

染色体 7q32-ter 鼻咽癌相关基因的初步研究*

张小慧 李忠花 张必成 董利 周鸣 曹利 唐珂 李伟芳 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为克隆 7q32-ter 区域等位基因杂合性丢失最小共同缺失区的鼻咽癌相关基因. 以 STS D7S509 为探针, PCR 法筛选位于该区的细菌人工染色体 (BAC) 克隆, 应用 EST 介导的定位-候选克隆策略并结合生物信息学筛选出在鼻咽癌细胞株和活检组织中表达增强的 EST AA773454, cDNA 克隆测序和生物信息学资源获取全长 cDNA, DNA 印迹和甲基化分析研究其表达增强的机制. 结果表明, 克隆的 NAG18 基因 cDNA 全长 802 bp, 编码 227 个氨基酸, 定位于胞核. 该基因分别与人、鼠 TAXREB107 基因及 RPL6 基因高度同源. 其表达增强的机制不是基因拷贝数的丢失和甲基化位点的改变. 可以断定 NAG18 是定位于 7q32-ter 最小共同缺失区的鼻咽癌相关基因, 它是一高度保守的基因, 参与了 DNA 的转录活化.

关键词 7q32-ter 最小共同缺失区, 鼻咽癌, 相关基因

学科分类号 R73

人类肿瘤的发生是一个包含多重遗传变化的多步骤过程, 其中一项重要的遗传变化是肿瘤抑制基因的失活和癌基因的激活^[1]. 研究表明, 环境因素和遗传因素的协同作用是鼻咽癌的主要病因. 环境因素方面, EB 病毒与鼻咽癌的相关性已得到肯定, 而在遗传因素方面, 对已知癌基因和抑癌基因的研究没有发现与之特异相关的基因. 对鼻咽癌的等位基因杂合性丢失分析 (loss of heterozygosity, LOH) 和基因表达谱的研究都表明还有多个未知的肿瘤相关基因在鼻咽癌的发生发展中起作用. 分子遗传学和细胞遗传学的研究表明: 鼻咽癌细胞在 7q32-ter 区有非随机的染色体片段丢失^[2], 其后研究发现在 7q32-ter 的微卫星位点 D7S500~D7S495 附近存在约 30%~46% 的高频率等位基因杂合性缺失, 遗传距离约 9.8 cM, 强烈提示该区域定位有与鼻咽癌密切相关的抑癌基因^[3]. 最近采用更高密度的微卫星位点分析显示 D7S500-D7S509-D7S495 是 LOH 高频率缺失集中的区域, 最小共同缺失区在 D7S509 附近, 距其邻近的微卫星位点 D7S500 和 D7S495 分别为 2.9 cM 和 1.2 cM^[4]. 因此, 我们以 STS D7S509 为探针 PCR 法筛选定位于该区的 BAC 克隆, 采用定位-候选克隆策略分析定位于该细菌人工染色体 (BAC) 的表达序列标签 (ESTs) 在鼻咽癌细胞和活检组织与正常鼻咽上皮细胞中表达差异情况, 筛选到一个与鼻咽癌相关的 EST, 并克隆到定位于 7q32-ter 最小共同缺失区的鼻咽癌相关基因.

1 材料与方法

1.1 组织和细胞

低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞株 HNE1 为本所建株^[5], 原代培养的正常人胚鼻咽上皮细胞 12 例. 12 例原发性鼻咽癌活检组织由湖南省肿瘤医院提供, 病理诊断均为低分化鳞癌, 且活检前未经放疗和化疗.

1.2 BAC DNA 抽提与测序

BAC 克隆 (22710#) 购自 Genome System 公司, 采用 QIAGEN 公司的 QIAfilter Plasmid Maxi Kits 抽提和纯化质粒. 所有操作步骤按试剂盒提供的方法进行.

BAC DNA 测序采用鸟枪法: 气雾法打断 DNA, 末端补平并加 "A", 连接、转化到大肠杆菌, PCR 检测, 随机挑选 50 个阳性亚克隆采用 ABI 自动测序仪进行自动测序 (由大连宝生物技术有限公司测序).

1.3 DNA 和 RNA 抽提

按“分子克隆实验操作指南”提取 8 对鼻咽癌活检标本及配对外周血标本的 DNA, 根据

* 国家 863 项目 (102-10-01-05) 和 973 重大项目 (“疾病基因组学” 理论和技术体系的建立鼻咽癌子项目) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2000-11-23, 接受日期: 2000-12-12

TRIZOL™ (GIBCOL/BRL 公司) 操作说明提取鼻咽癌细胞株 HNE1、原代培养的正常人胚鼻咽上皮细胞和 12 例鼻咽癌活检组织的 RNA。

1.4 差异 RT-PCR

用 DNaseI 消化 RNA 中痕量的 DNA: 反应体积 50 μ l, 总 RNA 10 μ g、DNase I 5 μ l, RNasin 1.5 μ l、Tris·HCl (pH 8.3) 10 mmol/L、MgCl₂ 10 mmol/L, 37 °C 1 h, 苯酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 最后 RNA 溶于 20 μ l 无核酸酶的水中。根据逆转录试剂盒 (Promega 公司) 说明作逆转录反应, 反应体积 20 μ l, 模板 RNA 1 μ g, 取 4 μ l 逆转录产物先后加入 EST 和 GAPDH 引物 (GAPDH 引物在第 5 个循环时加入) 进行扩增。PCR 反应参数: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 50 s, 56~58 °C 50 s, 72 °C 50 s 反应循环 30 次, 72 °C 延长 10 min, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 RNA 印迹和 DNA 印迹

按“分子克隆实验指南”操作程序及 Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots (# 7780-1, CLONTECH 公司) 说明操作, 68 °C 杂交, 2 × SSC、0.05% SDS 室温下淋洗膜 3 次, 然后 37 °C 洗膜 30~40 min, 0.1 × SSC、0.1% SDS 50 °C 洗膜 40 min, -70 °C 放射自显影。

1.6 甲基化分析

用 *Hpa*II 和 *Msp*I 一对内切酶完全消化 HNE1 基因组 DNA, 内切酶的用量 8~10 U 每微克 DNA, 37 °C 水浴 16~18 h, 其余步骤同 DNA 印迹。

1.7 数据处理

样本琼脂糖电泳照片及 RNA 印迹结果用 TIPAS98 图像分析仪的图像分析系统进行灰度扫描, 分析测定面积的积分光密度值 (IA)。样本量的数值 (IA 比值) 以目的片段 IA/内对照 GAPDH 或 β -actin IA 的比值来表示, 两样本的 IA 比值大于 1 或小于 0.5 则认为有差异。

1.8 cDNA 克隆测序

cDNA 克隆购自 Research Genetics Inc., 用质粒纯化试剂盒 (Promega 公司) 抽提、纯化, ABI 自动测序仪测序。

1.9 生物信息学分析

用于 cDNA 序列分析的各类数据库有: NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 BLASTN、ORF、UniGene 等, GDB (Genome Database), ExpaSy, The Sanger Center, Swiss protein 等。

2 结 果

2.1 BAC 克隆 22710 的测序结果

50 个阳性克隆的测序结果与 GenBank 的高通量测序结果进行 BLAST 分析, 发现所有序列均与克隆 AC009245 (215767kb) 高度同源, 同源性高达 99%。因而 BAC 克隆 (22710#) 的 gDNA 序列已得到。

2.2 定位于 BAC 克隆的鼻咽癌相关 ESTs 的筛选

将 BAC 克隆的序列与 dbEST 匹配, 挑选 30 个上皮来源的代表新基因的 3' EST, RT-PCR 检测它们在正常人胚鼻咽上皮和鼻咽癌活检组织的表达差异。发现 EST AA773454 在正常人胚鼻咽上皮表达微弱而在鼻咽癌细胞株 HNE1 中表达强烈, 在鼻咽癌活检组织中有 60% (7/12) 的表达增强 (鼻咽癌细胞和活检组织的 IA 比值/正常鼻咽上皮的 IA 比值分别为 0.89/0 和 1.51/0, 图 1), RNA 印迹证实了这一结果 (T 的 IA 比值/N 的 IA 比值大于 1, 图 2)。Multiple Tissue Membrane (MTN™)

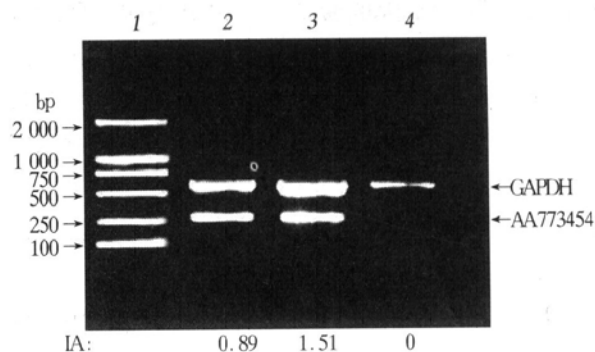


Fig 1 Differential expression of EST AA773454 in HNE1, NPC biopsies and human normal embryonic nasopharyngeal epithelia by RT-PCR

1: marker; 2: HNE1; 3: NPC biopsy; 4: human embryonic nasopharyngeal epithelia.

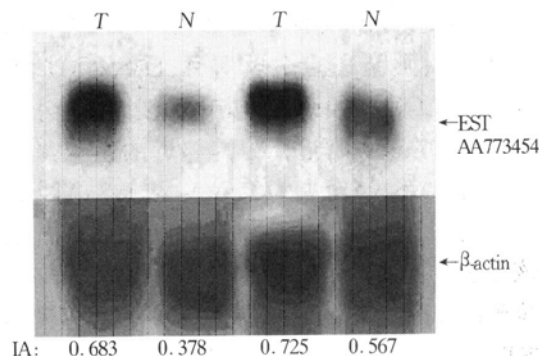


Fig 2 Differential expression of EST AA773454 between human embryonic nasopharyngeal epithelia and HNE1 by Northern blot

N: human embryonic nasopharyngeal epithelia; T: HNE1.

杂交表明该基因在人心、脑、肝、肾等多种组织中存在 800 bp 大小的转录本 (图 3)。

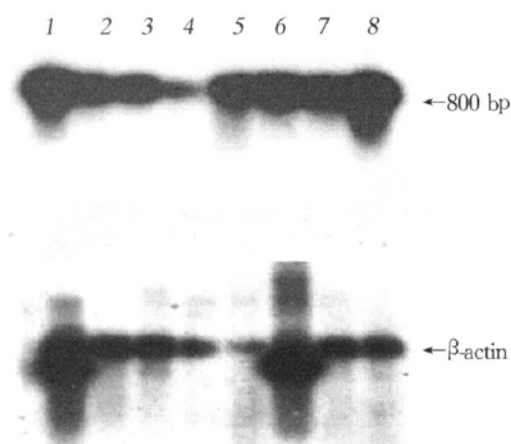


Fig. 3 Expression of NAG18 in MINTM blots by Northern blot
1: heart; 2: brain; 3: placenta; 4: lung; 5: liver; 6: skeletal muscle; 7: kidney; 8: pancreas.

2.3 NAG18 基因的全长克隆和结构的初步分析

测定包含 EST AA773454 相应 cDNA 克隆的序列, 获得全长为 802bp 的 cDNA 序列, 将该基因命名为 NAG18. 含有编码 227aa 的完整阅读框架, 3' 端有 polyA 尾和加尾信号 (图 4)。

```

GCACGAGCCCCATTGCAGCCGCAACCTGTCCTTGTCAGAGGAATTGGCAGGTATTCCCGATCTGCCATGTATTCCAGAAAG
M Y S R K
GCCATGTACAAGAGGAAGTACTCAGCCGCTAAATCCAAGGTTGAAAAGAAAAAGAAGGAGAAGGTTCTCGCAACTGTTACAA
A M Y K R K Y S A A K S K V E K K K K E K V L A T V T K
AACCAGTTGGTGGTGACAAGAACGGCGGTACCCGGGTGGTTAACTTCGCAAAATGCCTAGATATTATCCTACTGAAGATGT
P V G G D K N G G T R V V K L R K M P R Y Y P T E D V
GCCTCGAAAGCTGTTGAGCCACGGCAAAAAACCTTCAGTCAGCACGTGAGAAAAGTGCAGAGCCAGCATTACCCCCGGGACC
P R K L L S H G K K P F S Q H V R K L R A S I T P G T
ATTCTGATCATCTCTACTGGACGCCACAGGGGCAAGAGGGTGGTTTCTCTGAAGCAGCTGGCTAGTGCTTATTACTTGTGA
I L I I L T G R H R G K R V V F L K Q L A S G L L L V T
CTGGACCTCTGGTCTCAATCGAGTTCTCTACGAAGAACACACCAGAAATTTGTCATTGCCACTTCAACCAAAATCGATAT
G P L V L N R V P L R R T H Q K F V I A T S T K I D I
CAGCAATGTAAAAATCCCAAAACATCTTACTGATGCTTACTTCAAGAAGAAGAAGCTGCGGAAGCCAGACACCAGGAAGGT
S N V K I P K H L T D A Y F K K K K L R K P R H Q E G
GAGATCTTCGACACAGAAAAAGAGAAATATGAGATTACGGAGCAGCGCAAGATTGATCAGAAAGCTGTGGACTCACAAATTT
E I F D T E K E K Y E I T E Q R K I D Q K A V D S Q I L
TACCAAAATCAAAGCTATTCTCAGCTCCAGGGCTACCTGCGATCTGTGTTTGTCTGACGAATGGAATTTATCCTCACAA
P K I K A I P Q L Q G Y L R S V F A L T N G I Y P H K
ATTGGTGTCTTAAATGTCTTAAGAACCTAATTAATAGCTGACTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
L V F *

```

Fig. 4 Sequence and ORF of NAG18

||||||| : leucine zipper pattern.

BLAST 分析该基因与定位于 7q32-ter 的 BAC 克隆 22710 的同源性高达 98% (图 5), 说明该基因定位于 7 号染色体。

2.4 鼻咽癌相关基因的生物信息学分析

运用 Internet 中 BLASTN 将该基因的序列与 GenBank、EMBL、DDBJ、PDB 等数据库进行比较, 发现该基因与人 TAXREB107 基因 (921 bp)、ribosomal protein L6 (RPL6, 926 bp) 的同源性高达 99%, 与小鼠 TAXREB107 (950 bp)、RPL6 (950 bp) 的同源性高达 85%。该基因与 EST 库比较, 发现其与 60S RPL6 99% 同源。Swiss protein 预测该基因含有 684 bp 的完整阅读框架, 编码 227 个氨基酸, 蛋白质理论 pI/M_r: 10.62/26105.07, 该蛋白质定位于胞核, 含有 Disintegrin 的结构域。

2.5 NAG18 基因在鼻咽癌活检组织中的等位基因丢失与甲基化检测

DNA 印迹结果显示 6 对鼻咽癌活检组织及配对外周血 DNA 均有类似指纹的杂交带, 说明 AA773454 这一片段的确存在于人基因组中, 并且含有重复基因 RPL6 (图 6)。甲基化状况分析该基因在 HNE1 中不存在甲基化程度的增高 (图 7)。

```

NAG18: 6 agccccattgcagccgaaccctgtccttgcagaggaattggcaggtattcccgatctg 65
|||||
AC009245: 115836 agccccattgcagccgaaccctgtcattgtcagaggaattggcaggtattcccgatctg 115895
NAG18: 66 ccattgtattccagaaggccaigtacaagaggaagtactcagccgctaaatccaaggttg 125
|||||
AC009245: 115896 ctatgtattccagaaggccaigtacaagaggaagtactcagccgctaaatccaaggttg 115955
NAG18: 126 aaagaaaaaagaaggagaaggttctcgcaactgttacaaaaccagttggtggtgacaaga 185
|||||
AC009245: 115956 aaaagaaaaaagaaggagaaggttctcgcaactgttacaaaaccagttggtggtgacaaga 116015
NAG18: 186 acggcgtatcccggttggttaaaacttcgcaaaatgcctagatattatcctactgaagatg 245
|||||
AC009245: 116016 acggcgtatcccggttggttaaaacttcgcaaaatgcctagatattatcctactgaagatg 116075
NAG18: 246 tgcctcgaagctgttgagccacagcaaaaaacccttcagtcagcagtgagaaaactgc 305
|||||
AC009245: 116076 tgcctcgaagctgttgagccacagcaaaaaacccttcagtcagcagtgagaaaactgc 116135
NAG18: 306 gagccagcattacccccgggaccattctgatcatcctcactggacgccacaggggcaaga 365
|||||
AC009245: 116136 gagccagcattacccccgggaccattctgatcatcctcactggacgccacaggggcaaga 116195
NAG18: 366 aggtggttttctcgaagcagctggctagtggttattactgtgactggacctctgtgccc 425
|||||
AC009245: 116196 ggggtggttttctcgaagcagctggctagtggttattactgtgactggacctctgtgccc 116255
NAG18: 426 tcaatcgagttcctctacgaagaacacaccagaaatttgtcattgccacctcaacaaaa 485
|||||
AC009245: 116256 tcaatcgagttcctctacgaagaacacaccagaaatttgtcattgccacctcaacaaaa 116315
NAG18: 486 tcgatatcagcaatgtaaaaatcccaaacatcttactgatgcttacttcaagaagaaga 545
|||||
AC009245: 116316 tcgatatcagcaatgtaaaaatcccaaacatcttactgatgcttacttcaagaagaaga 116375
NAG18: 546 agctgcgaagcccagacaccaggaaggtgagatcttcgacacagaaaaagagaatatg 605
|||||
AC009245: 116376 agctgcgaagcccagacaccaggaaggtgagatcttcgacacagaaaaagagaatatg 116435
NAG18: 606 agattacggagcagcgcaagattgatcagaagctgtggactcacaattttaccnaaaa 665
|||||
AC009245: 116436 agattacggagcagcgcaagattgatcagaagctgtggactcacaattttaccnaaaa 116495
NAG18: 666 tcaaagctattctcagctccaggctacctgtgatctgtggttgcctgacgaatggaa 725
|||||
AC009245: 116496 tcaaagctattctcagctccaggctacctgtgatctgtggttgcctgacgaatggaa 116555
NAG18: 726 ttatcctcacaatttggtgttctaaatgtcttaagaaccttaattaaatagtgactac 784
|||||
AC009245: 116556 ttatcctcacaatttggtgttctaaatgtcttaagaaccttaattaaatagtgactac 116614

```

Fig.5 Homology analysis of NAG18

: ORF region of NAG18.

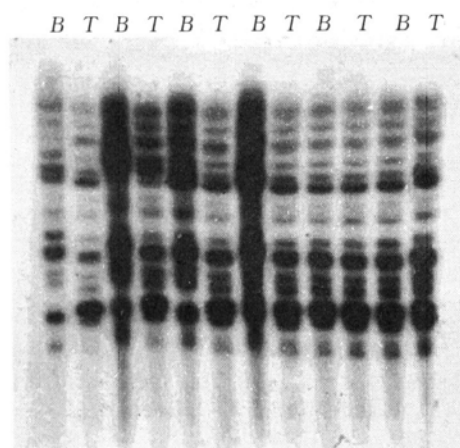


Fig 6 Southern blot of NAG18

T: NPC biopsies; B: paired peripheral blood.

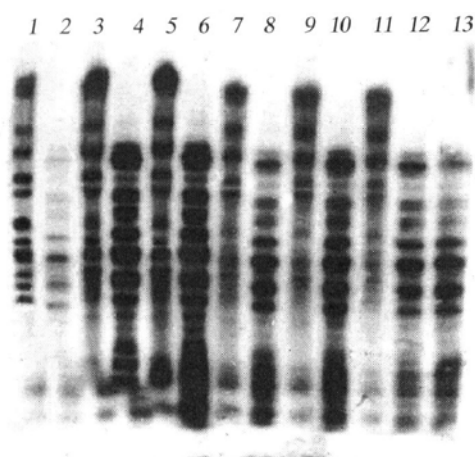


Fig 7 Methylation analysis of NAG18 in HNE1 cells

1, 3, 5, 7, 9, 11: *Msp* I digestion; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13: *Hpa* II digestion.

3 讨 论

研究表明, 人类染色体 7q31-ter 在多种恶性肿瘤中存在不同程度、不同区域的缺失, 如散发性肾癌、乳腺癌、前列腺癌、进展期卵巢癌、肠癌和其他头颈部肿瘤等在 7q31 区域有缺失^[6~14], 将 7 号染色体导入人绒毛膜癌细胞株和鳞癌细胞株均可使其恶性表型明显缓解^[15,16], 推测该染色体上可能存在一个或多个抑癌基因。

分子遗传学研究发现, 在 7q32 的微卫星位点 D7S500~ D7S495 附近存在等位基因杂合性缺失, 遗传距离 9.8 cM, 并克隆到定位于该区的一个鼻咽癌负相关基因^[17,18], 近期的研究更是将 LOH 缩小到 4.1 cM. 鼻咽癌活检组织中 7q32-ter 区域的杂合性丢失状况强烈提示该区定位有鼻咽癌抑癌基因。本实验在明确其最小共同缺失区位于 D7S500~ D7S509~ D7S495 之间的基础上, 采用 STS 序列

作为探针筛选定位于该区的 BAC 克隆, 并利用定位-候选策略较系统地检测了定位于该区域的 30 个 ESTs 的表达水平, 筛选到一个与鼻咽癌呈正相关的 EST AA773454, 分子生物学检测其在鼻咽癌细胞和活检组织中的表达高于正常组织, cDNA 克隆测序获得全长为 802 bp 的基因 NAG18, 是一个定位于 7q32 的鼻咽癌相关基因。计算机分析该基因含有 684 bp 的完整阅读框架, 编码 227 个氨基酸, 为一偏碱性的蛋白质, 定位于胞核, 且编码区含有亮氨酸拉链模式 (leucine zipper pattern), 说明该基因是与 DNA 转录活化有关的基因。

生物信息学分析该基因分别与人、鼠的 TAXREB107 基因高度同源。TAX 是人类 T 细胞白血病病毒 I 的转化蛋白, 它能通过与细胞内 IKK 激酶作用而持续活化核转录因子 NF- κ B, 在成人 T 细胞白血病中扮演着重要角色^[19]。而 EB 病毒编码的致癌蛋白 LMP1 通过激活 NF- κ B 而参与肿瘤的发生与发展^[20,21]。TAXREB107 是 DNA 结合蛋白, 能与位于人类 T 细胞白血病病毒 I 的长末端重复序列的 tax-responsive 增强子元件的 C 区特异性结合, 研究表明它可能参与了 tax 介导的转录的反式激活^[22]。

由此可见, NAG18 基因在鼻咽癌组织中表达增高的原因是通过与 DNA 结合从而激活 DNA 的转录, 并非基因拷贝数的丢失和甲基化位点的改变而在鼻咽癌的发生发展中起作用。此外, 该基因及其编码蛋白与人 RPL6 基因及编码产物高度同源, 表明该基因亦是一高度保守的基因, 故而 DNA 杂交显示有类似指纹的带型。

参 考 文 献

- 1 Miyoshi E, Uozumi N, Noda K, *et al.* Expression of alpha-fucosyltransferase in rat tissues and human cancer cell lines. *Int J Cancer*, 1997, **72** (6): 1117~ 1121
- 2 陈孝光, 姚开泰. RFLP 在鼻咽癌研究中的应用. 中国科协首届青年学术论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 48~ 52
Chen X G, Yao K T. Study of PFLP in nasopharyngeal carcinoma. In: Chinese Science Association ed. First Collection of Scientific Theses of Young Scholars in Chinese Science Association. Beijing: Publication of Chinese Science and Technology, 1992. 48 ~ 52
- 3 Tan G L, Xiao J Y, Tian Y Q, *et al.* Analysis of deletion mapping on chromosome 7q31.1 ~ 36 in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 1998, **4** (3): 165~ 171
- 4 唐湘娜, 阳剑波, 李桂源等. 鼻咽癌染色体 7q32 区域微缺失的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2000, **17** (3): 149~ 152
Tang X N, Yang J B, Li G Y, *et al.* *Chin Medical Genetics*, 2000, **17** (3): 149~ 152
- 5 Yao K T, Zhang H Y, Glaser R, *et al.* Establishment and

- characterization of two epithelial tumor cell lines (HNE-1 and HONE-1) latently infected with Epstein-Barr virus and derived from nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*, 1999, **45** (1): 83~ 86
- 6 Shridhar V, Sun Q C, Miller O J, *et al.* Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal carcinomas. *Oncogene*, 1997, **15** (22): 2727~ 2733
 - 7 Zenklusen J C, Bieche I, Lidereau R, *et al.* (c-a)_n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (25): 12155~ 12158
 - 8 Zenklusen J C, Thompson J C, Troncoso P, *et al.* Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinoma: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Res*, 1994, **54** (21): 6370~ 6373
 - 9 Koike M, Takeuchi S, Yokota J, *et al.* Frequent loss of heterozygosity in the region of D7S523 locus in advanced ovarian cancer. *Gene Chromo Cancer*, 1997, **19** (1): 1~ 5
 - 10 Zenklusen J C, Weitzel J N, Ball H P, *et al.* Frequent loss of heterozygosity in human squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad tumor suppressor gene. *Oncogene*, 1995, **11** (2): 359~ 363
 - 11 Latil A, Cussenot O, Fournier G, *et al.* Loss of heterozygosity at 7q31 is a frequent and early event in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 1995, **1** (11): 1385~ 1389
 - 12 Bieche I, Khodja A, Driouch K, *et al.* Genetic alteration mapping on chromosome 7 in primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1997, **3** (6): 1009~ 1016
 - 13 Wang X L, Uzawa K, Miyakawa A, *et al.* Localization of a tumour suppressor gene associated with human oral cancer on 7q31.1. *Int J Cancer*, 1998, **75** (5): 671~ 674
 - 14 Shridhar V, Sun Q C, Miller O J, *et al.* Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene*, 1997, **15** (22): 2727~ 2733
 - 15 Masahiro T, Sasaki M, Kato H, *et al.* Human chromosome carries a putative tumor suppressor gene (s) involved in chriocarcinoma. *Oncogene*, 1997, **15** (23): 2772~ 2781
 - 16 Zenklusen J C, Barret J C, Oshimura M, *et al.* Inhibition of tumorigenicity of a murine squamous cell carcinoma (SCC) cell line by a putative tumor suppressor gene on human chromosome 7. *Oncogene*, 1994, **9** (10): 2817~ 2825
 - 17 江 宁, 湛凤凰, 谢 奕, 等. 构建 7q32 区域鼻咽癌和鼻咽正常上皮细胞部分基因的图谱. *中华医学遗传杂志*, 1998, **15** (5): 267~ 270
Jiang N, Zhan F H, Xie Y, *et al.* *Chin Medical Genetics*, 1998, **15** (5): 267~ 270
 - 18 江 宁, 邓龙文, 谭国林, 等. 一个定位在 7q32 染色体区域的鼻咽癌负相关 EST. *遗传学报*, 1999, **26** (4): 301~ 308
Jiang N, Deng L W, Tan G L, *et al.* *Acta Genetica Sinica*, 1999, **26** (4): 301~ 308
 - 19 Sun S C, Ballad D W. Persistent activation of NF- κ B by the Tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular I- κ B kinases. *Oncogene*, 1999, **19** (49): 6948~ 6958
 - 20 Mosialos G. The role of Rel/NF- κ B proteins in viral on carcinogenesis and the regulation of viral transcription. *Seminars in Cancer Biology*, 1997, **8** (1): 121~ 129
 - 21 潘 雷, 曹 亚. EB 病毒 LMP1 促进鼻咽癌中 NF- κ B 表达的实验研究. *中国耳鼻喉科颅底外科学杂志*, 1999, **2** (3): 54~ 57
Pan L, Cao Y. *Chin J Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 1999, **2** (3): 54~ 57
 - 22 Morita T, Sato T, Nyunoya H, *et al.* Isolation of a cDNA clone encoding DNA-binding protein (TAXREB107) that binds specifically to domain C of the tax-responsive enhancer element in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I. *Aids Res Hum Retroviruses*, 1993, **9** (2): 115~ 121

Primary Study of Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) Associated Gene on Chromosome 7q32-ter^{*}

ZHANG Xiao-Hui, LI Zhong-Hua, ZHANG Bi-Cheng, DONG Li, ZHOU Ming,
CAO Li, TANG Ke, LI Wei-Fang, LI Gui-Yuan^{**}

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

Abstract In order to clone a novel putative NPC associated gene on the smallest common deletion region of 7q32-ter. BAC clone was screened by PCR using STS D7S509 probe. The up-regulated expression of 3' end expressed sequence tags (ESTs) localized within this smallest common deletion region were screened in NPC cell line HNE1 and NPC biopsies using EST-mediated positional candidate clone and bioinformatics. The full-length cDNA of candidate EST was cloned through cDNA clone sequencing and bioinformatics. Southern blot and methylation analysis were used to study the mechanism of up-regulated expression of NAG18 in NPC. The results showed that the full-length cDNA of NAG18 is 802bp, its encoding protein is 227 amino acids. It is highly homologous to human and mouse TAXREB107 and RPL6. Loss of gene copies and aberrant methylation are not the mechanism of its up-regulated expression. It can be concluded that the gene NAG18 located in this region may be a putative NPC associated gene. It is a highly conserved gene. It may participate in Tax-mediated trans-activation of transcription.

Key words nasopharyngeal carcinoma, the smallest common deletion region of 7q32-ter, NPC associated gene

^{*} This work was supported by grants from National High Technology Research and Development Project "863" (102-10-01-05) and State Key Basic Research Program "973" (NPC subprogram, foundation of "Disease Genomics" theory and technology system).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: lgy@public.cs.hn.cn

Received: November 23, 2000 Accepted: December 12, 2000