

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )05-0428-07

## 基因芯片对骨肉瘤发病相关基因的筛查

李国东, 蔡郑东\*, 张寅权, 汝 鸣, 纪 方( 第二军医大学 附属长海医院 骨科, 上海 200433 )

**[ 摘 要 ]** 目的: 筛查骨肉瘤发病相关的基因, 探讨其对于骨肉瘤发病的意义。方法: 采用 3 个骨肉瘤细胞株( MG-63、Saos-2、U-2OS )及 1 个成骨细胞株( Hfob1. 19 ), 提取总 RNA , 合成生物素标记的 cRNA , 与 Affymetrix® GeneChip® U133A 芯片杂交, 筛查骨肉瘤细胞差异表达  $\geq 2.0$  倍的基因。挑选其中 10 个差异表达基因, 分别设计合成引物, 用嵌合荧光( SYBR® Green I )实时 PCR 法定量检测 9 例新鲜骨肉瘤标本中该 10 个基因的表达水平, 应用 ABI Prism 7 000 分析其与成骨细胞株之间的表达差异。结果: 在芯片包含的所有基因( 约 22 000 个转录本 )中, 3 个骨肉瘤细胞株与成骨细胞株相比较, 共同上调 58 个基因, 共同下调 142 个基因; 这些差异表达基因主要包括能量和物质代谢基因、癌基因、信号转导基因、转录相关基因、细胞周期基因、细胞凋亡基因、免疫反应基因、抑癌基因等。在 200 个差异表达基因中挑选 10 个差异表达基因, 利用实时 RT-PCR 检测 9 例骨肉瘤组织标本中该 10 种基因的表达结果与芯片结果完全相符。结论: 骨肉瘤是一种多基因病变, 应用基因芯片可以发现该肿瘤发病相关的基因, 为深入探讨骨肉瘤的基因机制奠定基础。

**[ 关键词 ]** 骨肉瘤细胞; 成骨细胞; 基因微矩阵; 差异表达基因

**[ 中图分类号 ]** R738. 1; R730. 2 **[ 文献标志码 ]** A

## Screening for pathogenesis-related genes of osteosarcoma using gene microarray

LI Guo-dong, CAI Zheng-dong\*, ZHANG Yin-quan, RU Ming, JI Fang ( Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China )

**[ Abstract ]** **Objective:** To screen for the pathogenesis-related genes of osteosarcoma and to assess their roles for the development of osteosarcoma. **Methods:** Total RNA was extracted from 3 ATCC osteosarcoma cell lines and an osteoblastic cell line and was used to synthesize biotinylated cRNAs; the latter were hybridized to Affymetrix® GeneChip® U133A arrays and a gene with more than 2 folds of change was selected. Ten of the differentially expressed genes were chosen and the primers were designed and the synthesized. Then SYBR® Green real-time PCR( RT-PCR ) method was used to detect the expression of the 10 genes in 9 fresh osteosarcoma specimens. ABI Prism 7 000 system was used to analyze the different expression between osteosarcoma cell line and osteoblastic cell line. **Results:** We identified 58 up-regulated and 142 down-regulated genes in the 3 osteosarcoma cell lines. Many of the genes were firstly reported to be related to the pathogenesis of osteosarcoma. These differentially expressed genes were mainly involved in energy and material metabolism, oncogene, signal transduction gene, transcription - related genes, cell cycle-related genes, cell apoptosis-related gene, immune response gene, tumor suppressor genes, etc. The array results of 10 randomly selected genes were further verified by the RT-PCR in 9 fresh osteosarcoma specimens. **Conclusion:** Many genes are involved in the pathogenesis of osteosarcoma. Gene microarray can help to discover the genes related to the pathogenesis of osteosarcoma, which may lay a foundation for studying the molecular mechanism of osteosarcom.

**[ Key words ]** osteosarcoma cells; osteoblastic cells; gene microarray; different expression gene

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 5 ): 428-434 ]

骨肉瘤作为最常见的恶性骨肿瘤, 其分子生物学发生机制研究历来是相关基础研究领域的热点之一。过去人们在细胞遗传学及分子遗传学方面对骨肉瘤进行了大量研究, 但是由于其发生机制的复杂性以及研究手段的局限, 人们对于骨肉瘤发生的分子机制迄今仍然知之甚少<sup>[1]</sup>。基因芯片技术是一项业已被证明的高效率、高通量的差异基因筛查手

段。既往研究<sup>[2-6]</sup>中, 研究者利用这种技术发现了一些骨肉瘤发病及转移相关基因。目前, 随着全基因

**[ 基金项目 ]** 国家自然科学基金资助项目( No. 30170955 )。Supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30170955 )

**[ 作者简介 ]** 李国东( 1978- )男, 山西大同人, 博士研究生, 主要从事骨与软组织肿瘤临床和基础研究工作

\* Corresponding author. E-mail: czd856@sohu.com

组芯片(大约 22 500 个转录本)的产生,在基因组水平全面筛查骨肉瘤发病相关基因已成为可能。

本研究以 3 种骨肉瘤细胞系(MG-63、Saos-2、U-2 OS)和成骨细胞系 hFOB 1.19 为研究对象,应用 Affymetrix® GeneChip® U133A 全基因组芯片,检测人类基因组中已知的约 14 500 个基因在骨肉瘤及成骨细胞中的差异表达情况,并进一步采用实时 PCR(RT-PCR)检测 9 例新鲜骨肉瘤组织标本,对芯片筛查出的显著差异表达的基因进行验证,为深入探讨骨肉瘤发病的基因机制提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及培养条件

3 个骨肉瘤细胞系(MG-63、Saos-2 和 U-2 OS)及 1 个成骨细胞系(hFOB 1.19)分别来源如下:MG-63 由英国伦敦大学 Grigoriadis 博士馈赠;Saos-2、U-2 OS 及 hFOB 1.19 均购自美国标准菌库(ATCC)。

MG-63、Saos-2、U-2 OS 细胞均在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。遵照 ATCC 标准培养条件:MG-63 采用 MEM 培养液,添加 10% 灭活胎牛血清;Saos-2 采用 McCoy's 5a 培养液,添加 1.5 mmol/L 谷胺酰胺及 15% 灭活胎牛血清;U-2 OS 采用 McCoy's 5a 培养液,添加 1.5 mmol/L 谷胺酰胺及 10% 灭活胎牛血清;上述 3 种培养液均购自 Gibco 公司。成骨细胞系 hFOB 1.19 在 34℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,所用的 Ham's F12 及无酚红 DMEM 培养液(1:1)均购自 SIGMA 公司。培养液中添加 2.5 mmol/L 谷胺酰胺、0.3 mg/ml G418(GIBCO 公司)及 10% 灭活胎牛血清。所有用于基因芯片实验的细胞均处于对数生长期。

### 1.2 骨肉瘤组织标本的收集

9 例骨肉瘤组织标本均为 2002 年 10 月至 2004 年 5 月期间第二军医大学长海医院骨科手术切除标本,切除后立即置入液氮罐中冻存。患者男性 5 名,女性 4 名;平均年龄(19.3 ± 4.4)岁。其中瘤体位于膝关节周围者 6 例(66.7%)、肱骨干 1 例(11.1%)、股骨干 1 例(11.1%)、胫骨下段 1 例(11.1%)。所有组织标本均经长海医院病理科免疫病理确诊为骨肉瘤,组织分型均为成骨细胞型。

### 1.3 实验细胞株总 RNA 抽提及探针合成

将 4 个实验用细胞株各收集 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞,采用 QIAGEN's 总 RNA 抽提试剂盒(见 RNeasy Total RNA Isolation kit 说明手册)进行总 RNA 抽提。总 RNA 的质量及纯度采用 Agilent 2100 生物分析仪检

测,确认 28S/18S rRNA 泳带密度比值为 1.5 ~ 2 且 D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub> 为 1.8 ~ 2 者才继续进行其后的操作。芯片杂交剩余的 RNA 保存于 -80℃ 冰箱备用。

双链 cDNA 的合成、生物素标记 cRNA 的合成以及 cRNA 的片段化等过程严格遵循 Affymetrix® GeneChip® U133A 芯片实验方法。根据该方法,cDNA 的第一链系应用总 RNA、特异性寡核苷酸 T7-(d7)<sub>24</sub> 引物、SuperScript II 反转录酶合成;第二链系应用 T4 DNA 聚合酶、DNA 连接酶等合成;双链 cDNA 的纯化系采用 Phase Lock Gels(PLG)-酚/氯仿提取后乙醇沉淀完成;通过 BioArray® High Yield® RNA 转录标记试剂盒将以纯化的双链 cDNA 作为模版生成的 cRNA 进行生物素标记;标记的 cRNA 采用 QIAGEN RNeasy Columns 纯化并片段化为 35 ~ 200 的碱基片段。体外转录产物及片段化产物质量均采用 Agilent 2100 生物分析仪进行控制。

### 1.4 基因芯片杂交

将制备好的生物素标记的 cRNA 15 μg 分别与 4 张芯片杂交过夜。杂交缓冲液体系中包括 5 μl 对照寡核苷酸 B2(3 nmol/L)、15 μl 20 × 真核杂交对照体系(bioB, bioC, bioD, cre)、3 μl Herring sperm DNA(10 mg/ml)、3 μl 乙酰化 BSA(50 mg/ml)、150 μl 2 × 杂交缓冲液,加水配至 300 μl 缓冲体系。

芯片杂交后的洗涤、染色过程遵照标准的 Affymetrix® GeneChip® U133A 表达谱芯片实验指南,通过全自动芯片洗涤工作站予以完成。芯片杂交结果采用 Affymetrix 扫描仪 3000 进行扫描, Microarray Suite5.0 软件读取和处理数据。

### 1.5 杂交数据分析

在芯片的转录本矩阵中,每一个转录本由 11 对完全匹配-不完全匹配探针来表示。一个转录本只有当完全匹配杂交信号强度 ≥ 1.5 倍不完全匹配杂交信号强度,且平均强度差异 ≥ 4 倍实验噪音强度时才可认为“表达”。

芯片之间差异表达基因的筛选通过 Microarray Suite5.0 软件完成。各骨肉瘤细胞株与成骨细胞株之间差异表达 ≥ 2 倍的基因被筛选出来,再选择 3 株骨肉瘤细胞相对成骨细胞株共同差异表达的基因作为阳性结果。筛查过程借助于 Affymetrix 芯片分析中心(www.affymetrix.com/analysis)、GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)、swissprot 数据库等完成。

### 1.6 嵌合荧光法实时定量 PCR 检测骨肉瘤组织标本的基因表达

从芯片杂交结果中选择 10 种较典型的表达差

异基因,应用实时定量 PCR 检测 9 例临床采集新鲜骨肉瘤组织标本中该 10 种基因的表达情况,与芯片杂交结果进行比较加以验证。9 例骨肉瘤组织标本总 RNA 用一步法( TRIzol 试剂, GIBCO/BRL 公司)提取后全部保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

cDNA 第一链合成:从  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出 RNA,在室温下解冻,然后在 0.2 ml PCR 管中配制反应溶液;将反应管置于 PCR 仪中,  $65^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;变性反应结束后在 PCR 管中配制 cDNA 第一链合成反应体系(  $5 \times$  first-strand buffer 4.0  $\mu\text{l}$ 、0.1 mmol/L DTT 2.0  $\mu\text{l}$ 、RNA inhibitor 1.0  $\mu\text{l}$ 、Super-script II 1.0  $\mu\text{l}$ );将 PCR 管子置于 PCR 仪中进行探针标记反应,  $42^{\circ}\text{C}$  保温 50 min,  $70^{\circ}\text{C}$  变性 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。登录 GENE BANK 网站,以 10 个差异表达基因为模版设计上、下游引物。引物的合成(表 1)由上海生物芯片有限公司完成。

表 1 实时 PCR 引物

Tab. 1 Primers of the RT-PCR

Name	Unigene ID	Sequences
TPD52	Hs. 162089	5'TGAATTCGGCTGCAAATGC 3'
		5'ACAAGATGTGCTTGGACCTCG 3'
CLU	Hs. 436657	5'TGATCCCATCACTGTGACGGT3'
		5'CCGGTGCCTTTTTGCGGTAT3'
CD24	Hs. 375108	5'CTGCCTCGACACATAAACCT3'
		5'GGTCATCAAGACTACTGTGGCC3'
MEST	Hs. 440459	5'TTCCATATTTGAGCAGGCCAG3'
		5'TTCCATATTTGAGCAGGCCAG3'
PRG1	Hs. 1908	5'AATCCAACAAGATCCCCCT3'
		5'AAGCCACTCCCAGATCCTGAT3'
IGFBP3	Hs. 450230	5'CGCACAGGCTTTATCGAGAAT3'
		5'TCCACGCCCTTGTTCAGA3'
SPARC	Hs. 111779	5'TGGACTCTGAGCTGACCGAAT3'
		5'TGGATCTTCTCACCCGCA3'
OXTR	Hs. 2820	5'GCCACAACATGGATGAGCCTT3'
		5'GCCACAACATGGATGAGCCTT3'
BNIP3	Hs. 79428	5'CTCTTTAAACACCCGAAGCGC3'
		5'CCAGCAAATGAGAGAGCAGCA3'
LOXL2	Hs. 83354	5'TCGAGGTTGCAGAATCCGAT3'
		5'TTTCCGTCTCTTCGCTGAAGG3'

嵌合荧光法(SYBR<sup>®</sup> Green I)实时 PCR:采用 ABI SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR 方法(见 ABI SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR 方法说明)  $50^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min,然后  $95^{\circ}\text{C}$ 、10 min;接着进行 45 个循环,  $95^{\circ}\text{C}$ 、15 s,  $59^{\circ}\text{C}$ 、1 min。仪器使用 ABI Prism 7 000。差异表达倍数算法如下:首先算出  $n$ ,  $n =$  各标本相应基因 CT 值 -  $\beta$ -肌动蛋白 CT 值;  $2^{-n}$  即为理论模板数。对于上调基因,差异表达倍数 = 基因的理论模板数/hFOB 1.19 的理论模板数;对于下调基因,差异表达基因 = hFOB 1.19 的理论模板数/基因的理论模板数。

## 2 结果

### 2.1 骨肉瘤细胞株与成骨细胞株差异表达的基因

芯片杂交结果显示:3 个骨肉瘤细胞株与成骨细胞株差异表达基因中, MG-63 细胞上调 968 个基因,下调 888 个基因; Saos-2 细胞上调 878 个基因,下调 896 个基因; U-2 OS 细胞上调 1 150 个基因,下调 803 个基因。3 个骨肉瘤细胞株共同上调 58 个基因(表 2);共同下调 142 个基因(表 3)。结果提示:上调基因基本可分为能量和物质代谢基因、癌基因、信号转导基因、细胞复制和转录相关基因等;下调基因则基本可分为抑癌基因、凋亡基因、细胞周期基因、免疫反应基因、信号转导基因等。

### 2.2 10 个差异表达基因的在骨肉瘤组织标本中的实时 PCR 验证

综合考虑差异表达倍数和基因功能与肿瘤生物学关系的密切程度,选定芯片杂交阳性结果中 10 个差异表达基因作为验证对象。在共同上调基因中,选取了 CLU、TPD52(分别上调 31.30 和 19.73 倍)和 CD24 基因(在 2 个骨肉瘤细胞株中明显上调达 82.38 倍);在共同下调基因中,选择 MEST、PRG1、IGFBP3、SPARC、OXTR、BNIP3、LOXL2 等 7 个基因(分别平均下调 65.50、130.09、36.12、14.17、12.97、11.24、17.72 倍)在瘤组织标本中对它们的表达进行定量 PCR 检测。

上述 10 个验证基因在 9 例临床骨肉瘤标本中的表达情况见表 4、5。在 mRNA 水平上,与成骨细胞株相比,全部骨肉瘤组织标本中 10 个差异基因的表达与 Affymetrix 芯片结果高度一致(以 CD24 基因为例,芯片平均差异表达倍数为上调 82.38 倍;标本中验证结果为平均表达上调 84.72 倍),验证了芯片筛选骨肉瘤细胞差异表达基因结果的可靠性。

表 2 3 个成骨肉瘤细胞株中筛查出的部分共同上调基因

Tab. 2 Some up-regulated genes in the 3 osteosarcoma cell lines

Unigene ID	Name	Fold	Chromosome	Basic functions
Hs. 436657	<i>GLU</i>	+ 31. 30	8p21-p12	Fat metabolism
Hs. 162089	<i>TPD52</i>	+ 19. 73	8q21	Unknown
Hs. 534369	<i>HISTIH2BE</i>	+ 11. 36	6p21. 3	Assembly of neclosome
Hs. 413045	<i>CAP350</i>	+ 16. 77	1p36. 13-q41	Unknown
Hs. 439643	<i>SLC16A7</i>	+ 32. 86	12q13	Membrane transportation
Hs. 182432	<i>HISTIH2BM</i>	+ 7. 20	6p22-p21. 3	Assembly of neclosome
Hs. 424966	<i>PIR</i>	+ 8. 81	xp22. 31	Nuclear transcription
Hs. 8944	<i>PCOLCE2</i>	+ 20. 64	3q21-q24	Collagen metabolism
Hs. 525620	<i>PPAP2B</i>	+ 30. 89	1pter-p22. 1	Fat metabolism
Hs. 156761	<i>KIAA1102</i>	+ 13. 47	4p14	Contracture of smooth muscle
Hs. 255149	<i>MAN1A1</i>	+ 7. 13	6q22	Glucose metabolism
Hs. 82128	<i>TPBG</i>	+ 5. 81	6q14-q15	Cell mobility
Hs. 417077	<i>CYP51A1</i>	+ 4. 22	7q21. 2-q21. 3	Electron transportation
Hs. 180062	<i>PSMB8</i>	+ 14. 44	6p21. 3	Protein metabolism
Hs. 99029	<i>CEBPB</i>	+ 4. 35	20q13. 1	Transcription regulation
Hs. 502577	<i>PDE4DIP</i>	+ 5. 67	1q12	Synthesis of protein
Hs. 159651	<i>TNFRSF21</i>	+ 6. 83	6p21. 1-12. 2	Apoptosis
Hs. 114360	<i>TGFB14</i>	+ 8. 95	13q14	Transcription regulation
Hs. 111554	<i>ARL7</i>	+ 6. 16	2q37. 2	Signal transduction
Hs. 94896	<i>TMEM14A</i>	+ 5. 74	6p12. 3	Unknown

表 3 3 个成骨肉瘤细胞株中筛查出的部分共同下调基因

Tab. 3 Some down-regulated genes in the 3 osteosarcoma cell lines

Unigene ID	Name	Fold	Chromosome	Basic functions
Hs. 288720	<i>LRRC17</i>	-99. 86	7q22. 1	Unknown
Hs. 128087	<i>F2R</i>	-36. 96	5q13	Cell cycle regulation
Hs. 440459	<i>MEST</i>	-65. 50	7q32	Epoxy hydrolytic activity
Hs. 450230	<i>IGFBP3</i>	-36. 12	7p13-p12	Cell growth regulation
Hs. 155223	<i>STC2</i>	-22. 15	5q35. 2	Signal transduction
Hs. 83354	<i>LOXL2</i>	-17. 72	8p21. 3-p21. 2	Electron transportation
Hs. 432638	<i>SOX11</i>	-22. 04	2p25	Transcription regulation
Hs. 528308	<i>HRASLS3</i>	-17. 41	11q13. 1	Unknown
Hs. 40499	<i>DKK1</i>	-12. 33	10q11. 2	Signal transduction
Hs. 181768	<i>MYOD1</i>	-22. 73	11p15. 4	Transcription regulation
Hs. 458485	<i>GIP2</i>	-12. 83	1p36. 33	Immunity
Hs. 436042	<i>CXCL12</i>	-17. 51	10q11. 1	Balance of the blood calcium
Hs. 2820	<i>OXR</i>	-12. 97	3p25	Muscle contracture
Hs. 211610	<i>CUGBP2</i>	-12. 45	10p13	RNA binding
Hs. 8752	<i>TMEM4</i>	-9. 03	12q15	Unknown
Hs. 47166	<i>HTO21</i>	-11. 94	3p21. 1	Unknown
Hs. 111779	<i>SPARC</i>	-14. 17	5q31. 3-q32	Calcium binding
Hs. 68877	<i>CYBA</i>	-11. 06	16q24	Electron transportation
Hs. 79428	<i>BNIP3</i>	-11. 24	10q26. 3	Apoptosis
Hs. 118127	<i>ACTC</i>	-11. 069	15q11-q14	Muscle contracture

表 4 3 个上调基因在骨肉瘤组织标本中的 RT-PCR 验证

Tab.4 Confirmation of 3 up-regulated genes in osteosarcoma specimens by RT-PCR

Specimens	CT value of the genes / fold of the different expression			
	<i>β-actin</i>	<i>CD24</i>	<i>CLU</i>	<i>TPD52</i>
hFOB 1.19	20.8	27.9/1.0	25.9/1.0	30.6/1.0
No. 1	21.0	24.5/12.5	24.2/3.6	27.9/7.3
No. 2	20.2	24.1/9.0	25.5/0.8	29.2/1.6
No. 3	21.0	25.1/8.5	25.1/2.1	27.3/9.9
No. 4	23.4	21.3/610.8	22.6/602.2	26.4/113.8
No. 5	22.8	28.2/3.1	25.4/5.4	28.3/19.1
No. 6	26.9	29.8/18.8	28.3/13.2	27.8/457.6
No. 7	23.7	26.7/17.0	7.0/3.4	28.0/42.2
No. 8	21.5	22.3/79.3	24.9/3.4	27.5/14.4
No. 9	21.1	26.4/3.5	21.3/30.2	29.7/2.2

### 3 讨论

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤。在全部骨肿瘤中,骨肉瘤约占原发性肿瘤的 17%,占恶性骨肿瘤的 42%。其显著临床特点是:(1)主要患者群体为青少年;(2)几乎全为高度恶性,预后差;(3)易早期转移,肺为最常见的转移靶器官。虽然骨肉瘤细胞与成骨细胞性质完全不同,但骨肉瘤细胞与成骨细胞有很多相似之处,例如都能分泌碱性磷酸酶(AKP),都具有 BMP、雌激素等一些共同的受体表达并与相应配体结合产生生物学效应等等。事实上,由于成骨细胞培养的难度性,很多涉及到它的研究都是以骨肉瘤细胞这种成骨细胞系(osteoblast-like cell line)作为研究对象的<sup>[7-10]</sup>。骨肉瘤的以上特点都说明其发病与成骨生理密切相关。研究这种关系对于揭示骨肉瘤的发病机制有着重大意义。

表 5 7 个下调基因在骨肉瘤组织标本中的 RT-PCR 验证

Tab.5 Confirmation of the 7 down-regulated genes in osteosarcoma specimens by RT-PCR

Specimens	CT value of the genes / fold of the different expression							
	<i>β-actin</i>	<i>PRG1</i>	<i>MEST</i>	<i>LOXL2</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>BNIP3</i>	<i>SPARC</i>	<i>OXR</i>
hFOB 1.19	20.8	23.9/1.0	23.3/1.0	24.0/1.0	23.3/1.0	21.7/1.0	22.0/1.0	24.7/1.00
No. 1	21.0	24.7/1.4	26.9/10.4	28.3/17.2	27.3/14.2	24.9/7.7	21.6/3.9	29.7/28.6
No. 2	20.2	25.8/5.9	26.0/9.60	27.7/20.5	25.1/5.5	26.9/56.4	23.4/4.2	28.4/20.4
No. 3	21.0	26.2/4.2	25.3/3.6	26.0/3.3	23.9/1.3	24.9/3.3	23.5/4.7	27.6/6.2
No. 4	23.4	27.6/2.0	29.0/8.4	27.7/2.0	27.8/3.7	27.6/9.7	24.3/1.7	26.3/1.5
No. 5	22.8	27.6/3.3	29.0/12.7	26.1/1.1	25.5/1.1	25.6/3.6	24.8/1.8	30.7/16.9
No. 6	26.9	25.3/0.03	31.1/3.2	33.4/9.5	27.3/2.2	30.2/5.2	21.6/1.2	32.3/2.9
No. 7	23.7	32.7/59.5	31.3/35.3	29.5/6.0	28.4/4.7	26.1/2.8	22.5/1.1	31.4/14.5
No. 8	21.5	30.6/63.0	28.3/18.9	26.3/4.8	26.6/6.0	25.4/7.3	22.4/2.3	27.6/4.5
No. 9	21.1	26.4/4.6	32.5/4.6	26.5/4.4	31.9/317.4	25.3/9.3	21.6/2.1	27.3/4.9

大量研究表明,骨肉瘤这种恶性程度极高的骨肿瘤在分子和细胞遗传学上具有一些较普遍的、显著的改变<sup>[1]</sup>。但时至今日,骨肉瘤发病的基因机制仍然知之甚少。本研究使用骨肉瘤细胞株作为模型,通过基因芯片技术,在基因组水平上筛查到骨肉瘤细胞株与正常成骨细胞株之间显著差异表达的基因有 200 条(分别含上调和下调基因 58 和 142 条)。而后,从中挑选了 10 条显著差异表达基因,在 9 例临床切除并经病理证实的骨肉瘤组织标本中使用嵌

合荧光实时 RT-PCR 方法定量验证。验证结果证实两者的表达差异十分相似。该研究结果在国内外尚未见报道。

与对照成骨细胞株相比,骨肉瘤细胞株共同差异表达的 58 个上调基因中包括了一些与能量、物质代谢密切相关的基因,如 *CYC1*、*NNT*、*CYP51A1*、*MAN1A1*、*SQLE*,这很显然与肿瘤细胞的高代谢、高分化状态有关;还包括了一些与肿瘤恶性转移、侵袭相关的基因,如 *MMP-2*、*TPBG* 等;而另外一些显著

上调的肿瘤相关基因从未在骨肉瘤中报道过。(1) *TPD52*:该基因业已被证实在乳腺癌、前列腺癌、恶性淋巴瘤、白血病等多种肿瘤组织中高表达<sup>[12-13]</sup>。一些学者更指出 *TPD52* 是候选癌基因。在本研究中,3个骨肉瘤细胞株中,*TPD52* 的表达水平为对照的 19.73 倍。(2) 蛋白质延长因子基因 *eEF1A2*:该基因与它的同类基因 *eEF1A1* 一起被列为癌基因<sup>[14]</sup>,在原发性卵巢癌的致癌作用业已证实<sup>[15]</sup>。然而在上皮来源以外的恶性肿瘤中的致癌作用从未被报道过。本实验中 3 个骨肉瘤细胞株的 *eEF1A2* 的表达水比对照组提高了 3.57 倍。(3) *CD24*:业已被证实在多种肿瘤组织中高表达,但在间叶来源的骨肉瘤中还未见报道。然而在本研究的两个骨肉瘤细胞株 MG-63 和 Saos-2 中显著高表达,平均达对照的 82.38 倍。(4) 其他肿瘤相关基因:如与细胞衰老密切相关的 *CLU*、与核-胞浆转运相关的 *IPO4*、与细胞凋亡控制相关的 *TNFRSF21* 等近来证明与肿瘤发病密切相关的基因<sup>[18-20]</sup> 在本实验中均显著高表达。

在显著共同差异表达的 142 个下调基因中,包括了一些早已在多种肿瘤中被证实了的抑癌基因,如 *P53*、*P16*、*HRASLS3*、*DAB2* 等,还包括一些与肿瘤恶性进展、侵袭、转移密切相关的基因。如(1) *MEST*:这个印记基因(imprinted gene)的频繁缺失业已在乳腺癌、结肠癌、肺腺癌中证实与恶性进展有关<sup>[20]</sup>。本研究中 *MEST* 的表达均显著下调,这提示 *MEST* 有可能与骨肉瘤的发病相关。(2) *LICAM*:该基因编码细胞间黏附分子,骨肉瘤细胞 *LICAM* 表达明显下调可能与其细胞局部脱落、转移有关。

在显著下调基因中,有相当数量的基因具有促进、介导凋亡的作用。如(1) *BNIP3*:在胰腺癌细胞中,*BNIP3* 的甲基化修饰导致细胞凋亡受抑以致产生肿瘤细胞明显增殖<sup>[21]</sup>。(2) *IGFBP3*:通常认为 *IGFBP3* 介导转化生长因子- $\beta$  和 *P53* 诱导的细胞凋亡。本研究中该基因平均下调达 36.12 倍。(3) 其他与凋亡信号转导有关的基因:如 *NALP1*、*PRG1*、*ARHGDI3* 等均显示明显表达下调,说明骨肉瘤的发病与细胞凋亡过程在多个环节受抑有密切关系。

任何肿瘤的发生都是一个由多基因参与的多步骤、分阶段的复杂过程。在肿瘤发展的不同阶段,肿瘤细胞发生阶段特异性的基因水平的分子事件;肿瘤发病机制即包含了肿瘤发生、发展整个过程的分子改变。本研究采用了基因芯片大规模筛查方法,在基因组水平上筛查发现了与骨肉瘤发病密切相关的众多包括癌基因、抑癌基因在内的肿瘤发病相关

基因,这些基因的发现为进一步深入阐明骨肉瘤发病的基因机制奠定了重要的基础。

## [参 考 文 献]

- [1] Sandberg A, Bridge J. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 145(1): 1-30.
- [2] Wolf M, El-Rifai W, Tarkanan M, et al. Novel findings in gene expression detected in human osteosarcoma by cDNA microarray [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000, 123(2): 128-132.
- [3] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein six-1 as key metastatic regulators[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2): 175-181.
- [4] Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2): 182-186.
- [5] Rubin M, Varambally S, Beroukhim R, et al. Overexpression, amplification, and androgen regulation of *TPD52* in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3814-3822.
- [6] Mintz MB, Sowers R, Brown KM, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 1748-1754.
- [7] Prouillet C, Maziere J, Mazière C, et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(7): 1307-1313.
- [8] Kuroda S, Takeda S, Nakamura M, et al. Effects of six particulate metals on osteoblast-like MG-63 and HOS cells *in vitro*[J]. *Dent Mater J*, 2003, 22(4): 507-520.
- [9] Steddon S, McIntyre C, Schroeder NJ. Impaired release of interleukin-6 from human osteoblastic cells in the uraemic milieu[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(12): 3078-3083.
- [10] Sims AH, Finnon P, Miller CJ, et al. *TPD52* and *NFKB1* gene expression levels correlate with G2 chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of women with and at risk of hereditary breast cancer [J]. *Int J Radiat Biol*, 2007, 83(6): 409-420.
- [11] Tomlinson VA, Newbery HJ, Bergmann JH, et al. Expression of *eEF1A2* is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: overexpression of the gene is not dependent on modifications at the *EEF1A2* locus[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(10): 1613-1620.
- [12] Li R, Wang H, Bekele BN, Yin Z, et al. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach[J]. *Oncogene*, 2006, 25(18): 2628-2635.
- [13] Bertucci F, Cervera N, Birnbaum D, et al. A gene signature in breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(18): 1887-1888.
- [14] Karahan N, Guney M, Oral B, et al. *CD24* expression is a poor prognostic marker in endometrial carcinoma[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2006, 27(5): 500-504.
- [15] Winkler A, Zigeuner R, Rehak P, et al. *CD24* expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract correlates with

- tumour progression[ J ]. *Virchows Arch*, 2007, 450( 1 ): 59-64.
- [ 16 ] Sun B, Zhang S, Zhang D, *et al*. Clusterin is associated with spontaneous breast cancer in TA2 mice[ J ]. *FEBS Lett*, 2007, 581( 17 ): 3277-3282.
- [ 17 ] Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, *et al*. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer[ J ]. *J Clin Oncol*, 2007, 25( 7 ): 852-861.
- [ 18 ] Schmidt CS, Zhao J, Chain J, *et al*. Resistance to myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by death receptor 6-deficient mice[ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 4 ): 2286-2292.
- [ 19 ] Sukov WR, Chevillie JC, Lager DJ, *et al*. Malignant mixed epithelial and stromal tumor of the kidney with rhabdoid features: report of a case including immunohistochemical, molecular genetic studies and comparison to morphologically similar renal tumors, 2007, 38( 9 ): 1432-1437.
- [ 20 ] Hahn Y, Yang SK, Chung JH, *et al*. Structure and expression of the zebrafish *mest* gene, an ortholog of mammalian imprinted[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1731( 2 ): 125-132.
- [ 21 ] Mahon PC, Baril P, Bhakta V, *et al*. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer[ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 14 ): 6786-6795.
- [ 22 ] Belizon A, Balik E, Kirman I, *et al*. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits colitis-induced carcinogenesis[ J ]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50( 9 ): 1377-1383.
- [ 收稿日期 ] 2007 - 07 - 17 [ 修回日期 ] 2007 - 08 - 16
- [ 本文编辑 ] 王莹

## · 科技动态 ·

### ERK 结合 GSK-3 $\beta$ 使其失活导致 $\beta$ -catenin 表达的上调

$\beta$ -catenin 是一种癌基因,在人类诸多肿瘤中高表达。肝细胞癌(HCC)是人类最多发的恶性肿瘤之一,慢性乙型肝炎病毒(HBV)携带者 HCC 发病的概率比非携带者高出 100 倍以上。本文所报道的就是有关 HBV-X 蛋白(HBX)如何导致  $\beta$ -catenin 上调的机制。研究发现,被 HBX 激活的 ERK 通过与 GSK-3 $\beta$  的一个结合序列结合并磷酸化 GSK-3 $\beta$  的 43 苏氨酸位点,从而启动 GSK-3 $\beta$  使其 SER9 被 p90RSK 磷酸化,最终导致 GSK-3 $\beta$  的失活以及  $\beta$ -catenin 的上调。

HBV 感染是导致肝细胞癌的一个主要原因。该病毒基因组由一个局部双链环状 DNA 和 4 个交错基因(S/preS,C/preC,P,X)组成,其 X 基因是肝细胞癌中发现最频繁的病毒结合序列,编码蛋白为 HBX 可以抑制 p53 的功能,并能反式激活一些转录因子,包括 AP-1、NF-K $\beta$ 、CREB 以及 TBP。在转染了 HBX 基因的细胞株和 X 基因转基因小鼠模型上都能观察到恶性肿瘤转移的现象,因此 HBX 被认为在 HBV 感染的肝细胞肿瘤转移中发挥了重要作用。

$\beta$ -catenin 是 Wnt 信号通路的一个关键的效应分子。目前研究表明,Axin 和 APC 基因的作用就像是一个支架,促进  $\beta$ -catenin 被 GSK-3 $\beta$  磷酸化,磷酸化的  $\beta$ -catenin 被泛素-蛋白酶系统降解。无论 Axin 或 APC 结合位点,还是  $\beta$ -catenin GSK-3 $\beta$  磷酸化位点的突变,均可导致 GSK-3 $\beta$  无法磷酸化  $\beta$ -catenin。尽管 Wnt 调节 GSK-3 $\beta$  的分子机制还无法解释清楚,但发现 Wnt 活化的 Dsh 可以导致 GSK-3 $\beta$  从 Axin 解离。另外发现,Wnt 的刺激导致 GSK-3 $\beta$  激酶活性的减弱。由于上述两个机制阻止了  $\beta$ -catenin 被 GSK-3 $\beta$  的磷酸化,从而导致了  $\beta$ -catenin 的稳态。除了 Wnt 依赖的  $\beta$ -catenin 的稳态,还有许多生长因子可以通过磷酸化 GSK-3 $\beta$  使其失活,从而稳定  $\beta$ -catenin。一旦  $\beta$ -catenin 在胞质中蓄积到一定程度,它就会转入核内与 Tcf/Lef 结合并作为共活化物刺激 c-myc 和 cyclin D1 等目的基因的转录以便细胞增殖。该项研究确定了一种稳定  $\beta$ -catenin 的分子机制,即 ERK 启动 GSK-3 $\beta$  使其失活,为 HBX 和生长因子诱导  $\beta$ -catenin 提供了一条重要的信号传导通路。

免疫组化研究发现无论是在胞质还是胞核, $\beta$ -catenin 的蓄积都与 HBX 的表达密切相关。转染了 X 基因的 HEPG2 和 HEP3B 细胞较它们的亲代细胞株显著高表达  $\beta$ -catenin 及其下游基因 c-myc 和 cyclinD1。此外,通过免疫荧光染色法亦发现在稳定型 HBX 转染细胞中  $\beta$ -catenin 向核内的易位也有所增加。研究证实,HBX 介导的 GSK-3 $\beta$  的失活需要 ERK/p90RSK 信号通路的参与。通过分别阻断 AKT/PKC 和 p90RSK 的激酶活性,研究人员最终证实 ERK/p90RSK 信号通路中的 p90RSK 通过磷酸化 GSK-3 $\beta$  的 9 位丝氨酸残基导致其失活。ERK 结合在 GSK-3 $\beta$  的 DEF 结构域并磷酸化 GSK-3 $\beta$  的 43 号苏氨酸残基,仿佛支架一般桥连着 GSK-3 $\beta$  和 p90RSK,为后两者的磷酸化作用创造了条件。这一步骤对于随后发生的 GSK-3 $\beta$  的失活及  $\beta$ -catenin 的上调具有重要意义。作者还发现乳腺癌细胞中的 HER2 和 IGF-1 可以通过相同机制促使  $\beta$ -catenin 表达及其转录活性的上调。此外,胃癌和肾细胞癌的实体中发现了  $\beta$ -catenin 的蓄积以及相同的 P-ERK 与 P-GSK-3 $\beta$  间的功能关系。综上所述,本研究认为 ERK/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 之间的这种关系可能是存在于人类多种肿瘤中的一种普遍现象。

[ 陈永坚 摘译,安华章 审阅. Ding Q, Xia W, Liu JC, *et al*. *Mol Cell*, 2005, 19( 2 ): 159 - 170 ]