

应用基因芯片技术筛选转染 CDX2 基因后胃癌细胞差异表达基因

陈晓双 秦 蓉 储 婧 陈宗科

摘要 目的 观察转染 CDX2 基因后人胃癌细胞系 BGC-823 基因表达谱的变化。方法 通过脂质体介导法转染 pEGFP-C1-CDX2 和空载体 pEGFP-C1 至人胃癌细胞系 BGC-823 中,经 G418 筛选后获得稳定转染细胞,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CDX2 基因的表达。应用人类表达谱芯片 Affymetrix 2.0 对两组细胞同时进行基因芯片分析,筛选出差异表达基因(以表达差异 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5 倍为限),选择部分差异表达基因进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-time PCR)验证。结果 基因芯片筛选出 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 差异表达基因 599 个,其中上调基因 275 个,下调基因 324 个,这些基因主要涉及细胞增殖、分化、凋亡、信号转导、蛋白酶活性、肿瘤侵袭和转移等方面;Real-time PCR 检测部分差异表达基因 DKK3、FOXP1、TWIST1、GATA6、RUNX3 和 BMP2,其结果与芯片结果一致,确定芯片结果可靠。结论 应用人类表达谱芯片成功筛选出 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 后差异表达基因,为深入

探讨 CDX2 在胃癌中的作用机制提供线索。

关键词 胃肿瘤;尾侧型同源转录因子-2;基因芯片;实时荧光定量 PCR

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0730-05

胃癌是源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,发病率居我国恶性肿瘤首位。CDX2 尾型同源盒转录因子 2,位于人类 13 号染色体,属于 ParaHox cluster 成员。目前国内外普遍认为 CDX2 在肠黏膜上皮细胞的发育及其形态和结构特征的维持过程扮演重要的作用。前期研究^[1]显示 CDX2 在正常胃黏膜组织、慢性浅表性胃炎中不表达,在肠化组织中的表达明显高于异型增生和胃癌,在胃癌细胞中 CDX2 过表达明显抑制胃癌细胞增殖、降低其迁移能力。该文将 CDX2 基因和空载体分别转染至胃癌细胞系 BGC-823 中,构建实验组 BGC-823/CDX2 和阴性对照组 BGC-823/EV,利用基因芯片技术筛选 CDX2 转染人胃癌细胞 BGC-823 后差异表达基因;应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, Real-

2014-02-17 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090413118)

作者单位:安徽医科大学基础医学院病理学教研室,合肥 230032

作者介绍:陈晓双,女,硕士研究生;

秦 蓉,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: qin-rong0717@163.com

Effects and its mechanism of Arctigenin on mouse spleen cells

Lu Ming¹, Ji Feihong², Zhang Linjie¹

(¹ Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Shanghai Genhouse Biotechnology Corporation, Shanghai 201203)

Abstract **Objective** To investigate the effects of Arctigenin (ATG) on concanavalin (ConA)-stimulated cell proliferation and cytokine secretion in mouse spleen cells, and its possible mechanism. **Methods** The toxicity of ATG on mouse spleen cells was determined by MTT assay. The inhibition of proliferation was investigated by tritiated thymidine incorporation method. Secreted cytokines (IFN- γ and IL-2) were analyzed by ELISA. The associated proteins and phosphorylation levels of mTOR pathway (mTOR/P70S6K/Akt/AMPK/Raptor) were detected by Western blot. **Results** ATG had no significant toxicity to mouse spleen cells. ATG significantly inhibited mouse primary spleen cells proliferation induced by ConA. ATG suppressed IL-2 and IFN- γ production of mouse spleen cells in a concentration-dependent manner. ATG remarkably suppressed the phosphorylation of mTOR and P70S6K, and enhanced the phosphorylation of upstream AMPK and Raptor, while the phosphorylation of Akt did not change significantly. **Conclusion** ATG markedly suppresses the proliferation of mouse spleen stimulated by ConA cells and secretion of IFN- γ and IL-2, which may be correlated to the abilities of enhancing the phosphorylation of AMPK and Raptor, inhibiting the phosphorylation of mTOR and P70S6K.

Key words Arctigenin; cell proliferation; IL-2; IFN- γ ; mTOR

time PCR) 技术对基因芯片结果进行验证分析,从而确认基因芯片结果准确性。通过寻找受 CDX2 调控的下游基因,进一步探讨 CDX2 基因在胃癌细胞作用的可能分子机制,为下一步的功能研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料 真核表达质粒 pEGFP-C1-CDX2、空载体 pEGFP-C1 和人胃癌细胞系 BGC-823 细胞由本实验室长期保存。DMEM 培养液购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清购于杭州四季青公司;胰酶购于碧云天生物公司;总 RNA 提取试剂 TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;基因芯片为 Affymetrix Human Genome U133 2.0 Array, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 由加拿大 Fermentas 公司提供; Attractene Transfection Reagent、QuantiFast SYBR Green PCR Kit、QuantiFast Primer Assay (DKK3、FOXP1、TWIST1、GATA6、RUNX3、BMP2 和 β -actin) 均由德国 QIAGEN 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 BGC-823 细胞转染与筛选 在 35 mm 培养皿中常规培养 BGC-823 细胞,取处于对数生长期细胞用胰酶消化,重悬,以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中,以转染试剂 Attractene Transfection Reagent 分别介导 1.2 μ g 重组质粒 pEGFP-C1-CDX2 和阴性对照空载体 pEGFP-C1 转染 BGC-823 细胞。细胞转染 9 h 后换液,转染 24 h 后,按照 1:4 传代,接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后用 G418 进行抗性克隆筛选,G418 起初计量为 400 μ g/ml,培养 8 h 后,递减为 200 μ g/ml,维持此浓度,直至获得稳定的细胞株,并分别命名为 BGC-823/CDX2 和 BGC-823/EV。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 CDX2 基因 mRNA 表达 在 35 mm 培养皿中常规培养 BGC-823/CDX2、BGC-823/EV 和 BGC-823 3 组细胞,按照 TRIzol 说明书提取总 RNA。应用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA。CDX2 和内参照 GADPH 由英骏生物技术有限公司合成。CDX2 上、下游引物分别为 5'-ATCATC-GAATTCTGCCACCATGTACGTGAGCTACCTCCTGGA-CAAG-3' 和 5'-ATCATCGGATCCTCACTGGGTGACG-GTGGGGTTTAGCA-3', 产物大小 961 bp; 内参照 GADPH 上、下游引物分别为 5'-AACGGATTTG-GTCGTATTG-3' 和 5'-CTGGAAGATGGTGATGGG-3', 产物大小 210 bp。取 3 μ l cDNA 按常规操作进行

PCR 扩增,并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 总 RNA 提取及纯化 在 35 mm 培养皿中常规培养 BGC-823/CDX2 和 BGC-823/EV 两组细胞,48 h 后收获细胞,按照 TRIzol 说明书提取总 RNA,采用紫外分光光度计 Nanodrop-1000 测定样本吸光度,经 RNeasy Mini Kit (QIAGEN 公司,德国) 纯化样本并采用凝胶电泳系统 Agilent-2100 进行检测。Agilent 结果显示实验组与对照组 28S 和 18S RNA 比值符合芯片检测要求。

1.2.4 制备 cDNA 和 cRNA 对两组样本总 RNA 分别进行以下操作:应用 Affymetrix One-cycle cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 依次合成 1st cDNA 及 2nd cDNA,合成双链 cDNA,经 Affymetrix Genechip Sample Cleanup Module 纯化。纯化后的 cDNA 经 Affymetrix GeneChip IVT Labeling Kit 转录合成生物素标记 cRNA,并应用 Genechip Sample Cleanup Module 进行纯化。取 15 μ g 纯化后的 cRNA,加 8 μ l $5 \times$ Fragmentation Buffer 和 40 μ l RNase-Free Water,混匀,94 $^{\circ}$ C 温浴 35 min,反应结束后置于冰上使 cRNA 片段化,产生的 cRNA 片段大小为 35 ~ 200 bp,可用于芯片杂交。

1.2.5 芯片杂交、洗脱和染色 实验选用的芯片为 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array,该芯片包含人类全基因组 47 000 个转录本,38 500 个清晰的人类基因。取适量片段化 cRNA 与芯片进行杂交,45 $^{\circ}$ C,60 r/min,16 h。杂交完毕后,从芯片中吸出杂交液,应用 Fluidics Station 450 进行芯片洗脱和染色。

1.2.6 芯片扫描及数据采集 使用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 对芯片进行扫描,并采用 Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) Version 1.4 软件对扫描图像进行数据分析,根据 Ratio 值筛选出差异表达基因,并对差异表达基因进行 Gene Ontology 富集分析(参考网站 <http://www.geneontology.org>)。

1.2.7 Real-time PCR 验证芯片结果 按照 TRIzol 说明书分别提取 BGC-823/CDX2 和 BGC-823/EV 两组细胞总 RNA。应用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA。使用 QuantiFast SYBR Green PCR Kit 进行 Real-time PCR。DKK3、FOXP1、TWIST1、GATA6、RUNX3、BMP2 以及内参照 β -actin 引物均由 QIAGEN 公司合成。GATA6 引物: QT01001133,产物大小 76 bp; RUNX3 引物: QT00040306,产物大小 69 bp; BMP2

引物: QT00012544, 产物大小 148 bp; DKK3 引物: QT00036057, 产物大小 173 bp; FOXP1 引物: QT00064890, 产物大小 96 bp; TWIST1 引物: QT00011956, 产物大小 127 bp; 内参照 β -actin 引物: 01680476, 产物大小 104 bp。Real-time PCR 反应体系为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s; 60 °C 30 s; 重复 40 个循环; 溶解曲线温度范围: 60 ~ 95 °C。所有样本做 3 个复孔。获得样本 Ct 值, 以 β -actin 作为内参照, 根据相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算差异倍数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两样本 t 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 CDX2 基因 mRNA 表达 RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后显示, BGC-823/CDX2 在 961 bp 位置可观测到一条清晰的特异性条带, 而空白对照组 BGC-823 和阴性对照组 BGC-823/EV 在该位置未出现此条带, 表明稳定转染细胞株 BGC-823/CDX2 确有 CDX2 mRNA 的转录。见图 1。

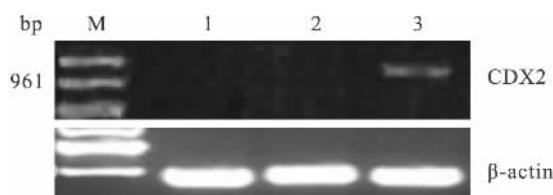


图1 RT-PCR 检测人胃癌 BGC-823 细胞 CDX2 mRNA 表达

M: Marker; 1: BGC-823 空白对照组; 2: BGC-823/EV 阴性对照组; 3: BGC-823/CDX2 转染组

2.2 基因芯片 经基因芯片筛选 CDX2 过表达胃癌细胞差异表达基因 599 个, 其中上调基因 275 个, 下调基因 324 个。对芯片结果进行功能分类, 发现差异基因涉及细胞增殖、分化、凋亡和信号转导、蛋白酶活性、肿瘤侵袭和转移等方面。部分差异表达基因见表 1、2。

2.3 Real-time PCR 验证分析差异表达基因

表1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank	编码蛋白	Ratio
1	NM_138557.2	Homo sapiens toll-like receptor 4(TLR4)	3.095
2	NM_001159700.1	Homo sapiens four and a half LIM domains 1(FHL1)	4.585
3	NM_006288.3	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen(THY1)	4.965
4	NM_001018057.1	Homo sapiens dickkopf 3 homolog (Xenopus laevis) (DKK3)	8.029
5	NM_013230.2	Homo sapiens CD24 molecule(CD24)	8.142
6	NM_000474.3	Homo sapiens twist basic helix-loop-helix transcription factor 1(TWIST1)	17.359
7	NM_031439.2	Homo sapiens SRY (sex determining region Y) -box 7(SOX7)	20.669
8	NM_001001547.2	Homo sapiens CD36 molecule (thrombospondin receptor) (CD36)	23.341
9	NM_001244808.1	Homo sapiens forkhead box P1(FOXP1)	37.147
10	NM_003118.3	Homo sapiens secreted protein , acidic , cysteine-rich (osteonectin) (SPARC)	66.429

据差异表达基因涉及的不同功能, 选择 6 个差异表达基因进行 Real-time PCR。其结果显示, 与 BGC-823/EV 比较, DKK3、FOXP1 和 TWIST1 在 BGC-823/CDX2 中表达上调 ($t = 12.100$, $t = 27.845$, $t = 14.072$; $P < 0.05$) 见图 2; GATA6、RUNX3 和 BMP2 在 BGC-823/CDX2 中表达下调 ($t = -5.548$, $t = -4.643$, $t = -3.930$; $P < 0.05$) 见图 3。Real-time PCR 结果与芯片结果一致, 说明芯片结果可靠。

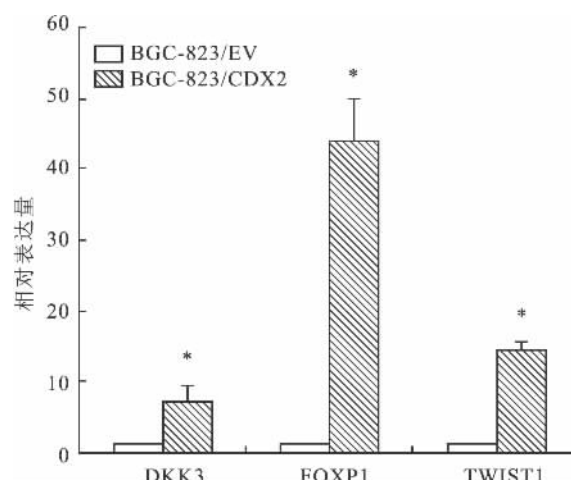


图2 DKK3、FOXP1 和 TWIST1 在 BGC-823/EV 和 BGC-823/CDX2 两组细胞中的相对表达水平
与 BGC-823/EV 组比较: * $P < 0.05$

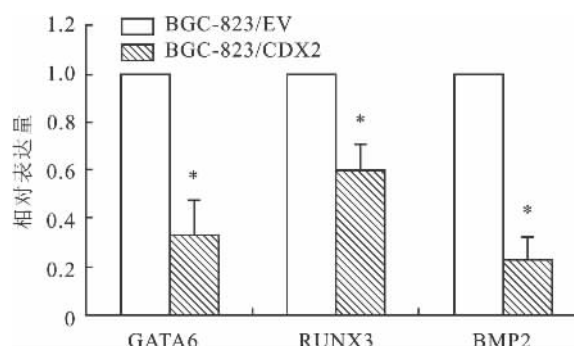


图3 GATA6、RUNX3 和 BMP2 在 BGC-823/EV 和 BGC-823/CDX2 两组细胞中的相对表达水平
与 BGC-823/EV 组比较: * $P < 0.05$

表2 部分表达显著减弱的基因

序号	GenBank	编码蛋白	Ratio
1	NM_001200.2	Homo sapiens bone morphogenetic protein 2(BMP2)	0.067
2	NM_005257.4	Homo sapiens GATA binding protein 6(GATA6)	0.095
3	NM_014751.4	Homo sapiens metastasis suppressor 1(MTSS1)	0.104
4	NM_053025.3	Homo sapiens metastasis myosin light chain kinase (MYLK)	0.112
5	NM_170731.4	Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	0.167
6	NM_018490.2	Homo sapiens leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4(LGR4)	0.180
7	NM_001185022.1	Homo sapiens claudin 7(CLDN7)	0.200
8	NM_001128620.1	Homo sapiens p21 protein (Cdc42/Rac) -activated kinase 1(PAK1)	0.230
9	NM_001031680.2	Homo sapiens runt-related transcription factor 3(RUNX3)	0.230
10	NM_001621.4	Homo sapiens aryl hydrocarbon receptor(AHR)	0.236

3 讨论

基因芯片技术的产生和发展与分子生物学、人类基因组计划密不可分,基因芯片拥有高度并行性、高通量、微型化等显著特点。目前,基因表达谱芯片可用于检测肿瘤相关基因表达、进行肿瘤分类和筛选抗肿瘤药物等,是消化道肿瘤分子水平研究的重要工具。

CDX2 基因在人胃癌细胞系 BGC-823 细胞中低表达,该研究建立在 CDX2 过表达胃癌细胞系基础上,利用人类表达谱芯片对该细胞系的表达谱进行初步研究。基因芯片筛选出表达差异基因共 599 个,其中上调基因 275 个,下调基因 324 个。这些差异表达基因在细胞增殖、分化、凋亡、细胞黏附及细胞周期等细胞生理过程中发挥重要调控作用,参与肿瘤细胞的信号转导、侵袭和转移等过程。

表达上调基因中,DDR2、GAS1、FAS、DKK3、TWIST1 等与细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤侵袭转移有密切联系。DDR2 作为受体型酪氨酸激酶通过纤维性胶原被激活,Kawai et al^[2]通过建立 ATDC5 细胞系和 miDdr2-transfected ATDC5 细胞系小鼠模型探究 DDR2 在软骨细胞增殖中的作用,推断 DDR2 可能负性调节细胞增殖。GAS1 经内在凋亡途径诱导细胞死亡,可通过调节 BCL-2/Bax 比值和激活 caspase-3 诱导胃癌细胞凋亡^[3-4]。死亡受体 FAS 是肿瘤坏死因子受体家族重要成员,经 FAS/FASL 通路转导死亡信号诱导细胞凋亡^[5]。DKK3 是 Wnt 复合物受体拮抗剂,在各种类型肿瘤中表达下调,经 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制肿瘤^[6]。TWIST1 是碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族中的高度保守的转录因子,可诱导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及促进细胞外基质的降解^[7],在

胃癌发生发展和侵袭转移中扮演重要作用^[8]。

表达下调基因中 PAK1、BDNF、CLDN7、RUNX3、BMP2 等参与细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤侵袭转移过程。PAK1 是典型的进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是小分子 GTPases Rho、Rac1 和 Cdc42 的重要效应分子。在胃肿瘤转移的研究中发现 PAK1 过表达时肿瘤细胞形成张力纤维和黏着斑复合物的能力减弱从而影响细胞骨架重构促进细胞迁移^[9]。BDNF 与它的主要受体 TrkB 结合后,使 MMP-1 表达上调, MMP-1 激活肽链内切酶降解肿瘤微环境中 ECM 蛋白从而促进人类软骨肉瘤细胞迁移,许多肿瘤组织中 BDNF 和 TrkB 表达上调^[10]。CLDN7 属于黏附连接蛋白家族成员,主要表达在弥漫型胃癌,可成为胃肿瘤预后标志物^[11]。在正常的胃黏膜上皮细胞中,转录因子 RUNX3 经 TGF- β 信号通路调节细胞增殖和凋亡, RUNX3 对胃黏膜上皮细胞起到保护性作用^[12]。骨形成蛋白 BMP2 属于 TGF- β 超家族,在胃癌侵袭和转移中, BMP2 信号通路是通过招募 PI3K/AKT 和 MAPK 通路,从而激活 NF- κ B 通路,使 MMP-9 激活和肿瘤细胞转移^[13]。

与其他研究方法相比,应用基因芯片技术可以快速高效地获取 CDX2 过表达 BGC-823 细胞的基因表达谱,及大量差异表达基因的信息,从而预测这些基因的功能和基因间的相互关系,以及与 CDX2 基因的调控关系。然而芯片结果主要反应基因在转录水平的变化,具有一定的局限性。

本研究应用人类表达谱芯片成功筛选出 CDX2 转染人胃癌细胞系 BGC-823 细胞后差异表达基因, Real-time PCR 验证芯片结果可靠。随后的基因功能分析中获取了许多 CDX2 可能作用的候选基因,这些基因都可能是 CDX2 在胃癌组织发生作用的靶点,为深入探讨 CDX2 在胃癌中的作用机制提供了

线索。

参考文献

- [1] 王娜娜,秦蓉,储婧,等. CDX2 在胃癌及癌前病变组织中的表达及其临床意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(6): 597-3.
- [2] Kawai I, Hisaki T, Sugiura K, et al. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3): 611-7.
- [3] Zarco N, González-Ramírez R, González R O, et al. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(6): 627-35.
- [4] Wang H, Zhou X, Zhang Y, et al. Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer[J]. *FEBS J*, 2012, 279(19): 3652-64.
- [5] Bębenek M, Duś D, Koźlak J. Prognostic value of the Fas/Fas ligand system in breast cancer[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2013, 17(2): 120-2.
- [6] Yue W, Sun Q, Dacic S, et al. Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1): 84-92.
- [7] Liu A N, Zhu Z H, Chang S J, et al. Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1-2): 195-203.
- [8] Low-Marchelli J M, Ardi V C, Vizcarra E A, et al. Twist1 induces CCL2 and recruits macrophages to promote angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 662-71.
- [9] Li L H, Luo Q, Zheng M H, et al. P21-activated protein kinase 1 is overexpressed in gastric cancer and induces cancer metastasis[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1435-42.
- [10] Lin C Y, Chang S L, Fong Y C, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved in brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-enhanced cell motility and matrix metalloproteinase 1 expression in human chondrosarcoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 15459-78.
- [11] Rendón-Huerta E, Teresa F, Teresa G M, et al. Distribution and expression pattern of claudins 6, 7, and 9 in diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinomas[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2010, 41(1): 52-9.
- [12] Voon D C, Wang H, Koo J K, et al. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(10): 2088-99.
- [13] Kang M H, Oh S C, Lee H J, et al. Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-κB pathway, and MMP-9 expression[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(12): 1746-62.

Screening differential expression genes in gastric cancer cells transfected with CDX2 gene using cDNA microarray technology

Chen Xiaoshuang, Qin Rong, Chu Jing, et al

(Dept of Pathology, Basic Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of CDX2 gene on the expression profile of gastric cancer cell line BGC-823 by cDNA microarrays. **Methods** The plasmid pEGFP-C1-CDX2 and the control vector pEGFP-C1 were transfected into BGC-823 cells *in vitro* by using the lipofectamin transfection reagent respectively. The expression levels of CDX2 mRNA were detected by RT-PCR. Different gene expression profiles between BGC-823/CDX2 and BGC-823/EV cells were analyzed by affymetrix human genome U113 2.0 arrays. Part of the results of cDNA microarray was confirmed by Real-time PCR. **Results** 599 different expression genes whose fold change was larger than 2 were screened. 275 were up-regulated and 324 were down-regulated in BGC-823/CDX2 cells. These genes were involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis, signal transduction and protease activity, invasion and metastasis of tumor, and so on. Six different expression genes (DKK3, FOXP1, TWIST1, GATA6, RUNX3 and BMP2) were selected for Real-time PCR and the results were in accordance with that of cDNA microarrays. **Conclusion** The influence of CDX2 on the expression profile of the gastric cancer cell line BGC-823 is extensive. The altered genes may be useful to clarify the mechanism of carcinogenesis of gastric cancer.

Key words stomach neoplasm; CDX2; cDNA microarray; Real-time PCR