

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.014

· 临床研究 ·

Ras 相关区域家族 7 基因在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

崔建利, 郭伟, 郭艳丽, 沈素朋, 邝钢, 杨植彬, 董稚明(河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所 病理研究室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**检测人食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中 Ras 相关区域家族 7(Ras-association domain family 7, RASSF7)基因的 mRNA、蛋白表达情况及其甲基化状态,探究 RASSF7 在 ESCC 发生发展中的作用。**方法:**组织标本取自河北医科大学第四医院 2011—2012 年间手术切除的 69 例 ESCC 原发灶组织及癌旁组织。分别应用 RT-PCR 及甲基化特异性 PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)方法检测 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)处理前后的 4 株食管癌细胞系(TE13、T. Tn、YES-2、Ec109)和 69 例病灶组织及其癌旁组织中 RASSF7 mRNA 表达水平及甲基化状态,应用免疫组织化学方法检测 69 例 ESCC 组织及相应癌旁组织中 RASSF7 的蛋白表达。**结果:**RASSF7 基因在 TE13、T. Tn、YES-2 细胞系中表达阳性,在 Ec109 细胞系中表达缺失;经 5-Aza-dC 处理后, RASSF7 在 TE13、T. Tn、YES-2 细胞中表达下调,在 Ec109 细胞中表达阳性。5-Aza-dC 处理前后 4 株食管癌细胞系中均未检测到 RASSF7 的甲基化。人 ESCC 组织中 RASSF7 的 mRNA 相对表达量(0.63 ± 0.08 vs 0.42 ± 0.20 , $P < 0.01$)与蛋白表达阳性率[81.2% (56/69) vs 53.6% (37/69), $P < 0.01$]均显著高于相应癌旁组织,且均与患者的淋巴结转移情况及分化程度有关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与 TNM 分期、年龄和性别无关(均 $P > 0.05$)。ESCC 组织和相应癌旁组织中均未检测到 RASSF7 的甲基化。**结论:**4 株食管癌细胞系、人 ESCC 组织和癌旁组织中 RASSF7 基因的表达差异与 RASSF7 本身甲基化状态无关,ESCC 组织中 RASSF7 的高表达可能参与了 ESCC 的发生及转移。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; Ras 相关区域家族 7 基因; 表达; 甲基化

[中图分类号] R735.1; R730.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0437-07

Expression of Ras-association domain family 7 gene in esophageal squamous cell carcinoma: Association with disease development and DNA methylation

Cui Jianli, Guo Wei, Guo Yanli, Shen Supeng, Kuang Gang, Yang Zhibin, Dong Zhiming (Pathology Laboratory, Cancer Institute of Hebei Province, Hebei Medical University-Affiliated Fourth Hospital, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the expression of Ras-association domain family 7 (RASSF7) gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in association with the disease pathogenesis and progression and to evaluate the effect of DNA methylation on RASSF7 expression. **Methods:** Sixty-nine patients diagnosed with ESCC in Hebei Medical University-Affiliated Fourth Hospital between 2011 and 2012 were recruited. Carcinoma and its surrounding non-carcinoma tissue specimens were collected from 69 of these patients. Four esophageal cancer cell lines (TE13, T. Tn, YES-2, and Ec109) were treated with DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC). RASSF7 mRNA abundance in the 69 tissue specimens and 4 esophageal cancer cell lines after 5-Aza-dC treatment were determined by RT-PCR and methylation specific polymerase chain reaction (MSP). RASSF7 protein content in the tissue specimens were assessed by immunohistochemical staining. **Results:** RASSF7 mRNA was detected in TE13, T. TN, Yes-2 cells but not in Ec109 cells. Treatment with 5-Aza-dC induced RASSF7 mRNA but significantly decreased RASSF7 mRNA levels in TE13, T. Tn, and

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101854);河北省医学研究重大专项基金资助项目(No. [2012]2056)。Project supported by the National Natural Science Foundation(No. 81101854), and the Major Projects of Medical Research Foundation of Hebei Province(No. [2012]2056)

[作者简介] 崔建利(1986-),女,硕士生,河北省石家庄市人,主要从事肿瘤分子病因学的研究, E-mail: cuijianli2014@163.com

[通信作者] 董稚明(Dong Zhiming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@aliyun.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.014.html>

Yes-2 cells. No aberrant *RASSF7* methylation was detected in any of the four esophageal cancer cell lines studied, regardless of 5-aza-dC treatment. Carcinoma tissue specimens had significantly higher abundance of *RASSF7* mRNA (0.63 ± 0.08 vs 0.42 ± 0.20 , $P < 0.01$) and a significantly higher rate of positive immunohistochemical staining for *RASSF7* protein 56 (81.2% vs 53.6%, $P < 0.01$) as compared with the non-carcinoma normal tissue specimens, and both *RASSF7* mRNA and protein were associated with lymph node metastasis and histological grade of ESCC. Methylation was detected neither in ESCC specimens nor in the corresponding non-carcinoma tissue specimens. **Conclusion:** The differential expression of *RASSF7* in different esophageal cancer cell lines, ESCC tumor tissue and non-carcinoma tissues is not related to methylation status of *RASSF7*. Increased expression of *RASSF7* in the ESCC tissue suggests a role for *RASSF7* in the pathogenesis and metastasis of ESCC.

[**Key words**] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Ras-association domain family 7 gene (*RASSF7*); expression; methylation

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 437-443]

食管癌是常见的消化道肿瘤之一,其发病率和病死率一直居高不下,明确其发病机制及寻找有效分子靶点是目前亟待解决的问题。RAS 相关区域家族(Ras-association domain family, RASSF)共包含 10 名成员,即 *RASSF1* ~ 10, 该家族又分为两组,传统的 *RASSF1* ~ 6 和 N-末端成员 *RASSF7* ~ 10^[1]。*RASSF7* 位于 11p15.5, 存在 6 个外显子, 由于 3' 端选择性剪切的作用形成 3 个亚型, 分别是 *RASSF7A*、*RASSF7B* 和 *RASSF7C*, 分别编码 320、337 和 373 个氨基酸。*RASSF7* 位于 *H-RAS1* 基因的上游 32 000 bp 范围以内, 最初被命名为 *HRC1* (*HRAS1* cluster 1)^[2] 和 *C11orf13*^[3], 位置上靠近 *HRAS1*、*KRAS2* 和 *RRAS2*^[2, 4-5], 提示其进化的起源相同。目前关于 *RASSF1A* 在食管癌中的各种研究较为深入, 然而有关 *RASSF7* 在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的研究尚未见报道。本研究旨在通过检测 *RASSF7* 基因在 ESCC 中的表达及影响其表达的表观遗传学机制, 阐明 *RASSF7* 基因在 ESCC 发生发展中的作用, 为 ESCC 的防治提供有价值的分子靶点。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

4 株食管癌细胞系 TE-13(低分化, 对放射较敏感)、TT. N(高分化)、EC109(高分化类上皮细胞样, 贴壁生长, 转移、侵袭能力特性均一般, 为食管癌常见细胞系)、Yes-2 由本室保存。RT-PCR 试剂盒、DNA 纯化试剂盒和绿色体系均购自 Promega 公司, 引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。免疫组化 SP 试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术开发公司, 兔抗人 *RASSF7* 多克隆抗体购自 Bio-Synthesis 公司。5-氮杂-2'-脱氧胞苷

(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC) 购自 Gibco 公司。

1.2 研究对象和标本来源

研究对象取自河北医科大学第四医院胸外科 2011 年 10 月至 2012 年 6 月的食管癌手术患者, 共 69 例, 其中男性 50 例、女性 19 例, 年龄 37 ~ 75 岁, 中位年龄 59 岁, 患者术前均未接受任何放疗和化疗。标本取自 ESCC 原发灶及距离原发灶边缘 5 cm 以上的癌旁组织。手术切除标本中一部分以 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 用于 H-E 及免疫组织化学染色; 另一部分迅速置于 -80℃ 冰箱保存, 用于提取 DNA 及 RNA, 行甲基化特异性 PCR (methylation specific polymerase chain reaction, MSP) 及 RT-PCR 检测。所有标本均经 3 名临床病理医师确诊, 依据国际抗癌联盟(UICC) 标准进行临床 TNM 分期: I 期 2 例(2.9%), II A 期 31 例(44.9%), II B 期 25 例(36.2%), III 10 例(14.5%), IV 期 1 例(1.5%); 有淋巴结转移者 33 例, 无淋巴结转移者 36 例; 高分化 17 例(24.6%), 中分化 6 例(8.7%), 低分化 46 例(66.7%)。实验标本的采集经河北医科大学第四医院道德伦理委员会批准, 且患者均签署知情同意书。

1.3 食管癌细胞系的培养及 5-Aza-dC 处理

TE13、T. Tn、YES-2、Ec109 细胞用含 100 μg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素、10% 胎牛血清、8% NaHCO₃ 的 RPMI 1640 培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。常规培养的同时用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC (5 μmol/L) 作用于 TE13、T. Tn、YES-2、Ec109 4 株细胞系, 每 24 h 更换一次培养液, 培养 2 d, 第 3 天换全血清培养基培养 24 h, 收集细胞。

1.4 RT-PCR 检测 *RASSF7* mRNA 在 ESCC 组织及食管癌细胞系中的表达

取 ESCC 组织及癌旁组织每例约 100 mg 及

5-Aza-dC处理前后的4株食管癌细胞系,应用 TRIzol 提取 RNA,测定其纯度及浓度。参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, *GAPDH* 作为内参照。引物、退火温度及产物大小见表 1。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。

PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 Gel work-2ID 软件对电泳图像中目的基因 *RASSF7* mRNA 表达水平进行半定量分析。以 *RASSF7* 与 *GAPDH* 条带的光密度值的比值表示 *RASSF7* mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR、MSP 引物及反应条件
Tab. 1 Primer sequences and reaction conditions of MSP and RT-PCR

Type	Primer sequence	Annealing temperature (t/°C)	Product size (bp)
RT-PCR			
<i>RASSF7</i>	F: 5' - CTGCCACAAGAGTGTCAGT -3' R: 5' - CCAGCTCCTCAGCATTCTC -3'	54	328
<i>GAPDH</i>	F: 5' -AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5' -AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	57	104
MSP			
Region1			
Methylation	F: 5' - TTTTCGTATTAGGATTTTGC GTTCG-3' R: 5' - CCGCAACTACAATAATCTAAACGCG-3'		113
Unmethylation	F: 5' - TTTTGTATTAGGATTTTGTGTTTG-3' R: 5' - CCACA ACTACAATAATCTAAACACA-3'	52	113
Region2			
Methylation	F: 5' - GCGGGGTTAGATATTTATTTGACG-3' R: 5' - CTCGCCAACCTAAAAACCCGCTCCG-3'		362
Unmethylation	F: 5' - GTGGGGTTAGATATTTATTTGATG-3' R: 5' - CTCACCAACCTAAAAACCCACTCCA-3'	54	362
Region 3			
Methylation	F: 5' - GGTTTTCGGTATTTGGGAGCGCG-3' R: 5' - CCGACCTACTCAAACCGCAAAAACG-3'		342
Unmethylation	F: 5' - GGTTTTGTTGATTTGGGACTGTG-3' R: 5' - CCAACCTACTCAAACCACAAAACA-3'	51	342

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 MSP 检测食管癌细胞系及 ESCC 组织中 *RASSF7* 基因的甲基化状态

采用蛋白酶 K 消化、酚/氯仿法提取 5-Aza-dC 处理前后的食管癌细胞系、69 例 ESCC 及癌旁组织中的 DNA 并进行亚硫酸氢盐处理, 参照 DNA 纯化试剂盒步骤进行纯化。经亚硫酸氢盐处理后, 单链 DNA 中未甲基化的 C 可脱氨基而转变为 U, 发生甲基化的胞嘧啶由于甲基的保护作用而不能转变为尿嘧啶。依据此原理设计相应引物(表 1), 以检测该基因是否发生了甲基化。运用 MethPrimer 在线预测 *RASSF7* 基因 5' 端 CpG 岛的分布情况, 结果显示

RASSF7 有两个 CpG 岛, 位于启动子区远端的 CpG 岛长度为 166 bp, 包含 17 个 CpG 位点, 位于启动子区近端的 CpG 岛长度为 943 bp 包含 120 个 CpG 位点。根据预测结果分别设计 3 对甲基化引物及非甲基化引物(图 1)进行 PCR 扩增。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 UV 凝胶电泳成像仪进行图像分析。以经甲基化酶 *Sss I* 处理后的基因组 DNA 为阳性对照, 灭菌双蒸水代替模板 DNA 为阴性对照。为保证实验的可靠性, 随机选取 10% 标本

进行重复实验。

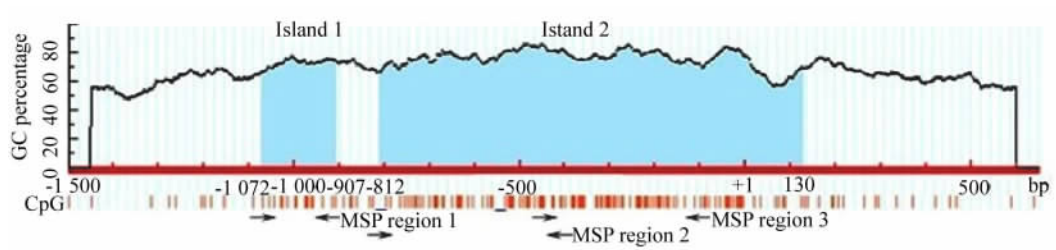


图 1 RASSF7 基因 CpG 岛的分布及 MSP 引物位置

Fig. 1 Distribution of CpG island and the locations of primers for MSP in RASSF7 gene

1.6 免疫组织化学方法检测 ESCC 组织中 RASSF7 蛋白的表达

每个蜡块常规 4 μm 连续切片 4 张, 1 张用于 HE 染色, 其余用于免疫组化检测。免疫组化检测采用常规 SP 法, 切片经脱蜡、封闭、修复, 滴加一抗 (兔抗人 RASSF7 多抗, 1:400 稀释), 4℃ 过夜。次日按照 SP 组化试剂盒依次滴加试剂, DAB 显色, 苏木精复染、梯度脱水、透明、中性树胶封片。设空白对照组, 以 PBS 代替一抗。以肺癌组织作为阳性对照。RASSF7 蛋白以胞质中出现棕黄或棕褐色颗粒为阳性表达, 结果判定标准: 物镜下阳性细胞数所占百分比 < 10% 为 1 分; 10% ~ 50% 为 2 分; 51% ~ 75% 为 3 分; > 75% 为 4 分。再依据多数阳性细胞呈现出的染色强度记为 4 个等级: 无显色记为 0 分; 淡黄色记为 1 分; 棕黄色记为 2 分; 棕褐色记为 3 分。将上述两项得分相加: 0 分为“-”, 1 ~ 2 分为“+”, 3 ~ 4 分为“++”, 5 ~ 6 分为“+++”。“+”、“++”、“+++”定义为阳性表达, “-”、“+”定义为阴性表达。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的组间比较采用 *t* 检验和近似 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 和校正 χ^2 检验, 双侧检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-dC 处理前后食管癌细胞中 RASSF7 mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果 (图 2) 显示, RASSF7 基因在 TE13、T. Tn、YES-2 细胞系中表达呈阳性, 在 Ec109 食管癌细胞系中表达很低, 经 5-Aza-dC 处理后, RASSF7 mRNA 在 TE13 细胞 (0.44 ± 0.09 vs 0.67 ± 0.10 , $t = -4.987$, $P = 0.038$)、T. Tn 细胞 ($0.39 \pm$

0.11 vs 0.70 ± 0.12 , $t = 6.098$, $P = 0.026$) 和 YES-2 细胞 (0.37 ± 0.08 vs 0.72 ± 0.12 , $t = 6.545$, $P = 0.023$) 中相对表达量显著降低; 而 Ec109 细胞中 RASSF7 mRNA 相对表达量显著升高 (0.40 ± 0.07 vs 0.12 ± 0.05 , $t = -6.234$, $P = 0.025$)。

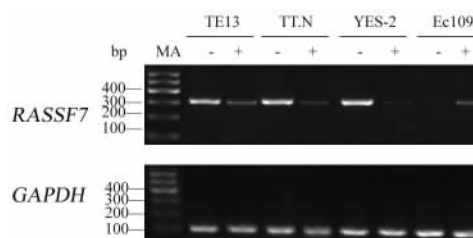


图 2 5-Aza-dC 处理前后食管癌细胞中 RASSF7 mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of RASSF7 mRNA in esophageal cancer cell lines before and after treated with 5-Aza-dC

- : Untreated with 5-Aza-dC; + : Treated with 5-Aza-Dc

2.2 RASSF7 mRNA 在 ESCC 组织中高表达

RT-PCR 检测结果 (图 3) 显示, 69 例 ESCC 组织中 RASSF7 mRNA 的相对表达量显著高于癌旁组织 (0.63 ± 0.08 vs 0.42 ± 0.20 , $t = 8.184$, $P = 0.000$)。分组分析 (表 2) 发现, 有淋巴结转移组的 RASSF7 mRNA 相对表达量显著高于无淋巴结转移组, 高、中分化鳞癌组 RASSF7 mRNA 的相对表达量显著低于低分化鳞癌组; 而不同 TNM 分期、年龄及性别组间的 RASSF7 mRNA 的相对表达量差异无统计学意义。

2.3 RASSF7 基因在食管癌细胞及 ESCC 组织中均未发生甲基化

MSP 检测结果显示, 启动子区远端及近端的 3 对甲基化引物在 5-Aza-dC 处理前后的 4 株食管癌

细胞系(图 4)、69 例 ESCC 组织及相应癌旁组织(图 5)中均未检测到 RASSF7 的甲基化。

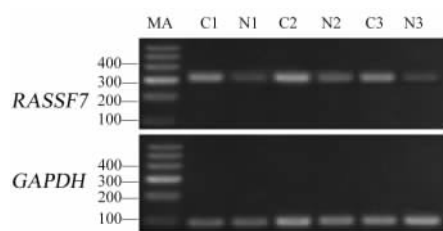


图 3 ESCC 及癌旁组织中 RASSF7 mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of RASSF7 mRNA in ESCC and pericarcinoma tissues

C(1-3): ESCC tissues; N(1-3): Corresponding pericarcinoma tissues

2.4 RASSF7 蛋白在 ESCC 组织中的表达

免疫组织化学方法检测结果(图 6)显示, RASSF7 蛋白表达于胞质。ESCC 组织中 RASSF7 蛋白阳性率显著高于癌旁组织[81.2% (56/69) vs 53.6% (37/69), $P < 0.01$]。RASSF7 蛋白在无淋巴结转移组的阳性率显著低于有淋巴结转移组,高、中分化组 RASSF7 蛋白阳性率显著低于低分化组;而不同 TNM 分期、年龄和性别组间 RASSF7 蛋白阳性率差异无统计学意义(表 2)。

统计分析结果表明, RASSF7 蛋白表达阳性的 ESCC 组织中 RASSF7 mRNA 相对表达量显著高于 RASSF7 蛋白表达阴性的 ESCC 组织(0.65 ± 0.07 vs 0.54 ± 0.04 , $t = 7.144$, $P = 0.000 < 0.05$)。

表 2 ESCC 组织中 RASSF7 基因的 mRNA 和蛋白表达与临床病理间的关系

Tab. 2 The correlation of mRNA and protein expressions of RASSF7 with ESCC clinical pathology

Feature	N	RASSF7 mRNA	t	P	RASSF7 n(%)	χ^2	P
Age(t/a)							
≤55	16	0.65 ± 0.08			14(87.5)		
>55	53	0.62 ± 0.08	1.396	0.167	42(79.2)	0.141	0.707
Gender							
Male	50	0.63 ± 0.08			41(82.0)		
Female	19	0.62 ± 0.08	0.505	0.615	15(78.9)	0.084	0.772
Lymph node metastasis							
Positive	33	0.66 ± 0.08			31(93.9)		
Negative	36	0.59 ± 0.06	4.151	0.000	25(69.4)	6.756	0.009
Differentiation							
Well/moderate	23	0.54 ± 0.03			12(52.2)		
Poor	46	0.67 ± 0.56	12.863	0.000	44(95.7)	16.219	0.000
TNM stage							
I + II	58	0.62 ± 0.08			46(79.3)		
III + IV	11	0.66 ± 0.08	1.592	0.116	10(90.9)	0.232	0.630

3 讨论

Ras GTP 酶是分子开关的一个超级家族,在 GTP 结合状态下 Ras 与其下游效应因子相互作用,并通过复杂的信号转导级联反应,介导 RAS 参与的细胞活动。两个研究得最为透彻的 Ras 效应因子是 Raf-丝氨酸-苏氨酸激酶^[6]和磷脂酰肌醇 3-激酶

(PI3-K)^[7]。近年发现一组新的 Ras 效应因子-Ras 相关域家族,它们直接或间接的与活化的 Ras 相互作用。*N-ras* 基因是一种 GTP 酶,有研究^[8]认为 RASSF7 作为其特定效应因子,其 RA 域与 N-Ras 的 GTP 结合形式相互作用启动抗凋亡机制以抵御应激刺激,促进细胞存活,在缺乏 RASSF7 基因或利用 RNAi 敲除 *N-ras* 基因的细胞中,应激所诱导的细

胞凋亡便会增加。

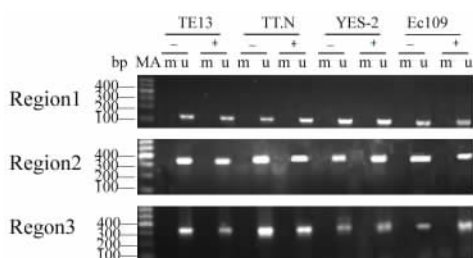


图 4 4 株食管癌细胞系中 RASSF7 均不存在甲基化

Fig. 4 No methylation of RASSF7 was detected in 4 esophageal cancer cell lines

- : Untreated with 5-Aza-dC; + : Treated with 5-Aza-dC; m: Methylation; u: Unmethylation

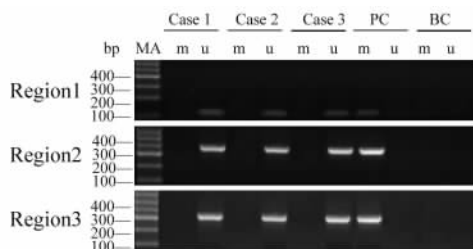


图 5 食管鳞癌组织中 RASSF7 不存在甲基化

Fig. 5 No methylation of RASSF7 was detected in ESCC tissues

PC: Positive control; BC: Black control

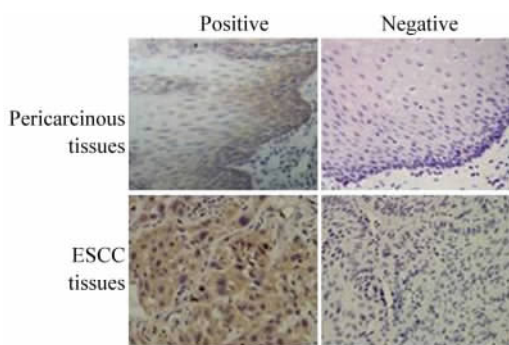


图 6 ESCC 组织中 RASSF7 蛋白的表达 (SP, ×400)

Fig. 6 Protein expression of RASSF7 in ESCC (SP, ×400)

RASSF7 对于有丝分裂是至关重要的, 敲除 RASSF7 会阻碍纺锤体形成, 导致核碎裂、细胞周期阻滞、神经管组织结构缺失等一系列生长缺陷, 最终使细胞走向凋亡^[4], 然而其具体作用及其机制尚不明确。RASSF7 广泛表达于多种组织及肿瘤细胞系中^[1,9-10], 且基因芯片研究^[9, 11-15]表明, RASSF7 在多种癌组织中表达上调。Sherwood 等^[4]指出, RASSF7

在肿瘤组织比正常组织上调 87 倍, 认为 RASSF7 可能促进癌症的形成。RASSF 家族中的若干成员已被证实为肿瘤抑制基因并且在多种肿瘤类型中检测到甲基化^[1, 10], 为了明确 RASSF7 对肿瘤是否具有类似抑制作用, Asha 等^[9]敲除非小细胞肺癌细胞株 H1792 中 RASSF7 的表达, 发现 H1792 细胞克隆形成力明显降低, 由此推测 RASSF7 可能具有促癌的特性。不同于 RASSF 家族的其它基因, 有学者经结合重亚硫酸盐限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)分析发现, RASSF7 在乳腺癌白血病、直肠癌、神经胶质瘤和肺癌等多达 63 种癌细胞系中均未发现甲基化^[9]。然而, 迄今在 ESCC 中还尚未见此类的报道。本研究设计了适用于 RASSF7 所有转录本的引物并检测了 5-Aza-dC 处理前后的 4 株食管癌细胞系 TE13、T. Tn、YES-2、Ec109 中 RASSF7 mRNA 的表达情况, 结果显示, 其在 Ec109 细胞中表达缺失, TE13、T. Tn、YES-2 表达阳性, 这与报道的 RASSF7 在多种癌细胞系中均有表达相一致。然而, 经 5-Aza-dC 处理后 Ec109 表达增强, TE13、T. Tn、YES-2 表达减弱, 据此推断 RASSF7 在 TE13、T. Tn、YES-2 可能未发生甲基化或是甲基化未起到主导作用。因甲基化酶抑制剂 5-Aza-dC 可逆转多种基因的高甲基化状态, 从而使因高甲基化失活的基因得以重新表达, 在这些基因中可能有对 RASSF7 呈负性调控的基因, 它们的重新表达可能恢复对 RASSF7 的负性调控, 使得 TE13、T. Tn、YES-2 在 5-Aza-dC 处理后 RASSF7 表达减弱。同理推断, 在 Ec109 细胞系中, 可能是对 RASSF7 具有正性调控作用的基因参与了该转录水平的调控。5-Aza-dC 处理前后 RASSF7 在四株细胞系的表达差异可能与细胞系间的特性差异相关, 然而其具体机制有待深入研究。随后, 通过预测 RASSF7 基因 5' 端 CpG 岛情况的同时选取启动子上游区域进行研究, 在近端启动子区及远端启动子区设计 3 对甲基化引物, 利用 MSP 检测 4 株食管癌细胞系处理前后的甲基化状态, 结果均未检测到甲基化。提示 DNA 甲基化可能不是导致 RASSF7 在食管癌细胞系表达异常的机制。为排除药物浓度及细胞株等其它因素的干扰, 利用 RT-PCR 及免疫组化 SP 法检测 69 例 ESCC 组织及相应癌旁组织 RASSF7 mRNA 及蛋白的表达情况, 发现 ESCC 组织中 RASSF7 mRNA 水平和蛋白表达显著高于癌旁正常组织, 且与患者性别、年龄及临床分期无关, 与组织分化程度及淋巴结转移相关, 且低分化组显著高于高分化组, 有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 提示 RASSF7 基因的高

表达可能与食管癌的发生发展以及转移相关,这与 Sherwood 等^[3,4]报道的结果相一致。进一步检测 69 例 ESCC 组织及相应癌旁组织的甲基化状态,同样未检测出甲基化。此外考虑突变是导致肿瘤的常见机制之一,有学者运用突变筛选上皮肿瘤细胞系的方法,对 *RASSF7* 进行突变筛选,然而同样未检测到 *RASSF7* 基因的突变^[9]。因此,*RASSF7* 在肿瘤发生发展中的详尽机制有待进一步探究。

总之,本研究结果提示,*RASSF7* 在 ESCC 细胞系及组织中的异常高表达可能是导致食管癌发生发展的重要机制之一。可以通过检测这些肿瘤相关基因的表达情况来寻找可能成为 ESCC 早期诊断的分子标记物,开发更为专一的抗肿瘤药物或治疗方案,提高 ESCC 的治疗效果并改善预后。

[参 考 文 献]

- [1] Van Der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 58-85.
- [2] Weitzel JN, Kasperczyk A, Mohan C, et al. The HRAS1 gene cluster: Two upstream regions recognizing transcripts and a third encoding a gene with a leucine zipper domain [J]. *Genomics*, 1992, 14(2): 309-319.
- [3] Sherwood V, Recino A, Jeffries A, et al. The N-terminal RASSF family: A new group of Ras-association-domain-containing proteins, with emerging links to cancer formation [J]. *Biochem J*, 2010, 425(2): 303-311.
- [4] Sherwood V, Manbodh R, Sheppard C, et al. RASSF7 is a member of a new family of RAS association domain-containing proteins and is required for completing mitosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(4): 1772-1782.
- [5] Falvella FS, Manenti G, Spinola M, et al. Identification of RASSF8 as a candidate lung tumor suppressor gene [J]. *Oncogene*, 2006, 25(28): 3934-3938.
- [6] Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions [J]. *Biochem J*, 2000, 351 (Pt 2): 289-305.
- [7] Downward J. Ras signalling and apoptosis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(1): 49-54.
- [8] Takahashi S, Ebihara A, Kajiho H, et al. RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7 [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 18(4): 645-655.
- [9] Recino A, Sherwood V, Flaxman A, et al. Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation, Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis [J]. *Biochem J*, 2010, 430(2): 207-213.
- [10] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 114-128.
- [11] Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10): 2649-2657.
- [12] Lowe AW, Olsen M, Hao Y, et al. Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(3): e323.
- [13] Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, et al. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 83(2): 177-185.
- [14] Tan DS, Lambros MB, Rayer S, et al. PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2269-2280.
- [15] Friess H, Ding J, Kleeff J, et al. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(6): 1180-1199.

[收稿日期] 2014 - 03 - 20

[修回日期] 2014 - 06 - 23

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、时刻必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006 - 02 - 15、5 h、30 min、30 s、14: 36: 08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万 ~ 10 万,不能写成 5 ~ 10 万; 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$, 或 $(3 \sim 5) \times 10^9$, 不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$; 60% 至 70% 不能写成 60 ~ 70%, 应写成 60% ~ 70%; 25.5 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 0.5) mg。(5) 带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 4 mm × 2 mm × 3 mm, 不能写成 $4 \times 2 \times 3$ mm 或 $4 \times 2 \times 3$ mm³。

(本刊编辑部)