

PLUNC 蛋白家族在抑制鼻咽上皮“炎-癌” 演进中的作用和机制*

魏芳^{1, 2)} 李夏雨^{1, 2)} 李小玲^{1, 2)} 张文玲²⁾ 廖前进^{2, 3)} 曾勇³⁾ 龚朝建²⁾
 周鸣^{1, 2)} 马健^{1, 2)} 熊炜^{1, 2)} 沈守荣¹⁾ 曾朝阳^{1, 2)**}

⁽¹⁾ 中南大学湘雅三医院疾病基因组研究中心, 非可控性炎症与肿瘤湖南省重点实验室, 长沙 410013;

⁽²⁾ 中南大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室及教育部癌变与侵袭原理重点实验室, 长沙 410078;

⁽³⁾ 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南省肿瘤医院, 长沙 410013)

摘要 人类鼻咽黏膜表面的分泌物中富含天然免疫蛋白, 腭、肺及鼻咽上皮克隆(palate, lung and nasal epithelium clone, PLUNC)蛋白家族成员 SPLUNC1 和 LPLUNC1 就是其中的重要组成部分, 这两个蛋白在鼻咽上皮相对特异高表达, 它们都具有杀菌/渗透增强蛋白(bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)结构域, 可通过 BPI 结构域与细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)结合从而直接杀灭或抑制细菌生长, 也可以有效抑制 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)等致癌微生物对鼻咽上皮的侵袭从而发挥其免疫防御功能. 它们还可以通过抑制 IL-6 等炎症因子的分泌和 NF- κ B、STAT3 等炎症相关通路的激活, 阻止鼻咽部的慢性炎症反应及鼻咽上皮的恶性转化. 在鼻咽癌细胞中重新表达 PLUNC 蛋白, 可以通过促分裂素原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)或 miR-141-PTEN-AKT 等信号通路抑制鼻咽癌细胞的增殖, 促进鼻咽癌细胞的凋亡. 进一步深入研究 PLUNC 蛋白家族在鼻咽癌发病中的作用机制, 对指导鼻咽癌的防治具有重要的意义.

关键词 PLUNC 蛋白家族, 炎症, 鼻咽癌

学科分类号 Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00396

人类鼻咽部长期保持温暖湿润的环境, 适于各种微生物的生长, 且长期暴露在各种外来化学物质的刺激下, 当鼻咽黏膜受到损伤时局部就会产生炎症反应, 长期处在一个富含炎症细胞和生长因子等的炎性微环境中, 上皮细胞容易被刺激引起增殖, 鼻咽上皮的慢性炎症最终可能演变为鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)^[1-4]. 在长期进化过程中, 人体拥有一套天然免疫(又叫固有免疫, innate immunity)系统来进行自我防卫^[5-8], 鼻咽部黏膜及其分泌的黏液就是一道天然免疫屏障. 鼻咽上皮分泌的黏液由一系列蛋白质或多肽组成, 它们能够感受、结合、转运、降解及清除各种有害物质及其副产物, 组成机体最原始的免疫保护壁垒. 腭、肺及鼻咽上皮克隆(palate, lung, and nasal epithelium clone, PLUNC)蛋白家族就是一类天然免疫蛋白^[9-12].

1 PLUNC 蛋白家族的结构及表达模式

PLUNC 蛋白家族第一个成员的编码基因 *plunc* 最早是在小鼠胚胎的腭及鼻咽上皮和成年小鼠的肺组织中被发现并克隆, 定位于小鼠 2 号染色体 2H1 区带, 根据其克隆的来源命名为腭、肺及鼻咽上皮克隆(palate, lung, and nasal epithelium clone, *plunc*)^[10]. 随后, 在该染色体区域附近 500 kb 范围内, 相继克隆出了 13 个 *plunc* 家族成员^[11](图 1a),

* 国家自然科学基金(81071644, 81172189, 81171930, 81201730, 81272298, 81372907, 81301757), 湖南省自然科学基金(14JJ1010)和中央高校基本科研业务费专项资金(2011JQ020)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-84805383, E-mail: zengzhaoyang@xyism.net

收稿日期: 2013-08-29, 接受日期: 2013-11-19

它们编码的蛋白均具有保守的杀菌 / 渗透增强蛋白 (bactericidal/permeability-increasing protein, BPI) 结构域 [也称为细菌脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 结构域]. 根据其编码蛋白的大小和所含 BPI/LBP 结构域的多少, 这 13 个 *plunc* 家族成员被分为两组: 长片段的 *plunc* (long *plunc*, *lplunc*), 编码蛋白包含 449~617 氨基酸不等, 均有 2 个 BPI/LBP 结构域,

包括 *Lplunc1*~6、*Lplunc9a* 和 *Lplunc9b* 共 8 个成员; 短片段的 *plunc* (short *plunc*, *Splunc*), 编码蛋白包含 235~367 氨基酸, 仅有 1 个 BPI/LBP 结构域, 包括 *Splunc1*~3、*Splunc5* 和 *Splunc6* 共 5 个成员, 最早被发现的 *plunc* 基因即 *Splunc1*(图 1a). 在 *plunc* 蛋白家族编码基因所在的染色体区段下游约 4 Mb 处还有紧邻的 *Bpi* 和 *Lbp* 两个基因, 它们编码的蛋白均含有 2 个 BPI/LBP 结构域.

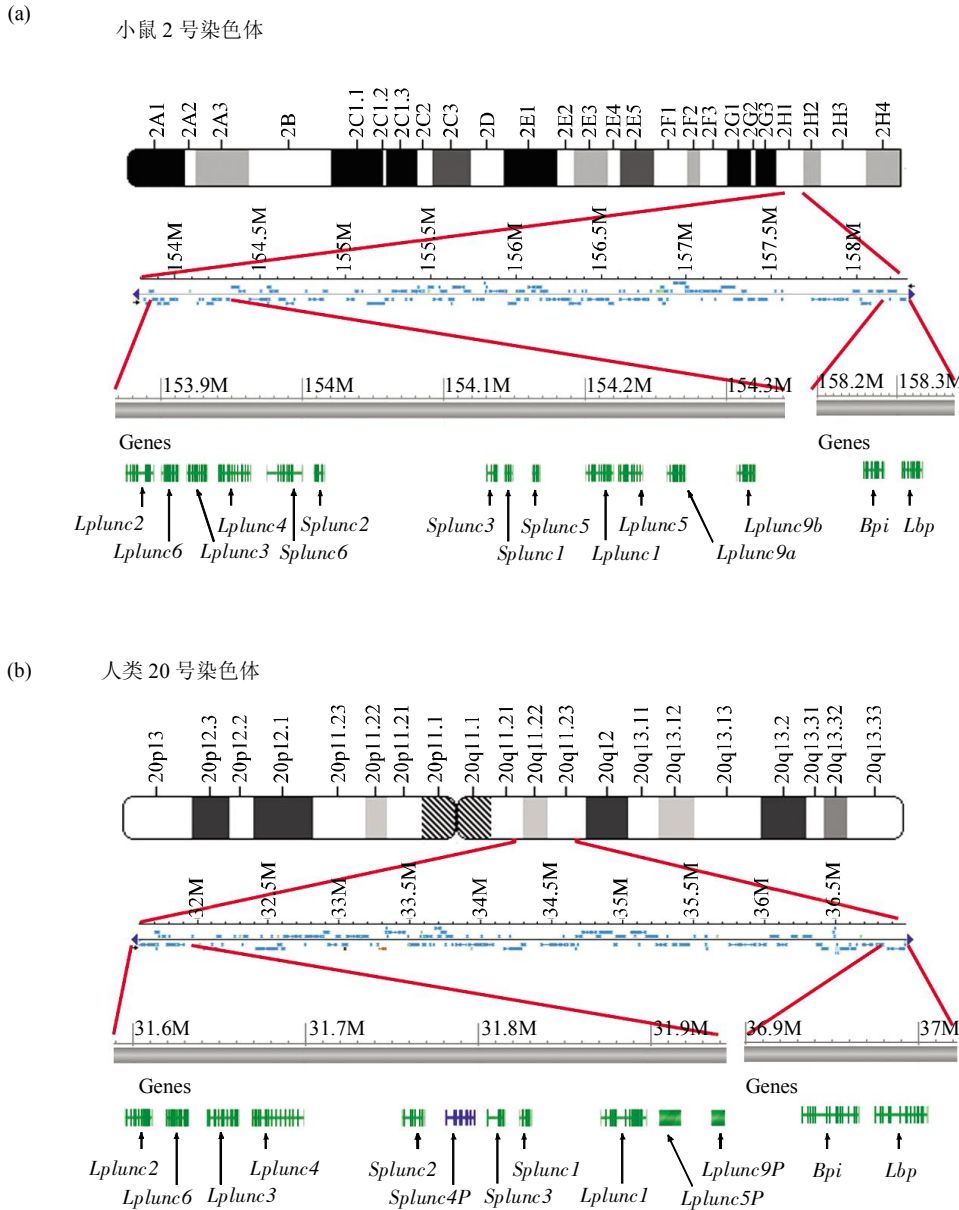


Fig. 1 Locating map of PLUNC family members on mouse (a) and human (b) chromosomes
图 1 PLUNC 蛋白家族成员在小鼠(a)和人类(b)染色体上的分布

PLUNC 蛋白家族大部分成员在多种哺乳动物中保守^[12-14], 与小鼠染色体 2H1 区带相对应的人类染色体 20q11.2 区段, PLUNC 家族成员同样成簇分布于 400 kb 的范围内, 包括 *Lplunc1*~4、*Lplunc6* 及 *Splunc1*~3 共 8 个蛋白编码基因, 以及 *Lplunc5p*、*Lplunc9p* 和 *Splunc4p* 这 3 个假基因(pseudogene). 同样的, 在它们下游约 5Mb 处有紧邻的 *Bpi* 和 *Lbp* 基因(图 1b). 最近, 人类基因组计划基因命名委员会(HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC)根据 PLUNC 蛋白家族都含有 BPI 结构域这一特点, 将 PLUNC 蛋白家族更名为 BPI 折叠家族(BPI fold containing family)^[15], 其中短的 PLUNC (SPLUNC)更名为 BPI 折叠家族 A(BPI fold containing family A, BPIFA), 如 SPLUNC1 更名为 BPIFA1^[16], 长的 PLUNC (LPLUNC)则更名为 BPIFB (BPI fold containing family B), 如 LPLUNC1 更名为(BPIFB1)^[17]. PLUNC 家族蛋白的结构特征除了都含有 BPI 结构域外, 在它们蛋白序列的 N 端都具有一个 19~22 氨基酸的信号肽序列, 表明它们是分泌性蛋白质^[18].

PLUNC 蛋白家族成员中, 目前研究得较多的是 SPLUNC1 和 LPLUNC1. 本课题组采用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)联合 cDNA microarray 技术对人鼻咽上皮组织特异性表达基因进行了分离鉴定, 克隆和鉴定了在鼻咽部相对特异表达基因 *Splunc1* 和 *Lplunc1*^[19]. 在多种组织中进行表达谱分析, 发现 *Splunc1* 和 *Lplunc1* 在人鼻咽、气管、肺和唾液腺有表达, 而在其他组织中几乎不表达^[19]. 通过制备 SPLUNC1 高特异性抗体, 对人体 42 种组织通过免疫组化进行精细定位发现, SPLUNC1 蛋白主要分布于上呼吸道等与外界环境及有害物质直接接触的部位, 由这些部位的上皮及黏膜下腺体表达, 在上皮细胞的顶端、浆液腺与睑结膜的睑板腺以及腺导管内表达量最高^[20]. Bingle 等^[18]则证实 LPLUNC1 是气道上皮和鼻道中杯状细胞分泌的产物, 在气道黏膜下层腺体以及口鼻中的小腺体中表达, SPLUNC1 也在上呼吸道、鼻道上皮及气道黏膜下层腺体中表达, 同时还是一些大唾液腺和小黏液腺的黏液细胞中表达^[21].

利用全基因组表达谱芯片^[22-24], 我们系统分析了 *plunc* 家族所有成员在正常鼻咽上皮和鼻咽癌中的表达状态, 发现尽管 *plunc* 家族成员在染色体上

成簇分布, 但在正常鼻咽上皮中仅有 *Splunc1* 和 *Lplunc1* 有较高水平表达且在鼻咽癌中显著下调($P < 0.001$), *Splunc3* 仅有较低水平的表达且在鼻咽癌和正常鼻咽上皮中没有显著差异, 其余 *plunc* 家族成员则在大部分正常和鼻咽癌组织样本中均不表达, 这些基因芯片结果得到了 Real-time PCR 的进一步验证(曾朝阳等未发表结果). 因此, 对于 *plunc* 家族成员在鼻咽癌发生发展过程中的作用和机制研究, 我们主要关注于 *Splunc1* 和 *Lplunc1* 这两个基因.

2 PLUNC 蛋白的免疫防御功能

PLUNC 蛋白家族成员均含有信号肽, 相对特异表达并分泌到呼吸道等与外界环境直接接触的上皮表面, 且都含有 BPI 结构域, 表明它们可能参与了机体的天然免疫防御. 晶体衍射分析表明, BPI 结构域是一个疏水的桶状结构^[25], 该桶状结构能与革兰氏阴性细菌细胞壁组分脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)特异性结合, 具有中和内毒素及直接杀菌作用. 我们表达重组的 SPLUNC1 蛋白用于处理革兰氏阴性细菌, 证实 SPLUNC1 蛋白确实能抑制细菌的生长, 具有明显的杀菌或抑菌作用^[26], 体外细菌脂多糖结合实验进一步证实 SPLUNC1 蛋白能与 LPS 直接特异性结合^[27], 通过 LPS 细胞摄入实验证明 SPLUNC1 还可通过其 BPI 结构域与进入细胞的 LPS 结合^[27], 从而发挥清除细菌的作用.

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)与鼻咽癌发病密切相关^[1], 我们的实验也证实 SPLUNC1 蛋白作为天然免疫分子, 除了发挥抑制和杀灭细菌的作用外, 还具有抑制 EBV 的作用. 利用重组表达的 SPLUNC1 处理 EBV 转化的细胞, 我们发现 SPLUNC1 能明显促进 EBV 感染细胞的凋亡与裂解, 同时部分 EBV 自身也出现明显的结构破损^[26]. 此外, SPLUNC1 还可抑制 EBV 编码的瘤基因 *Lmp1* 表达, 同时促进 EBV 表面糖蛋白 gp350 的表达, gp350 的表达有利于 EBV 被人体免疫系统识别, 并启动补体途径和抗体依赖细胞介导的细胞毒(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)作用对 EB 病毒进行清除^[26].

PLUNC 蛋白除了直接杀灭或抑制细菌和病毒发挥免疫防御功能外, 还具有抑制炎症反应的作用. 作为革兰氏阴性细菌的主要成分, LPS 被认为

是细菌引起慢性感染的主要毒素, 我们发现, LPS 不仅能刺激巨噬细胞等炎症相关细胞分泌炎症因子引起炎症反应, 同样也能直接刺激鼻咽癌等上皮细胞表达和分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 等炎症因子, 并激活细胞内 NF- κ B 等下游炎症反应通路, 引起炎症反应^[28-29]. 同时, 在 LPS 刺激巨噬细胞后, 用富含炎症因子的培养基上清液处理鼻咽癌细胞, 也会诱导鼻咽癌细胞内源性炎症因子的表达, 以维持和扩大局部炎症反应^[30]. 在这种炎症微环境下, 肿瘤细胞增殖能力得到增强, 表明慢性炎症在促进鼻咽癌发生发展过程中起到重要作用. 而 LPLUNC1 可明显抑制 LPS 诱导的鼻咽癌细胞和巨噬细胞分泌促炎因子, 并抑制 IL-6 等炎症因子介导的 NF- κ B 和 STAT3 等信号通路的激活, 参与抗炎反应. 在临床样本中, 我们发现, 大量鼻咽癌活检标本中存在炎症细胞如巨噬细胞的浸润, 同时炎症微环境中存在炎症因子如 IL-6 等的表达, 且高密度的肿瘤相关巨噬细胞浸润及 IL-6 的表达与鼻咽癌患者不良预后相关, 而 LPLUNC1 的表达水平与肿瘤相关巨噬细胞的浸润及 IL-6 的分泌呈负相关, 这也支持 LPLUNC1 对炎症细胞和炎症相关因子的抑制作用. 此外, 还有研究发现, SPLUNC1 蛋白能抑制支原体的生长并能抑制支原体诱导的 IL-8 的产生, SPLUNC1 可与 Toll 样受体 2 (Toll like receptor-2, TLR-2) 相互作用发挥宿主防御功能^[31-32].

3 PLUNC 蛋白的抑瘤功能

我们的多组基因芯片结果均显示 LPLUNC1 和 SPLUNC1 在正常鼻咽上皮中高表达, 在鼻咽癌组织中则显著下调或者不表达^[4, 22-23]. 随后, 我们利用组织芯片技术在鼻咽上皮癌变过程中不同临床阶段, 对 LPLUNC1 和 SPLUNC1 在较大样本的临床活检标本中进行了表达分析, 发现在轻度不典型增生 (mild dysplasia) 的鼻咽上皮组织中 PLUNC 蛋白 (包括 LPLUNC1 和 SPLUNC1) 就已明显表达下调, 随着鼻咽组织从轻度不典型增生向重度不典型增生及鼻咽癌的演进, PLUNC 蛋白的表达也逐步降低^[30, 33]. 由于 PLUNC 为分泌蛋白, 我们进一步收集了鼻咽癌和正常对照人群的鼻咽分泌物, 发现在鼻咽癌患者的鼻咽分泌物中 PLUNC 蛋白的浓度也显著低于正常对照人群, PLUNC 蛋白可作为鼻咽癌早期患病筛选的分子标记. 通过对鼻咽癌患者的

随访, 我们发现 PLUNC 的表达与鼻咽癌的临床预后密切相关, PLUNC 表达低的患者其预后较差^[30], 表明 LPLUNC1 和 SPLUNC1 可能在鼻咽癌的发生发展过程中起到抑瘤基因的作用.

为此我们进行了一系列的体内外实验以验证 PLUNC 蛋白在鼻咽癌发生发展过程中的抑瘤作用及其机制. 在鼻咽癌细胞系中重新表达 SPLUNC1^[33] 和 LPLUNC1^[34] 蛋白, 均可明显抑制鼻咽癌细胞的生长, 诱导鼻咽癌细胞的凋亡, 部分逆转鼻咽癌细胞在软琼脂中的停泊非依赖性生长 (anchorage independent growth) 等恶性表型, 降低鼻咽癌细胞在裸鼠皮下的成瘤能力.

Liao (廖前进) 等^[30] 发现, 鼻咽癌组织中浸润的肿瘤相关巨噬细胞及炎症因子 IL-6 (interleukin-6) 与患者不良预后密切相关, 并在体外培养细胞系中证实 LPS 刺激巨噬细胞及鼻咽癌细胞均可刺激细胞分泌 IL-6 等炎症因子, 激活 NF- κ B、STAT3 等炎症相关信号通路, 而 NF- κ B 等通路的激活可以促进鼻咽癌细胞的增殖. 在鼻咽癌细胞系中过表达 LPLUNC1 则可明显抑制 LPS 刺激后 IL-6 等炎症因子的分泌及 NF- κ B 通路的激活, 并阻遏炎症因子促进的鼻咽癌细胞增殖, 因此抑制炎症反应来阻止鼻咽癌的发生发展是 LPLUNC1 发挥抑瘤基因功能的机制之一^[30]. Yang (杨一新) 等^[34] 则利用基因芯片技术筛选过表达 LPLUNC1 后的鼻咽癌细胞差异表达基因, 发现 MAPK 及参与细胞周期调控通路多个分子表达改变, 进一步实验证实了 LPLUNC1 确实可以下调 MEK、ERK 等多个 MAPK 信号通路分子, 抑制 MAPK 信号通路活性, 从而下调 cyclinD1、CDK4 等的表达以及 Rb 的磷酸化, 进而抑制 AP1 和 E2F 等转录子的活性, 延缓鼻咽癌细胞周期 G1-S 期进程, 阻滞鼻咽癌细胞的增殖, 另外 LPLUNC1 还可以通过调控 Bcl-2 和 Bax 的表达, 促进鼻咽癌细胞的凋亡^[34] (图 2).

SPLUNC1 也可以通过两个方面发挥抑瘤作用: 一方面, SPLUNC1 可以抑制 EBV 病毒瘤基因 *Lmp1* 的表达^[26], 从而抑制 LMP1 及其激活的下游 PTEN/AKT 信号通路, 抑制 LMP1 对鼻咽癌发生发展的促进作用; 另一方面, 我们在利用 microRNA (miRNA) 芯片对转染 *SPLUNC1* 基因的鼻咽癌细胞系进行差异表达 miRNA 筛选时发现 SPLUNC1 可下调 miR-141 的表达^[35], 从而上调 miR-141 靶基因 PTEN, 进而负调控下游 AKT 信号转导通路抑制鼻

咽癌细胞的增殖, 并诱导鼻咽癌细胞凋亡. 同时 EBV 编码的潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)也可通过抑制 SPLUNC1 的表达影响

miR-141-PTEN-AKT 信号通路, 因此 EBV- LMP1、SPLUNC1 和 miR-141-PTEN-AKT 通路之间, 又存在较复杂的交互作用^[33](图 2).

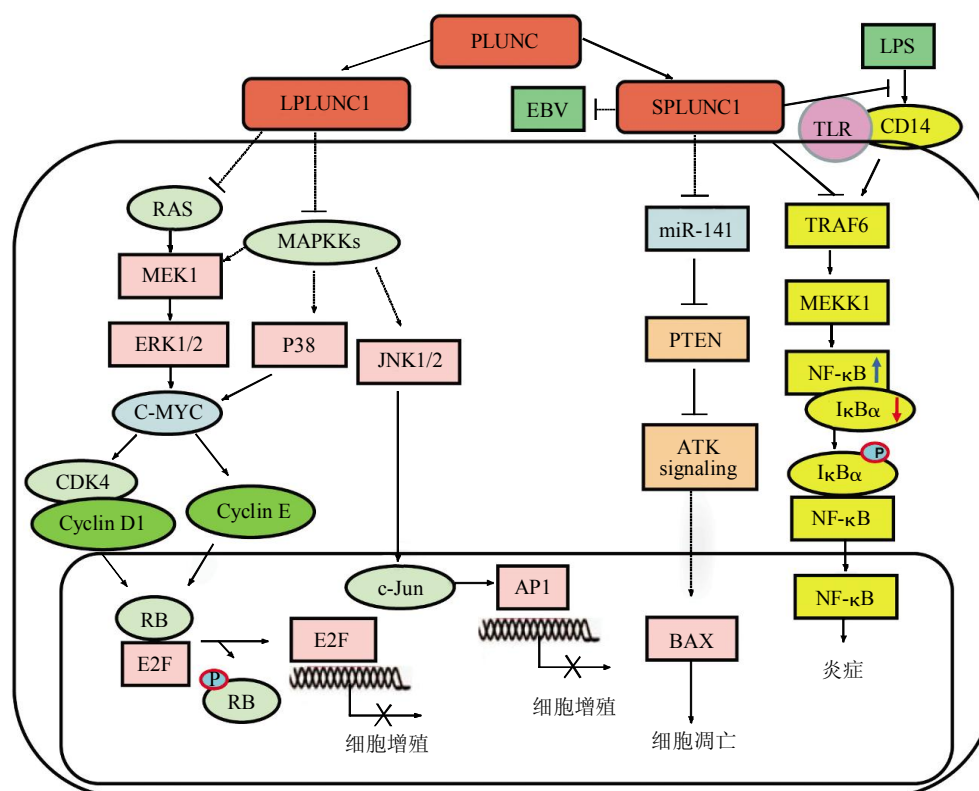


Fig. 2 Mechanisms of tumor suppressor genes, SPLUNC1 and LPLUNC1, in carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma

图 2 SPLUNC1 和 LPLUNC1 在鼻咽癌中发挥抑癌基因功能的机制

4 问题和展望

尽管通过多年的研究已经证实了 PLUNC 蛋白家族成员 SPLUNC1 和 LPLUNC1 是鼻咽上皮分泌的天然免疫分子, 能通过抑制和杀灭细菌及 EBV 等病毒发挥免疫防卫功能, 保护鼻咽上皮免受致癌微生物的侵袭, 并可抑制细菌、病毒等引起的炎症反应, 从而阻止鼻咽上皮的“炎-癌”演进. 同时 SPLUNC1 和 LPLUNC1 在鼻咽癌组织中表达下调, 在鼻咽癌细胞系中重表达 SPLUNC1 或者 LPLUNC1 可抑制肿瘤细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 部分逆转肿瘤细胞的恶性表型, 因此它们又具有明显的抑癌基因的功能. 但是 PLUNC 蛋白在鼻咽癌发生发展过程中的作用机制仍然存在一系列问题需要继续深入探索.

首先是 SPLUNC1 和 LPLUNC1 在鼻咽癌中表达下调的机制问题. 恶性肿瘤中抑癌基因的表达降低或缺失很多情况下与肿瘤基因组不稳定、抑癌基因所在的染色体区域缺失有关, 但人类染色体 20q11 区域并不是鼻咽癌中高频缺失区域^[36-38], 因此染色体片段的丢失应当不是鼻咽癌中 SPLUNC1 和 LPLUNC1 表达下调的主要原因. 虽然我们发现 EBV 表达的 LMP1 也可以抑制细胞内 PLUNC 蛋白的表达^[33], 但 LMP1 通过什么具体机制, 或者说通过哪些下游基因和通路抑制 PLUNC 蛋白表达, 目前还不是非常确切. 有意思的是, 在 *Splunc1* 上游 426 kb 处就是重要的 DNA 甲基转移酶 3β [DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta, DNMT3B] 基因, 而已有文献报道 LMP1 可以促进 DNA 甲基转移酶的表达^[39]. *Splunc1* 和 *Lplunc1* 表达下调是否

与它们启动子区域的甲基化相关? 姚开泰院士课题组通过关联分析发现 *Splunc1* 基因上游 C-2128T 和 C-1888T 两个单核苷酸多态位点与鼻咽癌发病相关, 且这两个位点鼻咽癌患者中有更多的 C 等位基因频率^[40], 这两个位点是否影响了 *Splunc1* 基因的启动子区域甲基化, 从而影响了鼻咽癌的易感性也是一个非常有意思的课题. 另外, 非编码 RNA 由于可以调控大量蛋白质编码基因的表达成为了今年生物医学领域的前沿和热点^[41-53], PLUNC 蛋白的表达下调是否与非编码 RNA 有关也引起了我们的兴趣.

其次是 PLUNC 蛋白发挥抑瘤功能的机制问题. SPLUNC1 和 LPLUNC1 都是典型的分泌型蛋白, 我们知道通常情况下细胞外的刺激对细胞产生影响, 往往需要有一个细胞膜上的受体分子接受和传递刺激, 并通过细胞内一系列分子的级联反应, 最终传到细胞核内, 启动下游相关基因的表达, 从而影响细胞的表型. PLUNC 蛋白在发挥抑瘤功能时, 作为细胞外的分泌蛋白如何调控细胞内的 MAPK、STAT3、AKT 等信号通路? 它们在细胞膜上是不是存在相应的受体? SPLUNC1 和 LPLUNC1 在发挥抑瘤功能时, 它们及它们下游的信号通路之间是否存在交互作用(cross talk)? 这些问题的阐明, 对更深入了解 PLUNC 蛋白在鼻咽癌中的作用机制, 进一步指导鼻咽癌的防治将具有重要的意义.

参 考 文 献

- [1] Zeng Z, Huang H, Zhang W, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: advances in genomics and molecular genetics. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(10): 966-975
- [2] Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2004, **64**(6): 1972-1974
- [3] Zeng Z, Zhou Y, Zhang W, *et al.* Family-based association analysis validates chromosome 3p21 as a putative nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus. *Genet Med*, 2006, **8**(3): 156-160
- [4] Zhang W, Zeng Z, Zhou Y, *et al.* Identification of aberrant cell cycle regulation in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma by cDNA microarray and gene set enrichment analysis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, **41**(5): 414-428
- [5] Zhao G J, Tang C K. Advances on the relationship of innate immune response and atherosclerosis. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(5): 406-415
- [6] Zheng Y, Xing Y L, Chen X J, *et al.* Regulation of innate immunity signaling by STING, a stimulator of interferon genes. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(1): 5-14
- [7] Huang H B, Deng M, Zheng Y, *et al.* Innate immune protein lactotransferrin prevents initiation and arrests progression of nasopharyngeal carcinoma. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(4): 319-324
- [8] Yang X X, Wang K, Chen X J, *et al.* Functions and regulation of MAVS, the mitochondrial antiviral signaling protein in innate immunity. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(5): 397-405
- [9] Britto C J, Liu Q, Curran D R, *et al.* Short palate, lung, and nasal epithelial clone-1 is a tightly regulated airway sensor in innate and adaptive immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, **48**(6): 717-724
- [10] Weston W M, LeClair E E, Trzyna W, *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *J Biol Chem*, 1999, **274**(19): 13698-13703
- [11] LeClair E E, Nguyen L, Bingle L, *et al.* Genomic organization of the mouse plunc gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **284**(3): 792-797
- [12] Bingle C D, Craven C J. Comparative analysis of the PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt 4): 806-809
- [13] Wheeler T T, Haigh B J, Broadhurst M K, *et al.* The BPI-like/PLUNC family proteins in cattle. *Biochem Soc Trans*, 2011, **39**(4): 1006-1011
- [14] Bingle C D, LeClair E E, Havard S, *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci*, 2004, **13**(2): 422-430
- [15] Bingle C D, Seal R L, Craven C J. Systematic nomenclature for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as a subfamily of the BPI fold-containing superfamily. *Biochem Soc Trans*, 2011, **39**(4): 977-983
- [16] Liu Y, Bartlett J A, Di M E, *et al.* SPLUNC1/BPIFA1 contributes to pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* respiratory infection. *Am J Pathol*, 2013, **182**(5): 1519-1531
- [17] Bingle L, Wilson K, Musa M, *et al.* BPIFB1 (LPLUNC1) is upregulated in cystic fibrosis lung disease. *Histochem Cell Biol*, 2012, **138**(5): 749-758
- [18] Bingle C D, Wilson K, Lunn H, *et al.* Human LPLUNC1 is a secreted product of goblet cells and minor glands of the respiratory and upper aerodigestive tracts. *Histochem Cell Biol*, 2010, **133**(5): 505-515
- [19] Zhang B, Nie X, Xiao B, *et al.* Identification of tissue-specific genes in nasopharyngeal epithelial tissue and differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, **38**(1): 80-90
- [20] Zhou H D, Fan S Q, Zhao J, *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol*, 2006, **125**(3): 315-324
- [21] Bingle L, Cross S S, High A S, *et al.* SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. *J Pathol*, 2005, **205**(4):

- 491–497
- [22] Zeng Z, Zhou Y, Xiong W, *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate molecular markers in nasopharyngeal carcinoma using microdissection and cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, **133**(2): 71–81
- [23] Zeng Z Y, Zhou Y H, Zhang W L, *et al.* Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Hum Pathol*, 2007, **38**(1): 120–133
- [24] Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, *et al.* Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by microarray analysis of subtracted cDNA libraries constructed by suppression subtractive hybridization. *Eur J Cancer Prev*, 2008, **17**(6): 561–571
- [25] Beamer L J. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt 4): 791–794
- [26] Zhou H D, Li X L, Li G Y, *et al.* Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biochem*, 2008, **309**(1–2): 191–197
- [27] Zhou H D, Li G Y, Yang Y X, *et al.* Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. *Mol Immunol*, 2006, **43**(11): 1864–1871
- [28] Yang Y, Zhou H, Li W, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) regulates TLR4 signal transduction in nasopharynx epithelial cell line 5-8F *via* NF κ B and MAPKs signaling pathways. *Mol Immunol*, 2007, **44**(5): 984–992
- [29] Liao Q, Guo X, Li X, *et al.* Analysis of the contribution of nasopharyngeal epithelial cancer cells to the induction of a local inflammatory response. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, **138**(1): 57–64
- [30] Liao Q, Zeng Z, Guo X, *et al.* LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation *via* inhibiting the Stat3 activation. *Oncogene*, 2013(DOI: 10.1038/onc.2013.161)
- [31] Chu H W, Gally F, Thaikoottathil J, *et al.* SPLUNC1 regulation in airway epithelial cells: role of Toll-like receptor 2 signaling. *Respir Res*, 2010, **11**: 155
- [32] Sayeed S, Nistico L, St Croix C, *et al.* Multifunctional role of human SPLUNC1 in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun*, 2013, **81**(1): 285–291
- [33] Chen P, Guo X, Zhou H, *et al.* SPLUNC1 regulates cell progression and apoptosis through the miR-141-PTEN/p27 pathway, but is hindered by LMP1. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e56929
- [34] Yang Y, Liao Q, Wei F, *et al.* LPLUNC1 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth via down-regulation of the MAP kinase and cyclin D1/E2F pathways. *PLoS One*, 2012, **8**(5): e62869
- [35] Zhang L, Deng T, Li X, *et al.* microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network. *Carcinogenesis*, 2010, **31**(4): 559–566
- [36] Deng L, Jing N, Tan G, *et al.* A common region of allelic loss on chromosome region 3p25.3–26.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, **23**(1): 21–25
- [37] Shao J Y, Wang H Y, Huang X M, *et al.* Genome-wide allelotype analysis of sporadic primary nasopharyngeal carcinoma from southern China. *Int J Oncol*, 2000, **17**(6): 1267–1275
- [38] Shao J, Li Y, Wu Q, *et al.* High frequency loss of heterozygosity on the long arms of chromosomes 13 and 14 in nasopharyngeal carcinoma in Southern China. *Chin Med J (Engl)*, 2002, **115**(4): 571–575
- [39] Tsai C N, Tsai C L, Tse K P, *et al.* The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression *via* activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(15): 10084–10089
- [40] He Y, Zhou G, Zhai Y, *et al.* Association of *PLUNC* gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet*, 2005, **42**(2): 172–176
- [41] 龚朝建, 张姗姗, 唐珂, 等. MicroRNAs 与非可控性炎症相关肿瘤. *中南大学学报医学版*, 2013, **38**(6): 639–644
Gong Z, Zhang S, Tang K, *et al.* *J Cent South Univ(Med Sci)*, 2013, **38**(6): 639–644
- [42] Gong Z, Zhang S, Zhang W, *et al.* Long non-coding RNAs in cancer. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(12): 1120–1124
- [43] Li S, Yu B, Wang Y, *et al.* Identification and functional annotation of novel microRNAs in the proximal sciatic nerve after sciatic nerve transection. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(9): 806–812
- [44] Liang J W, Wang P, Chen L, *et al.* miR-133b may regulate mouse B cell development by targeting the transcription factor foxO1. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(8): 744–750
- [45] Yang C, Wei W. The miRNA expression profile of the uveal melanoma. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(4): 351–358
- [46] Zhang Y. Progress, challenges and new concepts in microRNAs. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(12): 1096
- [47] Zhang Y, Dong D, Yang B. Atrial remodeling in atrial fibrillation and association between microRNA network and atrial fibrillation. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(12): 1097–1102
- [48] Zhu Y M, Xu Q, Dong L R, *et al.* Identification of proteins associated with let-7a in gastric carcinoma cell line SGC-7901 by proteomics. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(5): 441–448
- [49] Gong Z J, Huang H B, Xu K, *et al.* Advances in microRNAs and TP53 gene regulatory network. *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(12): 1133–1144
- [50] Luo H T, Zhao Y. The functional roles of microRNA. *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(10): 979–980
- [51] Wu Y, Du J, Wang X, *et al.* Computational prediction and experimental verification of miRNAs in *Panicum miliaceum* L. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(9): 807–817
- [52] Zhang Y, Li Y K. Regulation of innate receptor pathways by microRNAs. *Sci China Life Sci*, 2013, **56**(1): 13–18
- [53] Zhang W, Huang C, Gong Z, *et al.* Expression of LINC00312, a long intergenic non-coding RNA, is negatively correlated with tumor size but positively correlated with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *J Mol Histol*, 2013, **44**(5): 545–554

The Effect and Mechanism of PLUNC Protein Family Against Inflammation and Carcinogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma*

WEI Fang^{1,2)}, LI Xia-Yu^{1,2)}, LI Xiao-Ling^{1,2)}, ZHANG Wen-Ling²⁾, LIAO Qian-Jin^{2,3)}, ZENG Yong³⁾,
GONG Zhao-Jian²⁾, ZHOU Ming^{1,2)}, MA Jian^{1,2)}, XIONG Wei^{1,2)}, SHEN Shou-Rong¹⁾, ZENG Zhao-Yang^{1,2)**}

¹⁾ Hunan Key Laboratory of Nonresolving Inflammation and Cancer, Disease Genome Research Center,
The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾ Key Laboratory of Carcinogenesis of Ministry of Health and Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion
of Ministry of Education, Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

³⁾ Hunan Provincial Tumor Hospital and The Affiliated Tumor Hospital of Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Secretion on the surface of human nasal mucosa contains many innate proteins, the key factors of which are SPLUNC1 and LPLUNC1, members of the palate, lung and nasal epithelium clone (PLUNC) family. These two proteins are highly expressed in nasopharyngeal epithelium with the relative specificity. Both of them have bacterial/permeability-increasing protein (BPI) domain which can bind to lipopolysaccharide (LPS) to inhibit or kill bacterial growth directly. They also have the immuno defense function to protect nasopharyngeal epithelium from Epstein-Barr virus (EBV) and some other pathogenic microorganism effectively. These proteins play a significant role in the process of chronic inflammation and carcinogenesis of nasopharyngeal epithelium by inhibiting the secretion of inflammatory factors, such as IL-6, through activating NF- κ B and STAT3 signaling pathways. In addition, they also can suppress nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell growth and induce cell apoptosis through MAPK and miR-141-PTEN-AKT signaling pathways when the PLUNC proteins are re-expressed in NPC cell lines. Further study about the mechanism of PLUNC protein family in pathogenesis of NPC has important significance for the prevention and treatment guidance of NPC.

Key words PLUNC protein family, inflammation, nasopharyngeal carcinoma

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00396

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81071644, 81172189, 81171930, 81201730, 81272298, 81372907, 81301757), The Natural Science Foundation of Hunan Province (14JJ1010), and The Fundamental Research Funds for The Central Universities (2011JQ020).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84805383, E-mail: zengzhaoyang@xysm.net

Received: August 29, 2013 Accepted: November 19, 2013