

# 基因芯片在胃癌基因表达谱中的应用

黄素英(综述)/陈 华(审校)

(福建医科大学公共卫生学院环境卫生教研室 福建 福州 350004)

【摘要】胃癌的产生是一个多因素、多阶段的复杂过程,且涉及大量肿瘤相关基因的结构改变和表达异常。鉴于基因芯片技术快速、准确、高通量检测基因表达谱的优点,现将该技术应用于胃癌发生、发展以及治疗过程中基因表达谱的研究进展作一综述。

【关键词】基因芯片;胃癌;基因;基因表达谱;

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1004-616X(2008)06-0493-03

胃癌在我国发病率较高,居消化道恶性肿瘤的首位。明确其病因与发病机制、寻找早期诊断及有效药物靶点的手段显得尤为重要。目前研究认为,胃癌是一个复杂的多因素、多阶段的过程,涉及大量肿瘤相关基因结构改变与表达异常。基因芯片技术以其快速、准确、高通量地分析数以万计的基因表达谱,发现差异表达基因的优势,显示了其在肿瘤等生物学领域的应用价值,已有不少应用该技术检测胃癌等肿瘤相关基因表达的报道<sup>[1-5]</sup>。现就基因芯片在胃癌分子病理学研究中的进展作一综述。

## 1 基因芯片技术的概述

随着人类基因组计划完成,人类基因组研究的重心逐渐进入后基因组时代,进一步对基因的功能及其多样性进行深入的研究。通过对个体的不同生长发育阶段和不同生理状态下基因表达的平行分析,以及对相应基因功能的研究,为探索疾病的发病机制、诊断治疗、药物开发等方面发挥了重要作用,为推动功能基因组的各项基因组研究计划提供了手段。

基因芯片,又称 DNA 芯片、DNA 微矩阵(DNA microarray)或 DNA 微矩阵芯片,其工作原理是将大量特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针,有序且高密度地(点与点之间的距离一般小于 500 μm)排列固定于玻璃、硅等支持物上,然后将待测样品用荧光染料标记后与芯片杂交,对芯片上的杂交信号采用激光共聚焦荧光检测系统等进行扫描,通过计算机分析系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测,从而迅速获得所要的信息。基因芯片的杂交条件有赖于探针的长度、GC 碱基含量及芯片类型的优化。由于基因芯片获得的信息量大,对于数据的分析、处理、查询、比较等需要一个标准的数据格式。目前,正在构建基因芯片数据库,以利于数据的交流及结果的评估与分析。

## 2 基因芯片技术在胃癌基因表达谱中的应用

2.1 胃癌发生相关基因 胃癌的发生是一个复杂的过程,众多的基因参与其中。有学者利用含 8 464 个基因 cDNA 片段的芯片,筛选出 186 个与癌变相关的基因,其中包括原癌基因和抑癌基因,如 NNX3、N33、MRP-1,以及其它类基因,如免疫相关的 fibronectin、细胞凋亡相关的 CL-20 等。在分析胃癌和正常组织的基因表达谱差异中,筛查出了 10 个与胃癌相关的基因,其中 8 个呈上调并作用于肿瘤发生发展的不同环节,如 KGF 是 FGF 家族成员之一,与肝素结合刺激上皮细胞有丝分裂,其对应的受体 *KGFR-2* 是原癌基因 *bek* 的变异体,几乎所有上皮细胞或上皮细胞源性瘤细胞均见表达<sup>[6]</sup>;Bt2cAMP 反应的蛋白 *DEC1* 是控制软骨、肺和消化道细胞分化蛋白,它在胃癌组织中存在差异表达,提示与胃癌发生有关。其次还有与细胞受体、代谢、信号传导、DNA 合成、转录有关的基因表达改变,表明胃癌发生发展的多因素环节。运用人胃癌相关基因芯片检测 10 例胃癌及相对应正常胃组织标本,结果也显示在 5 个以上病例中均有 2 倍以上改变的基因克隆共有 48 个(8 个在所有病例中均明显差异),其中胃癌组织表达下调基因 39 个、表达上调基因 9 个,并证实人胃癌相关基因芯片具有良好的敏感性、可靠性与可重复性<sup>[7]</sup>。cDNA 芯片技术联合激光显微切割和 T7 噬菌体扩增技术可分析正常胃组织、早期胃癌和转移性癌的基因表达,发现半胱天冬酶 -8、基质金属蛋白酶 -7 和钙粘蛋白等多种基因的表达发生显著变化,这为更精确地研究肿瘤发展和转移提供了信息<sup>[8]</sup>。研究显示癌旁黏膜在基因表达水平上 143 个基因与胃癌表达的基因相同,提示这些基因可能与早期胃癌癌变的启动和演化有关<sup>[9]</sup>,便于胃癌的早期发现与诊断。

幽门螺杆菌(HP)在胃癌的发生过程中起着重要的作用。在胃癌细胞系研究中,利用芯片检测幽门螺杆菌(HP)介导胃癌细胞内信号传递旁路的基因表达变化。与野生型 *Cag*(PAI<sup>+</sup>) 共培养

收稿日期:2008-04-03;修订日期:2008-05-27

基金项目:福建省教育厅资助项目(JB06224)

作者简介:黄素英(1983-),女,福建省莆田人,硕士研究生,E-mail:

hugngsuy1983@qq.com

后, Sepulveda 等<sup>[10]</sup>发现结构基因、代谢基因、转录因子、生长因子受体、癌基因和抑癌基因等均出现显著变化。Maeda 等<sup>[11]</sup>则发现有 8 个基因表达显著上调, 突变株 TN2 CagE 无类似变化, 提示此表达上调具有 Cag(PAI<sup>+</sup>) 依赖性。其中 IL-8 表达显著升高, 达 11.8 倍, 被认为在胃癌演进中可能具有重要意义。Bach 等<sup>[12]</sup>运用该技术检测发现受幽门螺旋杆菌感染的胃细胞株中, 巨噬细胞炎症蛋白-2、c-myc、成骨蛋白-1 表达上调, 黏附素激酶、转录因子 Y-box 结合蛋白-1 表达下调, 这些有助于进一步了解幽门螺旋杆菌感染在胃癌发生中的分子机制。幽门螺旋杆菌 VacA 的基因表达谱的检测, 揭示 VacA<sup>+</sup> BCS 通过影响细胞骨架相关蛋白基因的表达以及直接诱导肿瘤相关启动子基因的表达和抑制肿瘤抑制基因的表达来干扰细胞支架的结构, 从而导致肿瘤产生。同时也改变炎症和应激反应基因的表达, 提示 VacA 是幽门螺旋杆菌致胃癌的重要基因<sup>[13]</sup>。

**2.2 胃癌转移相关基因** 转移是胃癌发展过程的重要环节, 直接影响患者的预后。发现转移相关的基因对于胃癌的预后具有重要意义。用全基因表达谱芯片对来源于胃癌原发灶的 SNU-1 和源自转移腹腔病灶的 SNU-5、SNU-16、SNU-620、KATO-III、G13TKB 细胞系进行大约 21 168 基因分析实验, 共发现 24 个基因上调和 17 个基因下调。上调基因有 CD44(细胞粘附), keratins 7, 8, 14(上皮标记), 醛基脱氢酶(药物代谢), CD9 和 IP3 受体(信号传导); 下调基因有 IL-2 受体、IL-4Star(免疫应答)、p27(细胞周期)和整合素 b4 等<sup>[14]</sup>。对研究胃癌腹膜播散和肿瘤转移规律有一定参考价值。Hasegawa 等<sup>[15]</sup>针对肠型胃癌进行癌细胞基因表达谱研究, 23 040 个已知基因的 cDNA 微阵列分析发现肠型胃癌组织中 61 个基因表达上调, 63 个下调, 并鉴定出 12 个基因的表达改变与胃癌转移相关。运用低密度 cDNA 微阵列技术分析胃癌转移相关基因, 通过 18 例胃癌黏膜及邻近的正常胃黏膜比较得出与肿瘤转移和侵袭密切相关的基因有 MMP-7、SIOO4A、类肝素酶、hTERT、KAI1、CDH1 和 nm23H1<sup>[16]</sup>。细胞黏附分子的作用是促进异源细胞间的相互黏附, 其异常表达与肿瘤发生和转移密切相关。徐斌等<sup>[17]</sup>对细胞黏附分子与胃癌发生及转移关系实验研究结果显示, 胃癌发生和转移可能与胃组织中黏附分子 NCAM、ICAM、VCAM 基因表达升高有关。在运用 cDNA 微阵列技术比较胃腺癌细胞株 RF-1 和转移灶癌细胞 RF-48 的基因表达谱差异中, 发现在 RF-48 细胞株中 81 个基因表达上调, 56 个基因表达下调, 进一步研究这些基因与肿瘤转移的关系, 有助于在了解胃腺癌发生转移的分子机制的同时发现新的治疗靶点<sup>[18]</sup>。有研究指出, cDNA 微阵列技术可以作为一种有效的胃癌预后指标, 但同时存在一些问题, 例如标本的制备有待于解决<sup>[19]</sup>。另外, 联合激光显微解剖法可用于检测肿瘤转移或组织学亚型相关的基因。有报道利用 cDNA 微阵列芯片技术研究甲基抑制剂 5-乙酰唑胺-2'-脱氧胞苷酸作用后, 转移的胃癌细胞中基因表达谱变化, 揭示肿瘤相关基因启动子的超甲基化对于肿瘤的转移起着重要作用<sup>[20]</sup>。而在很大程度上, 胃癌的形成是染色体水平的基因改变的积累结果。Weiss 等<sup>[21]</sup>采用全基因系列的 CGH 芯片, 确定基因组染色体的异常拷贝数。通过检查胃癌的染色体拷贝数异常, 对预测淋巴结状况和生存率, 具有指导性意义。

**2.3 胃癌细胞周期相关基因** 肿瘤过度增殖可能与参与

细胞周期调控基因失常有关。DNA 合成前期(G<sub>1</sub>期)至 DNA 合成期(S 期)是细胞周期的关键转换点。应用细胞同步化及基因芯片技术检测胃癌细胞株在 G<sub>1</sub> 期至 S 期转换中基因表达, 有助于阐明胃癌细胞增殖机制及选择治疗靶点。兰斌等<sup>[22]</sup>应用胸腺嘧啶核苷(thymidine)- 诺考达唑(nocodazole)及双胸腺嘧啶核苷(double thymidine)法分别阻断胃癌细胞株(MKN45)于 DNA 合成后期/有丝分裂期(G<sub>2</sub>/M)及 G<sub>1</sub>/S 交接点释放后收集标本, 应用 cDNA 微阵列基因芯片检测细胞周期中 G<sub>1</sub> 早期、G<sub>1</sub> 末期、S 早期及 S 晚期的基因表达谱, 通过专业软件进行聚类分析。结果检测到 147 个基因在 G<sub>1</sub> 末期出现上调, 其功能涉及 DNA 代谢、转录与翻译、翻译后修饰、泛素化、信号转导等, 这些基因在不同环节上影响细胞周期。可见多基因参与胃癌细胞周期 G<sub>1</sub> 期至 S 期的转换, 且为其转换所必需, 部分参与以上过程的基因与胃癌过度增殖有关。

**2.4 基因多态性与胃癌易感性** 基因芯片的另一重要应用是基因多态位点及基因突变的检测。大量实例说明, 基因组多样性的研究对阐明不同人群和个体在疾病的易感性和抵抗性方面表现出的差异具有重要意义, 一旦对基因组的编码序列进行系统筛查, 就有可能找出与疾病易感性有关的大量基因变异。IL-1 基因是由 IL-1A, IL-1B 和 IL-1RN 组成, 分别编码前炎性细胞因子 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-1 ra。IL-1 $\beta$ -31 是一种单核因子, 能促进胃部炎症的产生与发展, 启动或放大机体对幽门螺杆菌感染的炎性反应。IL-1B 有强烈抑酸作用, 从而导致胃萎缩, 增加胃癌发生的危险性<sup>[23]</sup>。并发现 IL-1B-31T/T 与 IL-1B-511 C/C 基因型携带者在病例组中均显著性升高, 说明 IL-1B -31T/T 与 IL-1B -511C/C 基因型均为潜在的危险基因型, 可能是胃癌的遗传易感因素。芯片技术中杂交测序技术(SBH), 是一种新的高效测序方法, 是基因芯片的另一重要应用, 其原理类似芯片检测多态位点, 可用于胃癌的数千个碱基长度的 DNA 测序。

## 2.5 胃癌治疗分子机制

基因芯片高通量筛选药物及对基因表达谱的检测, 有助于研究药物作用靶位点及分子机制, 为进一步的肿瘤治疗提供依据。Yoshida 等<sup>[12]</sup>应用 cDNA 基因芯片分析 6 株经噻唑二酮处理后胃癌细胞系基因表达谱的变化, 发现噻唑二酮可通过调节细胞周期和凋亡, 抑制胃肿瘤细胞的生长。细小病毒 H-1 为自主性细小病毒的主要代表之一, 具亲肿瘤细胞的特性, 有选择性杀伤和抑制肿瘤细胞和转化细胞的生长作用, 是一个较好的基因治疗载体。采用基因芯片技术研究胃癌细胞 HGC27 在感染 H-1 病毒感染前后(48 h)在被检测的 8 000 个目的基因中, 其中有 363 个基因的表达下调, 557 个基因的表达上调。其中与信号转导、DNA 合成及修复、细胞凋亡相关的基因有: sarpl,  $\beta$ -raf, mtkl, p38 $\gamma$ , mek2, creb, rad2l。对比 RT-PCR 和 Northern blot 方法, 表达谱芯片检测结果更具可靠性<sup>[24]</sup>。Ludwig 等<sup>[25]</sup>应用 588 个基因的芯片检测了多重耐药性胃癌细胞株的基因表达情况, 发现 9 个基因存在差异表达。在典型多重耐药性细胞株中热休克蛋白 27、醛基脱氢酶 1、波形蛋白表达增强; 在非典型多重耐药性细胞株中热休克蛋白 27、波形蛋白等基因低表达。这有助于阐明胃癌细胞多重耐药性的分子机制及用这些差异表达基因作为评价药物疗效的候选指标。有报道利用寡聚核苷酸芯片技术检测耐药胃癌细胞基因表达的差异, 发现新的耐药靶点便于发明更有效的化疗药物<sup>[26]</sup>。采用寡聚核

苷酸芯片技术分析 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱导小鼠的胃癌全基因,指出 MNNG 诱导的胃癌具有强的浸润性,可以作为研究胃癌分子表达的良好病理模型<sup>[27]</sup>。

### 3 问题

基因芯片技术虽具有快速、准确、高通量检测基因表达谱的优点,由于芯片制作的工艺复杂,信号检测也需专门的仪器设备,使一般实验室难以承担其高昂的费用,其次芯片实验技术上还有多个环节有待提高,如在探针合成方面,须进一步提高合成效率及芯片集成程度,使样品制备的简单化和标准化以利于普及。基因芯片的技术急需标准化,缺乏一种公认的实验方法,难以实现数据共享<sup>[28]</sup>;采用 PCR 方法扩增模板时难免带来 PCR 所具有的局限;信号检测的灵敏度与杂交反应的特异性和重复性也有待提高<sup>[29]</sup>。随着基因芯片的不断深入和技术的更加完善,它将在胃癌的研究中发挥更大的作用。

### 参考文献:

- [1] 杨少波,王孟薇,邵勇,等.应用 cDNA 微阵列芯片筛选胃癌相关基因[J].肿瘤防治杂志,2004,11(2):117-120.
- [2] 杨少波,王孟薇,邵勇,等.胃腺癌差异表达基因的 cDNA 微阵列研究[J].肿瘤防治杂志,2005,12(8):571-575.
- [3] Norsett KG, Laegreid A, Midelfart H. Gene expression based classification of gastric carcinoma[J]. Cancer Lett, 2004, 210(2):227-237.
- [4] Yu CD, Xu SH, Mou HZ, et al. Gene expression profile differences in gastric cancer, pericancerous epithelium and normal gastric mucosa by gene chip[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(16):2390-2397.
- [5] Terashima M, Maesawa C, Oyama K, et al. Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis[J]. Br J Cancer, 2005, 92(6):1130-1136.
- [6] 汪运山,马万山,吕晓霞,等.用基因表达谱芯片研究人正常胃和胃癌中与发育相关基因芯片的价值[J].山东医药,2001,11(41):944-946.
- [7] 杨少波,王孟薇,吴本俨,等.人胃癌相关基因芯片的研制及初步检测结果[J].解放军医学杂志,2006,10(31):944-946.
- [8] Mori M, Mimori K, Yoshikawa Y, et al. Analysis of the gene expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma[J]. Surgery, 2002, 131(S):39-47.
- [9] 余传定,许沈华,牟瀚舟,等.胃癌和癌旁黏膜与距癌远端切缘胃黏膜基因表达谱差异的研究[J].中华胃肠外科杂志,2005,11(8):520-523.
- [10] Sepulveda AR, Tao H, Carloni E, et al. Screening of gene expression profiles in gastric epithelial cells induced by Helicobacter pylori using microarray analysis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16(Suppl 2):145-157.
- [11] Maeda S, Otsuka M, Hirata Y, et al. cDNA microarray analysis of helicobacter pylori-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(2):443-449.
- [12] Yoshida K, Tanabe K, Fujii D, et al. Induction mechanism of apoptosis

by troglitazone through peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in gastric carcinoma cells[J]. Anticancer Res, 2003, 23(1):267-273.

- [13] Wang HT, Li ZH, Yuan JP, et al. Effect of Helicobacter pylori VacA on gene expression of gastric cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(1):109-113.
- [14] Sakakura C, Hagiwara A, Nakanishi M, et al. Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites[J]. Br J Cancer, 2002, 87(10):1153-1161.
- [15] Hasegawa S, Furukawa Y, Li MH, et al. Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23040 genes[J]. Cancer Res, 2002, 62(23):7012-7017.
- [16] Huang B, Xu H, Zhao Y, et al. Analysis of metastatic-related gene expression in gastric cancer by low-density cDNA microarrays[J]. Chin J Clin Oncol, 2006(3):77-82.
- [17] 徐斌,居小萍,胡先贵,等.细胞黏附分子与胃癌发生及转移关系的实验研究[J].中华胃肠外科杂志,2001,12(4):251-253.
- [18] Wang J, Chen S. Screening and identification of gastric adenocarcinoma metastasis-related genes using cDNA microarray coupled to FDD-PCR[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128(10):547-553.
- [19] Haraguchi N, Inoue H, Mimori K, et al. Analysis of gastric cancer with cDNA microarray[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 54(Suppl 1):S21-S24.
- [20] Chen J, Röcken C. Microarray analysis of gene expression in metastatic gastric cancer cells after incubation with the methylation inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine[J]. Clin Exp Metastasis, 2004(21):389-397.
- [21] Weiss MM, Kuipers EJ, Postma C, et al. Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival[J]. Oncogene, 2003, 22(12):1872-1879.
- [22] 兰斌,刘柄亚,张济,等.胃癌细胞周期 G<sub>1</sub>/S 转换期基因表达谱的分析[J].中华胃肠外科杂志,2005,5(8):229-233.
- [23] 高卫,崔霞,胡安拉,等.IL-1B 及 IL-1ra 基因多态性与胃癌易感性的相关性研究[J].江苏大学学报,2006,8(16):339-341.
- [24] 刘炯,冉志华,冯纓,等.基因芯片技术在细小病毒 H-1 诱导胃癌细胞基因表达研究中的应用价值[J].中华消化杂志,2004,5(24):285-288.
- [25] Ludwig A, Dietel M, Lage H. Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells. Anticancer Res [J], 2002, 22(6):3213-3221.
- [26] Kang HC, Kim IJ, Park JH, et al. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays[J]. Clin Cancer Res, 2004(10):272-284.
- [27] Abe M, Yamashita S. Global expression analysis of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas using oligonucleotide microarrays. Carcinogenesis [J], 2003(24):861-867.
- [28] 黄明哲.胃癌基因芯片研究进展[J].国外医学肿瘤学分册,2004,6(31):459-461.
- [29] 谢海龙.基因芯片在胃癌分子病理研究中的应用及进展[J].临床与实验病理学杂志,2004,8(20):474-476.

