文章编号:1000-5404(2006)02-0151-03

论著

# 德氮吡格对人肝癌细胞株 QGY-7701 基因表达的影响

李龙江[1],杨晓兰[1],袁拥华[1],刘 嫱[1],汤为学[2],陈志琼[1],余 瑜[1] (重庆医科大学:[1]药物化学和生物材料研究室,[2]病理生理学教研室,重庆 400016)

**提 要:目的** 研究德氮吡格(TNBG)对人肝癌细胞株 QGY-7701 基因表达的影响,探讨其抗肿瘤作用的分子机制。**方法** 采用基因芯片检测德氮吡格处理人肝癌细胞株 QGY-7701 前后 mRNA 的改变情况。**结果** 基因芯片筛选出差异表达基因共 1 200 条,尤以脂代谢相关基因变化最显著:脂肪合成有关的 10 条基因表达上调,脂肪分解有关的 3 条基因和脂肪转移有关的 1 条基因表达下调。**结论** 德氮吡格的抗肿瘤效应可能是通过干扰细胞的脂代谢来实现的。

**关键词:** 德氮吡格;肝肿瘤;基因表达;脂代谢

**中图法分类号:** R735.7;R966;R979.1 **文献标识码:** A

# Changes of gene expression of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701 induced by Tetrazanbigen

LI Long-jiang[1], YANG Xiao-lan[1], YUAN Yong-hua[1], LIU Qiang[1], TANG Wei-xue[2], CHEN Zhi-qiong[1], YU Yu[1] ([1]Research Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, [2]Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To study the effects of Tetrazanbigen (TNBG) on the gene expression of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701 for elucidating its antitumor mechanism. Methods The cDNA microarray technique was used to explore the gene expression profiles of the tumor cells before and after TNBG treatment. Results The cDNA microarray screened 1 200 differential expression genes. The expression difference of genes involving lipid metabolism was most remarkable, in which 10 genes involving lipid biosynthesis were up-regulated, 3 genes responsible for lipid degradation and 1 for lipid transport were down-regulated. Conclusion The mechanism of antitumor effect of TNBG is probably *via* interfering with lipid metabolism of tumor cells.

**Key words:** tetrazanbigen; hepatocellular carcinoma; gene expression; lipid metabolism

目前用于肿瘤治疗的主要手段有手术、放疗、化疗和生物治疗。化疗的作用主要有三方面:作为根治性治疗手段,术后辅助治疗,晚期肿瘤患者的姑息性治疗。但是,化疗也有其不利的方面:患者一般情况太差,不能耐受化疗;肿瘤对化疗药物产生了原发性或继发性耐药性;药物选择性不强,对生长缓慢或暂处于休止期的癌细胞无效或效力较差。因此,当前研发重点就集中于寻找高效低毒的新化疗药物。

德氮吡格(Tetrazanbigen, TNBG)为本研究室自主开发的具有创新构型的抗肿瘤化合物,已获中国发明专利(ZL95111 450.6)。前期荷瘤动物实验显示:本品对小鼠移植性肿瘤 $H_{22}$、艾氏腹水癌、$S_{180}$ 有抑制生长的作用;并且在兔移植性肝 $VX_2$ 肿瘤模型中,德氮吡格处理组较对照组的瘤块小且生存时间明显延长,表明该药在体内具有较好的抗肿瘤作用。此外,德氮吡格具有毒副作用较小,与常用抗癌药物基本无交叉耐药性的特点。但是,德氮吡格通过何种机制产生抗肿瘤效应,尚未阐明。本研究以人肝癌细胞株 QGY-7701 为模型,从分子水平初步探讨德氮吡格的抗肿瘤机制,以期为新的抗癌药物的研究开发奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与主要仪器

德氮吡格由本研究室自主全合成,配成 555.55 μmol/L 溶

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30371632),重庆市科委攻关课题(2002-14-25),重庆市教委课题(2002-18-04)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371632), the Fundation for the Key Sci&Teeh Research Project of Chongqing Scientific Committee (2002-14-25) and the Researd Foundation of Chongqing Municipal Education Commision (2002-18-04)

**作者简介:** 李龙江(1973-),男,四川省威远县人,博士研究生,讲师,主要从事抗肿瘤药物药理学方面的研究。电话:(023)68485478, E-mail: lljlyy2003@163.com

**通讯作者:** 余 瑜,电话:(023)68485808, E-mail: lljlyy@163.com

**收稿日期:** 2005-03-18;**修回日期:** 2005-06-15

液(储备液),室温保存;基因芯片由上海博星基因芯片有限责任公司提供,HGEC-80s,含 8 464 个基因。

### 1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 QGY-7701 由重庆医科大学病理生理学教研室提供,细胞培养在 RPMI1640 培养液中(含 10% 小牛血清,1 $\times 10^5$ U/L 青霉素、链霉素),置于 37 ℃、5% $CO_2$ 孵育箱内备用。

### 1.3 基因芯片检测

1.3.1 mRNA 提取和探针标记 收集 11.11 μmol/L 德氮吡格处理 72 h 及对照组细胞各 $1 \times 10^8$ 个[1]。用改进的 GibcoBRL 公司 Trizol 试剂一步法抽提细胞的总 RNA,用 Oligotex mRNA-MidiKit(Qiagen 公司)纯化 mRNA,紫外和电泳分析总 RNA 和 mRNA 质量。逆转标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dUTP 标记对照组,Cy5-dUTP 标记实验组。

1.3.2 芯片杂交 实验所用芯片为人类表达谱基因芯片(HGEC-80s),芯片上包含靶基因以及参照基因的 cDNA 共 8 464条,每条基因均为两点,随机分布于芯片上的不同位置。杂交方法按照试剂盒说明进行。

1.3.3 扫描分析 用 GenePix4000B 扫描芯片,用 GenePix-Pro3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。经过内参照基因的标准化,以 Cy5/Cy3 位 >2 或 <0.5,并且 Cy5、Cy3 信号强度 >200 作为判断基因差异表达的标准。

## 2 结果

### 2.1 基因芯片分析差异基因表达

图 1 为对照组表达谱(Cy3)扫描结果同 11.11 μmol/L 德氮吡格处理 72 h 后的表达谱(Cy5)扫描结果经过计算机数据叠加后产生的图像,反映了每个被检基因在二者相互比较中表达丰度的比值,代表了二者基因表达的差异。黄色点代表该基因表达丰度在二者中接近;红色点代表该基因在药物处理组中高表达,在对照组中低表达或不表达;绿色点则与红色点意义相反。在基因芯片上近 8 464 条靶基因中,筛选出 Cy5/Cy3 >2 或 <0.5 的基因 1 200 条,有差异表达的基因占芯片总数的 14.2%,下调基因为 654 条,上调基因为 546 条,其中与脂代谢相关的基因表达差异最明显。从表 1 可知:10 条与脂质(主要是胆固醇和脂肪酸)合成相关的基因表达明显上调,3 条与脂质分解相关的基因表达下调,1 条与脂肪酸转运相关的基因下调。

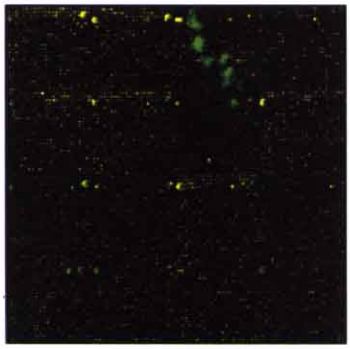


**图 1 11.11 μmol/L 德氮吡格处理 72 h 组(Cy5 标记)和对照组(Cy3 标记)双色荧光标记叠加图**

**表 1 德氮吡格诱导的与脂代谢有关的基因表达差异**

| GenBank | 比值(Cy5/Cy3) | 基因名称 |
|---|---|---|
| 脂质合成相关基因 | | |
| HUMFAPS | 9.884 | 法呢基焦磷酸合成酶 |
| HUMSQAUSYI | 9.818 | 角鲨烯合成酶 |
| AF067127 | 5.727 | 7-脱氢胆固醇还原酶(DHCR7) |
| HUMSQUAL | 5.319 | 肝脏角鲨烯合成酶 |
| AF097514 | 4.101 | 硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 |
| AF033345 | 3.136 | 甲羟戊酸激酶 |
| HSU18197 | 2.686 | 柠檬酸裂解酶 |
| HSU17081 | 2.627 | 脂肪酸结合蛋白 |
| HSU49260 | 2.460 | 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 |
| HSU93162 | 2.093 | C4-固醇甲基氧化酶 |
| 脂质降解相关基因 | | |
| HSLIPAS | 0.457 | 脂蛋白脂酶 |
| HUMACADM | 0.374 | 中链酰基辅酶 A 脱氢酶 |
| HUMCYP27 | 0.373 | 固醇 27 羟化酶 |
| 脂肪酸转运相关基因 | | |
| HSMTTP | 0.322 | 微粒体甘油三酯转移酶 |

## 3 讨论

前期研究表明[1]:德氮吡格能明显抑制人肝癌细胞株 OGY-7701 增殖并呈时间剂量依赖性;11.11 μmol/L 德氮吡格作用肿瘤细胞 72 h 后,油红 O 染色,光镜下可发现大量脂滴聚集在细胞质的独特现象。由此,设想德氮吡格可能通过干扰肿瘤细胞脂代谢途径来达到抗肿瘤效应,然而,其分子机制尚待阐明。

基因芯片采用原位合成或直接点样的方法,将 DNA 片段或寡核苷酸片段排列在硅片、玻璃等载体上形成微矩阵,待测样品用荧光分子标记后,与芯片上的 DNA 片段或寡核苷酸片段杂交,通过荧光扫描及计算机分析后获得大量的基因信息,其突出特点在于能够对微量样本中的核酸序列信息进行快速、高通量的检测和分析。以上的特点使基因芯片成为抗肿瘤药物前期基础性研究的强有力工具,为其从传统的细胞毒性药物向针对新靶点的新型抗肿瘤药物的发展提供了巨大的技术支持。基因芯片在抗肿瘤药物研究中主要用于抗肿瘤药物的筛选、确立药物作用的靶标以及抗肿瘤药物毒理学上的研究[2,3]。

本研究正是利用基因芯片高通量、快速的特点来寻找德氮吡格的靶标,阐明其抗肿瘤作用机制。基因芯片筛选出 1 200 条差异基因,其中脂代谢相关的基因差异表达最明显。在上调的基因中,有 10 条和脂质合成代谢有关,主要涉及胆固醇和脂肪酸的合成。与胆固醇合成密切相关的上调基因有:法呢基焦磷酸合成酶、角鲨烯合成酶、甲羟戊酸激酶、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶等。在整个芯片检测中,Cy5/Cy3 的最大比值

为 9.884，为编码法呢基焦磷酸合成酶的基因；而编码角鲨烯合成酶的基因的 Cy5/Cy3 比值也达到 9.818，呈显著升高。法呢基焦磷酸合成酶催化二甲丙烯焦磷酸和两分子类异戊二烯焦磷酸生成法呢基焦磷酸[4]，两分子法呢基焦磷酸在角鲨烯合成酶作用下缩合成角鲨烯[5]，这是胆固醇合成中的两个重要环节。此外，甲羟戊酸激酶[6]、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶[7]也和胆固醇合成密切相关，其基因表达也明显上调。据此说明药物处理后，肿瘤细胞胆固醇的合成明显增加。另一方面，脂肪酸合成相关基因的差异表达也呈上升之势，如硬脂酰辅酶 A 脱氢酶[8]，为不饱和脂肪酸合成的限速酶；柠檬酸裂解酶[9]催化合成细胞质中乙酰 CoA，而乙酰 CoA 是脂肪酸从头合成的起始物质。德氮吡格可以引起硬脂酰辅酶 A 脱氢酶和柠檬酸裂解酶的转录增加（Cy5/Cy3 比值分别为 4.101 和 2.686），最终表现为脂肪酸合成增加。综上可知：德氮吡格处理细胞后，胆固醇和脂肪酸的合成都是增加的。

但是，脂质分解代谢有关的一些基因转录则是下降的。固醇 27 羟化酶催化胆固醇合成胆汁酸，是胆固醇代谢的一个重要途径[10]；而脂肪酸在线粒体中进行 β-氧化的起始步骤是由中链酰基辅酶 A 脱氢酶[11]催化的；脂蛋白脂酶则和胆固醇、脂肪酸的降解均有关。基因芯片结果显示以上三者的转录都明显下降，Cy5/Cy3 的比值分别为 0.373、0.374 和 0.457，提示药物处理后，细胞内的胆固醇和脂肪酸分解代谢是降低的。

因此，综合基因芯片提供的信息，初步揭示德氮吡格可能的抗肿瘤机制为：使肿瘤细胞脂质合成增加，而分解下降，引起大量脂质聚集在细胞中，最终导致肿瘤细胞死亡。但聚积脂质是通过何种机制引起细胞的死亡，其信号转导途径还有待深入研究。

## 参考文献：


[1] 李龙江，余　瑜，汤为学，等. 德氮吡格对人肝癌细胞株 QGY-7701 增殖和凋亡的影响[J]. 四川大学学报：医学版，2005，36(3)：372－374.

[2] YOUNG R A. Biomedical discovery with DNA arrays[J]. Cell，2000，102(1)：9－15.

[3] BLOHM D H，GUISEPPI ELIE A. New developments in microarray technology[J]. Curr Opin Biotechnol，2001，12(1)：41－47.

[4] GOLDSTEIN J L，BROWN M S. Regulation of the mevalonate pathway[J]. Nature，1990，343(6257)：425－430.

[5] BLAGG B S，JARSTFER M B，ROGERS D H，*et al*. Recombinant squalene synthase. A mechanism for the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene[J]. J Am Chem Soc，2002，124(30)：8846－8853.

[6] LLUCH M A，MASFERRER A，ARRO M，*et al*. Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from Arabidopsis thaliana[J]. Plant Mol Biol，2000，42(2)：365－376.

[7] DHE PAGANON S，MAGRATH J，ABELES R H. Mechanism of mevalonate pyrophosphate decarboxylase：evidence for a carbocationic transition state[J]. Biochemistry，1994，33(45)：13355－13362.

[8] MIYAZAKI M，JACOBSON M J，MAN W C，*et al*. Identification and characterization of murine SCD4，a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors[J]. J Biol Chem，2003，278(36)：33904－33911.

[9] MOON Y A，LEE J J，PARK S W，*et al*. The roles of sterol regulatory element-binding proteins in the transactivation of the rat ATP citrate-lyase promoter[J]. J Biol Chem，2000，275(39)：30280－30286.

[10] HALL E，HYLEMON P，VLAHCEVIC Z，*et al*. Overexpression of CYP27 in hepatic and extrahepatic cells：role in the regulation of cholesterol homeostasis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2001，281(1)：G293－G301.

[11] TOLWANI R J，FARMER S C，JOHNSON K R，*et al*. Structure and chromosomal location of the mouse medium-chain acyl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its promoter[J]. Gene，1996，170(2)：165－171.


（编辑　陈聪连）


## 《中国医科大学学报》征订启事

《中国医科大学学报》为全国性医药卫生综合类学术期刊，国内外公开发行。本刊 1951 年创刊，为中国综合性医药卫生类核心期刊，《中国科技论文统计与分析》，《中国科学引文索引》统计源期刊。已进入美国化学文摘（CA）、美国生物学文摘（BA）、俄罗斯文摘杂志（AJ）等国家重要检索系统，并被国内中文生物医学期刊目次数据库、中国科学技术期刊文摘数据库、万方数据资源系统等多种权威数据库收录。2004 年获全国高校优秀期刊二等奖。

本刊登载国内外广大医药卫生科研工作者在医疗、教学、科研领域的科技论文。主要栏目有：基础医学、公共卫生学、法医学、口腔医学、医学心理学、临床医学、护理学、技术方法等。

校外来稿仅限于省级以上基金稿件，来信请注明基金项目、名称和批准号，并附相关单位证明及作者简介，基金项目论文将优先发表。

本刊为双月刊，A4 开本，112 页，8 元/册，全国各地邮局订阅。国内统一刊号：21-1227/R，国际标准期刊号：0258-4646，CODEN 码：ZYDXEN，国内邮发代号：8-175，国际邮发代号：BM904。

《中国医科大学学报》热忱欢迎校内外医疗、科研人员积极投稿，踊跃订阅。

地　址：沈阳市和平区北二马路 92 号　　邮　编：110001

电　话：（024）23250375　　**E-mail**：journal@mail.cmu.edu.cn