

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0208-04

人、鼠正常组织及人食管鳞状细胞癌组织中 RFP 蛋白的表达检测

张静敏¹, 金宁一², 米志强², 张宏桂³, 李霄², 连海², 孙迎春², 安汝国¹, 高桥雅英⁴(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 军需大学研究所, 长春 130062; 3. 北京中医药大学, 北京 100029; 4. 名古屋大学医学部, 名古屋市 466-8550)

[摘要] **目的:** 研究 RFP(Ret Finger Protein, RFP)在人、鼠正常组织及食管鳞状细胞癌组织中的分布。**方法:** 本研究运用实时定量 PCR 方法并以 18SrRNA 作为内对照分析了 RFP 在人子宫颈、子宫内膜、睾丸、胃、食管和脑组织以及在鼠肺、肾、子宫、卵巢、胸腺、心、肌肉、睾丸、皮肤、食管、脾、肝和肠等正常组织和人食管鳞状细胞癌组织中的表达。**结果:** RFP 蛋白只在人和鼠的睾丸组织中高表达,而在其他正常组织中低表达,在 20 例人食管鳞状细胞癌组织标本中检测到 13 例 RFP 表达上调,其中 9 例有显著意义($P < 0.05$)。**结论:** 由于 RFP 蛋白在正常组织中只高表达于睾丸组织,而约 65% 人食管鳞状细胞癌组织中该蛋白的表达上调。上述结果提示 RFP 蛋白可能是治疗人食管鳞状细胞癌的一个潜在的分子靶点。

[关键词] RFP, 实时定量 PCR, 人和鼠正常组织, 人食管鳞状细胞癌组织

[中图分类号] R730.5; R735.1 [文献标识码] A

The Expressive Detection for RFP Protein in Human, Mouse Normal Tissues and Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ZHANG Jing-min¹, JIN Ning-yi², MI Zhi-qiang², ZHANG Hong-gui³, LI Xiao², LIAN Hai², SUN Ying-chun², AN Ru-guo¹, Takahashi, M⁴(1. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun, 130021, China; 2. The Key Genetic Engeneerring Lab of PLA, Quartermaster University of PLA, Changchun, 13006, China; 3. Beijing University of Tradition Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 4. Nagoya University School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan)

[Abstract] **Objective:** To investigate the distribution of RFP(Ret Finger Protein) in Human, mouse normal tissues and human esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** Real-time Quantitative RT-PCR with 18SrRNA as the internal standard was used to detect the expression of RFP in human normal tissues such as cervical tissue, endometrial tissue, testis tissue, gastric tissue, esophageal tissue, brain tissue, human esophageal squamous cell carcinoma and mouse normal tissues such as lung tissue, kidney tissue, uterus tissue, ovary tissue, thymus tissue, heart tissue, muscle tissue, testis tissue, skin tissue, esophageal tissue, spleen tissue, liver tissue, colon tissue, intestinum tissue. **Results:** The highest level of RFP mRNA was only present in testis tissue among human and mouse normal tissues. In addition, the up-regulation of RFP protein was observed in 13 out of 20 human esophageal squamous cell carcinoma tissues, but only the upregulation of RFP in 9 out of 20 is significant($P < 0.05$). **Conclusions:** Regarding to the expression of RFP limited to testis among human and mouse normal tissues and the up-regulation of RFP in 13 out of 20 human esophageal squamous cell carcinoma tissues, the RFP can be used as a potential molecular target for the development of new therapeutics for human esophageal squamous cell carcinoma.

[Key words] RFP; Real time PCR; Human and mouse normal tissues; Human esophageal squamous cell carcinoma

* RFP(ret finger protein)蛋白属于巨 B 盒环指蛋白家族,该家族蛋白有由 3 种不同结构构成的基序,分别为 RING 指结构、B 盒结构和有三种螺旋构成的复绕

[作者简介] 张静敏(1964-),女,吉林省磐石人,副教授,主要从事细胞生物学研究

[通讯作者] 金宁一, E-mail: zhiqiangmi@yahoo.com.cn

域,除此之外,该家族蛋白还包含 B30.2 样特定的碳末端区域^[1]。在各种人和啮齿动物肿瘤细胞系及雄鼠生殖细胞中均检测到该蛋白 mRNA 的高水平表达,该蛋白与核基质有关,表达于各种细胞的核中,包括外周和中枢神经原细胞、肝细胞、肾上腺嗜铬细胞^[2,3]。

B 盒环指蛋白家族成员参与各种细胞过程,如正常细胞分化和生长、转化及癌变,其中 Xnf7 是一种转录因子,在爪蟾属胚胎发生中的背腹侧形成起作用;RPT-1 被证实在 IL-2 受体基因及 HIV-1 下调方面发挥作用。该蛋白家族其他成员如 RFP、PML 和 TIF-1 通过融合蛋白形成导致基因重排从而致肿瘤发生。到目前为止,尚未通过实时定量 PCR 方法进行成年人、小鼠正常组织及食管鳞状细胞癌组织中 RFP 基因表达的测定。我们应用实时定量 RT-PCR 方法研究了 RFP 在成年人、小鼠及食管鳞状细胞癌组织中的相对表达,研究结果证明该蛋白的 mRNA 丰度在睾丸组织中最高,而在其他正常组织中较低,在 20 例食管鳞状细胞癌组织标本中检测到 13 例 RFP 表达上调。

1 材料与方法

1.1 材料来源

成年鼠取自名古屋大学医学部实验动物中心,从 AICHI 癌症中心进行肿瘤手术切除的病人获得人正常组织及癌组织,组织样品立即冻于液氮中,然后保存于 -80℃ 供提取 RNA 用。所有样品的取得均遵守现行的道德规范准则,并正式得到所有参与者和该研究各方的同意。该协议同时也得到 AICHI 癌症中心医院的同意。

1.2 RNA 的分离及 cDNA 的获得

将样品剪碎后,用 RNeasy Mini Kit 试剂盒从新鲜冻存的组织中提取总 RNA,并进行无 RNA 酶的 DNaseI 处理。cDNA 的合成使用 TaqMan 反转录试剂盒,在 10 μl 反转录缓冲液(包括 5.5 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L 随机 6 核苷酸引物, 4 U RNA 酶抑制剂和 31.25 U MultiScribe 反转录酶)对 200 ng 的总 RNA 进行反转录,按以下步骤操作:25℃ 10 min; 37℃ 60 min; 95℃ 5 min。

1.3 实时定量 RT-PCR 方法分析基因表达

运用实时荧光检测方法对 mRNA 丰度进行定量。如上述获得的 cDNA 在 ABI Prism 7700 序列检测器上进行扩增,人和鼠 RFP 基因引物、18S 核糖体 RNA 基因引物设计如下:

鼠 RFP 上游引物,5'- CAGAATGGATTCTGGGCAG-3';

鼠 RFP 下游引物,5'- AGGAAACCTCACCAGAAT-

CA-3';

人 RFP 上游引物,5'- TCATCGCCGGGAGACAT-TATT-3';

人 RFP 下游引物,5'-GTCATTGGGGAGGTA-AGAGCC -3';

18S rRNA 上游引物,5'- AATCAGGGTTCGATTC-CGGA-3';

18S rRNA 下游引物,5'- CCAAGATCCAAC-TACGAGCT-3'

RFP 的表达检测使用 18S 核糖体 RNA 作内参(每个样品重复 3 次)。用 25 μl 的 SYBR Green I 荧光染料 PCR 系统(包括 5 μmol/L 的上游引物和 5 μmol/L 下游引物)进行 PCR 反应。PCR 条件为:95℃ 10 min, 50 个循环(95℃ 30 second, 56℃ 30 second, 72℃ 30 second)。使用 ABI prism 7700 型序列检测仪对报告荧光染料所发射的荧光进行实时监测。荧光发射量反映循环数并由序列检测仪的软件读出,给出对 PCR 扩增有意义的循环数阈值,循环数的值与基因组 DNA 对数呈线性关系。

1.4 统计学分析

组间差异的统计分析采用 *t* 检验。所有 *P* 值均表示两两对比,*P* < 0.05 为有显著意义。

2 结果

2.1 RFP 在小鼠正常组织中的表达

我们运用实时定量 RT-PCR 方法分析了 RFP 在小鼠正常组织中的表达。将睾丸组织样品进行系列稀释后做标准曲线来确定 RFP 和 18 S rRNA 的相对表达量。在不同稀释度的样品中扩增了 RFP 的 cDNA,在 PCR 反应中,低浓度的 cDNA 导致荧光信号增长较慢,每个反应都使用 18 S 核糖体 RNA 基因作为内对照。使用该技术对 RFP mRNA 含量的分析被证明是可靠且可重复的。我们比较了 RFP 在如下小鼠正常组织中的表达:肺组织、肾组织、子宫组织、卵巢组织、胸腺组织、心肌组织、肌肉组织、睾丸组织、皮肤组织、食管组织、脾组织、肝组织和肠组织(见图 1)。结果表明,与选取的其他正常组织相比,RFP 在小鼠睾丸组织中表达最高(*P* < 0.01),其他组织中皆低表达或不表达。

2.2 RFP 在人正常组织中的表达

进一步分析了 RFP 在正常人组织如子宫颈、子宫内膜、睾丸组织、胃组织、食管和脑组织的表达差异(见图 2)。RFP 也是在人的睾丸组织中表达最高(*P* < 0.01),而在其他组织中低表达。

2.3 RFP 在人食管鳞状细胞癌组织中的表达

运用实时定量 RT-PCR 方法分析了手术切除的 20

例食管鳞状细胞癌组织中 RFP 的表达情况。与正常食管鳞状上皮细胞相比,在 20 例食管鳞状细胞癌组织标本中检测到 13 例 RFP 表达上调,其中 9 例有显著意义($P < 0.05$) (见图 3,图 4)。

实时定量 RT-PCR 是 PCR 技术领域的最新成果,它为在组织或者细胞中测定 mRNA 含量提供了一个敏感、可重复且准确的方法。该方法基于扩增过程中荧光信号的产生和监测,由于直接在密闭的试管内对扩增的 DNA 进行检测,无需 PCR 后的样品处理,这减轻了样品的交叉污染^[4]。本研究利用实时定量 RT-PCR 方法^[5]研究了 RFP 基因在鼠和人正常组织及食管鳞状细胞癌组织中的表达,结果表明,在正常组织中该基因的表达只在睾丸组织中最高,在其他组织中表达较低或不表达。在随机选取的 20 例食管鳞状细胞癌组织标本中检测到 13 例 RFP 表达上调,其中 9 例显著。

图 1 RFP 基因在 14 种鼠正常组织中的表达检测

Fig.1 Expressive detection of RFP gene in 14 Mouse normal tissues

- 1: Lung; 2: Kidney; 3: Uterus; 4: Ovary; 5: Thymus;
- 6: Heart; 7: Muscle; 8: Spleen; 9: Colon; 10: Liver;
- 11: Testis; 12: Eso; 13: Skin; 14: Intestinum

图 3 RFP 基因在 20 例人食管鳞状细胞癌中的表达检测(EN 代表正常食管组,EC 代表食管鳞状细胞癌组织)

Fig.3 Expressive detection of RFP gene in 20 cases of Human esophageal squamous cell carcinoma, EN represent normal esophageal tissues(EN represent normal esophageal tissues, EC represent esophageal squamous cell carcinoma)

1 ~ 24; EN1 ~ 24

图 2 RFP 基因在 6 种人正常组织中的表达检测

Fig.2 Expressive detection of RFP gene in 6 human normal tissues

- 1: Cervicalnormal tissues; 2: Endometrial normal tissues;
- 3: Testis normal tissues; 4: Gastic normal tissues;
- 5: Esophageal normal tissues; 6: Brain normal tissues

图 4 RFP 基因在 20 例人食管鳞状细胞癌中的表达检测 (EN 代表正常食管组织,EC 代表食管鳞状细胞癌组织)

Fig.4 Expressive detection of RFP gene in 20 cases of Human esophageal squamous cell carcinoma, EN represent normal esophageal tissues(EN represent normal esophageal tissues, EC represent esophageal squamous cell carcinoma)

3 讨论

RFP 通过与 RET 原癌基因重排而最初被认定为癌基因。RFP 属于 B 盒环指蛋白家族,该家族蛋白含有由 3 种不同结构构成的基序,这三部分结构分别为环指结构、B 盒锌指结构和复绕域,除此之外,该家族蛋白还包含一个被称为 B30.2 样特定的碳末端区域,人和鼠之间 RFP 氨基酸同源性约为 98.4%。很多蛋白都发现有这种 RING 指结构,如 PML, BMI1/Mel18 和 RING1。

以前的工作表明,在各种人和啮齿动物的肿瘤细胞系及雌性生殖细胞中检测到 RFP mRNA 高水平表达,而且该蛋白与核基质有关,表达于各种细胞的核中,包括外周和中枢神经原细胞、肝细胞、肾上腺嗜铬

细胞^[6]。本研究表明在人和鼠的各种成年组织中该蛋白仅高表达于睾丸组织,这表明 RFP 蛋白阳性的细胞群在多数正常组织中是很小的,为了研究 RFP 基因在人肿瘤中是否上调,我们接着研究了 RFP 在 20 例人食管鳞状细胞癌及 4 例食管正常组织中的表达。研究发现,在 20 例食管鳞状细胞癌组织标本中检测到 13 例 RFP 表达上调,但只有 9 例的差异有显著意义,造成这一差别的原因可能是肿瘤的异质性较大,来源于不同个体同一组织的肿瘤表达相同蛋白的量可能不同,这也是造成目前许多靶向治疗方法对不同个体其效果不同的原因之一。考虑到在正常组织中仅高表达于睾丸组织,而在部分食管癌标本中高表达,RFP 可以作为治疗恶性肿瘤的一个潜在的分子靶点,但需要预先测定该蛋白在具体某个个体肿瘤组织中的表达情况。

[参 考 文 献]

[1] Torok M, Etkin LD. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins[J]. Differentiation, 2001, 67

(3): 63-71.

- [2] Shou W, Li X, Wu C, *et al.* Finely tuned regulation of cytoplasmic retention of xenopus nuclear factor 7 by phosphorylation of individual threonine residues[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(3): 990-997.
- [3] Le Douarin B, Zechel C, Gabnier J, *et al.* The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18[J]. EMBO J, 1995, 14(9): 2020-2033.
- [4] Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, *et al.* The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene Expression[J]. J Biom Techniques, 2003, 14(1): 33-43.
- [5] Philip S, Bernard, Carl T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics[J]. Clin Chem, 2002, 48(4): 1178-1185.
- [6] Tezel G, Nagasaka T, Iwahashi N, *et al.* Different nuclear/cytoplasmic distributions of ret finger protein in different cell types [J]. Pathol Int, 1999, 49(6): 881-886.

[收稿日期] 2003 - 12 - 08

[修回日期] 2004 - 03 - 31

· 科技动态 ·

凝集素样受体 KLRE1 抑制 NK 细胞的细胞毒性

NK 细胞识别、杀伤靶细胞有赖于活化或抑制性受体与多种配体间的相互作用。这些受体可分为两类不同的蛋白家族:KLRs 和带有免疫球蛋白样结构域的受体,均有抑制性和活化性成员。抑制性受体胞浆尾部含有 ITIMs;活化性受体缺乏 ITIMs,但在跨膜区有一个正电氨基酸并与含有 ITAM 的接头分子相关联。SHP-1 与磷酸化的 ITIMs 关联介导抑制 NK 细胞的细胞毒性。本研究报道了克隆的一个新的 NK 细胞受体 KLRE1。初步的实验结果提示 KLRE1 能抑制 NK 细胞的细胞毒性。

为探讨 KLRE1 的生物学功能,采用流式细胞仪分析、Northern blot、免疫共沉淀和重复靶向细胞裂解分析等方法,对 KLRE1 的基因定位、组织分布、分子结构、受体活性以及与 SHP-1 的关系等作了初步研究。结果显示:CB.17 SCID 小鼠来源的 NK 细胞 cDNA 文库转染 COS-7 细胞,表达克隆获得编码 mKLRE1 的 cDNA,然后用小鼠 cDNA 片段扫描 F344 大鼠 NK 细胞 cDNA 文库获得 rKLRE1 的 cDNA,对这两个 cDNA 分析后提示 KLRE1 是一个 II 型跨膜蛋白,C 末端有一个凝集素样结构域,构成新的 KLR 家族。KLRE1 不包含 ITIMs,跨膜区也未发现正电氨基酸。用 rKLRE1 的单克隆抗体 WEN 27 通过流式细胞仪分析提示 KLRE1 在 NK 细胞和 CD3⁺ 细胞的一个亚群上表达。接下来对 KLRE1 的分子结构进行了研究,用 rKLRE1-HA 表达载体稳定转染 RNKDA1 细胞系(RNKDA1-tx),然后获得 RNKDA1-tx 的细胞溶解物并在还原性和非还原性 SDS-PAGE 下分离,用 anti-HA 和 WEN-27 结合 Western blot 进行分析,瞬时转染 rKLRE1-HA 的 293T 细胞用同样的方法进行分析,结果表明 KLRE1 在 NK 细胞表面以二硫键连接的二聚体形式表达,其配偶体分子量约 27 kD,与 KLRE1 大致相等。重复靶向细胞裂解分析试验提示 KLRE1 抑制 NK 细胞的细胞毒性。并且在 DA NK 和 RNKDA1-tx 两种细胞利用免疫共沉淀方法分析 SHP-1 在 KLRE1 信号转导中的作用时,结果显示 KLRE1 能共沉淀 SHP-1。可见 KLRE1 与其配体组成一个功能性的异二聚体,该配体包含 ITIMs,能招引 SHP-1,从而组成一个抑制性的受体复合体。

本研究提示在啮齿类动物 NK 细胞表面存在一个新的由 NKC 编码的 C 型凝集素样受体 KLRE1,此受体能抑制 NK 细胞的免疫功能。

[刘海波 编译,曹雪涛 审阅; (英) J Exp Med, 2003, 197(11): 1551 - 1561]