

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2005.05.12

• 基础研究 •

硫化镍转化人支气管上皮细胞 基因差异表达芯片的研究

宾晓农 吕嘉春 谭敏 纪卫东 陈家堃

【摘要】 背景与目的 近年研究发现硫化镍(NiS)可引起人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell, 16HBE)发生恶性转化及转化细胞致癌性,其机制可能与 NiS 引起基因突变、多种转录因子的异常表达有关。为此,本研究利用 NiS 恶性转化的体外培养细胞模型,用 cDNA 微阵列技术研究经 NiS 转化后的 16HBE 细胞基因的差异表达,从基因组水平探讨 NiS 所致细胞恶变的相关基因差异改变。方法 分别提取 16HBE 和经 NiS 单独处理发生转化的 NiS-16HBE 细胞的总 RNA,逆转录合成 cDNA 并以 Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP 荧光素分别标记制作探针。探针混合后与含 4000 个人类基因的芯片杂交。以 ScanArray 4000 扫描仪扫描芯片,以 GenPix Pro 3.0 软件分析荧光信号,然后对差异表达的基因进行生物学信息分析。结果 NiS-16HBE 细胞样本与 16HBE 细胞样本比较,呈现差异表达的基因有 151 个(3.78%),其中 81 个(53.64%)上调,70 个(46.36%)下调。结论 NiS 的转化作用与应激反应基因、免疫相关基因、DNA 合成和修复基因、代谢相关基因、原癌基因和抑癌基因等多类基因的异常表达有关。

【关键词】 硫化镍 人支气管上皮细胞 基因芯片

【中图分类号】 R135;R994.3

Study on gene expression pattern in 16HBE cells treated with NiS BIN Xiaonong*, LU Jiachun, TAN Min, JI Weidong, CHEN Jiakun. * Institute for Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510182, P. R. China

Corresponding author: BIN Xiaonong, E-mail: gzbxn@163.com

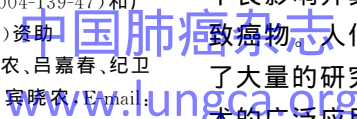
【Abstract】 Background and objective Recent researches have found that NiS can cause the malignant transforming activity and carcinogenicity on human bronchial epithelial cells (16HBE). Its molecular mechanism may be involved in mutation of genes and abnormal expression of transcription factors on 16HBE. And so, this study takes advantage of a model of 16HBE transformed by NiS and screens the differentially expressed genes between 16HBE cells and NiS treated 16HBE cells (NiS-16HBE) using cDNA microarray. **Methods** The total RNA was extracted from 16HBE cells and NiS-16HBE cells. The cDNA probes were prepared by labeling with Cy3-dCTP and Cy5-dCTP respectively through reverse transcription. The mixed probes were then hybridized to the cDNA microarray chips containing 4000 human genes. The chips were scanned by ScanArray 4000 laser scanner. The acquired fluorescent signals were analyzed by GenPix Pro 3.0 software. Bioinformation function of those differentially expressed genes was analysed. **Results** A total of 151 genes exhibited differential expression between 16HBE cells and NiS-16HBE cells. The expression of 70 genes (46.36%) was down-regulated and that of 81 genes (53.64%) was up-regulated. **Conclusion** The regulation of genes including stress response genes, immune related genes, DNA synthesis and repair genes, metabolism genes, pro-oncogenes and tumor suppressor genes may be involved in transforming activity of NiS.

【Key words】 NiS Human bronchial epithelial cell (16HBE) cDNA microarray

This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (to LU Jiachun and CHEN Jiakun) (No. 30200235, No. 30371196 and No. 39170651).

本研究受国家自然科学基金资助项目(30200235、30371196、39170651)、广东省自然科学基金(20011054)、广东省科学技术项目(2002B30104)、广东省社会发展领域科技计划项目(2004-139-47)和广东省医学科学技术研究基金项目(B2002058、B2001075)资助。
作者单位:510182 广州医学院化学致癌研究所(宾晓农、吕嘉春、纪卫东、陈家堃);广东省中医院病理科(谭敏)(通讯作者:宾晓农, E-mail: gzbxn@163.com)

金属毒物镍及其化合物广泛地存在于自然环境中,人类在生活和生产过程中过量接触会对机体产生不良影响并具有潜在致癌性,是国际公认的人类化学致癌物。人们曾对镍及其化合物的毒性及致癌机制作了大量的研究,取得了一定的成果。随着分子生物技术的广泛应用,在此方面的研究更加深入。近几年来



对金属毒物硫化镍(NiS)在分子毒理方面开展的一些研究工作发现,NiS可引起人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell,16HBE)发生恶性转化,其恶性转化细胞可致小鼠成瘤,机制可能与NiS引起基因突变、DNA高度甲基化、特异性抑制组蛋白乙酰化、改变多种转录因子的表达等有关;此外,NiS还可抑制DNA损伤修复而促进细胞癌变^[1]。由于NiS致癌的机制复杂^[2],所致恶性转化细胞在分子水平变化较多且显著,本研究利用NiS恶性转化的体外培养细胞模型,用基因表达谱芯片从基因组水平探讨NiS所致细胞恶变的相关基因变化,为阐述NiS致癌的分子机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 转化细胞模型构建 人支气管上皮16HBE细胞株来自美国加利福尼亚大学心血管研究所,NiS为Sigma公司产品。16HBE细胞以MEM培养基培养,至细胞处于对数生长期后,加入终浓度为0.5 μmol/L的NiS。NiS作用时间为24 h,每隔10天处理1次,共处理4次。细胞培养至第25代,经细胞形态学观察、ConA凝集实验、软琼脂集落形成率分析及裸鼠成瘤性实验,证实NiS诱导的细胞转化具有恶性转化的性质,以此为实验组(NiS-16HBE)。以同步培养的16HBE细胞培养至第25代的细胞为对照组(16HBE)。以实验组、对照组传至第25代细胞作为基因分析的样品来源。

1.2 表达谱芯片 芯片由上海联合基因科技(集团)有限公司制备,芯片型号H40S。该芯片包括离子通道和运输蛋白基因,细胞周期蛋白基因,细胞骨架和运动蛋白基因,DNA合成、修复蛋白基因,细胞受体、细胞信号和传递蛋白基因,发育相关基因,原癌基因和抑癌基因,细胞凋亡和应激反应蛋白基因,以及免疫相关基因共4000个靶基因。另外芯片上还设有作阳性对照的管家基因以及作阴性对照的水稻U2RNA基因、HCV外壳蛋白基因共56个及空白点样点40个,用以监控芯片杂交数据的可靠性。本研究选用2张芯片对细胞cDNA样本同时作平行分析。

1.3 RNA抽提及探针标记 用Trizol试剂(Invitrogen公司)按说明书方法分别抽提2组细胞样品的总RNA。RNA样本的OD₂₆₀/OD₂₈₀为2.0~2.1,总RNA 20℃电泳图谱有清晰的28S、18S条带,亮度比约为2:1,且70℃水浴保温1h后的电泳图谱无变化,说明RNA纯度合格,无降解。按芯片杂交试剂盒(上海联合基因公司产品)提供的方法,取60 μg总

RNA用于逆转录合成cDNA,逆转录cDNA链合成中掺入荧光标记dCTP标记制作cDNA探针。以Cy3-dCTP标记对照组(16HBE)cDNA,以Cy5-dCTP标记实验组(NiS-16HBE)cDNA。使用DNA纯化柱纯化DNA。

1.4 预杂交、杂交及洗片 预杂交液95℃变性2 min,将待预杂交的玻璃芯片95℃变性30 s后放入无水乙醇中30 s,晾干。已变性的预杂交液加到玻片上,42℃预杂交6 h。将探针在95℃水浴中变性2 min后迅速置于冰上。预杂交过的玻片于95℃水浴中变性30 s后浸入无水乙醇30 s。将探针加在芯片上,用盖玻片封片后置于密封舱,在杂交箱内42℃杂交16 h,去盖玻片后用60℃的0.5%的洗片试剂1、2%的洗片试剂2及5%的洗片试剂3逐次洗涤10 min,再用0.5%的洗涤液1冲洗玻片,晾干后扫描。

1.5 扫描与分析 用ScanArray 4000扫描仪扫描分析,观察杂交结果,采用40个管家基因作阳性对照基因(内参照),对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用GenPix Pro 3.0图像处理软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。先将所有数据以前景值与背景值相减,得出Cy3、Cy5标记的强度值,将Cy5小于200的强度值以200取代。根据总数为n的有效基因(selected=1,Cy3、Cy5值两者皆大于200或其一大于800,Ri=Cy5/Cy3在0.1~10间的Ri=Cy5/Cy3的自然对数值Ri'=ln(Ri),算出Ri'的平均值R',均一化系数ND=EXP(R')。将所有数据项的Cy3标记强度乘以均一化系数(ND),得出调整后的Cy3*。将所有Cy3*小于200的强度值以200取代。再计算所有基因调整后的Ratio值(Cy5/Cy3*),以Ratio值>2或<0.5为基因表达差异的判断标准(上海博星基因芯片公司筛选标准)。

2 结果

2.1 差异表达基因的筛选 本芯片上设有的作阳性对照的管家基因以及作阴性对照的水稻U2RNA基因、HCV外壳蛋白基因共56个及空白点样点40个,用以监控芯片杂交数据的可靠性。本研究选用的2张芯片杂交时,阴性对照的水稻U2RNA基因8个、HCV外壳蛋白基因8个及空白点样点40个的杂交信号均很低,证实本数据是可靠的。筛选出第1张芯片中Ratio>2或<0.5的数据项共有186个,第2张芯片共有167个,将这2张芯片中都出现差异表达的数据项筛出,共151项,占4000种人类基因的3.78%。这些数据所代表的基因在与两种探针杂交时表现出较

大的差异,上下调趋势一致,且有较好的代表性。以 2 张芯片中的相应基因的 Ratio 值计算每一基因的平均 Ratio 值,最小的为 0.105,最大的为 8.336。表达上调(平均 Ratio>2)的有 81 个基因(53.64%),表达下调

(平均 Ratio<0.5)的有 70 个基因(46.36%)。差异表达显著的基因列于表 1、2 及双色荧光标记叠加图(图 1)、杂交信号强度散点图(图 2)。

表 1 硫化镍转化人支气管上皮细胞 NiS-16HBE 表达显著增高的基因(平均 Ratio>2,共 81 条)

Tab 1 Up-regulated genes in NiS-16HBE

GenBank_id	Name of identified gene and function	Ratio of Cy5/Cy3 (NiS-16HBE/16HBE)
Yc1	c-myc/癌基因	2.352
M31468	ras-like protein/RAS 癌基因	6.861
AF007111	MDM2-like p53-binding protein (MDMX)/癌基因 MDM2	5.391
V01512	Cellular oncogene c-fos/癌基因	4.204
AL031281	Similar to Mouse Wnt-4/癌基因	5.341
U18671	Stat2/STAT/癌基因	3.215
Humorf12	KIAA0025/癌基因	3.931
Hsu62962	Int-6/癌基因	2.665
Humsatb1a	MAR/SAR DNA binding protein (SATB1)/癌基因	2.534
Hsmp21hom	Homologous to mouse P21/癌基因	2.517
D87685	KIAA0244 gene/癌基因	2.147
Humclk1a	clk1/癌基因	2.066
NM_006035	CDC42-binding protein kinase beta/细胞周期调控	2.775
U37022	Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)/细胞周期调控	5.301
AF015592	Cdc7 (CDC7)/细胞周期调控	3.003
AF016582	Checkpoint kinase Chk1 (CHK1)/细胞周期调控	3.402
NM_006007	Zinc finger protein 216 (ZNF216)/细胞周期调控	2.436
Z22533	ALK-1/生长因子受体,细胞增殖	3.487
NM_000582	Secreted phosphoprotein 1 (SPP1)/与细胞增殖有关	4.382
AB011537	MEGF4/MEGF8/内皮生长因子	3.184
NM_001431	Erythrocyte membrane protein/红细胞膜蛋白	2.066
X70326	MacMarcks/signal transduction 细胞增殖	2.831
X68277	Tyrosine phosphatase/酪氨酸磷酸(酯)酶,细胞增殖信号传导	7.976
Hsu12767	Mitogen induced nuclear orphan receptor 促有丝分裂核受体	3.025
Ab013382	DUSP6/细胞增殖	2.688
Hsmcp07	Membrane cofactor protein/膜共同因子蛋白	2.639
Hsstomat07	Human band 7.2b stomatin/红细胞表面蛋白带	2.166
hsbm40	Extracellular matrix protein BM-40/细胞外骨架蛋白	2.709
HUMINTB5A	Integrin beta-5 subunit/整合素 beta-5 亚基	2.057
X92106	Bleomycin hydrolase/博莱霉素水解酶,耐药	5.358
Humvim3	Vimentin (HuVim3)/长柔素	3.447
Humprp	Prion protein (PrP)/感染素蛋白	2.293
L10333	Neuroendocrine-specific protein A (NSP)/神经内分泌	4.700
X04741	PGP neuroendocrine marker protein/神经内分泌	2.313
NM_006183	Neurotensin (NTS)/神经内分泌,肿瘤高表达	3.005
M15518	t-PA/组织型纤维蛋白溶酶原,肿瘤转移	3.654
X14420	Pro-alpha-1 type 3 collagen/胶原蛋白,与肿瘤转移相关	6.228
J03464	Collagen alpha-2/胶原蛋白,与肿瘤转移相关	5.004
U21128	Lumican/与肿瘤增殖、转移相关	3.042
M11313	Alpha-2-macroglobulin/巨球蛋白,与肿瘤转移相关	3.107
XM084981	Laminin receptor/与肿瘤转移相关的基因	2.003
U54559	eIF3 p40/翻译抑制因子,肺癌高表达	4.303
D86322	Calmegin/组织蛋白酶	2.059
S79895	Cathepsin O2 [human, spleen]/组织蛋白酶(肿瘤转移有关)	2.059
Hstump	Translationally controlled tumor protein/肿瘤蛋白翻译控制	3.671
X57548	N-cadherin/钙粘蛋白,信号传导,与肿瘤转移相关	6.445

续表 1

GenBank_id	Name of identified gene and function	Ratio of Cy5/Cy3 (NiS-16HBE/16HBE)
Hsmaop14	Monoamine oxidase type A (14)/A 型单氨氧化酶	2.112
Hsu08092	Histamine N-methyltransferase (HNMT)/组氨酸 N-甲基转移酶	2.158
Af038662	3q13 beta-1, 4-galactosyltransferase/3q13beta 半乳糖苷转移酶	2.792
Hsu09510	Glycyl-tRNA synthetase/甘氨酸 tRNA 合成酶	2.942
Hsnmtdc	NAD-依赖亚甲基四氢叶酸脱氢酶环式水解酶/代谢	4.952
Humcbsa	Cystathionine beta-synthase (CBS)/丙氨酸丁氨酸硫醚 beta 合成酶	7.349
NM_004873	BCL2-associated athanogene5 (BAG5)/凋亡抑制	6.201
AF017986	SARP1/凋亡相关分泌蛋白,抗细胞凋亡	3.896
S73591	HHCPA78 homolog/VDUP1/氧化还原激活	3.008
D13435	PIG-F (phosphatidyl-inositol-glycan class F)/细胞因子	4.201
AF030428	Lung type- I cell membrane hT1a-2/肺 I 型细胞相关蛋白	2.117
M90657	Tumor antigen (L6)/肿瘤抗原	8.336
X79234	Ribosomal protein L11/L26/32/L9/41 核糖体蛋白	3.116
AF065389	Tetraspan NET-4/NET-6	4.201
Y00503	Keratin19/角蛋白 19	3.224
X86693	Hevin like protein/与肿瘤相关	6.732
NM_005346	Heat shock 70kD/热应激蛋白 70	4.301
Hum927a	Interferon-inducible protein 9-27/干扰素可诱导蛋白	2.374
Af061261	Zinc finger protein (MBLL)/锌指蛋白	2.994
Hss100pcb	Calcium-binding protein S100P/钙结合蛋白 S100	7.016
Humrab6a	GTP-binding protein (RAB6)/GTP 结合蛋白	2.888
Hsu59877	Low-Mr GTP-binding protein (RAB31)/小 GTP 结合蛋白	4.960
Hspabpii	Polyadenylate binding protein II/聚腺苷酸结合蛋白	2.244
Af029346	Chloride channel protein 3 (CLCN3)/氯离子通道蛋白	2.009
Hsliper	Lipocortin/钙结合蛋白(肿瘤标记)	2.032
Humgrp75	Mitochondrial HSP75/线粒体 HSP75	2.046
Hs18d	Interferon-inducible gene family/干扰诱导基因	2.091
Hsmitg	Mitochondrial DNA/线粒体 DNA	3.365
Hsu57693	TFIID subunits TAF20 and TAF15/转录因子	2.329
HUMISGF3A	Transcription factor ISGF-3/转录因子 ISGF3	2.123
Af067170	Alpha endosulfine/alpha 硫基基因	2.093
Hsu92014	Defective mariner transposon Hsmar2/转座子缺失	2.236
G18337	STS genomic/序列标记位点	2.535
Hsu80747	CAGH3/转录	2.036
Af070614	24732 unknown/未知基因	2.052

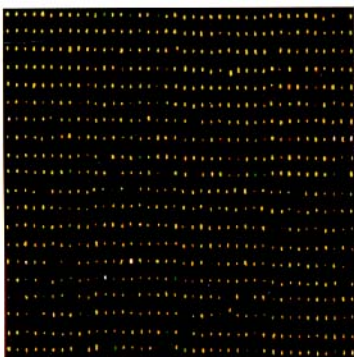


图 1 实验组与对照组细胞样本双色荧光标记叠加图

Fig 1 The 2-dye scanning results of merged image of hybridizing signals of Cy3-16HBE and Cy5-NiS-16HBE on gene chip. Color of spots in merged image showed expression status of genes: up-regulation (red), down-regulation (green), no change in expression (yellow)

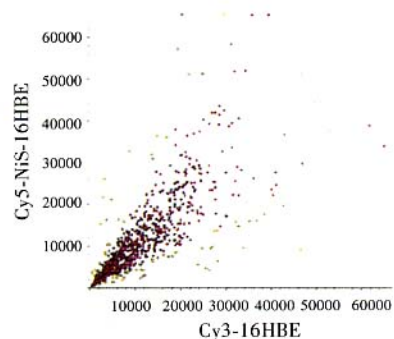


图 2 实验组与对照组细胞样本杂交信号强度散点图

Fig 2 The scatter plot of hybridizing signals of differentially expressed genes between 16HBE and NiS-16HBE on gene chip. Cy5-NiS-16HBE (Y-axis)/Cy3-16HBE (X-axis) scatter plot; The red spots showed up-regulated genes, the yellow spots showed down-regulated genes

表 2 硫化镍转化人支气管上皮细胞 NiS-16HBE 表达显著降低的基因(平均 Ratio<0.5,共 70 条)

Tab 2 Down-regulated genes in NiS-16HBE

GenBank_id	Name of identified gene and function	Ratio of Cy5/Cy3 (NiS-16HBE/16HBE)
L41870	Retinoblastoma susceptibility protein (RB1)/抑癌基因 RB	0.402
U50534	BRCA2/乳腺癌易感基因	0.198
J03068	DNF1552 (lung)/chromosome 3p/染色体 3P,SCLC 易缺乏	0.324
AB017363	Frizzled-1/卷曲蛋白,Wnt 抑制物,抑制细胞增殖	0.105
AF037989	STAT inhibitor-2/STAT 抑制基因,抑制细胞增殖	0.460
AB020315	Dickkopf-1 (hdkk-1)/Wnt 信号抑制物	0.201
U48436	Fragile X mental retardation protein FMR2p/脆性 X 综合征	0.451
Caveolhs3	Caveolin-1 gene/肿瘤抑制基因(信号传导蛋白)	0.212
AF043733	Death effector domain-containing/死亡效应子功能域	0.290
AF124440	MAGE tumor antigen D1 (MAGE-D1)/肿瘤抗原 MAGE-D1	0.437
Hsu22364	Cyclin B1 gene, promoter region/细胞周期素 B1 调控启动区	0.416
NM_002439	MSH3/DNA 错配修复基因	0.441
U18300	Damage-specific DNA binding/DNA 损伤结合蛋白	0.413
D21235	HHR23A protein,XPC/DNA 切除修复基因	0.331
NM_005732	RAD50/DNA 断裂修复基因	0.312
Hsrad2	Flap endonuclease-1/核酸内切酶 1	0.408
Hsu39817	Bloom's syndrome protein (BLM)/DNA 切除修复基因	0.410
Y07595	TFIIH/转录因子,DNA 修复	0.221
U32986	Xeroderma pigmentosum group E/XPE DNA 切除修复	0.396
AJ010046	Rho guanine nucleotide-exchange factor/与 DNA 修复有关	0.301
NM_003362	Uracil-DNA glycosylase (UNG)/DNA 碱基切除修复	0.286
NM_006596	Polymerase theta (POLQ)/聚合酶 T,与 DNA 修复有关	0.438
NM_005431	XRCC2/DNA 修复基因	0.483
NM_006793	Antioxidant protein 1(AOP1)/抗氧化蛋白	0.115
U12472	Glutathione S-transferase (GST phi)/GST	0.134
NM_001512	GSTA4/GST 家族	0.306
AF043105	Glutathione S-transferase mu 3 (GSTM3)/GST 家族	0.327
NM_007057	ZW10 interactor (ZWINT)/着丝粒组分	0.307
NM_002212	Integrin beta 4 binding protein (ITGB4BP)/Beta 整合素	0.486
AF070600	Beta-tubulin/微管蛋白	0.333
AF059611	Nuclear matrix protein NRP/B (NRPB)/核蛋白骨架	0.451
Hsu36188	Clathrin assembly protein 50 (AP50)/内涵素安装蛋白	0.480
NM_006388	Tat interactive protein (TIP60)/诱导凋亡	0.227
Hstsc22	TSC-22/诱导凋亡,抑制细胞增殖	0.238
U82828	Ataxia telangiectasia (ATM)/细胞周期调节,诱导凋亡	0.321
AF037448	GRY-RBP/RNA 转录和结构稳定基因	0.190
X55544	TREB protein/核因子	0.456
J04809	Cytosolic adenylate kinase (AK1)	0.339
M69043	MAD-3/与调节 NF-kappa B 有关	0.316
NM_006609	MAP3K2/MAPK 信号传导	0.437
Af004711	Signal recognition particle subunit 9 (SRP9)/信号识别	0.485
NM_001301	Core promoter element binding protein (COPEBb)/核蛋白	0.401
M59465	Tumor necrosis factor alpha inducible protein/TNF 诱导基因	0.330
X59892	IFN-inducible gamma2/干扰素诱导基因	0.294
Hum26spsp	26S proteasome subunit p97/TNF 受体相关蛋白	0.331
L19185	Natural killer cell enhancing factor/NK 细胞增强因子	0.403
Ab001872	Leucine zipper bearing kinase/亮氨酸激酶	0.264
AF020038	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH)/代谢	0.287
M23114	Calcium-ATPase (HK1)/钙 ATP 酶	0.438
U14970	Human ribosomal protein S3/核糖体蛋白	0.207
AF070548	2-oxoglutarate carrier protein/代谢	0.331
L16842	Ubiquinol cytochrome-c reductase/与线粒体呼吸链有关	0.367
L37936	Mitochondrial elongation factor Ts/线粒体翻译延伸因子	0.381

续表 2

GenBank_id	Name of identified gene and function	Ratio of Cy5/Cy3 (NiS-16HBE/16HBE)
U27649	BTG2/抗细胞增殖家族,信号传导	0.235
AF044958	NADH/线粒体呼吸链	0.330
Humenoa	Alpha enolase/alpha-磷酸丙酮酸水化酶	0.479
Humhmgcoa	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase/3 羟-3 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶	0.315
X02761	Fibronectin (FN precursor)/粘连蛋白	0.350
AB005047	SH3 binding/非受体结合蛋白,与细胞生长调节有关	0.482
Af125098	HSPC037 protein/热休克蛋白	0.461
AF091433	Cyclin E2/细胞周期素 E2,影响细胞有丝分裂	0.445
Af004711	Two-pore potassium channel TPKC1/双微孔钾离子通道	0.345
NM_044480	Fucosyltransferase 8 (FUT8)/墨角藻糖基乳糖	0.447
NM_044403	Deafness, dominant 5 (DFNA5)/听力损伤易感基因	0.410
AF007871	TorsinA (DYT1)/与脊柱炎有关的易感基因	0.214
AF006621	Embryonic lung protein (HUEL)/胚肺蛋白	0.118
Hsrnasmf	Sm protein F/小核糖核蛋白家族 F,参与肿瘤免疫	0.499
AK000560	FLJ20553 fis, clone KAT11806, highly similar to X79535 H	0.443
Hsu81004	GT24/(GT24)/与抑制肿瘤转移有关	0.270
Hstubb2	Beta 2 gene/beta-2 基因,与白介素-6 有关	0.272

2.2 差异表达基因的生物功能分析 对 151 个差异表达的基因逐个在 GenBank 及其他相关数据库中进

行检索,根据其功能进行分类(表 3)。

表 3 硫化镍转化人支气管上皮细胞 NiS-16HBE 差异表达基因的功能分类

Tab 3 Classify of function for the differentially expressed genes in NiS-16HBE

Potential gene function	Differentially expressed genes	Down-regulated genes	Up-regulated genes
Pro-oncogene and tumor suppressor gene	23	11	12
Ion channel and transport protein	2	1	1
Cell cycle protein	9	4	5
Cytoskeleton and movement protein	9	5	4
Apoptosis and stress response protein	5	3	2
DNA synthesis, repair and recombination	8	4	4
DNA binding, transcription and transcription factors	27	6	21
Cellular receptor	18	10	8
Immune related gene	8	5	3
Cell signal and transduction protein	9	6	3
Metabolism gene	16	10	6
Protein translation and synthesis related gene	13	2	11
Development related gene	4	3	1
Total	151	70	81

3 讨论

肿瘤作为一种复杂的多基因疾病,用单基因的特征是难于解释肿瘤的全部发病机制的^[3],因此,从多基因的角度探讨基因的变化规律是当前研究肿瘤发病机制的关键切入点。细胞内拥有大量的基因,基因与基因之间存在激活与抑制的平衡,肿瘤的发生就是基因失衡的结果。通过检测基因的表达状态可以了解基因的功能状况,但检测基因表达水平的传统方法敏感

度不够高(如 Northern blot),每次仅能检测单个或几个基因的表达(如 RT-PCR),有的还须大规模测序(如 SAGE)等。而新近发展起来的 cDNA 微矩阵基因芯片,不但可高敏感度地定量、定性检测基因表达水平,而且可同时研究同一组织或不同组织中成千上万个基因的表达^[4,5],突破了仅能检测单个或几个基因表达水平的局限性。化学物致癌作用同样不是单一基因的行为,而是涉及到多种基因的变化,因此近年来的研究认为,化学

物所致肿瘤同样也是多基因综合作用的结果。在用致癌物诱导细胞基因改变方面, Ye 等^[5]研究了四价铬诱导肺 A549 细胞的基因表达谱, 发现铬可诱导 150 条基因表达增高, 70 条基因表达降低。Zhao 等^[6]用石棉诱导人支气管上皮细胞 BEP2D 转化, 比较转化细胞与正常细胞, 发现 15 条表达差异基因。范保星等^[7]用 60 个肺癌相关基因制成芯片对人支气管上皮恶性转化细胞模型 BEP2D 的基因表达进行了检测。本研究通过对 NiS 诱导的恶性转化细胞/正常 16HBE 细胞基因的表达谱差异筛选, 发现 151 条基因呈差异表达 (3.78%), 其中 81 条基因在 NiS 诱导的恶性转化细胞中表达增高 (2.02%), 70 条基因在恶性转化细胞中表达下降 (1.75%)。从上述芯片的基因表达谱可知, 致癌物诱导恶性转化的基因表达谱上有差异的基因 < 5%, 说明少数基因的异常就可导致癌变的发生。

对本表达谱差异表达基因的分析显示, 硫化镍转化人支气管上皮细胞涉及相关基因数较多, 包括原癌基因和抑癌基因, 细胞周期相关基因, DNA 合成、修复基因, DNA 结合、转录基因, 细胞信号和传递相关基因以及代谢基因等。对大多数类别的基因, 既有上调, 又有下调, 可见其转化活性是对各类基因协调作用的结果。我们认为基因芯片技术在筛选化学物转化细胞导致相关基因的改变上, 具有高通量、高敏感、快速等特点, 对化学物在细胞、分子毒作用和致癌机制的研究中意义重大。有研究报道了硫化镍转化人支气管上皮细胞所致基因表达改变与其致细胞转化机制的联系^[8]。通过对本表达谱差异表达基因的部分生物功能分析, 观察到原癌基因表达上调有 12 条, 抑癌基因表达下调 11 条, 它们的改变从分子机制角度推测是均有利于细胞的恶性转变与肿瘤的发生、发展。此外, 其余有关基因的变化亦从基因组水平提示, 探讨 NiS 所致细胞恶变的相关基因变化可从硫化镍转化人支气管上皮细胞模型 (NiS-16HBE) 研究入手, 也为阐述 NiS 及重金属

类化合物致癌的分子机制提供了重要数据与研究方法。有关更多更详细的基因表达谱差异表达基因生物信息学分析, 尚待进一步的研究。

志谢 基因芯片检测由上海博星基因芯片公司完成, 特此致谢!

参 考 文 献

- 1 Ji WD, Wu ZL, Chen JK. Malignant transformation of human bronchial epithelial cell line induced by crystalline nickel sulfide. *Carcinogen Teratogen Mutagen*, 2002, 14(1): 15-18. [纪卫东, 吴中亮, 陈家堃. 结晶型 NiS 诱发人支气管上皮细胞系恶性转化. *癌变·畸变·突变*, 2002, 14(1): 15-18.]
- 2 Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer*, 2001, 37(12): 1554-1561.
- 3 Chen JJ, Peck K, Hong TM, et al. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5223-5230.
- 4 Huang DQ, Dai JL, Chen JX, et al. Investigation on the gene expression pattern of human lung cancer. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2000, 21(9): 827-830. [黄达蕾, 戴建凉, 陈菊祥, 等. 肺癌相关基因的表达谱研究. *第二军医大学学报*, 2000, 21(9): 827-830.]
- 5 Ye J, Shi X. Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222(1-2): 189-197.
- 6 Zhao YL, Piao CQ, Wu LJ, et al. Differentially expressed genes in asbestos-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells: implication for mechanism. *Carcinogenesis*, 2000, 21(11): 2005-2010.
- 7 Fan BX, Zhang KT, Ma SH, et al. Making lung cancer related cDNA microarray. *Lett Biotechnol*, 2001, 12(1): 12-14. [范保星, 张开泰, 马淑华, 等. 肺癌相关基因芯片的制作. *生物技术通讯*, 2001, 12(1): 12-14.]
- 8 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286(5439): 531-537.

(收稿: 2004-12-20 修回: 2005-01-19)

(本文编辑 李蓓兰)

· 启事 ·

致作者

为了确保图片制版的效果, 请作者向本刊投稿时, 尤其是经网上投稿时, 务必通过邮局寄来相关的插图, 特别是电泳图、X 光片或 CT 片、组织学照片、荧光照片等。电泳图需由原始凝胶电泳图拍摄而成, 并标注各条带的名称或编码, 以及 Marker 上各迁移带的片段大小, 请勿剪切图片。X 光片及 CT 片应要求部位明确。组织学照片及荧光照片应注明内部标尺比例或放大倍数及染色法等。大体标本照片在图中应有尺度标记。所有图片必须平整光滑, 具有良好的清晰度和对比度, 不能有折痕或缺损, 背面均应贴上标签, 注明图序、作者姓名、图的上下方向及其他相关信息。