

研究报告

NGAL 基因在永生化食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究*

许丽艳^{1)**} 李恩民²⁾ 熊华淇¹⁾ 蔡唯佳¹⁾ 沈忠英¹⁾⁽¹⁾ 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515031; ⁽²⁾ 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515031

摘要 为研究 NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) 基因在永生化食管上皮细胞恶性转化中的表达情况, 以永生化食管上皮细胞系 SHEE 和食管癌细胞系 SHEEC 互为对照, 用 cDNA 微阵列进行筛选, 用 RNA 印迹和 RT-PCR 进行鉴定, cDNA 克隆测序后与 GenBank 进行 BLAST 分析比较. 结果表明 NGAL 基因在 SHEEC 中出现显著差异过表达, 其 cDNA 序列与小鼠 24p3、大鼠 NRL (neur-related lipocalin)、人中性粒细胞 NGAL 和卵巢癌 NGAL 具有较高的相似性. 这提示 NGAL 基因在永生化食管上皮细胞恶性转化中可能发挥着重要作用, 可能是一种新的癌基因或促癌基因.

关键词 NGAL, cDNA 微阵列, 差异表达基因, 食管癌

学科分类号 Q781

我国是食管癌的高发地区, 其病因与发病机制至今不甚明了. 近年来人乳头瘤病毒 (HPV) 感染与食管癌发生发展之间的关系逐渐被人们所重视^[1]. 最近我们采用基因转染技术以腺病毒为载体将 HPV 18 型 E6E7 基因导入到正常胎儿食管上皮细胞中, 经筛选获得了永生化食管上皮细胞系——SHEE^[2], 在此基础上通过促癌物十二烷基萘豆蔻 (TPA) 诱导, 使 SHEE 发生了恶性转化, 从而又建立了食管癌细胞系——SHEEC^[3,4]. 很显然, 这不但对验证 HPV 感染可能是食管癌的致病因素之一是一个有力的证据, 同时也为我们在基因水平上研究食管上皮细胞恶性转化机制提供了一对很好的细胞模型. 在此基础上, 我们应用 cDNA 微阵列技术, 研究了 SHEE 和 SHEEC 之间的基因差异表达情况, 发现在 SHEE 和 SHEEC 之间绝大多数基因的表达水平是基本一致的, 而另有 60 余个基因出现了显著差异表达. 目前我们正在对这些显著差异表达基因进行克隆鉴定. 在所鉴定出来的基因中间, 有一个叫做 NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) 的基因在 SHEE 向 SHEEC 恶性转化中为显著异常过表达, 提示可能是一种新的癌基因或促癌基因. 对此本文报道如下.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

SHEE 和 SHEEC 在含 10% ~ 15% 小牛血清的

199 培养基 (Gibco 公司) 中贴壁生长, 待细胞长成单层后, 用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化细胞进行传代, 37℃ 下培养, 待细胞达一定数目 ($1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$) 后, 收获细胞, 备用.

1.2 cDNA 微阵列

采用中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所制备的 cDNA 微阵列^[5]. 先分别提取 SHEE 和 SHEEC 的 polyA⁺ RNA (QIAGEN kit); 然后分别取 2 μg polyA⁺ RNA, 在 ³³P-dATP 存在下反转录, 制备出单链 cDNA 探针; 两探针分别与携有 14 000 个基因的尼龙膜进行预杂交、杂交、压屏; 最后采用 FIJIFILM 公司的 RLA-3000 信号记录仪进行扫描分析.

1.3 RNA 印迹分析

分别提取 SHEE 和 SHEEC 的总 RNA (Trizol reagent, Gibco 公司), 在甲醛变性凝胶下电泳, 转膜; 以 NGAL PCR 产物 (NGAL 质粒来源于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所 cDNA 微阵列库) 为探针 (Alkphos direct labelling kit, Pharmacia 公司) 进行杂交, CDP-star 检测 (Pharmacia 公司), X-film 压片, 显影, 定影, 图象扫描分析.

1.4 RT-PCR

分别取 10 μg SHEE 和 SHEEC 的总 RNA 按常

* 国家自然科学基金青年基金项目 (39900069).

** 通讯联系人.

Tel: 0754-8900464, E-mail: nmli@21cn.com

收稿日期: 2001-01-20, 接受日期: 2001-02-23

规进行反转录 (MBI 反转录 kit), 然后参考文献 [6] 报道的 NGAL cDNA 序列合成引物. 引物 1: 5' GTGGATCCTTCCTCGGCCCTGAAATCATG 3'; 引物 2: 5' GGGAATTCTCAGCCGTCGATACACTGGTC 3'. 进行 PCR, 扩增产物包括了整个编码区. PCR 反应条件: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s, 68 °C, 3 min, 30 个循环; 68 °C 3 min. 最后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 照相. 以 GAPDH 作对照 (MBI 反转录 kit 提供).

1.5 PCR 产物的克隆、测序和同源性分析

将上述 RT-PCR 产物直接克隆到 pT-Adv 载体中 (AdvanTageTM PCR cloning kit, CLONTECH), 挑取白色菌落, 小量制备质粒 (QIAGEN kit), *Eco*RI 酶切鉴定, 取含有重组子的质粒, 进行测序 (上海基康公司). 利用 NCBI 公共数据库进行 BLAST 分析.

2 结 果

2.1 NGAL 基因在 SHEE 和 SHEEC 中的差异表达情况

采用 cDNA 微列阵技术研究发现, 在两种受试细胞中, NGAL 表达的光密度值, SHEEC 为 $67.44 \pm 6.95 \times 10^{-9}$, SHEE 为 $19.10 \pm 3.09 \times 10^{-7}$; 两者比值为 3.53. 表明 NGAL 在 SHEEC 中的表达水平显著高于在 SHEE 中的表达水平 (图 1). 而通过 RNA 印迹以及 RT-PCR 验证的结果是, 与 SHEE

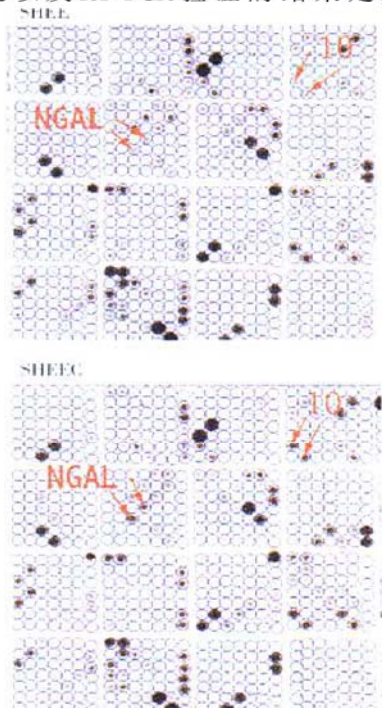


Fig. 1 The scanning of differentially expressed genes in the SHEE and SHEEC cell lines using cDNA microarray

比较, NGAL 基因在 SHEEC 中确实出现了显著过表达 (图 2 和图 3).

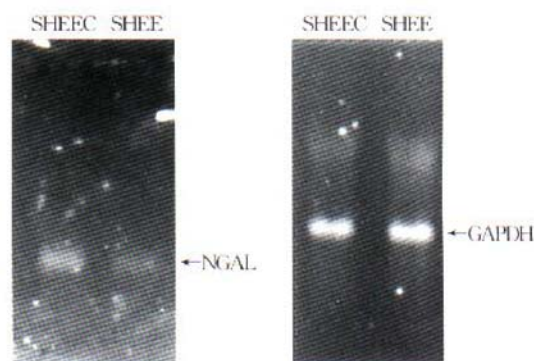


Fig. 2 Identification of differentially expressed NGAL mRNA in the SHEE and SHEEC cell lines by RNA blot

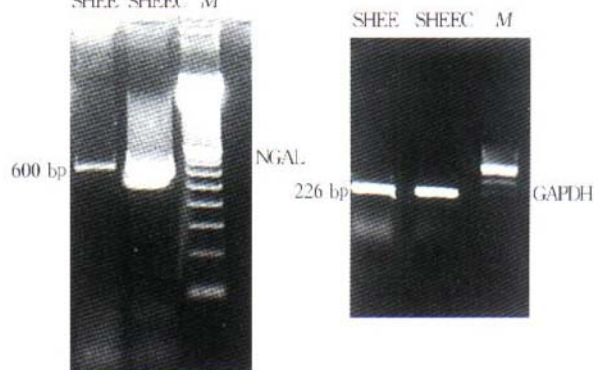


Fig. 3 Analysis of differentially expressed NGAL mRNA in the SHEE and SHEEC cell lines by RT-PCR
M: molecular mass maker.

2.2 NGAL cDNA 编码区的克隆与鉴定

将从 SHEEC cDNA 中扩增出来的 NGAL PCR 产物直接插入 pT-Adv 载体中, *Eco*RI 酶切鉴定结果见图 4. *Eco*RI 酶切后可见到 600 bp 左右的条带. 然后分别以 M13 和 T7 为测序引物进行双向测序, 拼接后与 GenBank 进行 BLAST 分析. 结果见图 5 和图 6. 从中可见, 来源于 SHEEC 中的 NGAL 片段包括了它的全编码区. 对其氨基酸序列

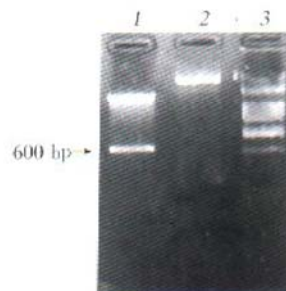


Fig. 4 *Eco*RI identification of a cDNA encoding NGAL in the pT-Adv/NGAL plasmid

1: pT-Adv/NGAL/ *Eco*RI; 2: pT-Adv/NGAL plasmid; 3: λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III.

进行 BLAST 分析表明, 它具有 lipocalin 家族的三个特征性结构域, 属于核心 lipocalin (Kernel lipocalin). 另外, 上述 NGAL 氨基酸序列与人类中性粒细胞 NGAL 和卵巢癌 HNL (human

neutrophil lipocalin from ovarian cancer cell line OC6) 的相似性皆是 99%; 与大鼠 NRL (neur related lipocalin, NRL) 的相似性为 63%; 与小鼠 24p3 的相似性为 61%.

```

1 - CTCCTCGGCCCTGAAATCATGCCCTAGGTCTCTGCTGGCTGGGCCTAGCCCTGTTGGG - 60
   - M P L G L L W L G L A L L G
61 - GGCTCTGCATGCCAGGCCAGGACTCCACCTCAGACCTGATCCCAGCCCCACCTCTGAG - 120
   - A L H A Q A Q D S T S D L I P A P P L S
121 - CAAGGTCCCTCTGCAGCAGAACTTCCAGGACAACCAATTCCAGGGGAAGTGGTATCTGGT - 180
   - K V P L Q Q N F Q D N Q F Q G K W Y V V
181 - AGGCCTGGCAGGAATGCAATTCTCAGAGAAGACAAAGACCCGAAAAGATGTATGCCAC - 240
   - G L A G N A I L R E D K D P Q K M Y A T
241 - CGTCTATGAGCTGAAAGAAGACAAGAGCTACAATGTCACCTCCGTCTCTTTAGGAAAAA - 300
   - V Y E L K E D K S Y N V T S V L F R K K
301 - GAAGTGTGACTACTGGATCAGGACTTTTGTTCAGGTTGCCAGCCCGCGGAGTTACAGCT - 360
   - K C D Y W I R T F V P G C Q P G E F T L
361 - GGGCAACATTAAGAGTTACCCTGGATTAACGAGTTACCTCGTCCGAGTGGTGAGCACCAG - 420
   - G N I K S Y P G L T S Y L V R V V S T N
421 - CTACAACAGCATGCTATGGTGTCTCTCAAGAAAGTTTCTCAAAACAGGGAGTACTTCAA - 480
   - Y N Q H A M V F F K K V S Q N R E Y F K
481 - GATCACCTCTACGGGAGAACCAAGGAGCTGACTTCGGAATAAAGGAGAACTTCATCCG - 540
   - I T L Y G R T K E L T S E L K E N F I R
541 - CTCTCCAAATCTCTGGGCCTCCCTGAAAACCATCGTCTTCCCTGTCCCAATCGACCA - 600
   - F S K S L G L P E N H I V F P V P I D Q
601 - GTGTATCGACGGCTGA - 616
   - C I D G *

```

Fig 5 Nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA encoding NGAL in SHEEC

		MOTIF 1			
NGAL (EC)	MPLGLLWLGLALLGALHAQAQDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQ	FQGK	WYVVGLA	GN	
NGAL (NP)	MPLGLLWLGLALLGALHAQAQDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQ	FQGK	WYVVGLA	GN	
HNL	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQ	FQGK	WYVVGLA	GN	
NRL	MGLGVLCIALVLLGVLQSQAQDSTQNLIPAPPLISVPLQPGFWTER	FQGR	WFVVGLA	GN	
24p3	MALSVMLGLLGLVLSQAQDSTQNLIPAPSLLTVPPLQPDFRSDQ	FRGR	WYVVGLA	GN	
NGAL (EC)	AILREDKDPQKMYATVYELKEDKSYNVTSVLFRKKK -- CDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIKSY				
NGAL (NP)	AILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKK -- CDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIKSY				
HNL	AILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKK -- CDYWIRTFVPGCQPGFTLGNIKSY				
NRL	AVQKERQSRFTMYSTIYELQEDNSYNVTSLVRGQG -- CRYWIRTFVPSSRPGQFTLGNIHSY				
24p3	AVQKKTEGSFTMYSTIYELQENNSYNVTSLVRDQDQG CRYWIRTFVPSSRAGQFTLGNMHRY				
		MOTIF 2		MOTIF 3	
NGAL (EC)	PGLTSYL	VRVSTNYNQHAMVF	FKKVSQNREYFKIT	LYGR	TKELTSELKEN
NGAL (NP)	PGLTSYL	VRVSTNYNQHAMVF	FKKVSQNREYFKIT	LYGR	TKELTSELKEN
HNL	PGLTSYL	VRVSTNYNQHAMVF	FKKVSQNREYFKIT	LYGR	TKELTSELKEN
NRL	PQIQSYD	VQVADTDYDQFAMVF	FQKTSSENKQYFKVT	LYGR	TKGLSDELKER
24p3	PQVQSYN	VQVATTDYNQFAMVF	FRKTSSENKQYFKIT	LYGR	TKELSPERKER
NGAL (EC)	NHIVFPVPIDQCIDG				
NGAL (NP)	NHIVFPVPIDQCIDG				
HNL	NHIVFPVPIDQCIDG				
NRL	NNIVFSVPTDQCIDN				
24p3	DNIIFSVPDQCIDN				

Fig 6 Alignment of the deduced amino acid sequence of NGAL from SHEEC with some members of the lipocalin family

NGAL (EC): NGAL from SHEEC; NGAL (NP): neutrophil gelatinase-associated lipocalin; HNL: human neutrophil lipocalin from ovarian cancer cell line OC6; NRL: rat neur related lipocalin; 24p3: mouse SV-40 induced 24p3. Three motifs of lipocalin family are shown in box^[7].

3 讨 论

本文用 cDNA 微列阵、RNA 印迹和 RT-PCR 等技术研究证明在 TPA 诱导永生食管上皮细胞的恶性转化过程中存在着 NGAL 基因的显著异常过表达。在此基础上, 克隆并鉴定了 SHEEC 中 NGAL 的编码区 DNA。氨基酸同源性分析表明, 来源于 SHEEC 中的 NGAL 与来源于人类其他细胞, 如中性粒细胞以及卵巢癌细胞中的 NGAL 几乎完全一致 (99%), 而与小鼠的 24p3 和大鼠的 NRL 的相似性也较高 (60% 以上)。以往的研究表明, 无论是小鼠的 24p3、大鼠的 NRL 还是人类的 NGAL, 它们同属于 lipocalin 家族。这个家族的共同特征是各成员都具有由一条多肽链构成的 β 折叠桶 (β -barrel) 状结构, 有三个特征性保守结构域, 可运输疏水性小分子^[8]。小鼠 24p3 是癌基因作用的产物。当猴病毒 40 (SV40)、多瘤病毒或其他肿瘤病毒感染小鼠肾细胞时, 可刺激 24p3 mRNA 的表达增加 7~10 倍, 且随着大 T 抗原的合成增加而升高。而一些促癌物质如佛波醇酯等也可诱导 24p3 表达增高, 这提示 24p3 可能是一种新的癌基因或促癌基因^[9]。NRL 是 HER/ neu 癌基因诱导的大鼠乳腺癌唯一过表达的基因, 比正常升高 12 倍, 可能在 neu 基因信号通路的下游发挥作用, 与乳腺癌快速生长和浸润密切相关^[10]。在人类, NGAL 首先是在中性粒细胞中发现的, 认为它除具有运输疏水性小分子的功能外, 还介导炎症反应, 调节基质金属蛋白酶 (MMPs) 活性等功能^[7, 11, 12]。最近有些人在研究乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌等肿瘤细胞系的基因表达时发现了 NGAL, 但他们并没有进一步阐明 NGAL 在其中究竟发挥着何种作用^[6, 13, 14]。HPV18 型 E6E7 基因是病毒癌基因, 在我们所建立的 SHEE 中, 这些基因已经存在, 但它并未使细胞癌变, 细胞只是停顿于永生化阶段。在此基础上, 加促癌物 TPA 诱导, SHEE 恶性转化为 SHEEC, 而与此同时对应性出现 NGAL 的显著异常过表达。很显然, 本文所揭示出来的上述实验事实对充分认识 NGAL 在肿瘤发生发展中的作用本质是有帮助的。虽然就此尚不能确认, 但 NGAL 基因是人类一种新的癌基因或促癌基因的可能性是很大的。当它被激活后, 可能会直接或间接地影响

其下游的一些相关基因的活性发生变化而引起一系列连锁反应, 最终造成细胞的恶变。但这些尚需进一步深入研究才能确认。

参 考 文 献

- 1 Sur M, Cooper K. The role of the human papilloma virus in esophageal cancer. *Pathology*, 1998, **30** (4): 348~354
- 2 沈忠英, 岑 山, 蔡唯佳, 等. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导人胚食管上皮永生化. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, **13** (2): 121~124
Shen Z Y, Cen S, Cai W J, *et al.* *Chin J Exp Clin Virol*, 1999, **13** (2): 121~124
- 3 沈忠英, 蔡唯佳, 沈 健, 等. 人乳头状瘤病毒 18E6E7 和 TPA 协同诱导人胚食管上皮细胞恶性转化的研究. *病毒学报*, 1999, **15** (1): 1~6
Shen Z Y, Cai W J, Shen J, *et al.* *Chin J Virol*, 1999, **15** (1): 1~6
- 4 Shen Z Y, Cen S, Shen J, *et al.* Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18 E6E7. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126** (10): 589~594
- 5 胡庚熙. 检查基因表达分析的生物技术——cDNA 阵列开发成功. *中国科学院院刊*, 2000, **15** (3): 197~198
Hu G X. *Bulletin of the Chinese Academy of Science*, 2000, **15** (3): 197~198
- 6 Stoesz S P, Friedl A, Haag J D, *et al.* Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer*, 1998, **79** (6): 565~572
- 7 Bundgaard J R, Sengelov H, Borregaard N, *et al.* Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202** (3): 1468~1475
- 8 Coles M, Diercks T, Muehlenweg B, *et al.* The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Mol Biol*, 1999, **289** (1): 139~157
- 9 Hrab R S, Turler H, Kress H, *et al.* SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene*, 1989, **4** (5): 601~608
- 10 Stoesz S P, Gould M N. Overexpression of neur-related lipocalin (NRL) in neur-initiated but not ras or chemically initiated rat mammary carcinomas. *Oncogene*, 1995, **11** (11): 2233~2243
- 11 Cowland J B, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*, 1997, **45** (1): 17~23
- 12 Kolkenbrock H, Hecker-Kia A, Orgel D, *et al.* Progelatinase B forms from human neutrophils. Complex formation of monomer/lipocalin with TIMP-1. *J Biol Chem*, 1996, **377** (7-8): 529~533
- 13 Bartsch S, Tsthesche H. Cloning and expression of human neutrophil lipocalin cDNA derived from bone marrow and ovarian cancer cell. *FEBS Lett*, 1995, **357** (3): 255~259
- 14 Furutani M, Arii S, Mizumoto M, *et al.* Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancer using a modified signal sequence trap method. *Cancer Lett*, 1998, **122** (1-2): 209~214

Study of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) Gene Overexpression in the Progress of Malignant Transformation of Human Immortalized Esophageal Epithelial Cell*

XU Li-Yan^{1)**}, LI Er-Min²⁾, XIONG Hua-Qi¹⁾, CAI Wei-Jia¹⁾, SHEN Zhong-Ying¹⁾

¹⁾ Institute of Oncologic Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China)

Abstract In order to study the neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) gene expression character in the progress of malignant transformation of human immortalized esophageal epithelial cell, differentially expressed NGAL gene was identified by using cDNA microarray in the human immortalized esophageal epithelial cell line (SHEE) and malignant transformed esophageal cancer cell line (SHEEC). NGAL expression profile was further confirmed by Northern blot and RT-PCR. A cDNA encoding NGAL from SHEEC was amplified by PCR and sequenced. Alignment was analyzed by NCBI database. The results indicated that NGAL gene was overexpressed in the SHEEC. The coding region cDNA of NGAL from SHEEC was cloned and identified. Alignment of its deduced amino acid sequence compared to the mouse 24p3 protein, the rat neutrophil-related lipocalin (NRL), the human NGAL from neutrophil and ovarian cancer demonstrated a very high degree of conservation. It can be concluded that NGAL overexpression possibly played an important role in the progress of malignant transformation of human immortalized esophageal epithelial cell. NGAL may be a new oncogene or promoter-tumor gene.

Key words neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL), cDNA microarray, differentially expressed gene, esophageal cancer

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (39900069).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900464, E-mail: nmli@21cn.com

Received: January 20, 2001 Accepted: February 23, 2001