

研究报告

利用 GenMAPP 筛查鼻咽癌差异表达基因*

周艳宏** 张必成** 曾朝阳 张文玲 范松青
李小玲 熊 炜 曹 利 李伟芳 李桂源***

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 利用 GenMAPP 软件对鼻咽癌和正常鼻咽上皮基因微阵列表达谱结果进行分析, 筛查鼻咽癌差异表达基因。结果显示: 在 17 000 个基因中, 与正常鼻咽上皮相比, 在鼻咽癌中发生 2 倍以上差异表达的基因共有 339 个, 其中有 160 个基因在鼻咽癌中表达上调, 179 个表达下调。这些基因分别与细胞增殖、基因转录、凋亡、信号转导、DNA 损伤修复、肿瘤分化和浸润转移及细胞周期调节等相关。鼻咽癌的发生发展存在多基因表达调控的改变, 对其差异表达基因的研究有助于阐明鼻咽癌发生发展机制。

关键词 鼻咽癌, 微阵列, 基因表达

学科分类号 R739.63

基因注释 (Gene Ontology) 对基因的生物学过程 (biological process)、细胞成分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 等方面进行了相应的注释。Harhay 等^[1]研究指出在功能基因组时代 Gene Ontology 能为基因的功能研究提供重要信息。而 GenMAPP 是分析微阵列结果、寻找相关生物通路新的有效工具^[2,3]。有研究指出基因注释和 GenMAPP 的 MAPPFinder 功能有机结合可以快捷地了解基因的生物学功能^[4], 通过 Gene Ontology 可以较完整地理解整个微阵列表达谱差异表达基因的信息, 为后续基因功能研究提供有意义的线索。

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是高发于我国华南地区及东南亚其他国家的一种常见恶性肿瘤^[5], 其发病是与 EB 病毒感染、遗传因素和环境因素有关的多因素多步骤的过程, 在这个过程中可能涉及到多个癌基因的激活与抑癌基因的失活, 但其分子发病机理仍不十分清楚。作为一种多基因遗传疾病^[5-9], 迅速分离、鉴定鼻咽癌恶性表型转化相关的差异表达基因^[10-13]是研究其发生发展分子机制的基础。本研究利用 GenMAPP 软件对鼻咽癌和正常鼻咽上皮基因微阵列表达谱结果进行分析、筛查鼻咽癌差异表达基因, 并为深入研究相关基因的功能提供新线索和理论依据。

1 材料与方法

1.1 新鲜标本

鼻咽部活检组织从中南大学湘雅三医院门诊采

集。鼻咽癌活检组织标本分为二份, 一份送医院病理科取得病理诊断, 另一份在 RNAlater 中 -20℃ 冻存储备用。

1.2 微阵列膜及主要试剂

GALAXY™ (型号: HC10001) cDNA 阵列膜由上海中科开瑞公司制备^[14], 膜上的探针数为 17 000 个, 包括 10 000 个左右的基因和 7 000 个左右的 EST, 每个点在芯片上均有两次重复, Trizol™ Reagent 为 Gibco-BRL 公司产品 (Gaithersburg, MD, USA), 同位素 [α -³²P]dATP 购自北京亚辉公司, mRNA 分离试剂盒购自 Qiagen 公司 (Valencia, CA, USA), RT 试剂盒及标记试剂盒均购自 Promega 公司 (Madison, MI, USA), 其他常用生化试剂购自华美生物工程公司。

1.3 总 RNA 的抽提及 mRNA 的分离

按 Trizol™ 试剂说明提取鼻咽癌活检组织和正常鼻咽上皮组织的总 RNA, 无 RNase 的 DNase 消化去除基因组 DNA, 紫外分光光度计定量, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测质量, 然后进行 mRNA 的逆转录与探针标记。

杂交: 将 cDNA 阵列膜置于 6×SSC 溶液中浸泡 2 min, 再将湿润的 cDNA 阵列膜放入杂交管, 加入预杂交液 40 ml, 再加入 200 μ l 已高温变性的

*国家自然科学基金资助项目 (30300205, 30300063, 30300201, 30470955, 30330560), 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0761) 和湖南省科技厅重大专项 (05SK1001-1)。

并列第一作者。* 通讯联系人。

Tel/Fax: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2005-06-13, 接受日期: 2005-07-28

鱼精 DNA(100 mg/L), 然后将杂交管放入杂交炉中, 于 68℃ 温育 3 h, 取出杂交管, 倒去预杂交液, 保持膜的湿润, 迅速加入 6 ml 杂交液和 80 μ l 高温变性的鱼精 DNA (100 mg/L), 随即加入已高温变性过的探针, 于 68℃ 杂交约 20 h.

洗膜: 取出 cDNA 阵列膜, 迅速将其置于 500 ml 洗液 I 中 ($2 \times$ SSC, 0.5% SDS), 室温浸泡 5 min, 温和地摇动, 然后将 cDNA 阵列膜转移至 500 ml 洗液 II 中 ($2 \times$ SSC, 0.1% SDS), 于 37℃ 浸泡 15 min, 温和地摇动, 再将 cDNA 阵列膜转移至 500 ml 洗液 III 中 ($0.1 \times$ SSC, 0.5% SDS), 于 37℃ 浸泡振荡 1 h, 500 ml 蒸馏水室温漂洗片刻, 将其置于吸水纸上, 吸走水分, 磷屏压片 12 h^[14].

1.4 图像与结果分析

DNA 微阵列共有 17 000 个基因, 每个基因 2 点. 采用 FIJIFILM 公司的 FLA-3000A Plate 信号扫描仪对结果进行扫描分析, 选用 Fluorescent Image Analyzer 扫描软件将 X 光片信号输入计算机, Array Gauge 软件分析基因的表达丰度. 并作以下校正: a. 每张膜上点了 8 种看家基因(每种基因有 12 个点), 只有当同种看家基因的各个点强度变化在 $\pm 25\%$ 之内, 才认为 array 的杂交结果是可信的, 否则重新实验. b. 每一方阵 ($7 \times 7 = 49$ 点) 中的空白点为本底, 校正本方阵的其余各点: 各点的校正值 = 各点的实测值 - 本底值; c. 同一张膜上代表同一基因的两点亮度值之比应在 0.5 ~ 2.0 之间, 否则认为是不可靠点被剔除. 在此基础上, 以看家基因

作为内标, 对两张膜杂交结果进行归一化(normalization)处理. 微阵列膜上代表同一个基因的两个点杂交信号取平均值, 得到该基因表达强度(密度)值^[14,15].

1.5 GenMAPP 2.0 软件分析

用 GenMAPP 2.0 软件^[2]分析基因表达数据并对差异基因进行注释. GenMAPP 2.0 软件的下载, 安装以及使用说明参见其网站: <http://www.GenMAPP.org>.

1.6 微阵列结果 RT-PCR 验证

得到 cDNA 微阵列结果后, 在芯片结果中随机选取在鼻咽癌组织中 2 个表达下调, 1 个表达上调的基因, 经 Primer 3 软件设计引物, 采用 RT-PCR 方法进行了验证.

50 μ l PCR 反应体系中含 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 mmol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 目的片段上下游引物 0.1 mmol/L, 模板 cDNA 5 μ l, Taq DNA 聚合酶 3 U, 石蜡油覆盖. 为较客观地反映 mRNA 表达的相对水平, 在目的基因及内对照 GAPDH 的 PCR 平台期前结束 PCR. 采用下列参数进行差异 PCR: 94℃, 50 s; 59℃, 50 s; 72℃, 1 min; 5 个循环后加入 5 mmol/L GAPDH 上下游引物混合液 1 μ l, 继续进行 23 个循环终止. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳: 上样量 5 μ l, 溴化乙锭染色, 紫外灯下照相.

所用引物序列见表 1, 在上海博亚生物技术公司合成.

Talbe 1 Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product size/bp
GAPDH	gtcagtgtgtggacctgacct	aggggagattcagtggtg	395
GNB5	atgtcactgtgccacttgga	tctcgaaactcctgacctcgt	282
DPP10	ggctgagctgcaatctaaca	tgtggaaggtgctgaaatcc	189
COX7B	caagttcgaagcattcagca	tgtgggtaactctgccaac	188

2 结 果

2.1 组织的总 RNA

提取鼻咽癌组织和正常鼻咽上皮组织的总 RNA, 经 DNase I 消化后 PCR 检测无 gDNA 污染, A_{260}/A_{280} 值均在 1.9~2.0 之间. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果分析总 RNA, 可见 28 S RNA 和 18 S RNA 条带清晰, 5 S RNA 条带基本上看不到, 说明 RNA 无明显降解(图 1).

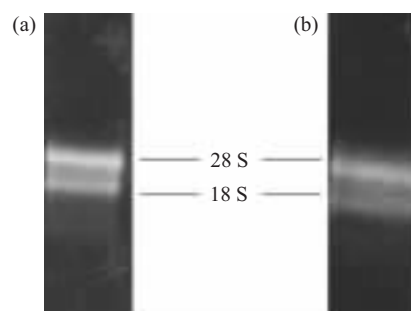


Fig. 1 Agarose electrophoresis profile of tissue total RNA
(a) Nasopharyngeal carcinoma tissue. (b) Normal nasopharyngeal epithelium tissue.

2.2 鼻咽癌和正常鼻咽上皮组织的差异表达谱

将鼻咽癌和正常鼻咽上皮组织所标记的 cDNA 探针，分别与 cDNA 微阵列膜杂交后显影，结果如图 2 所示. 图 2a 和 2b 分别为鼻咽癌组织和正常鼻咽上皮组织 cDNA 微阵列图谱. cDNA 微阵列图谱中的每一个斑点代表一个基因或 EST. 各基因或 EST 的表达水平在图 2 中通过颜色深浅来反应，越黑说明表达水平越高，该点的密度值大小是由该点本身在 X 片上杂交显影的密度与该阵列对照点在扣除杂交背景相比后的密度值. 因此，较为可靠地反应该基因或 EST 在组织中的相对表达水平高低.

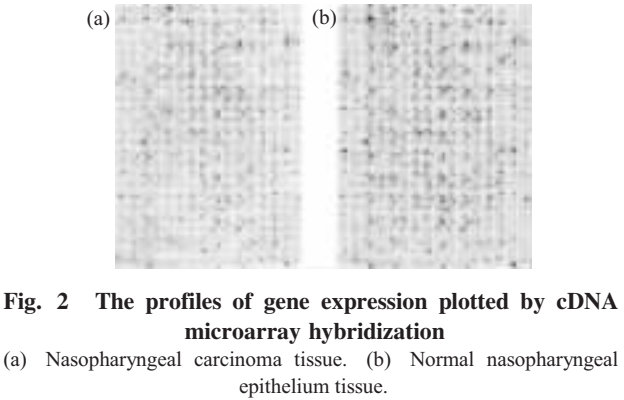


Fig. 2 The profiles of gene expression plotted by cDNA microarray hybridization

(a) Nasopharyngeal carcinoma tissue. (b) Normal nasopharyngeal epithelium tissue.

2.3 差异表达基因分析及功能注释

本研究所用 cDNA 微阵列膜含有 17 000 个人类基因的 cDNA 片段，部分为新克隆的但未知功

Table 2 Biological processes (A) , cellular components (B) , and molecular functions (C) distributed with the products of the 179 downexpressed genes in NPC-bearing gene ontology annotations

Category	NumGenes	Z Score	P-value
(A)Biological process			
Cytoskeleton organization and biogenesis	20	2.311	0.0290
Brain development	2	3.138	0.0250
Regulation of actin polymerization and/or depolymerization	42	3.138	0.0250
Negative regulation of metabolism	42	2.178	0.0390
Lipid catabolism	10	2.805	0.0170
Protein ubiquitination	48	2.310	0.0290
Regulation of lipid metabolism	8	3.138	0.0290
Actin filament-based process	10	3.106	0.0050
Actin cytoskeleton organization and biogenesis	8	2.506	0.0240
Biopolymer metabolism	19	-2.040	0.0460
Regulation of cell organization and biogenesis	16	3.138	0.0250
(B)Cellular component			
Cell	162	2.019	0.0410
Hemoglobin complex	4	3.138	0.0230
Integral to plasma membrane	18	-2.825	0.0070
Clathrin coat	3	2.577	0.0310
Clathrin vesicle coat	36	2.577	0.0310
Clathrin coat of trans-Golgi network vesicle	56	3.138	0.0240
Trans-Golgi network transport vesicle	32	3.138	0.0240
Intrinsic to plasma membrane	12	-2.859	0.0040
Cell projection	2	3.138	0.0220
(C)Molecular function			
Phospholipase activity	11	3.138	0.0380
Protein kinase activity	23	-2.133	0.0300
Protein serine/threonine kinase activity	2	-2.055	0.0410
Calcium ion binding	28	3.332	0.0010
Kinase activity	35	-2.318	0.0260
Transcriptional repressor activity	3	2.577	0.0410
Transferase activity	14	-2.405	0.0120
Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	27	-2.478	0.0180
Carboxylic ester hydrolase activity	13	3.106	0.0210
Ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds	11	2.115	0.0420
Ion binding	40	2.311	0.0190

NumGenes:number of genes. P-value:corrected P-value, Z score calculated by the MAPPFinder program. A P-value threshold of 0.05 is used.

能的新基因或尚未克隆的 EST 重叠群. 其中包括 8 个看家基因共 96 个重复点. 根据同一看家基因在两张膜上的比值 (ratio 值) 的平均值 R , 得出归一化 (Normalization) 系数, 将所有数据项乘以 Normalization 系数, 得出调整后的靶基因信号值, 弃去信号强度值皆小于 400 的基因点, 算出所有靶基因的 ratio 值.

利用 GenMAPP 软件分析其基因表达数据库, 获得在鼻咽癌中低表达和高表达的基因分别为 179 个和 160 个, 从参与的生物学过程 (biological process)、细胞成分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 等几方面进行了基因注释

(Gene Ontology), 其具体信息见表 2 和表 3. 这些基因可分为如下几类: a. 与细胞周期调控有关基因; b. 与细胞骨架有关的结构蛋白基因; c. 与 DNA 损伤修复有关的基因; d. 与核孔复合物的信号转导有关基因; e. 与端粒长度调节相关基因; f. 参与细胞外基质信号调节的基因; g. 代谢相关基因; h. 免疫相关基因. 同时对在鼻咽癌中表达下调和上调幅度最大的 10 个已知基因进行了分析, 具体参见表 4 和表 5, 并根据已有资料将部分基因归入参与的信号传导通路 (pathway), 其中 COX7B 参与氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 信号传导通路的调控 (图 3).

Table 3 Biological processes (A) , cellular components (B) , and molecular functions (C) distributed with the products of the 160 overexpressed genes in NPC-bearing gene ontology annotations

Category	NumGenes	Z score	P-value
(A)Biological process			
Membrane lipid metabolism	28	2.413	0.0390
Potassium ion transport	76	2.256	0.0410
Visual perception	39	2.614	0.0300
Metal ion transport	33	2.462	0.0190
Sensory perception of light	25	2.614	0.0300
(B)Cellular component			
Chromosome	46	2.594	0.0210
Cell	61	2.479	0.0307
Clathrin coat of trans-Golgi network vesicle	31	3.323	0.0221
Nucleus	25	3.117	0.0202
Cytoplasm	17	2.805	0.0170
Nucleosome	51	3.333	0.0010
Spindle pole	7	2.194	0.0450
(C)Molecular function			
Nucleotide binding	106	2.267	0.0230
Cation channel activity	28	2.614	0.0250
Kinase activity	12	2.523	0.0190
Transferase activity	43	2.122	0.0460
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	29	2.456	0.0180
Guanyl nucleotide binding	37	2.173	0.0340

NumGenes: number of genes. P-value:corrected P-value, Z score calculated by the MAPPFinder program. A P-value threshold of 0.05 is used.

Table 4 Top 10 genes in the “downexpressed in NPC” gene list

Gene ID	Gene symbol	Ratio	Biological process	Gene Ontology		Pathway
				Cellular component	Molecular function	
NM_000123	ERCC5	0.081326	Transcription-coupled nucleotide-excision repair	Nucleus	Single-stranded DNA binding	
NM_014950	ZBTB1	0.099447	Regulation of transcription, DNA-dependent	Nucleus	DNA binding	
NM_006578	GNB5	0.120783	Signal transduction	Heterotrimeric G-protein complex	GTPase activity	
NM_016308	UMP-CMPK	0.172625			Cytidylate kinase activity	
NM_016575	TU12B1-TY	0.193468				
NM_020395	LOC57117	0.19487	Regulation of transcription, DNA-dependent		DNA binding	
NM_001528	HGFAC	0.208973	Proteolysis and peptidolysis	Extracellular	Chymotrypsin activity	
NM_018975	TERF2IP	0.21889	Telomerase-dependent telomere maintenance	Nuclear chromosome	Telomeric DNA binding	
NM_020868	DPP10	0.244822	Proteolysis and peptidolysis	Membrane	Catalytic activity	
NM_014026	HSPC015	0.252268			Heat shock protein activity	

Table 5 Top 10 genes in the “overexpressed in NPC” gene list

Gene ID	Gene symbol	Ratio	Biological process	Gene Ontology		Pathway
				Cellular component	Molecular function	
NM_003618	MAP4K3	7.618112	Protein amino acid phosphorylation		Protein serine, threonine kinase activity	
NM_003199	TCF4	7.115017	Regulation of transcription from Pol II promoter	Nucleus	DNA binding	
NM_181786	HKR1	6.526523	Regulation of transcription, DNA-dependent	Nucleus	DNA binding	
NM_000354	SERPINA7	6.065933		Extracellular space	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	
NM_002095	GTF2E2	3.41116	Regulation of transcription, DNA-dependent	Nucleus	General RNA polymerase II transcription factor activity	
NM_003618	MAP4K3	3.288986	Protein amino acid phosphorylation		Protein serine/threonine kinase activity	Citrate cycle (TCA cycle)
NM_005324	H3F3B	3.277271			Oxidoreductase activity	Pyruvate metabolism,
NM_005917	MDH1	3.2644			Oxidoreductase activity	Citrate cycle (TCA cycle)
NM_001866	COX7B	3.23459		Mitochondrion	Cytochrome c oxidase activity	Oxidative phosphorylation
NM_015484	CBPIN	3.127903		Nucleus	Protein binding	
NM_207170						

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

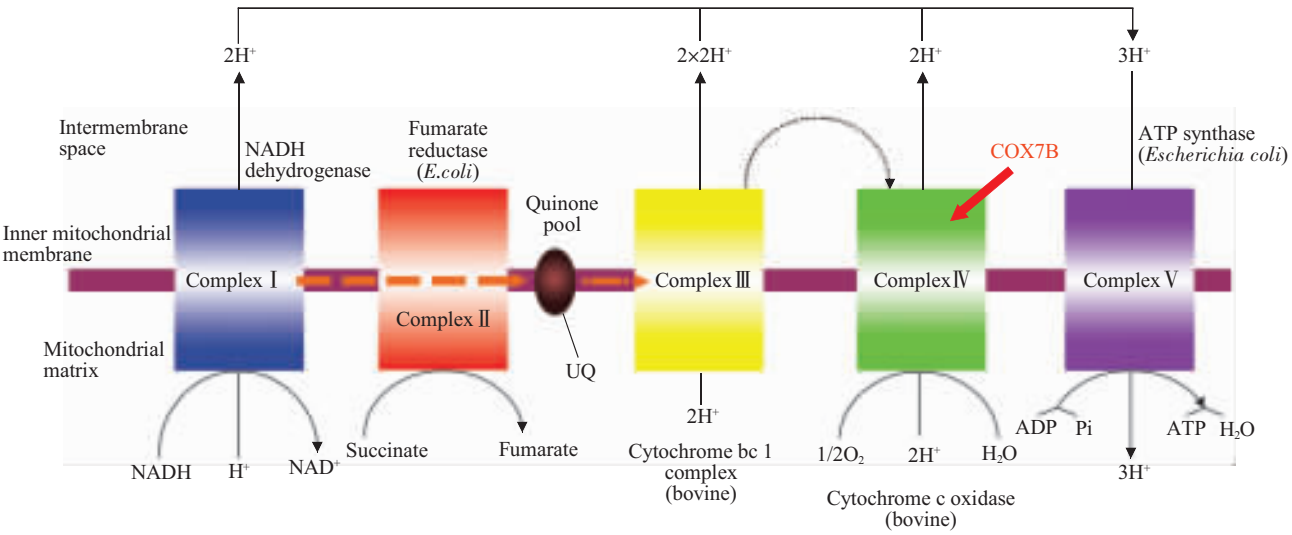


Fig. 3 The pathway connected with COX7B

2.4 基因芯片结果的 RT-PCR 验证

对芯片筛查出的差异表达基因，随机挑选了 3 个基因利用 RT-PCR 方法进行了验证，GNB5 基因在 10 个正常鼻咽上皮中高表达而在 15 个鼻咽癌中表达缺失或低表达(图 4a)，DPP10 基因 RT-PCR 结果与 GNB5 相似(图 4b，图中只显示了部分结果)，

COX7B 在鼻咽癌中高表达而在正常鼻咽上皮中表达下调(图 4c，图中只显示了部分结果)。以上 RT-PCR 结果与芯片结果相吻合，表明通过在芯片内部设置重复(每个基因在芯片上点 2 次)，严格筛选条件(芯片上同一个基因的 2 个点表达结果一致)，本研究选用的 Microarray 结果比较可靠。

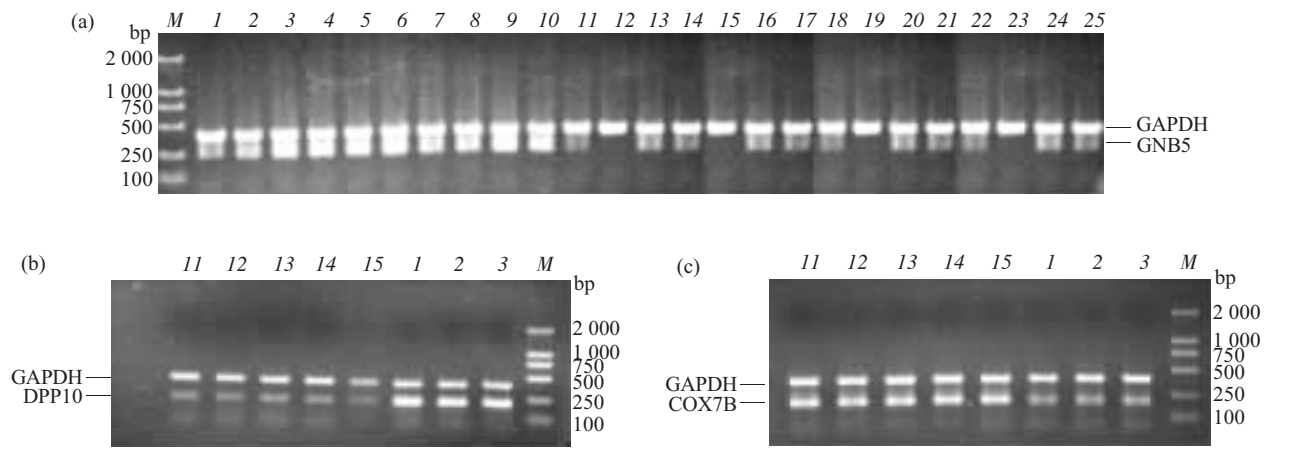


Fig. 4 Results of Microarray were confirmed by RT-PCR of three genes

(a) GNB5, (b) DPP10, (c) COX7B. M: DL2000 marker; 1~10: Normal nasopharyngeal epithelium; 11~25: Nasopharyngeal carcinoma.

3 讨 论

人类全基因组草图已经提前完成，目前已经进入了功能基因组时代。人类面临的更艰巨的任务是

研究基因组功能，也就是说不仅要了解基因组的碱基序列，而且还要掌握其中所包含的时空信息。今后相当长一段时间的主要工作将集中在揭示所有基因转录表达层次上的信息^[16]。

常见的基因表达水平的检测法均有其利弊, RNA 印迹法只适用检测高丰度的 mRNA; RT-PCR 虽可检测低丰度 mRNA 表达水平, 但因多种原因限制了检测基因表达的种类; mRNA 差异展示可同时检测多个基因表达, 但通常难于定量, 假阳性较多, 如为阳性还须进行亚克隆和测序以证实之; 基因表达系列分析 (SAGE) 是一种较好的 cDNA 测定方法, 但仍需复杂的样品制备和批量测序, 且以上方法均难于自动化。

基因芯片是 20 世纪 90 年代中期以来随着人类基因组计划快速发展起来的分子生物学高新技术, 亦是各学科交叉综合的崭新科学。基因芯片或微阵列技术以其无可比拟的信息量、高通量、快速、准确地分析基因表达^[17-20]。基因表达水平反映了在不同环境、细胞类型、细胞生长阶段和细胞状态下的功能信息, 绘制所有基因的表达图谱对于研究基因的功能十分重要。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, 为进一步探索这些基因的功能提供线索^[11, 17]。

近 20 年来对肿瘤发病机制中基因调控问题的深入研究, 使人们逐步认识到肿瘤是一种复杂的多基因遗传病, 实际是多种肿瘤相关基因表达失常或许多肿瘤抑制基因失活所致。不同细胞类型, 不同分化程度和不同发病部位甚至不同的发病个体, 受累基因有很大不同。正常基因的突变或缺失、癌基因的异常扩增和表达以及多个基因的协同作用, 基因本身的多效性和机体免疫因素等, 决定了最终肿瘤表型的表达与否。在肿瘤的发生、发展和肿瘤发生实验性逆转、复发等过程中都伴随着复杂的基因表达模式的改变。迄今为止, 尚未发现单一基因的改变可以解释所有肿瘤的发病机制。因此, 肿瘤组织中基因表达谱的改变仍是研究肿瘤基因调控机制的重要切入点。

鼻咽癌是一种多基因遗传性疾病, 它的发生可能涉及多个细胞分裂、分化和凋亡相关的传导通路的中断, 是多个基因协同作用的结果, 是多基因或多通路平衡失调的基因网络学说在鼻咽癌这一多基因遗传性疾病个体事件的体现。肿瘤的分子生物学研究除了要寻找在生物学上重要的个别基因并研究

其结构与功能外, 更重要的应是了解整个基因组的功能活动, 认识细胞全部基因的表达水平状况。临床耳鼻咽喉 - 头颈外科常见的恶性肿瘤之一, 鼻咽癌, 其发病机制尚不明确^[9]。作为一种典型的多基因遗传疾病^[7-10], 迅速分离、鉴定鼻咽癌恶性表型转化相关的差异表达基因是研究其发生发展分子机制的基础。

Fung 等^[21]比较正常鼻咽上皮细胞和鼻咽癌细胞系在含 42 个基因阵列的表达差异, 其中 13 个基因在正常鼻咽上皮细胞中高表达, 9 个基因低表达。我们采用含 17 000 个基因的 cDNA 微阵列膜, 分别将成人鼻咽和鼻咽癌活检标本的 mRNA 经逆转录标记成 cDNA, 并分别与 cDNA 微阵列膜杂交, 通过杂交信号的自动扫描软件分析, 获得了正常鼻咽上皮和鼻咽癌活检组织的基因表达谱。通过 GenMAPP 分析发现: 鼻咽癌活检组织与成人鼻咽相比, 有 179 个基因在鼻咽癌活检组织中表达下调, 160 个基因表达上调。其中 COX7B 基因参与氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)信号传导通路, 该通路于肾细胞癌^[22]、前列腺癌^[23]等多种肿瘤密切相关。成人鼻咽和鼻咽癌活检标本的差异基因表达谱的构建以及相关信号传导通路的逐渐明晰, 为成人鼻咽与鼻咽癌基因表达数据库和鼻咽癌基因网络学说的建立提供了重要的数据。

总之, 肿瘤基础研究表明, 无论是肿瘤的发生还是肿瘤细胞的转移, 均须通过多个步骤才能完成, 且每个步骤由多个基因共同控制。而基因表达谱芯片作为一门方兴未艾的技术, 为研究肿瘤发生发展中的基因开关及表达程度提供了强有力的工具, 利用它可随时获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤生长相关基因的表达模式, 特别是有利于发现一些未知的与新基因功能潜在相关的信号通路。基因芯片在肿瘤研究领域中具有非常重要的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Harhay G P, Keele J W. Positional candidate gene selection from livestock EST databases using Gene Ontology. *Bioinformatics*, 2003, **19** (2): 249~255
- 2 Dahlquist K D, Salomonis N, Vranizan K, *et al.* GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet*, 2002, **31** (1): 19~20
- 3 Patil M A, Chua M S, Pan K H, *et al.* An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2005, **24**: 3737~3747
- 4 Doniger S W, Salomonis N, Dahlquist K D, *et al.* MAPPFinder:

- using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol*, 2003, **4** (1): R7
- 5 Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p31 linked to family nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research*, 2004, **64** (6): 1972~1974
- 6 熊 炜, 曾朝阳, 肖炳霖, 等. 一个新硝基还原酶基因 NOR1 编码区单核苷酸多态及与鼻咽癌的关联分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 401~405
Xiong W, Zeng Z Y, Xiao B Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (3): 401~405
- 7 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 泛素相关蛋白基因 UBAP1 单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 766~770
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 766~770
- 8 熊 炜, 曾朝阳, 李小玲, 等. NGX6 基因单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关性. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34** (4): 512~515
Xiong W, Zeng Z Y, Li X L, *et al.* *Acta Biochem Biophys*, 2002, **34** (4): 512~515
- 9 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 高频等位基因不平衡位点 D6S1581 与鼻咽癌的遗传易感性研究. *中华医学遗传学杂志*, 2003, **20** (4): 311~314
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* *Chin J Med Genetics*, 2003, **20** (4): 311~314
- 10 谭 琛, 李 江, 王洁如, 等. NAG7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 372~377
Tan C, Li J, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 372~377
- 11 向娟娟, 余 鹰, 王洁如, 等. 一个有假基因特点的鼻咽癌相关基因的分离和克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (1): 51~55
Xiang J J, Yu Y, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (1): 51~55
- 12 彭 聪, 谭 琛, 张秋红, 等. 新基因 BRD7 对鼻咽癌蛋白质表达谱影响的初步研究. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (5): 721~725
Peng C, Tan C, Zhang Q H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (5): 721~725
- 13 张必成, 周 鸣, 周后德, 等. 鼻咽癌差异表达基因 PROL4 特性分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (2): 262~265
Zhang B C, Zhou M, Zhou H D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (2): 262~265
- 14 谭 琛, 李 江, 彭 聪, 等. cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因对鼻咽癌细胞基因表达谱的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 99~106
Tan C, Li J, Peng C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 99~106
- 15 周艳宏, 曾朝阳, 熊 炜, 等. 鼻咽癌组织的显微切割及其 RNA 线性扩增. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (5): 463~467
Zhou Y H, Zeng Z Y, Xiong W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (5): 463~67
- 16 Lockhart D J, Winzler E A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 2000, **405** (6788): 827~836
- 17 Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, *et al.* Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res*, 2001, **61** (17): 6474~6479
- 18 West M, Blanchette C, Dressman H, *et al.* Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (20): 11462~11467
- 19 Hegde P, Qi R, Gaspard R, *et al.* Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19 200 - element complementary DNA microarray. *Cancer Res*, 2001, **61** (21): 7792~7797
- 20 van't Veer L J, Dai H, van de Vijver M J, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, **415** (6871): 530~536
- 21 Fung L F, Angela K F Lo, Yuen P W, *et al.* Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sciences*, 2000, **67**: 923~936
- 22 Meierhofer D, Mayr J A, Foetschl U, *et al.* Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2004, **25** (6): 1005~1010
- 23 William S. Disruption of mitochondrial function by suramin measured by rhodamine 123 retention and oxygen consumption in intact DU145 prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, 1992, **52** (24): 6953~6955

Screening The Differential Expression Genes of Nasopharyngeal Carcinoma Using GenMAPP*

ZHOU Yan-Hong**, ZHANG Bi-Cheng**, ZENG Zhao-Yang, ZHANG Wen-Ling,
FAN Song-Qing, LI Xiao-Ling, XIONG Wei, CAO Li, LI Wei-Fang, LI Gui-Yuan***
(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medical, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To screen the differential expression genes of nasopharyngeal carcinoma(NPC), the cDNA microarray technique was employed to analyze the changes of gene expressions with GenMAPP. Total RNA was extracted from NPC and normal nasopharyngeal epithelium tissue respectively. Reverse transcription was performed and cDNA probe was random-prime labeled with ^{33}P -dATP and hybridized with the cDNA microarray membrane containing 16 150 genes and ESTs. The hybridized result was confirmed by RT-PCR analysis. The results suggested that 339 genes were differentially expressed over two fold, in which 160 genes were up-regulated and 179 genes were down-regulated in NPC. These genes were involved in cell proliferation, gene transcription, apoptosis, signal transduction, DNA damage and repair, tumor differentiation and metastasis, cell cycle, and so on. Therefore, the data suggested that some genes play a critical role in NPC, and provided an important clue to elucidate the mechanism of these genes.

Key words nasopharyngeal carcinoma, microarray, gene expression

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300205, 30300063, 30300201, 30470955, 30330560), The Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0761) and The Special Funds of Science & Technology Department of Human Province (05SK1001-1).

**These authors contributed equally in this work.

***Corresponding author . Tel/Fax: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: June 13, 2005 Accepted: July 28, 2005