

鼻咽癌分子标志物研究 *

张文玲¹⁾ 周艳宏¹⁾ 肖 岚¹⁾ 范松青²⁾
 曾朝阳¹⁾ 李小玲¹⁾ 武明花¹⁾ 李桂源^{1)**}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011)

摘要 鼻咽癌严重危害人类健康, 寻找其早期诊断及预后相关的分子标志物迫在眉睫. 在总结本课题组运用基因组学、转录组学、蛋白质组学和组织微阵列等高通量技术对不同分化阶段、不同组织类型和不同临床分期的鼻咽癌标本进行大规模筛选工作的基础上, 结合近年国际上有关进展, 初步构建了鼻咽癌不同发病阶段的分子靶标系统: a. 证实 SPLUNC1、p16、EBER-1、p27、RASSF1A 和 CDH13 是鼻咽癌早期诊断的理想分子靶标; b. 鼻咽癌上调基因 RB1, STMN1 和 DSP 及下调基因 SERPINB6, AGTRL1 和 SYTL2 的分类预测模型是区分正常鼻咽上皮和鼻咽癌的分子靶标; c. NGX6、Ezrin、LTF、OPN、THY1 和 Tiam-1 是鼻咽癌侵袭与转移预测的候选分子靶标; d. Cyclin D1、Survivin 和 HPA 是与鼻咽癌预后相关的候选分子标志物; e. 证实 Bcl-2、EGFR 和 Ki67 是预测鼻咽癌放疗敏感与否的候选分子靶标; f. SAA 和 cox-2 是监测鼻咽癌复发的候选分子标志物; g. 发现 BRD7、NGX6、NOR1 和 UBAP1 的 6 个 SNP 改变是鼻咽癌遗传易感风险因子; h. 建立了由 139 个基因组成的鼻咽癌不同临床分期分子靶标系统. 这些在大样本基础上的分子靶标筛选为鼻咽癌分子分型研究奠定了重要工作基础.

关键词 鼻咽癌, 癌基因, 抑癌基因, 分子靶标

学科分类号 Q74

鼻咽癌(NPC)是一种多基因遗传性疾病(polygenetic diseases), 其发病与遗传因素(遗传易感性)、EB 病毒感染、环境因素、饮食习惯等多种致癌因素有关. 目前 NPC 的发病机制还不十分清楚, 治疗效果也不理想, 5 年生存率仍徘徊在 50% 左右. 其原因主要与鼻咽癌发病部位隐蔽、鼻咽部组织构成复杂, 治疗方式较单一、缺乏特异性治疗药物有关, 且不同的鼻咽癌患者在病理类型、肿瘤分化程度、就诊时病变严重程度、临床表现、体质状况、对放疗化疗敏感性方面都存在着不同程度的差异. 因此寻找鼻咽癌早期诊断及预后相关的特异性分子标志物对实现鼻咽癌的早期诊断及个体化治疗具有深远意义.

1 鼻咽癌早期诊断的理想分子靶标

鼻咽癌发病部位隐蔽, 特别是在咽隐窝及鼻咽顶壁处, 早期症状不明显, 容易延误诊断和治疗, 因此筛选和鉴定鼻咽癌早期诊断特异的分子标志物, 对鼻咽癌进行早期诊断和治疗迫在眉睫. 本课题组通过多种基因克隆策略及自制的组织微阵列结

合原位杂交和免疫组化的方法证实 EBERs、p16、p27、SPLUNC1 是鼻咽癌早期诊断的理想分子靶标.

EBERs(EB virus encoded RNAs)是 EBER1 和 EBER2 的总称, 在所有已知的 EB 病毒潜伏感染中均有 EBERs 表达. Fan 等^[1]和 Zeng 等^[2]采用 EBER-1 原位杂交的方法发现, 在正常鼻咽上皮组织、不典型增生上皮组织仅偶尔见到 EBER-1 核阳性, 而在绝大多数的角化型鳞状细胞癌与非角化癌的癌细胞可见 EBER-1 核阳性. 表明 EB 病毒在正常鼻咽上皮就存在潜伏感染, 是鼻咽癌发生的早期事件.

p16 蛋白作为细胞周期的一种抑制因子, 主要通过 CDK4/CDK6 抑制, 降低或阻断 CDK4/

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB910502, 2006CB910504), 国家自然科学基金(30770825, 30700469), 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA02Z170)和全国优秀博士学位论文作者专项基金(200559)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2007-11-08, 接受日期: 2007-12-28

CDK6 对 pRb 的磷酸化修饰, 从而抑制细胞周期进程. p27 是一种非特异性的 CDKI, 主要作用于 G1 期 Cyclin-CDK 复合物, 抑制 CDK 的磷酸化从而抑制其激酶活性. Fan 等^[1]发现 p16、p27 蛋白失表达是鼻咽癌发生的早期事件, 可作为鼻咽癌早期诊断的候选分子靶. 也有研究^[3~5]报道 p16 与鼻咽癌复发关系密切. Baba^[6]等认为 p27 在鼻咽癌组织中表达下调是鼻咽癌发生的一个重要事件.

SPLUNC1 又名 NASG, 是一种鼻咽上皮固有免疫保护分子. Zhou 等^[7,8]发现, 它具有清除细菌和 EB 病毒的功能, 且能与纳米细菌结合, 在鼻咽癌发生的极早期阶段起固有免疫保护作用. 研究证明, 分泌性蛋白 SPLUNC1 在鼻咽上皮的不典型增生阶段及鼻咽癌患者的鼻咽分泌物中表达下调或缺失, 在鼻咽癌患者早期, 甚至鼻咽上皮还未出现不典型增生时, 即已出现明显下调或缺失, 是 NPC 早期分子诊断与患病风险筛查的理想分子靶标.

Zeng 等^[9]利用全基因组芯片分析发现鼻咽癌 3 个上调基因 RB1, STMN1 和 DSP 及 3 个下调基因 SERPINB6, AGTRL1 和 SYTL2 的分类预测模型能很好区分鼻咽癌和鼻咽慢性炎症上皮 (33/34, 97.1% 的正确率, Fisher's exact test, P -value = 8.389×10^{-8}), 因而该 6 个基因的合用有望作为鼻咽癌早期检测的分子标志.

RASSF1A 基因是最近新研究的位于 3p21.3 上的鼻咽癌候选抑癌基因之一, 属于 RAS 区域相关家族基因. RASSF1A 基因表达失活在鼻咽癌中经常发生, 可能由基因的突变或缺失引起, 也可能由于高甲基化等表观遗传(epigenetic)改变引起. Lo 等^[10, 11]证明了 RASSF1A 基因启动子 CpG 岛特异性甲基化与鼻咽癌的关系, 认为 CpG 岛甲基化是鼻咽癌发生的重要事件, 它的意义大于基因突变和缺失, 对鼻咽癌早期诊断、侵袭转移及治疗均有指导意义.

CDH13(heart-cadherin, H-cad)是一个独特的钙粘蛋白细胞粘附分子, 它在细胞粘附、信号转导及细胞生长调节等方面发挥着重要作用. 抑癌基因 CDH13 表达沉默可由其 5' 启动子区的异常甲基化、等位基因的缺失与异常甲基化的联合作用所致. 有研究发现 CDH13 与鼻咽癌密切相关. Sun 等^[12]报道 CDH13 启动子的异常甲基化与 H-cadherin 表达沉默密切相关, 且 CDH13 甲基化检测的敏感度达 81%, 特异度即假阳性为 0%, 这表明 CDH13 可用于鼻咽癌的早期诊断.

2 鼻咽癌侵袭、转移相关的候选分子标志物

肿瘤转移是一个非常复杂的过程, 基因不稳定和基因变异的积累, 通过影响生长因子和抑制因子之间的平衡, 可导致肿瘤侵袭性增强、新生血管形成, 最终引起转移. 其中可涉及多个癌基因和抑癌基因的改变, 并与激活的癌基因及抑癌基因之间的失衡有关. 我们通过定位克隆策略和基于鼻咽癌抑制消减杂交文库的 cDNA microarray 并结合组织微阵列筛选到 NGX6、LTF、Ezrin 等是鼻咽癌侵袭与转移预测的候选分子靶标.

NGX6 基因位于 9p21-22, 开放阅读框编码 338 个氨基酸, 即 NGX6 蛋白, 它可能是一种胞浆蛋白, 在 NPC 组织中表达下调, 转染 NPC 细胞系 HNE1 能够延缓其生长速度, 使肿瘤细胞更多地停留在 G0-G1 期. Ma 等^[13~15]发现 NGX6 基因的 EGF 和 CYTO 结构域是调节细胞粘附、运动迁移和生长增殖的关键功能域. NGX6 与 Ezrin 蛋白发生交互作用, 并下调 Ezrin 表达, 部分抑制 EGF 诱导的鼻咽癌 5-8F 细胞运动迁移, 减弱细胞侵袭能力, 增强细胞粘附和间隙连接通讯能力, 通过调节细胞外基质中粘附分子与降解酶系的表达、抑制肿瘤血管生成而抑制鼻咽癌的侵袭与转移.

Ezrin 是 ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)家族的重要成员. Ezrin 作为连接膜和细胞骨架的蛋白质, 通过组成膜细胞骨架相关复合体和形成特殊膜结构对细胞活动进行调节, 如细胞存活、粘附和运动, 而细胞的这一切活动都与肿瘤的发生、发展和转移有重要关系. Ezrin 的高表达可以促进肿瘤细胞的转移, 有文献报道 Ezrin 在转移性鼻咽癌中的表达高于非转移性鼻咽癌. Peng 等^[15]发现 Ezrin 在鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞系 5-8F 中均存在高表达, 当在 5-8F 细胞中用 RNAi 技术干扰掉 Ezrin 的表达后, 发现肿瘤细胞的侵袭能力减弱, 这表明 Ezrin 与鼻咽癌的进展和侵袭转移密切相关.

LTF(Lactotransferrin)基因编码乳铁转运蛋白, 旧称乳铁蛋白(lactoferrin, LF, DQ30560), 是一种糖蛋白, 广泛存在于乳汁、唾液、泪液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中. Xiong 等^[16]和周等^[17]先后通过对 18 个鼻咽癌家系的遗传连锁分析, 发现染色体 3p21 上 13.6 cM 区域(D3S1289~D3S1298)与鼻咽癌紧密连锁, 并制备了该区域内基因的特定芯片, 锁定了鼻咽癌发病相关的重要功能基因 LTF,

同时运用组织微阵列(TMA)和免疫组织化学技术对 LTF 基因蛋白质水平的表达情况在较大样本中进行了研究,发现 LTF 在鼻咽癌中表达下调,鼻咽癌旁和鼻咽慢性炎症组织中存在高表达。几乎所有的鼻咽部腺体均能检测到 LTF 蛋白的存在,证实 LTF 蛋白在腺体中高表达、为一细胞分泌性蛋白。此外, LTF 蛋白的表达与鼻咽癌转移呈负相关($P < 0.05$)。LTF 蛋白的表达与鼻咽癌临床分期存在显著相关性 ($P < 0.01$)。临床 I 期和 II 期鼻咽癌中 LTF 蛋白的表达明显高于临床 III 期和 IV 期($P < 0.01$) (尚未发表)。提示它可能与鼻咽癌的侵袭转移和临床进展有关,为鼻咽癌候选易感基因,可作为鼻咽癌侵袭、转移和临床进展预测的分子靶标。

骨桥蛋白 OPN (osteopontin) 是细胞外基质 (ECM) 中一种重要的功能性蛋白,与肿瘤细胞生长、增殖、侵袭和转移密切相关。Yeaman 等^[18]应用基因表达谱技术发现,OPN 被确定为临床上首选的新的肿瘤标记物。Tuck 等^[19]报道血浆 OPN 水平与乳腺癌转移密切相关。Wong 等^[20]发现非分化型鼻咽癌患者血清 OPN 水平与患者临床病理分级及颈部淋巴结转移相关。

THY1 基因位于染色体 11q22~23,该区域与鼻咽癌密切相关。Lung 等^[21]报道了 THY1 基因在鼻咽癌细胞系和鼻咽癌组织中的表达情况,发现该基因在鼻咽癌细胞系 HONE1 和其他几种鼻咽癌细胞系均存在表达缺失,其缺失是由于高甲基化所致;且在淋巴结转移性鼻咽癌中 THY1 基因表达下调的频率高达 63%,明显高于原发性肿瘤(33%)。当将 THY1 基因转染 HONE1 细胞后,克隆形成能力大大降低。这些说明 THY1 基因是一个鼻咽癌候选抑瘤基因,又由于它跟鼻咽癌转移密切相关,因此可作为鼻咽癌转移和进展的一个候选生物靶标。

T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 -1 (T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1, Tiam-1) 最初是由荷兰癌症研究所 Habets 等^[22]从 BW5147 小鼠 T 淋巴瘤细胞高侵袭变异株中分离鉴定得到的。cDNA 序列分析显示它可能是一种原癌基因。研究表明, Tiam-1 过表达可以诱导肿瘤细胞发生侵袭转移,其分子机制是 Tiam-1 与肿瘤“细胞骨架-粘附分子-细胞外基质”跨膜系统的相互作用、Tiam-1 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响以及其他肿瘤侵袭转移相关因子对 Tiam-1 活性的调控几方面。有文献报道 Tiam-1 基因在鼻咽癌组织中的表达明显高于正常鼻咽部组织,其过表达与鼻咽癌

浸润转移呈正相关。

3 鼻咽癌预后相关的候选分子标志物

鼻咽癌是一种高转移性恶性肿瘤,大部分患者就诊时已有颈部淋巴结转移而导致预后不良,因此,寻找可靠的预后预测标记物尤为重要,可指导临床上进一步治疗。我们通过自制的组织微阵列结合免疫组化的方法筛选到 Cyclin D1、Survivin 是与鼻咽癌预后相关的分子标志物。

CyclinD1 是细胞周期调节因子之一,对细胞周期进行正性调节。当 CyclinD1 表达失控时,细胞增殖周期发生失调,从而导致恶性肿瘤的发生。目前,在很多恶性肿瘤如鼻咽癌、喉癌、乳腺癌、食管癌、肺癌中等存在过表达。最近 Matthias 等^[23]还发现在头颈部鳞状细胞癌手术切除标本中 CyclinD1 蛋白过度表达是独立的预后因素。Hwang 等^[24]报道在鼻咽癌患者中, Cyclin D1 低表达患者比高表达患者更容易出现局部复发。我们通过生存曲线分析发现,在无病生存率(EFS)曲线中, Cyclin D1 低表达的患者较高表达的患者更容易复发, Cyclin D1 低表达的患者 3 年生存率为 30%,而 Cyclin D1 高表达的患者 3 年生存率为 70% (unpublished)。这表明 Cyclin D1 表达水平可作为鼻咽癌患者的预后分子靶标之一。

Survivin 属于凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 家族的成员, Survivin 与肿瘤对放、化疗的敏感性有关,有文献报道^[24]鼻咽癌患者中 Survivin 高表达的 3 年总生存率、无病生存率降低, Survivin 过表达与 NPC 患者预后差有关。我们利用组织微阵列和免疫组化技术发现, Survivin 蛋白在鼻咽癌组织中呈高表达,其阳性表达率显著高于癌旁上皮和鼻咽慢性炎症性上皮($P < 0.01$),而癌旁上皮其阳性表达率也高于鼻咽慢性炎症性上皮($P < 0.01$) (尚未发表)。

乙酰肝素酶 (heparanase, HPA) 是迄今发现的唯一能特异性降解细胞外基质和基底膜中的硫酸肝素糖蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 的内切糖苷酶。在肿瘤转移的过程中,肿瘤细胞过度表达乙酰肝素酶能破坏细胞外基质和基底膜,降低细胞间质屏障功能,促进肿瘤细胞侵入基质和血管壁,诱发新生肿瘤血管形成。Bar-Sela 等^[25]报道 heparanase 的表达与 NPC 患者的生存是呈负相关的,可作为 NPC 患者预后的一个可靠的指标,且可作为抗癌药物有效的靶标。

4 鼻咽癌放、化疗敏感与否的候选分子标志物

放射治疗是鼻咽癌首选的治疗方案,随着鼻咽癌综合治疗的发展,化学治疗在鼻咽癌治疗中也占有重要地位,因此寻找放、化疗敏感的分子标志物对提高鼻咽癌的疗效有重要意义.我们通过自制的组织微阵列结合免疫组化和原位杂交的方法证实 Bcl-2、EGFR 蛋白是预测鼻咽癌放疗敏感与否的候选分子靶标.

Bcl-2 基因为抗凋亡基因,它通过抑制细胞凋亡而延长细胞存活.我们利用免疫组化、原位杂交检测发现,80%的 NPC 组织中有 Bcl-2 表达,且在所有 EB 病毒感染的不典型增生细胞和正常鼻咽上皮细胞的基底层均有 Bcl-2 表达,但在 NPC 组织和不典型增生组织中的表达还是明显高于正常鼻咽上皮细胞,并且发生在病变早期,可能与 NPC 的发生、演进及转移密切相关.同时发现 Bcl-2 在鼻咽癌放疗敏感组和放疗不敏感组比较有统计学差异($P<0.01$),作为鼻咽癌放疗敏感性预测分子指标的有效性评估方面,灵敏度达 92.2% (尚未发表).

EGFR (epidermal growth factor receptor, EGFR) 通过与其配体表皮的生长因子(epidermal growth factor, EGF)或转化因子 α (transform growth factor α , TGF α)结合后,其酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)被激活,通过一系列细胞内信号传递启动细胞核内 DNA,促进细胞分裂增殖,改变细胞的代谢和行为. EGFR 在人类组织中大量存在,在恶性肿瘤中则发现其表达水平升高. Ma 等^[26]报道 EGFR 表达与未分化鼻咽癌患者预后差相关,提示 EGFR 表达情况可作为判断分析鼻咽癌病人预后的一个指标.我们发现 EGFR 在鼻咽癌组织中的表达(81.7%)明显高于癌旁上皮(62.4%)和炎性上皮(31.9%),在鼻咽癌放疗敏感组和放疗不敏感组比较均有统计学差异($P<0.01$) (尚未发表),表明 EGFR 可作为鼻咽癌患者的放化疗是否敏感指标之一.

Ki67 是一种细胞增殖核抗原,该基因位于人染色体 10q25(ter)上,与有丝分裂活动关系密切,表达于细胞增殖周期中除 G0 期以外的其他各期,有丝分裂后 Ki67 蛋白迅速降解.它是一个可靠而迅速地反映恶性肿瘤增殖率的指标,其高表达是细胞增殖活跃的重要标记,对肿瘤的转移及预后有影响,

并可作为评估鼻咽癌患者放射敏感性、预测预后的独立指标之一^[26].

5 监测鼻咽癌复发相关的候选分子标志物

血清淀粉样蛋白(serum amyloid A, SAA)由位于染色体 11p15.4-15.1 的 SAA1 和 SAA2 基因编码,它是一种急性时相反应蛋白,在正常人血清中表达水平很低,而在一些肿瘤如结肠癌、肾肿瘤患者的血清中则急剧升高.香港伊丽莎白医院临床肿瘤研究中心通过对鼻咽癌和正常个体的血清样本进行蛋白质分析研究,得出 SAA 是鼻咽癌相对特异的、具有监视鼻咽癌是否复发的重要生物学指标^[27].

环氧合酶-2(cox-2)是最近用于鼻咽癌研究的一个新的标志物,有文献报道^[28] cox-2 在鼻咽癌中的表达为 77%,主要参与肿瘤的血管生成和转移.在预后判断、复发监测方面有意义.

6 与鼻咽癌密切相关的几个 SNP 位点

本课题组^[29~32]通过直接测序、SNP 分析和家系关联分析,发现 BRD7 的(C450T 和 A737C)、NGX6 (rs879284)、UBAP1 (rs1049557)以及 NOR1 (ss2220003 和 ss3211583)中的 6 个 SNP 位点是鼻咽癌发生发展的重要遗传易感风险因子.同时 Xiao 等^[33]发现,从正常鼻咽上皮(图 1a)到鼻咽增生上皮(图 1b)及不典型增生鼻咽上皮(图 1c)再到鼻咽癌(图 1d)的演变过程中 UBAP1 蛋白的表达是依次减弱的(图 1)^[33].

此外,我们还建立了由 139 个基因组成的鼻咽癌不同临床分期的分子靶标系统.

根据以上所述,我们提出了鼻咽癌癌变不同阶段的分子标志物模式图(图 2).

7 结 语

综上所述,鼻咽癌的发生发展涉及了多个癌基因与抑癌基因的共同参与,这些癌基因的激活与抑癌基因的失活以及它们之间相互作用的失衡是鼻咽癌发生发展的分子基础.目前对这些分子标志物的研究还处于初步探索阶段,还须系统研究作用于鼻咽癌发病不同阶段的生物靶点基因,并在大样本的组织中进行验证及在临床试验中进行有效性评估,以期寻找更有利于鼻咽癌早期诊断及实现个体化治疗的分子靶标.

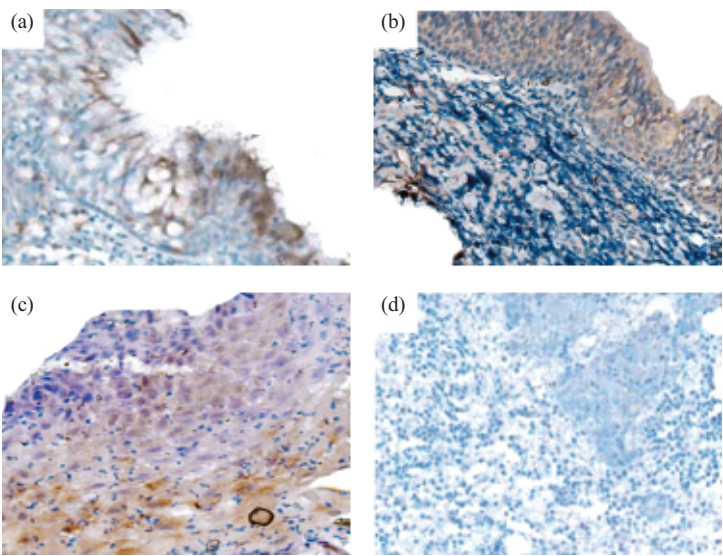


Fig. 1 The expression of UBAP1 protein in nasopharyngeal epithelium (NPE) and NPC tissues [39]
图 1 UBAP1 蛋白在鼻咽上皮及鼻咽癌组织中的表达 [39]

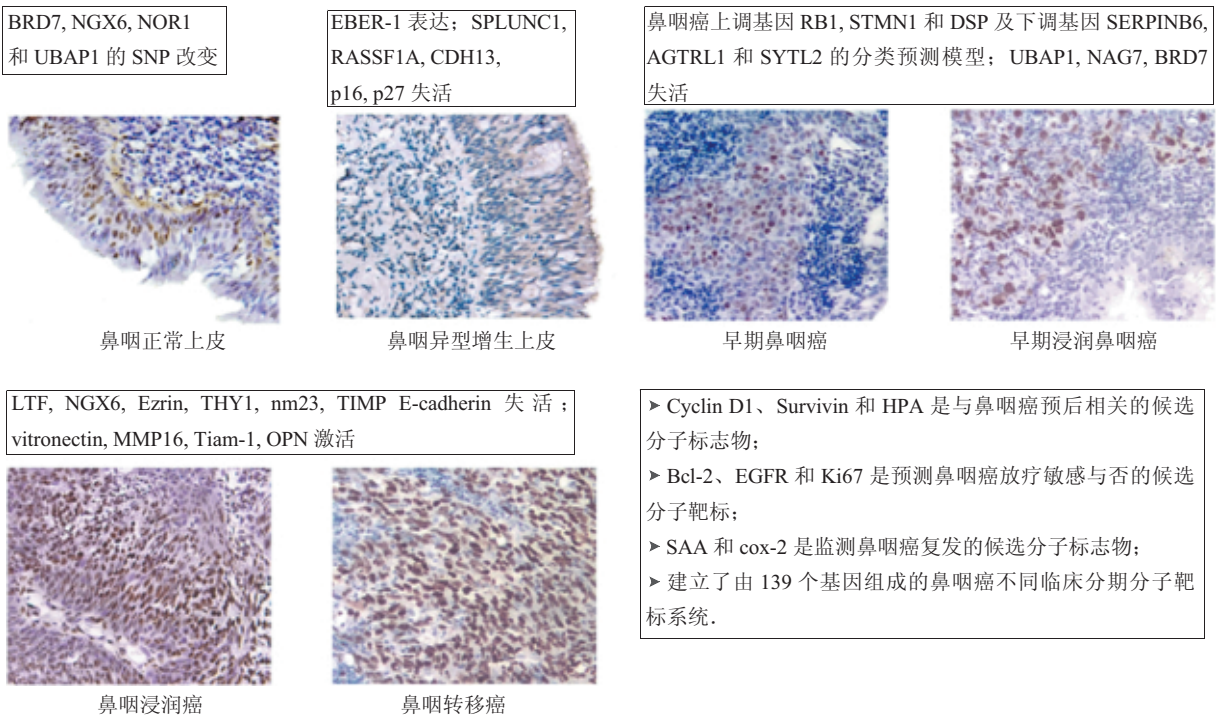


Fig. 2 Model of molecular markers involved in the multi-step process of NPC
图 2 鼻咽癌不同阶段分子标志物模式图

参 考 文 献

1 Fan S Q, Ma J, Zhou J, *et al.* Defferential expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and several tumor-related genes in various types of nasopharyngeal epithelial lesions and nasopharyngeal carcinoma using tissue microarray analysis. *Hum Pathol*, 2006, **37**:593~605

2 Zeng Z Y, Zhou Y H, Zhang W L, *et al.* Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Human Pathology*, 2007, **38** (1):120~133

3 Hwang C F, Cho C L, Huang C C, *et al.* Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol*, 2002, **13** (8):1246~1251

4 王力红, 姚 莉, 张尚福, 等. P16 蛋白表达在鼻咽癌中的表达与预后的关系系统. *华西医科大学学报*, 1999, **30** (4):394~396

5 Huang G W, Mo W N, Kuang G Q, *et al.* Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene products and their

- significance in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 2001, **111** (8):1465~1471
- 6 Baba Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, *et al.* Reduced expression of p16 and p27 proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 2001, **25** (5):414~419
- 7 Zhou H D, Fan S Q, Zhao J, *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol*, 2006, **125** (3):315~324
- 8 Zhou H D, Li G Y, Yang Y X, *et al.* Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. *Mol Immunol*, 2006, **43** (11):1864~1871
- 9 Zeng Z Y, Zhou Y H, Xiong W, *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate molecular markers in nasopharyngeal carcinoma using microdissection and cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, **133**(2): 71~81
- 10 Lo K W, Kwong J, Hui A B, *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61** (10):3877~3881
- 11 Kwong J, Lo K W, To K F, *et al.* Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (1):131~137
- 12 Sun D, Zhang Z, Van do N, *et al.* Aberrant methylation of CDH13 gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential diagnostic biomarker. *Oral Oncol*, 2007, **43** (1):82~87
- 13 Ma J, Zhou J, Fan S, *et al.* Role of a novel EGF-like domain-containing gene NGX6 in cell adhesion modulation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(2):281~291
- 14 Wang L, Ma J, Li J, *et al.* NGX6 gene inhibits cell proliferation and plays a negative role in EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Cell Biochem*, 2005, **95** (1):64~73
- 15 Peng S, Fan S, Li X, *et al.* The expression of ezrin in NPC and its interaction with NGX6, a novel candidate suppressor. *Cancer Sci*, 2007, **98** (3):341~349
- 16 Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2004, **64** (6): 1972~1974
- 17 周艳宏. 染色体 3p21 鼻咽癌易感基因区 LTF 基因的筛查及其抑制鼻咽癌细胞增殖的功能研究: [学位论文]. 长沙: 中南大学, 2007
- Zhou Y H. Identification of LTF Gene on the Region of NPC Susceptibility Gene-Chromosome 3p21 and the Function Study of LTF Gene That Inhibited Proliferation in the Nasopharyngeal Carcinoma Cells: [Thesis]. Changsha: Central South University, 2007
- 18 Yeatman T J, Chambers A F. Osteopontin and colon cancer progression. *Clin Exp Metastasis*, 2003, **20** (1):85~90
- 19 Tuck A B, Hota C, Chambers A F, *et al.* Osteopontin(OPN)-induced increase in human mammary epithelial cell invasiveness is urokinase(uPA)-dependenr. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, **70** (3): 197~204
- 20 Wong T S, Kwong D L, Sham J, *et al.* Elevation of plasma osteopontin level in patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 2005, **31** (5):555~558
- 21 Lung H L, Bangarusamy D K, Xie D, *et al.* THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 2005, **24** (43):6525~6532
- 22 Habets G G, Scholtes E H, Zuydgeest D, *et al.* Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, 1994, **77** (4):537~549
- 23 Matthias C, Branigan K, Jahnke V, *et al.* Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 1998, **4** (10):2411~2418
- 24 Xiang Y, Yao H, Wang S, *et al.* Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 2006, **116** (1): 126~130
- 25 Bar-Sela G, Kaplan-Cohen V, Ilan N, *et al.* Heparanase expression in nasopharyngeal carcinoma inversely correlates with patient survival. *Histopathology*, 2006, **49** (2):188~193
- 26 Ma B B, Poon T C, To K F, *et al.* Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma--a prospective study. *Head Neck*, 2003, **25** (10):864~872
- 27 Cho W C, Yip T T, Yip C, *et al.* Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res*, 2004, **10** (1): 43~52
- 28 Tan K B, Putti T C. Cyclooxygenase-2 expression in nasopharyngeal carcinoma: immunohistochemical findings and potential implication. *J Clin Pathol*, 2005, **58**(5):535~538
- 29 熊炜, 曾朝阳, 李小玲, 等. NGX6 基因单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关性. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**(4):512~515
- Xiong W, Zhen Z Y, Li X L, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2002, **34**(4):512~515
- 30 熊炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 泛肽相关蛋白基因 UBAP1 单核苷酸多肽及与鼻咽癌的相关研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(5):766~770
- Xiong W, Zhen Z Y, Shen S R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(5):766~770
- 31 熊炜, 曾朝阳, 肖炳燊, 等. 一个新硝基还原酶基因 NOR1 编码区单核苷酸多态及与鼻咽癌的关联性分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(3): 401~405
- Xiong W, Zhen Z Y, Xiao B Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(3):401~405
- 32 余鹰, 朱诗国, 向娟娟, 等. BRD7 单核苷酸多态性及鼻咽癌易感性分析. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(4):568~572
- Yu Y, Zhu S G, Xian J J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(4): 568~572
- 33 Xiao B, Fan S, Zeng Z, *et al.* Purification of novel UBAP1 protein and its decreased expression on nasopharyngeal carcinoma tissue microarray. *Protein Expr Purif*, 2006, **47** (1): 60~67

Biomarkers of Nasopharyngeal Carcinoma*

ZHANG Wen-Ling¹⁾, ZHOU Yan-Hong¹⁾, XIAO Lan¹⁾, FAN Song-Qing²⁾,
ZENG Zhao-Yang¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾, WU Ming-Hua¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)**}

¹⁾ Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾ Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant disease which had critically threatened human's health. It is very important to look for the biomarkers related to early diagnosis and prognosis of NPC. Using a series of large scale screening techniques from genomics, transcriptomics, proteomics and tissue microarray, combined with some international progress, a molecular marker system had been preliminarily constructed in different stages of NPC: (1) SPLUNC1, EBER-1, p16, p27, RASSF1A and CDH13, a group of molecular targets for the early diagnosis of NPC. (2) The class forecast model consisting of up-regulated RB1, STMN1, DSP and down-regulating SERPINB6, AGTRL1, SYTL2, the biomarkers to identify between normal nasopharyngeal epithelium and NPC. (3) NGX6, Ezrin, LTF, OPN, THY1 and Tiam-1, a group of candidate biomarkers forecasting the invasion and metastasis of NPC. (4) Cyclin D1, Survivin and HPA, a group of biomarkers related to the prognosis of NPC. (5) Bcl-2, EGFR and Ki67 proteins, a group of perfect candidate biomarkers for forecasting radiation sensitivity of NPC. (6) SAA and cox-2, the candidate biomarkers monitoring NPC recurrence. (7) The changes of six SNP from BRD7, NGX6, NOR1 and UBAP1, a group of the inheritance susceptibility risk factors. (8) Constructing a biomarker system of different clinical stages of NPC composed of 139 genes. These biomarkers based on screening with large amounts of samples lay an important foundation for molecular typing research of NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma, oncogene, tumor suppressor gene, molecular markers

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB910502, 2006CB910504), The National Natural Science Foundation of China(30770825, 30700469), Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA02Z170), A Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of PR China (200559).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: November 8, 2007 Accepted: December 28, 2007