

应用基因表达谱芯片从不同转移能力的 乳腺癌细胞中筛选转移相关基因*

叶丽虹** 尤嘉琮 乔玲 蔡娜 王长晔 刘毅

吴晶辉 吴莲英 王洪辉 张晓东**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 人乳腺癌细胞系 MCF-7 及其转移亚克隆 LM-MCF-7 为肿瘤转移分子机制的研究提供了细胞模型. 应用基因芯片技术比较两种具有不同转移能力细胞系基因表达谱的差异, 寻找乳腺癌转移相关基因. 提取两种细胞总 RNA, 分别用 Cy5-dCTP、Cy3-dCTP 标记 LM-MCF-7 和 MCF-7 的 cDNA, 并与含有 21 329 个基因的芯片进行杂交并扫描, 利用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件处理数据判断基因是否在两个细胞中存在表达差异. 经互换荧光标记物重复两次实验, 共筛选出差异表达基因 67 个, 其中 41 个在 LM-MCF-7 细胞中表达上调, 26 个在 LM-MCF-7 细胞中表达下调. 应用实时定量 RT-PCR 对 7 个表达差异明显的基因进行了验证. 生物信息学分析结果提示, 上述发现的差异基因编码产物与细胞内信号转导、转录调节、应激反应、新陈代谢、发育、细胞运动、细胞凋亡和细胞粘连等功能有关. 据文献报道, 这些差异表达的基因中有 35 个与肿瘤有关, 其中 9 个与乳腺癌转移有关, 6 个可能参与肿瘤浸润和转移过程. 根据基因芯片检测的结果, 从功能上对 LM-MCF-7 细胞和 MCF-7 细胞与细胞凋亡的关系进行了研究, 发现具有高转移倾向的 LM-MCF-7 细胞与 MCF-7 细胞相比, 抗凋亡能力较强. 上述与肿瘤转移相关基因在肿瘤转移中的作用及其分子机理有待深入研究.

关键词 基因芯片, 基因表达谱, 乳腺癌, 肿瘤转移

学科分类号 R364.7

我们应用 SCID (severe combined immunodeficiency, SCID) 鼠, 从人乳腺癌细胞系 MCF-7 中筛选和建立了具有高转移倾向的转移亚克隆 LM-MCF-7, 动物回接实验显示, 与亲本 MCF-7 细胞相比, LM-MCF-7 细胞成瘤早、转移快、转移部位广泛^[1]. 在上述研究的基础上, 本文应用基因芯片技术检测了上述具有不同转移能力的乳腺癌细胞系基因表达谱的差异, 旨在高通量地筛选乳腺癌转移相关基因, 并以基因芯片检测为基础, 从功能上对细胞凋亡与肿瘤转移的关系进行探究.

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养: LM-MCF-7 和 MCF-7 细胞应用 RPMI1640 (含有 10% FBS、100 U/ml 硫酸链霉素和 100 U/ml 青霉素) 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 条件下 CO₂ 培养箱中培养.

1.2 方法

1.2.1 芯片制备. 基因表达芯片含有人源性 21 329 条 70 mer 长度的 Oligo DNA, 每条 Oligo DNA 代

表一个基因 (商品号: CAP-B0006, 北京博奥生物芯片公司).

1.2.2 总 RNA 提取. 应用 Trizol (Invitrogen 公司, USA) 一步法提取 MCF-7 和 LM-MCF-7 细胞的总 RNA, 异丙醇沉淀, 并用 RNeasy mini spin column kit (Qiagen 公司, USA) 过柱纯化.

1.2.3 RNA 荧光标记. 取 10 μg 总 RNA, 以 T₇-Oligo (dT)₁₅ 为引物, 用 cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司) 合成双链 cDNA, 并用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) 纯化. 用 T₇ RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega 公司) 将双链 cDNA 体外转录合成 cRNA, 然后用 RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司) 纯化. 取 2 μg cRNA, 用 200 U/μl Superscript II 反转录酶 (Invitrogen 公司) 和 9 个碱基的随机引物进行反转

*国家自然科学基金资助项目(30370338), 天津市科技发展计划科技攻关项目(043182911).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23506830, Fax: 022-23501385

E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

收稿日期: 2005-01-26, 接受日期: 2005-02-16

录并纯化. 取 1 μg cRNA 反转录产物, 用 9 个碱基的随机引物进行 Klenow 标记并纯化, 纯化后抽干.

1.2.4 杂交与洗涤. 标记的 DNA 溶于 35 μl 杂交液中(3 $\times$ SSC, 0.2% SDS, 5 $\times$ Denhart's, 25%甲酰胺), 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜. 杂交结束后, 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 含 0.2% SDS, 2 $\times$ SSC 液体中洗 5 min, 而后在 0.2 $\times$ SSC 中室温洗 5 min, 玻片甩干后用于扫描.

1.2.5 检测和分析. 用 ScanArray Express 双通道激光扫描仪扫描基因芯片, 用 GenePix Pro 4.0 软件

分析芯片上每个点 Cy5 和 Cy3 荧光信号的强度和比值, 并用 Lowess 方法归一化; 以差异为两倍(即比值大于等于 2.0, 小于等于 0.5)的标准来确定差异表达基因^[2]. 为保证检测样本可靠性, 做了两次重复实验并互换荧光标记, 将两次实验结果均表现差异的基因列出于表 2 中.

1.2.6 实时定量 RT-PCR 验证分析. 对芯片结果中部分差异表达基因(表 1)进行 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 验证.

Table 1 Primer pairs of real-time PCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size/bp
KRT17	GTCCAGGATGGCAAGGTCA	ATGGGGAAGGGACTGAAGC	167
CEBPA	CTTGGTGCGTCTAAGATGAGG	ATTGGAGCGGTGAGTTTGC	142
STMN3	GTCCCCAGAGAGCCCTATG	CTGGCGGCTGAAGTTGTTATT	202
ADAMTS1	CAAGCCTCAGAATCCCATAC	TGCCGTTGATACACCATT	236
PLA2G4A	CATGCCCAGACCTACGATTTAG	TGCAGAATGCAATCCTTCAC T	134
ALCAM	CACTGACGGATGTGAGGCG	TGACGGGCTAGATCGAAGC	239
ALPPL2	ACGCCCTTTGCTTTATCTT	TGAGCCTCCTCTTTCTCTG	101
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250
GAPDH	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTCAGCG	202

分别提取 MCF-7 和 LM-MCF-7 总 RNA (方法同 1.2.2). 用 RNA free DNase I 处理 (Takara 公司) 实验体系 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 然后用苯酚 / 氯仿处理, 添加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠, 用 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀 RNA, 以 70% 乙醇清洗, 干燥后溶于适量 DEPC 水中. 取 2.5 μg 总 RNA 反转录形成 1st-cDNA (Superscript II, Invitrogen 公司). 使用 Light Cycler PCR 仪(Roche, PTC-225), Light cycler-fast start DNA master SYBR green I (Roche 公司) 进行实时定量 RT-PCR 扩增. 扩增条件为镁离子浓度 3 mmol/L, 引物浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 重复 45 个循环; 75 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 绘制溶解曲线, 电泳检测 PCR 扩增情况. 然后采用比较阈值法对实时定量 RT-PCR 结果进行定量分析^[3].

1.2.7 阿霉素诱导细胞凋亡. 培养 LM-MCF-7 和 MCF-7 细胞至对数生长期, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 使细胞生长同步化. 分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素 (adriamycin, ADR) 作用 3 h, 换新鲜培养液继续培养 12 h 后, 胰酶消化离心收集细胞. 每个样本均获取 10⁵ 个细胞, 用美国 Coulter 公司 EPICS-XL 流式细胞仪检

测细胞凋亡. 实验结果采用 χ^2 检测.

2 结 果

2.1 总 RNA 提取结果

分别提取 LM-MCF-7、MCF-7 细胞总 RNA, 过柱纯化后紫外分光光度计定量, 甲醛变性凝胶电泳检测 (图 1).

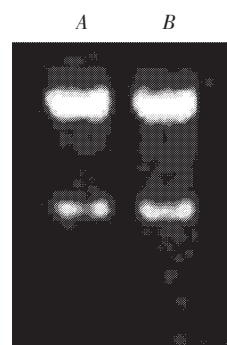


Fig.1 Electrophoresis of total RNA from MCF-7 cells (A) and LM-MCF-7 cells (B)

2.2 基因表达谱特征

2.2.1 基因表达谱杂交图. 第一次实验中 LM-MCF-7 细胞 cDNA 探针由呈红色的 Cy5 荧光素标记, MCF-7 细胞 cDNA 探针由呈绿色的 Cy3 荧光素标记, 在双色荧光扫描叠加图像中红点和绿点分别代表 LM-MCF-7 细胞中高表达和低表达的基因, 黄色点表示该基因表达的差异不显著, 第二次实验中将荧光标记互换(图 2).

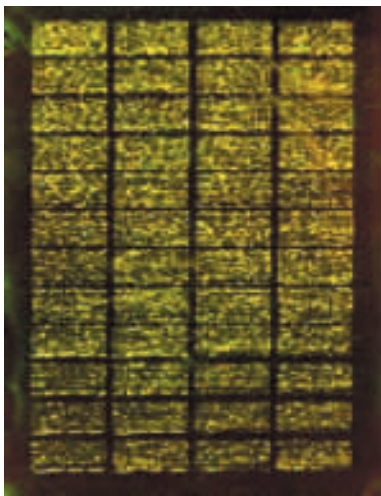


Fig.2 Scanning image of hybridizing signals on gene chips high expression (red), low expression (green), no change expression (yellow) from MCF and LM-MCF-7 cells.

2.2.2 基因表达谱散点图(scatter plot). 基因芯片杂交散点图可比较直观地看出两样品间基因表达的差异情况. 其中 x 轴和 y 轴分别以两样品的荧光信号强度值为坐标, 图 3 中每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号. 没有差异表达的基因分布在以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 3).

2.3 差异基因表达谱

基因芯片的假阳性率用 self-to-self 实验来确定. 本研究抽提同一批培养的 HeLa 细胞和 293 细胞的 RNA, 分为 2 等份, 一份标记 Cy5, 一份标记 Cy3, 然后和芯片进行杂交 (含有 21 329 个基因), 最终 HeLa 细胞得到 41 个、293 细胞得到 39 个假阳性的基因, 表明该方法具有较好的特异性. 荧光交换处理可避免荧光非特异性吸附所造成的假阳性率. 进而对实验组标本进行研究, 结果显示第一次实验结果和互换荧光标记后的第二次实验结果分别得到 183 个和 124 个差异表达基因, 两次实验共同差异基因为 67 个, 百分率分别为 36.6% 和 54.0%.

67 个差异表达的基因中, 在 LM-MCF-7 细胞中呈上调表达 (比值 ≥ 2.0) 的基因有 41 个, 呈下调表达

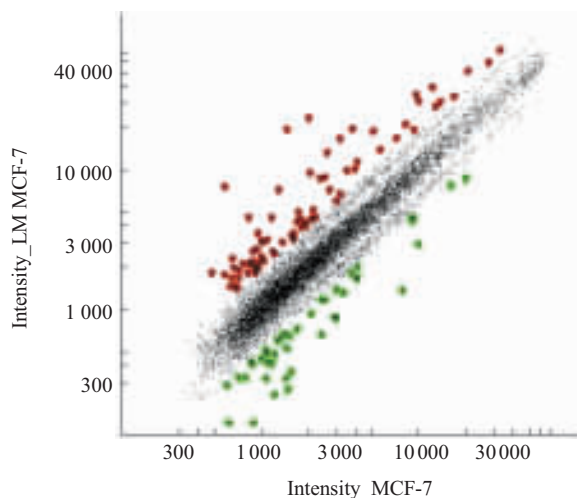


Fig.3 Scattered plot graph of Cy3-labeled and Cy5-labeled probes hybridizing with microarray

Each point on the plot represented a gene hybridization signal. The black point represented the ratios that ranged from 0.5 to 2.0, belonging to no different group, and the red points represented the ratios that were greater than 2.0, the green points represented the ratios that were smaller than 0.5, whose gene expression was mostly possible altered.

(比值 ≤ 0.5) 的基因有 26 个, 部分结果见表 2.

2.4 实时定量 RT-PCR

1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 (图 4), 得到的扩增片段大小与预期结果一致. 电泳条带整齐、亮度高, 可见基因扩增效率好, 得到单一条带, 表明基因扩增特异性好.

选择持家基因 ACTB 和 GAPDH 作为校准基因, 用 Roche Light Cyclor PCR 仪检测其在 LM-MCF-7 和 MCF-7 中表达差异 (C_t 值差) 分别为 0.2 和 0.3, 两个基因在相应样品中的表达差异为 0.1, 基本相同. 我们可随机选择 ACTB 作为校准基因 (表 3).

2.5 细胞凋亡

比较不同浓度 ADR 诱导 LM-MCF-7 和 MCF-7 细胞发生凋亡的效果, 获得 100 $\mu\text{mol/L}$ ADR 作用 3 h 为最佳条件. 撤药 12 h 后, 观察发现大部分细胞收缩变圆、解聚、膜皱缩和细胞膜表面有小泡形成, 并且大部分细胞从瓶壁上脱落下来. 流式细胞仪检测结果显示, LM-MCF-7 和 MCF-7 细胞在受到 ADR 作用后, 均出现了典型的“凋亡峰” (图 5). 细胞凋亡率 LM-MCF-7 为 29.20%, MCF-7 细胞为 37.50% (表 4), 二者具有显著差别 ($P < 0.001$).

Table 2 Expression profile in LM-MCF-7 and MCF-7 cells by cDNA microarray

			LM-MCF-7/MCF-7	
Accession No.	Gene name	Abbreviation	Ratio 1	Ratio 2
(A) Cell motility				
NM_002639	Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor,clade B (ovalbumin), member 5	SERPINB5	2.388 0	3.488 4
NM_000805	Homo sapiens gastrin	GAS	2.621 5	2.207 1
NM_000963	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (COX2)	PTGS2	7.811 5	5.439 5
(B) Cell adhesion				
NM_002290	Homo sapiens laminin, alpha 4	LAMA4	0.153 0	0.204 8
NM_000358	Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced	TGFβ I	0.359 0	0.440 3
NM_002205	Homo sapiens integrin, alpha 5	ITGA5	0.444 1	0.456 6
Y10183	H.sapiens Mrna for MEMD protein	ALCAM	2.831 3	3.219 4
(C) Transcription regulator				
NM_002135	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4,group A, member 1	NR4A1	2.198 5	2.393 7
NM_004472	Homo sapiens forkhead box D1	FOXDI	2.200 0	2.110 9
NM_004364	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP),alpha	CEBPA	8.809 5	11.755 6
(D) Response to stress				
NM_013230	Homo sapiens CD24 antigen	CD24	2.721 1	2.585 6
NM_005252	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	3.819 2	5.285 6
NM_000600	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	3.957 4	5.017 0
NM_001311	Homo sapiens cysteine-rich protein 1 (intestinal)	CRIP1	2.008 7	2.510 7
(E) Development				
NM_001200	Homo sapiens bone morphogenetic protein 2	BMP2	2.014 5	2.367 3
NM_002893	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 7	RBBP7	2.174 5	2.121 9
NM_001321	Homo sapiens cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	2.708 0	3.714 6
NM_004415	Homo sapiens desmoplakin	DSP	2.258 0	2.264 8
NM_000422	Homo sapiens keratin 17	KRT17	12.242 6	13.162 0
(F) Apoptosis				
NM_003374	Homo sapiens voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	0.410 3	0.488 2
(G) Signal				
NM_024701	Homo sapiens ankyrin repeat and SOCS box-containing 13	ASB13	0.433 5	0.463 2
NM_014241	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase-like, member a	PTPLA	0.402 7	0.491 8
NM_000600	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	3.957 4	5.017 0
Y10183	H.sapiens Mrna for MEMD protein	ALCAM	2.831 3	3.219 4
NM_006988	Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	4.750 7	4.708 6
(H) Transport				
NM_001038	Homo sapiens sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	SCNN1A	0.162 0	0.175 5
NM_003374	Homo sapiens voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	0.410 3	0.488 2
AF251295	Homo sapiens DC22 mRNA, complete cds.	AP1S2	2.010 8	2.162 4
NM_003234	Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	2.465 2	3.156 6
(I) Metabolism				
NM_016234	Homosapiensacyl-CoA synthetase long-chain family member 5	ACSL5	0.259 9	0.272 7
NM_001935	Homo sapiens dipeptidylpeptidase 4 (CD26,)	DPP4	0.270 0	0.227 1
NM_001710	Homo sapiens B-factor, properdin	BF	0.365 6	0.399 7
NM_016352	Homo sapiens carboxypeptidase A4	CPA4	0.413 5	0.478 4
AB032951	Homo sapiens mRNA for KIAA1125 protein	PRKCBP1	0.431 8	0.396 6
NM_001632	Homo sapiens alkaline phosphatase, placental	ALPP	2.122 1	2.158 7
NM_004472	Homo sapiens forkhead box D1	FOXDI	2.200 0	2.110 9
NM_005319	Homo sapiens histone 1, H1c	HIST1H1C	2.250 8	2.250 2
NM_004508	Homo sapiens isopentenyl-diphosphate delta isomerase	IDI1	2.267 6	2.855 8
AF178532	Homo sapiens aspartyl protease	BACE2	2.319 9	2.208 9
NM_000262	Homo sapiens N-acetylgalactosaminidase, alpha-	NAGA	2.719 9	2.612 8
NM_001976	Homo sapiens enolase 3, (beta, muscle)	ENO3	2.193 2	2.092 6
M68874	Homo sapiens phosphatidylcholine 2-acylhydrolase Mrna	PLA2G4A	3.166 1	2.920 4
NM_031313	Homo sapiens alkaline phosphatase, placental-like 2	ALPPL2	3.271 0	2.880 7
AK025736	Homo sapiens Cdna FLJ22083 fis, clone HEP14459	HMGCS1	5.545 3	5.666 5

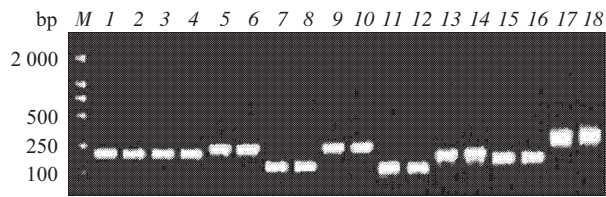


Fig.4 Electrophoresis for real-time PCR products from LM-MCF-7 (LM) and MCF-7 (M)
1: LM-GAPDH; 2: M-GAPDH; 3: LM-STMN3; 4: M-STMN3; 5: LM-ADAMTS1; 6: M-ADAMTS1; 7: LM-PLA2G4A; 8: M-PLA2G4A; 9: LM-ALCAM; 10: M-ALCAM; 11: LM-ALPPL2; 12: M-ALPPL2; 13: LM-KRT17; 14: M-KRT17; 15: LM-CEBPA; 16: M-CEBPA; 17: LM-ACTB; 18: M-ACTB; M: DL2000 marker.

Table 3 Results of real-time PCR

Gene name	<i>Ct</i>	$-\Delta\Delta C_t$	Ratio after normalization	Ratio on gene chip
LM-STMN3	24.13	4.90	20.69	5.55
M-STMN3	29.03			
LM-ADAMTS1	22.07	2.64	4.99	4.71
M-ADAMTS1	24.71			
LM-PLA2G4A	22.83	2.06	3.46	2.92
M-PLA2G4A	24.89			
LM-ALCAM	19.89	2.22	4.01	3.22
M-ALCAM	22.11			
LM-ALPPL2	20.85	3.90	10.59	2.88
M-ALPPL2	24.75			
LM-KRT17	19.25	3.59	8.89	13.16
M-KRT17	22.84			
LM-CEBPA	20.19	3.64	9.97	11.76
M-CEBPA	23.83			
LM-ACTB	13.62	0.05	1.0	
M-ACTB	13.67			

Ct refers to cycle numbers when the intensity of fluorescence reaches fluorescence threshold; $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target gene}}} - C_{t_{\text{house keeping gene}}})_{\text{experiment}} - (C_{t_{\text{target gene}}} - C_{t_{\text{house keeping gene}}})_{\text{control}}$; Ratio=LM-MCF-7(LM)/MCF-7(M).

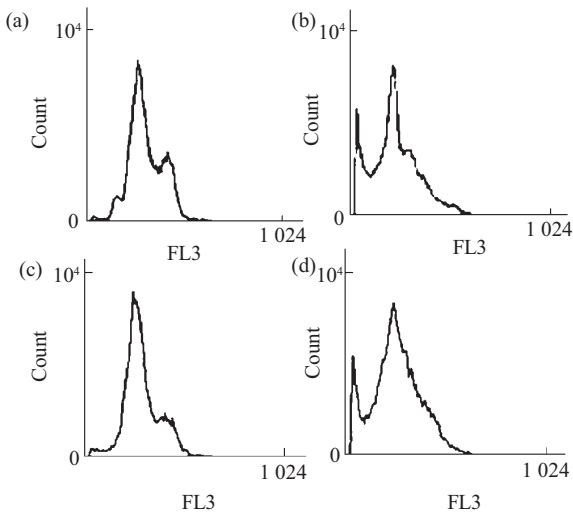


Fig.5 Flow cytometry analysis

(a) MCF-7 cells untreated; (b) MCF-7 cells treated with ADR; (c) LM-MCF-7 cells untreated; (d) LM-MCF-7 treated with ADR.

Table 4 Flow cytometry analysis

Cells	Apoptosis /%	G ₀ /G ₁	S	G ₂ +M
MCF-7	8.27	60.10	14.30	17.30
ADR-MCF-7	37.50	39.20	11.40	9.60
LM-MCF-7	7.04	53.40	17.10	23.20
ADR-LM-MCF-7	29.20*	40.50	14.10	14.50

ADR-LM-MCF-7 and ADR-MCF-7 were that LM-MCF-7 and MCF-7 cells were treated with ADR. **P*<0.001 (ADR-LM-MCF-7 *vs* ADR-MCF-7).

3 讨 论

表达谱基因芯片是用于基因组功能研究的一种应用型芯片，在功能基因组研究中发挥广泛的作用^[4].近年来的研究发现了一些与乳腺癌转移相关的基因，但大都是从单基因入手，本研究采用基因芯片分析则具有高通量和快速等优点.为了证明实验结果的可靠性，对基因芯片发现的部分基因进行了实时定量 RT-PCR 检测.结果显示，表 3 中基因在 LM-MCF-7 细胞中均有高水平表达，并且大部分基因在两种细胞中差异表达的比值与该基因在芯片检测结果中的差异比值很接近，表明该结果与基因芯片检测结果基本一致，进一步证实了各基因在不同转移能力乳腺癌细胞中表达的差异及芯片结果的准确性和可靠性.下面对表 2 列举的部分基因进行讨论：

3.1 细胞运动相关基因

在 LM-MCF-7 细胞中, 细胞运动相关基因均上调表达. PTGS2 即环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 是花生四烯酸转化成前列腺素的限速酶, 它有两种同工酶 COX-1 和 COX-2. COX-2 为诱导酶, 在多数正常细胞中不存在, 但可被一些炎症细胞因子、肿瘤促进因子、生长因子和癌基因迅速诱导. 有报道 COX-2 在胃癌、肺癌、乳腺癌临床病理标本中的表达与肿瘤侵袭和转移呈正相关^[5-7]. 在肝细胞癌旁硬化组织中以及分化良好的肝细胞癌中也有高表达^[8,9]. 我们的实验结果与文献报道是一致的. GAS1 蛋白产物为胃泌素前蛋白, 在人的胃癌和肠上皮组织变形中有过表达倾向, 可能与胃癌的发生有关. 在结直肠癌和肝转移的癌中也发现胃泌素的上调表达. GAS1 在 LM-MCF-7 细胞中高表达提示它与乳腺癌的转移也具有相关性.

3.2 细胞凋亡相关基因

VDAC1 为电压依赖性阴离子通道蛋白 1, 它通过参与细胞色素 c 的释放和 Bcl-2 的表达抑制促进细胞凋亡^[10]. 如果 VDAC1 的表达水平下调则有利于细胞的抗凋亡. COX-2 在癌症发生早期表达, 同样具有抗凋亡和促进肿瘤细胞增殖的作用. 本研究对具有不同转移能力的 LM-MCF-7 与 MCF-7 细胞进行了细胞凋亡的研究, 在相同浓度的 ADR 作用下, MCF-7 细胞的凋亡率为 37.5%, LM-MCF-7 细胞的凋亡率为 29.2%, 经 χ^2 检测两种细胞的凋亡率有显著差别 ($P < 0.001$). 表明肿瘤细胞的转移能力越强, 其抗凋亡能力越强, 这一结果与应用基因芯片检测发现的 VDAC1 基因在 LM-MCF-7 细胞中表达下调的结果是一致的. 因此, 具有高转移倾向的肿瘤细胞具有较高的抗凋亡能力, 有利于其转移的发生.

3.3 细胞粘连相关基因

ITGA5 为整联蛋白 α_5 , ITGA5 β_1 和 ITGA5 β_3 调节微纤维蛋白 -1 分子与微原纤维的细胞粘连^[11], 促进内皮细胞的迁移^[12], 并在血管生成中起作用. 纤维连接蛋白结合 ITGA5 β_1 和 ITGA5 β_3 分别调节 RhoA-GTP 的装载和细胞基质粘连的组织过程^[13]. LAMA4 可表达 24 个不同的肽段, 可在皮肤、心、肺、胎盘、骨骼肌和胰腺中表达^[14]. 它们属于细胞外基质糖蛋白家族, 主要影响细胞粘连和血管发生, 也作用于细胞分化、信号途径和神经轴突传递过程^[15]. 黏附分子低表达可使细胞转为运动或侵袭状态, 促使肿瘤转移. 目前未见它们与肿瘤转移相

关的报道, 本研究发现它们在 LM-MCF-7 细胞中低表达, 提示可能与乳癌转移有关, 其分子机制有待深入研究. ALCAM 是恶性皮肤黑色素瘤发生的标志物^[16], 有报道它与肺癌的转移归巢和血管增殖有关, 可促进肿瘤的转移^[17]. ALCAM 在 LM-MCF-7 中上调表达, 可能也参与了乳腺癌转移过程.

3.4 转录调节相关基因

NR4A1 是核激素受体超家族的 orphan member, 结合于神经生长因子诱导的蛋白 I -B 即 NGF I -B 的结合效应元件 NBRE. 对细胞的增殖、分化和凋亡起作用, 有转录激活作用. 是可诱导的 DNA 结合蛋白, 与血纤维蛋白溶解酶原活化剂抑制物 1 启动子 PAI-1 直接结合, 调控 TNF 诱导的 PAI-1 表达. NR4A1 转录水平在 TNF α 的作用下上调^[18]. FOXD1 与细胞生长有关, 调节 cAMP 依赖的蛋白激酶活性^[19]. 转录调节因子表达上调, 增强了细胞的转录活性, 可能提高了肿瘤细胞转移和入侵能力. 本研究结果提示, NR4A1 和 FOXD1 可能为乳癌转移相关基因.

3.5 应激和发育相关基因

应激和发育相关基因在 LM-MCF-7 细胞中均有显著上调, 说明在具有高转移能力的肿瘤细胞中表达更为活跃. c-FOS 在正常上皮组织和单纯增生的上皮细胞很少表达, 在食道癌癌旁区发育异常部位和鳞状上皮细胞癌、甲状腺癌和成神经管细胞癌中高表达. 基因芯片结果中 FOS 在 LM-MCF-7 中上调表达, 进一步表明它与乳腺癌转移相关. KRT17 在胃癌、食管鳞状细胞癌和甲状腺乳突状癌中, 较正常细胞都有高表达^[20-22], 还有文献报道 KRT17 在乳腺癌中高表达^[23]. KRT17 在高转移倾向的 LM-MCF-7 乳腺癌细胞中表达上调十分显著, 提示它可能促进乳腺癌的转移.

3.6 新陈代谢相关基因

ENO3 蛋白产物为烯醇化酶 3 (β 肌肉型), 烯醇化酶是普遍存在于生物体内的糖酵解途径的关键酶, 是由 α -磷酸甘油酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸的限速酶. 在高转移倾向 LM-MCF-7 乳腺癌细胞中 ENO3 过表达, 表明乳腺癌细胞的转移能力与新陈代谢水平密切相关.

参考文献

- 1 Ye L H, Wu L Y, Zhang X D, *et al.* A new highly metastasis breast cancer cell line (LM-MCF-7) identified from SCID mice injected MCF-7 cells and its application. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2 (9):

- 2 王永煜, 张幼怡. 基因芯片数据分析与处理. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (2): 321~323
Wang Y Y, Zhang Y Y. Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (2): 321~323
- 3 阳成波, 印遇龙, 黄瑞林, 等. 实时定量 RT-PCR 的原理及方法. 免疫学杂志, 2003, **19** (3): 145~150
Yang C B, Yin Y L, Huang R L, *et al.* Immunol J, 2003, **19** (3): 145~150
- 4 徐伟文, 李文全, 毛裕民. 表达谱基因芯片. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (6): 822~826
Xu W W, Li W Q, Mao Y M. Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (6): 822~826
- 5 Ryo O, Keigo Y, Takeshi F, *et al.* Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. Cancer, 2001, **91**(4): 1876~1881
- 6 Namita K, Qingyuan Y, Russell D, *et al.* Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and activity in a murine model of metastasis breast cancer. Int J Cancer, 2001, **93** (3): 681~686
- 7 Kozaki K, Kashikawa K, Tatematsu Y, *et al.* Multi-faceted analyses of a highly metastasis human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 suggest mimicry of inflammatory cells in metastasis. Oncogene, 2001, **20** (5): 4228~4234
- 8 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor differentiation. Hepatology, 1999, **29**: 688~696
- 9 Kondo M, Yamamoto H, Agano H, *et al.* Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease free survival in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 1999, **5**: 4005~4012
- 10 Zheng Y, Shi Y, Tian C, *et al.* Essential role of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release induced by arsenic trioxide. Oncogene, 2004, **23** (6): 1239~1247
- 11 Bax D V, Bernard S E, Lomas A, *et al.* Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. J Biol Chem, 2003, **278** (36): 34604~34616
- 12 Hotchkiss K A, Ashton A W, Schwartz E L, *et al.* Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human endothelial cell migration by specific activation of the integrins alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3. J Biol Chem, 2003, **278** (21): 19272~19279
- 13 Danen E H, Sonneveld P, Brakebusch C, *et al.* The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alpha V beta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. J Cell Biol, 2002, **159** (6): 1071~1086
- 14 Richards A, Al-Imara L, Pope F M, *et al.* The complete cDNA sequence of laminin alpha 4 and its relationship to the other human laminin alpha chains. Eur J Biochem, 1996, **238** (3): 813~821
- 15 Gonzalez A M, Gonzales M, Herron G S, *et al.* Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (25): 16075~16080
- 16 Van Kempen L C, Van den Oord J J, Van Muijen G N, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the Skin. Am J Pathol, 2000, **156**: 769~774
- 17 Van Kempen L C, Meier F, Egeblad M, *et al.* Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. Journal of Investigative Dermatology, 2004, **122**: 1293~1301
- 18 Gruber F, Hufnagl P, Hofer-Warbinek R, *et al.* Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter regulates TNF alpha -induced PAI-1 expression. Blood, 2003, **101** (8): 3042~3048
- 19 Dahle M K, Grønning L M, Cederberg A, *et al.* Mechanisms of FOXC2- and FOXD1-mediated regulation of the RI α subunit of cAMP-dependent protein kinase include release of transcriptional repression and activation by protein kinase B α and cAMP. J Biol Chem, 2002, **277** (25): 22902~22908
- 20 Kim M A, Lee H S, Yang H K, *et al.* Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. Hum Pathol, 2004, **35** (5): 576~581
- 21 Luo A, Kong J, Hu G, *et al.* Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. Oncogene, 2004, **23** (6): 1291~1299
- 22 周炜洵, 肖雨, 刘彤华, 等. 细胞角蛋白和 Ret 蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达. 中华病理学杂志. 2003, **32** (6): 530~533
Zhou W X, Xiao Y, Liu T H, *et al.* Chin J Pathology, 2003, **32** (6): 530~533
- 23 Van de Rijn M, Perou C M, Tibshirani R, *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. American Journal of Pathology, 2002, **161**(1): 1991~1996

Screening Metastasis-associated Genes in Breast Cancer Cells With Different Metastatic Ability by cDNA Microarray*

YE Li-Hong**, YOU Jia-Cong, QIAO Ling, CAI Na, WANG Chang-Ye,
LIU Yi, WU Jing-Hui, WU Lian-Ying, WANG Hong-Hui, ZHANG Xiao-Dong**
(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Human breast cancer cell line MCF-7 and its sub-clone LM-MCF-7 with high metastatic potential supply a cell model for studying molecular mechanisms of tumor metastasis. The two cell lines were used to screen tumor metastasis-associated genes by cDNA microarray, displaying differential gene expression profile. Total RNA of the two cells was extracted and the cDNAs were labeled with Cy5-dCTP and Cy3-dCTP, respectively. Then the cDNAs were hybridized on the gene chips containing 21 329 kinds of human genes. The signals were examined by GenePix Pro 4.0 software. The two labeling nucleic fluorescent dyes were exchanged each other so that the experiments were repeated twice. The results shown that 67 kinds of genes were markedly different between the two cells, in which 41 were up-regulated and 26 down-regulated in LM-MCF-7 cells. Some of results were confirmed by real-time PCR. The above genes are associated with functions, such as cell signal transduction, transcript regulation, transportation, response to stress, metabolism, development, movement, cell cycle, differentiation, apoptosis, conglutination, and so on. According to the reports 35 of 67 genes were involved in tumor, in which 9 were related to metastasis of breast tumor, and 6 may be involved in tumor invasion and metastasis. Based on the results, apoptosis was investigated in function in LM-MCF-7 and MCF-7 cells. It was found that the ability of antiapoptosis in LM-MCF-7 cells was higher than that in MCF-7 cells. The candidate genes associated with tumor metastasis will be further demonstrated in function.

Key words gene chips, gene expression profile, breast cancer, tumor metastasis

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370338) and Key Project of Development for Science and Technology in Tianjin (043182911).

**Corresponding author . Tel: 86-22-23506830, Fax: 86-22-23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

Received: January 26, 2005 Accepted: February 16, 2005