

肿瘤相关基因表达检测寡核苷酸芯片的 制备及其初步应用*

黄 坚^{1,2)} 杜清友¹⁾ 丁 雨²⁾ 王升启¹⁾**

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所全军生物芯片重点实验室, 北京 100850; ²⁾深圳益生堂生物企业有限公司, 深圳 518026)

摘要 为研制肿瘤相关寡核苷酸芯片, 并实现其在抗肿瘤反义核酸“癌泰得”作用机理研究方面的初步应用, 制备了包含近 450 种肿瘤相关基因特异寡核苷酸探针的寡核苷酸芯片, 建立了相应的质控标准. “癌泰得”用脂质体转染 HepG2 肿瘤细胞, 提取细胞总 RNA 反转录并荧光标记 cDNA, 用制备的寡核苷酸芯片检测肝癌细胞 HepG2 的肿瘤相关基因表达水平, 用软件分析获得其差异基因表达谱. 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的反义核酸“癌泰得”作用于 HepG2 细胞 15 h 后, MDNCF、DHS 等基因 mRNA 表达下调, MUC2、MPP11、LAT、HRIF-B、JNK3A1 等 mRNA 基因表达上调, 初步检测到了“癌泰得”的抗肿瘤作用可能的相关基因, 为进一步的分子作用机理的探讨奠定基础. 结果表明, 制备的肿瘤相关芯片敏感度高、特异性高、重复性均较好, 可用于检测肿瘤相关基因的表达谱, 为临床诊断和基础研究提供了技术平台.

关键词 肿瘤相关基因, 寡核苷酸芯片, 癌泰得, 表达谱

学科分类号 Q812

生物芯片技术用于基因表达谱研究是近年发展起来的一项新技术, 能够以定量方式同时监测大量基因相对表达^[1,2]. 与常用的 cDNA 芯片技术相比, 寡核苷酸芯片技术用于基因表达谱的研究具有其独特的优点^[3~5]. 由于芯片上的探针不需要 PCR 扩增, 大大简化了表达谱芯片制备的程序, 使芯片的制备更加简便易行; 由于探针性质统一, 可以统一杂交条件, 进一步提高检测的真实性和准确度, 减少假阳性和假阴性. 寡核苷酸表达谱芯片包括两种: 一种是以 Affymetrix 公司为代表的原位合成寡核苷酸芯片, 每个基因含 10~20 条探针, 探针长度 15~25 nt, 该种芯片的缺点是制备与使用非常复杂, 使用价格昂贵且存在知识产权方面的问题. 另一类是近年来发展起来的合成后点样寡核苷酸表达谱芯片制备技术, 每个基因含 1 条探针, 探针长度 46~80 nt^[4~8].

肿瘤是一类严重危害人类身体健康的疾病, 从分子水平对抗肿瘤药物的研究一直是肿瘤防治的研究热点. 由于肿瘤发病机理非常复杂, 交叉影响因素太多, 仅凭目前常用的从单因素或有限的几个因素进行研究往往不能有效地找到规律性的结果. 而基因表达谱芯片的应用有望解决这个问题. 通过检测肿瘤细胞中成千上万基因表达的变化, 有助于寻找肿瘤致病基因以及肿瘤发生发展的分子机制, 对抗肿瘤药物作用的分子机理研究, 有助于筛选各种

抗肿瘤药物.

反义核酸“癌泰得”(Cantide)是针对端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因 mRNA 的二级结构筛选出一条反义寡核苷酸, 具有明显的体外抗肿瘤活性, 而对照序列如正义、随机及错配的寡核苷酸均无明显抑制肿瘤细胞活性. “癌泰得”在裸鼠体内也具有显著的抗肿瘤作用^[9,10].

本研究应用已建立的寡核苷酸表达谱芯片技术平台^[3], 制备了肿瘤相关基因芯片, 并对其在反义核酸“癌泰得”作用肿瘤细胞 HepG2 的差异表达谱检测方面的应用, 进行了初步的研究和分析.

1 材料与方法

1.1 肿瘤相关基因的筛选与芯片设计

从国内外相关文献及各种肿瘤表达谱数据库中查寻并筛选了近 500 种肿瘤相关基因, 包括各种原癌基因, 抑癌基因, 及与细胞周期、细胞凋亡、DNA 合成和修复、细胞受体和应激反应、免疫、

* 全军医药卫生科研基金课题(01Z019)和北京市科技项目(H010210220113)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932211, Fax: 010-66932211

E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-04-08, 接受日期: 2003-06-02

代谢、细胞信号传递、细胞生长等相关的已报道基因。通过公共数据库 GenBank、EMBL、DDBJ 等搜寻其 mRNA 序列信息,用大规模探针设计软件^[8]设计了长度均为 40 nt, GC 含量 45% ~ 55% 的基因特异寡核苷酸探针,寡核苷酸探针经合成后用自动点样仪点样,制备含近 450 种肿瘤相关基因,约 900 点(2 点/基因,分两个重复点样区)的寡核苷酸芯片。芯片质控方法采用定量阳性对照结合定量内标看家基因、阴性对照,对逆转录、杂交过程进行监测和结果分析。芯片中包括定量阳性对照荧光素酶基因^[11] 12 个点,定量内标看家基因 12 种(GAPDH、 β -actin、TFR、21 ku highly basic protein、ribosomal protein L32、ALB、alpha-tubulin、SDHC、aldolase B、ribosomal protein S28、malate dehydrogenase 2、hprt) 24 个点,阴性对照 3 种(水稻 EST 序列 AU182426, AU182425, 结核杆菌 rpoB 基因 L27989) 6 个点,空白点样液若干点。

1.2 寡核苷酸探针的设计

用大规模寡核苷酸探针设计软件 MProbe 设计探针^[8],探针长度 40 nt, GC 含量 45% ~ 55%,自身无二级结构,选取编码区近 3' 端探针进行 BLAST 分析,筛选与人总 RNA 序列同源性小于 50% 的探针 1 ~ 2 条作为备用基因特异寡核苷酸探针。

1.3 寡核苷酸的合成

1.3.1 芯片寡核苷酸的合成:寡核苷酸探针合成在 ABI391 Z DNA 合成仪上完成,采用标准亚磷酰氨化学方法,5'或 3'氨基修饰用 N-MMTTr-6-氨基-2-氰乙基-N', N'-二异丙基亚磷酰氨(自制),在合成后的最后一步引入。合成完毕后浓氨水 55℃ 脱保护/切割 15 h, OPC 柱纯化。

1.3.2 反义核酸“癌泰得”的合成:硫代反义寡核苷酸“癌泰得”(5'-ACTCACTCAGGCCTCAGACT-3')由 Oligo Pilot II DNA 固相合成仪(Amersham-Pharmacia)合成,反相-离子交换 HPLC(Waters Delta Prep 4000)纯化,填料为 SOURCE 15Q(Amersham-Pharmacia),合成产物纯度 > 95%。

1.4 芯片的制备与后处理

寡核苷酸探针以 0.5 g/L 溶解于 3 × SSC 溶液中,用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪点在本室自制的醛基化玻璃片上,放置过夜,分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

1.5 细胞培养及转染

肝癌细胞系 HepG2 为本室保存,用含 10% 小牛血清,100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液培养。用脂质体 Lipofectin(Invitrogen)转染。将脂质体和“癌泰得”分别稀释于相应的无双抗的 DMEM 培养基中,室温 30 ~ 45 min 后,混合,室温 10 ~ 15 min。细胞用无双抗的 DMEM 洗一次后,加入相应体积的无双抗 DMEM,然后加入脂质体-DNA 混合物,使得“癌泰得”的最终浓度为 400 mmol/L,无“癌泰得”对照组仅加入脂质体为对照。37℃ 培养过夜(约 15 h)后,换成含 10% 小牛血清的正常培养基。

1.6 HepG2 细胞总 RNA 的提取及逆转录荧光标记

将培养细胞消化后用 PBS 洗一次,1 × 10⁷ 个细胞用 1 ml Trizol 试剂(Gibco 公司)悬浮,氯仿抽提后,加入异丙醇沉淀,然后用 DEPC 处理过的水溶解沉淀,取样品进行紫外分析和甲醛变性电泳,分析其纯度和完整性。然后进行逆转录荧光标记,给药及未给药的 HepG2 细胞总 RNA 分别用不同的荧光(Cy3 或 Cy5)标记。具体方法如下:总 RNA 80 μg,定量阳性对照荧光素酶体外转录 mRNA 0.1 μg, Oligo dT (16) 2 μg,混匀,70℃ 温育 10 min,冰上冷却。加入第一链反应缓冲液 5 μl, DTT 2 μl, dNTP 1 μl, Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 1.5 μl,混匀,42℃ 反应 2 min,加入逆转录酶 superscript II(Gibco 公司)1 μl,42℃ 温育 2 h。最后用 65℃ NaOH 降解 RNA,乙醇沉淀标记的 cDNA。

1.7 杂交及洗涤

按 1:3 的比例将逆转录产物与杂交液(50% 甲酰胺,5 × Denhardt 液,6 × SSC,0.5% SDS)混合,94℃ 水浴变性 2 min,将探针加在芯片的微矩阵中,用盖玻片封片,利用盖玻片与载玻片之间的毛细管现象将溶液均匀平铺到探针矩阵上,42℃ 杂交 3 h,杂交完毕后,室温下分别用洗液 A(1 × SSC,0.2% SDS),洗液 B(0.2 × SSC),洗液 C(0.1 × SSC)清洗,室温晾干。

1.8 检测与分析

用 Axon 公司的 Genepix 4000 扫描仪扫描芯片。用 ImaGene 4.2 软件进行数据分析和归一化处理,分别用 12 个看家基因和 6 个阳性对照均衡,对 Cy3 和 Cy5 扫描结果进行校正^[12]。用以下 2 个条件找出差异表达基因: a. Cy3 信号值/Cy5 信号值 > 2 或 Cy3 信号值/Cy5 信号值 < 0.5; b. Cy3 信号

值或 Cy5 信号值 $> 2 \times$ 阴性对照信号值。

2 结 果

2.1 HepG2 细胞总 RNA 制备结果

提取细胞总 RNA 进行甲醛变性凝胶电泳, 结果表明, 荧光素酶 mRNA、给药及未给药的 HepG2 细胞总 RNA (A_{260}/A_{280} 值为 1.85 ~ 1.93) 基本无降解, 28 S/18 S > 1.5 , 5 S RNA 条带很少, 证明获得了高纯度、高完整性的总 RNA。(电泳图谱略)

2.2 HepG2 细胞肿瘤相关基因差异表达检测结果
“癌泰得”作用 (给药浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$) 及

未作用的 HepG2 细胞总 RNA 分别用 Cy3-dUTP 及 Cy5-dUTP 标记, 对其差异表达谱进行芯片杂交检测, 用看家基因和定量阳性对照均衡, 对其差异表达进行分析, 实验重复三次。检测结果表明, 三次实验共有 10 ~ 22 种基因显示有差异表达 (2% ~ 5%), 每次均出现差异表达的基因有 7 种, 基因差异表达情况见表 1。其中一次的检测结果及分析见图 1 和图 2 (每个点的横坐标值为 Cy3-dUTP 标记的荧光探针杂交信号强度, 纵坐标值为 Cy5-dUTP 标记的荧光探针杂交信号值)。

Table 1 The transcriptional effects of “cantide” on genes in HepG2 cells

Gene name	GenBank Accession NO.	Fluorescent ratio (Cy3/Cy5)
MonoCyte-derived neutrophil chemotactic factor	NM-000584	0.46
Deoxyhypusine synthase	HSU26266	0.42
JNK alpha protein kinase	U34820	2.21
M-phase phosphoprotein	X98260	2.53
Linker for activation of T cell	NM-014387	2.69
Intestinal mucin	L21998	2.08
Gastric cancer multidrug resistance-associated protein	AF326778	2.16

Data are expressed as means.

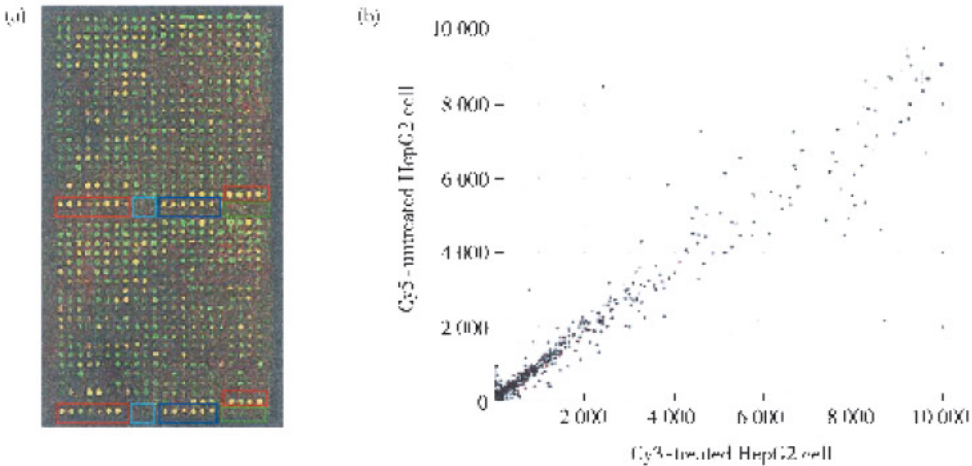


Fig.1 The pseudocolor image (a) and the scatterplot (b) of fluorescent signal intensity from hybridization to oligonucleotide microarray

cDNA from untreated and “cantide” treated cells were labeled with Cy5 and Cy3, respectively. ■: positive control; ■: house keeping gene; ■: negative control; ■: blank.

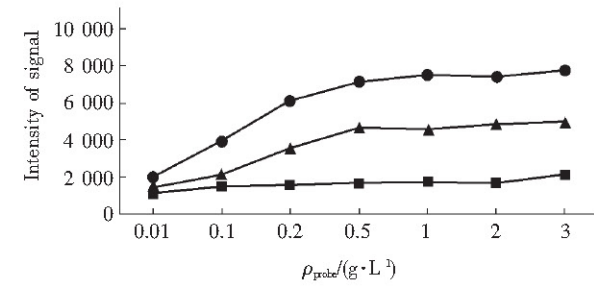


Fig. 2 Effects of different concentrations of probes on the fluorescent signal intensity

●—●: MALT1; ▲—▲: GCNA1; ■—■: ALR.

2.3 基因芯片的质量控制

2.3.1 芯片中寡核苷酸探针浓度的选择: 取 3 个不同 mRNA 表达水平的基因为研究对象, 检测了不同探针浓度 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L) 对杂交信号的影响 (图 2). 结果表明, 在低浓度范围内 (0.01 ~ 0.5 g/L), 杂交信号强度随探针浓度的增加而增加, 0.5 g/L 以上探针浓度对杂交信号影响无明显差异. 因此, 芯片中寡核苷酸探针浓度以 0.5 g/L 较好.

2.3.2 敏感度与特异性: 定量阳性对照 6 个点 (图 1 深蓝色方框), 看家基因 12 个点 (图 1 红色方框) 均出现较强信号, 3 种阴性对照 3 个点 (图 1 浅蓝色方框) 以及点样液 4 个点 (图 1 绿色方框) 均无明显信号. 说明芯片的检测结果敏感度和特异性是比较好的.

2.3.3 重复性: 对芯片两个重复矩阵的检测重复性进行了分析, 从芯片上下两个矩阵随机选取部分探针对应点, 比较其检测信号强度差异. 结果 CV 值均小于 15% (表 2). 说明芯片检测的重复性较好.

Table 2 Analysis of signal intensity of repeated genes in top and bottom panel of hybridization area (parts of controls and genes)

Probe	Signal intensity (Cy3)		CV
	Top panel	Bottom panel	
Positive control	10 800	11 600	<15%
Negative control	230	244	<15%
GAPDH	6 500	5 800	<15%
alpha-tubulin	8 600	8 100	<15%
DCC	5 500	5 300	<15%
NPM/ALK	3 800	3 600	<15%

Data are expressed as means.

3 讨 论

以前研究发现 (另文发表), 以端粒酶 hTERT 基因为靶的反义寡核苷酸“癌泰得”作用于肿瘤细胞后, 细胞内端粒酶 hTERT mRNA 和蛋白质表达水平下降, 出现明显的端粒酶活性下降, 并发现 Caspase 家族中的 CPP32 类和 ICE 类蛋白酶活性升高, 细胞明显发生凋亡. 推测“癌泰得”很可能通过抑制端粒酶活性, 直接或间接影响到与凋亡有关的蛋白酶活性, 进而激活 caspase 酶类活性导致细胞凋亡发生. 这也与有关端粒酶不仅调控细胞寿命, 而且还可能不通过端粒来调控细胞分化的报道相一致^[9,10].

基因芯片具有高通量、平行检测以及简便快速等优点, 可同时检测大量基因的表达情况. 为此制备了基因芯片, 通过检测“癌泰得”给药后, 细胞内肿瘤相关基因表达的改变, 来进一步探索“癌泰得”抗肿瘤的分子作用机理.

本研究制备的肿瘤相关基因芯片采用了体外转录的荧光素酶基因作为定量阳性对照、十几种看家基因作为定量内标、数种同源性较远的异源基因 (水稻、结核杆菌基因) 作为阴性对照, 以此作为对逆转录、杂交过程的质控和监测. 同时对芯片的灵敏度、特异性、重复性等指标进行了考察. 结果表明, 本方法制备的肿瘤相关基因芯片具有较好的灵敏度、特异性和重复性. 因此, 用该芯片进行的表达谱检测结果准确可信, 能够明显减少常规 cDNA 芯片导致的假阳性结果. 此外, 由于统一了各种基因探针的条件, 杂交结果更加真实可信. 当然, 也应该看到, 实验结果中几次实验的差异表达结果不尽相同, 原因可能是多方面的, 如每次实验的细胞状态、药物刺激效果、逆转录效率等有差别以及芯片自身稳定性等. 因此, 有必要同一实验重复几次, 取具有共性的结果更为合理.

在本实验中, 将“癌泰得”作用于肿瘤细胞 HepG2, 用肿瘤相关基因芯片检测了其基因表达谱. 通过与对照细胞相比, 发现一些基因的表达明显发生了变化 (表 3).

Table 3 The genes closely related with treatment with “Cantide”

Genes	Description	Expression
MonoCyte-derived neutrophil chemotactic factor	An important autocrine multifunctional cytokine, an important role in controlling the phenotypes associated with melanoma progression and metastasis.	down
Deoxyhypusine synthase (DHS)	Catalysis of the first step in the post-translational synthesis of hypusine in a single cellular protein, the precursor of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A).	down
c-Jun N-terminal kinases 3 (JNK3)	A member of the MAP kinase group, a critical role in activation of c-Jun and apoptosis, loss of expression of the JNK3 gene may play an important role in the development of brain tumors	up
M phase phosphoprotein 11 (MPP11)	A candidate for the putative cancer-related activity, an oncogenic function, a tumor suppressive role	up
The linker for activation of T cells (LAT)	Be essential for T cell activation, a potential substrate for PKC and calcineurin signaling pathways	up
Mucin (MUC2)	The fidelity of MUC2 expression held irrespective of the degree of malignant transformation, the essential roles in carcinoma-host and other cellular interactions.	up
Gastric cancer multidrug resistance-associated protein (MRP)	Be related to the chemosensitivity of tumor cells against some anticancer drugs	up

对具有差异表达的基因功能分析可以看到,反义核酸“癌泰得”作用 HepG2 细胞后,对肿瘤细胞生长具有直接或间接抑制作用的基因如 JNK 3A1、MPP11、LAT、MUC2 表达上调,对肿瘤细胞生长有直接或间接促进作用的基因如 MDNCF、DHS 表达下调. 因此,针对端粒酶的反义核酸“癌泰得”除了能抑制靶基因表达下降,随着细胞的分裂,导致肿瘤细胞端粒长度的缩短,从而诱导细胞衰老外,其快速的抗肿瘤作用应该是,通过抑制一些促进肿瘤细胞生长基因的表达,和增强一些抑制肿瘤细胞生长基因的表达而实现的. 因此,“癌泰得”可开发成为临床上治疗肿瘤的一种潜在药物. 这也进一步说明,端粒酶除了维持细胞端粒长度之外,还与调控细胞生长的一些基因存在信息交流,从而具有调控细胞生长的功能. 至于这些检测到的表达变化的基因,是如何与端粒酶发生联系的以及在“癌泰得”抗肿瘤作用中起到的作用如何,还需要进一步的实验研究.

参 考 文 献

1 Schena M, Shalon D, Dais R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (20): 467~470

2 Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1 000 genes.

Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (20): 10614~10619

3 黄坚,陈苏红,佟丽,等.小鼠细胞因子相关基因表达检测寡核苷酸芯片的制备及分析. *生物工程学报*, 2002, **18** (4): 105~108

Huang J, Chen S H, Tong L, *et al.* *Chin J Biotechnol*, 2002, **18** (4): 105~108

4 Lipshutz R J, Fodor S P, Gingeras T R, *et al.* High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genet*, 1999, **21**: 20~24

5 Wodicka L, Dong H, Mittmann M, *et al.* Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol*, 1997, **15**: 1359~1367

6 Southern E, Mir K, Shechinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genet (suppl)*, 1999, **21**: 5~9

7 Kane M D, Jatkoe T A, Stumpf C R, *et al.* Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (22): 4552~4557

8 Li W J, Huang J, Fan M, *et al.* MProbe: computer aimed probe design for oligonucleotide microarray. *Applied Bioinformatics*, 2002, **1** (3): 103~105

9 Wang S Q, Lin R X, Lin L, *et al.* The effect of antisense oligonucleotides targeting telomerase catalytic subunit on tumor cell proliferation *in vitro*. *Chin Sci Bull*, 2002, **47**: 378~381

10 Cao Y, Li H, Mu F, *et al.* Telomerase activation causes vascular smooth muscle cell proliferation in genetic hypertension. *FASB J*, 2002, **16**: 96~98

11 陈忠斌,杨静,王升启. cDNA 芯片阳性对照的制备及在芯片敏感性分析中的应用. *生物技术通讯*, 2002, **13** (5): 334~337

Chen Z B, Yang J, Wang S Q. *Lett Biotechnol*, 2002, **13** (2): 103~107

12 Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, *et al.* Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res*, 2000, **60**: 4161~4166

Preparation of Oligonucleotide Microarray for Tumor-associated Gene Expression Detection and Its Primary Application *

HUANG Jian^{1,2)}, DU Qing-You¹⁾, DING Yu²⁾, WANG Sheng-Qi¹⁾**

(¹⁾ *Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;* ²⁾ *YiShengTang Biological Products Co. Ltd, Shengzhen 518026, China*)

Abstract Preparation of oligonucleotide microarray for gene expression detection of tumor-associated gene and its primary application in study on molecular mechanism of antisense oligonucleotide “cantide” were carried out. An oligonucleotide microarray consisting of about 450 kinds of tumor-associated genes was constructed and the standards of quality controls of it were founded at the same time. Tumor cells were treated with “cantide” mixed with lipofectin and total RNA was extracted. Through reverse-transcription, cDNA was synthesized and labeled with Cy5 or Cy3. After hybridized with the prepared microarray, signal intensities were detected and expression profiles were analyzed by software. The results indicate that the oligonucleotide microarray prepared has high specificity, good sensitivity and stability etc. Compared to cells treated with lipofectin alone, the mRNA expression levels of seven genes appeared to show significant change. The mRNA expression of MDNCF, DHS genes were downregulated, while the mRNA expression of MUC2, MPP11, LAT, HRIF-B, JNK3A1 genes were upregulated after HepG2 cells treated with “cantide” for 15 h. The data should provide some candidate genes that may be involved in antitumor effect of “cantide”, and it is helpful to make a further investigation on the molecule mechanism. It can be concluded that the prepared oligonucleotide microarray can be used to investigate the gene expression profile of tumor-associated genes and provide technical platform for clinical diagnosis and basic research.

Key words tumor-associated gene, oligonucleotide microarray, cantide, gene expression profile

* This work was supported by grants from Medical and Health Research Funds of PLA (01Z019) and Science Research Funds of Beijing (H010210220113).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, Fax: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: April 8, 2003 Accepted: June 2, 2003