

新基因 **BRD7** 对鼻咽癌蛋白质 表达谱影响的初步研究*

彭 聪 谭 琛 张秋红 王晓艳 周 鸣 黄 河 王 蓉 李小玲**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 BRD7 基因是与鼻咽癌相关的候选抑癌基因. 为了进一步研究该基因的作用机制, 将 pcDNA3.1(+)/BRD7 的表达质粒经脂质体导入 HNE1 细胞, RNA 斑点杂交筛选出阳性克隆, 通过双向电泳分离过表达 BRD7 的 HNE1 细胞内蛋白质, 筛选出差异常表达的蛋白质点, 并进行质谱分析鉴定. 鉴定出 10 种表达上调的蛋白质点, 包括精氨(基)琥珀酸裂解酶, TSA (thio-specific antioxidant), Proteasome activator28 beta subunit (PA28), 金属蛋白酶抑制因子-2 前体等, 这些蛋白质涉及细胞生长, 细胞代谢等很多相关事件. 这些结果说明 BRD7 基因可能通过多种途径影响鼻咽癌的发生发展.

关键词 BRD7 基因, 细胞转染, RNA 斑点杂交, 双向电泳, 基质辅助激光解吸飞行时间质谱

学科分类号 R739.63, R756

鼻咽癌是好发于东南亚及我国南方各省区的恶性肿瘤, 发病率因种族、地区、年龄不同而差异显著, 其病因涉及 EB 病毒感染、化学致癌物作用及多种癌基因与抑癌基因结构和功能的改变^[1-3]. 分子遗传学研究表明鼻咽癌基因组在 3p、9p、7q3、11q 等位置存在高频率等位基因的杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH). 这些结果提示, 鼻咽癌的遗传不稳定性可能与这些区域存在遗传易感基因或抑癌基因有关. 而在目前已发现的抑癌基因中, p53 基因在鼻咽癌中的突变率极低, p16 基因在鼻咽癌中无点突变, 但表达下调, 而 RB、WAF1/p21、VHL 等抑癌基因在鼻咽癌基因组中均没有突变和表达异常. 因此, 在鼻咽癌基因组中可能存在尚未发现的易感/抑癌基因. BRD7 基因是我实验室通过 cDNA 代表性差异分析(cDNA RDA)从鼻咽癌组织中克隆的一个表达下调差异基因^[4,5], GenBank 登录号为 AF152604, 初步研究显示, 该基因可能是一个强有力的鼻咽癌抑癌候选基因^[6-8].

为了深入研究 BRD7 基因功能, 我们运用转基因技术构建过表达 BRD7 基因鼻咽癌细胞株 HNE1, 采用高通量的蛋白质组技术(双向电泳, 质谱)研究过表达 BRD7 鼻咽癌细胞株 HNE1 后蛋白质表达谱的改变, 通过对差异蛋白质点的鉴定与分析, 从而探讨 BRD7 基因在鼻咽癌发生、发展中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞: 低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞系 HNE1 为中南大学湘雅医学院肿瘤研究所建.

1.1.2 pcDNA3.1(+)/BRD7 载体: pcDNA3.1(+)载体为哺乳动物高效表达载体, 为 Invitrogen 公司的产品. pcDNA3.1(+)/BRD7 载体由我实验室构建.

1.1.3 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. DNA 抽提纯化试剂盒(小量质粒快速抽提纯化试剂盒、大量质粒快速抽提纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒)购自上海舜华生物工程有限公司. 分子质量标准均购自大连宝生物工程有限公司, 蛋白质中分子质量标准购自中国科学院上海生物化学研究所. 同位素 α -³²P-dCTP, α -³³P-dATP, 购自北京福瑞公司.

1.1.4 引物: 引物由大连宝生物有限公司合成. 上游(左侧)引物: 5'-cgt gga tcc gaa gaa gta gaa cag aca-3', 下游(右侧)引物: 5'-att ccc ggg gaa tta ttt cct ggc taa-3'.

* 国家重点基础研究发展规划项目(973)(G1998051008), 国家自然科学基金资助项目(30000065)和国家高技术“863”计划资助项目(102-10-01-05).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: XLLI2000@yahoo.com

收稿日期: 2003-01-27, 接受日期: 2003-03-21

1.1.5 蛋白质组研究所用试剂: 固相 pH 梯度干胶条 (pH 3 ~ 10, 18 cm)、IPG 缓冲液、覆盖液 (drystrip cover fluid)、石蜡油、银染试剂盒等购自 Pharmacia 公司; 丙烯酰胺 (acrylamide)、亚甲基双丙烯酰胺 (Bis) 为国产分析纯; 乙腈 (ACN) 为国产色谱纯; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.6 仪器: IPGphor 电泳单元及双向电泳附件、EPS 3500 电源、重泡胀附件和循环水浴箱等电聚焦系统、IPGphor 电泳系统 (Pharmacia 公司); 垂直平板电泳系统、循环水浴箱 (Bio-Rad 公司); PDQUEST 2-D 胶分析系统为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 稳定表达系的建立: 在 6 孔板中, 每孔接种 2×10^5 个 HNE1 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 80% 汇合期, 将重组体 DNA 和 100 μ l 无血清培养基, 15 μ l 脂质体混合, 加 800 μ l 完全培养基于复合物中, 混匀, 加到细胞中培养 12 h 后, 用 Hank's 液洗涤转染中的细胞后, 加入完全培养基继续培养。细胞转染 48 h 后, 用选择性培养基 (G418 浓度: 1 ~ 3 天为 250 mg/L, 以后为 550 mg/L) 培养, 隔天换液, 8 ~ 10 天出现抗性克隆, 14 天后挑单个克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系。

1.2.2 阳性克隆 RT-PCR 鉴定: DNase I 消化 RNA 中痕量的 DNA, 等体积苯酚: 氯仿 (1:1) 抽提, 乙醇沉淀, RNA 溶于 DEPC 处理的水中。按逆转录试剂盒操作程序作逆转录反应, 5 个循环后加入 GAPDH 上、下游引物混合液 1 μ l, 继续进行 27 个循环终止。溴乙锭染色, 紫外灯下照相。

1.2.3 RNA 斑点杂交按《分子克隆》操作。

1.2.4 蛋白质抽提与定量: 细胞培养至对数生长期, 弃出培养液, 用胰酶消化, PBS 洗后在约 2×10^6 细胞中加入 50 μ l 裂解液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT), 液氮反复冻融后, 加 20 μ l RNase (20 g/L) 在 4℃ 放置 15 min, 13 000 r/min, 4℃ 离心 30 min, 收集上清液, 样品存放于 -70℃。蛋白质定量用 Bradford 方法操作, 每次上样量为 500 μ g。

1.2.5 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳: 采用 IPGphor 等电聚焦系统, 把干胶条置于胶条盒中放置在 IPGphor 电泳仪上水化 (水化液组成为: 8 mol/L 尿素, 0.5% CHAPS, 2.8 g/L DTT 及痕量溴酚蓝) 15 ~ 18 h, 水化完毕按 500 V, 1 000 V 各 1 h, 8 000 V 5 h 等电聚焦, 聚焦结束后, 取出胶

条, 加入平衡液 A (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 0.1% DTT) 振荡平衡 15 min, 再换平衡液 B (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 1.5% 碘乙酰胺) 振荡平衡 15 min, 取出胶条滤干, 准备第二向电泳。

1.2.6 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按照 Bjellquist 的方法进行。采用分离胶浓度为 15% 的不连续 SDS-聚丙烯酰胺垂直平板电泳。

1.2.7 银染: 按银染试剂盒操作手册操作。

1.2.8 图象分析: 通过 PDQuest 2-D 分析软件系统, 分别比较四次重复结果图谱, 将 HNE1 和转染 BRD7 的细胞进行匹配分析, 获得 BRD7 基因转染所致的蛋白质差异表达变化, 将这些蛋白质点在双向电泳凝胶图谱上标出。

1.2.9 蛋白质的原位酶解: 蛋白质原位酶解按 Fernandez 和 Gharahdaghi 等方法进行, 主要分四步: a. 脱色。将银染蛋白质点沿边沿切割下来, 置于 EP 管中, 经双蒸水反复冲洗后, 加入新制备的脱色工作液 (30 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$: 100 mmol/L $Na_2S_2O_3$ = 1:1) 50 μ l, 至蛋白质点呈无色透明。加 100% 的乙腈 (ACN) 脱水, 至胶块完全变成白色后, 置于真空干燥仪中冷冻干燥。b. 还原与烷基化。在上述样品中加入 50 μ l 100 mmol/L NH_4HCO_3 (含 DTT 10 mmol/L), 57℃ 保温 1 h 后, 室温冷却, 除去过量的液体, 迅速加入同等体积的新配制的 100 mmol/L NH_4HCO_3 (含 55 mmol/L 碘乙酰胺), 室温下暗处放置 30 min, 待反应完成后用 100 mmol/L NH_4HCO_3 冲洗 2 ~ 3 次, 每次 5 ~ 10 min, 再用 ACN 脱水, 加入等体积的 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液和 100% ACN 混合液 (100 mmol/L NH_4HCO_3 : 100% ACN = 1:1), 待胶块吸胀后除去多余的液体, 冷冻干燥。c. 原位酶解。将甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮-胰蛋白酶溶于 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 (含 5 mmol/L $CaCl_2$), 配成 0.1 g/L 浓度的溶液, 每管中加入约 10 μ l 酶解工作液在 0℃ 让胶块吸收, 胶块吸胀后除去多余的酶解液, 并把胶块破碎, 加 20 μ l 不含酶的 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 (含 5 mmol/L $CaCl_2$) 覆盖, 37℃ 水浴 16 ~ 26 h。d. 萃取。酶解后的肽片段用 50 μ l 50% TFA 萃取 2 ~ 3 次, 每次萃取时间为 10 ~ 20 min, 合并萃取液, 冷冻干燥。

1.2.10 基质辅助激光解吸飞行时间质谱肽指纹图分析: 基质辅助激光解吸飞行时间质谱对样品要求较高, 样品盐度会严重影响分析, 因此在进行肽

质指纹图的分析前样品必须去盐。a. 样品脱盐。首先在样品中加入 10 μ l 0.1% TFA 水溶液, 振荡, 使样品充分溶解, 再用美国 Millipore 公司的 10 μ l ZipTip™ C18 器脱盐。b. 质谱分析制备好的样品, 使用美国 BRUKER 公司的 ProFlex™ III MADLI-TOF 质谱仪进行分析。

2 结 果

2.1 阳性克隆的鉴定

将挑选出来的单克隆细胞扩大培养, 抽提 RNA 进行 RT-PCR 鉴定。我们总共挑选出 8 个单克隆细胞, 用 RT-PCR 鉴定, 其中有 4 个为阳性克隆。为了进一步确证其真实性, 我们对其进行 RNA 斑点杂交 (图 1)。

2.2 HNE1 与转染 BRD7 后 HNE1 的双向电泳图谱

根据杂交结果选取 1 号克隆为实验细胞, 抽提 HNE1、转染空白载体的 HNE1 和稳定表达 BRD7

基因的 HNE1 阳性细胞内总蛋白, 采用双向凝胶电泳分离细胞内蛋白质, 图象扫描后用 PDQuest 软件分析, 可以识别 800 个左右的蛋白质点。四次重复结果统计显示, HNE1 和 pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 细胞二维图谱的蛋白质点分别为 (800 $\pm$ 18)、(800 $\pm$ 27) 个, 通过匹配分析后, 确立了 18 个受 BRD7 基因转染影响表达明显上调的差异表达蛋白质点, 通过质谱鉴定出其中 10 个差异点, 结果见图 2。

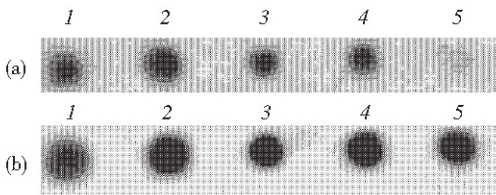


Fig. 1 Results of Northern-spot
(a) 1~4: pcDNA 3.1(+)/BRD7/HNE1; 5: HNE1. (b) GADPH.

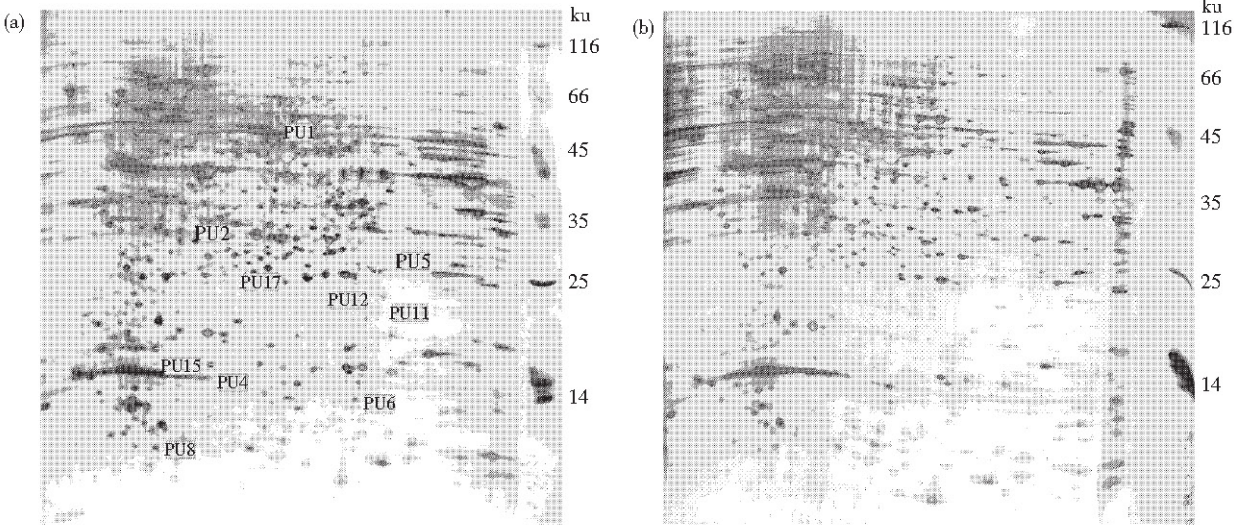


Fig. 2 Results of two-dimension electrophoresis
(a) different expression up proteins in 2D of pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1; (b) total proteins expression in 2D of HNE1.

2.3 质谱鉴定蛋白质

应用 MALDI-TOF-MS 方法对 18 个差异点进行鉴定, 10 个获得了比较可靠的结果 (图略)。获得的肽质量指纹与数据库的人类标准肽质指纹匹配, 结果见表 1。

3 讨 论

自 20 世纪 50 年代, DNA 分子双螺旋结构发

现以来, 生命科学在短短的半个世纪里, 取得了一系列令人振奋的进展。尤其是 20 世纪 90 年代, 人类基因组计划的提出, 大肠杆菌, 酵母, 线虫等结构比较简单的模式生物基因组 DNA 测序的完成, 加速了生命科学的研究^[8,9]而令人瞩目的人类基因组计划于 21 世纪初完成^[10], 它标志着我们已经可以从基因水平认识生命的奥秘。然而对于疾病的认识仅仅在基因组水平还远远不够, 基因仅是遗传信

息的携带者，生命活动的真正执行者是蛋白质，我们必须从基因组和蛋白质组的整体水平进行研究. 蛋白质组的概念从 1994 年提出以来，其相关技术体系得到了迅猛的发展，双向电泳技术的不断完

善，新的质谱技术的运用，以及高分辨率、高灵敏度、高重复性蛋白质组技术体系的建立，都为我们的研究提供了强有力的工具.

Table 1 Up-expression protein

Spot	Database searched	Accession number	Match peptides	Score	Coverage sequence %	Protein identify
PU1	NCBIlr	28878	10	2.01×10^4	18%	argininosuccinate Lyase
PU2	Genpept	6102891	13	2.32×10^3	42%	hypothetical protein
PU4	Genpept	X82321	6	2.97×10^3	26%	TSA
PU5	Genpept	U73514	11	1.28×10^8	75%	short-chainalcohol dehydrogenase
PU6	Swissprt	Q14933	5	1.45×10^5	41%	UbcH8 (Ubiquitin-protein ligase)
PU8	Swissprt	P05387	5	4.77×10^3	74%	60s acidic ribosomal protein p2
PU11	Genpept	10440170	5	2.16×10^3	33%	(AK027122) unnamedprotein product
PU12	Genpept	307195	9	1.74×10^3	27%	Metalloproteinase inhibitor-2 precursor
PU15	Swissprt	Q12798	6	1.56×10^3	30%	Centrin 1
PU17	Swissprt	Q9UL46	5	2.98×10^3	25%	Proteaseome activator28 beta subunit

鼻咽癌的发生发展涉及到多个基因，这些基因在整个基因网发挥着重要的作用，一个基因也可能通过多个基因、多个途径来影响细胞的功能. 研究表明，HNE1 细胞在转染 BRD7 基因后，蛋白质表达谱发生了改变，我们鉴定出 10 个表达明显上调的蛋白质点，其中精氨（基）琥珀酸裂解酶（argininosuccinate lyase），是精氨酸代谢中的关键酶之一. 而某些肿瘤如肝癌，黑色素瘤显示出精氨酸缺乏，提高这些肿瘤中精氨酸的含量有助于恶性表型的部分逆转^[11]. 另外，张必成等通过 cDNA 微阵列研究显示精氨（基）琥珀酸裂解酶在 HNE1 细胞中呈低表达（未发表）. TSA（thio-specific antioxidant）是一类抗氧化蛋白，一般来说抗氧化蛋白在保护细胞、维持细胞正常功能中有着重要的作用，有文献报道抗氧化蛋白能部分地抑制蛋白激酶 C 的活性^[12]. 肿瘤发生的一个重要原因就是能降低抗原性从而逃避机体的免疫监视. Proteaseome activator28 beta subunit（PA28）是一个与 MHC-I 类抗原递呈有关的蛋白质，有资料显示它能选择性地提高病毒 MHC-I 抗原的递呈^[13]，并且 PA28 的表达在肿瘤细胞中下调^[14~16]. metalloproteinases inhibitor-2 precursor 是金属蛋白酶抑制因子 2 前体，金属蛋白酶抑制因子 2 是一类很重要的调节因子，它能下调诸如 VEGF、TKR-growth factor 从而

影响肿瘤的发生与发展^[17,18].

这些蛋白质涉及到细胞周期调控，细胞代谢等很多相关事件，然而对这些差异表达蛋白质的最后确证，BRD7 是通过怎样的方式作用于这些蛋白质，以及这些蛋白质在鼻咽癌的发生发展到有着怎样的作用，都有待我们做进一步的研究和探索.

参 考 文 献

1 Lung M L, Sham J S, Lam W P, *et al.* Analysis of localized tumors provides further evidence for the direct association of Epstein-Barr virus with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 1993, **71**: 1190 ~ 1192

2 Hoi P H, Suen M W, Huang D P, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: genetic changes, Epstein-Barr virus infection, or both. A clinical and molecular study of 36 patients. *Cancer*, 1993, **72** (10): 2873 ~ 2878

3 Lo K, Huang P W, Lee C K. Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Med J (Engl)*, 1997, **110**: 548 ~ 549

4 余 鹰, 谢 奕, 李桂源, 等. 应用混合探针文库筛选法克隆多个肿瘤差异表达基因. *癌症*, 2000, **19** (7): 709 ~ 712

Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* *Chin J Cancer*, 2000, **19** (7): 709 ~ 712

5 余 鹰, 谢 奕, 李桂源, 等. 一个新鼻咽癌抑瘤候选基因的克隆及其功能初步分析. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (3): 319 ~ 323

Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (3): 319 ~ 323

6 余 鹰, 朱诗国, 李桂源, 等. BRD7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的抑制作用. *癌症*, 2001, **20** (6): 4 ~ 10

Yu Y, Zhu S G, Li G Y, *et al.* *Chin J Cancer*, 2001, **20** (6): 4

- ~10
- 7 余 鹰, 朱诗国, 李桂源, 等. BRD7 单核苷酸多态性及其鼻咽癌易感性分析. 生物化学与生物物理进展, 2000, **28** (4): 568 ~ 572
Yu Y, Zhu S-G, Li G-Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, **28** (4): 568 ~ 572
 - 8 余 鹰, 朱诗国, 李桂源, 等. 应用酵母双杂交系统筛选 BRD7 相互作用的蛋白质. 中国科学 C 辑, 2002, **32** (2): 153 ~ 158
Yu Y, Zhu S-G, Li G-Y, *et al.* Science in China (series c). 2002, **45** (5): 546 ~ 552
 - 9 Pensis E. Laboratory workhorse decoded. Science, 1997, **277** (5331): 1432 ~ 1434
 - 10 Ainscough R, Bardill S, Bartow K, *et al.* The *C. elegans* sequencing consortium Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. Science, 1998, **282**: 2012 ~ 2018
 - 11 Ensor C M, Holsberg F W, Bomalaski J S, *et al.* Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20 000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res, 2002, **62** (19): 54
 - 12 Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. J Nutr, 2002, **132** (12): 3819S ~ 3823S
 - 13 Sijts A, Sun Y, Janek K, *et al.* The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. Mol Immunol, 2002, **39** (3 ~ 4): 165 ~ 169
 - 14 Groettrup M, Soza A, Eggers M, *et al.* A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. Nature, 1996, **381** (6578): 166 ~ 168
 - 15 Johnsen A, France J, Sy M S, *et al.* Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. Cancer Res, 1998, **58** (16): 3660 ~ 3667
 - 16 Hajitou A, Sounni N E, Devy L, *et al.* Down-regulation of vascular endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on *in vivo* mammary tumor growth and angiogenesis. Cancer Res, 2001, **61** (8): 3450 ~ 3457
 - 17 Hoegy S E, Oh H R, Corcoran M L, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factorsignaling independent of metalloproteinase inhibition. J Biol Chem, 2001, **276** (5): 3203 ~ 3214
 - 18 DeClerck Y A, Imren S, Montgomery A M, *et al.* Proteases and protease inhibitors in tumor progression. Adv Exp Med Biol, 1997, **425**: 89 ~ 97

Preliminary Study of The Effect of a Novel BRD7 Gene on The Protein Expression of NPC *

PENG Cong, TAN Chen, ZHANG Qiu-Hong, WANG Xiao-Yan,
ZHOU Ming, HUANG He, WANG Rong, LI Xiao-Ling **

(Cancer Research Institute, Xiang-Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract BRD7 gene is a novel candidate tumor suppression gene associated with NPC. In order to study the function of BRD7, BRD7 was introduced into HNE1 cells by liposome transfection. After staining and image analysis, the ten differential expression spots which up-regulated in BRD7 transfected cells were isolated and identified by two-dimensional polyacrylamide gel eletrophoresis (2D PAGE) and MALDI-TOF. These proteins included argininosuccinate lyase, TSA, proteasome activator 28 beta subunit, metalloproteinase inhibitor-2 precursor, which involved in cell cycling, transcription regulation, metabolism and so on. The results indicated that the BRD7 gene may play effect on NPC cells by up-regulating the expression of these proteins.

Key words BRD7 gene, cell transfection, Northern spot, two-dimensional gel eletrophoresis, MALDI-TOF

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

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: XLLI2000@yahoo.com

Received: January 27, 2003 Accepted: March 21, 2003