

者出现电解质紊乱低钾血症。我们的调查显示晕船患者严重呕吐可引起电解质丢失,出现血清钾、钠、钙、氯化物下降,进而出现疲乏无力等症状,且低钠可进一步降低呕吐阈,可引起更严重的呕吐反应,并形成恶性循环。不仅如此呕吐引起的电解质紊乱还会对心脏产生影响<sup>[4]</sup>,已经证实呕吐、迷走神经兴奋可使心率变异的幅度增大<sup>[5,6]</sup>,患者会出现显著的心动过缓,短暂窦性停搏。故应该注意晕动病的并发症,及时纠正电解质紊乱。本研究予加服晕得安后,可明显补充晕船呕吐引起的电解质丢失,同时避免形成呕吐恶性循环,从而达到保护体能的自的。

以往重症晕船患者发生呕吐时采取的主要对策,是由随船的卫生员用开水临时冲泡补液盐,既不方便,口感也不佳。因此,我们在补液盐的基础上研制配备了晕得安口服液,以饮料的形式提供药品。经过临床试验其效果很好,服用方便,又能使晕船患者的电解质紊乱得到纠正,试验组中虽然仍有受试者出现电解质下降,但与对照组相比明显减少,低钾血症患者消失,电解质紊乱的发生率下降,而且服用方便、口感好。

综上,本研究表明,重症晕船患者血清电解质可发生明显改变,晕得安口服液能减轻血清电解质的变化。

[参考文献]

[1] 侯建萍,黄明方,于西全,等. 防晕船口服液和抗晕船口服液预防晕船的临床观察[J]. 解放军医学杂志,2005,30:438-440.

[2] 侯建萍,盖晓波. 航海晕动病发病机制的探讨[J]. 海军医学杂志,2005,26:371-373.

[3] 胡国昌,沈幼贞. 恶心和呕吐的生理学[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册,1995,16:154-158.

[4] 侯建萍,盖晓波,宋青杨,等. 防晕口服液对晕船患者心率变异性的影响[J]. 解放军医学杂志,2006,31:489-490.

[5] Fleisher LA, Frank SM, Sessler DI, et al. Thermoregulation and heart rate variability[J]. Clin Sci(Lond), 1996,90:97-103.

[6] 陶月玉,张道斌,罗伟,等. 心率变异性与晕动病关系的研究[J]. 中华航海医学与高压医学杂志,2004,11:158-160.

[收稿日期] 2006-08-25

[修回日期] 2006-10-30

[本文编辑] 孙岩

· 短篇论著 ·

## 应用基因芯片技术筛选前列腺癌转移相关基因

### cDNA microarray in screening of metastasis-associated genes of prostate cancer

贺松琴<sup>1</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 谭晓洁<sup>1</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 陈北川<sup>1</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室,上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院泌尿外科,上海 200433)

[摘要] 目的:筛选前列腺癌转移相关基因,为研究前列腺癌的转移分子标志奠定基础。方法:将DU145细胞接种于裸鼠前列腺腹叶,5周后分别从原发灶和肺转移灶分离肿瘤细胞,利用cDNA芯片技术检测2种细胞中差异表达基因。结果:成功建立了前列腺癌细胞系原位移植自发转移裸鼠模型,经多轮筛选获得了前列腺癌原位及肺转移细胞。通过基因芯片筛选获得284条差异表达基因,基因功能涉及细胞信号转导、细胞周期、细胞凋亡、转录、黏附和代谢等。结论:基因芯片高通量筛选提示200余条基因中的某些基因可能与人前列腺癌转移有关。本研究为前列腺癌转移分子机制提供参考。

[关键词] 前列腺肿瘤;肿瘤转移;相关基因;cDNA芯片

[中图分类号] R 737.25 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)11-1273-03

前列腺癌在许多西方国家是男性最常见的恶性肿瘤之一,随着我国男性人群平均寿命的延长、动物类食品消耗量增加和生活水平的提高,前列腺癌发病率明显上升<sup>[1,2]</sup>。肿瘤转移是手术失败和导致患者死亡的主要原因,因此研究肿瘤转移机制、寻找转移相关的基因成为目前肿瘤研究的主要任务。目前广泛应用前列腺特异抗原(PSA)作为诊断指标,但缺乏转移标志物。我们将前列腺癌细胞原位接种裸鼠,建立了前列腺癌自发转移动物模型,然后分别从原发灶及肺转移灶分离肿瘤细胞,利用基因芯片技术筛选前列腺癌转移相关基因,并对基因功能进行分析,为前列腺癌的预防和治疗提供有益的指导。

### 1 材料和方法

1.1 材料 人前列腺癌细胞DU145(中国科学院上海细胞研究所)。BALB/c裸小鼠购自中国科学院上海实验动物中

心,雄性,4周龄,SPF级环境饲养。

1.2 前列腺癌转移动物模型的建立 参照文献<sup>[3]</sup>,在5只裸鼠的前列腺腹叶包膜下缓慢注入20~40 μl浓度为10<sup>7</sup>/ml的DU145细胞,棉球压住注射口,拔出针头,棉球轻擦针刺部位,明确无出血、无细胞溢出后,缝合腹膜及皮肤。自接种日起5周后,颈椎脱臼法处死裸鼠,取前列腺原发灶肿瘤、可疑淋巴结及转移灶进行病理学检查及体外培养。

1.3 前列腺癌细胞的体外培养和再移植 采用常规体外培养的方法,分别对获取的原发灶及转移灶前列腺癌组织进行植块法原代培养。转移性前列腺癌细胞扩增后再接种裸鼠

[基金项目] 教育部回国人员启动基金(教外留司[2003]406)。Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry([2003]406)。

[作者简介] 贺松琴,硕士生。

\*Corresponding author. E-mail:gcao@smmu.edu.cn

前列腺,方法同1.2。如此筛选3次后,肺转移性前列腺癌和原位生长的前列腺癌再经过2~3代培养,一部分冻存,其余均用于基因芯片检测。

1.4 芯片制备 人cDNA表达谱芯片上排列有13 824个基因点,并设有10个阳性对照和6个阴性对照(商品号:SBC-R-HC-100-20,上海生物芯片有限公司)。

1.5 总RNA提取 应用TRIzol(Invitrogen公司)提取细胞总RNA,并用RNeasy mini kit(Qiagen公司)过柱纯化,1%琼脂糖凝胶电泳监控RNA质量。

1.6 探针标记 取样品总RNA 50 μg,加随机引物3 μg及Superscript 酶逆转录合成cDNA,合成过程中加入荧光标记的dCTP,用QIAquick Nucleotide Removal Kit(Qiagen公司)纯化荧光探针,并用酶标仪进行定量。

1.7 芯片杂交和洗涤 各取30 pmol荧光标记的探针,溶解于9 μl水中,94℃变性3 min,加入Human Cot-1 DNA(Bioasia公司)1~2 μg,70℃保温45 min,加入10 μl 4×杂交缓冲液(Amersham)和20 μl甲酰胺,取杂交液滴加于芯片上,盖上盖玻片,放入加有PBS的杂交盒,置42℃杂交箱中避光杂交16~18 h。取出芯片,浸入经过55℃预热的洗液(1×SSC/0.2% SDS)中,洗涤10 min;浸入55℃预热的洗液(0.1×SSC/0.2% SDS)中,洗涤10 min,重复2次;浸入室温洗液(0.1×SSC)洗涤5 min,重复2次;去离子水中室温洗涤2 min;迅速转入50 ml空离心管中,1 500 r/min离心5 min,晾干后扫描。

1.8 检测与分析 用Agilent扫描仪扫描基因芯片,用Split-tiff软件将所得到的两种荧光的复合图分割成单色荧光图像,再用图像分析软件Imagene分析芯片上每个点cy3和cy5荧光信号的强度和比值,并用LOWESS方法归一化,以差异为2倍(即Ratio 0.5或2.0)的标准来确定差异表达基因<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

2.1 前列腺癌转移动物模型建立 裸鼠于接种5周后下腹部可触及0.5 cm×0.5 cm×1 cm大小的硬块,解剖发现前列腺部位有一占位性肿块,与输精管黏连,小鼠有明显的尿潴留(图1A)。几乎所有的小鼠都有明显的肠系膜淋巴结转移,个别小鼠伴肝门淋巴结转移、腹腔沟淋巴结转移、肺转移(图1B)及弥漫性肝转移。组织学检查前列腺癌原发灶组织为低分化的肿瘤细胞排列紊乱已几乎完全取代了正常前列腺组织,仅可见几个残存的正常前列腺腺腔结构;检查转移灶组织发现有许多肿瘤细胞浸润,而且细胞形态与前列腺内的肿瘤细胞形态基本一致,表明业已发生了淋巴及远处转移。经过3次筛选,我们从前列腺原发部位及肺转移肿瘤组织中分别成功分离获得了肿瘤细胞DU145-P和DU145-LM。

2.2 总RNA提取 所抽提DU145-P和DU145-LM细胞的总RNA过柱纯化后紫外分光光度计定量,检测D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub>分别为2.01和2.02,经琼脂糖凝胶电泳后可以清晰地看到18S和28S两条条带,且28S:18S=2,说明总RNA质量好。

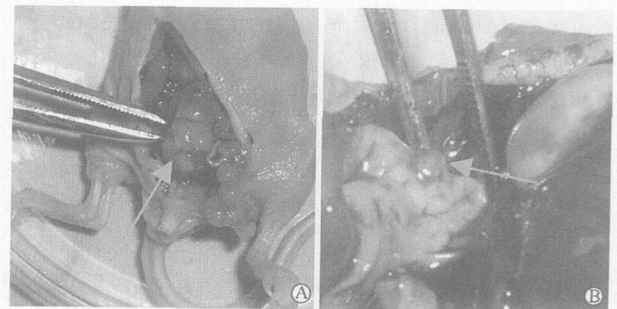


图1 前列腺原位成瘤伴尿潴留(A)和前列腺癌肺转移(B)  
A: 箭头所指为原位瘤; B: 箭头所示为肺转移肿块

2.3 芯片杂交结果 Cy3标记前列腺癌转移灶,Cy5标记前列腺癌原发灶。以前列腺原发灶作为对照,红光区域表示转移灶中某些基因表达上调,绿光区域表示转移灶中某些基因表达下调,黄光区域表示转移灶原发灶无差异表达。杂交后扫描阳性对照点信号强,阴性对照点信号弱或无,图像信号清晰,背景信噪低。证实该实验可靠。分别以2个样品的荧光信号强度值为X轴和Y轴坐标制作散点图,图中每一数据点代表芯片上1个基因点的杂交信号,没有差异表达的基因分布在持家基因均衡后的斜线周围,远离斜线的为差异表达(上调或下调)基因及阳性对照(图2)。

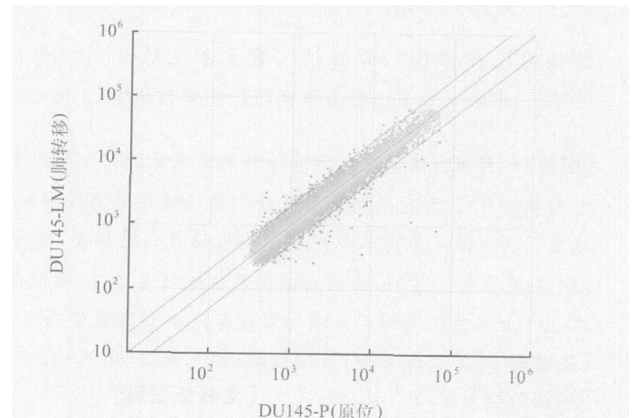


图2 基因表达谱散点图

2.4 差异基因分析 通过cDNA芯片筛选出与转移相关的基因共分11类,包括抗氧化剂活性相关基因、细胞凋亡相关基因、细胞黏连相关基因、细胞代谢相关基因、细胞周期相关基因、细胞运动相关基因、细胞信号转导相关基因、细胞骨架相关基因等(表1)。2倍以上(Ratio 0.5或2.0)差异基因共284个,在DU145-LM中上调基因162个(57.0%),下调基因122个(43.0%);3倍以上差异基因共56个,在DU145-LM中上调基因22个(39.3%),下调基因34个(60.7%);6倍以上差异基因共15个,在DU145-LM中上调基因6个(40.0%),下调基因9个(60.0%)。

## 3 讨论

肿瘤转移是一个复杂的过程,它的发生、发展是一系列相关基因共同作用的结果。本实验从cDNA芯片中检出的

表 1 差异表达基因的功能分类

基因功能	上调 基因数	下调 基因数	差异表达 基因数
抗氧化物活性	0	2	2
细胞凋亡	25	26	51
细胞黏连	42	43	85
代谢	27	31	58
细胞周期	10	6	16
酶调节活性	4	3	7
肌动蛋白活性	1	0	1
信号转导	13	11	24
细胞结构	3	3	6
转录调节	6	7	13
翻译和转运	7	9	16
其他	86	45	131

差异表达基因通过 GO (gene ontology) 数据库,将基因按参与“生物学过程”、“细胞中组分”、“实现”分子功能”进行分类。结果表明,前列腺癌的转移也是一个多基因、多阶段过程,它涉及了信号转导、细胞周期、细胞凋亡、转录、黏附和代谢等。下面对部分差异基因进行讨论。

3.1 脂氧合酶 (LOX) 它将花生四烯酸、亚油酸及其他不饱和脂肪酸转变为具有生物活性的代谢产物,从而影响细胞信号转导、结构及代谢。在花生四烯酸途径中,某些 LOXs 形成的不同代谢产物可促进肿瘤的形成,这些 LOX 同工酶及其代谢产物包括 5-LOX 及其产物 5-HETE 和 LTB<sub>4</sub>、8-LOX 及 8-HETE、12-LOX 及 12-HETE。12-HETE 很大程度上促进了前列腺癌侵袭与转移事件的发生,可能的机制包括上调细胞黏附分子,增加肿瘤细胞与基质蛋白纤维结合素及微血管内皮细胞的黏附,通过调节 PKC- $\alpha$  而在肿瘤生长和播散时促进细胞迁徙<sup>[4]</sup>。本研究中 LOX 基因在 DU145-LM 中明显上调,提示其可能在前列腺癌转移过程中起促进作用。

3.2 核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 广泛存在于真核细胞,是多功能的核转录因子,被激活后参与调控多种细胞因子、黏附因子及酶的表达,在炎症、肿瘤等疾病的发生、发展中起重要作用。研究发现,多种恶性肿瘤包括白血病、淋巴瘤和多数实体肿瘤都有 NF- $\kappa$ B 的激活;NF- $\kappa$ B 可能通过调控与细胞生长增殖、抗凋亡、血管生成和转移的相关基因表达,促进恶性肿瘤的发展。NF- $\kappa$ B 作为转录调节因子在前列腺癌转移过程中起关键性作用<sup>[5,6]</sup>。本研究中 NF- $\kappa$ B 基因在 DU145-LM 中明显上调,提示它可能与前列腺癌的转移有关。

3.3 癌胚抗原相关细胞黏附分子 (CEACAM) 属于癌胚抗原基因家族,是一类免疫球蛋白超家族黏附分子。与肿瘤发生关系密切的是 CEACAM1、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7 等 4 种糖蛋白。较多的研究认为 CEACAM1 除了细胞黏附功能,还被认为有肿瘤抑制作用。在膀胱癌、结肠癌、肝细胞肿瘤、前列腺癌、子宫内膜癌中均能检测到 CEACAM1 表达下调或缺失,CEACAM1 表达下调或缺失被认为涉及这些肿瘤的发生。但亦有学者提出了相反观点,发现正常肺组织不表达 CEACAM1,但肺癌,特别是肺腺癌 CEACAM1 表达明显升高,提示 CEACAM1 表达升高是一

不利的预后指标,它可能与促进肿瘤细胞生长有关。CEACAM7 的下调或缺失也被认为是肿瘤发生的早期事件。CEACAM5 的生物学功能尚不很清楚,它在正常组织细胞表面的表达可以作为黏附分子,介导同质和异质性黏附,其黏附功能可能与肿瘤的转移能力有关<sup>[7]</sup>。CEACAM6 被认为可使肿瘤细胞避免失巢凋亡<sup>[8]</sup>。本实验中 CEACAM6、CEACAM1 基因在 DU145-LM 中明显下调,提示其可能抑制前列腺癌转移,具体机制有待于进一步研究。

3.4 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 它是一种重要的抗氧化酶,实验证实抗氧化剂对多种肿瘤的生长有抑制作用,对肿瘤细胞凋亡则有促进作用。其机制一方面可能是抗氧化剂封闭自由基在肿瘤细胞增殖中的信号转导;另一方面是它们通过提高非特异免疫增加了 NO 的释放,因此直接抑制肿瘤细胞的增殖。GPx 至少存在 5 种异构体,其中 GPx1 被认为是清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主要酶,保护细胞免受氧化损伤,提高肿瘤细胞中 GPx1 活性能抑制由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的凋亡。在转染了 GPx cDNA 的人类乳腺癌细胞 (MCF-7) 中,GPx 活性与脂质过氧化物的清除呈明显的负性线性相关<sup>[9]</sup>。因此,较多的学者认为 GPx 是一种肿瘤抑制基因,而本实验中发现 GPx 在肺转移细胞中下调,亦提示其可能在抑制肿瘤转移中发挥作用,其作用机制有待于进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] 刘恩菊,项永兵,金凡,等.上海市区恶性肿瘤发病趋势分析(1972~1999年)[J].肿瘤,2004,24:11-15.
- [2] 孙颖浩.我国前列腺癌的研究现状[J].中华泌尿外科杂志,2004,25:77-79.
- [3] Lensch R,Gotz C,Andres C,et al. Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice[J]. Int J Oncol, 2002, 21: 695-706.
- [4] Nie D, Nemeth J, Qiao Y, et al. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20: 657-663.
- [5] Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, et al. NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (415 Suppl): S75- S85.
- [6] Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon[J]? J Cell Biochem, 2004, 91: 100-117.
- [7] Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells[J]. Clin Exp Metastasis, 1998, 16: 703-712.
- [8] Duxbury MS, Ito H, Benoit E, et al. Overexpression of CEACAM6 promotes insulin-like growth factor F-induced pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness [J]. Oncogene, 2004, 23: 5834-5842.
- [9] Wang HP, Qian SY, Schafer FQ, et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30: 825-835.

[收稿日期] 2006-05-25

[修回日期] 2006-10-18

[本文编辑] 尹茶