论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0360-04

1个新的胰腺癌相关基因的筛选和初步鉴定

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

提 要:目的 筛选和鉴定胰腺癌相关基因。**方法** 提取胰腺癌和癌旁正常胰腺组织中的RNA和mRNA,应用抑制消减杂交技术(SSH)构建消减cDNA文库。采用随机数字表法挑选有插入片段的阳性克隆进行测序及同源性分析。应用RT-PCR和Northern blot检测新基因在12例胰腺癌和癌旁正常胰腺组织以及4种胰腺癌细胞株(PaTu8988、SW1990、BxPC-3、AsPC-1)中的表达情况。**结果** 随机挑取50个直径>1 mm的白色克隆进行PCR扩增分析,其中47个克隆有插入片段,克隆阳性率为94%。对47个有插入片段的阳性克隆进行测序,得到42个可用序列。同源性分析发现41个为已知基因,1个为无任何功能线索的未知基因,可能代表了新基因。RT-PCR显示新基因在12例胰腺癌组织和4种胰腺癌细胞株中均表达,而在正常胰腺组织中未见表达。Northern blot分析得到相同的结果。**结论** 应用SSH技术成功构建了人胰腺癌抑制消减cDNA文库,并筛选出1条新的胰腺癌相关基因。新基因与胰腺癌的发生、发展密切相关,可作为胰腺癌诊断和基因治疗的分子靶标。

关键词:胰腺癌;抑制消减杂交;cDNA文库;逆转录聚合酶链反应

中图法分类号:R319;R394-33;R735.9 **文献标识码**:A

Screening and identification of a novel gene-related human pancreatic cancer

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

Abstract: Objective To screen and identify a novel gene-related human pancreatic cancer. **Methods** Total RNA and mRNA were isolated from human pancreatic cancer (as tester) and normal paracancerous pancreas tissues (as driver), respectively. The suppressive subtractive cDNA library was set up using suppressive subtractive hybridization (SSH). The positive clones randomly selected in the library were sequenced and analyzed for homology with BLAST. The expression of the novel gene in 12 specimens of pancreatic cancer and normal tumor-surrounding pancreas tissues and 4 pancreatic cancer cell lines (PaTu8988, SW1990, BxPC-3, AsPC-1) were detected by RT-PCR and Northern blot analysis. **Results** Random analysis of 50 white clones with PCR amplification showed that 47 clones contained inserted fragments. The positive rate was 94%. The 47 positive clones were selected for further sequencing and 42 usable sequences were obtained. After BLAST homology analysis, 41 of them were found to be known genes, and one of them was found to be unknown gene with no functional clues, might being a novel gene. RT-PCR analysis showed that the novel gene expressed in 12 specimens of pancreatic cancer tissues and 4 pancreatic cancer cell lines, but not in normal pancreas tissues. This result was just the same as the result of Northern blot analysis. **Conclusion** A suppressive subtractive cDNA library of human pancreatic cancer is constructed successfully by SSH. One novel gene is found and might be novel pancreatic cancer-associatedgene. The novel gene is associated with oncogenesis and development of pancreatic cancer, and might be potential tumor markers or molecular target for diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; suppressive subtractive hybridization; cDNA library; reverse transcriptase polymerase chain reaction

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)68754475-8095, E-mail: jiangyegui@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-04-14;修回日期:2006-08-31

胰腺癌是一种恶性程度高、易转移且预后差的消化腺肿瘤，近年来在我国的发病率逐年增高，对其发病机制的研究日趋重要。胰腺癌的发生发展与多种基因改变有关，但尚未发现胰腺癌相关特异基因。研究基因表达差异的方法很多，由于抑制性消减杂交（suppressive subtractive hybridization，SSH）引入了抑制性PCR技术，所以可以选择地扩增差异表达的目的cDNA片段，而抑制非目的片段的扩增，提高了特异基因的筛出率，可有效克隆到低丰度差异表达基因，被广泛应用于筛选多种肿瘤特异性基因[1-3]。本研究应用SSH技术筛选胰腺癌差异表达基因，并应用RT-PCR和Northern blot对筛选到的1条新基因进行进一步验证，为深入研究其在胰腺癌发生发展中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

收集第二军医大学长海医院2003年1月行胰十二指肠切除手术中切除的胰头癌标本1例，男性，60岁，病理类型为中分化腺癌。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）。将以上标本用于抑制性消减杂交。收集第二军医大学长海医院2003年1－6月手术切除的胰腺癌标本12例。其中男性8例，女性4例，平均年龄56.4岁。病理类型为高分化腺癌（3例）、中分化腺癌（7例）、低分化腺癌（2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）。将以上标本用于RT-PCR和Northern blot分析。标本切取后立即液氮冻存备用。4种胰腺癌细胞株（PaTu8988、SW1990、BxPC-3、AsPC-1）由本室保存。

1.2　cDNA消减文库的构建及阳性克隆的初步筛选

采用一步法利用Trizol总RNA提取试剂盒（Gibco）提取胰腺癌和癌旁正常组织总RNA，并应用Nucleo Trap mRNA Purification试剂盒（Clontech）纯化mRNA。应用PCR-Select™ cDNA Subtraction试剂盒（Clontech）进行抑制性消减杂交。分别将胰腺癌和癌旁正常组织mRNA与cDNA合成引物混合，在AMV逆转录酶和T_4 DNA聚合酶作用下完成双链的合成。将双链cDNA经*Rsa* Ⅰ 37 ℃下酶切1.5 h。经*Rsa* Ⅰ酶切后的胰腺癌组织双链cDNA稀释后为2组，分别与接头1和接头2R连接。用看家基因G3PDH为参照，以PCR的方法进行接头连接效率的分析。检测接头连接效率满意后，将连接有接头的胰腺癌组织双链cDNA分别与癌旁正常组织双链cDNA混合进行第1次消减杂交。立即加入过量新鲜变性的癌旁正常组织双链cDNA进行第2次消减杂交。消减杂交产物与PCR引物1混合，进行第1次PCR扩增。取10倍稀释后的第1次PCR产物用巢式PCR引物进行第2次PCR扩增。利用PCR扩增方法通过比较看家基因G3PDH在消减前后丰度的差别来进行消减杂交效率的分析。采用TOPO TA Cloning试剂盒（Invitrogen）将产物克隆至T/A载体，并转化大肠杆菌TPPO 10F'构建消减cDNA文库。采用随机数字表法挑选50个直径>1 mm的白色克隆进行扩大培养，用巢式PCR引物进行PCR扩增，观察有无插入片段。

1.3　测序与同源性分析

挑选有插入片段的阳性克隆，提取质粒，以M13或T7为测序引物，在ABI377型自动序列分析仪上测定其基因序列。将测得的序列输入计算机，进入美国国家生物信息中心（NCBI）的GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST），应用程序BLAST（standard nucleotide-nucleotide BLAST）与库中核酸序列进行同源性比较。

1.4　RT-PCR分析

应用RT-PCR方法进一步验证新基因在12例胰腺癌患者的胰腺癌和癌旁正常胰腺组织以及4种胰腺癌细胞株中的表达情况。根据新基因的cDNA序列，设计PCR特异引物（上游引物：5′-GGAAGAACCCAAACGA-3′，下游引物：5′-TCCAGGACCAGTCACTAA-3′，扩增产物大小：318 bp），引物由上海生工生物技术公司合成。以看家基因G3PDH（上游引物：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，下游引物：5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，扩增产物大小：440 bp）为内对照。采用一步法应用宝生物公司的RT-PCR试剂盒进行操作。

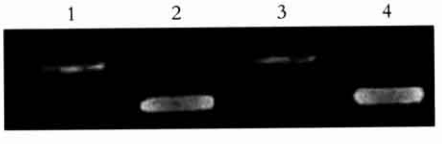
1.5　Northern blot分析

以新基因cDNA为模板，用随机引物DIG标记法制备探针，以G3PDH为内对照，应用Northern blot方法进一步验证新基因在12例胰腺癌患者的胰腺癌组织和癌旁正常胰腺组织，以及4种胰腺癌细胞株中的表达情况。

2　结果

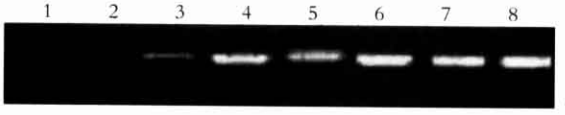
2.1　cDNA抑制消减文库的建立及阳性克隆的初步鉴定

双链cDNA与接头的连接效率的高低是决定抑制消减杂交成败的关键步骤，2%琼脂糖凝胶电泳显示用G3PDH 3′引物和PCR引物1扩增的产物条带亮度与用G3PDH 3′引物和G3PDH 5′引物扩增的产物条带亮度比较相差应大于25%，说明25%以上的cDNA片段连上了接头，连接效率较高，可用于杂交筛选步骤（图1）。以未进行消减杂交的第2次产物为模板扩增18个循环即可观察到产物条带，而以消减杂交后的第2次产物为模板则需扩增28个循环方可观察到产物条带，而且条带亮度较弱（图2），说明经过2轮杂交和2次抑制性PCR已经成功地使共同的序列获得大幅消减，同时也提示所构建的消减文库的消减效率高。文库扩增后得到257个白色菌落，菌落饱满清晰，直径1 mm左右。随机挑选50个白色克隆作PCR检测，结果显示47个克隆有插入片段，克隆阳性率94%。片段大小分布于300～800 bp，主要集中于300～600 bp。



1,3：分别连有接头1和2R的cDNA为模板，以G3PDH 3′引物和PCR引物1扩增；2,4：分别连有接头1和2R的cDNA为模板，以G3PDH 3′引物和G3PDH 5′引物扩增

图1　接头连接效率分析电泳图



1-4:消减后样品的 PCR 扩增 18、23、28、33 个循环;5-8:未消减样品的 PCR 扩增 18、23、28、33 个循环

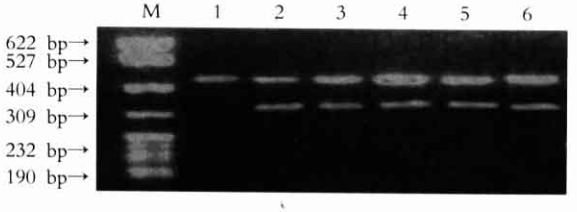
图2 消减效率鉴定电泳图

2.2 测序和同源性分析结果

将含有插入片段的47个阳性克隆进行测序,获得42个有效序列,经同源性分析后显示其中41个为已知基因,1个未发现与之明显同源的已知基因,可能为未知新基因。经生物信息学分析发现已知基因涉及编码细胞周期、细胞骨架、信号传导、代谢和蛋白合成等相关基因。

2.3 RT-PCR 验证结果

新基因在12例胰腺癌患者胰腺癌组织和4种胰腺癌细胞株中均有表达,在癌旁正常胰腺组织中未见表达(图3)。表明该新基因片段来自胰腺癌,可能代表胰腺癌特异相关基因。

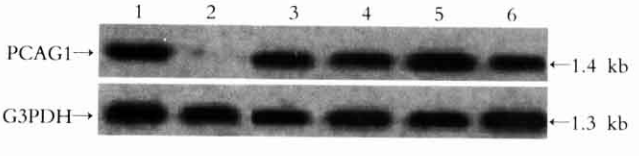


M: pBR322DNA/MSP Ⅰ标准;1:癌旁正常胰腺组织;2:胰腺癌组织;3:PaTu8988;4:SW1990;5:BxPC-3;6:AsPC-1

图3 RT-PCR 分析电泳图

2.4 Northern blot 分析结果

新胰腺癌相关基因在12例胰腺癌患者胰腺癌组织和4种胰腺癌细胞株中均表达,在癌旁正常胰腺组织中未见表达(图4),与RT-PCR结果相符。mRNA转录本约1.4 kb,未见其他剪接体。



1:胰腺癌组织;2:癌旁正常胰腺组织;3:PaTu8988;4:SW1990;5:BxPC-3;6:AsPC-1

图4 新胰腺癌相关基因 Northern blot 分析结果

3 讨论

胰腺癌的发生、发展与多种基因的表达及相互作用有关,而这些基因的差异表达是决定肿瘤表型、多样性的分子基础。近年来分子生物学的发展为克隆新基因提供了多种方法,SSH技术是1996年Diatchenko等在抑制性PCR的基础上建立起来的一种能够高效扩增并分离差异表达基因的生物学实验技术,广泛应用于生理病理过程中差异表达基因的筛选和功能研究[4,5]。SSH显著增加了获得低丰度表达差异的cDNA的概率,简化了消减文库的分析,最大优点是假阳性率低和敏感性高[6]。虽然建立的时间不长,但已经成功地用于在肿瘤、器官发育、信号转导等方面的研究[7]。

本研究应用抑制性消减杂交的方法,经严格检验,成功地构建了cDNA消减文库。本实验出现的已知基因,经生物信息学分析显示其涉及编码细胞周期、细胞骨架、信号传导、代谢和蛋白合成等相关基因。纤维黏连蛋白(FN)促进细胞黏附、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[8]。Ⅰ型分泌性磷蛋白(SPP1)可以与细胞结合,促进细胞贴壁和展开[9]。尿激酶型血纤维蛋白溶解酶原激活因子(u-PA)主要参与细胞分化、血管生成、细胞迁移、细胞外基质降解,与肿瘤侵袭转移密切相关[10]。本实验中上述细胞骨架与运动蛋白相关基因均上调表达,这可能是胰腺癌高转移性、高侵袭性的生物学特征的分子基础。G蛋白信号调节因子(RGS2)、蛋白酪氨酸磷酸酶D(PTPRD)和人有丝分裂激活蛋白激酶5(MAPK5)等信号传导相关基因在本实验中也呈上调表达,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,使生长信号不断传入,引起细胞增殖失控有关。此外,在差异表达基因中还包括转录因子(转录因子4)这样一类低丰度的基因,进一步证实了SSH方法在分离低丰度差异表达基因上的有效性。

本实验还观察到1条在GenBank中未登录的基因,可能为新的胰腺癌相关基因。RT-PCR显示该新基因在12例胰腺癌组织和4种胰腺癌细胞株中均表达,在癌旁正常胰腺组织不表达。表明此新基因片段均来自胰腺癌,可能代表胰腺癌特异相关基因。Northern blot与RT-PCR结果一致,在胰腺癌组织和胰腺癌细胞株中均表达,在癌旁正常胰腺组织不表达。提示新基因可能起癌基因的作用。正常情况下在胰腺组织中不表达,癌变过程中,在某些诱癌因素的作用下,导致该基因激活,在癌组织中的表达水平明显升高。

利用RT-PCR和Northern blot分析证明该新基因来自胰腺癌,充分说明SSH技术是筛选差异表达基因的有效而特异的方法。对新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,对胰腺癌早期诊断和提高疗效具有重要意义。

参考文献：

[1] Bangur C S, Switzer A, Fan L, *et al*. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis [J]. Oncogene, 2002, 21(23): 3814 - 3825.

[2] Chen I, Hsieh T, Thomas T, *et al*. Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization [J]. Gene, 2001, 262(1-2): 207 - 214.

[3] Miyasaka Y, Enomoto N, Nagayama K, *et al*. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization [J]. Br J Cancer, 2001, 85(2): 228 - 234.

[4] Wang H, Zhan Y, Xu L, *et al*. Use of suppression subtractive hybridization for differential gene expression in stroke: discovery of CD44 expression and localization in permanent focal stroke in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1020 - 1027.

[5] Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, *et al*. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization [J]. J Virol, 2001, 75(3): 1332 - 1338.

[6] Wang X, Feuerstein G Z. Suppression subtractive hybridisation: application in the discovery of novel pharmacological targets [J]. Pharmacogenomics, 2000, 1(1): 101 - 108.

[7] Zhang L, Cilley R E, Chinoy M R. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines [J]. J Surg Res, 2000, 93(1): 108 - 119.

[8] 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.

[9] Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, *et al*. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer [J]. Int J Cancer, 1998, 79(2): 127 - 132.

[10] Paciucci R, Tora M, Diaz V M, *et al*. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro [J]. Oncogene, 1998, 16(5): 625 - 633.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2007)04-0363-01

个案与短篇

10例隐匿性血管畸形的诊疗探析

刘启锋，刘玉河，刘 明，李 锋 （济南军区第八十八医院神经外科，泰安 271000）

隐匿性脑血管畸形（angiographically occult cerebrovascular malformation，AOVM）比较少见，脑血管造影检查难以准确显示，所以诊断较为困难。下面结合我院2000 - 2005年收治经病理证实的AOVM出血10例患者，进行诊治探讨。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组病例男性6例，女性4例，年龄8 ~ 35岁，平均21.5岁。7例以颅内出血发病（经CT证实），临床表现为突发性头痛，呕吐，意识障碍，其中6例出现偏瘫，1例同时伴有失语；2例以癫痫发作同时伴有阵发性偏头痛发病；另外1例主要表现为一侧肢体阵发性抽搐，伴有不同程度感觉障碍。本组病例病变均位于幕上，其中颞叶4例，额叶3例，顶叶2例，枕叶1例。根据Drake（1979年）提出的标准，其中中型血管畸形（直径2.5 ~ 5 cm）2例，小型血管畸形（直径<2.5 cm）8例。

1.2 辅助检查

病例均行脑血管造影及头颅CT检查，未发现畸形血管。8例行MRI检查，其中4例行MRA检查。影像学资料为：CT检查提示7例显示为脑内高密度出血影，1例显示混杂密度影，1例为脑室出血，其中显示钙化3例。8例MRI检查T_1像提示均为病灶均匀或不均匀斑块状高信号区，周边低信号影T_2像病灶表现为高信号区，周边仍见低信号区。其中3例可见流空影。MRA检查显示脑内有细小异常血管团影。

1.3 治疗方法

10例患者均行显微手术切除病灶治疗。术中见：8例血肿壁或腔内可见条索状异常血管样结构，切除送病理检查。1例病变区脑皮层有锈黄血色沉着伴陈旧性出血和钙化。1例术中见病灶周围黄染，在显微镜下病灶全切。病理诊断结果：动静脉畸形9例，海绵状血管瘤1例。

2 结果

所有手术患者恢复好，5例残留偏瘫，术后半年复查MRA提示病灶消失。随访5个月至3年，所有患者均无癫痫发作和再出血。

3 讨论

AOVM的发生率为1.9% ~ 2.5%[1]，其发生的原因可能为：

（下转367页）

作者简介：刘启锋（1972 - ），男，山东省泰安市人，硕士，主治医师，主要从事显微神经外科及神经介入方面的研究，发表论文10篇。电话：(0538)6216176，E-mail：Liuqifeng2006@163.com

收稿日期：2006-10-02；修回日期：2006-11-09