

# 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因

戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟

戴益琛, 谢军培, 曾伟, 中国人民解放军174医院消化科 福建省厦门市 361003

宋于刚, 南方医科大学南方医院消化科 广东省广州市 510515

作者贡献分布: 此课题由戴益琛, 宋于刚设计; 研究过程由戴益琛, 宋于刚, 谢军培及曾伟操作完成; 数据分析由戴益琛, 宋于刚, 谢军培及曾伟完成; 本论文写作由戴益琛完成。

通讯作者: 戴益琛, 361003, 福建省厦门市, 中国人民解放军174医院消化科. dyichen@sina.com

电话: 0592-6335542

收稿日期: 2008-03-14 修回日期: 2008-04-23

接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-08

## Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique

Yi-Chen Dai, Yu-Gang Song, Jun-Pei Xie, Wei Zeng

Yi-Chen Dai, Jun-Pei Xie, Wei Zeng, Department of Gastroenterology, the 174<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Yu-Gang Song, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yi-Chen Dai, Department of Gastroenterology, the 174<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China. dyichen@sina.com

Received: 2008-03-14 Revised: 2008-04-23

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-08

## Abstract

**AIM:** To explore the genes associated with Peutz-Jeghers syndrome (PJS) using gene chip technique.

**METHODS:** Differentially expressed genes of PJS polyps and colorectal adenoma tissues were identified using DNA microarray. Part of differentially expressed genes were identified by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** In comparison with normal mucosa and adenoma, 270 genes were differentially expressed in PJS polyps, of which 166 were up-regulated and 104 were down-regulated. PJS-specific differentially expressed genes included EPHB4, EPHB3, EPHB1, EFNB2, EFNA1, COL4A1, COL4A2, COL6A3 and COL6A2.

**CONCLUSION:** Ephrin, COL4A1, COL4A2, COL6A2 and COL6A3 are the novel genes associated with PJS, and they may play important roles in the pathogenesis of PJS polyps.

**Key Words:** Peutz-Jeghers syndrome; Microarray; Gene; Reverse transcription polymerase chain reaction

Dai YC, Song YG, Xie JP, Zeng W. Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2191-2194

## 摘要

**目的:** 探索黑斑息肉综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)特异性相关基因。

**方法:** 用基因芯片技术研究PJS息肉和大肠腺瘤的基因表达谱, 筛选出两者的差异表达基因, 通过比较, 建立和研究PJS特异的差异基因表达谱, 并以RT-PCR对部分差异表达基因进行检测来验证芯片结果。

**结果:** 大肠PJS息肉组的270个特异性差异表达的基因, 基因上调166个, 下调104个。PJS息肉部分特异差异表达基因分别为: EPHB4、EPHB3、EPHB1、EFNB2、EFNA1、COL4A1、COL4A2、COL6A3和COL6A2。

**结论:** Ephrin、COL4A1、COL4A2、COL6A2和COL6A3基因可能是PJS特异性相关基因。

**关键词:** 黑斑息肉综合征; 微阵列; 基因; 逆转录聚合酶链式反应

戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟. 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2191-2194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2191.asp>

## 0 引言

本研究用基因芯片技术研究黑斑息肉综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)息肉和大肠腺瘤

## ■背景资料

PJS患者在不同的时期可能存在着不同的基因突变, 即PJS病变是一个多因素作用、多基因参与、多阶段进展的过程。

## ■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科; 管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室; 李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

## ■研究前沿

选择LKB1/STK11基因无突变的大家系,进一步作定位分析,发现新的位点,克隆新的致病基因是当前研究的热点.

表 1 基因差异表达结果

差异表达基因	腺瘤特异性变化	PJS息肉特异性变化	两者相似的变化
总数	432	270	141
上调	93	166	31
下调	339	104	110

表 2 PJS部分特异差异表达基因

GenBank	Function	Tag	腺瘤	PJS息肉
AI261660	EphB4	EPHB4	1.01	0.48
AA456088	EphB3	EPHB3	0.93	0.40
R48320				
AI732309	EphB1	EPHB1	0.88	0.38
AA461108	ephrin-B2	EFNB2	1.49	0.38
AA857015	ephrin-A1	EFNA1	0.75	0.48
	collagen, type			
AA150402	IV, alpha 1	COL4A1	0.95	2.37
	collagen, type			
AA430540	IV, alpha 2	COL4A2	0.82	2.61
	collagen, type			
R62603	VI, alpha 3	COL6A3	0.92	2.86
	collagen, type			
AA633747	VI, alpha 2	COL6A2	0.87	2.38

的基因表达谱,筛选出两者的差异表达基因,通过比较,建立和研究PJS特异的差异基因表达谱,为PJS形成机制研究及PJS的防治提供的实验依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 大肠PJS息肉组织3例,大肠腺瘤组织3例,正常大肠黏膜组织7例.留取的新鲜组织标本,用Rnase-Free生理盐水漂洗,以去除血渍和污物,锡纸包裹并标记后迅速冻存于液氮中备用.含有8064个人类靶基因的基因表达谱芯片两张,由深圳微芯生物公司提供,产品编号为CSC-GE-80.用于大肠腺瘤性息肉与正常大肠黏膜组织比较的芯片编号为A,用于大肠PJS息肉与正常大肠黏膜组织比较的芯片编号为B.

1.2 方法 按TRIzol一步法提取样品组织总RNA,经质量检测后,将各组的RNA样品等量混合,进行反转录荧光标记,用Cy3-dUTP标记大肠腺瘤组和大肠PJS息肉组的cDNA,用Cy5-dUTP

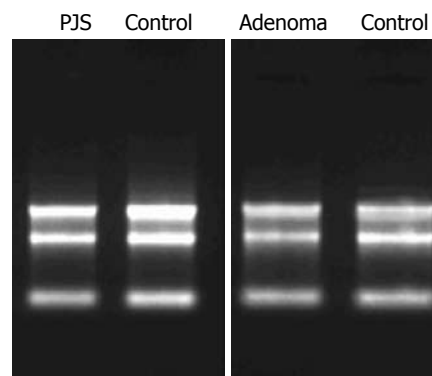


图 1 RNA 15 g/L琼脂糖凝胶电泳.

标记正常大肠黏膜组的cDNA.将已标记的样品cDNA探针与深圳微芯生物公司提供的含有8064个人类靶基因的基因表达谱芯片进行杂交,经清洗、扫描仪扫描荧光图像、提取杂交信号、经转换后以数据形式输出、对数据进行标准化处理后用生物信息学软件进行生物信息学分析.以芯片中密度值在 $5 \times 10^8$ 以上的数据点为有效数据,同时把比值大于2或小于0.5的数据点作为存在显著性表达差异基因点的筛选标准,筛选各组间差异表达基因.

为验证芯片的结果,选取基因在芯片检测中高表达的MYC基因、COL6A3,低表达的KRT8基因、CDKN1A基因和MAPK1基因,与ACTG基因对照,应用半定量RT-PCR的方法检测其在大肠PJS息肉、大肠腺瘤和正常大肠黏膜组织中的表达情况.

## 2 结果

2.1 总RNA抽提 样品进行总RNA提取并且进行过柱纯化,挑选的四个样品总RNA有清晰的28S和18S条带且没有明显的降解现象,符合芯片实验的要求(图1).

2.2 芯片杂交 杂交后芯片荧光信号强度高,背景较为均一,符合芯片结果的预期和分析的标准(图2).

2.3 基因差异表达 设定的数据筛选标准为以芯片中密度值(Density)在 $5 \times 10^8$ 以上的数据点为有效数据,同时比值(Ratio)大于2或小于0.5的数据点为存在显著性表达差异的基因点,按以上标准,大肠腺瘤与大肠PJS息肉基因差异表达情况见表1. PJS息肉部分特异差异表达基因见表2.

2.4 RT-PCR检测 所有目标基因都有明显的特异性扩增产物,与芯片的结果相比,通过RT-PCR检测的大部分目标基因在两组样品间的表达差异与芯片实验的结果有较好的重复性(表3),从而

表 3 芯片实验结果与RT-PCR实验结果

基因	Tag	腺瘤/对照		息肉/对照	
		芯片数据	RT-PCR数据	芯片数据	RT-PCR数据
Keratin 8	KRT8	0.12	0.11	0.26	0.56
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A(p21, Cip1)	CDKN1A	0.37	0.27	0.68	0.64
V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	2.85	1.73	1.09	1.11
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	0.20	0.90	0.27	0.02
Collagen, type VI, alpha 3	COL6A3	0.92	0.75	2.86	3.45

## ■应用要点

本研究找到的PJS相关基因, 为临床干预提供新的靶点。

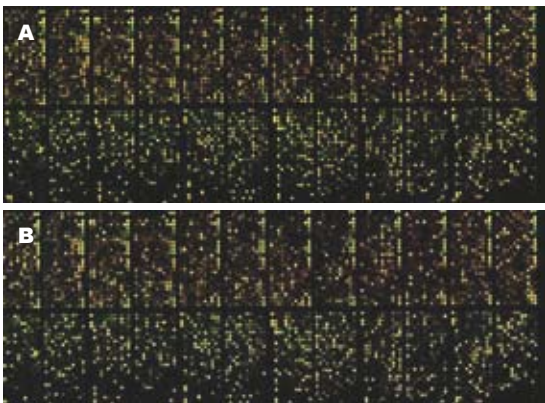


图 2 芯片杂交扫描图. A: 大肠腺瘤; B: PJS息肉.

验证基因芯片结果析可靠性.

### 3 讨论

PJS患者丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因(LKB1/STK11)突变率在10%-70%<sup>[1-2]</sup>, 可能还存在遗传异质性, 除了LKB1/STK11外, 可能还有其他未知致病基因<sup>[3-4]</sup>. 因此, 选择LKB1/STK11基因无突变的大家系, 进一步作定位分析, 发现新的位点, 克隆新的致病基因是当前研究的热点. 本实验应用8064个人类靶基因点制的基因表达谱芯片研究比较大肠腺瘤和大肠PJS息肉与正常肠黏膜组织的基因差异表达情况, 筛选和分析各组间的差异表达基因. 筛选出的PJS的差异基因表达谱, 为全面了解PJS和大肠腺瘤在分子水平上的变化提供了有价值的生物学信息.

PJS患者在不同的时期可能存在着不同的基因突变, 即PJS病变是一个多因素作用、多基因参与、多阶段进展的过程. 从本组基因芯片结果分析, PJS患者有多个基因的表达发生明显变化, 部分基因表达发生上调, 部分基因表达下调. 比较特征性的变化的有Ephrin通路基因, 胶原成份基因, 肿瘤相关基因, 及细胞因子基因, 这此差异表达的基因, 可能存在PJS患者致病的相关病理基因.

以往的研究表明, Ephrin基因与组织的空

间结构有关<sup>[5,8]</sup>. 本研究行基因芯片检查用的PJS息肉为错构瘤性息肉, 其EPHB4、EPHB3、EPHB1、EFNB2、EFNA1的表达均下调, 而腺瘤组织的相应基因表达与正常黏膜相比, 均未明显变化. 表明在PJS患者的胃肠道中, 可能因Ephrin通路调整机体发育的进程受到干扰, 胃肠道黏膜与胃肠道肌层发生错乱, 黏膜下肌层过度生长, 伸入到黏膜组织中, 产生错构瘤样的病理结构, 表明Ephrin基因是错构瘤性息肉的特征性基因.

以往的研究表明, COL4A1和COL4A2与基底膜的生长有关<sup>[9-10]</sup>. 本研究结果显示, 在错构瘤中, IV型 $\alpha$ 1基因COL4A1的表达为正常肠道黏膜的2.37倍, 而在腺瘤组织中, COL4A1的表达是正常肠黏膜的0.95倍. IV型 $\alpha$ 2基因COL4A2的表达为正常肠道黏膜的2.61倍, 而在腺瘤组织中, COL4A2的表达是正常肠黏膜的0.82倍. PJS错构瘤的IV型胶原基因表达水平明显比正常肠黏膜增高, 表明PJS错构瘤不仅存在黏膜上皮的过度生长, 也可能有基底膜的过度增殖. 以往的研究表明, COL6A3, COL6A2基因突变与肌肉生长发育有关<sup>[11-12]</sup>. PJS错构瘤的VI型胶原基因表达水平明显比正常肠黏膜增高, 其过度表达可能是导致PJS患者胃肠道平滑肌过度发育生长的原因.

PJS患者因Ephrin基因的表达异常, 导致胃肠道黏膜、平滑肌、基底膜的生长的空间结构发生异常, 而COL4A1、COL4A2基因的高表达, 显示细胞的基底膜也出现过度生长, COL6A3, COL6A2基因可能与PJS错构瘤平滑肌的过度增殖有关, 以上多个基因的共同作用, 进而出现错构瘤性改变.

### 4 参考文献

- 1 Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Loff S, Back W, Pagenstecher C, McLeod DR, Graham GE, Mangold E, Santer R, Propping P, Friedl W. High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers

## ■同行评价

本文具有较强的创新性,科学性和可读性,对指导临床具有重要意义。

- 2 syndrome. *Hum Mutat* 2005; 26: 513-519
- 3 Scott RJ, Crooks R, Meldrum CJ, Thomas L, Smith CJ, Mowat D, McPhillips M, Spigelman AD. Mutation analysis of the STK11/LKB1 gene and clinical characteristics of an Australian series of Peutz-Jeghers syndrome patients. *Clin Genet* 2002; 62: 282-287
- 4 de Leng WW, Keller JJ, Luiten S, Musler AR, Jansen M, Baas AF, de Rooij FW, Gille JJ, Menko FH, Offerhaus GJ, Weterman MA. STRAD in Peutz-Jeghers syndrome and sporadic cancers. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1091-1095
- 5 Hearle N, Lucassen A, Wang R, Lim W, Ross F, Wheeler R, Moore I, Shipley J, Houlston R. Mapping of a translocation breakpoint in a Peutz-Jeghers hamartoma to the putative PJS locus at 19q13.4 and mutation analysis of candidate genes in polyp and STK11-negative PJS cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 163-169
- 6 Brückner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275: 1640-1643
- 7 Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 1999; 400: 77-81
- 8 Hafner C, Meyer S, Langmann T, Schmitz G, Bataille F, Hagen I, Becker B, Roesch A, Rogler G, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B2 is differentially expressed in the intestinal epithelium in Crohn's disease and contributes to accelerated epithelial wound healing in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4024-4031
- 9 Hafner C, Meyer S, Hagen I, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4511-4518
- 10 Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ, van Mil SE, Smith RS, Schimenti JC, Aguglia U, van der Knaap MS, Heutink P, John SW. Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 2005; 308: 1167-1171
- 11 Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 260-266
- 12 Lampe AK, Dunn DM, von Niederhausen AC, Hamil C, Aoyagi A, Laval SH, Marie SK, Chu ML, Swoboda K, Muntoni F, Bonnemant CG, Flanagan KM, Bushby KM, Weiss RB. Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *J Med Genet* 2005; 42: 108-120
- 13 Baker NL, Murgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, Lamandy SR. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 279-293

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## PNS 与 WJG 论坛会议 - 朱作言院士访问 WJG 纪实

本刊讯 2008-02-18下午15:30-19:30国家自然科学基金朱作言院士参观World Journal of Gastroenterology(WJG)办公室并召开PNS与WJG论坛会议。随同人员有自然科学基金杂志社祖广安主任,任胜利博士,梁平博士及WJG副总编辑,北京肿瘤医院吕有勇教授。

此次论坛会议主要由WJG主编马连生社长就WJG 14年的成长历程发言。马社长从国际化期刊崛起的五大要素,即从主编是期刊的心脏,编委是期刊的质量,员工是期刊的后勤,作者是期刊的母亲,读者是期刊的上帝五个方面报告了办刊经验,并深化了办刊指导思想,即WJG旨在推广世界各地的胃肠病学和肝病专家临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。并将实践经验上升到理论的高度。同时,马社长还介绍如何组织策划约稿,栏目以及WJG走到现在所经历的挫折。

此外,吕有勇副总编辑还就“学术期刊是科学发现和技术创新的源泉”为题作简要报告。报告中特别指出如何才能做好一个同行评议审稿人的工作,并强调同行评议对文章的录用与否起决定性的作用。

会议之余WJG常务副总编辑张海宁陪同朱作言院士参观WJG办公室,朱作言院士随即考察员工实际的工作情况,与员工深入交流,了解同行评议的过程,电子编辑的排版工作。会后他表示:中国需要国际化的期刊杂志,在当今新的发展形势下,应加强交流和学习。WJG取得的成功为更多的杂志起了领头军的作用,我们会根据各位的介绍适时消化,希望通过学习,改进工作,也希望WJG早日实现IF为6的目标。(编务:江艳 2008-07-08)