

二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因

阚卫兵, 方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 高必峰

阚卫兵, 中国上海中医药大学附属普陀医院 上海市 200062
方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 中国上海中医药大学 上海市 201203
高必峰, 科罗拉多大学医学院 美国科罗拉多州 80220
阚卫兵, 男, 1970-01-16生, 山东省郯城县人, 汉族, 2005年上海中医药大学博士毕业, 主治医师, 主要从事中医药的分子生物学实验研究。
国家自然科学基金资助项目, No.30271576
通讯作者: 方肇勤, 201203, 上海市浦东区张江蔡伦路1200号, 上海中医药大学中医基础学院实验中医学教研室. zqfang@sh163d.sta.net.cn
电话: 021-51322119
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-15

Up-regulated genes in diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats

Wei-Bing Kan, Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan,
Xiao-Zhen Zhao, Zhong-Hua Wu, Xue-Shi Sheng, Bi-Feng Gao

Wei-Bing Kan, Affiliated Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Xiao-Zhen Zhao, Zhong-Hua Wu, Xue-Shi Sheng, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Bi-Feng Gao, Medicinal College of Colorado State University, 80220 Colorado, United States
Correspondence to: Zhao-Qin Fang, Department of Laboratory Medicine, College of Laboratory Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Zhangjiang Cailun Road, Pudong District, Shanghai 201203, China. zqfang@sh163d.sta.net.cn
Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-06-15

Abstract

AIM: To investigate the differentially expressed genes in rat liver cancer induced by diethylnitrosamine (DEN), and to explore mechanism in DEN-induced carcinogenesis.

METHODS: The model of liver cancer was induced by DEN. The RNA was extracted purified from the cancer cells with routine methods. Affymetrix Rat 230A GeneChip and technique were used to detect the discrepancies of gene expression between tissues of normal control and liver cancer.

RESULTS: Of 15 710 genes in the GeneChip, the positive expression covered a percentage of 84.54% in liver cancer. There were 509 genes whose expression levels in liver cancer were about 5 times as high as those in the normal controls, of which 325 were EST fragments. Of the 325 genes, 184 ones were with known function, of which 168 had been reported in relevant references.

Of the 168 genes, 100 ones were associated with the tumor (36 with liver cancer), 4 with liver, and the other 64 had no relation with tumor and liver.

CONCLUSION: DEN-induced up-regulations of genes in liver cancer are fairly complicated, of which 168 ones need paying more attention to.

Key Words: Liver cancer; Gene; GeneChip; Rats; Diethylnitrosamine

Kan WB, Fang ZQ, Guan DY, Zhao XZ, Wu ZH, Sheng XS, Gao BF. Up-regulated genes in diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(20):2420-2426

摘要

目的: 首次大范围地观察二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌组织基因表达的差异, 探索DEN诱发肝癌的分子机制。

方法: DEN诱导大鼠肝癌, 常规抽提和纯化RNA, 采用Affymetrix Rat 230A GeneChip及技术比较肝癌组织与正常大鼠肝组织基因表达的差异。

结果: 在芯片的15 710个基因中, 肝癌有84.54%的基因阳性表达, 肝癌基因表达在正常肝脏5倍以上的有509个, 其中325个为EST片段, 已知基因184个, 其中的168个基因可以检索到有关文献的报道。在这168个基因中, 有100个基因被发现与肿瘤有关, 其中有36个与肝癌有关; 有4个基因与肝脏有关; 另有64个基因与肿瘤和肝脏无关。

结论: DEN诱发大鼠肝癌的后基因组变化中168个基因值得关注。

关键词: 肝癌; 基因; 基因芯片; 大鼠; 二乙基亚硝胺

阚卫兵, 方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 高必峰. 二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2420-2426

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2420.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病隐匿、恶性程度高、预后差, 严重威胁到人类的身心健康。因

而探求肝癌的发病机制, 寻求有效的治疗方法, 一直是基础医务工作者努力的方向。二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌涉及到多基因的改变^[1-8], 为更广泛地揭示DEN诱发大鼠肝癌肝组织基因表达的差异, 上海中医药大学与美国科罗拉多大学医学院联合采用Affymetrix Rat 230A GeneChip芯片对大鼠肝组织进行了基因检测。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂wistar大鼠, 24只, 体质量100-120 g, 随机分为2组, 正常与模型组各12只, 常规饲养, 模型组大鼠自由饮用80 μg/L DEN水溶液, 至20 wk处死动物。取出肝脏立即进行RNA抽提。采用GIBCO公司Trizol试剂盒及其方法抽提肝(含肝癌)组织总RNA, 采用RNeasy Mini试剂盒及其操作手册方法纯化RNA。纯化后, RNA的 A_{260} 和 A_{280} 的比值在1.9-2.1之间。用Agilent 2100 Bioanalyzer检测总RNA并确认其完整性。每组动物随机取5份纯化后的RNA, 混匀、合并成一份样本, 定量。将总RNA转录为双链cDNA, 用基因芯片纯化模块(Affymetrix)净化和复原双链cDNA。

1.2 方法 以双链cDNA为模板, 用RNA转录标记试剂盒在生物素标记核糖核苷酸混合物中进行转录, 转录产生生物素标记的cRNA。用基因芯片纯化模块(Affymetrix)净化生物素标记cRNA。将cRNA在94°C断裂缓冲液(在10 mL/L Tween 20中添加100 mol/L MES、1 mol/L Na⁺、20 mol/L EDTA)中孵育35 min使其变为50-200个碱基的片段。cRNA片段的最终浓度定量为0.05 g/L。每样本取200 μL和Affymetrix Rat 230A GeneChip® arrays芯片在GeneChip® Hybridization Oven 640(Affymetrix)杂交箱中, 45°C下杂交孵育16 h。杂交完成后, 去除杂交液, 冲洗芯片, 用GeneChip® Fluidics Station 450(Affymetrix)对芯片行抗生蛋白链菌素-藻蓝蛋白染色。用分辨率为2.5-3 μm的GeneChip Scanner 3000(Affymetrix)扫描读取芯片信息。

统计学处理 详细步骤和灵敏度问题以及定量的方法参考Affymetrix genechip网站的技术手册。

2 结果

DEN诱发大鼠肝癌成功, 造模至20 wk时, 模型组大鼠均出现肝癌。Affymetrix Rat 230A GeneChip检测结果, 肝癌组织有84.54%(每张芯片含有15 710个基因)的基因有表达, 芯片杂交后扫描图见图1, 其中肝癌组织基因表达大于正常基因(大于2倍)计2 796个(图2)。将肝癌组织与正常肝组织所测的读数数值比较, 求出比值, 按比值由高到低排序, 剔除比值小于5



图1 芯片杂交后扫描图。

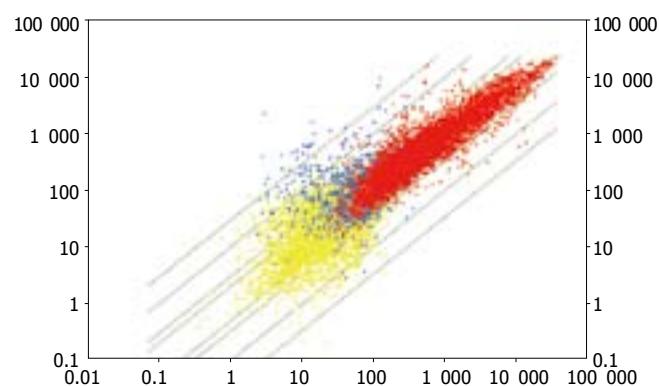


图2 正常大鼠肝脏与肝癌基因表达比较。图2中纵坐标为肝癌表达基因读数, 横坐标为正常肝脏表达基因读数; 图2中红色表示表达阳性的基因, 蓝色为疑似表达的基因, 黄色为接近阴性表达的基因; 为了在绘图中能够更好的体现杂交后数值的差异性, 图2采用 \log_2 数值作图以描述其差异。

倍的, 以及肝癌组织表达值读数在50以下的基因, 共得到509个基因, 其中325个基因是EST(未知基因)片段, 184个为已知基因。通过PubMed先后采用基因名称加Liver cancer、基因名称加cancer, 以及基因名称加Liver的检索方法, 对186个基因的20 a内的国外文献检索后, 统计表明: 已知基因中有16个基因在国外文献报道较少或无报道, 168个基因中有100个基因与肿瘤有关(其中有36个基因与肝癌有关), 4个基因与肝脏有关, 64个基因与肿瘤和肝脏无关(在文章中只是涉及到肿瘤和肝癌, 而非专门探讨的也归于此类)。兹将比值最高的前168个基因, 依据正常肝脏表达与否(表达读数小于50者计为不表达)依次归类如下。

2.1 肝癌组织表达大于正常肝脏的基因 这类基因, 在正常肝脏中有一定数量的表达, 大多表达数量很少。(1)肝癌组织表达大于(30倍以上)正常肝脏的基因, 3个基因在肝癌期间出现非常高的表达, 大于正常肝脏表达的30倍以上(表1)。(2)肝癌组织表达大于(30倍以下)正常肝脏的基因(表2)。

2.2 肝癌独特表达的基因 这类基因, 按照Affymetrix芯片数据处理, 正常肝脏所表达均为阴性, 其芯片读数大多在50以下。这类基因共有107个。(1)肝癌组织表达

大于正常肝脏30倍以上的基因(表3). (2)肝癌组织表达 大于正常肝脏30倍以下的基因(表4).

表1 肝癌组织表达大于(30倍以上)正常肝脏的基因

Genbank编号	基因名称英文(缩写和中文)	芯片读数	肝癌/肝脏	比值
56335	Glutathione-S-transferase, placental enzyme pi type(GST-pi, 谷胱甘肽-S-转移酶pi)	21 055/555		37
3817620	Aldose reductase-like protein (ARL-1, 醛糖还原酶相似蛋白)	12 703/121		104
1177817	UDP-glucuronosyltransferase (UGT, 尿苷二磷酸-葡糖醛酸转移酶)	9 203/114		80

表2 肝癌组织表达大于(30倍以下)正常肝脏的基因

Genbank编号	基因名称英文(缩写和中文)	芯片读数	肝癌/肝脏	比值
7106239	aflatoxin B1 aldehyde reductase (AFAR, 黄曲毒素B1乙醛还原酶)	18 598/1 813		10
6978470	Alpha-fetoprotein (Afp, 甲胎蛋白)	11 241/518		21
18183584	metallothionein-2 and metallothionein-1(金属硫蛋白2金属硫蛋白1)	11 211/1 603		6
13994165	Cytochrom P450 15-beta gene (Cyp2c12, 细胞色素P450 β 15)	10 270/524		19
6012070	dithiolethione-inducible gene-1 (DIG-1)	9 839/1 672		5
6978636	CD74 antigen	7 646/1 257		6
533123	lipid-binding protein(脂质结合蛋白)	6 922/593		11
14389298	vimentin (Vim, 房肽素)	5 655/481		11
204281	gamma-glutamylcysteine synthetase(γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶)	5 261/881		6
9506444	carbonic anhydrase 2 (Ca2, 碳酸酐酶2)	4 349/187		23
6978504	Annexin V (Anx5)	3 747/358		10
13929189	lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3)	3 590/456		7
8659576	thioredoxin reductase (硫氧还蛋白还原酶)	3 089/555		5
8393380	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd, 葡糖-6-磷酸脱氢酶)	2 950/295		9
18959233	glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb, 糖蛋白nmb)	2 861/201		14
6981203	Matrix Gla protein (Mgp)	2 835/296		9
3104998	Glutathione-S-transferase, alpha type (谷胱甘肽-S-转移酶α)	2 719/268		10
6981031	Heme oxygenase (Hmox1, 血红素加氧酶)	2 302/393		5
13592078	S-100 related protein, clone 42C (S100A10)	2 538/287		8
4133939	annexin VII	1 917/266		7
6978562	ATPase inhibitor (Atpi, ATP酶抑制因子)	1 852/237		7
3152927	mama	1 681/293		5
6978424	Alpha-2-macroglobulin (A2m, 巨球蛋白α2)	1 662/65		25
16758695	gamma-glutamyl transpeptidase(γ-谷氨酰胺转肽酶)	1 588/155		10
16905066	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab, 晶体蛋白α多肽2)	1 535/154		9
18188890	procollagen, type I, alpha 2 (I型前胶原, α2)	1 476/133		11
16757993	Pyruvate kinase 3 (Pk3, 丙酮酸激酶3)	1 397/181		7
13929207	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (Scd2)	1 356/55		24
11560084	connective tissue growth factor (Ctgf, 结缔组织生长因子)	1 326/152		8
13928849	3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh, 3磷酸甘油酸脱氢酶)	1 256/85		14
13506724	calcium binding protein (S100A6, 钙结合蛋白)	1 211/183		6
14010868	Aldehyde dehydrogenase class 3 (Aldh3a1, 醛脱氢酶3)	1 083/59		18
9910397	Ly6-C antigen gene (Ly6c)	1 056/190		5
6981229	Avian myelocytomatis viral (v-myc)	1 004/127		7
1565293	interferon inducible protein 10 (IP-10, 干扰素诱导蛋白10)	956/149		6
13540651	norvegicus gro (Gro1)	954/147		6
19424349	guanylate binding protein 2, interferon-inducible (Gbp2)	941/89		10
11761540	Pituitary tumor transforming gene (Ptgg1, 垂体瘤转化基因)	900/112		8
16758363	S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9, 钙粒蛋白B)	873/85		10
3127192	kidney-specific protein (KS, 肾特殊蛋白)	849/163		5
16758851	matrix metalloproteinase 12 (Mmp12, 基质金属蛋白酶12)	847/81		10
16758665	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1, 金属蛋白酶的组织抑制因子1)	808/99		8
9506466	carbonyl reductase (Cbr, 碳酰还原酶)	783/135		5
9506952	procollagen C-proteinase enhancer protein (Pcolce)	667/114		5
460632	asparagine synthetase (天冬酰胺合成酶)	648/115		5
10120485	glutathione S-transferase Yb4 gene (GstYb4, 谷胱甘肽S-转移酶Yb4)	572/105		5
19745193	thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor (Ts1pr)	568/80		7
432480	tyrosine kinase receptor (Ptk-3, 酪氨酸激酶受体)	465/59		7
12018329	leucocyte specific transcript 1 (Lst1, 白细胞特殊转录物)	391/68		5

9507122	factor-responsive smooth muscle protein (SM-20)	389/51	7
8393732	Lysyl oxidase (Lox, 赖氨酸氧化酶)	379/70	5
313807	cyclin B (细胞周期蛋白)	376/58	6
19173783	BCL2-related protein A1 (Bcl2a1, BCL2关联蛋白A1)	363/63	5
6978826	Fatty acid binding protein 2 (Fabp2, 脂肪酸结合蛋白2)	354/60	5
9845260	beta-galactoside-binding lectin (Lgals1)	347/64	5
497993	polo like kinase (plk)	316/51	6
6978608	Calcium-binding protein, intestinal, vitamin D-dependent (Calb3, 钙结合蛋白维生素D依赖型)	313/59	5
7230611	small rec (srec)	291/54	5

表3 肝癌独特表达的基因(表达大于正常肝脏30倍以上)

Genbank编号	基因名称英文(缩写和中文)	芯片读数	肝癌/肝脏	比值
13937374	Insulin-like growth factor II (Igf2, 胰岛素样生长因子2)	2 158/14		153
14939371	procollagen type I, alpha 1 (I型前胶原α1)	1 708/39		43
16758127	p75NTR-associated cell death executor (NADE, p75NTR关联细胞死亡执行子)	1 530/25		61
13300509	solute carrier family1 member3 (SLC1A3, 溶质载体家族1成员3)	1 372/15		91
8393822	Neurofilament protein, middle polypeptide (NF-M, 神经丝蛋白中等多肽)	826/10		80
4251655	Phosphofructokinase, liver, B-type (PFKL, 肝型磷酸果糖激酶)	889/14		62
3283976	ABC-type transporter MRP3 (多药耐药相关蛋白MRP3)	784/12		62
6980975	Glypican 3 (Gpc3)	779/11		67
6981339	Purkinje cell protein 4 (Pcp4, 浦肯野细胞蛋白4)	665/8		79
13929097	neurofilament, light polypeptide (NfL, 神经丝轻链多肽)	606/10		60
3366931	beta defensin-1(β防御素-1)	568/12		47
16758093	Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP, 脂肪型脂肪酸结合蛋白)	561/5		110
18644703	p16Ink4a (细胞周期依赖性激酶抑制基因)	533/2		190
13928713	Small inducible gene JE (Scya2)	479/8		56
12958612	regulator of G-protein signaling 2 (RGS2, G蛋白信号2调节因子)	379/10		35
6978856	Folistatin (Fst, 滤泡素抑制素)	369/10		34
11596856	mink-related peptide 2 (Kcne3)	331/10		30
790632	macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α, 巨噬细胞炎症蛋白1α)	306/5		54
13303079	t-cell receptor active beta-chain C-region (T细胞受体β链恒定C区)	276/6		40
6978806	Epithelial membrane protein 1 (Emp1, 上皮膜蛋白1)	273/8		31
11560134	brain acidic membrane protein (Basp1, 脑产酸膜蛋白)	247/7		31
6981331	plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1, I型纤溶酶原激活剂抑制因子)	240/7		30
16758073	chemokine orphan receptor 1 (Rdc1, 趋化因子孤儿受体)	156/4		34
16758835	interleukin 1 receptor type II (IL-1R II, II型白细胞介素1受体)	118/3		35
5263284	glutamate receptor subunit 3 (mGLUR3, 代谢型谷氨酸受体亚单位3)	115/2		39
18959247	Oxidized low density lipoprotein receptor1(LOX-1, 氧化低密度脂蛋白受体1)	103/2		54
6981705	Very low density lipoprotein receptor (Vldlr, 极低密度脂蛋白受体)	92/2		36

表4 肝癌独特表达的基因(表达大于正常肝脏30倍以下)

Genbank编号	基因名称英文(缩写和中文)	芯片读数	肝癌/肝脏	比值
16758619	androgen regulated vas deferens protein (Avdp, 雄激素调节输精管蛋白)	1 006/41		24
10863918	thymosin, beta 10 (Tmsb10, 胸腺激素β10)	885/37		23
17105345	phospholipid scramblase 1 (Plscr1)	554/40		13
9506474	Cell division cycle control protein 2 (Cdc2a)	544/40		13
8496160	insulin-like growth factor binding protein 5 (胰岛素样生长因子结合蛋白5)	437/44		9
8393182	Carboxypeptidase A1 (pancreatic), (Cpa1, 羧肽酶A1)	336/21		15
6978540	Activating transcription factor 3 (Atf3, 活化转录因子3)	312/12		24
19424307	lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2) (Lgals2)	307/17		17
11024651	transforming growth factor, beta-1 (Tgbf1, 转化生长因子β1)	305/16		18
13928927	kidney-derived aspartic protease-like protein (Kdap)	305/44		6
11067378	G alpha interacting protein (Gaip)	299/16		18
19923702	Cell surface glycoprotein CD44 (Cd44)	296/12		23
11559930	Homeobox gene Pem (Pem, 同源基因Pem)	251/24		10
13929055	Lutheran blood group (Lu, 吕德兰血型基因)	246/33		7
8504695	Discoidin domain receptor	241/36		6
8394182	regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4, G蛋白信号4调节因子)	240/12		18

16758941	MHC class II transactivator (C2ta, MHC II 类反式作用子)	239/31	7
13592080	secretin receptor (Scrt, 糜蛋白酶受体)	218/12	17
9506846	probasin (LOC54_193)	208/30	6
205247	Ly6-B antigen	199/7	25
202845	aldehyde dehydrogenase (醛脱氢酶)	199/29	6
13928813	phospholipase A2, group II A (Pla2g2a, 磷脂酶A2, II A组)	193/10	18
14949700	nucleolar phosphoprotein p130 (核仁磷蛋白p130)	195/7	26
9665228	espin	184/35	5
18959245	adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit (Ap3m2)	165/20	7
6981305	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (Tnfrsf11b, 肿瘤坏死因子11b)	165/29	5
8505375	Insulin-like growth factor-binding protein 5 (胰岛素样生长因子结合蛋白5)	162/23	7
4090268	GAS-7 protein	161/28	5
13592086	acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (Soat1)	155/18	8
5672675	salt-inducible protein kinase (盐诱导蛋白激酶)	155/23	6
4063710	melanocyte-specific gene 1 protein (msg1, 黑素细胞特殊基因1蛋白)	155/27	5
1785998	neogenin	153/28	5
4559279	defensin-5 precursor (防御素5前体细胞)	152/23	6
13928735	Adenosine monophosphate deaminase 3 (Ampd3, 磷酸腺苷脱氨酶3)	150/10	14
20302072	cadherin 13 (Cdh13, 钙黏蛋白13)	147/27	5
4131769	Very low density lipoprotein receptor (极低密度脂蛋白受体)	144/17	8
1654376	calcium-dependent tyrosine kinase (钙依赖型酪氨酸激酶)	138/20	6
8393483	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Grin1)	133/18	7
204322	glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP, 糖依赖性胰岛素释放肽)	130/24	5
16758167	fibroblast growth factor 13 (Fgf13, 成纤维细胞生长因子13)	123/11	10
9506448	carbonic anhydrase 4 (Ca4, 碳酸酐酶4)	123/20	6
13928725	CD8 antigen, alpha-chain (Cd8a)	122/5	24
16647985	synaptosomal-associated protein 2B	121/4	26
13183122	prostaglandin transporter subtype 2 (Pgt2)	120/17	6
13928873	forkhead box M1 (Foxm1)	119/15	7
16758103	peptidoglycan recognition protein (Pglyrp)	116/10	11
16758681	nuclear pore complex protein (Nup107, 核孔复合体蛋白)	116/13	8
7709997	CD3 antigen delta polypeptide (Cd3d)	112/11	10
17737277	transmembrane domain protein regulated in adipocytes 40 kDa (Tpra40-pending)	112/18	6
1816432	Naglucose cotransporter	109/13	8
13888554	Myelin basic protein (髓磷脂碱蛋白)	108/20	5
13929019	secretory carrier membrane protein 5 (Scamp5)	105/17	5
13929053	Shank1	104/16	6
6978700	Carboxypeptidase E (Cpe, 羧肽酶E)	103/4	22
16075338	G-protein coupled receptor G (蛋白结合受体)	103/8	12
8917586	integrin beta 2 alpha subunit (整合素β2α亚单位)	101/9	10
6978652	Cholinergic receptor, muscarinic 3 (Chrm3, 胆碱能受体毒蕈碱3)	98/12	7
8393983	phospholipase C, gamma 2 (Plcg2, 磷脂酶Cγ2)	96/14	6
19526760	caveolin 1 alpha	92/11	8
9957243	3-O-sulfotransferase	89/10	8
9967140	CINC-2 alpha	89/12	6
12711687	intermediate conductance calcium-activated potassium channel (Kcnn4)	88/8	10
6978506	Adrenomedullin (Adm)	86/8	9
16758815	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2 (Edg2)	84/3	25
13540657	bone marrow stromal cell antigen 1 (Bst1)	83/5	14
440381	receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP receptor)	83/11	7
8394099	Parathyroid hormone (Pth, 甲状旁腺激素)	83/13	6
1228945	protein tyrosine phosphatase epsilon C	83/14	5
8393708	lactate dehydrogenase 3, C chain, sperm-specific (乳酸脱氢酶3 C链)	80/8	9
14581684	Mg1	79/14	5
13676840	Alpha1,2-fucosyltransferase a (Fut1, 墨角藻糖基转移酶α2)	78/5	14
4324681	late gestation lung protein 1 (Lgl1)	73/12	6
6981645	Transforming growth factor, alpha (Tgfa)	73/13	5
14974738	cell cycle protein p55CDC	71/8	7
1669582	eosinophil cationic protein	68/9	7
13540542	neuronal pentraxin receptor (Npr)	65/11	5
206470	pancreatic secretory trypsin I (胰蛋白酶I)	62/4	15

6978544	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide (Atp1a2)	62/8	7
207535	thyrotropin-beta-subunit (促甲状腺素β亚单位)	60/6	9
13929101	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (Apba2)	50/9	5

3 讨论

在以上的众多基因中, 以胰岛素样生长因子2(IGF-2)、p75NTR关联细胞死亡执行子(NADE)、细胞周期依赖性激酶抑制基因(p16Ink4a)三个基因与肿瘤的关系尤为突出, 现将这三个基因的最新研究以及与肿瘤的关系进行简单的阐述。

3.1 IGF-2 人类的IGF-2是肝细胞自分泌和/或旁分泌的生长因子之一. Lee *et al*^[9]用黄曲霉素B1(AFB1)诱导的p53基因突变体p53mt249肝细胞癌, 发现肝癌形成中p53mt249通过IGF-2启动子4显著增加了IGF-2的转录表达, 使胎儿型IGF-2积累. IGF-2启动子4可以被野生型的p53和p53mt249所识别, 野生型p53抑制转录因子Sp1和TBP在启动子4上的结合; 而p53mt249在野生型p53不在的情况下, 可以刺激转录因子Sp1的磷酸化, 从而增加转录因子结合在启动子4上. p53mt249转染被HBV-X蛋白和TNF-α诱导凋亡的肝细胞, 可以通过增加IGF-2的产量而阻滞该细胞凋亡. 这个结果解释了诱变剂AFB1诱导的p53mt249突变体诱发肝细胞癌的分子机制. Fan *et al*^[10]发现在正常的成年肝组织中IGF-2和IGF-2R是很少表达的, 而其mRNA在慢性肝炎, 肝细胞癌, 肝硬化中分别约有33.3%, 66.7%, 72%的病人是高表达的. IGF-2和IGF-2R在肝细胞癌I - III级(Edmondson分级)的阳性率分别为0.25%, 76.2%, 100%. 另一研究发现^[11], 乙型肝炎X病毒蛋白(HBx)在诱导肝细胞瘤形成过程中, 通过被蛋白激酶C或分裂活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化的Sp1刺激IGF-2表达. PTEN在肝细胞瘤细胞株中的表达, 使Sp1被去磷酸化, 诱导Sp1与DNA结合的降低, 阻滞HBx激活IGF-2的转录. PTEN阻断了PKC、MAPK和MAPK激酶对Sp1磷酸化作用, 在肝细胞瘤形成过程中下调了IGF-2的表达. Scharf *et al*^[12]也观察到IGF-2和IGF-2受体在肝细胞癌和肝细胞瘤细胞株中高表达. 此外, IGF-2在胃癌的发病机制中也起到重要作用, 而血浆IGF-2水平的升高与肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌的严重程度呈正相关^[13,14].

3.2 NADE NADE最初是从人类卵巢卵泡细胞cDNA文库克隆出来的, 作为不明蛋白命名为pHGR74, 调节神经生长因子诱导的凋亡. Mukai *et al*^[15]通过酵母双杂交系统筛选了p75NTR联合蛋白, 并命名为p75NTR关联细胞死亡执行子(NADE). 鼠的NADE与人类的HGR74蛋白具有显著同源性, NADE特定结合在p75NTR的细胞死亡结构域, 在293T细胞中两者共同表现诱导

激活caspase-2、caspase-3和细胞核DNA断裂. 在缺失p75NTR时, NADE不能诱导凋亡. 在PC12、nnr5细胞株和少突胶质细胞得到同样的结果. 在被神经生长因子诱导的包含p75NTR介导的凋亡中, NADE是第一个信号衔接分子, 它在神经遗传学的发病机制中扮演一个重要角色. Mukai *et al*^[16]报道NADE是p75NTR联合蛋白, 通过和p75NTR死亡结构域的结合响应NGF介导凋亡. NADE有4个亚型: NADE2、NADE3、NADE4/Bex1和NADE5/Bex2. NADE在NGF诱导的少突胶质细胞凋亡和锌离子诱导的神经元死亡中起到重要作用. Tong *et al*^[17]从乳腺癌细胞株中分离出人类的NADE(pHGR74). 研究还发现NADE在人类的内分泌器官和鼠的胚胎组织是高表达的. NADE在中国仓鼠卵巢细胞株和人类MDA-MB-231乳腺癌细胞株中表达, 对细胞有抑制生长的作用.

3.3 p16Ink4a 该基因是细胞周期依赖性激酶抑制基因, 其表达的蛋白可直接与CDK4和CDK6结合而阻止其与cyclinD结合, 也可与cyclin-CDK复合物结合抑制其活性, 从而抑制pRb蛋白磷酸化和转录调节因子E2F的释放, 借此参与细胞周期调节, 促成细胞周期停滞. Pang *et al*^[18]对68例肝细胞癌进行了研究, 证实p16Ink4a甲基化率为61.7%. 认为该基因的甲基化在肝硬化向肝癌的转变中起到重要作用. Jarmalaite *et al*^[19]研究了64例与吸烟有关的肺癌, 发现肿瘤组织中p16Ink4a的甲基化约34%. 认为p16Ink4a基因启动子的CpG-岛的甲基化, 是导致抑癌基因失活的重要原因. Lee^[20]对8个正常的骨髓、3个反应性粒细胞增多的病人和21个恶性血液病的病人p16Ink4a mRNA的表达进行了研究, 发现p16Ink4a在正常的骨髓仅有少量的表达, 而在血液恶性肿瘤病人中表达异常增高($P<0.05$), 认为该基因高表达可能与血液学恶性肿瘤的发病机制有关.

在正常和肝癌两张芯片的看家基因中, 包括同一基因的上、中、下游的片段, 芯片读数具有一致性, 高表达的均高, 低表达的均低. 说明该芯片的技术以及本次检测的技术和结果均是可靠的, 假阳性率是非常低的, 同时也说明整个实验的各环节, 包括RNA的抽提、cDNA的转录等方法均是成功的. 在DEN诱发大鼠肝癌所表达大于正常肝脏5倍的509个基因中, 325个基因是EST未知基因片段, 占63%! 而且这些EST片段中的大部分无论是从芯片的绝对读数, 还是从相对比值上, 都比国内外研究肝癌所涉及

的已知基因变化更为明显。这揭示了肝癌基础研究的广阔未知领域。变化最为明显的168个已知基因中有68个(占40%)是国内外研究肿瘤中所未涉及的，在肿瘤有关基因中所涉及到肝癌数目更少。这进一步表明，肿瘤(尤其是肝癌)的基础研究尚有广阔的未知领域，而借助大通量的基因芯片技术检测，得以充分展现出那些变化显著的基因，这对于今后有重点和有选择性的研究是十分必要和有帮助的。基因芯片的结果分析方法有很多，基因读数比值排序分析法未必是最好的，但是是行之有效的方法。通过对这种方法整理出的基因结果分析，我们发现比值越大、排序越靠前的基因，其于肿瘤和肝癌的关系越明显，并且一些基因是人类在肿瘤的发生中认识比较早和研究比较多的基因，例如比值最高的前两个基因p16INK4a, IGF2。因此，我们对以上168个基因中比值最高、肝癌中上调最显著的前30个基因进行文献检索，总结分类。我们的研究还表明，在这些上调的基因中，清热、健脾、活血和3者组方等不同的中医处方、西药喃氟啶具有选择性的调节作用(另文报道)，而有些基因则不受调控。提示其中一些基因可能是这些治疗方法的靶基因，而那些不能被调节者，一旦今后研究证实是肝癌发生发展的关键基因，可以用于中西药新药筛选的参考基因。

4 参考文献

- 1 方肇勤, 管冬元, 李海燕, 胡效丰. 不同中医治法对大鼠肝癌作用的比较. 上海中医药大学学报 1999; 13: 57-59
- 2 Fang ZQ, Guan DY, Liang SH. Study on correlative genes in rat with hepatocarcinoma induced by DEN with DD-PCR. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 116
- 3 Guan DY, Fang ZQ. Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma. *J Trad Chin Med* 2000; 20: 223-226
- 4 管冬元, 方肇勤, 梁尚华, 秦红友, 鲁恒心. 不同治法对大鼠肝癌相关基因转录作用的研究. 上海中医药大学学报 2001; 15: 41-45
- 5 方肇勤, 管冬元, 梁尚华, 秦红友, 李海燕. 不同中医治法对DEN诱发大鼠肝癌作用的比较研究. 中医杂志 2002; 43: 542-544
- 6 管冬元, 鲁恒心, 方肇勤. 不同中医治法对ras/MAPK信号通路相关基因转录调节的实验研究. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 36-38
- 7 方肇勤, 管冬元, 梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整. 世界华人消化杂志 2003; 11: 276-280
- 8 Guan DY, Fang ZQ, Lu HX, Li HY. Preliminary investigation on regulating effects of different TCM treatments on transcription of the correlated genes of liver cancer in rats. *J Trad Chin Med* 2003; 23: 62-66
- 9 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 3717-3726
- 10 Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 285-288
- 11 Kang-Park S, Lee YI, Lee YI. PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett* 2003; 545: 203-208
- 12 Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-144
- 13 Pavelic K, Kolak T, Kapitanovic S, Radosevic S, Spaventi S, Kruslin B, Pavelic J. Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *J Pathol* 2003; 201: 430-438
- 14 LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 127-137
- 15 Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 2000; 275: 17566-17567
- 16 Mukai J, Suvanto P, Sato TA. Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm* 2003; 66: 385-402
- 17 Tong X, Xie D, Roth W, Reed J, Koeffler HP. NADE (p75NTR-associated cell death executor) suppresses cellular growth *in vivo*. *Int J Oncol* 2003; 22: 1357-1362
- 18 Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 8-15
- 19 Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S, Lazutka JR, Husgafvel-Pursiainen K. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 106: 913-918
- 20 Lee YK, Park JY, Kang HJ, Cho HC. Overexpression of p16INK4A and p14ARF in haematological malignancies. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 233-237

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁