

肺癌诊断基因的初步筛选

范保星¹ 笄冀平² 张开泰¹ 谢玲¹
项小琼¹ 王升启¹ 吴德昌¹

(1. 军事医学科学院放射医学研究所分子毒理研究室, 北京 100850;
2. 空军总医院病理科, 北京 100036)

【摘要】 目的 筛选肺癌细胞恶性转化不同时期差异表达的基因, 以期用于肺癌的诊断。方法 应用抑制消减杂交技术(SSH)、测序、cDNA 芯片(cDNA Microarray)、northern blot。结果 利用 SSH 建立了永生人支气管上皮细胞(BEP2D)恶性转化不同时期差异表达基因的 cDNA 文库, 其中, A 消减文库(BEP2D 细胞的 cDNA 为 tester, α 粒子照射 BEP2D 细胞后 35 代恶性转化细胞 R15Hp35 的 cDNA 为 driver) 有 416 个克隆, B 消减文库(α 粒子照射 BEP2D 细胞后 20 代转化细胞 R15Hp20 的 cDNA 为 tester, BEP2D 和 R15Hp35 细胞的 cDNA 混合后为 driver) 有 301 个克隆, C 消减文库(R15Hp35 细胞的 cDNA 为 tester, BEP2D 细胞的 cDNA 为 driver) 有 586 个克隆。对文库中 107 个克隆单向测序发现: 19 个克隆在 GenBank 中没有查到对应的同源序列, 其它 88 个克隆共代表了 76 个不同的已知基因。然后, 将 3 个文库中全部克隆的 cDNA 制作成 cDNA 芯片, 用该芯片筛选了 15 例肺癌组织、5 例肺癌旁组织和其他 8 种癌组织(肝癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、白血病、子宫内肌瘤、脑神经胶质瘤和结肠癌)中 mRNA 的表达差异。结果, 获得肺癌组织高于肺癌旁组织表达的 cDNA 26 个, 肺癌旁组织高于肺癌组织表达的 31 个, 2 者高于其他 8 种癌组织的分别为: 肺癌旁组织中 63 个, 肺癌组织中 87 个。将这 208 个具较大差异表达的基因重新制作成 cDNA 芯片, 再选用临床上同一鳞癌病人鳞癌和鳞癌旁组织各 1 例与该芯片杂交, 发现这些筛选出的基因的确在癌组织和癌旁组织中存在较大差异。结论 这些初步筛选出的差异表达基因有望成为肺癌诊断的候选基因。

关键词 肺肿瘤; 诊断; 基因; BEP2D 细胞; cDNA 芯片; 抑制消减杂交

中图分类号 R734.2 **文献标识码** A **文章编号** 1671-5144(2002)02-0075-05

Screen the lung cancer related diagnosis genes

Fan Baoxing¹, Da Jiping², Zhang Kaitai¹, Xie Ling¹,
Xiang Xiaoqiong¹, Wang Shengqi¹, Wu Dechang¹

(1. Department of Molecular Toxicology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, P. R. China; 2. Department of Pathology, Xi Diao Yu Tai Hospital, Beijing 100036, P. R. China)

【Abstract】 **Objective:** Screen the differentially expressed genes in differentially malignant transformed lung cancer cell lines, in the hope of applying to lung cancer diagnosis. **Methods:** suppression subtractive hybridization (SSH), sequence, cDNA Microarray, northern blot. **Result:** Constructed three differentially expressed cDNA libraries from different malignant transformed human bronchial epithelial cells (BEP2D) using SSH: A. subtraction library (The cDNAs of BEP2D cells as tester and that of R15Hp35 cells as driver.) contained 416 clones; B. subtraction library (The cDNAs of R15Hp20 cells as tester and that of R15Hp35 and BEP2D cells mixed together as driver.) contained 301 clones; C. subtraction library (The cDNAs of R15Hp35 cells as tester and that of BEP2D cells as driver.) contained 568 clones. Then, 107 cDNA clones were sequenced and analyzed: 19 cDNAs were found to be novel ones; and 88 cDNAs represent 76 different known genes. After that, the three library clones were made on one cDNA chip and hybridized with probes which come from 15 samples lung cancer tissues, 5 sample lung paracancerous tissues and other 8 kinds of tumor tissues (3 samples for each, including

作者简介: 范保星 (1973 -), 男, 山东省茌平县人, 医学博士, 助理研究员, 主要研究肺癌发生的分子机制。

liver, gastric, esophageal, breast, leukaemia, endometrium, glioma, colorectal.) respectively: 27 cDNAs expressed higher in lung cancer tissue than in paracancerous tissues; 31 cDNAs

expressed higher in lung paracancerous tissues than in cancer tissues. Compared with other 8 kinds tumors, lung paracancerous tissues have 63 cDNAs and lung cancer tissues have 87 cDNAs over expressed. Put the 208(27 + 31 + 63 + 87) cDNAs on one cDNA chip and hybridized with cancer and paracancerous tissues which come from same squamous cell carcinoma patient, the expression profile has distinct difference between the two tissues. **Conclusion:** The differentially expressed genes may be the potentially genes for diagnosis of lung cancer.

Key words lung cancer; diagnosis; genes; BEP2D cell; cDNA Microarray; suppression subtractive hybridization

在众多肿瘤中,肺癌是严重影响人们生命健康的恶性肿瘤,对其早期诊断是进行预防和治疗的关键,但由于缺乏肺癌组织特异和时相特异的分子标记物,使得肺癌的早期诊断一直存在较大的困难。该实验应用抑制消减杂交技术(SSH)获得了 α 粒子诱发永生生化人支气管上皮细胞(BEP2D)恶性转化不同时期差异表达的基因,将这些基因制作成cDNA芯片,然后有针对性的选用临床标本对芯片上的基因进行筛选,初步筛选出了肺癌组织部分差异表达基因的cDNA片段,这些差异表达的基因可望用于肺癌的临床诊断。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养

永生生化BEP2D细胞(美国, Harris CC提供)。R15H细胞为本实验室用1.5 Gy α 粒子照射BEP2D细胞后诱导建立的转化细胞系,照射后20代龄细胞(R15Hp20)具有形态学转化特征,但细胞接种裸鼠不成瘤;35代龄细胞(R15Hp35)开始癌变,细胞接种裸鼠后成瘤,病理学分型为鳞癌。细胞于HLC-8无血清培养液(美国, Biofluids Inc.), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下培养。

1.1.2 标本来源

15例肺癌组织、5例肺癌旁组织和8种其它癌组织(肝癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、白血病、子宫内膜癌、脑神经胶质瘤和结肠癌各3例)由空军总医院提供。

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取

用Trizol(Gibico公司)试剂,按其说明提取BEP2D、R15Hp20、R15Hp35细胞及各组织标本的总RNA,用DNase I消化去除gDNA后再抽取总RNA。

1.2.2 SSH

具体操作按SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit和Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtractive Kit说明书进行,将第2次(巢式)PCR产物克隆到pGEM-T

载体后建立cDNA消减文库。消减文库的建立方式为:以BEP2D细胞的cDNA为Tester, R15Hp35细胞的cDNA为Driver进行消减杂交获得A消减文库;以R15Hp20细胞的cDNA为Tester, BEP2D和R15Hp35细胞的cDNA混合在一起作为Driver进行消减杂交获得B消减文库;以R15Hp35细胞的cDNA为Tester, BEP2D细胞的cDNA为Driver进行消减杂交获得C消减文库。

1.2.3 重组质粒的鉴定

PCR鉴定:取1.0 μ l菌液培养液直接作模板,然后依次加入10 \times PCR buffer 2.5 μ l, Nested PCR primer 1R和2R各1.0 μ l, Taq DNA聚合酶0.5 μ l (2.5 U), 50 \times dNTP 0.5 μ l, H₂O 18.5 μ l, 于94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 cycles扩增,以空载体质粒为对照,反应结束后用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

测序鉴定:随机挑取A消减文库中50个克隆、B消减文库中25个克隆和C消减文库中32个克隆,对插入的cDNA片段进行单向测序。

1.2.4 cDNA芯片的制作

以pGEM-T的一对通用引物T7/SP6对3个文库中的全部克隆进行扩增,按文献[1]的方法将扩增出的cDNA制作成cDNA芯片。

1.2.5 cDNA探针的制备与杂交

按文献[1]中的方法合成探针并与芯片杂交。共合成3份探针:15例肺癌组织mRNA混合在一起后的探针,5例肺癌旁组织mRNA混合在一起后的探针,其它8种癌组织mRNA混合在一起后的探针。

1.2.6 图像扫描及分析

干燥后的芯片置ScanArray 3000扫描仪内扫描,ImaGene软件分析和处理数据,初步筛选具较大差异表达的基因。

1.2.7 二次芯片制作与杂交

将上述初步筛选出来的具较大差异表达的基因重新制作成cDNA芯片,再选用临床上1例鳞癌和1例鳞癌旁组织mRNA标记后的探针分别与该芯

片杂交,进一步验证初步筛选出来的差异表达的基因。

1.2.8 Northern 杂交分析

取抽提的同一个肺鳞癌病人的癌旁和癌组织总 RNA 各 30 μ g, 甲醛凝胶电泳, 转膜。随机挑取 2 个复筛的 cDNA 重组子, 用 T7/SP6 引物扩增外源插入片段, 回收各片段后, 用放射性同位素标记探针进行 Northern 杂交。

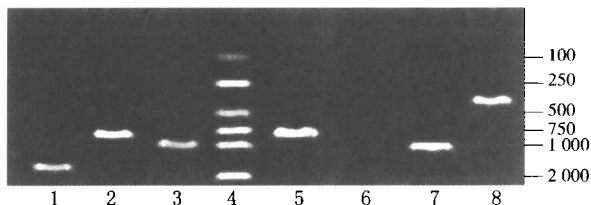
2 结果

2.1 消减 cDNA 文库构建

运用 SSH 技术, A、B、C 3 个消减 cDNA 文库获得的克隆数分别为: A 消减文库 416 个克隆, B 消减文库 301 个克隆, C 消减文库 586 个克隆。

2.2 重组质粒的鉴定

用与接头有互补序列的内引物 Nested primer 1R 和 2R 做 PCR, 因为只有插入片段才连有接头, 所以在电泳图谱上可见扩增产物者为阳性克隆, 而无扩增产物者为空载体质粒(图 1)。这些结果说明差异表达的基因已成功的克隆到 TA 载体中。



1、2、3 为 T7/SP6 引物扩增部分质粒, 4 为 2000bp DNA marker, 5、7、8 为 Nested primer 1R 和 2R 扩增重组质粒, 6 为 Nested primer 1R 和 2R 扩增空载体质粒

图 1 PCR 扩增和鉴定重组质粒

对 107 个 cDNA 克隆单向测序并与 GenBank 中序列比较发现: 19 个 cDNA 克隆在 GenBank 中未检索到同源序列, 占已测序克隆的 17.76%; 其它 88 个克隆共代表了 76 个不同的已知基因, 即消减库中约 86.37% 的克隆代表着不同的基因, 表明 cDNA 消减群体内部很少重复拷贝, 不同基因间丰度的差异得到了很好的均衡。

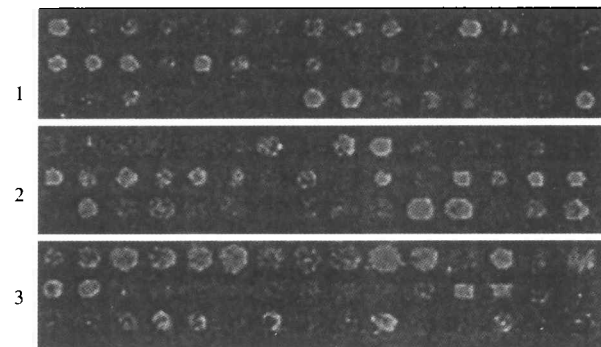
2.3 cDNA 芯片的制作

以 pGEM-T 载体两端的一对通用引物 T7/SP6 扩增了 1 303 个克隆的外源插入片段。经 1% 琼脂糖电泳鉴定, 除其中 13 个克隆没有扩增出插入片段外, 其余克隆都得到了特异扩增片段(图 1), 外源插入片段的大小大部分介于 500 ~ 1 000 bp 之间, 平均大小在 750 bp 左右, 与 SSH 设计预期的插入片段大

小吻合^[3]。按文献[1]的方法将 1 290 个(1 303 - 13)克隆的 cDNA 制作成 cDNA 芯片。

2.4 图像扫描及分析

3 组标记的探针分别与 cDNA 芯片杂交后, 结果如图 2 示(示部分图象)。图象经 Imagen 软件分析和处理后, 以表达量高于对照组 10 倍以上为标准进行差异表达基因的初选, 其中肺癌组织高于肺癌旁组织表达的 cDNA 26 个, 肺癌旁组织高于肺癌组织表达的 31 个, 2 者高于其他 8 种癌组织的分别为: 肺癌旁组织中 63 个, 肺癌组织中 87 个。

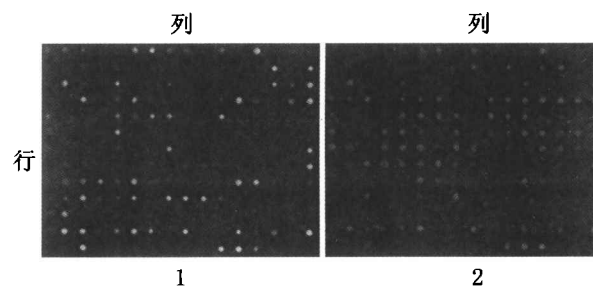


1 为肺癌组织探针杂交结果, 2 为肺癌旁组织探针杂交结果, 3 为其它 8 种癌组织探针杂交结果

图 2 cDNA 芯片杂交扫描结果(示部分图象)

2.5 二次芯片制作与杂交结果

初步筛选出的基因制作成的 cDNA 芯片经与临床上 1 例鳞癌和 1 例鳞癌癌旁组织 mRNA 标记后的探针分别杂交后, 发现这些初步筛选出的基因的确存在明显差异(图 3)。



1 为鳞癌癌旁组织探针杂交结果, 2 为鳞癌组织探针杂交结果

图 3 二次 cDNA 芯片杂交结果

2.6 Northern 杂交分析

为进一步验证复筛的 208 个克隆是否真正代表着在癌旁和癌组织中差异表达的基因, 随机挑取 2 个克隆, T7/SP6 扩增外源插入片段, 各片段分别与癌旁和癌组织中总 RNA 进行 Northern 杂交(图 4)。

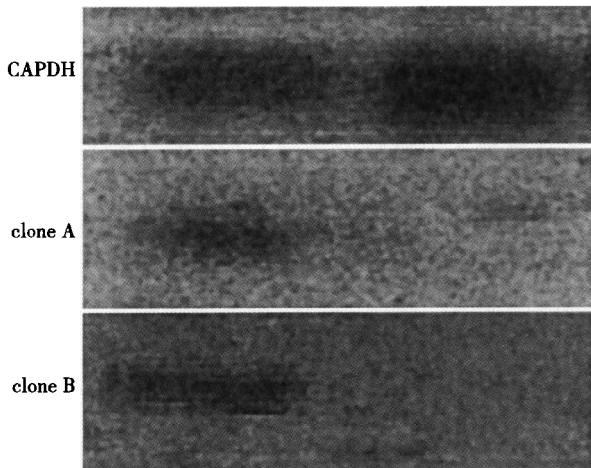


图4 Northern 杂交

克隆 A 在芯片上的表达为: 在癌组织中高表达, 在癌旁组织中低表达(见图 3, 第 6 行、4 列); 该克隆经 Northern 验证与芯片结果变化趋势一致。克隆 B 在芯片上的表达为: 在癌组织中高表达, 在癌旁组织中检测到微弱表达(见图 3, 第 8 行、9 列); 该克隆经 Northern 验证发现在癌组织中也是高表达, 但在癌旁组织中没有检测到表达。

3 讨论

BEP2D 细胞是经 HPV18 转染的永生化人支气管上皮细胞, 该细胞经 1.5 Gy α 粒子照射后第 20 代开始出现细胞形态学改变, 但接种裸鼠不成瘤, 说明细胞发生转化; 第 35 代接种裸鼠成瘤(鳞癌), 说明细胞发生恶化。因此以该细胞系为对象寻找肺癌发生、发展和恶化不同时期差异表达的基因具有重要价值。

肺癌是全世界发病率和死亡率增长最快, 对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤, 积极开展肺癌病因、诊断、治疗和预防的研究是当今迫切的任务, 目前, 肺癌的早期诊断已成为肺癌研究的重大课题。癌症尚未发现之前往往有一个相当长的癌前期过程, 病理学上的反映则是癌前期组织中出现不典型增生细胞(atypical hyperplastic cell), 轻度不典型增生尚具有可恢复性, 而重度不典型增生则会发展

成癌, 在此过程中伴随着许多分子和细胞遗传学的改变, 而基因的改变可能涉及癌变的更早期阶段。肺癌发生初始阶段涉及的基因改变颇多, 它们在肺癌发生中的出现顺序和几率尚未完全清楚, 通过对其深入研究将异常分子作为生物标记用于早期肺癌的检测和识别肺癌高风险个体, 无疑将对高危人群的进一步筛选以及对亚临床患者的早期诊断有很大的指导意义。

文库中的 cDNA 经 cDNA Microarray 初步筛选出后, 肺癌旁组织和肺癌组织中互相高于对方 10 倍以上表达的基因, 有望成为诊断肺癌恶性转化不同时期的基因; 而与其它 8 种癌组织相比, 肺癌旁和肺癌组织中 10 倍以上高表达的基因则有望成为诊断肺癌组织特异性的基因。上述初步筛选出的基因重新制成芯片并与临床上 1 例鳞癌组织 mRNA 标记后的探针和 1 例鳞癌癌旁组织 mRNA 标记后的探针杂交后, 发现初步筛选出的基因的确存在明显差异后, 下一步将会选用临床上更多的病理组织(主要是用不同类型和不同恶化阶段的肺癌组织)进一步筛选和验证, 最终希望获得对肺癌分型、分期以及肺癌组织特异性诊断的基因。

在初步筛选出的 cDNA 中, 有 6 个 cDNA 被测序(表 1), eEF1A(克隆 A229)的主要功能是进行蛋白质的合成, Abdelnaby 发现 eEF1A 在小鼠胚胎发育期和出生后的早期高表达, 出生 14 天后开始逐渐降低; 另外, 小鼠肌肉损伤时, eEF1A 蛋白含量迅速升高, 损伤修复后, 其含量又降至原来的水平^[2-3]。eEF1A 除了在蛋白的合成中起作用外, 还参与细胞的生长、发育、衰老和形态建成等。Silar P 发现 eEF1A 基因某些位点的突变, 可以延长细胞寿命^[4], 过表达 eEF1A 蛋白能降低细胞的生长速度, 使 G1 期延长、细胞变大^[5]。将 H₂O₂ 施入培养细胞后, 检测到 EF-1 α 的蛋白水平迅速增加, 同时细胞凋亡, 将反义 EF-1 α 载体转入细胞后抑制了 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡^[6]。而转染了正义 eEF1A 基因的细胞却促进了细胞凋亡, 说明 EF-1 α 的高表达在细胞

表 1 6 个已测序 cDNA 克隆

克隆号	高表达的组织	基因名称
A210	肺癌旁	lipopolysaccharide specific response-68 protein(gb AC006146.21)
A230	肺癌旁	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase(dbj AK025736.11)
A317	肺癌旁	tetracycline efflux protein and LacZ alpha peptide(gb U07168.11)
A229	肺癌旁	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(ref XM_004398.11)
B41	肺癌	New sequence
B280	肺癌	New sequence

A, B 分别代表 A, B 文库中的克隆

凋亡程序中起着较为重要的作用, Duttaroy A 认为 eEF1A 表达量的降低可导致蛋白合成的降低, 这样就减少了那些“凋亡因子”的合成, 从而使细胞逃脱凋亡程序^[7]。其在肺癌组织中的低表达则预示着修复或死亡程序的失败, 使细胞进入了恶化历程。另外 EF-1 还是 Rho 和 cdc2 激酶的底物, 参与细胞内的信号传递^[8-9]。HMG-CoA(克隆 A230)合成酶是胆固醇合成的关键酶, 与角化细胞的生长与分化有关。Siemianowicz K 发现 135 个肺癌病人血液中高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇和甘油三酸酯的浓度比正常人低^[10], Broitman SA 发现结肠癌细胞在低浓度或无脂蛋白胆固醇存在的情况下, 会获得一种生长优势, 而高浓度的脂蛋白胆固醇会抑制结肠癌细胞的增殖^[11]。Hardwick M 研究认为胆固醇参与了乳腺癌细胞的增殖和恶转^[12]。本实验中 HMG-CoA 合成酶在肺癌组织中的低表达可能与肺癌的发生和发展有关。另外, 胰岛素和 EGF 都能刺激表皮细胞内 HMG-CoA 合成酶 mRNA 的表达^[13]。LSR68(克隆 A210)参与细胞的免疫反应和信号传递, 并刺激 TNF-alpha 和 IL 的表达^[14], 其在肺癌组织中的低表达可能与癌细胞逃脱机体免疫和使细胞脱离凋亡程序有关。对初步筛选出的 cDNA, 特别是新 cDNA 的鉴定、分析以及功能的研究有助于理解肺癌发生的机理, 也将是我们下一步工作的一个重点。

参 考 文 献

- [1] 范保星, 张开泰, 马淑华, 等. 肺癌相关基因芯片的制作 [J]. 生物技术通讯, 2001, 12(1): 12-14
- [2] Khalyfa A, Bourbeau D, Chen E, et al. Characterization of Elongation Factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 Protein Expression in Normal and wasted Mice [J]. J Biol. Chem, 2001, 276(5): 22915-22922
- [3] Kyalifa A, Carlson B M, Carlson J A, et al. Toxin injury-dependent switched expression between EF-1 alpha and its sister. S1, in rat skeletal muscle [J]. Dev Dyn, 1999, 216(3): 267-273
- [4] Silar P, Rossignol M, Tahar R, et al. Informational suppressor alleles of the eEF1A gene, fertility and cell degeneration in *podospora anserina*. Mol Gen Genet, 2000, 264(3): 354-362
- [5] Munshi R, Kandl K A, Carr-Schmid A, et al. Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast [J]. Genetics, 2001, 157(4): 1425-1436
- [6] Chen E, Proestou G, Bourbeau D, et al. Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1): 140-148
- [7] Duttaroy A, Bourbeau D, Wang X L, et al. Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha [J]. Exp Cell Res, 1998, 238(1): 168-176
- [8] Izawa T, Fukata Y, Kimura T, et al. Elongation factor-1 alpha is a novel substrate of rho-associated kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(1): 72-78
- [9] Belle R, Minella O, Cormier P, et al. Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase [J]. Prog Cell Cycle Res, 1995, 1: 265-270
- [10] Siemianowicz K, Gminski J, Stajszczyk M, et al. Serum HDL cholesterol concentration in patients with squamous cell and small cell lung cancer [J]. Int J Mol Med, 2000, 6(3): 307-311
- [11] Broitman S A, Cerda S, Wilkinson J. Cholesterol metabolism and colon cancer [J]. Prog Food Nutr Sci, 1993, (1): 1-40
- [12] Hardwick M, Fertikh D, Culty M, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 831-842
- [13] Harris I R, Hoppner H, Siefken W, et al. Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(1): 83-87
- [14] Ostberg J R, Taylor S L, Baumann H, et al. Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response [J]. J Leukoc Biol, 2000, 68(6): 815-210

《中国全科医学》征稿征订启事

《中国全科医学》杂志是由中华人民共和国卫生部主管的国内第一家公开出版发行的国家级全科医学学术性刊物, 现为“中国科技论文统计源核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊”。主要栏目: 述评、海外论坛、全科医学病例讨论、全科医疗专题研讨、全科医疗临床研究、全科医学教育与模式探索、全科医疗管理、社区卫生服务与卫生改革、社会·家庭与心理、社区预防与健康促进、社区康复与护理、重点人群卫生与保健、社区合理用药、急诊急救、临床误诊分析与提示、全科临床荟萃、全科医生知识窗、视窗。欢迎临床医务人员、社区卫生人员、卫生管理人员及与全科医学相关的教学人员、科研人员踊跃投稿, 对于基金项目、科研课题等高质量

论文将优先刊用。

《中国全科医学》杂志为月刊, 国际标准版本, 大 16 开, 84 页, 邮发代号 18-33, 每期定价 7 元, 全年 84 元, 欢迎广大读者到邮局订阅, 亦可直接汇款至中国全科医学杂志社发行部邮购。E-mail: welcome@chinagp.net; http://www.chinagp.net

地址: 河北省邯郸市丛台路甲 42 号, 中国全科医学杂志社; 邮编: 056029; 电话(传真): 0310-3095356。北京市右安门外西头条 10 号, 中国全科医学杂志编辑部; 邮编: 100054; 电话(传真): 010-83525550

中国全科医学杂志社