

## 研究报告

## 人鼻咽与鼻咽癌及肺癌基因表达谱差异的研究\*

何志巍 许亮国 任彩萍 谢鹭 甘润良 姚开泰<sup>1)</sup>

(湖南医科大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室, 长沙 410078)

**摘要** 研究鼻咽癌、肺癌与正常鼻咽组织基因表达谱差异及筛选鼻咽癌相关基因, 采用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 逆转录标记组织总 RNA, 将 cDNA 探针与有 5 184 个基因或表达序列标签 EST (expression sequence tag) 的高密度 cDNA 微阵列 GF200 杂交, 软件分析表达谱差异. 结果发现三者均呈低表达为主的表达谱, 密度值在 200 以上的基因及 EST 在鼻咽癌有 110 个, 肺癌 134 个而鼻咽组织有 158 个; 5 个 EST 在鼻咽高表达但鼻咽癌低表达, 3 个 EST 在鼻咽癌高表达但正常鼻咽低表达. 结果表明鼻咽癌与正常鼻咽及肺癌组织存在差异表达基因, 可能还有新基因在鼻咽癌发生中起作用; 采用高密度 cDNA 微阵列是一种筛选差异表达基因的快速有效方法.

**关键词** 高密度 cDNA 微阵列, 基因表达谱, 鼻咽癌

**学科分类号** R734.2

多因素多阶段的肿瘤的发生过程中常有多个瘤基因或抑瘤基因的参与, 如胃癌的 p53、APP、DCC、CD44、nm23 等多个基因突变或表达异常; p53、c-myc、PCNA 等基因表达异常或突变参与肺癌的发生<sup>[1]</sup>; 而鼻咽癌与 p53、cyclin D1、c-myc、c-ras 等基因表达异常有关<sup>[2]</sup>, 但是否还存在其他一些相关的、新的基因在鼻咽癌中起作用? 又如何在较大范围内同时观察这些基因的表达变化呢? 本文采用目前国际最新的高密度 cDNA 微阵列技术, 同时检测鼻咽癌、肺癌和成人正常鼻咽组织 5 184 个基因或基因表达序列标签 ESTs (expression sequence tags, ESTs) 的表达差异, 旨在寻找癌组织相对高表达而正常组织低表达及正常组织高表达而癌组织低表达的基因, 进一步阐明鼻咽癌的发生机制.

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

26 例病理诊断为鼻咽低分化鳞状细胞癌 (NPC) 的鼻咽癌组织及 16 例 NPC 对侧鼻咽组织 (NP) 均由湘雅医院耳鼻喉科提供活检组织, 10 例肺癌 (LC) 来自湘雅医院胸外手术病人, 组织均为即刻液氮冻存.

### 1.2 总 RNA 提取及去 DNA 消化处理

用 TRIzol (GIBCO BRL) 抽提组织总 RNA.

DNase I 消化去除 gDNA 后再抽取总 RNA. 分光光度计测浓度和纯度, 以看家基因 G6PDH 设计引物, PCR 扩增检测有无 gDNA 污染. 取 RNA 50 ng 于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外仪检测摄像.

### 1.3 $\alpha$ -<sup>32</sup>P 标记 cDNA 探针及纯化

每样品取 5  $\mu$ g 总 RNA 溶于 8  $\mu$ l DEPC 处理水中, 加 2  $\mu$ l Oligo dT (1 g/L) (Research Genetics, POLY GF), 于 70  $^{\circ}$ C 变性 2 min 即刻置冰上, 再加入 6  $\mu$ l 5 $\times$  链合成缓冲液 (BRL/Life Tech)、1  $\mu$ l DTT 0.1 mol/L (BRL/Life Tech)、1.5  $\mu$ l dNTPs (dATP、dGTP、dTTP 均为 20 nmol/L) (Pharmacia 27-20350-02)、1.5  $\mu$ l SuperScript II RT (200 U/ $\mu$ l) (BRL/Life Tech) 和 10  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (北京亚辉生物公司), 于 37  $^{\circ}$ C, 逆转录 90 min. 用 Sephadex G-50 过柱纯化探针, 其比放射活性计数在  $1 \times 10^8$  cpm 每微克 DNA 以上.

### 1.4 杂交、洗膜及放射自显影

于 5 ml 杂交液 (MicroHyb, Research Genetics) 中加入 5  $\mu$ l Poly dA (1 g/L) (Research Genetics) 和 5  $\mu$ l Cot-1 DNA (1 g/L) (BRL/Life Tech) 42  $^{\circ}$ C 与 GF200 微阵列 (Research Genetics

\* 国家自然科学基金重点项目 (39730200) 和美国中华医学会基金项目 (96-655) 资助.

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1999-04-05, 修回日期: 1999-05-21

Co.) 预杂交 2 h 后, 加入纯化探针 200  $\mu$ l, 42  $^{\circ}$ C 杂交 12 h. 先用 30 ml 2  $\times$  SSC/1% SDS 液 50  $^{\circ}$ C 在杂交管内于杂交炉洗膜一次, 再于 50  $^{\circ}$ C 恒温摇床上用 100 ml 该液洗一次, 每次 20 min, 最后用 0.5  $\times$  SSC/1% SDS 液室温下洗膜 15 min. 用柯达胶片, -70  $^{\circ}$ C 曝光 24 h.

1.5 图像分析

D19 液显影后将 X 胶片用激光扫描仪输入 Pathways (Research Genetics) 分析软件, 对成像的点阵进行密度分析, 得到密度分布和杂交点阵图.

2 结果

2.1 组织总 RNA

提取各组织总 RNA, 经 DNase I 消化后, PCR 检测除阳性对照有扩增带外, 待检 RNA 中均无 DNA 条带.  $A_{260}/A_{280}$  值均在 1.9~2.0 之间, 电泳检测无降解, 见图 1.

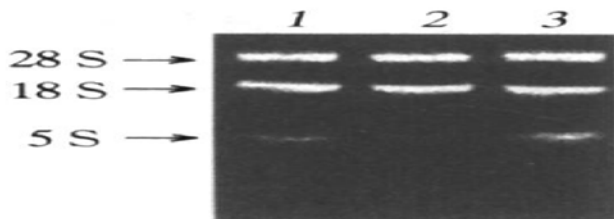


图 1 各组织总 RNA 2% 琼脂糖凝胶电泳  
1: NP; 2: NPC; 3: LC.

2.2 组织 5 184 个基因的表达谱

将各组织总 RNA 所标记的 cDNA 探针分别与 GF200 微阵列杂交后, 由软件处理结果如图 2~4 所示. 图中 1、2 为阵列的两个区 (field), A~H

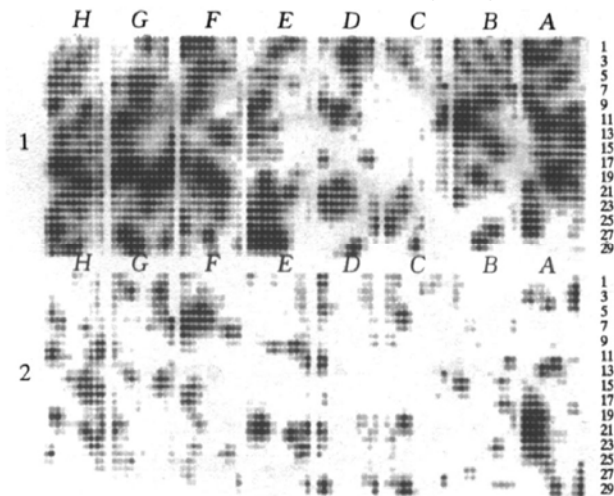


图 2 成人鼻咽组织总 RNA 与 GF200 微阵列杂交结果

为阵列的八个格 (grid), 每格有 12 列 (row) 和 30 行 (column). 每格第一列为定位对照点, 已去除. 这些定位对应于基因数据库中的不同 EST, 如 1B16 示第 1 区 B 格 1 列 6 行, 其基因库序号为 AA459697 是 EST.

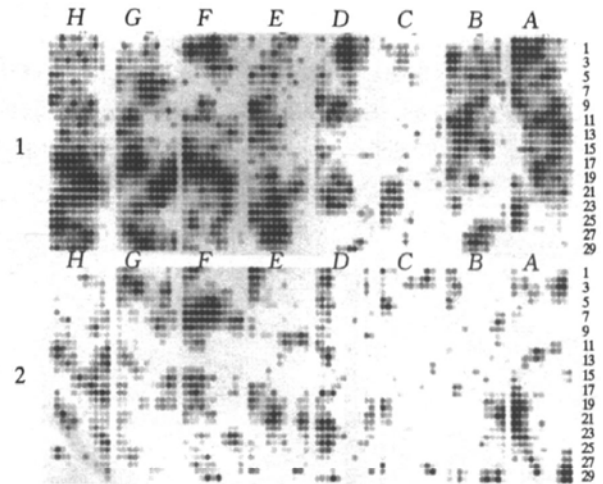


图 3 鼻咽癌组织总 RNA 与 GF200 微阵列杂交结果

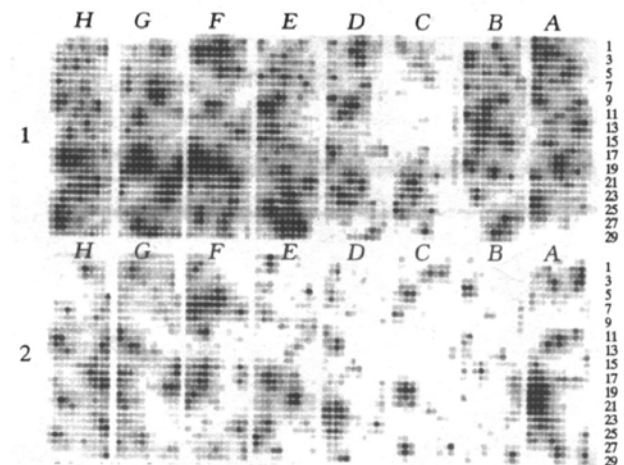


图 4 肺癌组织总 RNA 与 GF200 微阵列杂交结果

2.3 各组织基因表达谱的差异

由 Pathway 软件包分析各点阵杂交密度, 结果表明二者表达谱相似, 均存在大量低表达的 EST, 但在各密度值范围内的基因或 EST 数不同, 密度值在 200 以上的在鼻咽癌有 110 个, 肺癌 134 个而鼻咽组织有 158 个; 5 个 EST 在鼻咽高表达但鼻咽癌低表达, 3 个 EST 在鼻咽癌高表达但正常鼻咽低. 鼻咽癌与肺癌也存在不少差异表达基因, 如表 1. 结果说明正常鼻咽与鼻咽癌组织可能存在多个差异表达的新基因而在该瘤的发生中起作用, 如图 5、6、7 示.

表 1 在 GF200 微阵列表达密度值在 200 以上的 10 个已知基因

正常鼻咽组织	鼻咽癌组织	肺癌组织
转化生长因子	表皮生长因子 (EGF)	成纤维生长因子 7 (FGF7)
DNA 修复蛋白 XRCC 基因	EGF 受体 (EGFR)	髓样细胞核分化抗原 MNDa
胰岛素样生长因子 2	v-jun 同源物	核糖体蛋白 S17 (RPS17)
软骨糖蛋白-39 前体	干扰素受体 2 (IFNAR2)	Bcl 2
糖原磷酸化异构酶	细胞原癌基因 c-myc	干扰素 $\gamma$ 诱导蛋白
核糖体蛋白 L28	胶原酶 V	E2F 相关转录因子 DP-1
分泌性载体膜蛋白	维甲酸诱导的内源性逆转录病毒 DNA	转录因子 NFATx
克隆刺激因子 3 受体	干扰素 $\alpha$ 诱导蛋白	微小核糖核蛋白多肽 B 和 B1
TGF- $\beta$ 诱导的早期蛋白	半胱氨酸富集的纤维母细胞生长因子受体	丝/苏氨酸蛋白激酶受体 R1 前体
Na <sup>+</sup> 、Cl <sup>-</sup> 依赖性甜菜碱转运子	CDC28 蛋白激酶 2 (CKS2)	催乳激素 (PRL)

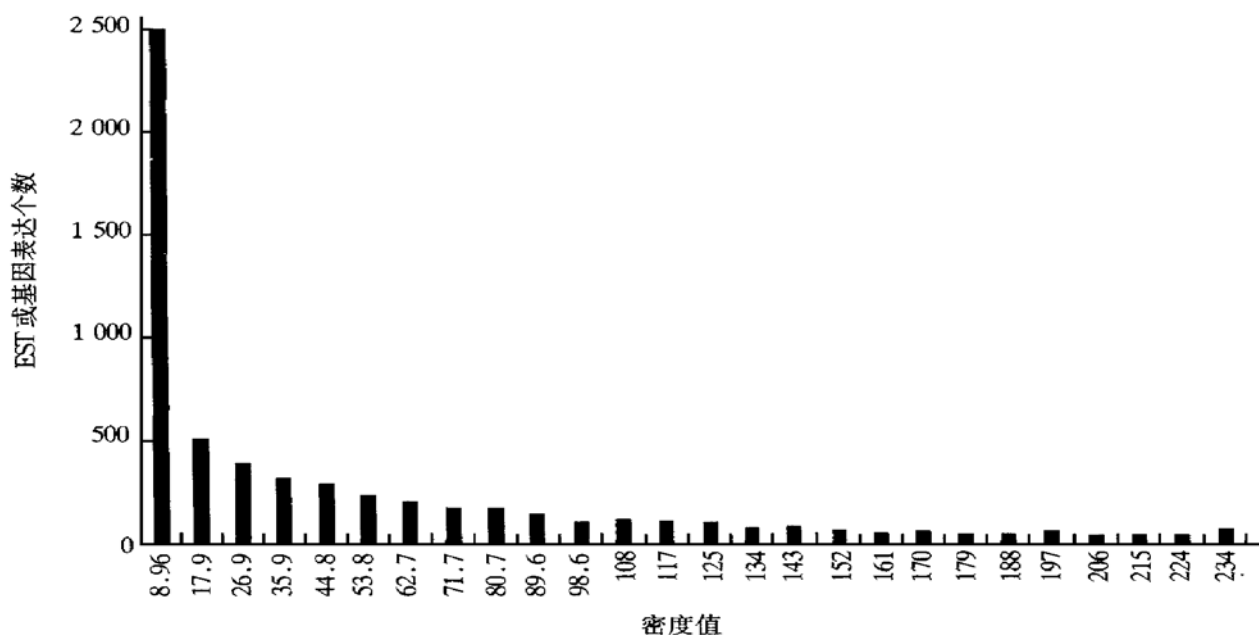


图 5 成人鼻咽组织总 RNA 与 GF200 杂交后的密度分布

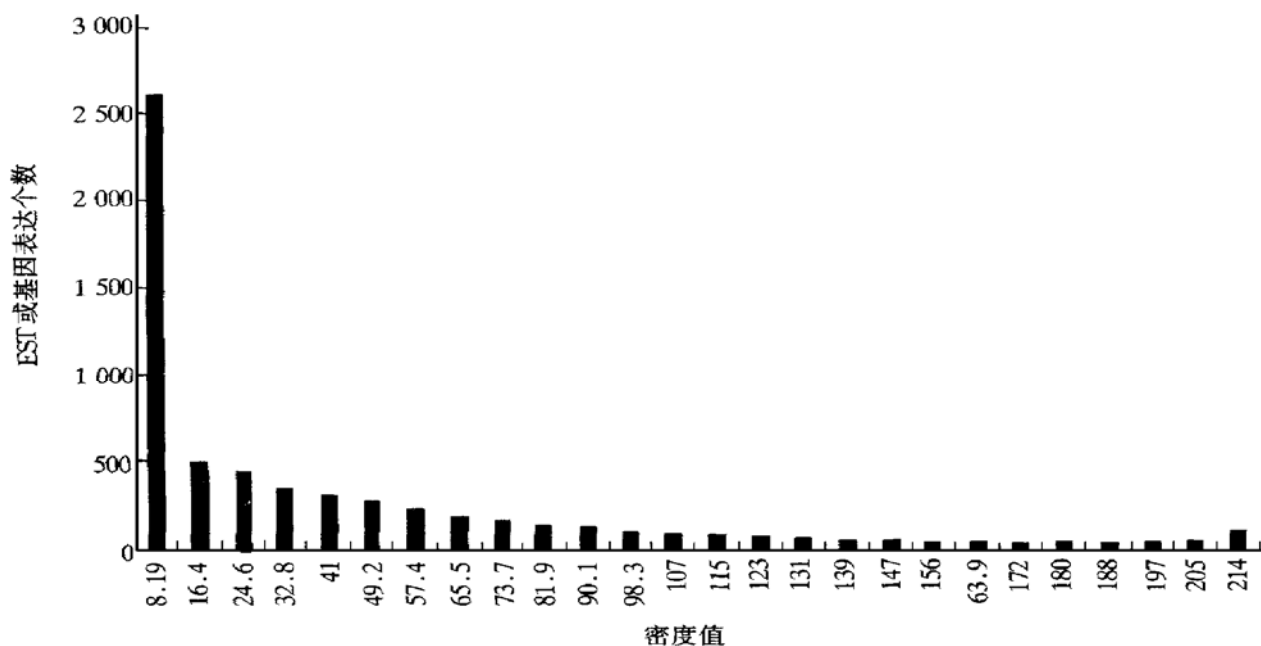


图 6 鼻咽癌组织总 RNA 与 GF200 杂交后的密度分布

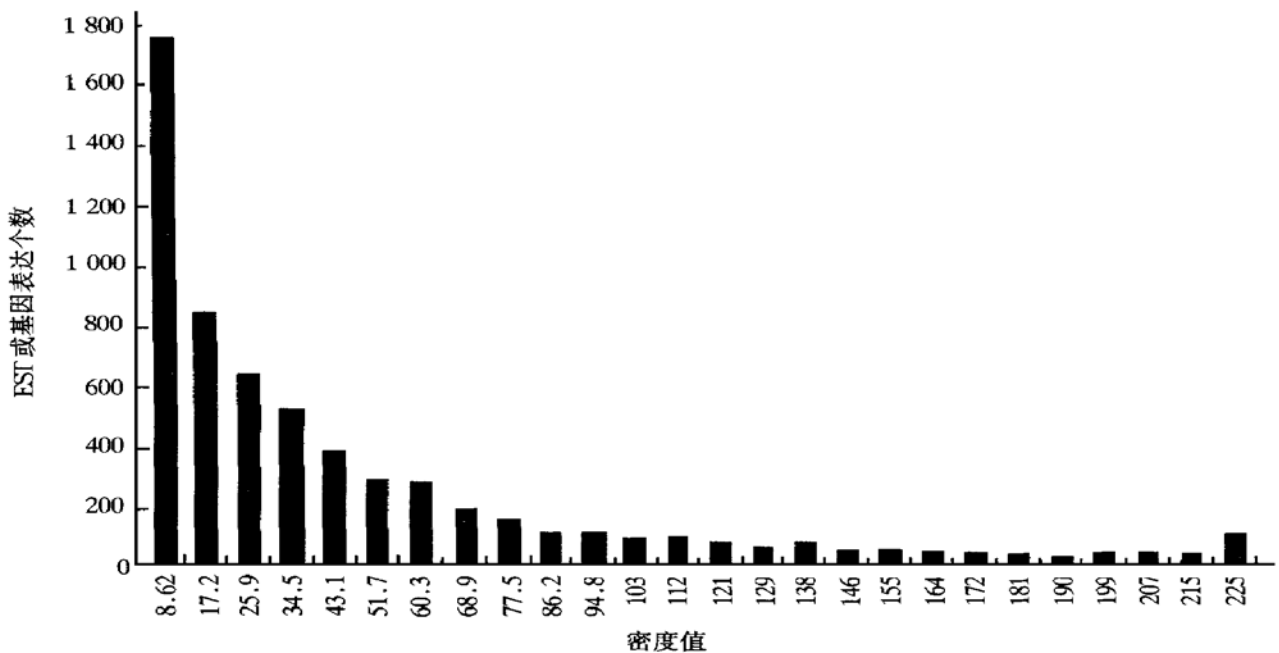


图7 肺癌组织总 RNA 与 GF200 杂交后的密度分布

### 3 讨 论

DNA 微阵列或芯片 (chip) 是在尼龙膜或硅片表面通过光导化学合成能代表不同基因的成千上万个寡核苷酸链作为探针, 与<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P 等或荧光素标记的目的材料中的 DNA 或 cDNA 互补序列结合, 由计算机对放射自显影或激光共焦显微镜扫描荧光密度进行分析, 获得杂交信号的强度及分布模式, 以反应目的材料中有关基因的表达情况, 是一种高产出的及目前研究基因表达的最佳方法<sup>[3,5]</sup>. 与传统的 RNA 印迹、RT-PCR 及 Serial Analysis Gene Expression (SAGE) 比较, 它的优势在于可高敏感地定量 (5 拷贝/个) 定性检测基因表达水平, 且可同时研究同一组织或不同组织中成千上万个基因的表达<sup>[5,6]</sup>.

我们已采用含有 588 个已知基因的 cDNA 阵列进行了人鼻咽癌基因表达的初步观察, 并发现多个基因在鼻咽癌中高表达<sup>[7]</sup>. 但是否还存在新的基因起作用呢? 采用高密度 cDNA 微阵列 GF200, 研究了成人鼻咽组织和鼻咽低分化鳞状细胞癌及肺癌组织基因的表达差异. 这 5 184 个点阵包括部分已知基因和处于严密转录调控下代表人类基因的表达序列标签 EST 的 cDNA 序列片段, 平均在 1 000 bp 长度其量达 5 ng, 足以敏感地检测低拷贝的基因表达. 结果显示密度值在 200 以上的基因或 EST 鼻咽癌有 110 个, 肺癌 134 个而鼻咽组织有 158 个;

5 个 EST 在鼻咽高表达但鼻咽癌低表达, 3 个 EST 在鼻咽癌高表达但正常鼻咽低表达; 而三者存在不少差异表达基因, 如催乳激素 (PRL)、成纤维生长因子 7 (FGF7)、髓样细胞核分化抗原 MNDA 等在肺癌高表达; 表皮生长因子 (EGF)、EGF 受体 (EGFR)、v-jun 同源物等在 NPC 中明显高表达; NP 则以转化生长因子、DNA 修复蛋白 XRCC 基因等高表达, 而这些基因的高表达正是构成该肿瘤或正常组织生物学功能特性的基础, 如 PRL 高表达使肺癌具有内分泌样作用表现. 高、低表达的基因用 RT-PCR 证实与杂交结果相符 (资料未显示), 其可靠性与文献报道相似<sup>[8]</sup>, 对有意义的 EST 正在进行基因克隆.

DNA 微阵列或芯片自 1995 年问世至今, 已应用于基因表达水平监测、DNA 测序、药物筛选、生长发育研究等方面, 而我国尚处于起步阶段. 从本实验结果看, 采用高密度 cDNA 微阵列是一种筛选差异表达基因的快速有效方法, 这种差异表达的 EST 为疾病相关基因的克隆奠定了坚实的基础.

### 参 考 文 献

- Porter P I, Gowm A M, Kramp S G, *et al.* Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol*, 1992, **145** (1): 145~ 153
- Sun Y. Molecular oncogene of human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer J*, 1995, **8** (6): 325~ 332
- Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (1): 40~ 44
- Nelson N. Microarrays pave the way to 21<sup>st</sup> century medicine. *J*

- National Cancer Institute, 1996, **88** (22): 1803~1805
- 5 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, *et al.* Expression monitoring by hybridization to high density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech*, 1996, **14** (6): 1675~1680
  - 6 Milosavljevic A, Zeremski M, Satrezoska Z, *et al.* Discovering distinct genes represented in 29 570 clones from infant brain cDNA libraries by applying sequencing by hybridization methodology. *Genome Res*, 1996, **6**: 132~141
  - 7 黎众魁, 谢鹭, 何志巍, 等 (Li Z K, Xie L, He Z W, *et al.*). 用 cDNA 表达阵列谱比较鼻咽癌与正常鼻咽组织的基因表达谱差异. *科学通报 (Chin Sci Bull)*, 1998, **16** (22): 2462~2463
  - 8 Schgal A, Boynton A, Young R, *et al.* Application of the differential hybridization of Atlas<sup>TM</sup> human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J Surgical Oncology*, 1998, **67** (1): 230~241

**Study of the Gene Expression Profile on Nasopharyngeal Carcinoma, Lung Cancer and Normal Adult Nasopharynx Tissues by High Density Microarray.** HE Zhī Wei, XU Liang-Guo, REN Cai-Ping, XIE Lu, GAN Rur-Liang, YAO Kai-Tai (Key Laboratory of the Chinese Ministry of Public Health, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

**Abstract** To study the gene expression profile on nasopharyngeal carcinoma (NPC), lung cancer (LC) and normal adult nasopharynx (NP) tissue and to obtain the NPC-related gene, the total RNA extracted from these tissues were retro-transcribed and labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P isotope. The cDNA probes were hybridized to high density cDNA microarray GF200 with 5 184 genes and ESTs, then the signals were analyzed by Pathways software. The results showed that the low density signals were distributed in three types of tissues and the number of genes and ESTs with the density value over 200 was respectively 110, 134 and 158 among NPC, LC and NP tissue. The results indicated that the different expression genes existed among NPC, LC and NP tissues and some new genes could play an important role in NPC. The high-density microarray was a rapid and effective method to select the different expression genes.

**Key words** high-density microarray, gene expression profile, nasopharyngeal carcinoma

## PCR 检定 OSM cDNA 转染细胞中基因组整合与转录\*

吕星 邢瑞云 孙志贤 裴雪涛 吴祖泽

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 用 PCR 和 RT-PCR 方法对人 OSM cDNA 转染的小鼠黑色素瘤细胞进行基因组整合和 mRNA 转录的检定。基因组整合检定时, 采用与调控序列和 cDNA 序列相对应的上、下游引物, 以连续的转录单位进行扩增, 能够更准确地反映整合与表达的关系; mRNA 检定时, 采用与 cDNA 序列和质粒克隆位点与加 polyA 信号之间序列相对应的上、下游引物, 可以区分宿主细胞中内源性基因与外源性基因的转录。

**关键词** 基因组整合, 转录, 抑瘤蛋白, 黑色素瘤

**学科分类号** Q784

基因组整合与 mRNA 转录的检定是确认外源基因转染宿主细胞后基因稳定表达的必要步骤。基因组整合检定时常用的方法是检测载体上的 neo 基因或 cDNA 序列。由于真核细胞基因组不存在 neo 基因, 以及绝大多数真核基因含有内含子, 一般将 neo 基因或 cDNA 序列检测阳性视为外源基因已整合入基因组。但 neo 基因毕竟不是外源基因, 基因组中也存在着 cDNA 的间断序列, 因此常有 neo 基因检测阳性而外源基因不表达或 cDNA 间断序列干

扰检测结果的问题。mRNA 转录检定通常是检测 cDNA 序列。这种方法在宿主细胞不表达与外源基因相同的基因的情况下是可行的, 反之则无法区分内源性与外源性基因的转录。

本项实验中, 我们用 PCR 和 RT-PCR 方法对人 OSM cDNA 重组质粒转染小鼠黑色素瘤细胞后

\* 国家自然科学基金 (39670825) 资助项目。

收稿日期: 1998-06-25, 修回日期: 1998-12-15