用微阵列研究鼻咽癌与正常鼻咽组织基因表达谱

何志巍 任彩萍 许亮国 刘卫东 谢 鹭 黎众魁 姚开泰*
(湖南医科大学卫生部癌变原理重点实验室, 长沙 410078. * 联系人)

摘要 用 α-^{32}P-dCTP 逆转录分别标记成人正常鼻咽和鼻咽癌组织总 RNA 5 μg, 将合成的 cDNA 探针与具有 5 184 个点阵的高密度 cDNA 微阵列杂交, 用软件分析两者表达谱差异结果发现, 鼻咽癌组织中, 密度值在 200 以上有 187 个 EST, 鼻咽组织中 307 个 EST, 而 38 个 EST 在鼻咽组织高表达但在鼻咽癌组织低表达. 48 个 EST 在鼻咽癌组织高表达但正常鼻咽组织低表达. 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; 采用高密度 cDNA 微阵列是一种可在大范围内筛选差异表达基因的强有力方法.

关键词 **cDNA 微阵列 基因表达谱 鼻咽癌 鼻咽**

大多数肿瘤的发生是多个瘤基因或抑瘤基因共同作用的结果, 如胃癌的 *p53*, *APC*, *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[1]; 而鼻咽癌与 *p53*, *cyclin D1*, *c-myc*, *c-ras* 等基因表达异常有关[2], 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, 同时检测鼻咽癌和成人正常鼻咽组织 5 184 个 EST 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, 以进一步阐明鼻咽癌发生的机制.

1 材料与方法

( ) 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 对侧鼻咽组织均由湘雅医院耳鼻喉科提供活检组织, 即刻液氮冻存.

( ) 总 RNA 提取及去 DNA 消化处理. 用 TRIzol (GIBCO BRL) 抽提组织总 RNA. DNase iv 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 *GAPDH* 设计引物, PCR 扩增检测有无 gDNA 污染. 取 RNA 5 μg 于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外仪检测摄象.

( ) α-^{32}P 标记 cDNA 探针及纯化. 每样品取 5 μg 总 RNA 溶于 8 μL DEPC 处理水中, 加 2 μL Oligo dT(1 μg/μL) (Research Genetics, POLY GF), 于 70 ℃变性 2 min 即刻置冰上, 再加入 6 μL 5 × 链合成缓冲液(BRL/Life Tech)、1 μL DTT 0.1 mol/L (BRL/Life Tech)、1.5 μL dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 均为 20 nmol/L) (Pharmacia 27-20350-02), 1.5 μL SuperScript ㊦RT(200 U/μL) (BRL/Life Tech) 和 10 μL α-^{32}P-dCTP(北京亚辉生物公司), 于 37 ℃, 逆转录 90 min. 用 Sephdex G-50 过柱纯化探针, 其放射活性计数在 5 000 次/min 以上.

( ) 杂交、洗膜及放射自显影. 于 5 mL 杂交液(MicroHyb, Research Genetics) 中加入 5 μL Poly dA(1 μg/μL) (Research Genetics) 和 5 μL Cot-1 DNA (1 μg/μL) (BRL/Life Tech) 42 ℃与 GF201 微阵列(Research Genetics Co.) 预杂交 2 h 后, 加入纯化探针 200 μL, 42 ℃杂交 12 h. 先用 30 mL 2 × SSC/1% SDS 液 50 ℃在杂交管内于杂交炉洗膜一次, 再于 50 ℃恒温摇床上用 100 mL 该液洗一次,

每次 20 min, 最后用 0.5×SSC/1%SDS 液室温下洗膜 15 min. 用 Kodak 胶片, – 70℃曝光 24 h.

( ) 图象分析. D19 液显影后将 X 胶片用激光扫描仪输入 Pathways 2.0 (Research Genetics) 分析软件, 对成象的点阵进行密度分析, 得到密度分布和杂交点阵图.

( ) RT-PCR 证实杂交结果. 选用在鼻咽组织高表达而鼻咽癌低表达及鼻咽组织低表达而鼻咽癌高表达的 EST 各 2 个, 进行 RT-PCR 反应, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, VDS(Pharmacia, 美国) 成象打印.

2 结果

2.1 组织总 RNA

提取各组织总 RNA, 经 DNase i消化后 PCR 检测无 gDNA 污染, A_{260}/A_{280} 值均在 1.9~ 2.0 之间, 电泳检测无降解, 见图 1.

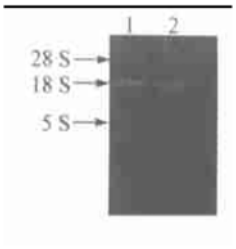


图 1 各组织总 RNA 2% 琼脂糖凝胶电泳
1——成人鼻咽组织, 2——鼻咽低分化鳞状细胞癌

2.2 组织 5184 个基因的表达谱

将各组织总 RNA 所标记的 cDNA 探针分别与 GF201 微阵列杂交后, 由软件处理结果如图 2.3 所示. 图中 1, 2 为阵列的 2 个区(Field), A~ H 为阵列的 8 个格(Grid), 每格有 12 列(Column) 和 30 行(Row). 这些定位对应于基因数据库中的不同 EST, 如 1 B 1 6 示第 1 区 B 格 1 列 6 行, 其基因库序号为 AA454597 为 EST.

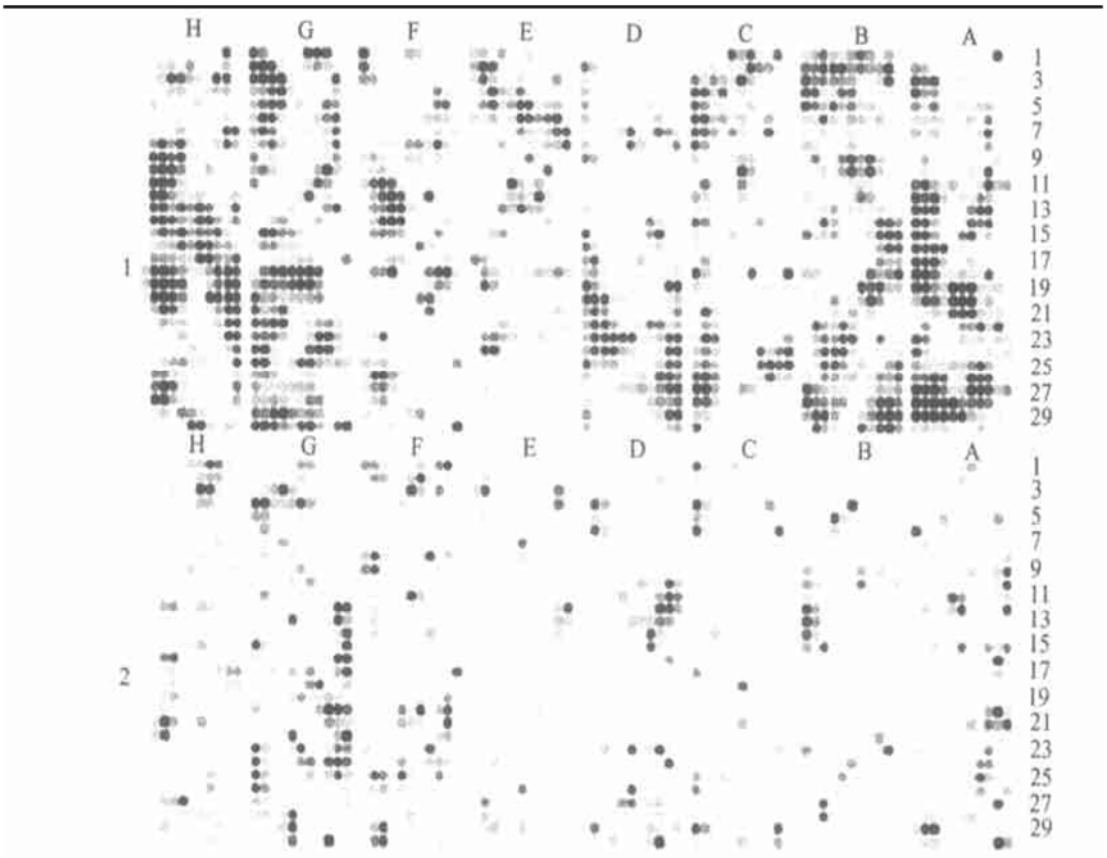


图 2 成人鼻咽组织 cDNA 探针与 GF201 微阵列杂交结果

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, 结果表明两者表达谱相似, 均存在大量低表达的 EST, 但在各密度值(无单位) 范围内的 EST 个数不同, 密度值在 200 以上的鼻咽癌组织中有 187

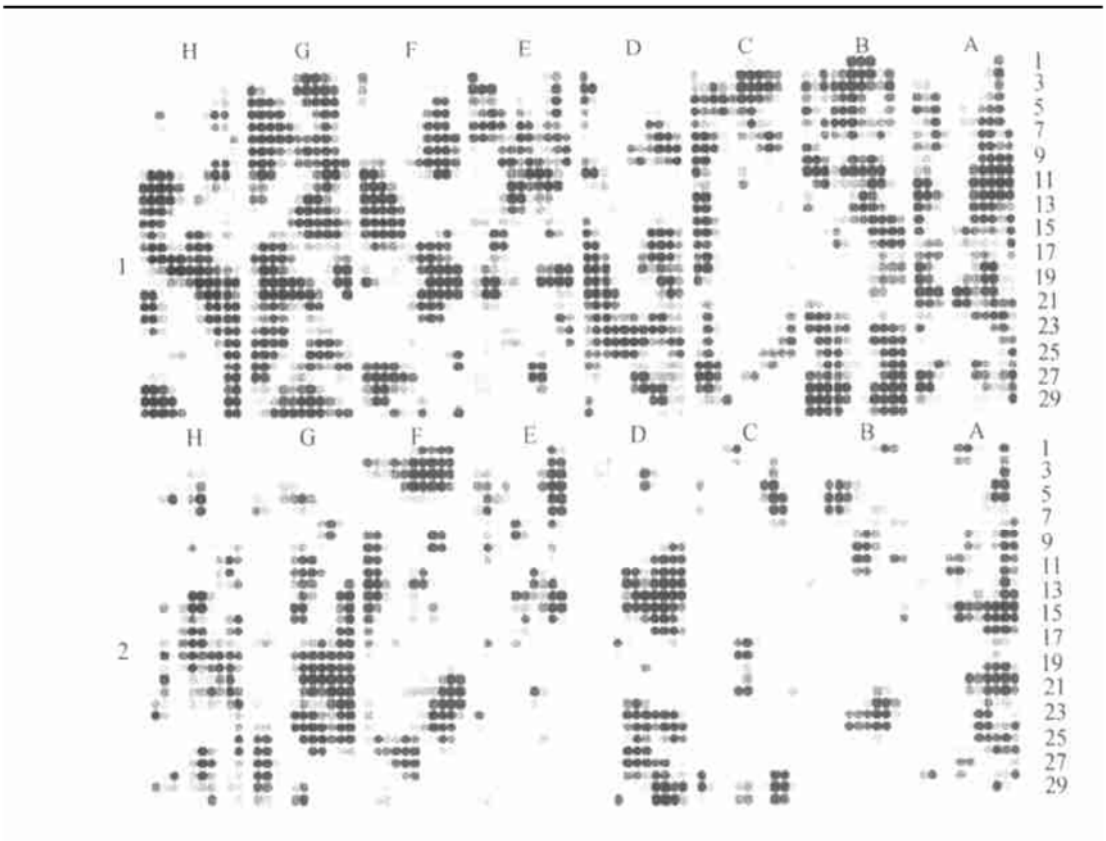


图 3 鼻咽癌组织 cDNA 探针与 GF201 微阵列杂交结果

个 EST, 鼻咽组织中 307 个 EST, 38 个 EST 在鼻咽组织高表达而在鼻咽癌组织低表达, 48 个 EST 在鼻咽癌组织高表达而正常鼻咽组织低表达. 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 4, 5 所示.

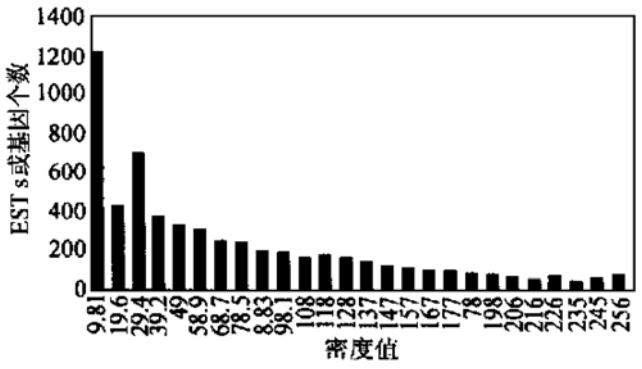


图 4 成人鼻咽组织总 RNA 与 GF201 杂交后的密度分布

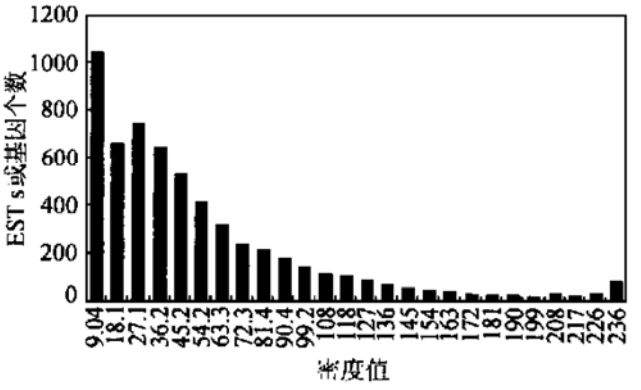


图 5 鼻咽癌组织总 RNA 与 GF201 杂交后的密度分布

3 讨论

人类基因组计划(HGP) 不仅积累了大量的基因序列资源而且也带来了研究方法的巨大进步, cDNA 微阵列或芯片技术便是这一时代的杰出代表, 是目前研究基因表达的最佳方法[3,4]. DNA 微阵列或芯片(Chip) 是在尼龙膜表面打点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^{32}P, ^{33}P, ^{35}S 或荧光素标记的待测材料中的 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结果进行分析处理, 获

得各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、新的基因分析方法[3,5]. 传统地对基因表达水平的检测方法有敏感度不够高(如 Northern blot)或一次仅能检测单个或几个基因表达(如 RT-PCR)或需大规模测序(如 SAGE)等局限性,而 cDNA 微阵列技术不但可高敏感地定量(5 拷贝/细胞)、定性检测基因表达水平,且其最大优点是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[5,6].

我们已采用含有 588 个已知基因的 cDNA 阵谱进行了人鼻咽癌基因表达的初步研究,并发现多个基因在鼻咽癌中高表达[7]. 但是否还存在新的基因起作用呢? 本文采用含有 5 184 个点阵的高密度 cDNA 微阵列,研究了成人鼻咽组织和鼻咽低分化鳞状细胞癌组织基因的表达差异. 这 5 184 个点阵代表不同的表达序列标鉴 EST,为处于严密转录调控下代表人类基因的 cDNA 序列片段. 结果显示鼻咽癌组织中有 187 个 EST 高表达,鼻咽组织中 307 个 EST 高表达,38 个 EST 在鼻咽组织高表达而在鼻咽癌组织低表达, 48 个 EST 在鼻咽癌组织高表达而正常鼻咽组织低表达. 说明正常鼻咽与鼻咽癌组织可能还存在多个差异表达的新基因而在该瘤的发生中起作用. 高、低表达的 EST 中各选 2 个用 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[8]. 我们已着手用这些 EST 在 Internet 上寻找同源序列进行相关基因的克隆,并将在很短的时间内绘制出人鼻咽癌与正常成人鼻咽组织 4 万个基因或 ESTs 的更大范围内的基因表达图谱,从而更深入了解鼻咽癌发生的分子机制.

DNA 微阵列或芯片自 1995 年至今 3 年的时间内,在美国已相当普及,广泛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,并有 11 家大公司投身于该技术的研制和开发[3],而我国尚处于起步阶段. 从本实验结果看,采用高密度 cDNA 微阵列是一种可在大范围内筛选差异表达基因的强力有效方法,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.

致谢 本工作得到蓝 轲、张 玲博士及周 文、史剑凌、杨玉文等同事的大力支持,特此致谢! 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39730200)和中华医学会基金(96-655)重点资助项目.

参 考 文 献

1 Porter P I, Gowm A M, Kramp S G, et al. Widespread *p53* overexpression in human malignant tumors. Am J Pathol, 1992, 14: 145~ 153

2 Sun Y. Molecular oncology of human nasopharyngeal carcinoma. The Cancer J, 1995, 8(6): 325~ 332

3 Ramsay G. DNA chips: state-of-the-art. Nature Biotechnology, 1998, 16: 40~ 44

4 Nelson N. Microarrays pave the way to 21st 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: 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. 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, 1998, 16(22): 2462~ 2463

8 Schgal A, Boynton A, Young R, et al. Application of the differential hybridization of Atlas™ human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. J Surgical Oncology, 1998, 67: 2340~ 2341

(1999-04-08 收稿, 1999-08-24 收修改稿)