文章编号:1000-5404(2006)06-0523-04

论著

应用基因芯片筛选人高、低转移肺巨细胞癌细胞株差异表达基因的初步探讨

梁志欣,陈良安,田 庆,王 平,范保星,刘又宁 (解放军总医院呼吸科,北京 100853)

提 要:目的 应用基因芯片探讨人高、低转移肺巨细胞癌细胞株95D和95C的基因表达差异,筛选肺癌转移相关基因。**方法** 提取人高转移肺巨细胞癌细胞株95D和人低转移肺巨细胞癌细胞株95C的mRNA并反转录为cDNA,分别用Cy5-dUTP和Cy3-dUTP进行标记后与基因芯片杂交,然后用Scan Array 3000扫描仪及ImaGene3.0软件处理杂交信号得到95D和95C的表达差异基因。对部分有差异表达的基因进行RT-PCR分析鉴定。**结果** 在被检测的人高、低转移肺巨细胞癌细胞株95D和95C中,共有466条基因出现表达差异,其中具有同一GenBank ID号的Double基因共108对,包括上调基因47对,下调基因61对。有表达差异的Fln29、RUVBL2、C14orf3等基因RT-PCR结果与基因芯片一致。**结论** 多基因参与了肺癌的转移过程,基因芯片技术是筛选肺癌转移相关基因的有效方法。

关键词: 肺癌;基因芯片;基因表达;RT-PCR
中图法分类号: R394-33;R73-354;R734.2 **文献标识码:** A

Detection of differentially expressed genes between high-rate and low-rate metastatic human lung giant cell carcinoma cell strains using cDNA microarray

LIANG Zhi-xin, CHEN Liang-an, TIAN Qing, WANG Ping, FAN Bao-xing, LIU You-ning (Department of Respiratory Diseases, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To analyze the differences in gene expression between human lung giant cell carcinoma cell strains of high metastatic 95D and low metastatic 95C and to screen lung cancer metastasis-associated genes using cDNA microarray. **Methods** The mRNAs were extracted from human lung giant cell carcinoma cell strains of high metastatic 95D and low metastatic 95C, and reversely transcribed to the cDNAs and labeled by Cy5-dUTP and Cy3-dUTP to prepare the hybridization probes. The mixed probes were hybridized to the cDNA microarray chip. The information was obtained by managing the cDNA microarray chip with Scan Array 3000 scanner and ImaGene3.0 software. A part of genes whose expressions changed in cDNA microarray analysis were further identified by RT-PCR. **Results** The cDNA microarray analysis showed that the expressions of 466 genes changed, among which 108 pairs of Double Gene had the same GenBank ID and some of the genes, including Fln29, RUVBL2, C14orf3 *et al*, were further confirmed by RT-PCR. The results of RT-PCR was coincided well with the cDNA microarray results. **Conclusion** Many different genes are involved in the metastasis of lung cancer. cDNA microarray technique might be a useful method in screening lung cancer metastasis-associated genes.

Key words: lung neoplasm; microarray; gene expression; RT-PCR

肺癌是严重危害人类生命健康的最常见恶性肿瘤之一,其转移是导致其治疗失败和死亡的主要原因。肿瘤转移是一个极为复杂的癌细胞和宿主细胞相互作用的连续过程,目前报道的参与肿瘤转移的基因达数百种,它们的基因产物通过刺激细胞的运动,参与细胞与基质间的相互作用,降解基质使其自身易于迁移,以及诱导肿瘤血管增生等机制促进肿瘤的侵袭和转移[1]。我们应用基因芯片对遗传学背景相同但转移能力不同的1对人肺巨细胞癌细胞株进行基因差异表达研究,并对部分差异表达的基因应用RT-PCR进一步鉴定其结果的可靠性,以求能较全面的了解肺癌侵袭和转移的基因及其调控机制,为探索新的抗转移途径提供思路和线索。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370616)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370616)
作者简介: 梁志欣(1976-),男,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事肺癌转移机制方面的研究。电话:(010)66936184,E-mail: liangzx301@163.com
通讯作者: 陈良安,电话:(010)66939361,E-mail: chenla301@263.net
收稿日期: 2005-09-20;**修回日期:** 2005-10-09

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺巨细胞癌细胞株95D及95C由解放军总医院病理科陈乐真教授惠赠并在本实验室保存。95D及95C细胞株是解放军总医院病理科陆应麟等[2,3]应用单细胞克隆化技术,从人肺巨细胞癌母系细胞(PLA-801)中分出并建成的亚系,95D细胞株具有自发性高转移生物学特性,95C细胞株具有不转移(或低转移)生物学特性,因两者为共源细胞株,具有相同的遗传背景,所以具有高度可比性,是研究肿瘤转移机制的理想细胞模型。

1.1.2 主要试剂与材料 RPMI Medium 1640培养基、TRIZOL Reagengt、RT-PCR第1链合成试剂盒(SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR)均购自美国Invitrogen公司,优级小牛血清购自美国Hyclone公司,DEPC、胰蛋白酶购自美国Sigma公司,mRNA柱纯化试剂盒购自Qiagen公司,琼脂糖购自美国Promega公司,LA *Taq* 酶,dNTP Mixture, 100 bp DNA标准均购于宝生物工程有限公司(TaKaRa),引物由北京奥科生物公司合成,溴化乙锭购自北京鼎国生物公司,异丙醇、氯仿及乙醇购自北京试剂公司,基因芯片(H80d)购自上海博星基因芯片公司(Biostar Genechip Inc , Shanghai),凝胶成像及图像分析系统(美国BIO-RAD公司),Scan Array 3000扫描仪(General Scanning公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与总RNA提取 95D及95C细胞株用RPMI Medium 1640培养基及10%优级小牛血清在37 ℃,5% CO_2 条件下进行培养及传代,应用Trizol试剂按说明书提取细胞总RNA,以紫外分光光度计测定总RNA浓度,完整性用含溴化乙锭的1.2%琼脂糖电泳鉴定,分装后-80 ℃冻存备用。

1.2.2 基因表达谱芯片检测 提取细胞总RNA后应用mRNA柱纯化试剂盒纯化各样品的mRNA并反转录成cDNA,以Cy3-dUTP标记95C细胞cDNA,Cy5-dUTP标记95D细胞cDNA,将探针加在预杂交好的基因芯片上,盖玻片封片,置于杂交舱中,42 ℃杂交15~20 h,然后洗涤室温凉干,扫描仪扫描芯片,ImaGene 3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。

1.2.3 杂交数据处理 根据总数为n的有效基因的Cy5/Cy3的自然对数值lnRi = ln Cy5/Cy3,以Ri值为0.1~10的有效基因作为均一化依据,算出这些基因Cy5/Cy3自然对数平均值ln(R'),即均一化(Normalization)系数。将所有数据项的Cy3标记强度乘以均一化系数,得出均一化的Cy3 * 值。Cy5/Cy3 * 比值大于2.0或小于0.5的数据判断为此基因的表达在两种细胞中有较大差异。

1.2.4 RT-PCR 取3 μg总RNA,严格按照SuperScript First-Strand Synthesis System试剂盒说明书进行逆转录,所得cDNA于-20 ℃冻存。根据基因库中的基因序列,分别针对基因芯片结果中有差异表达的基因:Fln29、RUVBL2、C14orf3、CGI-71和UFD2合成PCR引物(表1);扩增反应的条件:94 ℃预变性5 min, 94 ℃变性60 s,退火温度详见表2,时间45 s,72 ℃延伸1 min,共25个循环后72 ℃再延伸10 min。扩增产物于含有0.5 μg/ml溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳,然后凝胶成像系统在紫外线下摄取电泳图谱并应用核酸定量分析软件Quantity One(Bio-RAD)进行分析,以看家基因β-actin的表达为内对照,利用扩增基因/β-actin的灰度比值对该基因的表达进行半定量。

表1 引物序列以及PCR产物的大小

	引物序列	产物长度(bp)
β-actin	正义链:5′-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3′	310
	反义链:5′-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3′	
Fln29	正义链:5′-TTC CAT CAC CAG GAC CAG TGT-3′	496
	反义链:5′-TCC TGC CAC CTT CAC TCC TAC-3′	
RUVBL2	正义链:5′-GGA GAT CAT CCC TGG AGT GCT-3′	485
	反义链:5′- GGA AGG CGT CCT GGT ACT CCT-3′	
C14orf3	正义链:5′-ACC CAG GGC ATG ATC TTA CCT-3′	435
	反义链:5′- ACC TTC CAT GCA CAG CTC AGT-3′	
CGI-71	正义链:5′-TCT GGA GGA AAC AAG GGC TCT -3′	506
	反义链:5′-GGA GCA GAA TGA CCT TGA GGA-3′	
UFD2	正义链:5′-TGG ACA TGT TCC ACA TCC TCA-3′	410
	反义链:5′-ATC AGG AGC GTC GCT GTA GTC-3′	

2 结果

2.1 基因芯片杂交信号数据

此次所得均一化系数为:0.941,将均一化系数和Cy3值相乘,获得调整后的Cy3 * 值。Cy5/Cy3 * 比值<0.5为表达下调,>2.0为表达上调。Cy3与Cy5扫描结果经计算机数据叠加后得到图1所示图像,由于Cy3荧光信号和Cy5荧光信号分别以绿色和红色表示,因此,对于某一点的两种叠加荧光信号,如果Cy3信号较强,该点多显绿色(呈下调趋势);如果Cy5信号较强,该点多显红色(呈上调趋势);如果强度相似,即显示黄色。该图反映了芯片上每条基因在两株细胞中表达丰度的差异。



图1 95C细胞和95D细胞总RNA双色荧光标记叠加图

散点分布见图2所示,X轴以Cy3荧光强度值为坐标,Y轴以Cy5荧光强度值为坐标,每1个数据点代表芯片上1个基因

点的杂交信号；数据点若为红色，则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5～2.0，基本属非差异表达；数据点若为黄色，则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5～2.0 之外（很可能是有表达差异的数据）。

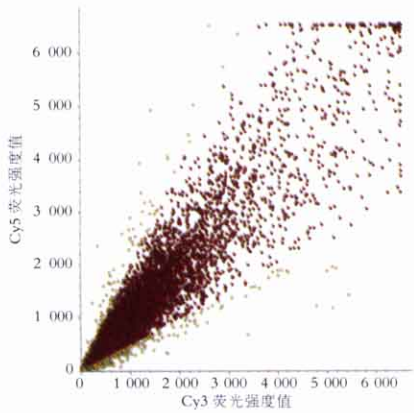


图 2　95C 细胞和 95D 细胞总 RNA 杂交信号强度散点图

2.2　对差异表达基因的初步分析

在被检测的 16 396 条有效基因中，出现表达差异的基因有 466 条，其中上调基因 168 条，下调基因 298 条，具有同一 GenBank ID 号的 Double 基因共有 108 对，上调基因 47 对，下调基因 61 对，这些基因在与两种探针杂交时表现出一定的差异，且上下调趋势一致。

2.3　RT-PCR

在基因芯片显示的差异表达基因中，我们选择了部分基因（表 2）如：Fln29、RUVBL2、C14orf3、CGI-71 和 UFD2 进行 RT-PCR 进一步验证分析，结果显示（图 3）：Fln29 和 UFD2 基因在 95D 细胞中高表达，RUVBL2、C14orf3、CGI-71 基因在 95D 细胞中低表达，与表达谱芯片的结果一致。

表 2　部分进行 RT-PCR 验证的基因

基因号	Cy5/Cy3 平均比率	编号基因定义	退火温度（℃）
AB007447	2.273	Fln29 mRNA	52
AF155138	0.495	RUVBL2 蛋白 mRNA	52
AJ243310	0.227	C14orf3 蛋白 mRNA	48
AF151829	0.350	CGI－71 蛋白 mRNA	52
AF043117	2.288	泛素融合降解蛋白 2（UFD2）mRNA	52



1：100 bp DNA 标准；2：UFD2（95C）；3：UFD2（95D）；4：Fln29（95C）；5：Fln29（95D）；6：RUVBL2（95D）；7：RUVBL2（95C）；8：C14orf3（95D）；9：C14orf3（95C）；10：CGI-71（95C）；11：CGI-71（95D）；12：100 bp DNA Ladder

图 3　95C 和 95D 细胞株 Fln29、RUVBL2、C14orf3、CGI-71 和 UFD2 基因表达的 RT-PCR 鉴定

3　讨论

肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的最主要原因，深入认识肿瘤细胞浸润转移的相关基因及其调控机制是确定新的肿瘤诊治策略的前提。虽然报道的参与肿瘤转移调控的基因达数百种，但有关这些基因的检测多限于一种或几种基因的表达[4,5]，不能全面反映各基因间的关系。本研究利用基因芯片高通量，高度并行性和敏感性的特点来获得严格的平行对照的实验设计[6]，同时采用遗传背景相同但转移能力不同的人肺巨细胞癌细胞株为研究对象，适合于可比性研究，避免了标本取样的组织学差异，以求能够全面、准确的反映出所筛选出的各基因间的关系。

本研究中我们应用基因芯片发现，在人高转移和低转移肺巨细胞癌细胞株之间出现表达差异的基因有 466 条。这些差异基因包括原癌基因和抑癌基因，细胞周期相关基因，DNA 合成和修复相关基因，细胞信号传递相关基因，还有蛋白翻译合成和代谢相关基因等多类基因。我们对部分差异表达基因进行了 RT-PCR 检验，其结果与基因芯片的检测结果一致，由此进一步验证了基因芯片结果的可靠性。本研究共有 466 条基因出现不同程度的上调和下调，说明肿瘤转移是一个多基因参与的复杂过程，它包含了多种基因的相互作用及其调控蛋白的差异。

在出现上调的基因中，有人类 Sk/Dkk-1 基因（GenBank 登录号 AF127563），它通过抑制 Wnt 信号传导在生长发育过程中起重要的作用[7]，而 Wnt 信号传导通路的失调被证明与肿瘤的进展有密切的关系[8,9]，在本研究检测到的所有表达差异基因中，Sk/Dkk-1 表达上调最为明显（Cy5/Cy3＊两次结果平均比值为 6.466），表明其可能与肿瘤的转移有较密切的关系，同时在某种程度上也佐证了信号转导系统的失调参与了肿瘤的浸润和转移。出现表达上调的基因中还包括人锌指蛋白 185（ZNF185，GenBank 登录号 Y09538），它是 1 条较新的 LIM 锌指结构域基因，定位于 Xq28 染色体[10]。Vanaja 等[11]发现 ZNF185 在前列腺癌中表达下调并认为 ZNF185 在前列腺癌的进展中起重要的作用。目前国内、外尚未见到有关 ZNF185 与肺癌关系的报道，本研究芯片结果显示其表达在高转移人肺巨细胞癌细胞株中上调，至于 ZNF185 的表达在前列腺癌中下调而在人高转移肺巨细胞癌细胞株

中上调的具体原因是肿瘤类别不同所致还是有其他原因，需待更深入的研究来论证。

下调的基因中有人类成纤维细胞胶原酶抑制因子（human fibroblast collagenase inhibitor，GenBank 登录号 M12670）。细胞外基质的降解是肿瘤浸润转移的重要步骤之一，基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）是一组参与细胞外基质降解的主要蛋白水解酶，成纤维细胞胶原酶（MMP-1）是 MMPs 家族中的一员，主要参与降解基质中的 I 和 III 型胶原，其在肿瘤转移中的作用已经被很多研究证实[12,13]。人成纤维细胞胶原酶抑制因子通过编码 MMP-1 的抑制蛋白而影响其功能，本研究中其杂交信号下调明显（Cy5/Cy3 * 两次结果平均比值为 0.279），说明在具有高转移能力的细胞株中 MMP-1 的抑制因素减弱，由此可能导致了 MMP-1 蛋白水解功能的进一步加强，使肿瘤细胞具有了更高的转移能力。

我们对芯片结果分析还发现，部分表达差异基因到目前还未见到其与肿瘤转移有关的报道，甚至个别基因查阅不到关于功能的任何介绍，如 CGI-71（GenBank 登录号 AF151829）是 Lai 等[14]以秀丽线虫为研究对象，应用比较蛋白质组学和生物信息学分析等方法获得其序列的基因，于 1999 年 5 月提交 GenBank 数据库，C14orf3（GenBank 登录号 AJ243310）序列由 Michaud J 于 1999 年 6 月提交 GenBank 数据库，但之后均少见到相关功能报道。对新基因进行系统的功能研究是非常复杂和困难的，本研究通过基因芯片发现这些功能未知基因在人高、低转移肺巨细胞癌细胞株中存在明显的表达差异，说明其与肿瘤转移能力可能有一定关系，这无疑会对今后这些基因的功能研究起到某种提示作用。当然，尚需要对这些基因进行系统的研究和检测以确定它们与肿瘤转移的确切关系[15]。

总之，肿瘤的转移和浸润是多基因、多阶段共同作用的结果，应用基因芯片可以快速、全面的分析研究肺癌转移相关基因，为完整的认识肺癌转移分子机制和探索抗转移途径提供新的思路和线索。

参考文献：

[1] WOODHOUSE E C, CHUAQUI R F, LIOTTA L A. General mechanisms of metastasis[J]. Cancer, 1997, 80(8 Suppl): 1529 - 1537.

[2] 陈乐真，黄靖香，游联璧，等. 人肺巨细胞癌细胞系（PLA-801）的建立和生物学特性[J]. 中华肿瘤杂志，1983，5(6)：409 - 413.

[3] 陆应麟，黄靖香，李向红，等. 人肺巨细胞癌 PLA-801 母系细胞系及其克隆化细胞株（A、C、D、E）裸鼠皮下种植后自发转移特性的研究[J]. 中华肿瘤杂志，1989，11(1)：3 - 7.

[4] MARCHETTI A, TINARI N, BUTTITTA F, *et al*. Expression of 90K (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Res, 2002, 62(9): 2535 - 2539.

[5] MULLER TIDOW C, METZGER R, KUGLER K, *et al*. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(2): 647 - 653.

[6] CHEUNG V G, MORLEY M, AGUILAR F, *et al*. Making and reading microarrays[J]. Nat Genet, 1999, 21(1 Suppl): 15 - 19.

[7] FEDI P, BAFICO A, NIETO SORIA A, *et al*. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 1999, 274(27): 19465 - 19472.

[8] MORIN P J, SPARKS A B, KORINEK V, *et al*. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC[J]. Science, 1997, 275(5307): 1787 - 1790.

[9] RUBINFELD B, ROBBINS P, EL GAMIL M, *et al*. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines[J]. Science, 1997, 275(5307): 1790 - 1792.

[10] HEISS N S, GLOECKNER G, BACHNER D, *et al*. Genomic structure of a novel LIM domain gene (ZNF185) in Xq28 and comparisons with the orthologous murine transcript[J]. Genomics, 1997, 43(3): 329 - 338.

[11] VANAJA D K, CHEVILLE J C, ITURRIA S J, *et al*. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression[J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 3877 - 3882.

[12] BRINCKERHOFF C E, RUTTER J L, BENBOW U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4823 - 4830.

[13] HUNTINGTON J T, SHIELDS J M, DER C J, *et al*. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(32): 33168 - 33176.

[14] LAI C H, CHOU C Y, CH'ANG L Y, *et al*. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics[J]. Genome Res, 2000, 10(5): 703 - 713.

[15] 杨丽萍，张舒林，刘旺根，等. 肺癌组织、支气管肺泡灌洗液及痰标本中 p16 基因甲基化特异性 PCR 检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(5)：734 - 736.

（编辑 汪勤俭）