

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.010

新疆食管癌中 Myc、TP53 表达及其与临床病理因素相关性研究 *

郭琼¹ 李卉² 沙亚哈提·别尔克哈之³ 湛宏鸣¹ 李惠武^{3△}

(1 新疆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

2 新疆医科大学协同创新中心 新疆 乌鲁木齐 830011; 3 新疆医科大学基础医学院科研中心 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:检测 Myc 和 TP53 在食管癌组织和远端无癌组织的表达情况,并分析其与临床病理因素之间的关系,初步探讨 Myc 和 TP53 在新疆食管癌发生发展中可能存在的特点。**方法:**经 Trizol 一步法提取 88 例新疆地区食管癌组织及其远端无癌组织标本总 RNA, mRNA 逆转录为 cDNA,经聚合酶链式反应生成产物,运用光密度值即半定量 RT-PCR 技术检测 88 例新疆地区食管癌组织、远端无癌组织中 Myc 和 TP53 的 mRNA 表达情况及二者阳性表达率,并分析 Myc 和 TP53 的表达与临床病理因素之间的相关性。**结果:**① Myc 的 mRNA 相对表达量在食管癌组织中高于远端无癌组织,差异有显著性($P < 0.01$); TP53 的 mRNA 相对表达量在远端无癌组织中高于癌组织($P < 0.05$);② Myc 的阳性表达率在 88 例食管癌组织中高于远端无癌组织($P < 0.05$); TP53 的阳性表达率在远端无癌组织中高于癌组织($P < 0.05$);③ Myc 的表达与分化程度($P < 0.01$)、TNM 分期($P < 0.01$)、淋巴结转移($P < 0.05$)、侵犯深度($P < 0.05$)和族别($P < 0.05$)有关,与性别无关; TP53 的表达与侵犯程度($P < 0.01$)有关,与性别、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和族别均无关;④ 88 例食管癌组织中, Myc 和 TP53 的表达呈现负相关($r = -0.501, P < 0.01$)。**结论:**Myc 在新疆地区食管癌组织中表达上调, TP53 则表达减弱。说明 Myc 参与食管癌的发生和发展,而 TP53 则可能保护正常组织不发生癌变。

关键词:食管癌; Myc; TP53; 新疆地区**中图分类号:**R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3637-04

Correlative Research between the Expression of Myc, TP53 and Clinical Pathological Factors in Esophageal Cancer of Xinjiang Area*

GUO Qiong¹, LI Hui, SHAYAHATI·Bieerkehazhi³, CHEN Hong-ming¹, LI Hui-wu^{3△}

(1 Histology and Embryology Department, Urumqi, Xinjiang, 830011, China; 2 Collaborative Innovation Center, Urumqi, Xinjiang, 830011, China; 3 Scientific Research Center, Basic Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To test the expression of Myc and TP53 in 88 cases esophageal cancer and distal normal tissue in Xinjiang area, and analyse the characteristic and clinical correlationship between Myc and TP53, further study the relationship of Myc and TP53 in the development of Xinjiang esophageal cancer. **Methods:** Trizol one step method was used to extract total mRNA from all cases, then the mRNA was converted into cDNA by reverse transcriptase (the polymerase chain reaction). Applying RT-PCR half quantitative and optical density value, the mRNA expression and the positive expression rate of Myc and TP53 was detected in 88 cases esophageal cancer and distal normal tissue in Xinjiang area then the correlation between the expression of Myc, TP53 and clinical pathological factors in esophageal cancer was analyzed. **Results:**① The relative value of Myc mRNA in cancer tissue was higher than in distal normal tissue($P < 0.01$), while the relative value of TP53 mRNA in distal normal tissue was higher than in cancer tissue($P < 0.05$); ② The positive expression rate of Myc in cancer tissue was higher than in distal normal tissue ($P < 0.05$), while the positive expression rate of TP53 was opposite($P < 0.05$); ③ The positive expression of Myc was associated with differentiation degree($P < 0.01$), clinical stages($P < 0.01$), lymph node metastasis ($P < 0.05$), tumor invasion depth($P < 0.05$) and race($P < 0.05$); TP53's positive expression was correlated with invasion depth ($P < 0.01$), and was uncorrelated with differentiation degree, clinical stages, lymph node metastasis, human race and sex; ④ In 88 cancer cases, Myc expression was negative related to TP53($r = -0.501, P < 0.01$). **Conclusion:** Myc expression was increased in esophageal cancer of Xinjiang area, and TP53 expression was decreased, which indicate Myc may play a certain role in the development of esophageal cancer, but TP53 could prevent normal tissue to change into tumor.

Key words: Esophageal cancer; Myc; TP53; Xinjiang area**Chinese Library Classification(CLC):** R735.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2015)19-3637-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81350021)

作者简介:郭琼(1980-),女,硕士,从事发育生物学研究,电话:13999805621, E-mail: guoqiong926@163.com

△ 通讯作者:李惠武,教授,博士,博士研究生导师, E-mail: huiwl@126.com

(收稿日期:2014-11-29 接受日期:2014-12-25)

前言

食管癌是我国最为常见的消化道恶性肿瘤之一。在新疆,食管癌的死亡率占恶性肿瘤死亡率的 25%,排在第 2 位^[1]。由于新疆特殊的地理位置和悠久的历史文化导致居住在该地区的人们在生活习俗和饮食习惯上具有特殊性。上述现象提示食管癌的发生过程中,可能存在遗传易感性和环境因素等方面的差异^[2,3]。有研究显示 *Myc* 和 *TP53* 在细胞周期、细胞凋亡及维持基因组稳定的过程中均发挥着不同程度的调控作用^[4,5],但是目前在新疆地区食管癌中同时对 *Myc* 和 *TP53* 二者之间的相关研究报道较少。本次实验从 mRNA 水平检测 88 例(汉族和哈萨克族)食管癌及远端无癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因的表达水平及与食管癌临床病理因素之间的关系,探讨 *Myc* 和 *TP53* 与新疆地区食管癌发生发展中可能存在的特点,为能够把 *Myc* 和 *TP53* 作为食管癌辅助诊断和预后评价指标的临床应用奠定初步的理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 6 月 -2010 年 6 月新疆肿瘤医院胸外科入院的食管癌患者 88 例(同时切取远端无癌组织),其中男性 57 例,女性 31 例,哈萨克族 52 例,汉族 36 例,年龄在 37~80 岁。

患者术前均未接受治疗,术中取材后将标本放于液氮中转运,随后用 -80℃ 低温冰箱保存备用。所有病理病理诊断均为食管鳞状上皮细胞癌,按照最新国际 TNM 分期(UICC),其中 T1 期 22 例、T2 期 17 例、T3 期 26 例、T4 期 23 例;淋巴结转移者 50 例、无淋巴结转移者 38 例;I 期 13 例、II a 期 20 例、II b 期 30 例、III 期 25 例;高分化癌 23 例、高中分化癌 25 例、中分化癌 15 例、中低分化癌 14 例、低分化癌 11 例。

1.2 引物与试剂

RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司);逆转录试剂盒 (Promega);PCR 反应试剂盒、PCR 扩增引物由上海生工有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 组织总 RNA 提取、RT-PCR ①总 RNA 提取:从 -80℃ 低温冰箱内快速取出组织块,切取适量后用液氮研磨至粉末状,立即放入适量 Trizol 中抽提。用 Eppendorf 核酸蛋白定量分析仪测定 RNA 浓度和 A 260/280 值,判断其质量,分装于冻存管后于低温冰箱内保存。cDNA 的合成按照试剂盒说明书操作;②PCR 扩增及反应体系:样本 cDNA 2 μL,目标基因及内参(GAPDH)上下游引物各 1 μL(10 μM),即用型 2× PCR 反应混合液 10 μL,双蒸水 6 μL,总体积 20 μL;③根据 NCBI GeneBank 中的基因序列,应用 Primer 5.0 软件设计引物。引物序列及 PCR 反应程序见表 1。

表 1 基因引物序列,PCR 产物大小及其反应程序

Table 1 Primer sequence, PCR products size and amplification conditions

Gene	Primer sequence(5'-3')	Size(bp)	PCR amplification conditions
<i>Myc</i>	F-TTTCGCAACAAGTCCTCT R-CAGCAAACCTCCTCACAGC	425	95℃ 5min;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,35 cycles;72℃ 7min
<i>TP53</i>	F-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA R-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC	199	95℃ 5min;95℃ 30s,53℃ 30s,72℃ 30s,35 cycles;72℃ 7min
GAPDH	F-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA R-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	300	95℃ 5min;95℃ 30s,54℃ 30s,72℃ 30s,35cycles;72℃ 7min

1.3.2 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析 目标基因在食管癌组织和远端无癌组织中的相对表达量比较采用配对 t 检验;目标基因在食管癌组织和远端无癌组织中的阳性表达率采用配对 X² 检验的 McNemar 分析;目标基因在食管癌组织中表达与临床病理资料的关系采用 X² 检验;目标基因在食管癌组织中表达相关性分析采用 Pearson 检验,所有检验水准 α=0.05, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织与远端无癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因 mRNA 相对表达量比较

用 PCR 电泳条带光密度值进行半定量分析发现,*Myc* 的 mRNA 相对表达量在 88 例食管癌组织中高于远端无癌组织,差异有显著性(P<0.01);*TP53* 的 mRNA 相对表达量在远端无癌组织中高于癌组织(P<0.05),见图 1、表 2。

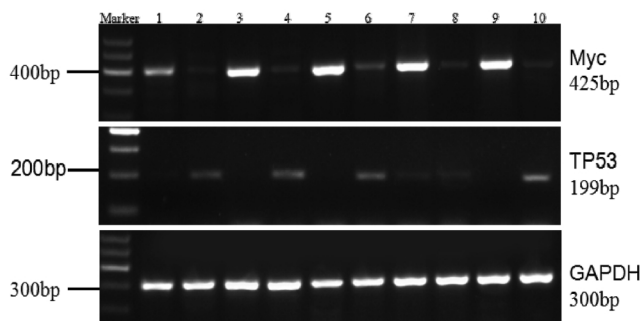


图 1 *Myc*、*TP53* 和 GAPDH 的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products for *Myc*, *TP53* and GAPDH

注:1、3、5、7、9:食管癌组织;2、4、6、8、10:远端无癌组织。

Note: 1,3,5,7,9 represents esophageal cancer tissue; 2,4,6,8,10 represents distal normal tissue.

表 2 食管癌组织及远端无癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因 mRNA 相对表达量比较Table 2 Comparison of the relative expression of *Myc* mRNA and *TP53* mRNA in esophageal cancer tissue and distal normal tissue

Group	<i>Myc</i> mRNA	<i>TP53</i> mRNA
Esophageal cancer tissue	0.534± 0.037*	0.093± 0.010 [#]
Distal normal tissue	0.114± 0.018	0.183± 0.025

注:与远端正常组织比较,* $P<0.01$;[#] $P<0.05$ 。Note: Compared with distal normal tissue, * $P<0.01$; [#] $P<0.05$.2.2 食管癌组织与远端无癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因阳性表达率的比较

Myc 和 *TP53* 在 88 例食管癌组织中的阳性表达率分别为 75.0%和 40.9%; 在相应的远端无癌组织中的阳性表达率分别为 35.2%和 70.5%。其中,*Myc* 的阳性表达率在癌组织中高于远端无癌组织($P<0.05$); *TP53* 的阳性表达率在远端无癌组织中高于癌组织($P<0.05$),见表 3。

表 3 食管癌组织及远端无癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因阳性表达率的比较Table 3 Comparison of the positive expression rate for *Myc* and *TP53* in esophageal cancer tissue and distal normal tissue

Group	n	<i>Myc</i>	<i>TP53</i>
Esophageal cancer tissue	88	66(75.0 %)*	36(40.9 %)*
Distal normal tissue	88	31(35.2 %)	62(70.5 %)

注:与远端无癌组织比较,* $P<0.05$ 。Note: Compared with distal normal tissue, * $P<0.05$.2.3 食管癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因阳性表达与临床病理资料的关系

在 88 例食管癌组织中,*Myc* 的表达与分化程度 ($P<0.01$)、TNM 分期($P<0.01$)、淋巴结转移($P<0.05$)、侵犯深度($P<0.05$)和族别($P<0.05$)有关,与性别无关;*TP53* 的表达与侵犯程度($P<0.01$)有关,与性别、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和族别均无关,见表 4。

表 4 食管癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因阳性表达与临床病理因素之间的关系Table 4 The relationship between the positive expression and clinical pathological factors for *Myc* and *TP53* in esophageal cancer tissue

Clinical factors		n	MYC		TP53	
			Expression (%)	P	Expression (%)	P
Sex	man	57	42(73.7)	0.800	21(36.8)	0.365
	woman	31	24(77.4)		15(48.4)	
Differentiation degree	Middle,low	40	24(60.0)	0.006	19(47.5)	0.282
	High	48	42(87.5)		17(35.4)	
TNM stage	I ~ II a	33	19(57.6)	0.005	16(48.5)	0.274
	II b~III	55	47(85.5)		20(36.4)	
Lymph node metastasis	No	38	23(60.5)	0.012	18(47.4)	0.382
	Yes	50	43(86.0)		18(36.0)	
Invasion depth	T1+T2	39	24(61.5)	0.013	23(59.0)	0.003
	T3+T4	49	42(85.7)		13(26.5)	
Race	Kazak	52	44(84.6)	0.023	22(42.3)	0.827
	Han	36	22(61.1)		14(38.9)	

2.4 食管癌组织中 *Myc* 和 *TP53* 基因阳性表达的相关性

88 例食管癌组织中,*Myc* 和 *TP53* 双阳性表达者占 8.0% (7/88), 双阴性表达者占 10.2%(9/88), 统计学分析显示 *Myc* 和 *TP53* 的表达呈现负相关($r = -0.501, P<0.01$)。

3 讨论

Myc 和 *TP53* 分别作为癌基因和抑癌基因在肿瘤发生发展的复杂网络调控中扮演何种分子角色及其之间的相互作用关系至今还不十分清楚。*Myc* 基因是一种细胞核内癌基因,在肿瘤形成中的激活方式主要是基因扩增,由此高表达 mRNA 产生大量的 *Myc* 蛋白,能够结合至特殊的 DNA 序列(如 E—

box 的 5'-CACGTG-3'),进而影响与肿瘤生长、转移、凋亡及血管生成有关的基因,如 *Bcl2*、*CCND1*、*PCNA* 等^[6-8]。*TP53* 发挥抑癌作用有两种途径,其一通过细胞核中转录依赖的活性;其二是通过细胞浆中非转录依赖的活性。前者可以调节基因的转录,影响细胞周期、DNA 修复、凋亡、信号转导、转录和代谢;后者可以诱导产生凋亡和自吞噬作用^[9-11]。*TP53* 正常功能的丧失主要是通过基因突变,经肿瘤中大量突变体分析证实其实变位点只要集中在 aa129~146、171~179、234~260 和 270~287^[12]。

食管鳞状上皮细胞癌的发生一般会经过单纯性增生、非典型性增生、原位癌和浸润性癌的病理变化过程。Zhong 等研究,*Myc* 基因的扩增在上述不同阶段均有重要调控作用^[13,14]。已

有研究发现食管癌中 *c-Myc* (*Myc* 中的一种亚型) 过表达, 认为它与细胞增殖分化有关^[15], 同时认为 *Myc* 基因过表达与肿瘤进展有关^[16,17]。本次实验结果发现, 在新疆地区食管癌组织中 *Myc* mRNA 相对表达量高于远端无癌组织 (见表 2), 其阳性表达率在癌组织内为 75.0% (表 3), 上述结果说明 *Myc* 参与食管癌的发生和发展, 对食管癌的形成有促进作用。结合其临床病理资料进一步发现 *Myc* 的表达会随着食管癌分化程度、分期、淋巴结转移和侵犯深度的加重而增强 (见表 4), 提示 *Myc* 的改变常会随着食管癌的发展而呈明显上调趋势, 同时在哈萨克族和汉族中, *Myc* 在前者表达稍高 (见表 4), 即 *Myc* 表达在哈萨克族中更容易导致食管癌的发生, 这可能是不同遗传背景因素造成的易感性不同。另有研究证实, *TP53* 作为一类重要的抑癌基因在血液系统来源的肿瘤发生中起着十分重要的调节作用^[18,20]。本次实验发现在新疆地区食管癌组织中 *TP53* mRNA 相对表达量低于远端无癌组织 (见表 2), 其阳性表达率在远端无癌组织内为 70.5% (表 3), 上述结果说明 *TP53* 在食管癌中低表达, 对食管癌的形成可能并没有直接的调控作用。结合其临床病理资料进一步发现, *TP53* 的表达与食管癌侵犯程度有关, 侵犯表浅有表达, 侵犯越深则表达越少; 而与其它指标如分期、淋巴结转移、分化程度和民族均无明显统计学意义 (见表 4), 但是依然表现出了病理程度越轻, 阳性表达较为明显的趋势, 提示 *TP53* 的改变常会随着食管癌的发展呈递减。在新疆食管癌组织中, 我们进一步分析了 *Myc* 和 *TP53* 表达的相关性, 发现二者呈负相关, 这说明在食管发生癌变的过程中, *Myc* 可能是促进作用; *TP53* 则可能抑制, 二者可能通过某种相互作用而拮抗。总结上述资料可以看出, *Myc* 在新疆食管癌组织中随着癌变进程而增强; *TP53* 在食管正常组织高表达, 在癌组织低表达或者不表达, 推断 *Myc* 基因表达与新疆食管癌发生的生物学行为有相关性; *TP53* 可能在保护食管癌组织不向癌组织转变中起调控作用。因此, *Myc* 和 *TP53* 这两个基因有可能为食管癌的早期诊断和预后判定提供有效检测的靶分子。

参考文献(References)

- [1] Zheng S, Vuitton L, Sheyhidin I, et al. Northwestern China: a place to learn more on esophageal cancer Part one: behavioural and environmental risk factors [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010, 22 (8): 917-925
- [2] Tang L, Xu F, Zhang T, et al. High teaperature of food and beverage intake increases the risk of esophageal cancer in Xinjiang, China[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(9): 5085-5088
- [3] Ott K, Sisic L, Büchler M. Squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Chirurg, 2011, 82(11): 974-980
- [4] Anso E, Mullen AR, Felsher DW. Metabolic changes in cancer cells upon suppression of *MYC*[J]. Cancer Metab, 2013, 1(1): 7-10
- [5] Hollstein M, Moriya M, Grollman AP, et al. Analysis of *TP53* mutation spectra reveal the fingerprint of the potent environment carcinogen, aristolochic acid[J]. Mutat Res, 2013, 753(1): 41-49
- [6] Li B, Simon MC. Molecular pathways: targeting *MYC*-induced metabolic reprogramming and oncogenic stress in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(21): 5835-5841
- [7] Tan J, Li Z, Lee PL, et al. PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy [J]. Cancer Discov, 2013, 3(10): 11561-11171
- [8] Link JM, Ota S, Zhou ZQ, et al. A critical role for Mnt in *Myc*-driven proliferation and oncogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(48): 19685-19690
- [9] Thurow HS, Hartwing FP, Alho CS, et al. Ewing sarcoma: influence of *TP53* Arg72Pro and MDM2 T309G SNPS[J]. Mol Bio Rep, 2013, 40 (8): 4929-4934
- [10] Hu Z, Wang J, Yao T, et al. Identification of novel mutations of *TP53*, *ALK* and *RET* gene in metastatic thymic squamous cell carcinoma and its therapeutic implication [J]. Lung Cancer, 2013, 81 (1): 27-31
- [11] Tomesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, et al. Mutations in *TP53*, *CTNNB1* and *PIK3CA* genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infection [J]. Genomic, 2013, 102(2):74-83
- [12] Huang Q, Yu L, Levine AJ, et al. Dipeptide analysis of p53 mutation and evolution of p53 family proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1844(1): 198-260
- [13] Zhong C, Fan L, Yao F, et al. HMGR is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma and is regulated by *Myc*[J]. Tumour Biol, 2014, 35(5): 4123-4129
- [14] Hart LS, Cunningham JT, Datta T, et al. ER stress-mediated autophagy promotes *Myc*-dependent transformation and tumor growth[J]. J Clin Invest, 2012, 122(12): 4621-4634
- [15] Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, et al. Genomic copy-number alterations of *MYC* and *FHIT* genes are associated with survival in esophageal squamous -cell carcinoma [J]. Cancer Sci, 2012, 103(8): 1558-1566
- [16] Leung JY, Andrechek ER, Cardiff RD, et al. Heterogeneity in *MYC*-induced mammary tumors contributes to escape from oncogene dependence[J]. Oncogene, 2012, 31(20): 2545-2554
- [17] Hglund A, Nilsson LM, Muralidharan SV, et al. Therapeutic implications for the induced levels of Chk1 in *Myc*-expressing cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(22): 7067-7079
- [18] Stoddart A, Fernald AA, Wang J, et al. Haploinsufficiency of del(5q) genes, *Egr1* and *Apc*, cooperate with *Tp53* loss to induce acute myeloid leukemia in mice[J]. Blood, 2014, 123(7): 1069-1078
- [19] Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, et al. Association of a microRNA/*TP53* feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. JAMA, 2011, 305(1): 59-67
- [20] Cherdyntseva NV, Gervas PA, Litvyakov NV, et al. Age-related function of tumor suppressor gene *TP53*: contribution to cancer risk and progression[J]. Exp Oncol, 2010, 32(3): 205-208