

As₂O₃ 处理前后 K562 细胞基因表达变化的基因芯片检测

冯春琼¹、袁文丽¹、袁凌¹、袁艳斌¹、袁嵘¹、袁清华¹、袁秋野¹、袁骥¹、袁文岭² 第一军医大学分子生物学研究所 广东 广州 510515 日 广州军区总医院分子肿瘤学研究所 广东 广州 510010 冤

摘要 目的 应用基因芯片研究三氧化二砷 As₂O₃ 处理前后 K562 细胞基因表达的变化遥方法 提取 As₂O₃ 处理前后 K562 细胞的总 RNA 纯化后 mRNA 后再反转录为 cDNA 遥 cDNA 经限制性内切酶 Sau3AI 切割后 DNA 片段分别用 Cy3 和 Cy5 标记 袁 自制的包含 348 个基因片段的胎盘库芯片杂交遥结果 杂交结果经扫描和软件分析 袁 发现了 11 个差异表达的基因片段 袁 其中有 3 个基因片段与细胞凋亡密切相关遥结论 我们构建的胎盘库基因芯片可以成功地用于研究药物作用前后基因表达的变化遥

关键词 基因芯片 三氧化二砷 As₂O₃ K562 细胞 凋亡

中图分类号 院 785 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊 002 冤 9-0772-04

Analysis with DNA chips of the changes of gene expressions in K562 cells in response to As₂O₃ treatment

FENG Chun-qiong¹, MA Wen-li¹, LI Ling¹, SONG Yan-bin¹, SHI Rong¹, WU Qing-hua¹, GUO Qiu-ye¹, ZHU Ji¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 50010, China

Abstract: Objective To investigate differential gene expression in apoptotic cells induced by As₂O₃, and identify novel apoptosis-related genes. Method Apoptosis of K562 cells cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% calf serum was induced by As₂O₃. Total RNA of the apoptotic and normal cells were then extracted, purified and subjected to reverse transcription into first-strand cDNA, labeled with Cy3/Cy5. Placenta DNA microarrays containing 348 DNA fragments were used to analyze the changes in gene expressions in the cells treated with As₂O₃. Result Eleven differentially expressed genes were identified in the apoptotic cells in comparison with the normal cells, 3 of which were associated with apoptosis, while the others were related to cell growth and proliferation. Conclusion The placenta DNA microarrays we constructed may well apply to the analysis of the differentially expressed genes.

Key words: DNA chips; arsenic trioxide; K562 cells; apoptosis

三氧化二砷(As₂O₃)是近来发现的临床治疗白血病的疗效较确切的药物之一遥对 As₂O₃ 的作用机制人们进行了广泛研究 袁 发现它在体外能抑制多种肿瘤细胞生长 袁 诱导肿瘤细胞凋亡遥细胞凋亡是一个由多基因参与的复杂的分子事件 袁 涉及许多信号转导通路如 H₂O₂ 信号通路 尧 维甲酸受体信号通路和许多凋亡相关基因如促凋亡基因 bax 家族 尧 凋亡抑制基因 bcl-2 家族 尧 细胞色素 C 和 caspase 酶家族基因等遥基因芯片技术可以平行地同时分析大规模的基因表达信息 袁 已成为分子生物学研究的有力工具之一遥本实验我们通过应用本研究所自制的包含 348 个基因片段的胎盘库芯片 袁 袁 与用 As₂O₃ 处理前后的 K562 细胞经反转录后得到的 cDNA 片段杂交 袁 袁 研究 As₂O₃ 作

用前后细胞基因表达的改变遥

1 材料与方法

1.1 材料

精制小牛血清和 RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司 袁 As₂O₃ 购自 Sigma 公司 袁 用 120mmol/L 的 NaOH 溶液配成 1 mmol/L 的贮备液 袁 益贮存遥总 RNA 提取试剂 Trizol 及 PCR 产物纯化试剂盒购自上海博彩生物工程公司遥 mRNA 纯化试剂盒购自 Pharmacia 公司遥逆转录酶 SuperScript 域购自 Gibco 公司遥 coli 聚合酶 尧 Nase 尧 Hae 尧 Taq 酶及其他常用酶类购自 TaKaRa 公司遥接头 渊IP 冤 渊'-pGATCmCACACCAGCCAAACCCA 日 (SIR) 院'-GGTTTGCTGTGTG 遥 PCR 通用引物 院 TTTGGCTGGTGTG-GATC 袁 均由上海生物工程公司合成遥预杂交溶液 院 25% 甲酰胺 袁 院 1% SDS 日 清洗溶液 院 院 1% SDS 袁 院 0.1% SDS 日 溶液 院 院 1% SDS 日 溶液 院 院 1% SSC 遥 Hybrid HunterTM 胎盘库购自美国 Invitrogen 公

收稿日期 院 002-03-08

基金项目 院 广州市重大科技攻关项目 渊 9202201 冤 院 广东省自然科学基金 渊 84092 冤

作者简介 院 冯春琼 渊 972 冤 冤女 袁 袁 云南曲靖人 袁 袁 995 年毕业于华西医科大学 袁 袁 助教 遥 电话 20-61640114-89097 袁 袁 mail:feng1215@fimmu.com

司袁经本研究所自行扩增制备胎盘库片段遥 Pixsys5500 芯片打印仪购自 Cartesian 公司袁canArrayLite 芯片扫描仪及其分析软件 Quantarray 购自 GsiLumonics 公司袁玻片及芯片杂交盒购自 Corning 公司遥

1.2 芯片探针的收集和制备

胎盘库经稀释涂板挑克隆鉴定后袁日性克隆扩大培养袁提取质粒并编号索引保存遥PCR 扩增质粒片段制备探针袁共收集了 348 个不同的胎盘文库探针片段袁大小在 300~800bp 之间袁调整浓度为 500ng/滋遥以看家基因甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶渊APDH)为阳性对照袁人类免疫缺陷病毒渊HIV)基因片段为阴性对照袁0% DMSO 为空白对照袁在 Corning 的玻片上袁每个探针重复打印 3 个点袁形成 30伊6 的点阵袁共 1080 个点遥打印后的玻片经 UV 交联渊能量为 90mJ)袁0 益干烤 2 h遥避光放置备用遥

1.3 细胞处理

K562 细胞在含 10%精制小牛血清袁青霉素袁链霉素各 100U/ml 的 RPMI1640 培养基中常规培养遥以 1伊0⁵/ml 的浓度接种袁在对数生长期加入 As₂O₃袁使其终浓度为 4 滋mol/L袁对照组加入相同摩尔数的 NaOH遥常规培养 4 h 后袁离心收获细胞袁BS 洗 2 次遥按照 Trizol 试剂盒的方法提取细胞的总 RNA袁用 Pharmacia 公司 mRNA 纯化试剂盒纯化后袁再反转录为 cDNA遥

1.4 样品制备

cDNA 用 Sau3AI 酶切后接上接头袁之后用 PCR 通用引物扩增遥CR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后取出 500ng袁加入 Cy3/Cy5 标记的引物渊00 滋mol/L)遥2 滋渊NaOH 作用的对照组用 Cy5 标记袁As₂O₃ 作用的处理组用 Cy3 标记袁同样条件再行 PCR 扩增和纯化袁将 PCR 产物终浓度调至 200ng/滋遥

1.5 杂交

标记后的样品 95 益变性后加到经预杂交的芯片阵列表面袁轻轻覆上盖玻片袁放入杂交盒内袁2 益杂交 18 h遥

1.6 检测与分析

杂交结束后袁分别用溶液玉尧清洗芯片袁空气干燥遥用 ScanArrayLite 芯片扫描仪扫描芯片袁分析 Cy5 和 Cy3 两种荧光信号的强度和比值袁以下 2 个条件作为判定基因差异表达的标准院1)Cy5 与 Cy3 信号之比 >2.0 或 <0.5院2)Cy5 和 Cy3 之一的信号值必须 >500.0遥

2 结果

2.1 细胞的总 RNA 电泳图

从电泳图渊图 1)袁可以看到明显的 28 S 尧 8 S 尧 5 S 的条带袁并且 28 S 的条带明显亮于 18 S 带袁总 RNA 质量很好遥

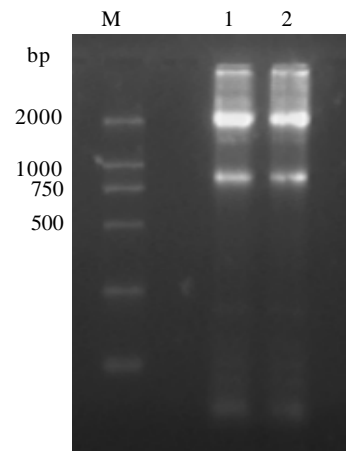


图 1 NaOH 和 As₂O₃ 处理后的 K562 细胞总 RNA 电泳图
Fig.1 Gel electrophoresis of the total RNA extracted from cells treated with NaOH and As₂O₃
M:Marker(DL2000);Lane1:NaOH-treated;Lane2:As₂O₃-treated

2.2 cDNA 电泳图

2 组细胞的 cDNA 行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳袁从电泳图渊图 2)袁可看到明显的拖尾(smear)袁并且大部分集中于 2000bp 以上袁说明 cDNA 的完整性较好遥

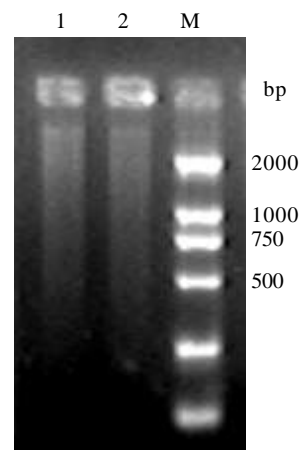


图 2 NaOH 和 As₂O₃ 处理后的 K562 细胞 cDNA 电泳图
Fig.2 Integrity of cDNAs on gel electrophoresis after treatment with NaOH and As₂O₃
M:Marker(DL2000);Lane1:As₂O₃-treated;Lane2:NaOH-treated

2.3 芯片杂交结果和分析

NaOH 和 As₂O₃ 处理后的样品分别用 Cy5 和 Cy3 荧光素标记袁杂交后经扫描仪扫描袁结果如图 3 所示遥图中第 30 行第 1~12 列是 GAPDH 阳性对照袁13~24 列是 HIV 阴性对照袁25~36 列是 DMSO 空白对照遥再将 Cy5 和 Cy3 的扫描图像完全重叠袁得到的杂交图中袁红色点表示低表达袁绿色点表示高表达袁

色点表示表达水平无改变

上图经软件分析后得到芯片杂交的散点图... 每个点的 Y 轴表示 Cy3 的杂交信号的相对强度... X 轴表示 Cy5 杂交信号的相对强度... 虚线所示的点 Cy5/Cy3 的比率为 1... 落在 2 条虚线以外的点即是 Cy3/Cy5 的比率大于 2 或小于 0.5 的点

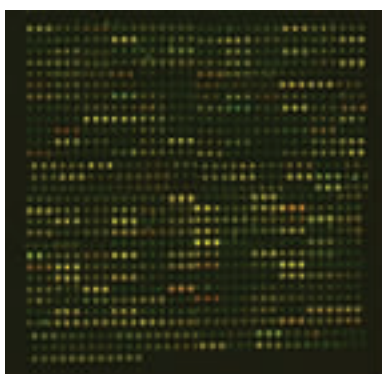


图 3 As₂O₃ 处理前后细胞的杂交图

Fig.3 Hybridization of K562 cells before and after As₂O₃ treatment

The greenspots represent the up-regulated genes, the red spots the down-regulated genes, and yellow spots indicate equal expression of two groups

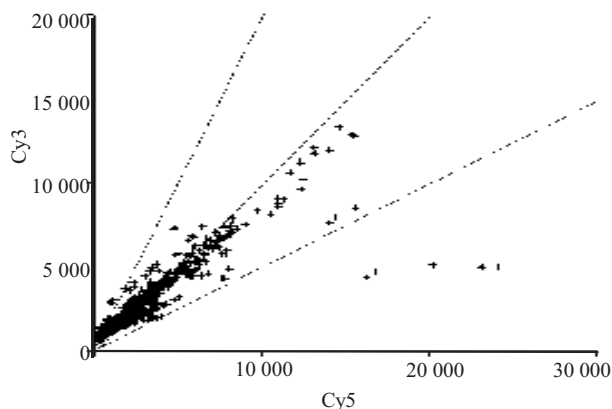


图 4 杂交信号的散点图

Fig.4 Plots of the hybridization signals on the chip

The spots located between the coordinate axis and the dotted lines are differentially expressed genes. Obviously the genes expressed significantly differently are down-regulated genes

对杂交结果的分析发现 K562 细胞经 As₂O₃ 作用后有 3 个差异表达基因... H19 基因... 细胞角蛋白 8 基因... K8 基因... 反式高尔基体网状结构的糖蛋白... GN 基因... 与细胞的凋亡密切相关... 还有一些差异表达基因... 乳酸脱氢酶 A 和 B 基因... 丙酮酸脱氢酶基因... NA 解旋酶基因... 真核细胞转录起始因子 3 基因... 等与细胞的生长代谢和增殖有关

3 讨论

实验中应用了自制的包含 348 个基因片段的胎盘库芯片... 芯片打印前再从质粒中扩增出所需片段... 并调整浓度为 500ng/... 用于芯片打印... 胎盘是人类胚胎期个体发育必需的重要器官... 它产生多种调节肽生长因子和细胞因子等... 通过复杂的调控作用... 保证胎盘和胎儿正常的生长发育... 因此对于胎盘文库而言... 它包含了较完全的人类基因信息... 可以避免一些特定组织器官文库某些相关基因表达丰富... 而有些基因表达很低或不表达的现象... 因此... 应用胎盘库芯片与 As₂O₃ 处理前后的 K562 细胞 cDNA 杂交... 能更多... 更全面地发现药物处理前后细胞基因表达的变化

在样品标记上没有采用 Schena 等... 的逆转录标记方法... 而是应用了本实验室马文丽... 郑文岭等创建的 RD-PCR 技术... 通过在 cDNA 酶切片段的两端接上通用接头... 依据接头序列设计引物... 再用此引物扩增 cDNA 片段... 这样就可以通过一对引物... 微量 cDNA 得到大量的片段... 将这些片段用 Cy3/Cy5 标记... 就可以非常方便地得到大量的标记了的探针片段... 并大大减少 mRNA 的用量... 增加杂交的信号强度

虽然我们在样品的制备... 标记中采用了 PCR 技术... 可能会使 2 组不同处理样品间的差异基因因 PCR 扩增而被掩盖... 一些低丰度表达的基因可能因此无法检测... 降低了此方法的灵敏度... 但由于我们应用的是 cDNA 的酶切片段... 每一个基因都被切成大小约为 256bp 的片段... 所以每一个基因都有几个被扩增的机会... 这些酶切片段... 也许有的易扩增... 一些... 的难扩增... 一些... 但对整个 cDNA 而言... 要所提取细胞 mRNA 降解少... 反转录得到的 cDNA 完整性较好... 每一个基因应该都有能代表该基因的片段存在... 各个片段间扩增的差异... 也能被掩盖... 相比之下... 目前普遍采用的随机引物介导的 cDNA 单链合成标记 Cy3/Cy5 的方法... 造成的随机性偏差更大... 而且杂交信号较弱... 资料另文发表... 而 Schena 等... 创建的从 mRNA 开始经逆转录标记的方法... 所需的 mRNA 用量较大... 约 2~5... 资料另文发表... 我们在实验中发现了 11 个差异表达的基因片段... 发现它们都与细胞的生长增殖... 肿瘤的形成和抑制有关... 证明了 RD-PCR 方法标记样品的可行性和有效性

芯片杂交检测后发现 K562 细胞经 As₂O₃ 处理后 H19 基因表达下调... H19 基因是一胚胎期特异基因... 与胚胎发育和肿瘤发生密切相关... 一般出生后 H19

基因不表达或表达很低但在一些情况下肿瘤细胞中也可以检出高水平的 H19 mRNA 且在膀胱癌和乳腺癌中并且 H19 基因的高表达与肿瘤的发生和侵袭密切相关我们在实验中发现 K562 细胞经 As_2O_3 作用后细胞生长明显受抑并诱导 K562 细胞凋亡从而推测 H19 基因表达下调是 K562 细胞经 As_2O_3 作用后细胞增殖及恶性程度降低的结果

表达上调的基因有人细胞角蛋白 8 基因 cytokeratin8, CK8 反式高尔基体网状结构的糖蛋白 trans-Golgi network glycoprotein, TGN 基因等细胞角蛋白目前共发现 19 种除 CK19 外其余角蛋白都配对出现在不同类型的上皮细胞中如 CK8+CK18 出现在简单上皮中是单层上皮的标志角蛋白 CK 基因表达异常会干扰上皮细胞正常分化过程成对表达的脱节可能是细胞恶性转变的早期信号在 von Hippel-Lindau 疾病导致的肾细胞单纯性囊肿非典型性囊肿和实体瘤细胞中表达细胞角蛋白 CK8 及 CK19 而细胞的凋亡标志成分如片段化 DNA 和 bcl-2 等则表达很低我们在实验中发现 CK8 表达而未发现 CK18 的表达推测这是恶性肿瘤细胞的一个特征而 CK8 的表达上调推测是细胞凋亡时的基因变化之一

反式高尔基体网状结构是高尔基体对分泌蛋白尧膜嵌蛋白尧溶酶体蛋白等进行分捡运输的主要场所冷休克诱导小鼠腹腔巨嗜细胞凋亡的研究显示细胞凋亡时参与细胞物质转运和交换的细胞器如溶酶体尧高尔基体等的数量增多是细胞凋亡的特征性变化我们实验中也观察到 As_2O_3 诱导 K562 细胞凋亡后反式高尔基体网状结构的糖蛋白表达增高证实了高尔基体基因的表达异常与 As_2O_3 诱导的细胞凋亡有关

我们在实验中发现了 11 个差异表达的基因其中有 3 个基因与细胞凋亡密切相关与既往研究差异表达的方法相比 D-PCR differential display-PCR 技术假阳性较高差减杂交技术差异基因的富集效率不高而 cDNA 的代表性差异分析 DNA-RDA 技术操作繁琐费时费力相比之下我们仅仅经过简单的几次杂交实验就发现了 11 个差异表达基因显然基因芯片技术用于差异基因的筛选操作更简单尧更快尧效率更高而且基因芯片包含的探针片段越多杂交后得到的高质量的信息也就越多基因芯片检测和筛选差异基因的优势就更明显这一工作我们正在进行中

致谢院胎盘库探针收集工作是分子生物学实验室全体同仁共同努力完成的衷心感谢他们为此付出了辛勤的劳动同时也感谢分子生物学实验室刘智尧刘丽尧亦尧教尧伯尧良尧张尧璇尧等同志对本实验的大力协助

参考文献

- Charles P, Caryn NK, Guo FF, et al. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-X Blood, 2000, 95(3):1014-22.
- Roboz GJ, Dias S, Lam G, et al. Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an anti-leukemic effect via inhibition of angiogenesis Blood, 2000, 96(4):1525-30.
- Anthony RV, Limesand SW, Jeckel KM. Transcriptional regulation in the placenta during normal and compromised fetal growth Biochem Soc Trans, 2001, 29(2):42-8.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray Science, 1995, 270(20):467-70.
- 马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示 D-PCR 一种新的差异显示技术 见: 孙志贤, 主编. 全军生物化学与分子生物学研究进展 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 99-113.
- Ma WL, Zheng WL, James FB, et al. Restriction display: a kind of new technology of differential display In: Sun ZX, ed. Progress in biochemistry and molecular biology of farmy Beijing: Military Medical Science Press, 1998. 99-113.
- Wilkin F, Paquette J, Ledru E, et al. H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels Eur J Biochem, 2000, 267(13):4020-7.
- Banet G, Bibi O, Matouk I, et al. Characterization of human and mH19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels use H19 regulatory sequences Mol Biol Rep, 2000, 27(3):157-65.
- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, et al. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression Am J Pathol, 1998, 153(5):1597-607.
- Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ, et al. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate Urol, 1990, 143(1):167-71.
- Paraff F, Chauveau D, Chretien Y, et al. Renal lesions in von Hippel-Lindau disease: immunohistochemical expression of nephron differentiation molecules, adhesion molecules and apoptosis proteins Histopathology, 2000, 36(5):457-65.
- 智尧汝, 尧东尧. 冷休克诱导小鼠腹腔巨嗜细胞凋亡的电镜观察 海南医学院学报, 1997, 3(2):49-52.
- Chen R, Qiao DF. Electron-microscopic observation of cold shock induced apoptosis of macrophagocytes in the abdominal cavity of mice Hainan Med Col, 1997, 3(2):49-52.