

· 实验研究 ·

胆管癌全基因组表达差异的初步观察

田志刚 徐 智* 张 亮^① 李晓红^① 凌晓锋 任永红^① 侯纯升 王姝杰^① 王立新 修典荣
宋士兵 张同琳 周孝思

(北京大学第三医院普通外科, 北京 100083)

【摘要】 目的 通过比较肝门部胆管癌与胆总管中下段癌的全基因组表达差异, 进一步揭示胆管癌发生、发展的内在分子机制。方法 采用含 21 329 条 Oligo DNA 的人类全基因组寡核苷酸芯片, 对 3 例肝门部胆管癌与正常胆管配对检测差异表达基因, 另取 4 例胆总管中下段癌标本与正常胆管配对检测差异表达基因, 通过 SAM 分析, 得到两者间差异表达基因, 并采用实时定量 RT-PCR 验证芯片结果。结果 肝门部胆管癌与胆总管中下段癌之间基因表达既存在共性, 又存在差异。与正常胆管组织相比, 两者共同上调基因 244 条, 共同下调基因 399 条; 而两者差异表达基因共 82 条 ($\text{ratio} \geq 2.0$ 或 ≤ 0.5)。通过 SAM 分析 ($q = 0$), 两者显著差异表达基因共 40 条, 其中上调基因 29 条, 下调基因 11 条, 包括 AREG、EPHA2、SPP1、PACE4 等。结论 高通量的基因芯片技术能够筛选出大量的胆管癌差异表达基因, 肝门部胆管癌与胆总管中下段癌的基因表达亦存在着明显的聚类性质差别。

【关键词】 肝门部胆管癌; 胆总管中下段癌; 全基因组寡核苷酸芯片; AREG; SPP1

中图分类号: R735.8

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2007)05-0480-06

Preliminary observations of differentially expressed genes in cholangiocarcinoma Tian Zhigang*, Xu Zhi*, Zhang Liang, et al. * Department of General Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To analyze differentially expressed genes between hilar and distal cholangiocarcinoma and to clarify the molecular mechanism of tumorigenesis. Methods Gene-expression profiles of 3 samples of hilar cholangiocarcinoma and 4 samples of distal cholangiocarcinoma were analyzed using oligo microarray containing 21 329 genes. The differentially expressed genes between the two groups were analyzed using the Significance Analysis of Microarrays (SAM) in order to get the specifically differentially expressed genes. The gene expression presence was verified by real-time PCR (RT-PCR). Results A total of 725 genes of cholangiocarcinoma was regulated significantly compared to normal bile duct. Of them, 244 genes were upregulated and 399 genes were downregulated in both groups; on the other hand, 82 gene expressions between hilar and distal cholangiocarcinoma had significant differences ($\text{ratio} \geq 2.0$ or ≤ 0.5). The SAM analysis showed that 40 genes, including AREG, EPHA2, SPP1, PACE4, and so on, were identified as differentially regulated between the two groups ($q = 0$). Conclusions These data are helpful for a better understanding of the tumorigenesis of cholangiocarcinoma and contribute to the development of diagnostic and therapeutic strategies. The gene expressions between hilar and distal cholangiocarcinoma are significantly different, which suggests that the two tumors have different molecular mechanisms of tumorigenesis.

【Key Words】 Hilar cholangiocarcinoma; Distal cholangiocarcinoma; Oligo microarray; AREG; SPP1

肝外胆管癌是指发生于左右肝管及其汇合部直至胆总管下段的肝外恶性肿瘤, 根据肿瘤位置不同, 又分为肝门部胆管癌及胆总管中下段癌。肝门部胆管癌或称高位胆管癌, 是指发生于左右肝管及其汇合部的恶性肿瘤, 又称为 Klatskin 瘤, 占肝外胆管癌的 58% ~ 75%^[1]。由于胆管癌发病隐匿, 确诊时多为晚期, 尤其肝门胆管癌的特殊解剖关系, 胆管癌的手术切除率及切净率均较低^[2]。肝门部胆管癌与胆总管下段癌部位不同, 治疗方式、预后存在巨大差异, 为了能够明确两者之间分子生物学机制是否存在差异, 揭示肿瘤发生、发展的不同特性, 同时为分子生物学治疗提供实验依据, 本文比较肝门部胆管

癌与胆总管中下段癌的基因表达的异同。

1 材料与方法

1.1 一般资料

试验分 2 组。A 组为我院 2005 年 10 月 ~ 2006 年 6 月手术切除, 病理证实的肝门部胆管腺癌标本 3 例, B 组为我院 2005 年 10 月 ~ 2006 年 6 月手术切除, 病理证实的胆总管中下段胆管腺癌标本 4 例, 由于临床正常胆管组织难以取得, 故对照来自肝移植受体(非癌)相对正常肝门部胆管组织 3 例, 所有标本均在离体后半小时内液氮保存备用。病例资料见表 1。为消除对照样本个体差异, 对照标本采用

* 通讯作者

① (生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206)

万方数据

Trizol 提取组织总 RNA 后混合为一个样本作为统一对照。

表 1 胆管癌标本一般情况

编号	性别	年龄	肿瘤位置	肿瘤大小(cm)	病理分化程度
C1	女	74	肝门部	12×7	低分化
C2	男	65	肝门部	13×6×5	中低分化
C3	男	46	肝门部	12×8	中分化
C4	男	56	胆管下段	3×2	中低分化
C5	女	61	胆管中下段	5×4	中低分化
C6	男	63	胆管下段	3×3	中分化
C7	男	59	胆管下段	3×3	中分化

1.2 实验基本过程

1.2.1 芯片来源

芯片采用北京博奥公司 22K 人类全基因组寡核苷酸芯片, Oligo 基因芯片由博奥生物芯片国家工程中心提供, 共有 21 329 条 70 mer 长度的寡核苷酸, 每条寡核苷酸代表人的一个基因, 核苷酸序列购自美国 Qiagen 公司。整个芯片实验的详细过程参见文献^[3]。

1.2.2 组织块总 RNA 的提取和测定

采用 Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 一步法提取组织块或细胞中的总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 并进一步采用 NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总 RNA 进行过柱纯化, 测定浓度和 OD_{260/280}, 并电泳检测 RNA 的完整性。RNA 分光光度计进行 RNA 定量时, OD_{260/280} 在 1.8~20 之间, 甲醛变性凝胶电泳 28S 和 18SrRNA 比值在 2.0 左右。

1.2.3 样品 RNA 荧光标记

取 5 mg 总 RNA, 作为模板反转录合成双链 DNA, 进一步体外扩增合成 cRNA, 随机引物反转录并使用 dCTP-Cy3 和 dCTP-Cy5 (GE healthcare) 进行标记。对照和胆管癌标本分别标记 Cy3 和 Cy5, 每对样品同时做荧光交换。

1.2.4 杂交、清洗及扫描

标记的 DNA 溶于 30 ml 杂交液中 (3×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhart's, 25% 甲酰胺), 于 42℃ 杂交过夜。杂交结束后, 先在 42℃ 左右含 0.2% SDS, 2×SSC 的液体中洗 5 min, 而后在 0.2×SSC 中室温洗 5 min。甩干后用晶芯 LuxScan 10K 微阵列芯片扫描仪 (CapitalBio) 双通道扫描仪扫描获得芯片杂交图。

1.3 数据分析

Genepix pro 4.0 软件 (Axon) 提取芯片数据, 然后用 Lowess 回归进行芯片数据归一化处理, 计算基因的比值 (Cy5/Cy3), 在挑选差异基因的标准时, 目前的趋势是把变化的倍数 (生物学意义) 和可信度 P 值 (统计学意义) 结合起来决定是否差异表达的基因^[4]。由于在此实验中, 我们每一个癌组织和对照组织做了 2 张荧光交换的芯片, 因此对于一对样品来说, 不能进行 student's one sample t-test 计算得到 P 值。考虑到在用同样的芯片平台所做过的

万方数据

实验中, 例如把同一份 RNA 样品进行多次 self-to-self 的芯片测试以决定芯片检测的灵敏度和精确性, 发现生物学意义的 2 倍预值一般都是 $P < 0.05$ 的, 因此在本研究中以 Cy5/Cy3 比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 分别作为显著性上调或显著性下调, 找出各对标本的差异表达基因, 最后各个胆管癌标本和正常对照的差异表达基因取交集, 就是胆管癌和正常胆管组织的差异表达基因。对这些差异表达基因进行 CLUSTER 和 TREEVIEW 分析^[4], 发现肝门部胆管癌与胆总管中下段癌存在明显的聚类性质的不同。对这些组间不同差异基因进一步做置信度分析 (Significance Analysis of Microarrays, SAM)^[5,6], 筛选肝门部胆管癌的特异性差异表达基因。

1.4 实时定量 RT-PCR 验证分析

在剩余 3 例胆总管中下段癌及对照 RNA 样本中行荧光定量实时 RT-PCR 验证芯片实验的准确性。分别选取胆管癌上调基因 SERPINB5 与下调基因 SCGB3A1, 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照。引物序列如下: Maspin (SERPINB5), 上游 5'-ACTCGCACAGGGATTCTCAC-3', 下游 5'-GCTTGCCATCTAAAGTAACTAAAC-3'; HIN-1 (SCGB3A1), 上游 5'-ATAGAGGGCTCCAGAAGTG-3', 下游 5'-CTCAGGTGTAGATGCTCCAGT-3'; GAPDH, 上游 5'-TGTTGCCATCAATGACCCCTT-3'; 下游 5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3'。实验步骤简述如下: 用 RNA free DNase I 处理 (Takara) 实验体系 37℃ 反应 30 min, 然后用苯酚/氯仿处理, 添加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠, 用 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀 RNA, 以 70% 乙醇清洗, 干燥后溶于适量 DEPC 水中。然后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测经过 DNase I 处理后 RNA 的质量。以上述经过 DNase I 消化的 RNA 为模板, PCR 检测基因组 DNA 的消化情况。取 2.5 μg 总 RNA 反转录形成 1st-cDNA (Superscript II, Invitrogen)。使用 Light Cycler PCR 仪 (Roche, PTC-225), Lightcycler-faststart DNA master SYBR green I (Roche) 进行实时定量 RT-PCR 扩增。条件为镁离子浓度 3 mmol/L, 引物浓度 0.25 μmol/L, 95℃ 变性 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 5 s, 72℃ 15 s, 重复 40 个循环; 75~95℃ 绘制溶解曲线。电泳检测 PCR 扩增情况。采用比较阈值法对实时定量 RT-PCT 结果进行定量分析。

2 结果

2.1 胆管癌基因表达谱变化

分别筛选在肝门部胆管癌 (A 组) 和胆总管中下段癌 (B 组) 患者中存在显著变化 (Cy5/Cy3 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5) 的基因进行分层聚类分析并使用 TREEVIEW 软件查看。可见两者之间既存在共性, 又存在差异。与正常胆管组织相比, 两者共同上调基因 244 条, 共同下调基因 399 条; 而两者差异表达基因 A 上调而 B 下调者 50 条, B 上调而 A 下调者 32 条 (图 1)。这些基因均为胆管癌相对正常组织发生显著变化的基因, 涉及多种细胞功能如细胞骨

架构成、细胞膜组成、促血管生成、细胞黏附、信号转导、细胞运动、转录、分子伴侣活性、蛋白激酶活性和受体结合等。

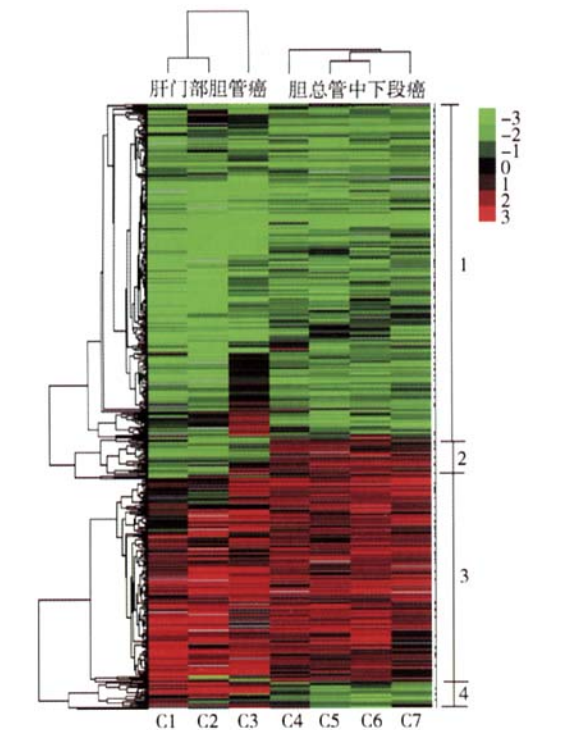


图 1 胆管癌 725 条差异表达基因的聚类分析 其中横排为差异表达基因,纵列为不同患者。红色表示与正常胆管基因比较表达上调,绿色表示表达下调,黑色表示表达无变化。其中肝门部胆管癌患者(A)为前 3 列,胆管中下段患者(B)为后 4 列,1 为 A 与 B 共同下调基因 399 条,2 为 A 下调而 B 上调基因 50 条(图 2),3 为 A 与 B 共同上调基因 244 条,4 为 A 上调而 B 下调基因 32 条(图 3),可见肝门部胆管癌与胆总管中下段癌基因表达亦存在着明显的聚类性质不同。

2.2 肝门部胆管癌与胆总管中下段癌差异表达基因

通过聚类分析发现,肝门部胆管癌与胆总管中下段癌 82 条基因存在着显著的聚类性质差别(图 1),分别位于 2(图 2)与 4 部分(图 3),两者的基因呈现完全相反的表达趋势。进一步用 SAM 软件比较分析肝门部胆管癌与胆总管中下段癌基因表达分析,得到差异表达基因 40 条($q=0$),其中显著上调基因 29 条(表 2),下调基因 11 条(表 3)。这些基因参与了多种分子功能,如细胞增殖(CXCL1、AREG、TCF8),信号转导(CCL11、EPHA2、GDF15、NR4A2),细胞黏附(SPP1、TNC、CCL11),基因转录(AK024106、NR4A2、CCNL1)等。

2.3 实时定量 RT-PCR 结果

1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示(图 4),得到的扩增片段大小与预期结果一致,电泳条带整齐,亮度高,可见基因扩增效率好,特异性高。芯片结果与 RT-PCR 结果吻合程度好($P=0.007$),芯片结果真实可信(表 4,图 5)。

万方数据

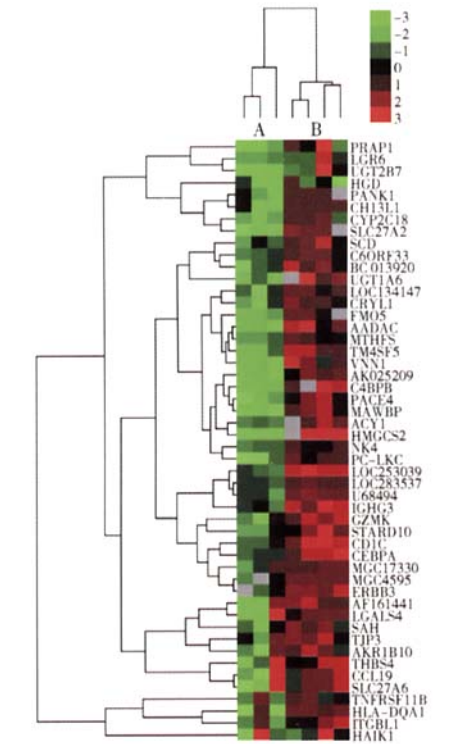


图 2 肝门部胆管癌(A)显著下调而胆管中下段癌(B)显著上调的基因的聚类分析

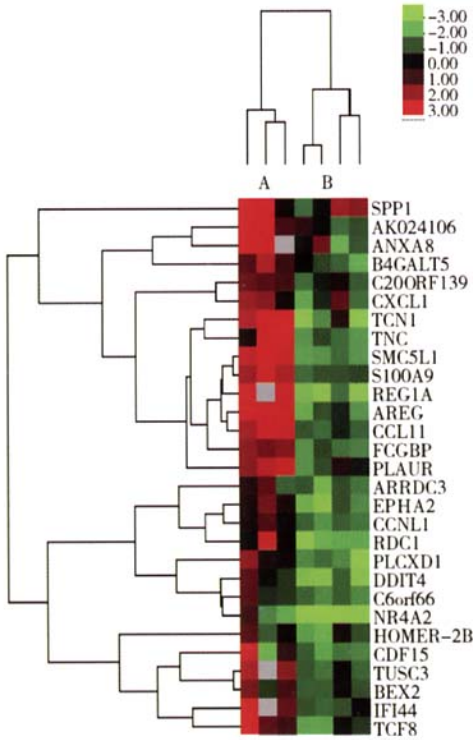


图 3 肝门部胆管癌(A)显著上调而胆管中下段癌(B)显著下调的基因的聚类分析

表 2 SAM 分析后肝门部胆管癌显著上调而胆管中下段癌显著下调 29 条基因 (按变化倍数降序排列)				
编号	基因名称	Gene bank 编号	表达产物	变化倍数
1	REG1A	NM_002909	胰石蛋白	510.16
2	TCN1	NM_001062	钴胺素传递蛋白 I	297.75
3	TNC	NM_002160	固生蛋白 C	139.81
4	AREG	NM_001657	双调蛋白	104
5	SMC5L1	AB011166	KIAA0594 蛋白	84.67
6	CCL11	NM_002986	嗜酸细胞活化趋化因子 11	56.77
7	RDC1	U67784	G 蛋白偶联受体	47.5
8	SPP1	NM_000582	骨桥蛋白	46.09
9	S100A9	NM_002965	S100 钙结合蛋白 A9	38.51
10	AK024106	AK024106	人类 cDNA; FLJ14044 结合蛋白	32.35
11	FCGBP	NM_003890	IgG 结合蛋白的 Fc 部分	31.5
12	PLCXD1	NM_018390	假设性蛋白 FLJ11323	30.53
13	GDF15	NM_004864	前列腺分化因子	27.7
14	ANXA8	NM_001630	膜联蛋白 A8	26.83
15	TCF8	NM_030751	转录因子 8	25.84
16	EPHA2	NM_004431	Eph 受体 A2	25.38
17	IFI44	NM_006417	干扰素介导, 丙型肝炎相关微管聚合蛋白	24.03
18	PLAUR	NM_002659	纤溶酶原活化因子	23.72
19	DDIT4	NM_019058	DNA 损伤诱导转录产物 4	22.73
20	TUSC3	NM_006765	假设性前列腺癌肿瘤抑制基因	22.14
21	B4GALT5	NM_004776	β 1,4 - 半乳糖转移酶, 多肽 5	21.34
22	ARRDC3	AB037797	KIAA1376 蛋白	15.18
23	CCNL1	NM_020307	细胞周期调节蛋白	15.08
24	NR4A2	NM_006186	细胞核受体亚家族 4, A2	12.39
25	CXCL1	NM_001511	趋化因子 CXCL1	12.2
26	C6orf66	NM_014165	HSPC125 蛋白	12.07
27	C20ORF139	BC017001	人类基因, 与 RIKEN cDNA 相似	11.16
28	BEX2	NM_032621	X 连锁蛋白	10.78
29	HOMER - 2B	NM_004839	早期快反应基因 2b	7.55

表 3 SAM 分析后肝门部胆管癌显著下调而胆管中下段癌显著上调 11 条基因 (按变化倍数降序排列)				
编号	基因名称	Gene bank 编号	表达产物	变化倍数
1	PACE4	NM_002570	偶合基本氨基酸裂解酶 4	0.17
2	AK025209	AK025209	人类 cDNA; FLJ21556 结合蛋白	0.14
3	MAWBP	NM_022129	MAWD 结合蛋白	0.13
4	SLC27A2	NM_003645	脂肪酸辅酶 A 连接酶, 超长链 1	0.12
5	UGT1A6	NM_001072	UDP 糖基转移酶 1 家族, 多肽 A6	0.12
6	FMO5	NM_001461	含黄素单氧化酶 5	0.12
7	TM4SF5	NM_003963	Tetraspan 跨膜蛋白 L6H	0.08
8	VNN1	NM_004666	血管非炎性因子 1	0.05
9	AADAC	NM_001086	Arylacetamide 脱乙酰基酶	0.04
10	C4BPB	NM_000716	补体成分 4 结合蛋白, beta	0.04
11	HMGCS2	NM_005518	3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 2 (线粒体)	0

3 讨论

基因表达谱分析为高通量的分析肿瘤变化基因提供了全新的手段, 可以为研究肿瘤的发生、发展、检测以及预后提供大量的数据。我们在胆管癌表达谱的筛选中发现大量的基因以及它们的细胞功能如细胞骨架构成、细胞膜组成。促血管生成、细胞黏附、信号转导、细胞运动、转录、分子伴侣活性、蛋白激酶活性和受体结合等可能与胆管癌相关, 这些基因有可能成为胆管癌潜在的代表基因而值得进一步

关注和深入研究。
本实验中, 胆管癌特异性显著上调基因共 340 个, 下调基因共 449 个。其中胶原蛋白酶家族 COL10A1、COL3A1 的表达都上调; 另外, 基质金属蛋白酶 MMP7 基因也发生上调。其他显著上调的基因中, 主要参与细胞骨架构成及细胞间紧密连接的基因包括 KRT17、KRT19、CLDN4、EPS8L1、ENC1 等。上述基因不仅在影响肿瘤细胞构成方面发挥着重要的作用, 同时可以通过调节细胞通路而影响细胞的功能, 如 ENC1。另外, 一些功能性基因的表达

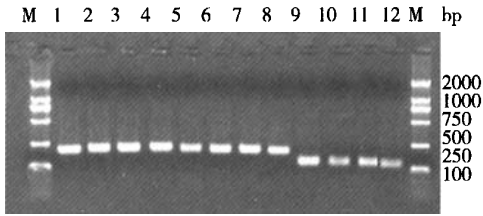


图 4 Real-time PCR 产物电泳图 1~4 分别为以对照、C5、C6、C7 样品的 1st-cDNA 为模板,real-time PCR 扩增 GAPDH 基因;5~8 分别为以对照、C5、C6、C7 样品的 1st-cDNA 为模板,real-time PCR 扩增 SERPINB5 基因;9~12 分别为以对照、C5、C6、C7 样品的 1st-cDNA 为模板,real-time PCR 扩增 SCGB3A1 基因;M TaKaRa 公司的 DNA marker DL2000

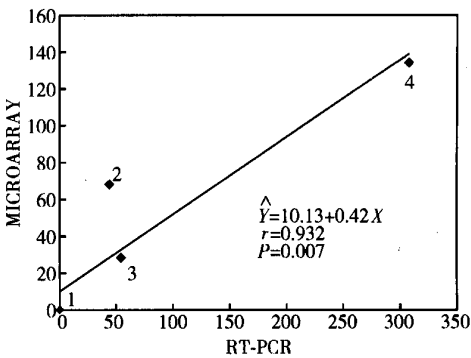


图 5 胆总管中下段癌样本实时定量 RT-PCR 结果与芯片结果线性回归分析示意图
坐标:1 (0.07,0.03) (0.20,0.06) (0.13,0.11);
2(43.87,68.10);3(54.17,28.40);4(307.79,134.00)

表 4 胆总管中下段癌样本实时定量 RT-PCR 结果

编号	基因名称	Ct	E	ΔCt (con-sam)	归一化前比值	归一化后比值	芯片比值
1	对照 - GAPDH	19.09	1.90				
2	C5 - GAPDH	19.16		-0.07	0.96		
3	C7 - GAPDH	20.92		-1.83	0.31		
4	C6 - GAPDH	19.13		-0.04	0.97		
5	对照 - SERPINB5	30.85	1.89				
6	C5 - SERPINB5	24.67		6.18	51.79	54.17	28.40
7	C7 - SERPINB5	23.72		7.13	95.00	307.79	134.00
8	C6 - SERPINB5	24.97		5.88	42.76	43.87	68.10
9	对照 - SCGB3A1	21.15	1.85				
10	C5 - SCGB3A1	25.53		-4.38	0.07	0.07	0.03
11	C7 - SCGB3A1	25.69		-4.54	0.06	0.20	0.06
12	C6 - SCGB3A1	24.55		-3.4	0.12	0.13	0.11

Ct(threshold cycle)值:表示反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数
E:扩增效率
ΔCt(con-sam) 值:表示对照样品的 Ct 值减去处理样品的 Ct 值得到的差值
归一化前比值:即 EΔCt,表示归一化之前对照样品与处理样品目的基因表达量的差异(处理样品÷对照样品)
归一化后比值:表示归一化之后对照样品与处理样品目的基因表达量的差异(处理样品÷对照样品)
芯片比值:为表达谱芯片基因表达差异

也发生了显著的上调,其中包括 DD96、PTK7、CDH3 等。在研究中,我们发现一个值得注意的现象:在胆管癌发生变化的表达基因中,JUP、SPINT2 及 Maspin 等降低肿瘤增殖侵袭能力的基因存在显著的高表达,而这些基因在其它肿瘤的研究中均表现为明显的表达抑制,如乳腺癌、胃癌等。

在肝门部胆管癌与胆总管中下段癌的差异表达基因中,显著差异表达的基因共 41 条,其中上调 30 条,下调 11 条。在这些基因当中,部分基因在肿瘤的发生发展中存在着重要的作用,而一部分基因功能尚待进一步研究。AREG (Amphiregulin) 在肝门部胆管癌中显著上调,而在胆总管中下段癌中却显著下调。AREG 位于 4q13-q21,又称为双调蛋白,属于表皮生长因子(epithelium growth factor, EGF)家族,与 EGF 和转化生长因子 α(transforming growth factor-α, TGF-α)在结构和功能上具有明显的同源性,可以通过结合 EGFR 刺激自我磷酸化,既促进正常细胞的增殖分化,又具有抑制肿瘤细胞生长的能
万方数据

力。Castillo 等^[7]认为,AREG 在肝细胞癌中发挥促进有丝分裂及抑制凋亡的作用。通过 siRNA 和中和抗体的方法阻断 AREG 的作用,可以导致 EGFR 传导通路信号减少,从而抑制细胞增殖,诱发凋亡,提示 AREG 在肝细胞癌的发生中起到重要的作用。

EPHA2(Eph receptor A2)是 Eph 受体酪氨酸激酶家族(RTKs)的一员,在调节细胞生长、生存、迁移及血管形成中存在着重要的作用。EPHA2 广泛表达于多种肿瘤组织,如乳腺癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌、肺癌、结肠癌等,尤其高表达于高侵袭性的肿瘤细胞^[8,9]。EPHA2 过表达不仅能导致正常细胞的恶性转化,同时还可以通过减弱细胞间的连接而增强肿瘤细胞的迁移能力^[10]。另外,EPHA2 在肿瘤新血管形成及侵袭转移中起到重要的作用^[11],抑制 EPHA2 的活化可削弱肿瘤血管的形成^[12]。

SPPI(secreted phosphoprotein 1)称为分泌磷酸蛋白 1,又称为骨桥蛋白,是一种具有多种功能的分泌性酸性糖蛋白,归类于细胞外基质(extracellular

matrix, ECM), 可促进细胞的黏附和迁移。骨桥蛋白的表达同肿瘤的致癌作用和转移密切相关, 在多种肿瘤组织中, 肿瘤组织中骨桥蛋白高度表达, 如胃癌^[13]、食管癌^[14]、神经胶质瘤^[15]等。在乳腺癌中, SPP1 的表达强弱与乳腺癌的恶性程度相关, 浸润性导管癌均表达 SPP1^[16], 正常组织与乳腺癌及其转移灶之间 SPP1 表达出现显著差异^[17]。而这种分泌特性的蛋白产物有望作为血清学候选标志物及药物作用的靶点。

本研究表明, 在胆管癌下调的基因中, 肝门部胆管癌与胆总管中下段癌基因表达同样既存在共性, 又存在显著差异。在共同表达下调的差异基因中, 包括 SCGB3A1 等。SCGB3A1 (secretoglobin-3A1), 即分泌素 3A1, 在人正常肺、乳腺、前列腺、胃和食管上皮细胞都有较高丰度表达, 但在乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、前列腺癌和胰腺癌却常常检测不到其表达, 因此又被称为 HIN-1 (high in normal-1)^[18-21]。分泌素 3A1 在上述肿瘤细胞的表达下降或抑制提示其对上皮细胞来源肿瘤的发生具有抑制作用。分泌素 3A1 能够通过抑制原癌基因 AKT 的信号转导通路而阻止细胞再进入周期分裂, 抑制细胞浸润、转移和促进细胞凋亡, 进一步证实其为抗癌基因^[22]。分泌素 3A1 基因的启动子超甲基化可能作为基因表达抑制的常见原因^[23]。而在两者差异表达基因中, 则包括 PACE4 (Pcsk6, proprotein convertase subtilisin/kexin type 6) 等。PACE4 即偶合基本氨基酸裂解酶 4, 为依赖于 Ca^{2+} 的丝氨酸蛋白酶, 属于前蛋白转化酶的一种, 可在多种上皮或神经肿瘤中表达。该酶的底物主要为一些肿瘤相关蛋白如 TGF- β 、MMPs 等, 而这些蛋白对肿瘤的生长、迁移发挥着重要的作用。通过对这些底物的调节, PACE4 在肿瘤的发生发展中存在着“开关”作用^[24]。

基因芯片的研究方法提供了大量的基因组信息, 对这些变化基因信息进行分析, 有助于对胆管癌发生发展的分子机制、信号转导通路进行进一步的认识, 并可能为肿瘤的早期诊断、基因分型、基因治疗提供新的方向。通过对肝门部胆管癌与胆总管中下段癌基因表达差异的研究, 发现肝门部胆管癌与胆总管中下段癌虽然细胞起源极其类似, 部位相近, 但基因的表达却存在着巨大的差异。我们希望能从中筛选出能够特异性诊断区分肝门部胆管癌与胆总管中下段的分子标记物或基因治疗的靶点。另外, 由于发生部位不同, 两种肿瘤达到临床诊断时肿瘤大小显著不同 (表 1), 肝门部胆管癌肿瘤体积巨大, 而胆总管中下段癌肿瘤体积相对较小, 肿瘤大小与基因表达差异之间的关系尚需要进一步研究。

参考文献

- 1 黄志强, 周宁新, 黄晓强. 肝门部胆管癌的外科治疗. 消化外科, 2003, 2(4): 229-238.
- 2 Ogura Y, Kawarada Y. Surgical strategies for carcinoma confluence. Br J Surg, 1998, 85(1): 20-24.
- 3 Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. Nat Biotechnol,

- 2006, 24(9): 1140-1150.
- 4 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 14863-14868.
- 5 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G, et al. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5116-5121.
- 6 Xu Y, Selaru FM, Yin J, et al. Artificial neural networks and gene filtering distinguish between global gene expression profiles of Barrett's esophagus and esophageal cancer. Cancer Res, 2002, 62: 3493-3497.
- 7 Castillo J, Erroba E, Maria J, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res, 2006, 66(12): 6129-6138.
- 8 Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, et al. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression. Int J Cancer, 1999, 84(5): 494-501.
- 9 Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). Cancer Res, 2001, 61(8): 3250-3255.
- 10 Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, et al. Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells. Am J Pathol, 2003, 162(4): 1037-1042.
- 11 Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hicks DJ, et al. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression. Faseb J, 2005, 19(13): 1884-1886.
- 12 Cheng N, Brantley DM, Liu H, et al. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. Mol Cancer Res, 2002, 1(1): 2-11.
- 13 Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, et al. Coexpression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. Int J Cancer, 1998, 79(2): 127-132.
- 14 Casson AG, Wilson SM, McCart JA, et al. Ras mutation and overexpression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin Lin human esophageal cancer. Int J Cancer, 1997, 72(5): 739-745.
- 15 Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, et al. Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. Lab Invest, 1995, 72(1): 55-63.
- 16 Gillespie MT, Thomas RJ, Pu ZY, et al. Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breastcancers. Int J Cancer, 1997, 73(6): 812-815.
- 17 Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. Am J Pathol, 1995, 146(1): 95-100.
- 18 Porter DA, Krop IE, Nasser S, et al. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. Cancer Res, 2001, 61: 5697-5702.
- 19 Krop IE, Sgroi D, Porter DA, et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98: 9796-9801.
- 20 Antonio M, Fabio B, Carla M, et al. Down regulation of high in normal-1 (HIN-1) is a frequent event in stage I non-small cell lung cancer and correlates with poor clinical outcome. Clin Cancer Res, 2004, 10: 1338-1343.
- 21 Krop I, Player A, Tablante A, et al. Frequent HIN-1 promoter methylation and lack of expression in multiple human tumor types. Mol Cancer Res, 2004, 2: 489-494.
- 22 Krop I, Parker MT, Bloushtain-Qimron N, et al. HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation. Cancer Res, 2005, 65: 9659-9669.
- 23 Shigematsu H, Suzuki M, Takahashi T, et al. Aberrant methylation of HIN-1 (high in normal-1) is a frequent event in many human malignancies. Int J Cancer, 2005, 113: 600-604.
- 24 Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, et al. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. Mol Carcinog, 2005, 44(3): 151-161.

(收稿日期: 2007-03-05)

(修回日期: 2007-03-26)

(责任编辑: 王惠群)