

· 基础研究 ·

肺癌细胞株中GEM和CDDP药物敏感性 相关基因的研究

杨春雨* 田振因* 刘炜 蔡莉

【摘要】背景与目的 筛选小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞株中与健择 (gemcitabine hydrochloride, GEM) 和顺铂 (cisplatin, CDDP) 药物敏感性相关的基因, 有助于进一步阐明抗癌药物作用机制, 为克服抗癌药物的耐药性、研制开发新的抗癌药物提供新线索, 同时也将为临床的个体化治疗提供理论依据。方法 采用MTT比色分析法测定4株SCLC细胞株和6株NSCLC细胞株对CDDP和GEM的药物敏感性, 同时应用cDNA macroarray技术检测10株肺癌细胞株中1 291个药物敏感性相关基因的表达状态, 分析二者之间的相关性。结果 与GEM药物敏感性呈明显正相关 ($r \geq 0.632, P < 0.05$) 的基因有6个; 与CDDP药物敏感性关联的基因共有45个; 与GEM、CDDP敏感性关联 ($r \geq \pm 0.4$) 的基因有41个; 肺癌细胞系中与GEM和CDDP两类药物敏感性呈明显相关的基因是 *Metallothionein* (信号转导分子)、*Cathepsin B* (组织蛋白酶B) 和 *TIMP1* (生长因子); 肺癌细胞系中与GEM、CDDP药物敏感性相关联的基因主要分布于 *Metallothionein*、*Cathepsin B*、生长因子 *TIMP1* 等类别。结论 SCLC和NSCLC细胞株中GEM、CDDP存在药物敏感性相关基因, 其中 *Metallothionein*、*Cathepsin B* 和 *TIMP1* 基因与GEM药物敏感性呈正相关, 与CDDP药物敏感性呈负相关。

【关键词】 cDNA macroarray; MTT比色分析法; 肺癌细胞株; 药物敏感性; GEM; CDDP

【中图分类号】 R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.10.02

Screening the Drug Sensitivity Genes Related to GEM and CDDP in the Lung Cancer Cell-lines

Chunyu YANG^{1*}, Zhennan TIAN^{2*}, Wei LIU¹, Li CAI¹

¹Department of Medical Oncology, the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China;

²Department of Postgraduate, the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China

Chunyu YANG and Zhennan TIAN contributed equally to this paper.

Corresponding author: Li CAI, E-mail: caiwenxin76@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Background and objective** Screening of small-cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines with gemcitabine hydrochloride (GEM) and cisplatin (CDDP) related to drug sensitivity gene might clarify the action mechanism of anti-cancer drugs and provide a new clue for overcoming drug resistance and the development of new anti-cancer drugs, and also provide theoretical basis for the clinical treatment of individual. **Methods** The drug sensitivity of CDDP and GEM in 4 SCLC cell lines and 6 NSCLC cell lines was determined using MTT colorimetric assay, while the cDNA macroarray was applied to detect the gene expression state related to drug sensitivity of 10 lung cancer cell line in 1 291, and the correlation between the two was analyzed. **Results** There were 6 genes showing significant positive correlation ($r \geq 0.632, P < 0.05$) with GEM sensitivity; 45 genes positively related to CDDP; another 41 genes related to both GEM and CDDP ($r \geq \pm 0.4$). Lung cancer with GEM and CDDP sensitivity of two types of drugs significantly related genes were *Metallothionein* (Signal transduction molecules), *Cathepsin B* (Organization protease B) and *TIMP1* (Growth factor); the GEM, CDDP sensitivity associated genes of lung cancer cell lines mainly distributed in *Metallothionein*, *Cathepsin B*, growth factor *TIMP1* categories. **Conclusion** There existed drug-related sensitive genes of GEM, CDDP in SCLC and NSCLC cell lines; of these genes, *Metallothionein*, *Cathepsin B* and *TIMP1* genes presented a significant positive correlation with GEM drug sensitivity, a significant negative correlation with CDDP drug sensitivity.

本研究受国家自然科学基金面上项目 (No.30772540), 黑龙江省科委攻关课题 (No.GC07C349) 和黑龙江省教育厅骨干教师资助项目 (No.1151G026) 资助

杨春雨和田振因同为第一作者

作者单位: 150040 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内四科 (杨春雨, 刘炜, 蔡莉), 150010 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院研究生部 (田振因) (通讯作者: 蔡莉, E-mail: caiwenxin76@yahoo.com.cn)

【 Key words 】 cDNA macroarray; MTT colorimetric assay; Lung cancer cell lines; Drug sensitivity; GEM; CDDP

This study was supported by the National Natural Science Foundation General Program (to Li CAI)(No.30772540), the Project Research of Science and Technology Commission of Heilongjiang Province (to Li CAI)(No.GC07C349) and the Backbone of Teacher Funded Projects of Education Office of Heilongjiang Province (to Li CAI)(No.1151G026).

生物芯片技术为研究肿瘤发生、发展中的基因表达谱及各阶段的关键基因提供了强有力的工具,弥补了以往检测基因技术上的不足。cDNA生物芯片根据芯片上杂交基因的密度不同分为低密度芯片(macroarray)和高密度芯片(microarray)两类^[1]。Macroarray在经济性、再现性、信赖性方面均优于microarray,且对仪器设备要求不高,故本研究采用macroarray技术检测了10株具有代表性肺癌细胞株的药物敏感性相关基因的表达状态,同时应用MTT比色分析法测定了10株肺癌细胞株对GEM、CDDP的药物敏感性,并分析了二者的相关性。

1 材料与方法

1.1 肺癌细胞株对GEM、CDDP的药物敏感性测定

1.1.1 实验用细胞株 实验用细胞株共11种(来源于日本医科大学第四内科、黑龙江省肿瘤研究所),其中,NSCLC细胞株为鳞癌LK-2,腺癌PC-7、PC-9、PC-14、A549,大细胞肺癌细胞株Lu65等6株;SCLC细胞株为H69、N231、Lu135、SBC-3等4株;对照细胞为永生化人支气管上皮细胞BET2A细胞株。在5%CO₂、37℃条件下,于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素的RPMI-1640培养液中培养传代,每2日-3日更换培养基,实验用细胞均处于对数生长期。

1.1.2 抗癌药物的配制 顺铂(CDDP)系日本化药株式会社产品,以无血清培养液调整最终浓度为0.005 μg/mL-10 μg/mL;健择(GEM)系日本化药株式会社产品,最终浓度为0.005 μg/mL-500 μg/mL。

1.1.3 药物敏感性测定 采用MTT比色分析法。

1.1.4 抗癌药物敏感性判定 ①以Reed-Muench法^[2],计算IC₅₀值。②以下列公式计算敏感指数:敏感指数公式的出处请见参考文献^[3]。敏感指数^[3]=IC₅₀/PPC。PPC:最高血浆浓度(peak plasma concentration),IC₅₀:50%抑制浓度(50% inhibit concentration)。

1.2 药物敏感性相关基因的测定 采用cDNA macroarray法。

1.2.1 总RNA提取及mRNA纯化 肺癌细胞癌株1×10⁸个,以RNA一步法提取总RNA,以紫外分光光度计测量样品

浓度和纯度,所得RNA_{260/280}值在1.8-2.0,电泳18S和28S RNA条带清晰。用Oligotex mRNA Midi Kit(MagExtractor公司)按说明分离纯化为mRNA。

1.2.2 mRNA的逆转录及标记 取poly(A)+RNA 0.8 μg,按说明用AMV(ToYoBo会社,日本)进行逆转录,同时加入Biotin-16-dUTP进行标记。产物用乙酸钠和无水乙醇沉淀后,重溶于去离子水。

1.2.3 芯片制备 抗癌药物感受性相关基因芯片由日本Geneticlab、Sapporo会社提供。含有1 291个被测cDNA克隆,每个cDNA克隆点两个点,并有280个阴性对照和49个看家基因作为内参照^[4]。

1.2.4 芯片杂交 杂交在杂交炉中进行。将芯片放入含有0.5 mg/mL鲑鱼精DNA的杂交液中,68℃预杂交30 min,加入100 M、100℃变性5 min的标记探针,68℃杂交20 h。以30 mL 2×SSC/0.1%SDS液和0.1×SSC/0.1%SDS液68℃分别洗涤芯片10 min,各3次。

2.5 信号检测 采用Imaging High Chemifluorescence Detection Kit(Toyobo Co., Osaka, Japan)以SABC(streptavidin-biotinylated peroxidase)间接法进行。将芯片放入30 mL、3%BSA封闭液中,振荡作用5 min后,放入20 mL链霉素抗生物素蛋白混合液(1:333)中振荡作用5 min,以40 mL洗液I振荡洗涤芯片3 min,各2次,洗涤后放入20 mL生物素标记的碱性磷酸酶(1:2 000)中,振荡作用5 min,随后以40 mL洗液I、II分别洗涤芯片3 min,各2次。将芯片转入新的塑料盒中,加入新配制的底物溶液,避光室温显色反应5 min,清水漂洗数次后,室温凉干。

1.3 图像分析及数据处理

1.3.1 基因表达强度的测定 以荧光扫描仪(Molecular dynamics, Flouormager 595)测定斑点的灰度值,并做以下校正:①每一方阵中的空白点为本底,校正方阵的其余各点,各点的校正值=各点的实测值-本底值;②同一张膜上代表同一基因的两点的值必须小于2倍,否则被认为是不可靠点而被剔除;③相比较的两张膜的校正系数=A膜全部看家基因总值/B膜全部看家基因总值, B膜的各点的值×该校正系数后与A膜各点的值比较。在此基础上比较两张膜上同一基因的值,差异在3倍以上者判断为差异表达基因。用GenMAPP version 1.0软件对芯片上的相关像

点进行表达强度值测定,得到两张膜相比较的基因对比视图及肺癌细胞株与BET2A细胞间的表达强度值比率。

1.3.2 计算机软件分析 设定A为药物活性模型(10株肺癌细胞株对NVB、Doc的药物敏感性(IC₅₀), Tr为mRNA表达水平的相关数据模型(1 291个基因在10株肺癌细胞株中的表达状况), 药物活性数据(A)的每排代表10株肺癌细胞株对一种抗癌药物的敏感性模型, 每纵列代表一个细胞株对抗癌药物的敏感性模型, 基因表达数据(Tr)含有10株肺癌细胞株中待检基因与BET2A细胞间的表达强度值比率。

1.3.3 统计分析 以两两平均连锁聚类方法分析由基因芯片实验所得到的基因表达数据,以图形方式显示最优线性排序,得到药物与基因表达模式的映像图(clustered image map, CIM)。在CIM中,药物被聚类在与它们相

关的基因上,同时,基因也被聚类在与它们相关的药物上,每片颜色反映一种基因和一种药物的联合,红颜色表示基因表达与抗肿瘤药物敏感性呈正相关;蓝颜色表示相反倾向;黄色或绿色则相关性较小。

2 结果

2.1 SCLC和NSCLC细胞系对GEM和CDDP的敏感性 SCLC和NSCLC细胞系对抗癌药物的敏感性不同(如表1,图1,图2),SCLC对GEM和CDDP均敏感,而NSCLC中PC-7对GEM敏感,PC9、LU65、LK2对GEM较敏感,PC-14、A549对GEM耐药,NSCLC细胞系对CDDP均敏感。即SCLC和NSCLC细胞系对CDDP均敏感。

2.2 SCLC和NSCLC细胞系中与GEM敏感性相关的基因 与GEM药物敏感性呈明显正相关($r \geq 0.632, P < 0.05$)有6个基因(如表2所示),其中与肿瘤侵袭转移和预后及与肿瘤细胞凋亡、生长抑制相关的*Metallothionein*(信号转导分子)、*Cathepsin B*(组织蛋白酶B)和*TIMP1*(生长因子)基因与两种类型肺癌细胞系均呈显著正相关,相同性为50%(3/6),表明这三种基因与肺癌细胞系的抗癌药物敏感性呈明显相关,不排除细胞外基质中存在抗癌药物耐药性相关因素;同时也表明肿瘤细胞凋亡执行功能低可导致抗癌药物耐药性的产生。*TNF-R1*(瘤坏死因子受体1)和*TGF beta-induced 68 kDa*基因只与SCLC细胞系对GEM药物敏感性呈明显正相关,表明SCLC细胞凋亡执行功能低下可导致抗癌药物耐药性的产生;*Galectin-1*只与NSCLC细胞系对GEM药物敏感性呈明显负相关。

2.3 SCLC和NSCLC细胞系中与CDDP敏感性相关的基因 与CDDP药物敏感性关联的基因共有45个(见表3),占被检测基因数的3.49%,其中有7个基因与CDDP药物敏感

表1 SCLC和NSCLC对抗癌药物敏感指数的比较

Tab 1 Comparison of anti-cancer drugs sensitive indices for SCLC and NSCLC

Cell types	IC ₅₀ /PPC	
	GEM	CDDP
NSCLC		
Lu65	6.41	1.36
LK-2	4.40	1.89
PC-7	<0.004	1.82
PC-9	1.15	1.41
PC-14	>40.32	1.14
A549	>40.32	2.18
SCLC		
Lu135	<0.004	0.09
N231	0.31	0.50
H69	0.30	0.66
SBC-3	<0.004	1.94

<1 sensitive; 1-10 less sensitive; >10 resistant.

表2 SCLC和NSCLC中与GEM、CDDP药物敏感性明显相关联的基因

Tab 2 Gene significantly associated with GEM and CDDP drug sensitivity in SCLC and NSCLC

Accession number	Gene	GEM		CDDP	
		SCLC+NSCLC	NSCLC	SCLC+NSCLC	NSCLC
X64177	<i>Metallothionein</i>	0.729***	0.731***	-0.734***	-0.735***
L16510	<i>Cathepsin B</i>	0.703***	0.715***	-0.722***	-0.724***
X03124	<i>TIMP1</i>	0.662**	0.700**	-0.683**	-0.703**
J04456	<i>Galectin-1</i>	—	0.695**	-0.621	-0.707**
X55313	<i>TNF-R1</i>	0.661**	—	-0.675**	-0.624
*	<i>TGF beta-induced 68 kDa</i>	0.646**	—	-0.646**	-0.571
X12451	<i>Cathepsin L</i>	—	—	-0.635**	-0.562

* Gene without accession number; ** (Related coefficient $\geq 0.632, P < 0.05$); *** (Related coefficient $\geq 0.715, P < 0.02$).

表3 CDDP药物敏感性关联基因的分析

Tab 3 Analysis of genes associated with CDDP drug sensitivity

Accession number	Gene	Function classification number	CDDP	
			SCLC+NSCLC	NSCLC
X64177	<i>Metallothionein</i>	1	-0.734***	-0.735***
L16510	<i>Cathepsin B</i>	9	-0.722***	-0.724***
X03124	<i>TIMP1</i>	3	-0.683**	-0.703**
X55313	<i>TNF-R1</i>	2	-0.675**	-0.624
*	<i>TGF, beta-induced, 68 kDa</i>	1	-0.646**	-0.571
X12451	<i>Cathepsin L</i>	3	-0.635**	-0.562
J04456	<i>Galectin-1</i>	1	-0.621	-0.707**
*	<i>Annexin 11</i>	10	-0.566	-0.524
M16006	<i>PAI-1</i>	3	-0.555	-0.501
M62403	<i>IGFBP4</i>	13	-0.538	-0.577
X51675	<i>UPAR</i>	3	-0.530	-0.499
U61276	<i>Jagged</i>	1	-0.508	-0.432
X13276	<i>CD13</i>	1	-0.501	-0.452
U03864	<i>Alphal A-AR</i>	5	-0.486	-0.589
M59371	<i>EphA2 (Eck)</i>	1	-0.486	-0.516
M74088	<i>APC</i>	13	-0.427	-0.427
L25081	<i>RhoC</i>	1	-0.409	-0.488
*	<i>Fibromodulin</i>	13	-0.443	-0.435
U66075	<i>GATA-6</i>	4	-0.465	-0.440
Y00371	<i>HSC70</i>	7	-0.402	-0.546
M14113	<i>Procoagula</i>	13	0.478	0.462
Z12020	<i>MDM2</i>	8	0.419	0.463
L15409	<i>VHL</i>	13	-0.492	—
Z11887	<i>MMP-7</i>	3	-0.465	—
L47345	<i>Elongin A</i>	4	-0.455	—
L33801	<i>GSK-3 beta</i>	2	-0.437	—
AB002409	<i>SLC</i>	2	-0.433	—
AB006780	<i>Galectin-3</i>	2	-0.432	—
M35011	<i>Integrin beta 5</i>	11	-0.417	—
M69066	<i>Moesin</i>	1	-0.414	—
AF080158	<i>IKK beta</i>	4	-0.405	—
U17163	<i>ETV 1</i>	7	-0.402	—
U16957	<i>AT2</i>	2	0.403	—
M64722	<i>Clusterin</i>	13	—	-0.612
M87770	<i>FGFR-2 (KGFR, Bek)</i>	6	—	-0.538
X14787	<i>Thrombospondin 1</i>	3	—	-0.515
J04456	<i>HSP 32</i>	1	—	-0.457
*	<i>Lactate dehydrogenase A</i>	13	—	-0.426
U01877	<i>P300</i>	1	—	-0.418
*	<i>Thymosin beta10</i>	13	—	-0.416
M33680	<i>CD81</i>	2	—	-0.410
U20240	<i>C/EBP γ</i>	4	—	-0.409
U22322	<i>Rak</i>	1	—	-0.405
AF101264	<i>CaMKK</i>	1	—	0.410
M15518	<i>TPA</i>	3	—	0.410

*Gene without accession number.

表4 SCLC和NSCLC中共同差异表达的GEM、CDDP药物敏感性关联基因

Tab 4 Common differentially expressed genes associated with GEM and CDDP drug sensitivity in SCLC and NSCLC

Accession number	Gene	Function classification number	GEM		CDDP	
			SCLC+NSCLC	NSCLC	SCLC+NSCLC	NSCLC
X64177	<i>Metallothionein</i>	1	0.729	0.731	-0.734***	-0.735***
L16510	<i>Cathepsin B</i>	9	0.703	0.715	-0.722***	-0.724***
X03124	<i>TIMP1</i>	3	0.662	0.700	-0.683**	-0.703**
X55313	<i>TNF-R1</i>	2	0.661	0.621	-0.675**	-0.624
*	<i>TGF beta-induced 68 kDa</i>	1	0.646	0.572	-0.646**	-0.571
X12451	<i>Cathepsin L</i>	3	0.625	0.550	-0.635**	-0.562
J04456	<i>Galectin-1</i>	1	0.590	0.695	-0.621	-0.707**
M16006	<i>PAI-1</i>	3	0.550	0.503	-0.555	-0.501
*	<i>Annexin 11</i>	10	0.545	0.506	-0.566	-0.524
M62403	<i>IGFBP4</i>	13	0.528	0.574	-0.538	-0.577
X51675	<i>UPAR</i>	3	0.523	0.493	-0.530	-0.499
U61276	<i>Jagged</i>	1	0.501	0.426	-0.508	-0.432
U03864	<i>Alpha A-AR</i>	5	0.461	0.585	-0.486	-0.589
M59371	<i>EphA2</i>	1	0.467	0.525	-0.486	-0.516
X13276	<i>CD13</i>	1	0.499	0.456	-0.501	-0.452
U66075	<i>GATA-6</i>	4	0.453	0.441	-0.465	-0.440
M74088	<i>APC</i>	13	0.417	0.421	-0.427	-0.427
*	<i>Fibromodulin</i>	13	0.440	0.431	-0.443	-0.435
M14113	<i>Procoagulant</i>	13	-0.479	-0.435	0.478	0.462

*Gene without accession number.

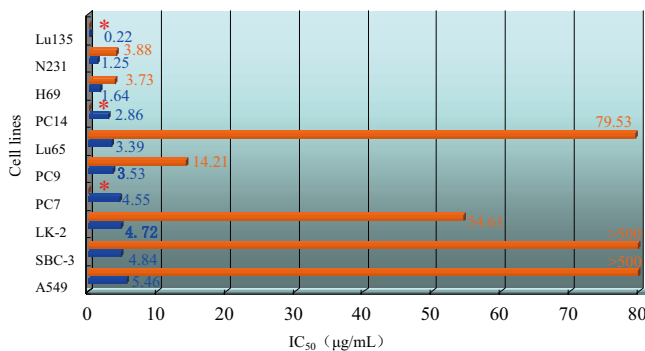


图1 CDDP、GEM对肺癌细胞株的IC₅₀

Fig 1 IC₅₀ of CDDP, GEM for lung cancer cell lines
Red represents GEM; blue represents CDDP; *P<0.05.

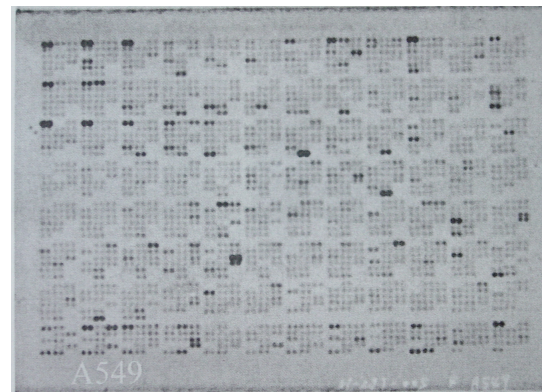


图2 A549的cDNA macroarray结果图

Fig 2 The result graph of A549 cDNA macroarray

性呈显著负相关, *Metallothionein*、*Cathepsin B*和 *TIMP1*基因与两种类型肺癌细胞系均呈显著负相关, 相同性为42.9% (3/7); *TNF-R1*、*TGF beta-induced 68 kDa*和 *Cathepsin L*基因只与SCLC细胞系对CDDP药物敏感性呈显著负相关, *Galectin-1*只与NSCLC细胞系对CDDP药物敏感性呈明显负相关。芯片结果分析后将基因功能进行了分类, 其中有与肿瘤侵袭、转移和预后相关的基因、与肿瘤细胞凋亡相关基因、生长抑制相关的*Metallothionein*、*Cathepsin B*

和*TIMP1*基因等等。具体分类: 1、信号转导分子; 2、生长因子受体; 3、生长因子; 4、凋亡相关因子; 5、细胞骨架; 6、细胞周期蛋白; 7、转录因子; 8、代谢酶类; 9、组织蛋白酶B; 10、分子伴侣; 11、细胞表面受体; 12、发育过程分子; 13、其它等13类。

2.4 SCLC和NSCLC细胞系中与GEM、CDDP敏感性关联的基因与GEM、CDDP敏感性关联 ($r \geq \pm 0.4$) 的基因有41个 (见表4, 表5), 其中19个基因共同表达 (见表

表5 SCLC和NSCLC中特异性表达的GEM、CDDP药物敏感性关联基因
Tab 5 Specifically expressed genes associated with GEM and CDDP drug sensitivity in SCLC and NSCLC

Accession number	Gene	Function classification number	GEM		CDDP	
			SCLC+NSCLC	NSCLC	SCLC+NSCLC	NSCLC
M64722	<i>Clusterin</i>	13	—	0.610	—	-0.612
J04456	<i>HSP32</i>	1	—	0.451	—	-0.457
Y00371	<i>HSC 70</i>	7	—	0.532	-0.402	-0.546
L25081	<i>Rho C</i>	1	—	0.473	-0.409	-0.488
M87770	<i>FGFR-2</i>	6	—	0.542	—	-0.538
X14787	<i>Thrombospondin 1</i>	3	—	0.516	—	-0.515
M33680	<i>CD81</i>	2	—	0.406	—	-0.410
*	<i>Thymosin beta 10</i>	13	—	0.412	—	-0.416
U22322	<i>Rak</i>	1	—	0.415	—	-0.405
*	<i>Lactate dehydrogenase A</i>	13	—	0.416	—	-0.426
U01877	<i>P300</i>	1	—	0.419	—	-0.418
AB006780	<i>Galectin-3</i>	2	0.425	—	-0.432	—
Z11887	<i>MMP-7</i>	3	0.460	—	-0.465	—
L15409	<i>VHL</i>	13	0.497	—	-0.492	—
U17163	<i>ETV1</i>	7	0.401	—	-0.402	—
M69066	<i>Moesin</i>	1	0.406	—	-0.414	—
M35011	<i>Integrinbeta 5</i>	11	0.412	—	-0.417	—
L33801	<i>GSK-3 beta</i>	2	0.439	—	-0.437	—
L47345	<i>Elongin A</i>	4	0.445	—	-0.455	—
Z12020	<i>MDM2</i>	8	-0.419	-0.435	0.419	0.463
AF101264	<i>CaMKK</i>	1	-0.414	-0.407	—	0.410
M15518	<i>TPA</i>	3	—	-0.413	—	0.410

*Gene without accession number.

4)，22个基因具有一定的特异性（见表5）。

2.5 SCLC和NSCLC细胞系中与GEM、CDDP敏感性呈明显相关联的基因 肺癌中与GEM和CDDP两类药物敏感性呈明显相关的基因是*Metallothionein*、*Cathepsin B*和*TIMP1*（见表2），上述基因与GEM呈正相关，而与CDDP呈负相关。NSCLC中与GEM、CDDP药物敏感性均相关的基因有4个，而SCLC中有5个。

2.6 SCLC和NSCLC细胞系中与GEM、CDDP敏感性相关联的基因的分布 肺癌细胞系中与GEM、CDDP药物敏感性相关联的基因主要分布于*Metallothionein*、*Cathepsin B*、生长因子*TIMP1*等类别。

3 讨论

肺癌是我国目前发病率和死亡率都很高的常见肿瘤，患者自行就诊时多为中晚期，已失去手术的最佳时机，同时又有很高的复发率，因此，化疗就成为目前治疗肺癌的主要方法之一。临床上常常发现不同类型的肺

癌对同一化疗药物敏感性不同，而同一种类型的肺癌的不同个体对同一种化疗药物敏感性有时也不同，这与肺癌的生物学特性（病理分型、肿瘤异质性和细胞动力学）、病人个体差异（病人对化疗药物的敏感程度以及对药物的耐受程度）、药物本身的毒性反应等有关。晚期肿瘤通常对单一药物的化疗效果不佳，容易对其产生耐药性，即使最初对单一药物敏感，由于分子基因遗传的缘故，一部分肿瘤细胞也会生存下来产生耐药。相反，联合化疗对一些明确类型的肿瘤甚至晚期肿瘤效果较好。我们试图通过此实验找出对GEM和CDDP敏感的基因表达规律，以指导临床的个体化化疗。

通过基因表达比较分析研究抗癌药物敏感性的方法有多种：Northern blot、差异显示（differential display）检测基因表达、cDNA文库测序方法、基因表达序列分析（SAGE）等，上述方法虽可行，但其缺点也很明显，费时费力，不宜开展。DNA芯片技术可同时从疾病及药物两个角度对生物体的多个参量进行研究，另外还可以获取大量的其它相关信息。因此，在此种情况下，任何一

元化的分析方法均不及DNA芯片技术这种集成化的分析手段更具有优势^[5]。

CDDP为细胞周期非特异性药物，通过与DNA链结合，阻碍DNA合成及细胞分裂，可作用于细胞周期的任意时相，尤其是对处于有丝分裂期和DNA合成期的细胞杀灭作用更强，在治疗晚期NSCLC中占有极突出的位置，因此，含CDDP的联合化疗方案被美国临床肿瘤学会（ASCO）推荐为有较好行为状态评分的晚期NSCLC患者的治疗方案，现在CDDP已广泛用于NSCLC的治疗^[6-8]，其分子水平上的耐药机制有^[9-13]：①细胞内蓄积量的减少：一般认为与细胞内摄入减少和排出亢进有关，细胞内摄入与Na⁺-K⁺-ATP酶有关，排出与GSH-铂结合体运输系统的GS-X泵和MRP2/CMOAT/ABCC2的CDDP排出泵有关。②GSH、金属蛋白等细胞内解毒功能亢进：CDDP主要通过GST- π （谷胱甘肽-S-转移酶，glutathione-S-transferase）在细胞质内与2分子GSH形成复合体，以GSH-铂结合物形式在ATP存在下排出至细胞外。因此，GSH合成增加、GST- π 活性增加将导致CDDP耐药性。另外，金属蛋白、硫氧还蛋白增加也是耐药性产生的原因之一。③DNA修复功能亢进：CDDP被摄入细胞后，通过与肿瘤细胞内的DNA链结合，阻碍DNA合成及细胞分裂。DNA修复功能亢进将降低CDDP的药效而表现出耐药性。

GEM的作用机制是阻碍DNA合成，GP方案是美国国立综合癌症网络（NCCN）上提供的NSCLC标准化疗方案之一。

我们应用cDNA macroarray技术检测了10株肺癌细胞株中CDDP的敏感性相关基因，结果显示：与GEM、CDDP敏感性关联（ $r \geq \pm 0.4$ ）的基因有41个，其中19个基因均具有相关性，22个基因具有一定的特异性，分类主要分布于Metallothionein、Cathepsin B和TIMP1等类别。

SCLC和NSCLC细胞株中GEM、CDDP存在药物敏感性相关基因，但相关性相反，与GEM呈正相关而与CDDP呈负相关。本实验发现与GEM、CDDP敏感性相关的基因，期望能对临床的化疗用药起指导作用，并为化疗的个体化治疗明确方向。同时，一些药物敏感性基因对预测肺癌患者的生存期、复发转移有一定的帮助。

Metallothionein（MT）是一种低分子蛋白，参与正常与肿瘤细胞的分化与增殖，在一些恶性肿瘤（乳腺癌、肾癌、卵巢癌）中它的过度表达是一种预后不良因素，Dziegiel等^[14]研究表明，在非小细胞肺癌患者中MT高表达者生存期较短。

Cathepsin B是一种溶酶体的半胱氨酸肽酶，可能在人肿瘤细胞的侵袭和转移中起了很重要的作用。Werle^[15]表

明，Cathepsin B在NSCLC淋巴结转移中起了很重要的作用，使用与Cathepsin B相关的淋巴结可作为肺癌生存期长短的一种评价因素。

Peng等^[16]通过实验得出结论：MMP1和TIMP1蛋白在肺癌中的表达与肺癌的转移和侵袭存在相关性，TIMP1蛋白在癌组织中的表达要比正常组织中低得多，因此TIMP1可作为一种重要的肺癌生物学标志物。

本研究明确了10株肺癌细胞的GEM、CDDP药物敏感性和1 291个筛选关联基因表达状态的关系，有助于抗癌药物作用机制的进一步阐明，为克服药物的耐药性、研制开发新的抗癌药物提供了新线索；同时，将选出的部分敏感基因用于临床检查，进而根据检查结果选择合理而有效的药物，为临床选择以不同靶向性分子为基础的肺癌的联合化疗的个体化治疗提供理论性依据。因此，我们将对初步筛选出的与药物敏感性相关的基因，特别是新的不为人熟知的基因进行鉴定、分析以及功能的研究。另外，我们将利用RNA干扰（RNA interference, RNAi）技术建立SiRNA文库封闭高表达的耐药基因，以恢复肿瘤对化疗药物的敏感性，这将是我们的课题的重点。

参 考 文 献

- 1 Tamaoki M. Isolation of O3-response genes from Arabidopsis thaliana using cDNA macroarray. *Methods Mol Biol*, 2008, 410: 29-42.
- 2 Reed LJ, Muench HA. Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493.
- 3 Wu JZ, Situ Zhenqiang, Wang W, et al. Chemosensitivity of salivary gland and oral cancer cell lines. *Clin Med J*, 1992, 105(12): 1026-1028.
- 4 Sato Y, kondo T, Yamada F. Basic study on the sensitivity test for inhibiting fibroblast. *Cancer and Chemotherapy proliferation(II)*, 2001, 28(12): 1885-1890. [佐藤嘉孝, 近藤達平, 山田二三夫. 腫瘍間質結締組織抑制下の感受性試験の基礎的研究(続報). *癌と化学療法*, 2001, 28(12): 1885-1890.]
- 5 Ildsmith SE, Elcock FJ. Microarrays and the microscope. *Mol Pathol*, 2001, 54(1): 8-16.
- 6 Liu L, Wang XW, Li L, et al. A randomized comparative trial of three combined regimens containing cisplatin for treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*, 2006, 25(8): 990-994.
- 7 Chen LK, Xu GC, Liang Y, et al. Intrapericardial infusion of etoposide and cisplatin in treating malignant pericardial effusion of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*, 2006, 25(4): 505-508.
- 8 Chen LK, Xu GC, Guan ZZ, et al. Nadaplatin or cisplatin combined with paclitaxol in treatment for non-small cell lung cancer: a randomized controlled study. *Chin J Oncol*, 2007, 29(6): 437-440.
- 9 Kobayashi S, Koyama Y. Topological differences in the interaction of human DNA topoisomerase I with DNA-histone complexes modified by cis- and trans-DDP. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2007, 55(4): 526-531.

- 10 Holzer AK, Howell SB. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10944-10952.
- 11 Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, *et al.* Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein (BCRP), ABCG2, in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(4): 827-832.
- 12 Cai XB, Jing XB, Hu H, *et al.* The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis of esophageal cancer cell line EC-109. *Ai Zheng*, 2006, 25(4): 427-431.
- 13 Gao GL, Wan HY, Zou XS, *et al.* Relationship between the expression of P-glycoprotein, glutathione S-transferase and thymidylate synthase proteins and adenosine triphosphate tumor chemosensitivity assay in cervical cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2007, 42(3): 201-205.
- 14 Dziegiel P, Jeleń M, Muszczyńska B, *et al.* Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas. *Rocz Akad Med Białymst*, 2004, 49(Suppl 1): 43-45.
- 15 Werle B, Karf C, Lah TT, *et al.* Cathepsin B in infiltrated lymph nodes is of prognostic significance for patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 2000, 89(11): 2282-2291.
- 16 Peng ZM, Yang ZL, Liu Y. Expression of MMP1 and TIMP1 proteins in lung cancer and its biological significance. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2002, 27(2): 159-161.

(收稿: 2009-01-19 修回: 2009-02-23)

(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

《中国肺癌杂志》关于开通Scholarone Manuscripts 在线稿件处理系统的通知

为了方便作者投稿、专家审稿及提高编辑部工作效率和管理水平,《中国肺癌杂志》(pISSN 1009-3419, eISSN 1999-6187, www.lungca.org)于2009年10月15日起采用国际著名投稿系统Scholarone Manuscripts,实行在线稿件处理,将大大提高本刊办刊水平。

原来的投稿方式(发邮件到信箱 cnlungca@gmail.com)在2009年10月仍然有效,欢迎您使用新的投稿方式。

投稿网址 中文 <http://mc03.manuscriptcentral.com/cjlc>

英文 <http://mc03.manuscriptcentral.com/lc>

如有不明之处,请联系《中国肺癌杂志》编辑部022-27219052或Email: cnlungca@gmail.com。

关于Scholarone Manuscripts

ScholarOne Manuscripts 是汤森路透集团ScholarOne的旗舰产品之一,实现了自动化的期刊投稿,和轻松完成稿件的管理、编辑和评阅流程。ScholarOne Manuscripts在全球有一千三百万多用户,被3 000多种学会和出版社的期刊和图书所采用,包括《新英格兰医学杂志》等国际权威期刊。ScholarOne Manuscripts与汤森路透的ISI Web of Knowledge平台集成,后者为用户提供高质量和多学科文献的集成访问、发现和评价。在ISI Web of Knowledge 平台上提供了Web of Science这一最权威的多学科引文数据库。通过该集成,审稿人和主编能够轻松地核实并访问稿件的参考文献,并且主编能够根据稿件内容搜寻新的审稿人。ScholarOne Manuscripts同时还与EndNote Web集成,使作者可以将收集的文献信息变成格式化的参考文献列表,方便了撰稿和投稿,也减少了参考文献著录中的差错。因此,这一完整的解决方案将科研人员、作者、审稿人和编辑,根据其各自的工作和信息流需要无缝地集成到一起。

若需更多信息,请访问:<http://www.thomsonscientific.com.cn/hyhg.html>或http://www.thomsonreuters.com/products_services/scientific/Manuscript_Central。

关于汤森路透

汤森路透集团是全球领先的专业信息服务提供商。我们将专业知识与创新科技相结合,为金融、法律、税务与财会、科学技术、医疗保健和媒体领域的专业人员和决策者提供重要的信息。集团总部位于纽约,主要分支机构设于英国伦敦、美国明尼苏达州的伊根等地。集团在93个国家/地区的机构共有5万多名员工。

著名的《期刊引用报告》(Journal Citation Reports)即是该公司产品。请访问www.thomsonreuters.com。

《中国肺癌杂志》编辑部

2009年10月