

·成果简介·

## 鼻咽癌分子遗传学研究成果简介\*

曾益新 等

(中山大学肿瘤防治中心, 广州 510275)

[关键词] 鼻咽癌, 基因畸变, 基因表达

鼻咽癌多发于我国广东省和广西壮族自治区等地区, 对高发区广大人民的身体健康带来极大危害。为了做好鼻咽癌(NPC)的预防工作, 进一步提高NPC的早期诊断和治疗水平, 开展我国尤其是华南高发地区NPC的发生发展的分子遗传机制研究是一项紧迫而重要的课题。由于鼻咽癌在欧美发达国家为罕见疾病, 一直以来有关研究在这些国家均未得到重视, 而NPC在国内的研究进展也相对缓慢, 国内外尚没有对该课题进行系列研究, 有关的研究结果也未能全面反映NPC的遗传变异对该肿瘤的临床病理的影响。该研究项目自1997年开始, 在国家重大基础研究规划(973计划)、国家863计划、美国中华医学基金(CMB)及国家自然科学基金等研究基金的资助下, 结合我国资源优势, 应用最新的分子生物学和分子遗传学技术对鼻咽癌进行了大样本、全方位、多层次的系统研究, 完整地揭示了鼻咽癌在染色体及基因水平的变异情况, 确立了遗传因素参与NPC的发生发展的分子机制。主要在以下三个方面进行了系统研究并取得了阶段性成果。

### 1 染色体水平的变异研究

用比较基因组杂交技术和微卫星多态性分析技术, 研究了大样本量NPC的全基因组的染色体遗传变异, 明确了各染色体在鼻咽癌细胞中的扩增和缺失情况, 定位了NPC等位基因杂合性高频缺失区, 并率先报道了鼻咽癌在染色体特定区域的缺失与NPC临床病理(T分期、N分期、TNM分期、病人血清EBV IgA/VCA和IgA/EA、病理亚型)变化的关系<sup>[1-3]</sup>。本系列研究的具体内容及成果包括以下方面:

(1) 用微卫星多态性分析技术定位了大样本量(90例, 为所有文献报道最多)鼻咽癌全基因组等位基因杂合性缺失(LOH)区, 证明NPC在染色体3p, 9p, 9q, 11q, 13q, 14q, 16q等区域发生高频缺失, 新发现NPC在染色体1p36-p34, 2p25-p24, 5q13-q11, 5q31-q33和19q13发生高频LOH。精确定位了鼻咽癌在染色体1p36区的缺失区, 报道了在1p36.11-36.22内可能存在至少一个与NPC发生相关的肿瘤抑制基因(TSG)。

(2) 用比较基因组杂交技术(CGH)研究, 观察到NPC在染色体12q、4q、3q、1q和18q等存在遗传物质扩增, 其中共同扩增区位于12q13-q15、4q12-q21和3q21-q26; 在3q21-q26.2、4p12-q21、8p和12q14-q15等; 在染色体16q、14q、1p、3p、16p、11q和19p等区发生染色体物质的丢失, MDRs分别位于14q24-qter、1pter-p36.1、3p22-p21.3、11q21-qter和19p远端区。

(3) 率先报道了染色体特定区域的缺失与NPC临床病理(T分期、N分期、TNM分期、病人血清EBV IgA/VCA和IgA/EA、病理亚型)的关系。9p21和19q13区LOH与晚期(T3+T4, III+IV)NPC密切相关, 12p11区LOH与早期NPC(T1+T2)有关; 血清抗EBV IgA/VCA和IgA/EA滴度高的鼻咽癌病人在16q和19q13发生高频LOH; WHO-III型鼻咽癌在染色体4q21和14q11-q12发生高频LOH。表明9p21, 16q和19q13等区的杂合性缺失与鼻咽癌的侵袭、发展有一定关系; 研究同时发现, LOH量化值高(FAL值, fractional allelic loss value)并伴随血清高滴度EBV/EA和EBV/VCA抗体的NPC病人, 多表现为T3+T4期、远处淋巴结

\* 2005年度国家自然科学基金二等奖获奖项目。  
本文于2006年4月18日收到。

转移和进展期 TNM(III + IV 期), 而同时表现低频率 LOH 和低滴度 EBV IgA/VCA 和 IgA/EA 抗体的鼻咽癌病人, 大部分为早期(T1 + T2, TNM - I + II), 提示 EBV 感染与特定染色体区的 LOH 可能在 NPC 的发生发展机制中起协同作用; CGH 分析发现染色体 1q、8q、18q 的扩增和 9p 的丢失与 NPC 临床晚期进展有密切关系<sup>[1-3]</sup>。

## 2 基因水平的变异研究

具体内容及成果包括以下方面:

(1) 率先对不同分期的 NPC 组织用 Microarray 技术检测基因表达谱(含 17 000 个 cDNA 片段), 发现不同 TNM 期 NPC 与非癌鼻咽组织有不同的差异表达基因, 有 166 个 ESTs 在 II 期 NPC 与非癌鼻咽组织之间有差异表达, 88 个 ESTs 在 III 期 NPC 与非癌鼻咽组织之间有差异表达, 30 个 ESTs 在 III 期 NPC 与非癌鼻咽组织之间有差异表达, 5 个 EST 在所有 4 个不同 TNM 期的 NPC 组织与非癌鼻咽组织之间均发生差异表达;

(2) 首次构建了含 300 余例鼻咽癌的组织芯片, 结合间期荧光原位杂交技术(FISH)技术和免疫组化技术, 检测了 p53、p16、c-myc、cyclin D1 和 c-erbB-2 基因表达状况。间期荧光原位杂交技术(FISH)研究发现部分鼻咽癌发生 c-myc、cyclin D1 和 c-erbB-2 基因扩增; cyclin D1 基因的扩增与 NPC 的中晚期进展可能有一定关系, 并与颈淋巴结转移正相关; c-erbB-2 基因的过表达与 17 号染色体多体性有关; 组织芯片结合免疫组织化学染色研究发现鼻咽癌发生高频率的 p16 蛋白缺失;

(3) 应用抑制性削减杂交法, 构建了鼻咽癌组织和非癌鼻咽组织的削减库, 并克隆到两个与鼻咽癌发病相关的新的候选基因, 其中 NP9(Gene Bank 登录号: BF718797)基因在鼻咽癌中表达下调, 并通过抑制核转录因子 NF- $\kappa$ B 的转录活性下调 Cyclin D1 的表达; EB 病毒 A73 基因在鼻咽癌组织中广泛表达, 并可能作为信号分子参与鼻咽上皮癌变过程的信号传递;

(4) 在高频率缺失区内, 在 SEMA3B 基因上共发现两个导致氨基酸改变的单核苷酸多态性 Thr415Ile 和 Ile242Met。在 Thr415Ile 多态位点中, 可导致 SEMA3B 基因功能缺陷的 Ile 等位基因频率在鼻咽癌患者中占有较高比例, SEMA3B 基因在鼻咽癌组织中发生高频率表达缺失, 提示该基因可能是与鼻咽癌发生相关的肿瘤抑制基因; 在该区我们

还发现 BLU 基因表达缺失与该基因启动子区甲基化有关<sup>[4,5]</sup>。

## 3 遗传易感性研究

通过对 1903 个讲广州方言的鼻咽癌家系进行复合分离分析, 明确了家族性鼻咽癌的遗传模式; 通过对 32 个讲广州方言的鼻咽癌高发家系进行全基因组扫描连锁分析、精细定位及单体型分析, 将鼻咽癌的遗传易感区域定位在 4 号染色体上(4p15.1-q12 区), 进一步研究工作把该区域缩小在 8.29cM 的 4p11-p14 区内。这些结果确立了遗传因素参与鼻咽癌的发病, 并为易感基因的克隆提供了基础; 流行病学研究发现, 鼻咽癌高危家族成员一级亲属的 SIR(标化发病比)是一般人群的 2.09 倍, 发病危险性是一般人群的 7.12 倍至 79.64 倍; 而且也发现鼻咽癌一级亲属患其他部位恶性肿瘤如肝癌、肺癌、食管癌、胃癌的风险显著降低, 提示广东省说广东话特定人群对鼻咽癌发病有易感性; 鼻咽癌高发家族成员 EB 病毒相关抗体呈高表达, 是鼻咽癌发生的高危人群<sup>[6-9]</sup>。

本研究小组有关 NPC 分子遗传变异的研究成果使我单位走在了该研究领域的前列, 已在权威的肿瘤或遗传刊物如 *Nature Genetics*, *Gene*, *Chromosome & Cancer*, *International Journal of Oncology*, *Cancer*, *International Journal of Cancer*, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *Anticancer Research*, *Chinese Journal of Medicine*, 《科学通报》, 《中华肿瘤学杂志》, 《中华病理学杂志》, 《中华遗传学杂志》及其他刊物发表论文 41 篇, 这些论文已被 SCI 论文引用 76 次。研究小组负责人曾益新被肿瘤领域著名的综述性刊物 *Seminars in Cancer Biology* 邀请以 Familial Nasopharyngeal Carcinoma 为名撰写综述<sup>[10]</sup>, 多次在国内和香港、日本召开的会议上作学术报告, 介绍本工作的进展; 同时, 多次接待国内同行参观学习, 并提供技术支持, 获得国内外同行的热烈反响。几年来, 本研究小组为国内外输送了 10 多名博士、硕士研究生, 并培养了数名有发展前景的中青年科学研究人才。

鼻咽癌是具有中国特色的恶性肿瘤, 尤其高发于广东地区。本工作发挥了特有的资源优势, 利用国际上先进的分子遗传学技术, 对大样本量标本进行了系统而深入的研究, 在国际上首次开展了全基因组连锁分析, 成功定位了鼻咽癌遗传易感区域, 明确了本地区高发鼻咽癌家族的遗传模式, 确立了遗

传因素在鼻咽癌发病中的作用,并为易感基因的克隆打下基础;本研究首次对大样本量鼻咽癌标本进行全基因组染色体变异分析,对鼻咽癌组织中一系列基因的表达、突变和多态与鼻咽癌发生发展的关系做了较深入的研究。基本上明确了本地区 NPC 发生的分子遗传变异谱,尤其是明确了 NPC 发生高频率遗传变异(扩增和杂合性缺失)的染色体,精细定位了发生高频率 LOH 的具体染色体区带;在国内外构建了第一块鼻咽癌组织芯片(Tissue Array),并结合 FISH 和免疫组化技术分析癌基因和抑癌基因的表达情况,首次将大容量基因芯片技术用于不同临床分期鼻咽癌差异基因表达研究,发现了不同 TNM 期鼻咽癌与非癌鼻咽组织有不同的差异表达基因;率先报道了某些染色体的杂合性缺失与鼻咽癌临床病理(T 分期、N 分期、TNM 分期、病人血清 EBV IgA/VCA 和 IgA/EA、病理亚型)有密切关系,发现了与 NPC 临床病理改变如 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤浸润、组织病理分型相关的遗传变异区,对于将来在分子水平建立 NPC 新的分子分期和分子分型系统具有特别重要的意义,并提出了遗传变异和 EBV 感染可能在 NPC 发生发展过程中起协同促进作用的观点和论据。该研究部分成果已达到国际先进、国内领先水平,对今后 NPC 肿瘤易感基因(或相关基因)的定位和克隆有重要指导意义,对 NPC 早期诊断、治疗和预后判断有重要价值。

(参加本课题研究工作的还有:方熾、邵建永、冯炳健、黄薇、贾卫华、刘晓琼、陈汉奎、夏建川、鄢践、郭颖、黄必军、梁启万、张锋、张林杰、马英红、黄贻学、刘启才)

## 参 考 文 献

- [1] Shao JY, Wang HY, Zeng YX. Genome-wide allelotyping analysis of sporadic primary nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncology*, 2000, 17: 1267—1275.
- [2] Fang Y, Guan XY, Trent J. Analysis of genetic alterations in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2001, 30: 254—260.
- [3] Shao JY, Huang XM, Zeng YX. Loss of Heterozygosity in Human Nasopharyngeal Carcinoma: Clinical and Epstein-Barr Virus Infection Correlation. *Anticancer Res*, 2001, 21(4): 3021—3030.
- [4] Liu XQ, Zhou Y, Zeng YX. Transcriptional gene expression profile of human nasopharynx. *Int J Mol Med*. 2004, 14(3): 409—420.
- [5] Liu XQ, Chen HK, Zeng YX. Alterations of BLU, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, in human nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2003, 106: 60—65.
- [6] Feng BJ, Huang W, Zeng YX. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4. *Nature Genetics*, 2002, 31: 395—399.
- [7] Jia WH, Feng BJ, Zeng YX. Familial risk and clustering of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China. *Cancer*. 2004 Jul 15, 101(2): 363—369.
- [8] 陈汉奎,冯炳健,曾益新等.单倍体型分析将家族性鼻咽癌易感基因定位于 4p11-p14 区域. *科学通报*, 2003, 48(16): 1776—1779.
- [9] Jia WH, Collins A, Zeng YX et al. Complex segregation analysis of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China: evidence for a multifactorial mode of inheritance (complex segregation analysis of NPC in China). *Eur J Hum Genet*. 2004, (13): 248—252.
- [10] Zeng YX, Jia WH. Familial nasopharyngeal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*, 2002, V454: 1—8.

## STUDY ON THE MOLECULAR GENETIC ALTERATIONS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Zeng Yixin

(Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510275)

**Key words** nasopharyngeal carcinoma, genetic aberration, gene expression