

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.06.15

· 基础研究 ·

康莱特抗小鼠肺腺癌 LA795 肺转移 相关基因表达谱的研究

吴煜 杨宇飞 邬冬华

【摘要】 目的 寻找康莱特抗肿瘤转移的表达差异基因。方法 以 LA795 小鼠肺腺癌肺转移组织,制备 mRNA 探针,应用含有 4 096 条鼠基因的 cDNA 表达谱芯片,用 ScanAr ray 3000 扫描仪扫描芯片荧光信号图像,分析肿瘤组织和康莱特治疗后肿瘤组织中差异表达基因。结果 发现在康莱特组和对照组存在差异表达的基因,其中重复 3 次均差异表达的基因有 27 条,其中表达增高的基因 25 条,表达降低的基因 2 条。其中 12 条是小鼠肌 cDNA 文库中的基因。经初步研究,发现 6 条可能与肿瘤发生、发展及转移相关的基因。结论 运用本基因表达谱芯片对基因表达谱进行分析,能够有效筛选出抗肺转移的相关差异基因。本组共发现 6 条与康莱特抗肿瘤转移相关的基因。

【关键词】 康莱特 基因表达谱 抗转移

【中图分类号】 R73-35⁺4

Study on the gene expression patterns of KANGLAITE in anti-lung metastasis of LA795 mouse WU Yu, YANG Yufei, WU Donghua. Department of Oncology, Xiyuan Hospital of TCM, Beijing 100091, China

【Abstract】 Objective To screen the differential expression genes of KANGLAITE in anti-tumor metastasis. **Methods** mRNA was extracted and purified from the lung of the mouse with LA795 lung metastasis, hybridized respectively on 4 096-gene chip. cDNA microarray was scanned for the fluorescent signals and analyzing difference expression. **Results** Twenty-seven differential expressed genes were obtained. Among these genes, 25 were up-regulated and 2 were down-regulated. Twelve of them were Mus musculus cDNA clone. Six genes related with genesis, development and metastasis of tumor. **Conclusion** cDNA microarray for analysis of gene expression patterns is a powerful method to identify differential expressed genes. In this study, 6 genes are thought to be associated genes of KANGLAITE in anti-tumor metastasis.

【Key words】 KANGLAITE Gene expression patterns Anti-metastasis

This work was supported by a grand from the National Natural Sciences Foundation of P. R. China (to YANG Yufei) (30070957).

恶性肿瘤转移是肿瘤治疗的主要障碍,控制转移是决定癌症预后的关键因素。有关肿瘤转移的机制,在运动因子及其受体、基质降解酶、转移的信息传导、癌细胞基因缺陷、转移相关基因和肿瘤抑制基因等方面都做了大量深入的研究。

康莱特系从传统中药薏苡仁中提取的抗癌活性成分^[1],对移植性肿瘤小鼠 Lewis 肺癌、大鼠 W256 癌肉瘤、小鼠 B16 黑色素瘤肺转移模型和移植于裸鼠的人体肝癌(QGY)具有明显的抗肿瘤作用^[2]。薏苡仁脂对 LA795 肺转移具有明显抑制作用,抑制率与环磷酰胺(CTX)相近,即使在晚期薏苡仁脂对 LA795 肺转移

抑制率仍达 52.28%^[2]。同时薏苡仁脂对 LA795 移植瘤灶有明显的抑制作用。我们运用基因芯片技术,寻找康莱特抗小鼠肺腺癌 LA795 模型肺转移的差异表达的基因,对研究肿瘤转移的发生机制及康莱特治疗肿瘤转移的有效机理有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与瘤株 实验动物选用 T739 小鼠,由北京中国医学科学院肿瘤所提供,体重(18±2)g,雌雄各半,共 40 只。肿瘤瘤株选小鼠肺腺癌 LA795,由北京中国医学科学院肿瘤所提供。

1.1.2 药物 康莱特注射液由浙江康莱特药业有限公司提供,(97)卫药准字 Z-108 号,生产批号 200004091-2。环磷酰胺由上海华联药业有限公司生

本研究受国家自然科学基金项目(30070957)资助

作者单位:100091 北京,中国中医研究院西苑医院肿瘤科(通讯作者:吴煜)

产。

1.1.3 芯片材料和设备 40ScDNA 芯片和 Scanarray 扫描仪由上海博星基因芯片有限公司提供。产品系列号 :Mouse40S。产品批号 20001109。

1.2 实验方法

1.2.1 动物实验 无菌条件下取接种 10 天的新鲜无坏死癌块组织 ,制成单细胞悬液 ,用生理盐水将悬液稀释成 6×10^6 /ml 癌细胞原液。取 0.1 ml 细胞原液 ,接种于小鼠的左腿后侧。接种第 4 天随机分为 2 组。康莱特组 :开始腹腔注射康莱特 25 mg/kg 体重 ,一日 1 次 ,连用 14 次。对照组 :以同量生理盐水腹腔注射。第 20 天杀鼠取肺组织 ,迅速液氮冻存储备用。

1.2.2 探针制备 按改进的一步法抽提各组小鼠肺组织总 RNA^[3] ,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 公司)分离纯化为 mRNA。每 1 份探针取 4 μ g mRNA ,参照 Schena 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化^[4]。在一链合成中掺入荧光标记 dUTP ,用 Cy3-dUTP 标记对照组组织 mRNA ,用 Cy5-dUTP 标记康莱特组组织 mRNA。乙醇沉淀后将 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 标记的探针混合溶解在 20 μ l 5 \times SSC + 0.2% SDS 杂交液中。

1.2.3 芯片杂交 将芯片和杂交探针分别做 95 $^{\circ}$ C 变性后置于杂交舱内 ,加入混合探针 ,用杂交密封舱加以密闭(不能留有气泡)。置于密封舱内 60 $^{\circ}$ C 杂交 15 ~ 17 h。然后揭开盖玻片 ,用 SSC 和 SDS 溶液洗涤 10 min ,室温晾干。

1.2.4 检测与分析 用 ScanArray 3000 扫描仪扫描芯片 ,提取基因表达的荧光信号的强度和比值。用预先选定的内参照基因对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。

以 40 个看家基因作参照对原始数据进行标准化处理^[5] ,剔除 Cy3 和 Cy5 信号强度均小于 400 的基因表达数据。基因显著性差异表达的判定标准为 :Ratio >2 或 Ratio <0.5(Ratio = Cy5/Cy3)。

以上实验重复 3 次。

2 结果

2.1 肺转移灶差异 试验第 20 天处死小鼠 ,完整取出肺组织 ,肉眼计数肺部肿瘤转移灶。结果表明 ,康莱特组肺转移灶数比对照组明显减少 ,具有显著性意义(表 1)。

2.2 芯片杂交技术体系验证 在芯片上共有 4 096 个 cDNA。为了监控芯片杂交技术体系的整个过程 ,

在每块芯片上设定了阴性对照 :水稻 U2 RNA 基因(8 个点)、HCV 外壳蛋白基因(8 个点)、空白点样液(32 个点) 3 次芯片杂交这些点的杂交信号均很低 ,证实了数据的可靠性。

表 1 康莱特组和对照组的肺转移灶比较

Tab 1 Comparison of numbers of metastatic sites of the lung between KANGLAITE and control groups

Group	No. of animals	No. of metastatic sites	T value	P value
KANGLAITE	20	3.35 \pm 2.10	5.9283	<0.001
Control	20	7.40 \pm 2.11		

2.3 基因表达谱差异 图 1 为基因表达谱的散点图(scatter plot)。X 轴、Y 轴分别以 Cy3 荧光强度值(= 前景值 - 背景值)和 Cy5 荧光强度值为坐标 ,每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号。其中的每一个点代表一个基因 ,X 轴和 Y 轴分别代表基因的 Cy3 和 Cy5 信号强度。为表达谱芯片双色荧光扫描图像 ,Cy5 荧光标记康莱特组 ,Cy3 荧光标记空白对照组。数据点若为红色 ,则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 至 2.0 之间 ,基本属非差异表达 ;数据点若为黄色 ,则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 到 2.0 范围之外 ,该点很可能属于表达差异。

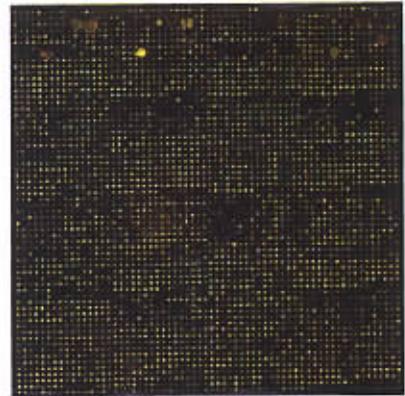


图 1 对照组/实验组杂交信号强度散点图

Fig 1 The scatter plots of gene expression pattern

图 2 是基因表达谱的荧光标记叠加图 ,Cy5 荧光标记康莱特组 ,Cy3 荧光标记空白对照组。对于某一点的两种叠加荧光信号 ,如果 Cy3 信号较强 ,该点多显绿色(下调趋势) ;如果 Cy5 信号较强 ,该点多显红色(上调趋势) ;如果强度相似 ,即显黄色。

用微矩阵基因芯片筛选康莱特治疗 LA795 小鼠肺腺癌肺转移与空白对照组的差异表达的基因 ,发现 3 次重复实验都差异表达的基因有 27 条 ,表达增高的

基因 25 条,表达降低的基因 2 条(表 2)。其中 12 条 条可能与肿瘤发生、发展及转移相关的基因。是小鼠肌 cDNA 文库中的基因。经初步研究,发现 6

表 2 3 次基因芯片试验均表达异常的基因

Tab 2 Expression abnormal genes in all 3 times of cDNA microarray

Gene ID	Genbank ID	Potential gene function	Cy5/Cy3		
			Case 1	Case 2	Case 3
m0202b05	AA435172	ve23e11. r1 Mus musculus cDNA ,5'end	2.175	2.182	2.240
m0264a03	AA510391	vh57c12. r1 Mus musculus cDNA ,5'end	2.325	3.176	3.78
m0042g01	AA691777	vu16g01. r1 Mus musculus cDNA ,5'end	2.015	2.119	3.032
m0113f07	AF004934	Mus musculus Ste20-like kinase mRNA ,complete cds	2.279	2.422	2.482
m0009e01	AF043120	Mus musculus beta prime coatomer protein mRNA ,partial cds	2.396	2.436	2.596
m0046a03	AF143955	Mus musculus coronin-1 mRNA ,complete cds	2.008	2.077	2.711
m0137d08	AF173681	Mus musculus thioredoxin interacting factor mRNA ,complete cds	2.299	2.327	2.605
m0159e03	AI131909	ue97g01. x1 Mus musculus cDNA ,3'end	0.433	0.482	0.495
m1081b06	AI414322	md87d02. x1 Mus musculus cDNA ,3'end	2.397	3.004	3.651
m0109h07	AI847660	UI-M-API-agm-a-03-0-UI. s1 Mus musculus cDNA ,3'end	2.145	2.145	3.169
m0037a02	AI988007	um10d12. x1 Mus musculus cDNA ,3'end	2.416	2.512	2.564
m0119c01	AU015482	AU015482 Mus musculus cDNA ,3'end	2.115	2.286	2.290
m0059h01	AU067242	AU067242 Mus musculus cDNA ,5'end	2.133	2.164	3.173
m0280b01	AV024133	AV024133 Mus musculus cDNA	2.166	2.451	2.505
m0264h03	AV340225	AV340225 Mus musculus cDNA ,3'end	3.369	4.250	4.581
m0235f09	AW550000	L0058F01-3 Mus musculus cDNA ,3'end	3.739	3.823	3.989
m0984d10	AW822214	up63a02. x1 Mus musculus cDNA ,3'end	3.133	3.265	3.827
m0042g08	D00725	Serine protease inhibitor 2	3.889	3.923	4.019
m0123h01	D37837	Mouse mRNA for 65-kDa macrophage cytosolic protein ,complete cds	2.194	2.405	2.946
m0016c02	L49467	Mus musculus troponin T fast skeletal muscle isoform FA1e17 (Tntt3) mRNA ,complete cds	2.215	2.285	2.400
m0042f11	M96827	C57BL/6J ob/ob haptoglobin mRNA ,complete cds	2.064	2.424	2.771
m0114g08	NM_013615	Mus musculus outer dense fiber of sperm tails 2 (Odf2) mRNA	2.170	2.520	2.816
m0202c03	U13921	Keratin complex 1 , acidic , gene 13	2.492	2.740	5.620
m0265b03	U73200	Mus musculus p116Rip mRNA ,complete cds	2.964	3.008	4.628
m0110a09	U89915	Mus musculus junctional adhesion molecule (Jam)mRNA ,complete cds	2.082	2.157	2.617
m0011b12	V00722	Mouse gene for beta-1-globin	2.036	2.142	3.090
m0202g10	X95281	Mus musculus mRNA for retinal short-chain dehydrogenase/reductase	0.332	0.436	0.457

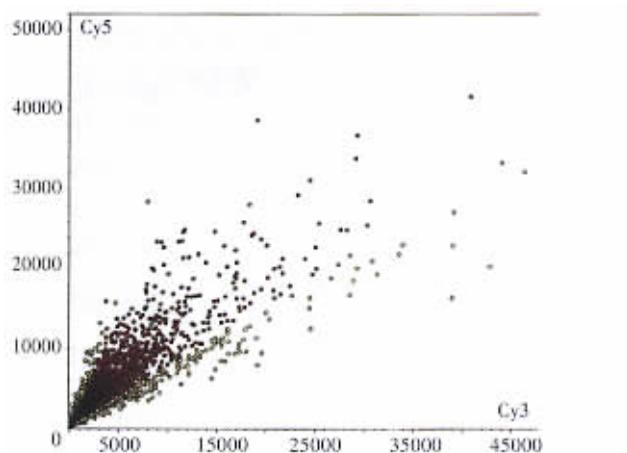


图 2 对照组/实验组双色荧光标记叠加图

Fig 2 Bicolor fluorescence labelling stack diagram of contrast bundle/experiment bundle

3 讨论

肿瘤的转移不是单个基因突变的结果,而是多个基因作用的结果。许多基因和信号通路控制着细胞扩增、分化、死亡,在癌症发生中起关键作用。微矩阵芯片技术能够在基因组水平并行分析大量基因,全面了解各个基因在不同时期、不同生理状态的表达变化,从而迅速获得丰富、全面的肿瘤生物学信息^[6]。本研究采用的微矩阵基因芯片是以联合基因科技集团克隆的 4 096 条基因为靶基因,制备成 cDNA 芯片,对肿瘤组织和康莱特治疗后肿瘤组织 mRNA 逆转录产生的 cDNA 进行杂交检测,寻找和筛选中药康莱特抗肿瘤转移相关的特异性基因,发现差异表达的基因有 27 条,表达增高的基因 25 条,表达降低的基因 2 条。其中 12 条是小鼠肌 cDNA 文库中的基因。经初步研究,发

现 6 条可能与肿瘤发生、发展及转移可能相关的基因。

AF143955 :CORO1C ,是象 coronin 的肌动蛋白结合蛋白的同种。其 cDNA 由 3 857 个核酸所组成,推测其氨基酸序列与 P57 有 65% 的同一性,P57 是人类具有的象 coronin 的肌动蛋白结合蛋白,因此,此基因可能在细胞质分裂、运动性和信号转导中具有重要的作用^[7],并且积极参与细胞粘着、有丝分裂和吞噬作用^[8]。

AF173681 维生素 D3 调节蛋白质 1(VDUP1) ,从一个杂交酵母中发现的硫氧还蛋白(TRX)的管制蛋白质,是一个鼠科和人类共有的 VDUP1。鼠 VDUP1 (mVDUP1)在各种不同的组织中都有表达,而且存在于细胞质中;与细胞增殖 - 联合的基因互相影响,而且能激活 c-Jun N-末端激酶,使 IL-6 高表达,与细胞凋亡信号有关^[9]。在骨髓细胞瘤和巨噬细胞谱系的分化管制机制中,TRX 与 VDUP1 的交互作用可能参与重要的细胞氧化还原作用的过程^[10]。TRX 的过表达保护细胞免于体外和体内的氧化压力引起的细胞毒性影响,在基因表达、细胞增殖和细胞凋亡在作用中扮演决定的角色^[11]。

本研究发现在有显著差异表达的基因中,很多都与肿瘤的发生和发展过程有着密切的关系。另外,其它一些基因可能也有相关,如 D00725(丝氨酸蛋白抑制剂)为蛋白类抑制剂和相关蛋白质 ,D37837(巨噬细胞蛋白质)在巨噬细胞激活作用过程中起重要作用^[12],V00722(珠蛋白基因),U13921(角蛋白基因),U89915 为调整单核白细胞的免疫球蛋白。目前我们正在对基因芯片中获得的新老差异表达基因进行进一步的功能研究和信息学分析。

参 考 文 献

1 李大鹏,黄洁敏,苏维埃,等. 薏苡仁油脂的化学成分分析. 中药新药与临床药理,1999,10(2): 99-101.

2 李炳生,陈秀华,任文龙,等. 康莱特注射液的抗肿瘤作用. 中国医药工业杂志,1998,29(10): 456-458.

3 陈菊祥,范静平,应康,等. 基因表达谱芯片在胰腺癌相关基因筛选中的应用研究. 第二军医大学学报,2000,21(9): 824.

4 Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 10614-10619.

5 Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, 270(5235): 467-470.

6 Welford SM, Gregg J, Chen E, et al. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. Nucleic Acids Res, 1998, 26(12): 3059-3065.

7 Iizaka M, Han HJ, Akashi H, et al. Isolation and chromosomal assignment of a novel human gene, CORO1C, homologous to coronin-like actin-binding proteins. Cytogenet Cell Genet, 2000, 88(3-4): 221-224.

8 Okumura M, Kung C, Wong S, et al. Definition of family of coronin-related proteins conserved between humans and mice: close genetic linkage between coronin-2 and CD45-associated protein. DNA Cell Biol, 1998, 17(9): 779-787.

9 Junn E, Han SH, Im JY, et al. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. J Immunol, 2000, 164(12): 6287-6295.

10 Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21645-21650.

11 Nishinaka Y, Masutani H, Nakamura H, et al. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. Redox Rep, 2001, 6(5): 289-295.

12 Kumar A, Singh SM, Sodhi A. Endotoxin-induced protein phosphorylation in macrophages is modulated by tumor cells. Int J Immunopharmacol, 1998, 20(1-3): 99-110.

(收稿 2003-01-28 修回 2003-08-03)

(本文编辑 张世雯)

· 启 事 ·

致作者

从 2004 年起,本刊将开设·研究生论文·专栏,欢迎广大医学院校、研究机构在读研究生踊跃投稿。