

网络出版时间: 2017-7-29 12:01 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.029.html>

## 食管鳞癌中 SHANK2 基因断裂及其临床意义

周菲<sup>1,2</sup>, 史志周<sup>2</sup>, 商利<sup>2</sup>, 宫婷<sup>2</sup>, 徐昕<sup>2</sup>, 蔡岩<sup>2</sup>, 王学文<sup>1</sup>, 张钰<sup>2</sup>, 王明荣<sup>2</sup>, 郝佳洁<sup>2</sup>, 贾雪梅<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 SHANK2 基因在食管鳞癌中的断裂情况及其与食管鳞癌患者预后的相关性。方法 利用微阵列比较基因组杂交(array-CGH)技术分析 SHANK2 基因在 59 例食管鳞癌中的断裂情况,利用荧光原位杂交(FISH)技术在 124 例食管鳞癌中进行验证,进一步分析该基因断裂与食管鳞癌患者临床病理参数的相关性及其与预后的关系。结果

Array-CGH 结果显示,SHANK2 基因在食管鳞癌中的断裂频率为 16.9% (10/59)。FISH 验证结果显示,其断裂频率为 15.3% (19/124)。对全部 183 例肿瘤检测的情况进行临床病理参数相关性分析,结果显示 SHANK2 基因断裂与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移等均无显著相关性。但是,Kaplan-Meier 生存分析结果表明,SHANK2 基因断裂患者的总生存显著低于未断裂病例( $P=0.009$ )。进一步通过 Cox 回归分析显示,SHANK2 基因断裂为一个独立的预后因素( $P=0.039$ ,  $HR=3.021$ , 95%  $CI: 1.055 \sim 8.648$ )。结论 SHANK2 基因断裂可能作为食管鳞癌患者预后判断的分子标志物。

**关键词** 食管鳞癌; SHANK2 基因断裂; 预后

**中图分类号** R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1545-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.029

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一。我国食管癌的主要类型为食管鳞癌,位于恶性肿瘤死亡率的第四位<sup>[1]</sup>。患者总体 5 年生存率为 15%~25%<sup>[2]</sup>。因此,鉴定与食管鳞癌中的常见分子改变,可能为肿瘤的诊断及患者预后判断提供重要支持。11q13 区段在食管鳞癌中存在高频扩增<sup>[3]</sup>,同时该区域也是一个高频断裂区<sup>[4]</sup>。在前期工作中,该研究在 11q13 区段中检测到众多的断裂点,并显示 SHANK2 基因在食管鳞癌细胞系 KYSE180 中发生断裂<sup>[5]</sup>。SHANK2 是新近发现的一类骨架蛋白,为突触后致密物质蛋白质家族成员之一,参与突触后致密物质的形成,并调节膜蛋白招募与膜蛋白内化<sup>[6]</sup>。Rinaldi et al<sup>[7]</sup> 研究发现 SHANK2 可通过 ERK1/2 信号通路活化调控神经元分化。目前 SHANK2 的研究主要集中在神经系统领域<sup>[8]</sup>,在食管鳞癌中少见报道,对其预后判断价值的评估更是罕见。该文研究了食管鳞癌原发肿瘤中 SHANK2 基因的断裂频率,进一步分析了该基因断裂与临床病理参数的相关性,探讨了 SHANK2 基因断裂在食管鳞癌患者预后判断中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集中国医学科学院肿瘤医院 183 例食管鳞癌标本。标本均经病理学诊断为食管

2017-04-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81520108023、81330052);北京市自然科学基金(编号:7151008)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学组织胚胎学教研室,合肥 230032;

<sup>2</sup>国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,分子肿瘤学国家重点实验室,北京 100021

作者简介:周菲,女,硕士研究生;

郝佳洁,女,博士,副研究员,责任作者,E-mail: [hjj8173@126.com](mailto:hjj8173@126.com);

贾雪梅,女,硕士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: [jiaxueme@126.com](mailto:jiaxueme@126.com)

common risk factors of plaque burden and cross-sectional areas of plaque and media and vascular external elastic membrane, HDL-C was the protective factor of plaque burden and area of plaque and media. Lp-PLA2 was a strong predictor of necrosis percentage, but with a negative correlation with other plaque tissues percentages. Hypertension was positively correlated with the percentage of necrotic plaque, and it was negatively correlated with the percentage of fibrous tissue. Homocysteine was positively correlated with plaque burden and percentage of necrotic plaque. LDL-C was negatively correlated with the percentage of calcified plaque. **Conclusion** Diabetes, hypertension, homocysteine, Lp-PLA2 and cholesterol levels have some predictive value for coronary plaque formation and plaque burden.

**Key words** coronary heart disease; lipoprotein-associated phospholipase A2; intravascular ultrasound; vulnerable plaque

鳞癌,其中男142例,女41例,年龄39~85岁,中位年龄61岁;T1、T2、T3、T4期分别为3、35、134、11例。淋巴结转移阳性、阴性分别为95、88例;I、II A、II B、III期分别为3、82、17、80、1例;肿瘤高、中、低分化分别为43、98、39例,不详3例。其中有完整随访病例为55例,死亡病例29例,生存时间4~84个月,中位生存时间34个月。所有患者术前未经过放疗和化疗等抗肿瘤治疗。本研究经中国医学科学院肿瘤医院伦理委员会批准(NCC2015G-06)。

**1.2 断裂和断点分析** 利用本实验室前期文章<sup>[3]</sup>中上传至GEO数据库中的array-CGH数据(编号:GSE46452)进行断裂点的分析。图像及数据分析使用Agilent Genomic Workbench Software 5.0(美国Agilent公司)软件。当SHANK2基因内部不同探针之间Log<sub>2</sub> ratio值相差至少0.5时,该病例被定义为断裂阳性病例。断裂点位于存在明显拷贝数差异的两个探针之间。

**1.3 荧光原位杂交(fluorescence in-situ hybridization, FISH)** SHANK2基因两端的细菌人工染色体(BAC)DNA(RP11-402B19和RP11-512I24)用于验证SHANK2基因的断裂。RP11-402B19和RP11-512I24分别利用Cyanine 3(Cy3)-dUTP(美国PerkinElmer公司)和Green-dUTP(美国Abbott公司)通过随机引物法进行标记。标记后的探针各取3 μl,加入6 μl Cot-I DNA和6 μl 鲑鱼精DNA,1/10倍体积3 mol/L醋酸钠,2.5倍体积预冷的无水乙醇,-20℃放置60 min,12 000 r/min离心15 min,弃上清液。加入500 μl 75%乙醇清洗一次,12 000 r/min离心10 min,弃上清液,室温晾干,10 μl杂交液(50%甲酰胺,10%硫酸葡聚糖,1% Tween-20,2×SSC)溶解,待用。样品玻片前处理:在1×PBS中清洗5 min,梯度乙醇脱水(75%、85%、100%,各3 min),晾干。将RNase A(100 mg/ml溶解于2×SSC)加于玻片上样品位置,置于湿盒中,37℃处理40 min,2×SSC中3 min,重复一次,梯度乙醇脱水,晾干。将胃蛋白酶(50 mg/ml溶解于0.01 mol/L HCl)加于玻片上样品位置,置于湿盒中,37℃处理10 min,1×PBS中清洗5 min,1%多聚甲醛10 min,1×PBS清洗5 min,梯度乙醇脱水,晾干。探针75℃变性8 min,立即置于冰上2 min,37℃预复性30 min。前处理后的玻片置于70%甲酰胺/2×SSC中,75℃变性3 min,预冷的2×SSC中2次,每次3 min,梯度乙醇脱水,晾干。将探针加于玻片上样品位置,加上盖玻片,封片胶封片,置于湿盒中,37℃

保温48 h。杂交后玻片置于50%甲酰胺/2×SSC,43℃洗片15 min,2×SSC中3 min,重复一次,梯度乙醇脱水,晾干,1 mg/ml 4,6-diamino-2-phenylindole(DAPI)封片。FISH图像利用蔡司Axio显微镜观察,并通过数码冷CCD(美国Princeton Instruments公司)进行采集。所有荧光信号使用单通道滤光片采集,然后利用MetaMorph(美国Universal Imaging公司)进行图像处理。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 17.0统计软件进行分析。采用双侧 $\chi^2$ 检验判断SHANK2基因断裂与临床病理参数的相关性。采用Kaplan-Meier方法分析SHANK2基因断裂与患者术后总生存之间的关系,进一步通过Cox比例风险模型分析不同临床病理参数和SHANK2基因断裂对食管鳞癌患者术后生存时间的影响。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SHANK2在食管鳞癌中断裂** 利用GEO数据库中的array-CGH数据(编号:GSE46452),本研究对59例原发性食管鳞癌组织基因内部DNA拷贝数情况进行了分析。根据基因内部探针拷贝数差异,共鉴定出了63个断裂基因,其中SHANK2基因存在高频断裂,频率为16.9%(10/59),且其是11q13区段中断裂频率最高的基因(图1A)。本研究进一步在124例食管鳞癌中进行了FISH验证,结果显示其断裂频率为15.3%(19/124)(图1B)。

**2.2 SHANK2基因断裂与患者术后生存时间的关系及其独立预后判断价值** 本研究对全部183例食管鳞癌组织SHANK2基因断裂与临床病理参数的相关性进行了分析。结果显示,SHANK2基因断裂与年龄呈显著相关性( $P = 0.014$ ),而与其他临床病理参数无明显相关性(表1)。Kaplan-Meier生存分析表明,SHANK2基因断裂与食管鳞癌患者术后的不良预后显著相关( $P = 0.009$ )(图2A)。Cox回归分析结果显示,SHANK2基因断裂和淋巴结转移是食管鳞癌患者术后独立的预后因素( $HR = 3.021$ ,95% CI: 1.055 ~ 8.648, $P = 0.039$ 、0.015)(表2)。本研究进一步将SHANK2基因断裂和淋巴结转移联合,显示无淋巴结转移且SHANK2基因未断裂患者的总生存明显优于淋巴结转移或SHANK2基因断裂的病例( $P = 0.003$ )(图2B)。

## 3 讨论

11q13是食管鳞癌、头颈鳞癌、口腔鳞癌等多种

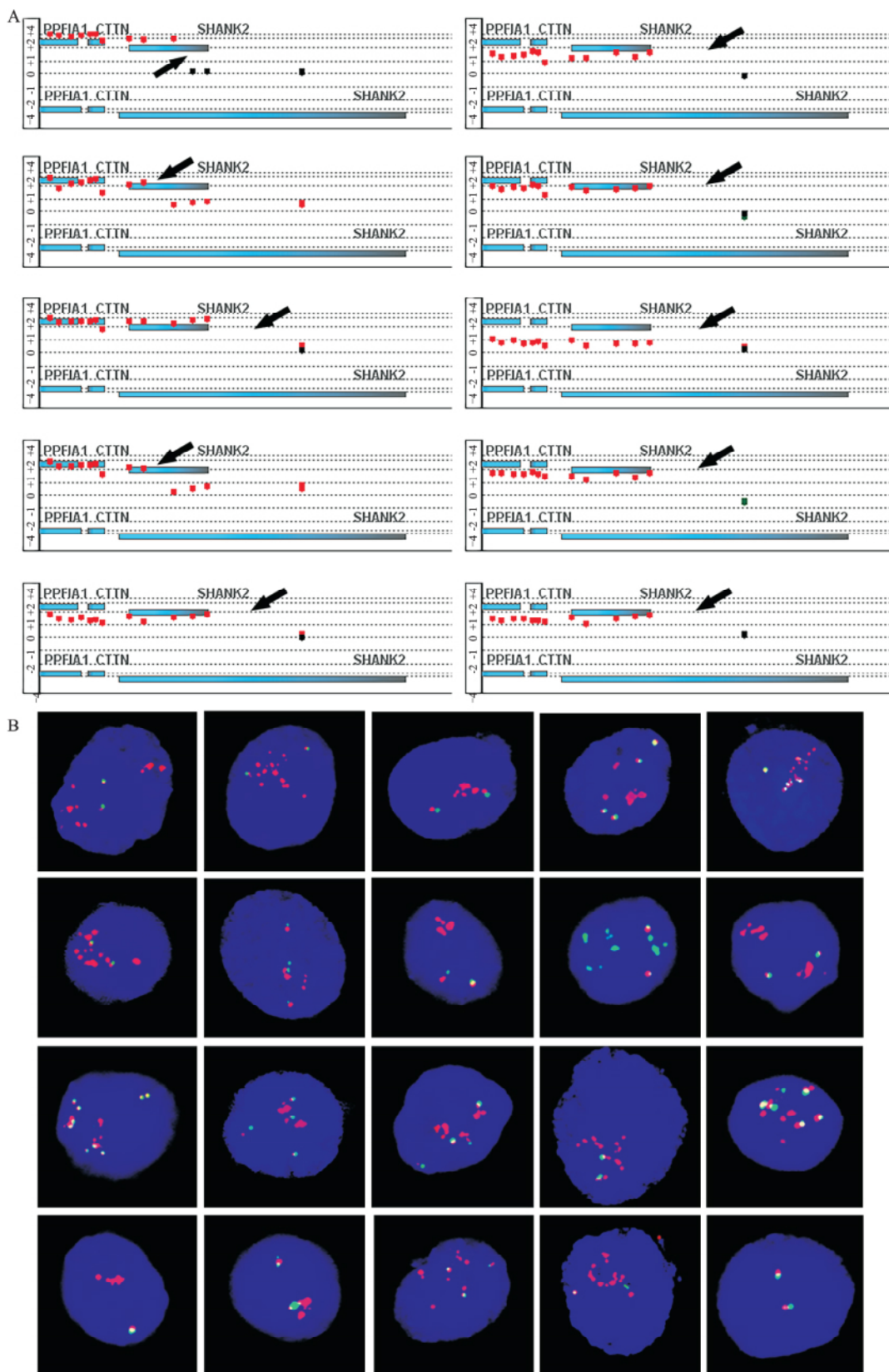


图1 食管鳞癌中 SHANK2 基因断裂阳性病例

A: Array-CGH 结果显示 SHANK2 基因内部不同探针拷贝数, 每一张图代表一个病例, 蓝色矩形块代表基因, 纵坐标代表探针拷贝数的 Log2 ratio 值, 红色、绿色和黑色圆点分别代表扩增、缺失和无明显拷贝数改变; B: FISH 结果显示 SHANK2 基因两侧 BAC-DNA 的数量, 红色为 RP11-102B19, 绿色为 RP11-512I24, 正常人外周血对照中两个 BAC-DNA 数量相等, 且均为 2 个拷贝(右下角), 其他每张图片代表一例食管鳞癌

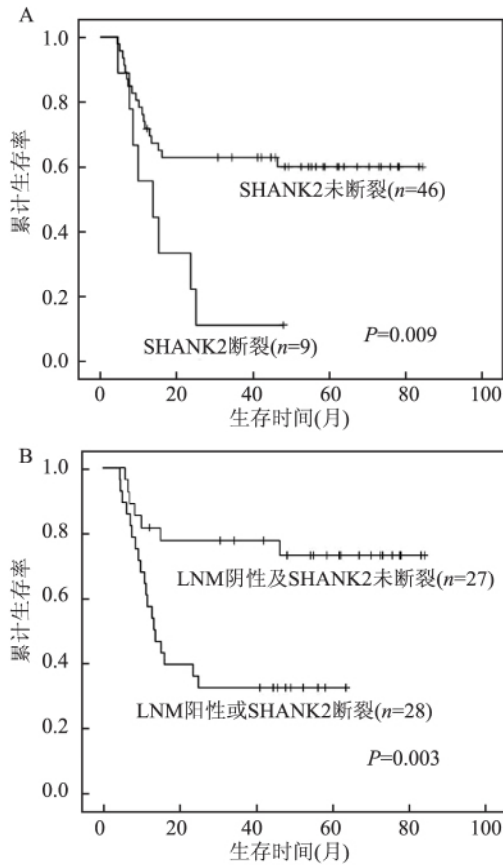


图2 SHANK2 基因的断裂与食管鳞癌患者预后的相关性

A: SHANK2 基因断裂的食管鳞癌患者的生存时间相对较短; B: 淋巴结转移或 SHANK2 断裂的患者的生存时间相对较短; LNM: 淋巴结转移

表1 SHANK2 基因断裂与临床病理参数的相关性

临床病理参数	n	SHANK2 [n( % )]		P 值
		未断裂	断裂	
性别				
男	142	116 (81.7)	26 (18.3)	0.143
女	41	38 (92.7)	3 (7.3)	
年龄(岁)				
< 60	75	57 (76.0)	18 (24.0)	0.014
≥ 60	108	97 (89.8)	11 (10.2)	
T 分期				
T1/T2	37	30 (81.1)	7 (18.9)	0.615
T3/T4	146	124 (84.9)	22 (15.1)	
淋巴结转移				
阴性	88	79 (89.8)	9 (10.2)	0.067
阳性	95	75 (78.9)	20 (21.1)	
临床分期				
I / II	84	75 (89.3)	9 (10.7)	0.104
II B / III / IV	99	79 (79.8)	20 (20.2)	
分化程度				
高	43	35 (81.4)	8 (18.6)	0.544
中	98	83 (84.7)	15 (15.3)	
低	39	34 (87.2)	5 (12.8)	

表2 Cox 回归分析

因素	单因素分析			多因素分析		
	HR 值	95% CI	P 值	HR 值	95% CI	P 值
性别	1.208	0.455 ~ 3.206	0.704	0.849	0.260 ~ 2.766	0.785
年龄	1.282	0.593 ~ 2.768	0.528	2.611	0.953 ~ 7.153	0.062
肿瘤大小	1.491	0.657 ~ 3.385	0.340	1.629	0.652 ~ 4.070	0.296
T 分期	0.975	0.423 ~ 2.248	0.952	1.283	0.467 ~ 3.524	0.629
淋巴结转移	3.132	1.388 ~ 7.069	0.006	3.451	1.275 ~ 9.340	0.015
分级	1.341	0.719 ~ 2.501	0.356	1.248	0.585 ~ 2.663	0.567
SHANK2	2.909	1.255 ~ 6.738	0.013	3.021	1.055 ~ 8.648	0.039

实体肿瘤中的高频扩增区段<sup>[9-11]</sup>。Sugahara et al<sup>[12]</sup>在头颈鳞癌中发现,11q13 区段 FGF4 和 CCND1 基因存在扩增,且二者与淋巴结转移相关。CCND1 在调节细胞从 G1 期进入 S 期中发挥重要作用,与口腔鳞癌患者的不良预后相关<sup>[13]</sup>。前期研究<sup>[5,10]</sup>显示 11q13 是食管鳞癌中扩增频率最高的区段,且与食管鳞癌患者淋巴结转移相关。Ying et al<sup>[13]</sup>发现该区段中 CCND1、FGF19 和 SHANK2 基因的 mRNA 水平显著升高,且位于扩增区中心位置的 CCND1 的扩增和高表达与食管鳞癌患者的淋巴结转移具有显著相关性。在最近的一项研究中, Qin et al<sup>[14]</sup>报道了食管鳞癌中 SHANK2 基因 mRNA 水平升高与食管鳞癌患者的不良预后相关。

染色体断裂和重排也是恶性肿瘤中常见的遗传学改变,在多种肿瘤的发生发展中发挥了重要作用<sup>[15]</sup>。前期研究<sup>[5]</sup>显示 11q13 区段不仅存在高水平扩增,同时其也是食管鳞癌中断裂频率最高的区段。然而,该区段中的关键断裂基因及其临床意义目前尚无报道。本研究利用 array-CGH 分析显示, SHANK2 是 11q13 区段中断裂频率最高的基因,并利用 FISH 技术在原位验证了该基因的断裂,且使用两种方法分析得出的数值非常相近。本研究显示 SHANK2 基因断裂与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移等均无显著相关性,只与年龄相关,该相关性需要扩大病例验证。本文进一步通过生存分析显示 SHANK2 基因断裂是食管鳞癌患者独立的预后因素,且将 SHANK2 基因断裂与淋巴结转移联合后进行生存分析结果提示 SHANK2 基因断裂与淋巴结转移联合可提高对于食管鳞癌患者预后判断的准确性。

综上所述,检测 SHANK2 基因的断裂可能有助于对食管鳞癌患者进行预后判断,但其在食管鳞癌中的功能与作用机制则需要进一步探究。

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Zuo T, et al. National cancer incidence and

- mortality in China ,2012[J]. *Chin J Cancer Res* ,2016 ,28(1) : 1 - 11.
- [2] Pennathur A , Gibson M K , Jobe B A , et al. Oesophageal carcinoma[J]. *Lancet* ,2013 ,381(9864) : 400 - 12.
- [3] Shi Z Z , Shang L , Jiang Y Y , et al. Consistent and differential genetic aberrations between esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma detected by array comparative genomic hybridization [J]. *Clin Cancer Res* ,2013 ,19(21) : 5867 - 78.
- [4] Jarmuz-Szymczak M , Pelinska K , Kostrzewska-Poczekaj M , et al. Heterogeneity of 11q13 region rearrangements in laryngeal squamous cell carcinoma analyzed by microarray platforms and fluorescence in situ hybridization [J]. *Mol Biol Rep* ,2013 ,40(7) : 4161 - 71.
- [5] Hao J J , Shi Z Z , Zhao Z X , et al. Characterization of genetic rearrangements in esophageal squamous carcinoma cell lines by a combination of M-FISH and array-CGH: further confirmation of some split genomic regions in primary tumors [J]. *BMC Cancer* , 2012 ,12: 367.
- [6] Sala C , Vicidomini C , Bigi I , et al. Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders[J]. *J Neurochem* ,2015 ,135(5) : 849 - 58.
- [7] Rinaldi S , Melaccio F , Gozem S , et al. Comparison of the isomerization mechanisms of human melanopsin and invertebrate and vertebrate rhodopsins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2014 ,111(5) : 1714 - 9.
- [8] Peykov S , Berkel S , Schoen M , et al. Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia [J]. *Mol Psychiatry* ,2015 ,20(12) : 1489 - 98.
- [9] Song Y , Li L , Ou Y , et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. *Nature* , 2014 , 509(7498) : 91 - 5.
- [10] 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 - 73.
- [11] Muller D , Millon R , Lidereau R , et al. Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Eur J Cancer B Oral Oncol* ,1994 ,30B(2) : 113 - 20.
- [12] Sugahara K , Michikawa Y , Ishikawa K , et al. Combination effects of distinct cores in 11q13 amplification region on cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol* , 2011 ,39(4) : 761 - 9.
- [13] Ying J , Shan L , Li J , et al. Genome-wide screening for genetic alterations in esophageal cancer by aCGH identifies 11q13 amplification oncogenes associated with nodal metastasis [J]. *PLoS One* , 2012 ,7(6) : e39797.
- [14] Qin H D , Liao X Y , Chen Y B , et al. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma reveals critical genes underlying tumorigenesis and poor prognosis [J]. *Am J Hum Genet* , 2016 ,98(4) : 709 - 27.
- [15] Frohling S , Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer [J]. *N Engl J Med* ,2008 ,359(7) : 722 - 34.

## Clinical relevance of SHANK2 splitting in esophageal squamous cell carcinoma

Zhou Fei<sup>1,2</sup> , Shi Zhizhou<sup>2</sup> , Shang Li<sup>2</sup> , et al

(<sup>1</sup>*Dept of Histology & Embryology , Anhui Medical University , Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*State Key Laboratory of Molecular Oncology , National Cancer Center/Cancer Hospital , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Beijing 100021)*

**Abstract Objective** To explore the splitting and clinical significance of SHANK2 gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The technique of array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) was used to analyze the SHANK2 splitting in 59 primary ESCC tumors , and then performed a validation by break-apart fluorescence in-situ hybridization (FISH) in additional 124 tumors. The relationship between SHANK2 splitting and clinico-pathological parameters of all the 183 cases , as well as the prognostic value of SHANK2 splitting were examined. **Results** Array-CGH results showed that the splitting of SHANK2 was present in 16.9% (10/59) of tumors. The splitting frequency validated by FISH was 15.3% (19/124). There was no correlation between SHANK2 splitting and tumor stage , differentiation , and lymph node metastasis. However , Kaplan-Meier curves showed that the overall survival (OS) of patients with SHANK2 splitting were much shorter than those without splitting ( $P=0.009$ ). Further cox regression analysis indicated that SHANK2 splitting was an independent prognostic factor ( $P=0.039$  ,  $HR=3.021$  ,  $95\% CI: 1.055 \sim 8.648$ ). **Conclusion** SHANK2 splitting might act as a prognostic marker for ESCC.

**Key words** esophageal squamous cell carcinoma; SHANK2 splitting; prognosis