**食管鳞癌细胞系间差异性分析**

**目的：**

**通过比较其化疗耐受性，放疗耐受性等迥异的食管鳞癌细胞系间在DNA甲基化，突变谱式和表达铺上面的差异，发现决定化疗和放疗耐受机制的DNA甲基化调控的基因。 通过充分使用公众数据库中的信息所进行的功能注释，临床相关性的分析，选出值得进行功能和机制研究，和临床研究的不超过20个DNA甲基化调控的蛋白编码/miR基因。**

**现状：**

**1， 除了放疗耐受性的结果尚未完全以外， 我将其余的结果列在下面**

**2， RNAseq （miRomic 和transcriptome）的分析正在进行之中， DNA seq （ 詹启敏的团队已完成）**

**3， 除了10株食管鳞癌细胞系的数据以外，我们还提供了1例正常食管上皮组织的k450的数据， 将10株食管鳞癌细胞系作为一组与正常食管组织进行比较，有望发现在食管鳞癌特征性的DNA甲基化异常的候选基因。**

**4， 我们先前使用MBD-cap seq的方法完成了一例正常组织（样品13） 和12例食管鳞癌细胞系混合（mix 3）。我们（上海实验室）先前已通过BSP分析验证10个候选基因（ 你参与此数据的分析，并有此批数据）。 目前，我们（ 合肥实验室）已重新完成了此批候选基因的BSP分析。**

**我建议你及时将此组学分析的结果成立成文，作为食管鳞癌第一文章的基础。**

**一，化疗耐受结果分析**

**前期已经使用7种化疗药物（Ci，5FU，Pa，Dt，Nd，Mi，Vb）对10株食管癌细胞系（KYSE-30，KYSE-70，KYSE-140，KYSE-150，KYSE-180，KYSE-410，KYSE-450，KYSE-510，COLO680n，TE1）进行了IC50的测定,并对各个细胞的化疗耐受性进行分析**

**从单药角度分析:**

**5FU：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **5FU（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **800** | **31.4** | **0.4** | **5.1** | **30.3** | **2019.6** | **2.19** | **2.87** | **1.5** | **200** |
| **相对值** | **2000** | **78.5** | **1** | **12.75** | **75.75** | **5049** | **5.48** | **7.18** | **3.75** | **500** |

**K510（相对IC50:5049）对5Fu的最为耐受性， 而K70（相对IC50:3.76）和K450（相对IC50:1）则对5FU最敏感，可以选这两株细胞研究其对5FU敏感和耐受的机制；**

**VB：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **VB（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **6.64** | **8** | **2** | **/\*** | **130.63** | **/\*** | **121.37** | **29.31** | **0.2** | **6.9** |
| **相对值** | **33.2** | **40** | **10** | **/\*** | **653.15** | **/\*** | **606.85** | **146.55** | **1** | **34.5** |

**另外K140和K510（对Vb极度耐受，无法计算IC50）对Vb耐受，而K70（相对IC50:1）和K450（相对IC50:10）则对VB敏感，故可以选这四株细胞研究其对VB敏感和耐受的机制。在上述这两种药物研究的细胞中，K510同时对5FU和VB耐受，K70和K450则同时对5FU和VB敏感，**

**Ci：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ci IC50（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **14.54** | **8.55** | **4.3** | **0.53** | **2.71** | **3.46** | **7.99** | **4.39** | **6.67** | **18.88** |
| **相对值** | **27.43** | **16.13** | **8.11** | **1** | **5.11** | **6.53** | **15.08** | **8.28** | **12.58** | **35.62** |

**TE1（相对IC50:35.62）对Ci的最为耐受性， K140（相对IC50:1）则对Ci最敏感，可以选这两株细胞研究其对Ci敏感和耐受的机制；**

**Pa:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Pa（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **2.74** | **2.27** | **2.9** | **6.17** | **2.7** | **4.34** | **1.94** | **2.99** | **1.94** | **10.2** |
| **相对值** | **1.41** | **1.17** | **1.49** | **3.18** | **1.39** | **2.24** | **1.00** | **1.54** | **1.00** | **5.26** |

**TE1（相对IC50:5.26）对Pa的最为耐受性， 而K70（相对IC50:1）和COLO680n（相对IC50:1）则对Pa最敏感，可以选这两株细胞研究其对Pa敏感和耐受的机制；**

**Dt：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Dt（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **11.3** | **7.77** | **9** | **5** | **3.9** | **9.89** | **7.1** | **3.44** | **8** | **37** |
| **相对值** | **3.28** | **2.26** | **2.62** | **1.45** | **1.13** | **2.88** | **2.06** | **1** | **2.33** | **10.76** |

**TE1（相对IC50:10.76）对Dt的最为耐受性， 而K180（相对IC50:1）则对Dt最敏感，可以选这两株细胞研究其对Dt敏感和耐受的机制；**

**Nd:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nd（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **10.19** | **10.87** | **1.39** | **0.89** | **1.54** | **4.83** | **7.8** | **4.5** | **1.18** | **13.6** |
| **相对值** | **11.45** | **12.21** | **1.56** | **1** | **1.73** | **5.43** | **8.76** | **5.06** | **1.33** | **15.28** |

**TE1（相对IC50:15.28）对Nd的最为耐受性， 而K140（相对IC50:1）则对Nd最敏感，可以选这两株细胞研究其对Nd敏感和耐受的机制；**

**Mi：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **绝对IC50值（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **绝对值** | **0.5** | **0.5** | **0.13** | **0.64** | **1.71** | **0.3** | **0.28** | **0.2** | **0.29** | **0.32** |
| **相对值** | **3.85** | **3.85** | **1** | **4.92** | **13.15** | **2.31** | **2.15** | **1.54** | **2.23** | **2.46** |

**K30（相对IC50:13.15）对Mi的最为耐受性， 而K450（相对IC50:1）则对Mi最敏感，可以选这两株细胞研究其对Mi敏感和耐受的机制；**

**多药耐受性：**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **绝对IC50值（ug/ml）** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **5FU** | **800** | **31.4** | **0.4** | **5.1** | **30.3** | **2019.6** | **2.19** | **2.87** | **1.5** | **200** |
| **Vb** | **6.64** | **8** | **2** | **/\*** | **130.63** | **/\*** | **121.37** | **29.31** | **0.2** | **6.9** |
| **Ci** | **14.54** | **8.55** | **4.3** | **0.53** | **2.71** | **3.46** | **7.99** | **4.39** | **6.67** | **18.88** |
| **Pa** | **2.74** | **2.27** | **2.9** | **6.17** | **2.7** | **4.34** | **1.94** | **2.99** | **1.94** | **10.2** |
| **Dt** | **11.3** | **7.77** | **9** | **5** | **3.9** | **9.89** | **7.1** | **3.44** | **8** | **37** |
| **Nd** | **10.19** | **10.87** | **1.39** | **0.89** | **1.54** | **4.83** | **7.8** | **4.5** | **1.18** | **13.6** |
| **Mi** | **0.5** | **0.5** | **0.13** | **0.64** | **1.71** | **0.3** | **0.28** | **0.2** | **0.29** | **0.32** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **\*，最高剂量的药物无法杀死50%以上的细胞， 无法计算出此细胞系的IC50（ug/ml)，提示此细胞系高度耐受** | | | | | | | | | | |
| **相对IC50值** | | | | | | | | | | |
| **药物** | **KYSE410** | **KYSE150** | **KYSE450** | **KYSE140** | **KYSE30** | **KYSE510** | **COLO680n** | **KYSE180** | **KYSE70** | **TE1** |
| **5FU** | **2000** | **78.5** | **1** | **12.75** | **75.75** | **5049** | **5.48** | **7.18** | **3.75** | **500** |
| **Vb** | **33.2** | **40** | **10** | **/\*** | **653.15** | **/\*** | **606.85** | **146.55** | **1** | **34.5** |
| **Ci** | **27.43** | **16.13** | **8.11** | **1** | **5.11** | **6.53** | **15.08** | **8.28** | **12.58** | **35.62** |
| **Pa** | **1.41** | **1.17** | **1.49** | **3.18** | **1.39** | **2.24** | **1.00** | **1.54** | **1.00** | **5.26** |
| **Dt** | **3.28** | **2.26** | **2.62** | **1.45** | **1.13** | **2.88** | **2.06** | **1** | **2.33** | **10.76** |
| **Nd** | **11.45** | **12.21** | **1.56** | **1** | **1.73** | **5.43** | **8.76** | **5.06** | **1.33** | **15.28** |
| **Mi** | **3.85** | **3.85** | **1** | **4.92** | **13.15** | **2.31** | **2.15** | **1.54** | **2.23** | **2.46** |
| **ACR7\*\*** | **80.62** | **75.62** | **24.78** | **24.30\*\*\*** | **675.66** | **5068.39\*\*\*** | **635.9** | **163.97** | **20.47** | **603.88** |
| **CI7** | **11.52** | **10.80** | **3.54** | **3.47** | **96.52** | **724.06** | **90.84** | **23.42** | **2.92** | **86.27** |
| **ACR6** | **80.62** | **75.62** | **24.78** | **11.55** | **675.66** | **19.39** | **635.90** | **163.97** | **20.47** | **103.88** |
| **CI6** | **13.44** | **12.60** | **4.13** | **1.93** | **112.61** | **3.23** | **105.98** | **27.33** | **3.41** | **17.31** |
| **ACR5** | **47.42** | **35.62** | **14.78** | **11.55** | **22.51** | **19.39** | **29.05** | **17.42** | **19.47** | **69.38** |
| **CI5** | **9.48** | **7.12** | **2.96** | **2.31** | **4.50** | **3.88** | **5.81** | **3.48** | **3.89** | **13.88** |
| **CI5** | **4.11** | **3.08** | **1.28** | **1.00** | **1.95** | **1.68** | **2.52** | **1.51** | **1.69** | **6.01** |
| **CI5a** | **3.21** | **2.41** | **1.00** |  | **1.52** |  | **1.96** | **1.18** | **1.32** | **4.69** |

\*，最高剂量的药物无法杀死50%以上的细胞， 无法计算出此细胞系的绝对IC50（ug/ml) 和相对IC50（倍数），提示此细胞系高度耐受

\*\*, 累集化疗耐受（ACR）指数（ACRI）： 每株细胞系的相对IC50的总和和受试药物的个数（ 7， 6 或5）的比值。

ACR： Accumulated chemoresistance; CI: Chemoresistance index； RCI5: Relative ACRI5相对的五药化疗耐受指数。　RCI5a：**\*\*\*，**由于，K140和K510没有Vb的IC50,从而此值从计算中剔除掉。

食管鳞癌细胞系的5-FU和Vb的化疗耐受性的差别极大，最为耐受的细胞系的IC50是最为敏感的细胞系的600倍以上。 K410（相对IC50:2000）和K510（相对IC50:5049）对5Fu的耐受性， 而K70（相对IC50:3.76）和K450（相对IC50:1）则对5FU敏感； 另外K140和K510（对Vb极度耐受，无法计算IC50）对Vb耐受，而K70（相对IC50:1）和K450（相对IC50:10）则对VB敏感。

就对余下5个药物的化疗耐受性而言，最为耐受的食管鳞癌细胞系的相对IC50都在35.62 倍以下。如果用ACRI5的相对值（RACRI5）来评估食管鳞癌细胞系的化疗耐受性的话，K450（RACR1a：1.0）和K180（1.18）是剔除了k140和K510(对Vb极度耐受的）以外的8株细胞系中最为敏感的细胞系，而K410（3.21）和TE-1（4.69）是最为耐受的细胞系。所以可以考虑从TE1,K410和K450,K180中选目标细胞系来研究多药（Ci，Pa,Dt,Mi,Nd）耐受机制.

**汇总表：**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 最耐受细胞 | 次耐受细胞 | 最敏感细胞 | 次敏感细胞 |
| **5FU** | K510 | K410 | K450 | K30 |
| **Vb** | K510 | K140 | K70 | K450 |
| **Ci** | TE1 | K410 | K140 | K30 |
| **Pa** | TE1 | K140 | K70 | COLO680 |
| **Dt** | TE1 | K410 | K180 | K30 |
| **Nd** | TE1 | K150 | K140 | K70 |
| **Mi** | K30 | K140 | K450 | k180 |
| **Ci，Pa,Dt,Nd,Mi多药** | TE1 | K410 | K450 | K180 |

**如上汇总表，在耐受细胞中选TE1和K510作为研究对象，可覆盖除Mi外的另外6种药物及多药耐受的耐受细胞；敏感细胞选用K450和K70作为研究对象，可以覆盖处Ci外的另外6种药物及多药敏感的敏感细胞系。**

**细胞学实验总结：**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **化疗实验** | **增殖实验结果** | **迁移实验结果** | **侵袭实验结果** |
| **TE1** | **Ci，Pa,Dt,Mi,Nd多药耐受** | **K410,TE1，K510 < K180,K450** | **K410 > K450和K180；**  **TE1≈K180，但TE1 < K450；**  **K510 <K450。** | **K410,TE1 > K180,K450**  **K510 <K450** |
| **K410** | **Ci，Pa,Dt,Mi,Nd多药耐受** |
| **K510** | **5FU,VB耐受** |
| **K450** | **CiPa,Dt,Mi,Nd以及5FU,VB多药敏感** |
| **K180** | **Ci，Pa,Dt,Mi,Nd多药敏感** |
| **注** |  | **耐受细胞增殖速率低于敏感细胞增殖速率** | **这提示，K510与TE1的迁移机制与K410不同。** | **再一次提示，引起K510和K450之间差异的机制与引起K410,TE1,尤其是K410和K450之间差异的机制是不同的。** |

**由上总结表，可以看出:**

**相对于多药敏感细胞K450和K180，多药耐受细胞K410增殖速度慢，而迁移速率以及侵袭速率更快；**

**相对于多药敏感细胞K450和K180，多药耐受细胞TE1增殖速度以及迁移速率(TE1≈K180)慢，而侵袭速率更快；**

**相对于多药敏感细胞K450(包括5FU,VB耐受)，5FU,VB耐受细胞K510增殖速度满，迁移速率以及侵袭速率都较慢；**

**提示，引起5FU,VB耐受的K510和敏感细胞K450之间差异的机制与引起多药耐受的K410,TE1,尤其是K410和敏感细胞K450之间差异的机制是不同的**

**所以在研究中可以将TE1,K410与K450,K180做为一组研究对象，而K510和K450作为另一组研究对象来进行实验分析。**