

NM23-H1、DJ1 和 TIM1 在低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 细胞株中共同表达 *

冯雪萍¹⁾ 陈主初^{1,2)} 肖志强^{1)**} 杨海燕¹⁾ 诸葛勤¹⁾ 朱 果¹⁾
杨轶轩¹⁾ 李 明¹⁾ 李 萃¹⁾ 李茂玉¹⁾ 李 峰^{1,2)} 张鹏飞¹⁾ 肖健云³⁾

¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组重点实验室, 长沙 410008;

²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410008;

³⁾中南大学湘雅医院耳鼻喉科, 长沙 410008)

摘要 鼻咽癌为一种好发于鼻咽顶前壁及咽隐窝的头颈肿瘤, 98%属低分化鳞癌. 鼻咽癌就诊的患者中约 75%已有颈淋巴结转移, 颅神经受累(Ⅱ~Ⅵ, Ⅸ~Ⅻ)也较易发生. CNE2 为一种低分化鼻咽鳞癌细胞系, 其生物学行为具有低分化鼻咽鳞癌的一些共同特点. 选择恶性程度高的鼻咽癌组织(Ⅳ期, 低分化鼻咽鳞癌)和恶性程度高的低分化鼻咽鳞癌细胞株 CNE2 为研究样本, 应用双向凝胶电泳技术获得了 6 例分辨率较高、重复性较好的低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 细胞系双向凝胶电泳图谱, 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术, 分析了 145 个蛋白质斑点(组织 66 个点, 细胞株 79 个点), 共鉴定出了 74 种蛋白质, 其中瘤基因 DJ1、转移相关基因 NM23-H1 和磷酸丙糖激酶异构酶 1(TIM1) 3 种蛋白质, 在 CNE2 细胞系和该 6 例低分化鼻咽鳞癌组织中均共同表达. 并进一步应用 RT-PCR 法检测低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 和 12 例低分化鼻咽鳞癌组织三者 mRNA 的表达: 在细胞系 CNE2 和 3 例Ⅳ期低分化鼻咽鳞癌病人的组织中三者全表达, 3 例Ⅲ期及 6 例Ⅱ期也各有 1 例为全表达, 而在正常对照的 6 例慢性鼻咽炎组织中未检测到三者的同时表达且有一例为全阴性, NM23-H1、DJ1 和 TIM1 三者的 mRNA 在Ⅲ、Ⅳ期低分化鼻咽鳞癌组织共同表达, 与正常对照组织相比, 发现两者有显著性差异($\chi^2=10.214$, $P<0.005$). NM23-H1、DJ1 和 TIM1 三者的共同表达, 可能与低分化鼻咽鳞癌的发生发展有关.

关键词 低分化鼻咽鳞癌, 2-DE, MALDI-TOF-MS, 蛋白质组, RT-PCR

学科分类号 R739.6

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方常见的一种恶性肿瘤, 多为低分化鳞癌, 其发生发展机理尚不清楚. 蛋白质组学(proteomics)以细胞、组织或机体在特定时间和空间上表达的所有蛋白质即蛋白质组(proteome)为对象, 研究蛋白质的组成及活动规律, 其研究手段主要依靠双向凝胶电泳(2-DE)技术对总蛋白质进行分离以及通过质谱技术对分离的蛋白质予以鉴定. 本研究以低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 细胞系为样本, 首先建立两者的 2-DE 图谱, 然后应用质谱技术结合数据库搜寻对二者共同表达的蛋白质进行鉴定, 以寻找与低分化鼻咽鳞癌发生发展相关的蛋白质.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本获取. 组织样本: 18 例人低分化鼻咽鳞癌(男性, 25~35 岁, 6 例Ⅱ期、3 例Ⅲ期、9 例Ⅳ

期)组织标本均取自湘雅医院耳鼻喉科, 活检组织经病理确诊; 8 例相对正常组织为慢性鼻咽炎患者, 并经病理证实为慢性鼻咽炎. 细胞样本: 人鼻咽低分化鳞癌细胞系 CNE2 为中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组重点实验室液氮保存细胞.

1.1.2 试剂、仪器. 固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH3~10, 24 cm)和 2-D Quant Kit 购自 Amersham Biosciences, 甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲-酮-胰蛋白

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB5102), 国家自然科学基金资助项目(30000028, 30240056, 30370642), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教计函[2002]48), 湖南省科技厅重大科技专项(02SSY2001-1)和湖南省卫生厅重点科研项目(Z02-4).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327321

E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-11-22, 接受日期: 2004-12-28

酶 (TPCK-Trypsin) 和基质 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CCA) 均购自 Sigma 公司, 小牛血清和 RPMI1640 为 Gibco BRL 公司产品; 逆转录酶试剂盒为美国 Promega 公司产品, 引物由广州瑞真生物技术有限公司合成. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、ImageMaster 2D Elite4.01 凝胶图像分析软件、Imagescanner、LabScan 扫描控制和分析软件均系 Amersham Biosciences 公司产品; MALDI-TOF-MS 质谱仪、PCR 合成仪分别为 ABI 公司、Eppendorf 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞、组织处理. 含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养 CNE2 细胞, 收集对数生长期细胞用无菌生理盐水洗涤 3 次后立即抽提蛋白质或液氮保存备用; 用无菌生理盐水洗涤新鲜鼻咽癌活检组织 3 次, 用无菌纱布吸干盐水立即抽提蛋白质或液氮保存备用.

1.2.2 总蛋白质的制备. 在含 2×10^6 个细胞的离心管中加入 200 μ l 细胞裂解液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris base, 65 mmol/L DTT), 充分旋涡混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 15 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 吸取上清液即为细胞总蛋白质. 取低分化鼻咽鳞癌组织 (湿重约 40~80 mg), 于液氮下充分研磨至粉末状, 加 400 μ l 组织裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L thiourea, 2% NP-40, 1% Triton X-100, 100 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris base, 2% pharmalyte), 同上方法抽提组织总蛋白质. 2-D Quant Kit 测定蛋白质浓度, 根据蛋白质浓度确定每次上样量.

1.2.3 固相 pH 梯度双向凝胶电泳和银染. 第一向固相 pH 梯度等电聚焦按 Gorg 等^[1]的方法进行. 分别取细胞、组织总蛋白质提取物约 90~150 μ l (根据浓度计算蛋白质总量为 300 μ g) 与水化液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH3~10L, 痕量溴酚蓝) 充分混合, 使总体积达 450 μ l, 加至 IPG 持胶槽中, 将 IPG 干胶条放入持胶槽中, 再加上覆盖液 800 μ l, IPGphor 等电聚焦仪, 30 V 水化 14 h 后, 依次经 500 V 1 h、1 000 V 1 h, 8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦, 总电压时间为 68 000 Vh. 等电聚焦结束后平衡, 迅速取出 IPG 胶条先后置于 10 ml 平衡液 A (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝) 和 10 ml 平衡液 B

(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 1% SDS, 3% 碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝) 中分别平衡 15 min. 平衡后进行第二向垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将 IPG 胶条移至 0.75 mm 厚的不连续胶 (4.8% 均匀浓缩胶, 12% 均匀分离胶) 的浓缩胶上端并紧密贴合, 在一端加入低分子质量的蛋白质标准品, 排尽气泡后, 用含痕量溴酚蓝的 0.8% 琼脂糖封顶. 电泳条件为: 每胶 2.5 W 恒流电泳 30 min 后, 改用每胶 17 W 恒流电泳至溴酚蓝离胶最底缘约 1 mm 处停止电泳进行银染显色. 40% 乙酸加 10% 冰乙酸固定 30 min; 30% 乙醇加 5% 硫代硫酸钠再加 6.8% 乙酸钠敏化 30 min; 蒸馏水洗涤 2 次, 每次 8 min, 2.5% 硝酸银银染 20 min; 蒸馏水洗涤 2 次, 每次 1 min; 2.5% 无水乙酸钠加 0.074% 甲醛显影至蛋白质斑点清晰后立即加入 1.46% EDTA-Na 中止 10 min; 蒸馏水洗涤 10 min; 最后用 30% 乙醇加 4.6% 甘油保存.

1.2.4 凝胶图像分析. 凝胶通过 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件获取图像, 利用 ImageMaster 2D Elite 4.01 分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配、1D 校正等分析. 斑点位置的重复性按 Corbett 等^[2]的方法进行计算. 所有数据的统计分析在 SPSS for Windows 10.0 软件和 Excel 上进行.

1.2.5 制备质谱样品. 质谱样品制备按文献[3]略加修改: 切割选定蛋白质点并置于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中 (另选取不同 2-DE 胶对应的匹配点以及空白胶作对照) 双蒸水振动洗涤 3 次, 100 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和 30 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) 脱色, 双蒸水振动洗涤 3 次, 50% 乙氰和 100% 乙氰各脱水 15 min, 然后冷冻抽干, 加入 5 μ l TPCK-Trypsin (0.032 g/L, 用 10% 乙氰和 40 mmol/L NH_4HCO_3 稀释配制) 冰上吸胀 30 min, 然后加覆盖液 30 μ l (10% 乙氰和 40 mmol/L NH_4HCO_3), 37 $^{\circ}$ C 酶解 24 h, 25 μ l 萃取液 (100% 乙氰与 5% 三氟乙酸等体积混合) 萃取 60 min, 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 重复萃取, 将 2 次萃取上清液收集于 0.5 ml Eppendorf 管中, 冷冻抽干仪浓缩至总体积 10 μ l. 再轻微旋涡取 0.5 μ l 样品均匀点样于不锈钢板上, 加 0.5 μ l CCA 基质液, 室温干燥待测.

1.2.6 质谱分析. 将制备好的点样板置于 Applied Biosystems Voyager System 4307 MALDI-TOF-MS 仪上进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定, 离

子源加速电压为 20 000 V, 反射电压比为 1.12, N2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 获得肽质量指纹图。

1.2.7 数据库查询. 通过 Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) 的 Mascot 软件搜寻 MSDB 和 SWISS-PROT 数据库. 搜寻参数如下: 肽质量指纹图肽片段质量选择在 800~4 000 u 范围, 表观等电点的误差范围为 ± 0.5 pH, 表观分子质量的误差范围为 $\pm 20\%$, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-Cys), 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点, 最少匹配肽片段数为 5, 物种来源选择人类, 离子选择[M+H]和 monoisotopic, 另根据需要调整参数。

1.2.8 RT-PCR 检测 mRNA.

a. 组织 RNA 抽提. 取组织块 50~80 mg 加液氮研磨成粉末, 加入 1 ml Trizol 匀浆并冰上孵育 10 min, 加 0.2 ml 氯仿, 12 000 g, 4℃ 离心 15 min. 取上清液移入 1.5 ml 新离心管, 加 0.5 ml 异丙醇震荡, 冰上孵育 15 min, 12 000 g, 4℃ 离心 10 min, 弃去上清液. 加入 75% 的乙醇 1 ml 震荡, 12 000 g, 4℃ 离心 5 min, 弃去上清液, 如此处理 2 次. 加入 25 μ l 的 1% DEPC 水溶解 RNA. 取 5 μ l RNA 电泳观察 5 S、18 S 和 28 S 条带, 分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 吸光度比值, 计算 RNA 浓度。

b. 逆转录合成 cDNA. RT 反应体系(第一步): RNA 抽提物 1 μ g、OligodT 引物 1 μ l 和去离子水 5 μ l, 70℃ 反应 5 min 立即置冰上 15 min 以上; RT 反应体系(第二步): 0.5 μ l RNasin、1 μ l 10 mmol/L dNTP、50 $\times$ RT 缓冲液 4 μ l、25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μ l, AMV 逆转录酶 1.5 U, 42℃ 1 h, 99℃ 10 min 后立即置冰上或保存于 -20℃. 合成 PCR 产品: PCR 反应体系为 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μ l、10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l、上下游引物 50 μ mol/L 各取 1.5 μ l (TIM1: 5' CTCAG AGCACCCGTATCAT 3', 5' CAGGAGCAAATC CCACC 3', 退火温度 55.2℃, 产物大小 424 bp; nm23-H1: 5' GACCGTCCATTCTTTGC 3', 5' CT GCCCTCCTGTCATTC 3', 退火温度 53.4℃, 产物大小 302 bp; DJ1: 5' TACTGCTCTGTTGGCTC AT 3', 5' TGCCCTGTTTATTCTGC 3', 退火温度 50.3℃, 产物大小 460 bp; 内参 GAPDH: 5' GTC AGTGGTGGACCTGACCT 3', 5' TGAGGAGGG

GAGATTCAAGTG 3', 产物大小 420 bp)、cDNA 模板 2.5 μ l、34 μ l 双蒸水、Taq 酶 0.5 μ l、总反应体积 50 μ l. 循环设置: 第一步 94℃ 2 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min 循环 1 次; 第二步 94℃ 45 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min 循环 30 次; 然后 72℃ 10 min; 2.5% 琼脂糖电泳分离产物。

2 结 果

2.1 低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 细胞系双向凝胶电泳图谱

选择癌组织及 CNE2 细胞总蛋白质 350 μ g 进行双向凝胶电泳, 在相同条件下随机选择同一样品进行了 3 次双向电泳重复性检测, 发现双向凝胶电泳图谱均非常相似, 通过 ImageMaster 图像软件对其进行点分析, 获得 3 块凝胶平均蛋白质斑点数为 1218 ± 78 . 经背景消减后, 分别将其中的一块胶定为参考胶进行 3 块胶间的蛋白质点匹配, 平均匹配点数为 $1\,004 \pm 45$, 匹配率为 89.2%. 参考 Corbett 等^[2]的方法, 任意选择 3 块胶上相互匹配且分辨清楚的蛋白质点 100 个, 测出其他 2 块胶对应蛋白质点在 IEF 方向及 SDS-PAGE 方向上的位置偏差, 发现 3 块凝胶的蛋白质点在位置上有较好的重复性, 不同胶间的蛋白质点在 IEF 方向的计算偏差为 (0.875 ± 0.256) mm, 在 SDS-PAGE 方向上的偏差为 (1.79 ± 0.45) mm, 由此获得了分辨率较高、重复性较好的人低分化鼻咽鳞癌组织和人低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 的双向电泳图谱(图 1, 2)。

2.2 肽质指纹图

对分离较好的人低分化鼻咽鳞癌组织图像中的 66 个蛋白质斑点和人低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 图像中的 79 个蛋白质斑点作好标记(图 1, 2)并进行 MALDI-TOF-MS 肽质指纹分析, 共获得 136 张肽质指纹图(图 3)。

2.3 数据库搜寻结果

低分化鼻咽鳞癌组织 58 张肽质指纹图共搜寻出 26 种蛋白质, 低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 的 78 张肽质指纹图共搜寻出 48 种蛋白质, 136 张肽质指纹图共搜寻出 74 种蛋白质, 其中 NM23-H1、TIM1 和 DJ1 三种蛋白质在低分化鼻咽鳞癌组织和低分化鼻咽鳞癌 CNE2 细胞系图谱中共同表达, 它们的蛋白质登录号相同 (a. NPC 组织 2 号点 Top Score: 83 for Q86XQ2, NM23-H1.- Homo sapiens. CNE2 细胞 38 号点 Top Score: 68 for Q86XQ2, NM23-H1.- Homo sapiens. b. NPC 组织 20 号点 Top

Score:79 for gi|31543380, RNA-binding protein regulatory subunit; oncogene DJ1 -Homo sapiens. CNE2 细胞 43 号点 Top Score: 70 for gi|31543380, RNA-binding protein regulatory subunit; oncogene DJ1 -Homo sapiens. c. NPC 组织 21 号点 Top Score: 106 for gi|17389815, TIM 1-Homo sapiens. CNE2 细胞 50 号点 Top Score:117 for gi|17389815, TIM

1-Homo sapiens.)(图 4, 5). 而且三种蛋白质在 NPC 组织和 CNE2 细胞系 2-DE 图谱中的位置也相同 (图 6). 另外, 在低分化鼻咽鳞癌组织的 2-DE 图谱中 3 个串联点 (21, 59, 60) 和人低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 的 2-DE 图谱中 3 个串联点(50, 79, 49) 均被鉴定为 TIM1(图 6).

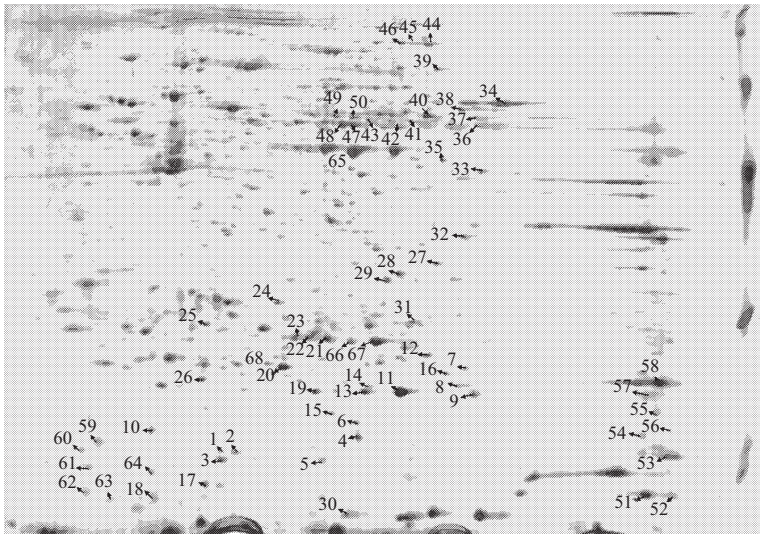


Fig.1 2-DE map of the proteins from poor differential NPC tissue

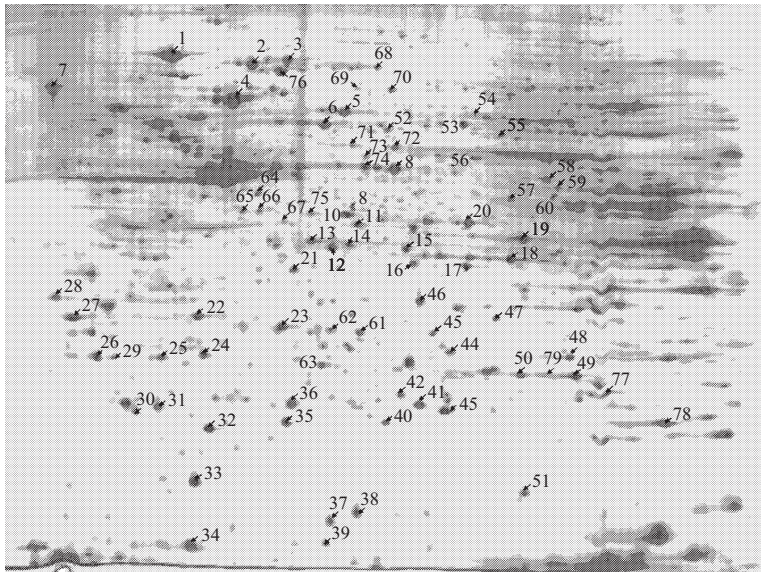


Fig.2 2-DE map of the proteins from poor differential NPC cell line CNE2

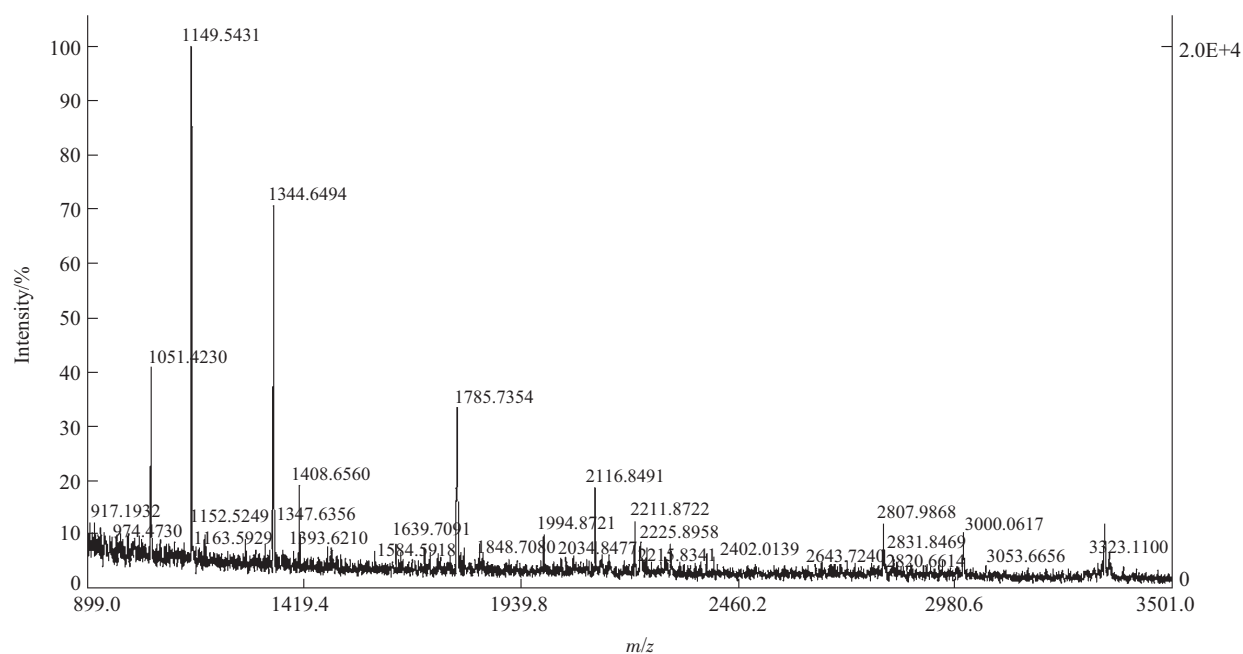


Fig.3 Peptide mass fingerprinting of protein NM23-H1 from NO.2 in 2-DE map of nasopharyngeal squamous carcinoma tissue by MALDI-TOF-MS

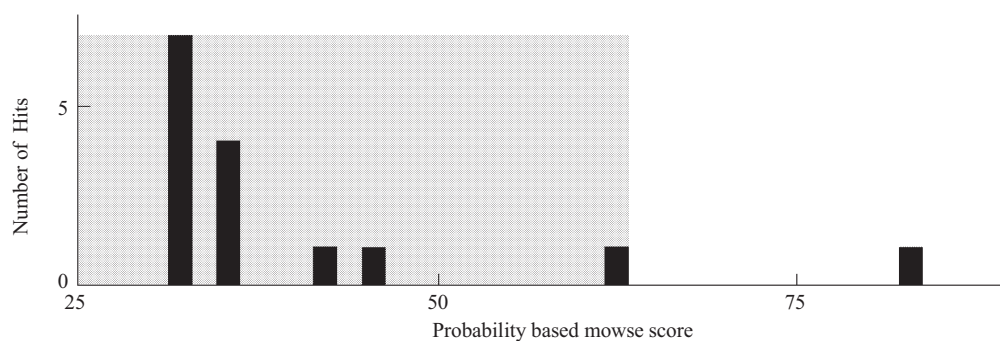


Fig.4 The researching result of protein NM23-H1 peptide mass fingerprinting , NO.2 in 2-DE map of nasopharyngeal squamous carcinoma tissue

Q86XQ2, Top Score: 83 for Q86XQ2, NM23-H1.- Homo sapiens ,Human. Probability Based Mowse Score.

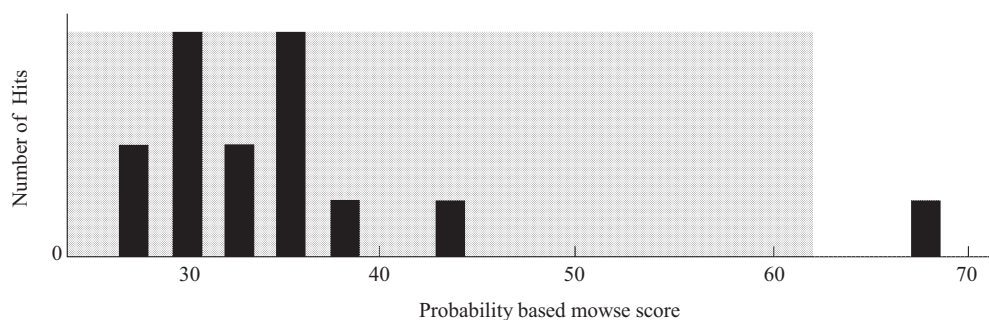


Fig.5 The researching result of protein NM23-H1 peptide mass fingerprinting , NO.38 in 2-DE map of nasopharyngeal squamous carcinoma cell line CNE2

Q86XQ2, Top Score: 68 for Q86XQ2, NM23-H1.- Homo sapiens ,Human. Probability Based Mowse Score.

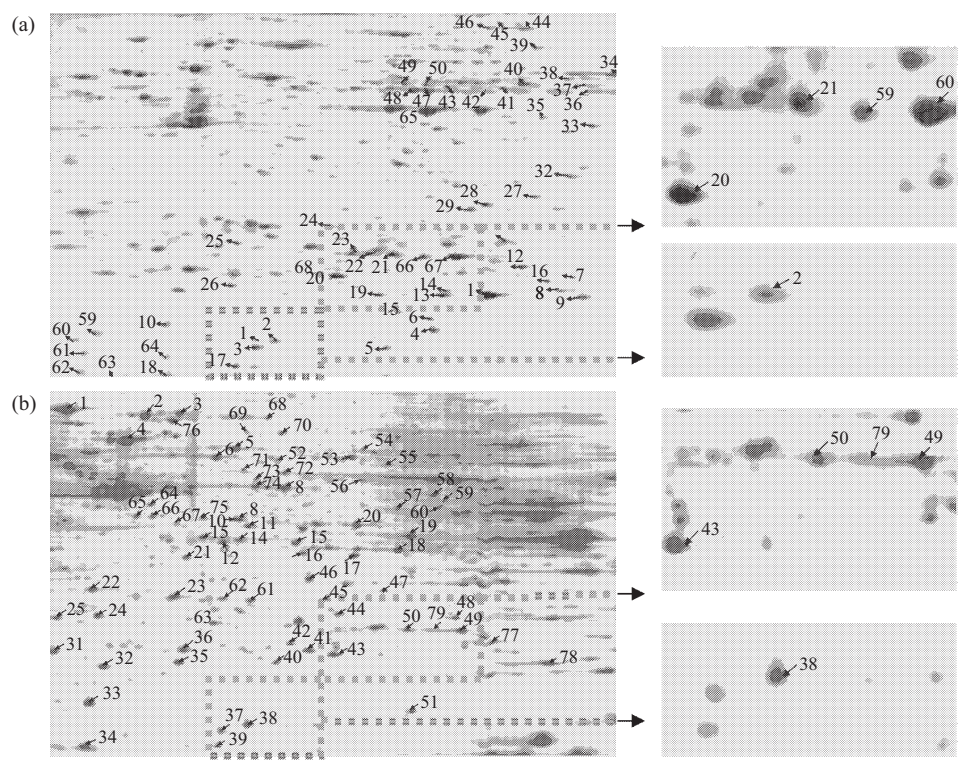


Fig.6 2-DE enlarged map of the proteins from poor differential NPC tissue (a) and poor differential NPC cell line CNE2 (b)

NM23-H1 was identified from both NO.38 and NO.2, oncogene DJ1 was identified from both NO.20 and NO.43, TIM1 was identified from both NO. 21、59、60 and NO. 50、79、49.

2.4 RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 半定量结果显示，在人低分化鼻咽鳞癌组织中其 mRNA 表达率：NM23-H1 为 83.3% (Ⅱ期为 66.7%，Ⅲ、Ⅳ期为 100%)、TIM1 为 66.7% (Ⅱ期为 50.0%，Ⅲ期为 33.3%、Ⅳ期为 100%) 和 DJ1 为 83.3% (Ⅱ期为 66.7%，Ⅲ、Ⅳ期为 100%)。在正常对照的慢性鼻咽炎组织中其表达

率：NM23-H1 为 62.5% (5/8)、DJ1 为 75.0% (6/8) 和 TIM1 为 1.3% (1/8)。从三者表达的总体分析显示，在细胞系 CNE2 和 3 例Ⅳ期低分化鼻咽鳞癌病人的组织中三者全表达，3 例Ⅲ期及 6 例Ⅱ期也各有 1 例为全表达，而正常对照的 6 例慢性鼻咽炎组织未检测到三者的同时表达且有 1 例为全阴性 (表 1 和图 7)。

Table 1 The results of NM23, TP1, DJ1 and GAPDH by RT-PCR in nasopharynx tissues and CNE2

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Sort	n	n	n	Ⅲ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅱ	n	Ⅱ	n	Ⅳ	Ⅳ	Ⅳ	Ⅱ	n	n	Ⅱ	n	Ⅱ	Ⅲ	CNE
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NM23	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
TP1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
DJ1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

The letter n means chronic nasopharyngitis epithelium tissue, Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ stand for Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ-stage NPC tissue respectively, CNE stands for CNE2 cell line.

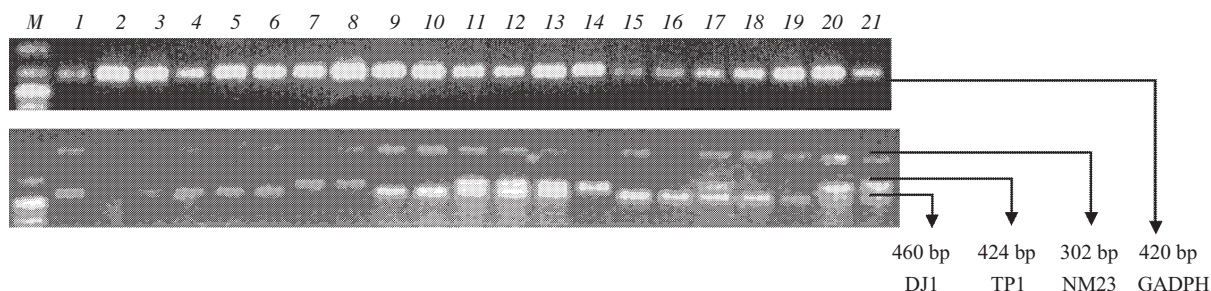


Fig.7 The maps of NM23, TP1, DJ1 and GAPDH by RT-PCR in nasopharynx tissues and CNE2

M means maker (300 bp, 400 bp, 500 bp and 600 bp from upper to below respectively); 1, 2, 3, 8, 10, 15, 16 and 18 are chronic nasopharyngitis epithelium tissue, 5, 7, 9, 14, 17 and 19 are II-stage poor differential NPC tissue, 4, 6 and 20 are III-stage poor differential NPC tissue, 11, 12 and 13 are IV-stage poor differential NPC tissue, 21 is poor differential NPC cell line CNE2(the lower map). In **Figure.6**, NM23-H1 was identified from both NO.38 and NO.2, oncogene DJ1 was identified from both NO.20 and NO.43, TIM1 was identified from both NO. 21, 59, 60 and NO. 50, 79, 49.

3 讨 论

NM23-H1 基因定位于 17 号染色体 p¹¹-q¹¹ 之间, 与 p53 抑瘤基因位于同一个区段, 人的 NM23-H1 蛋白质约为 17 ku, 由 152 个氨基酸组成. 以往研究认为 NM23-H1 是一种具有抗肿瘤转移作用的基因, 目前对 NM23-H1 与肿瘤发生发展的关系有了新的认识. 有研究发现, 在成人软组织肉瘤中, NM23-H1 表达在恶性程度高的肿瘤较恶性程度低的肿瘤显著上调^[4], NM23 阳性的淋巴瘤病人预后显著不如 NM23 阴性的病人^[5]. NM23 与核苷二磷酸激酶(nucleoside-diphosphate kinas, NDPK)高度同源, NDPK 是一类广泛存在的激酶, 它将 5' 端的核苷三磷酸的一磷酸基团转移到 5' 端的核苷二磷酸(nucleoside diphosphate, NDP)上, 使其活化, 活化的 NDP 参与微管的聚合和 G 蛋白介导的信号传导. 因此, NM23 蛋白的改变, 一方面可能使微管聚合异常而引起减数分裂时纺锤体异常, 从而导致癌细胞染色体非整倍体形成, 促进肿瘤的发展, 另一方面亦可能通过影响细胞骨架而引起细胞运动, 从而参与肿瘤浸润转移过程. 本研究显示, NM23-H1 蛋白在低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 和低分化鼻咽鳞癌组织中均表达. 另一方面, NM23-H1 mRNA 在所检测的 III、IV 期 NPC 组织中均表达, 但与正常对照的慢性鼻咽炎组织相比尚无显著性差异 ($\chi^2=1.069$, $0.50 < P < 0.25$), II、III、IV 期 NPC 组织与正常对照的慢性鼻咽炎组织相比也无显著性差异 ($\chi^2=0.013$, $0.90 < P$), II 期与 III、IV 期 NPC 组织相比也无显著性差异 ($\chi^2=0.600$,

$0.50 < P < 0.25$), 提示 NM23-H1 在 mRNA 水平可能更多的是与其他基因相互调控而对低分化鼻咽鳞癌发生发展起作用.

瘤基因 DJ1 (oncogene DJ1) 也称为 RNA 结合蛋白调节亚单位(RNA-binding protein regulatory subunit). 人的 DJ1 基因位于 1p36.2~p36.3, 该区域有一个与几种肿瘤有关的染色体异常位点^[6]. DJ1 基因包含 7 个外显子, 其中外显子 2~6 编码 DJ1 蛋白, 它为一种与生长相关的有丝分裂原依赖的瘤基因产物^[7], 参与 RAS 相关的信号传导并能与活化的 RAS 协同转化 NIH3T3 细胞^[7]. Naour 等^[8]采用蛋白质组学方法寻找乳腺癌血清肿瘤标志物时发现, 在部分乳癌患者血清中检测到了 DJ1 蛋白及其诱导产生的自身抗体, 而在正常对照组血清中该蛋白质和抗体均未发现, 认为 DJ1 对乳腺癌有潜在诊断价值. 本研究显示, 在低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 中均有 DJ1 蛋白表达, 但其低分化鼻咽鳞癌的 mRNA 表达与正常对照的慢性鼻咽炎组织相比无显著性差异 ($\chi^2=0.013$, $0.90 < P$). 然而, Naour 等^[8]在正常和乳癌组织中也均检测到了 DJ1 蛋白, 但乳腺癌组织中的 DJ1 蛋白是以一种有活性的分泌性蛋白质存在且能刺激机体产生自身抗体, 但正常组织中的 DJ1 蛋白无此功能. NPC 组织中的 DJ1 蛋白是否也为一种能分泌到 NPC 患者血清中的分泌性蛋白质及能否诱导产生自身抗体, 以及低分化鼻咽鳞癌发生发展的相关性有待我们进一步实验探讨.

磷酸丙糖异构酶 TIM 是糖酵解代谢中的一个关键酶. 磷酸丙糖异构酶 1 (TIM1), 属于磷酸丙糖

异构酶家族成员. 有研究表明, TIM1 在膀胱上皮鳞状化生、膀胱鳞癌^[9]、肾癌细胞株^[10]和肺腺癌组织^[11]中均有表达. TIM 的突变亦与肿瘤发生密切相关,如在恶性黑色素瘤中发现了 TIM 的突变体,该突变体由于第 450 位的碱基 C 由碱基 T 替代,从而导致了第 28 位的野生型苏氨酸残基 (ACT) 转变成了异亮氨酸残基 (ATT)^[12,13]. 本实验发现, TIM1 的蛋白质在低分化鼻咽鳞癌细胞系 CNE2 和低分化鼻咽鳞癌组织均表达,其蛋白质在 2-DE 图谱中有大且浓染的串联点,表明存在 TIM1 不同的剪切异构体或为翻译后修饰产物,但这些 TIM1 异构体/修饰产物在 NPC 发病中的作用有待进一步研究. 本实验进一步应用 RT-PCR 检测 II、III、IV 期 NPC 组织与正常对照的慢性鼻咽炎组织中的 mRNA 表达,发现两者相比尚无显著性差异 ($\chi^2=0.804$, $0.50 < P < 0.25$), IV 期 NPC 组织与正常对照相比也无显著性差异 ($\chi^2=0.331$, $0.75 < P < 0.50$). 这也提示 TIM1 与 nm23-H1 同样,在 mRNA 水平它们可能更多的是与其他基因相互调控而对低分化鼻咽鳞癌发生发展起作用.

由上述可知,肿瘤转移相关基因 nm23-H1、瘤基因 DJ1 (oncogene DJ1) 和磷酸丙糖异构酶 1 (triosephosphate isomerase 1, TIM1) 三者虽然都与肿瘤关系密切,但发现其各自在 NPC 组织与正常对照的慢性鼻咽炎组织中的 mRNA 表达,两者相比都无显著性差异,提示它们可能更多的是与其他基因相互调控而起作用. 本研究发现 DJ1、NM23-H1 和 TIM1 三种蛋白质在 CNE2 细胞系和该 6 例低分化鼻咽鳞癌组织中均共同表达, NM23-H1、DJ1 和 TIM1 三者的 mRNA 在 III、IV 期 NPC 组织共同表达,与正常对照组织相比,发现两者有显著性差异 ($\chi^2=10.214$, $P < 0.005$). 这提示 NM23-H1、DJ1 和 TIM1 的共同表达可能与低分化鼻咽鳞癌的发生发展有关,这也与 NPC 是一种多基因、多阶段的疾病,涉及到多种蛋白质的相互作用相符. 但其共同表达所产生的相互调控作用,以及与 NPC 发生发展的机制有待深入探讨.

参 考 文 献

- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6):1037~1053
- Corbett J M, Dunn M J, Posch A, *et al.* Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*, 1994, **15** (8-9):1205~1211
- Li C, Chen Z C, Xiao Z Q, *et al.* Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **309** (1): 253~260
- D'Souza R J, Sheikh Z A, Busund L T, *et al.* Expression of nm23 protein in adult soft tissue sarcoma is correlated with histological grade. *Anticancer Res*, 2003, **23** (4): 3289~3294
- Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, *et al.* Clinical significance of intracytoplasmic nm23-H1 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2004, **10** (7): 2482~2490
- Taira T, Takahashi K, Kitagawa R, *et al.* Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter. *Gene*, 2001, **263** (1~2): 285~292
- Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, *et al.* DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **231** (2): 509~513
- Le Naour F, Misek D E, Krause M C, *et al.* Proteomics-based identification of RS/DJ1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2001, **7** (11): 3325~3327
- Montgomerie J Z, Gracy R W, Holshuh H J, *et al.* The 28K protein in urinary bladder, squamous metaplasia and urine is triosephosphate isomerase. *Clin Biochem*, 1997, **30** (8): 613~618
- Lichtenfels R, Kellner R, Atkins D, *et al.* Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **21**: 1646 (1~2): 21~31
- Chen G, Gharib T G, Huang C C, *et al.* Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (7): 2298~2305
- Sundberg E J, Sawicki M W, Southwood S, *et al.* Minor structural changes in a mutated human melanoma antigen correspond to dramatically enhanced stimulation of a CD4+ tumor-infiltrating lymphocyte. *J Mol Biol*, 2002, **319** (2): 449~461
- Pieper R, Christian R E, Gonzales M I, *et al.* Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 1999, **189** (5): 757~766

Over Expression of NM23-H1、DJ1 and TIM1 in Poor Differential Nasopharyngeal Carcinoma Tissues and CNE2 Cell Line*

FENG Xue-Ping¹⁾, CHEN Zhu-Chu^{1,2)}, XIAO Zhi-Qiang^{1)**}, YANG Hai-Yan¹⁾, ZHUGE Qin¹⁾, ZHU Guo¹⁾,
YANG Yi-Xuan¹⁾, LI Ming¹⁾, LI Cui¹⁾, LI Mao-Yu¹⁾, LI Feng^{1,2)}, ZHANG Peng-Fei¹⁾, XIAO Jian-Yun³⁾

¹⁾Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital, Changsha 410008, China)

Abstract Nasopharyngeal cancer (NPC) is a type of head and neck cancer and occurs in the uppermost region of the throat situated behind the nasal cavity. 98% of them are poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma. 75% of NPC were found with enlarged lymph nodes in the neck, and also usually cranial nerve dysfunction (usually II~VI or IX~XII). CNE2 is a kind of poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma cell line, which existed some vital characteristic of poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma. High malignant NPC tissues (in IV-stage, poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma) and high malignant poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma cell line CNE2 as the test samples were chosen and good 2-DE patterns of the 6 cases nasopharyngeal squamous carcinoma tissues and poor differential pharyngeal were established. Squamous carcinoma cell line CNE2 proteins with high resolution and good reproducibility using Immobilized pH gradient two-dimensional technology. Total 145 protein spots (66 spots in the tissues and 79 spots in the cell line) were analyzed by MALDI-TOF-MS, and 74 protein spots were identified. 3 proteins of the identified proteins were found to over express in poor differential pharyngeal squamous carcinoma cell line, as well as in 6 cases IV-stage nasopharyngeal squamous carcinoma tissues. Their mRNAs in cell line CNE2 and in 14 cases of human nasopharyngeal squamous carcinoma tissues were tested by RT-PCR. All mRNAs of TIM1、DJ1 and NM23-H1 were expressed both in cell line CNE2 and in tissues (3 cases in IV-stage, 1 cases in III-stage and 1 cases in II-stage, but none of 6 cases in chronic epithelium tissues), and one of 6 cases chronic epithelium tissues did expressed none of TIM1, DJ1 and NM23-H1 mRNAs. mRNAs of nm23-H1, DJ1 and TIM1 in III, IV-stage NPC tissues were expressed simultaneously, which were compared with chronic nasopharyngitis epithelium tissues, were existed the evidently difference ($\chi^2=10.214$, $P<0.005$). The over expressions of nm23-H1, DJ1 and TIM1 in both the NPC tissues and the cell line may be correlated with the pathogenesis of poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma.

Key words poor differential nasopharyngeal squamous carcinoma, 2-DE, MALDI-TOF-MS, proteomics, RT-PCR

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB5102), The National Natural Science Foundation of China (30000028, 30240056, 30370642), Outstanding Scholars of New Era from Ministry of Education of China (2002-48), Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan (02SSY2001-1) and Key Research Program from Public Health Bureau of Hunan Province (Z02-4).

**Corresponding author. Tel: 86-731-4327239, Fax: 86-731-4327321, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: November 22, 2004 Accepted: December 28, 2004