

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002675

超高速细胞分选平台结合 cDNA microarray 技术 筛查宫颈癌细胞潜在分子标志物

陈红香¹, 周自华², 周艳宏³(1. 新疆维吾尔自治区人民医院妇科, 乌鲁木齐 830001; 2. 湖南娄底市中心医院肿瘤科, 长沙 410078;
3. 中南大学基础医学院肿瘤研究所, 长沙 410011)

【摘要】目的:通过超高速细胞分选平台结合 cDNA microarray 技术, 筛查宫颈癌细胞可能潜在的分子标志物。**方法:**采用 MoFlo XDP 型超高速细胞分选平台纯化细胞膜表面表达 CD38 和不表达 CD38 的宫颈癌细胞, 利用 RNAlater 技术得到 cDNA microarray 实验所需 RNA, 然后进行基因芯片分析。**结果:**利用 MoFlo XDP 型超高速细胞分选平台可以获得纯度为 99.0% 以上的 CD38 阳性表达宫颈癌细胞。**结论:**cDNA microarray 分析发现了 RORA、PLIN4、AUTS2、IFITM1 等宫颈癌细胞潜在分子标志物, 为宫颈癌研究提供了新的技术方法。

【关键词】流式细胞术; cDNA microarray; 宫颈癌; 分子标志物**【中图分类号】**R737.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-05-08

Screening of potential molecular markers in cervical cancer cells by ultra-high-speed cell selection platform combined with cDNA microarray technology

Chen Hongxiang¹, Zhou Zihua², Zhou Yanhong³(1. Department of Gynecology, Xinjiang Uygur Municipal People's Hospital; 2. Department of Oncology,
Loudi Central Hospital of Hunan; 3. Cancer Research Institute, School of Basic Medical Sciences,
Central South University)

【Abstract】Objective: To screen potential molecular markers of cervical cancer cells by ultra-high speed cell sorting platform combined with cDNA microarray technology. **Methods:** In this paper, the MoFlo XDP-type ultra-high-speed cell selection platform was used to purify cervical cancer cells expressing CD38 and not expressing CD38 on the cell membrane surface. RNAlater technology was used to obtain the RNA required for cDNA microarray experiments, and then by gene chip analysis was made. **Results:** The MoFlo XDP-type ultra-high-speed cell selection platform can be used to obtain cervical cancer cells with a CD38-positive expression of 99.0% purity. **Conclusion:** Through the analysis of cDNA microarray, potential molecular markers of cervical cancer cells such as RORA, PLIN4, AUTS2, and IFITM1 have been found, which provides a new technical method for the research of cervical cancer.

【Key words】flow cytometry; cDNA microarray; cervical cancer; molecular marker

近年发展起来的流式细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 技术广泛应用于生物医

作者介绍: 陈红香, Email: xjzzqmyy@126.com,

研究方向: 肿瘤机制。

通信作者: 周艳宏, Email: zhouyanhong@csu.edu.cn。

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (编号: 2017D01C122)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201021.0849.002.html>
(2020-10-21)

学领域的细胞分离与纯化。FACS 具有分选纯度高、分选群体多、分选参数多、灵活性强等优势^[1-3]。分选后的细胞能够用于后续细胞培养、移植等, 也可用于核酸提取、原位杂交或单细胞 PCR 扩增等^[3-5]。流式细胞分选在转录组学研究、代谢物转运方式和肿瘤细胞免疫应答机制研究等方面应用越来越广泛^[4-7]。

cDNA 微阵列是核酸杂交基础上发展起来的一

项检测分析技术。现在该技术已经非常成熟,可对不同实验对象中的多个基因表达模式进行平行对比分析^[8-10]。该技术已广泛应用于快速筛选大量致病相关基因、肿瘤标志物、发育相关基因以及疾病诊断、药物筛选等领域^[9-12]。

我国每年宫颈癌新发病例达 13.15 万,宫颈癌死亡人数每年约 5.3 万,约占全部女性恶性肿瘤死亡人数的 18.4%。宫颈癌是我国女性最常见的恶性肿瘤之一,严重危害我国女性健康与生命^[13-14]。虽然目前治疗宫颈癌的方式有手术治疗、化学治疗、免疫治疗和中药治疗等,但中晚期宫颈癌的病死率依然居高不下,尤其晚期和复发型宫颈癌的治疗效果仍不满意,预后极差。究其原因,与宫颈癌发病机制尚未明确以及缺乏真正有效的预后预测方法有关^[15-18]。CD38 是一种多功能跨膜蛋白,在多种肿瘤类型中异常表达。有研究显示,CD38 通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路来调节宫颈癌细胞的代谢,而 PI3K/Akt/mTOR 通路可能是治疗宫颈癌的候选靶点。为了研究 CD38 在宫颈癌细胞中的作用及其可能的机制,并为宫颈癌的治疗提供新的治疗靶标。本文介绍一种超高速细胞分选平台结合高通量芯片技术筛查宫颈癌细胞潜在分子标志物的方法,为宫颈癌的防治研究探讨新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人源宫颈癌 Caski 细胞来源于中南大学肿瘤研究所细胞库,细胞形态为上皮细胞样,贴壁生长。用含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基于湿度 95%、5%CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂 RNAlater RNA Stabilization Reagent(Invitrogen 公司)用于超高速分选平台纯化后的宫颈癌 Caski 细胞保存(RNAlater 稳定剂);TRIzol Reagent(Invitrogen 公司)用于细胞总 RNA 的提取;All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit(GeneCopoeia 公司)用于逆转录 PCR 检测;ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix(Vazyme 公司)用于 qRT-PCR 的检测;同时还有 RPMI1640 培养基(Hyclone 公司)以及二甲苯、乙醇、盐酸(国产分析纯)和 CD38-PE 抗体(Biolegend 公司)。

1.1.3 引物序列信息 详见表 1。

1.1.4 主要仪器设备与分析软件 荧光实时定量 PCR 仪(美国 Bio-RAD 公司);CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司);MoFlo XDP 型超高速流式细胞分选仪(美国 Beckman Coulter 公司)。流式细胞仪分析软件 Summit v5.2 software(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA);qRT-PCR 分析软件 BIO-RAD CFK Manager 2.0 software(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 宫颈癌 Caski 细胞膜表面 CD38 表达水平检测与细胞分选 待 Caski 细胞密度达 60%~80%时终止培养,将细胞收集到离心管中;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,1×PBS 重悬洗涤 3 次;将细胞悬液分为实验组与对照组,实验组加入 5 μL CD38-PE 流式抗体(对照组加 5 μL 的 1×PBS),充分混匀,4℃避光孵育 20 min;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1×PBS 重悬洗涤 3 次;MoFlo XDP 型流式细胞仪检测分析。通过上述分析得到 CD38 阳性表达的细胞,然后利用 MoFlo XDP 型流式细胞仪的分选功能将 CD38⁺细胞和 CD38⁻细胞分别收集于 2 个不同的无菌离心管中,用于后续基因芯片实验和差异基因的 qRT-PCR 验证。

1.2.2 RNA 质量控制与芯片杂交 样品总 RNA 利用 Nano-Drop ND-2100(Thermo Scientific)定量并经 Agilent 2100(Agilent Technologies)检测 RNA 完整性。RNA 质检合格后,样本的标记、芯片的杂交以及洗脱参照芯片标准流程。首先,总 RNA 经过 poly A 加尾,再进一步用生物素标记,标记好的 RNA 和芯片杂交,洗涤和染色后利用 Affymetrix Scanner 3000

表 1 定量 RT-PCR 所用的基因引物

基因	上游引物	下游引物
<i>RORA</i>	GCAGATGGGTAACCAGGAAA	TGCTCAGGGAGCTACAGGTT
<i>PLIN4</i>	TGCTGCAGAATGACTTGGAG	GACCCAGGTCACCTAAACGA
<i>MAN1A1</i>	GAAACCCCATCTTTGCTGAA	AGCTGTCTCCAAGTCCTCCA
<i>CD38</i>	TGCTGATGACCTCACATGGT	CCATTGAGCATCACATGCAC
<i>AUTS2</i>	CCAATGGCTTGTCTTTTCAT	ACTGTCCCTGCAGCTGTTC
<i>IFITM1</i>	ATGTCGTCTGGTCCCTGTTT	GTCATGAGGATGCCAGGAAT
<i>RSAD2</i>	TCACTCGCCAGTGCAACTAC	CACCAACTTGCCAGGTATT
<i>TMEM71</i>	GGCTGAGAAGCTGGAAGATG	GCCAGGTTATCCAGCACATT
<i>GAPDH</i>	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	ACTGAGTGTGGCAGGGACTC

(Affymetrix)扫描得到原始图像。

1.2.3 数据分析 原始图像采用 Affymetrix GeneChip Command Console 软件(version4.0, Affymetrix)处理,用 Expression Console (version1.3.1, Affymetrix)读取原始数据并进行 RMA 标准化。接着利用 Genespring 软件(version 12.5, Agilent Technologies) 进行后续处理。差异 mRNA 利用 Fold Change 的倍数变化值进行筛选,筛选的标准为上调或者下调倍数变化值 ≥ 2.0 。

1.2.4 CD38⁺细胞和 CD38⁻细胞总 RNA 的抽提 细胞总 RNA 的抽提操作程序参考 Invitrogen 公司 TRIzol Reagent 的方案进行。简要步骤如下:在分选得到的 CD38⁺细胞和 CD38⁻细胞中(1×10^6)分别加入 1 mL TRIzol Reagent,置于冰上 20 min;按照 1 mL TRIzol : 0.2 mL 氯仿比例,加入相应体积的氯仿,涡旋振荡 15 s,冰上静置 5 min;4℃、12 000 r/min 离心 20 min;温和吸取上层水相于新的无酶离心管(需预冷)中,此水相中含有 RNA;按照 1 mL TRIzol : 0.2 mL 氯仿 : 0.5 mL 异丙醇比例,加入预冷的异丙醇,混匀,冰上静置至少 30 min;4℃、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清;加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇,混匀;4℃、7 600 r/min 离心 5 min,弃上清;重复 3 次;用移液枪温和吸弃残余液体,干燥 5~10 min(切不可完全干燥)加入 DEPC 水 10~20 μ L,充分混匀,于 Nanodrop 仪器测定 RNA 浓度,用于后续 qRT-PCR 试验。

1.2.5 逆转录 使用 GeneCopoeia 公司的 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No. AORT-0020)进行基因的逆转录反应。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 采用 Vazyme 公司的 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (Q311-01/02/03)进行基因的 qRT-PCR 反应。

2 结果

2.1 宫颈癌 Caski 细胞膜表面 CD38 表达水平分析

为明确干细胞标志物 CD38 在宫颈癌 Caski 细胞膜表面的表达水平,本研究收集细胞密度在 60%~80%的宫颈癌 Caski 细胞,1 $\times$ PBS 漂洗 2 次,细胞计数后取 1×10^5 个 Caski 细胞加入 CD38-PE 抗体 5 μ L(实验组)、对照组加 5 μ L 的 1 $\times$ PBS,4℃避光孵育 20 min,用 1 $\times$ PBS 漂洗 2 次后上 MoFlo XDP 型流式细胞仪检测。结果显示,对照组细胞(1 $\times$ PBS 孵育的 Caski 细胞)膜表面 CD38 的阳性率为 1.02%(图 1A),实验组细胞干细胞标志物 CD38 的阳性表达率为 3.95%(图 1B),提示有 2.93%的 Caski 细胞膜表面表达 CD38 分子(即 CD38⁺细胞)、97.07%的 Caski 细胞膜表面不表达 CD38 分子(即 CD38⁻细胞)。

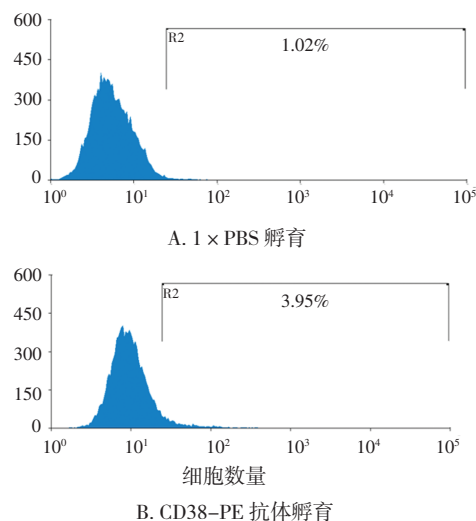


图 1 Caski 细胞膜 CD38 表达水平分析

2.2 CD38⁺宫颈癌 Caski 细胞的分选与纯度检测

为纯化 CD38⁺和 CD38⁻的宫颈癌 Caski 细胞用于后续的 mRNA 芯片分析,本研究收集细胞密度在 60%~80%的宫颈癌 Caski 细胞,1 $\times$ PBS 漂洗 2 次,细胞计数后取 1×10^8 个 Caski 细胞加入相应体积的 CD38-PE 抗体,4℃避光孵育 20 min,用 1 $\times$ PBS 漂洗 2 次后上 MoFlo XDP 型流式细胞仪进行 CD38 的阳性率分析和对 CD38⁺和 CD38⁻的宫颈癌 Caski 细胞进行分选。为验证分选后 CD38⁺细胞的纯度,取 1×10^5 个 CD38⁺细胞再次进行抗体染色与流式检测。结果显示,有 99.26%的细胞仍然分布在 CD38⁺区域(图 2),提示纯化的 CD38⁺的宫颈癌 Caski 细胞纯度大于 99%。

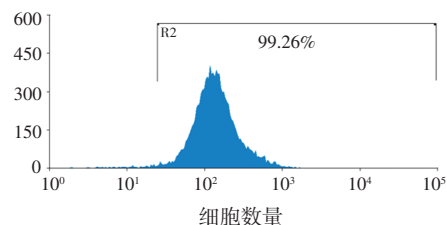


图 2 纯化 CD38⁺细胞中 CD38 表达的检测

2.3 基因芯片技术筛查 CD38⁺和 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞的差异 mRNA 分子

纯化后 CD38⁺和 CD38⁻的宫颈癌 Caski 细胞用于总 RNA 的制备,RNA 质检合格后,标记样本、芯片杂交、扫描得到原始图像,原始图像通过软件分析后得到差异 mRNA。结果显示,与 CD38⁻细胞相比较,在 CD38⁺细胞中表达上调(2 倍或者 2 倍以上)的基因有 859 个,其中上调倍数排在前 20 位的基因有 RORA,PLIN4,MAN1A1 和 CD38 等(表 2);而在 CD38⁺细胞中表达下调(2 倍或者 2 倍以上)的基因有 863 个,其中下调倍数排在前 20 位的基因有 AUTS2,IFITM1,RSAD2 和 TRIM22 等(表 2)。

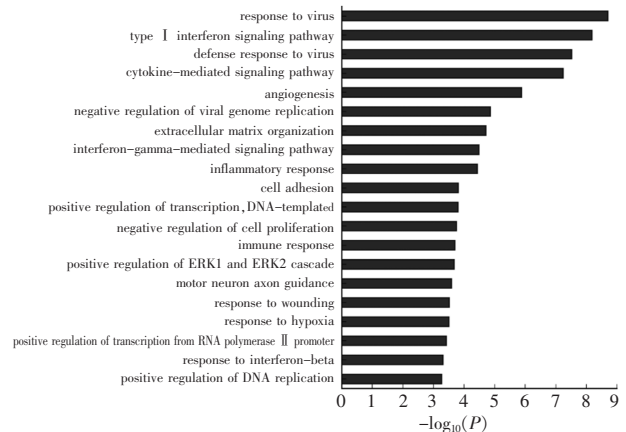
表 2 CD38⁺ 和 CD38⁻ 宫颈癌 Caski 细胞的差异 mRNA 分子

序号	CD38 ⁺ 细胞 中表达情况	差异倍数	基因名称	NM号
1	上调	292.79	<i>RORA</i>	NM_134260
2	上调	118.79	<i>PLIN4</i>	NM_001080400
3	上调	107.36	<i>MAN1A1</i>	NM_005907
4	上调	88.01	<i>CD38</i>	NM_001775
5	上调	87.33	<i>CSPG4</i>	NM_001897
6	上调	75.28	<i>NRCAM</i>	NM_001037132
7	上调	70.88	<i>TMTC1</i>	NM_175861
8	上调	58.86	<i>FARP1</i>	NM_005766
9	上调	51.63	<i>ADAM23</i>	NM_003812
10	上调	50.51	<i>ARC</i>	NM_015193
11	上调	37.39	<i>PSCA</i>	NM_005672
12	上调	36.68	<i>TSPAN8</i>	NM_004616
13	上调	35.29	<i>SLC1A1</i>	NM_004170
14	上调	35.12	<i>SRRM4</i>	NM_194286
15	上调	32.87	<i>CES1</i>	NM_001025195
16	上调	32.66	<i>SLC12A3</i>	NM_000339
17	上调	32.10	<i>KLF12</i>	NM_007249
18	上调	31.49	<i>MECOM</i>	NM_001164000
19	上调	31.40	<i>BDKRB1</i>	NM_000710
20	上调	30.92	<i>CYP4F11</i>	NM_021187
21	下调	600.89	<i>AUTS2</i>	NM_015570
22	下调	515.04	<i>IFITM1</i>	NM_003641
23	下调	95.43	<i>RSAD2</i>	NM_080657
24	下调	57.45	<i>TRIM22</i>	NM_006074
25	下调	57.09	<i>TMEM71</i>	NM_144649
26	下调	54.58	<i>XAF1</i>	NM_017523
27	下调	43.88	<i>IFI27</i>	NM_005532
28	下调	42.16	<i>CCL2</i>	NM_002982
29	下调	34.90	<i>APCDD1</i>	NM_153000
30	下调	33.76	<i>MYCN</i>	NM_005378
31	下调	31.86	<i>OAS2</i>	NM_016817
32	下调	30.41	<i>KLK8</i>	NM_144505
33	下调	27.69	<i>B4GALNT4</i>	NM_178537
34	下调	27.13	<i>DIP2C</i>	NM_014974
35	下调	26.66	<i>FAM83F</i>	NM_138435
36	下调	26.28	<i>CXCL10</i>	NM_001565
37	下调	26.02	<i>NANOGNB</i>	NM_001145465
38	下调	24.94	<i>C1orf116</i>	NM_023938
39	下调	24.05	<i>PRR15L</i>	NM_024320
40	下调	22.89	<i>LRRIC18</i>	NM_001006939

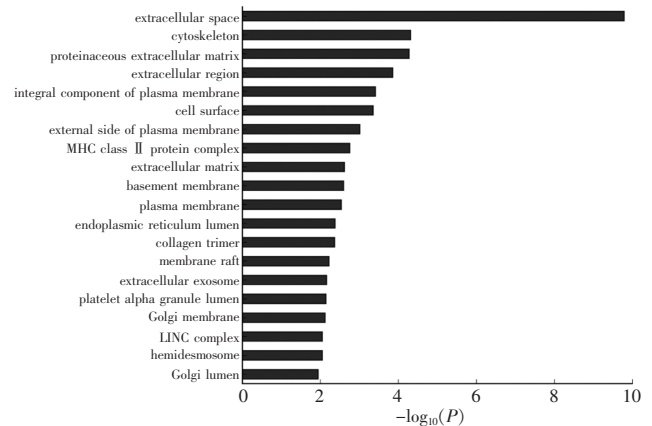
2.4 CD38⁺ 和 CD38⁻ 宫颈癌 Caski 细胞差异 mRNA 分子的 GO 分析

利用 CD38⁺ 和 CD38⁻ 细胞差异表达倍数 2 倍或者 2 倍以上的 1 722 个基因(在 CD38⁺ 细胞中表达上调的 859 个基因和表达下调的 863 个基因)进行 GO 分析,结果发现参与的生物学过程(biological process)主要有 response to virus(GO:0009615)、type I interferon signaling pathway(GO:0060337)、defense response to virus(GO:0051607)和 cytokine-mediated signaling pathway(GO:0019221)、angiogenesis(GO:0001525)等过程(图 3A);细胞成分(cellular component)主要是 extra-

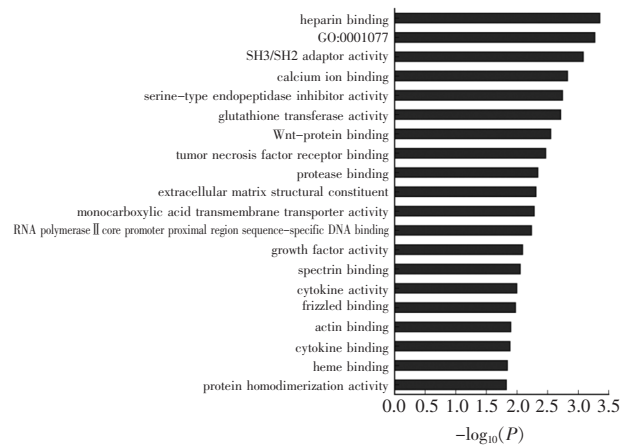
cellular space(GO:0005615)、cytoskeleton(GO:0005856)、proteinaceous extracellular matrix(GO:0005578)、extracellular region(GO:0005576)和 integral component of plasma membrane(GO:0005887)等(图 3B);分子功能(molecular function)主要是 heparin binding(GO:0008201)、SH3/SH2 adaptor activity(GO:0005070)和 calcium ion binding(GO:0005509)等(图3C)。



A. 生物学过程



B. 细胞成分



C. 分子功能

注:横坐标 $-\log_{10}(P)$, P 取对数,如果横坐标为 2, P 值即为 0.01,如果横坐标为 1, P 值即为 0.1。 P 值越小越好

图 3 CD38⁺ 和 CD38⁻ Caski 细胞差异 mRNA 的 GO 分析

2.5 CD38⁺和 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞差异 mRNA 分子的 KEGG 分析

利用 CD38⁺和 CD38⁻细胞差异表达倍数 2 倍或者 2 倍以上的 1 722 个基因(在 CD38⁺细胞中表达上调的 859 个基因和表达下调的 863 个基因)进行 KEGG 分析,结果发现参与的主要信号通路有 Influenza A (path:hsa05164)、Cytokine-cytokine receptor interaction(path:hsa04060)、Inflammatory bowel disease(path:hsa05321)、Pathways in cancer(path:hsa05200)、Rheumatoid arthritis (path:hsa05323)、Toxoplasmosis (path:hsa05145)、Staphylococcus aureus infection(path:hsa05150)和 Hippo signaling pathway(path:hsa04390)等(图 4)。

2.6 CD38⁺和 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞差异 mRNA 分子的 qRT-PCR 验证

为验证所筛选出来的差异 mRNA 分子的可靠性,分别从表达上调的 mRNA 分子选取差异倍数最大的 4 个基因(*RORA*、*PLIN4*、*MAN1A1* 和 *CD38*)和表达下调的 mRNA 分子选取差异倍数最大的 4 个基因(*AUTS2*、*IFITM1*、*RSAD2* 和 *TRIM22*)进行 qRT-PCR 验证。结果显示,与 CD38⁻细胞相比较,*RORA*、*PLIN4*、*MAN1A1* 和 *CD38* 基因在 CD38⁺宫颈癌 Caski 细胞中表达上调(表 3),*AUTS2*、*IFITM1*、*RSAD2* 和 *TRIM22* 基因在 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞中表达下调(表 3)。qRT-PCR 验证结果与芯片结果趋势一致,提示芯片结果的可靠性。

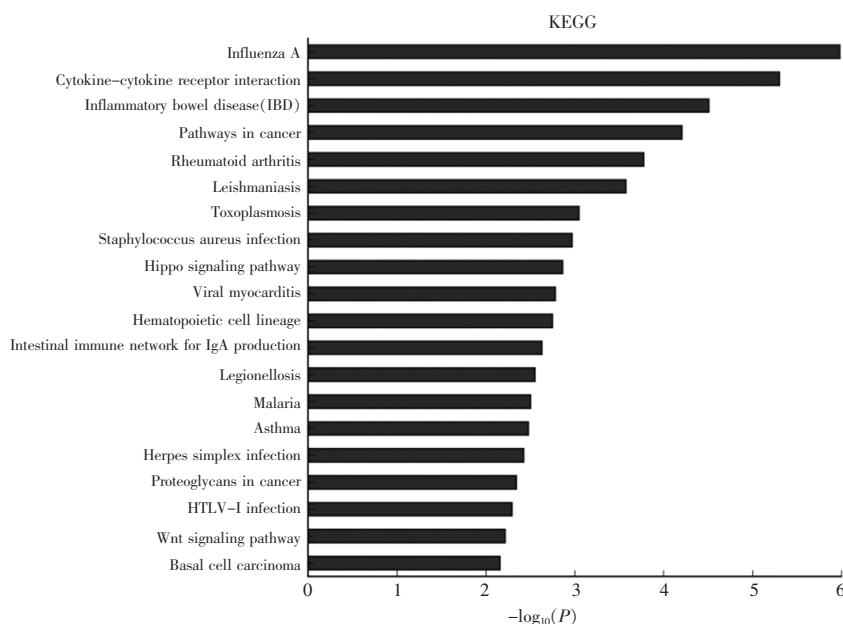


图 4 CD38⁺和 CD38⁻Caski 细胞差异 mRNA 的 KEGG 分析

表 3 CD38⁺和 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞差异 mRNA 分子的 qRT-PCR 验证

基因名称	细胞	目的基因 CT 值 ($\bar{x} \pm s$)	GAPDH CT 值 ($\bar{x} \pm s$)	Δ CT	CT	差异倍数 ^a
<i>RORA</i>	CD38 ⁺	25.18 ± 0.10	18.65 ± 0.16	6.53	-2.87	7.31
	CD38 ⁻	28.63 ± 0.23	19.23 ± 0.15	9.40		
<i>PLIN4</i>	CD38 ⁺	26.43 ± 0.50	18.65 ± 0.16	7.78	-2.63	6.19
	CD38 ⁻	29.64 ± 0.70	19.23 ± 0.15	10.41		
<i>MAN1A1</i>	CD38 ⁺	27.17 ± 0.14	18.65 ± 0.16	8.52	-2.42	5.36
	CD38 ⁻	30.18 ± 0.45	19.23 ± 0.15	10.95		
<i>CD38</i>	CD38 ⁺	28.42 ± 0.49	18.65 ± 0.16	9.77	-2.18	4.52
	CD38 ⁻	31.18 ± 0.34	19.23 ± 0.15	11.95		
<i>AUTS2</i>	CD38 ⁺	27.45 ± 0.60	18.65 ± 0.16	8.80	2.18	0.22
	CD38 ⁻	25.84 ± 0.23	19.23 ± 0.15	6.62		
<i>IFITM1</i>	CD38 ⁺	30.06 ± 0.24	18.65 ± 0.16	11.41	1.68	0.31
	CD38 ⁻	28.95 ± 0.32	19.23 ± 0.15	9.72		
<i>RSAD2</i>	CD38 ⁺	30.19 ± 0.05	18.65 ± 0.16	11.54	1.35	0.39
	CD38 ⁻	29.42 ± 0.40	19.23 ± 0.15	10.19		
<i>TRIM22</i>	CD38 ⁺	31.06 ± 0.14	18.65 ± 0.16	12.41	1.23	0.42
	CD38 ⁻	30.41 ± 0.46	19.23 ± 0.15	11.18		

注:a 表示 CD38⁺细胞与 CD38⁻细胞的比值

3 讨论

细胞是构成人体组织和器官的基本单位。不同组织中细胞种类不一,即使是相同组织,细胞成分也非常复杂。肿瘤细胞相关蛋白的表达水平、细胞表观遗传状况及突变状态等重要信息可能只在某一类别的细胞中体现^[19-21]。利用肿瘤组织中的所有细胞集合进行相关研究,会因为细胞群体的复杂性而错失很多重要信息。以复杂细胞群体为研究对象,其结果只能反映所有细胞的平均水平,而具备某一特征的细胞表达的信息往往存在差异,比如 CD133⁺和 CD133⁻的胶质瘤细胞在胶质瘤中的作用和机制存在明显差异^[22]。分选型流式细胞仪及显微切割技术的出现,很大程度解决了上述因细胞类型混杂而影响研究结果的问题^[1-5,20]。

随着技术的发展,分选型流式细胞仪成为一类超高速细胞分选、纯化平台,它不但能做到无菌分选,而且可多参数选择,具有高通量和分选纯度高等特点,近年来已广泛应用于目的细胞或粒子的快速分离,如肿瘤干细胞、具有某些特征性分子表达的肿瘤细胞亚型、外周血原代单核细胞和精子等^[2-7,20]。本研究利用 MoFlo XDP 型超高速细胞分选平台,首先分析干细胞标志物 CD38 在宫颈癌 Caski 细胞膜表面的阳性表达率为 2.93%,然后进一步纯化 CD38⁺和 CD38⁻的宫颈癌 Caski 细胞。为证实细胞分选的纯度,将纯化的细胞再次进行流式细胞术分析,结果显示利用 MoFlo XDP 型超高速细胞分选平台可以获得纯度在 99.0%以上的 CD38 阳性表达宫颈癌细胞。高纯度且具有某些表达特征的细胞亚型的获得,可以为进一步研究宫颈癌的发病机制提供良好的研究样本。

实现对细胞群体的划分和纯化、对细胞群体间基因表达差异的检测以及细胞群体差异功能分析,是肿瘤细胞异质性分析、免疫细胞群体鉴定及胚胎发育研究的黄金方法。本研究在获得高纯度的 CD38⁺和 CD38⁻宫颈癌 Caski 细胞后,再利用基因芯片技术分析 CD38⁺和 CD38⁻的宫颈癌 Caski 细胞差异 mRNA 分子;结果发现与 CD38⁻细胞相比较,在 CD38⁺细胞中表达上调(2 倍或者 2 倍以上)的基因有 859 个,其中上调倍数排在前 20 位的基因有

RORA、*PLIN4*、*MAN1A1* 和 *CD38* 等。值得一提的是,CD38 分子排在第 4 位,从侧面证实分选的 CD38⁺宫颈癌细胞的可靠性;而在 CD38⁺细胞中表达下调(2 倍或者 2 倍以上)的基因有 863 个,其中下调倍数排在前 20 位的基因有 *AUTS2*、*IFITM1*、*RSAD2* 和 *TRIM22* 等。Taheri M 等^[23]研究了 *RORA* 与前列腺癌的关系,但是目前尚未见 *RORA* 与宫颈癌关系的报道。本研究的结果为进一步深入探讨这两者的关系提供了前期线索和证据。已有研究发现,*PLIN4* 基因变异与肺癌的预后相关^[24],*PLIN4* 基因突变与胃癌的发病相关^[25],目前也未见 *PLIN4* 基因与宫颈癌发病关系的相关研究。前期研究结果显示,CD38 在宫颈癌的发生发展中具有重要作用,CD38 在宫颈癌中高表达、过表达 CD38 影响宫颈癌细胞系 PI3K/Akt 的表达水平^[16];进一步的机制探讨发现 CD38 影响宫颈癌细胞内钙离子浓度、活性氧及线粒体膜电位水平;透射电镜结果显示 CD38 影响宫颈癌细胞内线粒体形态。本研究还证实 CD38 通过影响线粒体的功能来促进宫颈癌细胞的增殖、抑制其凋亡,为 CD38 在实体瘤中的作用及其机制提供了更新的证据^[27]。由此可见,对 CD38⁺和 CD38⁻细胞亚型的分析和分选,有助于发现宫颈癌潜在的分子标志物。

为验证所筛选出来的差异 mRNA 分子的可靠性,分别从表达上调的 mRNA 分子选取了差异倍数最大的 4 个基因(*RORA*、*PLIN4*、*MAN1A1* 和 *CD38*)和表达下调的 mRNA 分子选取了差异倍数最大的 4 个基因(*AUTS2*、*IFITM1*、*RSAD2* 和 *TRIM22*)进行 qRT-PCR 验证。结果显示 qRT-PCR 验证结果与芯片结果趋势一致,提示芯片结果的可靠性。采用超高速细胞分选平台和基因芯片技术,发现了 *RORA*、*PLIN4*、*MAN1A1* 等一些新的宫颈癌潜在分子靶标,为宫颈癌等恶性肿瘤的研究提供了一种新的技术方法。

参 考 文 献

- [1] Rinke C, Lee J, Nath N, et al. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics[J]. Nat Protoc, 2014, 9(5): 1038-1048.
- [2] Simonsen JB, Larsen JB, Hempel C, et al. Unique calibrators derived from fluorescence-activated nanoparticle sorting for flow cytometric size estimation of artificial vesicles: possibilities and limitations[J].

- Cytometry A, 2019, 95(8):917-924.
- [3] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):16897-16919.
- [4] Chamrád I, Uřínovská J, Petrovská B, et al. Identification of plant nuclear proteins based on a combination of flow sorting, SDS-PAGE, and LC-MS/MS analysis[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1696:57-79.
- [5] Jiang NG, Chen C, Gong Q, et al. Flow cytometric sorting coupled with exon capture sequencing identifies somatic mutations in archival lymphoma tissues[J]. Lab Invest, 2017, 97(11):1364-1374.
- [6] Sinha M, Lowell CA. Isolation of highly pure primary mouse alveolar epithelial type ii cells by flow cytometric cell sorting[J]. Bio-Protoc, 2016, 6(22):e2013.
- [7] Fromm JR, Thomas A, Wood BL. Characterization and purification of neoplastic cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting[J]. Am J Pathol, 2017, 187(2):304-317.
- [8] Wu JL, Mai KJ, Li D, et al. Expression profile analysis of 5-day-old neonatal piglets infected with porcine *Deltacoronavirus*[J]. BMC Vet Res, 2019, 15(1):117.
- [9] Wu YO, Yang J, Ai ZX, et al. Identification of key genes and transcription factors in aging mesenchymal stem cells by DNA microarray data[J]. Gene, 2019, 692:79-87.
- [10] Aydinoglu F, Lucas SJ. Identification and expression profiles of putative leaf growth related microRNAs in maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313[J]. Gene, 2019, 690:57-67.
- [11] Zhang JH, Liu Y, Shi GX. Gene microarray analysis of expression profiles in *Suberoyllanilide hyroxamic acid*-treated Dendritic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(2):392-397.
- [12] Petschner P, Tamasi V, Adori C, et al. Gene expression analysis indicates reduced memory and cognitive functions in the hippocampus and increase in synaptic reorganization in the frontal cortex 3 weeks after MDMA administration in Dark *Agouti* rats[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1):580.
- [13] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-E386.
- [14] 郝敏, 王静芳. 宫颈癌流行病学研究与调查[J]. 国外医学. 妇幼保健分册, 2005, 16(6):404-406.
- Hao M, Wang JF. An epidemiological study on cervical cancer[J]. Foreign Med Sci Sect Matern Child Health, 2005, 16(6):404-406.
- [15] Liao S, Xiao SS, Chen HX, et al. The receptor for activated protein kinase C promotes cell growth, invasion and migration in cervical cancer[J]. Int J Oncol, 2017, 51(5):1497-1507.
- [16] Liao S, Xiao SS, Chen HX, et al. CD38 enhances the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells by affecting the mitochondria functions[J]. Mol Carcinog, 2017, 56(10):2245-2257.
- [17] Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, et al. Polymorphisms in TP53(rs1042522), p16(rs11515 and rs3088440) and NQO1(rs1800566) genes in Thai cervical cancer patients with HPV 16 infection[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(1):341-346.
- [18] Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Moschaki V, et al. Comparison of cytology, HPV DNA testing and HPV 16/18 genotyping alone or combined targeting to the more balanced methodology for cervical cancer screening[J]. Gynecol Oncol, 2016, 142(1):120-127.
- [19] Damiani C, Maspero D, Di Filippo M, et al. Integration of single-cell RNA-seq data into population models to characterize cancer metabolism[J]. PLoS Comput Biol, 2019, 15(2):e1006733.
- [20] 周艳宏, 曾朝阳, 熊炜, 等. 鼻咽癌组织的显微切割及其 RNA 线性扩增[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(5):463-467.
- Zhou YH, Zeng ZY, Xiong W, et al. Microdissection and RNA line-amplication of nasopharyngeal carcinoma tissue[J]. Prog Biochem Biophys, 2005, 32(5):463-467.
- [21] Zheng DW, Liao S, Zhu GC, et al. CD38 is a putative functional marker for side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell lines[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(3):300-311.
- [22] Baxter PA, Lin Q, Mao H, et al. Silencing BMI1 eliminates tumor formation of pediatric glioma CD133⁺ cells not by affecting known targets but by down-regulating a novel set of core genes[J]. Acta Neuropathol Commun, 2014, 2:160.
- [23] Taheri M, Noroozi R, Dehghan A, et al. Association study of retinoic acid related orphan receptor A (RORA) gene and risk of prostate disorders[J]. Urol J, 2019, 16(2):141-144.
- [24] Qu LW, Zhou B, Wang GZ, et al. Genomic variations in paired normal controls for lung adenocarcinomas[J]. Oncotarget, 2017, 8(61):104113-104122.
- [25] Zhang J, Huang JY, Chen YN, et al. Whole genome and transcriptome sequencing of matched primary and peritoneal metastatic gastric carcinoma[J]. Sci Rep, 2015, 5:13750.
- [26] Liao S, Xiao SS, Zhu GC, et al. CD38 is highly expressed and affects the PI3K/Akt signaling pathway in cervical cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 32(6):2703-2709.

(责任编辑:周一青)