维普资讯 http://www.cqvip.com

应用基因芯片研究 As_2O_3 诱导 K562 细胞前后差异表达基因

郭秋野[1]，马文丽[1]，冯春琼[1]，吴清华[1]，彭翼飞[1]，郑文岭[2]（1. 南方医科大学基因工程研究所，广东 广州 510515；2. 华南基因组中心，广东 广州 510830）

［摘 要］ **目的** 研究三氧化二砷（As_2O_3）处理K562细胞前后，基因表达的变化。**方法** 提取 As_2O_3 作用K562细胞前后的总RNA，逆转录成cDNA并用Cy3标记对照组，Cy5标记处理组，与自制的包含162个cDNA片段的K562芯片杂交。**结果** K562细胞经 As_2O_3 作用后，162个基因片段的表达都有所降低，其中25个基因片段的表达降低较为显著（Cy5/Cy3 <0.5）。这些表达下调的基因片段包括转导因子、代谢酶、信号通路蛋白、激酶等，有6个差异表达基因与细胞的凋亡通路密切相关。As_2O_3 可能通过抑制胰岛素样生长因子的功能，诱导细胞凋亡。**结论** 应用自制的基因芯片筛选到了 As_2O_3 诱导K562细胞前后差异表达的基因，主要与细胞凋亡密切相关。

［关键词］ 基因芯片；三氧化二砷；凋亡；差异表达基因
［中图分类号］ R73；Q786 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2006)04-0231-03

Investigation of the differential expression genes of K562 cells induced by arsenic trioxide with microarray

GUO Qiu-ye, MA Wen-li, FENG Chun-qiong, WU Qing-hua, PENG Yi-fei, ZHENG Wen-ling (Institute of Genetic Engineering, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To identify the difference in gene expression profile of K562 cells induced by arsenic trioxide. **Methods** The probes about 200 bp - 500 bp derived from PCR-amplified products were spotted on the microscope slides to produce 30 × 18 microarrays. Total RNA was extracted by using Trizol reagents, 40μg of total RNA labeled by reverse transcription using Superscript II transcriptase, oligo (dT) primer, and Cy5-dCTP or Cy3-dCTP for experimental and control samples, respectively. Then the labeled cDNAs were hybridized to microarrays at 42 ℃ for 12 - 18 h. The microarrays were scanned by using a dual-laser scanner and the experimental data were analyzed with the Quantarray software package. **Results** Among the 540 spotted microarray, 25 genes were found down-regulated, including transcription factors, metabolic emzymes, signal transduction proteins and kinases etc. Further analysis revealed about 6 genes were involved in the apoptosis pathway. Moreover, we suggested that the apoptosis induced by arsenic trioxide was the results of inhibiting the functions of IGFs. **Conclusion** Our results demonstrated that the cDNA microarray contracted by us could successfully apply to analysis the expression profile of hundreds of genes and screen the differential expression genes.

Keywords: microarray; arsenic trioxide; apoptosis; differential expression gene

白血病是危害人类健康的恶性疾病之一。临床和基础研究表明 As_2O_3 可用于临床治疗急性早幼粒细胞性白血病（APL）[1]，在体外对多种肿瘤细胞株，都能有效地抑制细胞生长，诱导细胞凋亡。一般认为 As_2O_3 是通过维甲酸信号通路、激活 Caspase 酶家族和干扰肿瘤血管生成而发挥诱导细胞凋亡的作用。基因芯片技术，是近年发展起来的平行检测数以万计基因表达的有利工具，本实验应用自制的基因芯片，研究 As_2O_3 诱导K562细胞前后细胞基因表达的改变，筛选差异表达的基因。

［基金项目］ 广东省重点实验室建设经费资助项目（2004B60144）
［作者简介］ 郭秋野（1977 - ），男，吉林省长春市人，实验师，主要从事表达谱基因芯片的研究。电话：（020）62789098，E-mail：tonyguo77@126.com
［收稿日期］ 2006-06-14 ［修回日期］ 2006-07-05

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640细胞培养基购自GBL公司，精制小牛血清购自Hyclone公司，As_2O_3 购自Sigma公司，溶于120 mmol/L的NaOH溶液中，配成1 mmol/L的贮备液，4 ℃贮存；总RNA提取试剂盒Trizol购自上海博彩生物工程公司，SuperScript II购自GBL公司。2 × 预杂交溶液：25% 甲酰胺，5 × SSC，0.1% SDS；清洗溶液 I：2 × SSC，0.1% SDS；溶液 II：0.1 × SSC，0.1% SDS；溶液 III：0.1 × SSC。Pixsys5500芯片打印仪购自Cartesian公司，ScanArray Lite芯片扫描仪及其分析软件Quantarray购自Gsi Lumonics公司，玻片及芯片杂交盒购自Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562细胞在含10%小牛血清，青霉素、链霉素各100 U/ml的RPMI1640培养基中，37 ℃，5% CO_2 常规培养。

1.2.2 细胞处理及凋亡检测 细胞以 1×10^5 个/ ml 接种，

维普资讯 http://www.cqvip.com

在对数生长期加入 As_2O_3，使其终浓度为 4 μmol/L，常规培养 24 h 后，提取细胞 DNA，1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 样品制备 K562 细胞培养基中加入 As_2O_3，继续培养 4 h 后，离心收获细胞，参照 Trizol 试剂盒的方法，提取细胞总 RNA。取总 RNA 40 μg，用 SuperScript II 逆转录成 cDNA 第一链，用 Cy3 标记对照组，Cy5 标记处理组，PCR 产物纯化试剂盒纯化后溶于 30 μl TE 中。真空抽干，重溶于 5 μl 水中。分别取出 2 μl，加入 2 × 杂交缓冲液 2 μl，95 ℃ 5 min，14 000 r/min 离心 2 min，取 3.5 μl 用于与芯片杂交。

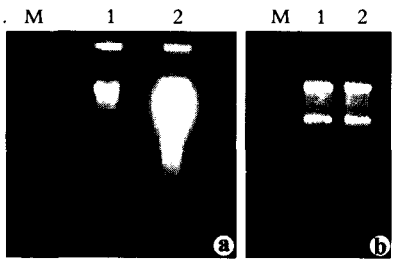
1.2.4 芯片探针的收集及芯片制备 常规培养的 K562 细胞，提取细胞的总 RNA，合成 cDNA 第一链后，用 RD - PCR 的方法[2]收集 cDNA 片段，与 T 载体连接后转入质粒中保种。PCR 扩增插入片段，异丙醇纯化后，调整浓度为 600 ng/μl，打印芯片。共收集 162 个 cDNA 探针片段，以看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为阳性对照，水稻基因组 DNA 为阴性对照，50% 二甲基亚砜（DMSO）为空白对照，每个探针重复打印 3 个点，形成 30 × 18 的阵列。打印好的芯片经紫外交联，80 ℃ 干烤 2 h，避光保存备用。

1.2.5 芯片的杂交检测及数据处理 芯片在 42 ℃ 杂交 18 h，取出，分别用清洗溶液 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 洗涤，空气干燥。扫描仪扫描每个探针的荧光强度，用 ScanArray 软件进行标准化校正。首先计算出标准化因子（F），F 等于处理组看家基因荧光强度的总和除以对照组看家基因荧光强度的总和。之后，处理组每个点的荧光强度值乘以 F，得到经标准化校正后的荧光强度值，再计算两组荧光强度的比值（Cy5/Cy3），Cy5/Cy3 等于处理组各点的荧光强度值除以对照组相应点的荧光强度值。判断基因差异表达的标准：①两者的荧光强度之比 Cy5/Cy3 > 2 或 < 0.5；②任一点的荧光强度值必须 > 500。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测和总 RNA 电泳

细胞经 As_2O_3 作用 24 h 后，提取的细胞 DNA 经电泳，可见到典型的细胞凋亡的“梯状”带，而对照组则无（图 1a）。对照组和处理组细胞提取的总 RNA 电泳检测，可见明显的 28 s、18 s 条带，总 RNA 的质量很好（图 1b）。



a：DNA 电泳；b：总 RNA 电泳；1：对照组；2：处理组；M：DL2000 Marker

图 1 DNA 及总 RNA 电泳图

2.2 芯片的杂交检测

芯片阵列经杂交后扫描结果见图 2。芯片的第 14 行第 1 - 3、7 - 9、13 - 15 点是 GAPDH 的阳性对照；第 4 - 6、10 - 12、16 - 18 点是水稻基因片段的阴性对照；第 15 行 18 个点均为 50% DMSO 的空白对照；第 30 行的第 1 - 3、7 - 9 点是 GAPDH 的阳性对照，第 4 - 6、10 - 12、16 - 18 点是水稻基因片段的阴性对照。

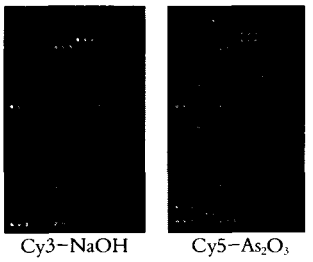


图 2 处理组 Cy5 和对照组 Cy3 的荧光杂交图

从荧光扫描图可以明显看出，As_2O_3 处理 K562 细胞后，细胞的基因表达整体下调。将 Cy3 和 Cy5 的荧光杂交图重叠，得到双色荧光杂交图，进一步分析发现有 25 个基因表达下调（Cy5/Cy3 < 0.5）。它们的 Genebank ID 分别是 XM_016703、BC003153、NM_013411、BC017449、BC017449、BC015883、XM_040578、NM_006451、BC019362、AY032628、NM_004261、BC001188、AF015812、NM_001880、BC009585、BC001829、XM_050074、BC001484、BC002406、BC003412、BC015153、XM_016660、NM_002567、XM_049354、BC016707。

3 讨论

应用 As_2O_3 治疗白血病以来，对 As_2O_3 的作用机理研究表明，As_2O_3 能抑制白血病细胞生长、诱导白血病细胞凋亡[3]。本实验也观察到 As_2O_3 作用人白血病 K562 细胞后，细胞生长明显变缓，部分细胞出现皱缩、染色质浓聚及胞膜起泡现象，DNA 电泳出现典型的凋亡“梯状”带，提示细胞处于凋亡状态，此时细胞的生命活动受到抑制，mRNA 的表达量明显降低，这与杂交结果显示的情况一致。数据分析发现下调表达的基因片段有 25 个，其中与 As_2O_3 作用效果密切相关的基因片段约有 6 个（微管蛋白 α、腺苷酸激酶-2、氨基肽酶、SUMO-1、I 型纤溶酶原激活物抑制因子），与细胞的生长增殖有关的有 6 个，与细胞代谢相关的有 4 个。

本研究显示 As_2O_3 作用 K562 细胞后，微管蛋白 α 的表达下调，微管蛋白的产生不足会使细胞停留在有丝分裂期，从而影响细胞的生长增殖。推测微管蛋白 α 表达下调，是 As_2O_3 抑制 K562 细胞生长的原因之一。As_2O_3 诱导细胞凋亡主要有几个途径：①激活 Caspase 家族。As_2O_3 与谷胱甘肽过氧化物酶及线粒体膜上的腺苷酸转运蛋白分子中的 - SH 基结合，一方面阻碍了 H_2O_2 的消除，另一方面使细胞线粒体通透性转运孔道开放、膜电位降低，位于线粒体内、外膜间

维普资讯 http://www.cqvip.com

的腺苷酸激酶-2等有害蛋白质释放入胞浆内,细胞色素C释放,激活Caspase家族,使DNA片段化,从而导致细胞凋亡。氨基肽酶(GPDA)是人体内的一种肽链水解酶,在肿瘤细胞的生长和凋亡中也发挥着重要作用,氨基肽酶基因的下调表达,促进As_2O_3诱导的细胞凋亡。②维甲酸受体信号通路。APL基因(pml)和维甲酸受体α基因(rarα)融合,表达PML-RARα融合蛋白。As_2O_3通过降解PML和PML-RARα而诱导APL细胞凋亡。SUMO-1是与泛素相关的蛋白质,能与许多种类的蛋白质共价结合,调控其功能,与As_2O_3诱导的凋亡密切相关[4-5]。As_2O_3能增强PML与SUMO-1的共价结合,从而引发PML降解,诱导细胞凋亡。③抑制肿瘤血管生成。I型纤溶酶原激活物抑制因子通过抑制内皮细胞与玻基结合素之间的粘附,促进玻基结合素向纤溶酶的移动,刺激内皮细胞向纤溶酶迁移,促进血管生成,从而发挥促进细胞生长,抑制细胞凋亡的效应[6],PAI-1基因的低表达与它在As_2O_3诱导的细胞凋亡中的作用相符。

转铁蛋白受体(TrfR)是细胞膜表面的一种糖蛋白,铁离子通过转铁蛋白运载经TrfR介导吸收到细胞内。在细胞的增殖过程中,铁离子的需求量增加,细胞表面TrfR的表达量也相应增加,被认为是转化增殖细胞和肿瘤细胞表面的特殊标志。转铁蛋白是胰岛素样生长-3结合蛋白(IGFBP-3)的结合蛋白,本实验发现TrfR基因和胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs)家族的成员Mac30在As_2O_3作用后表达下调。推测As_2O_3下调胰岛素样生长因子的结合蛋白及结合蛋白的结合蛋白,从而抑制胰岛素样生长因子功能的发挥,可能是As_2O_3诱导细胞凋亡的新途径。

本实验应用自制的K562细胞的cDNA芯片,从细胞的整体水平、分子水平来研究As_2O_3诱导K562细胞凋亡后,细胞基因表达的变化。在以前工作的基础上[7],又筛选出了25个差异表达的基因片段,其中约有6个基因片段与As_2O_3的作用效果密切相关,分别位于As_2O_3抑制细胞生长,诱导细胞凋亡的不同通路中,表明了基因芯片技术在研究基因表达谱方面的优势。

[参考文献]

[1]孙鸿德,马 玲,胡晓晨,等. 癌灵I号结合中医辨证治疗急性早幼粒细胞白血病32例[J]. 中国中西医结合杂志, 1992,12(3):170-171.

[2]马文丽,郑文岭,James FB. 限制性显示(RD-PCR):一种新的差异显示技术[A]. 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展[C]. 北京:北京军事医学科学出版社,1998.99-113.

[3]卓家才,汪明春,陶小梅,等. 联合应用化疗药物对三氧化二砷耐药白血病细胞的毒性实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2005,10(9):1033-1037.

[4]Zhong S, Muller S, Ronchetti S, et al. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation[J]. Blood, 2000,95(9):2748-2752.

[5]Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, et al. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As_2O_3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation[J]. J Exp Med, 2001,193(12):1361-1371.

[6]Isogai C, Laug WE, Shimada H, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin[J]. Cancer Res, 2001,61(14):5587-5594.

[7]冯春琼,马文丽,李 凌,等. As_2O_3处理前后K562细胞基因表达变化的基因芯片检测[J]. 第一军医大学学报, 2002,22(9):772-775.

(编辑:余汇洋)

(上接230页)

区之间有实际屏障,人流、物流由污到洁不能逆行[3]。对产房、换药室、治疗室、重症监护室、新生儿病房、洗衣房等,可制定适合各科实际工作的感染管理制度,督促检查落实到位,同时应做好各项监测工作,加强重点科室的管理来提高整体预防措施的实施,达到预防工作和管理制度规范化,以确保病人和医护人员的安全。

3.4 加强自我保护意识

培养医护人员自我防护意识,严格执行操作规程和规章制度,掌握本专业的防护特点,护理人员要把控制医院感染提高到法制的高度来认识,加强对护理人员院感知识的培训,认真贯彻《消毒技术规范》及《医院感染管理规范》,进一步提高护理人员对控制院感的认识,上班时要穿工作服、戴工作帽,无菌操作时要戴口罩,必要时穿隔离衣。操作前、后要用流水洗手,必要时用消毒液泡手,如接触具有传染性病人、抽血、处理污染物品尽量要戴手套,做到既保护自己又保护患者,防止交叉感染发生。

控制好院内感染工作,消毒、灭菌、隔离是切断病原微生物传播的重要途径,降低院感的发生率是提高医疗护理质量的前提和减少医疗纠风的主要方面,为提高医疗护理质量,保障病人的生命安全,所以护理人员在预防和控制院感工作中起着非常重要的作用。

[参考文献]

[1] 蔡红卫,万 萍. 医院感染与护理相关因素分析及对策[J]. 局解手术学杂志,2003,12(4):315-316.

[2] 于鞍灵,邢洪敏. 住院病人医院感染流行病学分析[J]. 局解手术学杂志, 2005,14(1):28-29.

[3] 张秀銮,何 萍,张 芳. 消毒供应科在预防医院感染管理工作中的作用[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(12):1411-1412.

(编辑:郭光金)