

• 实验研究 Experimental research •

高强度聚焦超声对人胰腺癌裸鼠移植瘤差异性表达基因的影响

洪立立, 郭志, 邢文阁, 郭秀英, 陈立军, 武变荣

【摘要】目的 研究高强度聚焦超声(HIFU)辐照人胰腺癌移植瘤后差异性表达基因,从基因组学初步探讨 HIFU 的生物学机制。**方法** 构建人胰腺癌裸鼠 YY-1 移植瘤模型,HIFU 辐照后采用 Agilent 人类基因表达谱芯片检测差异性表达基因,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术验证上调基因 HIF1 α 、SMAD4 及下调基因 Bcl-xl。**结果** 与未辐照对照组相比,辐照组表达谱芯片分析发现与胰腺癌相关的差异性基因共 65 个,其中上调 43 个,下调 22 个。基因本体(GO)分析提示显著表达改变的基因富集于细胞核、细胞质部位,并与蛋白结合、金属离子结合、锌离子结合、转录调控、细胞凋亡等功能相关。RT-PCR 检测结果与表达谱芯片分析结果一致。**结论** HIFU 辐照可引起一系列基因调控改变,这些差异性表达基因可能参与调控肿瘤生物学过程。

【关键词】 高强度聚焦超声; 胰腺癌; 基因本体; 表达谱芯片

中图分类号:R735.9 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-11-0984-05

Effect of high-intensity focused ultrasound on the differential expression genes in nude mouse models with transplanted human pancreatic cancer HONG Li-li, GUO Zhi, XING Wen-ge, GUO Xiu-ying, CHEN Li-jun, WU Bian-rong. Department of Oncology, Dagang Hospital of Tianjin Binhai New Area, Tianjin 300060, China

Corresponding author: HONG Li-li, E-mail: honglitj@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of high-intensity focused ultrasound (HIFU) on the differential expression genes in nude mouse models with transplanted human pancreatic cancer, and based on the genomics to make a preliminary discussion on the biological mechanism of HIFU. **Methods** YY-1 transplanted tumor models of human pancreatic cancer were established in nude mice. After HIFU irradiation, the differential expression genes were identified by using Agilent human gene expression spectrum chip, and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was employed to verify the up-regulated genes HIF1 α and SMAD4, as well as the down-regulated gene Bcl-xl. **Results** Compared with the control group (non-irradiation group), the analysis of Agilent human gene expression spectrum chip revealed that the differential genes that were related to pancreatic cancer had 65 genes in total, among them 43 genes were up-regulated and 22 genes were down-regulated. Gene ontology analysis indicated that the genes that showed significantly altered expression were enriched in the nucleus and cytoplasm, and they were related to some functions, including protein binding, metal ion binding, zinc ion binding, regulation of transcription, apoptosis, etc. The results of RT-PCR detection were consistent with those of Agilent human gene expression spectrum chip analysis. **Conclusion** HIFU irradiation can cause a series of changes in gene regulation, and these differential expression genes may participate in the regulation of tumor biological process. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 984-988)

【Key words】 high-intensity focused ultrasound; pancreatic cancer; gene ontology; expression spectrum chip

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2016.11.013

基金项目:天津市滨海新区卫生局重点支持项目(2011BHKZ009)

作者单位:300270 天津市滨海新区大港医院肿瘤科(洪立立、陈立军、武变荣);天津医科大学肿瘤医院介入治疗科(郭志、邢文阁、郭秀英)

通信作者:洪立立 E-mail: honglitj@163.com

近年来,高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound,HIFU)用于治疗胰腺癌、肝癌、前列腺癌等恶性肿瘤以及子宫肌瘤等良性肿瘤取得了良好效果^[1-4]。HIFU 可将超声波能量聚焦在体内靶区域内,在焦点形成瞬间高温并杀灭肿瘤细胞^[5],但关于 HIFU 辐照肿瘤组织后引起的基因水平改变的研究较少。本研究采用表达谱芯片技术初步观察 HIFU 辐照 BALB/c-nu 裸鼠移植瘤(人胰腺癌细胞系 YY-1)后的基因表达谱差异,拟从基因水平探讨 HIFU 作用机制,以期为临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞系

BALB/c-nu 裸小鼠购自北京大学医学部实验动物科学部(无特定病原体级,许可证号 SCXK 京 2006-0008)。人胰腺癌 YY-1 细胞系源于人胰腺导管上皮癌(天津医科大学附属肿瘤医院提供)。

1.2 细胞培养及移植瘤模型建立

人胰腺癌 YY-1 细胞系接种于含 10%胎牛血清的 McCoy 5A 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 绝对湿度培养箱中培养,每日在倒置显微镜下观察,确保细胞贴壁生长,以 0.125%胰蛋白酶液消化传代,48~72 h 换液。将处于对数生长的瘤细胞经胰蛋白酶液消化、收集,加入磷酸缓冲液(PBS)制成 2×10^7 个/ml 细胞的细胞悬液,于每只裸鼠右侧背部皮下注射 0.2 ml 细胞悬液,接种后 3~4 周出现肉眼可见的肿瘤。待移植瘤生长至直径 1 cm 左右,备实验用。

1.3 HIFU 辐照方法

采用北京源德医疗设备有限公司研制的 HIFU 治疗系统(FEP-BY02 型)。裸鼠以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,固定于自制鼠板,肿瘤表面皮肤涂耦合剂,水囊充满脱气水后轻压于皮肤表面。选择肿瘤中心点设置靶皮距,以连续扫描方式启动手动治疗程序覆盖肿瘤。辐照参数:声功率 200 W;单元发射时间(t_1)990 ms;占空时间(t_2)10 ms, $t_2/t_1=1/99$;总发射次数(T)4 次。假照组(对照组)同样行麻醉、上机程序,但治疗时关闭电功率。

1.4 基因芯片制备和检测

选择 Agilent 基于 G3 平台最新设计的人类表达谱芯片,探针设计参照的数据库为 RefSeq Build 36.3、Ensemble Release 52、UniGene Build 216、GenBank(April 2009)。

HIFU 辐照后第 7 天剪取辐照组和假照组标本 80 mg,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,Qiagen RNeasy

试剂盒纯化总 RNA,具体步骤参考 RNeasy 试剂盒操作规程。RNA 杂交及芯片扫描:将总 RNA 反转录合成 cDNA,采用标记产物并以 Qiagen RNeasy 试剂盒纯化 cRNA,经 NanoDrop ND-1000 型分光光度计分析 RNA 浓度,测定吸光度以确定样品浓度和纯度。芯片杂交:加入片段化混合液,60℃温浴 30 min 进行片段化,加入 2x GEx 杂交缓冲液混匀后上芯片,65℃杂交 17 h。芯片洗涤和扫描:已完成杂交的芯片以缓冲液洗去杂质,氮气吹干后放入 Agilent G2505C 型扫描仪扫描获取原始图像。

1.5 芯片数据分析

采用 Feature Extraction 特征提取软件处理提取原始数据,GeneSpring 数据分析软件作标准化和后续处理。用 *t* 检验、*P* 值和倍数变化值作差异性基因筛选,Cluster 3.0 软件对差异性基因作聚类分析,并作基因本体(GO)分类检索及富集度分析。

1.6 反转录-聚合酶链反应验证

选取上调基因 HIF1a、SMAD4 及下调基因 Bcl-xl,分别采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术进行验证,以 β -actin 作为内参。引物由北京擎科生物工程有限公司合成,HIF1a 引物序列的上游序列为 GAAAGCAGTTCC-GCAAGC,下游序列为 TTATGTATGTGGGTAGGA-GATGG,扩增长度 197 bp;SMAD4 引物序列的上游序列为 CACGGGCTT-GGATTGATT,下游序列为 TTCTTCTAACTGGGC-TCTGC,扩增长度 156 bp;Bcl-xl 引物序列的上游序列为 GTGCGTGGAAAG-CGTAGACA,下游序列为 TGGGAGGGTAGAGTGG-ATGGT,扩增长度 284 bp; β -actin 引物序列的上游序列为 GACGACATGGAG-AAGATCTG,下游序列为 ATGGCGTGGGGGAG-GGCGTA,扩增长度 287 bp。获得的 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法比较相对基因表达量情况。

1.7 统计学方法

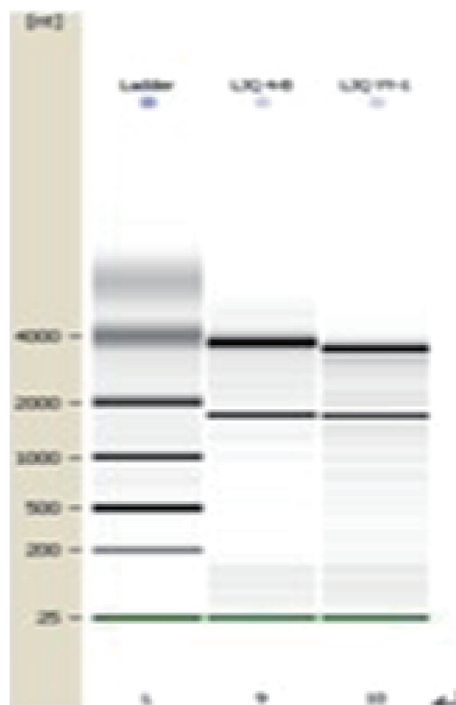
对所得全部资料建立数据库,采用 SPSS 17.0 版软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 质检情况

样本 RNA 总量 $> 5 \mu\text{g}$,RNA 浓度 $> 200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。样品 RNA 体积 $> 20 \mu\text{l}$,RNA 总量 $> 4 \mu\text{g}$ 。实验结果显示,RNA 纯度 $A_{260}/A_{280} \geq 2$, $A_{260}/A_{230} \geq 2$,符合表达谱芯片实验要求。采用毛细管电泳检测计算 RNA

完整度指数(RIN),RIN 值越高,表示 RNA 整体质量越好,结果显示,28S:18S rRNA 条带亮度 >0.7 ,RIN 值 >7.0 ,RNA 样品电泳条带清晰,质量符合实验要求(图 1)。

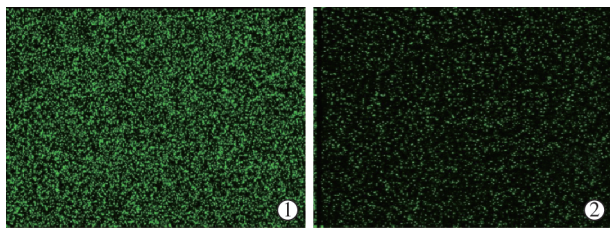


右向左依次为辐照组、假照组及标准参照物(Ladder)

图 1 RNA 凝胶电泳图

2.2 芯片杂交图

芯片杂交后扫描所得荧光强度图像,可反映芯片杂交状况,图中每个亮点是与 cDNA 杂交后发出的荧光,将荧光强度作一系列数据处理即可找出两个样品间差异性表达基因;亮度越高、越清晰、越致密均匀,杂交状况越好。结果显示,芯片杂交扫描图信号清晰、每点分布均匀,背景干净,符合芯片数据分析的要求,见图 2。



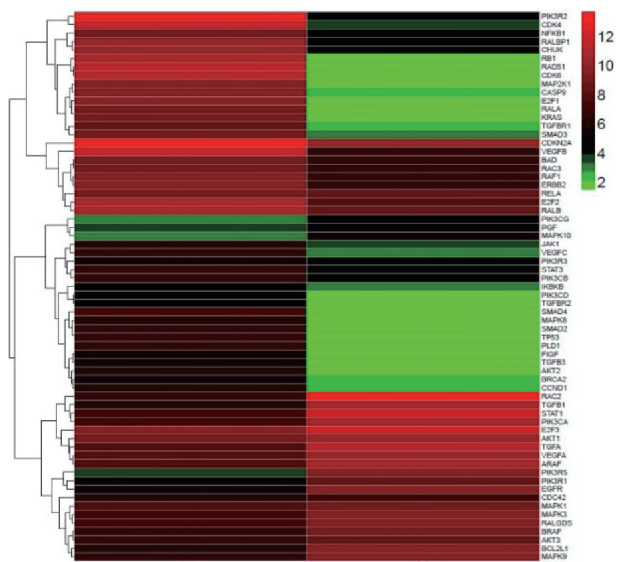
①辐照组;②假照组

图 2 芯片杂交扫描图

2.3 差异性基因表达

HIFU 辐照后,采用信号比值定位方法,按上调或下调倍数变化值 ≥ 2 且 $P \leq 0.05$ 标准对基因表达谱结果进行筛选,得到与胰腺癌相关差异性表达基因共 65 个,其中上调 43 个,下调 22 个。用 Cluster

3.0 软件对这些差异性表达基因作聚类分析显示,辐照组和假照组间表达存在明显差异,见图 3。



①辐照组;②假照组

图 3 胰腺癌相关差异性基因聚类分析图

2.4 GO 分析结果

GO 包含 Entrez gene 库 38 675 个注释基因中的 17 348 个,分为生物过程、分子功能及细胞组分三部分^[6]。每一分类中均提供一个描述功能信息的分级结构。统计每个 GO 条目中所包括的差异基因个数,并以统计检验方法计算每个 GO 条目中差异性基因富集的显著性。GO 分析结果提示,表达改变的基因在细胞组分水平上富集于细胞核、细胞质部位,同时线粒体等部位也不同程度发生基因改变;在分子功能水平上富集在蛋白结合、金属离子结合、锌离子结合、DNA 结合方面,同时三磷酸腺苷(ATP)结合、水解酶及转移酶活性等方面也不同程度发生改变;在生物过程水平上则主要富集在转录调控、细胞凋亡领域,同时转运、细胞周期、蛋白质磷酸化等领域也一定程度发生改变,见图 4。

2.5 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测结果显示,与假照组相比,辐照组 HIF1A、SMAD4 基因表达显著升高、Bcl-xl 基因表达显著下降,与表达谱芯片结果趋势一致,见表 1。

3 讨论

表达谱芯片技术是以特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针,与待测标记样品的基因杂交,再通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描,并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号进行比较和检测,获得所需信息^[7]。表达谱芯片技术具

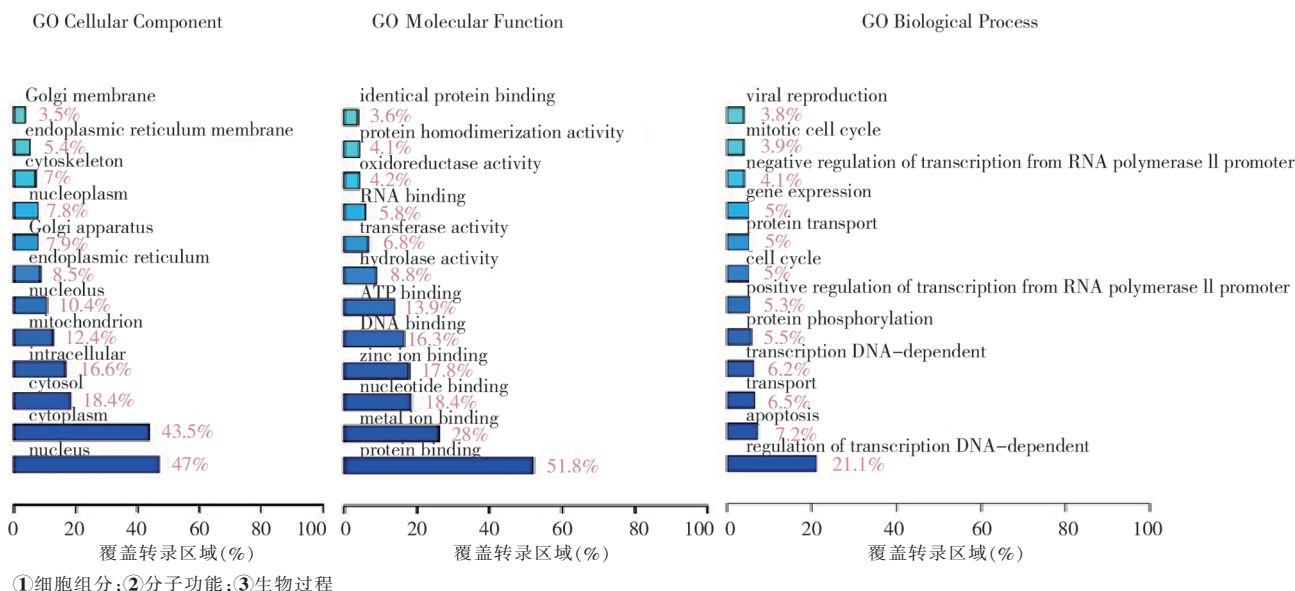


图 4 差异基因 GO 分析图

表 1 RT-PCR 相对定量检测结果

基因	分组	Ct 均值	相对表达量
HIF1A	辐照组	20.08±1.31*	48.28
	假照组	28.35±2.05	1
SMAD4	辐照组	23.95±2.42*	51.63
	假照组	32.32±3.61	1
Bel-xl	辐照组	28.08±2.54*	0.11
	假照组	25.73±1.97	1

注: * 辐照组与假照组比较, $P < 0.05$

有高通量、简便、多参数、集约化、平行化等优点,被广泛应用于肿瘤防治研究。我们在前期研究中发现 HIFU 辐照可诱导肿瘤细胞凋亡, 凋亡率于辐照后 7 d 达到峰值^[8], 因此在本研究中采用该时间点标本, 以表达谱芯片技术检测差异性表达基因, 旨在从基因组水平获取信息。

GO 分析为最常用的分析软件, 通过 GO 分类和各种 GO 数据库相关分析工具将分类与具体基因联系起来, 研究者即可对相应基因的功能进行描述, 判定检定结果是否具有统计学意义, 推测差异性表达基因所参与的生物功能^[6]。本研究中, GO 富集结果提示显著表达改变的基因在细胞组分上富集于细胞核、细胞质、线粒体、细胞间隙等部位, 在分子功能水平上则富集于蛋白结合、金属离子结合、锌离子结合、DNA 结合等方面; GO 分析结果提示, 生物过程方面发生显著改变的差异性基因主要富集在转录调控、细胞凋亡领域, 同时转运、细胞周期、蛋白磷酸化等领域也不同程度发生改变。

作为非侵袭性局部消融方法, HIFU 作用机制包括热效应及非热效应(机械效应、空化效应)。研究发现, 尽管两者在病理特征上存在一些差别, 但

光镜下观察均可发现细胞间隙增大、核固缩、碎裂、溶解等现象^[9], 电镜下观察则可发现细胞膜、核膜连续性丧失, 胞质内细胞器破坏等^[10]。本研究中 GO 分析结果与上述病理表现一致, 验证了 HIFU 杀灭肿瘤细胞的可靠性, 同时说明 HIFU 通过广泛效应调控肿瘤分化、增殖、生长等生物学过程: ①HIFU 可破坏肿瘤细胞 DNA 结构, 使细胞周期停滞, 从而抑制肿瘤细胞增殖; ②通过级联反应, 调控凋亡, 抑制肿瘤生长; ③通过蛋白磷酸化, 启动多种信号转导通道, 影响肿瘤生物学进程。

采用表达谱芯片技术研究 HIFU 作用机制的文献报道较少。Tabuchi 等^[11]首次报道采用表达谱芯片方法研究低强度超声对白血病 Mol4 细胞株基因表达谱的影响, 发现超声在非热模式下可使基因表达谱发生变化(上调基因 4 个, 下调基因 2 个)。Hundt 等^[12]通过对头颈肿瘤裸鼠模型研究发现, HIFU 辐照可引起广泛的基因表达谱变化, 连续辐照方式引起的病理变化以热效应所致缺血、坏死为主, 差异基因主要与代谢改变相关; 而脉冲辐照产生的非热效应主要与免疫功能相关。与上述研究相比, 本研究中发现了更为丰富的差异性表达基因, 可能原因在于: ①研究中差异性基因主要以代谢功能(32.5%)为主, 同时生物过程分析中细胞凋亡占有重要位置(排第 2 位), 提示本实验中 HIFU 可能同时通过热效应和非热效应发挥调控作用; ②随着功率、频率、占空比等参数不同, HIFU 辐照可产生不同的生物学效应; ③基于不同肿瘤细胞系的生物学特性存在差异, 研究结果可能不同。

综上,本研究初步从基因水平获取了大量信息,结合分子生物学方法,探索了 HIFU 作用机制。但 HIFU 在不同的条件下影响肿瘤细胞的具体分子生物学机制及差异,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 熊六林,赫崇军,姚松森,等.高强度聚焦超声热疗治疗晚期胰腺癌的初步应用[J].中华普通外科杂志,2001,16:345-347
- [2] 洪立立,郭志,司同国,等.HIFU 补救治疗 TACE 失败肝癌的临床研究[J].介入放射学杂志,2014,23:833-839.
- [3] Chapelon JY, Rouviere O, Crouzet S, et al. Prostate focused ultrasound therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 880: 21-41.
- [4] 王智亮,熊正爱,陈骊,等.高强度聚焦超声消融治疗围绝经期子宫肌瘤的初步研究[J].中国超声医学杂志,2014,30:55-58.
- [5] Hsiao YH, Kuo SJ, Tsai HD, et al. Clinical application of high-intensity focused ultrasound in cancer therapy[J]. J Cancer, 2016, 7: 225-231.
- [6] Primmer CR, Papakostas S, Leder EH, et al. Annotated genes and nonannotated genomes: cross-species use of Gene Ontology in ecology and evolution research[J]. Mol Ecol, 2013, 22: 3216-3241.
- [7] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer[J]. Nature, 2002, 415: 530-536.
- [8] 洪立立,郭志,邢文阁,等.不同功率高强度聚焦超声治疗人胰腺癌转移瘤初步实验研究[J].介入放射学杂志,2015,24:621-624.
- [9] 吴蓉,胡兵,姜立新,等.高强度聚焦超声治疗裸鼠卵巢癌皮下移植瘤的初步观察[J].中国医学影像技术,2007,23:31-33.
- [10] 伍烽,王智彪,陈文直,等.高强度聚焦超声体外破坏原发性肝癌的病理学观察[J].中华肿瘤杂志,2001,23:237-239.
- [11] Tabuchi Y, Ando H, Takasaki I, et al. Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4[J]. Cancer Lett, 2007, 246: 149-156.
- [12] Hundt W, Yuh EL, Bednarski MD, et al. Gene expression profiles, histologic analysis, and imaging of squamous cell carcinoma model treated with focused ultrasound beams[J]. AJR Am J Roentgenol, 2007, 189: 726-736.

(收稿日期:2016-05-05)

(本文编辑:边信)

•病例报告 Case report•

肝癌 TACE 术后破裂并发肝脓肿及肺动脉碘化油栓塞 1 例

吴正阳, 朱明, 周朋利, 吴刚, 韩新巍

【关键词】原发性肝癌;肝动脉化疗栓塞术;肝脓肿;肺动脉碘化油栓塞;胆汁瘤
中图分类号:R735.7 文献标志码:D 文章编号:1008-794X(2016)-11-0988-03

Rupture of hepatic tumor complicated by liver abscess and pulmonary lipiodol embolism after TACE: report of one case WU Zheng-yang, ZHU Ming, ZHOU Peng-li, WU Gang, HAN Xin-wei. Department of Interventional Radiology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province 450052, China

Corresponding author: HAN Xin-wei, E-mail: wu888zhy@163.com (J Intervent Radiol, 2016, 25: 988-990)

【Key words】primary hepatocellular carcinoma; hepatic arterial chemoembolization; liver abscess; pulmonary artery lipiodol embolism; biloma

临床资料

患者男,67岁。因体检发现肝脏占位1周就诊,既往有

乙肝病史20年,不规律服用抗病毒药。入院后完善相关检查,Child-Pugh A级,AFP>1 200 u/ml,CT显示肝内巨大占位,达18 cm×17 cm,诊断为原发性肝癌。外科会诊后已无手术指征,遂行TACE。术中见肝内巨大肿瘤染色,无动-静脉瘘,而后SP微导管(Terumo, Japan)超选至肿瘤供血动脉,缓

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2016.11.014

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院放射介入科

通信作者:韩新巍 E-mail: wu888zhy@163.com