文章编号:1000-5404(2014)24-2437-04

论著

Variation_91720 拷贝数变异与食管鳞癌易感性的关联研究

刘 曦[1],吴园园[2],张 坤[2],陶桓晟[2],官兴颖[2],杨 康[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院胸心外科[1],医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨 PIK3CA 基因中 Variation_91720 拷贝数变异(copy number variation,CNV)与中国西南地区汉族人群食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)易感性的关联。**方法** 选取 149 例中国西南地区 ESCC 患者和 205 例年龄、性别相匹配的健康人群作为研究对象,采用基于 *Taq*Man® 实时定量 PCR 检测外周血中 Variation_91720 拷贝数;基于 SYBR Green 实时定量 PCR 检测 34 例 ESCC 患者癌及癌旁组织中 PIK3CA 基因 mRNA 表达量。**结果** Variation_91720 拷贝数在 ESCC 患者和对照人群中分布有显著差异($P<0.01$),ESCC 患者中 Variation_91720 拷贝数减少频率显著高于对照人群($P<0.01$,$OR=5.617$,95% $CI=2.750\sim11.470$),是 ESCC 发生的危险因素;Variation_91720 拷贝数增加显著低于对照人群($P=0.028$,$OR=0.419$,95% $CI=0.193\sim0.911$),是 ESCC 发生的保护因素。34 例 ESCC 患者中癌组织的 PIK3CA 基因 mRNA 表达量显著高于癌旁组织($P=0.038$),基因表达差异与相应的外周血基因组 Variation_91720 拷贝数变异之间无显著统计学差异($P=0.066$)。**结论** Variation_91720 拷贝数变异与中国西南地区汉族人群 ESCC 的易感性相关联;其拷贝数减少与增加 ESCC 的易感性相关而其拷贝数增加与降低 ESCC 的易感性相关,可能成为 ESCC 的高危人群筛选和早期诊断生物标记物。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;拷贝数变异;Variation_91720;易感性
[中图法分类号] R181.37;R394.5;R735.1 [文献标志码] A

Correlation of copy number variation of Variation_91720 in PIK3CA gene with susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma: a report of 149 patients from Southwest China

Liu Xi[1], Wu Yuanyuan[2], Zhang Kun[2], Tao Huansheng[2], Guan Xingying[2], Yang Kang[1] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital; [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation of the copy number variation (CNV) of Variation_91720 in PIK3CA gene with the susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in Han population at the Southwest region of China. **Methods** From the Southwest region, 149 ESCC patients and 205 healthy controls were selected as the research subjects. The copy number of Variation_91720 in peripheral blood was detected by TaqMan real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), while the mRNA expression of PIK3CA gene in tumor tissue and adjacent tissue was detected by SYBR Green-based qRT-PCR. **Results** The copy number distribution of Variation_91720 in the ESCC patients was significantly different from that in the healthy controls ($P<0.001$). The copy number loss of Variation_91720 was found to be a risk factor of ESCC ($P<0.001$, $OR=5.617$, 95% $CI=2.750-11.470$), whereas the copy number gain of Variation_91720 was a protective factor ($P=0.028$, $OR=0.419$, 95% $CI=0.193-0.911$). In 34 ESCC patients, the PIK3CA mRNA expression was statistically higher in the tumor tissue than in the adjacent tissue ($P=0.038$), but there was no significant statistical difference between the PIK3CA mRNA expression and the Variation_91720 CNV ($P=0.066$). **Conclusion** The copy number loss of Variation_91720 in PIK3CA gene may increase the susceptibility to ESCC, whereas the copy number gain of Variation_91720 may decrease the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172379)
[通信作者] 杨 康, E-mail:yangkangmh@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1617.028.html(2014-11-06)

susceptibility. Variation_91720 may be a biomarker for high-risk population screening and early diagnosis of ESCC.

[**Key words**] esophageal squamous cell carcinoma; copy number variation; Variation_91720; susceptibility

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172379). Corresponding author: Kang Yang, E-mail: yangkangmh@yahoo.com.cn

食管癌(esophageal cancer, EC)是人类常见的恶性肿瘤之一,其发病率居全世界恶性肿瘤第8位,病死率居第6位[1]。食管癌病死率高、预后差,术后5年生存率低于20%[2]。中国是食管癌的高发区,且以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为主,约占食管癌的90%[2]。因此,探索ESCC早期诊断生物标记物为亟待解决的问题。研究表明,遗传因素在肿瘤发生过程中具有重要作用。遗传多态性可通过影响相关基因功能,进而影响食管癌的易感性[3]。拷贝数变异(copy number variation, CNV)是一种重要的遗传多态性,它指基因组中大于1 kb的DNA片段发生扩增、缺失、插入及其相互组合而产生的复杂变异[4]。与单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)相比,CNV可能包含更多功能性DNA序列,从而对基因表达和疾病易感性产生更重要影响[5-6]。研究证实,基因组CNV与人类肿瘤发生的易感性相关,可能成为肿瘤预防、诊断及治疗的重要遗传标记[7]。PIK3CA是一个重要的癌基因,以往研究发现12.5%的中国ESCC患者存在PIK3CA基因突变[8],另有研究报道中国人群中PIK3CA基因的SNP与骨肉瘤发生的遗传易感性相关[9]。Variation_91720是位于PIK3CA基因启动子区域的一个CNV,此CNV是否影响肿瘤的易感性尚少见研究报道。本研究以中国西南地区汉族人群为研究对象,探讨Variation_91720拷贝数变异与ESCC易感性的关系,以期为发掘可用于筛查高危人群、早期诊断ESCC的遗传标记奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象及样本

收集2006年12月至2012年1月在第三军医大学西南医院门诊及住院的西南地区汉族ESCC患者149例作为病例组。所有ESCC患者经病理诊断确诊,依照美国癌症联合委员会(AJCC)制订的第7版(2009年)食管癌国际TNM分期标准进行临床分期。同时收集2009年5-9月在第三军医大学西南医院体检,年龄、性别、区域与病例组匹配的西南地区汉族健康者205例作为对照组。病例组排除标准:①同时合并其他恶性肿瘤;②有放化疗、手术史;③一般情况较差患者;④严重免疫系统疾病患者。对照组排除标准:①既往有恶性肿瘤病史者;②年龄小于18岁。

抽取外周血2 mL,利用Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI)试剂盒提取基因组DNA。其中34例行食管癌根治术患者,保留其癌及癌旁组织,酚氯仿抽提RNA。所有样本-70 ℃保存。研究方案经第三军医大学伦理委员会批准,研究对象及其家属签署知情同意书。

1.2 CNV候选位点选择

经基因组变异数据库(Database of Genomic Variants, DGV, http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home)查询,Variation_91720覆盖PIK3CA基因启动子、第1外显子及部分第1内含子区域,长度18 721 bp。本研究选择其作为ESCC易感性关联研究的候选CNV位点。

1.3 Variation_91720拷贝数检测

以RNase P为定量PCR内参标准,采用*Taq*Man® 实时定量PCR方法检测Variation_91720的拷贝数(探针由ABI公司提供,货号Hs06609754_cn)。定量PCR反应体系20 μL,Premix 10 μL,目的探针1 μL、内参探针1 μL、DNA模板20 ng/L、蒸馏水补足。反应条件:95 ℃预变性10 min, 95 ℃变性15 s,60 ℃退火兼延伸1 min,共40个循环。

1.4 RNA提取

在对ESCC患者行食管癌根治术时,收集癌组织和癌旁组织(距离癌巢边缘5 cm以上)各约100 mg,加入TRIzol处理后,用酚氯仿抽提法进行RNA抽提,分装,-70 ℃保存。

1.5 PIK3CA mRNA表达量检测

逆转录mRNA为cDNA,采用SYBR Green实时定量PCR方法检测cDNA以代表PIK3CA mRNA的表达量。利用软件Oligo 6 Demo和Primer Premier 5.0设计引物,引物的设计均考虑到跨越cDNA至少1个内含子以避免污染。PIK3CA引物序列:上游5′-TTGCTGTTCGGTGCTTGG-3′,下游5′-GACTTGCCTATTCAGGTGCTTC-3′;以GAPDH为内参,引物序列:上游5′-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3′,下游5′-GCGCCCAATACGACCAAATC-3′。定量PCR反应体系20 μL,Premix 10 μL,上游引物0.5 μL、下游引物0.5 μL、cDNA模板1 μL、蒸馏水8 μL。反应条件:95 ℃预变性30 s, 95 ℃变性5 s ,60 ℃退火兼延伸30 s共40个循环,溶解曲线从65~95 ℃,每升高0.3 ℃读板15 s。

1.6 统计学分析

Variation_91720的拷贝数结果利用Applied Biosystems CopyCaller™ 2.0软件进行相对定量,计算方法为$2^{-\Delta\Delta Ct}$相对定量法。组织PIK3CA基因mRNA表达量以$2^{-\Delta Ct}$表示,癌组织和癌旁组织的表达量差异大小用$2^{-\Delta\Delta Ct}$相对定量法比较,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示。所有信息导入SPSS v13.0统计软件进行分析。病例组和对照组之间年龄差异比较行Mann-Whitney U检验。病例组和对照组之间性别、拷贝数分布差异比较行χ^2检验。分析拷贝数与ESCC患病风险行二分类Logistic回归分析。不同拷贝数中临床分期差异比较行Kruskal-Wallis H检验。mRNA在

癌组织和癌旁组织中表达差异行 Wilcoxon 符号秩和检验。Variation_91720 拷贝数与组织 PIK3CA 基因 mRNA 表达量差异的相关性行 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 2 组研究对象一般资料分析

纳入 ESCC 患者外周血 DNA 样本 149 例,其中男性 85 例,女性 64 例,年龄(56.5 ± 8.1)岁。病理类型均为鳞癌,临床 TNM 分期为Ⅰ期 20 例,Ⅱ期 82 例,Ⅲ期 37 例,Ⅳ期 10 例。健康对照 DNA 样本 205 例,其中男性 111 例,女性 94 例,年龄(57.3 ± 6.9)岁。病例组与对照组年龄比较经 Mann-Whitney U 检验显示差异无统计学意义(统计量 U = 14 749.5,统计量 W = 35 864.5,P = 0.582),病例组与对照组性别比较经 χ^2 检验显示差异无统计学意义(χ^2 = 0.294,P = 0.588)。研究对象均为来自中国西南地区的汉族人群。

2.2 Variation_91720 拷贝数与食管鳞癌易感性关联分析

*Taq*Man® 探针法检测 Variation_91720 拷贝数结果显示:病例组 Variation_91720 拷贝数小于 2 的样本 39 例(26.2%),拷贝数等于 2 的样本 101 例(67.8%),拷贝数大于 2 的样本 9 例(6.0%);对照组 Variation_91720 拷贝数小于 2 的样本 11 例(5.4%),拷贝数等于 2 的样本 160 例(78.0%),拷贝数大于 2 的样本 34 例(16.6%)。χ^2 检验结果提示病例组和对照组之间 Variation_91720 拷贝数分布有显著差异(χ^2 = 35.584,P < 0.01)。进一步行二分类 Logistic 回归提示 Variation_91720 拷贝数小于 2 为 ESCC 发病危险因素(P < 0.01,OR = 5.617,95% CI = 2.750 ~ 11.470);校正年龄和性别后(P < 0.01,OR = 5.602,95% CI = 2.743 ~ 11.444)。而拷贝数大于 2 为 ESCC 发病保护因素(P = 0.028,OR = 0.419,95% CI = 0.193 ~ 0.911),校正年龄和性别后(P = 0.033,OR = 0.423,95% CI = 0.192 ~ 0.933)。对病例组 Variation_91720 不同拷贝数样本与临床分期的相关性进行分析,Kruskal-Wallis H 检验结果提示二者差异无统计学意义(χ^2 = 1.685,v = 2,P = 0.431,表 1)。

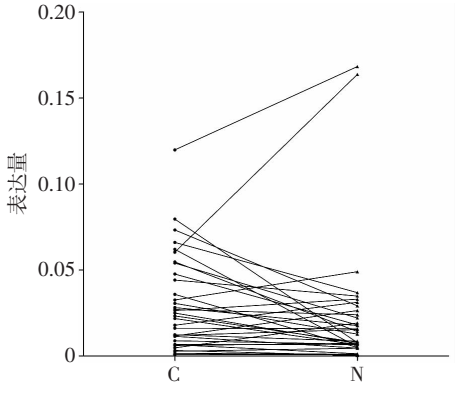
表 1 病例组 Variation_91720 拷贝数与不同临床分期的关系

拷贝数	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
<2	5	21	10	3
2	14	55	25	7
>2	1	6	2	0

Kruskal-Wallis H 检验:P = 0.431

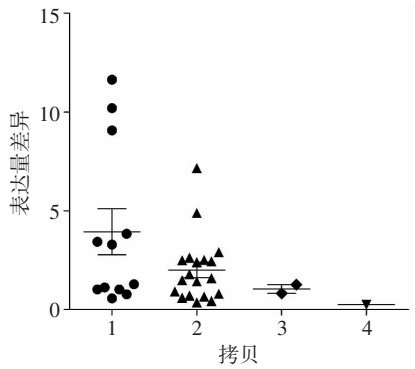
2.3 ESCC 肿瘤组织 PIK3CA mRNA 表达改变与 Variation_91720 拷贝数变异相关性

检测 34 例 ESCC 患者的癌组织与癌旁组织中 PIK3CA mRNA 表达量,行 Wilcoxon 符号秩和检验比较癌组织与癌旁组织 PIK3CA 表达量差异显示癌组织表达量较癌旁组织显著增高(Z = −2.077,P = 0.038,图 1)。计算相对表达量差异($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示)比较癌及癌旁组织表达量差异情况,结果显示 58.8%(20/34)病例癌组织较癌旁组织表达量明显增高(定义 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值小于 0.8 为减低,大于 1.2 为增高,0.8 ~ 1.2 为正常)。为了验证患者癌组织与癌旁组织中 PIK3CA mRNA 表达量差异是否与其基因组中的 Variation_91720 拷贝数变异相关,进一步采用 Spearman 相关分析探索 PIK3CA mRNA 表达量差异与 Variation_91720 拷贝数的相关性,发现 ESCC 患者中 1 拷贝样本(共 12 例)的癌组织 PIK3CA mRNA 表达较其癌旁组织差异最大,2 拷贝样本(共 19 例)次之,而高拷贝样本(3、4 拷贝,共 3 例)的患者表达差异最小,拷贝数与表达量之间呈现负相关关系(等级相关系数 = −0.319),即随 Variation_91720 拷贝数增加 PIK3CA mRNA 表达量逐渐减低,统计分析二者差异无统计学意义(P = 0.066,图 2)。



横坐标为组织样本种类:C:癌组织;N:癌旁组织;纵坐标为表达量,以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示;癌组织表达量显著高于癌旁组织(Z = −2.077,P = 0.038)

图 1 Wilcoxon 符号秩和检验比较 ESCC 患者癌及癌旁组织中 PIK3CA mRNA 表达量



横坐标为 Variation_91720 拷贝数,纵坐标为癌组织及癌旁组织表达量差异,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示;随拷贝数增加表达量差异有减低趋势,呈负相关,统计学差异不显著(等级相关系数 = −0.319,P = 0.066)

图 2 ESCC 患者 Variation_91720 拷贝数与癌及癌旁组织中 PIK3CA mRNA 表达量差异关系 Spearman 相关分析

3 讨论

近年,CNV 用于人类复杂疾病的遗传易感性研究已经成为新的热点。越来越多的研究表明,CNV 可影响结肠癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤的易感性,CNV 可能导致癌基因的扩增、抑癌基因的缺失等,从而影响肿瘤的遗传易感性[7,10]。但迄今为止,CNV 与食管癌易感性的关联研究报道还非常少见。仅有 Sun 等新近

报道,通过对中国北方汉族人群128对ESCC表型不一致同胞对外周血进行全基因组CNV扫描研究,发现ABCC4基因的CNV与ESCC易感性相关[11]。

PIK3CA基因位于富含癌基因的染色体3q26区域,编码产物为磷脂腺肌醇激酶-3(phosphatidylinositol3-kinase,PI3K)的催化亚基p110α,后者是一种在细胞成活、增殖中起第2信使作用的脂质激酶[12]。研究证实,PIK3CA基因突变可以异常活化PI3K信号通路,是恶性肿瘤发生中常出现异常的通路之一,在结肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌等常见恶性肿瘤中都存在PIK3CA基因突变[12-13]。在ESCC组织中PIK3CA基因表达异常增高,与ESCC预后相关[8]。另有研究报道,PIK3CA基因的SNP可影响甲状腺瘤、骨肉瘤等恶性肿瘤的易感性[9]。鉴于PIK3CA基因在肿瘤及食管癌发生中的重要性,本研究首次在中国西南地区汉族人群中探讨了PIK3CA基因启动区的Variation_91720拷贝数变异与ESCC易感性的关联,发现Variation_91720拷贝数减少与ESCC易感性相关,可增加ESCC易患风险。检测34例ESCC患者的癌组织与癌旁组织PIK3CA mRNA表达量,证实癌组织中PIK3CA表达量明显高于癌旁组织($P<0.05$),与Hou等[8]的报道相符。为了解Variation_91720拷贝数是否与PIK3CA基因的表达差异相关,我们进一步分析了该34例ESCC患者的Variation_91720拷贝数与PIK3CA mRNA在癌组织与癌旁组织间的表达差异,发现ESCC患者基因组DNA中Variation_91720拷贝数与其癌及癌旁组织PIK3CA mRNA表达量呈现负相关趋势,即Variation_91720拷贝数少的样本其癌组织mRNA表达量增加明显,但由于总体样本量偏小,特别是高拷贝样本仅有3例,统计学上差异不显著($P=0.066$)。对此需在后续研究中进一步扩大样本量验证。

基因组CNV可能通过基因扩增或激活作用,促进基因表达量增加;低拷贝变异也可能通过减弱基因表达的阻遏抑制作用等方式,增加组织基因表达量[14],我们经UCSC(http://genome.ucsc.edu/index.html)分析发现,Variation_91720覆盖PIK3CA基因启动区和第1外显子,其中含1个840 bp的CpG岛(-245~595 bp),CpG岛通常为甲基化调控区域,而甲基化高低可调节基因的表达。Wang等[15]对76对食管癌和癌旁组织研究发现,癌组织中PIK3CA基因部分CpG岛(-250~50 bp)的甲基化程度较癌旁组织显著降低,此CpG岛的低甲基化与PIK3CA基因在食管癌组织中的高表达相关。据此我们推测,Variation_91720拷贝数减少的个体,其PIK3CA基因启动区CpG岛也相应减少,减弱了甲基化对基因转录的抑制作用,这可能是使PIK3CA基因表达量增加的原因之一。此外,PIK3CA基因启动子还受到其他因素的调控而对表达产生影响。关于Variation_91720拷贝数影响PIK3CA基因的分子机制值得进一步研究。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] Chen M F, Yang Y H, Lai C H, *et al*. Outcome of patients with esophageal cancer: a nationwide analysis[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(9): 3023-3030.

[3] Cheung W Y, Liu G. Genetic variations in esophageal cancer risk and prognosis[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2009, 38(1): 75-91, viii.

[4] Redon R, Ishikawa S, Fitch K R, *et al*. Global variation in copy number in the human genome[J]. Nature,2006, 444(7118): 444-454.

[5] Stranger B E, Forrest M S, Dunning M, *et al*. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes[J]. Science, 2007, 315(5813): 848-853.

[6] Fanciulli M, Petretto E, Aitman T J. Gene copy number variation and common human disease[J]. Clin Genet, 2010, 77(3): 201-213.

[7] Kuiper R P, Ligtenberg M J, Hoogerbrugge N, *et al* Germline copy number variation and cancer risk[J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(3): 282-289.

[8] Hou J, Jiang D, Zhang J, *et al*. Frequency, characterization, and prognostic analysis of PIK3CA gene mutations in Chinese esophageal squamous cell carcinoma[J]. Hum Pathol, 2014, 45(2): 352-358.

[9] He M L, Wu Y, Zhao J M, *et al*. PIK3CA and AKT gene polymorphisms in susceptibility to osteosarcoma in a Chinese population[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(9): 5117-5122.

[10] Kuiper R P, Ligtenberg M J, Hoogerbrugge N, *et al*. Germline copy number variation and cancer risk[J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(3): 282-289.

[11] Sun Y, Shi N, Lu H, *et al*. ABCC4 copy number variation is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(9): 1941-1950.

[12] Li B, Cheung P Y, Wang X, *et al*. Id-1 activation of PI3K/Akt/NFkappaB signaling pathway and its significance in promoting survival of esophageal cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(11): 2313-2320.

[13] Agell L, Hernandez S, Salido M, *et al*. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are infrequent events[J]. Mod Pathol, 2011, 24(3): 443-452.

[14] Henrichsen C N, Vinckenbosch N, Zollner S, *et al*. Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes[J]. Nat Genet, 2009, 41(4): 424-429.

[15] Wang W F, Xie Y, Zhou Z H, *et al*. PIK3CA hypomethylation plays a key role in activation of the PI3K/AKT pathway in esophageal cancer in Chinese patients[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(12): 1560-1567.

(**收稿**:2014-07-12;**修回**:2014-09-05)

(编辑 龙 亮)