论著

文章编号:1000-5404(2011)10-0980-04

95D细胞转移相关基因在原发灶、循环肿瘤细胞和转移灶中的差异表达

李雪涛,陈芳琳,王欣欣,孙建国,陈正堂 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所)

【摘要】 **目的** 利用人巨细胞肺癌高转移株(95D)裸鼠自发转移模型,分析CD9、RHOA、MYL12A、B2M、PTOV1、HSPA1B肿瘤转移相关基因在原发灶、循环血肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)和转移灶中的差异表达。**方法** 根据前期实验结果并利用GoSufer软件进行GO(gene ontology)分析,筛选出可能与肿瘤转移相关的基因CD9、RHOA、MYL12A、B2M、PTOV1、HSPA1B。利用稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的人巨细胞肺癌细胞株95D/GFP,建立肺癌裸鼠自发转移模型,用流式细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting,FACS)分别纯化原发灶、外周血和转移灶中的肿瘤细胞,利用Real-time PCR技术检测上述基因在上述肿瘤细胞中的相对表达量。**结果** CD9、RHOA、MYL12A基因在CTCs中表达较少,其次是肝转移灶,在皮下原发灶中表达较多;B2M基因在皮下原发灶、CTCs和肝转移灶中依次降低;PTOV1基因在CTCs中高表达,其次是皮下原发灶,肝转移灶中表达最少;HSPA1B基因只在原发灶中表达。**结论** CD9、RHOA、MYL12A、B2M、HSPA1B基因可能是潜在的肺癌转移抑制基因,而PTOV1可能促进肺癌微转移。

【关键词】 人巨细胞肺癌;荧光示踪技术;循环肿瘤细胞;荧光定量PCR
【中图法分类号】 R394.2;R734.2;R730.2 【文献标志码】 A

Differential expression of metastasis-associated genes in primary tumor, circulating tumor cells, and metastasis of human giant-cell lung cancer cell line 95D

Li Xuetao, Chen Fanglin, Wang Xinxin, Sun Jianguo, Chen Zhengtang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the differential expression of metastasis-associated genes (CD9, RHOA, MYL12A, B2M, PTOV1, and HSPA1B) in primary tumor, circulating tumor cells (CTCs), and metastasis in a xenograft nude mouse model of lung cancer with spontaneous metastasis, which is established with highly metastatic human giant-cell lung cancer cell line 95D. **Methods** Metastasis-associated genes CD9, RHOA, MYL12A, B2M, PTOV1, and HSPA1B were selected according to previous experimental data and gene ontology analysis by GoSufer software. The xenograft nude mouse model of lung cancer was established with 95D cells steadily expressing green fluorescent protein (GFP). Fluorescence-activated cell sorting was used to purify the tumor cells in subcutaneous primary tumor, peripheral blood, and metastasis. Real-time PCR was used to detect relative expression levels of the above genes in the tumor cells. **Results** CD9, RHOA, and MYL12A had the lowest expression levels in CTCs, medium expression levels in liver metastasis, and the highest expression levels in primary tumor. PTOV1 had the highest expression level in CTCs, a medium expression level in subcutaneous primary tumor, and the lowest expression level in liver metastasis. B2M had the highest expression level in subcutaneous primary tumor, a medium expression level in CTCs, and the lowest expression level in liver metastasis. HSPA1B was detected only in subcutaneous primary tumor. **Conclusion** CD9, RHOA, MYL12A, B2M, and HSPA1B may be potential genes inhibiting lung cancer metastasis. Gene PTOV1 may contribute to the micrometastasis of lung cancer.

【**Key words**】 human giant-cell lung carcinoma; fluorescent tracer technique; circulating tumor cells; Real time-PCR

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071786) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2005BA5006). Corresponding author: Sun Jianguo, Tel 86-23-68774490, E-mail: sunjg09@yahoo.com.cn; Chen Zhengtang, Tel 86-23-68755626, E-mail: czt05@163.com

肺癌是引起人类死亡最常见的恶性肿瘤,其中80%为非小细胞肺癌(non small-cell lung cancer, NSCLC)。近年来,尽管局部晚期肺癌经过综合治疗,总体疗效有所提高,但到目前为止,肺癌患者的预后仍没有明显改善,即使手术切除Ⅰ~Ⅲa期的肺癌患者,其5年生存率也仅为30%~40%,大多数患者死于肿

【基金项目】 国家自然科学基金(81071786);重庆市自然科学基金(CSTC 2005BA5006)
【通信作者】 孙建国,电话:(023)68774490,E-mail:sunjg09@yahoo.com.cn
陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:czt05@163.com

瘤的复发与转移。研究表明,部分患者在治疗时已存在目前形态学不能诊断的转移,即微转移(micrometastasis),这是导致治疗失败和患者死亡的主要原因。因此微转移的早期诊断不仅对肿瘤的复发和预后的判断有重要意义,而且能指导对患者的进一步治疗[1-2]。在前期实验中,我科陈芳琳等[3]利用序列基因表达技术(serial analysis of gene expression,SAGE)比较了人巨细胞肺癌高转移株95D在原发灶和肺部转移灶之间的基因表达差异,共筛选出差异基因62个(表达差异3倍或3倍以上)。本实验利用GoSufer软件对上述基因进行基因本体论(gene ontology,GO)分析并筛选出可能与肿瘤转移相关的基因,利用Real-time PCR技术比较这些基因在肿瘤原发灶、外周血和肝转移灶细胞中的差异表达,弄清肿瘤转移过程中基因表达谱的连续性变化,并与前期实验结果进行比较,找出2次实验结果的异同,旨在阐明有微转移倾向癌细胞特定的基因表达模式,为肺癌微转移提供可靠的预警依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

BALB/c裸小鼠20只购于新桥医院实验动物中心,4~6周龄,雌雄不拘,体质量16~18 g,无菌层流室饲养。稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的人巨细胞肺癌高转移株95D/GFP及普通95D细胞由新桥医院肿瘤科陈芳琳博士赠予。RPMI1640培养基、优等胎牛血清(Hylcone公司),胶原酶Ⅳ、DNA酶Ⅰ(GIBCO公司),红细胞裂解液(Boster公司),FACSAriaII cell sorter(BD公司),RNAprep pure Micro Kit(TIANGEN公司),ReverTra Ace qPCR RT Kit、SYBR Green Realtime PCR Master Mix(TOYOBO公司),ABI7500实时荧光定量PCR系统(ABI公司),CRi-Maestro2活体成像系统(CRI公司),BD FACSAriaII流式细胞仪,NANOProp2000核酸检测仪(Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 差异基因的筛选 将前期实验中原发灶和肺部转移灶之间表达差异在3倍或3倍以上基因(人巨细胞肺癌高转移株95D)的信息按GoSufer软件所要求的格式编排并输入软件,设置显著性测试中 P 值 = 0.05,分析其生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component),选取其中与细胞的生长、发育、增殖、粘附等相关的基因,并选择GO注释信息包含细胞粘附与细胞迁移的基因。

1.2.2 95D/GFP的培养 以稳定表达GFP的人巨细胞肺癌高转移株95D/GFP及普通95D细胞为研究对象,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基在37 ℃、5% CO_2条件下培养。

1.2.3 GFP标记的裸鼠皮下移植瘤及自发转移模型的建立

取对数生长期贴壁95D/GFP细胞,吸出原有培养基后,用不含血清的RPMI1640培养基反复吹打制成细胞悬液。1 000 r/min室温离心5 min,收集细胞后,弃上清,再用无血清的RPMI1640重悬细胞,以台盼蓝法检测细胞活率在95%以上后,取20只裸鼠,以 1×10^7/只的细胞数接种于右侧腋下。接种2个月后,于第三军医大学西南医院烧伤科利用CRI观察裸鼠活体成像情况,然后处死并解剖裸鼠,收集裸鼠原发灶组织及已发生转移的裸鼠的肝转移灶组织并以心脏穿刺法收集其新鲜外周血。

1.2.4 原发灶、转移灶及外周血肿瘤单细胞悬液的制备

将裸鼠脱颈椎处死后放入75%酒精浸泡10 min。无菌条件下取出皮下原发灶及肝转移灶,放入含双抗PBS溶液中浸泡10 min,洗去血污后移入10 ml锥形瓶中。用眼科剪将样本剪至1 mm^3大小后加入PBS溶液配置的终浓度为1%的胶原酶Ⅳ、75 U/ml的DNA酶Ⅰ混合液10 ml。将锥形瓶放入37 ℃振荡水浴4 h,经400目细胞筛过滤,细胞悬液1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,沉淀加入0.5 ml PBS重悬,按1∶10(体积分数)加入37 ℃预温的红细胞裂解液(Boster),反复吹打混匀,冰上裂解5 min,待红细胞完全裂解后1 000 r/min室温离心5 min弃上清,加入300 μl PBS溶液重悬后上机分选。将用心脏穿刺法收集到的新鲜抗凝血按红细胞裂解液说明书方法裂解红细胞后加入300 μl PBS溶液重悬后上机分选。流式细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting,FACS)均以普通95D细胞控制组标本,用PBS溶液适当稀释细胞浓度较高的样本,利用第三军医大学西南医院病理科BD FACSAria Ⅱ流式细胞仪进行检测分选。

1.2.5 总RNA提取 将FACS收集的细胞按RNAprep pure Micro Kit说明书操作收集,并用核酸检测仪检测 $D(260)/D(280)$ 值及浓度。

1.2.6 cDNA的制备 取 $D(260)/D(280)$ 值为1.8~2.0的RNA样品使用TOYOBO公司的ReverTra Ace qPCR RT Kit进行反转录。把RNA样品在65 ℃条件下温浴5 min后立即放于冰上,配置30 μl的反应体系包括:6 μl 5×RT Buffer、1.5 μl RT Enzyme Mix、1.5 μl Primer Mix、14 μl RNA、7 μl Nuclease-free Water。反转录条件:37 ℃ 15 min,98 ℃ 5 min,产物保存于4 ℃或-20 ℃条件下。

1.2.7 Real-time PCR检测 采用TOYOBO公司的SYBR Green Real-time PCR Master Mix试剂盒,ABI公司的PRISM 7500型定量PCR仪进行PCR定量检测。20 μl反应体系包括:SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10 μl,上游引物0.5 μl,下游引物0.5 μl,cDNA溶液1 μl,蒸馏水8 μl。每个基因设3个复孔,每组均设阴性对照,以β-actin为内参基因。反应条件:①PTOV1、HSPA1B、MYL12A基因:94 ℃ 1 min,1个循环;95 ℃ 15 s。60 ℃ 15 s,72 ℃ 45 s,45个循环。②CD9、RHOA、B2M基因:94 ℃ 1 min,1个循环;95 ℃ 15 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 45 s,45个循环。每个循环末自动记录荧光强度。应用ABI7500 System SDS Software1.3.1软件进行数据处理,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物由上海生工生物技术有限公司合成,见表1。

表1 引物基因序列

基因与引物名称			引物序列(5′→3′)	扩增产物
内参照	β-actin	上游:	TGACGTGGACATCCGCAAAG	205 bp
		下游:	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	
NM_001664.2	RHOA	上游:	CATCGACAGCCCTGATAGTTTA	108 bp
		下游:	AGATCCTTCTTATTCCCAACCA	
NM_001769.2	CD9	上游:	CAAATACCTGCTGTTCGGATT	117 bp
		下游:	GTTTCTTGCTCGAAGATGCTC	
NM_006471.2	MYL12A	上游:	AGCCAAAGACAAAGATGACTGA	188 bp
		下游:	TAGAAAGTCCCGTTTCCAGTCT	
NM_004048.2	B2M	上游:	ACTTTGAGTGCTGTCTCCATGT	159 bp
		下游:	AGCTTTGAGTGCAAGAGATTGA	
NM_017432.3	PTOV1	上游:	TACTCTGACTCCACTGCAAAGC	199 bp
		下游:	AGTCGCAGTCTCTGTTGGTG	
NM_005346.4	HSPA1B	上游:	ACTTCGTGGAGGAGTTCAAGA	164 bp
		下游:	GTAGAAGTCGATGCCCTCAAAC	

2 结果

2.1 筛选差异基因

生物过程、分子功能和细胞组分采用GO分析，选取CD9、RHOA、MYL12A、B2M、PTOV1、HSPA1B基因用于下一步实验。CD9、RHOA、MYL12A、B2M在肺转移灶中高表达，而PTOV1、HSPA1B在肺转移灶中不表达(表2)。

表2 SAGE法检测不同来源的同一基因标签表达丰度

基因名称	皮下原发灶	肺转移灶
CD9	0	5
RHOA	2	13
MYL12A	1	8
B2M	4	14
PTOV1	6	0
HSPA1B	5	0

2.2 成功建立95D/GFP自发转移瘤模型

裸鼠腋下注射95D/GFP2周后均成瘤，成瘤率100%。其中3只未生存至2个月，发生肝转移4只，肺部微转移1只，淋巴结微转移3只(图1~3)。成功制备皮下移植瘤及肝转移灶的单细胞悬液并抽取混合外周血约6 ml。

2.3 利用FACS分离制备单细胞悬液

利用FACS在皮下移植瘤、去红细胞外周血和肝转移灶的单细胞悬液中分选出表达GFP的细胞，分别收集细胞数为2×10^6、3 963、5×10^5。

2.4 Real-time PCR检测

NANOProp2000核酸检测仪(Thermo)测得上述细胞来源RNA $D(260)/D(280)$值分别为1.86、1.97及1.85，均位于1.8~2.0，说明样品RNA纯度较高，可以进行下一步实验。为确保精确相对定量，经熔解曲线分析及ABI7500 System SDS Software1.3.1软件检测，忽略异常样本后按$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量分析，结果见表3(以肝转移灶表达量为参照)，因HSPA1B基因只在皮下原发灶中表达，在外周血及肝转移灶中不表达，所以未列在表3中。

表3 不同来源的同一基因相对表达情况(以肝转移灶表达量为参照)

基因名称	皮下原发灶	循环血肿瘤细胞	肝转移灶
CD9	1.043	0.873	1
RHOA	5.074	0.513	1
MYL12A	9.091	0.282	1
B2M	176.765	6.276	1
PTOV1	1.594	1.811	1

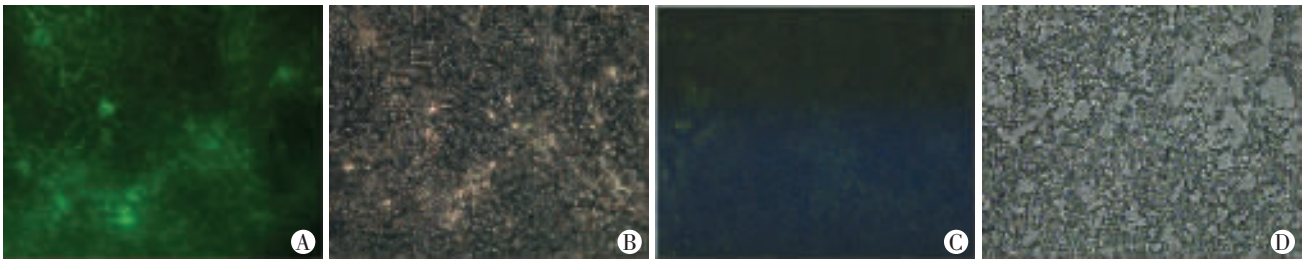
2.5 表达趋势比较

比较两次实验结果(表2、3)可见只有PTOV1与HSPA1B基因都在原发灶高表达，在转移灶低表达或不表达，两次实验中表达变化趋势基本相同，说明在其重复性较好，HSPA1B可能



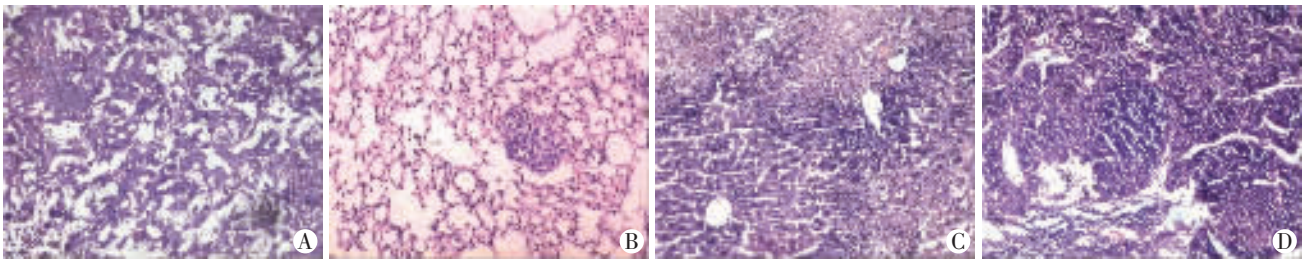
A:蓝光激发皮下原发灶及右下肢淋巴结成像；B:白光下皮下原发灶及右下肢淋巴结成像；C:蓝光激发下肝转移成像；D:白光下肝转移成像

图1 肿瘤大体成像观察



A:原发灶荧光成像；B:原发灶白光成像；C:肝转移灶荧光成像；D:肝转移灶白光成像

图2 肿瘤组织冰冻切片成像 (×400)



A:原发灶；B:肺部微转移灶；C:肝脏转移灶；D:淋巴结微转移灶

图3 肿瘤组织普通切片病理学观察 (HE ×200)

抑制肺癌的转移。但也不能排除 CD9、RHOA、MYL12A、B2M 是肺癌微转移的潜在抑制基因的可能性。PTOV1 虽然在转移灶中低表达,但在 CTCs 中表达升高,则可能说明其促进肿瘤细胞的脱落并向远处迁徙。

3 讨论

本研究中我们先后应用 GO 分析、GFP 荧光示踪、流式细胞分选术及 Real-time PCR 检测等方法比较了 CD9、RHOA、MYL12A、B2M、PTOV1、HSPA1B 基因在原发灶、外周血和转移灶肿瘤细胞中的表达差异,这些基因均与细胞的粘附、运动、迁徙、增殖和凋亡有关,获得了一个较为完整的肿瘤转移过程中基因表达谱的连续变化趋势信息。其中 PTOV1 与 HSPA1B 基因在两次实验中表达变化趋势基本相同,特别是 RHOA 基因,无论是在肝转移灶、肺部转移灶还是循环肿瘤细胞中均不表达,实验结果完全一致。该基因产物属于热休克蛋白(heat shock protein,HSP)70 家族,HSP 是一种高度保守性蛋白质,广泛存在于原核和真核生物细胞中,在生理条件下,HSP 呈基础表达,调控细胞的增殖与分化、胚胎的生长发育、激素的功能效应等。在细胞处于高温、缺血、微生物感染、组织创伤等“应激”情况下都可诱导产生,也称“应激蛋白”。HSP 能调节蛋白质的折叠、传递与降解,在维持组织细胞的自身稳定和环境适应性方面有重要作用。Conroy 等[4] 根据其分子量大小分为 HSP27 及泛素、HSP60、HSP70 家族[(66 ~ 78) × 10^3]、HSP90 家族[(83 ~ 90) × 10^3]和 HSP110 家族。HSP70 是肿瘤热休克蛋白的主要组成成员。有研究表明,在不同类型的肿瘤,根据不同的作用机制 HSP70 发挥不同的作用。Garg 等[5] 发现在体外实验中减少 HSP70-2 在宫颈癌细胞中的表达可以抑制癌细胞的生长、聚集、迁徙及侵袭能力。Partida-Rodriguez 等[6] 也发现 HSP70-1 的表达与胃癌有显著相关。另一方面,夏丽敏等[7] 发现沉默 HSP70-2 后能够通过激活线粒体凋亡通路导致肝癌细胞凋亡。在儿童急性淋巴母细胞白血病中,HSP 也被认为是一种肿瘤抑制信号并刺激 NK 细胞对肿瘤进行杀伤[8]。由此可见 HSP 在肿瘤发生发展过程中的具体机制还有待进一步研究。但结合本实验结果,我们可以推测,HSPA1B 能够抑制 95D 巨细胞肺癌的迁徙和远处转移,是潜在的肺癌转移抑制基因。

有实验报道 PTOV1 在前列腺癌及其他恶性肿瘤中高表达[9],与肿瘤的远处侵袭正相关,是潜在的肿瘤转移促进基因。在本次实验中,PTOV1 基因虽然在肺部及肝脏转移灶中的表达量均低于皮下原发灶,但其在 CTCs 中的表达量却高于原发灶,可见 PTOV1 表达升高可以促进 95D 巨细胞肺癌细胞脱落并释放入外周血,促进肺癌的远处转移,是潜在的肺癌转移促进基因。现在很多研究者通过大通量基因检测的方法去比较各种不同肿瘤原发灶和转移灶之间的基因表达差异,期望通过这种方法去寻找到肿瘤转移的关键基因,但是通过本次实验我们可以看到,在原发灶和转移灶之间表达差异相差并不大的基因其在循环血肿瘤细胞中却差异明显,可见仅仅单独研究转移过程中的首尾两端是不完全的。肿瘤转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程,我们研究肿瘤转移最理想的状态是能实时监控肿瘤细胞的基因谱表达变化,但目前看来是难以实现的。传统的 CTCs 富集方法主要是基于细胞免疫学和形态学,或者将二者相结合的方法,近年来为了提高富集的敏感性及特异性。Wang 等[10] 也开始运用表面加强的拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)纳米颗粒来富集 CTCs,并在 19 名头颈部肿瘤患者的每 100 万个外周血细胞中成功分离富集出 1 ~ 720 个 CTCs。而本实验利用 GFP 示踪技术和 FACS,通过加入对外周血循环中的肿瘤细胞基因谱表达的研究,尽可能的接近理想状态,为找到更多、更真实的肿瘤转移相关基因提供了一个可行的研究方法。

参考文献:

[1] Mocellin S, Keilholz U, Rossi C R, *et al*. Circulating tumor cells: the leukemic phase ' of solid cancers[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(3): 130 - 139.

[2] 齐晓伟,姜军,杨新华,等. 乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(9): 850 - 853.

[3] 陈芳琳. 非小细胞肺癌转移相关基因 LongSAGE 筛查的初步研究[D]. 重庆:第三军医大学,2008:33 - 69.

[4] Conroy S E, Latchman D S. Do heat shock proteins have a role in breast cancer? [J]. Br J Cancer, 1996, 74(5): 717 - 721.

[5] Garg M, Kanojia D, Saini S, *et al*. Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells[J]. Cancer, 2010, 116(16): 3785 - 3796.

[6] Partida-Rodriguez O, Torres J, Flores-Luna L, *et al*. Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer[J]. Int J Cancer, 2010, 126(8): 1861 - 1868.

[7] 夏丽敏,田德安,张琼,等. 沉默热休克蛋白 70-2 基因经线粒体依赖通路介导肝癌细胞凋亡[J]. 中华肝脏病杂志,2008,16(9): 678 - 682.

[8] Ucisik-Akkaya E, Davis C F, Gorodezky C, *et al*. HLA complex-linked heat shock protein genes and childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility[J]. Cell Stress Chaperones, 2010, 15(5): 475 - 485.

[9] Fernandez S, Mosquera J L, Alana L, *et al*. PTOV1 is overexpressed in human high-grade malignant tumors[J]. Virchows Arch, 2011, 458(3): 323 - 330.

[10] Wang X, Qian X, Beitler J J, *et al*. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles [J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1526 - 1532.

(收稿 2011-03-01 修回 2011-03-18)

(编辑 汪勤俭)