

RASSF1A 对黑色素瘤 A375 细胞基因网络的影响*

易 梅^{1, 2)} 李 吉¹⁾ 粟 娟¹⁾ 张江林¹⁾ 陈 翔¹⁾ 杜乾君¹⁾
向 波^{2, 3)} 熊 炜^{2, 3)} 李小玲^{2, 3)**} 谢红付^{1)**}

(¹⁾中南大学湘雅医院皮肤性病科, 长沙 410008; ²⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078;

³⁾中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院(湖南省肿瘤医院), 长沙 410013)

摘要 RASSF1A (Ras association domain family 1 isoform A)是定位于染色体 3p21.3 区域的抑癌基因, 编码一个由 340 个氨基酸残基构成的微管相关蛋白。该基因在包括恶性黑色素瘤在内的多种肿瘤中因启动子高甲基化而表达沉默。本研究建立了 RASSF1A 稳定表达的恶性黑色素瘤 A375 细胞系, 通过全基因组表达谱基因芯片分析 RASSF1A 过表达对 A375 细胞基因表达谱的影响, 发现 RASSF1A 引起 184 个基因表达上调, 26 个基因表达下调。通过 Realtime RT-PCR 对部分差异表达基因进行验证, 结果表明与芯片筛选结果一致。RASSF1A 影响的差异表达基因功能上归属于细胞生长与增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞间黏附、信号传导等生物过程。采用 STRING 软件构建了 RASSF1A 影响的差异表达基因调控网络, 结果表明 RASSF1A 调控的差异表达基因构成一个高连接度的基因网络。其中, 炎症细胞因子、转录因子位于网络中央。RASSF1A 通过影响炎症细胞因子与转录因子之间的表达, 影响 A375 细胞基因网络, 调节黑色素瘤恶性生物学行为。

关键词 RASSF1A, 恶性黑色素瘤, 基因微阵列, 基因调控网络

学科分类号 R75, Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00246

基因调控网络(gene regulatory network)是指细胞内(或特定一个基因组内)基因和基因之间的相互作用关系所形成的网络, 几乎所有的生命活动都是受到基因网络的调控。孤立地研究单个基因及其表达难以真实反映生命现象的内在规律。后基因组时代, 以系统的观点来研究高度复杂的生命现象是生命科学研究的趋势。构建基于芯片数据的基因调控网络, 找到最能反映基因之间相互关系的网络表达特征, 具有十分重要的生物学意义。RASSF1A (Ras association domain family 1 isoform A)是定位于染色体 3p21.3 区域的抑癌基因^[1-3]。研究发现, RASSF1A 具有促进细胞凋亡、诱导细胞周期 G1-S 期阻滞和诱导细胞衰老的功能^[4-5]。本研究发现过表达 RASSF1A 抑制了恶性黑色素瘤 A375 细胞生长。全基因组表达谱芯片分析发现 RASSF1A 引起 A375 细胞 184 个基因表达上调, 26 个基因表达下调。生物信息学分析表明, RASSF1A 影响的差异表达基因主要与细胞死亡、细胞增殖、细胞周期、

细胞运动和炎症免疫应答等过程相关, 主要涉及促肾上腺皮质激素释放激素信号通路(corticotropin releasing hormone signaling)、TGF- β 等信号通路。采用 STRING 软件构建基于芯片数据的差异表达基因网络, 结果发现, RASSF1A 影响的差异表达基因相互关联, 构成一个高连接度的基因调控网络, 由参与细胞死亡、细胞增殖、细胞周期、细胞运动和免疫应答过程的子网络(sub-network)构成, 其中 IL-6、c-Jun、c-Fos 等炎症细胞因子、转录因子构成网络节点。采用 RT-PCR 对 IL-6、c-Jun、c-Fos 组成的子网络及其靶基因 p21^{Waf1/Cip1} 进行检测。结

* 国家自然科学基金(81102065, 81171930), 教育部高等学校博士学科点基金(20110162120009), 中南大学自由探索计划(201012200017, 2011QNZT138)资助项目。

** 通讯联系人。

李小玲. Tel: 0731-82355400, E-mail: lixl@xysm.net

谢红付. Tel: 0731-84327128, E-mail: xiehongfu@tom.com

收稿日期: 2013-06-09, 接受日期: 2013-08-27

果显示 RASSF1A 引起 IL-6、c-Jun、c-Fos 和 p21^{Waf1/Cip1} 表达上调。该研究结果提示, RASSF1A 可能通过调节炎症细胞因子与转录因子的表达与相互作用影响 A375 细胞基因网络, 从而抑制黑色素瘤细胞生长。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染

以人胎脑 cDNA 文库质粒为模板, PCR 扩增人 RASSF1A 基因全长开放阅读框(open reading frame, ORF), 两端携带 *EcoR* V 和 *EcoR* I 酶切位点, 酶切后连接 pIRES.neo3 载体。重组质粒经 *EcoR* V 和 *EcoR* I 酶切, 阳性克隆经测序证明 RASSF1A 基因正确插入。人恶性黑色素瘤细胞 A375 购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。细胞用含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养。pIRES.neo3 和 pIRES-RASSF1A 质粒采用 lipofactamin 2000 转染 A375 细胞, 200 mg/L G418 筛选 2 周, 所有 G418 抗性克隆消化后混合为池克隆扩大培养, 用于后续实验。

1.2 生长曲线测定

消化细胞制备单细胞悬液, 细胞计数仪计数细胞调整至 10⁴/ml, 接种 24 孔板, 每孔接种 1 ml, 5% CO₂, 37℃ 培养。每天消化细胞计数, 设置 3 个复孔, 计数细胞数, 绘制生长曲线。

1.3 寡核苷酸芯片杂交

培养稳定转染细胞及对照细胞, 采用 TRIzol 抽提总 RNA。每样品取 1~15 μg 总 RNA, 用 RNA free DNase I (TAKARA 公司) 消化痕量 gDNA, 以 T7-Oligo(dT) Promoter 引物逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 在 T7 RNA Polymerase 和生物素标记核苷酸反应下, 经体外转录合成生物素标记 cRNA, 纯化标记后 cRNA, 与 Affymetrix 公司 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 芯片杂交。杂交后芯片清洗染色, 采用 Affymetrix 公司 Scanner 3000 7G 扫描信号。

1.4 定量 RT-PCR

分别提取空载体转染 A375 细胞和 RASSF1A 转染 A375 细胞总 RNA(方法同 1.2)。用 RNA free DNase I (TAKARA 公司)消化痕量 gDNA, 苯酚 / 氯仿抽提。取 2 μg 消化后的 RNA 采用反转录试剂盒(Promega 公司)制备 cDNA。采用 iQ5 Real-time PCR detection systems(Bio-Rad 公司), SYBR Premix

DimerEraser (TAKARA 公司) 进行实时定量 RT-PCR 扩增。对部分基因采用 RT-PCR 凝胶电泳检测。用于 PCR 扩增的基因引物见表 1。

Table 1 List of the sequences of primers used in RT-PCR analysis

Genes	Primers sequence	Annealing temperature/℃
RASSF1A-F	5' GCAAGTTTGCACCTCTTTGA 3'	55
RASSF1A-R	5' TGCAGGATACGTAGGAAGTT 3'	
RASSF2-F	5' GGAGAGTGATATGAAGAGCG 3'	55
RASSF2-R	5' AGGTCTTCAGATGCAAGAGA 3'	
CDC42EP3-F	5' GATAAAGGCAGCTAAAACGA 3'	55
CDC42EP3-R	5' TGTGCAAGTGTTCCTCTTTG 3'	
TGFBI-F	5' CAACAGACCTCAGGAAAGAG 3'	55
TGFBI-R	5' GGCTCACATCTCATTATGGT 3'	
DUSP1-F	5' GAAGGACATTTGGGCTGTGT 3'	55
DUSP1-R	5' GCTCTTGTCTGTTCTCGGG 3'	
RhoB-F	5' TTATTTAAGGGTGGTGATGG 3'	55
RhoB-R	5' ACTTCTAGGACAGGCACAAA 3'	
LAMB1-F	5' TTCTCCAGTTGCTAGCTTTC 3'	55
LAMB1-R	5' CATGATAAGGATCTTGGGAA 3'	
ITGB2-F	5' GGAAGTGTCTCAGGACTTTACG 3'	60
ITGB2-R	5' AGCTGCTGACCTTGAACCT 3'	
JUN-F	5' TGTACCTGATGCTATGGTCA 3'	55
JUN-R	5' CTTTGTGAAAATCTGCCACC 3'	
THBD-F	5' TACGGGAGACAACAACACCA 3'	55
THBD-R	5' AAGTGAAGCTCGCAGAGGAA 3'	
CCND2-F	5' GAAGAGGCTGCTTCTCTACA 3'	55
CCND2-R	5' ACTTCCTCTCCAAAACCTC 3'	
GPR37-F	5' AGGAGTCCTATGGAGCCTAC 3'	55
GPR37-R	5' AAGGCAGAAGAAGATGATGA 3'	
MAGEA1-F	5' GGCCAAGCACCTCTGTATC 3'	55
MAGEA1-R	5' CAGCATTTCTGCCTTTGTGA 3'	
ICAM3-F	5' GGTACTTATCAGTGCCAAGC 3'	55
ICAM3-R	5' CTCCTAACATGGTAACTGC 3'	
IL6-F	5' GGCACTGGCAGAAAAACAACC 3'	55
IL6-R	5' TTTGTGGTTGGGTGAGGGGT 3'	
p21cip1-F	5' GCACTCAGAGGAGGCGCCAT GTCA 3'	55
p21cip1-R	5' GGGGCCCCGTGGGAAGGTAG AG 3'	
GAPDH-F	5' AACGGATTTGGTCGTATTGG 3'	55
GAPDH-R	5' TTGATTTTGGAGGGATCTCG 3'	

1.5 差异表达基因的生物信息学分析

通过 Ingenuity IPA Software 分析差异表达基因所属的功能分类。采用 STRING[®](<http://string-db.org/>)

软件构建 RASSF1A 影响的黑色素瘤细胞差异表达基因调控网络。

2 结 果

2.1 RASSF1A 稳定转染抑制黑色素瘤 A375 细胞生长

PCR 扩增人 RASSF1A 基因全长开放阅读框 (ORF), 两端携带 *EcoR* V 和 *EcoR* I 酶切位点. 纯化 PCR 产物和空白载体 pIRES.neo3 经 *EcoR* V 和 *EcoR* I 酶切, 酶切产物回收, 连接后转化大肠杆菌 JM109, 抽提质粒经 *EcoR* V 和 *EcoR* I 酶切鉴定后阳性克隆送测序, 获得 RASSF1A ORF 正确插入的载体. 转染 A375 细胞, 200 mg/L G418 筛选 2 周后获得抗性克隆, 将所有抗性克隆(>10 个)消化后混合为池克隆, 扩大培养, 抽提 RNA, 逆转录为 cDNA, RT-PCR 检测发现 RASSF1A 转染的 A375 细胞扩增得到 RASSF1A 基因片段, 而空白载体 pIRES.neo3 转染组无 RASSF1A 表达(图 1), 结果表明 RASSF1A 稳定细胞系构建成功. 生长曲线检测发现, 稳定转染 RASSF1A 基因后 A375 细胞生长速度减慢(图 1).

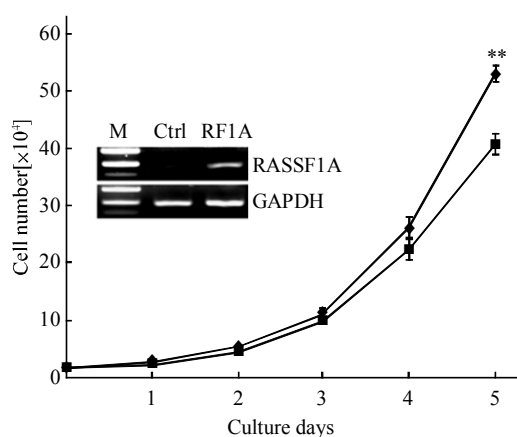


Fig. 1 Over-expression of RASSF1A suppress the growth of A375 cells

The expression of RASSF1A was determined by RT-PCR analysis. Tumor cell growth kinetics were determined by longitudinal cell counts using a coulter particle analyzer. $**P < 0.01$. $\blacklozenge$: Ctrl/A375; $\blacksquare$: RF1A/A375.

2.2 RASSF1A 表达引起 A375 细胞基因表达谱改变

抽提对照细胞与 RASSF1A 稳定转染细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 体外转录制备生物素标记

的 cRNA 探针, 与 Affymetrix 公司的 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 芯片杂交. 杂交后芯片清洗染色, 采用 Affymetrix 公司 Scanner 3000 7G 扫描信号. 根据芯片位点杂交的信号强度, *t* 检验结合两倍差异的标准, 确定差异表达基因. 筛选得到受 RASSF1A 基因调控的差异表达基因共 210 个, 其中上调 184 个, 下调 26 个基因. 我们选取了部分表达上调的基因 (RASSF2、CDC42EP3、TGFB1、DUSP1、RhoB、LAMB1、ITGB2、Jun) 以及下调基因 (CCND2、GRP37、MAGEA1 和 ICAM3) 进行 Realtime RT-PCR 验证, 结果表明 RASSF2、CDC42EP3、TGFB1、DUSP1、RhoB、LAMB1、ITGB2、Jun 基因 mRNA 在 RASSF1A 稳定表达 A375 细胞中表达上调, 而 CCND2、GRP37、MAGEA1 和 ICAM3 基因 mRNA 在 RASSF1A 稳定表达 A375 细胞中较对照细胞下调 (图 2). Realtime RT-PCR 检测得到的基因表达趋势与基因芯片检测结果基本一致, 相关系数 $r^2 = 0.9534$ (图 3), 说明芯片结果如实反映了 RASSF1A 稳定转染前后 A375 细胞基因表达的变化.

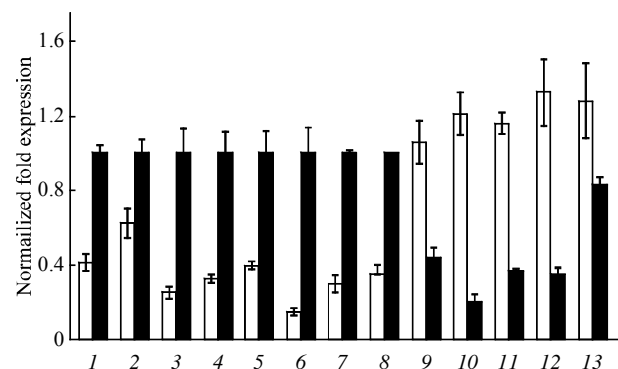


Fig. 2 Realtime RT-PCR analysis of differential expressed genes modulated by RASSF1A overexpression in A375 cells

Total cellular RNA was isolated from cultured cells using a Trizol reagent. The RNA samples were then treated with DNase to remove contaminated DNA and one microgram of these RNA samples was reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, in accordance with the manufacturer's instructions. qPCR was then performed using the SYBR Premix DimerEraser kit and iCycler iQ5 multi-color detection system. The primers used for PCR amplification were described in Table 1. $\square$: IRES/A375; $\blacksquare$: RASSF1A/A375. 1: RASSF2; 2: CDC42EP3; 3: TGFB1; 4: DUSP1; 5: RhoB; 6: LAMB1; 7: ITGB2; 8: JUN; 9: THBD; 10: CCND2; 11: GRP37; 12: MAGEA1; 13: ICAM3.

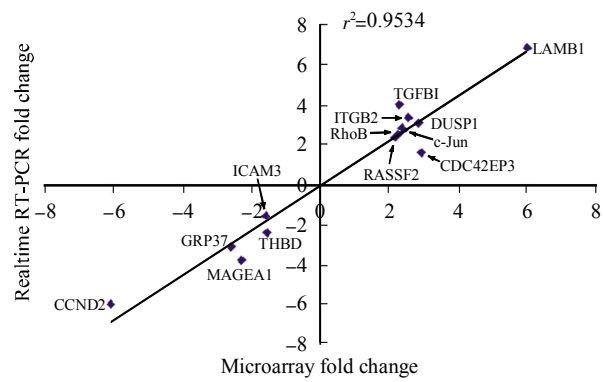


Fig. 3 Linear regression analysis and the coefficient of variation between realtime RT-PCR data and microarray data

Thirteen genes were selected for realtime-PCR. The "fold-change" (Log2) of the RNA transcripts was calculated by using the RASSF1A transfected versus the matched vector transfected for both PCR and microarray data. Linear regression analysis was performed and the coefficient of variation was calculated.

2.3 RASSF1A 调控的 A375 细胞差异表达基因的功能分类

将所有差异表达基因输入 Ingenuity IPA Software, 分析受 RASSF1A 影响的差异表达基因所属的功能和通路. 分析结果表明, 差异表达基因生物学功能主要与细胞死亡、细胞生长与增殖、细胞发育、细胞运动、细胞周期调控、细胞免疫应答和炎症等生物过程有关(图 4a). 受 RASSF1 影响的 A375 差异表达基因主要参与促肾上腺皮质激素释放

激素信号通路 (corticotropin releasing hormone signaling)、TGF- β 信号通路(图 4b). 表 2 列举了 Ingenuity IPA 分析得到的前 5 条信号通路成员 (表 2). 其中有 84 个差异表达基因参与细胞死亡调节, 包括 c-Jun、c-Fos、RhoB、MAP3K5(ASK1)等基因. 有 88 个差异表达基因参与细胞生长与增殖调控, 39 个差异表达基因参与细胞周期进程. IL-6、c-Jun、c-Fos 等分子同时参与了细胞死亡、生长与增殖、运动和细胞周期调控等多个生物学过程.

2.4 RASSF1A 调控的 A375 细胞差异表达基因调控网络

通过基因芯片和 IPA 分析, 我们获得了 RASSF1A 对 A375 细胞基因表达的影响及差异表达基因的功能分类, 然而, 这些差异表达基因之间是否存在内在联系仍未可知. STRING(search tool for the retrieval of interacting genes/proteins)软件根据基因组、高通量实验、共表达、已有知识等 4 个资源数据, 生成蛋白质相互作用(包括直接和间接作用)网络. 我们将所有差异基因输入 STRING 数据库, 在线分析差异基因构成的基因网络. 结果发现 RASSF1A 影响的差异表达基因构成一个高连接度的基因网络(图 5). 其中, 转录因子位于该网络的中央, 与为数众多的差异表达基因存在功能互作, 构成网络节点. 尤其是 RASSF1A 转染后表达上调的 EGR1、c-Fos、c-Jun 转录因子位于整个网络核心, 与许多基因相关联(图 5). 而炎症细胞因子, 如 IL-6、IL-8 等, 则紧邻 c-Fos、c-Jun 等核心转录因子, 并且与之存在互作(图 5).

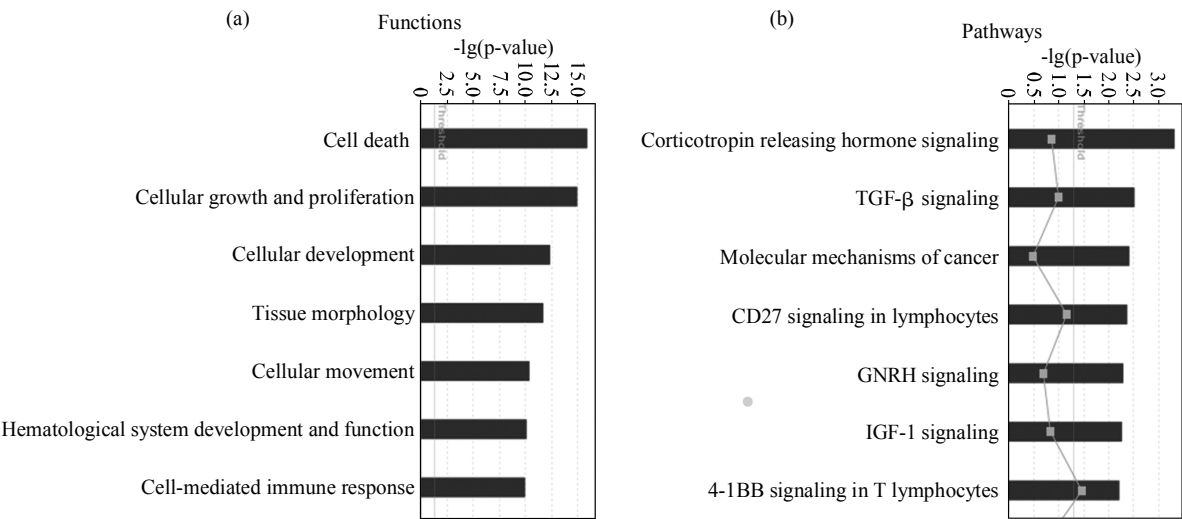


Fig. 4 The top 7 functions and pathways of differential expressed genes revealed by IPA analysis

Table 2 The top 5 Associated Pathways affected by RASSF1A expression in A375 cells	
Associated pathways	Genes in ingenuity network
Cell death	SOCS3, CTGF, IFI16, MAP1B, NLRP1, IL6, KIAA0562, IL7R, NR4A3, STK4, HNRNPA1, PEG10, EGR2, RHOB, GPR37, TNFSF9, TRIB2, BCHE, PAX2, HIPK2, KLF2, CLCA2 (includes EG:9635), IL8, GJA1, ATF3, FOXP1, THBS1, EGR3, EGR4, HBEGF, IER3, CSF3, IL7, INHBA, FOSB, IGF2, CCND2, CD70, DUSP1, DUSP19, BHLHE40, ST3GAL1, CFLAR, SIRPA, PMEPA1, FYN, ID2, GDF15, SAT1, RPS6, MAP3K5 (includes EG:4217), NUAK2, ETV6, TRIB1, DUSP5, JUN, EDN1, MCAM, PLK2, GAS1, SERPINA1, VDR, COL18A1, CD24, PTGER4, HEY1, TGFBI, EGR1, SMAD6, CDC42EP3, NFKBIZ, DLC1, ITGB2, FOS, LDLR, NR4A2, NF1, CBS, RASSF2, NR4A1, TGFA, MEF2C, PTGS2, AMIGO2
Cellular growth and proliferation	SOCS3, CTGF, IFI16, IL13RA2, IL6, SPRY4, IL7R, STK4, NR4A3, HNRNPA1, PEG10, EGR2, RHOB, RORA, TNFSF9, LAMB1, PXDN, PAX2, HIPK2, KLF2, CLCA2 (includes EG:9635), IL8, PFKFB3, GJA1, ATF3, H19, FOXP1, THBS1, EGR3, EGR4, HBEGF, IER3, CSF3, MAFF, IL7, INHBA, STC1, FOSB, IGF2, CCND2, DUSP1, CD70, BHLHE40, CFLAR, EBI3, SIRPA, PMEPA1, FYN, ID2, GRB14, GDF15, SAT1, RPS6, ETV6, TRA2A, TRIB1, DUSP5, JUN, PTPRJ, EDN1, PLK2, MCAM, GAS1, FABP4, SERPINA1, VDR, COL18A1, CD24, EED, PTGER4, HEY1, SUZ12, TGFBI, EGR1, SMAD6, HNRNPD, DLC1, GRB10, FMN2, ITGB2, FOS, NR4A2, LDLR, NF1, TBC1D8, NR4A1, TGFA, PTGS2
Cellular movement	SOCS3, CTGF, IL13RA2, MAP1B, IL6, SPRY4, RHOB, TNFSF9, LAMB1, PAX2, MYO5B, HIPK2, KLF2, IL8, GJA1, PODXL, ATF3, THBS1, HBEGF, CSF3, IL7, INHBA, STC1, IGF2, DUSP1, EBI3, SIRPA, FYN, ID2, GDF15, MAP3K5 (includes EG:4217), NUAK2, ETV6, TRIB1, JUN, EDN1, PTPRJ, MCAM, NAV1, FABP4, SERPINA1, VDR, COL18A1, CD24, PTGER4, HEY1, TGFBI, EGR1, NFKBIZ, DLC1, CXCL6, FOS, ITGB2, LDLR, NR4A2, NF1, TGFA, PTGS2
Cell-mediated immune response	SOCS3, FYN, ID2, IL13RA2, RPS6, IL6, IL7R, JUN, EGR2, RORA, CD24, KLF2, FOXP1, EGR3, THBS1, EGR1, IER3, IL7, INHBA, FOS, ITGB2, IGF2, CD70, ST3GAL1, NR4A1, CFLAR, PTGS2, EBI3, SIRPA
Cell cycle	FYN, ID2, IFI16, GDF15, RPS6, IL6, ETV6, NR4A3, JUN, EDN1, RHOB, PLK2, GAS1, HIPK2, IL8, ABHD5, GJA1, H19, ATF3, THBS1, EGR1, HBEGF, IER3, CSF3, IL7, INHBA, GRB10, FOS, IGF2, CCND2, NR4A2, CD70, DUSP1, BHLHE40, RASSF2, NR4A1, TGFA, SIK1, PTGS2

2.5 RASSF1A 调节 A375 细胞以转录因子为节点的细胞死亡基因网络

为了更细致地了解 RASSF1A 影响的差异表达基因功能上的关联，我们进一步将 IPA 分析获得的细胞死亡相关差异表达基因输入 STRING 数据库，结果发现，这些细胞死亡相关基因构成一个基因调控网络(图 6)，转录因子 EGR1、c-Fos、c-Jun 位于网络中央，而 TNFSF9、DLC1、STK4 等已知参与细胞凋亡的效应分子位于网络外围，炎症因子 IL-6、IL-8 等则紧邻 Fos、Jun 等转录因子，构成网络节点之一。

2.6 RASSF1A 调节 A375 细胞以转录因子为节点的细胞周期基因网络

将 IPA 分析获得的细胞周期相关基因输入 STRING 数据库，结果发现，受 RASSF1A 影响的细胞周期相关基因也构成一个基因调控网络，转录因子 EGR1、c-Fos、c-Jun 构成网络节点，而 CCND2、GAS1 等细胞周期调节分子位于网络外

围。炎症细胞因子 IL-6、IL-8 同样参与了细胞周期调控网络，在网络当中紧邻转录因子 c-Fos、c-Jun (图 7)。

2.7 RASSF1A 调节的炎症因子 IL-6 和转录因子 c-Jun 相互作用网络及初步验证

我们发现炎症细胞因子 IL-6 在 RASSF1A 影响的基因网络中居于中央，同时参与了细胞死亡与细胞周期调控网络。进一步分析发现，IL-6 与 19 个差异基因关联，其中包括转录因子 c-Jun、c-Fos、ATF3、EGR1(图 8)。而转录因子 c-Jun 又与另外 38 个差异表达基因相关联，构成一个小网络(图 9)。提示 RASSF1A 有可能通过促进 IL-6 表达，影响 c-Jun 介导的信号通路，调节下游基因表达。随后，采用 RT-PCR 检测 IL-6、c-Jun、c-Fos 和 p21^{Waf1/Cip1} mRNA 表达水平。结果显示，RASSF1A 稳定表达上调 IL-6、c-Jun、c-Fos 和 p21^{Waf1/Cip1} mRNA 表达水平(图 10)。

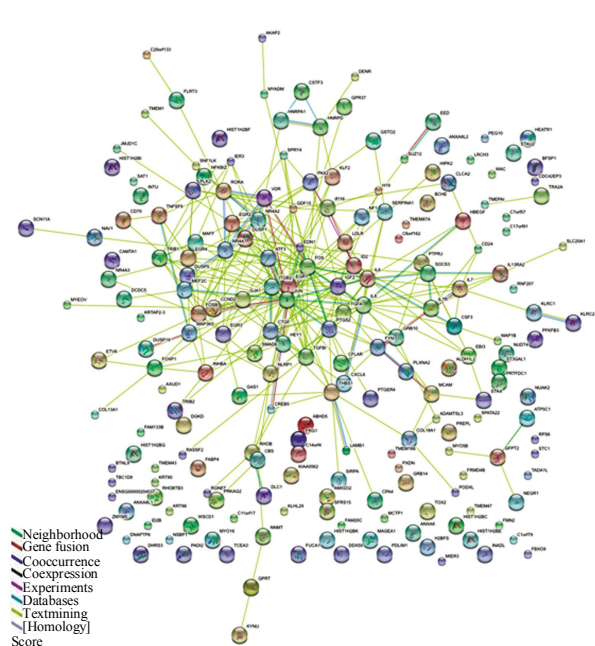


Fig. 5 Global view of RASSF1A modulated gene network visualization on the STRING based on evidence from a variety of sources

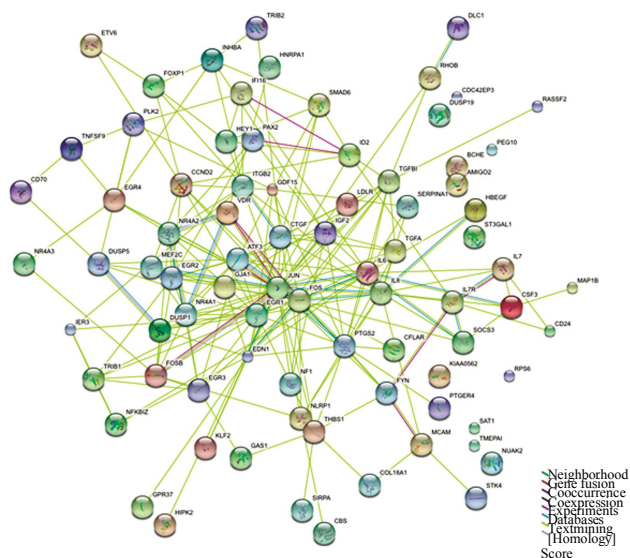


Fig. 6 RASSF1A modulated cell death network visualization on the STRING based on evidence from a variety of sources

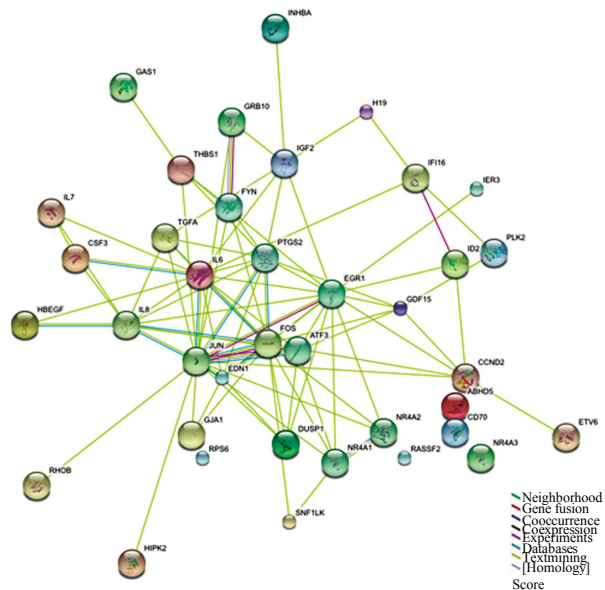


Fig. 7 RASSF1A modulated cell cycle network visualization on the STRING based on evidence from a variety of sources

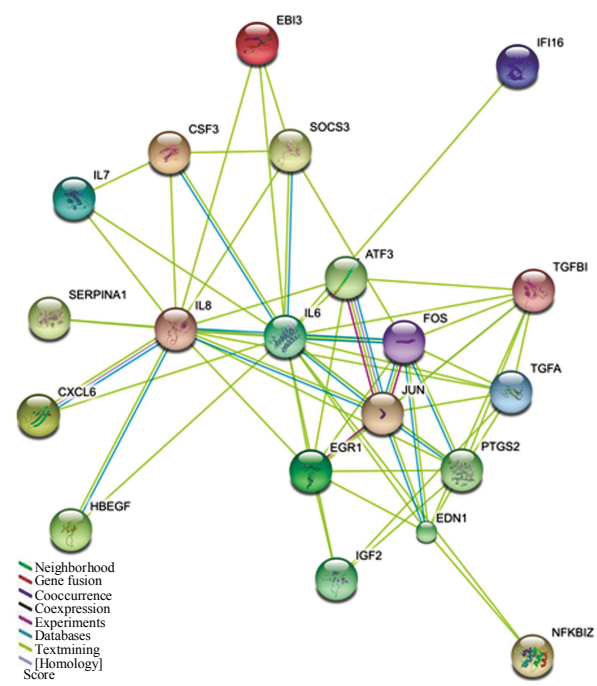


Fig. 8 Subnetwork centered by IL-6 from STRING based on evidence from a variety of sources

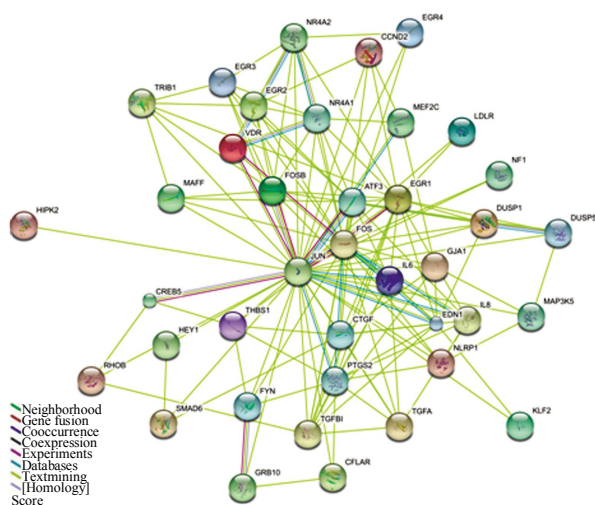


Fig. 9 Subnetwork centered by c-Jun from STRING based on evidence from a variety of sources

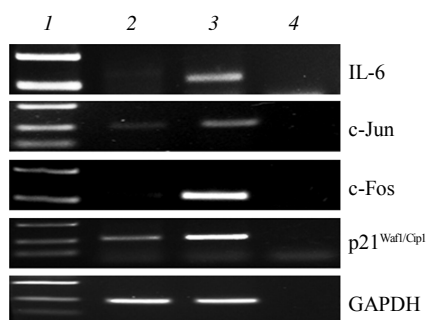


Fig. 10 The expression of IL-6, c-Jun, c-Fos, p21^{Waf1/Cip1} network assayed by RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from cultured cells using a Trizol reagent. The RNA samples were then treated with DNase to remove contaminated DNA and one microgram of these RNA samples was reverse-transcribed into cDNA using M-MLV reverse transcriptase, in accordance with the manufacturer's instructions. The expression level of IL-6, c-Jun, c-Fos, p21^{Waf1/Cip1} was determined by RT-PCR. The primers used for PCR amplification were described in Table 1. 1: DL2000; 2: IRES/A375; 3: RF1A/A375; 4: H₂O.

3 讨 论

利用表达谱芯片大规模、高通量和平行处理的优点, 可以绘制一张反映正常、异常和受控条件下所有基因表达的时空图, 使人类的基因图从一维走向多维. 并且, 通过生物信息学方法, 对各基因的表达进行比较和统计分析, 确定不同基因在表达上的相关性, 从而找到未知基因的功能信息和已知基

因的未知功能, 并阐明特定生物学行为中所包含的分子机制^[7-8]. 本研究构建了稳定表达 RASSF1A 基因的黑色素瘤 A375 细胞系, 发现稳定表达 RASSF1A 抑制了 A375 细胞的生长. 基因芯片筛查发现, RASSF1A 表达引起 A375 细胞基因表达谱改变, 受其影响的差异表达基因存在广泛的相互作用, 构成一个基因调控网络, 其中受 RASSF1A 影响的炎性细胞因子和转录因子构成基因调控网络的节点.

RASSF1A 是 2000 年新发现的一个抑癌基因, 该基因定位于染色体 3p21 区域^[3]. RASSF1A 蛋白编码 340 个氨基酸残基, 分子质量约为 39 ku. 该基因广泛表达于人体各种组织和细胞, 在多种实体瘤组织和细胞系中因启动子高甲基化表达沉默^[9]. 多项研究报道在恶性黑色素瘤组织和细胞系中, RASSF1A 基因启动子存在高甲基化修饰^[10-16]. 我们前期研究表明, RASSF1A 蛋白在恶性黑色素瘤组织表达下调. 在 A375 细胞中转染 RASSF1A 基因, 引起 A375 细胞周期 G1-S 期阻滞, 促进细胞凋亡^[17]. 为了系统阐明 RASSF1A 抑制 A375 细胞的分子机制, 我们利用全基因组基因表达芯片构建了 RASSF1A 调控的 A375 基因差异表达谱, 结果表明在 A375 细胞中稳定表达 RASSF1A 基因, 引起 184 个表达上调, 26 个基因表达下调. 生物信息学分析表明, 差异表达基因生物学功能主要与细胞的死亡、生长与增殖、发育、运动、周期调控、免疫应答和炎症等生物过程有关.

Chow 等^[18]采用基因芯片筛查 RASSF1A 表达调控的鼻咽癌 C666-1 细胞差异表达基因, 发现 RASSF1A 引起 27 个基因表达上调, 30 个基因表达下调. 通过与我们的芯片结果相比较可以发现, RASSF1A 在不同细胞系之间调控的靶基因在功能分类上比较接近, 甚至具有相同的靶基因. 例如 ATF3 在 RASSF1A 转染的鼻咽癌 C666-1 细胞和恶性黑色素瘤 A375 细胞中都表达上调, 而 GAS1 在 RASSF1A 转染的两种细胞都表达下调. 我们也比较了 RASSF1A 表达调控的肺癌 A549 细胞差异表达基因^[19]. DUSP1 在 A375 细胞和 A549 细胞中都受 RASSF1A 表达上调. 还有一些基因家族的不同成员, 在两种细胞内呈现相同的变化趋势, 如 CCND3 在 RASSF1A 转染的 A549 细胞内表达下调, CCND2 则在 RASSF1A 转染的 A375 细胞中下调, 两者同属于 G1 期细胞周期素 cyclin D 家族成员, 参与细胞周期 G1-S 期限制点的调控. 通过比

较在三种不同肿瘤细胞中调控的差异基因, 可以发现, RASSF1A 调控的不同肿瘤细胞差异表达基因在功能分类上比较接近, 都涉及到细胞转录调控、细胞信号转导、细胞骨架与黏附等生物学过程, 表明 RASSF1A 基因在不同肿瘤细胞中都通过影响这一类基因的表达参与调节细胞的转录、信号传导、黏附等生物学过程。

基因调控网络以系统的观点从基因之间相互作用的角度揭示复杂的生命现象, 是功能基因组学研究的重要内容。调控网络, 涉及到的不再是个别的基因产物或蛋白分子, 也不再是单一的信号通路或代谢途径, 而是由众多的基因、非编码 RNA、蛋白质和代谢小分子等各种生物分子元件作为“网络节点”, 彼此间通过复杂的相互作用形成多维的和动态的“互联网”, 调节细胞生物行为的走向。我们运用 STRING 在线软件对 RASSF1A 调控的 A375 差异表达基因进行基因网络分析, 结果发现 RASSF1A 调控的 A375 差异表达基因构成一个基因网络, RASSF1A 影响的差异表达炎症细胞因子与转录因子位于网络的中央。

IL-6 是一个多功能炎症细胞因子, 具有抑制恶性黑色素瘤细胞生长、增殖的作用^[20-22]。IL-6 的表达主要通过转录水平进行调节^[23]。IL-6 启动子区域存在多个转录因子结合位点, 包括 AP-1、SP1、NF- κ B 等^[24-25], 其中 NF- κ B 是最为关键的转录因子^[25]。Tuyt 等^[23]研究发现在正常黑色素细胞中, NF- κ B 依赖的 IL-6 表达受 ERK1/2、JNK、c-Jun 调节。功能失活的 Raf 和 JNK1 引起 IL-6 启动子活性降低, 而 c-Jun 可以与 NF- κ B 协同作用, 增强 NF- κ B 的转录活性, 促进 IL-6 表达。Vivi Ann 等发现 IL-6 上调 p21^{Waf1/Cip1} 表达诱导恶性黑色素瘤细胞周期 G1-S 期阻滞, IL-6 上调 p21^{Waf1/Cip1} 表达是通过激活转录因子 STAT3、STAT1 结合至 p21^{Waf1/Cip1} 启动子。在 IL-6 抵抗的晚期黑色素瘤细胞中, IL-6 诱导 p21^{Waf1/Cip1} 表达和抑制细胞增殖的作用丧失。在 IL-6 抵抗的细胞中, 尽管 IL-6 可以激活转录因子 STAT3、STAT1 结合至 p21^{Waf1/Cip1} 启动子, 却不能诱导其表达增加, 这说明晚期黑色素瘤细胞 IL-6 抵抗有着更为复杂的分子机制^[20]。Jan-Jacob 等^[26]研究发现, IL-6 处理可以引起 c-Jun、c-Fos 与 STAT3 结合形成复合物, 共同结合于 IL-6 靶基因启动子区域的 IL-6 反应元件(interleukin 6 response element, IRE), 增强 STAT3 对 IL-6 靶基因的转录。过表达 c-Jun、c-Fos 显著增强了 IL-6 对靶基

因的诱导作用; 相反, 缺失转录激活结构域或 DNA 结合结构域的 c-Jun 突变体则不能与 STAT3 相互作用^[26]。然而转移性恶性黑色素瘤组织中 c-Jun 的 mRNA 表达水平降低^[27]。

在肺癌细胞中过表达 RASSF1A, 上调 p21^{Waf1/Cip1} 表达水平^[5]。在本研究中, RASSF1A 稳定转染 A375 细胞中 p21^{Waf1/Cip1} 较空载体转染细胞上调 1.79 倍, 由于差异小于 2 倍, 因而未纳入差异基因调控网络。我们通过 RT-PCR 检测了 IL-6、c-Jun、c-Fos 和 p21^{Waf1/Cip1} 基因 mRNA 表达水平, 结果表明转染 RASSF1A 后均表达上调。我们注意到, 在对照细胞中 IL-6、c-Jun、c-Fos 表达水平较低, 尤其是 IL-6 和 c-Fos, 在对照细胞中几乎没有表达, 而在转染 RASSF1A 后表达显著增加。由此, 我们推测, RASSF1A 可能通过影响 IL-6、c-Jun、c-Fos 参与构成的基因调控网络调节 A375 细胞增殖相关基因表达。受 RASSF1A 影响的 IL-6 与 c-Jun、c-Fos 基因, 有可能相互之间存在反馈调节。RASSF1A 通过调节这一个细胞因子-转录因子基因网络, 促进 p21^{Waf1/Cip1} 表达, 发挥抑制黑色素瘤 A375 细胞周期和增殖的作用。

综上所述, 本研究采用基因芯片筛选 RASSF1A 调控的黑色素瘤 A375 差异表达基因, 通过 realtime RT-PCR 对芯片结果进行验证。通过 Ingenuity IPA Software 对差异表达基因进行功能分类, 结果发现 RASSF1A 影响的差异表达基因主要参与细胞的死亡、生长与增殖、发育、运动、周期调控、免疫应答和炎症等生物学过程。RASSF1A 影响的差异表达基因构成一个复杂的基因调控网络, 炎症细胞因子 IL-6 与转录因子 c-Jun、c-Fos 等构成网络的节点, 同时参与调控细胞死亡、细胞周期等过程。本研究表明, RASSF1A 通过调节炎症细胞因子与转录因子的表达与相互作用, 影响黑色素瘤细胞基因调控网络。

参 考 文 献

- [1] Zeng Z, Zhou Y, Zhang W, *et al.* Family-based association analysis validates chromosome 3p21 as a putative nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus. *Genetics in Medicine*, 2006, **8**(3): 156-160
- [2] Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research*, 2004, **64**(6): 1972
- [3] Dammann R, Li C, Yoon J H, *et al.* Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. *Nature Genetics*, 2000, **25**(3): 315-319

- [4] Yi M Y J, Chen X, Li J, *et al.* RASSF1A suppresses melanoma development by modulating apoptosis and cell-cycle progression. *J Cell Physiol*, 2011, **226**(9): 2360–2369
- [5] Thaler S, Hhnel P S, Schad A, *et al.* RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Research*, 2009, **69** (5): 1748–1757
- [6] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, *et al.* The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39** (suppl 1): D561–568
- [7] Brown P O, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*, 1999, **21** (1 Suppl): 33–37
- [8] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science(Washington)*, 1995, **270** (5235): 467–470
- [9] Agathangelou A, Cooper W N, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research*, 2005, **65** (9): 3497–3508
- [10] Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, *et al.* Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Research*, 2003, **63** (7): 1639–1643
- [11] Hoon D S B, Spugnardi M, Kuo C, *et al.* Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene*, 2004, **23**(22): 4014–4022
- [12] Reifemberger J, Knobbe C B, Sterzinger A A, *et al.* Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *International J Cancer*, 2004, **109** (3): 377–384
- [13] Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, *et al.* Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, **126** (2): 422–431
- [14] Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C, *et al.* Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma. *Histology and Histopathology*, 2007, **22**(9): 1005–1015
- [15] Tanemura A, Terando A M, Sim M S, *et al.* CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 2009, **15** (5): 1801–1807
- [16] Tellez C S, Shen L, Estéicio M R H, *et al.* CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines. *Melanoma Research*, 2009, **19** (3): 146–155
- [17] Yi M, Yang J, Chen X, *et al.* RASSF1A suppresses melanoma development by modulating apoptosis and cell-cycle progression. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, **226** (9): 2360–2369
- [18] Chow L S N, Lam C W, Chan S Y Y, *et al.* Identification of RASSF1A modulated genes in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 2005, **25** (2): 310–316
- [19] Agathangelou A, Bièche I, Ahmed-Choudhury J, *et al.* Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Research*, 2003, **63** (17): 5344–5351
- [20] Floerenes V A, Lu C, Bhattacharya N, *et al.* Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene*, 1999, **18** (4): 1023–1032
- [21] Sun W H, Kreisle R A, Phillips A W, *et al.* *In vivo* and *in vitro* characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Research*, 1992, **52** (19): 5412–5415
- [22] Kortylewski M, Heinrich P C, Mackiewicz A, *et al.* Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene*, 1999, **18** (25): 3742–3753
- [23] Tuyt L M L, Dokter W H A, Birkenkamp K, *et al.* Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-κB-dependent IL-6 expression in human monocytes. *The Journal of Immunology*, 1999, **162** (8): 4893–4902
- [24] Tuyt L M L, De Wit H, Koopmans S B, *et al.* Effects of IL-3 and LPS on transcription factors involved in the regulation of IL-6 mRNA. *British Journal of Haematology*, 1996, **92** (3): 521–529
- [25] Akira S, Kishimoto T. NF-IL6 and NF-κB in cytokine gene regulation. *Advances in Immunology*, 1997, **65**: 1–46
- [26] Schuringa J J, Timmer H, Luttickhuizen D, *et al.* c-Jun and c-Fos cooperate with STAT3 in IL-6-induced transactivation of the IL-6 response element (IRE). *Cytokine*, 2001, **14** (2): 78–87
- [27] Yamanishi D T, Buckmeier J A, Meyskens F L. Expression of c-jun, jun-B, and c-fos proto-oncogenes in human primary melanocytes and metastatic melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*, 1991, **97** (2): 349–353

Gene Network Modulated by RASSF1A Over-expression in Melanoma A375 Cells*

YI Mei^{1,2)}, LI Ji¹⁾, SU Juan¹⁾, ZHANG Jiang-Lin¹⁾, CHEN Xiang¹⁾, DU Qian-Jun¹⁾,
XIANG Bo^{2,3)}, XIONG Wei^{2,3)}, LI Xiao-Ling^{2,3)**}, XIE Hong-Fu^{1)**}

¹⁾ Department of Dermatology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾ Cancer Research Institute of Central South University, Changsha 410078, China;

³⁾ Hunan Provincial Tumor Hospital and The Tumor Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine,
Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Gene regulatory networks have an important role in every process of life, including cell differentiation, metabolism, the cell cycle and signal transduction. The RASSF1A is a tumor suppressor gene involved in several growth regulatory and pro-apoptotic pathways. In this study, we have used microarray technology to define differences in the gene expression profiles subsequent to exogenous wild-type RASSF1A in melanoma A375 cells. Gene expression changes were verified in a subset of genes using real time RT-PCR. Association of modulated genes with biological functional groups identified several pathways affected by RASSF1A including cell death, cellular growth and proliferation, and cellular development. GRN of modulated genes were identified using the STRING. Pro-inflammatory factors and transcription factors locates in the center of RASSF1A modulated gene regulatory networks. Our results suggested that RASSF1A might affect melanoma gene regulatory network *via* modulating the expression and interaction between pro-inflammatory factors and transcription factors.

Key words RASSF1A, malignant melanoma, microarray, gene regulatory network

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00246

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81102065, 81171930), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20110162120009) and The Free Exploration Program of Central South University of China(201012200017, 2011QNZT138).

**Corresponding author.

LI Xiao-Ling. Tel: 86-731-82355400, E-mail: lixl@xysm.net

XIE Hong-Fu. Tel: 86-731-84327128, E-mail: xiehongfu@tom.com

Received: June 9, 2013 Accepted: August 27, 2013