

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.06.001
文章编号: 1005-8982 (2023) 06-0001-06

上消化道疾病专题·论著

比较基因组杂交技术分析食管鳞状细胞癌遗传变异及 *PPF1A1* 异常表达的临床意义*

刘涛¹, 陈兆云¹, 刘清², 郑树涛², 杨丽菲², 张琪琪², 阿尔孜古丽·吐尔逊², 卢晓梅²

(1. 新疆医科大学第一附属医院 检验科, 新疆 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学 临床医学研究院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 分析食管鳞状细胞癌中基因组的遗传学变异特征, 探讨异常扩增基因 *PPF1A1* 与临床病理参数及预后的相关性。**方法** 选取2014年3月—2014年7月新疆医科大学第一附属医院食管鳞状细胞癌患者手术切除的6对肿瘤组织及癌旁正常组织。采用比较基因组杂交技术(CGH)检测食管鳞状细胞癌患者基因组遗传学变化, 免疫组织化学法检测异常扩增基因 *PPF1A1* 在食管鳞状细胞癌中的表达水平, 分析 *PPF1A1* 基因与食管鳞状细胞癌病理参数及预后的相关性。**结果** CGH分析结果发现食管鳞状细胞癌患者中5号染色体p15.33和11号染色体的q13.3和q22.1变异较大。食管癌组织 *PPF1A1* 阳性表达率高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。不同临床分期、淋巴结转移食管癌患者的 *PPF1A1* 高表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 临床分期越高 *PPF1A1* 的阳性表达率也越高, 淋巴结有转移的患者 *PPF1A1* 的阳性表达率高于无淋巴结转移的患者。而不同性别、年龄、病理分级、分化类型、肿瘤大小、浸润深度食管癌患者的 *PPF1A1* 高表达率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 *PPF1A1* 高表达与低表达患者生存曲线比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), *PPF1A1* 高表达患者生存期较短, 预后较差。**结论** 食管鳞状细胞癌中11q13.3变异较大, *PPF1A1* 基因可能在食管鳞状细胞癌的转移和预后中起一定作用。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 比较基因组杂交; *PPF1A1*; 临床病理参数; 治疗结果

中图分类号: R363.1

文献标识码: A

Analysis of the genetic variation of esophageal squamous cell carcinoma via comparative genomic hybridization and clinical significance of abnormal *PPF1A1* expression*

Liu Tao¹, Chen Zhao-yun¹, Liu Qing², Zheng Shu-tao², Yang Li-fei²,
Zhang Qi-qi², Aertziguli Tuerxun², Lu Xiao-mei²

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Clinical Medical Research Institute, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To analyze the genomic variation of esophageal squamous cell carcinoma, and to explore the correlations between the abnormal *PPF1A1* expression and clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** Six pairs of tumor and adjacent tissues surgically removed from patients with esophageal squamous cell carcinoma in the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from March 2014 to July 2014 were collected. The genomic changes in these samples were detected via comparative genomic hybridization (CGH), and the expression of the abnormally amplified gene *PPF1A1* in esophageal squamous cell carcinoma was

收稿日期: 2021-09-08

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:81860510, No:81960527), 省部共建国家重点实验室精准医学专项(No:SKL-HIDCA-2020-JZ2)

[通信作者] 卢晓梅, E-mail: luxiaomei88@163.com

detected by immunohistochemistry. The correlations between the gene expression of *PPF1A1* and pathological parameters of esophageal squamous cell carcinoma and prognosis were analyzed. **Results** The CGH analyses showed that the variations were pronounced within p15.33 of Chromosome 5 and q13.3 and q22.1 of Chromosome 11 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Immunohistochemical results verified that the positive expression rate of *PPF1A1* in esophageal cancer tissues was higher than that in the adjacent tissues ($P < 0.05$). There were differences in the positive expression rate of *PPF1A1* among esophageal squamous cell carcinoma patients with different clinical stage and between those with and without lymph node metastasis ($P < 0.05$). Specifically, the positive expression rate of *PPF1A1* was higher in those with advanced clinical stage and with lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was no statistical difference in the positive expression rate of *PPF1A1* among esophageal squamous cell carcinoma patients with different gender, age, and pathological grade, degree of differentiation, size and depth of invasion of tumors. The survival curves were different among patients with high and low expressions of *PPF1A1* ($P < 0.05$), and those with positive *PPF1A1* expression had a shorter survival duration and a worse prognosis. **Conclusions** 11q13.3 variation is significant in esophageal squamous cell carcinoma, and *PPF1A1* may play a role in the metastasis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma.

Keywords: esophageal cancer; comparative genomic hybridization; *PPF1A1*; clinicopathology; therapeutic outcome

食管癌是临床常见的消化道恶性肿瘤之一,根据最新世界癌症研究报告显示,食管癌发病率在恶性肿瘤中排第7位,因而恶性程度高,发现均为中晚期,导致病死率高居恶性肿瘤第6位^[1-2]。食管癌主要包括食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)两大病理组织类型,其发病率具有明显地域和种族差异,全球新发食管癌病例中,约70%病例在中国^[3-4]。欧美国家以EAC为主,而亚洲以ESCC最为常见^[5-6]。吸烟和饮酒是导致ESCC最主要的两大外因,但驱动ESCC发生、发展的遗传因子和基因组变异目前缺乏清晰准确的结论^[7-9]。

比较基因组杂交技术(comparative genome hybridization, CGH)技术可快速筛选出肿瘤组织整个染色体基因组的变化,并探测恶性肿瘤组织中基因组的缺失和扩增,为肿瘤的早期干预和治疗提供依据^[10-12]。本研究通过CGH技术筛选食管鳞状细胞癌患者组织样本(转移/未转移)中缺失、扩增的基因,采用免疫组织化学法进一步验证显著扩增基因表达与临床病理参数的相关性,探讨其在食管癌发生、发展中的作用,为其临床早期干预和临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2014年3月—2014年7月新疆医科大学第

一附属医院收治的90例食管鳞状细胞癌患者。选取6对手术切除的肿瘤组织及癌旁正常组织进行CGH筛选。患者术前未发生转移,其中3例食管鳞状细胞癌患者术后发生转移并在1年内死亡,而另外3例患者术后未发生转移且存活 ≥ 1 年。6例患者术前未接受任何系统的放射治疗、化学治疗等。84例食管癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司(货号:HEsoS180Su02)。患者有完整的临床病理资料集和随访记录。本研究经新疆医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准,患者家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CGH 提取6对食管鳞状细胞癌组织及其癌旁组织基因组DNA,进行特异性标记和杂交样本制备,随后采用Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0芯片扫描。应用Affymetrix Genotyping Console 3.0软件分析拷贝数。

1.2.2 免疫组织化学法检测 将食管癌组织芯片HEsoS180Su02于60℃烤箱烤片过夜,依次经过二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,抗原修复后,用兔抗人一抗PPF1A1多克隆抗体(14175-1-AP)按浓度1:150稀释,4℃冰箱孵育过夜,次日山羊抗兔二抗37℃温箱孵育1h,磷酸盐缓冲液清洗,二氨基联苯胺显色,苏木色复染和磷酸盐缓冲液返蓝,最后用中性树脂封片,在显微镜下观察染色结果。

1.2.3 染色结果判读 由2位具有经验丰富的高年资医师采用盲法对染色结果进行判读。PPF1A1

染色后,阳性表达样本在细胞膜或胞浆内呈棕黄色或黄色颗粒。根据组织化学评分标准^[13]分别对芯片上每个点阵的染色强度和阳性细胞百分比评分。根据染色强度赋分:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;根据阳性细胞数赋分:每个点阵上取5个高倍视野,统计阳性细胞百分比,阳性细胞数<5%计0分,5%~<25%计1分,25%~<50%计2分,50%~<75%计3分,75%~100%计4分。根据两者计分相积判定阳性等级:0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用独立样本 *t* 检验;计数资料以构成比或率(%)表示,比较用 χ^2 检验;Kaplan-Meier法绘制生存曲线,比较采用Log-rank χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGH分析结果

与食管正常组织比较,在6例食管癌患者样本中检测到72.7%(16/22)的染色体发生了扩增或缺失,仅有27.3%(6/22)染色体未检测到变异,分别是

4号、15号、16号、18号、21号和22号染色体,而3号、5号、8号和11号染色体变异较大,扩增频率最高的染色体区段是11q(见图1和表1)。提示在该特异性位点上很可能存在与食管癌发生、发展相关的癌基因。

在6例食管癌组织中发现11号染色体上的PPF1A1、KIAA1377、MMP13基因扩增频率为83.3%(5/6),而FGF19、FGF3、CNTN5、PGR、PGR基因扩增频率为66.7%(4/6)(见表2)。其中PPF1A1位于染色体11q13.3上,随后应用免疫组织化学法扩大样本量,检测食管癌组织中PPF1A1的表达,分析其与ESCC临床病理参数和预后的相关性。

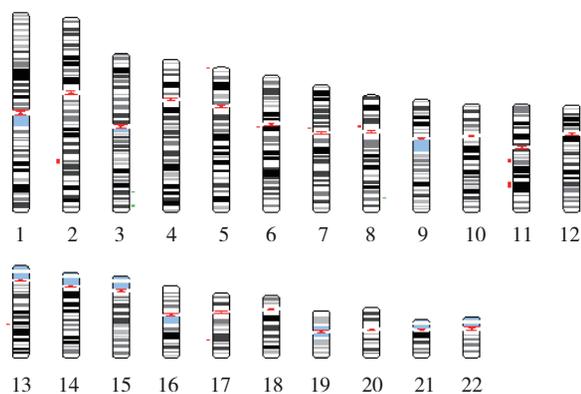


图1 食管癌患者染色体区段

表1 食管癌患者染色体扩增和缺失区域

染色体	扩增区域	缺失区域
1号		1p32.3
2号	2q31.1,2q31.1-2q31.3	
3号	3q24,3q26.1	3q26.31,3q28,3p12.3,3p14.2,3q26.1
5号	5p15.1,5q13.3,5q22.2,5p15.32,5p15.1,5p13.2,5p13.2-5p13.1,5p12,5p11.2	5q12.1
6号	6q12	
7号	7p22.2,7p22.1,7p21.2,7p15.3,7q22.1-7q31.1	
8号	8p11.23,8p11.23-8p11.22,8p11.22,8p11.22-8p11.21,	8q24.12,8q24.13,8q24.21
9号	9p21.1	9p21.3,9p21.3-9p21.1
10号	10q11.21,10p11.21	
11号	11q13.3,11q13.4,11q13.3-11q13.4,11q22.1,11q22.2,11q22.2-11q22.3,11q13.2-11q13.3,11q13.1	11q11
12号	12q13.2	
13号	13q21.33-13q22.1,13q22.1,13q13.3	13q21.1
14号	14q32.13	14q13.3
17号	17q23.1-17q23.2	
19号	19q13.32	
20号	20q13.2	

表 2 食管癌组织中 chr11 染色体上不同基因扩增频率

基因	ID	扩增频率/%
PPFIA1	8500	83.3
MMP13	4322	83.3
KIAA1377	57562	83.3
FGF19	9965	66.7
FGF3	2248	66.7
CNTN5	53942	66.7
PGR	5241	66.7

2.2 PPFIA1 在食管癌组织中的表达

在 90 例食管癌患者癌组织和其对应的癌旁正常组织中检测 PPFIA1 的表达, PPFIA1 主要在食管癌细胞的胞浆和胞膜中表达(见图 2); 根据组织化学评分标准, 食管癌组织 PPFIA1 阳性表达率为 88.89% (80/90), 癌旁组织为 62.22% (56/90), 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=17.326, P=0.000$), 食管癌组织高于癌旁组织。

2.3 不同临床因素食管癌患者 PPFIA1 高表达率比较

在 PPFIA1 阳性表达的 80 例患者中, 不同临床

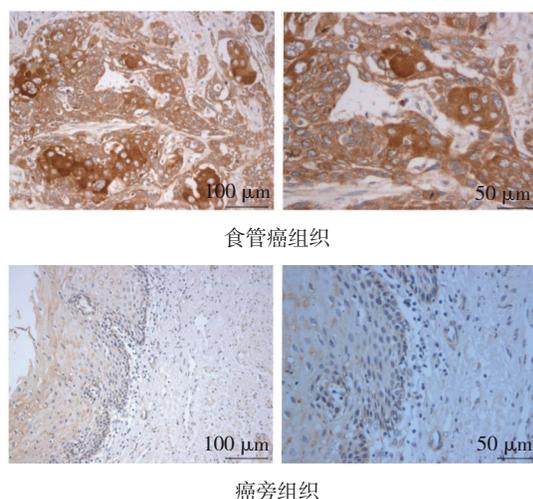


图 2 PPFIA1 在食管癌组织和癌旁组织中的表达

分期、淋巴结转移食管癌患者的 PPFIA1 高表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 临床分期越高 PPFIA1 的阳性表达率也越高, 淋巴结有转移的患者 PPFIA1 的阳性表达率高于无淋巴结转移的患者。而不同性别、年龄、病理分级、分化程度、肿瘤直径、浸润深度食管癌患者的 PPFIA1 高表达率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同临床因素食管癌患者 PPFIA1 高表达率比较 例 (%)

因素	高表达	χ^2 值	P 值	因素	高表达	χ^2 值	P 值
性别				淋巴结转移			
男	67(83.75)	3.273	0.070	N ₀	36(45.00)	7.200	0.007
女	13(16.25)			N ₁ ~N ₃	44(55.00)		
年龄				分化程度			
> 60 岁	58(72.50)	0.256	0.613	高分化	6(7.50)	5.001	0.082
≤ 60 岁	22(27.50)			中分化	11(13.75)		
病理分级				低分化	63(78.75)		
I 级	55(68.75)	1.557	0.459	肿瘤大小		1.040	0.308
II 级	12(15.00)			≤ 20 cm ³	51(63.75)		
III 级	13(16.25)			> 20 cm ³	29(36.25)		
临床分期				浸润深度			
I 级	3(3.75)	8.373	0.015	黏膜层	4(5.00)	4.073	0.130
II 级	37(46.25)			肌层	22(27.50)		
III 级	40(50.00)			外膜层	54(67.50)		

2.4 PPFIA1 表达与食管癌患者预后的关系

食管癌患者随访 45 ~ 70 个月(平均 60 个月)。PPFIA1 高表达与低表达患者生存曲线比较, 经 Log-

rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.236, P = 0.034$), PPFIA1 高表达患者生存期较短、预后较差。见图 3。

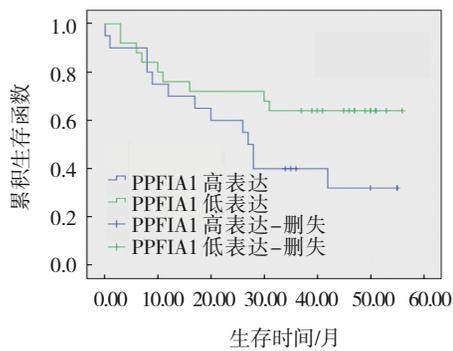


图3 PPF1A1表达与食管癌患者预后的生存曲线

3 讨论

食管癌发病具有种族差异性和家族聚集性等特点,提示目前食管癌发生、发展的遗传因子和基因组变异缺乏清晰的结论^[14]。BARROS-FILHO等^[15]发现在口腔鳞状细胞癌中11q13中出现明显扩增。而本研究利用CGH筛选食管鳞状细胞癌遗传变异发现,在食管鳞状细胞癌中变异较大的区域分别是5号染色体p15.33和11号染色体的q13.3和qq22.1,其中扩增频率最高的也是11号染色体的q13.3。本研究结果与SONG等^[16]采用GWAS技术的研究结果一致,在11q13.3区域的PPF1A1基因在食管鳞状细胞癌组织中出现明显扩增,提示11q13.3区域PPF1A1基因可能在食管鳞状细胞癌的发生、发展中起着重要作用。

PPF1A1基因位于染色体11q13.3上,其编码的蛋白是LAR蛋白-酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白家族的一员,其与酪氨酸磷酸酶LAR的细胞膜内远端磷酸酶结构域结合并定位于细胞黏着斑,从而调节黏着斑的解聚和侵袭性伪足的形成与维持,进而协调细胞与胞外基质的相互作用,促进细胞的迁移^[17-18]。有研究报道,PPF1A1在多种恶性肿瘤中呈高表达,在结肠癌中,PPF1A1蛋白能与ING4相互结合,调节结肠癌细胞的迁移能力,促进结肠癌的转移^[19]。在头颈部鳞状细胞癌和乳腺癌细胞内,PPF1A1调节波形蛋白中间丝网络等细胞骨架,控制细胞黏着斑和侵袭性伪足形成、细胞黏连、细胞外基质降解和细胞迁移^[20-21]。本研究发现,PPF1A1在食管癌组织中高表达,其阳性表达率与食管癌患者的临床分期和淋巴结转移密切相关,提示在食管癌中,PPF1A1可能通过调节细胞运动而促进食管癌的转移,影响食管癌的发生、发展。

Kaplan-Meier生存曲线分析发现,生存期相对较短,预后较差的患者中PPF1A1表达量较高,而生存期相对较长,预后较好的患者中,PPF1A1的阳性表达量较低,且两者间有差异,提示PPF1A1的表达可能与食管癌患者的预后也存在一定的关系。

综上所述,CGH筛选发现在食管鳞状细胞癌中11q13.3存在明显扩增,且位于该位置的PPF1A1基因与食管鳞状细胞癌的临床分期和淋巴结转移相关,对食管鳞状细胞癌的预后有一定的影响。因此有必要进一步探讨其促进肿瘤转移的作用机制,为食管鳞状细胞癌的临床治疗和预后提供理论依据。

参考文献:

- [1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. Int J Cancer, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] SALEM M E, P A, XIU J, et al. Comparative molecular analyses of esophageal squamous cell carcinoma, esophageal adenocarcinoma, and gastric adenocarcinoma[J]. Oncologist, 2018, 23: 1319-1327.
- [4] ABNET C C, ARNOLD M, WEI W Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 360-373.
- [5] YANG L, ZHANG X Y, MACKAY M, et al. Identification of radioresponsive genes in esophageal cancer from longitudinal and single cell exome sequencing[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020, 108: 1103-1114.
- [6] ISLAMI F, DESANTIS C E, JEMAL A. Incidence trends of esophageal and gastric cancer subtypes by race, ethnicity, and age in the united states, 1997-2014[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019, 17(3): 429-439.
- [7] LIN D C, HAO J J, NAGATA Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Genet, 2014, 46(5): 467-473.
- [8] ZHENG S, VUITTON L, SHEYHIDIN I, et al. Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part one: behavioural and environmental risk factors[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010, 22(8): 917-925.
- [9] ZHENG S, VUITTON L, SHEYHIDIN I, et al. Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part two: gene alterations and polymorphisms[J]. Eur J Gastroenterol

- Hepatol, 2011, 23(12): 1087-1099.
- [10] YANG H, LIN Z, LIN Y, et al. Risk factors of esophageal squamous cell cancer specific for different macroscopic types[J]. Nutr Cancer, 2020, 72(8): 1336-1344.
- [11] CHIRAC P, MAILLET D, LEPRÊTRE F, et al. Genomic copy number alterations in 33 malignant peritoneal mesothelioma analyzed by comparative genomic hybridization array[J]. Hum Pathol, 2016, 55: 72-82.
- [12] KIKUCHI-KOIKE R, NAGASAKA K, TSUDA H, et al. Array comparative genomic hybridization analysis discloses chromosome copy number alterations as indicators of patient outcome in lymph node-negative breast cancer[J]. BMC Cancer, 2019, 19: 521.
- [13] DEBAUGNIES F, MAHADEB B, FERSTER A, et al. Performances of the h-score for diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adult and pediatric patients[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 145: 862-870.
- [14] MATEJCIC M, IQBAL P M. Gene-environment interactions in esophageal cancer[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015, 52: 211-231.
- [15] BARROS-FILHO M C, REIS-ROSA L A, HATAKEYAMA M, et al. Oncogenic drivers in 11q13 associated with prognosis and response to therapy in advanced oropharyngeal carcinomas[J]. Oral Oncol, 2018, 83: 81-90.
- [16] SONG Y M, LI L, OU Y W, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. Nature, 2014, 509(7498): 91-95.
- [17] PEHKONEN H, von NANDELSTADH P, KARHEMO P R, et al. Liprin- α 1 is a regulator of vimentin intermediate filament network in the cancer cell adhesion machinery[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24486.
- [18] PEHKONEN H, LENTO M, von NANDELSTADH P, et al. Liprin- α 1 modulates cancer cell signaling by transmembrane protein CD82 in adhesive membrane domains linked to cytoskeleton[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 41.
- [19] SHEN J C, UNOKI M, YTHIER D, et al. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1[J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2552-2558.
- [20] ALFARSI L H, EL ANSARI R, CRAZE M L, et al. PPF1A1 expression associates with poor response to endocrine treatment in luminal breast cancer[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 425.
- [21] ZHOU H, CAO T, LI W P, et al. Combined expression and prognostic significance of PPF1A1 and alg3 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(3): 2693-2701.

(李科 编辑)

本文引用格式: 刘涛, 陈兆云, 刘清, 等. 比较基因组杂交技术分析食管鳞状细胞癌遗传变异及 *PPF1A1* 异常表达的临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(6): 1-6.

Cite this article as: LIU T, CHEN Z Y, LIU Q, et al. Analysis of the genetic variation of esophageal squamous cell carcinoma via comparative genomic hybridization and clinical significance of abnormal PPF1A1 expression[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(6): 1-6.