文章编号:1000-5404(2006)16-1707-03

论著

恶性胶质瘤患者外周血淋巴细胞基因表达谱的研究

程迎新,唐文渊 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

提 要:目的 运用基因芯片技术研究恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞基因表达差异,以探讨恶性胶质瘤患者免疫细胞的基因表达特点。**方法** 应用含13 824点cDNA的人类基因表达谱芯片分别检测23例恶性胶质瘤患者和40例正常外周血淋巴细胞基因表达差异。提取恶性胶质瘤患者和健康人淋巴细胞的mRNA,反转录制备标有不同荧光素的cDNA探针,将探针与芯片杂交后扫描荧光强度并数字化,用专业软件对检测结果进行分析从而筛选出差异性表达的基因。**结果** 发现恶性胶质瘤患者淋巴细胞有96个基因呈现差异表达,其中上调表达的基因25个,下调表达的基因71个。**结论** 恶性胶质瘤患者和正常人的外周血淋巴细胞基因表达存在差异。淋巴细胞DNA结合,转录功能异常和信号传导功能异常可能是恶性胶质瘤患者免疫功能有别于健康人的原因之一。

关键词: 胶质瘤;基因芯片;淋巴细胞;血液

中图法分类号: R392.12;R394.2;R730.264 **文献标识码:** A

Multiform peripheral blood lymphocyte gene expression spectrum in glioblastoma patients

CHENG Ying-xin, TANG Wen-yuan (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the difference of the peripheral blood lymphocyte gene expression in the glioblastoma patients and the normal subjects by the gene chip engineering technique. **Methods** The human gene expression spectrum chip containing 13 824 cDNA was used to detect the gene expression in the peripheral blood lymphocytes of 23 glioblastoma patients and 40 normal persons. The lymphocyte mRNA in the glioblastoma patients and healthy subjects was withdrawn. The cDNA probe with the different fluorescein was made by reverse transcription. The probe and the chip were hybridized. The fluorescence intensity was scanned and digitized, and gene expression was compared between the two groups. **Results** The peripheral blood lymphocytes in the glioblastoma patients had 96 genes to present the difference expression with that of normal subjects, including 25 upregulated genes and 71 downregulated genes. **Conclusion** The gene expression in the peripheral blood lymphocytes of glioblastoma patients and normal subjects exists difference. The lymphocyte DNA union, the abnormal function of transcription and signal conduction are the possible reasons for the different immune function between the glioblastoma patients and the healthy subjects.

Key words: glioblastoma; gene expression; lymphocyte; peripheral blood

尽管20年来神经外科治疗水平不断提高,恶性脑胶质瘤(glioblastoma)患者的预后却没有得到明显的改善[1]。近年来随着人们对T淋巴细胞和B淋巴细胞介导的机体免疫机制的进一步详尽了解,对胶质瘤患者的免疫状态也进行了广泛的研究,这些研究表明胶质瘤患者的免疫功能比健康人低,而胶质瘤能逃避免疫杀伤的机制之一正是它的生长抑制了人体正常的免疫功能,因此诱导机体对肿瘤的免疫反应从而杀伤脑胶质瘤细胞具有诱人的前景[2,3]。基因芯片技术(cDNA microarray)是近年来发展起来的新技术,能高通量、高效、快捷的大规模平行检测不同样品的基因表达,其最大的优点是改变了传统的一次实验仅能对单个或几个基因表达差异进行观察。本研究采用基因芯片技术分析恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞

作者简介:程迎新(1977-),男,山东省潍坊市人,博士,主要从事脑胶质瘤的基础方面的研究。电话:13193195828,E-mail: cqykdx@hotmail.com.

通讯作者:唐文渊,电话:(023)89011159

收稿日期:2005-10-11;修回日期:2006-06-01

基因表达差异，试图为改善恶性胶质瘤患者的免疫状况提供更丰富的内容。

1 材料与方法

1.1 材料

恶性胶质瘤患者血液标本来自重庆医科大学附属第一医院神经外科2003年6月至12月收治的23例恶性胶质瘤患者（术前查体排除有自身免疫系统疾病、急性感染、心肺疾病以及其他一些系统性疾病的患者），男性12例，女性11例，年龄22～72岁，平均38岁，每例4 ml。恶性胶质瘤患者的临床病理分级按WHO神经系统肿瘤分类标准分为：WHOⅢ级13例，WHOⅣ级10例。正常健康人血液标本由本院健康人群提供，共40例，每例4 ml。血液分离有核细胞后，立即加入Trizol混匀，液氮过夜后－80 ℃冰箱保存。

1.2 芯片制备

人类基因表达谱芯片使用的13 824个靶基因的cDNA克隆由上海生物工程有限公司提供，以通用PCR引物扩增，PCR反应及产物纯化用标准方法进行，琼脂糖凝胶电泳监控PCR质量。靶基因溶解于3x SSC点样液中，用Cartesian7500点样仪点于硅烷化玻片上，每个靶基因重复点2点。点样后玻片经2 h水合，室温干燥0.5 h，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

参照文献[4]用一步法分别提取恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞的总RNA，每1份探针取RNA逆转录标记cDNA探针并纯化。用Cy3-dUTP标记正常人外周血淋巴细胞，用Cy5-dUTP标记恶性胶质瘤患者淋巴细胞，乙醇沉淀后将探针混合溶解在20 μl5xSSx +0.2% SDS杂交液中。

1.4 杂交及洗涤

将芯片和杂交探针在95 ℃水浴中变性，玻片置于95 ℃水浴中变性30 s，再将玻片置于无水乙醇中30 s，探针取出后迅速置于冰上，将探针加在芯片上，用盖玻片封片，置于密封舱，在42 ℃杂交箱内杂交16～18 h，去盖玻片后用2xSSC +0.2% SDS，0.1% x SSC +0.2% SDS，0.1% x SSC +0.2% SDS溶液洗涤10 min，室温晾干。

1.5 荧光扫描和结果分析

用Ceneral Scanning公司的ScanArray 3000扫描仪扫描芯片，获取基因表达的荧光信号强度值，用预先选定的内参照基因对Cy3和Cy5的原始获取信号进行均衡和修正。用ImagCene3.0软件对扫描图像进行数字化处理，计算Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值，并对两次重复点进行平均。判断基因差异表达的标准：①Cy3和Cy5信号比值大于2或者小于0.5（基因表达变化在2倍以上）；②Cy3和Cy5信号值其中之一必须＞800或者Cy3和Cy5的值均大于200；③PCR结果良好。

2 结果

2.1 mRNA的定性分析

从1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳中可见mRNA的18S和28S条带清晰，说明RNA质量好，无降解。紫外分光检测分析显示，提取总RNA的$D(260)/D(280)>1.9$，说明RNA的纯度和完整性达到要求，无蛋白质和DNA残留。

2.2 基因表达谱分析结果

Cy3荧光信号和Cy5荧光信号以绿色和红色表示分别标记正常人外周血标本与恶性胶质瘤患者外周血标本，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。见图1。



图1 基因芯片杂交信号扫描图

利用生物信息学方法对检测结果进行分析，所得恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞差异表达的基因共有96个，其中表达上调2倍以上的基因共有25个；表达下调0.5倍的共有71个，差异表达的基因涉及细胞的生长发育、分化、能量运输、信号传导和应激应答等生物学过程。这些基因按照功能分为8大类（表1）。

表1 恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞差异表达基因的分类

基因分类	差异表达基因数目	上调基因表达数目	下调基因表达数目
DNA结合，转录因子	10	4	6
细胞信号和传递蛋白	11	2	9
原癌基因	1	0	2
细胞骨架和运动蛋白	5	2	3
热休克蛋白	2	2	0
细胞代谢	9	3	6
免疫相关	5	2	3
其他	52	10	42
合计	96	25	71

3 讨论

目前针对脑胶质瘤尤其是恶性胶质瘤的治疗仍以手术、化疗为主，但是尚不能明显改善恶性胶质瘤患者的预后，而且近10年来没有进一步的改善。黄强等[3]通过对胶质瘤20年的研究认为，通过生物治疗激发机体的免疫功能有可能消灭残存的全部瘤细胞而达到永久治愈目的，这或许就是完全治愈胶质瘤途径。最近的研究表明，胶质瘤和宿主免疫系统之间存在着相互作用，主要表现为胶质瘤可使宿主的免疫功能低下，而宿主则可通过调整免疫功能来阻止肿瘤的生长[5]，因

此寻找胶质瘤特异性的标志抗原和特异性的增强对胶质瘤的主动免疫的生物治疗成为胶质瘤研究的热点[5]。笔者在本研究中利用基因芯片技术的高通量，快捷高效，大规模平行研究的特点对恶性胶质瘤患者和正常人外周血淋巴细胞的基因表达图谱进行比较，从而在基因水平上对恶性胶质瘤患者的免疫状况进行整体了解。

在本实验结果中上调表达的基因里面有热休克蛋白家族的成员，分别是 NM016438 和 AF0878。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)广泛存在于原核生物和真核生物中，具有高度保守性。尽管肿瘤的发生具有抗原个体差异性，基因突变也是随机和多变的，但由于热休克蛋白不具有遗传多态性，可载所有外源肽分子，并由热休克蛋白呈递给自己的 MHC Ⅰ类分子，激发 CTL 反应。因此，热休克蛋白介导的免疫保护作用可以适应不同的肿瘤类型和不同的肿瘤患者，在同种间不受 MHC 限制，另外热休克蛋白多肽复合物还可激发记忆性 T 细胞反应，作为治疗制剂或疫苗，热休克蛋白-多肽复合物在肿瘤治疗中具有非常好的应用前景[6]。是否可以对实验结果显示的热休克蛋白 NM016438 和 AF0878 进行针对性的研究，以提高机体的免疫功能而对肿瘤细胞进行杀伤，值得进一步研究。

在下调表达的基因里面涉及免疫应答，糖、蛋白质和核苷酸等生命元素的代谢、转录、凋亡，细胞周期，生长发育、分化，多肽和蛋白质、离子及有机酸的运输，信号传导，核融合等一系列生物学过程，其中编码精氨酸酶的基因在国内肿瘤免疫研究中尚少见报道。精氨酸可以促进具有合成作用的激素释放和氮平衡，并且具有免疫刺激和胸腺刺激作用，它在氮代谢及肌酸和多胺的合成中起基础作用。精氨酸代谢具有平衡免疫反应的作用，对巨噬细胞和 T 细胞尤其重要。Hesse 等[7]研究认为危重患者的存活率很大程度上依赖于机体各系统的协调反应，免疫应答是其中的一个中心环节，疾病进程中占主导地位的细胞因子模式能最终反映机体的免疫活性。通过对外科术后患者，危重患者，营养不良患者的精氨酶代谢研究发现，适当的补充精氨酸有利于患者免疫功能的恢复[8,9]。恶性胶质瘤患者的精氨酸代谢过程，以及如何干预其精氨酸代谢以增强恶性胶质瘤患者免疫功能是下一步研究的重点。

本研究显示，恶性胶质瘤患者和正常人的外周血淋巴细胞基因表达存在差异。在已知分类的基因中，差异表达显著的是关于细胞信号和传递蛋白的基因(11 个，占总数的 11.4%)，关于 DNA 结合，转录因子的基因(10 个，占总数的 10.4%)，关于细胞代谢有关的基因(9 个，占总数的 9.3%)，因此我们推测在恶性胶质瘤的生长过程中通过某种机制影响了机体免疫细胞的 DNA 结合和转录，导致细胞代谢下降，基因表达呈下降趋势，而且机体细胞信号和传递蛋白的基因功能的紊乱必然影响到免疫细胞的正常识别功能，从而导致胶质瘤逃脱机体的免疫监控，异常增生，其详细机制尚需要进一步的实验研究证实。

总之我们通过本研究试图利用基因芯片技术在基因水平上从整体的角度观察恶性胶质瘤患者的免疫状况，国内外尚少见类似的报道，对恶性胶质瘤的免疫研究是一个新的尝试，该实验结果是否有普遍意义，能否根据该实验结果设计出改善患者免疫功能的治疗措施，这些都是很值得我们今后继续探讨的问题。

参考文献：

[1] LACROIX M, ABI-SAID D, FOURNEY D R, *et al*. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival[J]. J Neurosurg, 2001, 95(2): 190 - 198.

[2] MILLER D W. Immunobiology of the blood-brain barrier[J]. J Neurovirol, 1999, 5(6): 570-578.

[3] 黄　强，兰　青，董　军，等. 人脑胶质瘤研究 20 年[J]. 中国肿瘤, 2001, 10(1): 34 - 36.

[4] 彭秀玲，袁汉英，谢　毅，等. 基因工程实验技术[M]. 长沙：湖南科学技术出版社, 1998: 197 - 199.

[5] WIENDL H, MITSDOERFFER M, HOFMEISTER V, *et al*. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape[J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4772 - 4780.

[6] STRIK H M, WELLER M, FRANK B, *et al*. Heat shock protein expression in human gliomas[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6B): 4457 - 4462.

[7] HESSE M, MODOLELL M, LA-FLAMME A C, *et al*. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6533 - 6544.

[8] RODRIGUEZ P C, ZEA A H, DESALVO J, *et al*. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes[J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1232 - 1239.

[9] 付振峰，王　武，谭占国. 人脑星形细胞肿瘤组织中 bcl-2 基因的表达[J]. 郑州大学学报：医学版, 2004, 39(1): 93 - 95.

（编辑　龙　亮）