

应用基因芯片技术研究骨巨细胞瘤的基因表达

潘晓华¹, 肖德明^{1,2}, 任莉莉³, 戴勇³, 李富荣³, 李体远³

Gene Expression in Giant Cell Tumor of Bone by cDNA Microarray

PAN Xiao-hua¹, XIAO De-ming^{1,2}, REN Li-li³, DAI Yong³, LI Fu-rong³, LI Ti-yuan³

1. Department of Orthopedics, The Second Medical College of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China; 2. Department of Orthopedics, 2nd Shenzhen People's Hospital; 3. Clinical Research Center, The Second Hospital Medical College of Jinan University, Shenzhen People's Hospital

Corresponding Author: XIAO De-ming, E-mail: dm.xiao@hotmail.com

Abstract Objective To study the gene expression disparity of giant cell tumor with (GCT) cDNA microarray. **Methods** Total RNA of 8 fresh GCT specimens and 4 normal bony callus were extracted, purified to mRNA and then reverse transcribed to cDNA respectively. cDNA expression microarray with a set of 8 064 human genes was conducted to analysis the difference among the samples and the comparison. The hybridization signals were scanned by Amersham Pharmacia Gen and analyzed by software Image Quant. **Results** Significant different expressed genes were found between the GCT samples and normal bony callus ($P < 0.01$), Forty-seven genes differentially expressed for above 5 folds in GCT specimens were identified, with twenty-five genes up-regulating and twenty-two down-regulating which are mainly extra cellular matrix regulating genes, oncogene and cytokine genes. **Conclusion** cDNA microarray is a powerful tool to identify genes associated with GCT, which facilitates the pathogenesis elucidation, diagnosis and treatment of GCT.

Key words cDNA microarray; Giant cell tumor; Gene; Disparity

摘要:目的 运用基因芯片技术研究骨巨细胞瘤差异性基因表达。**方法** 提取手术切除新鲜 GCT 标本 8 例及 4 例正常骨痂的细胞总 RNA, 应用含有 8 064 个人类基因点的 cDNA 表达谱芯片基因芯片筛选差异性表达基因, Amersham Pharmacia Gen 扫描杂交信号, 用 Image Quant 软件分析实验结果。**结果** 8 例骨巨细胞瘤患者与正常人群相比较基因表达差异的比例约占总数的 26%, 两者间的基因表达差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表达差异五倍以上的基因 47 个, 其中 25 个基因表达明显上调, 22 个基因表达明显下调, 以细胞外基质调节基因、肿瘤相关基因、细胞因子类基因为主要类别。**结论** 基因芯片技术对骨巨细胞瘤分子水平病理机制研究有重要意义, 为其诊断治疗进一步提供了线索。

关键词: 基因芯片; 骨巨细胞瘤; 基因; 差异性

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)02-0095-05

0 引言

基因芯片技术是近年发展起来的一项新技术, 可以一次性对同一样品进行大量序列检测和核酸分析, 从而高效快捷地测试和分析基因、配体、抗原等生物活性物质。骨巨细胞瘤为好发于青少年长骨干骺端的低度恶性或潜在恶性肿瘤, 生物学行为多变,

故其治疗效果往往欠佳; 至今其发病机制仍未清楚。本研究利用基因芯片技术鉴别骨巨细胞瘤差异表达基因谱, 进而探索研究骨巨细胞瘤分子水平致病机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器和软件

Eppendorf 台式微型离心机 (Eppendorf Ltd.)、Eppendorf 5810R 冷冻桌面离心机 (Eppendorf Ltd.)、Gen III Microarray Spotter 芯片点样仪 (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.)、Generation array scanner 芯片扫描仪 (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.)、Shellab General Purpose Incuba-

收稿日期: 2006-10-24; 修回日期: 2006-12-24

基金项目: 深圳市科技计划项目资助课题 [200204061]

作者单位: 1. 518020 广东深圳, 暨南大学第二临床医学院, 深圳市人民医院骨科; 2. 深圳市第二人民医院骨科; 3. 深圳市人民医院临床研究中心

通讯作者: 肖德明, E-mail: dm.xiao@hotmail.com

作者简介: 潘晓华 (1969-), 男, 博士在读, 副主任医师, 主要从事骨科肿瘤的综合治疗

tor 恒温杂交箱 (Shellab Ltd.)、Bio-Rad Mini-Sub GT System 电泳设备 (Bio-Rad Ltd.)、DU520 UV/Vis Spectrophotometer 紫外分光光度计 (Beckman Coulter Ltd.)、Vilber Gel Documentation System 凝胶成像仪 (Vilber Ltd.)、UV Crosslinker (Viber Lourmat France) 紫外交联仪、MIDAS 8064 点基因芯片 (Chipscreen Biosciences Ltd.)、图像扫描软件 Image Quant (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.)、图像分析软件 Array Vision 6.0 (Imaging Research Ltd.)、实时荧光定量 PCR 通用系统 (ABI)。

1.2 实验试剂

Trizol Reagent (Life Technologies, Inc.)、QIAgene RNeasy mini kit (QIA GEN, Inc.)、QIAgene PCR Purification kit (QIA GEN, Inc.)、Ambion messageAmp aRNA kit (Ambion, Inc.)、Cy-Scribe cDNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd.)。

1.3 标本采集分组及 RNA 提取

取自 2002 ~ 2004 年本院及广州华侨医院、中山大学附属一院手术切除新鲜标本 8 例 (术中判断及术后病理证实为 GCTB), Jaffe: I 级 6 例、II 级 1 例、III 级 1 例; Campanacci 分级: I 级 6 例、II 级 1 例、III 级 1 例; Enneking 分期: G0 T1 ~ 2M0 5 例、G1 T1 ~ 2M0 2 例、G2 T2M0 1 例; 部位: 股骨远端 5 例、胫骨近端 2 例、桡骨远端 1 例; 年龄 23 ~ 55 岁, 平均 34 岁; 男 5 例、女 3 例。对照组 4 例, 取自胫骨和股骨骨折内固定取出术中的正常骨痂, 男女各 2 例、年龄 23 ~ 50 岁, 平均 30 岁。所有标本均分成约 1 cm × 1 cm × 1 cm 小块, 于离体 30 min 内保存于液氮中。组织样品加入适量体积的 Trizol 后采用自动匀浆器至完全匀浆, 加入适量的氯仿、RW1、RPE 溶液、DEPC 水按步骤离心, 以 3M 乙酸钠静置至沉淀后加入适量 DEPC 水溶解沉淀, 测定 RNA 样品浓度和总量, 取样品琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量并将合格样品保存于 -80 °C 归档 (浓度达试验要求的 20 μg 量, 其 A260/A280 比值不低于 1.8)。

1.4 实验方法

1.4.1 探针标记 样品 RNA 和 second round prime、Spike RNA 在 70 °C 混合变性、冷却各 5 min 后, 在 42 °C 条件下和 0.1 M DTT、dye-dCTP、dNTP mix 等反应 2 h, 反应完毕后采用 QIA quick PCR Purification Kit 纯化, 加入适量 Buffer PB 混匀后逐步离心, 可得 57 μl 产物。

1.4.2 预杂交或预处理 将放入玻片的片夹放入

200 ~ 250 ml 预热至 55 °C 预杂交缓冲液的染色缸, 置于摇床上于室温缓慢摇晃 20 ~ 30 min; 取出并立刻甩干片夹内玻片, 用气罐轻轻吹至其完全干燥。

1.4.3 探针制备及杂交 将标记好的探针 (Cy3/Cy5) 按等量混匀 (各 40 pmol) 抽干后, 按顺序加入下列试剂: 杂交缓冲液 7.5 μl、甲酰胺 15 μl、灭菌水至总体积 30 μl, 充分溶解并混匀后短暂离心, 95 °C 水浴 5 min, 立刻置于冰上 1 min, 振荡混匀后短暂离心, 将混好的探针铺在基因芯片有样品的一侧, 然后再将盖玻片放上, 并放置于 42 °C 孵箱中 16 h。

1.4.4 洗片 杂交结束后, 取出玻片置于片夹内放入预先放满去离子水的染色缸中, 让其垂直并自然滑落; 取出片夹, 迅速放入另一个预先盛有 200 ~ 250 ml 预热至 55 °C 的 0.1% SSC 洗脱液染色缸中, 在摇床上于室温缓慢摇晃 20 min; 取出片夹, 再重复洗涤一次后取出并立刻甩干片夹内玻片, 用气罐轻轻吹至其完全干燥。

1.4.5 扫描和数据处理 将完全干燥的玻片放入扫描片夹中用扫描仪进行扫描, 将图像转化为基于荧光强度的数字信号, 进行数据分析和处理。

1.4.6 杂交信号分析和标准 杂交信号强度为每个荧光通道扫描数据, 包括每个基因点的扫描数值 (Vol-RFU) 扣除背景数值 (Bkgd) 后的实际数值 (sVOL), 可用以初步估计该基因在每个样品中的表达水平及每个基因数据的有效性。将荧光信号通过 LOWESS 方法归一化后以比值 (Ratio) 表示基因表达量在实验组 (肿瘤组) 和对照组间的变化倍数 (大于 1 的数值代表相应基因表达量上调倍数, 小于 1 的数值则代表相应基因表达量下调, 以该数值倒数的负值来表示); 对于基因表达变化的显著性, 对于在两个通道上的荧光信号均符合有效信号标准的数据采用上下 2 倍变化的标准; 对于仅在其中一个通道上具有有效杂交信号的数据, 表达变化显著性的标准调整为上下 3 倍。

1.4.7 杂交及检测偏差的控制 与荧光标记杂交的基因表达谱芯片为 8 064 位点全长 cDNA 芯片, 共有 7488 个克隆片段, 其中 7458 个为表达基因片段, 长度在 500 个碱基对以上 (平均长度为 1.4 kb); 其他 30 个为空白载体片段。包括 120 个外参照标准基因和 132 个内参照标准基因以及其他阴性和阳性对照基因共 384 个基因, 每个对照基因在芯片上重复点样 12 次。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计分析软件, 对计量资料进行卡方检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 随访结果

8 例中行病灶刮除、自体或异体骨植骨术 4 例,行瘤段边缘切除、人工关节置换术 4 例,均获随访至今,平均 32 个月,复发一例,未发现肺转移。

2.2 骨巨细胞瘤患者差异性基因表达

在 8 000 多个基因点中, 8 例骨巨细胞瘤患者与正常人群相比较基因表达差异的比例约占总数的 26%, 两者间的基因表达差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 反映出除去实验误差可能造成的影响外, 两者间存在明显的生物来源性质差异(个体差异性 & 病理生理特性的差异)。其表达差异基因主要有细胞因子及受体基因、转录相关基因、凋亡相关基因、生长分化相关基因、信号转导相关基因、细胞周期相

关基因、电子传递和氧化相关基因、转移酶相关基因、核酸酶相关基因等, 其中差异表达 5 倍以上的基因 47 个, 25 个基因表达明显上调, 22 个基因表达明显下调。我们对此具有明显功能特征的基因数据进行了初步分析, 其归类主要包括细胞外基质调节基因、肿瘤相关基因、细胞增殖与凋亡调控基因、细胞因子类基因, 见表 1~3。

1 例病人(Jaffe 级、Campanacci 分级 级、G2T2M0)于 2004 年 6 月行胫骨囊内刮除、自体骨植骨术, 近期症状复发, X-ray 检查发现植骨区密度明显下降, 囊壁较术前扩大, 骨皮质出现破坏, 有肿瘤复发迹象, 肺部无明显异常, 其基因谱里差异性上调明显表达者为 MMP13、TNFRSF11B; 差异性下调表达明显为 SCYD1、MMP3 基因, 见图 1~3。

表 1a 与细胞外基质组成及转换相关的差异性上调表达基因 (12 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	MMP13 *	N69322
dermatan sulphate proteoglycan 3	DSPG3 *	AA131238
dermatopontin	DPT *	R48303
matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12 *	R92994
collagen, type III, alpha 1	COL3A1	T98612
matrix metalloproteinase 9	MMP9	T72581
collagen, type I, alpha 2	COL1A2	AA490172
collagen, type VIII, alpha 2	COL8A2	AA780815
collagen, type V, alpha 2	COL5A2	AA461456
cathepsin S	CTSS	AA236164
matrix metalloproteinase 2	MMP2	AA936799
collagen, type V, alpha 3	COL5A3	AA994760

表 1b 与细胞外基质组成及转换相关的差异性下调表达基因 (8 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
matrix metalloproteinase 3	MMP3	W51794
cartilage oligomeric matrix protein	COMP	N94385
collagen, type X, alpha 1	COL10A1	A1828306
matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP7	AA031514
collagen, type I, alpha 2	COL1A2	AA490172
collagen, type VI, alpha 1	COL6A1	H99676
collagen, type XVIII, alpha 1	COL18A1	N81029
matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	MMP15	AA443300

表 2a 差异性上调表达的肿瘤相关基因 (6 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1 *	AA430032
v-erbB2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3	ERBB3 *	AA664212
myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA *	N29376
pim-2 oncogene	PIM2 *	AA863383
retinoblastoma 1 (including giant cell tumor)	RB1	AA045192
Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	FGR	AA256172
MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 4	MADH4	AA456439

表 2b 差异性下调表达的肿瘤相关基因 (6 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
prostaglandin E synthase	PTGES	AA436163
TYRO3 protein tyrosine kinase	TYRO3	W69497
hyaluronoglucosaminidase 1	H YAL1	AA464196
E74-like factor 3 (ets domain transcription factor , epithelial-specific)	ELF3	AA434373
membrane protein , palmitoylated 2 (MAGU K p55 subfamily member 2)	MPP2	R60019
v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	ERBB2	AA446928
sarcoma amplified sequence	SAS	R45413

表 3a 差异性上调表达的细胞因子及受体类基因 (7 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)	SCYA3 *	AA677522
tumor necrosis factor receptor superfamily , member 11b (osteoprotegerin)	TNFRSF11B *	AA194983
small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys) , member 18 , pulmonary and activation-regulated	SCYA18	AA495985
small inducible cytokine A3-like 1	SCYA3L1 *	R47893
small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys) , member 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	SCYB6 *	AI889554
small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b) SCYA4 H62864 small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys motif) , member 13 (B-cell chemoattractant)	SCYB13	AA410383
small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys) , member 20	SCYA20	AI285199

表 3b 差异性下调表达的细胞因子及受体类基因 (6 个)

Gene	Gene Tag	GenBank
small inducible cytokine subfamily D (Cys-X3-Cys) , member 1 (fractalkine , neurotactin)	SCYD1	R66139
small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys) , member 14 (BRAK)	SCYB14	W72294
interferon gamma receptor 1	IFNGR1	H11482
tumor necrosis factor , alpha-induced protein 2	TNFAIP2	AA457114
tumor necrosis factor , alpha-induced protein 2	TNFAIP2	AA457114
leukocyte immunoglobulin-like receptor , subfamily B	LILRB2	H54023

*、差异表达 10 倍以上。

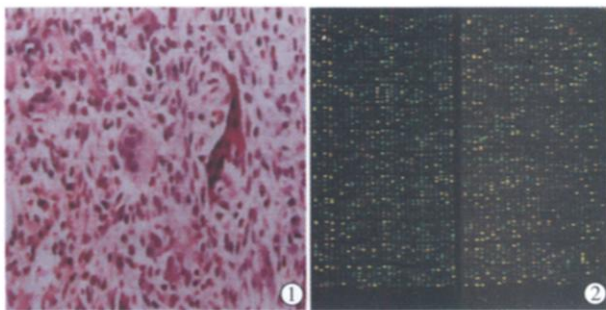


图 1 病理结果

图 2 基因扫描结果

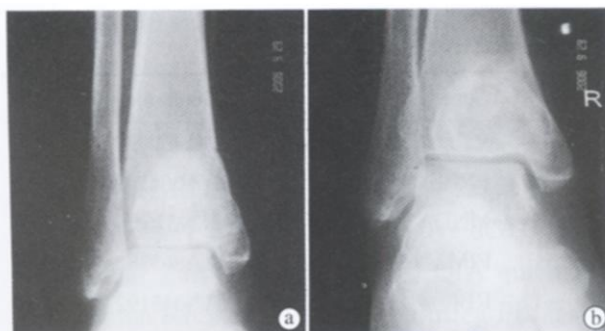


图 3a Xray :术后一周

图 3b Xray :术后 2 年

3 讨论

骨巨细胞瘤是好发于 20 ~ 40 岁人群的原发性骨肿瘤,我国的发病率高达 18.4 % 以上,为西方国家 2 ~ 3 倍^[1]。因其组织来源未定,生物学行为复杂而多变,故临床治疗后易复发^[2]。目前的分级方法及分期原则均不能完全准确反映其恶性程度、转移及复发倾向。依靠巨细胞的数量和肿瘤基质细胞组织学特征对骨巨细胞瘤的 Jaffe 分级,经长期临床观察此类标准与肿瘤生物学行为不平行,虽然在一定程度上反映了肿瘤细胞的侵袭性,但因 Jaffe 分级本身主观性强,且术前穿刺标本及病理取材本身具局限性,特别是 级和 级间界限不明确, I、II 级者也存在一定的复发和转移率,用以指导治疗的预后价值有限^[3]。肿瘤影像学 Campanacci 分级标准和肿瘤复发也无相关性^[4],相当一部分患者影像学呈现极强的侵袭性,而病理学 Jaffe 分级为 级^[5]; Enneking 肌肉骨骼系统肿瘤分期经组织学、肿瘤大小及远处转移三方面确立后行边缘或大于边缘的外科边界治疗,传统的标准治疗方法是肿瘤的刮除,用自

体髂骨填充刮除肿瘤后遗留的空腔,这种瘤内切除方法只能达到囊内的外科边界,其局部复发率可高达 40%~60%^[2],故对骨巨细胞瘤行边缘或广泛切除治疗是必要的,彻底切除可能降低肿瘤的复发率,但带来一些缺损修复及功能恢复的问题。因此临床上为弥补各自缺陷多采用此三种方法综合分析骨巨细胞瘤的属性和病变程度以指导选择合适的治疗方案。但是这种综合方法价值有限。已有多例报告指出,综合分析法定性为典型良性骨巨细胞瘤,术后半年却发生肺部广泛转移而死亡^[6]。

基因芯片技术可直接检测 mRNA 的种类及丰富度,是研究基因表达的有力工具,我们尝试通过基因芯片技术进行探讨骨巨细胞瘤的肿瘤发生机制,并力图寻求分子水平的骨巨细胞瘤分级方法。选取典型骨巨细胞瘤样本,以正常人骨组织作为对照,应用人类全长基因表达谱芯片可以得到骨巨细胞瘤特异性基因表达谱,从而获得肿瘤组织中差异表达显著的基因,筛选出肿瘤发生以及恶化过程中起重要作用的相关基因或基因群,建立起肿瘤发展过程中呈时间梯度的基因表达谱。通过此表达谱监测发生显著改变的某些基因以其表达程度进行诊断和预测骨巨细胞瘤的发生定性、转归等,为治疗方案的选择提供指导。

本研究中应用基因芯片技术成功获得骨巨细胞瘤区和正常骨的基因表达谱及基因表达差异图,初步筛选出表达变化显著具有特定功能的基因群,证明应用基因芯片技术进行骨巨细胞瘤基因表达谱的研究是可行的。如 MMP13 基因在软骨的形成过程中发挥重要作用是骨性关节炎中破坏降解软骨的关键性因素,在本研究中该基因呈明显表达上调,符合对该基因目前的研究认识;而 TNFRSF11B 是骨保护素基因,能够促进破骨细胞活性而在骨质疏松研究中益显重要,它主要表达于淋巴细胞、骨髓基质和成骨旺盛的骨骼区^[7],能够激活破骨细胞,在老鼠体内注射骨保护素能够造成高钙血症^[8],骨保护素配体(OPGL)能够强化淋巴结树突状细胞(DCs)功能促使 T 致敏而产生破骨细胞源性因子^[9],近期还发现干扰素通过影响骨保护素配体(OPGL)信号转导而阻止破骨细胞分化^[10],在本研究中该基因呈明显表达上调符合实验预期,但是这些基因表达动态和疾病转归有待继续观察。

我们认为肿瘤发生和发展是一个复杂的多阶段过程,当参与调控细胞增殖、分化和衰亡即凋亡等基本生命过程的多种肿瘤相关基因相继或同时发生突变、重排、缺失、扩增而被异常激活或失活时,正常的受控增殖、分化或凋亡受到干扰,于是细胞无限增殖、分化受阻或寿命延长而形成肿瘤。要了解整个癌变过程中的基因改变,以至癌变在各个阶段中细胞全部基因表达的动态变化,需要研究的不是一个或几个基因而是整个基因组从正常到肿瘤各个阶段中上千个基因表达的动态变化。因此利用基因表达谱数据可以较全面获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤相关基因表达的相关模型。

在未来研究中通过此项技术将良性、恶性的骨巨细胞瘤基因表达谱进行聚类分析,进而建立骨巨细胞瘤定性分级的分子标准,将是研究的重点方向。

参考文献:

- [1] 武志弼,杨光华.中华外科病理学[M].北京:人民卫生出版社,2002.2275-2280.
- [2] Prosser GH, Baloch KG, Tillman RM, et al. Does curettage without adjuvant therapy provide low recurrence rates in giant-cell tumors of bone? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 435(6): 211-218.
- [3] 马庆军,党耕町.骨巨细胞瘤诊断与治疗研究现状[J].中华外科杂志,2005,43(12): 819-821.
- [4] Lackman RD, Hosalkar HS, Ogilvie CM, et al. Intralesional curettage for grades II and III giant cell tumors of bone[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 438(9): 123-127.
- [5] Lausten GS, Jensen PK, Schiodt T, et al. Local recurrences in giant cell tumour of bone: long-term follow up of 31 cases[J]. Int Orthop, 1996, 20(3): 172-176.
- [6] Ghert MA, Rizzo M, Harrelson JM, et al. Giant cell tumor in the appendicular skeleton[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 400(7): 201-210.
- [7] Logar DB, Komadina R, Prezelj J, et al. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and osteoporosis[J]. J Bone Miner Metab, 2007, 25(4): 219-225.
- [8] Lacey DL, Timms EI, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. Cell, 1998, 93(2): 165-176.
- [9] Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand[J]. Nature, 1999, 402(6759): 304-309.
- [10] Takayanag H, Kim S, Matsuo K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta[J]. Nature, 2002, 418(6882): 744-749.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]