

文章编号: 1004-0374 (2010) 03-0302-04

· 技术与应用 ·

基因芯片技术在肿瘤缺氧微环境研究中的应用进展

刘俊*, 赵宁

(上海交通大学附属第一人民医院普外科, 上海200080)

摘要: 缺氧微环境是实体肿瘤的特征之一, 也是影响实体肿瘤发生、发展、侵袭、转移及耐药的重要因素, 但其影响肿瘤的具体机制尚未完全明确。根据检测的 mRNA 数量, 基因芯片分为传统的表达谱芯片和功能分类芯片。随着技术的发展, 基因芯片技术因能对成千上万种基因的表达情况同时进行定量检测, 在生命科学研究包括缺氧微环境对肿瘤作用的研究中越来越多地得到应用。选择性应用这些基因芯片除了能证明缺氧微环境与肿瘤发生发展有关外, 同时还能筛选肿瘤缺氧微环境调节的未知靶基因及缺氧微环境重要调节因子的未知下游靶基因, 还能为研究缺氧微环境影响肿瘤分子机制提供有用的线索。基因芯片技术正成为该领域非常重要的研究工具之一。

关键词: 基因芯片技术; 缺氧微环境; 肿瘤

中图分类号: R318; R730.231 **文献标识码:** A

The advances in the research on tumor hypoxia environment using DNA chip technique

LIU Jun*, ZHAO Ning

(Department of General Surgery, Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: Hypoxia environment is one of the characteristics of solid tumor, which affects the tumorigenesis, development, invasion, metastasis and chemo-resistance. But the mechanisms how the hypoxia environment affect tumor biological behavior are not yet fully clear. According to the number of mRNA detected, DNA chip technique can be classified to conventional expression profile chip and functional classification chip. DNA chip technique, which can simultaneously detect the expressions of thousands of genes, has been increasingly applied in life science research including the effect of hypoxia environment on tumor behaviors. With application of these gene chips, besides the association of hypoxic micro-environment with tumorigenesis, and tumor development was verified, the unknown target genes of hypoxic micro-environment and its important regulatory factors can be screened out, and useful clues to study the molecular mechanisms of the impact of hypoxia microenvironment on tumors are provided. DNA chip technique is becoming one of the essential tools in this field

Key words: DNA chip technique; hypoxia environment; tumor

缺氧微环境是常见生理过程, 也是实体肿瘤微环境中重要的特征之一, 在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[1]。存在显著缺氧微环境的肿瘤往往表现出更强的侵袭能力和对传统放化疗的耐受性。肿瘤细胞在缺氧下生存的分子机制尚未完全明确, 对这种机制的进一步理解有利于开发新的抗癌药物。传

统的研究由于技术的限制往往在感兴趣的一个或数个基因上进行研究。随着基因芯片技术的发展, 越来越多关于肿瘤缺氧微环境的研究应用基因芯片技

收稿日期: 2009-08-17; 修回日期: 2009-09-26

* 通讯作者: E-mail: liujun@yahoo.com.cn

术^[2],故对基因芯片技术在肿瘤缺氧微环境研究中的应用作一综述。

1 缺氧微环境与肿瘤

缺氧微环境,特别是缺氧微环境最关键的调节因子——缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)^[3]与实体肿瘤的关系被广泛研究。肿瘤的快速生长、肿瘤新生血管的功能异常以及大多数肿瘤的乏血管表现提示肿瘤内部存在缺氧微环境,如Le等^[4]和Koong等^[5]分别对非小细胞性肺癌和胰腺癌使用Eppendorf极谱电极活体穿刺检测发现,肿瘤组织内部的氧浓度明显低于正常组织中的氧浓度。Hong等^[6]发现结肠癌组织中缺氧标志物CA9等明显高表达。这些研究均证明了实体肿瘤中存在明显的缺氧微环境,并伴有HIF-1 α 的高表达。进一步的研究发现缺氧微环境在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移和耐药中起重要作用^[7-10],如Lam等^[11]研究发现缺氧可导致非小细胞性肺癌对吉西他滨化疗产生耐受。

2 基因芯片技术的概述

基因芯片技术^[12]是采用cDNA或寡核苷酸片段作探针固定在芯片上,再将待测样品与对照样品的mRNA以两种不同的荧光分子(Cy3和Cy5)进行标记,然后同时与芯片进行杂交,通过分析两种样品与探针杂交的荧光强度的比值,来检测基因表达水平的变化,即基因芯片检测的是样品的mRNA的变化。根据制作方法不同,基因芯片可分为原位合成芯片和显微打印芯片。根据探针的不同,可分为寡核苷酸芯片、cDNA芯片和RNA芯片等。一般寡核苷酸芯片多为原位合成芯片,而其他芯片多为显微打印芯片。根据检测mRNA的数量,分为表达谱芯片和功能分类芯片。表达谱芯片对已知的整个基因组表达进行检测,而功能分类芯片对感兴趣的特定生物学通路上的几百个或更少的基因的表达进行检测。功能分类芯片由于针对性比较强,避免了表达谱芯片中无关基因的干扰,其准确性更高,因此在肿瘤缺氧微环境研究中有应用增多的趋势。值得一提的是最新发展的PCR功能分类芯片^[13],把实时定量PCR技术与基因芯片技术结合,能在同一张芯片上对上百个基因的mRNA表达水平准确定量检测。基因芯片尚可分为预制芯片和定制芯片。目前商品化的芯片都是预制芯片,而定制芯片多为研究人员自行设计的。例如选择与4种代谢过程(药物耐

受、药物代谢、细胞应激和细胞毒理)相关的263个基因放在同一张芯片上,用于对药物的毒理效应进行筛选的SuperArray“毒理和药物耐受基因芯片”为预制的功能分类的寡核苷酸芯片。基因芯片技术可对不同来源的细胞内的mRNA水平进行大规模平行检测和分析,具有高效、高通量和平行化等特点,克服了先前,如O'Rourke等^[14]和Park等^[15]在研究缺氧与肿瘤时应用的差异显示PCR方法的假阳性率高、重复性差及对高拷贝基因有偏向性的缺点,因此目前在基因表达分析与基因功能研究等领域包括肿瘤的缺氧微环境的应用研究报道较多。

3 缺氧微环境的制备及基因芯片研究标本的获取

目前常用的微环境缺氧模型主要有以下三类:(1)持续充气缺氧模型。Büchler等^[16]利用三气培养箱的调节功能调节氧浓度低于5%,达到培养环境低氧,其局限性在于很难将氧浓度降低到1%以下,构建近乎完全缺氧的模型;有学者将预混的5%CO₂和95%N₂持续充入缺氧盒中,达到近乎无氧状态的状态。(2)产气缺氧模型。利用技术相对成熟的厌氧菌培养检测设备(厌氧盒或产气袋等)模拟无氧环境进行缺氧培养,氧浓度可达1%以下,是目前缺氧微环境模型中最常用的一种,主要的优点是便利性。(3)化学法缺氧模型。原理是利用CoCl₂或去铁乙胺诱导细胞中HIF-1 α 的高表达^[17],但其实质只是诱导HIF高表达,并非真正模拟了缺氧微环境。一般缺氧培养8h、12h、16h、24h或48h后收集培养细胞的总RNA进行基因芯片检测。使用的细胞有乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌和胰腺癌等各种肿瘤的细胞株进行常氧和缺氧下培养,分析缺氧微环境对肿瘤细胞的影响。也有使用某些缺氧重要调节因子^[18],如HIF-1 α 基因高表达或敲除的肿瘤细胞,分析这些因子在肿瘤缺氧微环境中的作用。

4 基因芯片技术在肿瘤缺氧微环境研究中的具体应用

4.1 筛选缺氧微环境调节的未知靶基因

Bando等^[19]应用表达谱芯片检测乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231在缺氧下基因表达情况,分析显示在12625个基因中有26个基因在两个细胞株中缺氧情况下高表达,其中有6个是新鉴定的基因。这为研究缺氧微环境对肿瘤的作用以及研究新的治疗靶点提供了线索。Seta等^[20]应用基因芯片技

术证明了MKP-1受缺氧调节。Koong等^[21]应用功能分类基因芯片技术检测在缺氧下鳞癌细胞系FaDu细胞588个与侵袭有关的基因的表达,用已知受缺氧调节的VEGF mRNA水平作基准,发现IGFBP-3、LRP、BIK等9个与侵袭相关的基因受缺氧调节,进而结合其他技术分析发现受缺氧调节的PAI-1在头颈部肿瘤患者的血浆水平与肿瘤的缺氧程度相关。Thomas等^[22]应用人类表达谱芯片检测前列腺癌细胞株PC-3在缺氧下的表达,结果发现,在缺氧的多核糖体中104个mRNA数量增加2倍以上,这些增加的mRNA基因多为糖代谢及糖酵解有关的基因,如血红素氧合酶1、磷酸激酶和乳酸脱氢酶A等。同时分析发现56个多核糖体mRNA在缺氧下明显减少,并与缺氧下转录活性抑制有关,其中11个mRNA为编码核糖体的基因。该研究应用基因芯片技术得到缺氧受抑制基因的转录活性与编码核糖体的基因对缺氧敏感有关。

4.2 筛选缺氧微环境重要调节因子的未知下游靶基因

基因芯片技术结合应用过表达或RNAi干扰沉默缺氧微环境重要调节因子的表达,筛选下游靶基因是基因芯片技术应用最广泛的领域,如Sar等^[23]应用表达谱芯片检测缺氧对多个肿瘤和非肿瘤细胞基因表达的影响,结果发现组氨酸脱甲基酶JMJD1A基因在缺氧下所有的细胞中上调且为HIF-1 α 依赖性;又如Comerford等^[24]利用Lockhart等^[25]的缺氧诱导的MDR1基因可能受HIF-1 α 调节的基因芯片筛选结果,利用RT-PCR等技术证明了缺氧可通过HIF-1 α 上调MDR1基因的表达,而且上调的MDR1/p-Gp与缺氧介导的Doxorubicin耐药有关。

4.3 证明缺氧微环境与肿瘤的发生发展有关及提供研究其分子机制的线索

基因芯片技术可通过对结果的簇分析以及对已知功能基因的分析,证明缺氧微环境与肿瘤的发生发展有关,并能进一步为其分子机制提供线索。Abramovitch等^[18]应用表达谱芯片分析过表达CREB和亲本细胞鼠原发性肝癌细胞株BNLIMEA.7R.1在缺氧和常氧下的基因表达,结果发现77个缺氧调节基因是CREB下游靶基因,应用簇分析技术发现与CREB有关的已知功能的37个基因与肿瘤细胞的生长促进、凋亡抑制和血管生成增加有关。另外发现筛选出的一些CREB调节的基因与肿瘤的进展有关,如内皮素1、Cyr61、P62和肾上腺髓质素等。应用基因芯片技术除了筛选出CREB靶基因外,初

步证明缺氧调控的CREB与肿瘤的发生发展有关,结合其他实验技术,证明了CREB是除缺氧诱导因子(HIF)以外的缺氧微环境影响肿瘤发生发展的重要的调节因子。Koike等^[26]研究发现3个结肠癌细胞株的唾液酸化的路易斯寡糖在缺氧下显著增多,而具有唾液酸化的路易斯寡糖或类似结构的分子是介导肿瘤与内皮细胞黏附的选择素的配体。随后应用碳水化合物合成和代谢及黏附分子相关的功能分类基因芯片分析缺氧下相应基因的表达,结果发现与合成选择素碳水化合物配体相关的岩藻糖基转移酶VII(FUT7)、唾液酸转移酶ST3GAL-1(ST30)和UDP-半乳糖转运子-1(UGT1)基因表达在缺氧下明显升高。同时意外发现,增强肿瘤细胞与纤维连接蛋白黏附的黏附分子多配体聚糖-4(SDC4)和整合素 α 5(ITGA5)的表达在缺氧下也明显升高。基因芯片研究发现,缺氧微环境能通过增强选择素-整合素介导的途径增强肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附能力,提示缺氧微环境可能通过上述途径促进肿瘤细胞的转移。Kulshreshtha等^[27]应用ArrayExpress公司的microRNA功能分类芯片检测了4个细胞株(结肠癌HT29、HCT116和乳腺癌MCF-7、MDA-MB231)在缺氧下的基因表达,筛选出23个成熟的microRNA在缺氧时表达增加,并命名为缺氧调节的microRNA(hypoxia-regulated microRNA, HRM),随后用定量RT-PCR验证了基因芯片的部分结果。结合其他实验技术,发现缺氧可诱导很多microRNA表达增加,这些HRMs可以抑制Caspase的激活,并与缺氧诱导的细胞周期的阻滞有关,同时发现这些HRMs在很多肿瘤中过表达,因此认为HRMs是缺氧微环境对肿瘤发生发展影响的重要机制。

5 小结与展望

综上所述,基因芯片技术在缺氧微环境对肿瘤影响的研究中具有筛选缺氧及重要缺氧调节因子,调节的未知基因的优势,能通过对结果的簇分析和个别基因的分析证明缺氧微环境与肿瘤的发生发展、侵袭、转移及耐药有关,并能初步提供可能的分子机制,为进一步的确定性研究提供线索。目前基因芯片技术在肿瘤缺氧微环境研究的应用有增多的趋势,但基因芯片技术尚存在表达谱芯片准确性不够高,功能分类芯片多为已知基因以及芯片结果仍需要定量RT-PCR验证的缺点,有待进一步的改进。随着对肿瘤缺氧微环境研究的深入,

与其他,如定量RT-PCR、RNAi技术的更加有效的结合及制作、分析技术的发展,基因芯片技术将在肿瘤缺氧微环境研究中发挥更大的作用。

[参考文献]

- [1] Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*, 2009, 107(6): 1053-62
- [2] Seta KA, Millhorn DE. Functional genomics approach to hypoxia signaling. *J Appl Physiol*, 2004, 96(2): 765-73
- [3] Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung*, 2009, 96(1): 19-28
- [4] Le QT, Chen E, Salim A, et al. An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(5): 1507-14
- [5] Koong AC, Mehta VK, Le QT, et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 48(4): 919-22
- [6] Hong YS, Cho HJ, Kim SY, et al. Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2009, 9: 246
- [7] Ye J, Koumenis C. ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis. *Curr Mol Med*, 2009, 9(4): 411-6
- [8] Sun HC, Qiu ZJ, Liu J, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis. *Int J Oncol*, 2007, 30(6): 1359-67
- [9] Li Y, Qiu X, Zhang S, et al. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1 α and HIF-2 α correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(4): 322-30
- [10] Amberger-Murphy V. Hypoxia helps glioma to fight therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(3): 381-90
- [11] Lam W, Bussom S, Cheng YC. Effect of hypoxia on the expression of phosphoglycerate kinase and antitumor activity of troxacitabine and gemcitabine in non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(2): 415-23
- [12] Dufva M. Introduction to microarray technology. *Methods Mol Biol*, 2009, 529: 1-22
- [13] Lim J, Derrick SC, Kolibab K, et al. Early pulmonary cytokine and chemokine responses in mice immunized with three different vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* determined by PCR array. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 122-6
- [14] O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, et al. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur J Biochem*, 1996, 241(2): 403-10
- [15] Park H, Adams MA, Lachat P, et al. Hypoxia induces the expression of a 43-kDa protein (PROXY-1) in normal and malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(1): 321-8
- [16] Büchler P, Reber HA, Tomlinson JS, et al. Transcriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor by hypoxia-inducible factor 1 is crucial for invasion of pancreatic and liver cancer. *Neoplasia*, 2009, 11(2): 196-206
- [17] Lee SH, Kim HG. Cobalt chloride-induced downregulation of puromycin-sensitive aminopeptidase suppresses the migration and invasion of PC-3 cells. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(5): 530-6
- [18] Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, et al. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1338-46
- [19] Bando H, Toi M, Kitada K, et al. Genes commonly upregulated by hypoxia in human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(8): 333-40
- [20] Seta KA, Kim R, Kim HW, et al. Hypoxia-induced regulation of MAPK phosphatase-1 as identified by subtractive suppression hybridization and cDNA microarray analysis. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 44405-12
- [21] Koong AC, Denko NC, Hudson KM, et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 883-7
- [22] Thomas JD, Johannes GJ. Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA*, 2007, 13(7): 1116-31
- [23] Sar A, Ponjevic D, Nguyen M, et al. Identification and characterization of demethylase JMJD1A as a gene upregulated in the human cellular response to hypoxia. *Cell Tissue Res*, 2009, 337(2): 223-34
- [24] Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug-resistance (*MDR1*) gene. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3387-94
- [25] Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(13): 1675-80
- [26] Koike T, Kimura N, Miyazaki K, et al. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 8132-7
- [27] Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(5): 1859-67