

一种新的抑癌候选基因 ——NDR2 在人类正常组织及相应肿瘤中的表达*

李 剑 刘新平 林树新¹⁾ 邓艳春 孟庆军 张文红 李树钧 聂晓燕 药立波**

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032;

¹⁾第四军医大学基础部病理生理学教研室, 西安 710032)

摘要 为观察 NDR2 基因在人类正常组织及相应肿瘤组织中的表达分布特点, 收集人脑与胶质瘤、肺与肺癌、胃与胃癌、结肠与结肠癌组织标本, 分别进行组织石蜡切片和总 RNA 提取, 应用免疫组化方法和 RT-PCR 技术检测 NDR2 蛋白质及 mRNA 表达水平, 并通过 DNA 测序验证 PCR 产物的正确性。免疫组化结果表明, 在上述各组织均有 NDR2 蛋白不同程度的表达。RT-PCR 结果显示, 在人脑和胶质瘤组织、肺与肺癌组织、胃与胃癌组织、结肠与结肠癌组织中均有 NDR2 mRNA 表达, 其表达水平以脑组织为最高。NDR2 mRNA 在正常脑和肺组织的表达水平分别显著高于胶质瘤与肺癌组织, 而结肠与结肠癌组织, 胃与胃癌组织 NDR2 mRNA 表达水平则无显著差别。以上结果表明, NDR2 基因可能广泛表达于人体正常组织内, 而在胶质瘤与肺癌中的表达较相应正常组织减低, 提示该基因可能与神经系统及呼吸系统肿瘤的发生发展有关, 为进一步探讨该基因功能提供了线索。

关键词 NDR2, 肿瘤, 免疫组织化学, mRNA 表达, RT-PCR

学科分类号 Q73

NDR 家族基因是新近发现的一组基因。因为最初发现 NDR 基因时, 观察到在 N-myc 基因敲除的小鼠胚胎内, 其表达发生明显上调, 故命名为 N-myc downstream regulated gene, 意即位于 N-myc 下游并受其调节的基因^[1]。人 NDR2 基因是本室用锚定引物从正常人脑组织克隆到一个新基因, 于 2000 年 1 月被 GenBank 收录, 名称为 syld, 登录号为 AF159092^[2]。本室发现的 syld 基因, 经生物信息学分析及 GenBank 确认, 属于 NDR 家族 2 型基因, 这也是首次在人体内发现 NDR2 基因^[3], 目前关于其功能尚不十分清楚。初步研究显示, NDR2 基因为正常脑组织和胶质瘤组织的差异表达基因。因此我们认为该基因可能和肿瘤的发生有关系, 把它列为抑癌候选基因。为进一步确定该基因表达产物的组织分布, 尤其是在各种正常组织及相应肿瘤中表达的差异, 本实验对 NDR2 蛋白的组织分布及 NDR2 mRNA 的表达水平进行初步检测, 旨在发现该基因表达产物的组织分布特点。

1 材料和方法

1.1 标本取材

脑与胶质瘤、肺与肺癌、胃与胃癌、结肠与结肠癌标本由第四军医大学西京医院和唐都医院提供。在病人手术中分别取癌变组织及癌旁正常组织, 部分于液氮中速冻 10 min 后置于 -70℃ 冰箱保存, 用于总 RNA 提取; 部分经 4% 多聚甲醛固

定, 用于常规石蜡包埋切片。

1.2 免疫组化法检测 NDR2 蛋白表达

对上述正常及相应肿瘤组织进行常规石蜡切片 (6 μm), 采用 SABC kit (Boster 公司) 进行免疫组化染色, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色。所用 NDR2 抗体为本室张文红硕士制备, 以胞浆或胞核中出现棕黄色免疫反应颗粒为阳性, 以 PBS 代替一抗为空白对照。

1.3 RT-PCR 检测 NDR2 mRNA 表达水平

应用 Gibco BRL 公司的 TRIzol Reagent 试剂盒进行组织总 RNA 提取^[2], 每 100 mg 组织加入预冷的 1 ml TRIzol 提取液, 在玻璃匀浆器中充分匀浆, 其余步骤严格按 TRIzol Reagent 说明书进行。所得 RNA 经 DNaseI (Sigma 公司) 消化后, 溶解于 DEPC (Sigma 公司) 处理水中。用 Promega 公司的逆转录试剂盒合成 cDNA, 以 G3PDH 基因表达为内对照进行半定量的 RT-PCR 反应。NDR2 引物由本室邓艳春博士惠赠, 产物片段为 1 200 bp。G3PDH 正向引物为 5' gcctcaagatcatcagcaat3', 反向引物为 5' aggtccaccactgacacgtt3', 产物片段为 307 bp (赛百盛公司合成)。NDR2 循环参数: 94℃ 5 s, 72℃

* 国家自然科学基金项目 (39870718) 和国家杰出青年科学基金 (39825113) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 029-3374513, E-mail: bioyao@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2001-08-24, 接受日期: 2001-10-18

4 min (5 个循环); 94 °C 5 s, 70 °C 4 min (5 个循环); 94 °C 5 s, 68 °C 4 min (25 个循环). G3PDH 循环参数: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min (35 个循环). 10 μ l PCR 反应液在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离, EB 染色后照相, Kodak Digital Science 1D 软件系统扫描. 以 NDR2 mRNA 扩增带的平均光密度对 G3PDH mRNA 扩增带平均光密度的比值代表细胞中 NDR2 mRNA 的表达水平 (即 mRNA 丰度).

1.4 PCR 产物测序

回收琼脂糖中的 PCR 产物片段 (PCR 产物胶回收试剂盒为上海华舜公司产品), 连接于

pMD18-T 载体, 转化 JM109 感受态细胞. 铺板, 经蓝白和氨苄双筛选, 挑取白色菌落扩大培养 (pMD18-T 载体及 JM109 感受态细胞为 TaKaRa 公司产品). 提取质粒 DNA, 酶切鉴定, 最后经双脱氧链终止法进行 DNA 序列测定^[3].

1.5 统计处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student *t* 检验作统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差别显著的界限.

2 结 果

2.1 NDR2 蛋白的免疫组化检测

在胶质瘤、肺与肺癌、结肠与结肠癌和胃与胃

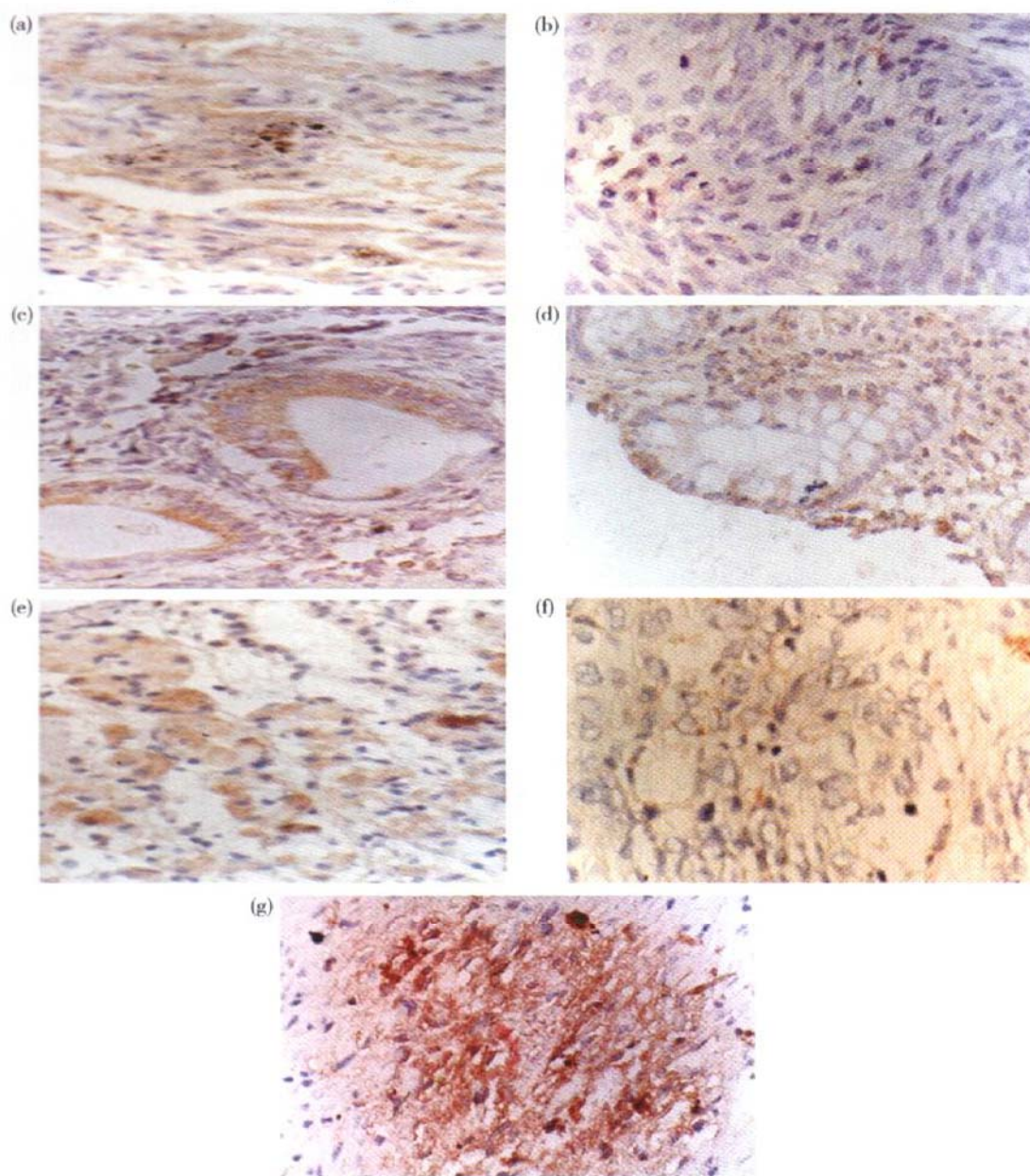


Fig. 1 The expression of NDR2 gene in different tissues

(a) lung; (b) lung cancer; (c) colon; (d) colon carcinoma; (e) stomach; (f) carcinoma of stomach; (g) glioma. ($\times 400$).

癌组织细胞的胞浆内均可见棕黄色阳性免疫反应颗粒 (因取材困难未做正常脑组织的免疫组织化学). 而且 NDR2 蛋白在正常组织中的表达强于相应的肿瘤组织 (图 1).

2.2 半定量 RT-PCR 测定 NDR2 mRNA 表达水平

2.2.1 NDR2 mRNA 基因在脑和胶质瘤组织中的表达: NDR2 基因在脑和胶质瘤组织中均有表达, 其在脑中的表达明显高于胶质瘤组织 (图 2). 经内参照归一化处理后发现, 其在胶质瘤中的表达水平仅为脑组织的 55.7% ($P < 0.05$, 脑 $n = 3$, 胶质瘤 $n = 6$).

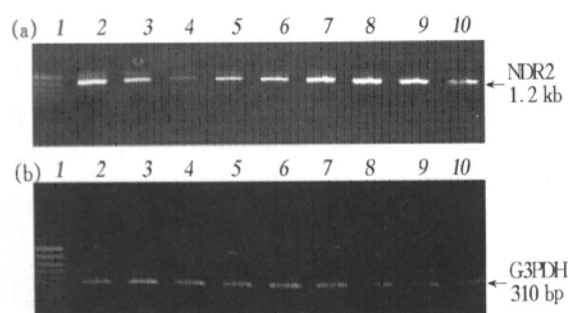


Fig. 2 RT-PCR analysis of NDR2 (a) and G3PDH (b) mRNA in human brain and glioma tissues

1: marker; 2~7: glioma; 8~10: human brain.

2.2.2 NDR2 基因在肺与肺癌组织中的表达: NDR2 基因在在肺与肺癌组织中均有表达, 而 NDR2 在肺癌中的表达水平远低于肺组织 ($P < 0.05$, $n = 3$), 仅为后者的 43.5% (图 3).

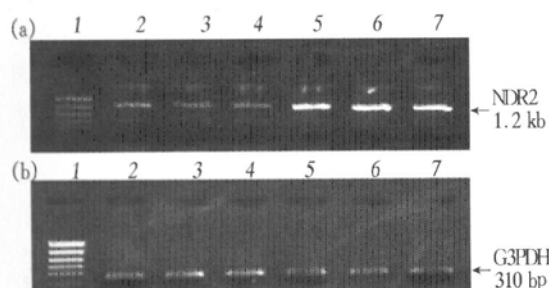


Fig. 3 RT-PCR analysis of NDR2 (a) and GAPDH (b) mRNA in human lung and lung cancer tissues

1: marker; 2~4: lung cancer; 5~7: human lung.

2.2.3 NDR2 基因在结肠与结肠癌组织中的表达: NDR2 基因在结肠与结肠癌组织中均有表达, 其表达水平在两者之间无明显差异 (图 4) ($P > 0.05$, $n = 4$).

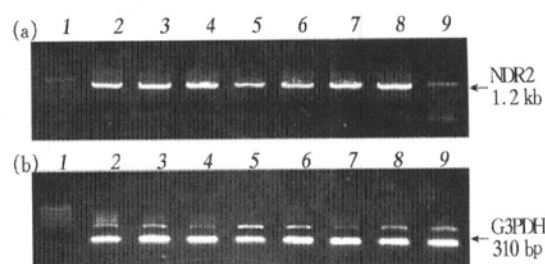


Fig. 4 RT-PCR analysis of NDR2 (a) and GAPDH (b) mRNA in human colon and carcinoma of colon

1: marker; 2~5: carcinoma of colon; 6~9: human colon.

2.2.4 NDR2 基因在胃与胃癌组织中的表达: NDR2 基因在在胃与胃癌组织中均有表达, 其表达水平在两者之间无明显差异 (图 5) ($P > 0.05$, $n = 9$).

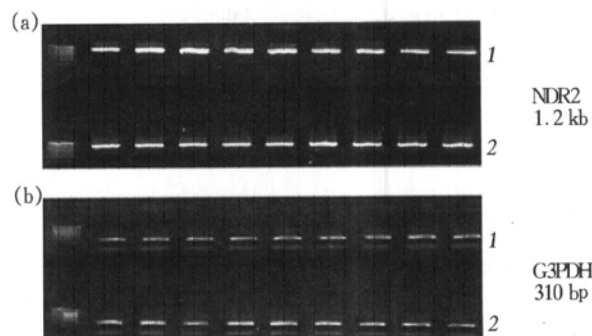


Fig. 5 RT-PCR analysis of NDR2 (a) and GAPDH (b) mRNA in human stomach and carcinoma of stomach

1: carcinoma of stomach; 2: human stomach.

2.2.5 NDR2 基因在 4 种正常组织及相应肿瘤中表达水平的比较 (图 6): 人脑与胶质瘤、肺与肺癌、胃与

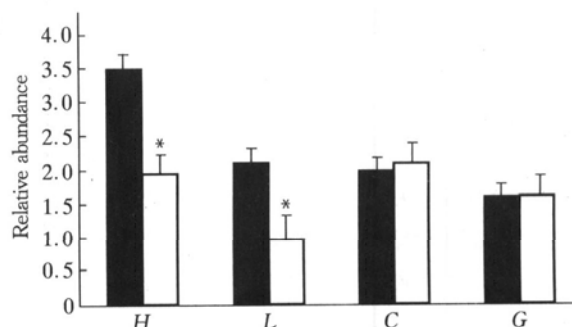


Fig. 6 Amounts of NDR2 as a ratio to GAPDH mRNA in different kinds of tissue

* $P < 0.05$. H: brain and glioma; L: lung and lung cancer; C: colon and carcinoma of colon; G: stomach and carcinoma of stomach.

■: normal; □: cancer.

- 1 Millward T A, Hess D, Hemmings B A. NDR protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs. *J Biol Chem.* 1999, **274** (48): 33847~ 33850
- 2 邓艳春, 药立波, 刘新平, 等. 一种含有 ACP 样结构域新基因的发现. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (1): 72~ 76
Deng Y C, Yao L B, Liu X P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (1): 72~ 76
- 3 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (6): 3389~ 3402
- 4 Agarwala K L, Kokame K, Kato H, *et al.* Phosphorylation of RTP, an ER stress responsive cytoplasmic protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **272**: 641~ 647
- 5 Salsnikow K, Blagosklonny M V, Ryan H, *et al.* Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res*.

- 2000, **60** (1): 38~ 41
- 6 Guan R J, Ford H L, Fu Y, *et al.* Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Res*, 2000, **60** (3): 749~ 755
- 7 van Belzen N, Dinjens W N, Diesveld M P, *et al.* A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest*, 1997, **77**: 85 ~ 92
- 8 Okuda T, Kondoh H. Identification of new genes ndr2 and ndr3 which are related to Ndr1/RTP/Drg1 but show distinct tissue specificity and response to N-myc. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266** (1): 208~ 215
- 9 Zhou R H, Kokame K, Tsukamoto Y, *et al.* Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. *Genomics*, 2001, **73** (1): 86~ 97

Expression Pattern of NDR2 Gene, A Candidate Tumor-suppressor, in Different Human Tissues and Tumors*

LI Jian, LIU Xin-Ping, LIN Shu-Xin¹⁾, DENG Yan-Chun, MENG Qing-Jun,
ZHANG Wen-Hong, LI Shu-Jun, NIE Xiao-Yan, YAO Li-Bo**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an 710032, China;

¹⁾ Department of Pathophysiology, Fourth Military Medical University Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract In order to further probe the function of NDR2 gene, the expression of NDR2 gene was determined in different human tissues and their relevant tumors. Tissues of human brain and glioma, lung and lung cancer, colon and carcinoma of colon, stomach and carcinoma of stomach were collected for total RNA extraction and paraffin-embedment. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to examine the expression of NDR2 both in mRNA and protein level. DNA sequencing was performed to confirm the result of RT-PCR. Immunohistochemistry results showed that NDR2 protein was extensively expressed in the tissues. RT-PCR further showed an extensive expression of NDR2 mRNA, with a higher expression level in normal brain and lung tissue than glioma and lung cancer respectively, while no differences were observed between colon and carcinoma of colon, stomach and carcinoma of stomach. These results suggest a possible involvement of NDR2 in the genesis and progression of glioma and lung cancer, which provide a clue for further studies on NDR2.

Key words NDR2, tumors, immunohistochemistry, mRNA expression, RT-PCR

* This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (39870718) and the Youth Fund of National Science Foundation of China (39825113).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374513, E-mail: bioyao@fmmu.edu.cn

Received: August 24, 2001 Accepted: October 18, 2001