文章编号:1000-5404(2007)17-1709-03

论著

一条全长胰腺癌相关新基因的初步研究

蒋业贵[1],李兆申[2],刘同华[3],王宇明[1] (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 对应用cDNA芯片技术筛选出的一条全长胰腺癌相关新基因进行鉴定。**方法** 对应用cDNA芯片技术筛选出的一条全长胰腺癌相关新基因进行测序和生物信息学分析,应用RT-PCR和Northern blot检测该基因在12例胰腺癌和癌旁正常胰腺组织以及4种胰腺癌细胞株中的表达情况。**结果** 生物信息学分析显示新基因定为于染色体4p15,有一包含501 bp的ORF,拟编码由166个氨基酸组成的蛋白质,其理论分子量为18 293.23,等电点为8.57。BLASTp分析发现,该蛋白与一种人类假想蛋白FLJ90013同源性大于90%,可能为该假想蛋白家族新成员。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** 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;cDNA芯片;基因表达谱

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

Characterization of a novel full-length gene associated with human pancreatic cancer

JIANG Ye-gui[1], LI Zhao-shen[2], LIU Tong-hua[3], WANG Yu-ming[1] ([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 identify a novel full-length human pancreatic cancer-associated gene screened by cDNA microarray. **Methods** One novel full-length gene which overexpressed in the pancreatic cancer was sequenced and analyzed for bioinformatics. The expression of the novel gene in 12 specimens of pancreatic cancer and normal tumor-surrounding pancreatic tissues and 4 pancreatic cancer cell lines were detected by RT-PCR and Northern blot analysis. **Results** Bioinformatics analysis showed that the chromatosome of the novel gene localized to 4p15, and had an open frame of 501 base pair encoding 166 amino acids of protein. Its theoretical molecular weight was 18 293.23 and PI was 8.57. This protein had more than 90% homologous human hypothetical protein FLJ90013 using BLASTp analysis, and may be a new member of FLJ90013 protein family. The novel gene expressed in 12 specimens of pancreatic cancer tissues and 4 pancreatic cancer cell lines, but not in normal pancreatic tissues. This result was just the same as the result of Northern blot analysis. **Conclusion** The analysis of gene expression profile of tumor based on cDNA microarray can realize high-throughput screening of the genes associated with the pancreatic cancer, and it can help to rapidly explore the gene function. The novel gene is associated with oncogenesis and development of pancreatic cancer, and might be potential tumor marker or molecular target for diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; cDNA microarray; gene expression spectrum

胰腺癌在我国的发病率逐年增高,是严重危害人民生活健康的一种疾病。由于胰腺癌的治疗效果尚不理想,因此对胰腺癌分子病理学及肿瘤相关基因的研究逐渐受到重视。基因芯片技术是近几年发展起来的一项新技术,可以一次性对同一样品进行大量序列检

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)68754475-8003,E-mail: jiangyegui@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-10-13;修回日期:2006-12-30

测和核酸分析，是探知基因在肿瘤与正常组织中表达差异、基因在不同组织和器官中表达差异、基因在不同状态的细胞中表达差异等的重要手段。在以前的研究中，我们应用 cDNA 芯片技术从胰腺癌中筛选出 189 条胰腺癌相关基因，其中有 88 条无任何功能线索的新基因[1]。本研究在此基础上，对其中一条在胰腺癌中高表达的全长新基因进行生物信息学分析，应用 RT-PCR 和 Northern blot 对其进行进一步的验证，为胰腺癌的治疗和预防提供有益的指导。

1 材料与方法

1.1 材料

收集上海市长海医院 2003 年 1－6 月手术切除的胰腺腺癌标本 12 例。其中男性 8 例，女性 4 例，平均 56.4 岁（40～70 岁）。病理类型：高分化腺癌（3 例）、中分化腺癌（7 例）、低分化腺癌（2 例）。以上标本用于 RT-PCR 和 Northern blot 分析。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）。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）由长海医院消化科实验室保存。

1.2 新基因的生物信息学分析

以 M13 或 T7 为测序引物，在 ABI377 型自动序列分析仪上测定新基因序列。将获得的序列输入计算机，通过 internet 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 与库中核酸序列进行同源性比较，并进行染色体定位。将基因最大 ORF 所编码的氨基酸序列输入计算机，通过 internet 进入美国国家生物信息中心（NCBI）的非重复数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTp/nr/），进行氨基酸的同源性分析。利用多种软件进行新基因编码蛋白质的多种分析，包括氨基酸序列和分子量预测、等电点分析、蛋白质二级结构预测等。

1.3 RT-PCR 分析

应用 RT-PCR 方法进一步验证新基因在 12 例胰腺癌和癌旁正常胰腺组织中，以及 4 种胰腺癌细胞株中的表达情况。根据新基因序列，设计 PCR 特异引物（上游引物为：5′-AACAGTGCCTGCTACG-3′，下游引物为：5′-GGGACATTGTGAGGGT-3′，扩增产物大小：364 bp），引物由上海生工生物技术公司合成。以管家基因 G3PDH（上游引物为：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，下游引物为：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。

1.4 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 例胰腺癌和癌旁正常胰腺组织中，以及 4 种胰腺癌细胞株中的表达情况。

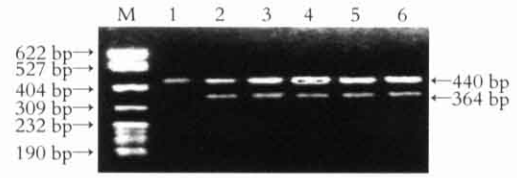
2 结果

2.1 新基因的生物信息学分析

新基因经测序得到 1 454 bp 的全长序列。经 BLASTn 分析，未发现与之同源的人类基因，推测其为人类新基因。与人类基因组序列比较，新基因与人类第 4 号染色体序列上的一段核苷酸序列基本相同，说明其基因序列真实可靠，染色体定为于 4p15。NCBI ORF Finder 分析发现新基因的 ORF 从 352～852 bp，包含 501 bp，拟编码 166 个氨基酸。经 BLASTp 分析，发现与一种人类假想蛋白 FLJ90013 高度同源，推测为 FLJ90013 假想蛋白家族新成员。通过 EXPASY 软件包的 COMPUTE PI/MW 预测蛋白的分子量为 18 293.23，等电点（pI）为 8.57。应用 EXPASY 软件包的 GOR 方法预测蛋白的主要二级结构为 α 螺旋（23.49%）、线性结构（23.49%）和不规则螺旋（53.01%）。通过 Sosui 程序预测，该蛋白质没有信号肽，但是有两处跨膜螺旋。

2.2 RT-PCR 验证结果

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中未见表达（图 1）。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。

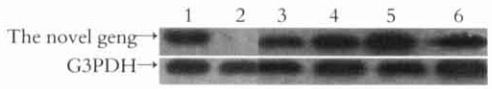


M：pBR322DNA/MSP Ⅰ标准；1：胰腺癌组织；2：正常胰腺组织；3：PaTu8988；4：SW1990；5：BxPC-3；6：AsPC-1

图 1 RT-PCR 分析结果

2.3 Northern blot 分析结果

新胰腺癌相关基因在 12 例胰腺腺癌组织和 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 2），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：正常胰腺组织；3：PaTu8988；4：SW1990；5：BxPC-3；6：AsPC-1

图 2 新胰腺癌相关基因的 Northern blot 分析结果

3 讨论

目前认为，肿瘤的发生和发展是一个复杂的多阶段的过程，实际是多种肿瘤相关基因表达失常或许多

肿瘤抑制基因失活所致。要了解整个癌变过程中的基因改变，以至癌的各个阶段中细胞全部基因表达的动态变化，需要研究的不是一个或几个基因，而是整个基因组在从正常到癌的各个阶段中上千个基因表达的动态变化。由于 DNA 芯片技术可直接检测 mRNA 的种类及丰富度，所以它是研究基因表达的有力工具。利用基因表达谱数据可以随时获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤生长相关基因的表达模式。

在以前的研究中[1]，我们应用 cDNA 芯片技术从胰腺癌中共筛选出在胰腺癌中共同显著差异表达基因 189 条，其中已知基因 101 条，另外还有 88 条无任何功能线索的新基因。已知基因主要包括原癌基因和抑癌基因[2,3]、细胞周期蛋白相关基因、细胞骨架和运动蛋白相关基因[4,5]、细胞凋亡相关基因、应激反应相关基因、DNA 合成、修复和转录因子类基因[6,7]、细胞受体相关基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因[8]、代谢相关基因、蛋白翻译和合成相关基因等，其中上调表达基因 50 条，下调表达基因 51 条。上述结果表明基因芯片技术的肿瘤基因表达谱分析能够高通量筛选胰腺癌相关基因，并高效对基因功能进行研究；胰腺癌的发生、发展是一个非常复杂的多阶段过程，涉及到众多肿瘤相关基因表达失常或抑癌基因的失活。

在上调表达未知新基因中，挑选一条在胰腺癌中高表达的全长新基因进行生物信息学分析。新基因全长序列经 BLASTn 分析，未发现与之同源的人类基因，推测其为人类新基因。与人类基因组序列比较，新基因与人类第 4 号染色体序列上的一段核苷酸序列基本相同，说明其基因序列真实可靠，其主要二级结构为 α 螺旋、线性结构和不规则螺旋。通过 Sosui 程序预测该蛋白质没有信号肽，但是有两处跨膜螺旋。新基因拟编码的氨基酸序列经 BLASTp 分析，发现与一种人类假想蛋白 FLJ90013 高度同源。假想蛋白 FLJ90013 是 Strausberg 等[9] 2002 年在利用人体多种组织建立 cDNA 文库中获得的一种蛋白质，其结构和功能尚不清楚。

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。Northern blot 分析显示新基因的 mRNA 转录本约 1.4 kb，与测得的基因长度基本一致，进一步证实新基因的 mRNA 是全长基因的转录产物，高度提示为未知的新基因。利用 RT-PCR 和 Northern Blot 分析证明该新基因来自胰腺癌，充分说明基因芯片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] 蒋业贵，李兆申，王宇明，等. 应用 cDNA 芯片技术筛选胰腺癌相关基因[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：235－238.

[2] Hsu L C, Doan T P, White R L. Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1[J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7713－7718.

[3] Cesinaro A M, Migaldi M, Corrado S, *et al*. Expression of p27kip1 in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas[J]. Am J Dermatopathol, 2002, 24(4): 313－318.

[4] Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, *et al*. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis[J]. Am J oathol, 2000, 157(4): 1167－1175.

[5] Bajou K, Lewalle J M, Martinez C R, *et al*. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-I and by enhancing their expression[J]. Int J Cancer, 2002, 100(5): 501－506.

[6] Esteller M, Herman J G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours[J]. J Pathol, 2002, 196(1): 1－7.

[7] Ng H H, Jeppesen P, Bird A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(4): 1394－1406.

[8] Penso J, Beitner R. Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology[J]. Mol Genet Metab, 2002, 76(3): 181－188.

[9] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al*. Generation and initial analysis of more than 15000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 16899－16903.

[10] 蒋业贵，李兆申，王宇明，等. 一个新的胰腺癌相关基因的筛选和初步鉴定[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：360－363.

（编辑　张大春）