论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1974-03

比较基因组杂交芯片筛选头颈部鳞状细胞癌患者转移相关的差异表达基因

李雅冬[1],A Gowhere[2],洪苏玲[3] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:颌面外科[1],耳鼻喉头颈外科[3];Strasbourg,France,Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss,3 rue Porte de l'Hopital [2])

[摘要] **目的** 检测头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma,HNSCC)标本,寻找与HNSCC转移有高度相关性的基因。**方法** 采用比较基因组杂交芯片技术,分别检测80例临床HNSCC标本,包括舌癌17例,口腔癌13例,口咽癌14例,下咽癌36例。**结果** 比较基因组杂交CGH检测结果示同未发生转移的HNSCC组织标本相比,发生转移的HNSCC组织标本内,基因扩增有显著性差异的位置有1q、4q、7q、11q、Xq,基因缺失有显著性差异的位置有5p、8p、9p、11q、13q、17p。Cox单因素分析发现这些差异基因主要涉及到转录调控和信号传导等功能分类。**结论** HNSCC标本中存在与HNSCC转移相关的扩增基因和缺失基因。

[关键词] 头颈部鳞状细胞癌;基因芯片;转移

[中图法分类号] R394-33;R730.43;R739.91 [文献标志码] A

Differential expression of metastasis-related genes in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a genomic hybridization microarray study

Li Yadong[1], A Gowhere[2], Hong Suling[3] ([1]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, [3]Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China; [2]Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 rue Porte de l'Hopital, Strasbourg, France)

[**Abstract**] **Objective** To detect the metastasis-related genes in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods** HNSCC metastasis-related genes were detected with genomic hybridization microarray in 80 samples from HNSCC patients, including 17 from tongue cancer patients, 13 from oral cancer patients, 14 from oropharynx cancer patients, and 36 from hypopharynx cancer patients. **Results** Genomic hybridization CGH showed that significant differences were observed in gene amplification at the sites of 1q, 4q, 7q, 11q and Xq, and in gene deletion at the sites of 5p, 8p, 9p, 11q, 13q and 17p between the samples with and without HNSCC metastasis. Cox univariate analysis showed that the differentially expressed genes were mainly related with the functions of transcription regulation and signal transduction, *etc*. **Conclusion** HNSCC metastasis-related gene amplification and deletion can be found in samples from HNSCC patients.

[**Key words**] head and neck cancer; gene microarray; metastasis

Supported by the Foundation of Chongqing Medical University (2007020). Corresponding author: Hong Suling, E-mail: pro_hsl@163.com

头颈部发生的肿瘤,其原发部位和病理类型之多,居全身肿瘤之首。超过90%的头颈部肿瘤为鳞状细胞癌。头颈部癌细胞的侵袭和转移是恶性肿瘤的生物学本质,也是头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)治疗失败和患者致死的主要原因[1]。临床上有些HNSCC患者最先发现的是转移病灶,而不是原发灶。例如鼻咽癌,在原发灶很小的时候,癌细胞即可通过淋巴通道向全身各处转移。在头颈部,有些器官经常活动,例如发生在舌部的鳞癌远处转移的比例相当高。大多数HNSCC患者并不是因为头颈部原发灶致死,而是由于发生远处转移,导致重要脏器功能丧失,全身衰竭,恶病质,最后死亡[2]。鉴于HNSCC发生转移的时间早、比例大致死率高的特点,抑制HNSCC转移成为治疗的关键[3-4]。随着生

[基金项目] 重庆医科大学校办基金(2007020)

[通信作者] 洪苏玲,E-mail:pro_hsl@163.com

物技术的发展,从基因水平入手,解决头颈癌的转移有了实现的可能。因此寻找有效的基因治疗手段是目前亟待解决的问题。随着近年来功能基因组学和肿瘤治疗技术的快速发展,生物靶向性治疗已成为肿瘤治疗学研究的最新趋势。本课题寻找与头颈癌转移相关的基因,旨在为今后的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

80例HNSCC肿瘤标本均来自法国的保罗施特劳斯生物中心,选择标本的标准包括肿瘤部位(口腔、舌、口咽、下咽),通过各种临床物理检查(如触诊、B超、CT、X线片、鼻咽纤维镜等)未发现远处转移,均为第1次手术治疗,术前无放化疗,术后病理分析结果均显示手术切缘距肿瘤边缘至少有3 mm安全距离。在随访期内,发生远处转移的患者共39例,转移部位包括骨、肺和肝;未发生远处转移的患者共41例。

患者接受HNSCC原发灶切除术的时间为1988－2003年,患者知情同意,手术同时收集肿瘤标本。为避免采集癌巢中心的坏死组织,标本采集部位是癌灶与正常组织接近处,切取后,迅速放入－80 ℃液氮中储藏。剩余肿瘤组织用6%甲醛固定,石蜡包裹,进行病理分析。HNSCC临床分期采用UICC TNM标准。采用连续切片技术证实每个肿瘤切面中60% ~80%是肿瘤细胞。80例患者男性73例,女性7例,中位年龄58.1(35~79)岁。原发灶T1共8例,T2共38例,T 3共26例,T4共8例;19例未发现区域淋巴结转移,61例发现区域淋巴结有转移。随访5~159个月。术后合并放化疗共66例。其他资料见表1。

表1 患者及标本的临床资料

临床资料	无远处转移病例	有远处转移病例	总计
患者存活情况			
生存	31	3	34
死亡	10	36	46
肿瘤部位			
舌	9	8	17
口腔	11	2	13
口咽	6	8	14
下咽	15	21	36
临床分期			
Ⅰ:T1N0M0	1	0	1
Ⅱ:T2N0M0	7	4	11
Ⅲ:T1-2N1M0或T3N0M0	13	5	18
Ⅳ:T4N0-1或T1-4N2-3	20	30	50
病理分化程度			
高	13	7	20
中	21	19	40
低	7	13	20

1.2 主要仪器和试剂

CGH软件分析系统(英国AI公司cytovision3.7),DNA提取试剂盒(美国Sigma公司),CGH杂交试剂盒(32-801023)(美国Vysis公司)。

1.3 方法

利用BAC CGH基因芯片分析80例HNSCC标本,包括舌癌17例,口腔癌13例,口咽癌14例,下咽癌36例。按照IntegralChip 4.4k CGH基因芯片(Bacterial artificial chromosomes comparative genomic hybridization arrays)的操作规程进行基因组DNA提取,标记探针、纯化和定量、杂交、洗片、图像采集、CGH软件分析系统统计分析结果。

2 结果

CGH检测示,同未发生转移的HNSCC组织标本相比,发生转移的HNSCC组织标本内,基因扩增有显著性差异的位置有1q、4q、7q、11q、Xq,基因缺失有显著性差异的位置有5p、8p、9p、11q、13q、17p。Cox单因素分析发现与HNSCC转移相关的,发生扩增或缺失基因数量最多的5位基因功能组,表2~4显示与HNSCC转移最具相关性的20个扩增基因和缺失基因。

表2 与头颈部鳞状细胞癌转移相关的基因功能组

基因表达情况	基因数量	功能分类
扩增	1 600	转录调控
扩增	628	细胞分化
扩增	560	DNA代谢
扩增	384	RNA合成
扩增	275	蛋白质合成
缺失	764	信号传导
缺失	697	细胞周期
缺失	628	细胞分化
缺失	590	细胞凋亡
缺失	449	细胞黏附

表3 与头颈部鳞状细胞癌转移相关性最显著的20个扩增基因

探针位置	基因名称	染色体定位
228027_at	GPRASP2	chrXq22.1
213709_at	BHLHB9	chrXq23
229963_at	NGFRAP1L1	chrXq22.1
224367_at	BEX2	chrXq22
218332_at	BEX1	chrXq21-q23
228988_at	ZNF6	chrXq21.1-q21.2
214749_s_at	ARMCX6	chrXq21.33-q22.3
228063_s_at	NAP1L5	chr4q22.1
217858_s_at	ARMCX3	chrXq21.33-q22.2
212850_s_at	LRP4	chr11p11.2-p12
227561_at	DDR2	chr1q12-q23
223761_at	FGF19	chr11q13.1
215294_s_at	SMARCA1	chrXq25
215440_s_at	BEXL1	chrXq22.1-q22.3
203874_s_at	SMARCA1	chrXq25
212813_at	JAM3	chr11q25
202016_at	MEST	chr7q32
203875_at	SMARCA1	chrXq25
218694_at	ARMCX1	chrXq21.33-q22.2
209108_at	TSPAN6	chrXq22

表4 与头颈部鳞状细胞癌转移相关性最显著的20个缺失基因

探针位置	基因名称	染色体定位
210561_s_at	WSB1	17q11.1
202391_at	BASP1	5p15.1
203437_at	TMEM11	17p11.2
203620_s_at	FCHSD2	11p13
201976_s_at	MYO10	5p15.1
218372_at	MED9	17p11.2
207667_s_at	MAP2K3	17p11.2
220353_at	FLJ10661	11q13
218826_at	SLC35F2	11q22
228338_at	LOC120376	11q23
1566956_at	OR7E104P	13q21
212836_at	POLD3	11q13
224801_at	NDFIP2	13q31
208089_s_at	TDRD3	13q21
225169_at	FLJ23441	11q14
229097_at	DIAPH3	13q21
203473_at	SLCO2B1	11q13
226547_at	MYST3	8p11.2
205267_at	POU2AF1	11q23
224802_at	NDFIP2	13q31

3 讨论

近年来世界大多数地区HNSCC的发病率有明显增高趋势,在因恶性肿瘤死亡的疾病中排第3位,严重威胁人类的健康。据流行病学研究,我国头颈部鳞癌(包括喉癌、鼻咽癌和口腔鳞癌等)的发病率已占头颈肿瘤的第1位,且有逐年上升趋势[5-7]。由于头颈部解剖区域相对狭窄,功能区域相对集中,因此这一区域的肿瘤及手术均会严重影响患者美观和相应功能,若能采取无创性治疗方法治愈,则可兼顾患者美观和功能。但由于HNSCC发生发展是一个长时间、多阶段的过程,至今其机制尚未完全明了。进一步研究HNSCC发生发展机制、寻求治疗HNSCC的新途径成为我们面临的重要课题。

肿瘤的发生被认为是来源于基因水平发生改变的细胞,其中出现的遗传因素可能包括同源染色体的缺失及某些癌基因及抑癌基因的扩增或缺失、表达上调或下调。因此可以预见,如果在HNSCC中检出与转移相关的基因关键区域的突变,将有助于找到HNSCC治疗的新靶点。1992年Kallioniemi等[8]在荧光原位杂交基础上结合消减技术发展而来的一种新的分子遗传学方法:CGH技术。它能一次性全方位地检测肿瘤全基因组水平的异常,可以检出肿瘤基因组的缺失区域和扩增部位。这种方法很快就被广泛应用于染色体异常的检测,成为研究肿瘤特别是实体瘤的有力工具[9]。

为了研究头颈部肿瘤中DNA拷贝数量的变化,我们利用BAC阵列分析了80个HNSCC患者的标本,并进行CGH检测,发现同未发生转移的HNSCC组织标本相比,发生转移的HNSCC组织标本内,基因扩增有显著性差异的位置有1q、4q、7q、11q、Xq,基因缺失有显著性差异的位置有5p、8p、9p、11q、13q、17p。Kelley等[10]研究发现11q13基因扩增与HNSCC转移相关,Rothschild等[11]研究发现11q13.1-q13.3基因扩增与HNSCC转移相关。本实验结果表明11q基因扩增与缺失都与HNSCC转移相关。可见11q基因对HNSCC影响的重要性,并将作为下一步研究的重点内容。

基因的扩增或缺失在临床具有重要意义[12]。本研究发现,在HNSCC患者的临床标本中一些基因的扩增或缺失同HNSCC发生远处转移有相关性。本研究不仅发现与HNSCC发生转移有关的染色体改变,也能预测与HNSCC病程发展中相关染色体基因的异常。这些染色体基因变异和缺失可能依赖于一种或多种与HNSCC病程有关的因素,对揭示肿瘤发生、发展机制以及了解患者预后具有重要的意义。

参考文献:

[1] Colella S, Richards K L, Bachinski L L, *et al*. Molecular signatures of metastasis in head and neck cancer[J]. Head Neck, 2008, 30(10): 1273-1283.

[2] Shrime M G, Ma C, Gullane P J, *et al*. Impact of nodal ratio on survival in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Head Neck, 2009, 31(9): 1129-1136.

[3] Davis S J, Divi V, Owen J H, *et al*. Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2010, 136(12): 1260-1266.

[4] 杨秋安, 杨金霞, 付卫江, 等. 下咽癌EGFR、NM23、Bcl-2基因表达与临床意义[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(4): 109-113.

[5] Guggino W B, Stanton B A. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(6): 426-436.

[6] Gupta K B, Kumar V, Goyal V, *et al*. Chest wall metastasis of squamous cell carcinoma of larynx[J]. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2011, 53(2): 113-115.

[7] Dedivitis R A, Denardin O V, Castro M A, et al. Risk factors for distant metastasis in head and neck cancer[J]. Rev Col Bras Cir, 2009, 36(6):478-481.

[8] Kallioniemi A, Kallioniemi O P, Sudar D, *et al*. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors[J]. Sience, 1992, 258(5083): 818-821.

[9] 张艳亮, 戴勇, 涂植光, 等. 微阵列比较基因组杂交分析18等臂双着丝粒染色体胎儿全基因组拷贝数变化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1037-1040.

[10] Kelley L C, Shahab S, Weed S A. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(4): 289-304.

[11] Rothschild B L, Shim A H, Ammer A G, *et al*. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification[J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 8017-8025.

[12] 王立东, 郭军辉, 宋昕, 等. 食管贲门双源癌与单发食管癌和贲门癌基因组与蛋白质组对比[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(1): 24-28.

(**收稿**:2011-04-25;**修回**:2011-05-27)

(编辑 汪勤俭)