

· 临床研究 ·

Cyclin D1 在食管癌中的表达及其临床意义

张 旭, 黄晓平, 马国伟, 苏晓东, 朱志华, 戎铁华

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心胸科, 广东 广州 510060)

摘 要: 【目的】检测食管癌中 Cyclin D1 的表达并探索其临床意义。【方法】运用 RT-PCR 与组织芯片免疫组化法检测 Cyclin D1 在食管癌组织、配对的邻近食管上皮中的表达状态。分析探讨 Cyclin D1 的表达状态与食管癌临床和病理参数之间的关系。【结果】61%和 35%的病例分别在食管鳞癌及其邻近上皮组织中显示 Cyclin D1 表达增加。食管癌组织与其邻近的上皮组织之间 Cyclin D1 的表达具有显著差异 ($\chi^2=8.776$, $P<0.01$)。不同 T 分期的肿瘤组织中 Cyclin D1 的表达差异具有统计学意义, 在 T3+T4 期的表达率为 70%, T1+T2 期的表达率为 40% (T3+T4 vs T1+T2, $\chi^2 = 5.363$, $P<0.05$); 在 T3 期的表达率为 70%, T1 期的表达率为 30% (T3 vs T1, $\chi^2= 4.646$, $P<0.05$)。【结论】Cyclin D1 可能是参与食管癌化的分子标志物, 并且可能是区分不同食管癌 T 分期的有价值的分子标志物。

关键词: 食管肿瘤; Cyclin D1; 组织芯片; 分子标志物

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0657-04

Cyclin D1 Expression in Esophageal Cancer and Its Clinical Significance

ZHANG Xu, HUANG Xiao-ping, MA Guo-wei, SU Xiao-dong, ZHU Zhi-hua, RONG Tie-hua

(State Key Laboratory of South-East Oncology//Department of Thorax, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】Cyclin D1 expression in esophageal carcinomas were detected and its clinical significance were explored. 【Method】The expression status of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinomas tissue and matched adjacent epithelia were investigated by RT-PCR and tissue microarray immunohistochemistry analysis. The relationship between the expression status of cyclin D1 and the clinical and pathological parameters of esophageal cancer were explored. 【Result】61% and 35% cases showed increased expression of cyclin D1 in esophageal carcinomas and the adjacent epithelia, respectively. Significant difference for cyclin D1 expression was found between esophageal carcinomas and the adjacent epithelia ($\chi^2=8.776$, $P<0.01$). Comparing cyclin D1 expression in the carcinomas at different T stages, we found significant alterations. The expression rates were 70% at T3+T4 stage and 40% at T1+T2 stage (T3+T4 vs T1+T2, $\chi^2 = 5.363$, $P<0.05$); the expression rate were 70% at T3 stage and 30% at T1 stage (T3 vs T1, $\chi^2= 4.646$, $P<0.05$). 【Conclusion】The results suggested that cyclin D1 might be a molecular marker in esophageal carcinogenesis and in distinguishing different T stage in esophageal cancer.

Key words: esophageal neoplasm; cyclin D1; tissue microarray; molecular marker

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):657-660,693]

已经报道食管癌的基因变异包括 P53、P16 基因突变, int-2、hst-1、cyclin D1 和 EGFR 等扩增和/或过表达, 以及许多染色体区域的杂合性丢失^[1,2]。

然而, 导致食管上皮癌变的详细的分子事件尚不清楚。Cyclin D1(CCND1)定位于 11q13 染色体区域, 是一个细胞周期调控蛋白。Cyclin D1 基因在

收稿日期: 2006-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572103); 广东省自然科学基金资助项目 (5300808); 中国博士后科学基金资助项目 (2005037612)

作者简介: 张 旭(1973-), 男, 广东普宁人, 博士生; 戎铁华, 教授, 导师, 通讯作者. E-mail: zsdzhangxu@yahoo.com.cn

食管鳞癌中普遍扩增^[3]。Cyclin D1 过表达与肿瘤增殖、淋巴结转移以及预后相关^[4,5]。迄今为止,很少有中国食管癌中 Cyclin D1 变化的报道。本研究的目的旨在运用 RT-PCR 与组织芯片检测 Cyclin D1 在中国食管癌中的表达状态。分析探讨 Cyclin D1 的表达状态与中国食管癌临床和病理参数之间的关系。

1 材料与方法

1.1 肿瘤样品

2005 年 3 月至 2005 年 9 月由中山大学肿瘤防治中心病理科收集 66 例食管鳞癌手术新鲜组织样本,包括食管鳞癌组织、配对的邻近食管上皮(距离癌组织 2 cm 以内)。来自同一患者配对的食管癌组织样品由经验丰富的病理科大夫切取,立即置于 RNA 保护液中 4 ℃ 过夜,然后放在 -86 冰箱或者液氮中保存。所有患者在手术前均未接受过放化疗。所记录的资料涉及肿瘤的临床病理参数,包括组织病理分期、分级、淋巴结转移以及临床资料如年龄和性别等(表 1)。

表 1 66 例食管鳞状细胞癌的基本临床资料和 cyclin D1 在癌组织中的表达情况

Table 1 Basic clinical data in 66 esophageal squamous cell carcinomas and expression status of cyclin D1 in carcinoma n

Items	CCND1(+)	CCND1(-)
60 yr	16	13
<60 yr	24	13
Male	30	20
Female	10	6
LN(+)	21	13
LN(-)	19	13
T1	2	5
T2	7	8
T3	29	12
T4	2	1
G1	12	7
G2	17	8
G3	10	9
G4	1	2

LN: lymph node metastasis

1.2 细胞培养

EC9706(食管癌细胞株 9706)细胞在含有 100

mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中置于 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 空气环境的培养箱中培养。EC9706 细胞系由中国协和医科大学肿瘤研究所王明荣教授惠赠。收集细胞用于 RT-PCR 反应。

1.3 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

根据厂商说明书用 TRIZOL(Gibco)试剂提取总 RNA。用 DNaseI (Takara) 处理来自细胞系 EC9706、肿瘤组织、邻近及远端食管上皮的 50 μg 总 RNA, 去除基因组 DNA 的污染。在 50 μmol/L digo (dT)引物和 25 U RNA 酶抑制蛋白存在的情况下,在 20 μL 逆转录缓冲液(200 μmol/L Tris-HCl, pH 8.4, 500 mol/L KCl, 2.5 μmol/L MgCl₂, 10 μmol/L 2-巯基苏糖醇, 0.5 μmol/L dNTP)中,用 200 U 反转录酶(Promega)逆转录 5 μg 的 RNA 样品。42 ℃ 孵育 15 min, 然后 72 ℃ 加热 15 min 灭活逆转录酶。

1.4 RT-PCR 检测

在含有 1 μL 第一链 cDNA、1X PCR 缓冲液、1.5 mol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTPs 和 0.5 μmol/L 的 Cyclin D1 或者 β-actin(内参照)引物以及 1.5 U Taq DNA polymerase (Takara)的 20 μL 反应体系中进行 RT-PCR 反应。94 ℃ 加热 5 min 启动 PCR 反应,接下来 94 ℃ 40 s (Cyclin D1)/30 s (β-actin)、59 ℃ (Cyclin D1)/55 ℃ (β-actin) 40 s (Cyclin D1)/30 s (β-actin)、72 ℃ 1 min (Cyclin D1)/40 s (β-actin)进行 35 个循环。最后 72 ℃ 延伸 5 min。RT-PCR 产物在 12 g/L 琼脂糖(含 0.1 mg/mL 溴乙锭)凝胶中电泳。Cyclin D1 与 β-actin PCR 产物的长度分别是 750 bp 和 315 bp。Cyclin D1 上游引物是 5' TGT TTG CAA GCA GGA CTT TG 3', 下游引物为 5' ACG TCA GCC TCC ACA CTC TT 3'。β-actin 的上游和下游引物分别为 5' CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA 3' 和 5' ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A 3'。用 β-actin 作为内参照。1.5 食管癌组织芯片免疫组化检测

食管癌组织芯片由陕西超英生物技术有限公司制备。切片的厚度为 4 μm。两张切片上分别含有 50 个食管癌组织及其配对的正常组织(标本的来源与 RT-PCR 的标本来源一致,每张组织芯片只能做 50 个标本,出于科研费用的考虑,放弃部分标本)。切片上两个连续的垂直点来自于相同的肿瘤或者正常组织。切片上可读的样本实际数目

是46。肿瘤材料的限制和切片的损伤是组织芯片切片上样品丢失的主要原因。HE染色用于检验组织芯片制作的质量(图1)。食管癌组织石蜡切片经过二甲苯与梯度乙醇(体积分数100%~70%)进行脱蜡处理。然后用体积分数3% H₂O₂孵育5 min。抗人Cyclin D1单克隆抗体(Santa Cruz, US)用血清1:100稀释,切片于室温孵育1 h,用PBS洗涤。HRP偶联的抗鼠IgG用作二抗(1:100; Santa Cruz, US)。PBS洗涤后二抗37℃放置30 min。DAB显色5~10 min。苏木素复染,脱水,封片。XDS-1B显微镜下分析免疫组化染色的食管癌组织芯片。阳性标准为见到深染的棕褐色蛋白,阴性对照用PBS代替一抗。

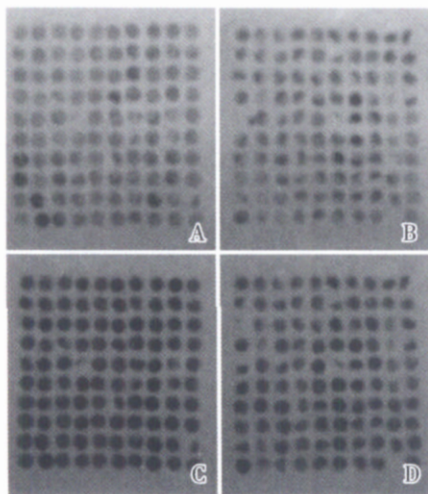


图1 食管癌组织芯片 cyclin D1 的概况

Fig.1 An overview of tissue microarray of cyclin D1 in esophageal cancer

A: 100 esophageal cancer tissue spots stained for detecting Cyclin D1; B: 100 tissue spots from normal esophageal epithelia stained for detecting Cyclin D1; C: 100 esophageal cancer tissue spots stained with hematoxylin and eosin; D: 100 tissue spots from normal esophageal epithelia stained with hematoxylin and eosin. Two vertical consecutive spots stand for tissue spots from the same carcinoma

1.6 统计分析

卡方检验评估 Cyclin D1 变化与临床/病理参数(肿瘤分期、分级、淋巴结转移、年龄和性别)之间的关系。P值为双向,P值小于0.05时认为具有统计学显著性。

2 结果

2.1 食管癌中 Cyclin D1 表达上调

结果显示,在66例食管癌组织中,40例 Cyclin D1 表达增加,占61%;而在66例食管癌邻近上皮组织中,23例 Cyclin D1 表达增加,占35%。 $\chi^2=8.776$, $P < 0.01$,差异有统计学意义。图2是显示 Cyclin D1 在食管鳞癌中表达状态的代表性图例。

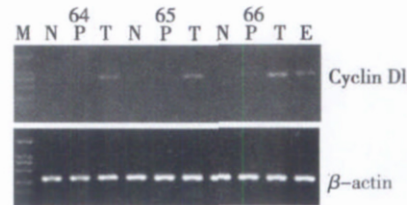


图2 食管鳞癌中 Cyclin D1 的表达

Fig.2 Expression status of Cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinomas

M: molecular weight marker DL2000; N: normal esophageal epithelium distant away from the carcinomas; P: adjacent esophageal epithelia; T: esophageal carcinoma; E: esophageal cancer cell line EC9706; 64, 65, 66: case number

2.2 Cyclin D1 的组织芯片分析

84%(42/50)和41%(19/46)的病例分别在食管癌及其邻近的上皮组织显示 Cyclin D1 的阳性标记。56%(28/50)的病例显示其食管癌组织 Cyclin D1 蛋白表达水平增加。深染的棕褐色 Cyclin D1 蛋白主要见于癌巢周围的细胞核和/或细胞浆,而在大多数正常食管上皮中 Cyclin D1 染色阴性或者着色较淡(图1,3)。

2.3 Cyclin D1 表达增加与食管癌临床/病理资料之间的关系

晚期食管癌患者与早期相比较,Cyclin D1 在食管癌组织中的表达显著增加。在 T3+T4 期,Cyclin D1 的表达率为70%;T1+T2 期的表达率为40%。T3+T4 vs T1+T2, $\chi^2 = 5.363$, $P < 0.05$,表达差异有统计学意义。而且,Cyclin D1 在 T3 期的表达率为70%,T1 期的表达率为30%, $\chi^2 = 4.646$, $P < 0.05$,表达差异有统计学意义。Cyclin D1 表达状态与临床和病理参数分级(G3+G4 vs G1+G2)、淋巴结转移(阳性 vs 阴性)、性别(男性 vs 女性)和年龄(60岁以上 vs 60岁以下)等之间的关系时, χ^2 分别为1.555, 0.039, 0.032 和 0.640;P都大于0.05。Cyclin D1 的表达变化在这些临床/病理资料中没有显著性差异。

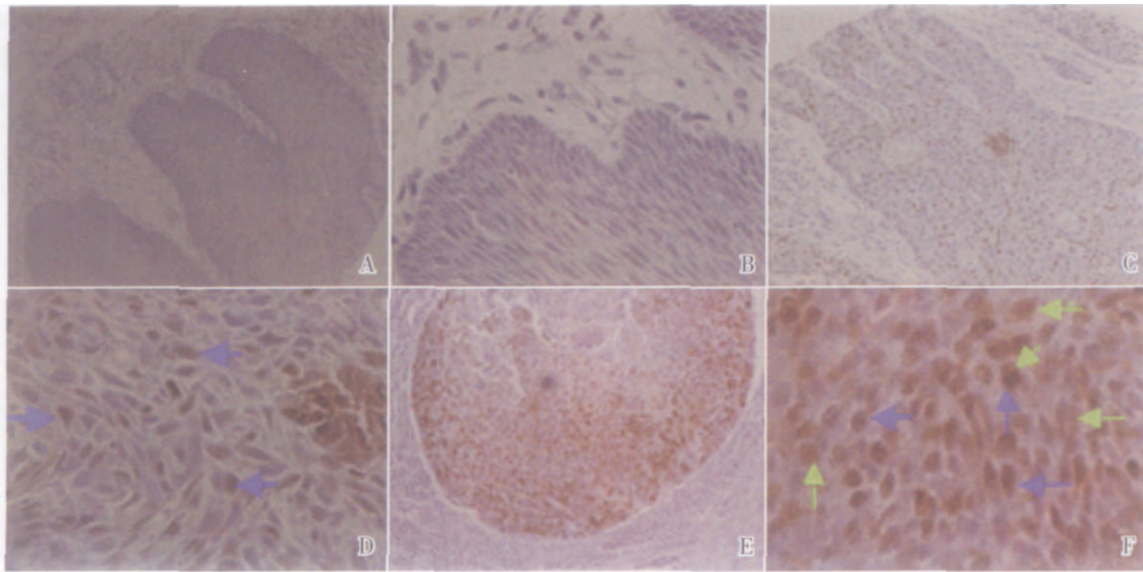


图 3 食管癌组织芯片中 Cyclin D1 的免疫组化染色

Fig.3 Expression of Cyclin D1 in paraffin -embedded esophageal cancer tissues of tissue microarrays by immunohistochemical staining

A: Negative staining of Cyclin D1 in normal esophageal epithelium ($\times 100$); B: Negative staining of Cyclin D1 in normal esophageal epithelium ($\times 400$); C: Positive staining of Cyclin D1 in the cancerous nest of esophageal cancer tissue ($\times 100$); D: Positive staining of Cyclin D1 in the cancerous nest of esophageal cancer tissue ($\times 400$); E: Strong positive staining of Cyclin D1 in the cancerous nest of esophageal cancer tissue ($\times 100$); F: Strong positive staining of Cyclin D1 in the cancerous nest of esophageal cancer tissue ($\times 400$).

The blue arrows showed positive nuclei staining of Cyclin D1 in esophageal cancer cells; The green arrows indicated positive cytoplasm staining of Cyclin D1 in esophageal cancer cells

3 讨 论

我们运用 RT-PCR 方法检测大量基因包括凋亡相关基因、细胞增殖相关基因、DNA 损伤与修复相关基因以及信号传导相关基因等在食管鳞癌中的表达状态,其他学者有关的研究也显示食管鳞癌中许多基因的表达类型发生变化^[6-9]。本研究中,我们对在细胞周期 G1 期发挥调控作用的基因 Cyclin D1 特别有兴趣。我们检测了 Cyclin D1 在食管癌中的表达状态,结果显示在 61%的肿瘤组织 RNA 和蛋白表达水平 Cyclin D1 表达增加。我们也检测了邻近食管癌组织的黏膜组织(距离肿瘤组织 2 cm 以内)Cyclin D1 的表达状态,结果显示,35%的病例表达增加。比较食管癌组织及其邻近的食管黏膜组织 Cyclin D1 的表达状态时发现两者之间具有显著差异($\chi^2=8.776$, $P < 0.01$),而且一些肿瘤组织 Cyclin D1 的表达水平明显高于其邻近的上皮组织,提示随着肿瘤的发生发展 Cyclin D1 表达累积。Cyclin D1 可能是参与食管癌

化的分子标志物。

食管癌不同的临床治疗措施的选择很大程度上依赖于临床和病理分期。尽管运用标准的诊断措施得到相同的肿瘤分期,但是相同分期的食管癌患者常常经历不同的临床后果,其原因是现有的临床与组织病理学分期不能反映肿瘤内含的复杂生物学性状。越来越多的证据^[10,11]提示,分子分期可能是解决这一问题的有效手段。然而,到目前为止,我们尚未能发现有意义的分子标志物用于食管癌的临床分期。从现在开始到不久的将来,寻找有价值的分子标志物仍然是食管癌研究的一个热点课题。本研究中我们观察了 Cyclin D1 表达增加与食管癌组织病理学分期之间的关系。较晚期的食管癌患者与较早期的相比较时,Cyclin D1 在食管癌组织中的表达显著增加(T3+T4 vs T1+T2, $\chi^2=5.363$, $P < 0.05$)。而且,T3 与 T1 期 Cyclin D1 的表达状态具有显著差异($\chi^2=4.646$, $P < 0.05$)。结果提示,Cyclin D1 可能是用于区分不同食管癌 T 分期的有价值的分子标志物。

(下转第 693 页 to page 693)

- 科学版, 2006, 27(1):97- 100.
- [2] 殷善开, 易红良, 张胜兰, 等. 内耳畸形与耳蜗骨化患者的耳蜗植入 [J]. 中华耳科学杂志, 2004, 3(3):179-182.
- [3] 郝 昕, 洪梦迪, 韩东一, 等. 人工耳蜗植入后聋儿听力培建效果的评价[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2002, 10(3):143- 145.
- [4] 中华医学会耳鼻咽喉科学分会, 中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会. 人工耳蜗工作指南(2003年, 长沙)[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(2): 66- 69.
- [5] 曹克利, 魏朝刚, 金 昕, 等. 多道人工耳蜗植入 533 例临床分析 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(10): 579- 583.
- [6] NIPARKO J K, KIRK K I, MELLON N K, et al. 人工耳蜗植入 [M]. 王直中, 曹克利主译. 北京: 人民卫生出版社, 2003:221.
- [7] 余力生, 孙怡君, 丁国玉, 等. 迷路纤维化的诊断及人工耳蜗植入 3 例分析 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2003, 17(7):394- 395.
- [8] 张道行, 胡宝华, 肖玉丽, 等. 人工耳蜗植入的术前评估与术中处理 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(10): 594- 597.
- [9] HELMS J, 余力生, 孔维佳. 人工耳蜗植入的手术技术[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(10): 635- 640.
- [10] GRAHAM J M, PHELPS P D, MICHAELS L. Congenital malformation of the ear and cochlear implantation in children: Review and Temporal bone report of common cavity [J]. J Laryngol Otol Suppl, 2000, 25:1- 14.
- [11] TONG K A, HARNBERGER H R, DAHLEN R T, et al. Large vestibular aqueduct syndrome: a genetic disease?[J]. AJR Am J Roentgenol, 1997, 168(4):1097-1101.
- [12] AU G, GIBSON W. Cochlear implantation in children with large vestibular aqueduct syndrome [J]. Am J Otol, 1999, 20(2):183- 186.
- [13] KIM L S, JEONG S W, HUH M J, et al. Cochlear implantation in children with inner ear malformations [J]. Ann Otol Rhino Laryngol, 2006, 115(3):205- 214.
- [14] 姜泗长, 顾 瑞, 王正敏. 耳科学[M]. 第 2 版, 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 818.
- [15] 韩德民. 人工耳蜗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 208.

(编辑 刘清海)

(上接第 660 页 from page 660)

参考文献:

- [1] MONTESANO R, HOLLSTEIN M, HAINAUT P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis[J]. Int J Cancer, (Pred Oncol), 1996, 69 (3): 225- 235.
- [2] MANDARD A M, HAINAUT P, HOLLSTEIN M. Genetic steps in the development of the squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. Mutation Research, 2000, 462 (2- 3) :335- 342.
- [3] JIN Y, JIN C, LAW S, et al. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of clonal chromosomal aberrations and CCND1 amplification in esophageal carcinomas [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2004, 148 (1):21- 28.
- [4] KUNISAKI C, SHIMADA H, AKIYAMA H, et al. Prognostic factors in esophageal cancer [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51 (57): 736- 740.
- [5] SHINTANI M, OKAZAKI A, MASUDA T, et al. Overexpression of cyclin D1 contributes to malignant properties of esophageal tumor cells by increasing VEGF production and decreasing Fas expression [J]. Anticancer Res, 2002, 22 (2A) :639- 647.
- [6] ZHI H, ZHANG J, HU G, et al. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2003, 106 (3) :327- 333.
- [7] Negative implication of C-MYC as an amplification target in esophageal cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006, 165(1):20- 24.
- [8] WU M Y, ZHUANG C X, YANG H X, et al. Expression of Egr - 1, c - fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (4) :476- 480.
- [9] HUANG X P, RONG T H, WU Q L, et al. MCM4 expression in esophageal cancer from southern China and its clinical significance [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(10):677- 682.
- [10] HOSCH S B, STOECKLEIN N H, IZBICKI J R. Molecular markers and staging of early esophageal cancer[J]. Langenbecks Arch Surg, 2003, 388 (2):77- 82.
- [11] LAMBERT R. Diagnosis of esophagogastric tumors [J]. Endoscopy, 2004, 36 (2): 110- 119.

(编辑 黄小延)