

利用基因芯片技术研究人胰腺癌相关基因

金 钢^{1*}, 胡先贵¹, 应 康², 唐 岩¹, 刘 瑞¹, 张怡杰¹, 景在平¹, 谢 毅², 毛裕民²

(1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433; 2. 复旦大学生命科学院, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察人胰腺癌基因表达谱的变化,研究胰腺癌发生、发展过程中的相关基因,并探讨基因表达谱芯片技术在筛查肿瘤相关基因中的应用价值。**方法:**应用含有4 096条人类全长基因的cDNA表达谱芯片,对9例临床切除的胰头导管腺癌标本组织抽提及纯化的mRNA进行芯片杂交,并对基因表达谱进行分析研究。**结果:**按差异显著阳性标准,从4 096个基因中筛选出在胰腺癌组织中共同差异表达基因184条,其中87条表达上调,97条表达下调,包括原癌及抑癌基因、细胞周期、信号转导、细胞外基质、细胞骨架和运动蛋白、转录因子、DNA损伤修复基因、凋亡相关蛋白以及核糖体蛋白等相关编码基因。其中有11条为尚未在GenBank登录的人类新基因。**结论:**运用cDNA表达谱芯片分析基因表达谱,能够快速筛查出新的肿瘤相关基因,并高效率地对基因功能进行研究。

[关键词] 基因芯片; 基因; 胰腺癌

[中图分类号] R 735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)01-0080-04

cDNA microarray in analysis of pancreatic cancer-related genes

JIN Gang^{1*}, HU Xian-Gui¹, YING Kang², TANG Yan¹, LIU Rui¹, ZHANG Yi-Jie¹, JING Zai-Ping¹, XIE Yi², MAO Yu-Min²

(1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the pathogenesis of pancreatic cancer and the role of DNA microarray in expediting our understanding of the molecular pathophysiology of pancreatic cancer, and to identify the novel cancer associated genes. **Methods:** Nine histologically defined head pancreatic adenocarcinoma specimens were screened with cDNA microarray including 4 096 human genes. **Results:** Using this methodology, 184 genes, whose ratios of Cy5/Cy3 were higher than 2.0 or lower than 0.5, were screened out after 9 couples of hybridizations. In the cancerous tissue 87 of them had higher expression and 97 lower expression, including 11 novel human genes oncogenes and tumor suppression genes, cell-cycle-related genes, signal-transduction-related genes, extracellular matrix and skeleton-related genes, transcription factors, DNA damage and repair-related genes, apoptosis-related genes, and ribosomal protein-related genes. **Conclusion:** cDNA microarray is a powerful strategy to identify novel cancer-associated genes, and it can help to rapidly explore the roles of the novel genes in clinical pancreatic cancer.

[KEY WORDS] microarray; gene; pancreatic cancer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 80-83]

胰腺癌严重危害人民生命健康,其恶性程度高、治疗效果及预后较差,对其发生、发展的分子生物学机制的研究正成为这一领域的热点^[1]。筛选在胰腺癌发病过程中起关键性调控作用的基因,将对于胰腺癌的早期诊断和有效的基因治疗具有重要意义。本研究应用含有4 096条人类全长基因的cDNA表达谱芯片,对9例胰头导管腺癌及正常胰腺标本进行胰腺癌相关基因筛查,探索胰腺癌基因表达谱变化及其生物学特性的内在联系与规律,为研究胰腺癌的基因治疗提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料 9例胰头导管腺癌组织取自长海医院普通外科1999年11月至2000年5月手术切

除标本,均经病理证实。其中男5例,女4例,年龄51~71岁,平均57.9岁。临床分期(日本胰腺癌规约外科分期,1993年9月修订):I期2例,II期2例,III期4例,IV期1例。正常胰腺组织取自1例交通意外死亡成年男子。所有标本快速液氮冻存。

1.2 芯片及探针制备 cDNA芯片所用的4 096个靶基因cDNA克隆由博道公司和合作伙伴提供。用改进的一步法^[2]抽提胰腺癌及正常胰腺组织总RNA。紫外分析及电泳检测显示获得高质量的总RNA。采用Oligotex mRNA Midi Kit(Quagen公

[基金项目] 国家自然科学基金(30000160)。

[作者简介] 金 钢(1971-),男(汉族),博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: jingang@sh163.net

司)分离纯化 mRNA。每一份探针取 4 μ g mRNA, 参照 Schena 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。在第 1 链合成中掺入荧光标记 dUTP, 用 Cy3 dUTP 标记正常组织 mRNA, 用 Cy5 dUTP 标记胰腺癌组织 mRNA。

1.3 RNA 质量鉴定 测定总 RNA 的 D_{260} 、 D_{280} 。总 RNA 热稳定实验:取 2 支 0.5 ml Eppendorf 管分别加入 RNA 400 ng, 分别在 70 C、20 C 各处理 1 h, 同时进行 1.5% 琼脂糖电泳。

1.4 芯片杂交 基因芯片和杂交探针分别置于 95 C 水浴中变性 5 min, 立即将探针加在基因芯片上, 盖玻片封片, 置于密封舱内 60 C 杂交 15~17 h, 用 SSC 和 SDS 溶液洗涤 10 min, 室温晾干。

1.5 检测与分析 采用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片, 用 ImageGene 3.0 软件 (BioDiscovery Inc., USA) 处理得到的图像文件, 分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值 (Ratio 值)。用 40 个管家基因进行 Cy3 和 Cy5 的均衡和修正。每对组织探针杂交重复 2 次。基因差异表达的标准: (1) Cy3 和 Cy5 信号比值 >2 或 <0.5 ; (2) Cy3 或 Cy5 信号值均必须大于 600。筛选出的差异表达基因被认为胰腺癌相关基因的候选基因。

1.6 质量监控 设定了几组阴性对照基因: 水稻 U2 RNA 基因 (8 个点)、HCV 外壳蛋白基因 (8 个点)、空白点样液 (116 个点), 以证实芯片杂交数据的可靠性。同时将正常胰腺组织的 mRNA 分别用 Cy3 dUTP 及 Cy5 dUTP 进行标记和杂交, 并重复 2 次。

2 结果

2.1 RNA 及芯片质量监控结果 总 RNA $D_{260}/D_{280} > 1.9$, 18 s 和 28 s 电泳条带清晰, 热稳定试验显示 70 C 1 h 与 20 C 1 h 电泳 28 s 条带无明显降解。mRNA 主要集中于相对分子质量为 900~4 000 的连续条带。芯片所设置阴性对照位点荧光信号低, 符合设计条件。将每块芯片杂交 Cy3/Cy5 值的 lg 值与克隆点的位置的相互关系进行分析, 各相邻克隆点之间的信号值无明显的相关性, 说明每块芯片的杂交质量稳定, 无明显区域性误差发生。

2.2 芯片杂交结果 图 1 为基因表达谱的散点图, 图中的点大部分集中在比值为 1 的斜线周围, 有一部分远离直线, 而且偏离斜线的点中位于下方的偏多。9 例胰腺癌进行芯片杂交, 筛选出明显差异表达基因 184 条, 其中表达上调 87 条 (占 47.3%), 表达下调 97 条 (占 52.7%)。在表达上调的基因中包括原癌基因、细胞周期相关基因、信号转导相关基因、

细胞外基质蛋白、细胞骨架和运动蛋白、细胞表面抗原和转录因子等, 在表达下调的基因中包括抑癌基因、DNA 损伤、修复相关基因、凋亡相关蛋白、细胞周期相关蛋白、基底膜成份蛋白、黏附分子、核糖体蛋白、鸟嘌呤核苷酸交换因子、信号转导相关基因和转录因子等 (表 1、2)。此外还检测到与胰腺癌相关的 11 条全长人类新基因, 尚未在 GenBank 登录。本实验挑取其中 1 条基因进行了 RT-PCR 及 Northern 杂交, 证实其芯片实验数据是可靠的, 我们将其命名为 S100P 基因, 已被收入 GenBank 数据库 (ID AF539739)^[3]。

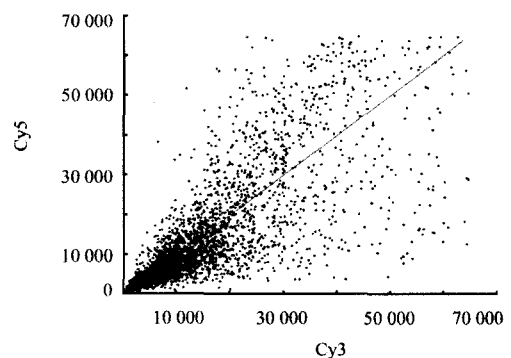


图 1 胰腺癌基因表达谱的散点图
Fig 1 Scatter plot of gene expression pattern in pancreatic cancer tissue

3 讨论

从本实验结果分析, 胰腺癌组织表达上调基因主要分布在 1p、1q、2q、7q、9q、12p、12q、14q、15q、21q 等染色体, 而下调基因主要分布在 1p、1q、2p、2q、3p、3q、7q、8q、15q、17q、19q、22q 等, 与以往的研究结果^[4]基本相似。说明胰腺癌相关基因变化呈一定的染色体分布规律。

在上调的 2 条原癌基因中, Rab22b 和 Rho GDP 解离抑制因子 (Rho GDI) 都属于 Ras 原癌基因超家族成员, 其平均 Ratio 值分别高达 3.53 和 4.504。胰腺癌中 Kras 基因突变发生率非常高, 可高达 80%^[5]。Ras 基因的功能异常对 Ras 依赖性生长调节通路中的其他基因都有影响, 因而 RAB22B 在胰腺癌中的高表达可能与 Kras 基因突变有关。Ras 蛋白具有与 GTP 和 GDP 结合的特性。GEF 使 Ras 蛋白从无活性的 GDP 结合状态转化为有活性的 GTP 结合状态, 而 Rho GDI 则降低 GDP 从 Ras 样 GTP 酶解离的速率, 抑制 Ras 功能状态的转化, 其作用结果相反^[6]。而在本实验中, Rho GDI 表达明显上调, 但有 3 种鸟嘌呤核苷酸交换因子, 即人染色体浓缩蛋白 1 样蛋白 (CHC1L)、人真核翻译延长因

表 1 胰腺癌组织表达上调的部分基因

Tab 1 Part of upregulated genes in pancreatic cancer

Category	Genbank ID	Description	Symbol	Gene map locus	Average ratio
Oncogene	AF183421	Rab22b, RAS oncogene family	Rab22b	18p11.3	3.530
Cell cycle	NM_001175	Rho GDP dissociation inhibitor	Rho GDI	12p12.3	4.504
	NM_001788	Cell division cycle 10	CDC10	7p14.3-14.1	3.219
Signal transduction	NM_001798	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	12q13	2.853
	NM_002592	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	20pter-p12	3.388
	NM_002835	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	7q11.23	4.236
	NM_007039	Protein tyrosine phosphatase D1	PTPD1	14q31.3	2.65
	NM_004721	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	MAPK13	3q25-29	2.361
	NM_000876	Insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	6q26	2.192
	NM_000700	Annexin I	ANXA1	9q12-21.2	4.092
Extracellular matrix	NM_002345	Lumican	LUM	12q21.3-22	9.892
	NM_000089	Alpha 2 type I collagen	COL1A2	7q22.1	11.638
	NM_000090	Alpha 1 type III collagen	COL3A1	2q31	18.165
	M26576	Alpha 1 type IV collagen preproprotein	COL4A1	13q34	4.171
	NM_000393	Alpha 2 type V collagen preproprotein	COL5A2	2q14-32	3.677
	NM_001920	Decorin	DCN	12q13.2	3.633
	NM_000582	Secreted phosphoprotein 1	SPP1	4q21-25	5.033
	NM_004385	Chondroitin sulfate proteoglycan 2	CSPG2	5q14.3	6.073
	NM_003380	Vimentin	VIM	10p13	2.543
	NM_033138	Caldesmon 1	CALD1	7q33	5.097
	NM_002026	Fibronectin 1	FN1	2q34	18.298
	NM_003254	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	TIMP1	Xp11.3	13.791
	Cytoskeleton & motility	NM_001613	Alpha 2 actin	ACTa2	10q23.3
NM_006009		tubulin, alpha 3	TUBA3	12q12-14.3	2.647
NM_005717		Actin-related protein complex subunit 5	ARPC5	1q25.1	2.221
NM_000366		Tropomyosin 1	TPM1	15q22.1	2.113
Cell surface antigen	NM_002659	Plasminogen activator, urokinase receptor	Upar	19q13	6.073
	NM_001769	CD9 antigen	CD9	12p13	2.614
Enzyme	NM_000396	Cathepsin K preproprotein	CTSK	1q21	2.809
	NM_002654	Pyruvate kinase, muscle	PKM2	15q22	3.186
Transcription factor	NM_007315	Signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	2q32.2-32.3	2.945
	BC007874	Fructose bisphosphatase 3	FBP3	9q34.2	2.35
	NM_001530	Hypoxia-inducible factor 1, alpha	HIF1 α	14q21-24	2.796
	NM_006940	SRY-box 5 isoform A	SOX5	12p12.1	2.671
	AF332192	Regulatory factor X, 4	RFX4	12q	2.094

子 1delta (EEF1D) 和人真核翻译延长因子 1beta2 (EEF1B2) 均在下调基因中出现, 说明了 Ras 蛋白的 GDP 结合状态与胰腺癌发病有关。von Hippel Lindau 综合征基因 (VHL) 具有抑癌基因的功能, 尚无与胰腺癌相关的文献报道, 但在本实验中表达下调, 提示其可能与胰腺癌发病相关。

在胰腺癌表达谱差异基因中, 涉及范围最广的是信号转导相关基因, 如蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPN12)、蛋白酪氨酸磷酸酶 D1 (PTPD1)、人有丝分裂激活蛋白激酶 13 (MAPK13)、人胰岛素样生长因子 2 受体 (IGF2R)、膜联蛋白 1 (ANXA1) 等都呈现高表达。同时, 胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (IGFBP1)、胰岛素样生长因子结合蛋白 9 (IGFBP9)、肝素结合生长因子 (PTN)、人 G 蛋白信号 16 调节子 (BAF53a)、TATA 盒结合蛋白相关因子 (TAF2K)、BRG1 相关因子 (BAF53a)、甲状腺受体作用蛋白 15 (SGN2) 等则表达下降。说明胰腺癌

的发生发展可能与生长因子信号转导通路的异常活跃、继而使得生长信号不断传入, 引起细胞增殖失控有关^[7]。组织中蛋白酪氨酸磷酸酶活性的升高被认为与人和动物的糖尿病和肥胖的胰岛素抵抗有关。胰腺癌患者多伴有糖尿病或糖耐量异常, 本实验发现, 胰腺癌组织中 PTPN12 和 PTPD1 基因均显著高表达, 似乎是原因之一。

胰腺癌的恶性程度较高, 治疗效果差, 术后远处转移及复发时间早。从芯片结果分析, 上述这些生物学特性存在着基因表达异常方面的机制。在胰腺癌组织上调基因中, 出现了较其他肿瘤更多的细胞外基质及细胞骨架和运动蛋白编码基因。细胞外基质的降解酶主要为基质金属蛋白酶和胶原酶, 它们的作用底物为胶原蛋白。在芯片结果中, I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL1A2)、III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL3A1)、IV 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL4A1)、V 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL5A2) 基因均明显上调。目前已知 IV 型胶原高表达与各种

表 2 胰腺癌组织中表达下调的部分基因
Tab 2 Part of downregulated genes in pancreatic cancer

Category	Genbank ID	Description	Symbol	Gene map locus	Average ratio
DNA injury and repair	NM_006763	BTG family, member 2	BTG2	1q32	0.141
	NM_014877	Helicase with zinc finger domain	HELZ	17q24.2	0.337
	NM_014140	SWI/SNF-related matrix-associated actin regulator of chromatin a like 1	SMARCAL1	2q34-36	0.397
Tumor suppressor Apoptosis	NM_000551	von Hippel Lindau syndrome gene	VHL	3p25	0.45
	NM_001229	Caspase 9 isoform alpha preproprotein	CASP9	1p36.3-36.1	0.29
Cell-cycle dependent	NM_022173	TIA1 protein isoform 1	TIA1	2p13	0.413
	NM_002923	Regulator of G-protein signalling 2	RGS2	1q31	0.186
	NM_005381	Nucleolin	NCL	2q12	0.411
Adhesive molecule	NM_006341	MAD2 homolog 2	MAD2L2	1p36	0.348
	NM_001078	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	1p32-31	0.363
	NM_000216	Kallmann syndrome 1 protein	KAL	Xp22.32	0.444
Ribosomal protein	NM_005655	TGF- β inducible early growth response	TIEG	8q22.2	0.431
	BC001365	Ribosomal protein L4	RPL4	15q22	0.399
	NM_005617	Ribosomal protein S14	RPS14	5q31-33	0.319
	NM_000969	Ribosomal protein L5	RPL5	1p21.3	0.375
	NM_033301	Ribosomal protein L8	RPL8	8q24.3	0.398
Guanine Nucleotide exchange factor	NM_002950	Ribophorin 1	RPN1	3q21.3-25.2	0.314
	NM_001268	RCC1-like G exchanging factor	CHC1L	13q14.3	0.363
	NM_001960	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	EEF1D	19p13.13	0.242
Transcription factor	NM_001959	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	EEF1B2	2q33-34	0.305
	NM_014390	EBNA-2 co-activator (100 000)	p100	7q31.3	0.322
	NM_005080	X-box binding protein 1	XBP-1	22q12.1	0.325
	NM_001880	Activating transcription factor 2	ATF2	2q32	0.314
Signal transduction	NM_012082	Transcription factor GATA4	FOG2	8q23	0.348
	NM_004301	BRG1-associated factor	BAF53a	3q27.1	0.250
	NM_004236	Thyroid receptor interacting protein 15	SGN2	15q21.2	0.377
	NM_002825	Pleiotrophin	PTN	7q33-34	0.355
	NM_002928	Regulator of G-protein signalling 16	RGS16	1q25-31	0.422
	NM_005645	TBP-associated factor 13	TAF2K	1p13.1	0.462
	NM_000596	Insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	7p13-12	0.365
NM_002514	IGFBP9	IGFBP9	8q24.1	0.376	

肿瘤的浸润有关,是一种肿瘤转移的标志基因。细胞骨架和运动蛋白的功能是参与细胞迁移和运动,在胰腺癌表达谱中, $\alpha 2$ 肌动蛋白(ACTa2)、微管蛋白(TUBA3)、人原肌球蛋白 1(TPM1)、肌动蛋白相关蛋白(ARPC5)基因等均表达上调,提示了胰腺癌细胞具有较强的迁移和运动能力。此外肿瘤转移相关基因尿激酶型纤溶酶原激活物受体基因(Upar)在胰腺癌中也是显著高表达,平均 Ratio 值达 6.073。这些基因表达谱类型可能决定了胰腺癌高转移性、高侵袭性的生物学特征和较差的预后^[8]。

除了上述已知基因外,本实验还检测到与胰腺癌相关的 11 条新基因,正在进行相关功能实验。

[参考文献]

- [1] Kern SE, Hruban RH, Hidalgo M, et al. An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1(6): 607-613.
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation

by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(2): 156-159.

- [3] Griffin CA, Hruban RH, Moesberger LA, et al. Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(11): 2394-2399.
- [4] Jin G, Wang S, Hu XG, et al. Characterization of the tissue-specific expression of the S100P gene which encodes an EF-hand Ca^{2+} -binding protein [J]. *Mol Biol Rep*, 2003, 30(4): 243-248.
- [5] Mizumoto K, Tanaka M. Genetic diagnosis of pancreatic cancer [J]. *J Hepatobil Pancreat Surg*, 2002, 9(1): 39-44.
- [6] Su LF, Knoblauch R, Garabedian MJ. Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3231-3237.
- [7] Tamura M, Gu J, Tran H, et al. PTEN gene and integrin signaling in cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(21): 1820-1824.
- [8] Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, et al. TGF- β -induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. [J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(2): 204-211.

[收稿日期] 2003-05-10

[修回日期] 2003-11-10

[本文编辑] 曹 静