

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.004

# 基因芯片筛选稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 基因的肝癌细胞中 肿瘤转移相关差异表达基因\*

葛丽丽<sup>1</sup>, 杨小昂<sup>2</sup>, 朴军颜<sup>2</sup>, 尹艳慧<sup>3</sup>, 张毓<sup>3</sup>(1. 河南省郑州市儿童医院检验科 450053; 2. 郑州大学医药科学研究院 450052;  
3. 北京大学免疫学系 T 细胞室 100083)

**[摘要]** **目的** 筛选稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 基因的肝癌细胞中肿瘤转移相关的差异表达基因。**方法** 分别提取稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞(5B4)及转染空质粒的对照细胞(Mock)总 RNA, 通过基因芯片技术筛选差异表达基因。**结果** 与 Mock 细胞比较, 5B4 细胞共筛选出 1 694 个差异表达基因, 有 11 个基因表达差异明显, 其中 MMP-1、PTGS2、FN、CA9、IL-8、ILK、Areg 7 个基因在转染 FATE/BJ-HCC-2 基因后表达量明显上升, 差异倍数分别为 81.80、49.86、11.30、16.26、3.48、2.79、2.20。E-cadherin、RhoBTB3、ALPP、HLA-DRB 4 个基因表达量明显下降, 差异倍数分别为 -5.42、-2.23、-5.93、-8.03。**结论** 采用基因芯片技术对 FATE/BJ-HCC-2 参与的肝癌转移的差异表达基因进行细致的筛选, 其最终目的是为研究肝癌转移机制打下坚实的理论基础。

**[关键词]** 肝肿瘤; 基因芯片; 基因差异表达**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1595-03

## Screening of tumor metastasis related differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma cells with FATE/BJ-HCC-2 gene stable transfection by gene chip\*

Ge Lili<sup>1</sup>, Yang Xiaolang<sup>2</sup>, Piao Junyan<sup>2</sup>, Yin Yanhui<sup>3</sup>, Zhang Yu<sup>3</sup>(1. Department of Clinical Laboratory, Zhengzhou Municipal Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450053, China;  
2. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China;  
3. T Cell Room, Department of Immunology, Peking University, Beijing 100083, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen the tumor metastasis related differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma (HCC) cells 7402 after stable transfection with FATE/BJ-HCC-2 gene. **Methods** Total RNA was extracted from FATE/BJ-HCC-2-transfected HCC(5B4) cells and empty vector control (Mock) cells respectively. Differentially expressed genes were obtained using cDNA microarray. **Results** Compared with Mock cells, a total of 1 694 differentially expressed genes were screened out in 5B4 cells, the 11 gene expressions had obvious differences, among which the expression amounts in 7 genes were significantly increased, including MMP-1, PTGS2, FN, CA9, IL-8, ILK and Areg. The fold changes were 81.80, 49.86, 11.30, 16.26, 3.48, 2.79 and 2.20, respectively. The expression amounts in 4 genes were significantly decreased, including E-cadherin, E-cadherin, RHOBTB3, ALPP and HLA-DRB4. The fold changes were -5.42, -2.23, -5.93 and -8.03, respectively. **Conclusion** Adopting gene microarray technology can carefully screen the differentially expressed genes of FATE/BJ-HCC-2 involved HCC metastasis, its final goal is to lay a solid theoretical foundation for studying the HCC metastasis mechanism.

**[Key words]** hepatocellular neoplasms; gene chip; differential gene expression

肝癌具有隐匿性强、容易转移的特点, 并且很多患者在确诊的时候已经处于疾病的晚期, 还出现了严重的肿瘤远处转移现象, 所以高度转移是肝癌的一个非常重要的生物学特征。如果肝癌细胞发生转移, 就会对后期的预后及患者的生存概率产生非常严重的影响, 是致死的主要原因<sup>[1]</sup>。作者前期的研究结果显示, FATE/BJ-HCC-2 mRNA 在肝癌组织中高表达, 与肝癌组织分化程度相关, 并且能够促进肝癌细胞的增殖和转移<sup>[2-3]</sup>。经过大量的研究分析发现, 肝癌细胞发生侵袭及转移的机制主要是由很多的分子和信号通路联合形成的。这些分子的作用主要是对肝癌细胞在体内的侵袭产生促进作用, 并且在恶性循环中也发挥着至关重要的作用<sup>[4-5]</sup>。

基因芯片, 又称 DNA 芯片、生物芯片, 是将大量(通常每平方厘米点阵密度高于 400)探针分子固定于支持物上后与标

记的样品分子进行杂交, 主要是对所有的探针分子发出的混杂信号强度进行检测, 然后获得相应样品分子的数量及相关的信息等<sup>[6]</sup>。本文采用基因芯片技术在全基因组范围内检测稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞(5B4)及转染空质粒的对照细胞(Mock)之间基因表达谱的差异, 寻找与 FATE/BJ-HCC-2 基因相关的肝癌转移基因, 探索肝癌转移的分子机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞(5B4)及转染空质粒的对照细胞(Mock)均由北京大学医学部 T 细胞实验室建立及保存。10% 胎牛血清及 DMEM 培养基(Gibco 公司); Trizol 试剂(Invitrogen 公司); Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 芯片(北京博奥生物有限公司)。

### 1.2 方法

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071724); 河南省基础与前沿基金资助项目(142300413224)。 作者简介: 葛丽丽(1981—), 检验技师, 硕士, 主要从事免疫学检验及研究工作。

**1.2.1 细胞的培养** 将 5B4 和 Mock 细胞分别接种于含 10% 胎牛血清及 10 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素 DMEM 培养基,在 37  $^{\circ}$ C 的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。

**1.2.2 细胞总 RNA 提取** 取对数生长期的 5B4 和 Mock 细胞消化后分别加至 1 mL Trizol 试剂中,待液氮挥发后装入 EP 管中,室温静置 5 min;加入氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,4  $^{\circ}$ C,离心半径 15 cm,12 000 r/min,低温离心 15 min;吸取上层水相,加入等量异丙醇,室温放置 10 min,12 000 r/min 低温离心 15 min;弃上清液 75% 乙醇进行漂洗,温度控制在 4  $^{\circ}$ C。随后 10 000 r/min 离心 10 min。等到离心处理结束之后放到室温环境中,并加入 50  $\mu$ L 焦碳酸二乙酯(DEPC)水进行溶解处理,最后放到 -20  $^{\circ}$ C 的环境中储存,以备下次使用。

**1.2.3 探针制备及芯片杂交** 首先,提取细胞总 RNA,以 T7Oligo(dT)Primer 为引物,合成 cDNA。然后,利用 cDNA 作为模板,选择 T7 Enzyme Mix 进行 cRNA 的合成,加入生物素 biotin 100  $\mu$ L,利用磁珠的纯化作用对 cRNA 进行处理,去掉其中的盐类及酶类物质。利用 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 芯片进行杂交。对 cRNA 进行片段化处理(100 bp)后,置于预杂交液芯片中杂交,温度为 45  $^{\circ}$ C,时间为 10 min。将预杂交液取出,并加入相同体积的杂交液,利用生物素对 cRNA 进行标记处理后再次杂交,温度为 45  $^{\circ}$ C,时间为 16 h。最后,将芯片从炉中取出,进行洗脱和染色处理。

**1.2.4 检测与分析** 首先,芯片结果采用 Agilent Microarray Scanner 进行细致的扫描,随后会获得相关基因表达的荧光信号的强度值,然后利用内参基因信号进行检测校对。接下来荧光信号的强度可以根据每个芯片上所检测到 *P* 值,并结合数据集的检测值进行分析:(1)检测值(absolute call)不存在 *P* (present)值的数据集合;(2)出现 *A*(absent)或临界值 *M*(marginal)时,表示不表达状态;(3)只有检测值存在 *P* 的数据集才能够进行下一步的研究分析。差异基因筛选标准:倍数变化值大于等于 2.0 或小于等于 0.5。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术验证** 利用 RT-PCR 技术检测差异基因在两组细胞中的表达差异,观察其检测结果与基因芯片检测结果是否一致。利用 Primer5.0 软件自行设计引物,分别配置 RT-PCR 反应体系,反应体系如下:SYBR Green 10  $\mu$ L,上游引物 1  $\mu$ L,下游引物 1  $\mu$ L,dNTP 1  $\mu$ L,Taq 酶 2  $\mu$ L,cDNA 5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L,总体积为 50  $\mu$ L。将每管溶液混匀,6 000 r/min 离心 2 min。将配置好的反应体系置于 RT-PCR 仪上进行扩增反应,反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 25 s,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

## 2 结果

**2.1 总 RNA 提取结果** 提取 5B4 和 Mock 细胞总 RNA,经甲醛变性凝胶电泳检测,结果可见,细胞 RNA 电泳条带清晰,5B4 细胞 RNA 的吸光度(*A*)值  $A_{260}/A_{280}$  为 1.96;MOCK 细胞 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  为 1.97,均大于 1.80;细胞总量大于或等于 8  $\mu$ g;电泳 28S 与 18S 比值大于 2:1,样品纯度、总量及完整性均符合表达谱芯片实验要求。

**2.2 芯片杂交信号散点图** 细胞的总 RNA 主要是利用基因芯片技术对差异表达基因结果进行筛选,见图 1。该图中的 X 轴表示的一个样品的荧光信号强度值,Y 轴表示的是另一个样品的荧光信号强度值。图中的所有数据点都表示芯片上的对应的一个基因点的杂交信号,红色的标记表示 B/A 的比率值大于或等于 2.0,绿色的标记表示 B/A 的比率值小于或等于

0.5,均为表达存在差异的基因,黑色的标记表示的是 B/A 的比率值为 0.5~2.0,这说明表达几乎不存在差异。该图中的荧光信号值在对称轴直线两侧也有少量的分布,说明存在上调和下调基因。见图 1。

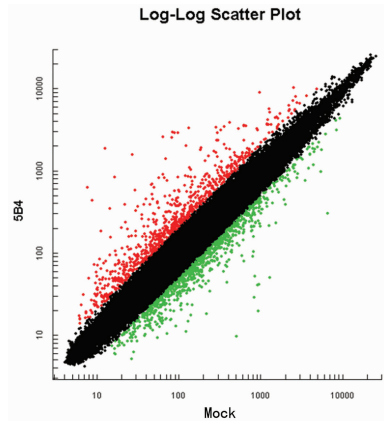


图 1 基因芯片杂交信号散点图

**2.3 基因芯片检测结果分析** 与 Mock 细胞相比,5B4 细胞中 11 条基因表达差异显著,其中上调基因 7 条,下调基因 4 条,见表 1。按照基因 GO 的分类信息进行研究,这些差异表达的基因大多数都分布在一些具有黏附、凋亡及调节细胞周期特征的细胞上,有一些还会分布在具有信号转导功能的细胞中。

表 1 稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞中肿瘤转移相关分子芯片分析

基因	变化倍数	基因全称
MPP1	81.80	matrix metalloproteinase 1
PTGS2	49.86	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
CA9	11.30	carbonic anhydrase IX
IL-8	16.26	interleukin 8
FN	3.48	fibronectin
ILK	2.79	integrin Linked Kinase
Areg	2.20	amphiregulin
E-cadherin	-5.42	epithelial cadherin
RhoBTB3	-2.23	RHO-related BTB domain containing 3
ALPP	-5.93	alkaline phosphatase, placental (regan isozyme)
HLA-DRB	-8.03	major histocompatibility complex

**2.4 RT-PCR 验证结果** RT-PCR 检测结果显示,11 条基因中有 9 条基因在两组细胞中的 mRNA 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其中 MPP1、PTGS2、CA9、IL-8、FN、ILK、Areg 在 5B4 细胞中的 mRNA 表达量与 Mock 细胞相比明显上调,其差异倍数分别为:84.38、46.62、11.83、14.70、3.89、2.25、2.22。E-cadherin、RhoBTB3 在 5B4 细胞中表达明显下调,在 Mock 细胞中的 mRNA 表达量分别是 5B4 细胞中的 15.06 倍和 5.68 倍 ( $P < 0.05$ )。而 ALPP 和 HLA-DRB 在两组细胞中的 mRNA 表达差异不明显 ( $P > 0.05$ )。将 RT-PCR 检测结果绘制成柱状图,结果表明,RT-PCR 所测 11 条基因中有 9 条基因的表达结果与基因芯片检测结果基本一致,超过 80% 以上,具有重要的参考价值,可以用于差异表达基因的筛选。

## 3 讨论

恶性肿瘤会向体内的细胞侵犯,还会对周围正常组织造成破坏,参与血液循环,这一过程被称为侵袭。肿瘤的侵袭及转移过程是互有关系的不同病理过程。侵袭是转移的前奏和前

提,转移是侵袭的结果。肿瘤的侵袭和转移指的是癌基因、抑癌基因参与到调节过程中并起到一定作用的复杂过程,能够调控整个肿瘤转移过程,具体途径有:过度表达与肿瘤转移有关的基因以及所有相关基因产物参与其中。Liotta 等<sup>[7]</sup>将癌细胞向细胞外浸润的步骤分成三大阶段:(1)癌细胞与纤维连接蛋白、基质成分板层素等特异性结合,这一步骤的实现必须有癌细胞受体分子参与;(2)癌细胞或其周围的间质细胞能够与基质相连接,它们所分泌的物质可以将细胞外基质的蛋白水解酶分解;(3)细胞外基质被分解以后,癌细胞可以在其中进行移动、转移。经过研究发现,多种分子及信号通路会促进肝癌细胞产生侵袭及转移。肝癌细胞在机体内的侵袭过程受到这些分子的促进,这些分子还在肝癌细胞转移的恶性循环步骤中起到相当重要的作用。所以说,将与肝癌转移有关的一些分子筛选出来可以帮助探索肝癌的转移机制。

基因芯片技术与物理、化学、网络信息学及生物学这些高新技术联系在一起,操作步骤为 cDNA 或上千个特异性基因探针杂交之后检测,然后再综合分析及判断所有基因表达的个体、组织、病变、刺激等特异性,这是一种实验方法。此方法利用综合、全面、系统的观点研究了生命这一现象。这一技术能够避免出现像普通核酸印记技术这样操作复杂、不能完全自动化的缺点,并且能够采用大规模、高通量的方式来同时分析上千上万个基因<sup>[8]</sup>。所以说,基因芯片技术比其他寻找细胞或组织间差异表达基因的方法更好,能够将各种细胞、组织中所有基因的表达规律、情况作出全面了解,该项技术已经成功地应用于同时成千上万基因的表达和大规模基因的发现,以及多态性筛查和基因组 DNA 克隆的映射,为全面理解基因功能和基因之间的相互关系及发病机制提供依据。本研究通过提取稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞(5B4)及空质粒转染的对照细胞(MocK)中的总 RNA,然后通过基因芯片技术将两组细胞和肝癌转移相关的特异表达基因筛选出来。经过筛选的基因一共有 11 条,其中 7 条上调基因和 4 条下调基因。这些基因主要作用是调控细胞的分化、信号转导、酶活性及细胞因子之间的相互作用等。将 11 条基因进行相关的 RT-PCR 反应,以确保基因芯片结果的准确性,最终的结果表明,基因芯片的分析结果和 RT-PCR 反映实验的结果基本一致,由此可以说明基因芯片分析结果具有较高的可信度。

根据相关的文献报道可知,基因芯片筛查出来的 11 条基因均参与肿瘤的发生发展过程,与肿瘤的起始过程密不可分,并在肿瘤的迁移和侵袭中起着重要作用<sup>[9]</sup>。据报道,MMP1 在甲状腺癌、口腔鳞状癌等肿瘤中高表达,并与肿瘤的发展过程高度相关<sup>[10-11]</sup>。余海浪等<sup>[12]</sup>通过研究乳腺癌转移相关的基因表达谱,并对差异基因的相互关系进行分析,发现差异基因编码蛋白间的相互作用主要表现在 14 个蛋白,而 MMP1、MMP2、PTGS2 在重要的节点位置,这些差异基因主要涉及细胞周期与增殖、细胞黏附、细胞迁移、血管形成及信号转导等生物通路和生物过程<sup>[12]</sup>。有学者认为,MMP 与 ILK 可以相互影响共同促进肿瘤的发生发展过程<sup>[13]</sup>。IL-8 水平的高低与胃癌等多种肿瘤具有正相关性<sup>[14]</sup>。有文献报道,HLA-DRB1 的基因多态性也与乳腺癌的进展过程具有密切关联<sup>[15]</sup>。

本研究通过基因芯片技术成功筛选出了与 FATE/BJ-HCC-2 相关的肝癌转移表达基因。与转染空质粒的对照细胞相比,这些与肿瘤转移相关的基因在稳定转染 FATE/BJ-HCC-2 的肝癌细胞中明显高表达或低表达,说明它们在肝癌转移癌变过程中与 FATE/BJ-HCC-2 引起的肝癌转移有着一

定的联系,其具体作用机制尚需进一步研究。下一步研究将从基因组、蛋白质组水平上对重点基因进行检测,以确定肝癌转移发生发展的关键性分子和治疗靶点。

## 参考文献

- [1] Torbenson MS. Hepatocellular carcinoma[M]. Switzerland:Springer International Publishing,2015:169-218.
- [2] Yang XA,Dong XY,Qiao H,et al. Immunohistochemical analysis of the expression of FATE/BJ-HCC-2 antigen in normal and malignant tissues[J]. Lab Invest,2005,85(2):205-213.
- [3] 闫萌,王巍,杨小昂,等. FATE/BJ-HCC-2 基因表达促进细胞增殖及肿瘤形成[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(8):748-754.
- [4] Yuen JW,Poon LS,Chan AS,et al. Activation of STAT3 by specific Galpha subunits and multiple Gbetagamma dimers[J]. Int J Biochem Cell Biol,2010,42(6):1052-1059.
- [5] 邢茜,陈思宇. microRNA 与肝癌研究进展[J]. 肿瘤基础与临床,2014,27(5):447-451.
- [6] 张红,楚胜华,冯东福,等. 应用基因芯片筛选不同胶质瘤细胞相关基因[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(2):253-255.
- [7] Liotta LA. Gene products which play a role in cancer invasion and metastasis[J]. Breast Cancer Res Treat,1988,11(2):113-124.
- [8] 张琪琪,张志强,温浩,等. 利用基因芯片技术筛选食管癌细胞侵袭转移的相关分子靶标[J]. 中国老年学杂志,2015,35(8):2148-2152.
- [9] Quesada V,Ordóñez GR,Sánchez LM,et al. The degradome database:mammalian proteases and diseases of proteolysis[J]. Nucleic Acids Res,2009,37(Database issue):D239-243.
- [10] 周艳华,周华山,吴平. MMP-1 和 TIMP-1 在甲状腺癌组织中的表达及意义[J]. 中国现代医药杂志,2015,17(4):1-5.
- [11] 陈中,张素欣,张雨温. MMP1、TIMP1 和 TIMP3 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 现代口腔医学杂志,2011,25(6):408-412.
- [12] 余海浪,夏晓燕,丁大鹏,等. 乳腺癌转移相关基因的筛选与生物信息学分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2012,28(11):1069-1074.
- [13] Troussard AA,Costello P,Yoganathan TN,et al. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) [J]. Oncogene,2000,19(48):5444-5452.
- [14] 黄美君,梁小裕,管敏昌,等. 胃癌患者血清 VEGF 和 IL-8 水平变化及临床意义[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(19):2796-2798.
- [15] 董燕,木克代斯·拜克提亚尔,艾秀清,等. HLA-DRB1 基因多态性与乳腺癌关联研究的 Meta 分析[J]. 实用肿瘤杂志,2015,30(2):139-144.