

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体^[2,4]。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)^[5-6]。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 α 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用^[7],表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行临闯肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静, 刘彦仿, 杨守京, 孙志伟, 乔庆, 张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF α 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8: 616-620
- 3 陈惠鹏. 医药生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟, 刘彦仿, 袁清安, 俞伟源, 黄翠芬, 马兰花, 于继云. 抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 α 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保, 南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510
国家自然科学基金资助项目, No.39970825
项目负责人: 南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平^[1]。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面^[2-4]。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。

标本切除后立即置于液氮,冻存备用。TRIzol 试剂购自 Life Technologies 公司, dNTP 购自 Promega 公司; Taq 酶购自上海生物工程服务公司; 逆转录酶及缓冲液购自 Gibco 公司; 荧光素 3 标记的脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy3 dUTP)、荧光素标记的 5 脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy5 dUTP) 购自美国 Amersham Pharmacia 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。芯片类型(微芯公司基因表达谱芯片 CSC-GE-80), Gen III Microarray Spotter 芯片点样仪购自 Amersham Pharmacia 公司; 恒温杂交箱购自 Shellab 公司; 芯片扫描仪购自 Amersham Pharmacia 公司; 聚合酶链反应(PCR)仪购自 MJ Research 公司; 扫描图像显示用软件为 ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd); 扫描图像分析用软件为 ArrayVision (Imaging Research, Ltd)。芯片实验数据分析软件为 MIDAS(Chipscreen Biosciences, Ltd)。

1.2 方法 按一步法抽提、纯化大肠癌及正常大肠组织的总 RNA。用无 RNA 酶的三蒸水溶解沉淀, 紫外分光分析及电泳检测显示, 获得高质量的总 RNA。参照 Draghici *et al*^[9] 方法进行逆转录标记 cDNA 探针并纯化。在链合成中掺入荧光素标记的 dUTP, 用 Cy3 dUTP 标记正常组织 mRNA, 用 Cy5 dUTP 标记大肠癌组织 mRNA。检测标记的荧光含量。用分光光度计检测 260 nm, 550 nm, 650 nm 时的 A 值, 然后计算出荧光含量。将标记好的探针(Cy3/Cy5)按等量混匀, 溶解在 30 μ L 的杂交缓冲液中。将芯片和杂交混合探针分别置于 95 $^{\circ}$ C 双蒸水浴中变性 5 min, 立即将混合探针加在芯片上, 封片(不能留有气泡), 置杂交舱, 密闭, 42 $^{\circ}$ C 孵箱恒温杂交 16 h, 洗片, 晾干。玻片完全干燥后, 放入扫描片夹中, 利用扫描仪进行扫描; 扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号, 随后进行数据分析和处理。用以下 3 个条件作为判定基因差异表达的标准: (1) Cy3 和 Cy5 信号的比值相差 2 倍(上调 Cy3/Cy5 >2.0 或下调 <0.5)以上; (2) Cy3 或 Cy5, Cy3 和 Cy5 信号值其中之一必须 >600; (3) 聚合酶链反应实验结果良好。同时要求筛选出的内对照基因表达数据在所有标本中重复^[6-9]。

2 结果

大肠癌组织 A_{260}/A_{280} 值达 1.85, 而癌旁正常肠黏膜组织的 A_{260}/A_{280} 值 1.96, 电泳结果证实高纯化的总 RNA。部分基因芯片杂交结果及所有基因点 CY3/CY5 信号强度散点图(图 1, 2)。用微矩阵基因芯片筛选 4 例大肠癌和癌旁正常肠黏膜组织的差异表达的基因, 按照我们的数据筛选标准, 芯片结果中有 1 807 个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有 936 个, 最有显著性上调的有 36 个; 下调表达的基因有 871 个, 最有显著性下调的有 30 个。筛选出的有显著差异性的基因按照功能进行分类可以发现他们涉及到细胞生长的各个方面, 包括细胞增生, 细胞凋亡, 细胞代谢以及细胞骨架结构, 同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达

变化。这反映了肿瘤生长过程涉及到各方面的基因表达变化。

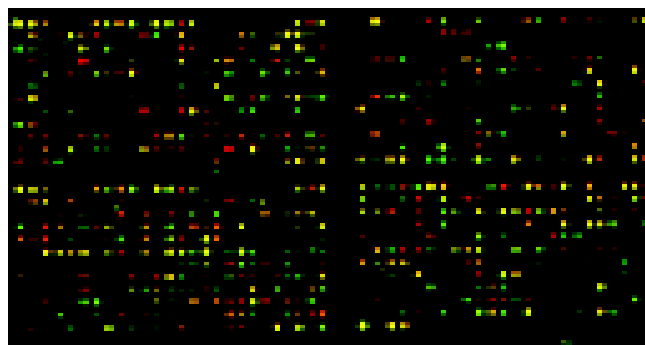


图1 部分基因芯片杂交双色荧光标记叠加图。Cy3 标记正常大肠黏膜的总 RNA 作为对照组, Cy5 标记大肠癌的总 RNA 作为实验组, 分别与芯片杂交后进行双色荧光叠加。对于某一点的两种叠加荧光信号, 如果 Cy3 信号较强, 该点多显示绿色(下调); 如果 Cy5 信号较强, 该点多显示红色(上调); 如果强度相似, 即显示黄色。

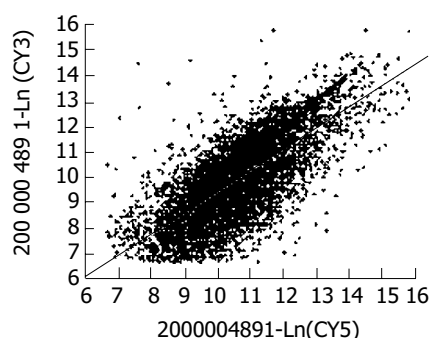


图2 所有基因点 CY3/CY5 杂交信号强度散点图。X 轴、Y 轴分别以 Cy3 荧光强度值和 Cy5 荧光强度值为坐标, 每一个数据点代表芯片上一个基因杂交信号。

3 讨论

我们采用的微矩阵基因芯片是以微芯基因科技公司的 8 000 条基因为靶基因, 制备成 cDNA 芯片, 以临床切除的大肠癌及正常大肠黏膜标本为研究对象, 对这两种组织总 RNA 逆转录产生的 cDNA 进行杂交检测, 寻找和筛查大肠癌相关基因, 探讨大肠癌在发生、发展过程中各种基因的表达变化, 为大肠癌的早期诊治提供理论依据。软件统计分析微矩阵扫描结果提示, 大肠癌发生中有众多基因发生了分子生物学改变(个体差异存在不同), 其中有 1 807 个基因发生了显著性变化, 上调表达的基因有 936 个, 最有显著性上调的有 36 个; 下调表达的基因有 871 个, 最有显著性下调的有 30 个。而且发现在大肠癌的发生、发展中有类基因的参与, 他们涉及到细胞生长的各个方面, 包括细胞增生, 细胞凋亡, 细胞代谢以及细胞骨架结构, 同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达变化。证实大肠癌中基因改变的多样性, 进一步推断肿瘤的发生、发展是一多基因、多阶段过程^[10-12]。

由于肿瘤部位所包含的细胞类型的多样性, 使得人们在解释这些相关基因的表达变化与肿瘤中特定细

胞类型的表型变化的相关性时遇到一定的困难.但是对于那些有非常明显变化的基因和主要的细胞类型间的相关性仍然可以在进一步的研究中得到明确^[13-15].我们按照相关的功能挑选了部分基因可以看出一些与肿瘤相关的基因表达变化,如细胞凋亡相关基因的下调表达,但是同时也注意到一些细胞凋亡启动基因的表达上调,这其中可能反映了肿瘤对抗细胞凋亡的内在机制^[16-17];而在原癌基因方面,大部分发生了表达上调,但是也有部分表达下调,这可能与不同原癌基因在不同肿瘤发生中的作用不同有关;其他如细胞骨架蛋白相关基因的表达变化则与肿瘤细胞的生长和转移特性密切相关^[18].

4 参考文献

- 1 南清振,高蕾,杨希山,肖冰,周京旭,张亚历,施理. mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因. 第一军医大学学报 2001;21:258-261
- 2 纪冬,成军,刘妍,王建军,郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:1707-1711
- 3 岑辉,唐小萍,韩英,曾晓,吴岚军,方永明. 低密度基因芯片的性能与应用. 中国医学检验杂志 2004;5:8-11
- 4 Man XB, Tang L, Qiu XH, Yang LQ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. Expression of cytochrome P4502E1 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1565-1568
- 5 Draghici S, Kulaeva O, Hoff B, Petrov A, Shams S, Tainsky MA. Noise sampling method: an ANOVA approach allowing robust selection of differentially regulated genes measured by DNA microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:1348-1359
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062
- 7 成军,刘妍,洪源,王建军,杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 8 刘妍,成军,王春花,杨倩,王建军,纪冬. 基因表达谱芯片技术筛选XTP4基因转染细胞差异表达基因. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:209-213
- 9 Li SR, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003;35:327-336
- 10 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 11 潘胜武,孙安乐,刘变英,崔大祥,闫小君,栗彤,雷宇锋,王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1431-1432
- 12 Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes'B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:263-271
- 13 陈尧,周总光. 基因表达谱芯片在筛选直肠癌转移相关基因中的应用. 中华胃肠外科杂志 2004;7:137-139
- 14 Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J. Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e13
- 15 Skubitz KM, Skubitz AP. Gene expression in aggressive fibromatosis. *J Lab Clin Med* 2004;143:89-98
- 16 Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84:320-331
- 17 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 18 Ognjanovic S, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD. The effects of pre-B-cell colony-enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1187-1195

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化

邢晓静, 官月华, 袁媛

邢晓静, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关项目资助, No. 2001BA703B06(B)
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路 92 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.com.edc.cn
电话: 024-23256666-6153
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨血清骨桥蛋白(osteopontin, OPN)水平与慢性萎

缩性胃炎之间的关系。

方法: 慢性萎缩性胃炎患者 42 名, 正常人 38 名, 胃癌患者 42 例应用酶联免疫技术(ELISA 法)检测血清 OPN 表达情况。

结果: 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 水平($25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$) 低于正常人($41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$), 低于胃癌患者血清 OPN 水