

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00713

人类头颈鳞癌基因组单核苷酸多态性与肿瘤转移的关系

李雅冬¹, Ali Gowhere², 洪苏玲^{3*}

1. 重庆医科大学附属第一医院颌面外科, 重庆 400016

2. Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 rue Porte de l'Hopital, Strasbourg 67085, France

3. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉头颈外科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 检测头颈鳞癌标本,寻找与头颈鳞癌转移高度相关的基因。**方法** 采用单核苷酸多态性基因芯片技术,检测80例临床头颈鳞癌标本,包括舌癌17例,口腔癌13例,口咽癌14例,下咽癌36例。在随访期内,将发生远处转移的39例患者标本作为试验组,将未发生远处转移的41例患者标本作为对照组,利用Cox回归分析基因单核苷酸多态性对肿瘤远处转移的影响。**结果** 单核苷酸多态性检测发现,在位于11q13的区域出现了一个基因组增多所致的独特的峰值。在这个基因组内,Cox回归分析显示,SHANK2基因的rs9651738位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是3.61($P=0.003$),FGF4基因的rs4980690位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是3.63($P=0.006$),ANO1基因的rs7929885位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是4.35($P=0.008$),PPF1A1基因的rs687660位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是4.24($P=0.011$),ORAOV1基因的rs6606651位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是3.04($P=0.013$),CCND1基因的rs592412位点的T等位基因相对G等位基因的相对危险度是4.07($P=0.013$)。**结论** 位于基因组11q13的SHANK2基因的rs9651738位点、FGF4基因的rs4980690位点、ANO1基因的rs7929885位点、PPF1A1基因的rs687660位点、ORAOV1基因的rs6606651位点、CCND1基因的rs592412位点的T等位基因相对G等位基因可增加头颈鳞癌发生转移的危险性。

[关键词] 鳞状细胞癌;头颈部肿瘤;基因芯片;单核苷酸多态性;肿瘤转移

[中图分类号] R 739.81 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0713-04

Relationship between single nucleotide polymorphism in genome of head and neck squamous cell carcinoma tissue and tumor metastasis

LI Ya-dong¹, Ali Gowhere², HONG Su-ling^{3*}

1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 rue Porte de l'Hopital, Strasbourg 67085, France

3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To screen for the genes associated with metastasis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by studying the specimens of HNSCC. **Methods** Eighty HNSCC specimens, including 17 involving the tongue, 13 involving mouth, 14 involving oropharynx, and 36 involving hypopharynx, were subjected to single nucleotide polymorphism chip analysis. The thirty-nine patients with distant metastasis during follow-up were taken as experimental group and the 41 without distant metastasis were taken as controls. Cox regression analysis was used to examine the influence of single nucleotide polymorphism (SNP) on distant metastasis of HNSCC. **Results** The results of SNP demonstrated a distinct peak of frequent genomic gain at 11q13. Cox analysis of the array data showed the following results: a relative risk of T allele of rs9651738 as the SNP probe of SHANK2 gene was 3.61($P=0.003$), relative risk of T allele of rs4980690 as the SNP probe of FGF4 gene was 3.63($P=0.006$), relative risk of T allele of rs7929885 as the SNP probe of ANO1 gene was 4.35($P=0.008$), relative risk of T allele of rs687660 as the SNP probe of PPF1A1 gene was 4.24($P=0.011$), relative risk of T allele of rs6606651 as the SNP probe of ORAOV1 gene was 3.04($P=0.013$), and relative risk of T allele of rs592412 as the SNP probe of CCND1 gene was

[收稿日期] 2011-04-26

[接受日期] 2011-05-11

[基金项目] 重庆医科大学校办基金. Supported by Fund from Chongqing Medical University.

[作者简介] 李雅冬, 博士生, 主治医师. E-mail: llxxydd@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89011020, E-mail: pro_hsl@163.com

4.07($P=0.013$). **Conclusion** It is indicated that the following genes at 11q13 can increase the risk of metastasis of HNSCC, including T allele of rs9651738 in SHANK2, T allele of rs4980690 in FGF4, T allele of rs7929885 in ANO1, T allele of rs687660 in PPF1A1, T allele of rs6606651 in ORAOV1, and T allele of rs592412 in CCND1.

[**Key words**] squamous cell carcinoma; head and neck neoplasms; gene microarray; single nucleotide polymorphism; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 713-716]

头颈部癌细胞的侵袭和转移,是恶性肿瘤的生物学本质,也是头颈部鳞癌治疗失败和患者致死的主要原因^[1]。在临床上,有些头颈鳞癌患者最先发现的是转移病灶,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,例如舌部,发生在舌部的鳞癌,其远处转移的比例相当高。大多数头颈鳞癌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^[2-3]。鉴于头颈部鳞癌发生转移的时间早,比例大,致死率高的特点,抑制头颈鳞癌转移成为治疗的关键^[4-5]。而随着生物技术的发展,从基因水平上入手,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。近年来,生物靶向治疗已成为肿瘤治疗学研究的最新趋势,本课题采用单核苷酸多态性(SNP)基因芯片技术,检测了80例临床头颈鳞癌标本,旨在寻找与头颈癌转移相关的基因,为今后的治疗奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 患者和标本 80例头颈鳞癌肿瘤标本均来自法国保罗施特劳斯生物中心,选择标本的标准包括肿瘤部位(包括舌癌17例,口腔癌13例,口咽癌14例,下咽癌36例),通过各种临床物理检查(如扪诊、B超、CT、X线片、鼻咽纤维镜等)未发现远处转移,均为第一次手术治疗,术前未进行放、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3mm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。

患者接受头颈部鳞状细胞癌原发灶切除术的时间是1988~2003年,肿瘤标本是在患者知情的情况下在手术同时收集的,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。头颈部鳞状细胞癌临床分期采用UICC TNM标准。病理分析采用连续切片技术,证实每个肿瘤切面中60%~80%是肿瘤细胞。具体资料如表1。

1.2 主要仪器及试剂 370K SNP芯片(美国

Affymetrix), Illumina Beadstudio分析系统(美国Affymetrix)。

表1 患者和标本的资料

Tab 1 Data of patients and samples

Index	Patients with distant metastasis	Patients without distant metastasis	Total
Gender(n)			
Male	37	36	73
Female	4	3	7
Age (year, median[range])	58.7 (35-79)	56.6 (38-73)	58.1 (35-79)
Other therapy(n)			
Radiotherapy	37	33	70
Chemotherapy	1	6	7
No	3	0	3
Follow-up (month, median[range])	81.2 (36-159)	27.2 (5-121)	-
Survival(n)			
Survival	31	3	34
Death	10	36	46
Tumor site			
Tongue	9	8	17
Oral	11	2	13
Oropharynx	6	8	14
Deglutition	15	21	36
Primary tumor size			
T1	5	3	8
T2	20	18	38
T3	11	15	26
T4	5	3	8
Lymph node metastasis			
No	16	3	19
Yes	25	36	61
Clinical stage			
I: T1N0M0	1	0	1
II: T2N0M0	7	4	11
III: T1-2N1M0 or T3N0M0	13	5	18
IV: T4N0-1 or T1-4N2-3	20	30	50
Differentiation degree			
High	13	7	20
Moderate	21	19	40
Low	7	13	20

1.3 SNP基因芯片检测 利用SNP基因芯片技术分析80例头颈部鳞状细胞癌标本,按照Affymetrix 370K SNP (single nucleotide polymorphism)基因芯片的操作规程进行基因组DNA提取、酶切、连接接头、PCR扩增、纯化和洗脱、片段化、标记、杂交,以及芯片洗涤和染色。

1.4 统计学处理 利用Illumina Beadstudio分析

系统进行 Cox 回归分析结果, 以相对危险度 (relative risk, RR) 为衡量基因对患者发生远处转移情况影响强度的指标。

2 结果

2.1 SNP 检测结果 SNP 检测结果显示, 在位于 11q13 的区域出现了一个基因组增多所致的独特的峰值 (图 1)。

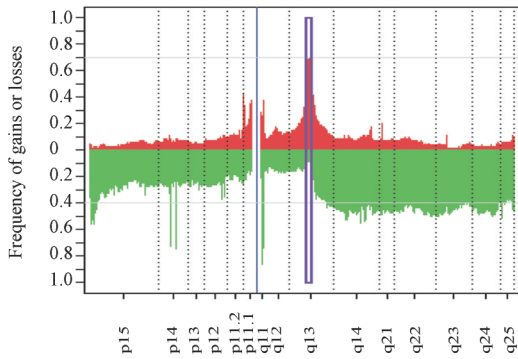


图 1 SNP 结果显示 11 号染色体 q13 区的基因扩增频率显著增加

Fig 1 Single-nucleotide polymorphism results revealing predominant peak of amplification corresponding to the 11q13 amplicon

SNP array data were used to identify gains (red) and losses (green)

2.2 SNP 等位基因对肿瘤远处转移的影响 在这个基因组内, 利用 Cox 分析基因芯片的数据, 结果 (图 2) 显示, SHANK2 基因的 rs9651738 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 3.61 ($P=0.003$), FGF4 基因的 rs4980690 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 3.63 ($P=0.006$), ANO1 基因的 rs7929885 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 4.35 ($P=0.008$), PPFIA1 基因的 rs687660 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 4.24 ($P=0.011$), ORAOV1 基因的 rs6606651 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 3.04 ($P=0.013$), CCND1 基因的 rs592412 位点的 T 等位基因相对 G 等位基因的相对危险度是 4.07 ($P=0.013$)。

3 讨论

目前基因芯片技术在肿瘤研究中得到了广泛的应用, 基因芯片能够为肿瘤基因组研究提供大量的转录水平上的基因表达数据, 相应的数据分析技术为肿瘤相关基因的研究提供了一种全新的、系统的研究方法, 在众多基因芯片技术中, 人们越来越关注 SNP 基因芯片。2004 年 Murray 等^[6]首次应用 SNP

芯片研究人类肿瘤全基因组拷贝数目异常, 发现与传统 BAC 和 cDNA 芯片比较, SNP 芯片密度高、分辨率高, 可提供更为精确的包含抑癌基因和癌基因的候选位点。本研究使用高分辨率的 SNP 芯片 (Illumina 370K SNP), 分析了 80 例头颈鳞状细胞癌患者的标本。结果发现了一个基因组增多所出现的独特的峰值, 这个基因组位于 11q13^[7-8]。而有些学者也发现 11q13 区的基因扩增会导致头颈鳞癌患者较差的预后^[9], 也有学者发现 11q13 区的基因扩增会导致一些其他肿瘤较差的预后^[10]。还有学者在对下咽癌的研究中, 发现 11q13 区的扩增与淋巴结转移和肿瘤较高复发率具有相关性^[11]。SNP 阵列的高分辨率使我们能够识别在扩增的 11q13 区中, 与肿瘤转移相关的基因。本研究采用 Cox 回归分析基因芯片的数据, 结果发现, 在 11q13 区域的一些基因的扩增或过表达与未来发生远处转移具有高度相关性, 分别是 SHANK2 基因、成纤维生长因子 4 (fibroblast growth factor-4, FGF4) 基因、anoctamin 1 (ANO1) 基因、蛋白酪氨酸磷酸酶 (PPFIA1) 基因、口腔癌过表达序列 1 (oral cancer overexpressed 1, ORAOV1) 基因和细胞周期蛋白 D₁ (cyclin D₁, CCND1) 基因。

snp id	logrank test p	Relative Risk	chromosome	chromosomal	gene symbol	entrez gene id
rs9651738	0.00280502	3.60912418	11	70038072	SHANK2	22941
rs4980690	0.00621537	3.62957184	11	69301845	FGF4	2249
rs7929885	0.00775931	4.34667994	11	69561617	ANO1	55107
rs579298	0.00892981	2.81588943	11	70004953	SHANK2	22941
rs10897613	0.00909606	3.97151995	11	70512379	LOC650708	650708
rs2000605	0.01013627	4.00973552	11	70031496	SHANK2	22941
rs573795	0.01018441	4.15141221	11	70020065	SHANK2	22941
rs687660	0.01053585	4.24486264	11	69789180	PPFIA1	8500
rs948195	0.01073008	3.23895301	11	70101954	SHANK2	22941
rs1792254	0.01082253	3.3410837	11	70772029	FLI42102	399923
rs624765	0.01089851	4.16207697	11	69826722	PPFIA1	8500
rs7120230	0.01206105	2.38571187	11	70617976	LOC650708	650708
rs6606651	0.01281449	3.03834461	11	69207473	ORAOV1	220064
rs592412	0.01333124	4.07157719	11	69139375	CCND1	595
rs3017478	0.0135134	3.5391324	11	70375682	C11orf76	220070
rs4980700	0.01372721	2.77340675	11	69328598	FGF3	2248
rs12418125	0.01378985	2.5767486	11	69577147	ANO1	55107
rs4077321	0.01380173	2.90587616	11	70444202	C11orf76	220070
rs4616067	0.01382089	3.75928744	11	69265903	FGF4	2249
rs6598087	0.01548901	2.74176508	11	69381718	FGF3	2248
rs7103884	0.01606521	1.92257964	11	69372742	FGF3	2248
rs3781659	0.01616388	4.94083307	11	69680534	ANO1	55107
rs481845	0.01626669	4.07358655	11	69711231	ANO1	55107
rs4506683	0.01674224	4.33450375	11	70583721	LOC650708	650708
rs11604398	0.01692255	3.06855679	11	70547169	LOC650708	650708
rs12365708	0.01715236	1.89097107	11	68269119	MTL5	9633
rs10796848	0.01724589	1.99914239	11	69311550	FGF4	2249
cnv0005215	0.01756439	1.82972255	11	69211797	ORAOV1	220064
rs546502	0.01862737	3.10926555	11	69796137	PPFIA1	8500
rs3781661	0.01929927	3.18449262	11	69677281	ANO1	55107
rs7940681	0.01942361	1.49874972	11	69509350	ANO1	55107

图 2 利用 Cox 分析 SNP 位点与肿瘤远处转移的关系

Fig 2 Cox analysis of association of SNP data with distant metastasis

在上述基因中, CCND1 是研究最多的基因, 它定位于人染色体 11q13, 全长 120 kb, 基因跨距约为 15 kb, 其编码蛋白主要分布在细胞核和胞质中, 是重要的细胞周期调控蛋白, 一旦发生改变, 就有可能导致细胞周期的异常调控, 最终导致细胞转化甚至

癌变。CCND1 基因结构异常常见于鳞癌和腺癌,主要表现为基因拷贝数增加,染色体重组及 CCND1 基因多态性的发生等。CCND1 与肿瘤的浸润、转移和恶化有关,在转移癌中的扩增明显高于原发癌^[12]。SHANK2 基因是 SHANK 家族的 3 种剪切变异型 (SHANK 1、SHANK 2 和 SHANK 3) 之一。SHANK 分子含有多个蛋白结合位点,如 ankyrin、SH3、PDZ 结构域、脯氨酸富集区和 SAM 结构域,所有结构域都包含有与特定蛋白质结合的位点,这种多结构域的特点使之能很好地行使骨架蛋白的功能。其 PDZ 结构域可连接突触后致密区,或将膜受体与细胞骨架相连,从而使 SHANK 蛋白在细胞间信号传递中发挥关键作用^[13]。PPFIA1 编码蛋白分布于细胞质,可行使信号转导、蛋白结合的功能,可调节细胞黏附点的解除,调节细胞和基质之间的相互作用。ORAOV1 是一个定位于 11q13 的新基因。现有的研究显示 ORAOV1 是口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 的一个重要的候补癌基因,它参与了口腔黏膜的癌变,以及 OSCC 肿瘤细胞生长和血管生成的调控。FGF-4 具有广泛的生物学活性,并且在肿瘤形成中起到重要作用,包括细胞增殖、运动,血管形成和抑制细胞死亡^[14],它与头颈部鳞状细胞癌等多种不同恶性肿瘤的浸润性(累及的淋巴结,进展等级)或与患者预后有关,可能影响癌症的进展^[15]。

在前述与未来发生远处转移具有高度相关性的基因中,ANO1 是一个研究较少的基因,包含 26 个外显子,位于人 11 号染色体。目前已知 ANO1 的编码蛋白属膜蛋白,具有 8 个穿膜片段,N 端和 C 端面向细胞质一侧。ANO1 有 2 个保守区域,但并不知道其功能,有一个区域参与有丝分裂,并具有多个潜在的糖基化和磷酸化位点。有学者利用免疫组化检测 ANO1 在软组织肿瘤中的表达情况,结果发现 ANO1 在 139 例胃肠道间质瘤表达的特异性高达 97.8%,而在 438 例其他类型的软组织肿瘤中阳性率不足 1%,因而推测其可作为诊断和治疗胃肠道间质瘤的指标^[16]。在本研究中,ANO1 的 SNP 探针的相对危险度最大,为 4.94。这说明在 11q13 区内,ANO1 与头颈鳞癌转移具有高度相关性。

综上所述,以上多个基因的扩增与头颈鳞癌发生远处转移具有相关性,可能具有特别重要的功能。而由于 ANO1 是一种膜蛋白,定位并暴露在细胞表面,也许将来有可能利用抗体来进行肿瘤治疗。ANO1 与头颈鳞癌转移高度相关,鳞癌细胞的转移涉及到细胞的迁移,而细胞迁移与细胞膜和周围介质的作用密切相关,ANO1 作为膜蛋白,在这方面可能具有重要的作用,基于以上考虑,下一步本课题组将研究

ANO1 过表达如何促进头颈鳞癌发生转移。

[参考文献]

- [1] Le Tourneau C, Velten M, Jung G M, Bronner G, Flesch H, Borel C. Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas: analysis of a series of 621 cases[J]. *Head Neck*, 2005, 27: 801-808.
- [2] Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24: 9-17.
- [3] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002[J]. *Cancer J Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [4] Davis S J, Divi V, Owen J H, Bradford C R, Carey T E, Papagerakis S, et al. Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136: 1260-1266.
- [5] 杨秋安, 杨金霞, 付卫江, 张廷国, 王 妍, 刘文君, 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: 109-113.
- [6] Murray S S, Oliphant A, Shen R, McBride C, Steeke R J, Shannon S G, et al. A highly informative SNP linkage panel for human genetic studies[J]. *Nat Methods*, 2004, 1: 113-117.
- [7] Gibcus J H, Kok K, Menkema L, Hermsen M A, Mastik M, Kluin P M, et al. High-resolution mapping identifies a commonly amplified 11q13.3 region containing multiple genes flanked by segmental duplications[J]. *Hum Genet*, 2007, 121: 187-201.
- [8] Huang X, Godfrey T E, Gooding W E, McCarty K S Jr, Gollin S M. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45: 1058-1069.
- [9] Klussmann J P, Mooren J J, Lehnen M, Claessen S M, Stenner M, Huebbers C U, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 1779-1786.
- [10] Borg A, Sigurdsson H, Clark G M, Fern M, Fuqua S A, Olsson H, et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis[J]. *Br J Cancer*, 1991, 63: 136-142.
- [11] Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Shinozawa Y, Shimizu N, Abe O. Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1991, 51: 1504-1508.
- [12] Mielcarek-Kuchta D, Olofsson J, Golusinski W. p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2003, 206: 549-554.
- [13] 费 舟, 张 磊, 刘 伟, 章 翔. 大鼠弥漫性袖索损伤后皮层 Shank 蛋白亚型的变化及意义[J]. *临床神经外科杂志*, 2009, 6: 171-174.
- [14] He Q M, Wei Y Q, Tian L, Zhao X, Su J M, Yang L, et al. Inhibition of tumor growth with a vaccine based on xenogeneic homologous fibroblast growth factor receptor-1 in mice[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21831-21836.
- [15] Funahashi Y, Hernandez S L, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, et al. A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 4727-4735.
- [16] West R B, Corless C L, Chen X, Rubin B P, Subramanian S, Montgomery K, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165: 107-113.