

cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因对鼻咽癌细胞基因表达谱的影响*

谭琛 李江 彭聪 张秋红 唐珂 李小玲 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 运用 cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因重表达对 HNE1 细胞基因表达谱的影响。抽提 HNE1 细胞和 pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1 细胞总 RNA, 分离 polyA mRNA, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 并在逆转录过程中用 ^{33}P -dATP 进行标记, 与含有 16 150 个基因和表达序列标签 (EST) 的 cDNA 表达阵列膜杂交, 获得基因表达图谱。Array Gauge 软件分析 NAG7 基因的重表达所导致的鼻咽癌细胞 HNE1 基因表达谱改变, 并用 RNA 印迹对微阵列杂交结果进行验证。结果分析表明, 2 倍以上的差异表达基因或 EST 179 个, 其中表达上调的 91 个, 表达下调的 88 个; 已明确基因表达产物的上调基因 29 个, 下调基因 37 个。在差异表达基因中, 涉及基因转录调控、信号转导、细胞生长、细胞代谢和细胞凋亡等基因。RNA 印迹证实生长阻滞特异蛋白 1 (gas 1) 基因表达上调。特别值得关注的是, 先前的蛋白质组研究结果亦发现 NAG7 基因可导致生长阻滞特异蛋白 1 表达上调, 说明 gas 1 基因在 NAG7 重表达的 HNE1 细胞中具有重要作用, 这为深入研究 NAG7 基因的作用环节和机理提供了重要的线索。

关键词 cDNA 微阵列, 基因表达, NAG7 基因, gas1 基因, 鼻咽癌

学科分类号 R739

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 的细胞和分子遗传学研究表明 NPC 是一个多基因遗传病, 遗传易感因素如: 3p、9p、7q、11q、13q 和 14q 染色体杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 与 NPC 发生关系十分密切^[1]。但在目前已发现的抑瘤基因中, 如: p53、p16、RB、WAF1/p21、VHL 等抑瘤基因在 NPC 的发生发展中作用不大^[2,3], 因此, 在鼻咽癌基因组中可能存在尚未发现的易感/抑瘤基因。我室通过文库筛选结合生物信息学方法, 从 3p25.3~26.3 最小共同缺失区成功地克隆了与 NPC 相关的肿瘤抑制候选基因 NAG7^[4], GenBank 登录号为 AF086709。为了全面评价 NAG7 基因在 NPC 发生中的作用, 我们通过构建 NAG7 基因真核表达重组体, 脂质体介导转染入 HNE1 细胞, 采用 cDNA 微阵列 (cDNA microarray) 技术分析 NAG7 基因对 NPC 细胞基因表达谱的影响, 进而从整体水平揭示 NAG7 基因在 NPC 发生中的作用环节。

cDNA 微阵列或芯片 (chip) 技术是近年发展起来的分析基因表达谱的新方法, 可以检测组织细胞全部基因的表达, 以便从整体上分析基因表达谱的改变^[5]。当前, cDNA 微阵列已普遍应用于各种肿瘤的研究, 包括利于诊断和治疗反应预测的基因

表达谱分析、预后的基因表达相关模式、与肿瘤发生表型或药物耐受相关的基因和基因产物的识别、以及通过细胞系分析基因表达与化学治疗反应的相关分析, 同时也是分析肿瘤耐受药物的有力工具^[6]。因此, 高通量的 cDNA 阵列方法分析基因表达谱为肿瘤相关基因的筛查、肿瘤发生机制的探讨以及潜在的分子诊断和治疗提供了快速而丰富的信息资源。运用 cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因的功能, 这不仅可获得大量的信息资源, 同时也是将单基因的功能研究与整体作用机制有机地结合, 因而更有利于阐明 NAG7 基因在 NPC 发生发展中的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和表达载体: 鼻咽癌细胞系 HNE1 为本研究所 1992 年建株^[7], NAG7 基因稳定转染 HNE1 细胞系, 即 pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1,

* 国家“十五”高技术 863 计划 (2001AA221031) 和国家自然科学基金资助项目 (39800142, 30100105)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805446, E-mail: lgy@xymu.net

收稿日期: 2002-06-25, 接受日期: 2002-08-06

为我室建立^[8]. 细胞用含 15% 小牛血清的 1640 培养基, 5% CO₂、37℃ 条件下培养. pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司 (Madison, MI, USA), pcDNA3.1 (+) 载体购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA).

1.1.2 主要试剂: Trizol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), cDNA 微阵列膜由上海科瑞公司制备, Hybond-N 尼龙膜 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), 同位素 [α -³²P] dCTP、[α -³³P] dATP 购自北京亚辉公司, mRNA 分离试剂盒购自 QIAGEN 公司 (Valencia, CA, USA), RT 试剂盒及标记试剂盒均购自 Promega 公司 (Madison, MI, USA), 其他常用化学药品、RPMI 1640 等购自华美生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离: 按 TrizolTM 试剂盒操作程序提取 HNE1 细胞和 NAG7 基因稳定转染 HNE1 细胞的总 RNA. 用于 cDNA 微阵列的总 RNA, 按 QIAGEN 公司的 mRNA MidiKit 操作程序进一步分离 mRNA.

1.2.2 mRNA 的逆转录与探针标记: 将 8 μ l mRNA (1 μ g) 转移至 0.5 ml 离心管中, 加入随机引物 3 μ l, 无 RNase 水定容到 20 μ l, 70℃ 水浴 3 min, 然后冰上骤冷, 依次加入 5 $\times$ 缓冲液 10 μ l, RNase 抑制剂 1 μ l, dNTP (A⁻) 1 μ l, dATP (1.0 mmol/L) 1 μ l, M-MLV 酶 2 μ l, ³³P-dATP 15 μ l 混匀, 将离心管置于 37℃ 水浴 0.5 h, 再置于 42℃ 水浴 1.5 h, 取出, 加入 1.5 μ l 10 mol/L NaOH, 95℃ 水浴 5~7 min, 取出后冷却 3 min, 离心数秒, 再依次加入 0.9 μ l 冰醋酸和 10 μ l 3 mol/L NaAc, 混匀后, 加入 150 μ l 无水乙醇, 彻底混匀, 加入 2 μ l 糖原, 混匀后, 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清至另一离心管中, 测定沉淀管与上清管的 cpm 值, 向沉淀中加入 40 μ l 去离子水溶解, 获得 cDNA 探针.

1.2.3 杂交: 将 cDNA 阵列膜置于 6 $\times$ SSC 溶液中浸泡 2 min, 再将湿润的 cDNA 阵列膜放入杂交管, 加入预杂交液 40 ml, 再加入 200 μ l 已高温变性的鱼精 DNA (100 mg/L), 然后将杂交管放入杂交炉中, 于 68℃ 温育 3 h, 取出杂交管, 倒去预杂交液, 保持膜的湿润, 迅速加入 6 ml 杂交液和 80 μ l 已高温变性的鱼精 DNA (100 mg/L), 随即加入已高温变性过的探针, 于 68℃ 杂交约 20 h.

1.2.4 洗膜: 取出 cDNA 阵列膜, 迅速将其置于 500 ml 洗液 I (2 $\times$ SSC, 0.5% SDS) 中, 室温浸泡 5 min, 温和摇动, 然后将 cDNA 阵列膜转移至 500 ml 洗液 II (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS) 中, 于 37℃ 浸泡 15 min, 温和地摇动, 再将 cDNA 阵列膜转移至 500 ml 洗液 III (0.1 $\times$ SSC, 0.5% SDS) 中, 于 37℃ 浸泡振荡 1 h, 500 ml 蒸馏水室温漂洗片刻, 将其置于吸水纸上, 吸走水分, 磷屏压片 12 h.

1.2.5 信号扫描和分析: 使用 FJIFILM 公司的 FLA-3000A Plate 信号扫描仪, 选用 Fluorescent Image Analyzer 扫描软件将 X 光片信号输入计算机, Array Gauge 软件分析基因的表达丰度. 将两张膜上的背景亮度值均设为 0, 同一张膜上任意两个对照基因的亮度值差异在 2 倍之内, 同一张膜上代表同一克隆的两个点亮度差异在 2 倍之内, 一张膜上同一克隆的两点亮度分别是另一张膜上对应点亮度的 2 倍以上, 可以确信这个克隆代表的基因在这两种样品中有明显的表达差异, 从而确立差异表达基因.

1.2.6 RNA 印迹分析: 按 Grummer 等^[9] 方法检测 NAG7 基因的重表达水平, 内对照为看家基因 GAPDH. cDNA 微阵列杂交结果的证实, 内对照为看家基因 β -actin.

2 结果

2.1 总 RNA 抽提的质量鉴定

分别提取 HNE1 细胞和 pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1 细胞的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的提取质量 (图 1), 结果显示 28 S 的

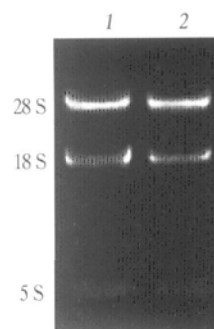


Fig. 1 The quality of total RNA analysis with 1% agarose electrophoresis

1: HNE1 cell; 2: pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1 cells. The result indicated that the quality of total RNA was satisfied for Northern blot and cDNA microarray analysis.

亮度强于 18 S, 且 5 S 亮度极弱, 表明 RNA 的质量可靠, 未降解, 可用于 RNA 印迹和 cDNA 微阵列分析.

2.2 NAG7 基因的重表达分析

由图2可见, 在HNE1细胞中, NAG7基因几

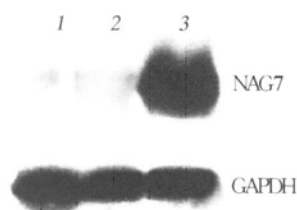


Fig. 2 Northern blot analysis the expression of NAG7 gene

1: HNE1 cells; 2: pcDNA3.1 (+) / HNE1 cells; 3: pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1 cells. The result suggested that NAG7 gene was re-expressed in NAG7 gene transfected HNE1 cell line.

乎不表达, 而在NAG7稳定转染的pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1细胞中NAG7基因表达明显上调, RNA印迹检测结果表明, NAG7基因转染HNE1细胞后获得了重表达.

2.3 基因表达图谱

图3a和图3b分别为HNE1细胞和pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1细胞cDNA微阵列图谱. 如图3所示, cDNA微阵列图谱中的每一个斑点代表一个基因或表达序列标签 (EST). 各基因或EST的表达水平在图3中通过颜色深浅来反应, 越黑说明表达水平越高, 该点的密度值大小是由该点本身在X片上杂交显影的密度, 与该阵列对照点在扣除杂交背景相比后的密度值. 因此, 较为可靠地反应该基因或EST在细胞中的相对表达水平高低.

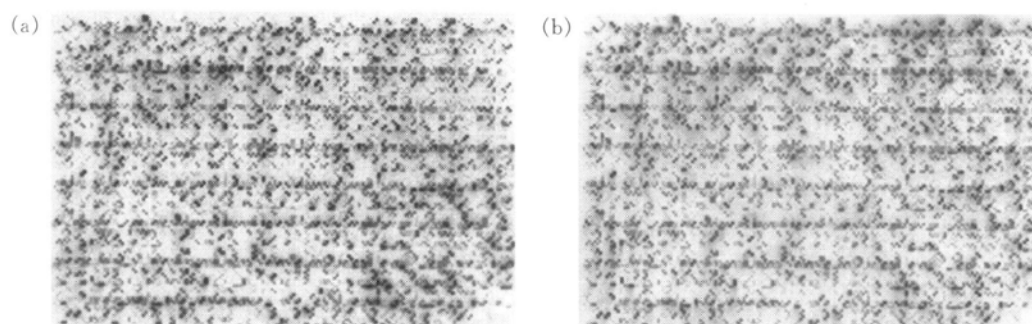


Fig. 3 The profiles of gene expression plotted by cDNA microarray hybridization

(a) HNE1 cells; (b) pcDNA3.1 (+) / NAG7/HNE1 cells. The result suggested that re-expression of NAG7 gene resulted in the alteration of gene expressional profile in HNE1 cells.

2.4 NAG7 基因重表达所致的差异基因表达

Array Gauge 软件分析表明, NAG7 基因重表达可导致 HNE1 细胞基因表达谱的改变, 其中 91 个已知基因或 EST 表达上调, 在上调基因中: 38 个为 EST, 24 个为人源 mRNA 或为假定蛋白质基因 (即其基因编码的蛋白质尚未鉴定), 29 个为已明确其表达产物的基因. 与此相对应的是 88 个已知基因或 EST 表达下调, 在下调基因中: 24 个为 EST, 27 个为人源 mRNA 或是假定蛋白质基因, 37 个为已知基因编码产物的基因.

表 1 和表 2 分别列出了 NAG7 基因重表达所致

29 个表达上调和 37 个表达下调的基因. 表中的 Accession ID 为基因 GenBank 编号, Name 为该基因在 GenBank 中的名称, Index 为基因阵列膜中的位置, Negative Avg 代表该基因在 HNE1 细胞中表达的平均密度值, Positive Avg 代表 NAG7 基因转染 HNE1 细胞后基因表达的平均密度值, Ratio (P/N) 则是代表 NAG7 基因转染前后同一基因的表达差异. 由此可以看出, NAG7 基因的重表达, 可导致鼻咽癌细胞内一系列基因发生表达改变, 而这些基因表达的改变为揭示 NAG7 基因的功能提供了重要线索.

Table 1 Profile of up regulated genes induced by NAG7 gene re-expression

AccessionID	Name	Index	Negative Avg	Positive Avg	Ratio (P/N)
D84488	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	I-K-22-3-D	7.878 020 76	17.031 928 00	2.161 955 21
AA572994	CGF43 protein	I-A-20-7-D	6.300 748 34	21.335 123 00	3.386 125 24
L00635	farnesyltransferase, CAAX box, beta	I-K-18-1-B	1.493 819 71	3.317 826 98	2.221 035 74
AB017430	kinesin-like 4	I-P-19-3-C	4.327 069 99	10.570 895 00	2.442 968 38
X56411	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	I-N-18-3-E	0.813 672 75	3.280 408 02	4.031 606 09
U95032	growth arrest-specific protein 1	I-F-14-3-B	4.297 861 33	11.076 054 00	2.577 108 29
AB007960	CGF61 protein	I-J-20-3-E	1.664 899 76	3.398 901 80	2.041 505 37
M83738	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	I-N-21-1-A	5.770 817 75	11.849 382 00	2.053 328 12
X80695	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	I-L-15-1-A	2.161 448 59	4.496 528 98	2.080 331 21
U22233	methylthioadenosine phosphorylase	I-B-20-1-C	3.446 634 29	8.045 106 64	2.334 192 13
AF054987	aldolase C, fructose-bisphosphate	I-O-1-1-C	1.869 360 98	3.997 607 40	2.138 488 77
AF012872	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide	I-K-11-1-C	1.681 590 43	4.278 250 69	2.544 169 25
AK001639	gamma tubulin ring complex protein (76p gene)	2-M-19-3-G	2.499 435 66	5.126 416 68	2.051 029 66
NM_018444	pyruvate dehydrogenase phosphatase	I-J-22-7-D	1.381 157 33	3.741 910 10	2.709 256 93
NM_000035	aldolase B, fructose-bisphosphate	I-O-14-3-E	1.460 438 37	3.174 387 09	2.173 585 11
U58766	tissue specific transplantation antigen P35B	I-P-15-3-C	1.685 763 24	3.498 685 95	2.075 431 39
X65607	metallothionein 1X	I-M-11-3-B	2.240 729 69	5.519 317 389	2.463 178 58
W36286	steroid dehydrogenase homolog	I-O-17-7-B	4.385 487 55	10.683 153 10	2.436 024 04
X62167	peripheral myelin protein 2	I-P-18-1-E	0.688 492 17	3.118 258 35	4.529 112 24
AJ010346	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	I-A-17-7-B	7.878 020 76	17.031 928 00	2.161 955 21
U20536	caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	I-F-14-3-F	5.153 260 46	12.073 896 40	2.342 962 57
Z46973	phosphoinositide 3-kinase, class 3	I-N-19-3-C	4.297 861 33	11.076 054 10	2.577 108 29
M29877	fucosidase, alpha L-1, tissue	I-P-14-1-E	4.527 358 65	9.361 011 74	2.067 654 11
X73424	propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	I-K-19-1-E	2.799 868 82	7.427 691 69	2.652 871 32
NM_003145	signal sequence receptor, beta (translocator-associated protein beta)	I-J-21-1-A	11.353 864 60	22.806 942 90	2.008 738 31
L13848	DEAD/H (Asp/Glu/Ala/Asp/His) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophysin)	I-L-12-3-E	2.098 858 59	4.334 378 95	2.065 112 42
U27185	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	I-N-15-1-D	1.464 611 05	3.093 312 02	2.112 036 51
X54924	CDC28 protein kinase 2	I-P-20-3-E	6.826 505 66	13.739 046 50	2.012 603 11
AF029893	beta 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase	I-O-19-3-F	2.570 371 38	10.963 796 10	4.265 452 13

Table 2 Profile of down-regulated genes induced by NAG7 gene re-expression

AccessionID	Name	Index	Negative Avg	Positive Avg	Ratio (P/ N)
AK001326	tetraspan 3	1-O-17-1-A	140.502 510 00	56.752 304 00	0.403 923 77
AL161973	myeloid/ lymphoid or mixed lineage leukemia	2-B-6-1-B	155.653 511 00	58.498 525 60	0.375 825 28
M13299	blue cone pigment	1-D-21-3-C	7.056 003 09	3.380 191 80	0.479 051 91
AL022721	peroxisome proliferative activated receptor, delta	1-P-19-3-F	8.053 273 67	3.124 494 79	0.387 978 22
AJ133355	zinc finger protein 237	2-O-3-5-E	17.633 748 00	6.978 662 25	0.395 756 03
NM_000065	complement component 6	1-C-2-3-E	4.857 000 82	2.282 565 11	0.469 953 61
M97388	down regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	2-I-23-3-A	4.857 000 82	2.282 565 11	0.469 953 61
X57351	interferon induced transmembrane protein 2 (1~8D)	1-C-16-1-E	8.499 751 56	4.016 316 77	0.472 521 66
X13839	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	2-O-5-3-G	3.563 469 64	0.810 747 17	0.227 516 22
AL133415	vimentin	1-F-23-1-F	35.947 645 10	33.165 796 20	0.922 613 87
L09708	complement component 2	1-M-16-3-E	110.801 368 00	52.174 699 70	0.470 884 97
D31886	RAB3 GTPase activating protein	1-K-8-1-E	11.458 181 30	5.687 703 13	0.496 387 94
AB014529	A kinase (PRKA) anchor protein 11	2-D-12-1-E	3.696 995 37	1.677 622 85	0.453 780 07
AJ223075	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	1-B-22-3-G	3.438 289 16	1.609 021 24	0.467 971 47
XM_048124	S100 calcium-binding protein A7	1-N-7-3-B	6.901 613 71	2.544 498 80	0.368 681 71
M12272	alcohol dehydrogenase 3 (class I), gamma polypeptide	1-J-19-3-B	130.492 256 00	54.201 568 00	0.415 362 33
AL022721	ribosomal protein L10a	1-P-19-3-F	8.053 273 67	3.124 494 79	0.387 978 22
D88587	ficolin (collagen/ fibrinogen domain-containing) 3 (Hakata antigen)	1-K-1-1-C	67.555 707 90	27.833 573 30	0.412 009 20
BE178753	general transcription factor II, i	1-B-19-7-B	3.087 784 17	0.792 037 78	0.256 506 84
Z11793	selenoprotein P, plasma, 1	1-O-21-1-C	180.869 022 00	71.245 967 80	0.393 909 16
NM_014345	endocrine regulator	1-J-9-3-C	8.524 786 94	4.234 594 82	0.496 739 07
AB032984	voltage-gated sodium channel beta-3 subunit (scn3b gene)	2-C-23-3-D	3.071 093 08	1.328 378 14	0.432 542 45
AB000887	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 19	1-D-21-1-B	3.692 822 69	1.540 419 51	0.417 138 77
AV655899	ras homolog gene family, member E	1-H-20-5-E	27.393 650 10	13.096 684 90	0.478 092 00
AF022991	period (Drosophila) homolog 1	1-P-1-3-B	159.834 533 00	51.675 779 30	0.323 307 97
U05227	GTP-binding protein homologous to Saccharomyces cerevisiae SEC4	1-K-1-1-B	14.074 451 90	4.434 163 33	0.315 050 51
AB029348	heat shock transcription factor 4	1-D-19-1-B	6.233 984 94	2.956 108 92	0.474 192 50
U03105	proline-rich protein with nuclear targeting signal	1-L-2-1-D	4.231 098 53	1.902 137 69	0.449 561 19
U14970	ribosomal protein S5	1-O-8-1-E	11.086 812 50	4.683 624 26	0.422 450 10
M64930	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	2-N-24-1-C	17.930 008 80	7.608 550 30	0.424 347 26
NM_000430	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit (45 ku)	1-D-10-3-B	3.058 575 27	1.390 743 25	0.454 702 96
AF079167	oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	1-E-12-1-A	3.050 229 90	1.446 871 99	0.474 348 50
M74524	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	1-A-22-3-D	6.901 613 71	2.544 498 80	0.368 681 71
D79990	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	1-A-11-1-A	14.420 784 90	7.053 500 41	0.489 120 42
AB028449	helicase moi	2-O-5-1-E	5.341 031 55	1.739 988 14	0.325 777 54
X99656	SH3-domain GRB2-like 1	1-P-5-3-B	38.292 692 10	17.780 309 60	0.464 326 44

2.5 RNA 印迹验证 cDNA 微阵列的结果

cDNA 微阵列表达分析的结果发现, 生长阻滞特异基因 1 表达上调, 蛋白质组分析结果亦表明, 生长阻滞特异蛋白 1 表达增加, 为了证实 cDNA 微阵列的结果, 我们采用 RNA 印迹检测其表达, 结果显示: NAG7 基因的重表达可导致生长阻滞特异蛋白 1 基因表达明显增加 (图 4).

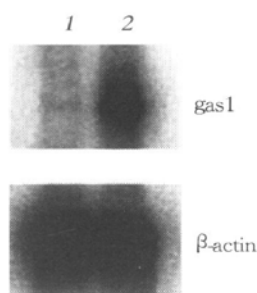


Fig. 4 Northern blot analysis the expression of growth arrest special protein 1 (gas 1) gene
1: HNE1 cells; 2: pcDNA3.1 (+) / NAG7/ HNE1 cells. The result indicated that gas1 gene was up-regulated derived from NAG7 gene re-expression.

3 讨 论

cDNA 微阵列 (cDNA microarray) 技术自 1995 年发明至今短短几年的时间里, 不仅已广泛应用于基因表达分析、DNA 测序、药物筛选、生长发育等各个领域^[5], 而且在鼻咽癌发病学的研究中也显现出重要的作用, 如: Fung 等^[10]使用 cDNA 阵列杂交的方法检测了恶性和非恶性鼻咽上皮细胞差异基因的表达, 结果发现总共 42 个基因在恶性和非恶性 NPC 细胞或两者均表达. 其中有 13 个基因在恶性 NPC 细胞中过表达, 而 9 个基因在恶性 NPC 细胞中表达抑制, 并通过 RT-PCR 进行证实. Xie 等^[11]则使用与肿瘤生物学相关的含 588 个基因的 cDNA 阵列筛选正常鼻咽组织和鼻咽癌, 检测细胞周期/生长控制、凋亡、瘤基因/抑瘤基因和生长因子/细胞因子在鼻咽癌中的差异表达, 结果发现细胞增殖趋向上升, 抗凋亡能力趋于增强, 自分泌和旁分泌生长因子在 NPC 的演进中具有重要作用, 而何志巍等^[12]在此基础上采用含 5 184 个 EST 的 cDNA 阵列, 研究成人鼻咽组织和鼻咽低分化鳞状细胞癌组织基因的表达差异, 结果显示鼻咽癌组织中有 187 个 EST 高表达, 鼻咽组织中 307 个 EST 高表达, 38 个 EST 在鼻咽组织高表达而在鼻咽癌组织中低表达, 48 个 EST 在鼻咽

癌组织高表达而正常鼻咽组织低表达, 说明正常鼻咽与鼻咽癌组织可能存在多个差异表达的新基因, 并在该肿瘤的发生中起作用.

上述 cDNA 微阵列技术在鼻咽癌研究中的应用均是研究癌组织的基因表达, 但尚未涉及鼻咽癌相关基因对鼻咽癌细胞基因表达谱影响的研究, NAG7 基因是潜在的鼻咽癌相关候选抑瘤基因, 对鼻咽癌细胞的恶性表型具有抑制作用^[13], 为了全面而不孤立地评价 NAG7 基因在鼻咽癌发生、发展中的作用, 就必须研究 NAG7 基因对鼻咽癌细胞基因表达谱的影响. Hong 等^[14]将肿瘤抑制基因 PTEN 导入人肺癌细胞系, 建立稳定的可诱导野生 PTEN 过表达的高侵袭细胞系, 然后采用高密度 cDNA 微阵列技术绘制 PTEN 过表达的细胞基因表达谱, 结果发现 PTEN 可导致一系列基因发生表达上调与下调, 并用 RNA 印迹和流式细胞技术分析证实 PTEN 的过表达可降低整合素 α -6 的表达. 研究表明, PTEN 的过表达可通过下调一系列基因而抑制肺癌侵袭, 并提出 cDNA 微阵列技术对研究肿瘤抑制基因的下游功能可能是一有效的工具. 因此, 本文亦通过 cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因重表达的鼻咽癌细胞 HNE1 基因表达谱, 结果发现, NAG7 基因的重表达可导致 HNE1 细胞基因表达谱发生改变, RNA 印迹亦证实 NAG7 的重表达可上调生长阻滞特异蛋白 1 (growth arrest special protein 1, gas1) 的表达. gas1 定位于 9q21.3~22.1, 该位点在许多肿瘤中均为一高频缺失区^[15]. Evdokiou 等^[16]为了研究 gas1 基因是否为一肿瘤抑制基因, 将其转染致 gas1 阴性的人肿瘤细胞 A549 并建立稳定表达 gas1 细胞株. 研究发现 gas1 的表达可抑制体外细胞的生长及裸鼠中少数肿瘤的缓慢生长. 进一步的研究表明, gas1 抑制肿瘤细胞的生长与肿瘤形成的机制为 gas1 基因产物引起生长阻滞受 p53 介导, MDM2 的过度表达或 p53 的突变可抑制 gas1 介导的生长抑制途径. Lee 等^[17]的研究则表明 Myc 可抑制生长阻滞基因 gas1 的转录. 大量的研究结果提示, Rb 和/或 p53 基因产物具有介导 h-gas1 (human gas1) 生长抑制效应的激活作用. 所有这些结果提出一种可能性, 即 h-gas1 很可能是遗传改变的靶分子, 进而导致其在肿瘤细胞中失活^[15,18]. h-gas1 作为一整合膜蛋白, 其抑制细胞生长的机制很可能是通过作用于 START 限制点以阻止细胞从 G1 期进入 S 期, 从而抑制细胞增

殖^[19]。我室先前的研究表明, NAG7 基因具有抑制鼻咽癌恶性表型的作用^[20], 而蛋白质组研究结果亦证实 NAG7 基因的重表达可使 *gas1* 基因表达产物 GAS1 蛋白表达上调^[8], 流式细胞技术分析表明 HNE1 细胞阻滞于 G1 期, 进入 S 期细胞减少^[21], 上述结果提示: *gas1* 基因在 NAG7 重表达的 HNE1 细胞中发挥着重要作用, 是 NAG7 基因作用的关键靶分子之一, 然而, *gas1* 基因在鼻咽癌细胞中的作用机理尚需进一步阐明。

总之, 采用 cDNA 微阵列技术, 分析 NAG7 基因重表达于鼻咽癌细胞 HNE1 的基因表达谱的变化, 可确立 NAG7 基因重表达所致的差异表达基因, 进而探讨 NAG7 基因在基因表达水平上的作用环节。因此, 此研究策略有效地将单基因的功能研究与整体基因功能研究有机地结合, 再与蛋白质组研究的结果相整合, 更有利于从整体上全面探讨 NAG7 基因的作用机理^[13]。

参 考 文 献

- Hui A B, Lo K W, Leung S F, *et al.* Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*, 1999, **82** (2): 498~ 503
- Crook T, Nicholls J M, Brooks L, *et al.* High level expression of ΔN -p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene*, 2000, **19** (30): 3439~ 3444
- Sun Y, Hildesheim A, Lanier A E, *et al.* No point mutation but decreased expression of the p16/MTS1 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 1995, **10** (4): 785~ 788
- 谢 奕, 邓龙文, 江 宁, 等. 定位于染色体 3p25.3 区域的新克隆及在鼻咽癌中的表达分析. *中华医学遗传杂志*, 2000, **17** (4): 225~ 228
Xie Y, Deng L W, Jiang N, *et al.* *Chinese J Medical Genetics*, 2000, **17** (4): 225~ 228
- Ramsay G. DNA chip: state of the art. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (1): 40~ 44
- Lobenhofer E K, Bushel P R, Afshari C A, *et al.* Progress in the application of DNA microarrays. *Environ Health Perspect*, 2001, **109** (9): 881~ 891
- 祝和成, 姚开泰, 李桂源, 等. 4 株鼻咽癌上皮细胞株的建立及其生物学特性. *湖南医科大学学报*, 1992, **17** (5): 103~ 105
Zhu H C, Yao K T, Li G Y, *et al.* *Hunan Medical University Bulletin*, 1992, **17** (5): 103~ 105
- 谭 琛, 李 江, 谢 奕, 等. 应用二维电泳和质谱技术研究 NAG7 基因的功能. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (4): 373~ 378
Tan C, Li J, Xie Y, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33** (4): 373~ 378
- Grummer R, Hellmann P, Traub O, *et al.* Regulation of connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, 1996, **227** (1), 23~ 32
- Fung L F, Lo A K, Yuen P W, *et al.* Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci*, 2000, **67** (8): 923 ~ 936
- Xie L, Xu L, He Z, *et al.* Identification of differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by means of the Atlas human cancer cDNA expression array. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126** (7): 400~ 406
- 何志巍, 任彩萍, 许亮国, 等. 微阵列技术分析鼻咽癌和正常鼻咽组织的基因表达谱. *科学通报*, 1999, **44** (23): 2528~ 2531
He Z W, Reng C P, Xu L G, *et al.* *Science Bulletin*, 1999, **44** (23): 2528~ 2531
- Tan C, Li J, Wang J R, *et al.* Proteomic analysis of differential protein expression in human nasopharyngeal carcinoma cells induced by NAG7-transfected. *Proteomics*, 2002, **2** (3): 306~ 312
- Hong T M, Yang P C, Peck K, *et al.* Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **23** (3): 355~ 363
- Del Sal G, Collavin L, Ruaro M E, *et al.* Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine *gas1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (5): 1848~ 1852
- Evdokiou A, Cowled P A. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 1998, **75** (4): 568~ 577
- Lee T C, Li L, Philipson L, *et al.* Myc represses transcription of the growth arrest gene *gas1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (24): 12886~ 12891
- Ruaro E M, Collavin L, Del Sal G, *et al.* A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (9): 4675 ~ 4680
- Hayles J, Fisher D, Woollard A, *et al.* Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell*, 1994, **78** (5), 813~ 822
- 谭 琛, 李 江, 王洁如, 等. NAG7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 372 ~ 377
Tan C, Li J, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 372~ 377
- 谭 琛, 李 江, 彭 聪, 等. NAG7 基因对鼻咽癌细胞周期和凋亡的影响. *癌症*, 2001, **21** (5): 449~ 455
Tan C, Li J, Peng C, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2001, **21** (5): 449~ 455

The Effects of NAG7 on Gene Expressional Profile of HNE1 Cells Using cDNA Microarray Analysis*

TAN Chen, LI Jiang, PEN Cong, ZHANG Qi-Hong, TANG Ke, LI Xiao-Ling, LI Gu-Yuan**

(Cancer Research Institute, School of Xiangya Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To observe whether the re-expression of NAG7 gene could affect the gene expression of HNE1 cells, the cDNA microarray technique was employed to analyze the changes of gene expressions. 250 µg total RNA was extracted and 1 µg polyA mRNA was isolated. Reverse transcription was performed and cDNA probe was random-prime labeled with ³³P-dATP and hybridized with the cDNA microarray membrane containing 16 150 genes and ESTs. The hybridized result was confirmed by Northern blot analysis. FLA-3000A Plate scanner and Array Gauge software were used to screen and analyze the expressions of each gene. The background was eliminated and the differences of signal intensity of matched spots over 2 times were set as a marker to identify the differential expression genes. The results suggested that 179 genes were differential expressed, in which 91 genes were up-regulated and 88 genes were down-regulated in NAG7 re-expressed cells. These genes were involved in gene transcription, regulation, proliferation, metabolism, apoptosis, and so on. Northern blot result testified that growth arrest specific protein 1 (gas 1) expressed up-regulated. Especially, the previous results of proteomic research also found that the protein of gas 1 expressed up-regulated. Therefore, the data suggested that gas 1 gene plays a critical role in NAG7 re-expressed HNE1 cells, and provides an important clue to elucidate the mechanism of NAG7 gene.

Key words cDNA microarray, gene expression, NAG7 gene, gas 1 gene, nasopharyngeal carcinoma (NPC)

* This work was supported by grants from The State "Ten-five" 863 High Technology R&D Project of China (2001AA221031) and The National Natural Sciences Foundation of China (39800142, 30100105).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805446, E-mail: ligy@xymu.net

Received: June 25, 2002 Accepted: August 6, 2002