

鼻咽癌差异表达基因 PROL4 特性分析*

张必成 周 鸣 周后德 肖炳焱 聂新民 朱诗国 李伟芳 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 在正常成人鼻咽与鼻咽癌活检组织之间进行抑制性消减杂交和微阵列 (microarray) 杂交, 获得了鼻咽癌差异表达基因 PROL4 的全长 cDNA 序列, 其 GenBank 登录号为: AF530472. 该基因包含 567 个核苷酸, 其编码产物是由 134 个氨基酸组成的富含脯氨酸蛋白. 采用 RT-PCR 证实了 PROL4 基因在鼻咽癌细胞株 HNE1 和鼻咽癌活检组织中表达下调或缺失 (42/48). 12 种组织 RNA 印迹显示: PROL4 基因在人骨骼肌、胸腺和肺组织中表达, 其转录本大小约为 0.6 kb, 与所克隆的 PROL4 基因的 cDNA 大小一致. 进而通过肿瘤表达谱阵列 (cancer profiling array) 杂交检测了其在乳腺癌、子宫癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、小肠癌组织及其配对的正常组织的表达状况.

关键词 鼻咽癌, 差异表达基因, PROL4, 克隆, 基因表达

学科分类号 R739.63

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方各省发病率及死亡率较高的恶性肿瘤, 如湖南省标准化死亡率达 4.6/10 万. 鼻咽癌的发生不仅有明显的家族聚集现象, 而且鼻咽癌患者基因组不稳定, 易受 EB 病毒、化学致癌物的攻击和有遗传脆弱性, 自发性和诱发性姐妹染色体交换频率以脆性部位表达的频率明显高于正常人^[1], 提示鼻咽癌的遗传不稳定性可能与鼻咽癌基因组中存在遗传易感基因有关. 我们实验室为了更精确、更全面反映鼻咽癌的遗传改变, 通过全基因组扫描 (complete genome scan, CGS) 和比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization, CGH) 发现 NPC 染色体多个区域出现染色体缺失^[2]. 鼻咽癌基因组的不平衡, 说明在这些区域可能存在多个与鼻咽癌发生、发展相关的肿瘤易感基因或肿瘤抑制基因. 但国内外仍未获得鼻咽癌特异的易感基因. 为了进一步分离与鉴定鼻咽癌特异的易感基因, 我们在正常成人鼻咽与鼻咽癌活检组织之间建立了正向、反向两次抑制性消减杂交, 构建了鼻咽癌相关的两个消减 cDNA 文库, 进而采用消减 cDNA 文库微阵列 (microarray) 技术, 分离鉴定鼻咽癌差异表达基因 (另文报道). 本文对所获得的鼻咽癌差异表达基因 PROL4 的特性进行进一步分析.

1 材料与方法

1.1 组织标本

低分化鳞状鼻咽癌细胞系 HNE1 为本所建株. 水囊引产的 6~8 月龄左右的胚胎 10 例由中南大学

湘雅医院提供, 经患者同意. 10 例正常成人鼻咽和 58 例鼻咽癌活检标本由中南大学附属湘雅医院和湖南省肿瘤医院提供, 经患者同意.

1.2 引物

PROL4 基因表达分析引物为 5'-TGCTGG-TGGTCCTGCTCTCA-3', 5'-AGTGGTTGCTCCT-GGGGATG-3'; 内对照 GAPDH 的引物为 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3', 5'-TCT-AGACGGCAGGTCAGGTCACCC-3' (598 bp).

1.3 试剂盒

随机引物标记盒、反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Promega 公司, TRIZOL™ 试剂购自美国 GIBCO/BRL 公司.

1.4 总 RNA 的抽提及其质量鉴定

按照 TRIZOL™ 试剂盒操作程序提取鼻咽癌活检组织和正常成人鼻咽上皮组织总 RNA. 首先用 DNase I 消化人胚鼻咽上皮、鼻咽癌细胞株 HNE1、正常成人鼻咽上皮和鼻咽癌活检组织 RNA 中痕量的 DNA: 反应体积 100 μl, 总 RNA 10 μg, DNase I 10 U, RNasin 200 U, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, 37 °C, 1 h, 等体积苯酚:氯仿 (1:1) 抽提, 乙醇沉淀, RNA 溶于 10 μl 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水中. 取 1 μl

* 国家高技术“863”计划资助项目 (102-10-01-05 和 2001AA221031) 和国家重点基础研究发展规划资助项目 (973) (G1998051008).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xymu.net

收稿日期: 2002-10-21, 接受日期: 2002-11-19

RNA 样品进行 PCR 扩增 GAPDH 基因片段, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测无特异扩增条带以保证 DNA 消化完全.

1.5 RT-PCR 检测 PROL4 在鼻咽癌中的表达

按逆转录试剂盒操作程序作逆转录反应, 采用下列参数进行差异 PCR: 94 °C, 50 s; 59 °C, 50 s; 72 °C, 1 min; 5 个循环后加入 5 mmol/L GAPDH 上下游引物混合液 1 μ l, 继续进行 23 个循环终止. 取 5 μ l PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6 RNA 印迹

以 PROL4 基因和 β -肌动蛋白 (actin) 基因的 cDNA 片段为模板, 以 α -³²P-dCTP 为标记物, 采用随机引物标记试剂盒分别标记 PROL4 基因和 β -actin 基因的 cDNA 片段. 12 种组织 Human Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot (# 7780-1) 购自 Clontech 公司, 含人脑、心、骨骼肌、结肠、胸腺、脾、肾、肝、小肠、胎盘、肺、外周血淋巴细胞 12 种组织标本, 采用 ExpressHybTM 杂交液 (Clontech 公司), 68 °C 预杂交 4 h, 68 °C 杂交 16 h. 2 \times SSC、0.05% SDS 在 37 °C 洗膜 40 min, 0.1 \times SSC、0.1% SDS 在 55 °C 洗膜 20 min, -70 °C 放射自显影 1~7 天.

1.7 PROL4 基因在多种肿瘤组织中的差异表达

Cancer Profiling Array (# 7841-1) 购自

Clontech 公司, 含有乳腺癌、子宫癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、小肠癌及其配对的正常组织. 以 α -³²P-dCTP 为标记物, 采用随机引物标记试剂盒分别标记 PROL4 基因和 Ubiquitin 基因 cDNA 片段, 标记 DNA 量为 50~100 ng, 探针的每微克 DNA 放射活性计数率 (cpm 值) 大于 1×10^8 . Sephadex G-50 柱纯化探针. 采用 ExpressHybTM 杂交液 (Clontech 公司), 65 °C 预杂交 4 h, 65 °C 杂交 16 h. 2 \times SSC、1% SDS 在 65 °C 洗膜 30 min, 0.1 \times SSC、0.5% SDS 在 65 °C 洗膜 30 min, -70 °C 放射自显影 1~7 天. 使用 Typhoon 800 (Pharmacia 公司, USA) 信号记录仪进行信号记录扫描, 并进行杂交信号对比分析.

2 结果

2.1 序列测定及其同源性分析

在正常成人鼻咽与鼻咽癌活检组织之间进行抑制性消减杂交和 microarray 杂交, 获得了鼻咽癌差异表达基因 PROL4 的全长 cDNA 序列, 其 GenBank 登录号为 AF530472, 该基因包含 567 个核苷酸, 其编码产物是由 134 个氨基酸组成的富含脯氨酸蛋白 (图 1).

```

AACTCCAGAGCCTCCTTCAAG
ATGCTGCTGCTCCTGCTCTCAGTGGTCCTTCTGGCTCTGAGCTCA
M L L V L L S V V L L A L S S
GCTCAGAGCACAGATAATGATGTGAACTATGAAGACTTTACTTTC
A Q S T D N D V N Y E D F T F
ACCATACCAGATGTAGAGGACTCAAGTCAGAGACCAGATCAGGGA
T I P D V E D S S Q R P D Q G
CCCCAGAGACCTCCTCCTGAAGGACTCCTACCTAGACCCCTGGT
P Q R P P P E G L L P R P P G
GATAGTGGAACCAAGATGATGGTCTCAGCAGAGACCACCAAAA
D S G N Q D D G P Q Q R P P K
CCAGGAGGCCATCACCGCCATCCTCCCCACCTCCTTTTCAAAAT
P G G H H R H P P P P P F Q N
CAGCAACGACCACCCGACGAGGACACCGTCAACTCTCTTACCC
Q Q R P P R R G H R Q L S L P
CGATTTCTTCTGTCAGCCTGCAGGAAGCATCATCTTCTCCAG
R F P S V S L Q E A S S F F Q
AGGGACAGACCAGCAAGACATCCCCAGGAGCAACCACTCTGGTAA
R D R P A R H P Q E Q P L W *
TCTAGAATTCAGTGGCAGAAAATAAATAAGAAGATAACTTCTTTCAG
AAAGCCATGACATTGAAATAATGTGGTCATAACTCTTCTTTCAGTATA
CCAATAAAATATTAATAGCATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 1 The full-length cDNA sequence of PROL4 gene and its amino acid protein predicted by open reading frame

2.2 PROL4 基因在鼻咽癌活检组织中的表达

用差异 RT-PCR 检测发现: 48 例鼻咽癌活检组织中 42 例 (87%) PROL4 基因表达下调或缺失, 10 例正常成人鼻咽组织能检测到较强的表达产物 (图 2).

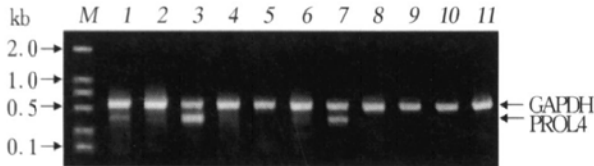


Fig. 2 The expression of PROL4 was analyzed by RT-PCR in normal nasopharyngeal epithelial tissues and NPC biopsies

1: primary cultural human embryo nasopharyngeal epithelium; 2: NPC cell line HNE1; 3: normal adult nasopharyngeal epithelial tissue; 4~11: NPC biopsies; M: DL2000 DNA marker.

2.3 PROL4 基因的多种组织 RNA 印迹

用 PROL4 基因的 cDNA 片段标记探针, 对多种组织 MTN 膜进行杂交, 结果显示: PROL4 基因在骨骼肌中有表达, 以骨骼肌组织中表达相对较高, 在胸腺和肺组织中有表达, 而在其他组织中未检测到明显表达, 其转录本大小为 0.6 kb (图 3).

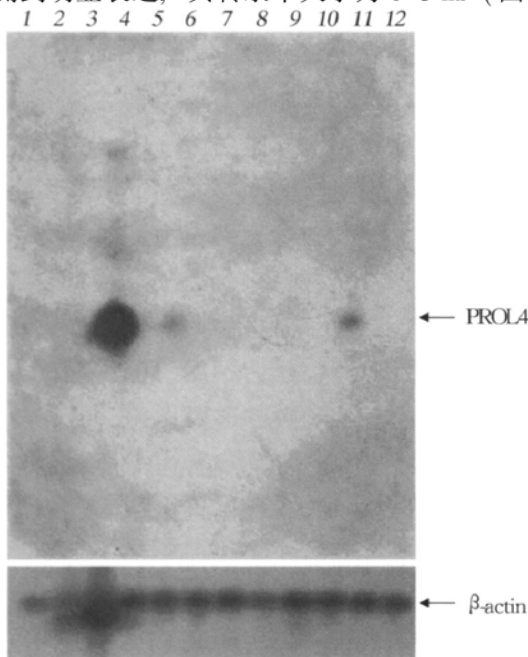


Fig. 3 The expression of PROL4 gene was analyzed by human multiple tissue Northern (MTNTM) blots hybridization

1: brain; 2: heart; 3: skeletal muscle; 4: colon; 5: thymus; 6: spleen; 7: kidney; 8: liver; 9: small intestine; 10: placenta; 11: lung; 12: peripheral blood leukocyte.

2.4 PROL4 基因在多种肿瘤组织中的表达

Cancer Profiling Array 的杂交结果表明: PROL4 基因在乳腺癌 (5/50)、子宫癌 (6/42)、

结肠癌 (5/35)、胃癌 (3/27)、卵巢癌 (2/14)、肺癌 (6/21)、直肠癌 (2/18) 中表达上调, 而在胃癌 (4/27)、肺癌 (2/21) 中表达下调, 在肾癌、甲状腺癌、子宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、小肠癌中表达无表达异常 (图 4).

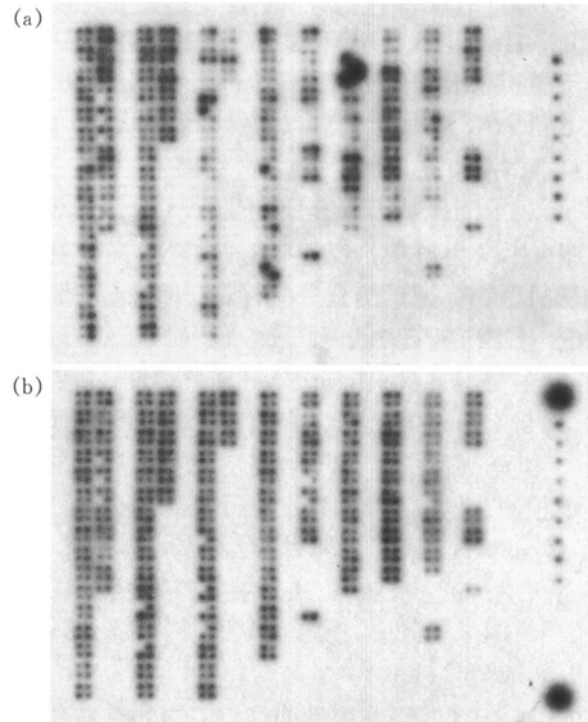


Fig. 4 The expression analysis of PROL4 gene by human Multiple Cancer Profiling Array

(a) The array was hybridized by PROL4 gene. (b) The array was hybridized by Ubiquitin gene.

3 讨 论

鼻咽癌是一种多基因遗传性疾病, 它的发生可能涉及多个细胞分裂、分化和凋亡相关的传导通路的障碍, 是多个基因协同作用的结果, 是多基因或多通路平衡失调的基因网络学说在鼻咽癌这一多基因遗传性疾病个体事件的体现. 恶性肿瘤的种族分布差异, 癌的家庭聚集现象, 遗传性缺陷易致肿瘤形成都提示遗传因素在肿瘤发生中起重要作用. 肿瘤的遗传易感性主要与基因组中的遗传易感基因有关, 因此, 分离和鉴定鼻咽癌基因组中的遗传易感基因, 是阐明其遗传易感机理和确定其防治策略的关键. 鼻咽癌的发生发展可能是多个易感基因在癌变的不同阶段通过不同途径作用的结果, 这些易感基因构成了一个易感基因群. 虽然有研究表明 p53 的过表达和 p16 的缺失与甲基化可能参与了鼻咽癌的发生发展^[3~5], 但目前国际上尚未获得鼻咽癌特异的抑瘤基因和易感基因. 因此, 有必要进一步

分离和鉴定鼻咽癌基因组中的抑癌基因和易感基因。

我们对正常成人鼻咽上皮组织和鼻咽癌活检组织之间进行了抑制性消减杂交和 cDNA microarray 杂交, 获得了鼻咽癌差异表达基因 PROL4 的全长 cDNA 序列, 其 GenBank 登录号为: AF530472, 该基因包含 567 个核苷酸, 其编码产物是由 134 个氨基酸组成的富含脯氨酸蛋白。富含脯氨酸蛋白可能在滋润保护粘膜中行使生物学功能。与其他富含脯氨酸的蛋白质相似, PROL4 基因可能对粘膜行使保护功能, 如微生态的调节^[6]。

肿瘤表达谱阵列 (cancer profiling array) 的杂交结果表明: PROL4 基因在乳腺癌 (5/50)、子宫癌 (6/42)、结肠癌 (5/35)、胃癌 (3/27)、卵巢癌 (2/14)、肺癌 (6/21)、直肠癌 (2/18) 中表达上调, 在胃癌 (4/27)、肺癌 (2/21) 中表达下调, 而在肾癌、甲状腺癌、子宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、小肠癌中表达无表达异常, 但总之, 该基因在上述肿瘤及其配对的正常组织中表达差异不十分明显。我们用 RT-PCR 证实了 PROL4 基因在鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 和 87% (42/48) 的鼻咽癌活检标本中表达下调。在所获得的鼻咽癌差异表达基因中, 还包含了 PRB3 基因。PRB3 基因也是富含脯氨酸蛋白 (PRP) 多基因家族的成员之一。因此 PRB3 和

PROL4 可能在鼻咽的滋润和保护中具有重要的生物学功能^[7,8]。值得一提的是 PROL4 和 PRB3 都定位于染色体 12p13.2~13.3, 这两个基因在鼻咽癌发生、发展过程中可能具有重要的生物学功能。

参 考 文 献

- 1 Li G Y, Yao K T, Glaser R. Sister chromatid exchange and nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1989, **43** (4): 613~618
- 2 李忠花, 王璐, 张小慧, 等. 比较基因组杂交研究鼻咽癌遗传变异. *中华医学遗传学杂志*, 2001, **18** (5): 338~342
Li Z H, Wang L, Zhang X H, *et al.* *Chin J Med Genet*, 2001, **18** (5): 338~342
- 3 谢奕, 姚开泰, 胡维新. 鼻咽癌、宫颈癌和肺癌中 p53 基因的突变和表达对比研究. *中华病理学杂志*, 1997, **26** (4): 229~232
Xie Y, Yao K T, Hu W X. *Chin J Pathology*, 1997, **26** (4): 229~232
- 4 Lo K W, Cheung S T, Leung S F, *et al.* Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1996, **56** (12): 2721~2725
- 5 Lo K W, Huang D P, Lau K M. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1995, **55** (10): 2039~2043
- 6 Ann D K, Lin H H. Macaque salivary proline rich protein: structure, evolution, and expression. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993, **4** (3~4): 545~551
- 7 Dickinson D P, Thiesse M. A major human lacrimal gland mRNA encodes a new proline-rich protein family member. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, **36** (10): 2020~2031
- 8 Azen E, Prakobphol A, Fisher S J. PRB3 null mutations result in absence of the proline-rich glycoprotein G1 and abolish fusobacterium nucleatum interactions with saliva *in vitro*. *Infect Immun*, 1993, **61** (10): 4434~4439

Characterization Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma Differentially Expressed Gene PROL4*

ZHANG Bi-Cheng, ZHOU Ming, ZHOU Hou-De, XIAO Bing-Yi, NIE Xir-Min,

ZHU Shi-Guo, LI Wei-Fang, LI Xiao-Ling, LI Gu-Yuan**

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

Abstract The full-length cDNA sequence of a novel gene PROL4 was obtained through suppression subtraction hybridization and cDNA microarray technique between NPC biopsies and normal adult nasopharyngeal epithelial tissue. PROL4 gene whose GenBank accession number was AF530472 consisted of 567 bp and coding 134 amino acids. RT-PCR confirmed that PROL4 gene was down expressed in NPC cell line HNE1 and NPC biopsies (42/48). As it was shown by Northern blot, PROL4 gene was expressed in skeletal muscle, thymus and lung, whose transcription size was about 0.6 kb. The expression profiling was further tested by Cancer Profiling Array hybridization in multiple cancer tissues such as breast carcinoma, uterus carcinoma, colon carcinoma, stomach carcinoma, ovary carcinoma, lung carcinoma, kidney carcinoma, rectum carcinoma, thyroid carcinoma, cervix carcinoma, prostate carcinoma, pancreas carcinoma and small intestine carcinoma.

Key words nasopharyngeal carcinoma, differentially expressed gene, PROL4, gene cloning, gene expression

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (102-10-01-05, 2001AA221031) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1998051008).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: lgy@xymu.net Received: October 21, 2002 Accepted: November 19, 2002