

应用 cDNA 表达芯片研究复方黄连 对 CNE1 鼻咽癌移植瘤基因表达的影响

王光平^{1,2}, 唐发清², 周金平³

(1. 中南大学湘雅医院血液科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院中心实验室, 长沙 410008;

3. 中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 研究复方黄连对鼻咽癌裸鼠移植瘤基因表达的影响。方法: 培养的鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞接种 Balb/C 裸鼠, 待移植瘤形成后灌喂复方黄连, 然后从移植瘤组织提取 RNA, 经逆转录标记后的 cDNA 作为探针, 与高通量 cDNA 表达芯片杂交并用激光共聚焦扫描仪分析基因表达。通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)半定量技术进一步分析差异表达基因的表达。结果: 复方黄连处理移植瘤裸鼠 30 d 后, 移植瘤明显减小, 其抑瘤率为 29.5%。同时, 移植瘤组织基因表达发生显著变化。用该复方处理的 CNE1 鼻咽癌移植瘤组织有 147 条基因表达发生改变, 包括 102 条下调表达的基因和 45 条上调表达的基因。RT-PCR 半定量技术分析证实有 3 条基因为真正差异表达, 它们分别是 *MAD3*, *H731* 和 *CHK1* 基因。其中, *MAD3* 和 *H731* 基因表达上调, *CHK1* 基因表达下调。结论: 复方黄连可抑制 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤的生长并可影响其基因的表达, 它对 CNE1 鼻咽癌移植瘤的抑制作用与其调节移植瘤基因表达密切相关。

[关键词] 基因表达; cDNA 芯片; 复方黄连; 移植瘤; 鼻咽癌

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-5625(2003)04-0347-06

Effect of Coptis Chinensis compound on the gene expression in transplanted tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma cell line of CNE1 by cDNA microarray

WANG Guang-ping^{1,2}, TANG Fa-qing², ZHOU Jin-ping³

(1. Department of Hematology; 2. Central Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

3. Department of Pathology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Coptis Chinensis compound on the gene expression of transplanted tumor in nasopharyngeal carcinoma cell line of CNE1. **Methods** The cells were injected into Balb/C nude mice, and after the transplanted tumor was established, the nude mice with tumors were treated with Coptis chinensis compound. The nude mice were then killed, tumor tissues were isolated and the total RNA was extracted. Hybridization with a cDNA microarray was conducted using a probe of fluorescent-labeled cDNA mixture that was reversely transcribed from the RNA. The gene expression level was analyzed after scanning the fluorescent intensity by a laser scanner, and further confirmed by RT-PCR. **Results** After using Coptis Chinensis compound for 30 days, the size of transplanted tumors were remarkably reduced, and the inhibition rate of tumor growth was 29.5%. In the meantime, the expression of 147 genes in the tissue of implanted tumor treated with the compound altered: the expression of 102 genes was down-regulated, and that of 45 genes was up-regulated. Furthermore, the differential expression of 3 genes was verified by RT-PCR, *MAD3* and *H731* genes were up-regulated, and that of *CHK1* was down-regulated. **Conclusion** Coptis Chinensis compound can af-

fect the gene expression in the tissue of implanted tumor, which implies that the inhibition of Coptis Chinensis compound on the growth of the implanted tumor with CNE1 cells in nude mice might be associated with the control of gene expression.

Key words: compound of Coptis Chinensis; gene expression; cDNA microarray; transplanted tumor; nasopharyngeal carcinoma

[Bull Hunan Med Univ 2003 28(4) 0347-06]

研究显示,黄连及其主要成分小檗碱或黄连素可抑制胃癌、乳腺癌和结肠癌细胞的生长^[1];可杀死 91% 的恶性脑瘤细胞^[2]。以往的工作发现,以黄连和黄芪为主的复方黄连可抑制鼻咽癌细胞移植瘤和复种移植瘤的生长和成癌率^[3],可使鼻咽癌前病变和高危人群 EB 病毒抗体转阴,使鼻咽部异型增生得到缓解,该复方对鼻咽癌高危者治疗作用总有效率达 83.87%^[4],但其详细的作用机制尤其是分子机制尚不清楚。本研究采用高通量 cDNA 表达芯片分析复方黄连处理 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤后的基因表达,以探讨其作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Balb/C 裸鼠购于中国医学科学院动物研究所。鼻咽癌细胞系 CNE1 购于中南大学湘雅医学院细胞中心。RPMI 1640 细胞培养基购自 Sigma 公司。RNA 提取试剂和 SuperScript II 逆转录酶为 Gibco BRL 公司产品。Taq DNA 聚合酶为美国 Promega 公司产品。Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 均为 Amersham Pharmacia 公司产品。高通量 cDNA 表达谱芯片 HGEC-80S 购于上海博星基因芯片公司(内含 8192 条基因 cDNA,除 87 个管家基因、6 个定位基因、12 个空白对照基因和 8 个阴性对照基因外,含 8079 条待测基因)。复方黄连制剂“益气解毒颗粒”由川黄连、生黄芪、党参、茯苓、甘草和白花蛇舌草组合而成。Robbins Scientific Model 1000 杂交箱为 Robbins Scientific 公司产品,GenePix 4000B 扫描仪购于 Axon Instruments 公司。PCR 仪为美国 PE 公司的 480 型 DNA 扩增仪。

1.2 细胞培养与接种 鼻咽癌细胞系 CNE1 细胞复苏后,加入含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。取 Balb/C 裸鼠 10 只,鼠龄 3~4 周,体重 17~22 g,饲养于经浸泡消毒的饲养笼中。无菌饲养一周后,于前腋下接种 0.5×10^7 个 CNE1 细胞(0.5 ml)以形成移植瘤。

移植瘤形成后,先用游标卡尺测量肿瘤直径的大小,再换算成重量。将肿瘤重量相同的动物配对并分成实验组和对照组。

1.3 移植瘤的处理 复方黄连制剂“益气解毒颗粒”用无菌蒸馏水配成 10% 的浓度过滤后,采用灌喂法给予实验组移植瘤小鼠服用。每公斤体重所用剂量按公式 $d_B = d_A \times R_B/R_A \times (W_A/W_B)^{1/3}$ ^[5] 换算。其中 A 和 B 分别指人和小鼠, d_A 和 d_B 分别表示人和小鼠的每公斤体重剂量(mg/kg), R_A 和 R_B 分别表示人和小鼠的体型分数(人为 100,小鼠为 59), W_A 和 W_B 分别表示人和小鼠的体重(kg)。每两天服用一次,连续 15 次。对照组仅灌喂无菌水。

1.4 抑瘤率的计算 动物处死后,取瘤组织并称其重量,按下列公式计算抑瘤率。抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.5 移植瘤组织的病理学分析 动物处死后,取瘤组织用石蜡包埋,HE 染色,于显微镜下观察。

1.6 移植瘤组织 RNA 的提取与探针标记 移植瘤组织匀浆后,按常规一步法提取和纯化总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,通过琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性。参照 Schena 等^[6]方法逆转录 50 μ g 细胞总 RNA 并标记 cDNA。用 Cy3 dUTP 标记对照组 cDNA,用 Cy5 dUTP 标记实验组 cDNA。

1.7 分子杂交 上述制备的探针和基因芯片 95℃ 水浴变性 5 min 后,于 60℃ 杂交 15~17 h。然后于 $2 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$, $0.1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{SDS}$ 和 $0.1 \times \text{SSC}$ 溶液在中在 60℃ 温度下分别洗涤 10 min。

1.8 荧光扫描与结果分析 用 GenePix 4000B 扫描仪对杂交后的芯片扫描,并用 Image3.0 软件分析荧光强度。以管家基因的荧光信号对原始数据进行标化处理,计算 Cy5 荧光信号强度与 Cy3 荧光信号强度比值。Cy5/Cy3 > 2.0 或 < 0.5

为阳性,即认为该基因为差异表达。其中,Cy5/Cy3 >2.0,表示药物处理后,该基因的表达为上调;而 Cy5/Cy3 <0.5,表示药物处理后,该基因的表达为下调。

1.9 RT-PCR 分析 总体积 30 μ l,含 30 μ g 总 RNA,1 \times 逆转录缓冲液,1 mmol/L dNTP,100 U RNA 酶抑制剂,400 U M-MLV 逆转录酶和 150 pmol 随机引物(即含六核苷酸的寡核苷酸混合物)的反应体系首先于 37 $^{\circ}$ C 逆转录 1 h。95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活酶

后,取 5 μ l 反应产物用于 PCR 扩增。50 μ l PCR 反应体系包括 1 \times PCR 反应缓冲液,200 μ mol/L dNTP,1.5 mmol/L MgCl₂,20 pmol 上、下游引物和 2.5 U Taq DNA 聚合酶。此体系 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,按表 1 所述条件进行扩增。扩增后,取 10 μ l 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并定量各条带的密度。待测基因 PCR 产物各条带密度与内对照 GAPDH 密度的比值作为待测基因 mRNA 表达的相对含量。

表 1 RT-PCR 引物序列及反应条件

基因	引物序列	扩增长度(bp)	反应条件
MAD3	5'GCCACACGTGTCTACACT3'	420	94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环
	5'CATGAATTCCTTGCACCTATAACGTCAG3'		
H731	5'AGAGCTGCTCTGGATAAG3'	380	94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环
	5'TCCAGATTAATGTCCGGA3'		
CHK1	5'GGTACAAGGGATCAGCTT3'	340	94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环
	5'GAACTCCAATCCATCACCC3'		
GAPDH	5'GCTGGCGCTGAGTACGTCGT3'	605	94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环
	5'TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC3'		

2 结 果

2.1 复方黄连对鼻咽癌移植瘤的抑瘤作用 接种鼻咽癌细胞 CNE1 3~4 周后,Balb/C 裸鼠开始长出肉眼可见的肿瘤。继续饲养一周后,用复方黄连干预。经 30 d 的处理,移植瘤明显缩小,抑瘤率 29.5%。对移植瘤组织作石蜡切片,HE 染色后,经光学显微镜观察显示,移植瘤均为鳞癌,但药物处理的与未用药物处理的瘤组织病理学未见明显改变(图 1)。

2.2 复方黄连对鼻咽癌移植瘤基因表达的影响 用复方黄连处理 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤后,瘤组织的基因表达发生显著的改变,有 147 条基因的表达发生改变,为整个芯片待测基因的 1.8%。其中,表达下调的基因有 102 条,为差异表达基因的 69.4%,上调表达的基因有 45 条,为差异表达基因的 30.6%。经生物信息学分析,在 147 条表达发生改变的基因中包括:①肿瘤基因、肿瘤抑制基因如 *b-raf*、*Trk* 和 putative tumor suppressor *ST13* 基因等。②生长因子及其受体如 pleiotrophin 和 endothelia receptor 基因等。③细胞周期调节基因如 *CHK1* 和

CDK4 基因等。④参与凋亡调控基因如 *H731*。⑤与信号转导有关的基因如 *MAD3* 等。⑥基因表达调节因子如 *eIF6* 和 transcription factor *BTF3* 等。⑦其它基因如 fibronectin *FN1* 和 lumican 等。图 2A 表示复方黄连处理以及未处理的移植瘤组织杂交荧光信号叠加结果。从图中可知,下调表达的基因明显多于上调表达的基因。图 2B 表示处理以及未处理的移植瘤组织芯片杂交信号强度散点图。深红色数据点表示 Y 值与 X 值比值在 0.5~2.0 之间,表示该基因表达无差别;黄色数据点表示比值在 0.5 到 2.0 范围之外,即该基因的表达有差别。从图中可看出,差异表达基因明显少于非差异表达基因。

2.3 RT-PCR 分析结果 通过 RT-PCR 半定量技术,到目前为止,在四个基因中有三个基因的表达证实为真正差异表达。其中,*MAD3* 和 *H731* 在复方黄连处理的 CNE1 鼻咽癌移植瘤的表达为上调(图 3A 和 3B),而 *CHK1* 的表达为下调(图 3C)。这三个基因的表达改变与 cDNA 表达芯片杂交结果相一致。

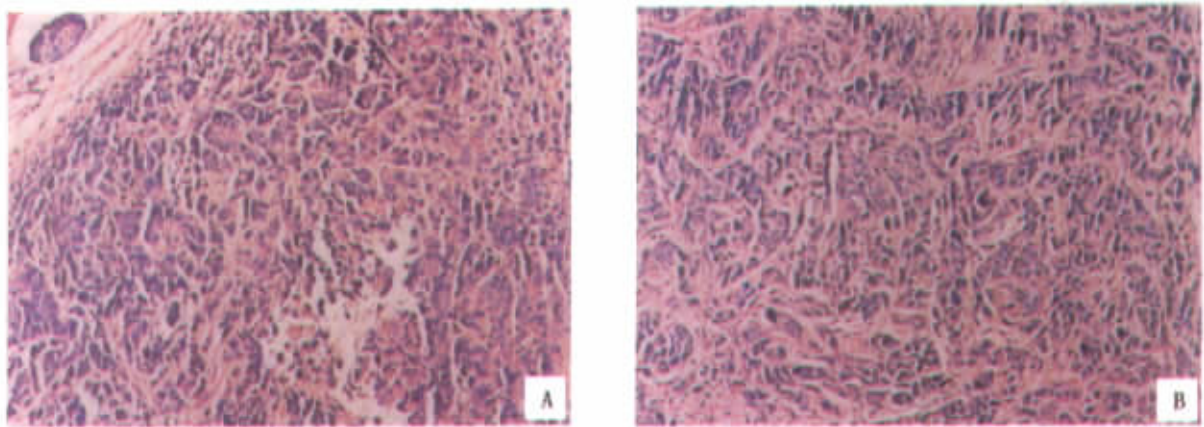


图 1 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤组织石蜡切片 HE 染色结果示移植瘤为鳞癌(×100) A : 无菌蒸馏水处理 ;B : 复方黄连处理

Fig. 1 Pathological analysis of tissues section from the implanted tumor (HE ×100) A : Treated with distilled water ; B : treated with Coptis Chinensis compound

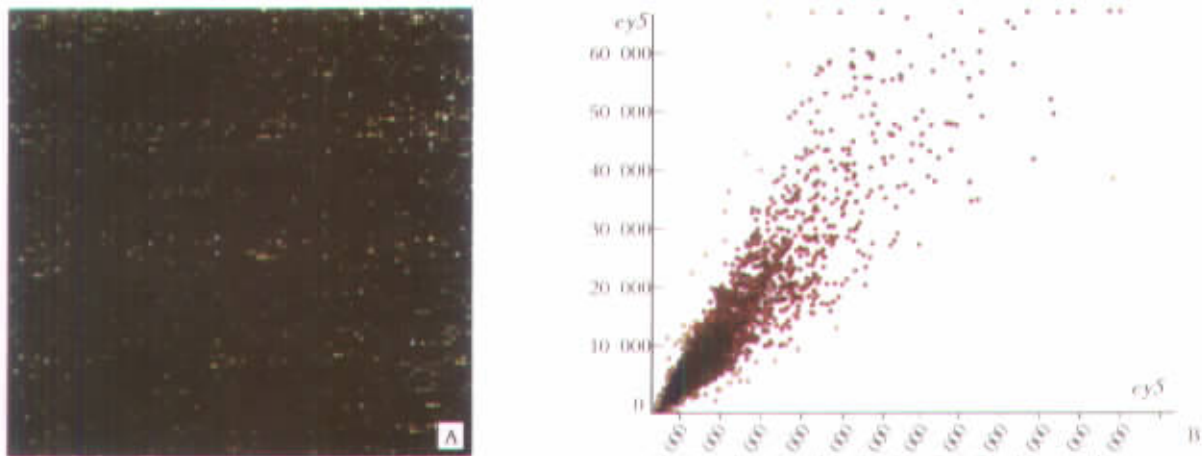


图 2 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤基因表达芯片杂交扫描结果 A : cDNA 芯片杂交信号扫描结果 ;B : cDNA 芯片杂交信号强度散点图

Fig. 2 Results of cDNA microarray assay A : Result of cDNA microarray assay of implanted tumor. The green dots stand for Cy3 signals ,indicating down-regulated genes ,the red dots stand for Cy5 signals ,indicating up-regulated genes. B :scatter plot of cDNA microarray. X axis presents the value of Cy3 fluorescent intensity ,Y axis presents the value of Cy5 fluorescent intensity. Each dot shows hybridization signal of a gene in cDNA microarray.

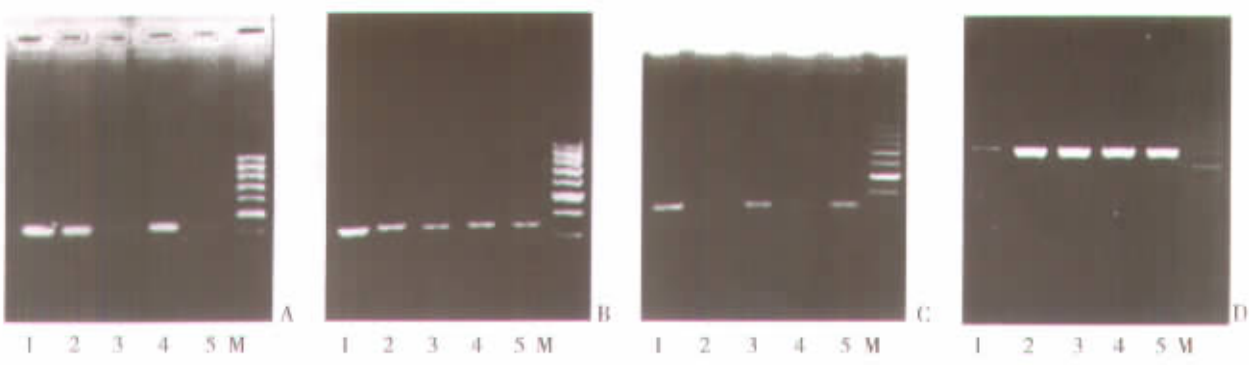


图 3 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤差异表达基因的 RT-PCR 分析结果

Fig. 3 Results of RT-PCR. A :MAD3 ;B :H731 ;C :CHK1 ;D :GAPDH. 1 : CNE1 cell ;2 : tumor tissues treated with Coptis Chinensis compound ;3 : tumor tissues treated with distilled water ;M : DNA molecular marker of 100 bp DNA ladder

3 讨 论

应用 cDNA 表达芯片研究发现,复方黄连干预鼻咽癌裸鼠移植瘤后有 147 条基因表达发生改变。其中, *MAD3*、*H731* 和 *CHK1* 基因的表达被 RT-PCR 证实并且其基因表达的改变与 cDNA 表达芯片杂交结果相一致。*MAD3* 基因编码产物为 I- κ B α 蛋白^[7],因而它参与细胞内 NF- κ B 活化的信号传导。另外, *p67* 和 *TRAP2* 也为复方黄连干预 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤差异表达的基因。*P67* 为一种糖蛋白,可调节 PKR 的功能^[8]。PKR 即双链 RNA 活化的蛋白激酶(double-strand RNA-activated protein kinase, PKR),它能活化 IKK 激酶,从而进一步活化 NF- κ B^[9]。*TRAP2* 属新近发现的肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor-associated factor, TRAFs)成员,为细胞内信号传导联结蛋白。研究认为, TRAFs 家族参与肿瘤包括鼻咽癌细胞 NF- κ B 活化的信号传导^[10,11]。在鼻咽癌中,EB 病毒致瘤蛋白潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)能有效激活细胞 NF- κ B 并随着 LMP1 表达增加, NF- κ B 活性也呈递增趋势,而抑制 NF- κ B 的活化可抑制鼻咽癌细胞的恶性表型^[12]。因此, NF- κ B 的活化在鼻咽癌的发生发展中可能起着重要作用。复方黄连可使鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 *MAD3* 基因的表达增加,并可使 *p67* 和 *TRAP2* 基因的表达降低,表明复方黄连对鼻咽癌裸鼠移植瘤的抑制作用可能与其调节移植瘤组织 NF- κ B 的活化相关。

H731(又称为 *PDCD4*)是一种细胞核抗原,它的过表达被认为可抑制肿瘤启动子诱导的细胞转化,这种抑制作用是通过抑制 AP-1 依赖的反式活化^[13]。AP-1 是细胞核内又一重要转录因子,通常所说的 AP-1 是指 Jun/Fos 组成的二聚体。Fos 和 Jun 不仅与细胞增殖、转化密切相关^[14],而且可通过反式激活一些带有 AP-1 结合位点促细胞转化等基因的表达,从而参与肿瘤的发生与发展。研究认为, AP-1 反式激活是一些细胞癌变不可缺少的条件,它的活化与细胞癌变高度相关^[15]。另有报道,黄连素可抑制肝癌细胞 AP-1 的活性^[16]。本研究显示,复方黄连可上调 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 *H731* 基因的表达,表示复方黄连可通过调节 *H731* 基因的表达进而影响 AP-1 的活化,从而成为复方黄连抑制鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的可能机制之一。

CHK1 即细胞周期“检测点”(checkpoint)激酶,另外, *CDK4* 即经复方黄连处理后 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤表达发生改变的基因,它们都参与细胞周期的调控。已有研究发现,黄连素可使白血病细胞 HL-60 G2/M 期的细胞亚群数目增加,细胞周期紊乱^[17]。复方黄连下调 *CHK1* 和 *CDK4* 基因在 CNE1 鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞的表达,提示复方黄连可能通过调节细胞周期的调控而抑制移植瘤细胞的生长。

肿瘤是一种多因素、多基因性疾病,它的发生发展与多种基因的改变有关。中药,尤其是复方中药其作用特点是多部位、多靶点的干预。因此,采用常规分析单一基因表达的方法很难研究复方中药作用的分子机制。基因表达芯片是将大量的靶基因 cDNA 片段有序的、高密度化点在玻璃、硅等载体上制作而成。因而,它可以快速、高效、高通量同时分析成千上万的基因在不同情况下的表达。本研究显示,用基因表达芯片同时检测到 147 条表达改变的基因,例如参与细胞周期以及细胞凋亡调控等基因,它们与肿瘤的发生发展密切相关。因此,基因表达芯片技术是研究中药对基因表达的影响和抗肿瘤作用分子机制探讨的有效手段。

参考文献:

- [1] Li XK, Motwani M, Tong W, et al. Huanglian, A Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2000, 58(6): 1287-1293.
- [2] Zhang RX, Dougherty DV, Rosenblum ML. Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1- β -bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors[J]. Chin Med J, 1990, 103(8): 658-665.
- [3] 唐发清, 田道发. 黄连及复方对鼻咽癌细胞裸鼠复种移植瘤的抑制作用[J]. 癌症, 1995, 14(6): 459-460.
- [4] 田道发, 唐发清. 复方黄连对血清 EBV 相关抗体阳性患者的治疗作用初步观察[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 1996, 2(增刊): 33-34.
- [5] 徐叔云, 主编. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 203.
- [6] Schena M, Schalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1 000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 10614-10619.
- [7] Haskill S, Ber AA, Tompkins SM, et al. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity[J]. Cell, 1991, 65(7): 1281-1289.

[8] Gil J , Esteban M , Roth D , *et al.* *In vivo* regulation of the dsRNA dependent protein kinase PKR by the cellular glucoprotein p67 [J]. *Biochemistry* , 2000 , 39(51) : 16016-16025.

[9] Gil J , Alcam J , Esteban M , *et al.* Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase , PKR involve the I kappa B kinase complex[J]. *Oncogene* , 2000 , 19(11) : 1369-1378.

[10] Caunt CJ , Kiss-Toth E , Carlotti F , *et al.* Ras controls tumor necrosis factor receptor-associated factor(TRAF)6-dependent induction of nuclear factor-kappa B , selective regulation through receptor signaling components[J]. *J Biol Chem* , 2001 , 276 (9) : 6280-6288.

[11] 王承兴 李晓艳 , 肖绘 , 等. EB 病毒 LMP1 在鼻咽癌细胞系中通过 TRAF2 活化 NF-KB [J]. *癌症* , 2000 , 19(6) : 517-520.

[12] 潘雷 , 顾焕华 , 梁荣 , 等. 鼻咽癌中 EBV LMP1 激活 NF-κB 的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志* , 1999 , 5 (2) : 95-99.

[13] Yang HS , Jansen AP , Nair R , *et al.* A novel transformation

suppressor pcdcd4 , inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappa B or ODC transactivation[J]. *Oncogene* , 2001 20(6) : 669-676.

[14] Karin M , Liu ZG , Zandi E. AP-1 function and regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol* , 1997 9(2) : 240-246.

[15] Young MR , Li JJ , Rincon M , *et al.* Transgenic mice demonstrate AP-1 transactivation is required for tumor promotion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 96(17) : 9827-9832.

[16] Fukuda K , Hibiya Y , Mutoh M , *et al.* Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells[J]. *Planta Med* , 1999 , 65(4) : 381-383.

[17] Kou CL , Chou CC , Yung BY. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells[J]. *Cancer Lett* , 1995 93(2) : 193-200.

(本文编辑 傅希文)



(上接第 326 页)

3 讨 论

卵巢畸胎瘤是一种常见的卵巢肿瘤 , 占卵巢肿瘤的 10% ~ 20% , 绝大部分为成熟畸胎瘤 , 小部分为未成熟畸胎瘤。成熟畸胎瘤内任何一种或几种成份发生恶变则称为成熟畸胎瘤恶变 , 恶变率约为 1% ~ 3%^[1]。恶变成份以鳞状上皮最多见 , 占 85% 左右 , 其余成分恶变罕见。畸胎瘤恶变多见于绝经后妇女^[2]。部分患者有腹部包块长期存在并短期内迅速增大的病史 , 本文中有 1 例患者 B 超发现右附件包块 3 年余 , 入院前半月包块迅速增大。恶变早期 , 患者多无特殊临床症状 , 如恶变扩散浸润周围脏器或者淋巴结转移 , 则临床症状加重 , 如腹痛、腹胀、腿痛、下肢及外阴浮肿等^[3]。本文 8 例患者均有腹痛、腹胀 , 其中 1 例右下肢疼痛剧烈(每次需用“曲马多”止痛)。如恶变范围广 , 则可见恶变的癌或肉瘤组织穿出囊壁侵犯周围组织 , 被侵组织显示出血坏死^[2]。如膀胱、直肠被侵时 , 患者便出现血尿、便血等临床表现 , 本文有 1 例患者腹痛同时伴血尿十余天 , 术中发现膀胱后壁已全部被癌组织侵犯。

畸胎瘤恶变必须采取综合治疗的方法才能提高疗效^[4]。基本原则为 : 手术治疗为主 , 术后辅以化疗或放疗 , 手术大多采用卵巢肿瘤细胞减灭术 , 术后采用对生殖细胞肿瘤敏感的化疗方案如 VAC 和 VBP(V 为长春新碱 , B 为博莱霉素 , P 为顺铂) 等 , 鳞癌变患者再辅以放疗 , 效果较好。

本文有 1 例患者手术较彻底 , 但因术后未辅以化疗 , 最后死亡。发生鳞癌变的患者预后不佳 , 死亡率达 75% ~ 86%^[1]。目前认为影响预后的因素有以下 4 个方面^[3] : ①囊壁是否受侵犯 ; ②与邻近器官恶性粘连程度或分离粘连时囊壁有无破裂 ; ③肿瘤有无淋巴或静脉侵犯 ; ④腹水中有无癌细胞。

为预防畸胎瘤恶变 , 对于绝经后妇女的卵巢成熟畸胎瘤应视为潜在恶性肿瘤^[5] , 一旦发现肿瘤 , 即使是良性也应尽早切除 , 以免发生恶变。

参考文献 :

[1] Hirakawa T , Tsuneyoshi M , Enjoj M. Squamous cell carcinoma arising in mature cystic teratoma of ovary[J]. *Am J Surg Pathol* , 1989 , 13(5) : 397-405.

[2] 连利娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 2001. 520.

[3] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 1991. 1936.

[4] 张彦娜 , 李孟达. 卵巢成熟性畸胎瘤恶变的预后规律[J]. *实用癌症杂志* 2000 , 15(6) : 617-619.

[5] 陈小祥 , 彭素蓉 , 邵衡华. 卵巢成熟性囊性畸胎瘤恶变临床及预后分析[J]. *肿瘤研究与临床* , 2001 , 13(3) : 189-190.

(本文编辑 傅希文)

应用cDNA表达芯片研究复方黄连对CNE1鼻咽癌移植瘤基因表达的影

作者: 王光平, 唐发清, 周金平

作者单位: 王光平(中南大学湘雅医院血液科, 长沙, 410008; 中南大学湘雅医院中心实验室, 长沙, 410008), 唐发清(中南大学湘雅医院中心实验室, 长沙, 410008), 周金平(中南大学湘雅二医院病理科, 长沙, 410011)

刊名: 湖南医科大学学报 

英文刊名: BULLETIN OF HUNAN MEDICAL UNIVERSITY

年, 卷(期): 2003, 28(4)

被引用次数: 10次

参考文献(17条)

1. Li XK, Motwani M, Tong W Huanglian, A Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells 2000(06)
2. Zhang RX, Dougherty DV, Rosenblum ML Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors 1990(08)
3. 唐发清, 田道发 黄连及复方对鼻咽癌细胞裸鼠复种移植瘤的抑制作用 1995(06)
4. 田道发, 唐发清 复方黄连对血清EBV相关抗体阳性患者的治疗作用初步观察[期刊论文]-中国耳鼻喉咽喉底外科杂志 1996(z1)
5. 徐叔云 药理实验方法学 2002
6. Schena M, Schalon D, Heller R Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1 000 genes 1996(20)
7. HASKILL S, Ber AA, Tompkins SM Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity 1991(07)
8. GilJ, Esteban M, Roth D In vivo regulation of the dsRNA dependent protein kinase PKR by the cellular glucoprotein p67 2000(39)
9. GilJ, Alcam J, Esteban M Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involve the I kappa B kinase complex 2000(11)
10. Caunt CJ, Kiss-Toth E, Carlotti F Ras controls tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6-dependent induction of nuclear factor-kappa B, selective regulation through receptor signaling components 2001(09)
11. 王承兴, 李晓艳, 肖绘 EB病毒LMP1在鼻咽癌细胞系中通过TRAF2活化NF- κ B[期刊论文]-癌症 2000(06)
12. 潘雷, 顾焕华, 梁荣 鼻咽癌中EBV LMP1激活NF-kB的实验研究[期刊论文]-中国耳鼻喉咽喉底外科杂志 1999(02)
13. YANG HS, Jansen AP, Nair R A novel transformation suppressor pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappa B or ODC transactivation 2001(06)
14. Karin M, Liu ZG, Zandi E AP-1 function and regulation 1997(02)
15. Young MR, Li JJ, Rincon M Transgenic mice demonstrate AP-1 transactivation is required for tumor promotion 1999(17)
16. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M Inhibition of activator protein 1 activity by berberine in human hepatoma cells 1999(04)
17. Kou CL, Chou CC, Yung BY Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human

相似文献 (10条)

1. 期刊论文 [宋宝, 刘杰, 韩金祥, 高雪芹, 黄海燕, SONG Bao, LIU Jie, HAN Jin-xiang, GAO Xue-qin, HUANG Hai-yan](#)

[应用cDNA芯片分析与食管鳞癌相关的基因表达 - 临床肿瘤学杂志2005, 10 \(4\)](#)

目的:应用cDNA芯片技术研究食管鳞癌的异常基因表达,并对这些基因的功能进行初步分析.方法:选择382个肿瘤相关基因克隆,制备成cDNA芯片,提取食管鳞癌组织以及相应正常食管组织RNA,反转录后标记为cDNA探针,与自行制备的cDNA芯片杂交,经扫描及分析后筛选出两种组织中差异表达基因.结果:发现差异表达基因75个,表达上调基因44个,下调基因31个,包括癌基因、抑癌基因、细胞周期相关蛋白、粘附因子、基质金属蛋白酶、信号传导因子、生长因子及其受体、与细胞代谢相关的酶等.结论:食管鳞癌的发生发展涉及多基因改变,cDNA芯片技术是疾病基因筛选的有效方法.

2. 学位论文 [裴晓俊 cDNA芯片在乳腺癌个体化治疗中作用的研究](#) 2006

乳腺癌辅助化疗能够降低乳腺癌患者的复发和死亡,但是绝对死亡率的减少仅为10%-12%。目前乳腺癌的治疗,临床医师均依据循证医学指南经验用药,对于病理类型和分期以及个别乳腺癌相关基因(如:ER、PR、HER-2)相同的乳腺癌患者,均采用相同的化疗方案。但是乳腺癌是一种多种分子改变累积的多基因疾病,表现为病人的临床异质性。因此,接受同样方案治疗却有着完全不同的预后的乳腺癌患者比比皆是。这就说明了我们目前的主要依靠细胞形态学进行乳腺癌分类的方法不足够准确,迫切需要找到一种能够准确分类,且这种分类可以准确指导化疗方案的制定的方法。

基因芯片的高通量、微型化、自动化的特点使其可以同时检测成千上万个基因。我们可以利用它来检测乳腺癌组织基因表达图谱,发现差异表达基因,基因表达图谱的差异为乳腺癌的临床异质性提供了分子水平上的证据,并可以对此对乳腺癌重新分类,且这种分类和患者接受某种化疗后的预后相关,从而发现预测具体患者对于具体化疗方案敏感性的基因表达模式。

本研究采用新辅助化疗为研究背景。行新辅助化疗不仅可以在治疗前获取乳腺癌原发肿瘤样本分析其基因表达图谱,还可以在化疗周期间获取乳腺癌标本以检测早期基因表达变化,而且,可以通过直接监测肿瘤大小变化了解化疗疗效。新辅助化疗后的临床缓解和病理缓解状况均和患者的预后相关。接受新辅助化疗后那些临床上肿瘤消退明显的患者预后要优于那些消退不明显或明显耐药的患者,而达到病理完全缓解(pCR)的患者,其无病生存率(DFS)、无远处疾病生存率(DDFS)和总生存率(OS)都高于其他患者,且差别具有统计学意义。结合临床肿瘤大小变化及术后病理缓解情况评估化疗方案疗效,探索基因表达模式同化疗疗效间的相关性,从而发现能够预测疗效的基因表达模式。总之,新辅助化疗为我们发现这一预测因子提供了理想的平台。

本研究就运用了基因芯片技术和新辅助化疗为平台或背景进行研究,期望本研究能为乳腺癌的个体化治疗的相关研究提供一些参考。

目的:

利用自制cDNA芯片检测乳腺癌新辅助化疗前后肿瘤基因表达图谱及其变化,以发现能够预测化疗疗效的基因表达图谱,指导临床医师制定更合理的乳腺癌化疗方案,使患者可以获得最有效、最经济的治疗。

方法:

所有病人均在接受治疗前通过组织学证实为乳腺癌患者,在征得病人同意后对病人行三周期新辅助化疗并在化疗开始前及化疗第二周期前和术后取肿瘤组织冻存备行基因图谱分析。

1. 摇菌、提取质粒、PCR扩增,获得肿瘤相关基因PCR产物,经纯化后点至玻片上,制备成包含5952个点阵的肿瘤相关基因cDNA芯片。

2. 提取冻存乳腺癌组织与正常乳腺组织总RNA,经反转录并标记为cDNA探针,与cDNA芯片杂交,经Scanarray4000芯片扫描仪扫描图象,应用Quantarray3.0软件分析,得到基因表达的数据资料。应用半定量RT-PCR方法对cDNA芯片检测的某些差异表达基因的表达状况进行验证。

结果:

1. 经实验证实,自行制备的肿瘤相关基因cDNA芯片,扫描图象信号清晰,背景信噪低,重复性好,结果理想。

2. 在乳腺癌标本中共有33个肿瘤相关基因有差异表达。

3. 用半定量RT-PCR验证了MMP9基因的表达特征与芯片检测结果基本一致。

结论:

1. cDNA芯片技术可以快速、系统、准确地揭示基因的表达特征,为研究乳腺癌的化疗预测因子提供了良好工具。

2. 通过研究乳腺癌组织差异表达基因与新辅助化疗疗效的相关性,为下一步建立基因预测表达谱提供了重要参考。

3. 期刊论文 [李崇辉, 张爱群, 刘巨超, 臧传波, 陈明易, 徐迎新, 黄志强 内毒素活化巨噬细胞早期和晚期基因表达的](#)

[cDNA芯片分析 - 中国危重病急救医学2004, 16 \(6\)](#)

目的利用cDNA芯片技术分析内毒素活化的小鼠腹腔巨噬细胞早期和晚期基因表达,以更全面了解内毒素在感染、创伤反应中通过巨噬细胞介导的炎症和免疫反应.方法以未刺激的和用1 mg/L脂多糖(LPS)分别刺激2 h(早期)和24 h(晚期)的小鼠腹腔巨噬细胞制备33P标记的cDNA探针,并分别与小鼠cDNA表达芯片(含1 176个已知基因)杂交.结果巨噬细胞活化早期的3倍差异表达基因为69个,其中44个上调,25个下调;巨噬细胞活化晚期的3倍差异表达基因中有11个上调,26个下调,只有8个基因同时出现于活化早期和晚期的差异表达基因中.许多转录因子、细胞内信号转导调节蛋白、炎症细胞因子和细胞凋亡相关基因的表达均发生了明显的调节变化.发现BTB和CNC同源1(BACH1)、早期生长反应蛋白2(EGR2)、E47反应蛋白1(EIPI)、Ngfr-A结合蛋白2(NAB2)、成髓细胞白血病癌基因蛋白(MYBL2)、神经纤维瘤蛋白基因1(NF1)、睫状神经营养因子(CNTF)和Sema4A等一些以前未曾报道与LPS诱导的巨噬细胞活化相关的基因.结论采用cDNA芯片技术了解内毒素诱导的巨噬细胞活化早期和晚期的综合基因表达信息,有助于更好地了解感染、创伤后细菌内毒素诱导的炎症免疫反应.

4. 学位论文 [童一民 铜绿假单胞杆菌QS相关基因CDNA芯片的研制及基因差异表达的研究](#) 2006

绿假单胞菌(俗称绿脓杆菌, *Pseudomonas aeruginosa*)在自然界分布广泛,在人的正常皮肤上也有分布,是人类3大机会致病菌之一。也是院内感染的主要病原之一。绿脓杆菌感染的治疗相对困难,其突出的主要原因是由于本菌对抗生素和消毒剂的内在耐受性。

目前已完成基因组序列的测定,其基因组全长达6.3Mbp,这样巨大的基因组信息,可产生更多的调控各生理功能的蛋白产物,扩展了绿脓杆菌对各种环境的适应能力。

研究表明,绿脓杆菌细胞外毒力因子的产生并非单个细菌细胞所为而是达到一定密度的细胞群体所为:从少量细菌中分离出来的细胞外毒力因子可激发宿主免疫反应来中和这些化合物;而整个菌群一旦达到某种密度,其毒力基因协调表达使绿脓杆菌分泌的细胞外因子达到足以克服宿主防御系统的高水平。即使使用合适的抗生素治疗也不能阻止这一进程。因此该过程必须在毒力基因协调表达之前在早期得到阻断。这种以细胞密度依赖方式协调表达特异性基因的现象称为法定菌数信号传感应答(quorum sensing and response)。绿脓杆菌通过密度感应信号系统经由高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactone, acyl-HSL)信号分子来传递信息、监控细菌细胞密度从而控制其细胞外毒力因子的产生。表明了QS信号系统是绿脓杆菌的独立细胞分化成为复杂的多细胞结构所必需的,并发现多聚磷酸激酶(polyphosphate kinase, ppk)在生物膜的形成、毒力因子的产生、绿脓杆菌的运动方式方面起着重要的作用,说明生物膜的形成和毒力因子的产生是由某些共同的基因表达进行调控的。

PA的主要耐药机制包括以下两个方面:(1)生物被膜(biofilm, BF)在细菌耐药方面发挥着十分重要的作用。BF状态的细菌对抗菌药物的抵抗力比浮游状态细菌强1000倍。PA的BF耐药机制复杂,主要有以下个方面:①限制抗生素渗透。在BF状态下细菌分泌大量细胞外多糖(EPS)基质,EPS可粘结单个细菌而形成细菌团块,即微菌落微菌落可以由单一菌种或由多种微生物发育而成。在这些微菌落内,细菌发育成为功能上异质性的有组织群体。大量微菌落使BF加厚,EPS的产生对BF结构的发展十分重要。已证实EPS基质对某些抗生素和杀虫药有明显的阻碍作用。目前普遍认为,PA的BF对氨基糖苷I-类抗生素的渗透有阻碍作用。②生长速度与代谢活性改变。BF中一些细菌处于低代谢和有限氧状态,对很多抗生素不敏感。③表型的改变。表而生长可诱导菌表达与浮游状态时不同的基因,诱导产生BF特有的表型。

(2) 多药外排泵通过基因组分析,在PA中有12种耐药结节分化家族(resistance-nodulationdivisionfamilyRND)外排泵。PA产生的 β -内酰胺酶(β -lactamase)是使 β -内酰胺类抗生素耐药的主要机制。

细菌QS系统与细菌耐药的关系:(1)QS系统与BF耐药PA的QS系统对BF的形成有明显作用。(2)QS系统与多药外排泵首先,PA重要的外排泵之一MexAB-OprM本身参与了QS系统的信号分子转运。

(3)QS系统与 β -内酰胺酶QS系统是否参与了调节 β -内酰胺酶表达。

因此,干扰QS信号系统是一个很有前景的降低细胞外毒力因子产生以及处理生物膜提高药物敏感性的途径,并且寻找其中关键的中间代谢产物的拮抗剂将开辟新的药物研制和疾病治疗途径。而探明存在多少与细胞贴细胞信号系统相关的基因、其中有多少是生物膜的形成或毒力因子的产生所必需的以及哪些基因对该系统的信号产生了延迟反应等问题是我们首先必须彻底解决的。

本研究的设计基于以下考虑:利用绿脓杆菌PA01基因组研究成果,可对5,570个预测的开放阅读框架(openreadingframe,ORF)用PCR方法进行扩增、克隆、测序,优选出与细胞贴细胞信号系统相关的关键基因,通过特异引物的设计,RCR扩增,克隆出这些基因片段,点样制备成基因芯片,可以用于筛选药物或中草药的有效成分,找到几种可阻断信号通路、抑制毒力基因表达或生物膜形成的药物,进行临床分离菌株与PA01菌株基因表达的相似性分析,以指导临床用药;本研究采用基因芯片技术通过检测基因表达水平来探明细胞贴细胞信号系统与毒力基因表达或生物膜形成相关的基因并筛选其阻断药物,不但在技术上可行,而且符合绿脓杆菌的细胞贴细胞信号系统需多基因(现已知至少有39个基因)参与调节的模式。该项设计可望达到绿脓杆菌的快速检测、发现基因功能和筛选药物之目的。

1, QS相关基因片段的获得通过查阅国外最新相关文献,归纳总结出所有证实与QS信号系统相关的基因,利用细菌基因组测序的研究成果,确定这些基因的序列。利用生物学软件,设计出这些基因片段的特异引物,以细菌基因组DNA为模板,PCR扩增、克隆出这些基因的片段。所得克隆测序鉴定,确认每个所取得的克隆的实际序列。

2, QS相关基因cDNA芯片的研制与国家人类基因组南方研究中心合作开展了“结核杆菌等致病菌耐药性变异检测DNA芯片研制和开发”工作,建立了基因芯片研制的工作基础。利用南方研究中心的试验设备,严格按照芯片制作的步骤,制作QS信号系统相关基因的cDNA芯片。

3, 在妥布霉素药物作用下,QS相关基因表达的差异.生物被膜产生的差异.在妥布霉素的作用下,比较铜绿假单胞菌标准菌株PA01在不同药物作用下的生长状况,比较在一定强度妥布霉素的作用下,PA01的QS相关基因表达的差异。数据处理分析后,观察QS相关基因中哪些基因的表达受到的抑止,哪些基因的表达收到的激发。从而验证药物刺激对PA01的效果。

比对在相同生长条件下细菌的不同生长时期的QS相关基因的表达差异。比较了平台期和指数期的QS相关基因的差异表达,有9个QS基因表达量显著增加,有6个基因表达量显著下降,出现高表达的基因有:

PA2300,PA2144,PA1216,PA1212,PA2566,PA1319,PA2564,PA3189。出现低表达的基因有:PA2250,PA0399,PA0447,PA1658,PA1669,PA1999。

cDNA芯片是一种新的关于细菌毒力和耐药机制的研究手段,将为控制群效应信号系统、降低细胞外毒力因子产生、处理生物膜提高药物敏感性以及寻找新的药物奠定理论和实验基础,并为快速检测和控制铜绿假单胞菌感染提供有效措施,同时将为铜绿假单胞菌基因表达谱的建立和基因功能分析奠定基础。在国内,首次研制出与QS相关基因的cDNA芯片,QS相关cDNA基因芯片的制备,使得可以运用基因芯片技术到研究铜绿假单胞菌QS系统相关基因,比较直观的观察不同药物对基因表达调控的影响,为找到能较好抑制铜绿假单胞菌正常生长的药物研究提供新方法。

5. 期刊论文 [项春生, Yidong Chen, Jiang Yuan, Gerald C. Gooden, Michael L. Bittner, Paul S. Meltzer, Jeffery M. Trent, Steve Zeichner](#) cDNA芯片技术和病毒感染的基因表达 -科学通报1999, 44 (5)

论述了最近发展的cDNA芯片技术及其在基因的发现和表达以及在疾病诊断上的应用.该技术是把cDNA的阵列由高速自动控制仪器置于玻璃片上,用标记的探针测定互补结合的情况,可同时进行大量基因的表达和基因的发现研究.这是一个高效率和大规模的基因组分析和表达的研究技术.使用这一新技术,发现了HIV感染期间hsp70基因表达发生的变化,传统的Northern分析证实了芯片的测定结果.综述中还包括了作者未发表的有关HIV和HHV8的研究资料,一致说明了cDNA芯片技术对新基因的发现、疾病描述和鉴定与疾病相关基因方面的可靠性和适用性.

6. 会议论文 [邹飞雁, 谢海龙, 陈主初, 余艳辉](#) 应用cDNA芯片分析肺癌候选抑癌基因HLCBG1转染的A549细胞基因表达谱的改变 2003

抽提肺癌细胞系A549细胞和转基因HLCBG1 / A549细胞总RNA,将mRNA逆转录为cDNA,并在逆转录过程中用Cy3或Cy5进行标记,与含有3900个基因和表达谱(EST)的表达所致A549细胞基因表达谱改变,并用Northern印迹对基因芯片杂交结果进行验证.获得差异表达基因或EST 47个,其中表达上调的有7个,表达下调的有40个;已明确基因表达产物的上调基因有5个,下调基因有29个.涉及原癌基因和抑癌基因、DNA合成与修复、蛋白重组与翻译、发育和代谢、细胞增殖和凋亡等.这为进一步研究HLCBG1基因在肺癌发生发展中的作用机理提供了重要分子基础。

7. 学位论文 [褚延广](#) 星星草耐盐分子机理研究及相关基因的克隆 2005

星星草是一种有较强耐盐碱能力的盐生植物,是进行植物耐盐碱机理研究的理想材料。为研究NaHCO₃胁迫下星星草的耐盐机理,以450mmol/L NaHCO₃胁迫处理的星星草叶片为材料构建了cDNA文库,同时,用表达序列标签(EST)分析和cDNA表达谱芯片分析相结合的方法研究了NaHCO₃和干旱胁迫下星星草基因的表达。

所构建cDNA初始文库的滴度为1.0×10⁶pfu/mL,文库的重组率为95%,PCR检测显示,插入片段的平均长度为0.8kb。从文库中随机挑选3168个克隆进行测序,共获得2972条高质量的序列;通过序列的聚类分析共将1102条序列拼接为496个contig,其余1870条序列为单一序列,共获得2366条无重复的独立序列,它们的GenBank登录号为CN485355~CN487720。

从2366个序列中挑选660个cDNA经PCR扩增后作靶基因点样在玻片上制成cDNA芯片。将对照、NaHCO₃和干旱处理的星星草总RNA,经荧光染料Cy5-dCTP和Cy3-dCTP标记后制成cDNA探针,与cDNA芯片进行杂交。

2366个序列的BLASTX分析结果显示,共有1274条序列与已知基因序列高度同源,618条为与已知基因同源性较低,其余474条序列与已知基因无任何同源性。将1274条与已知基因同源的序列按功能分为12类,其中代谢、转录调节、功能未知及细胞防御相关四类基因的表达丰度最高,分别占已分类EST总数的18.84%、12.48%、1.22%和9.66%。对高丰度表达基因和162条可能与耐盐相关基因的分析表明,光合作用、转录调节、转运蛋白和细胞防御4类基因的表达丰度较高,说明光合作用、水分和离子的转运、耐盐基因的表达调控、活性氧等毒性物质的去除等过程在星星草抗盐胁迫时起到了重要作用。cDNA芯片研究NaHCO₃胁迫下星星草基因表达结果显示,共有25个基因在盐胁迫处理前后差异表达,其中17个基因在盐胁迫下表达下调,8个基因在盐胁迫下表达上调,这些基因的功能主要涉及了信号传导与转录调控、细胞防御、细胞代谢3个方面,这些差异表达的基因可能在星星草抗盐过程中具有重要作用。cDNA芯片研究干旱胁迫下星星草基因表达,共发现下调表达的基因24个,上调表达基因18个。差异表达基因的功能主要涉及了信号传导、转录调控、逆境响应等方面。通过以上研究,初步建立了NaHCO₃、干旱胁迫前后星星草基因的表达谱。

植物的抗盐过程是一个复杂的多基因协同作用的体系。以上研究说明,通过EST技术和cDNA芯片分析等基因组学研究手段的应用,可有效获取盐胁迫下星星草众多基因的表达特征信息,从而为系统阐明星星草抗盐碱分子机理奠定坚实的基础。

8. 期刊论文 [范保星, 孙敬芬, 刘庆峰, 陈良安, 刘又宁, 王升启, 吴德昌](#) 总RNA和mRNA来源的探针与cDNA芯片杂交的差异研究 -生物技术通讯2004, 15 (1)

提取BEP2D细胞的总RNA并按两种方式进行cDNA芯片探针的标记,一种是将100 μg BEP2D细胞的总RNA利用逆转录法直接标记成荧光探针,另一种是从100 μg BEP2D细胞的总RNA中分离出mRNA,然后再标记成荧光探针.将两份标记好的探针同时与含有230个基因的cDNA芯片杂交.杂交后的芯片经Axon4100B扫描仪扫描,发现两种方式标记探针的一致性为93.04%,并且mRNA来源探针杂交后的荧光信号值较总RNA的弱.探讨了这两种方法标记探针在基因芯片表达谱研究中的差异性,目的是为了利用这两种方法标记探针进行基因表达谱研究者提供一些依据。

9. 学位论文 [毛向明](#) 基因芯片技术在成年男性精子基因表达谱研究中的应用 2005

不孕不育是全世界关注的课题。目前每100对已婚夫妇中,就有10对夫妇存在不孕不育问题。其中男性因素占到了50%。也就是说,男性精子质量不佳,已影响到人类的繁衍生息。

该文把精子中具有编码功能的序列作为重点,把精子的基因表达谱作为研究对象。

要研究精子的基因表达，首要的问题是提取到精子中表达的RNA。精子与体细胞不同，是单倍体细胞，处于分化的终末阶段，因此，以前人们一直认为精子中无基因表达，精子基因分子生物学研究也一直没有深入开展。直到最近几年，KramerJ等人首先报道了在精子内检测到了RNA的表达，此后MullerD等人先后改进了异硫氰酸胍/有机溶剂的抽提方法，并排除了各种可能造成DNA污染因素，自成人精子中分离到了RNA，才证实了成熟精子中确实存在RNA的表达。随着对精子分子生物学研究的不断深入，精子中有基因表达也越来越得到人们的认同，如顶体中的水解蛋白酶(透明质酸酶，顶体素)和磷脂酶，线粒体中的琥珀酸脱氢酶，此外还有Na⁺、K⁺-ATP酶、酪氨酸蛋白酶、尿激酶、乳酸脱氢酶等等。这些发现和认识激发了人们进一步研究精子基因表达的浓厚兴趣。

提取细胞或组织中的RNA，异硫氰酸胍法一直是传统而经典的方法，对大多数的细胞和组织都能得到良好的结果，但在提取精子中的RNA时，效果并不理想。

精子是单倍体细胞，比之体细胞，RNA的表达数相对少。作为分化末期状态细胞，RNA的表达量可能也有所降低，所以总体而言，精子中的RNA量较正常体细胞低得多。

针对这种特殊的实验材料，该实验对RNA的提取程序进行了探索。选择了QAGEN公司开发的、针对小样品量的RNA提取试剂盒——RNeasyMiniKit，来提取成年男性活力正常的精子RNA，取得了良好的效果。

对提取到的RNA在进行逆转录前需进行质量检测，以确保没有基因组DNA污染。应用常规的凝胶电泳检测提取到的少量的精子RNA，无法在电泳结果中看到RNA中的三条核糖体RNA条带，也无法根据常规的条带间的灰度比值，来判断RNA有无降解或存在DNA污染。针对这个问题，该文应用了微流体芯片高压凝胶电泳进行了质量检测。在极少量的上样检测中(25ng)，发现了RNA中的三个核糖体RNA条带，但与正常体细胞的RNA电泳图谱不一致。在缺乏标准判断指标的前提下，根据重复多次(13次)的实验结果，提出了精子RNA电泳图谱的基本形状，及精子RNA质量评价的基本标准。

进而，该文将经过质量检测的精子RNA逆转录为cDNA，应用马文丽、郑文岭教授创建的限制性显示技术，对cDNA进行了限制性酶切、加通用接头，用通用引物进行PCR扩增，将扩增产物作为模板，3，端延伸一个碱基的通用引物为分組引物进行了十组PCR分組扩增，并将十组PCR产物转入大肠杆菌，经涂板、挑克隆、鉴定、提取阳性质粒等操作，收集到了560个精子的cDNA片段，编号索引后-20℃保存备用。

将质粒中保存的精子cDNA片段，根据质粒上的序列设计引物，扩增插入的精子cDNA片段。上述片段扩增量达到足够量后(2μg)用异丙醇纯化，纯化产物重溶于Milli-Q超纯水中，取出适量，加入50%DMSO，调整浓度为300ng/μl，在Corning的玻璃片上，以3-磷酸甘油醛(GAPDH)为阳性对照，HIV基因片段为阴性对照，50%二甲亚砜(DMSO)为空白对照，每个探针重复打印三次，制作了精子表达谱基因芯片。

应用自制的精子cDNA芯片进行了两个方面的研究。①验证该文收集的精子cDNA探针的准确性和可信性；②对精子的基因表达进行了初步的研究。精子样品按上述同样的方法和操作程序进行限制性显示实验操作，但在cDNA片段的两端连接上了与探针序列不一样的通用接头2，再用相应的通用引物2扩增，避免杂交时，探针和待杂交样品间都具有大约40bp的同源性片段，从而对杂交结果的准确性造成影响。经此法制备的精子cDNA片段，用Cy3荧光物质标记后，与36×34的芯片阵列进行了单色杂交，杂交结果证实该文收集的精子cDNA探针具有较好的准确性和可信性，可进行进一步的杂交实验和分析。进一步收集精子样品和人的淋巴细胞，采用与单色杂交相同的方法和程序，制备了Cy3标记的精子cDNA片段和Cy5标记的人淋巴细胞cDNA片段，与42×40的芯片阵列杂交。杂交结果提示，精子中已有大量的基因表达，并且在精子中与基因复制、转录和转录调控以及蛋白质的翻译和降解等相关的基因表达基本属于无差异表达类型或低表达类型，而与精子发生相关的基因、精子本身的特异性抗原等基因则显著高表达，如精子相关抗原4、精子发生相关基因2、DAZ3基因等。与能量生成密切相关的基因，如糖酵解相关基因表达上调，而与氧化磷酸化相关的基因则表达下调，这与获能前的精子主要依赖无氧酵解供能的生理特点相一致。此外，在表达的基因片段中，有2个探针与人直肠癌癌cDNA消减文库中的基因高度同源，但功能未知，还有一些基因探针与NCBI的NR和EST数据库比较，都未发现有同源性片段，推测是精子中特异表达的基因，已作为新EST向GeneBank进行了提交。

为进一步扩大研究精子的基因表达谱，该研究应用了人全基因组寡核苷酸芯片(AgilentHuman1B基因芯片)，对正常的睾丸组织与射精精子，以及正常与无活力射精精子的基因表达谱进行了研究。采用cRNA线性标记扩增技术对精子的mRNA进行线性扩增和标记。杂交后该文建立了正常精子基因表达谱，发现在待测的21073个基因中，正常精子两次杂交共同检测到表达的基因仅有2157个，包括目前已知的与精子的发生和活力相关的基因22个。精子基因表达谱的建立展现了射精精获得的精子内表达mRNA的全貌，为我们进一步研究精子内所进行的各种分子生物学及细胞生物学过程奠定了基础。正常精子与正常睾丸组织分别提取总RNA，纯化后mRNA经cRNA线性标记扩增，并与人全基因组寡核苷酸芯片杂交，结果发现正常精子相对于睾丸组织而言共有67个基因表达上调，包括16个目前已知的与发育相关的基因，14个与精子发生、成熟及活力相关的基因等如TCFL5、HIST1H1T基因等。除此之外，这些表达上调的基因按照功能分类，还包括14个与配子发生相关的基因，13个与蛋白代谢及修饰相关的基因，11个与核苷、核苷酸、核酸代谢相关的基因，10个与信号转导相关的基因，8个与蛋白修饰相关的基因，6个与蛋白磷酸化相关的基因和6个与细胞内信号级联放大相关的基因等。这些基因的筛出，为进一步研究精子成熟过程中发挥重要作用的基因提供了依据。

正常精子与活力不足精子的基因表达差异分析发现活力不足的精子中表达上调的基因有69个，包括目前已知的与精子发育及活力明确相关的C1QBP、SEMG2、ABP1、SPATA5、SEMG1、USP25、CREM、GRP58、NM139073.1共9个基因。表达下调的基因有116个，包括目前已知与精子发育及活力明确相关的基因MGC26706、CATSPER1、ODF1、PRKAR2A、ROPN1、RSLH1、CATSPER2、AF053356CDS3、TEKT3、GAPDS、TEKT2、DJ473B4共12个。筛选出的其余的差异基因初步认为都与精子活力不足的发生有关，当然确切的结论尚需进一步的研究确定。

综上所述，该文通过提取精子的RNA，收集精子cDNA芯片探针，自制精子cDNA表达谱芯片并进行杂交分析，以及与人全基因组寡核苷酸基因芯片的杂交分析，充分证实了精子中有较丰富的基因表达，建立了正常精子基因表达谱，筛选出了一些与精子发育成熟高度相关的基因和一些与精子活力不足相关的基因，为进一步建立人类正常精子的指纹图谱，在基因水平揭示影响精子质量的因素，促进人类精子功能基因的研究，做出了有益的探索。

10. 期刊论文 [庄远红, ZHUANG Yuan-hong cDNA芯片技术的应用](#) -[江西教育学院学报](#) 2006, 27 (3)

主要介绍cDNA芯片技术在细胞代谢、环境压力反应、新基因发现、药物筛选等领域的应用。

引证文献(10条)

1. [陈万涛](#) [口腔颌面-头颈鳞癌的分子生物学研究](#)[期刊论文]-[中国口腔颌面外科杂志](#) 2008 (3)
2. [王光平](#).[陈方平](#).[付敢](#) [鼻咽癌细胞系IκBα mRNA表达及其DNA序列分析](#)[期刊论文]-[中南大学学报（医学版）](#) 2007 (5)
3. [王晓岚](#).[肖大江](#).[朱国臣](#) [中药及天然药物对鼻咽癌基础药理研究进展](#)[期刊论文]-[辽宁中医药大学学报](#) 2007 (6)
4. [罗彪](#).[韦启后](#).[梁谨](#).[黄世庆](#).[黄冰](#) [小檗碱对人鼻咽癌CNE-2 细胞端粒酶活性的影响](#)[期刊论文]-[陕西医学杂志](#) 2007 (10)
5. [银晖](#).[王光平](#).[易红](#).[冷如意](#).[齐振华](#).[付敢](#).[陈方平](#) [重组突变型IκBα cDNA对CNE1鼻咽癌细胞凋亡的诱导作用](#)[期刊论文]-[现代肿瘤医学](#) 2007 (4)
6. [罗彪](#).[韦启后](#).[梁谨](#).[黄世庆](#).[黄冰](#) [小檗碱对人鼻咽癌细胞生长的抑制作用](#)[期刊论文]-[右江医学](#) 2006 (4)
7. [余园媛](#).[王伯初](#).[彭亮](#).[王晶波](#).[曾辰](#) [黄连的药理研究进展](#)[期刊论文]-[重庆大学学报（自然科学版）](#) 2006 (2)
8. [杨欢](#) [黄连阿胶汤化学成分的研究及对模型大鼠尿儿茶酚胺排泄量的影响](#)[学位论文]硕士 2005

9. [刘书静](#) [鼻咽癌颅内转移的证型特点及其分子基础初步研究](#)[学位论文]博士 2005

10. [王玉祥](#) [RNA干扰细胞周期检测点激酶CHK1和CHK2表达对食管癌细胞照射后细胞周期阻滞的消除作用](#)[学位论文]
]博士 2005

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_hnykdx200304008.aspx

授权使用: 曹周华(caozh), 授权号: 852666fc-d594-4f3f-a629-9e52008b5540

下载时间: 2010年12月20日