论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0666-04

高密度Oligo基因芯片筛选人永生化成骨细胞恶性转化中印迹基因的研究

孟 刚,李 懿,郭乔楠 (第三军医大学西南医院病理研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索骨肉瘤发病相关印迹基因,研究印迹基因表达水平对于骨肉瘤发病的重要意义。**方法** 建立人成骨细胞恶性转化模型,收集转化过程中4个不同时间点(40、55、70、90 d)细胞,以未处理第90天传代细胞为对照,提取总RNA,合成生物素标记的cDNA与博奥生物CAP-F0017芯片杂交。用实时荧光定量PCR对随机选取的2个基因在3组样本(对照,40 d,90 d)中的表达情况进行验证。**结果** 以表达差异≥2.0或≤0.5为限,共筛选出10个差异表达印迹基因;CD81、GRB10、NDN、MEST在转化过程中表达下调,H19、MKRN3、SLC22A1L、SLC22A3、TSSC3、CDKN1C在转化过程中表达上调,功能分类显示差异表达基因主要与细胞生长/维持和细胞信号转导相关,随机挑选2个差异表达基因的实时RT-PCR结果与芯片结果相符。**结论** 在人成骨细胞恶性转化过程中发现10个差异表达印迹基因,通过对10个差异表达基因的分析有助于揭示骨肉瘤发生过程中印迹基因的参与机制。

关键词:骨肉瘤;印迹基因;基因芯片

中图法分类号:R318.04;R394.2;R738.1 **文献标识码**:A

Screening imprinted genes during malignant transformation of immortalized human osteoblastic cells by large-scale oligomicroarray technique

MENG Gang, LI Yi, GUO Qiao-nan (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenesis-related imprinted genes in osteosarcoma and investigate the role of imprinted genes expression in osteosarcoma pathogenesis. Methods The model of malignant transformed immortalized human osteoblastic cells was established and the malignant transformed cells were collected on day 40, 55, 70, 90. The untreated cells passaged from the normal cells on day 90 served as control. After the total RNA extraction, the finally synthesized biotinylated cDNAs were hybridized to CapitalBio Genechip CAP-F0017.2 of the differentially expressed genes. Two genes were chosen at random to further confirm the array results using the SYBR Green real-time PCR in samples of control, day 40 and day 90. Results By an entrance limit of ≥2.0 or ≤0.5, ten imprinted genes which biological functions are mainly related with cell growth/maintenance and signaling transduction were detectable for notablely differential expression, including down-regulated genes of CD81, GRB10, NDN, MEST and up-regulated genes of H19, MKRN3, SLC22A1L, TSSC3, CDKN1C in the malignant transformation of immortalized human osteoblastic cells. The array results were further confirmed by the real-time RT-PCR. Conclusion Ten imprinted genes were detectable for notablely differential expression. Our results will promote our understanding of the molecular mechanisms of imprinted genes in the course of osteosarcoma pathogenesis.

Key words: osteosarcoma; imprinted gene; DNA microarray

骨肉瘤是骨组织最常见的原发性恶性肿瘤,在骨肉瘤中可见到明显异型性的成骨细胞和肿瘤性骨样组织,因此骨肉瘤的发生与成骨细胞的恶性转化有着密切的关系。体外细胞转化实验是反映体内肿瘤多阶段发生过程的良好细胞模型,与体内细胞恶性转化有较好的相关性。我们运用高密度Oligo基因芯片分析人

基金项目:国家自然科学基金(30371446)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371446)

作者简介:孟 刚(1975-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事骨肿瘤发生机制方面的研究。电话:(023)68753878

通讯作者:郭乔楠, E-mail: qiaonan85@263.Net

收稿日期:2006-06-13;**修回日期**:2006-08-18

永生化成骨细胞恶性转化过程中印迹基因表达谱的改变，初步探讨印迹基因群在骨肉瘤发生过程中的表达改变及相关分子机制。

1　材料与方法

1.1　成骨细胞恶性转化模型的建立及鉴定

人永生化成骨细胞系（hFOB1.19）购自美国模式菌种收藏所（ATCC）。BALB/c 裸鼠 4 只由第三军医大学实验动物中心提供，6 周龄，雌雄不拘，体质量 15～17 g；佛波酯（12-O-Te-tradecanoyl phorbol 13-acetate，TPA）购自 FLUKA，N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine，MNNG）购自日本东京化成工业株式会社，化学物均以 DMSO 为溶剂。参照 IARC 推荐的两阶段转化方法[1]，用 MNNG（终浓度为 1 μg/ml）作为启动剂，当细胞进入指数生长期后作用 24 h 即完成 1 次诱发，如此重复诱发 4 次（35 d）后维持细胞在含 TPA（终浓度为 200 ng/ml）的培养液中继续培养（细胞 80% 融合时传代），并设 DMSO 溶剂对照组，隔天观察、记录各瓶细胞生长及形态变化。当实验组细胞中出现较多转化灶时，取 0.2 ml 含 5×10^6 个实验转化细胞和对照细胞的无血清 DMEM 混悬液分别注入裸鼠双侧腋部皮下，每组各 2 只。每周观察记录注射部位及肿块发生情况，当肿瘤体积达 1 cm^3 时，处死动物，解剖，固定包埋肿瘤组织块，进行病理学检查。

1.2　组织 RNA 抽提与标记

我们一共选取转化过程中 4 个时间点（转化第 40、55、70、90 天细胞）作为实验样本；以未处理第 90 天传代细胞为对照，收获细胞样品后，用 Tripure 试剂（Roche 公司）提取总 RNA，通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA，并进一步采用 NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒（MACHEREY-NAGEL，Germany）对总 RNA 进行过柱纯化，最后用分光光度计定量，甲醛变性胶电泳质检。用 SuperScript Ⅱ逆转录酶试剂盒（Invitrogen 公司）将实验组和对照组总 RNA 分别转录为 cDNA，转录过程中用标有 Cy5、Cy3 的 dNTP 分别掺入实验组和对照组的 cDNA。

1.3　芯片杂交与清洗

晶芯 SmartArrayer48 微阵列芯片点样系统及人类全基因高密度 Oligo 寡核苷酸芯片（CAP-F0017）由北京博奥生物有限责任公司提供，共有 21 522 条 70 m 长的 Oligo DNA。标记的 DNA 溶于 30 μl 杂交液中（3×SSC，0.2% SDS，5×Denharts，25% 甲酰胺），于 42 ℃杂交过夜。杂交结束后，先在 42 ℃左右含 0.2% SDS，2×SSC 的液体中洗 4 min，而后在 0.2×SSC 中室温洗 4 min。玻片甩干后即可用于扫描。每个样本重复做 2 张芯片。

1.4　芯片扫描，图像采集与数据分析

芯片用 LuxScan 10 K/A 双通道激光扫描仪（CapitalBio）进行扫描，采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件（Axon Instruments 公司）对芯片图像进行分析，把图像信号转化为数字信号；然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化；筛选出 Ratio ≥2.0 或≤0.5 的基因作为差异表达基因。

1.5　实时荧光定量 PCR 验证

我们随机选取 2 个基因 H19 和 TSSC3；3 个样本：对照、转化第 40 天和转化第 90 天样本。组织 RNA 抽提同上，DNaseI 消化抽提 RNA 中基因组 DNA 后，用 SuperScript Ⅱ逆转录酶试剂盒将实验组和对照组总 RNA 分别转录为 cDNA；引物合成由上海博亚公司完成，以 cDNA 模板进行实时定量-PCR 扩增，使用 Roche 公司 Light Cycler PCR 仪（Roche，型号 PTC-225），试剂为 Lightcycler-faststart DNA master SYBR green I（Roche，目录号 3003230，联星代理）。实验体系为：镁离子浓度 3 mmol/L，引物浓度 0.4 μmol/L，退火温度 60 ℃，95 ℃变性 10 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 5 s，72 ℃ 15 s，78 ℃测定荧光强度，重复 40 个循环。

2　结果

2.1　细胞转化及鉴定

实验组细胞从第 82 天开始出现形态变化，可观察到转化灶的出现，转化灶细胞呈多边形，细胞核大，细胞质较少，排列密集，与周围未转化细胞有明显区别（图 1）；裸鼠接种第 90 天实验转化细胞 2 周后，在注射局部均开始出现小肿块，并逐渐长大，对照组未见肿块形成。肿块 HE 切片镜下可见细胞大部分呈巢团状分布，以大圆细胞为主，细胞核大，细胞核膜清楚，核仁 1～3 个，可见病理性分裂像，符合恶性肿瘤诊断标准（图 2）。

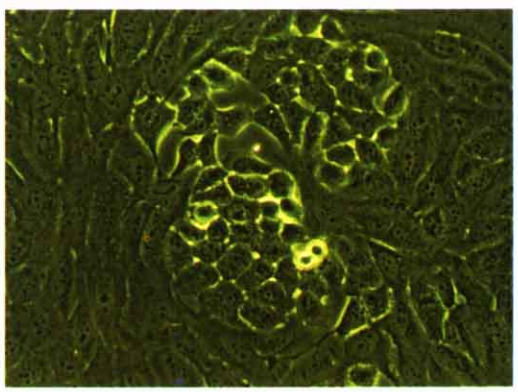


图 1　实验组裸鼠细胞处理后转化灶形成　（倒置显微镜 ×400）

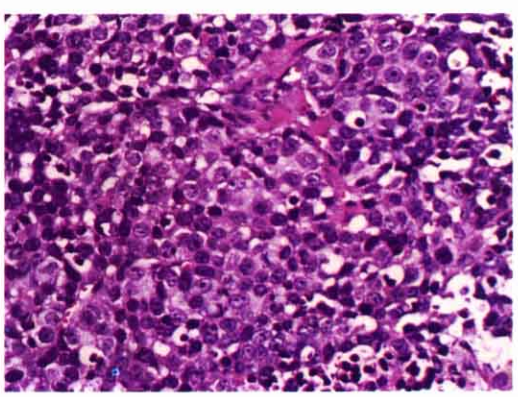


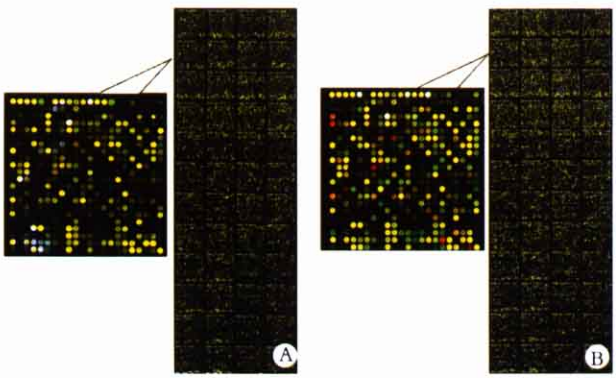
图 2　实验组裸鼠移植瘤的组织学观察　（HE ×400）

2.2 芯片内参照点的信号分析

为监控芯片杂交的整个过程，设定了对照系统：每张芯片设计有4个看家基因克隆片段，检测结果表明，芯片内重复点样基因的表达水平都比较高，两个样品的表达水平比值在1.0左右，提示芯片内部数据的波动性正常；阴性对照用空白点样液，评价污染及交叉污染情况，芯片中杂交这些点的信号均很低。

2.3 RNA 抽提和 Oligo 芯片

从5个样本取的总 RNA，经紫外分光光度计 $D(260)$、$D(280)$测定，$D(260)/D(280)$为1.8～2.0；甲醛变性胶电泳检测出5S、18S和28S条带，28S的亮度为18S的2倍以上，符合总 RNA 要求；对样品进行 Oligo 芯片检测，结果达到信号分析的质量要求。如图3所示，对于某一点的信号，如果 Cy3 信号较强，该点多显绿色，如果 Cy5 信号较强，该点多显红色，如果强度相似，即显黄色。同一样本的2张芯片上的同一个点的光密度比值（Cy3/Cy5，Ratio 值）取平均值，经扫描得到21 522个基因的表达数据。



A：第40天；B：第90天

图3 第40、90天转化细胞的基因芯片扫描融合图像及5区局部放大图像

2.4 52个印迹基因中差异表达基因的表达信息及 Ratio 值

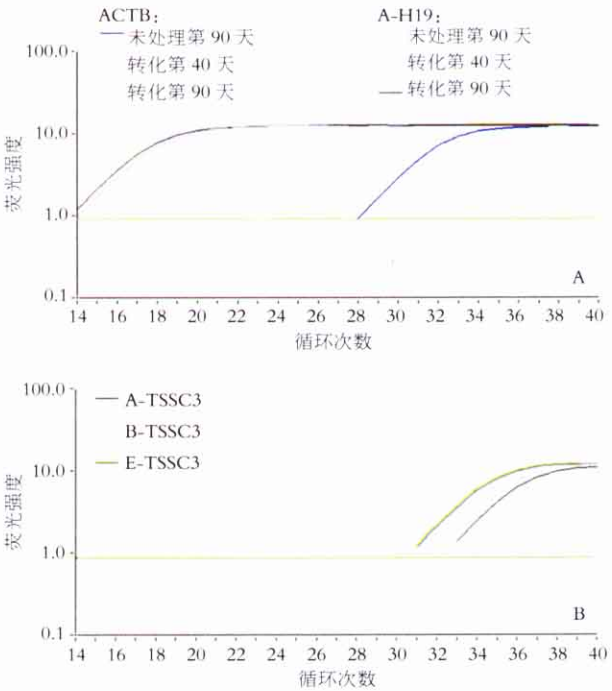
我们对从专门从事印迹基因研究的美国 Jirtle 实验室和定期更新的专业网站 http://www.geneimprint.com 查询到迄今为止明确的52个印迹基因进行数据分析，按照 Ratio≥2 或≤0.5 为标准，共筛选出10个差异表达基因，其中 CD81、GRB10、NDN、MEST 在转化过程中表达下调，H19、MKRN3、SLC22A1L、SLC22A3、TSSC3、CDKN1C 在转化过程中表达上调，其表达信息及 Ratio 值见表1。

2.5 2个差异表达印迹基因的 RT-PCR 验证

结果表明在 mRNA 水平上，H19 和 TSSC3 基因在3个点（未处理第90天，转化第40天，转化第90天）显示与基因芯片同趋势的差异表达情况，与芯片结果相符。扩增曲线如图4。

表1 4张芯片中10个差异表达印迹基因的基因信息及表达 Ratio 值

基因	GB 信息	40 d	55 d	70 d	90 d
CD81	NM_004356	1.073 9	0.994 7	0.732 7	0.412 0
GRB10	D86962	0.846 2	0.993 4	0.162 1	0.045 7
H19	BC004532	6.779 3	9.155 2	26.716 3	26.300 0
MKRN3	NM_005664	1.352 4	1.592 5	2.336 7	3.530 0
NDN	NM_002487	1.159 1	0.813 7	0.163 2	0.012 1
CDKN1C	NM_000076		4.262 6	20.544 1	10.800 0
MEST	NM_002402	1.086 9	1.042 0	0.188 5	0.313 0
SLC22A1L	NM_002555	2.070 9	2.513 8	5.087 5	5.300 0
SLC22A3	NM_021977	1.244 5	3.842 3	3.160 3	6.690 0
TSSC3	NM_003311	1.489 0	1.451 9	2.611 9	2.620 0



A：H19 基因；B：TSSC3 基因

图4 H19 基因、TSSC3 基因扩增曲线

3 讨论

基因印迹指的是某些基因呈不遵从孟德尔定律的亲源依赖性单等位基因表达，其另一等位基因不表达或表达极弱，具有这种现象的基因被称为印迹基因。印迹的肿瘤基因为单等位基因表达，相当于功能上的单倍体，仅需1次突变就使该基因失活，因而更易发生肿瘤，增加了肿瘤的易感性[2]。利用基因芯片技术，我们找出在人成骨细胞恶性转化过程中表达变化的印迹基因，从分子遗传学角度探讨骨肉瘤的发生机制，为

骨肉瘤的预防及治疗提供理论和实验依据。

我们共筛选出 10 个差异表达基因，并用实时定量-PCR 验证了结果。按照 Biominer，SOURCE Search 的描述进行功能分类，其中与细胞生长/维持相关的基因有 H19、MKRN3、NDN、CDKN1C、SLC22A1L、TSSC3、MEST，与细胞信号转导相关的基因有 CD81、GRB10，与物质转运相关的基因有 SLC22A3、SLC22A1L。在恶性转化过程中出现改变的印迹基因主要与细胞生长/维持和信号转导相关，这也与迄今为止生命科学研究中所识别到的大多数肿瘤相关基因的功能一致。CD81 又名抗增生抗体识别靶抗原 1（TAPA-1）其介导的细胞信号转导可能涉及细胞的黏附、迁移、增殖、分化等。染色分析显示 CD81 基因定位于肿瘤抑制基因相关区域，它是肿瘤相关基因的候补基因[3]。GRB10（生长因子受体结合蛋白 10）能结合许多处于激活状态的酪氨酸激酶受体（包括胰岛素受体、胰岛素生长因子 1 受体等），在有丝分裂、减数分裂等信号途径中发挥作用，GRB10 蛋白是胰岛素样生长因子信号途径的内源性负性调控因子，是 DNA 合成的内源性抑制因子[4]。H19 mRNA 能使许多与细胞的侵袭、迁移和血管形成有关的基因上调，因此 H19 在肿瘤形成、发展和转移中有重要作用。H19 和 IGF2 交互印迹，H19/IGF2 表达异常与人类许多肿瘤的发生有关，有研究显示骨肉瘤细胞中隔离子体蛋白结合位点甲基化的改变导致 H19 基因印迹丢失，引起 H19 mRNA 水平增高[5]。近期有报道 MKRN3（环锌指蛋白 127）的表达抑制可能与曲古抑菌素 A 抑制组蛋白脱乙酰基酶有关，而抑制组蛋白脱乙酰基酶能延缓肿瘤的进展[6]。NDN 是一种生长阻遏剂，能促进细胞进入停滞期，功能与 Rb 蛋白相似，可以抑制如 SV40 大 T 抗原、腺病毒 e1a 等细胞周期促进蛋白的活性；它也可通过与 p53 相互作用抑制细胞生长[7]。CD81、GRB10、NDN 在人成骨细胞转化过程中表达呈下调趋势，H19、MKRN3 在转化过程中表达呈上调趋势，这些印迹基因可能与骨肉瘤的发生、发展密切相关。

SLC22A3 编码一种多特异性有机阳离子转运蛋白，这种蛋白对清除体内的药物和环境毒素起重要作用[8]，其表达增高可能与此有关。在其他肿瘤中，MEST（中胚层特异转录物）被认为是一个肿瘤促进因子，CDKN1C（细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子）与 SLC22A1L 扮演着肿瘤抑制基因角色[9-11]，TSSC3 与凋亡相关，我们发现在人成骨细胞恶性转化过程中这 4 个基因的表达变化与它们在其他肿瘤中的表达变化不一致，但这 4 个基因与骨肉瘤发生、发展的关系目前尚少见报道，它们在骨肉瘤的发生、发展中可能扮演着特殊角色，结果需要进一步验证和深入研究。

参考文献：

[1] IARC/NCI/EPA working group. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols[J]. Cancer Res, 1985, 45: 2395 - 2399.

[2] Weinstein L S. The role of tissue-specific imprinting as a source of phenotypic heterogeneity in human disease[J]. Biol Psychiatry, 2001, 50(12): 927 - 931.

[3] Carloni V, Mazzocca A, Ravichandran K S. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells[J]. Oncogene, 2004, 23(8): 1566 - 1574.

[4] Dufresne A M, Smith R J. The adapter protein GRB10 is an endogenous negative regulator of insulin-like growth factor signaling[J]. Endocrinology, 2005, 146(10): 4399 - 4409.

[5] Ulaner G A, Vu T H, Li T, *et al*. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(5): 535 - 549.

[6] Chambers A E, Banerjee S, Chaplin T, *et al*. Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(8): 1165 - 1175.

[7] Lau J C, Hanel M L, Wevrick R. Tissue-specific and imprinted epigenetic modifications of the human NDN gene[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(11): 3376 - 3382.

[8] Jiang W, Prokopenko O, Wong L, *et al*. IRIP, a new ischemia/reperfusion-inducible protein that participates in the regulation of transporter activity[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(15): 6496 - 6508.

[9] Nan K J, Guo H, Ruan Z P, *et al*. Expression of p57(kip2) and its relationship with clinicopathology, PCNA and p53 in primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(8): 1237 - 1240.

[10] Yamada H Y, Gorbsky G J. Tumor suppressor candidate TSSC5 is regulated by UbcH6 and a novel ubiquitin ligase RING105[J]. Oncogene, 2006, 25(9): 1330 - 1339.

[11] 宋业纯，杨　辉，刘仕勇，等. 高密度 Oligo 基因芯片筛选小鼠嗅球发育相关基因的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：841 - 843.

（编辑　张大春）