The mixed probes were hybridized with a piece of Biostar H-140s single dot human whole gene chip. **Results** There were 1 855 genes in I group and 613 genes in the II group respectively, which were up regulation or down regulation. Furthermore, of 60 genes whose Cy5/Cy3 ratios were simultaneous express abnormal in both I and II group, in addition to 30 ESTs, 30 genes were in GenBank, which included 26 genes that had not reported relating to squamous esophageal cancer except 4 genes. **Conclusion** Microarray may play important roles in explore the same change of both ESCC and their adjacent almost normal tissues related to both with and without family history.

Key words: esophageal neoplasms; gene expression profiling; digonucleotide sequence analysis; family history

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是常见恶性肿瘤之一, 5 年生存率仅为 14%^[1]。江苏省淮安市楚州区是本省乃至全国 EC 高发区之一,且绝大多数为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。基因芯片法是研究肿瘤发病机制的方法之一^[2],对 EC 基因表达谱的研究已有报道^[3-4],但未见对散发和具家族史 ESCC 患者癌及癌旁组织基因表达谱的研究报道。笔者运用上海联合基因公司 14 000 点人类基因组芯片(BiostarH-140s)对该课题进行了探索性研究,结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 3 例散发 ESCC 患者癌及癌旁组织(I 组)和 6 例具家族史 ESCC 患者癌及癌旁组织(II 组)来源于 2003 年 1 月至 2003 年 6 月本院及中国人民解放军第 82 医院和泗阳县人民医院肿瘤外科,患者术前均未接受放疗或化疗;癌组织为中分化或高分化鳞癌,癌旁组织为正常鳞状上皮(无癌细胞浸润);细胞株 Eca109 由本室保存。

1.2 取材及组织处理 见文献[3]。

1.3 基因芯片制备 见文献[3]。

1.4 总 RNA 提取、预杂交、标记探针、杂交、鉴定 见文献[3]。

1.5 I 组和 II 组患者表达相同肿瘤基因分析 应用 Office

2003 Access 软件分析两组患者癌及癌旁组织差异表达基因谱中的相同基因,以 Ratio>2.5 或 Ratio<0.25 为标准对基因进行筛选。

1.6 芯片结果有效性分析 以 3 例 ESCC 癌组织和 EC 细胞株(Eca109)为研究对象,采用 RT-PCR 验证 UBE2C 基因。上游引物:5'-TGA TGT CTG GCG ATA AAG GGA-3';下游引物:3'-AGC GAG AGC TTA TAC CTC AGG-5'。反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。

2 结果

2.1 I 组患者癌及癌旁组织基因表达谱 差异表达基因检出率为 13.1%(1 855/14 112),其中未分类新基因 844 个(下调基因 378 个,上调基因 466 个),已知功能基因 1 011 个(下调基因 560 个,上调基因 451 个)。

2.2 II 组患者癌及癌旁组织基因表达谱 差异表达基因检出率为 4.3%(613/14 112),其中未分类新基因 252 个(下调基因 127 个,上调基因 125 个),已知功能基因 361 个(下调基因 182 个,上调基因 179 个)。

2.3 I 组与 II 组患者癌及癌旁组织差异基因表达谱比较结果 见表 1。

2.4 I 组与 II 组患者表达相同差异基因分析 两组间共检出

* 基金项目:南京医科大学科技发展基金资助(NJ01-23)。

60 个表达相同的差异基因,结果见表 2。

2.5 基因芯片结果有效性分析 经 RT-PCR 验证,基因芯片结果符合预期。

表 1 I 组与 II 组患者癌及癌旁组织差异基因表达谱比较 (n)

基因分类	I 组		II 组	
	上调	下调	上调	下调
原癌基因和抑癌基因	8	20	5	6
离子通道和运输蛋白	5	19	5	2
细胞周期蛋白	7	14	8	3
外压反应蛋白	1	2	1	2
细胞骨架和运动蛋白	15	30	9	15
细胞凋亡相关的蛋白	2	5	1	1
DNA 合成和修复、重组蛋白	8	10	2	3
DNA 结合、转录和转录因子	17	32	14	7
细胞受体	4	14	8	4
免疫相关蛋白	8	39	12	13
细胞信号和传递蛋白	29	79	27	19
代谢相关蛋白	23	97	26	13
蛋白合成相关基因	10	58	11	22
发育相关基因	6	14	5	5
其他	160	160	51	42
未明功能基因 [△]	280	87	41	47
重复计数基因 [☆]	43	120	47	22
合计 [*]	451	560	179	182
新基因 ^{**}	466	378	125	127

注:△为已有 Genbank 登录号,但无明确功能分类;☆一个基因因有多种功能造成重复计数;*合计=(有明确功能分类的基因数+未明功能基因数)-重复计数基因数;**表达序列标签(EST)。

表 2 I 组与 II 组患者表达相同肿瘤基因分析^{}**

GENBANK 登录号	Ratio
NM_000518	0.067
NM_002274	0.08
NM_002047	0.084
NM_007244	0.086
NM_001423▲	0.097
NM_006198	0.102
NM_032330	0.155
NM_004684	0.162
NM_006763	0.179
NM_003186	0.186
NM_001449	0.205
NM_001823	0.205
NM_000600	0.221
AB037797	0.239
NM_006096	2.803
NM_005611▲	2.934
NM_021238	2.966
NM_005500	3.217
NM_019091	3.218
NM_006350	3.219
NM_003118	3.473
NM_004181	3.504
NM_002638	3.565
NM_007019▲	4.390
NM_000089	4.720

续表 2 I 组与 II 组患者表达相同肿瘤基因分析^{}**

GENBANK 登录号	Ratio
NM_018043	5.354
NM_030949	5.609
NM_020221	6.209
AL359590	6.407
NM_000582▲	42.615

注:**不包含另 30 个 EST;▲已确认与 EC 相关的基因[按表中顺序依次为泛素耦联酶 E2C (ubiquitin-conjugating enzyme E2C, UBE2C)、分泌磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 即骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、视网膜母细胞瘤样蛋白 2 (retinoblastoma-like 2, RBL2/P130)、上皮细胞膜蛋白-1 (epithelial membrane protein 1, EMP-1)]。

3 讨 论

EC 发病存在家族聚集现象^[5],且肿瘤具有异质性,故本研究分别将散发或具家族史 ESCC 患者癌及癌旁组织等量分别混合后提取总 RNA,进行基因芯片分析。ESCC 癌组织异常表达基因和 microRNAs 研究偶有报道^[6-7]。本研究利用 Office 2003 Access 软件,从 I 组与 II 组患者癌及癌旁组织基因表达谱中筛选出 60 个相同的差异基因(见表 2)。在 30 个具 Genebank 登录号的基因中,只有 EMP-1、OPN、UBE2C 和 RBL2/P130 已证实与 EC 相关。

EMP-1 在 ESCC 组织中表达下降,与其在 EC 和正常食管黏膜上皮的表达水平相差 6 倍^[8]。OPN 在 ESCC 组织中表达升高,且 Ito 等^[9]的研究发现 ESCC 患者癌组织中不仅表达 OPN,且其高表达与 ESCC 患者预后不良相关,抑制 OPN 的表达有利于控制肿瘤细胞的浸润和转移。另有研究表明,ESCC 患者低表达核心蛋白聚糖,而高表达 OPN,建议综合应用核心蛋白聚糖、OPN 及个体生活习惯(是否吸烟、饮酒及吃槟榔或槟榔子等)为 ESCC 诊断指标^[10]。UBE2C 在 ESCC 组织中高表达,且与细胞增殖和肿瘤发生密切相关。在 Barrett's 食管向食管腺癌进展的过程中,73% (11/15) 的患者存在 UBE2C 表达水平的增高;通过抑制 UBE2C 的表达,可明显抑制 Seg-1 细胞株的增殖^[11]。在 U251 细胞株中,UBE2C/UbcH10 的表达水平也明显增高,抑制 UBE2C/UbcH10 的表达可明显抑制细胞生长,并可通过上调 BAX、P53,下调 Bcl-2 和将细胞阻遏于 G2/M 期诱导细胞凋亡^[12]。RBL2/P130 在 ESCC 组织中高表达。Bergqvist 等^[13]的研究发现,在 P53 突变的 Kyse 系列人类 EC 细胞株中端粒酶活性呈宽度分布,其活性与细胞恶性程度正相关,而 N-肉豆蔻酰基转移酶 2、核糖体 L3 蛋白、RBL2/P130 和周期蛋白 G2 与端粒酶活性正相关,仅锌指蛋白 207 与端粒酶活性负相关。

基因芯片技术具有高通量的特点,可同时分析上万个基因的表达情况,可为相关蛋白和 microRNAs 的研究提供信息^[14-15]。本研究应用基因芯片技术共发现 60 个散发和具家族史 ESCC 患者癌组织共同表达的差异基因,除 30 个 EST 外,尚有 26 个基因未见相关报道,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] Guo W, Jiang YG. Current gene expression studies in esophageal carcinoma[J]. Curr Genomics, 2009, 10(8): 534-539
 [2] 李梅. 阵列比较基因组杂交技术在肿瘤研究中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 979-981
 [3] 姜玉章, 熊化生, 郭伟, 等. 食管鳞癌家族史患者(下转第 158 页)

首先,应用 EP10-A2 对配套和自建检测系统进行初步性能评价,结果表明配套和自建检测系统的总不精密度均小于美国临床实验室改进法案修正案 (CLIA'88) 能力验证计划的分析质量要求规定的总允许误差的 1/3^[5]。

在此基础之上,按 EP9-A2 文件要求进行比对试验。自建系统检测 AST、Urea、Cr、TCH、TG 在医学决定水平处的 EA 小于 BC95%CI 下限,偏差不可接受。经新鲜血清赋值传递后 EA 均在 BC95%CI 内或大于上限,偏差可以接受。校准前后的数据表明,经新鲜血清赋值传递后的自建系统检测结果与配套系统的可比性明显提高,实现了一致性。

EP9-A2 文件通过计算给定的医学决定水平处的 BC95%CI,以判断其与 EA 的关系,能够以更严密的统计理论作出科学的结论^[6]。以生物变异的倚倚限度判断偏差的可接受性取代了以 CLIA'88 分析质量要求规定的总允许误差的 1/2 或 1/3 为判断标准的方法^[7],充分考虑了检测系统的能力、成本和效率。

为确保控制品的长期有效性,常规作法是一次性购买足够量控制品用于自建检测系统的校准。本研究以新鲜血清对非自建系统的控制品进行重新赋值,从而达到不同系统结果一致的目的。此时,无论校准品还是质控品,其原有的赋值已没有意义。只要新赋值具有长期可靠、稳定的特性,就可作为自建系统的校准品。以控制品作为正确度传递的工具,要求瓶间差小、性能稳定。新鲜血清由于排除了基质效应,是最佳的临时校准品。两者结合应用既克服了基质效应,又具有良好稳定性。校准品是完成样品检测的一个组分,在具有良好性能的检测系统中,校准品的校准值对检测结果的量值起着重要作用^[8]。罗氏 c. f. a. s 校准物是目前国际公认的性能稳定的具有溯源性的定值校准物,但因自建系统使用的是非配套仪器和试剂,其检测结果与原校准值间存在一定的差异,试验表明新

鲜血清赋值传递可将这种差异减小。

综上所述,应用 EP9-A2 评估偏差的可接受性,采用方法学比对,通过新鲜血清赋值传递、校准、验证,可使不同检测系统的结果具有一致性。

参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method Comparison and Bias Estimation Using Patients Samples; Approved Guideline, EP09-A2[S]. Ann Arbor; Thomson Reuters, 2002.
 - [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline, EP10-A2[S]. Ann Arbor; Thomson Reuters, 2002.
 - [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:79-80.
 - [4] 孙虹,台虹,赵崇吉. 不同生化分析系统间检测结果的偏差评估及应用[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(10):587-590.
 - [5] 孙宏华,石凌波,康红,等. 应用 NCCLS EP10-A2 分别对自建和配套生化检测系统进行初步性能评价[J]. 热带医学杂志,2009,9(8):961-962.
 - [6] 杨剑虹,倪红兵. 不同检测系统常用血清酶测定结果对比及倚倚评估[J]. 检验医学与临床,2008,5(22):1366-1368.
 - [7] 张秀明,庄俊华,徐宁,等. 不同检测系统血清酶测定结果的倚倚评估与可比性研究[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(4):346-348.
 - [8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2007:33-35.
- (收稿日期:2010-07-01)
-
- (上接第 155 页)
- 癌及癌旁组织基因表达谱的初步研究[J]. 放射免疫杂志,2007,20(3):282-284.
- [4] Zhang X, Lin P, Zhu ZH, et al. Expression profiles of early esophageal squamous cell carcinoma by cDNA microarray[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2009, 194(1): 23-29.
 - [5] Ilhan M, Erbaydar T, Akdeniz N, et al. Palmoplantar keratoderma is associated with esophagus squamous cell cancer in Van region of Turkey: a case control study[J]. BMC Cancer, 2005, 28(5): 90-97.
 - [6] Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JH, et al. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry[J/OL]. <http://www.biomed-central.com/1471-2407/916>.
 - [7] Matsushima K, Isomoto H, Kohno S, Nakao K. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma[J]. Digestion, 2010, 82(3): 138-144.
 - [8] 王海涛,刘芝华,王秀琴,等. EMP-1 基因对人食管癌细胞系生长的影响[J]. 癌症,2002,21(3):229-232.
 - [9] Ito T, Hashimoto Y, Tanaka E, et al. An inducible short-hairpin RNA vector against osteopontin reduces metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1308-1316.
 - [10] Wu IC, Wu DC, Huang CC, et al. Plasma decorin predicts the presence of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2010, 127(9): 2138-2146.
 - [11] Jules L, Raouf DA, Wang Z, et al. Expression and Effect of Inhibition of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2C on Esophageal Adenocarcinoma[J]. Neoplasia, 2006, 8(12): 1062-1071.
 - [12] Jiang L, Bao Y, Luo C, et al. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(2): 211-217.
 - [13] Bergqvist M, Brattstrom D, Brodin D, et al. Genes associated with telomerase activity levels in esophageal carcinoma cell lines[J]. Dis Esophagus, 2006, 19(1): 20-23.
 - [14] Li Y, Ma J, Guo Q, Duan F, et al. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dis Esophagus, 2009, 22(8): 664-667.
 - [15] Xie JJ, Xu LY, Wu JY, et al. Involvement of CYR61 and CTGF in the fascin-mediated proliferation and invasiveness of esophageal squamous cell carcinomas cells[J]. Am J Pathol, 2010, 176(2): 939-951.
- (收稿日期:2010-05-04)