

研究快报

一个新鼻咽癌抑瘤候选基因的克隆
及其功能初步分析*余 鹰 谢 奕 曹 利 张必成 周 鸣 湛凤凰 李桂源¹⁾

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 从 cDNA 代表差异分析法 (cDNA representational difference analysis, cDNA RDA) 分离的新 cDNA 片段入手, 进一步采用 RT-PCR 验证, 其中发现 AF152605 片段在 74% 鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 活检组织中表达下调和缺失, DNA 印迹显示其代表一转录本为 2.1 kb 的基因, 结合生物信息学, 运用文库筛选克隆该基因, 命名为 NAG4 基因, GenBank 登录号 AF179285, 定位于 6q22.1~22.33, 至少含有两个外显子, 并在第一外显子的上游有 TATA 盒样序列, 编码一个 508 个氨基酸组成的、分子质量为 57.4 ku 的蛋白质; 功能预测 NAG4 基因产物与小鼠溴区蛋白 BP75 有 84% 同源, 是含有多个磷酸化位点和溴区结构域的核内转录因子; 突变分析表明 NAG4 基因在 HeLa 细胞株中发生整码突变。以上结果说明 NAG4 基因是鼻咽癌抑瘤基因的良好候选者, 其表达的下调参与了鼻咽癌的发生。

关键词 鼻咽肿瘤, 基因表达, 抑瘤基因, 克隆, 溴区结构域

学科分类号 R739.63

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方常见的上皮源性恶性肿瘤, 湖南省的死亡率为 $4.6/10^5$, 位居全国第四。流行病学研究调查表明, 鼻咽癌的发病与 EB 病毒感染、某些环境理化因素和遗传因素有关, 但是其分子发病仍不十分清楚。我们应用 cDNA 代表差异分析法 (cDNA representational difference analysis, cDNA RDA) 试图比较鼻咽癌和正常鼻咽上皮的差异表达基因从中找到突破, 已成功分离出鼻咽癌细胞株 HNE1 中表达下调/缺失的 17 个 cDNA 序列, 其中 8 个 cDNA 序列为新基因序列^[1]。为了进一步筛选与克隆鼻咽癌相关的抑瘤基因候选者, 通过 RT-PCR 方法验证其在鼻咽癌活检组织中的差异表达, 以进一步深入研究。

1 材料和方法

1.1 材料

原代培养的正常人鼻咽上皮细胞 1 例, 去除淋巴细胞和纤维组织, 呈单一的上皮细胞形态; 20 例低分化鳞状上皮鼻咽癌, 来自湖南省肿瘤医院门诊 (5~6 月) 活检标本, 所有标本均经过病理学确诊; HeLa 细胞株为本实验室库存。

差异表达 cDNA 序列中特异引物用软件 PCR Designer 1.03 (Research Genetics) 设计, 由上海

细胞研究所赛尔生物技术公司合成。甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GADPH) 基因的两条引物为 F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'; R: 5'-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA-3'; 其扩增目的片段为 598 bp。AF152605 的两条引物为 F: 5'-TGGAAGCCTCTCACAAGCT-3'; R: 5'-TGTGTACTAATGCCATGAT-3'; 其扩增目的片段为 270 bp。

1.2 RNA 抽提与差异 RT-PCR

按照 TRIzolTM 试剂盒 (Gibco BRL 公司) 操作程序提取原代培养的正常人鼻咽上皮细胞和鼻咽癌活检组织 RNA; 后用 DNase I 消化 RNA 中痕量 DNA, PCR 扩增 GADPH 检测无特异扩增条带以保证 DNA 消化完全。RNA 取量约为 2 μ g 按 RT 试剂盒 (Promega 公司) 操作步骤进行逆转录反应。为较客观地反映 mRNA 表达的相对水平, 在特异引物及内对照 GADPH 的 PCR 平台期前结束 PCR。采用下列参数进行差异 PCR: 94℃变性 50 s; 55℃复性 50 s; 72℃延伸 1 min; 5 个循环后加入

* 国家 863 (102-10-01-05)、973 重点项目《“疾病基因组学”理论和技术体系的建立》及国家自然科学基金 (39700158) 资助。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (0731) 4805446, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 1999-12-25, 修回日期: 2000-02-21

50 $\mu\text{mol/L}$ GADPH 上下游引物混合液 1 μl , 继续进行 23 个循环终止。

1.3 探针的标记

按照《分子克隆实验指南》, 碱抽提法大量抽提质粒, 然后根据 pT3T7D-Pac 载体选用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切、回收目的片段。以此回收目的片段为模板进行 PCR 法标记探针, 50 μl 反应体系: 模板 DNA 5 ng, KCl 50 mmol/L, MgCl_2 1.5 mmol/L, TrisHCl 10 mmol/L, pH 8.0, Taq DNA 聚合酶 3 U, dCTP、dTTP、dGTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$, [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (北京亚辉公司) 2.96×10^6 Bq, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 50 s; 55 $^\circ\text{C}$ 复性 50 s; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min; 35 个循环。经 Sephadex G-50 柱纯化测 cpm 值。

1.4 DNA 印迹

Human Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blots (# 7760-1) 购自 Clontech 公司, 含人心、脑、肺、肝、肾、骨骼肌、胎盘、胰腺八种组织标本, 每种组织用 2 μg mRNA 进行转膜。采用 ExpressHybTM Hybridization Solution 杂交液 (Clontech 公司), 68 $^\circ\text{C}$ 杂交 1 h, $2 \times \text{SSC}$ 、0.1 $\times \text{SDS}$ 37 $^\circ\text{C}$ 、15 min 洗膜 2 次, 0.1 $\times \text{SSC}$ 、0.1 $\times \text{SDS}$ 50 $^\circ\text{C}$ 、10 min 洗膜 2 次, -70 $^\circ\text{C}$ 放射自显影 72 h。

1.5 文库筛选

首先通过连续稀释测定噬菌体文库的滴度, 每 150 mm 培养皿铺约 3×10^4 pfu (共 6×10^5 pfu), 37 $^\circ\text{C}$, 6~8 h 后待噬菌斑开始相互融合为止, 用 135 mm 尼龙膜印膜, 再变性、中和和漂洗, 80 $^\circ\text{C}$ 真空干烤 2 h, 常规预杂交、杂交和洗膜, 放射自显影。按上述过程连续筛选 3 轮, 直到阳性克隆大于 95% 以上。

1.6 DNA 序列测定与生物信息学分析

质粒 DNA 和 Lambda gt10 DNA 分别按照 QIAGEN Plasmid Mini Kit 和 Lambda Preps DNA Purification System 操作手册进行抽提、纯化。用 ABI 公司的 377 型 DNA 自动测序仪从 DNA 正负两链进行核苷酸序列测序。测序后对新序列、新基因进行匹配分析以及对新基因进行全长和其编码的蛋白质的结构与功能进行预测。

2 结 果

2.1 AF152605 在正常鼻咽上皮细胞和鼻咽癌活检组织中的差异表达

为了进一步确证通过 cDNA RDA 方法分离鼻

咽癌细胞株 HNE1 的差异片段 AF152605 在鼻咽癌活检组织中差异表达, 根据上述设计特异性引物, 以 GADPH 为内对照分别作 RT-PCR 检测, 结果显示 AF152605 在鼻咽癌活检组织中有 37% (5/13) 表达缺失和 37% (5/13) 的表达下调 (部分结果见图 1)。说明 AF152605 cDNA 序列在正常鼻咽上皮与鼻咽癌组织中存在表达差异, 不是细胞培养引起的变化。

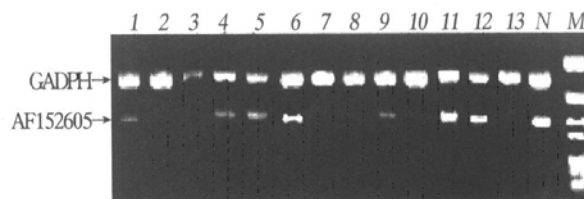


图 1 RT-PCR 分析 AF152605 在鼻咽癌组织中的表达
M: pGEM-7zf (+) 分子质量标准; N: 正常鼻咽上皮细胞; 1~13: 鼻咽癌活检组织。

2.2 差异表达 cDNA 序列多组织 RNA 印迹

AF152605 cDNA 序列经匹配分析与已知 IMAGE 566805 EST 同源, 从 Research Genetics 公司购得测序, 再根据延长的 cDNA 序列设计特异性引物使用 PCR 法标记探针, 对多组织 MTN 膜进行杂交, 结果显示: AF152605 在心、脑、肺、肝、肾、骨骼肌、胎盘、胰腺八种组织都有表达, 以心、脑、骨骼肌和胰腺组织中表达相对较高, 其转录本为 2.1 kb 大小 (图 2)。

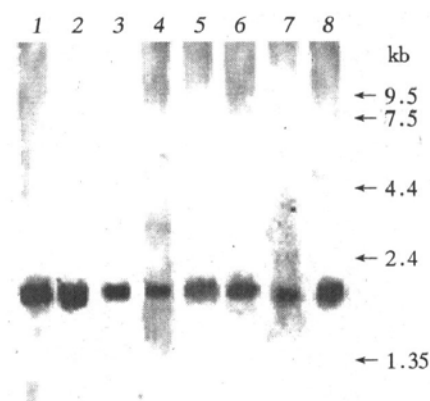


图 2 AF152605 在多组织的表达状况

1: 心; 2: 脑; 3: 肺; 4: 肝; 5: 肾; 6: 骨骼肌; 7: 胎盘; 8: 胰腺。

2.3 NAG4 基因的克隆

根据杂交结果选择其表达丰度较高的骨骼肌 cDNA 文库进行筛选, 三轮筛选后获得 18 个独立阳性克隆 (图 3), PCR 鉴定后, 选择长度大于

2 kb的4个克隆进行测序, 其克隆序列基本一致, 长度为2 138 bp, 与RNA印迹的2.1 kb转录本结果基本相符, 在5'端407 nt非编码区(untranslated region, UTR)后包含1 524 nt组成

的完整蛋白质阅读框架, 而且具有典型的加尾信号(AATAAA)和polyA尾, 因此认为几乎达到了全长(图4), 命名为NAG4, GenBank收录号AF179285.

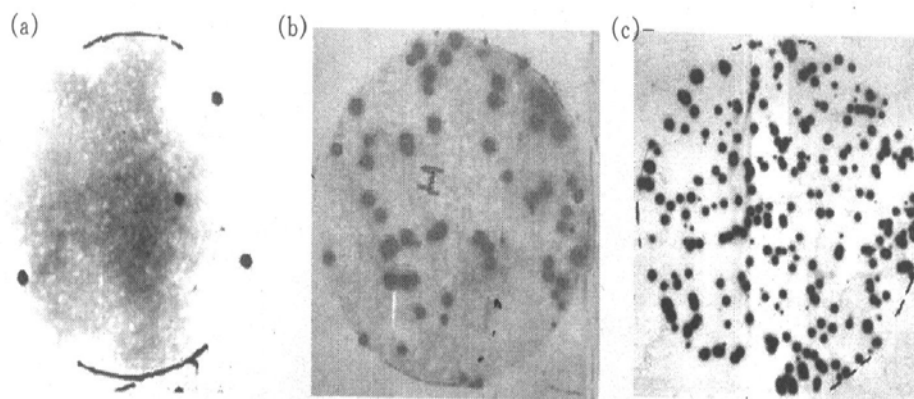


图3 AF152605 cDNA的骨骼肌文库筛选

(a), (b), (c) 分别示第一、二、三轮筛选结果.

ACAAGTCGGACAAACACCTCTACGAGGAGTATGTNGAGAAGCCCTTGAAGCTGGTCCTCAAAGTAG
GAGGGAACGAAGTCACCGAACTCTCCACGGGCAGCTCGGGGCACGACTCCAGCCTCTTCGAAGACA
AA AACGATCATGACAAACACAAGGACAGAAAGCGGAAAAAGAGAAAGAAAGGAGAGAAGCAGATTC
CAGGGGAAGAAAAGGGGAGAAAACGGAGAAGAGTTAAGGAGGATAAAAAGAAGCGAGATCGAGACC
GGGTGGAGAATGAGGCAGAAAAAGATCTCCAGTGTACGCCCTGTGAGATTAGACTTGCCCTCCTG
AGAAGCCTCTCACAAGCTCTTTAGCCAAACAAGAAGAAGTAGAACAGACACCCCTTCAAGAAGCTT
TGAATCAACTG
ATGAGACAATTGCAGAGAAAAGATCCAAGTGCTTTCTTTTCATTTCCCTGTGACTGATTTTATTGCT
M R Q L Q R K D P S A F F S F P V T D F I A
CCTGGCTACTCCATGATCATTAAACACCCAATGGATTTTAGTACCATGAAAGAAAAGATCAAGAAC
P G Y S M I I K H P M D F S T M K E K I K N
AATGACTATCAGTCCATAGAAGAACTAAAGGATAACTTCAAATAATGTGTACTAATGCCATGATT
N D Y Q S I E E L K D N F K L M C T N A M I
TACAATAAACCAGAGACCATTATTATAAAGCTGCAAAGAAGCTGTTGCACTCAGGAATGAAAATT
Y N K P E T I Y Y K A A K K L L H S G M K I
CTTAGCCAGGAAAGAATTGAGAGCCTGAAGCAGAGCATAGACTTCATGGCTGACTTGCAGAAAAC
L S Q E R I Q S L K Q S I D F M A D L Q K T
CGAAAGCAGAAAGATGGAACAGACACCTCACAGAGTGGGGAGGACGGAGGCTGCTGGCAGAGAGAG
R K Q K D G T D T S Q S G E D G G C W Q R E
AGAGAGGACTCTGGAGATGCCGAAGCACACGCCTTCAAGAGTCCCAGCAAAGAAAATAAAAAGAAA
R E D S G D A E A H A F K S P S K E N K K K
GACAAAGATATGCTTGAAGATAAGTTTAAAAGCAATAATTTAGAGAGAGAGCAGGAGCAGCTTGAC
D K D M L E D K F K S N N L E R E Q E Q L D
CGCATCGTGAAGGAATCTGGAGGAAAGCTGACCAGGCGGCTTGTGAACAGTCAGTGCGAATTTGAA
R I V K E S G G K L T R R L V N S Q C E F E
AGAAGAAAACCAGATGGAACAACGACGTTGGGACTTCTCCATCCTGTGGATCCCATTTGTAGGAGAG
R R K P D G T T T L G L L H P V D P I V G E
CCAGGCTACTGCCCTGTGAGACTGGGAATGACAACTGGAAGACTTCAGTCTGGAGTGAATACTTTG
P G Y C P V R L G M T T G R L Q S G V N T L
CAGGGGTTCAAAGAGGATAAAAGGAACAAAGTCACTCCAGTGTATATTTGAATTATGGGCCCTAC
Q G F K E D K R N K V T P V L Y L N Y G P Y
AGTTCTTATGCACCGCATTATGACTCCACATTTGCAAATATCAGCAAGGATGATTCTGATTTAATC
S S Y A P H Y D S T F A N I S K D D S D L I

```

T ATTCAACCTATGGGGAAGACTCTGATCTTCCAAGTGATTTTCAGCATCCATGAGTTTTTGGCCACG
Y S T Y G E D S D L P S D F S I H E F L A T
TGCCAAGATTATCCGTATGTCATGGCAGATAGTTTACTGGATGTTTAAACAAAAGGAGGGCATTCC
C Q D Y P Y V M A D S L L D V L T K G G H S
AGGACCCTACAAGAGATGGAGATGTCATTGCCTGAAGATGAAGGCCATACTAGGACACTTGACACA
R T L Q E M E M S L P E D E G H T R T L D T
GCAAAAGAAATGGAGATTACAGAAGTAGAGCCACCAGGGCGTTTGGACTCCAGTACTCAAGACAGG
A K E M E I T E V E P P G R L D S S T Q D R
CTCATAGCGCTGAAAGCAGTAACAAATTTTGGCGTTCCAGTTGAAGTTTTTGAAGTCTGAAGAAGCT
L I A L K A V T N F G V P V E V F D S E E A
GAAATATTCCAGAAGAACTTGATGAGACCACCAGATTGCTCAGGGAAGTCCAGGAAGCCCAGAAT
E I F Q K K L D E T T R L L R E L Q E A Q N
GAACGTTTGAGCACCAGACCCCTCCGAACATGATCTGTCTCTTGGGTCCCTCATACAGAGAAATG
E R L S T R P P P N M I C L L G P S Y R E M
CATCTTGCTGAACAAGTGACCAATAATCTTAAAGAACTTGACACAGCAAGTAAGTCCAGGTGATATC
H L A E Q V T N N L K E L A Q Q V T P G D I
GTAAGCACGTATGGAGTTCGAAAAGCAATGGGGATTTCCATTCTTCCCCCGTCATGGAAAACAAC
V S T Y G V R K A M G I S I P S P V M E N N
TTTGTGGATTTGACAGAAGACACTGAAGAACCTAAAAAGACGGATGTTGCTGAGTGTGGACCTGGT
F V D L T E D T E E P K K T D V A E C G P G
GGAAGTTGA
G S *
GGCTGCCTGGTATTTGATTATATATTATGTACATACTTTTTTCATTCTTAAGTCTTAGAAATGCTTTTC
AG AAGATATTAAATATTTGTAAATTGTGTTTTTAATTAAACTTTGGAACAGCGAATTTGGATGTTTC
C AGAGGTTGGACTTGTATTAGGTAATAAAGCTGGACCTGGGACTCGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

```

图4 NAG4 基因全长 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

溴区结构域 (bromodomain) 用黑体显示; 加尾信号用斜体显示。

2.4 NAG4 基因的染色体定位和突变分析

通过用 BLAST 搜寻 GenBank 数据库, 发现 NAG4 基因 cDNA 全部序列位于一人 PAC 509L4 克隆 (登录号为 Z99496) 的基因组序列中, PAC 509L4 精细定位在 6q22.1~6q22.33, 从其物理图谱上看, NAG4 基因至少有两个以上的外显子组成, 其第一外显子上游发现有 TATA 框样启动子序列 (图 5); 另外, 与已知 EST 相比较, 我们发

现 HeLa S3 细胞系的一段 EST (IMAGE 843206) 序列完全相同, 经其全长测序有 2.0 kb, 含有完整的开放阅读框架和 polyA 尾, 与 NAG4 基因阅读框架相比, 呈现整码突变 (插入 CAG), 我们通过设计包含 NAG4 基因开放阅读框架的特异性引物, 使用 RT-PCR 方法在培养的 HeLa 细胞中扩增、亚克隆和测序, 也进一步证实上述结果 (图 6)。

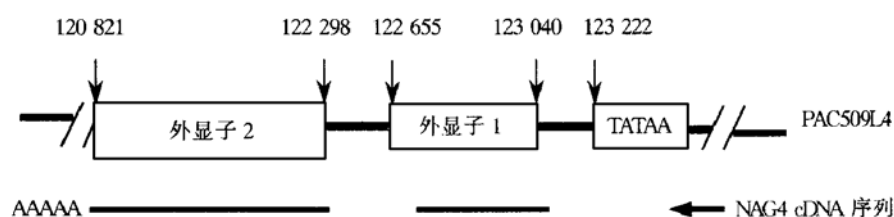


图5 NAG4 基因的物理图谱

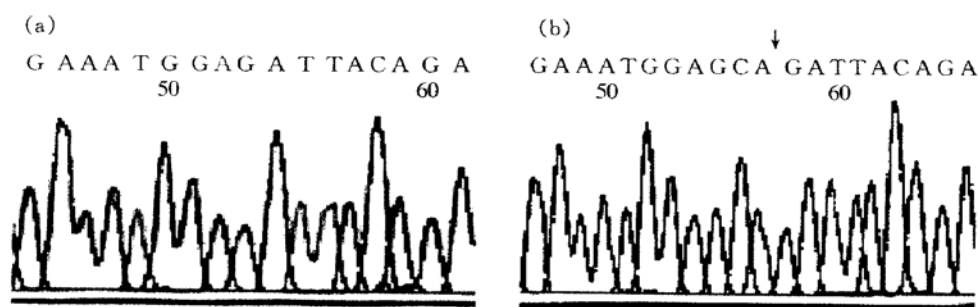


图6 NAG4基因在HeLa细胞株发生整码突变

→ 示在HeLa细胞中NAG4基因插入CAG (谷氨酰胺). (a) NAG4基因在正常组织中的测序; (b) NAG4基因在HeLa细胞系中的测序.

2.5 NAG4蛋白质结构与功能预测

使用蛋白质专家系统 (<http://www.expasy.ch>) 和 GCG (Genetic Computer Group, version 9.0) 软件分析, NAG4 基因编码 508 个氨基酸, 分子质量为 57.4 ku, 等电点为 5.12; ScanProsite 分析 NAG4 蛋白有一个糖基化位点、9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、16 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、一个 N-肉豆蔻酸化位点和一个酪氨酸激酶磷酸化位点; α 螺旋 (51.38%) 明显多于 β 折叠 (11.61%); eMotif 分析, 包含一溴区结合域 (bromodomain motif); 定位于胞核. Blastp 分析表明与已知小鼠溴区结合蛋白 BP75 84% 的同源.

3 讨 论

鼻咽癌是一种多基因遗传性疾病, 其发生不仅具有明显的地域性和家族集聚现象, 而且存在基因组不稳定的特性, 易受 EB 病毒、化学致癌物的攻击, 有遗传脆弱性^[2]. 细胞和分子遗传学研究发现, 鼻咽癌基因组存在高频率 3p13~26、9p21~22、7q31.3~33、11q13.3~24、13q14.3、13q32.34 和 14q 染色体的等位基因杂合性丢失; 在目前已发现的抑瘤基因中, p53 基因在鼻咽癌中突变率极低, 但 p53 蛋白有高水平的表达, 推测与 EB 病毒的瘤蛋白和/或细胞瘤蛋白有关^[3]; p16 基因在鼻咽癌中虽无点突变, 但存在表达的下调, 认为可能与 p16 基因的异常甲基化有关^[4]; RB、WAF1/CIP/P21、VHL 等抑瘤基因鼻咽癌基因组中均没有突变和表达下调^[5]; 最近, 我们实验室通过大规模全基因组扫描发现在 3p 和 9p 存在的恒定的染色体缺失. 这些结果强烈提示鼻咽癌的遗传不稳定性可能与鼻咽癌基因组存在遗传易感基因有关, 即鼻咽癌基因组可能存在尚未发现的易感/抑

瘤基因.

从鼻咽癌表达缺失方面克隆的 NAG4 基因, 编码 508 个氨基酸的蛋白质, 其包括多个磷酸化和糖基化等功能位点以及溴区结构域, Subprograns 预测 NAG4 蛋白定位于胞核, 可靠度 (reliability) 为 89. 溴区结构域是进化上相当保守的功能团, 主要存在于转录调节相关的蛋白质中^[6], 近来有资料显示溴区结构域能与 TATA 结合蛋白 (TATA-binding protein, TBP) 直接相互作用、参与核组蛋白的乙酰化^[7]和染色质组装^[8]; Dhalluin 等^[9]发现组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 相关共转录激活因子 P/CAF (P300/CBP-associated factor) 的溴区结构域三维结构是上下结构左手四螺旋丛 (left-handed up-and-down four-helix bundle), 并证明该区能特异地与乙酰化赖氨酸相互作用. 大量证据表明, 含溴区结构域蛋白质的缺失促使 HIS3 启动子的转录功能丧失, 并决定细胞生长与分化^[10]; 视网膜母细胞瘤蛋白 P300 通过溴区结构域抑制 E1A 癌蛋白和激活 SV40 增强子功能^[10], 从而维持正常的细胞生长发育; 通过染色体移位和蛋白融合使溴区结构域功能的丧失或缺失, 与乳头状甲状腺癌^[11]和白血病^[12,13]的发病潜在相关. 我们克隆 NAG4 基因在 37% 的鼻咽癌中表达缺失, 目前已发现在 HeLa 宫颈癌细胞株发生突变, 进一步说明 NAG4 基因代表良好的鼻咽癌抑瘤候选基因, 其功能正在深入研究中.

从我们采用 cDNA RDA 获得的在鼻咽癌中不表达或表达降低的已知基因来看, 一些基因具有抑瘤基因功能^[14], 例如 TRIP1 基因是 TGF β 的信号传导通路下游的一个重要因子, 当其发生功能障碍时必定导致 TGF β 抑制细胞表型转换能力丧失;

ezrin 基因与抑瘤基因 NF2 高度同源, 推测 NF2 基因信号传导是通过 ezrin 发挥抑瘤功能; TAF II 68 和组蛋白 H1⁰ 基因与 DNA 合成、基因调控和转录有关。以上表明, 鼻咽癌的发生可能涉及多个细胞分裂、分化和凋亡相关的传导通路的中断, 是多个基因协同作用的结果, 可以说是多基因或多通路平衡失调的基因网络学说在鼻咽癌这一多基因遗传性疾病个体事件的体现。

参 考 文 献

- 1 湛凤凰, 江 宁, 曹 利, 等. cDNA 代表性差异表达分析法分离鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 表达差异 cDNA 序列的初步研究. 中华医学遗传学杂志, 1998, **15** (6): 341~ 344
Zhan F H, Jiang N, Cao L, *et al.* Chin J Med Genet, 1998, **15** (6): 341~ 344
- 2 Li G Y, Yao K T, Ronald G. Sister chromatid exchange and nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer, 1989, **43** (4): 613~ 618
- 3 谢 奕, 姚开泰, 胡维新. 鼻咽癌、宫颈癌和肺癌 p53 基因突变与表达的对比. 中华医学病理杂志, 1997, **26**: 229~ 232
Xie Y, Yao K T, Hu W X. Chin J Pathology, 1997, **26**: 229~ 232
- 4 Lo K W, Cheung S T, Leung S F, *et al.* Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res, 1996, **56** (12): 2721~ 2725
- 5 Lo K W, Huang P W, Sin D, *et al.* Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. Chin Med J, 1997, **110** (7): 548~ 559
- 6 Jeannmougin F, Wurtz J M, Le Douarin B, *et al.* The bromodomain revisited. Trends Biochem Sci, 1997, **22** (5): 151~ 153
- 7 Sterner D E, Grant P A, Roberts S M, *et al.* Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. Mol Cell Biol, 1999, **19** (1): 86~ 98
- 8 Ito T, Levenstein M E, Fyodorov D V, *et al.* ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. Genes Dev, 1999, **13** (12): 1529~ 1539
- 9 Dhalluin C, Carlson J E, Zeng L, *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. Nature, 1999, **399** (6735): 491~ 496
- 10 Eckner R, Ewen M E, Newsome D, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. Genes Dev, 1994, **8** (8): 869~ 884
- 11 Klugbauer S, Rabes H M. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. Oncogene, 1999, **18** (30): 4388~ 4433
- 12 Koken M H, Saib A, de The H. A C4HC3 zinc finger motif. C R Acad Sci III, 1995, **318** (7): 733~ 739
- 13 Sobulo O M, Borrow J, Tomek R, *et al.* MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t (11; 16) (q23; p13. 3). Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (16): 8732~ 8737
- 14 湛凤凰, 曹 莉, 胡成平, 等. 鼻咽癌与已知基因同源的差异表达 cDNA 序列. 湖南医科大学报, 1999, **24** (2): 103~ 106
Zhan F H, Cao L, Hu C P, *et al.* Bull Hunan Med Univ, 1999, **24** (2): 103~ 106

Molecular Cloning and Functional Primary Study of a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene Related with Nasopharyngeal Carcinoma. YU Ying, XIE Yi, CAO Li, ZHANG Bi-Cheng, ZHOU Ming, ZHAN Feng-Huang, LI Gui-Yuan (Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract In order to further identify expressing difference of cDNA fragments isolated from cDNA representational difference analysis (cDNA RDA) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) biopsies and to clone those deregulated genes related with NPC, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify the differentially expressing of cDNA fragment, among which AF152605 was found to be down-regulated in sporadic NPC samples (74%). As it were shown by Northern blot, AF152605 is highly expressed in heart, brain, skeletal muscle and placenta whose transcription size is 2.1 kb. Combining bioinformatics, the gene (GenBank accession number AF179285) named as NAG4, was cloned by using library screening, which locates at 6p22~ 6p23.3. Comparative analysis shows that the NAG4 gene has at least two exons and a "TATAA BOX" sequence lies at upstream of the first exon. And the NAG4 gene encodes a protein proposed of 508 amino acid with predicted molecular mass of 57.4 ku, Blast homology searches reveal that NAG4 protein, containing a bromodomain and several important phosphorylation sites, takes on high similarity to musculus bromodomain-containing protein BP75. Moreover, condon mutation of NAG4 gene was found in HeLa cell line. So it is further demonstrated that NAG4 gene is a good candidate of putative tumor suppressor genes associated with NPC, whose down-expression may be involved in the development of NPC.

Key words nasopharyngeal neoplasms, gene expressing, tumor suppressor gene, cloning, bromodomain