

弥漫大 B 淋巴瘤 12 号染色体基因表达的研究 *

马全富 白向阳 曹 阳 姜利军 杨 洁 李 夜 曾 祯 卢运萍

(华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤生物医学中心 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:研究弥漫大 B 淋巴瘤(Diffuse Large B-Cell Lymphoma,DLBCL)12 号染色体基因表达情况。方法:收取临床 DLBCL 病人淋巴结标本液氮速冻,快速冷冻切片,采用激光显微切割技术分离单纯淋巴瘤细胞,提取淋巴瘤细胞中的 mRNA 与表达谱芯片杂交,通过信号扫描、处理后获得表达基因杂交信号强度。每基因设 11-20 对探针。杂交信号与错配探针对比,扣除背景值后,使用 Wilcoxon 符号秩和检验选取与错配杂交信号有显著差异的基因作为分析结果($P=0.05$)。随机选取两个检测到的基因,使用 PCR 方法检验基因芯片结果的可靠性。结果:成功地从快速冷冻保存的 DLBCL 标本中提取了 RNA。使用表达谱芯片进行研究,发现了共 164 条 12 号染色体编码的基因在淋巴瘤细胞中表达。并根据胞内定位、基因功能和基因所属的代谢通路三种分类方法对所得基因进行分类分析。基因表达密度分析显示 12 号染色体上的基因表达情况与编码基因分布情况比较一致。结论:使用表达谱芯片研究了 12 号染色体上的基因表达情况,为研究 DLBCL 提供了依据。

关键词 表达谱芯片;弥漫大 B 淋巴瘤;12 号染色体

中图分类号:R733.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)16-3049-04

Transcriptional Analysis of Chromosome 12 in DLBCL*

MA Quan-fu, BAI Xiang-yang, CAO Yang, JIANG Li-Jun, YANG Jie, LI Ye, ZENG Zhen, LU Yun-ping

(Molecular Cancer Research Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To explore the profile of expressed genes encoded by chromosome 12 in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods:** DLBCL lymph node and reactive lymph node were flash frozen in liquid nitrogen. Lymphoma cells were separated from frozen section by Laser Capture Microdissection (LCM). The mRNA of the cells from the DLBCL lymph node was labeled with biotin and hybridized with expression profile microarray, and the data of expressed genes were obtained. Preliminary bioinformatics analysis was performed. **Results:** Using expression profile microarray, 164 genes encoded by chromosome 12 found expressed in DLBCL lymph node. The classification of most detected gene is unclear. **Conclusion:** The profile of expressed genes encoded by chromosome 12 by using expression profile microarray may provide useful information for DLBCL.

Key words: Microarray; DLBCL; Chromosome 12; Expression profiling

Chinese Library Classification(CLC): R733.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)16-3049-04

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤(Non-hodgkin's lymphomas NHL),约占成人 NHL 的 30%-40%^[1]。病毒感染、基因重排、基因突变^[2]是导致淋巴瘤的常见原因^[3]。而其在形态学、临床表现及其治疗反应上都表现出异质性,确定 DLBCL 的预后影响因素有利于我们进行个体化治疗。曹智^[4]等进行 73 例 DLBCL 临床病理分析发现 BCL-6、MUM-1 和 CD138 与预后相关。Scherer 等人在 2006 年 3 月 16 号的 Nature 杂志上发表了人类 12 号染色体的最终基因序列。并对它的基因编码情况做了分析。在人类的 12 号染色体上共有编码基因 1435 个。其中已知基因位点 1294 个,新的编码序列 12 个,新转录本(transcript)34 个,假想基因 2 个,假基因 93 个^[5]。Scherer 等人的分析表明 12 号染色体上有多个与疾病相关基因,而且很多基因的变异与癌症相关,其中最有名的是 ETV6 基因。这个基因与急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukaemia ALL)^[6]、急性髓系细胞白血

病^[7](acute myeloblastic leukaemia AML)和骨髓增生异常综合征^[8](myelodysplastic syndromes MDS)相关。另外 BCL7A 基因与非霍奇金 B 细胞淋巴瘤相关^[9]。人类染色体测序后分析的结果为进一步研究打下了基础。激光显微切割(LCM)是一种新型分离技术。可以精确分离样品细胞进行基因表达分析^[10]。本文使用基因芯片技术对采用 LCM 精确分离的弥漫大 B 淋巴瘤细胞中 12 号染色体的基因表达情况做了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

淋巴瘤淋巴结标本来源于武汉同济医院血液科患者的手术标本,术后病理结果证实为弥漫大 B 细胞淋巴瘤。微量 mRNA 提取试剂购自 Qiagen 公司。双链 cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司。表达谱芯片采用 Affymetrix 生物芯片公司提供的人类基因组 U133 plus2.0 芯片。该芯片涵盖了大约 54,000 个

* 基金项目 国家自然科学基金(81101571)

作者简介:马全富(1978-),医学博士,从事利用模式生物研究肿瘤血管和淋巴管生成。

E-mail: dm626925@126.com 电话:027-83663134

(收稿日期:2012-02-15 接受日期:2012-03-15)

人类基因序列。基因芯片结果验证引物如下。

IRAK3 上游引物:5'AGCTGCGGGATCTCCTTAGAGAA3'
IRAK3 下游引物:5'GGAGGATCTTCAGCAAAATACAA3'
STAT2 上游引物:5'ACGCCAGGTCACAGAGTTGCTA3'
STAT2 下游引物:5'AACCTCCGGAAGCCTTGTAATTG3'
PTK9 上游引物:5'TCTCAGAATGCCAGGGATATGA3'
PTK9 下游引物:5'TTGGAATCCTCTTTGGCAAAATC3'
TA-PP2C 上游引物:5'ACAGAACCAGCCACCGCTTACAC3'
TA-PP2C 下游引物:5'TTCCACCTCTCACATTCAATCC3'

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及纯化 新鲜淋巴结组织手术送检标本无菌保存于冰冷的固定液中送回实验室。固定过夜后,液氮速冻,-80 度长期保存。使用时将同批保存的相同标本组织分别做冰冻切片和石蜡切片,石蜡切片 HE 染色鉴定组织的完整性。完整性好的组织,做冰冻切片,激光显微捕获淋巴瘤细胞,微量法提取细胞中的总 RNA。

1.2.2 微量 RNA 的体外扩增 使用 T7-OligodT 代替常规的 Oligo-dT 做逆转录反应,合成的双链 cDNA 用 T7 RNA 聚合酶做体外转录。mRNA 进行无偏线性扩增以后,用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测所获 aRNA 的纯度和浓度。

1.2.2 表达谱芯片的样品制备及检测 表达谱芯片采用 Affymetrix 生物芯片公司提供的人类基因组 U133 plus2.0 芯片。扩增后的 aRNA 进行质量鉴定,以 biotin 掺入进行逆转录,标记 aRNA。然后进行芯片杂交。

1.2.3 表达谱芯片原始数据分析 基因芯片上的每一个基因或 EST 都是由 11-20 对 25 碱基的探针组成。测得的杂交信号数据扣除背景值以后,使用 Wilcoxon 符号秩检验探针杂交信号强度与相应对照错配基因探针的差异。以 0.05 作为显著性差异标准。P 值小于或等于 0.05 的基因作为阳性基因。

1.2.4 表达谱芯片的结果验证 随机选取两条阳性表达基因 IRAK3、STAT2 和两条阴性基因 PTK9、TA-PP2C,设计引物。以提取的 RNA 为模板,使用随机引物做逆转录合成 cDNA。进行 PCR 反应。反应条件为 94℃ 变性 2min,循环条件如下:94℃ 45S,55℃ 45S,72℃ 45S,共做 35 个循环延伸条件为 72℃ 3min。

1.2.5 基因芯片结果的分析 使用 geneontology 网站相关数据进行基因表达的分类分析^[11]。使用 SPSS 软件做基因表达的密度统计。

2 结果

2.1 组织完整性鉴定与 RNA 提取结果

组织冰冻切片后 HE 染色(图 1),挑选组织保存完好,结构清楚的,用同批组织做冰冻切片,激光显微捕获 DLBCL 淋巴结中的淋巴细胞。微量法提取 RNA,体外扩增后 RNA 完整性检测结果表明 18S、28S RNA 条带清晰,比例适当, RNA 完整性良好(图 2)。

2.2 表达谱芯片结果

经鉴定质量完好的样本送样。全长 aRNA 标记后,与基因芯片杂交,对同一个基因进行 11-20 个不同探针的杂交。不同的扫描点信号强度用 Affymetrix® 软件包进行统计分析。以 P 值小于 0.05 为差异显著性判断标准,有显著性差异的基因标

记为阳性(P)。差异不显著的基因标记为阴性(A)。位于人类 12 号染色体上的可检测基因共有 1433 条,经统计学检测,弥漫大 B 淋巴瘤细胞表达基因 164 条(P>0.05)。

2.3 表达谱芯片的结果验证

随机选取两条阳性表达基因 IRAK3、STAT2 和两条阴性基因 PTK9、TA-PP2C,设计引物。以提取的 RNA 为模板,使用随机引物做逆转录合成 cDNA。进行 PCR 反应。结果可见基因芯片结果显示的阳性基因扩增良好,而阴性基因无明显可见扩增(见图 3)。

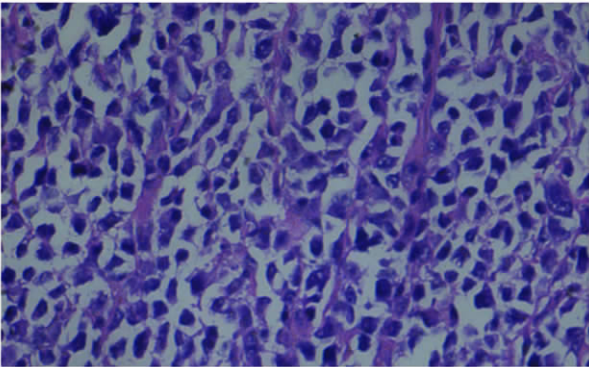


图 1 DLBCL HE 染色

Fig.1 DLBCL HE staining

HE 染色(200×),大细胞呈弥漫分布,细胞形态不规则,核大,形态多样

HE staining (200×),large cells show diffuse distribution, cell morphology is irregular, nucleus is big and its morphology is diversiform

2.4 表达谱芯片结果分析

表达谱芯片显示阳性表达的基因按不同的胞内定位分析,根据网络数据库提供的信息,按照 AMIGO 的分类标准将蛋白分成核蛋白、胞浆蛋白、膜蛋白、核糖核蛋白复合体、过氧化物酶体膜、可溶性组分六部分^[12]。共有 41 个蛋白被分类。另有分类不明蛋白 123 个(见表 1)。

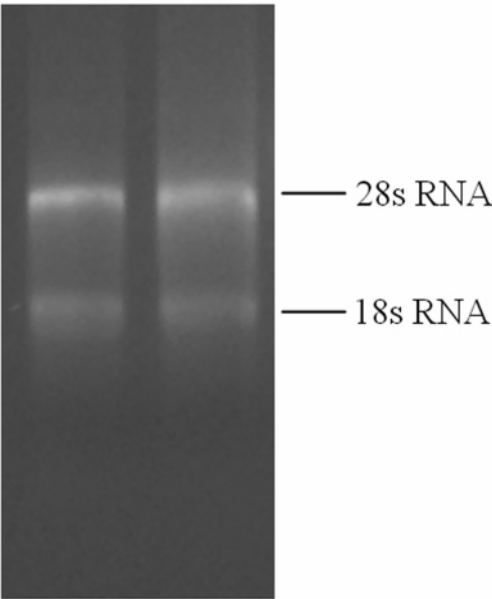


图 2 RNA 完整性检测图

Fig.2 The integrity of RNA

表达谱芯片显示阳性表达的基因按不同的分子功能进行分析,根据网络数据库提供的信息,按照 AMIGO 的分类标准将蛋白分成嘌呤核苷酸结合蛋白、DNA 结合蛋白、转移磷酸基团的转移酶活性蛋白、对酸酐的水解酶活性蛋白、蛋白激酶活性蛋白、穿膜受体蛋白、对酯键的水解酶活性蛋白、ATP 依赖的水解酶活性蛋白、RNA 结合蛋白、肽酶活性蛋白、受体信号蛋白(丝胺酸/苏氨酸激酶活性)、金属离子结合蛋白。共有 38 个蛋白被分类。另有分类不明蛋白 126(见表 2)。

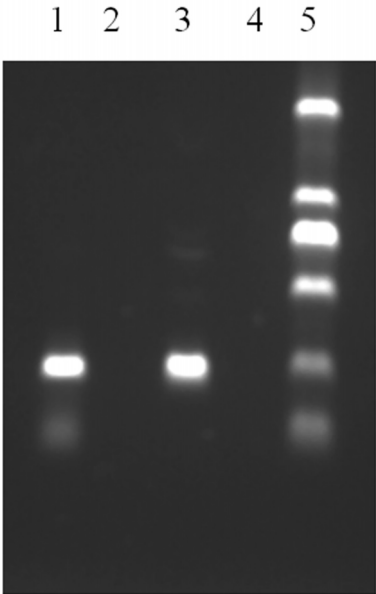


图 3 基因芯片结果的 PCR 验证

Fig.3 Validation of the results of gene expression profile data by RT-PCR
1、IRAK3 PCR 产物 2、PTK9 PCR 产物 3、STAT2 PCR 产物 4、TA-PP2C PCR 产物
1.IRAK3 per product 2. PTK9 per produc 3. STAT2 per product
4. TA-PP2C per product

表达谱芯片显示阳性表达的基因按不同的生物代谢途径进行分析,根据网络数据库提供的信息,按照 AMIGO 的分类标准将蛋白分成核酸或核苷酸代谢相关蛋白、细胞生长与维持相关蛋白、蛋白代谢相关蛋白、信号传导相关蛋白、生物合成相关蛋白、磷酸代谢相关蛋白、分解代谢相关蛋白、脂类代谢相关蛋白、器官发生相关蛋白。共有 55 个蛋白被分类。另有分类不明蛋白 115(见表 3)。

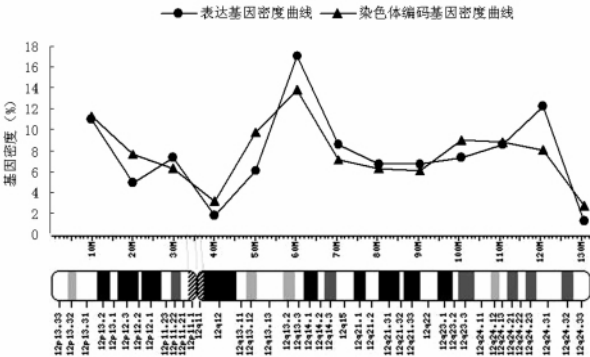


图 4 基因表达密度分析
Fig.4 The density of gene expression

2.5 基因表达的密度统计

使用 SPSS 软件做基因表达的密度统计。将所有表达蛋白在基因组上定位。并以 10M 为距离单位,绘制基因表达丰度图。与编码基因分布图相比较。结果显示基因表达情况与基因分布情况较一致只是在 60M 与 120M 的地方表达量略高(见图 4)。

表 1 按细胞组分分析

Table 1 The analysis of cellular component	
Cellular component	Number
Nucleus protein	16
Cytoplasm protein	14
Membrane protein	18
Ribonucleoprotein complex	2
Peroxisomes membrane	1
Soluble component	1
Unclassified protein	123

表 2 按分子功能分析

Table 2 The analysis of molecular function	
Molecular function	Number
Purine nucleotide binding	12
DNA bindin	11
Phosphotransferase Activity	7
Hydrolase activity to carbonic anhydride	6
Protein kinase activity	6
Membrane penetrating receptor	6
Hydrolase activity to ester bond	4
Hydrolase activity depending on ATP	3
RNA binding	3
Peptidase activity	3
Receptor signal protein(PAK)	3
Metal ions binding	3
Unclassified protein	126

表 3 按生物过程分析

Table 3 The analysis of biological process	
Biological process	Number
Nucleic acid metabolism or nucleotide metabolism	17
Cell growth and maintenance	16
Protein metabolism	14
Signal transduction	14
Biosynthesis	8
Phosphate metabolism	8
Catabolism	4
Lipid metabolism	4
Organogenesis	3
Unclassified protein	115

3 讨论

随着人类基因组测序的完成,人类对疾病的研究进入了"后基因组时代"(postgenome era),基因染色体上所编码基因的表达情况与生理病理状态的关系成了下一步研究的重点^[13,14]。2006年3月的Nature杂志上发表了人类12号染色体的最终基因序列,并对它的基因编码情况做了分析。研究结果表明12号染色体上有多个与疾病相关基因。而且很多基因的变异与癌症相关,淋巴瘤^[15,16]是一种较为常见的恶性肿瘤,分类十分复杂,病理多变,病变广谱。为了研究在发生淋巴瘤的情况下,12号基因的表达情况有何变化,收集了本院的弥漫大B淋巴瘤患者的淋巴结,经病理鉴定后,精确分离相关细胞,依基因芯片结果分析其12号染色体的表达情况。同时考虑到肿瘤局部除肿瘤细胞外还有许多的间质细胞,传统方法提起肿瘤手术标本的总RNA进行表达谱分析不能准确的反应肿瘤细胞中基因表达的变化。我们采用了激光显微捕获技术(LCM)精确分离处于某一阶段的肿瘤细胞,可以有效地富集基因。避免由于细胞纯度不高而造成的基因表达分析结果不准确^[17,18]。LCM技术相对于抗体标记后流式分选技术和使用同步化的细胞系来说,具有自己的独特优点。激光显微切割的标本在采集之后就迅速降温,固定并冷冻保存。并且冰冻切片简单快速,这些都有助于保存细胞内RNA的原始状态^[19]。能够更准确地反应实际医疗中患者体内特定细胞的瞬时基因表达情况。

在2002年Kapranov从十一个人类细胞系中提取mRNA逆转录成cDNA后与代表21和22号染色体上的基因编码情况的芯片杂交,研究21和22号染色体上的基因转录情况。结果显示基因的转录数量十倍于已知编码基因的数量^[20]。在本研究中,将所有基因芯片检测得到的表达蛋白在基因组上定位。并以10M为距离单位,绘制基因表达丰度图。与编码基因分布图相比较。结果显示基因表达情与基因分布情况较一致,并未发现类似现象。这可能是因为表达谱芯片与Kapranov所有芯片机理不同所致。

通过分析,得到的在淋巴瘤中12号染色体上表达的基因共有164条,占其编码基因总数的十分之一强。基因表达密度基本与基因分布密度相一致。12号染色体表达的基因定位于细胞内多个部位,即有核蛋白,又有膜蛋白和胞浆蛋白。其中核蛋白占的比例最大。很多核蛋白参与基因表达调控机制,对其进行详细研究有可能会发现淋巴瘤基因变异与疾病形成之间的关系。同时通过对分子功能的分析发现,DNA结合蛋白和核苷酸结合蛋白占很大比例。这也说明十二号染色体编码的基因在淋巴瘤细胞中活跃地参与DNA和RNA的合成。对代谢途径的分析也印证了这一点,参与核苷酸代谢的蛋白占很大一部分。以上分析表明在所检测的淋巴瘤细胞中,十二号染色体编码的基因活跃地参与核酸代谢。同时分析还发现无论按何种方法分类,不明蛋白总是占绝大多数。这说明了生命本质的了解还需要更多的研究。

参考文献(References)

- [1] Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non hodgikin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non Hodgikin's Lymphoma Classification Project [J]. J Clin Oncol, 1998,16:2780-2795
- [2] 周晓燕,朱伟萍,张太明,等. 弥漫性大B细胞淋巴瘤中bcl-6基因5'非编码区突变分析[J]. 中华病理学杂志,2003,32(1):10-13
Zhou XY, Zhu WP, Zhang TM, et al. Study of mutations in 5'-non-coding region of BCL-6 gene in Diffuse Large B-cell Lymphomas[J].

- Chinese Journal of Pathology, 2003, 32(1):10-13
- [3] Rogers BB. Overview of non-Hodgkin's lymphoma [J]. Semin Oncol Nurs, 2006, 22(2):67-72
- [4] 曹智,宋艳,苏勤,等. 弥漫性大B细胞型淋巴瘤73例临床病理分析[J]. 肿瘤防治研究,2008,35(11):796-799
Cao Zhi, Song Yan, Su Qin, et al. Clinicopathologic Analysis of 73 Cases with Diffuse Large B Cell Lymphoma [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2008, 35(11):796-799
- [5] Steven E Scherer, Donna M.Muzny, Christian J, et al. The finished DNA sequence of human chromosome 12[J]. Nature, 2006, 440:346-351
- [6] Qiao Y, Ogawa S, Hangaishi A, et al. Identification of a novel fusion gene, TTL, fused to ETV6 in acute lymphoblastic leukemia with t(12;13)(p13;q14), and its implication in leukemogenesis [J]. Leukemia 2003, 17(6):1112-1120
- [7] Yamamoto K, Nagata K, Yagasaki F, et al. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 12 during clonal evolution in myelodysplastic syndrome with t (5;12)(q13;p13) involving the ETV6 gene[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2000, 119(2):113-117
- [8] Mauvieux L, Helias C, Perrusson N, et al. ETV6 (TEL) gene amplification in a myelodysplastic syndrome with excess of blasts [J]. Leukemia, 2004, 18(8):1436-1438
- [9] Zani VJ, Asou N, Jadayel D, et al. Molecular cloning of complex chromosomal translocation t (8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon[J]. Blood, 1996, 87(8):3124-3134
- [10] 陈凌,付丽. 利用激光显微切割技术提取高质量RNA [J]. 中华病理学, 2005,34(10):680-682
Chen L, Fu L. Application of the microdissection to extract the high quality RNA in the tumor research [J]. Chinese Journal of Pathology, 2005,34(10):680-682
- [11] Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) project in 2006[J]. Nucl Acids Res, 2006, 34:D322-D326
- [12] Jensen LJ, Gupta R, Staerfeldt HH, et al. Prediction of human protein function according to Gene Ontology categories [J]. Bioinformatics, 2003, 19(5):635-642
- [13] Liolios K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, et al. The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:D332-D334
- [14] Mewes HW, Frishman D, Mayer KF, et al. MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes in 2005[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:D169-D172
- [15] Delsol G. Molecular abnormalities in lymphomas [J]. Bull Cancer. 2010,97(11):1347-1364
- [16] Chan WJ. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma [J]. Int J Hematol, 2010,92(2):219-230
- [17] Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, et al. Use of Immunocytochemistry to Identify the in situ Expression Profile of Cellular Constituents of the Tumor Microenvironment [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(6): 635-642
- [18] Bai X, Huang M, Ma D, et al. Development and characterization of a novel method to analyze global gene expression profiles in endothelial cells derived from primary tissues[J]. Am J Hematol, 2008,83(1): 26-33
- [19] Kihara AH, Moriscot AS, Ferreira PJ, et al. Protecting RNA in fixed tissue: an alternative method for LCM users [J]. J Neurosci Methods, 2005,148(2):103-107
- [20] Kapranov P, Cawley SE, Drenkow J, et al. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22 [J]. Science, 2002, 296(5569): 916-919