技术与方法　文章编号：0253-3626(2010)05-0706-05

用全基因芯片技术对金黄地鼠口腔颊黏膜癌前病变相关基因的筛选和分析

张国栋，杨　凯，梅　杰

（重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科，重庆　400016）

【摘　要】目的：利用全基因芯片技术筛选口腔颊黏膜癌前病变发生发展的相关致病基因。方法：用 9、10- 二甲基；1，2- 苯并蒽（Dimethylbenzanthracene，DMBA）诱导建立金黄地鼠颊鳞癌模型，分别提取正常颊黏膜和癌前病变组织的总 RNA 并合成用 Cy3 荧光标记的 cRNA，分别与含有 41 000 个基因 /ESTs 序列的 Agilent 大鼠全基因芯片杂交，以 Log2Ratio≥2.5 和 Log2Ratio≤-2.5 为阈值来确定差异表达基因，然后用 Gene Ontology 对差异表达基因行功能分类分析，最后用 RT-PCR 对部分差异表达基因进行验证。结果：金黄地鼠颊黏膜自正常黏膜到癌前病变发展过程中，共得到 1 331 条差异表达基因，其中上调基因 747 条，下调基因 584 条。Gene Ontology 分析发现这些差异基因主要涉及到大分子代谢、信号传导等 8 大功能分类。对上调基因 Atp6v0d2 和下调基因 Sfrp2 行 RT-PCR 验证结果与芯片结果相符。结论：口腔颊黏膜癌前病变的发生涉及众多基因表达的改变，通过对这些基因的进一步研究，将对探索口腔黏膜癌前病变的发病机制、有效的干预防止癌前病变的发生或逆转癌前病变具有重要意义。

【关键词】颊囊黏膜；癌前病变；全基因表达谱；基因芯片

【中国图书分类法分类号】R739.8；R730.45　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2009-08-31

DNA microarray screening and analysis of the virulence gene in golden hamster cheek poch mucosa with precancerous lesions

ZHANG Guo-dong, et al

(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The aim of this study was to screen and analysize the important virulent genes in golden hamster cheek poch mucosa with precancerous lesions induced by DMBA. *Methods*: The models of golden hamster cheek poch mucosa precancerous lesions were induced by DMBA (styrene- dimethyl -anthracene). We extracted the total RNA from the normal mucosa and precancerous lesions; then we respectively used the Cy3 to mark the cDNA of normal mucosa and precancerous lesions; and used the Agilent Rat microarray containing 41,000 genes/ESTs to screen the differentially expressed genes; used the screening criteria of Log2Ratio ≥2.5 and Log2Ratio ≤-2.5, at last using the Gene Ontology to analysis the biology function of the important virulent genes. Meanwhile, we confirmed the correctness of the results of the Gene Chip by using the RT-PCR to verificate some important pathogenic genes. ***Results***: We detected a total of 1331 differentially expressed genes (up-regulated 747; down-regulated 584).GO analysis showed that these *differentially expressed genes mainly related to the macromolecular metabolism, signal transduction and so on. The RT-PCR results of* Atp6v0d2 and Sfrp2 were consistent with the gene chip analysis. *Conclusion*: Towards the screening and analysis of the important differentlily expressed genes in the gold hamster cheek pouch mucosa with precancerous lesions, we found that the special stage-precancerous lesions involved in changes in multiple genes. The further study of these genes is useful to explore the pathogenesis of precancerous lesions in the oral mucosa and effectively prevent the occurrence of precancerous lesions.

【Key words】Cheek poch mucosa; Precancerous lesions; Gene expression profiling; Gene chip

目前人们已证实[1,2]：口腔黏膜上皮癌变的发生是一个多阶段、多步骤、涉及多基因改变的复杂病理过程，不同的基因在癌症的不同发展阶段扮演不同的角色。80% 的口腔癌源于癌前病变[3]，目前仍尚无有效地临床方法预防癌前病变的发生和阻断这些癌前病变的继续恶性发展，若能通过有效的干预方法防止癌前病变的发生、或逆转癌前病变或阻止癌前病

作者介绍：张国栋（1984- ），男，硕士，
研究方向：口腔颌面外科。

通讯作者：杨　凯，男，教授，E-mail：cqfyyk@yahoo.com.cn。

基金项目：重庆市卫生局科研项目（编号：03-2-073）。

变的癌变,这将对口腔癌的预防和治疗产生重大意义。

本研究利用 9,10- 二甲基;1,2- 苯并蒽(Dimethylbenzanthracene,DMBA)诱导建立叙利亚金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变模型,用包含 41 000 条基因/ESTs 的 Agilent 全基因表达谱芯片全面分析正常颊黏膜和癌前病变基因表达谱的差异,结合相关生物信息学方法,首次基于全基因组水平对口腔颊黏膜癌前病变发生发展的相关基因进行筛选和分析,为探索口腔黏膜癌前病变发生发展的分子机理和研究逆转癌前病变或阻止癌前病变癌变的干预方法提供科学研究方向。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

5%丙酮液(上海博蕴公司);叙利亚金黄地鼠 20 只(卫生部成都生物制品研究所);9,10- 二甲基 1,2 苯并蒽(9,10-Dimethylen-1,2Benzanthracene,DMBA;美国 SIGMA公司);PCR 仪(PTC-100,MJ 公司);杂交炉(G-2545A,Agilent 公司);Agilent 扫描仪(G2565AA,Agilent 公司);分光光度计(ND1000,Nanodrop 公司);单标 Agilent 大鼠全基因表达谱 4*44K 芯片(美国 Agilent 公司);RT-PCR 试剂盒(Bioflux 公司)。

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变模型的建立 叙利亚品系金黄地鼠 20 只,体重 90~120 g,6~8 周龄,雌雄各半,分为 2 组,Ⅰ组为实验组,Ⅱ组为空白对照组,每组 10 只。将Ⅰ组金黄地鼠固定于自制鼠架上,拉开颊囊,用 1 号油画笔于每周一,三,五下午在金黄地鼠双侧颊囊上涂 0.5%DMBA 丙酮,共计 6 周,所有动物涂擦后禁食禁水 2 h,Ⅱ组对照组不行处理。在第 6 周时处死Ⅰ组和Ⅱ组动物,分别取其颊囊组织,将所取一半颊囊组织立即置于液氮中保存,另一半用 10%福尔马林液常规固定、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片,行病理检查,光镜下观察病变情况,挑选合适的癌前病变标本。

1.2.2 金黄地鼠正常颊囊黏膜及癌前病变标本 RNA 的提取及纯化 采用 Invitrogen 的 TRIzol 试剂盒分别提取Ⅰ组和Ⅱ组标本中的总 RNA,使用 QIAGEN Raeasy Kit 分别纯化总 RNA,具体步骤参照试剂盒操作说明。最后分别将Ⅰ组和Ⅱ组标本中的总 RNA 等量完全溶解于 Mili-Q 水中,-80℃冻存待用。

1.2.3 cRNA 标记与合成 运用逆转录法荧光标记提取的样本 RNA,各组均用 Cy3 单标标记。具体步骤如下:向 2 支 1.5 ml 的试管中分别加入以上 2 种标本 RNA 各 2 μg,然后向 2 试管中分别加入引物 5 μl,用 Rnase-free 水补足到 11.5 μl,然后充分混匀,60℃水浴 10 min,冰水冷却 5 min。然后分别再加入 DDT 2 μl(浓度为 100 mmol/L),DNTP 1 μl,Buffer 4 μl,RNase OUT 0.5 μl,MMLV RT 1μl,共计 8.5 μl,然后混匀,离心,热盖 65℃,40℃反应 2 h,合成各组 cRNA。然后用 aaUTP 标记合成的 cRNA,通过 QIAGEN Raeasy Mini Kit 纯化标记合成的 cRNA,并用分光光度计测定其浓度,浓度测定后的 cRNA 用荧光标记且再次纯化。

1.2.4 cRNA 样品片段化及芯片杂交 分别提取用 Cy3 标记好的癌前病变及正常黏膜 cRNA 各 875 μg,加入BloockingAgent 11 μl,Fragmentation Buffer 2.2 μl,最后加入 Nuclease-free 水至总体积到 55 μl,将上述配置好的混合液加热至 60℃温浴 30 min 进行片段化;然后向片段化溶液中加入 GEXHy bridization Buffer 55 μl;最后加上述溶液 100 μl 于芯片上,然后在 65℃ 17 h 10 rmp 滚动杂交。取出芯片于洗液 1 中洗涤 1 min,然后再将芯片放入洗液 2 中于 37℃洗涤 1 min。

1.3 芯片扫描和数据处理

芯片杂交结果采用 Agilent G2565AA 荧光扫描仪进行扫描,Feature Extraction 软件读取,扫描仪分辨率为 5 μm,光电欧联管分别设置为 100%和 10%各扫描 1 次,2 次扫描结果 Agilent 软件自动合并,合并结果采用 Feature Extraction 进行均一化处理。本次实验的均一化系数为 0.853,2 张芯片的平均信号强度与平均背景的比值均大于 3,符合 Agilent 表达谱芯片的成功标准。筛选差异表达基因的标准为:Ration≥5.7(Log2Ration≥2.5)和 Ration≤-5.7(Log2Ration≤-2.5)。

1.4 生物信息学分析

利用 Agilent 公司提供的 Cluster3.0 软件对金黄地鼠正常颊黏膜及癌前病变的差异表达基因行聚类分析;用 Gene Ontology(http://www.ncbi.nlm.nib.gov/)功能分类标准对差异基因进行功能分类分析。

1.5 RT PCR 法验证芯片结果

为验证芯片结果的可靠性,随机选取芯片结果中上调基因 Atp6v0d2 和下调基因 Sfrp2 用 RT-PCR 验证。按照说明书使用 Invitrogen 的 TRIzol 试剂盒分别从各个样品组织中提取总 RNA,然后取 1 μg 的 RNA 在 20 μl 的反应体系中按照 Invitrogen 说明书加入一定剂量的逆转录酶和随机六聚体逆转录成 cDNA,随后将逆转录成的 cDNA 进行 PCR 扩增反应,其过程为 94℃ 3 min 预变性,94℃ 1 min 变性,52℃30 s 退火,72℃ 1 min 延伸,30 个循环,72℃ 10 min 终止。其中 PCR 引物使用 Primeor3.0 设计,见表 1。

2 结 果

2.1 金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变模型的建立和病理检查

用 0.5%DMBA 丙酮液涂擦金黄地鼠颊囊黏膜 6 周后,肉眼下见颊部出现黏膜增厚,有大量粗糙突出的白色斑块,表面出现糜烂面(图 1);组织病理检查见:颊黏膜上皮粒层和棘层细胞增厚,基底细胞呈明显的复层样改变,细胞极性消失,但基底膜清楚,偶可见核浓染及错角化,黏膜下淋巴细胞浸润,见图 2。

2.2 样品 RNA 浓度和纯度的检测

样品 RNA 浓度计算公式为:$A_{260}\times 40$ μg/μl,因此260 nm 处读值为 1 表示 RNA 浓度为 40 μg/μl。将Ⅰ组和Ⅱ组标本

表 1 验证基因 RT-PCR 引物

基因名称	基因文库号	引物序列	产物长度(bp)
Atp6v0d2	NM_001011972	F:5'-CGAGGGTGCAAAGCCAGCCT-3' R:5'-AGCCGCAGTCCCTCCGGATA-3'	700
Sfrp2	ENSRNOT00000012658	F:5'-CTCCTGCCGCCCACAGAGGA-3' R:5'-GATGCTGCGGGAGATGCGCT-3'	400
β-actin	NM_001101.2	F:5'-CCCGCCACCAGTTCGCCAT-3' R:5'-TGTGGGTGACCCCGTCTCCG-3'	500

RNA 溶于 20 μl DEPC 水中，取 1 μl 测定，正常颊囊黏膜和癌前病变组织 RNA 溶液的浓度分别为 0.365、0.828 μg/μl，A_{260}/A_{280} 比值分别为 2.01、2.05。证明为较纯的 RNA，适合 Agilent 芯片检测。

2.3 变性琼脂糖凝胶电泳

28 S 和 18 S 核糖体 RNA 的条带亮而浓，上面 1 条带的密度大约是下面 1 条带的 2 倍，未见 DNA 污染，见图 3。

2.4 芯片杂交结果及生物信息学分析

2.4.1 癌前病变显著性差异表达基因的筛选和聚类分析 金黄地鼠颊囊黏膜自正常黏膜变化到癌前病变的发生发展过程中，共有 1 331 条显著性差异表达基因，未知基因 53条，已知基因 1 278 条，包括上调基因 747 条，下调基因 584 条。

2.4.2 Gene Ontology 功能分析 1 331 条差异表达基因主要分为 8 大功能组，见表 2。表 3 和表 4 列出了上调及下调变化倍数最大的前 20 名基因及其相应功能和染色体定位情况。

2.4.3 RT-PCR 验证结果 上调基因 Eaf2 和下调基因 Ecg2 的 RT-PCR 验证结果见图 4。我们将 Eaf2 和 Ecg2 的 PCR 扩增产物的积分光密度值与 β-actin 的积分光密度值相比，得出积分光密度比率值，见表 5，结果证明目的基因 A 值比值与芯片结果变化趋势一致。

3 讨 论

口腔癌中 90%为鳞状细胞癌，颊癌是最常见的口腔癌之一[4]，尽管手术、化疗、放疗和生物治疗等治疗方法在近几十年来取得了巨大的发展，但目前对口腔癌的治疗后其 5 年生存率也仅为 55%～60%[5,6]。



图 1 肉眼下金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变

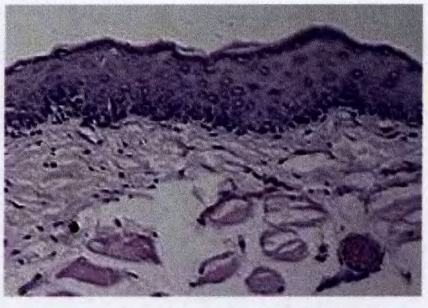
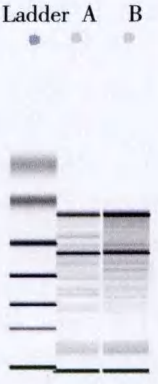


图 2 金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变光镜下的改变(HE×200)



A. 金黄地鼠正常颊囊黏膜；B. 金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变

图 3 RNA 琼脂糖凝胶电泳

表 2 差异表达基因的 Gene Ontology 分类

功能分类	上调基因数目	下调基因数目
细胞结构相关基因	232	181
大分子代谢相关基因	61	48
信号传导相关基因	38	30
分子定位相关基因	87	68
细胞生理过程调节相关基因	239	187
物质转运相关基因	31	25
免疫调节相关基因	58	46
未知基因	36	17

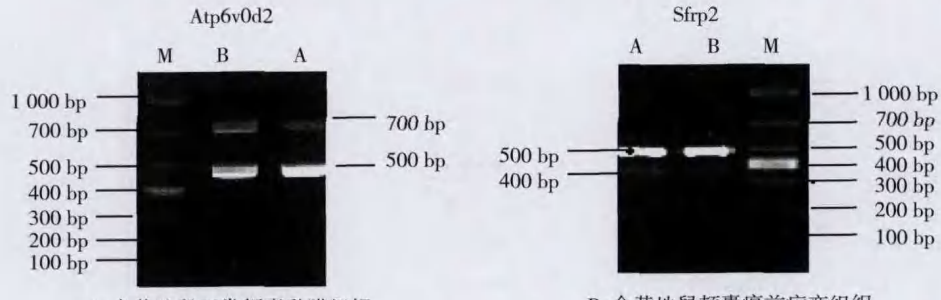
注：同一个基因可能涉及不同功能

表 3 金黄地鼠颊囊正常黏膜向癌前病变转化中表达上调倍数最大的前 20 名的基因

Genbank 登录号	基因名称	染色体定位	变化倍数	功能分类
NM_213769	Vps37b	chr12q15	12.95	物质代谢
CB544723	CB544723	chrXq31	10.92	未知
BF395964	BF395964	chr15q11	10.16	未知
NM_031736	Slc27a2	chr3q36	9.49	物质代谢
NM_022854	Fabp9	chr2q23	8.47	物质代谢
BF391522	BF391522	chr7q33	8.42	未知
U15550	Tnc	未知	8.00	细胞黏附
XM_222794	Tnn	chr13q22	7.63	细胞黏附
S79307	S79307	未知	7.25	未知
BM386498	BM386498	chr12q16	6.90	未知
CB548350	CB548350	未知	6.78	未知
NM_198733	Cyp2b13	chr1q21	6.77	癌基因
未知	ENSRNOT00000023693	未知	6.7681	未知
NM_130399	Ada	chr3q42	6.7634	免疫调节
NM_001011972	Atp6v0d2	chr5q13	6.70	离子转运
NM_031055	Mmp9	chr3q42	6.67	物质代谢
BF554576	BF554576	chr6q16	5.78	未知
NM_053976	Krt1-18	chr2q22	5.64	细胞结构
未知	ENSRNOT00000039417	chr7q36	5.50	细胞结构
CN542880	CN542880	chr9q31	5.31	未知

表 4 金黄地鼠颊囊正常黏膜向癌前病变转化过程中表达下调倍数最大的前 20 名的基因

Genbank 登录号	基因名称	染色体定位	变化倍数	功能分类
AW143803	AW143803	chrXq36	-6.56	未知
未知	XM_227369	chr2q34	-6.12	未知
未知	CK476066	chr3q32	-5.79	未知
NM_00100413	Ka24	chr10q32.1	-5.64	细胞结构
BI285820	BI285820	chr1q35	-5.51	未知
BQ206156	BQ206156	chr2q11	-5.32	未知
XM_341380	Zic5	chr15q25	-5.27	细胞分化
AI230614	AI230614	chr13q23	-5.19	未知
XM_001039341	LOC497978	chr10q26	-5.16	物质代谢
未知	A_44_P201738	未知	-5.15	未知
ENSRNOT00000012658	Sfrp2	chr2q34	-5.10	抑癌基因
AW917697	AW917697	chr16P16	-5.08	未知
M16406	M16406	chr1q43	-4.99	信号传导
TC623083	TC623083	chr4q44	-4.92	未知
AA849743	AA849743	chr1q31	-4.91	未知
XM_001017444	Tm2d2	chr16q12.4	-4.82	物质代谢
XM_225241	Hivep1	chr17P12	-4.79	免疫调节
BQ199467	BQ199467	chr3q41	-4.77	未知
XM_001056150	LOC362068	chr2q11	-4.69	信号传导
XM_013170	Gucy2c	chr4q43	-4.65	信号传导



A. 金黄地鼠正常颊囊黏膜组织　　B. 金黄地鼠颊囊癌前病变组织

图 4　RT-PCR 验证结果

表 5　RT-PCR 与芯片结果的比较

基因名称	基因 mRNA/GAPDH(A)	mRNA B ($\bar{x} \pm s$)	A/B 比值	基因芯片比值
Atp6v0d2	0.1292 ± 0.0023	0.8023 ± 0.0143	6.21	6.70
Sfrp2	0.4201 ± 0.0034	0.09702 ± 0.0007	-4.33	-4.65

大多数的口腔鳞癌都经历一个“正常上皮—癌前病变—鳞癌”的动态发展过程[7-9]，这一动态发展变化过程是由于细胞内多基因表达的改变而发生，若能通过有效的干预方法防止癌前病变的发生、或逆转癌前病变或阻止癌前病变的癌变，这将对口腔癌的预防和治疗产生重大意义。

本研究用 DMBA 诱导建立金黄地鼠颊部鳞癌模型，用包含 41 000 条基因/ESTs 的 Agilent 全基因表达谱芯片首次全面分析正常颊黏膜和癌前病变基因表达谱的差异，并对差异基因进行功能分类分析，从全基因组水平筛选和分析口腔黏膜癌前病变发生发展相关基因的改变，这将对探索口腔黏膜癌前病变发生发展的分子机理和发展有效的预防和治疗方法具有重要作用。

目前判定基因表达差异显著的标准是：Ratio≥2.5 为上调基因，Ratio≤0.5 为下调基因，本研究以此标准筛选出金黄地鼠颊囊黏膜在癌前病变的发生发展过程中共有 5 932 条基因出现显著性差异表达，其中上调 3 223 条，下调 2 709条。由于差异基因数量太大，本研究进一步提高基因表达差异的倍数，我们以 Ratio≥5.7 和 Ratio≤-5.7 为差异基因筛选标准，发现共有 1 331 条显著性差异表达基因，其中上调 747 条，下调 584 条。用 Gene Ontology 功能分类标准对差异基因进行功能分类分析表明：这些显著性差异表达基因 31.0%与细胞结构有关，8.2%与大分子代谢有关，5.1%与信号传导有关，11.7%与分子定位有关，32.0%与细胞生理过程调节有关，4.2%与分子转运有关，7.8%与免疫调节有关，4.0%为功能未知基因，其中下调基因主要涉及到了 DNA 结合、转录和转录因子、细胞信号和传递蛋白、免疫相关基因、细胞因子、代谢相关基因等，上调基因主要涉及到了癌基因、免疫相关基因、代谢相关基因、细胞因子、细胞信号、和传递蛋白等。

本研究表明：金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变的发生是多种基因异常表达的结果。通过对上述致病基因的深入研究，将会对探索口腔黏膜癌前病变的发病机制、预防癌前病变的发生和逆转癌前病变提供极大的帮助。

参 考 文 献

[1] Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, et al.Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia[J]. Oral Oncol, 2005, 41(4): 365-374.

[2] Choi P, Chen C.Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma r[J].Cancer, 2005, 104(6):1113-1128.

[3] Shiu M N, Chen T H.Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer[J].Eur J Cancer Prev, 2004, 13(1): 39-45.

[4] Kademani D, Bell R B, Scbmidt B L, et al.Oral and maxillofacial surgeons treating oral cancer: a preliminary report from the American Association of Qral and Maxillofacial Surgeons Task Force on Oral Cancer [J].Oral Maxillofac Surg, 2008, 66(10): 2151-2157.

[5] Bernier J, Cooper J S.Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: How strong is the evidence [J].Oncoloogist, 2005, 10(3): 215-224.

[6] Kademani D, Bell R B, Bagheri S, et al.Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: The influence of histologic grade[J].Oral Maxillofac Surg, 2005, 63(11): 1599-1605.

[7] Vogelsten B, Kinzler K W.The multistep nature of cancer[J].Trends Gentel, 1993, 9(4): 138-141.

[8] Epstein J B, Gorsky M, Fischer D, et al.A survey of the current approaches to diagnosis and management of oral premalignant lesions[J].J Am Dent Assoc, 2007, 138(12): 1555-1562.

[9] Meier J D, Enepekides D J, Poirier B, et al.Treatment With 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model[J].Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133(11): 1149-1152.

（责任编辑：冉明会）