文章编号:1000-5404(2006)03-0235-04

论著

应用cDNA芯片技术筛选胰腺癌相关基因

蒋业贵[1],李兆申[2],王宇明[1],刘同华[3] ([1]第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]第二军医大学长海医院消化科,上海 200433;[3]第三军医大学新桥医院药剂科,重庆 400037)

提 要: 目的 应用基因芯片技术筛选胰腺癌相关基因。**方法** 将14 000种人类基因PCR产物用CartesianPixsys7500点样仪按微矩阵排列点样于化学涂层的载玻片上,制成基因芯片。按一步法抽提4例胰腺癌和癌旁正常胰腺组织的总RNA,将等量的RNA分别逆转录合成荧光分子掺入的cDNA一链做探针,混合后杂交上述基因芯片。经严格洗片后用ScanArray3000扫描仪扫描芯片荧光信号图像,每点上两种荧光信号的强度分别代表Cy5-dCTP和Cy3-dCTP的量,获得的荧光信号图像用计算机分析。**结果** 按差异显著性标准,从14 000条基因中筛选出在胰腺癌组织中共同差异表达基因189条,其中已知基因101条,新基因88条。在筛选出的已知基因中,有50条表达上调,51条表达下调,包括原癌及抑癌基因、细胞周期蛋白相关基因、细胞骨架和运动蛋白相关基因、细胞凋亡和应激反应相关基因、DNA合成和修复相关基因、转录因子类基因、细胞受体相关基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因、蛋白翻译和合成相关基因、代谢相关基因等。**结论** 基因芯片技术的肿瘤基因表达谱分析能够高通量筛选胰腺癌相关基因,并高效对基因功能进行研究。胰腺癌基因表达谱的分析有助于认识肿瘤发病机制。

关键词: 胰腺癌;cDNA芯片;基因表达谱
中图法分类号: R319; R394-33; R735.9 **文献标识码**: A

Screening the human pancreatic cancer-associated genes by cDNA microarray

JIANG Ye-gui[1], LI Zhao-shen[2], WANG Yu-ming[1], LIU Tong-hua[3] ([1] Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2] Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; [3] Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To screen the human pancreatic cancer-associated genes by cDNA microarray. **Methods** The PCR products of 14 000 genes were spotted onto a chemical-material-coated-glass plates in array. DNAs were fixed onto the glass plate after series of treatments. The total RNAs were isolated from 4 specimens of the pancreatic cancer and the normal tumor-surrounding pancreatic tissues. Both equal quantity RNAs were reversely transcribed to cDNAs and labeled with the fluorescent Cy5-dCTP and Cy3-dCTP to prepare the hybridization probes. The mixed probes were hybridized to the cDNA microarray. After high-stringent washing, the fluorescent signals were scanned by ScanArray 4000 scanner. The values of Cy5-dCTP and Cy3-dCTP on each spot were analyzed and calculated by GenePix Pro 3.0 software. **Results** By applying this cDNA microarray, 189 differentially expressed genes in pancreatic cancer, whose ratios of Cy5/Cy3 were higher than 2.0 or lower than 0.5, were screened out among the 14 000 target genes, comprising 101 known genes and 88 novel gene. Among the known genes, upregulated and downregulated genes were 50 and 51 respectively, including oncogenes and tumor suppression genes, cell cycle related genes, cell skeleton and cinetc-protein related genes, cell apoptosis related genes, DNA synthesis related genes, DNA damage and repair-related genes, transcription factors, receptor related genes, immune related genes, signal transduction related genes, protein translation and synthesis related genes, metabolism related genes. **Conclusion** The analysis of gene expression profile of tumor based on cDNA microarray can realize high-throughput screening of the genes associated with the pancreatic cancer, and it can help to rapidly explore the genes function. Further analysis of the obtained genes will help to understand the molecular mechanism of the pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; cDNA microarray; gene expression profile

胰腺癌是一种恶性程度高、治疗效果差的恶性肿瘤,虽经手术在内的各种积极治疗,患者的5年生存率低于5%,胰腺癌确诊后患者平均生存期6个月。近年来胰腺癌的发病率有增高的趋势,对其发病机制

作者简介:蒋业贵(1966-),男,安徽省巢湖市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝炎和消化系肿瘤的基础和临床方面的研究,发表论文45篇。电话:(023)68754475,E-mail: jiangyegui@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-04-05;修回日期:2005-10-11

和早期诊断的研究日趋重要[1]。基因芯片技术是近几年发展起来的一项新技术,它通过微加工工艺在厘米见方的芯片上集成有大量的基因,在一次实验中可以对成千上万种基因的表达水平进行快速、准确、高效的检测[2],是探知基因在肿瘤与正常组织中表达差异、基因在不同组织和器官中表达差异、基因在不同状态的细胞中表达差异等的重要手段,已被广泛地用于肿瘤发生的分子生物学研究领域[3,4]。本研究应用含有 14 000 条人类基因的 cDNA 表达谱芯片,以临床切除的胰腺癌及正常胰腺组织为研究对象,高效率、高通量筛选胰腺癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因群,并对基因功能进行研究,为进一步研究胰腺癌发生、发展的分子机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

收集上海市长海医院 2003 年 2 - 5 月手术切除的胰腺癌标本 4 例。其中男性 2 例,女性 2 例,平均年龄 51.8(47 ~ 67)岁,病理学类型为高分化腺癌 1 例、中分化腺癌 2 例、低分化腺癌 1 例。同时取肿瘤组织与距肿瘤 5 cm 以上的正常胰腺组织(经病理学证实)。标本切取后立即液氮冻存备用。

1.2 芯片制备

所用芯片类型为 BiostarH140s,由上海博星基因有限责任公司提供,包含 14 071 个 cDNA 克隆,其中人类已知和未知基因13 939条,对照基因 173 条。靶基因溶解于点样液中,用 Cartesian 7500 点样仪点于 TeleChem 公司的硅烷化玻片上。点样后玻片进行 2 h 水合,30 min 室温干燥,置于紫外交联仪中交联,再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

1.3 探针制备

采用一步法提取胰腺癌和癌旁正常胰腺组织总 RNA。每一份探针取 RNA 逆转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dCTP 标记正常胰腺组织,用 Cy5-dCTP 标记胰腺癌组织。探针溶解在 20 μl 5 × SSC + 0.2% SDS 杂交液中。

1.4 芯片杂交和洗涤

将配制好的预杂交液放入 95 ℃水浴锅内变性 2 min,将待预杂交的玻片放入 95 ℃水浴锅内变性 30 s,玻片取出后即放入无水乙醇中 30 s,晾干;将已变性的预杂交液加到玻片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内 42 ℃预杂交 5 ~ 6 h。将探针置于 95 ℃水浴中变性 2 min,芯片置于 95 ℃水浴中变性 30 s,芯片取出浸无水乙醇 30 s,探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用 Parafilm 密封,放入 42 ℃杂交箱内杂交过夜(16 ~ 18 h)。再用 3 个染色缸装洗片试剂,放入 60 ℃水浴锅,将玻片依次浸入染色缸中用 2 × SSC + 0.2% SDS、0.1 × SSC + 0.2% SDS 和 0.1 × SSC 洗涤 10 min,晾干后扫描。

1.5 检测与分析

芯片双波长扫描用 General Scanning 公司的 ScanArray4000,通过芯片图像分析软件 GenePix Pro 3.0 对芯片进行分析。为了校正 Cy5、Cy3 标记体系间的系统误差,实验数据要依据管家基因进行均一化处理。将 Cy3 信号值乘上均一化系数,得出调整后的 Cy3*。并且,为了避免弱信号对实验结果的干扰,将所有小于 200 的 Cy3* 值以 200 取代。计算每个基因点在本次实验中的表达差异值 Ratio,Ratio = Cy5/Cy3*。筛选出 Ratio 大于 2 或小于 0.5 的基因点,这些数据所代表的基因在与两种探针杂交时表现出较大的差异。

2 结果

2.1 总 RNA 质量鉴定

所提取总 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.878 ~ 2.083,说明没有蛋白质和 DNA 残留,纯度较高。经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后可以清晰地可看到 18S 和 28S 两条清晰条带,说明 RNA 质量良好,没有降解。热稳定试验显示 70 ℃ 1 h 和 - 20 ℃ 1 h 电泳条带比较,28S 条带无降解。

2.2 芯片检测结果

4 组芯片杂交结果显示,所有阳性对照(管家基因)的杂交信号清晰,阴性对照的杂交信号都很低,从而证实了数据的可靠性。按差异显著性标准,从 14 000 条基因中筛选出在胰腺癌组织中共同差异表达基因 189 条,其中已知基因 101 条,新基因 88 条。在筛选出的已知基因中,有 50 条表达上调,51 条表达下调(表 1、2),包括原癌及抑癌基因、细胞周期蛋白相关基因、细胞骨架和运动蛋白相关基因、细胞凋亡和应激反应相关基因、DNA 合成和修复相关基因、转录因子类基因、细胞受体相关基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因、蛋白翻译和合成相关基因、代谢相关基因等。在筛选出的新基因中,有 40 条表达上调,48 条表达下调。

表 1 胰腺癌组织中表达上调的部分基因

功能分类	GenBank 收录号	基因描述
细胞周期	NM_031966	Homo sapiens cyclin B1 (CCNB1)
细胞骨架和运动蛋白	NM_022790	Homo sapiens matrix metalloproteinase 19, transcript variant rasi - 3 (MMP19)
	NM_002026	Homo sapiens fibronectin 1 , transcript variant 1 (FN1)
细胞凋亡	NM_004050	Homo sapiens BCL2 - like 2 (BCL2L2)
DNA 合成和修复	NM_003926	Homo sapiens methyl - CpG binding domain protein 3 (MBD3)
免疫相关	NM_177433	Homo sapiens melanoma antigen, family D, transcript variant 2 (MAGED2)
信号传导	NM_002923	Homo sapiens regulator of G - protein signalling 2, 24kD (RGS2)
	NM_001743	Homo sapiens calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) (CALM2)
	NM_005990	Homo sapiens serine/threonine kinase 10 (STK10)
代谢相关	NM_005617	Homo sapiens ribosomal protein S14 (RPS14)
	NM_002627	Homo sapiens phosphofructokinase, platelet (PFKP)
	NM_001428	Homo sapiens enolase 1, (alpha) (ENO1), mRNA (ENO1)

表 2　胰腺癌组织中表达下调的部分基因

功能分类	GenBank 收录号	基因描述
抑癌基因	NM_002634	Homo sapiens prohibitin (PHB)
	NM_007295	Homo sapiens breast cancer 1, early onset, transcript variant BRCA1b (BRCA1)
细胞周期	NM_006349	Homo sapiens putative cyclin G1 interacting protein (CG11)
细胞凋亡	NM_032982	Homo sapiens caspase 2, apoptosis - related cysteine protease, transcript variant 1 (CASP2)
	NM_004208	Homo sapiens programmed cell death 8 (apoptosis - inducing factor) (PDCD8)
DNA 合成和修复	NM_006230	Homo sapiens polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit (50kD) (POLD2)
免疫相关	NM_003299	Homo sapiens tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1)
信号传导	NM_004127	Homo sapiens G protein pathway suppressor 1 (GPS1)
	NM_000557	Homo sapiens growth differentiation factor 5 (cartilage - derived morphogenetic protein - 1) (GDF5)
代谢相关	NM_000975	Homo sapiens ribosomal protein L11 (RPL11)
	NM_000071	Homo sapiens cystathionine - beta - synthase (CBS)
	NM_000169	Homo sapiens galactosidase, alpha (GLA)

3　讨论

肿瘤的发生和发展是一个复杂的多阶段的过程，实际是多种肿瘤相关基因表达失常或许多肿瘤抑制基因失活所致。因此要了解癌变过程中的基因变化，需要研究的不是一个或几个，而是整个基因组在从正常到癌的各个阶段中上千基因表达的动态变化。基因芯片技术能大规模对多种样本中基因差异表达进行平行分析，可以对生命科学与医学中的各种生物化学反应过程进行集成，其最大的优点是一次性对同一样品进行大量序列检测和核酸分析，所以越来越多地应用与基因表达的研究。

本实验从 14 000 条基因中筛选出在胰腺癌组织中共同差异表达基因 189 条，其中已知基因 101 条，新基因 88 条。在筛选出的已知基因中，有 50 条表达上调，51 条表达下调，包括原癌及抑癌基因、细胞周期蛋白相关基因、细胞骨架和运动蛋白相关基因、细胞凋亡和应激反应相关基因、DNA 合成和修复相关基因、转录因子类基因、细胞受体相关基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因、蛋白翻译和合成相关基因、代谢相关基因等。

人 prohibitin 基因位于 17q21，其表达产物 Prohibitin 具抗增殖活性，与视网膜母细胞瘤基因编码蛋白 pRB 蛋白结合，抑制转录因子 E2F 的转录活性。BRCA1 即人类乳腺癌易患基因，是 1994 年发现的一个抑癌基因，它所编码的蛋白质与一种双链 DNA 损伤修复有关的称为 RDAI 蛋白质有关，有认为其突变与 p53 突变有相关性，是一种重要的促进细胞凋亡因子，对肿瘤生长起抑制作用[5]。本实验中抑癌基因 prohibitin 和 BRCA1 在胰腺癌中呈下调表达，与胰腺癌的发生、发展密切相关。

细胞周期素 B1 是细胞周期的正性调控子，参与细胞 DNA 合成、复制，促进细胞进入有丝分裂，它的正常表达是保证 G_2/M 期进程顺利完成的主要因子。p27 是一种细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂（CDK1），p27 蛋白通过结合和调节细胞周期蛋白依赖激酶（CDK）而控制细胞增殖[6-8]。因此，提高 p27 基因表达水平是一种治疗癌的新方法[9]。本研究结果显示细胞周期素 B1（CCNB1）、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1B（CDKN1B，p27）等表达上调，从而促进胰腺癌的发生、发展。

MMP19 是最近发现的锌依赖性蛋白酶超家族成员，在染色体定位和结构上与其他 MMP 不同，与肿瘤的生长和转移密切相关。MMP19 可降解众多的基质，包括蛋白多糖、胶原链的非螺旋区、弹力蛋白、FN 和 LN 等。MMP19 活性的增强可促进瘤细胞侵袭和转移。肝素酶（HPSE）属于糖基水解酶，其水解位点是糖苷键，可以降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖，促进肿瘤的转移和浸润[10,11]。纤维粘连蛋白（FN）可以与胶原 collagen、肝素 heparan 等结合，促进细胞粘附、影响细胞迁移和分化，参与细胞骨架构建及细胞形态的形成，在肿瘤的侵袭和转移中起重要作用[12]。尿激酶型血纤维蛋白溶解酶原激活因子（urine type plasminogen activator，PA）主要参与细胞分化、血管生成、细胞迁移、细胞外基质降解，促进肿瘤侵袭和转移[13]。本研究结果显示上述基因在胰腺癌中均上调表达，这种基因表达谱类型可能决定了胰腺癌高转移性、高侵袭性的生物学特征和较差的预后。

众所周知，细胞凋亡异常在肿瘤的发生、发展过程中占有重要地位。肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡的结果，凋亡减弱是肿瘤的重要发生机制。本实验检测到 caspase、程序性细胞死亡因子（PDCD）、Fas 相关因子（FAF1）、死亡相关转录因子（DATF1）等凋亡相关基因表达下调，而凋亡抑制基因 Bcl2 表达增高，抗凋亡蛋白与凋亡蛋白不平衡，最终导致肿瘤迅速增长，形成不同组织类型的胰腺癌。

异常的启动子的 CpG 岛的 DNA 甲基化将导致肿瘤抑制基因、DNA 修复基因及转移抑制基因的转录抑制，并与其他的肿瘤相关基因的不稳定性有关[14]。甲基磷酸胞苷酰鸟苷结合蛋白 3（MBD3）是一个重要的转录调控因子，它通过与甲基化的磷酸胞苷酰鸟苷

(CpG)位点结合,影响正常的转录过程。DNA 聚合酶δ(POLD2)不仅参与 DNA 的复制,还参与 DNA 核苷酸的剪切修复,同时地对维持 DNA 复制的精确性有重要作用,其表达下降,可能使细胞基因组不稳定,从而导致肿瘤的产生。在本实验中 MBD3 胰腺癌中表达上调,而 POLD2 表达下调,提示 DNA 合成、修复和转录相关基因的异常表达与胰腺癌的发生发展存在密切的关系。

本实验发现许多信号传导相关基因在胰腺癌中上调表达,如 G 蛋白信号调节因子(RGS2)、蛋白酪氨酸磷酸酶 E(PTPRE)、人有丝分裂激活蛋白激酶 5(MAPK5)、胞内激酶(Ser/Thr 激酶 STK10)等。同时,G 蛋白通路抑制因子 1(GPS1)、生长分化因子 5(GDF5)等下调表达。说明胰腺癌的发生发展可能与多条信号传导通路的异常活跃,使生长信号连续不断传入,引起细胞增殖失控有关。蛋白酪氨酸磷酸酶作为胰岛素作用通路上的负调节酶,组织中蛋白酪氨酸磷酸酶活性的升高,被认为与人和动物的糖尿病和肥胖的胰岛素抵抗有关。以往对于胰腺癌患者多伴有糖尿病或糖耐量异常这一现象无法从机制上加以解释,而实验显示,胰腺癌组织中蛋白酪氨酸磷酸酶 E 基因均显著高表达,似乎是这一现象的原因之一。

在检测到的表达上调的基因中,与代谢有关的基因较多,如磷酸果糖激酶(PFKase)、酪氨酸磷酸酶(PTPase)、ATP 酶、烯醇化酶等[15]。这说明胰腺癌和其他恶性肿瘤同一样是以高糖酵解为特征的,这也是肿瘤细胞的主要能量来源。在胰腺癌中大多数核糖体蛋白基因表达下调,只有少数表达上调。这可能与癌细胞的功能简单化有关。蛋白酪氨酸磷酸化是一个可逆的过程,是蛋白酪氨酸磷酸酶和/或蛋白酪氨酸激酶激活的结果。这种平衡是调控生长和分化的关键。酪氨酸磷酸酶(PTPase)参与多种激素(包括表皮生长因子、胰岛素、胰岛素样生长因子 1 等)介导的信号调控、能量代谢、细胞增殖和促进 MHC1 类抗原的表达。酪氨酸磷酸酶活性下降会降低细胞表面 MHC1 类抗原的表达,使恶性细胞逃逸免疫监视。

此外,本实验显示 88 条与胰腺癌相关的新基因,对这些基因的结构和功能进行深入研究,进一步探讨其在胰腺癌发生、发展中的分子机制,有可能使其成为胰腺癌诊断和基因治疗的分子靶标。总之,本研究结果说明基因芯片技术的肿瘤基因表达谱分析能够高通量筛选胰腺癌相关基因,并高效对基因功能进行研究;基因芯片技术是克隆差异表达基因及发现新基因的有效方法;胰腺癌的发生、发展是一个非常复杂的多阶段过程,涉及到众多肿瘤相关基因表达失常或抑癌基因的失活。

参考文献:

[1] KERN S E, HRUBAN R H, HIDALGO M, *et al*. An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy [J]. Cancer Biol Ther, 2002, 1(6): 607-613.

[2] YEATMAN T J. The future of cancer management: translating the genome, transcriptome, and proteome [J]. Ann Surg Oncol, 2003, 10(1): 7-14.

[3] CHEN J J, PECK K, HONG T M, *et al*. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model [J]. Cancer Res, 2001, 61(13): 5223-5230.

[4] YANAGAWA R, FURUKAWA Y, TSUNODA T, *et al*. Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray [J]. Neoplasia, 2001, 3(5): 395-401.

[5] HSU L C, DOAN T P, WHITE R L. Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1 [J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7713-7718.

[6] HARADA K, SUPRIATNO, YOSHIDA H, *et al*. Low p27Kip1 expression is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2002, 22(5): 2985-2989.

[7] SCHWERER M J, SAILER A, KRAFT K, *et al*. Cell proliferation and p27Kip1 expression in endophytic schneiderian papillomas [J]. Laryngoscope, 2002, 112(5): 852-857.

[8] CESINARO A M, MIGALDI M, CORRADO S, *et al*. Expression of p27kip1 in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas [J]. Am J Dermatopathol, 2002, 24(4): 313-318.

[9] CHIARLE R, FAN Y, PIVA R, *et al*. S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase [J]. Am J Pathol, 2002, 160(4): 1457-1466.

[10] MARCHETTI D, LI J, SHEN R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase [J]. Cancer Res, 2000, 60(17): 4767-4770.

[11] FRIEDMANN Y, VLODAVSKY I, AINGORN H, *et al*. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis [J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1167-1175.

[12] ITO H, MIYAZAKI M, NISHIMURA F, *et al*. Secretion of extracellular matrix (fibronectin), growth factor (transforming growth factor beta) and protease (cathepsin D) by hepatoma cells [J]. Oncology, 2000, 58(3): 261-270.

[13] BAJOU K, LEWALLE J M, MARTINEZ C R, *et al*. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression [J]. Int J Cancer, 2002, 100(5): 501-506.

[14] ESTELLER M, HERMAN J G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours [J]. J Pathol, 2002, 196(1): 1-7.

[15] PENSO J, BEITNER R. Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology [J]. Mol Genet Metab, 2002, 76(3): 181-188.

(编辑 陈聪连)