

# slp-76基因在肝癌及其他消化系统肿瘤中的差异表达分析

李鑫<sup>1</sup>, 卢联合<sup>1</sup>, 李文东<sup>1</sup>, 赵红心<sup>1</sup>, 丁芳<sup>2</sup> (1. 北京地坛医院, 北京 100015; 2. 中国医学科学院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** 目的 分析slp-76基因在肝癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结肠癌及其癌旁组织中的表达情况。方法 应用微阵列技术筛选出slp-76基因在肝癌组织中高表达, 以逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对上述消化系统肿瘤组织及其癌旁组织中的slp-76基因表达进行检测; 应用Northern blot技术对肝癌组织及其癌旁组织中的slp-76基因表达进行检测。结果 RT-PCR证实slp-76在79.3% (24/29)的肝癌组织中高表达( $P=0.005$ ); 在73.3% (22/30)的食管癌组织中高表达( $P=0.005$ ); 在75% (21/28)的贲门癌组织中高表达( $P=0.014$ ); 在75% (15/20)胃癌组织中高表达( $P=0.005$ ); 在72.2% (13/18)结肠癌组织中高表达( $P=0.008$ ); Northern blot证实slp-76基因在肝癌组织中呈高水平表达。结论 slp-76基因在消化系统肿瘤中高表达, slp-76与上述消化系统肿瘤生长关系密切; 在RNA水平, 该基因在上述肿瘤间的表达无显著性差异( $P=0.968$ )。

**关键词:** 消化系统肿瘤; slp-76基因; 差异表达

## Differential expression and analysis of slp-76 gene in cancer and adjacent normal tissue of hepatocellular carcinoma and other digestive system cancers

LI Xin<sup>1</sup>, LU Lian-he<sup>1</sup>, LI Wen-dong<sup>1</sup>, ZHAO Hong-xin<sup>1</sup>, DING Fang<sup>2</sup> (1. Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China; 2. Key Laboratory of Molecular Oncology of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To confirm the microarray hybridization results and examine the expression of slp-76 gene in cancer and adjacent normal tissue of hepatocellular carcinoma and other digestive system cancers.

**Methods** According to analysis results of microarray, distinctly expressed slp-76 gene was screened out. RT-PCR and Northern blot techniques were applied to check expression of slp-76 in digestive system cancers and adjacent normal tissue. **Results** By RT-PCR analysis, we found that slp-76 gene overexpressed in cancers of the digestive system. By Northern blot, slp-76 gene was confirmed to be up-expressed among total 6 samples of hepatocellular carcinoma. **Conclusions** Slp-76 gene was differentially expressed in cancers of the digestive system and closely related to growth in cancers of digestive system. At RNA level, this gene showed no statistical differentiation among cancers of the digestive system ( $P=0.968$ ).

**Key words:** Digestive system cancers; slp-76 gene; Differential expression

slp-76为人酪氨酸磷酸蛋白, 具有激活T细胞, 促进白细胞介素-2分泌的作用, 其基因定位于染色体5q33, 全长2032 bp。目前, slp-76在肿瘤中的作用尚不清楚。本研究应用微阵列技术筛选发现slp-76基因在肝癌及其癌旁组织中差异表达显著, 为了解slp-76与肝癌及其他消化系统肿瘤之间的关

系, 在RNA水平检测slp-76基因在肝癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结肠癌及其癌旁组织中的差异表达情况, 希望寻找与肝癌及其他消化系统肿瘤发生发展相关的候选标记基因, 为癌变基因的研究和临床诊治提供新的靶点。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

原发性肝癌29例、食管癌30例、贲门癌28

通讯作者: 李鑫 Email: leaxin@sina.com

例、胃癌20例、结肠癌18例的癌组织及其癌旁组织,取自北京地坛医院和中国医学科学院肿瘤医院,术前患者均未接受过化疗或放疗,病理诊断:肝癌组织为早期肝细胞癌,癌旁组织为正常肝组织并除外癌细胞浸润;食管癌组织为低、中、高分化鳞癌;贲门癌、胃癌、结肠癌组织均为低、中、高分化腺癌,癌旁组织为正常或单纯性增生柱状上皮,并除外癌细胞浸润。

## 1.2 主要试剂

Trizol试剂购自美国Gibco公司;PCR试剂为Promega产品;PCR Marker购自Gibco公司;PCR引物由上海生物工程技术有限公司合成。

## 1.3 方法

1.3.1 采用Trizol试剂提取组织总RNA 取新鲜组织0.5 g,捣碎后置样品管中,加入5 ml裂解液,充分震荡,使沉淀完全溶解,加入1 ml氯仿混匀,12 000 转/分钟离心15 分钟,小心吸取上层水相,加入2.5 ml 异丙醇混匀,12 000 转/分钟离心10 分钟,弃上清,加75%乙醇5 ml,10 000 转/分钟离心5 分钟弃上清,室温晾干约20 分钟,即可得到标本的总RNA,加DEPC水溶解后,加3倍体积无水乙醇,-70℃放置保存。

1.3.2 RNA-cDNA反转录 向处理好的样品中加入Oligo (dT),70℃水浴10分钟,加入7 μl 逆转录液,42℃水浴5分钟,加1 μl 酶混合液,42℃水浴30分钟。

1.3.3 RT-PCR ①slp-76基因目的片段长229 bp:上游引物为5'-AGCCACCTGTGCCAAAGCAT-3',下游引物为5'-TATGGTGGCAGGAGGCA CT-3';内参GAPDH 扩增片段长500 bp,上游引物5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3';②slp-76 Northern blot引物:扩增片段为732 bp,上游引物5'-TGTGCAACGGTTCCTGCCT-3',下游引物5'-GCTTCCCGGTGCCTCTGTCT-3'。反应在PE公司9600型DNA扩增仪上进行,以DEPC水代替cDNA作为阴性对照,以GAPDH作为内参照。按下述条件扩增:94℃预变性3分钟,92℃30秒,58℃30秒,72℃1分钟,28个循环后于72℃延伸5分钟。

1.3.4 电泳分析 取10 μl PCR反应产物在含EB的2%琼脂糖凝胶上电泳,图像分析仪采集图像,以内参GAPDH为基准,进行半定量分析,即以扩增目的片段/GAPDH的灰度比值代表所扩增目的基因片段的相对表达水平,值越大表示slp-76基因表达水平越高。

1.3.5 Northern印迹杂交 用Trizol分别提取6例肝癌患者及其癌旁组织的总RNA。转膜:取Hybond N+尼龙膜,将已润湿的3 MM滤纸铺于尼龙膜上转膜16~24 小时。取下尼龙膜,在Gene-linker紫外交联30 秒,使RNA固定于膜上。用 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP标记探针,纯化变性后,按标准Northern印迹方法<sup>[1]</sup>进行杂交。

## 1.4 统计学处理

原始数据经SPSS 11.5软件进行统计学处理。Fisher's Exact Test统计学结果采用 $\chi^2$ 检验并以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

通过RT-PCR分析发现,slp-76基因在79.3% (24/29)肝癌组织中高度表达(图1),癌组织与癌旁组织表达水平差异有显著统计学意义, $\chi^2$ 检验 $P = 0.005$ ;在73.3% (22/30)食管癌组织中高表达,癌组织与癌旁组织表达水平差异有显著统计学意义, $\chi^2$ 检验 $P = 0.005$ ;在75% (21/28)贲门癌组织中高表达,癌组织与癌旁组织表达水平差异有显著统计学意义, $P = 0.014$ ;在75% (15/20)胃癌组织中高表达,癌组织与癌旁组织表达水平差异有显著统计学意义, $P = 0.005$ ;在72.2% (13/18)结肠癌组织中高表达,癌组织与癌旁组织表达水平差异有显著统计学意义, $P = 0.008$ 。slp-76基因在肝癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结肠癌之间的表达水平经统计学比较发现:在RNA水平,该基因在上述肿瘤间的表达无显著性差异( $P = 0.9684$ )。6例肝癌和癌旁组织的Northern杂交分析显示slp-76基因在4例肝癌组织中高表达,而其对应的癌旁组织中表达微弱甚至缺失(图2)。

## 3 讨论

slp-76是一个分子量为76 kD,含有SH2结构

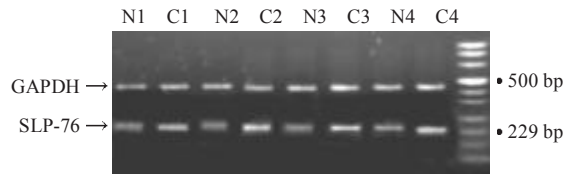


图1 SLP-76在肝癌(C)与癌旁组织(N)中的表达

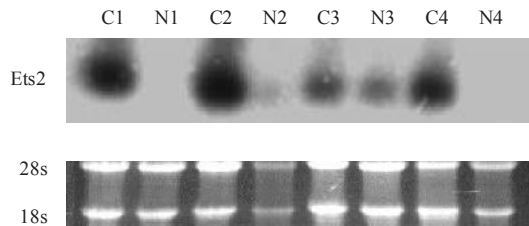


图2 SLP-76在肝癌(C)与癌旁组织(N)中的表达

域的白细胞蛋白。其cDNA全长为1984 bp, 染色体定位在5q33.1<sup>[2]</sup>。其编码了一个含有533个氨基酸的蛋白, 并含有3个结构域: N-端包含了一个PEST结构域和几个酪氨酸残基, 上面有多个酪氨酸磷酸化位点; 另外两个结构域分别为一个中心富集脯氨酸的结构域和一个含有羧基末端的SH2结构域<sup>[3]</sup>。SH2最初是从癌基因产物Src蛋白鉴定出来的, 其功能是特异结合磷酸化的酪氨酸, SH2区和磷酸化的酪氨酸结合后产生生物化学效应, 从而保证信号的顺利转导<sup>[4]</sup>。

本研究发现, slp-76在肝癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结肠癌中均高表达( $P > 0.05$ ), 这提示高表达的slp-76基因可能与上述消化系统肿瘤的发生或发展密切相关。统计学分析发现slp-76基因在肝癌、食管癌、贲门癌、胃癌、结肠癌之间RNA水平的表达无显著性差异( $P = 0.9684$ ), 这提示该基因非上述某种消化系统肿瘤的特异性基因。有研究证实, slp-76基因主要在T细胞、B细胞和自然杀伤细胞中表达<sup>[5]</sup>, slp-76具有衔接子或支架蛋白的功能, 在T细胞系中, 高度表达的slp-76可增加T细胞抗原受体(TCR), 从而激活IL-2启动子<sup>[6]</sup>, 产生IL-2并促进淋巴细胞发育<sup>[7]</sup>, 最终实现T细胞的免疫功能。在slp-76缺失的T细胞系, 不

再出现钙离子动员或在对TCR刺激的反应中出现ras途径的活化<sup>[8]</sup>, 导致胸腺细胞静止于发育的双阴性阶段<sup>[9]</sup>。因此, slp-76对于T细胞系 $\alpha$ 、 $\beta$ TCR的成熟并介导信号转导是必需的<sup>[10]</sup>。slp-76在上述肿瘤中高度表达, 提示了在肿瘤发生后, slp-76可能促使机体的免疫系统发挥作用。众所周知, 肿瘤的发生发展是多基因多阶段的过程, 在这一过程中, 涉及到多个癌基因和抑癌基因, 虽然slp-76在肿瘤中高表达, 但却未能抑制肿瘤的发生发展, 目前尚无关于slp-76与肿瘤关系的深入报道, 该基因虽然在RNA水平高度表达, 但其在肿瘤中的作用, 其编码的蛋白具有诱导细胞恶性转化的作用, 还是作为抑癌基因存在, 其与肿瘤发生、发展的关系如何尚待探讨。因此, 进一步认识slp-76的功能, 有助于理解肿瘤免疫调节的分子机制, 在肿瘤的诊断和治疗领域拓展新的思路、开辟新的途径。

#### 参考文献

- [1] J.萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯(金冬雁等译). 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.363-372.
- [2] Sunden SL, Carr LL, Clements JL, et al. Polymorphism in and localization of the gene LCP2 (SLP-76) to chromosome 5q33.1-qter. Genomics[J], 1996,35:269-270.
- [3] Jackman JK, Motto DG, Sun Q, et al. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells[J]. J Biol Chem, 1995,270:7029-7032.
- [4] 曾益新主编. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [5] Wong J, Ishiai M, Kurosaki T, et al. Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins[J]. J Biol Chem, 2000,275:33116-33122.
- [6] Musci MA, Motto DG, Ross SE, et al. Three domains of SLP-76 are required for its optimal function in a T cell line[J]. J Immunol, 1997,159:1639-1647.
- [7] Pivniouk VI, Geha RS. The role of SLP-76 and LAT in lymphocyte development[J]. Curr Opin Immunol, 2000,12:173-178.
- [8] Sommers CL, Menon RK, Grinberg A, et al. Knock-in mutation of the distal four tyrosines of linker for activation of T cells blocks murine T cell development[J]. J Exp Med, 2001,194:135-142.
- [9] Beach D, Gonen R, Bogin Y, et al. Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma 1[J]. J Biol Chem, 2007,282:2937-2946.
- [10] Maltzman JS, Kovoov L, Clements JL, et al. Conditional deletion reveals a cell-autonomous requirement of SLP-76 for thymocyte selection[J]. J Exp Med, 2005,202:893-900.

收稿日期: 2007-07-21