基因阳性表达的个体发生食管癌的危险性显著增加。

参考文献

[1] 王秀梅,张卫群,陈波,等. MTHFR基因多态性与哈萨克族食管癌易感性[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8): 937 - 938.

[2] 陈波,马彦清,杨磊,等. 哈萨克族食管癌与 CYP2E1基因多态性及烟酒嗜好的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(36): 3852 - 3855.

[3] 秦江梅,王秀梅,陈波,等. 新疆哈萨克族食管癌与叶酸摄入水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(1): 27 - 30.

[4] 林军,邓长生,朱尤庆,等. HLA - DRB1、- DQB1基因多态性与食管鳞癌遗传关联性[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(12): 726 - 729.

[5] Itoh A, Shimada A, Kodama K, et al. GAD-reactive T cells were mainly detected in autommune-related type 1 diabetic patients with *HLA-DR*9[J]. Ann N Y A Cad Sci, 2004, 1037: 33 - 40.

[6] 戴云鹏,阎文英,沈柏钧,等. 急性淋巴细胞白血病患者 HLA - DRB1基因多态性研究[J]. 临床免疫学杂志, 2003, 19(5): 352 - 354.

[7] Rudwaleit M, Gibson K, Wordsworth P, et al. HLA associations of systemic lupus erythematosus in Chinese from Singapore[J]. Ann Rheum Dis, 1995, 54: 686 - 687.

[8] 缪凤琴,张建琼,单军,等. 食管癌组织 HLA - I类抗原及相关分子的表达及意义[J]. 南京师范大学学报, 2004, 27(4): 76 - 79.

收稿日期: 2008-11-27 (潘雯编辑 王奕校对)

文章编号: 1001-0580(2009)07-0800-02 **中图分类号**: R 730.1 **文献标志码**: A 【论 著】

花色苷抗炎抗肿瘤相关信号通路研究*

王庆,刘驰,郭红辉,胡艳,夏敏,侯孟君,凌文华

摘 要: **目的** 用基因芯片观察花色苷矢车菊素 - 3 - 葡萄苷(C3G)作用人白血病单核细胞细胞株(THP - 1)源性巨噬细胞前后相关信号通路上基因表达的差异。**方法** 100 μmol/L的 C3G作用于 THP - 1源性巨噬细胞 12h,用信号转导通路发现者基因芯片研究 C3G对 THP - 1源性巨噬细胞基因表达谱的影响,并利用半定量逆转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)法对筛选出的部分基因进行验证。**结果** C3G作用后有 7条信号通路中的 15个基因发生改变,其中表达上调的基因有 5个,包括肿瘤基因 p53(TP53)、核因子 κB抑制因子 α(NFKBIA)、视黄醇结合蛋白基因 2(RBP2)等;表达下调的基因有 10个,包括 FBJ鼠科骨肉瘤病毒癌基因同源物(V - fos)、诱导型一氧化氮合酶(NOS2A)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)等,这些基因编码的宿主蛋白均为肿瘤免疫、炎症反应相关的信号转导通路中的关键点。半定量 RT - PCR结果显示,经 C3G干预后,NOS2A和 $PTGS_2$的表达水平下调了 58%和 54%。**结论** 花色苷类植物化合物可能通过促有丝分裂、果蝇无翼基因同源物(WNT)、p53、磷脂酶 C、核因子 κB(NFKB)、Janus激酶/信号转导和转录活化因子(JAK/STAT)和维甲酸等信号转导通路发挥其抗炎、抗肿瘤功能。

关键词: 花色苷;巨噬细胞;抗肿瘤;炎症

Study on signal pathways of cyanidin-3-glucoside in association with inhibiting inflammation and carcinogenesis by gene microarray

WANG Qing, LIU Chi, GUO Hong-hui, et al. Nutrition and Food Hygiene Branch, School of Public Health, Zhongshan University (Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cyanidin-3-glucoside (C3G) on gene expression relevant to signal pathway in THP-1 macrophage by DNA microarray for screening signal pathways of cyanidin-3-glucoside in associstion with inhibiting inflammation and carcingensis. **Methods** THP-1 macrophages were treated with 100 μmol/L C3G for 12 hr, then the expression levels of RNA transcipts were assessed using human signal transduction pathway finder microarray analysis, and some of the results were confirmed by semi-quantitative RT-PCR. **Results** The results showed that 15 genes in 7 signal transduction pathways were differentially regulated in the THP-1 macrophages at 12 hr post C3G-treatment. Five genes including TP53, NFKBIA, RBP2 were upregulated and 10 genes including FOS, NOS2A, PTGS2 were downregulated. These genes encode a host of proteins as the important targets in signal transducition pathways involved in inflammatiry response and carcinogensis. **Conclusion** Anthocyanins might inhibit the inflammatory response and carcinogensis via divergent signal pathways such as mitogenic pathway, Wnt pathway, p53 pathway, NFKB pathway, and JAK/STAT pathway.

Key words: antheocyanin; macrophage; tumor immurity; inflammation

花色苷(Anthocyanin)是广泛存在于蔬菜、水果等植物中的一类水溶性天然色素。近 20年来,许多研究[1-3]证实,花色苷具有抗氧化、抗炎及抗肿瘤等一系列生物学特性,但其具体的分子机制及涉及的信号通路尚未完全明确。人白血病单核细胞株(THP - 1)源性巨噬细胞是 THP - 1细胞株经诱导后形成的,既保留了肿瘤细胞的一般特性,又具有巨噬细胞介导炎症反应的功能。因此,本研究拟通过信号转导通路发现者基因芯片观察花色苷作用 THP - 1源性巨噬细胞后基因表达谱的改变,了解花色苷在抗炎、抗肿瘤作用中涉及的相关信号通路及可能的靶作用基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂 核酸分析仪(德国 Beckman公司);HB - 1000杂交炉(美国 UVP公司);梯度 PCR仪(英国 Hybaid公司);凝胶成像分析系统(法国 Vilber Lourmat公司)。矢车菊素 - 3 - 葡萄糖苷(C3G,挪威 Polypenol AS公

*基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30730079);广东省自然科学基金重点项目(07117377)
作者单位: 中山大学公共卫生学院营养与食品卫生系,广州 510080
作者简介: 王庆(1979 -),男,江西吉安人,讲师,博士,研究方向:营养与肿瘤预防。

司);生物素标记 dUTP(Biotin - 16 - dUTP,瑞士 Roche公司);线性 DNA扩增试剂盒、cDNA纯化试剂盒和信号转导通路发现者基因芯片(美国 SuperArray Bioscience公司);RNA逆转录试剂盒(日本 Toyobo公司);PCR试剂盒(大连 TaKaRa公司)。

1.1.2 细胞　THP - 1细胞株(武汉大学中国细胞保藏中心)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养　使用含 10%胎牛血清的 RPMI - 1640培养基,于 37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养,每 2 d传代 1次。细胞离心收集后,将细胞密度调度整至 4×10^6个/mL,种至 6孔板,每孔重新加入含 10%胎牛血清的 RPMI-1640培养基 2 mL,加入佛波脂(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA),使培养基中其终浓度达到 167 nmol/L,刺激 48 h诱导成巨噬细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3遍,换新鲜培养基继续培养 2 h,实验组加入 C3G,使培养基中终浓度达到 100 μmol/L;溶剂对照组加入二甲基亚砜(DMSO),使培养基中其终浓度达到 0.1%(v: v),12 h后收集对照组及实验细胞的总 RNA。

1.2.2 芯片检测及分析　每孔细胞加入 1 mL Trizol试剂,提取总 RNA,样品置于 - 80 ℃冰箱中保存待测,样品的探针标记、纯化,芯片的杂交和信号检测按照信号转导通路发现者基因芯片实验操作说明书进行,最后进行芯片数据标准化处理分析,差异基因筛选标准设定为实验组/对照组 ≥2为上调基因,实验组/对照组 ≤0.5为下调基因。

1.2.3 逆转录 - 聚合酶链反应(reverse transcription - polymerase chain reaction, RT - PCR)　cDNA第 1链的合成参照 RNA逆转录试剂盒的说明书进行。诱导型一氧化氮合酶(NOS2A)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)及看家基因 3 - 磷酸甘油醛氢酶(G3PDH)的 PCR扩增引物根据文献[4,5]由上海生工生物工程公司合成。其序列为 NOS2A:(F: 5′ACAAGCCTACCCCTCCAGAT-3′; R: 5′CTTGGATGGTTGACTGCCCT-3′); PTGS2:(F: 5′GGGCAAAGACTGCGAAGAAG-3′; R: 5′CCCATGTGACGAAATGACTG-3′); G3PDH:(F: 5′ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′; R: 5′TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′)。PCR反应条件为:94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, [57.8 ℃ 30 s(NOS2A); 60.8 ℃ 30 s(PTGS2); 60 ℃ 30 s(G3PDH)], 72 ℃ 1 min,循环 30次; 72 ℃ 10 min。取 PCR产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳后凝胶像系统上观察、拍照,最后以目的条带与 G3PDH条带的亮度比值作为目的条带的含量值,进行统计检验。

2 结　果

2.1 基因芯片杂交结果及生物学分析　芯片图像经扫描及统计分析后,共检出花色苷 C3G作用后表达上调的基因有 5个,包括 TP53、核因子 κB抑制因子 α(NFKBIA)、alpha - 2巨球蛋白(alpha - 2 Macroglobulin, α2M)、视黄醇结合基因 2(RBP2)及核受体相互作用蛋白 1(Nuclear receptor interacting protein 1, NRIP1);表达下调的基因有 10个,包括 FBJ鼠科骨肉瘤病毒癌基因同源物(V - jun)、果蝇无翼基因同源物 1(WNT1)、WNT1诱导信号通路相关蛋白 3(WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP3)、鼠双微基因 2(murine double minute 2, mdm2)、NOS2A、PTGS2、端粒体反转录酶(TERT)、血管内皮细胞粘附分子 1(Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1)和趋化因子配体 9(chemokine ligand 9, CXCL9),共涉及有丝分裂、WNT、p53、磷脂酶 C、核因子 κB(Nuclear factor κB, NFKB)、Janus激酶/信号转导和转录活化因子(JKA/STAT)和维甲酸 7条信号转导通路。

2.2 基因芯片分析结果的半定量 RT - PCR验证(图 1)　为验证基因芯片结果,本研究采用半定量 RT - PCR技术检测 C3G干预前后 THP - 1源性巨噬细胞内 NOS2A及 PTGS2基因的 mRNA水平。实验结果表明,在 C3G干预 12 h后,THP - 1源性巨噬细胞内 NOS2A及 PTGS2的 mRNA表达水平分别比 0.1%DMSO处理组(溶剂对照组)下调了 58%及 54%。

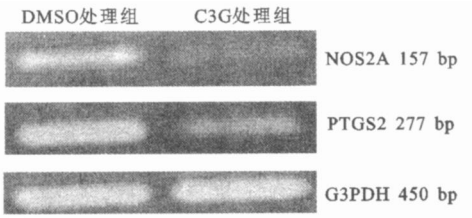

图 1　C3G干预前后的 NOS2A、PTGS2、G3PDH的 mRNA电泳图

3 讨　论

本研究芯片结果及 RT - PCR实验均显示,花色苷干预后炎性因子 NOS2A及 PTGS2的 mRNA表达水平下调,说明花色苷具有抑制炎症的能力。但由于炎症反应是由各种炎症细胞及炎性因子所共同参与的,涉及多条炎症相关信号通路,而调控炎症反应的这些信号通路,如有丝分裂、磷脂酶 C、NFKB和 LAK - STAT等,存在着交汇作用,相互影响[6-7]。所以,花色苷作用的具体靶位点和信号转导通路还有待特异性的相关信号通路芯片的进一步检测。有研究认为,TP53是一种抑癌基因,可以调节细胞周期/凋亡通路下游靶基因的表达;而鼠双微基因 2(mdm 2)蛋白是高度保守的原癌基因 mdm 2的表达产物,在细胞核内抑制 p53介导的转录和凋亡活性,从而促进了肿瘤的发生[8]。本次基因芯片的检测结果显示,C3G干预后,p53信号通路中 TP53基因上调而 mdm 2基因下调。因此,推测 p53信号通路可能是花色苷调节肿瘤免疫的重要信号通路之一。结果显示,C3G还可能通过提高维甲酸信号通路中抑癌基因 RBP2及 NRIP1的表达,下调有丝分裂通路中的原癌基因 V - fos、V - jun, NFKB通路中的端粒体反转录酶(TERT), Jak - Stat通路中的 CXCL9, WNT通路中原癌基因 WNT1及 WISP3的表达,发挥其抑制肿瘤发生的功能。

参考文献

[1] 周波,王晓红,郭连营,等. 玉米紫色植株花色苷色素抗脂质过氧化作用[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(1): 50 - 51.
[2] Xia M, Ling W, Zhu H, et al. Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory singaling in endothelial cells by regulating cholerol distribution[J]. Arrerioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 519 - 524.
[3] Jing P, Bomser JA, Schwart SJ, et al. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inbition of colon cancer cell growth[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 9391 - 9398.
[4] Woo CW, Man RY, Siow YL, et al. Ganoderma lucidum inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 275: 165 - 171.
[5] Zhang WY, Liu HQ, Xie KQ, et al. Procyanidin dimer B2[epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells[J]. Biochem Biophye Res Commun, 2006, 345: 508 - 515.
[6] Bubici C, Papa S, Dean K, et al. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance[J]. Oncogene, 2006, 25: 6731 - 6748.
[7] Maines MD. Biliverdin reductase: PKC interaction at the cross-talk of MAPK and PI3K signaling pathways[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9: 2187 - 2195.
[8] Coates PJ. p53 and Mdm 2: not all cells are equal[J]. J Pathol, 2007, 213: 357 - 359.

收稿日期: 2008-11-20　(王奕编校)