

卡铂对肝癌 HepG2 细胞影响的基因芯片分析*

岳萍, 陈琳, 黄文竹, 胡祖权, 王贇, 邱炜**

(贵州医科大学 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] **目的:** 分析卡铂对肝癌 HepG2 细胞基因转录水平的影响。**方法:** 用 50 mg/L 卡铂处理 HepG2 细胞 48 h 后, Trizol 法抽提总 RNA, 利用基因芯片检测 HepG2 细胞基因在转录水平上的表达变化, 分析获得差异基因; 采用基因本体论(GO)分析差异转录基因分子功能、细胞组成及参与的生物过程, 采用京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析差异转录基因涉及的相关信号通路。**结果:** 差异转录的基因共有 1 474 个(与对照组相比, 变化倍数 >3), 其中上调基因有 520 个, 下调基因有 954 个; 这些差异转录基因参与了酶结合、腺嘌呤核苷酸结合等相关功能, 并与内质网、高尔基体、细胞骨架、锚定连接及细胞外间隙等有关; 差异转录基因涉及淀粉和蔗糖代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、MAPK 通路、类固醇激素生物合成、补体与凝血级联途径等信号通路。**结论:** 卡铂影响 HepG2 细胞中多个基因的转录, 这些基因调控细胞多种功能。

[关键词] 肝肿瘤; 卡铂; HepG2 细胞; 基因芯片; 差异基因; GO 分析; KEGG 分析

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)03-0279-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.03.007

Microarray Analysis of Carboplatin on HepG2 Cells in Hepatocellular Carcinoma

YUE Ping, CHEN Lin, HUANG Wenzhu, HU Zuquan, WANG Yun, QIU Wei
(School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of carboplatin on gene transcription level of HepG2 cells was studied in this experiment to provide important information for the clinical treatment of carboplatin-based therapy against liver cancer. **Methods:** At 48 h after HepG2 cells were treated with 50 mg/L carboplatin, and total RNA was extracted by Trizol method. Gene chip was used to detect the expression changes of HepG2 genes at the transcription level, and differential genes were obtained. Genomic ontology (GO) was used to analyze the molecular function, cell composition and biological processes involved in differentially transcribed genes, and Kyoto gene and genome encyclopedia (KEGG) was used to analyze the relevant signal pathways involved in differentially transcribed genes. **Results:** There were 1 474 differentially transcribed genes (compared with the control group, Fold Change > 3), of which 520 were up-regulated and 954 were down-regulated. These differential genes involve all aspects of cell life, including a variety of physiological processes and signaling pathways. **Conclusion:** Carboplatin affects the transcription of multiple genes in HepG2 cells, which regulate multiple functions of the cells.

[Key words] liver neoplasms; carboplatin; HepG2 cells; microarray; differential genes; GO analysis; KEGG analysis

*[基金项目] 贵州省科技厅项目[黔科合 LH 字(2014)7083 号]; 贵州省科技厅项目[黔科合 LH 字(2015)7326 号]

** 通信作者 E-mail: qwei407@163.com

网络出版时间: 2019-03-23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190323.1455.007.html>

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最主要的恶性肿瘤之一,被认为是癌症相关死亡的第三个最常见的病因,其发病率和死亡率几乎相等^[1-3]。由于 HCC 缺乏明显的临床症状和特异性的血清学诊断指标,其在早期很难被发现。因此,大多数患者在确诊时已是 HCC 晚期,患者 5 年生存率较低^[4-5]。卡铂是第二代铂制剂,它除了保留了第一代铂(顺铂)的抗肿瘤范围广、对实体肿瘤疗效高等优点外,其对神经系统及肾脏的毒性作用明显低于顺铂^[6-7]。大量临床试验表明,卡铂对 HCC、肺癌、脑肿瘤、淋巴瘤、神经母细胞瘤、生殖细胞瘤等多种恶性肿瘤有明显的治疗作用^[8-13]。目前,卡铂与紫杉醇、依托泊苷等其他药物联合化疗的治疗方案已被证实具有明显的优越性^[14-17]。卡铂主要作用于 DNA,破坏 DNA 复制,从而产生细胞毒性,抑制肿瘤的生长^[18-19]。本课题组的研究发现,卡铂对肝癌 HepG2 细胞膜流动性、渗透脆性、迁移能力和细胞骨架等生物流变学特性有显著影响(待发表),为进一步了解其分子机制,本研究利用基因芯片技术检测卡铂对 HepG2 细胞总体基因转录的影响,分析获得差异基因;采用基因本体论(gene ontology, GO)分析差异转录基因分子功能、细胞组成成分及参与的生物过程,采用京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析差异转录基因涉及的相关信号通路。为卡铂治疗肝癌提供更多的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2(课题组保存)、卡铂注射液(齐鲁制药有限公司国药准字 H20020181)、DMEM 培养基(美国 HyClone 公司)、青霉素/链霉素(美国 Gibco 公司)、10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌 HepG2 细胞的复苏与培养 将肝癌细胞保存管从液氮中取出并立即放于 37℃ 温水中解冻,在 1 min 中内完成。然后在无菌操作台中取出细胞悬液,低速离心,弃上清液,加入到含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,并置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,次日更换培养液。待细胞铺板面积达约 80%~90% 时,进行卡铂处理实验,或用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后进行传代培养。

1.2.2 细胞分组 RNA 提取 取 3 份 HepG2 细

胞,采用浓度为 50 mg/L 的卡铂处理,作为处理组 1~3;取 3 份 HepG2 细胞不加卡铂处理,作为对照组 1~3;6 份细胞均培养 48 h,然后用 Trizol 法提取总 RNA;使用 Thermo NanoDrop 2000 测定总 RNA 浓度,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测总 RNA 的完整性。RNA 质控参考指标见表 1。

表 1 RNA 质控参考指标

样品质检	2100 RIN 值	28 S/18 S
合格	≥7.0	≥0.7
部分降解 1	2100 RIN ≥7.0	28 S/18 S <0.7
部分降解 2	6.0 ≤2100 RIN <7.0	-
完全降解	<6.0	-

注:RIN 为 RNA 完整性计数;“-”为无比值

1.2.3 基因芯片杂交 总 RNA 样本通过质检后,分别合并 3 份处理和对照组 RNA 样本,采用 GeneChip 3' IVT Express Kit 制备 aRNA (amplified RNA)。将 aRNA 进行纯化,然后将其片段化后与基因芯片探针进行杂交。杂交完成后取出芯片,用 GeneChip Fluidics Station 450 进行自动洗染,洗染完成后扫描获得数据。

1.2.4 生物信息学分析 按照 |Fold Change| > 3 标准筛选有显著差异转录的基因。然后通过 GO 分析差异转录基因分子功能、细胞组成成分及参与的生物过程,采用 KEGG 分析差异转录基因涉及的相关信号通路。

2 结果

2.1 总 RNA

结果显示,提取 RNA 的 RIN ≥7.0, 28 S/18 S ≥0.7, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.9~2.05;浓度 >1 000 μg/L,质检结果合格,可进行后续实验。见表 2。

表 2 处理组和对照组 HepG2 细胞总 RNA 质检结果

组别	浓度 (μg/L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN	28 S/18 S	质检结果
对照组 1	1 411.2	2.01	9.2	1.2	合格
对照组 2	1 367.6	2.03	9.2	1.1	合格
对照组 3	2 216.1	1.98	9.1	1.1	合格
处理组 1	1 166.1	2.00	7.5	0.9	合格
处理组 2	1 105.1	2.00	7.5	0.9	合格
处理组 3	1 503.7	1.99	7.4	0.9	合格

2.2 基因芯片检测

与对照组相比,顺铂处理组差异转录的基因有 1 474 个,其中上调基因有 520 个,下调基因有 954 个。上调基因有(部分):*EGR1*、*FOS*、*HSPA7*、*HS-PA6*、*ZNF280A*、*FOXC1*、*PMAIP1*、*TP53I3*、*IER5L*、*HIST2H2AA4*、*HIST2H2AA3*、*DLX2*、*SNAI1*、*CSTA*、*SNORA28*、*EIF5*、*SERTAD1*、*TREM2*、*CD3D*、*HEXIM1*、*HBEGF*、*IER5*、*RGS2*、*HCP5*、*E2F7*、*CC-NE2*、*ATF3*、*HSPA8*、*HSPH1*、*CYP4F2*、*LACC1*、*TN-FSF9*、*PGF*、*NPPC*、*CHORDC1*、*HMOX1*、*ZFAND5*、*TOB2*、*SMOX* 及 *SMIM13* 等。下调基因有(部分):*PLCB1*、*FNDC3B*、*PTPRM*、*DOCK4*、*PRKCA*、*PLPPR1*、*PPM1H*、*GPC6*、*SAMD4A*、*SBF2*、*LOC101928168*、*CHN2*、*SORL1*、*PTPRK*、*MYO10*、*IGF1R*、*PCCA*、*CRADD*、*PPP1R9A*、*SHANK2*、*MAML2*、*FRAS1*、*NBAS*、*DCDC2*、*CPVL*、*SORBS2*、*ITPR1*、*DTNA*、*TBC1D5*、*PTPRG*、*DAPK1*、*RELN*、*TTC28*、*TGFBR3*、*LRBA*、*PSD3*、*ARID1B* 及 *DOCK1* 等。

2.3 差异基因的 GO 分析

GO 分析结果显示,富集程度最显著的 10 种差异转录基因参与了细胞增殖、刺激反应、信号传导、蛋白质代谢及氮化合物代谢等相关的生物过程,见表 3。在分子功能方面,差异转录基因参与了酶结合、腺嘌呤核苷酸结合、受体结合、脂质结合、大分子复合物结合等相关功能,见表 4。结果还显示,在细胞组成方面,差异转录基因与内质网、高尔基体、细胞骨架、锚定连接及细胞外间隙等相关,见表 5。

表 3 差异转录基因参与的生物过程分析

Tab.3 Analysis results of biological processes involved differentially transcribed genes

功能分类	差异基因数(n)	P	FDR
细胞增殖	176	3.36E-56	1.56E-52
分子功能的正调控	193	1.01E-55	2.35E-52
刺激反应的负调控	166	3.60E-55	5.59E-52
刺激反应的正调控	199	1.76E-54	2.05E-51
水解酶活性	162	7.94E-54	7.39E-51
信号传导	182	1.02E-53	7.90E-51
蛋白质代谢过程的负调控	146	1.22E-53	8.14E-51
应激反应	170	2.86E-53	1.66E-50
氮化合物代谢过程的负调控	171	6.19E-52	3.20E-49
细胞死亡	168	9.45E-52	4.40E-49

注:P 为差异分析的显著性指标,FDR 为错误发现率

表 4 差异转录基因分子功能分析

Tab.4 Analysis results of molecular function involved in differentially transcribed genes

功能分类	差异的基因数(n)	P	FDR
酶结合	210	1.49E-69	1.39E-66
分子功能调节	166	1.75E-55	8.11E-53
酶活性调节	125	1.72E-44	5.32E-42
腺嘌呤核苷酸结合	157	5.07E-43	1.18E-40
核糖核酸结合	176	7.42E-43	1.38E-40
受体结合	143	7.24E-36	1.12E-33
脂质结合	91	1.26E-34	1.68E-32
过渡金属离子结合	133	1.68E-32	1.95E-30
含磷基团转移酶活性	104	5.54E-29	5.72E-27
大分子复合物结合	124	1.54E-27	1.30E-25

注:P 为差异分析的显著性指标,FDR 为错误发现率

表 5 差异转录基因细胞组成分析

Tab.5 Analysis results of cell composition involved differentially transcribed genes

功能分类	差异的基因数(n)	P	FDR
内质网	170	6.08E-47	3.55E-44
细胞突起	161	1.37E-36	4.01E-34
细胞骨架	170	2.32E-36	4.51E-34
内质网组成部分	124	3.64E-35	5.32E-33
高尔基体	137	2.21E-33	2.58E-31
细胞连接	116	1.09E-30	1.06E-28
神经元组成部分	121	7.05E-30	5.88E-28
神经元突起	99	1.04E-27	7.56E-26
锚定连接	68	3.03E-26	1.96E-24
细胞外间隙	120	4.71E-26	2.75E-24

注:P 为差异分析的显著性指标,FDR 为错误发现率

2.4 差异基因的 KEGG 信号通路

利用 IPA 软件对差异基因进行相关信号通路分析,富集程度最显著的 10 条通路见表 6。

表 6 差异转录基因涉及的富集程度最高的信号通路

Tab.6 Related signaling pathways involved in differentially transcribed genes

通路名称	差异基因数	P	FDR
淀粉和蔗糖代谢	22	2.21E-20	8.92E-18
Focal adhesion 通路	33	1.42E-15	2.85E-13
内吞作用	31	4.16E-15	5.59E-13
卟啉与叶绿素代谢	16	1.59E-14	1.61E-12
抗坏血酸和醛酸代谢	13	4.63E-14	3.73E-12
MAPK 通路	35	2.11E-13	1.41E-11
戊糖与葡萄糖醛酸转化途径	13	3.07E-13	1.77E-11
类固醇激素生物合成	16	3.12E-12	1.57E-10
补体与凝血级联途径	17	1.27E-11	5.67E-10
通过细胞色素 P450 的外源物质代谢途径	17	1.63E-11	6.55E-10

注:P 为差异分析的显著性指标,FDR 为错误发现率

3 讨论

铂类制剂是目前治疗癌症最有效的药物之一,在世界范围内得到了广泛的临床应用。卡铂作为第 2 代铂类抗肿瘤药物已经被研究了很多年,其进入肿瘤细胞后水解成水合物,该水合物进一步去质子化生成羟基化的配位离子,这些离子的化学性质活泼,通常能与 DNA 的两个鸟嘌呤碱基 7-位氮原子(N-7)交联而形成加合物,从而阻止 DNA 的复制,并且 DNA 修复机制不能识别这些加合物^[18-20]。虽然这些发现可以解释为什么卡铂能抑制肿瘤的发展,但这些研究结果仅仅局限于 DNA 损伤方面。本研究通过基因芯片技术来研究卡铂对肝癌细胞基因转录的影响,这对从总体上了解卡铂的作用机制来说具有重要意义。

基因芯片是一种能够检测总 mRNA 转录水平变化的分子生物学技术,该技术可以对 mRNA 进行定量检测来研究基因的转录差异。本研究采用 Affymetrix mRNA 基因芯片技术来研究卡铂对 HepG2 细胞总体基因转录的影响,结果发现卡铂能显著影响 1 474 个基因的转录(变化倍数 >3),其中上调基因有 520 个,下调基因有 954 个。这些差异基因涉及到了细胞生命的各个方面,其中 GO 分析发现这些差异基因参与了细胞增殖、刺激反应、氮化合物代谢、蛋白质代谢等多种生物过程,腺嘌呤核苷酸结合、脂质结合、大分子复合物结合、含磷基团转移酶活性等相关分子功能,与内质网、高尔基体、细胞骨架、锚定连接及细胞外间隙等细胞组成相关;KEGG 分析发现这些差异基因还参与了 MAPK 通路、戊糖与葡萄糖醛酸转化、抗坏血酸和醛酸代谢、补体与凝血级联途径等信号通路。

4 参考文献

- [1] NI Q, CHEN J, LI X, et al. Expression of OTUB1 in hepatocellular carcinoma and its effects on HCC cell migration and invasion [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49(8):680-688.
- [2] ZHAO G, HAN C, ZHANG Z, et al. Increased expression of microRNA-31-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating Sp1 transcription factor in HepG2 hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2):371-377.
- [3] BEST J, SCHOTTEN C, THEYSOHN J M, et al. Novel

implications in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Gastroenterol*, 2017, 30(1):23-32.

- [4] LIN X L, LIU M, LIU Y, et al. Transforming growth factor β 1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial-to-mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1):129-136.
- [5] IKEDA M, MORIZANE C, UENO M, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2018, 48(2):103-114.
- [6] NAGASAKI M, ZAKI M, ISSA M, et al. Definitive chemoradiotherapy with carboplatin for squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Laryngoscope*, 2017, 127(10):2260-2264.
- [7] OLIVEIRA L, CAQUITO J M JR, ROCHA M S. Carboplatin as an alternative to cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level [J]. *Biophys Chem*, 2018, 241:8-14.
- [8] DOWNING K, JENSEN B P, GRANT S, et al. Quantification and clinical application of carboplatin in plasma ultrafiltrate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 138:373-377.
- [9] SUN T, LI L. A cohort study of hypersensitivity reaction in patients with epithelial ovarian cancer treated with carboplatin [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2019, 29(3):566-571.
- [10] YANG W, BARTH RF, HUO T, et al. Radiation therapy combined with intracerebral administration of carboplatin for the treatment of brain tumors [J]. *Radiat Oncol*, 2014, 9:25.
- [11] GEURTSSEN M L, KORS W A, MOLL A C, et al. Long-term audiological follow-up of carboplatin-treated children with retinoblastoma [J]. *Ophthalmic Genet*, 2017, 38(1):74-78.
- [12] MOEUNG S, CHEVREAU C, BROUTIN S, et al. Therapeutic drug monitoring of carboplatin in high-dose protocol (TI-CE) for advanced germ cell tumors: Pharmacokinetic results of a phase II multicenter study [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(23):7171-7179.
- [13] GILLEM J, GIUFFRIDA M, KRICK E. Efficacy and toxicity of carboplatin and cytarabine chemotherapy for dogs with relapsed or refractory lymphoma (2000-2013) [J]. *Vet Comp Oncol*, 2017, 15(2):400-410.
- [14] CHON H S, KANG S, LEE J, et al. Phase I study of oral ridaforolimus in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with solid tumor cancers [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):407.

(下转第 288 页)