

# SLP-2基因在食管鳞癌中的差异表达及其生物信息学分析

张立勇, 王 涛, 丁 芳, 刘仲敏, 刘芝华, 李衍达

张立勇, 李衍达, 清华大学自动化系生物信息学教育部重点实验室  
北京市 100084  
王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021  
项目负责人: 李衍达, 100084, 北京市海淀区清华园, 清华大学自动化系生物信息学教育部重点实验室. daulyd@tsinghua.edu.cn  
电话: 010-62782409 传真: 010-62784047  
收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-13

## Differential expression and bioinformatics analysis of SLP-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma

Li-Yong Zhang, Tao Wang, Fang Ding, Zhong-Min Liu, Zhi-Hua Liu, Yan-Da Li

Li-Yong Zhang, Yan-Da Li, Ministry of Education Key Laboratory of Bioinformatics, Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, Beijing, China  
Tao Wang, Fang Ding, Zhong-Min Liu, Zhi-Hua Liu, National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute/Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China  
Correspondence to: Yan-Da Li, Ministry of Education Key Laboratory of Bioinformatics, Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China. daulyd@tsinghua.edu.cn  
Received: 2004-03-18 Accepted: 2004-04-13

## Abstract

**AIM:** One of the differentially expressed genes, SLP-2 (stomatin-like protein 2, SLP-2), was obtained from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patient-matched tissues using cDNA microarrays, which was overexpressed in ESCC tissues compared with their normal counterparts. This study was to confirm overexpression of SLP-2 in ESCC, to construct tissue expression pattern of SLP-2 in different embryonic tissues and to carry out bioinformatics analysis.

**METHODS:** Overexpression of SLP-2 in esophageal squamous cell carcinoma was confirmed by RT-PCR and Northern blot. Tissue expression pattern was constructed by RT-PCR. And the biological property was analyzed by bioinformatic softwares.

**RESULTS:** RT-PCR and Northern blot showed that SLP-2 was overexpressed in ESCC tissues and distributed in different embryonic tissues. Relatedness between members of the stomatin superfamily was compared using CLUSTAL procedure. Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) software predicted that it possessed a PHB domain (prohibitin homologue) and a coiled coil.

**CONCLUSION:** cDNA microarray is a powerful tool for screening differentially expressed genes. SLP-2 is overexpressed in ESCC tissues and expressed in different embryonic tissues. The biological property is analyzed by bioinformatic softwares. Our study lays a good foundation

for elucidation the molecular mechanism of initiation and progression of ESCC.

Zhang LY, Wang T, Ding F, Liu ZM, Liu ZH, Li YD. Differential expression and bioinformatics analysis of SLP-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1517-1521

## 摘要

**目的:** 应用cDNA微阵列从食管鳞癌配对组织中得到一批在食管鳞癌中差异表达的基因, 其中包括 SLP-2. 他在食管鳞癌组织中的表达比其在配对的正常组织中高6倍以上. 验证 SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达的结果, 构建组织表达谱, 同时对其进行生物信息学分析.

**方法:** 利用 RT-PCR 和 Northern blot 对 SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达的结果进行验证, 构建组织表达谱. 利用 CLUSTAL 和 SMART 软件对 SLP-2 进行生物信息学分析.

**结果:** RT-PCR 和 Northern blot 表明, SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达, 并在多种组织中表达. CLUSTAL 软件分析表明, SLP-2 蛋白是 stomatin 超家族的一员, 但缺少 stomatin 超家族所特有的 N-端疏水性结构域. SMART 软件分析表明, SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域和一个螺旋丰富的区域.

**结论:** cDNA 微阵列是筛选差异表达基因的有力工具. SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达, 并在多种组织中都有表达. 生物信息学分析表明其缺少 stomatin 超家族所特有的 N-端疏水性结构域, 具有一个 PHB 结构域和一个螺旋丰富的区域, 为阐明 SLP-2 参与肿瘤发生发展的分子机制奠定了良好的基础.

张立勇, 王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 李衍达. SLP-2 基因在食管鳞癌中的差异表达及其生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1517-1521  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1517.asp>

## 0 引言

深入研究食管癌发生发展的分子机制, 对于阐明肿瘤发生发展的机制、设计新的抗食管癌药物和有针对性地进行个体治疗至关重要. 食管癌的发生发展是一个多因素、多基因参与的多步骤的复杂生物学过程<sup>[1-7]</sup>. 虽然在基因表达异常、分离表达失调蛋白和肿瘤排斥抗原等方面有所进展, 但对食管癌的发生发展机制的认识仍有待于进一步阐明<sup>[8-11]</sup>. 利用 cDNA microarray 技术发现了一些在食管癌中差异表达的基因<sup>[8, 12-13]</sup>. 我们首次

发现SLP-2(stomatin-like protein 2)在食管鳞癌中高表达。目前尚无SLP-2与肿瘤相关研究的报道,利用RT-PCR和Northern blot对SLP-2在食管鳞癌组织中高表达的结果进行验证,构建组织表达谱。利用CLUSTAL和SMART软件对SLP-2进行生物信息学分析,为进一步阐明SLP-2参与肿瘤发生发展的分子机制打下了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 配对的食管鳞癌组织标本取自中国医学科学院协和医院和肿瘤医院,由2位以上资深病理学专业人员确诊,所有患者均未经放化疗。胎儿组织取自中国医学科学院协和医院,为6月龄女性。所有组织经液氮速冻后, -80℃冰箱冻存备用。从-80℃冰箱中取出食管癌组织及其配对的手术切除组织,加入适量液氮后迅速研成粉末。总RNA的提取按照TRIzol试剂盒(Gibco)说明书进行。用DEPC处理的去离子水溶解RNA, 12 g/L甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检查总RNA的完整性。紫外分光光度计测定RNA的含量( $A_{260}$ 值)和纯度( $A_{260}/A_{280}$ 比值)后, -80℃保存备用。

**1.2 方法** cDNA第一链的合成按照Transcriptase Super Script II™ Preamplification System for First Strand cDNA试剂盒(Gibco)说明书进行。PCR总反应体系为25 μL,其中含1-4 μL模板, SLP-2上游引物序列为: 5'-GTGACTCTCGACAATGTAAC-3';下游引物序列为: 5'-TGATCTCATAACGGAGGCAG-3',各0.4 μmol/L, dATP, dCTP, dGTP, dTTP每种0.2 mmol/L, 1×PCR缓冲液, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U Taq酶。PCR反应在PE9600型PCR仪上进行,扩增条件为: 94℃预变性5 min; 94℃30 s, 57℃30 s, 72℃30 s, 27个循环, 72℃延伸5 min。以GAPDH作为内对照。扩增产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳后置于Fluo-S Mutilmager凝胶扫描仪中进行检测。Northern blot采用Primer-a-Gene® (Promega)探针标记系统,用α-<sup>32</sup>P-dCTP标记的SLP-2片段作为探针,按照说明书对食管鳞癌配对组织总RNA印迹进行杂交。

生物信息学分析从美国国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)蛋白

质数据库中调取stomatin超家族不同成员的氨基酸序列,利用CLUSTAL软件对其进行同源性预测相关性分析。NCBI蛋白质数据库中调取SLP-2蛋白的氨基酸序列,利用SMART软件对其进行结构域预测。

## 2 结果

**2.1 SLP-2基因在食管鳞癌中高表达** 与相应配对正常食管上皮相比, SLP-2在食管鳞癌组织中表达上调(74%, 40/54, 图1)。Northern blot结果表明, SLP-2在食管鳞癌组织中表达上调(77%, 10/13, 图2)。

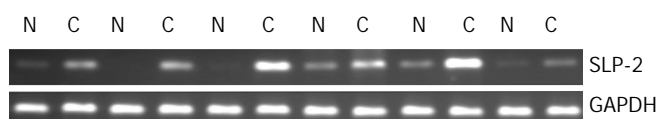


图1 半定量RT-PCR检测SLP-2在食管鳞癌配对组织中的差异表达。N: 正常食管上皮; C: 配对的肿瘤组织。

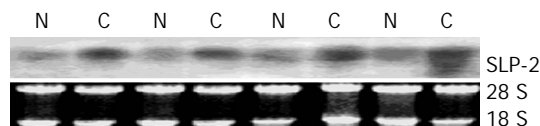


图2 Northern blot检测SLP-2在食管鳞癌配对组织中的差异表达。N: 正常食管上皮; C: 配对的肿瘤组织。

**2.2 SLP-2基因在多种胎儿组织中表达** 取新鲜胎儿的不同组织,分别提取总RNA。逆转录成cDNA后,以SLP-2引物对cDNA进行半定量RT-PCR反应,以GAPDH作为内对照。结果表明,在mRNA水平上,SLP-2在胎儿脑、肾脏、肺、胸腺、气管、食管黏膜、胃、肌肉、心脏、结肠、脾脏、小肠、胆囊等组织中广泛表达,其中在脑和肾脏等组织中表达量很低(图3)。

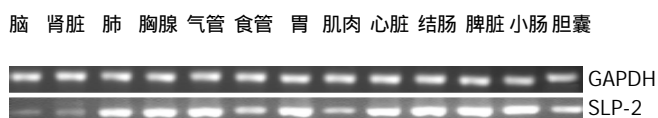
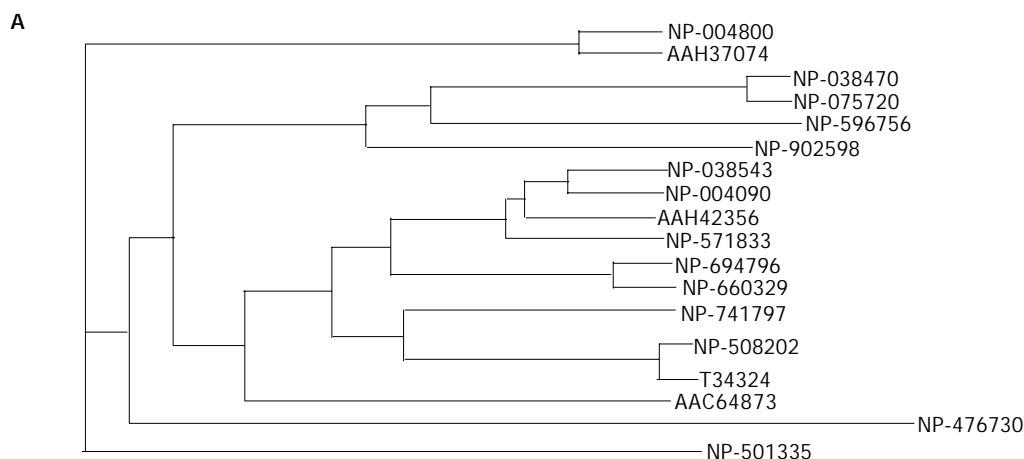


图3 半定量RT-PCR检测SLP-2在胎儿组织中的表达。



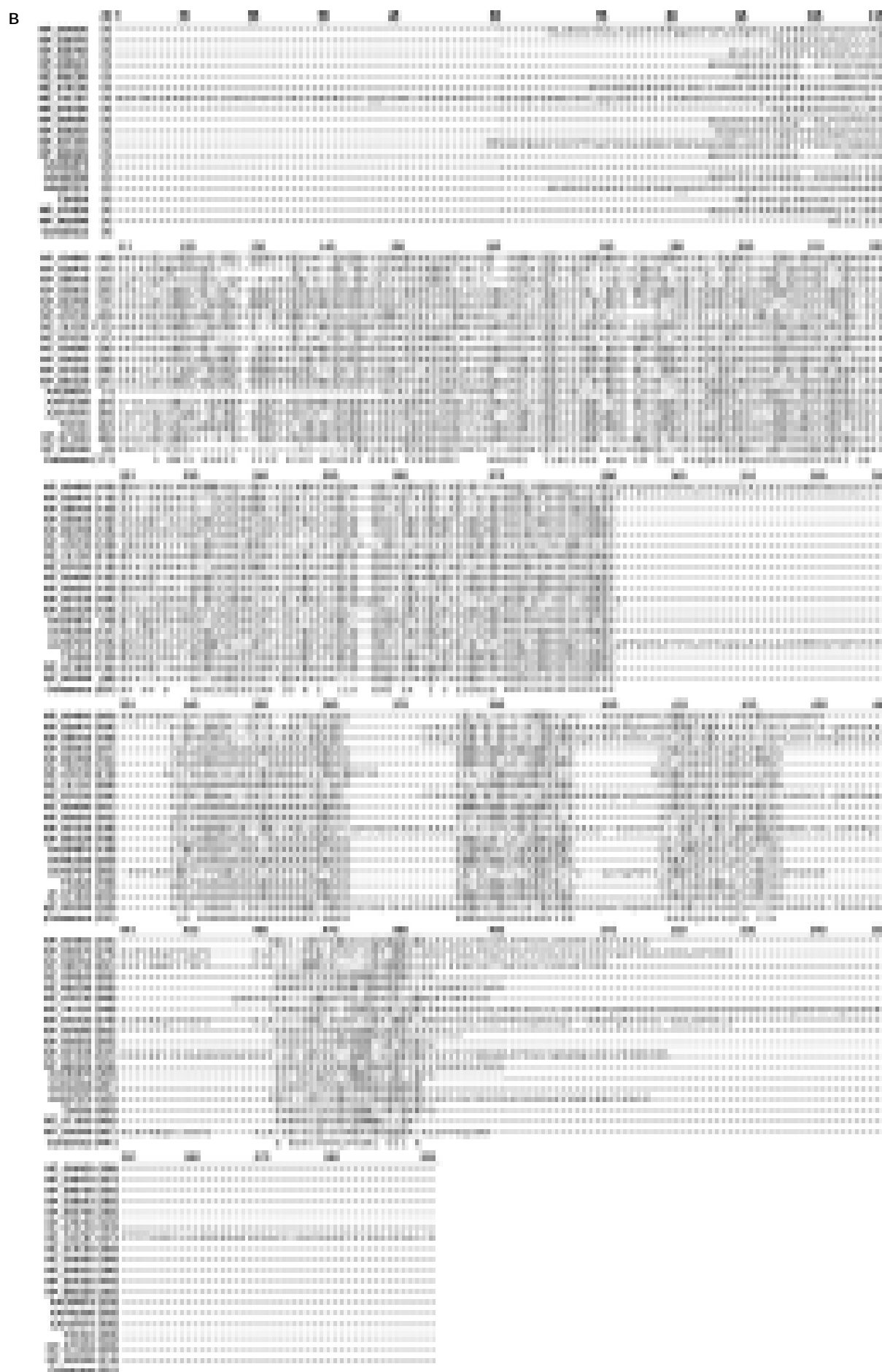


图4 SLP-2超家族不同成员的相关性. A: CLUSTAL软件预测SLP-2超家族不同成员的相关性; B: CLUSTAL软件分析SLP-2超家族不同成员的同源性.

表1 stomatin 超家族的不同成员

蛋白质	登录号	物种来源	氨基酸数目
stomatin	NP_004090	Homo sapiens	288 aa
stomatin	NP_038543	Mus musculus	284 aa
stomatin	NP_571833	Danio rerio (zebrafish)	284 aa
UNC-1	NP_508202	Caenorhabditis elegans	285 aa
	T34324	Caenorhabditis elegans	282 aa
MEC-2	NP_741797	Caenorhabditis elegans	481 aa
UNC-24	NP_501335	Caenorhabditis elegans	415 aa
SLP-1	NP_004800	Homo sapiens	398 aa
SLP-1	AAH37074	Mus musculus	399 aa
SLP-1	NP_476730	Drosophila melanogaster	322 aa
SLP-2	NP_038470	Homo sapiens	356 aa
SLP-2	NP_075720	Mus musculus	353 aa
SLP-3	NP_660329	Homo sapiens	291 aa
SLP-3	NP_694796	Mus musculus	287 aa
slp	AAC64873	Rhizobium etli	222 aa
	AAH42356	Xenopus laevis	281 aa
	NP_596756	Schizosaccharomyces pombe	354 aa
	NP_902598	Chromobacterium	313 aa
		violaceum ATCC 12472	

2.3 SLP-2 超家族不同成员的相关性 从NCBI蛋白质数据库中调取 stomatin 超家族不同成员的氨基酸序列(表1), 利用 CLUSTAL 软件对其进行相关性分析. 结果表明, 所有这些 stomatin 的同源蛋白和来自其他物种(如小鼠和斑马鱼)的 stomatin 在结构上都具有典型的 N-端疏水性结构域和决定 stomatin 基因家族的一致氨基酸序列(如 RX2(L/I/V)(S/A/N)X6(L/I/V)DX2TX2WG(L/I/V)(K/R/H)(L/I/V)X(K/R)(L/I/V)E(L/I/V)(K/R). SLP-2 蛋白具有 stomatin 基因家族所共有的一致序列, 但不具有 stomatin 基因超家族所共有的 N-端疏水性结构域(图 4A, 4B).

2.4 SLP-2 蛋白的结构域 从NCBI蛋白质数据库中调取 SLP-2 蛋白的氨基酸序列, 利用 SMART 软件对其进行结构域预测. 结果表明, SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域(多肽链的52位氨基酸至211位氨基酸之间的肽段)和一个富含螺旋的区域(多肽链的 231 位氨基酸至 252 位氨基酸之间的肽段).

### 3 讨论

Stomatin 基因定位于 9q34.1, 编码 M<sub>r</sub>31 000 的整合膜蛋白<sup>[14-15]</sup>. Stomatin 蛋白在结构上具有由 23 个氨基酸残基组成的特征性 N-端疏水性结构域, 这个结构域附近的 Cys<sup>29</sup> 是主要的棕榈酰化位点<sup>[15-16]</sup>; 跨膜片段的远端氨基酸序列是亲水性的, 可能形成双向 β-折叠和 α-螺旋结构; C-端结构域朝向胞质<sup>[15]</sup>. Stomatin 蛋白的 Ser<sup>9</sup> 可以被磷酸化, 含有这个磷酸化位点的 N-端序列邻近 N-端疏水性结构域, 并朝向胞质<sup>[15, 17]</sup>. 在脊椎动物中发现的 stomatin 的同源物有 SLP-1 (stomatin-like protein 1, SLP-1)、SLP-2 和 SLP-3 (stomatin-like protein 3, SLP-3)<sup>[15, 18]</sup>. SLP-1 与 UNC-24 最为相似, 主

要分布于脑, 而不出现于成熟红细胞中<sup>[15, 19]</sup>. SLP-3 是从嗅觉上皮中分离的嗅觉神经元蛋白<sup>[18]</sup>. 所有这些 stomatin 的同源蛋白和来自其他物种(如小鼠和斑马鱼)的 stomatin 在结构上都具有典型的 N-端疏水性结构域和决定 stomatin 基因家族的一致氨基酸序列. 这表明 stomatin 及其同源物可能作为离子通道和细胞骨架之间的连接分子, 从而影响通道的稳定性和质膜的组织<sup>[15]</sup>.

SLP-2 是从人心脏 cDNA 文库中得到的 stomatin 的同源物, 是 stomatin 基因超家族的一员<sup>[15, 20]</sup>. SLP-2 基因定位于 9p13.1, 由 10 个外显子和 9 个内含子组成, 长约 3 250 bp, 编码长约 1.5 kb 的 mRNA, 指导有 356 个氨基酸组成的多肽链的合成<sup>[15, 20]</sup>. SLP-2 蛋白由 3 个主要的结构域组成: N-端 α-螺旋区、由 α-螺旋和 β-折叠交替组成的结构域和 C-端结构域. SLP-2 蛋白在人体组织中广泛分布. 它具有 stomatin 基因家族所共有的一致序列, 但不具有 stomatin 基因超家族所共有的 N-端疏水性结构域. 与人 SLP-1 不同, 他也出现在成熟红细胞膜中, 并且与血影蛋白-肌动蛋白细胞骨架相结合, 也可能与其他膜整合蛋白结合, 但其本身并不整合到膜双层中. SLP-2 可能作为外周膜蛋白将 stomatin 或其他整合膜蛋白与细胞骨架联系起来, 从而调控离子通道的传导、鞘脂和富含胆固醇的脂质筏的组织<sup>[15, 20]</sup>.

SLP-2 mRNA 编码区中有 3 个潜在的翻译起始位点, 可能负责组织特异性的翻译. COS 细胞的 Western blot 结果显示, SLP-2 蛋白呈现 3 条带, M<sub>r</sub> 分别为 45 500, 44 600 和 34 300<sup>[15, 20]</sup>, 表明 SLP-2 具有潜在的生物学功能. 应用 cDNA microarray 技术比较分析了食管鳞癌/正常配对组织的基因表达谱, 首次发现 SLP-2 在食管鳞癌中表达上调. 目前尚无 SLP-2 参与肿瘤发生的相关报道. RT-PCR 和 Northern blot 验证了在食管鳞癌组织中高表达, 并在多种组织中都有表达. SLP-2 生物信息学分析表明, SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域, 这个结构域是 prohibitin 的同源物. 这些都为阐明 SLP-2 与食管鳞癌发生发展的关系奠定了良好的基础.

### 4 参考文献

- 1 王群, 杨翠红, 周津, 王秀琴, 周传农, 刘芝华, 吴旻. 食管癌表达上调基因 EC45 cDNA 的克隆. 自然科学进展 2001;11:217-221
- 2 Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003;9:650-654
- 3 Zhao XJ, Li H, Chen H, Liu YX, Zhang LH, Liu SX, Feng QL. Expression of e-cadherin and β-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:225-232
- 4 Wang HT, Kong JP, Ding F, Wang XQ, Wang MR, Liu LX, Wu M, Liu ZH. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:392-398
- 5 Zhang W, Bailey-Wilson JE, Li W, Wang X, Zhang C, Mao X, Liu Z, Zhou C, Wu M. Segregation analysis of esophageal cancer in a moderately high-incidence area of northern China.

- Am J Hum Genet* 2000;67:110-119
- 6 Wang DX, Li W. Advances on pathogenesis of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1029-1030
  - 7 Hu SP, Yang HS, Shen ZY. Study on etiology of esophageal carcinoma: retrospect and prospect. *Zhongguo Aizheng Zazhi* 2001;11:171-174
  - 8 Lu J, Liu Z, Xiong M, Wang Q, Wang X, Yang G, Zhao L, Qiu Z, Zhou C, Wu M. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int J Cancer* 2001;91:288-294
  - 9 Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF 3rd. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6293-6297
  - 10 Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Zhao Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:117-124
  - 11 Cui YP, Wang JB, Zhang XY, Bi MX, Guo LP, Lu SH. Using yeast two-hybrid system to identify ECRG2 associated proteins and their possible interactions with ECRG2 gene. *World J Gastroenterol* 2003;9:1892-1896
  - 12 Zhou J, Zhao LQ, Xiong MM, Wang XQ, Yang GR, Qiu ZL, Wu M, Liu ZH. Gene expression profiles at different stages of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:9-15
  - 13 Su H, Hu N, Shih J, Hu Y, Wang QH, Chuang EY, Roth MJ, Wang C, Goldstein AM, Ding T, Dawsey SM, Giffen C, Emmert-Buck MR, Taylor PR. Gene expression analysis of esophageal squamous cell carcinoma reveals consistent molecular profiles related to a family history of upper gastrointestinal cancer. *Cancer Res* 2003;63:3872-3876
  - 14 Stewart GW. Stomatin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:271-274
  - 15 Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J Biol Chem* 2000;275:8062-8071
  - 16 Snyers L, Umlauf E, Prohaska R. Cysteine 29 is the major palmitoylation site on stomatin. *FEBS Lett* 1999;449:101-104
  - 17 Salzer U, Ahorn H, Prohaska R. Identification of the phosphorylation site on human erythrocyte band 7 integral membrane protein: implications for a monotopic protein structure. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151:149-152
  - 18 Goldstein BJ, Kulaga HM, Reed RR. Cloning and characterization of SLP-3: a novel member of the stomatin family expressed by olfactory receptor neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4:74-82
  - 19 Seidel G, Prohaska R. Molecular cloning of hSLP-1, a novel human brain-specific member of the band 7/MEC-2 family similar to *Caenorhabditis elegans* UNC-24. *Gene* 1998;225:23-29
  - 20 Owczarek CM, Treutlein HR, Portbury KJ, Gulluyan LM, Kola I, Hertzog PJ. A novel member of the STOMATIN/EPB72/mec-2 family, stomatin-like 2 (STOML2), is ubiquitously expressed and localizes to HSA chromosome 9p13.1. *Cytogenet Cell Genet* 2001;92:196-203

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004 年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004 年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001 年国家社会科学基金项目”。该书定于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版。

该书已于 1992, 1996, 2000 年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达 51 种, 统计文献量达到 943 万余篇次(1999-2001 年), 涉及期刊 1 万 2 千种。本版还加大了专家评审力度, 1873 位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1800 种核心期刊, 分属七大编 75 个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学学报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究。(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)