

结肠正常黏膜和腺癌中差异表达基因的生物信息学分析

谷雪梅¹, 张昊², 来茂德¹

(1. 浙江大学医学院病理学与病理生理学系、环境基因组学研究中心, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江大学计算机系, 浙江 杭州 310027)

[摘要] 目的:系统地分析由 SSH 方法获得的结肠正常黏膜和腺癌的差异表达基因。方法:构建基于 Linux 的核酸自动分析平台,对用 SSH 方法获得的 3 个文库之一的 T-N 差减文库进行分析。用半定量 RT-PCR 对部分结果进行验证。结果:成功构建了基于 Linux 的核酸自动分析平台,得到了 15 个 contigs,其中与已知基因相匹配的有 13 个(T-N),未与已知基因匹配或者意义未明的有 2 个;部分基因的半定量 RT-PCR 发现,人胸腺素 $\beta 4$ (*Homo Sapiens thymosin beta 4*, THY)和人乙型肝炎病毒 x 抗原反式活化蛋白 2(*Homo Sapiens HbxAg transactivated protein 2*, XTP)的表达从正常黏膜—腺癌有逐步增高的趋势。结论:构建基于 Linux 的核酸自动分析平台是系统分析核酸序列的有效方法,根据对 3 个文库的系统分析结果,为进一步阐明结肠肿瘤分子机制提供了许多有价值的信息。

[关键词] 肠黏膜/病理学; 腺癌/病理学; 结肠肿瘤/病理学; 基因表达; 结肠腺癌; 生物信息学; Linux
[中图分类号] R 735.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)02-0095-07

Bioinformatics analysis to the differentially expressed genes of normal mucosa and carcinoma of colon

GU Xue-mei, ZHANG Hao, LAI Mao-de (*Department of Pathology and Pathophysiology, Center for Environmental Genomics, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China*)

[Abstract] **Objective:** To systemically analyze the differentially expressed genes from normal mucosa and carcinoma of colon obtained by SSH method. **Methods:** An automatic platform for the analysis of nucleotides based on Linux was constructed, and one of the three subtracted libraries from SSH (T-N) was systematically analyzed by this platform. Part of the results was verified by semi-quantity RT-PCR. **Results:** The automatic platform for the analysis of nucleotides based on Linux was successfully constructed. There were 15 contigs from the subtracted T-N libraries, among which 2 had no match with known genes in the GenBank. The expressions of genes *Homo Sapiens thymosin beta 4* (THY) and *Homo Sapiens HbxAg transactivated protein 2* (XTP) had trends of increase with the progress of normal tissue-adenoma-adenocarcinoma when verified by semi-quantity RT-PCR. **Conclusion:** Linux-based automatic platform provides an efficient way to systematically analyze the nucleotide sequences, which may be used in study on the mechanism of colorectal carcinogenesis.

[Key words] Intestinal mucosa/pathol; Adenocarcinoma/pathol; Colonic neoplastic/pathol; Gene expression; Colon adenocarcinoma; Bioinformatics; Linux

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004,33(2):95-101.]

结直肠癌是严重影响人类健康的常见恶性肿瘤之一,我国的发病率正在逐渐上升,但其发病机制尚未完全明了。大量的研究表明,大多数结直肠癌是从正常黏膜演变为腺瘤进而发展成腺癌的,即腺瘤—腺癌途径(adenoma-adenocarcinoma sequence)。这一发展过程涉及到多个癌基因的激活和抑癌基因的失活,并且

收稿日期:2004-01-06 修回日期:2004-02-06
基金项目:国家自然科学基金(30371605)资助项目
作者简介:谷雪梅(1978—),女,硕士生,主要从事肿瘤分子病理学研究。
通讯作者:来茂德(1960—),男,博士,病理学教授,主任医师,博士生导师,主要从事肿瘤分子病理学研究;E-mail: lmp@zju.edu.cn

认为这些基因的改变并非是按固定顺序阶段性发生的,而是其累积作用在肿瘤的发生中起作用的^[1]。除了已知基因如 p53, k-ras 等的作用以外,还有许多未知基因的作用和已知基因的未知作用有待于进一步的鉴定。因此,通过一定的方法识别、分离和鉴定结直肠癌发生发展相关的差异表达基因,寻找结直肠癌发生不同阶段转变过程中的关键基因,将有助于更深入地认识结直肠癌发生发展的机理,并为早期诊断、治疗和预后提供依据。人们熟知的癌基因组解剖计划(CGAP)就是要筛选所有与癌发生、发展相关的基因,并对正常、癌旁和癌组织的基因特征作出综合分析。

目前用于检测差异表达基因的方法有很多,如 mRNA 差异显示技术(mRNA differential display-reverse transcription polymerase chain reaction,DDRT-PCR)^[2],抑制性差减杂交技术(Suppression subtractive hybridization,SSH)^[3],cDNA 微点阵法(cDNA microarrays)^[4],基因表达的系列分析(Serial analysis of gene expression,SAGE)^[5,6]等。运用这些方法能够得到大量结直肠肿瘤差异表达的 ESTs(Expressed Sequence Tag),这是进行后续研究的基础,因此,对这些数据进行系统有效的分析显得非常重要。随着人类基因组计划的深入进展,有关核酸、蛋白质序列以指数级增长。国际上许多机构如美国国家生物技术信息中心(NCBI),欧洲生物信息学研究所(EBI)等都提供了大量的核酸和蛋白质序列信息,以及丰富的基于互联网的生物信息学资源。如何充分利用这些资源,避免重复劳动,可以更加快速地对我们的试验获得的 EST 数据进行高通量的系统分析。

为此,我们通过自行构建基于 Linux 操作系统的核酸序列自动分析平台,对本实验室通过 SSH 方法得到的 3 个结肠癌差减文库之一,差减 T-N 文库(105 个克隆),进行了系统地分析。

1 材料与方法

1.1 材料 SSH 研究对象来自浙江大学医学院附属医院结肠癌患者的肿瘤组织及远端正常

黏膜,经病理诊断证实为同时患有结肠腺癌和腺瘤。18 例结肠腺癌组织及其远端正常黏膜(其中有 6 例同时患有结肠腺癌和腺瘤的标本)用于半定量 RT-PCR 验证。所有组织标本在术后立即液氮冷冻,−80℃ 保存。部分组织制备成石蜡切片,常规病理确诊其病理类型。液氮冷冻的组织用 Trizol(Sangon, Shanghai)一步法抽提总 RNA,紫外分光光度法测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度,只有 A260/A280 在 1.8~2.0 的样本才进入下一步实验。

1.2 SSH 法筛选结直肠肿瘤差异表达基因和差减文库的建立 所用的试剂盒为 CLONTECH 公司的 PCR-select Differential Scree-ning Kit。按照试剂盒说明书进行操作。筛选出来的差异片段与 pGEM-T Easy Vector (Promega,USA) 连接后,转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(本实验室制备),经氨苄青霉素抗性和 X-gal、IPTG 蓝白筛选后,加等量的甘油保存于 −80℃^[7]。其中在正向消减杂交中,以腺癌组织 cDNA 为驱动者,正常组织 cDNA 为受检者,构建 T-N 文库;以腺瘤组织 cDNA 为驱动者,正常组织 cDNA 为受检者,构建 A-N 文库;以腺癌组织 cDNA 为驱动者,腺瘤组织 cDNA 为受检者,构建 T-A 文库。

1.3 差减文库测序 使用 MegaBACE1000 测序仪,DYEnamic ET Dye terminator Cycle Sequencing Kit 盒,20 μl 的反应体系中,引物 1 μl,DYEnamic ET Terminator reagent premix 8 μl,模板 0.2~2 μg。PCR 循环条件为 95℃,20 s;50℃,15 s;60℃,1 min;32 cycles。测序操作按 MegaBACE 1000 DNA 分析系统所提供的操作方法和流程。

1.4 基于 Linux 的核酸序列自动分析平台的构建^[8]

1.4.1 微机上 Linux 操作系统的安装及局域网的配置:我们选择 RedHat 9.0 版本的 Linux 操作系统。计算机硬件配置为:P4 1.8GB/512MB DDR266 RAM/200GB 7200RPM IDE 硬盘。

1.4.2 系列软件的获得及安装应用:从测序峰图到核酸序列的转换,以及序列拼接的系列软件 Phred/Phrap/Consed 和对本地的数据库

进行序列相似性分析的 BLAST 软件,均可通过 E-mail 与相应作者联系得到(表 1)。得到软件时,软件被打包成. tar、. bz2、. gz 压缩包, Linux 操作系统下的软件大多都是未编译过的,所以这些软件需要解压缩以后进行自行编译。方法是:进入软件包所在的目录,右键单击

软件包,选择解压到此处,然后打开终端,在终端中进入解压后软件所在的目录,依次输入./configure、./make、./ make install 即可完成安装过程。BLAST 软件包解压缩后即可直接使用。将所需要使用的应用程序都放入同一个目录 /bin/ 中,以方便今后的使用。

表 1 平台的主要构成软件及其获取途径
Table 1 Main softwares of the platform and the ways to get them

软件名称	安装路径	联系作者及地址	软件功能
phred	/home/howard/bin/	Brent Ewing: Bge@u.washington.edu	可将测序所得的峰图文件批量转换成核酸序列文件
phd2fasta	/home/howard/bin/	Brent Ewing: Bge@u.washington.edu	将核酸序列文件批量转换成 fasta 格式
cross _ match	/home/howard/bin/	Phil Green: Phg@u.washington.edu	去除载体序列
RepeatMasker	/home/howard/bin/	Arian Smit: asmit@nootka.mbt.washington.edu	去除重复序列如 Alu 等
phrap	/home/howard/bin/	Phil Green: Phg@u.washington.edu	完成序列拼接
blast	/home/howard/bin/	ftp://ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast_linux.tar.Z	已知序列与数据库比对软件

1. 4. 3 核酸序列数据库的获得及其格式化: 世界上三大核酸序列数据库, NCBI 的 GenBank 数据库, 欧洲生物信息学研究所 (European Bioinformatics Institute, EBI)所维护的 EMBL 数据库和日本国立遗传学研究所 (DNA Data Bank of Japan)的 DDBJ 数据库, 每天都交换数据以达到数据的及时更新和一致, 在 NCBI 的 ftp 上 (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov>)提供下载服务。我们用于核酸分析的数据库 nr00 和 nr01 即是从该地址远程登录下载得到的。

数据库在下载时都是以压缩包的形式存放的。在解压缩之后要对其进行格式化才能够使用, 具体格式化的方法如下: [howard@serverhoward]/home/howard/bin/formatdb -p F -o T -i /home/60GB/db/nr/ (/db/nr/为 nr 数据库保存路径)。其中参数“-p”后的“F”表示需要格式化的序列是核酸序列; 参数“-i”后为需要格式化的文件名。

1. 4. 4 本地化核酸序列分析平台的使用: 用 Phrep 将原始峰图文件转化成相应的质量控制文件, 用 Phd2fasta 将其转换成 Fasta 格式的核酸序列文件, 用 Cross _ match 去除载体,

RepeatMasker 去除重复序列。然后用 Phrap 将去除重复序列的最终序列进行拼接, 对拼接得到的 contigs 进行 Blast 比对本数据库, 得到最终的结果输出。上述步骤通过自行编写的一个 Shell 程序可以集合为一个命令, 实现整个过程的自动完成, 无需值守。若要修改软件运行参数或者数据库名称, 只需要修改 shell 程序内相应的参数和数据库路径即可。同时, 编写相应的 Perl 程序, 将分析得到的结果归类汇总成表格, 可以直接在 Window 操作系统的 Excel 方式打开。对本实验室的 3 个文库, 我们的参数设置为: 数据库选择 NCBI 的 nr 数据库中的 nt00、nt01, identity>90%, E-value<1E-10。

1. 5 半定量 RT-PCR 以 3 μ g 癌与相应正常组织总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA 第 1 链 (MBI Fermentas, Lithuania), 取 0. 2~0. 3 μ l 为模板, 以指数扩增期的循环数进行 PCR 扩增。以 G3PDH 作为内对照, 以“特异性基因的像素值/G3PDH 的像素值”作为标本中特异性基因的相对表达量, 比较同一病例腺癌与正常黏膜特异性基因相对表达水平。抽取 3 个感兴趣的基因进行研究, 半定量 RT-PCR 所用的引物序列见表 2。结果用 SPSS10. 0 统计学软件的

配对秩和方法进行分析。

表 2 半定量 RT-PCR 所用引物序列

Table 2 Primer sequences used in the semi-quantity RT-PCR		
Gene name	Sequence of primer	Length of product (bp)
G3PDH	sense: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	444
	antisense: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	
DIO2	sense: 5'-TTG CTC ATC CTA AAG TCA C-3'	298
	antisense: 5'-AGA TTC CAA CTT CCT CCT-3'	
THY	sense: 5'-TCA TTA CGA TTC GCC TGC TT-3'	161
	antisense: 5'-CCT CGC TTC GCT TTT CCT-3'	
XTP	sense: 5'-GGCAGC ACC AGT AGT CAA-3'	237
	antisense: 5'-GCC CTC CAT AAG AAC CTC-3'	

G3PDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;
DIO2: Homo Sapiens deiodinase, iodothyronine, type II;
THY: Homo Sapiens, thymosin, beta 4; XTP: Homo Sapiens HbxAg transactivated protein 2

表 3 T-N 差减文库搜索结果

Table 3 The homological search results of T-N subtracted library					
Contig	Gene names	Accession number	Score	e-value	Similarity
T-N					
Contig1	Homo sapiens mRNA for immunoglobulin lambda light chain	Y14738.1	924	0	98
Contig2	Homo sapiens cDNA: FLJ21280 fis, clone COL01884	AK024933.1	200	3.00E-48	91
Contig3	Homo sapiens HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1	NM_024610.2	343	3.00E-91	100
Contig4	Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds	M17733.1	562	e-157	98
Contig5	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	NM_001553.1	823	0	99
Contig6	Homo sapiens gene for thymosin beta-4	AJ295158.1	636	e-179	96
Contig7	Homo sapiens HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1	NM_024610.2	343	1.00E-91	100
Contig8	Homo sapiens, Similar to immunoglobulin lambda joining 3, clone MGC:45681 IMAGE:4851128, mRNA, complete cds	BC033102.1	559	e-156	96
Contig9	Homo sapiens, Similar to immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker), clone MGC:12848 IMAGE:4308411, mRNA, complete cds	BC006402.1	313	1.00E-82	99
Contig10	Homo sapiens BAC clone RP11-335G13 from 2, complete sequence	AC097500.3	321	8.00E-85	92
Contig11	Homo sapiens cDNA FLJ39987 fis, clone STOMA2000567	AK097306.1	474	e-131	98
Contig12	Homo sapiens type 2 iodothyronine deiodinase mRNA, complete cds and	AF093774.1	755	0	99
Contig13	Homo sapiens HBxAg transactivated protein 2 (XTP2) mRNA, complete cds	AF488829.1	1362	0	99
Contig14	Human mRNA for histocompatibility antigen HLA-DR (fragment).	V00523.1	684	0	99
Contig15	Homo sapiens, similar to anti TNF-alpha antibody light-chain Fab fragment, clone MGC:32715 IMAGE:4694346, mRNA, complete cds	BC034142.1	1334	0	97

2.3 半定量 RT-PCR 对 3 个基因的半定量 RT-PCR 验证,发现 thymosin,beta 4 基因在

2 结 果

2.1 差减文库的建立 经过 SSH,在差减 A-N、T-A 和 T-N 文库中分别筛选到大约 400、300 和 350 个菌落数,经过正向和反向的差减杂交及 Virtual Northern Blot^[7],取其中表达明显有差异的克隆进行后续的研究,A-N、T-A 和 T-N文库中分别含有 100、131 和 105 个克隆。

2.2 应用本地核酸自动分析平台对 T-N 文库的分析结果 对 T-N 文库的测序结果发现除个别空载体外,其插入片段大小不同,长度在 0.2~1.0 kb 之间。将测序所得的原始峰图直接在本 地核酸自动分析平台上分析。经过去除载体、重复序列和拼接后,得到了 15 个 contigs。将这些 contigs 与 nr00,nr01 核酸数据库进行 BLASTN 比对,结果见表 3。

结肠腺癌中高表达 ($P<0.05$),deiodinase, iodothyronine, type II 基因在结肠腺癌中较远

端正常组织表达有降低的趋势,HbxAg trans-activated protein 2 基因在结肠腺癌中较远端正常组织有表达增高的趋势,但是这两者在统计学上均无显著意义($P>0.05$),见图 1。对 6 例同时有正常黏膜、结肠腺瘤和腺癌组织的病例进行分析,发现这 3 个基因的表达都有从正常黏膜-腺瘤-腺癌逐步增高的趋势(图 2)。

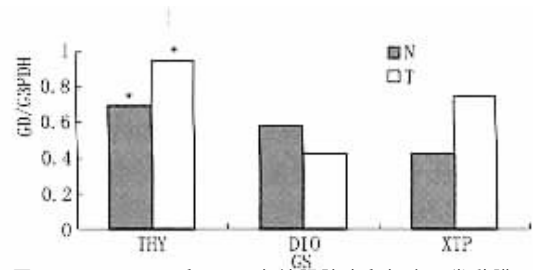


图 1 DIO2,THY 和 XTP 在结肠腺癌和相应正常黏膜中的表达情况

Fig. 1 Expression of DIO2, THY and XTP in the colon adenocarcinoma and corresponding normal mucosa

GS: Specific genes; DIO2: Homo Sapiens deiodinase, iodothyronine, type II; THY: Homo Sapiens, thymosin, beta 4; XTP: Homo Sapiens HbxAg trans-activated protein 2; N: Corresponding normal mucosa; T: Carcinoma of colon

* $P<0.05$

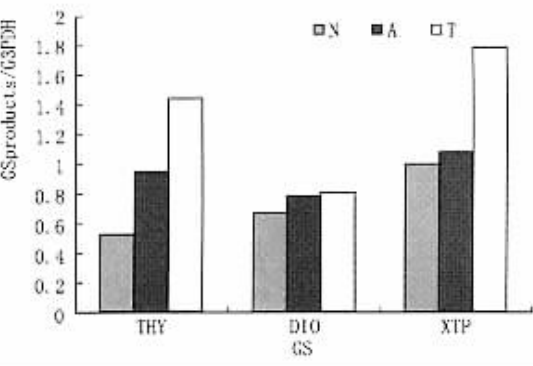


图 2 DIO2,THY 和 XTP 在 6 例腺癌、腺瘤和相应正常配对组织中的表达情况

Fig. 2 Expression of DIO2, THY and XTP in 6 cases of matched colon adenocarcinoma, adenoma and corresponding normal mucosa

GS: Specific genes; DIO2: Homo Sapiens deiodinase, iodothyronine, type II; THY: Homo Sapiens, thymosin, beta 4; XTP: Homo Sapiens HbxAg transactiva-ted protein 2; N: Corresponding normal mucosa; T: Carcinoma of colon

3 讨 论

生物学及医学领域中的许多问题的产生都与细胞之间基因的差异表达有关。目前,探索这些差异表达的基因,仍然是研究的热点所在。现有的多种分离差异表达基因的方法,如 DDRT-PCR、cDNA-RDA (代表性差异显示分析)、cDNA 微点阵法及 SAGE 法等,虽然也成功地分离了一些差异表达的基因,但都不同程度地存在对低丰度 mRNA 富集效率低、费时费力、假阳性率高等缺点。SSH 是一种以抑制 PCR 效应为基础的新的消减杂交技术,利用两种接头,选择性地扩增差异表达的靶片段,抑制非靶向片段的扩增,一般的实验室都可以开展,从而具有简便易行、灵敏度高、重复性好等诸多优点,具有广泛的应用前景^[9]。本实验室运用 SSH 法,在结肠腺瘤和腺癌组织而非细胞系中分离到差异表达的基因。相对于细胞系,组织还包含了肿瘤微环境的影响,能更全面地说明问题。3 个差减文库中筛选到的差异表达基因,来自同一患者的正常黏膜、腺瘤和腺癌之间的两两对照,既有利于差异片段的富集,又能提高富集片段的特异性。

对各种方法分离得到的差异表达基因片段,首先要明确其性质,即是否属于已知基因,位于已知基因的哪个部位。目前,广泛使用的基因比对策略是基于 Internet 通过公共核苷酸数据库,对筛选到的片段进行逐个比对。具体步骤为:在 Windows 环境下,利用 DNASTar 等软件,将测序峰图文件转换成 fasta 格式的序列文件,去除载体序列。然后应用 RepeatMasker 提供的在线服务 (<http://ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker.html>),去除片段中的重复序列,再逐条向 NCBI 的 BLAST 主页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>选择 BLASTn 中的 nr 数据库)递交,分析其与非冗余数据库(non-redundant database)中的 mRNA/cDNA 序列的相似性,将结果保存于本地机器。有些差异序列可能属于同一基因的不同片段位置,故对最后比对所得的结果还需进行归类汇总。这种方法虽然简单可行,但是如果需要分析的数据较多,过多的

重复劳动致使效率非常低。为此,我们构建了基于 Linux 的核酸序列自动分析平台。

Linux 系统与 Windows 系统相比,具有更加完善的内存管理机制、更加灵活的进程间通信机制、更加强大的安全性、自带的强大的网络服务器功能(Telnet、Web 服务器等),在作为科学研究使用上有着不可比拟的优势。Linux 因为其源代码的开放性,目前有非常多的版本可以选择,其中当属 Red Hat Linux 的使用范围最广,所提供的软件包也是最多的。因而我们选择了 RedHat 9.0。以 P4 1.8GB/512MB DDR266 RAM/200GB 7200RPM IDE 配置的 PC 机价格并不昂贵。以免费的 Linux 操作系统和低价位的 PC 机为基础,借助 Phrep/Phrap/Consed 系列软件和自行编译的 Perl 程序,利用常用的核酸序列数据库(如 GenBank),实现了大批量差异基因片段从测序峰图文件到核酸序列的转换和序列的拼接,以及序列比对等一系列过程的全自动分析。这种方法具有很多的优点,尤其是其数据处理的高通量和更快的处理速度(节省网络时间)、以及对重要数据的保密等,同时也避免了很多重复劳动。在中小型实验室的局域网中,还可以考虑将此平台移植到含有 Linux 操作系统的服务器中,开通 telnet 服务,利用 Linux 出色的多用户管理,组建小型局域网。本实验作为服务器的 PC 机为 Linux 操作系统,其余台式机均为 Window2000 操作系统,通过 100MB 交换机将这些电脑建成局域网,应用 Telnet 程序远程登录服务器,进行 Linux 下的数据操作和分析,还可以通过在 IE 栏中输入服务器的 IP 地址,将任意序列在本地服务器上的核酸或者蛋白质序列数据库进行检索,极大地扩大了序列同源性分析的自由度。

但是,利用本地 PC 机进行核酸序列自动分析,尚存在着不足之处。世界上三大核酸数据库(GenBank,EMBL,DBJ)之间每天交换数据,以保证能最大程度地涵盖数据信息。而提供下载的 NCBI 的 ftp 服务器上的数据库是每个月更新一次,因此就有可能遗漏最新的发现。而且由于各种软件算法的不同,其得出的结果也有可能存在着一定的偏差。但是就其总体来说,基于本地的核酸自动分析系统具有不可比拟的

高通量,高速度和保密性,而且可以推广到蛋白质的分析范围,只要拥有普通配置的 PC 机和能运用 Linux 操作系统的实验室都可以开展,非常有用。对其存在的不足,可通过结合基于 Internet 的核酸分析方法来弥补。

本实验室成功构建了基于 Linux 的本地化核酸自动分析平台,结合 SSH 方法,对筛选出来的差异表达基因进行了快速有效的分析和综合。经过去除载体、重复序列和拼接后,分别得到了 15 个 contigs,这些 contigs 经过 BLAST 比对,发现大部分已知基因均已被报道与肿瘤发生密切相关,还有一些基因在结肠癌的发生发展中以前从未提及,部分基因在现有的数据库中未找到同源匹配序列,如 contig2、contig11 等。这一发现提示了新基因存在的可能,也表明了结肠癌发生中值得进一步探索的空间还很大。

在筛选到的已知基因中,免疫球蛋白、人类组织相容性抗原 HLA 和胸腺素 β_4 及胰岛素样生长因子结合蛋白 7(IGFBP7)等,在差减 T-A、T-N 文库中被同时筛选到(数据未公布)。这些基因均已报道与肿瘤发生有密切相关^[10~14]。近年来的研究发现,上皮性肿瘤细胞也可以表达 Ig 或 Ig 样物质,如乳腺癌细胞、结肠癌、肝癌细胞等^[10]。Cao 等^[15]利用减式杂交技术,也分离到多个结肠癌负相关基因片段,对其中一个新基因 SNC73 cDNA 分析比较,发现与 IgA1 高度同源,正常黏膜中该基因的表达远高于相应的结肠癌组织。原位杂交检测显示,SNC73 基因的表达定位于正常黏膜上皮细胞,而非间质的其他细胞。众所周知,在正常机体内,免疫球蛋白是 B 淋巴细胞特有的产物,机体的其它细胞不产生 Ig,并且细胞内也未发现 Ig。因此,这一现象值得进一步研究:Ig 或 Ig 样物质是否的确可以由上皮细胞产生?不同的 Ig 在正常黏膜上皮及相应的肿瘤中表达有何差异?这种表达在上皮性肿瘤特别是结直肠癌的发生发展中起什么作用?在筛选到的众多基因中,胸腺素 β_4 、XTP 的表达经过半定量 RT-PCR 验证,发现有从正常-腺瘤-腺癌逐渐增高的趋势。胸腺素 β_4 在差减 T-A、T-N 文库中被多次筛选到。Wang 等^[16]发现,胸腺素 β_4 高表达的结肠癌细胞系 SW480 的形态和细胞内

actin 的骨架发生了改变;通过 E-cadherin 的细胞间黏附力下降,而在培养基中形成集落的能力增强;细胞生长速率明显增加,可能与 β -catenin 介导的 c-Myc 基因的激活有关。这些发现提示,胸腺素 β_4 可能是结肠肿瘤发生发展中的一个晚期事件。甲状腺脱碘酶 (iodothyronine, DIO) 有 3 个异构体 (isoform): DIO1、DIO2 和 DIO3。DIO2 主要的功能是通过对甲状腺素 T₄ 的 5' 脱碘而调节人血浆中甲状腺素 T₃ 的浓度,此外还参与甲状腺细胞的分化过程。有文献报道,在垂体腺瘤中有 DIO 酶的异常表达,其 mRNA 的表达被认为与 TSH 分泌型垂体腺瘤不受甲状腺素负反馈有关^[17]。在差减 T-N 文库中筛选到该基因,是我们首次发现其在结肠肿瘤中差异表达。究竟是 DIO2 在结肠肿瘤中担任什么样的角色,它是否参与了结肠肿瘤的进程,还是与其相似结构域的其他基因的作用? 甲状腺素的水平跟结直肠癌是否相关? 这些都有待于进一步研究证明。XTP 是 2002 年新发现的一个功能尚不清楚的基因,有报道在正常膀胱上皮不表达,但是在大于 30% 的膀胱肿瘤中明显高表达^[18]。该基因位于 1q23-24, 预测编码 2701 个氨基酸组成的蛋白,具体的功能未知。鉴于多数分离到的已知基因与恶性表型间的关系,我们推测这些全新的基因也与肿瘤的发生发展相关,需要进一步明确的是,它们的表达是否在结肠肿瘤的进展中起普遍的作用,可否作为有效的肿瘤标记或者肿瘤抗原。

在过去的 50 年中,人们主要着重于单个基因在癌与相应正常组织中的表达差异分析,很少对癌细胞的基因表达作出综合的分析,但是肿瘤的进展是多步骤多基因共同作用的结果。一方面不同的癌之间有差异,另一方面,不同的癌间又有共性的东西。在本实验中,筛选到的基因除了一些已知的癌中高表达的基因外,还包含一些以前从未在结肠肿瘤中发现的基因,甚至是全新的基因,表明不同的癌的发生,可能具有特定的模式。基因彼此间相互作用所形成的局域网,可能既具有个体的特异性,又具有肿瘤类型甚至细胞的特异性。系统性的分析差异表达基因,进一步发现各种基因彼此间的关系,无

疑对肿瘤的诊断、治疗和预防都将具有十分深远的意义和重要的开发价值。

References:

- [1] LAI Mao-de (来茂德). Molecular mechanism of colorectal carcinogenesis [J]. **Journal of Practical Oncology** (实用肿瘤杂志), 2000, 15(2): 73—78. (in Chinese)
- [2] LIANG P, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. **Science**, 1992, 257(5072): 967—971.
- [3] DIATCHENKO L, LAU Y F, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1996, 93(12): 6025—6030.
- [4] SCHENA M, SHALON D, DAVIS R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. **Science**, 1995, 270(5235): 467—470.
- [5] VELCULESCU V E, ZHANG L, VOGELSTEIN B, et al. Serial analysis of gene expression [J]. **Science**, 1995, 270(5235): 484—487.
- [6] LASH A E, TOLSTOSHEV C M, WAGNER L, et al. SAGEmap: a public gene expression resource [J]. **Genome Res**, 2000, 10(7): 1051—1060.
- [7] ZHANG Cheng-gang, HE Fu-chu (张成岗, 贺福初) eds. **Bioinformatics Method and Practice** (生物信息学方法与实践) [M]. Beijing: Science Press; 2002, 257—274. (in Chinese)
- [8] LUO M J, LAI M D. Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon [J]. **World J Gastroenterol**, 2001, 7(5): 726—731.
- [9] LUO Min-jie (罗敏捷). Introduction of suppression subtractive hybridization [J]. **Foreign Medical Sciences: Clinic Biochemistry & Medical Test** (国外医学·临床生物化学与检验学分册), 2000, 21(5): 252—253. (in Chinese)
- [10] QIU Xiao-yan, YANG Gui-zhen (丘晓彦, 杨贵贞). Character of the Ig-like material in malignant tumor cells and the analysis of the gene structure [J]. **Chinese Journal of Immunology** (中国免疫学杂志), 1996, 12(5): 295—295. (in Chinese)
- [11] SCHMITT A O, SPECHT T, BECKMANN G, et al. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumor tissues [J]. **Nucleic Acids Res**, 1999, 27(21): 4251—4260.

(下转第 124 页)

病理学参数间,没有发现具有统计意义的相关性。

3 讨 论

Catenins 是一组与钙粘蛋白(cadherin)在细胞膜内起作用的粘附蛋白,包括 α 、 β 、 γ 等几种。其中 β -catenin 是原癌基因编码的蛋白质,具有高度保守性。 β -catenin 在细胞内有两种功能:其一是通过影响细胞的粘附性、运动性而影响组织形态结构的发生;其二是 Wnt 信号通路中的重要成分^[2]。在正常上皮细胞中, β -catenin 的水平极低,主要分布于细胞与细胞接触间的细胞膜上,APC 基因和(或) β -catenin 基因的突变使得 β -catenin 蛋白的浓度升高,并异位聚集于细胞浆和细胞核上^[3,4]。我们研究的结果表明,在正常黏膜及癌旁黏膜中, β -catenin 阳性染色主要位于细胞膜,局部胞浆淡染,但在腺癌(瘤)中,其阳性染色主要位于细胞浆,并有部分细胞核阳性的出现,而细胞膜的阳性却明显下降,并且膜与膜之间的连接模糊不清。这也说明了 β -catenin 的异常表达参与了结直肠癌的发生过程。

通过对结果的分析, β -catenin 在胞浆的阳性表达率与分化程度相关,分化程度越高,其阳性表达率越高,在高、中、低分化腺癌中,其阳性率分别为 100%、95.5%、68.8%。这与 Takayama 等^[5]的研究结果一致。另外,我们还发现,虽然腺癌的胞浆阳性率与 Dukes 分期无

显著差别,但 B/C 期的阳性表达程度明显高于 A 期,两者比较的差别有显著意义,提示 β -catenin 的表达程度与浸润深度有关,越靠近浆膜层,其阳性表达程度越高。因此,检测 β -catenin 在细胞中的定位,可为患者的预后估计提供參考。

References :

[1] HUANG ZHI-DA, LAI MAO-DE(黄智达,来茂德). Molecular mechanisms of colorectal adenomagenesis [J]. **Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology** (临床与实验病理学杂志),1999,15(3):235—237. (in Chinese)

[2] LAI MAO-DE(来茂德). β -catenin and related factors in colorectal tumorigenesis [J]. **Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology** (临床与实验病理学杂志),2000,16(5):412—414. (in Chinese)

[3] VALIZAD A, KARAYIANNAKIS AJ, EL-HARIRY I et al. Expression of E-cadherin-associated molecules (α -, β - and γ -catenins and p120) in colorectal polyps [J]. **Am J Pathol**, 1997,150 (6):1977—1984.

[4] KOBAYASHI M, HONMA T, MATSUDA Y et al. Nuclear translocation of β -catenin in colorectal cancer [J]. **Br J Cancer**, 2000,82(10):1689—1693.

[5] TAKAYAMA T, SHIOZAKI H, DOKI Y, et al. Aberrant expression and phosphorylation of β -catenin in human colorectal cancer [J]. **Br J Cancer**, 1998,77 (4):605—613.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 101 页)

[12] JIANG Z, XU M, SAVAS L, et al. Invariant chain expression in colon neoplasms [J]. **Virchows Arch**, 1999, 435(1):32—36.

[13] YAMAMOTO T, GOTOH M, KITAJIMA M, et al. Thymosin beta-4 expression is correlated with metastatic capacity of colorectal carcinomas [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1993, 193(2):706—710.

[14] UMEDA F, ONO Y, SEKIGUCHI N, et al. Increased mRNA expression of a novel prostacyclin-stimulating factor in human colon cancer [J]. **J Gastroenterol**, 1998, 33(2):213—217.

[15] CAO J, CAI X, ZHENG L, et al. Characterization of colorectal-cancer-related cDNA clones obtained by

subtractive hybridization screening [J]. **J Cancer Res Clin Oncol**, 1997, 123(8):447—451.

[16] WANG W S, CHEN P M, HSIAO H L, et al. Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells [J]. **Oncogene**, 2003, 22(21):3297—3306.

[17] TANNAHILL L A, VISSER T J, MCCABE C J, et al. Dysregulation of iodothyronine deiodinase enzyme expression and function in human pituitary tumours [J]. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 2002, 56(6):735—743.

[18] HUANG W C, TAYLOR S, NGUYEN T B, et al. KIAA1096, a gene on chromosome 1q, is amplified and overexpressed in bladder cancer [J]. **DNA Cell Biol**, 2002, 21(10):707—715.

[责任编辑 张荣连]