

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01109

· 研究快报 ·

应用基因芯片技术筛选生长激素腺瘤相关基因

干小强¹, 丁学华^{1*}, 卢亦成¹, 胡国汉¹, 陈菊祥¹, 肖华胜²

1. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003

2. 生物芯片上海国家工程中心, 上海 201203

[摘要] **目的** 应用基因芯片技术筛选人生长激素腺瘤发生、发展相关基因, 为后续研究奠定基础。**方法** 应用人全基因组寡核苷酸芯片 HG-U133 Plus 2.0 检测 8 例生长激素腺瘤组织、2 例混合正常垂体组织的基因表达谱, 差异表达基因进行筛选和生物信息学分析。Real-time qPCR 验证芯片结果。**结果** 筛选出与生长激素腺瘤相关的上调基因 187 条, 下调基因 899 条; 差异表达基因功能主要涉及分子结合、凋亡或肿瘤相关、代谢、信号转导、细胞周期、物质运输等多个生物过程。**结论** 基因芯片技术可初步筛选出人生长激素腺瘤相关基因; 生长激素腺瘤的发生、发展是多基因、多分子、多通路的网络调控过程。

[关键词] 分泌生长激素的脑垂体腺瘤; 寡核苷酸序列分析; 基因表达谱

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1109-05

Whole genome oligonucleotide microarrays in screening of growth hormone adenoma associated genes

GAN Xiao-qiang¹, DING Xue-hua^{1*}, LU Yi-cheng¹, HU Guo-han¹, CHEN Ju-xiang¹, XIAO Hua-sheng²

1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203, China

[Abstract] **Objective** To screen for differentially expressed genes associated with the development and progression of human growth hormone adenoma, so as to lay a foundation for future study. **Methods** The whole genome oligonucleotide microarray (Affymetrix 133 plus 2.0) was used to examine gene profiles of 8 growth hormone adenoma samples and 2 normal pooled pituitary samples. Differentially expressed genes were subjected to bioinformatics analysis. Real-time qPCR was used to verify the microarray result of a randomly selected candidate gene. **Results** A total of 187 up-regulated genes and 899 down-regulated genes associated with growth hormone adenoma were screened out, with their functions mainly associated with molecular binding, apoptosis/tumor, metabolism, signal transduction, cell cycle, and transportation activities. **Conclusion** Microarray technology can be used for preliminary screen of growth hormone adenoma associated genes. The development and progression of growth hormone adenoma are complex processes involving multiple genes, molecules, and pathways.

[Key words] growth hormone-secreting pituitary adenoma; oligonucleotide array sequence analysis; gene expression profile

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1109-1113]

生长激素腺瘤发生、发展的分子生物学机制探讨一直是相关研究的热点。基因芯片能将分散在传统研究中的反应、检测、分析等过程连续化、自动化、集成化, 可直接对微量的垂体腺瘤组织进行高效、快速、高通量检测, 从而使得在分子水平上全面、综合分析其发生、发展机制成为可能^[1-2]。因此, 本研究应用全基因组高密度寡核苷酸芯片对中国汉族人生长激素腺瘤的基因表达谱进行了高通量检测, 并与正常成人垂体组织的基因表达谱进行了比较和初步分析, 为进一步阐明生长激素腺瘤的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本的获取及保存 收集第二军医大学长征医院神经外科经蝶手术 88 例鞍区肿瘤组织。在 22 例生长激素腺瘤中优化选择 8 例, 均为: (1) 原发肿瘤, 既往无放疗、手术史且术前未接受生长抑素类及胰岛素等控制血糖类药物; (2) 无内分泌疾患或长期激素(如糖皮质激素)服用史且术前无甲状腺激素类药物替代治疗; (3) 临床表现、内分泌激素检测、术后病理支持生长激素腺瘤诊断; (4) 组织取瘤方式一致, 均为活检钳夹取瘤体的实质部分。8 例患者,

[收稿日期] 2010-01-03 [接受日期] 2010-08-13

[作者简介] 干小强, 博士, 主治医师, 现为第四军医大学西京医院全军神经外科研究所博士后。E-mail: xiaoqiangan@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886810, E-mail: dxuehua.cz@163.com

其中男3例,女5例,平均(42.6±2.5)岁,均存在不同程度的肢端肥大。主要临床表现:3例男性均为头痛,1例存在视力、视野改变;4例女性存在闭经、泌乳改变,1例存在视力、视野改变。术前激素检查8例患者均显示生长激素水平明显升高(33.2~105.5 ng/ml),5例同时存在泌乳素水平升高(22.96~114.36 ng/ml),相应的垂体激素免疫组化均显示4例GH、PRL阳性,4例仅GH阳性。7例正常成人垂体组织来自于捐献尸体,死因均为心源性疾患,均在死后6 h内取材。所有待测样本离体后均立即放入液氮保存。

1.2 主要试剂及仪器 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司);RNeasy Mini Kit(Qiagen 公司);mRNA 纯化试剂盒(Qiagen 公司);RNA 转录标记试剂盒、基因芯片杂交炉 640、基因芯片流程工作站 400、Gene Array Scanner 3000 7G 扫描仪(Affymetrix 公司);QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen 公司);高密度寡核苷酸芯片(Affymetrix, HG-U133 Plus 2.0)代表人类全基因组 47 400 转录本,承载 38 500 条明晰的人类基因,具有 54 000 个短寡核苷酸探针。

1.3 主要分析软件及数据库 GCOS 分析软件包(Affymetrix 公司),Dat. view 1.0 软件;NCBI 数据库;Entrez 数据库;GDB 数据库等。

1.4 基因芯片技术筛选差异表达基因

1.4.1 RNA 抽提、探针制备和芯片杂交 采用一步法 TRIzol 分别提取试验组和对照组组织总 RNA,并用 RNeasy Mini Kit 纯化,1%琼脂糖电泳和分光光度计评价 RNA 的质量和完整性。分别来自于 2 例或 5 例正常垂体组织的 RNA 混合成 2 份正常对照的 RNA 及 8 例生长激素腺瘤的芯片实验按照 Affymetrix 公司提供的操作指南进行。以 RNA 为模板,合成单链及双链 cDNA,纯化;再以双链 cDNA 为模板,用 RNA 转录标记试剂盒进行体外转录合成生物素标记的 cRNA,片段化处理;分光光度计质控合格的 cRNA 与 HG-U133 Plus 2.0 基因芯片在杂交炉 640 中 45℃ 预杂交 10 min,取出杂交缓冲液,加等体积处理好的杂交液,45℃ 杂交 16 h。然后于基因芯片流程工作站 400 中洗脱。

1.4.2 芯片数据处理与生物信息学分析 杂交后的 HG-U133 Plus 2.0 基因芯片予以 Gene Array Scanner 3000 7G 扫描仪上扫描,Image Viewer 软件提取杂交信号叠加图。所有原始数据予以 GCOS 软件包进行均一化和数据校正。将实验组与对照组芯片上对应探针之间的荧光信号强度比值进行转换。分别要求配对的实验组样本或正常对照组探针应为检出(其信号值的 P 值位于 0~0.04),且两者平均

差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 ,筛选出与生长激素腺瘤密切相关的上调或下调基因。汇总 16 次比较结果后共同存在的差异表达基因再次进行生物信息学分析。

1.5 实时荧光定量多聚酶链反应验证分析结果 随机选择下调表达的 YES1(v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1) 基因,再次进行实时荧光定量多聚酶链反应(qRT-PCR)。3 μg 总 RNA 反转录 cDNA,抽取 1 μl 正向、反向引物加入 qRT-PCR 反应的 96 孔板。反应条件为 50℃ 孵育 2 min,95℃ 活化 5 min;95℃ 40 个循环变性 15 s;60℃ 退火 1 min。特异性基因探针经 Primer 5.0 软件(Premier Biosoft International, Canada)设计,并由上海 Invitrogen 公司合成。该基因的正向引物是 5'-TCC AAC AGC TTT TCG TCT TCA G-3';反向引物为 5'-GCT AGA AGG CTG TTT TTG CCA A-3';选择 GAPDH 作为内参基因。

2 结果

2.1 总 RNA 质量 制备探针的无功能腺瘤组织和正常垂体组织总 RNA 的质控结果显示 D_{260}/D_{280} 均在 1.9~2.1,18S 和 28S 电泳条带清晰,未见明显降解。热稳定实验证明 RNA 纯度高,满足实验要求。

2.2 基因芯片杂交后的扫描结果 芯片杂交后的所有原始信息均储存在 DAT 格式的芯片图像上。通过提取生物素信号值获得实验组和对照组的数据,显现的是灰度值。每个像素的灰度值 0~65 535,每个灰度值均反映图像所对应的芯片位置生物素标记荧光分子的相对强度信息。如图 1 显示所有 10 张芯片(生长激素腺瘤芯片编号 C81、C79、C87、C53、C56、C72、C67、C31;正常对照编号 Q1、Q2),均具有较低的整体背景、较高的信噪比;从芯片信号点的质量上观察:所有信号点的大小以及形状规则程度呈均一化、信号点的信噪比及信号点的背景强度、信号点的信号饱和程度均显现良好,近乎一致化。这些说明芯片的实验结果理想。

2.3 基因芯片杂交信号散点图 图 2 显示的 1 例生长激素腺瘤与正常混合对照组比较后的散点图。散点图的 X 轴为对照组的信号值,Y 轴为实验组的信号值,图中红色的点为实验组和对照组该探针均为存在,蓝色的为 2 组中有 1 个值不存在,而黄色的点为 2 组均不存在。红色的点为实验组及对照组均存在的基因,只是表达量不同。斜线是表达量的比值,散点图中共有 8 条斜线。它们由上往下为 30、10、3、2、-2、-3、-10、-30,分别为 2、3、10、30 倍变化。从图中可以看出红色的点大部分集中在 2~-2 线内,说明大部分基因在两组中的表达基本相

同。筛选出来的差异基因应该在 2 和 -2 线外以表

明这些基因的表达水平有显著差异。

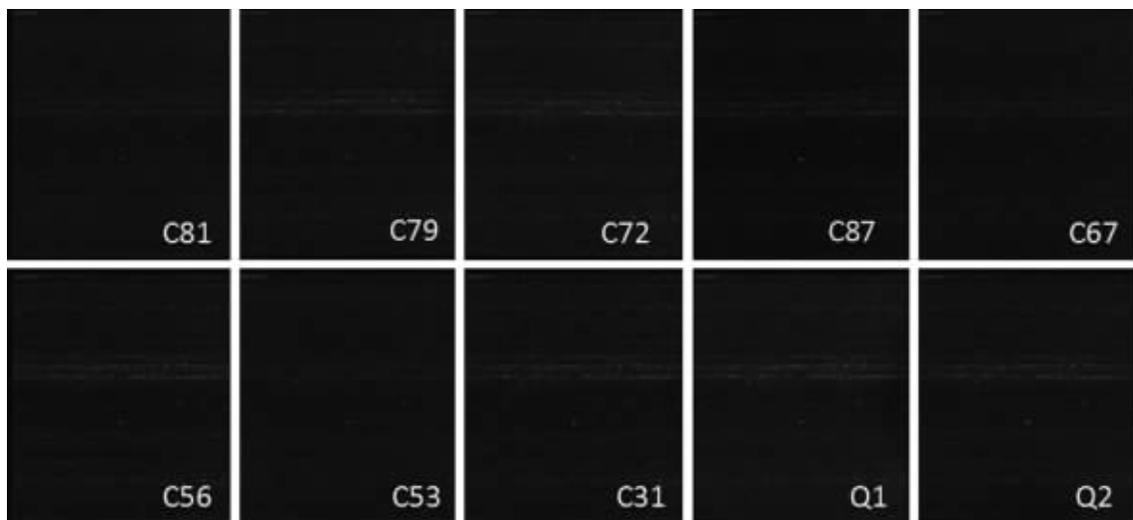


图 1 8 张生长激素腺瘤 (C81, C79, C87, C53, C56, C72, C67, C31) 与 2 张正常对照 (Q1, Q2) 芯片扫描图

Fig 1 Scanograms of gene chips of 2 normal controls (Q1, Q2) and 8 growth hormone adenomas (C81, C79, C87, C53, C56, C72, C67, C31)

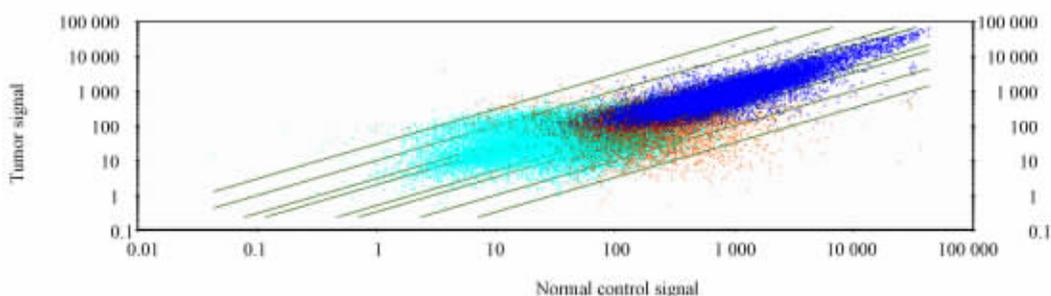


图 2 实验组生长激素腺瘤与正常对照组的基因表达谱比较后的散点图

Fig 2 Scatter plots for comparison of gene expression profile of normal control and growth hormone adenoma groups

2.4 与生长激素腺瘤相关的差异基因及功能基因群分析 按前面所述分析方法, 筛选上调基因 187 条, 下调基因 899 条, 其中一致性差异基因共 315 条 (上调 29 条、下调 286 条)。部分结果见表 1。这些差异基因功能聚类显示主要涉及分子结合 (516 条)、凋亡或肿瘤相关 (246 条)、代谢 (224 条)、信号转导 (204 条)、物质运输 (106 条)、细胞周期 (91 条)、转录调控 (81 条) 等多个生物过程。平均差异倍数 4 倍以上的上调基因 20 条, 如: S100A8 (S100 calcium binding protein A8)、ENPP2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2)、APOL1 (apolipoprotein L 1)。平均差异达 4 倍以上的下调基因 410 条, 如 GAL (galanin)、EDN3 (endothelin 3)、GPC4 (glypican 4)。与生长激素腺瘤相关的特征性基因, 如 GH2 (growth hormone 2)、GHRHR (growth hormone releasing hormone receptor) 等基因, 平均上调 2.5 倍以上; 而且相应的与无

功能腺瘤一些相关特征性基因, 如 GNRHR (gonadotropin-releasing hormone receptor), 下调达 31 倍; LHB (luteinizing hormone beta polypeptide) 下调近 67 倍。

2.5 qRT-PCR 验证结果 如图 3 所示, 芯片样本中 qRT-PCR 分析的 YES1 基因表达趋势与芯片一致, 证实芯片结果可靠。

3 讨论

流行病学研究显示隐匿性生长激素腺瘤的发病率可高达 1 043/百万^[3], 临床明确诊断延迟近 4~10 年, 而且即使肿瘤治愈或良好控制, 其后遗症如关节疼痛、畸形仍明显影响患者的生活质量^[4]。因此, 在分子水平上阐明生长激素腺瘤发生、发展相关的机制具有重要的临床意义。对于垂体腺瘤的发病机制, 目前唯一明确的是致癌基因 gsp 突变, 但其仅出现在 40% 的生长激素腺瘤, 且该基因突变与腺瘤侵

袭性、生长激素水平无相关性^[5]。进一步的研究表明垂体腺瘤发生中缺少与肿瘤发生相关经典机制中的

致癌基因活化或抑癌基因失活^[6]。这说明可能一些不常见或尚未发现的癌基因涉及其形成机制。

表 1 列举与正常对照组比较筛选生长激素腺瘤相关的差异基因表达

Tab 1 Genes differentially expressed in normal controls and growth hormone adenomas

Probe ID	GenBank ID	Gene name	Symbol	Diff-expressed trend
1552378_s_at	NM_172037	Retinol dehydrogenase 10	RDH10	Up-regulated
1565358_at	AJ417079	Retinoic acid receptor, alpha	RARA	Up-regulated
1568672_at	BM991952	ELL associated factor 2	EAF2	Up-regulated
202905_x_at	AI796269	Nibrin	NBN	Up-regulated
205992_s_at	NM_000585	Interleukin 15	IL15	Up-regulated
1552365_at	NM_033128	Scinderin	SCIN	Down-regulated
1552478_a_at	NM_006147	Interferon regulatory factor 6	IRF6	Down-regulated
201445_at	NM_001839	Calponin 3, acidic	CNN3	Down-regulated
201645_at	NM_002160	Tenascin C (hexabrachion)	TNC	Down-regulated
202291_s_at	NM_000900	Matrix gla protein	MGP	Down-regulated

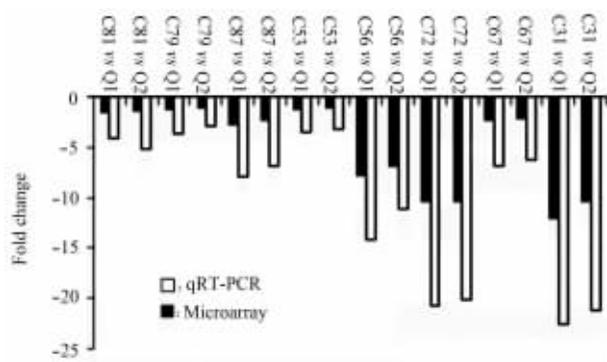


图 3 YES1 基因 qRT-PCR 验证基因芯片分析结果

Fig 3 qRT-PCR in verification of YES1 expression identified by gene chip analysis

Normal control: Q1, Q2; Growth hormone adenoma: C81, C79, C87, C53, C56, C72, C67, C31

结合临床影像学与手术观察,生长激素释放激素(GHRH)基因高表达的生长激素腺瘤容易出现鞍底破坏和(或)海绵窦侵袭,而且其相应的受体基因 GHRHR 明显更高表达,提示 GHRH 基因表达可能以自分泌或旁分泌的方式刺激生长激素腺瘤生长和生长激素的分泌^[7-8],且与生长激素腺瘤侵袭性相关^[9]。本研究结果表明,与正常对照相比,GHRH 基因表达并未明显升高,平均表达上调仅约 1.7 倍,提示 GHRH 基因与生长激素腺瘤的发展密切相关,但对其发生可能关系不大。

本研究结果还发现一些不常见的具有致癌作用的基因,如 ELK1(ELK1, member of ETS oncogene family)、ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2 oncogene)、FYN(FYN oncogene related to SRC, FGR, YES)、PIM2 (pim-2 oncogene)、PVT1(Pvt1 oncogene homolog),平均上调 2~9 倍;另外一些可能具有抑癌功能的基因,如 SCIN

(scinderin)、TWIST1(twist homolog 1)、ID1(inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein)、GAS1 (growth arrest-specific 1),则特异性下调 4~22 倍。因此,有必要进行针对性扩大样本量的研究。

肿瘤细胞的倍增、发展涉及生长因子及其受体表达异常。本研究发现 EGF(epidermal growth factor)及其受体 EGFR(Epidermal growth factor receptor)、PDGFA(Platelet-derived growth factor alpha polypeptide)及其受体 PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide)、NGFB(nerve growth factor, beta polypeptide)、HGF(hepatocyte growth factor)等生长因子可异常上调,平均升高 2~4 倍。尽管这些基因表达在生长激素腺瘤中的具体意义仍有待明确,但至少表明这些因子所参与的信号转导通路异常可参与生长激素腺瘤的发生、发展。

细胞周期相关基因表达紊乱会导致肿瘤细胞分裂、增殖、分化异常活跃。芯片分析显示与细胞周期相关的基因,如 ATF5 (activating transcription factor 5)、BCAT1(branched chain aminotransferase 1, cytosolic)、CDKN1A [cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)],DBC1 (deleted in bladder cancer 1) 表达增强;而 MDK (midkine)、NEDD9 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9)、NOTCH2(Notch homolog 2)、ZAK(sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK)、CDKN1B(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)等基因,则显示下调 2~7 倍。但是没有发现居于核心地位的细胞周期蛋白 D (CCND)等亚型基因表达呈现明显异常,部分印证了作

为良性肿瘤的垂体腺瘤低增殖、低分化的特性。

目前认为垂体腺瘤的侵袭性生物学行为转变首先表现在硬膜侵袭。由于取材的局限性,即使针对一小部分的鞍底硬膜进行电镜检查,微腺瘤的硬膜侵袭发生率也可高达 69%^[10],暗示临床上所见的垂体腺瘤可能均是病理组织学上侵袭性腺瘤。尽管大多数学者否认硬膜侵袭与临床预后相关性,但它的存在意味着在病理层面上难以做到肿瘤全切除^[11],因此明确其分子机制有助于深刻理解、积极诊治侵袭性垂体腺瘤。芯片结果可显示一些具有黏附功能的基因,如 BCAN (Brevican)、CDH6 (Cadherin 6, type 2, K-cadherin)、CNTN2 (contactin 2)、ITGB1 (integrin beta 1)、LAMB1 (Laminin beta 1),平均上调 3~8 倍,而与细胞外机制降解相关的金属蛋白酶及其抑制因子,如 MMP1 (matrix metalloproteinase 1)、MMP3 (matrix metalloproteinase 3)、MMP17 (matrix metalloproteinase 17)、TIMP2 (TIMP metalloproteinase inhibitor 2)、TIMP4 (TIMP metalloproteinase inhibitor 4),可平均上调 2~4 倍;而 MMP28 (matrix metalloproteinase 28)、TIMP3 (TIMP metalloproteinase inhibitor 3)则平均表达下降 3~8 倍,提示这些异常表达可能特异性与硬膜侵袭相关。

综上所述,本研究结果初步证实生长激素腺瘤发生、发展是多基因、多因素、多通路的网络调控过程,也说明界定单一的分子异常来清晰阐述生长激素腺瘤的肿瘤机制非常困难^[12]。同时,研究结果还显示与凋亡、代谢相关的基因也参与肿瘤发生、发展,因此对于进一步研发药物促进腺瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞代谢具有广阔的前景。当然,本研究仍有诸多局限,如缺乏功能性人类垂体细胞株培养、可靠的动物模型有限及难以复制垂体腺瘤独特的生物学行为等存在^[13],且各亚类腺瘤、正常垂体的遗传谱也会由于人种不一发生巨大变化^[14-15],后续研究仍需要进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] Zhan X, Desiderio D M. Heterogeneity analysis of the human

pituitary proteome[J]. *Clin Chem*, 2003, 49:1740-1751.

- [2] Zhan X, Desiderio D M. Comparative proteomics analysis of human pituitary adenomas: current status and future perspectives [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24:783-813.
- [3] Qian X, Scheithauer B W, Kovacs K, Lloyd R V. DNA microarrays: recent developments and applications to the study of pituitary tissues[J]. *Endocrine*, 2005, 28:49-56.
- [4] 干小强, 卢亦成, 丁学华. 生物芯片在垂体腺瘤分子机制研究中的应用[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2007, 12:91-93.
- [5] Levy A, Lightman S L. Growth hormone-releasing hormone transcripts in human pituitary adenomas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74:1474-1476.
- [6] Thapar K, Kovacs K, Stefanescu L, Scheithauer B, Killinger D W, Lloyd R V, et al. Overexpression of the growth-hormone-releasing hormone gene in acromegaly-associated pituitary tumors. An event associated with neoplastic progression and aggressive behavior[J]. *Am J Pathol*, 1997, 151:769-784.
- [7] Schneider H J, Sievers C, Saller B, Wittchen H U, Stalla G K. High prevalence of biochemical acromegaly in primary care patients with elevated IGF-1 levels[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 69:432-435.
- [8] Chanson P, Salenave S. Acromegaly[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2008, 3:17.
- [9] Wakabayashi I, Inokuchi K, Hasegawa O, Sugihara H, Minami S. Expression of growth hormone (GH)-releasing factor gene in GH-producing pituitary adenoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74:357-361.
- [10] Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas[J]. *Nature*, 1987, 330:566-568.
- [11] Asa S L, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors[J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4:97-126.
- [12] Selman W R, Laws E R Jr, Scheithauer B W, Carpenter S M. The occurrence of dural invasion in pituitary adenomas[J]. *J Neurosurg*, 1986, 64:402-407.
- [13] Ironside J W. Best Practice No 172: pituitary gland pathology [J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56:561-568.
- [14] Levy A, Lightman S. Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2003, 24: 94-127.
- [15] Heaney A P, Melmed S. Molecular targets in pituitary tumours [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4:285-295.

[本文编辑] 贾泽军