

文章编号:1005-6947(2005)02-0091-04

· 肝癌专题研究 ·

HBV 相关肝细胞癌的基因差异表达

黄宇琨¹, 范学工¹, 邱贻², 李江³

(中南大学 1. 湘雅医院 传染科, 湖南 长沙 410008; 2. 湘雅移植医学研究院, 湖南 长沙 410013; 3. 湘雅医学院 肿瘤研究所, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 探讨癌基因、抑癌基因在 HBV 相关 HCC 中的表达。方法 提取 22 例 HBV 相关 HCC 患者肝癌及癌旁组织的 mRNA, 逆转录合成含有 33p-dATP 标记的 cDNA 探针, 与含有 3 170 个基因或表达序列标签 (EST) 的 cDNA 微阵列进行杂交, 图像分析, 基因数据库搜索, RT-PCR 验证。结果 肝癌组织与癌旁组织间共有 1 369 个差异表达基因或表达序列标签 (EST), 其中有 121 个基因或 EST 表达差异 > 2 倍。肝癌组织与癌旁组织比较, 121 个基因或 EST 中表达上调的有 88 个, 表达下调的有 33 个。TM4SF1 基因在肝癌组织中阳性表达率为 86.4%, 在癌旁组织中无表达 ($P < 0.001$); ST14 基因在癌旁组织中阳性表达率为 72.8%, 在癌组织中无表达 ($P < 0.01$)。结论 TM4SF1 基因的表达上调和 ST14 基因的表达下调参与了肝癌的发生。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 肝细胞瘤/病理学; 基因表达; 癌基因; 抑癌基因

中图分类号: R735.7; R730.261

文献标识码: A

Study on differential genes expression in HBV-related hepatocellular carcinoma

HUANG Yu-kun¹, FAN Xue-gong¹, QIU Fu², Li Jiang³

(1. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Xiangya Transplantation Medical Academy of Central South University, Changsha 410013, China; 3. Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of oncogenes and tumor suppressor genes in hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** mRNA was extracted from cancerous and paracancerous tissues of 22 patients with HBV-related HCC and synthesized into cDNA. The cDNA labeled with 33p-dATP was hybridized for cDNA microarray each consisting of 3170 genes or expressed sequence tags (EST). The differential expression genes were searched in gene data base and verified using RT-PCR. **Results** The differential expression of 1369 genes or EST was identified including 121 genes or EST altered 2 times or more in cancerous tissues compared with paracancerous tissues. Compared with paracancerous tissues, 88 showed overexpression and 33 genes were down-regulated. The positive expression of transmembrane 4 superfamily member 1 (TM4SF1) in cancerous tissues was 86.4% and could not be detected in paracancerous tissues ($P < 0.001$). The positive expression of suppression of tumorigenicity 14 (ST14) in paracancerous tissues of HBV-related HCC patients was 72.8% and could not be detected in cancerous tissues ($P < 0.01$). **Conclusions** The positive expression of TM4SF1 in cancerous tissues, and ST14 in paracancerous tissues of HCC were related to the development of HBV-related HCC.

Key words: LIVER NEOPLASMS/pathol; HEPATOMA/pathol; GENES EXPRESSION; ONCOGENES; TUMOR SUPPRESSOR GENES

CLC number: R735.7; R730.261

Document code: A

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生

是由于细胞增殖与分化出现异常, 表现为细胞的过度增殖与分化减低, 从而出现未分化细胞的恶性生长现象, 除了癌基因的致癌作用外, 抑癌基因的突变也在肿瘤的发生发展中起作用。cDNA 微阵列技术是近年发展起来的一种新技术。cDNA 微阵列克服了传统方法对基因表达水平检测敏感度不够高

收稿日期:2004-11-11; 修订日期:2004-12-06。

作者简介:黄宇琨(1974-), 女, 湖南长沙人, 中南大学湘雅医院博士研究生, 主要从事 HBV 相关疾病方面的研究。

通讯作者:范学工 电话:0731-4327092(O); E-mail: xgfan@hotmail.com。

(如 RNA 印迹)和需要大规模测序(如基因表达序列分析)的局限性,并高敏感地定性、定量检测基因表达水平,以及同时研究同一组织或不同组织中成千上万个基因的表达,是一种高通量、快速有效的基因表达分析方法^[1]。本研究通过提取肝癌组织的 mRNA 与 cDNA 微阵列进行杂交,并用 RT-PCR 验证差异表达的基因,旨在进一步探讨乙型肝炎病毒(HBV)相关 HCC 癌变的机理,从而为研究肝癌的癌变机制提供线索。

1 材料和方法

1.1 标本来源

选取湘雅医院 2002 年 3 月~2002 年 10 月收治的 22 例乙型肝炎病毒(HBV)相关 HCC 手术患者的肝癌组织及癌旁组织标本。男 18 例,女 4 例;年龄 21~72(平均 51)岁;TNM 分期 I,II 期 14 例,III 期 8 例。合并慢性乙型肝炎 6 例,肝硬化 16 例;肿瘤直径 ≥ 5 cm 者 17 例,肿瘤直径 < 5 cm 者 5 例;肿瘤位于肝右叶 7 例,位于肝左叶 15 例。手术切除后立即取出组织(肝癌组织取材时避开中心坏死区,癌旁组织取材于癌周 3cm 处),液氮冻存储备用,所有癌组织均经病理检查证实诊断,癌旁组织亦证实无癌细胞存在。

1.2 主要试剂

TRIzol(美国 Gibco 公司产品),cDNA 微阵列膜(由上海开瑞公司制备),同位素 ^{33}P -dATP(北京亚辉公司产品),mRNA 分离试剂盒(购自美国 Qia-gen 公司),RT 试剂及标记试剂盒(均购自美国 Promega 公司),PCR 标记物购自北京鼎国生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 mRNA 分离 按说明书用 TRIzol 提取总 RNA,用于 cDNA 微阵列的总 RNA 按 QIAGEN 公司的 mRNA midi Kit 操作程序进一步分离 mRNA。

1.2.2 mRNA 的逆转录及探针标记 将 $8\mu\text{L}$ mRNA($1\mu\text{g}$)转移到 0.5mL 离心管中,加入随机引物 $3\mu\text{L}$,添加 $9\mu\text{L}$ 无 RNase 水, 70°C 水浴 3min,然后冰上骤冷;依次加入 $5\times$ 缓冲液 $10\mu\text{L}$,RNase 抑制剂 $1\mu\text{L}$,dNTP(A-) $1\mu\text{L}$,dATP(1.0mmol/L) $1\mu\text{L}$,M-MLV 酶 $2\mu\text{L}$, ^{33}P -dATP $15\mu\text{L}$ 后混匀,将离心管放置于 37°C 水浴 0.5h , 42°C 水浴 1.5h ;取出后,

加入 $1.5\mu\text{L}$ 10N 的氢氧化钠; 95°C 水浴 $5\sim 7\text{min}$,取出后冰上冷却 3min,离心数秒,再依次加入 $0.9\mu\text{L}$ 冰醋酸和 $10\mu\text{L}$ 3M 醋酸钠,混匀后加入 $150\mu\text{L}$ 无水乙醇,彻底混匀后加入 $2\mu\text{L}$ 糖原,混匀后 15000r/min ,离心 10min,小心吸取上清至另一离心管中,测定沉淀管与上清管的 cpm 值,向沉淀中加入 $40\mu\text{L}$ 无 RNase 水溶解,获得 cDNA 探针。

1.2.3 微阵列膜杂交、洗膜、显影 将 cDNA 微阵列膜浸泡于 $6\times\text{SSC}$ 溶液 2min 后放入杂交管中,每管加入 40mL 预杂交液及变性的 100g/mL 鱼精 DNA $600\mu\text{L}$, 68°C 预杂交 3h 以上。弃去预杂交液,每管加入杂交液 6mL 和已经变性过的鱼精 DNA($100\mu\text{g/mL}$) $80\mu\text{L}$,加入 $40\mu\text{L}$ 已变性的探针, 68°C 杂交 24h。杂交后的微阵列膜置于 500mL 洗液 1($2\times\text{SSC}$, 0.5% SDS) 37°C 水浴摇床中振荡 5min,转移至 500mL 洗液 2($2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS) 中, 37°C 水浴摇床振荡 15min,转移至 500mL 洗液 3($0.1\times\text{SSC}$, 0.5% SDS) 中, 37°C 水浴摇床振荡 60min,换 500mL 洗液 3, 62°C 水浴摇床振荡 60min,去离子水漂洗 2 次,磷屏压膜显影。

1.2.4 信号扫描和分析 用 FLA-3000A 扫描仪(Fuji Photo Film 公司产品)扫描磷屏,进行感光强度分析,分析软件为 Array Gauge software(Fuji Photo Film 公司产品)。膜的信号分析标准:2 张膜上的背景亮度值均设为 0,如出现下列情况,表示克隆代表的基因在这 2 种样品中有明显的表达差异:(1)同一张膜上任意 2 个对照基因的亮度值差异在 2 倍以上;(2)同一张膜上代表同一克隆的 2 个点亮度差异在 2 倍之内;(3)一张膜上同一克隆的两点亮度分别是另一张膜上对应点亮度的 2 倍以上。

1.2.5 RT-PCR 验证差异表达的基因 通过查询基因库和人类数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 和 <http://www.chgc.sh.cn>)筛选的差异表达基因,选取差异表达的基因进行 RT-PCR 验证。按照前面所述的方法抽提 HepG2 细胞株、正常肝组织、肝癌组织及相应的癌旁组织 RNA,逆转录为 cDNA。RT 方法如下:mRNA $0.2\mu\text{g}$,OligoDT $1\mu\text{L}$,加去离子水补足至 $12\mu\text{L}$, 65°C 温育 5min,加入 $5\times$ RT 缓冲液 $4\mu\text{L}$;dNTP(10mM) $1\mu\text{L}$;M-MLV 逆转录酶 $1\mu\text{L}$,离心 5s, 37°C 60min ; 95°C 温育 5min 灭活反转录酶,稍加离心,即行 PCR 扩增。PCR 反应体系:

25 mM MgCl₂ 2 μL; 10 × PCR 缓冲液 5 μL; 10 mM dNTP 1 μL; 上下游引物 10 pmol/μL 共 2 μL; 内参照引物 2 μL cDNA 模板 2 μL; ddH₂O 10.5 μL; Taq 酶 0.5 μL; 轻质石蜡油 25 μL; 总体积为 50 μL。反应程序为 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 为 30 个循环, 然后 72℃ 10 min, 取出后 4℃ 5 min 后电泳。TM4SF1 引物序列是: 上游 5'-TCTTCATTGGGCTGGAACAG-3', 下游 5'-GAGGGTGGTTTGTTCCTCA-3'; ST14 基因引物序列是: 上游 5'-TGTG-GAGCTGATCGCCTTCA-3', 下游 5'-CTGGCTGAG-GAAGACTGAGG-3'; GAPDH (内参照) 是 5'-TTG-CAAGTTGCTG TTCCTCA-3', 5'-GATCTCGCTCCTG-

GAAGATG-3'。TM4SF1 基因产物片段为 761 bp, ST14 基因产物片段为 441 bp; 内参照扩增片段为 675 bp。

2 结果

2.1 肝癌和癌旁组织的基因图谱及差异表达的基因

肝癌组织与癌旁组织间共有 1 369 个差异表达基因或表达序列标签 (EST), 其中有 121 个基因或 EST 表达差异 > 2 倍。肝癌组织与癌旁组织比较, 121 个基因或 EST 中表达上调的有 88 个, 表达下调的有 33 个^[2] (表 1)。

表 1 部分肝癌和癌旁组织中差异表达的基因

基因分类	基因库登记号	基因名称	比率
细胞周期调控基因			
上调	X66363	PCTAIRE 蛋白激酶 1 (PCTAIRE protein kinase 1)	3.7750846998
	AI632545	ESTs	3.1501823812
	NM_015646	Ras 相关蛋白 1b (ras-related protein1b)	7.7881264437
下调	BE734084	ESTs	0.391218052145
	AF067855	复染色体 (Geminin)	0.299401703
癌基因	M90657	跨膜 4 超家族成员 1 (Transmembrane 4 superfamily member 1)	9.674243018
	M14328	α 烯醇化酶 (alpha enolase)	3.375445457
	NM_006267	RAN 结合蛋白 2 (RAN binding protein 2)	3.819221432
抑癌基因	BC005826	suppression of tumorigenicity 14	0.1434363637
	AI346507	ESTs	0.21083527581
	AF129756	G6B 蛋白 (G6B protein)	0.392829577

注: 比率为各基因在肝癌组织与癌旁组织的表达水平的比值

2.2 RT-PCR 检测基因的结果

TM4SF1 基因在 86.4% (19/22) 的肝癌组织中表达, 在所有的癌旁组织均无表达 ($P < 0.001$)

(图 1); ST14 基因在 72.8% (16/22) 的癌旁组织有表达, 所有的癌组织均无表达 ($P < 0.01$) (图 2)。

M: marker; 1: 阳性对照 (HepG2 细胞株); 2, 3: 肝癌组织; 4: 癌旁组织; 5: 阴性对照 (正常肝组织)

图 1 RT-PCR 检测 TM4SF1 基因在肝癌组织及癌旁组织的表达

M: marker; 1: 阴性对照 (HepG2 细胞株); 2: 肝癌组织; 3: 癌旁组织; 4: 阳性对照 (正常肝组织)

图 2 RT-PCR 检测 ST14 基因在肝癌组织及癌旁组织的表达

3 讨论

跨膜4超家族成员1 (transmembrane 4 superfamily member, TM4SF1) 属于跨膜4超家族,其成员有特殊的4次跨越细胞膜结构,并能与HLA抗原以及整合素相连,从而能促细胞生长、传导信息,可能与病毒的黏附与进入肝细胞有关^[3]。TM4SF1又名肿瘤相关抗原L6 (tumor-associated antigen L6) 为胞浆膜蛋白,易于被相应的抗体识别。研究^[4,5]表明TM4SF1在肺癌、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中高表达,且已有TM4SF1单克隆抗体能够有效抑制乳腺癌细胞生长的临床报道^[5],提示TM4SF1可能是一个肿瘤免疫治疗的靶点^[6]。虽然TM4SF1在肿瘤发生发展过程中的确切生物学功能仍然不清楚,但在肺癌患者中的研究^[7]表明, TM4SF1表达的升高与术后肿瘤早期扩散和患者生存率降低呈正相关,提示TM4SF1可能与肿瘤的侵袭和转移有关。本研究发现TM4SF1在86.4%的肝癌组织表达,而在癌旁组织中无表达,提示TM4SF1在HBV相关HCC中也可能是一个肿瘤标志物,有关该基因的功能和其在HCC中的临床意义,笔者正在进一步研究中。

Zhang等^[8]通过荧光原位杂交技术发现ST14 (suppression of tumorigenicity 14) 位于人染色体11q24~q25,此区域在大肠癌、乳腺癌和卵巢癌均存在杂合子丢失的现象,提示ST14的缺失可能参与了上述肿瘤的发生。Lin等^[9]发现ST14位于乳腺癌细胞表面,能够编码胰蛋白酶样-丝氨酸蛋白酶 (trypsin-like serine proteases)。Oberst等^[10]通过分析正常乳腺细胞和乳腺癌细胞株,发现ST14的表达可以作为区分正常细胞和乳腺癌细胞的标志物。Takeuchi等^[11]证实,ST14在正常的细胞,如肝、前列腺、肾等表达,笔者发现ST14基因在72.8% (16/22)的HBV相关HCC的癌旁组织有表达,所有的癌组织无表达,提示ST14作为一种抑癌基因的下调参与了肿瘤的发生机制。笔者推测ST14表达下调时,由于缺少了ST14的抑制突变的功能,肝细胞突变增加,最终促进HCC发生。

参考文献:

[1] Chen L, Goryachev A, Sun J, *et al.* Altered expression of

genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia [J]. *Hepatology*, 2003, 38(3):567-576.

- [2] 黄宇琨,范学工,邱斌,等. 肝细胞癌有关肿瘤细胞调控基因差异表达的研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2004, 3(4):298-301.
- [3] Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, *et al.* Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(13):9230-9238.
- [4] Takahiro T, Hitoshi H, Noboru H. Clinical Significance of CD151 Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12):4109-4114.
- [5] DeNardo SJ, Warhoe KA, O'Grady LF, *et al.* Radioimmunotherapy for breast cancer: treatment of a patient with I-131 L6 chimeric monoclonal antibody [J]. *Int J Biol Markers*, 1991, 6(4):221-230.
- [6] Marken JS, Schieven GL, Hellstrom I, *et al.* Cloning and expression of the tumor-associated antigen L6 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(8):3503-3507.
- [7] Kao YR, Shih JY, Wen WC, *et al.* Tumor-associated antigen L6 and the invasion of human lung cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7):2807-2816.
- [8] Zhang Y, Cai X, Schlegelberger B, *et al.* Assignment of human putative tumor suppressor genes ST13 (alias SNC6) and ST14 (alias SNC19) to human chromosome bands 22q13 and 11q24-q25 by in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83(1-2):56-57.
- [9] Lin CY, Anders J, Johnson M, *et al.* Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(26):18231-18236.
- [10] Oberst M, Anders J, Xie B, *et al.* Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(4):1301-1311.
- [11] Takeuchi T, Shuman MA, Craik CS. Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, 96(20):11054-11061.