文章编号:1000-5404(2007)04-0279-05

论著

采用基因芯片技术筛选人小细胞肺癌SH77/CDDP多药耐药相关基因表达谱的研究

周向东,钱桂生,刘凌志 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 获得人小细胞肺癌(SCLC)SH77/CDDP多药耐药(MDR)相关基因表达谱,为进一步阐明顺铂(CDDP)所致SCLC MDR的机制奠定基础。**方法** 在成功建立CDDP诱导的人SCLC MDR细胞系SH77/CDDP的基础上,分别提取SH77/CDDP和其亲代SH77细胞的总RNA,反转录合成双链cDNA,通过反转录合成生物素标记的cRNA探针,片段化处理后分别与Affymetrix GeneChip®人类U133系列芯片(U133A、U133B,共包含3.9万个转录本,其中有3.3万个已知基因,0.6万个未知的cDNA序列表达标签)杂交,杂交信号经扫描等处理并用生物信息学对检测结果进行分析。**结果** 与SH77亲代细胞相比,在SH77/CDDP细胞中有2 389个(6.13%)基因表达增高,其中增高1倍以上的有464个(1.19%),增高2倍以上的有89个(0.23%),增高3倍以上的有26个(0.07%),增高4倍以上的有7个(0.02%)。其中差异最显著的36个基因包括ABCC3、HSP70、CYP26B1、CYP4A11、IGF1R、LOX2、CAP2、LRP2BP、AKNA、ELTD1等,上调幅度2.5~5.1倍,根据Gene Ontology分类和Tree View分析,这36个基因的功能主要为运输、细胞黏附、信号转导、转录和离子结合等。**结论** 高通量的基因芯片技术筛选出大量CDDP所致SCLC MDR相关基因,对这些耐药相关基因功能的验证有助于揭示CDDP所致人SCLC MDR的发生机制。

关键词: 肺肿瘤;基因芯片;耐药;顺铂

中图法分类号: R318.04;R394.2;R734.2 **文献标识码:** A

Investigation on expression pattern of multidrug resistance-associated gene in human small cell lung cancer cell lines SH77/CDDP using gene chip technique

ZHOU Xiang-dong, QIAN Gui-sheng, LIU Ling-zhi (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To obtain the expression pattern of multidrug resistance-associated gene in human small cell lung cancer (SCLC) MDR cell line SH77/CDDP and provide basis for further studying the mechanism of human SCLC MDR induced by cisplatin. **Methods** Total RNA was isolated from SCLC MDR cell line SH77/CDDP and its parental cells, and synthesized into double-stranded cDNA, then synthesized into biotin-labeled cRNA probe by *in vitro* transcription. The cRNA probes were separately hybridized with Affymetrix GeneChip and human U133 set chips (U133A and U133B, containing 39 000 transcripts, including 33 000 known human genes and 6 000 unknown cDNA expression sequence tags, ESTs), and the signals were scanned by the GeneArray Scanner. The results were analyzed by bioinformatics. **Results** Compared with the gene expression profile of parental SH77 cells, 2 389(6.13%) genes were up-regulated in SCLC MDR cell line SH77/CDDP cells, of which 461 (1.19%), 89 (0.23%), 26 (0.07%) and 7 (0.02%) genes were separately up-regulated one-fold, two-folds, three-folds and four-folds. 36 genes, including ABCC3, HSP70, CYP26B1, CYP4A11, IGF1R, LOX2, CAP2, LRP2BP, AKNA, ELTD1 and otherwise, were up-regulated 2.5 – 5.1 folds. According to Gene Ontology and Tree View analysis, these 35 genes were involved in transport, cell

基金项目: 国家自然科学基金(30200118);重庆市应用基础研究项目(2002-2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200118) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2002-2004)

作者简介: 周向东(1963-),男,河南省平舆县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肺癌方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)65387412, E-mail: xiangdongzhou@126.com

通讯作者: 钱桂生:电话:(023)68755603
刘凌志: E-mail: lingzhiliu2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-16;**修回日期:** 2006-11-20

adhesion, signal transduction, transcription and ion binding and so on. **Conclusion** Many multidrug resistance-associated genes induced by cisplatin have been screened by high-throughput gene chip method. Validating their cellular functions will help to identify the mechanism of human SCLC MDR induced by cisplatin.

Key words: lung neoplasm; gene chip; drug resistance; cisplatin

流行病学调查表明,小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)占支气管肺癌的20%~25%,90%以上与吸烟有关。患者5年生存率5%左右[1]。肺癌细胞对化疗及放疗的耐受是SCLC低生存率的直接原因。目前认为肿瘤细胞耐药的原因非常复杂,多药耐药(multidrug resistance, MDR)是主要的原因,即肿瘤细胞接触一种抗癌药物后对多种结构和作用机制不同的抗癌药物产生耐受性。由于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)多表现为原发性耐药,尤其是肺腺癌,大多对化疗药物不敏感,而SCLC多为获得性耐药,因此,研究SCLC发生MDR的机制更有实用价值;到目前为止,在化疗方案中铂类药物始终是有效并广泛应用的一线药物,因此,研究顺铂(CDDP)所致SCLC MDR相关基因表达谱的改变具有重要意义。由CDDP导致SCLC MDR的机制尚未完全清楚。

在成功建立中国人SCLC MDR细胞系SH77/CDDP[2]的基础上,我们采用Affymetrix高通量基因芯片研究人SCLC SH77 /CDDP MDR相关基因表达谱,并采用生物信息学对所获结果进行分析。

1 材料与方法

1.1 细胞株

中国人SCLC细胞系SH77购于上海细胞所,MDR细胞系SH77/CDDP由我所以CDDP为诱导药物,采用逐步增加剂量的方法诱导建立[2]。

1.2 RNA提取和探针制备

采用Trizol试剂分别提取SH77和SH77/CDDP细胞的总RNA,用T7-Oligo$(dT)_{24}$引物[5′-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-$(dT)_{24}$-3′]反转录合成双链cDNA,使用Affymetrix公司的Enzo RNA Transcript Labeling Kit体外反转录合成生物素标记的cRNA探针。cRNA探针经片段化处理后用于与基因芯片杂交。

1.3 杂交和扫描

实验所用芯片为Affymetrix公司生产的全人类基因组U133系列芯片(U133A、U133B),共包含3.9万个转录本,其中有3.3万个已知基因,0.6万个未知的cDNA序列表达标签。U133系列高密度寡核苷酸芯片利用原位光刻技术生产,检测时用一种荧光标记,杂交、洗片和染色均在Affymetrix公司的专用设备Affymetrix® Fluidics Station 400中完成。使用Affymetrix公司的G2500AGeneArray Scanner对杂交信号进行扫描,在与全人类基因组U133系列芯片杂交前,cRNA探针的质量已在与"test chip"的杂交中被检验和证实。

1.4 数据分析

芯片扫描后获得的数据利用Affymetrix® Microarray Suit Software 5.0计算和处理。在比较2张芯片的结果之前,先对每张芯片的数据进行归一化(normalization)处理。以荧光信号强度比值的对数(在2张芯片相比较时代表了1个转录本变化的大小和方向),作为筛选差异表达基因的标准(本研究只列出了部分表达上调的基因)。

2 结果

2.1 芯片质量的检测

图1是SH77/CDDP细胞cRNA探针与test chip杂交后的扫描图谱,图样和四角的点及中央的"+"均清晰可见,整张扫描图内的点线分布较均匀,表明cRNA探针质量良好。

本研究检测了2株细胞,4张芯片,只列出了其中1张芯片的扫描图谱(图2)。检测报告中表明这4张芯片中的看家基因β-actin和GAPDH的5′端和3′端均被检测到,且5′端和3′端的信号比值明显低于3.0的标准,外加的阳性对照bioB、bioC、bioD和cre也被检测到,且信号强度随着浓度由低到高呈现出由弱到强的趋势。以上结果表明芯片质量良好,检测结果可信。

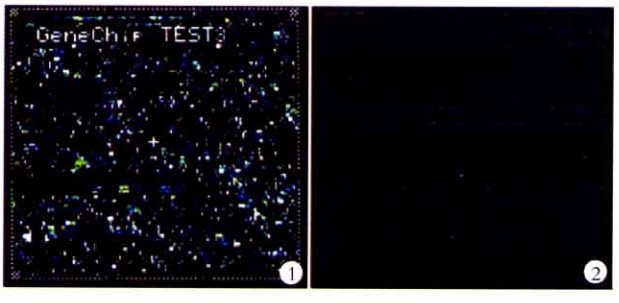


图1 SH77/CDDP细胞cRNA探针与test chip杂交后扫描结果
图2 SH77/CDDP细胞cRNA探针与人类U133A芯片杂交后扫描结果

2.2 芯片检测结果

我们所采用的U133A芯片包含22 283个探针,U133B芯片包含22 645个探针。通过采用U133系列芯片杂交筛选SCLC细胞株SH77亲代细胞及其对应的MDR SH77/CDDP,结果发现与SH77亲代细胞相比,在SH77/CDDP细胞中有2 389个(6.13%)基因表达增高,其中增高1倍以上的有464个(1.19%),增高2倍以上的有89个(0.23%),增高3倍以上的有26个(0.07%),增高4倍以上的有7个(0.02%)。表1中

列出了差异表达最显著的 36 个基因，它们的荧光信号强度比值的对数为 2.5 ~ 5.1。根据 Gene Ontology 分类和 Tree View 分析[3]，将差异表达基因按照生物学过程和分子功能进行功能分类（表 2、3）。SH77/CDDP 和 SH77 比较的散点图见图 3、4，X 轴代表 SH77 细胞经归一化处理后的杂交信号强度，Y 轴则代表 SH77/CDDP 细胞的杂交信号强度，以 45° 角为界，斜率 1.0 以下的信号点表示无上调表达，斜率大于 1.0 的信号点为 SH77/CDDP 中表达上调的差异基因，斜率大于 2.5 的信号点为表达显著上调的差异基因。

表 1　SH77/CDDP 中表达上调 2.5 倍以上的 36 个基因（与 SH77 相比）

基因符号	基因描述	信号上调倍数
AKNA	AT-hook 转录因子	5.1
SCEL	sciellin	4.4
FLJ23518	HSPC048 蛋白	4.4
LOC130940	BC015395 推定蛋白	4.2
C10orf39	10 号染色体开放性阅读框	4.2
LOXL2	赖氨酰氧化酶类似物 2	4.1
—	MRNA；cDNA DKFZ p686P18215（来自 DKFZ p686P 18215 克隆）	4.0
CLECSF12	C-型凝集素结构域家族 7，膜 A	3.7
ZFP36L2	2 锌指蛋白 36，类 C3H 型	3.5
IL4	白细胞介素 4	3.5
LRP2BP	LRP2 结合蛋白	3.5
ABCC3	ATP 结合盒蛋白，C 亚家族	3.5
SH3BGR	富谷氨酸 SH3 结构域结合蛋白	3.3
CYP26B1	细胞色素 P450，26 家族，B 亚家族，多肽 1	3.3
CAP2	CAP，adenlate 环化酶相关蛋白 2	3.2
EIF4G3	Eukaryotic translation initiation factor 4，gamma，3 真核生物转录起始因子 4，gamma 3	3.2
ADAMTS13	含 1 型血小板反应素基序 13 的 ADAM 金属肽酶	3.1
HSP70	CDNA FLJ12144 fis，MAMMA 1000361 克隆	3.1
DKFZp434C0328	DKFZp434C0328 推定蛋白	3.0
ARHGDIB	RHo GDP 解离抑制因子 beta	2.9
LIFR	白血病抑制因子受体	2.9
—	mRNA；cDNA DKFZp564C163（来自 DKFZp564C163 克隆）	2.8
ELTD1	EGF，latrophilin 及含 7 次跨膜结构域蛋白 1	2.8
LOC374443	CLR 拟基因	2.8
TGFBI	转化生长因子，beta 诱导，68×10^3	2.7
GDF15	生长分化因子 15	2.7
EGR1	早期生长反应基因 1	2.7
GRIN3A	谷氨酸受体，离子向性，N-甲基-D-天冬氨酸 3A	2.7
LAMA4	层黏连蛋白 alpha 4	2.6
CNTN5	接触蛋白 5	2.6
EMR3	含类黏蛋白的类 EGF 分子，激素受体-3 类似物	2.6
CYP4A11	细胞色素 P450，4 家族，A 亚家族，多肽 11	2.5
WNK1	WNK 赖氨酸缺陷蛋白激酶 1	2.5
KIAA1434	KIAA 1434 推定蛋白	2.5
FLJ20972	FLJ20972 推定蛋白	2.5
ATP6V1B1	ATP 合酶，H + 转运，溶酶体 V1，B 亚单位，单体 1（肾小管酸中毒合并耳聋）	2.5

“—”：未知基因

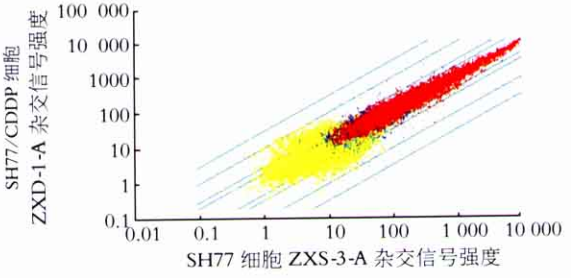


图 3　SH77 及其 MDR 细胞系 SH77/CDDP U133A 基因芯片比较的散点图

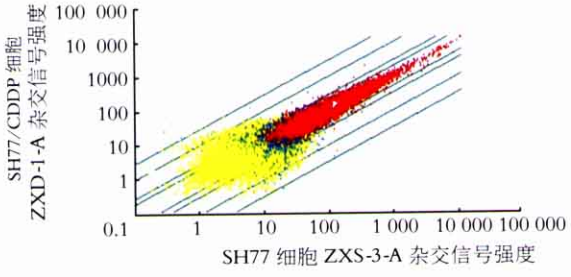


图 4　SH77 及其 MDR 细胞系 SH77/CDDP U133B 基因芯片比较的散点图

表 2　SH77/CDDP 中差异表达基因的生物学过程分类（与 SH77 相比）

生物学过程	基因符号	信号上调倍数
转录	AKNA	5.1
	EGR1	2.7
转运	ABCC3	3.5
	CYP26B1	3.3
	GRIN3A	2.7
	ATP6V1B1	2.5
	CYP4A11	2.5
	WNK1	2.5
发育	SCEL	3.5
细胞黏附	LOXL2	4.1
	ADAMTS13	3.1
	TGFBI	2.7
	LAMA4	2.6
信号转导	LRP2BP	3.5
	CAP2	3.2
	ADAMTS13	3.1
	ARHGDIB	2.9
	LIFR	2.9
	ELTD1	2.8
	GDF15	2.7
	EMR3	2.6
	IGF1R	2.5
细胞生长和/或维持	CAP2	3.2
生理过程调节	ZFP36L2	3.5
	PLRG1	3.1
行为	CLECSF12	3.7
代谢	IL4	3.5
	ADAMTS13	3.1
	CYP4A11	2.5
	KIAA1434	2.5
对刺激的反应	FLJ23518	4.1
	CLECSF12	3.7
	HSP70	3.1

表3 SH77/CDDP 中差异表达基因的分子功能分类（与 SH77 相比）

分子功能	基因符号	信号上调倍数
转运子活性	LOXL2	4.1
	GRIN3A	2.7
	ATP6V1B1	2.5
转录因子活性	ZFP36L2	3.5
	ABCC3	3.5
	EIF4G3	3.2
	EGR1	2.7
生长因子活性	IL4	3.5
	GDF15	2.7
抑制因子活性	ARHGDIB	2.9
	WNK1	2.5
细胞因子活性	IL4	3.5
	CYP26B1	3.3
	GDF15	2.7
激酶活性	WNK1	2.5
转化酶活性	WNK1	2.5
催化活性	KIAA1434	2.5
受体活性	LOXL2	4.1
	CLECSF12	3.7
	IL4	3.5
	LIFR	2.9
	ELTD1	2.8
	GRIN3A	2.7
	EMR3	2.6
离子通道活性	GRIN3A	2.7
G 蛋白偶联受体活性	ELTD1	2.8
	EMR3	2.6
结合		
金属离子结合	LOXL2	4.1
	SCEL	3.5
	ZFP36L2	3.5
	CYP26B1	3.3
	ATP6V1B1	2.5
	CYP4A11	2.5
钙离子结合	ADAMTS13	3.1
	ELTD1	2.8
	GRIN3A	2.7
	EMR3	2.6
铜离子结合	LOXL2	4.1
受体结合	IL4	3.5
	LAMA4	2.6
蛋白结合	CLECSF12	3.7
	LRP2BP	3.5
	EIF4G3	3.2
	TGFB1	2.7
	CNTN5	2.6
	LAMA4	2.6
	WNK1	2.5
DNA 结合	ZFP36L2	3.5
	EGR1	2.7
RNA 结合	EIF4G3	3.2
核酸结合	ZFP36L2	3.5
	EGR1	2.7
核苷酸结合	ABCC3	3.5
	IGF1R	2.5
ATP 结合	ABCC3	3.5
	ATP6V1B	2.5
	IGF1R	2.5
	WNK1	2.5
糖结合	CLECSF12	3.7
信号转导活性	PLRG1	3.1
	ELTD1	2.8

3 讨论

CDDP 所致的 SCLC MDR 系多基因参与的复杂过程，如细胞膜泵出和摄入改变导致药物在细胞内蓄积减少；谷胱甘肽和金属硫因作用导致药物代谢失活；DNA 修复加速；细胞凋亡通路不能被激活等[4]。虽然目前已发现一些与 CDDP 所致 SCLC MDR 相关的基因，但其 MDR 产生的机制尚未完全清楚。而要阐明该 MDR 的机制，必须获得 CDDP 所致 SCLC MDR 相关的基因表达谱。

基因芯片技术具有高通量的特点，1 次实验可以同时检测数千乃至数万个基因，并可进行平行分析，具有快速、准确、敏感的特点，目前已广泛用于肿瘤研究。本研究选用 Affymetrix GeneChip® 人类 U133 系列芯片（U133A、U133B，共包含 3.9 万个转录本）检测了中国人 SCLC MDR 细胞株 SH77 /CDDP MDR 相关基因表达谱，共获得了 2 389 个在 SH77/CDDP 中高表达的基因，其中差异最显著的有 36 个基因，比亲代细胞 SH77 表达高 2.5 ~ 5.1 倍。在这些基因中，一些已报道与 MDR 相关，更多是未报道的，还有 7 个是未知功能的基因。根据 Gene Ontology 分类和 Tree View 分析发现，这 36 个基因的功能主要涉及运输、细胞黏附、信号转导、转录、代谢和离子结合等多个方面，说明 CDDP 所致 SCLC MDR 是多基因参与、极其复杂的过程。

在已报道与 MDR 相关的基因中，ABCC3 是 ABC（ATP-binding cassette）超家族中的成员，它通过结合 ATP 发生二聚化，ATP 水解后解聚，通过构象的改变将与之结合的底物转移至膜的另一侧，与 MDR 密切相关，ABCC3 也因此被称为 MDR 相关蛋白 3（MDR-associated proteins 3，MRP3）[5]。热休克蛋白（heat shock proteins，HSPs）是生物体在不良环境因素作用下产生的具有高度保守性的应激蛋白。研究表明，HSP70 在肿瘤细胞中具有抗凋亡作用；应用 HSP70 反义寡核苷酸可以特异性地逆转 2 种不同生物学特性的前列腺癌细胞的耐药；在乳腺癌组织中可同时检测到 MDR 相关基因 P-gp、GST-π 和 HSP70 的表达，HSP70 的阳性率为 33.33%，且其阳性率随乳腺癌组织分化程度下降而升高（$P<0.01$）[6]。细胞色素 P450（CYP450）是肝微粒体混合功能氧化酶中最重要的一族，在药物代谢过程中发挥着重要的作用。CYP26B1 和 CYP4A11 即是这个超家族的成员，在 SH77/CDDP 中表达分别增高 3.3 倍和 2.5 倍。研究表明，上调胰岛素样生长因子 1 受体（insulin-like growth factor-I receptors，IGF1R）的表达可以抑制乳腺癌细胞 MCF7 的凋亡[7]。IGF1R 被发现在多种肿瘤细胞中高表达。它具有内在

的酪氨酸激酶，通过活化几个转导蛋白从而调节基因表达，Ras即是其中的1个。已有证据表明Ras蛋白能够促进MDR蛋白1（MDR1）的表达，从而导致肿瘤细胞耐药[8]。

在这36个基因中，更多的是目前尚未报道与MDR相关的基因，但它们都各有其特点。如脂蛋白受体相关蛋白2结合蛋白（lipoprotein receptor-related protein 2-binding protein，LRP2BP）、钙磷酸盐2（calcium phosphate 2，CAP2）、缩短的人ras同源基因家族GDP解离抑制因子beta（a truncated human ras homolog gene family GDP dissociation inhibitor beta，ARHGDIB）、白血病抑制因子受体（leukemia inhibitory factor receptor，LIFR）、生长分化因子15（growth-differentiation factor 15，GDF15）等主要与细胞信号转导有关；类赖氨酰氧化酶2（lysyl-oxidase-like 2，LOXL2）、转化生长因子beta诱导基因（transforming growth factor beta-induced，TGFBI）、LAMA4（laminin alpha4）、ADAMTS13（ADAM metallopeptidase with thrombospondin type1 motif 13）等主要与细胞黏附有关；AKNA（AT-hook transcription factor）、EGR1（early growth response 1）主要与转录有关；IL4（interleukin 4）主要与代谢有关；LOXL2、ELTD1（EGF latrophilin and seven transmembrane domaoin containint 1）、GRIN3（glutamate receptor，ionotropic，N-methyl-D-aspartate 3A）、EMR3（egf-like module containing mucin-like，hormone Receptor-like 3）、SCEL（sciellin）、ZFP36L2（zinc finger protein 36，C3H type-like 2）、CYP26B1、CYP4A11、ATP6V1B1等主要与金属离子结合有关。LOC130940、C10orf39、cDNA DKFZp686P18215、DKFZp434C0328、cDNA DKFZp564C163、KIAA1434、FLJ20972是序列已知但功能未知的基因。

总之，本研究应用基因芯片技术获得了中国人SCLC SH77/CDDP MDR相关基因表达谱，并采用生物信息学对所获结果进行了初步分析，从中筛选出36个在MDR细胞中差异表达最显著的基因作为中国人SCLC MDR的候选基因，深入研究这些基因将有助于阐明CDDP所致SCLC MDR的机制，从而为逆转SCLC MDR奠定基础。

参考文献：

[1] Riedel R F, Crawford J. Small-cell lung cancer: a review of clinical trials[J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 15(4): 448-456.

[2] 周向东，钱桂生，刘凌志. 人小细胞肺癌SH77多药耐药细胞系的建立及其生物学特征分析[J]. 第三军医大学学报，2003，25(16)：1405-1407.

[3] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, *et al*. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25-29.

[4] Kartalou M, Essigmann J M. Mechanisms of resistance to cisplatin [J]. Mutat Res, 2001, 478(1-2): 23-43.

[5] Zollner G, Wagner M, Fickert P, *et al*. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25(2): 367-379.

[6] 张剑权，黄桂林，吴海红，等. 乳腺癌P-gp、HSP70和GST-π表达及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志，2004，10(3)：136-138.

[7] Ravid D, Maor S, Werner H, *et al*. Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling[J]. Oncogene, 2005, 24(8): 1338-1347.

[8] Schwarze C P, Neu S, Beck J, *et al*. Influence of IGF-I and cell density on MDR1 expression in the T-lymphoblastoid cell line CCRF-CEM [J]. Horm Res, 1999, 52(4): 192-199.

（编辑　张大春）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每一篇文章或资料应标识1个文献标识码。一般设置以下5种标准：

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部