

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.010

## 喉鳞状细胞癌组织中 *NDRG1*、*NDRG2* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态及其蛋白的表达

兰利利, 赵瑞力, 刘猛, 徐玉茹(河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:**探讨喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)组织中 *N-myc* 下游调节基因 1(*N-myc* downstream regulated gene 1, *NDRG1*)及 *NDRG2* 基因启动子甲基化状态和蛋白表达情况及其临床意义。**方法:**应用甲基化特异性 PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)技术及免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法检测 45 例 LSCC 组织、18 例癌旁组织中 *NDRG1*、*NDRG2* 基因启动子区 CpG 岛甲基化及蛋白表达情况,分析其与临床特征的关系。**结果:**LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子区的甲基化发生率显著高于癌旁正常组织[66.7%(30/45) vs 33.3%(6/18), 53.3%(24/45) vs 22.2%(4/18), 均  $P < 0.05$ ],其高甲基化与淋巴结转移及临床分期有关( $P < 0.05$ ),与病理分级、临床分型、吸烟史、年龄和性别无关( $P > 0.05$ )。在 LSCC 组织中,*NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白的阳性表达率显著低于癌旁组织[37.8%(17/45) vs 88.9%(16/18), 33.3%(15/45) vs 83.3%(15/18), 均  $P < 0.01$ ],其低蛋白表达与淋巴结转移及临床分期有关( $P < 0.05$ ),与病理分级、临床分型、吸烟史、年龄和性别无关( $P > 0.05$ )。LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 启动子区甲基化与其蛋白表达呈负相关( $r_1 = -0.713, P < 0.01$ ;  $r_2 = -0.472, P < 0.01$ )。**结论:**在 LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因均呈高甲基化及低蛋白表达状态,这可能与喉癌的发生和发展有关,*NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化可能是抑制它们蛋白表达的机制之一。

**[关键词]** 喉癌;*NDRG1*;*NDRG2*;启动子甲基化

**[中图分类号]** R739.65; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0658-07

## Promoter region CpG island methylation status and protein levels of *NDRG1* and *NDRG2* in laryngeal squamous cell carcinoma

Lan Lili, Zhao Ruili, Liu Meng, Xu Yuru( Department of Head and Neck Surgery, the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China )

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the promoter region CpG island methylation status and protein levels of *NDRG1* and *NDRG2* in laryngeal carcinoma. **Methods:** Larynx tumor tissue ( $n = 45$ ) and normal lung tissue ( $n = 18$ ) specimens were collected from 45 patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) who underwent surgery in the Department of Head and Neck Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University between January, 2010 and December, 2011. The promoter CpG island methylation status and protein levels of *NDRG1* and *NDRG2* in the collected specimens were quantified by methylation specific polymerase chain reaction and immunohistochemistry, respectively. **Results:** The methylation level of promoter CpG island was significantly higher in LSCC tissue and in normal larynx tissue for both *NDRG1* (66.7% vs 33.3%,  $P < 0.05$ ) and *NDRG2* (53.3% vs 22.2%,  $P < 0.05$ ) genes. The proportion of *NDRG1* and *NDRG2* promoter methylation in LSCC tissue specimens was associated with lymph node metastasis and clinical stage ( $P < 0.05$ ), but neither with pathological grade and clinical classification of the lesion nor with smoking history, age and sex ( $P > 0.05$ ). *NDRG1* protein was detected in 37.8% (17/45) of LSCC specimens and in 88.9% (16/18) of normal tissue specimens ( $P < 0.01$ ) and *NDRG2* protein in 33.3% (15/45) of LSCC specimens and in 83.3% (15/18) of normal larynx tissue specimens ( $P < 0.01$ ). Like promoter methylation status, *NDRG1* and *NDRG2* protein levels in LSCC

**[作者简介]** 兰利利(1983-)女,河北省唐山市人,医师,主要从事喉恶性肿瘤诊断治疗方面的研究, E-mail: xingecao0926@163.com

**[通信作者]** 赵瑞力(Zhao Ruili, corresponding author), E-mail: zhrui@126.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1517.008.html>

tissue were associated with lymph node metastasis and clinical stage ( $P < 0.05$ ), but not with pathological grading and clinical classification of the lesions, smoking history, age and sex ( $P > 0.05$ ). CpG island methylation in the promoter region was negatively correlated with protein expression for both *NDRG1* ( $r_1 = -0.713$ ,  $P < 0.01$ ) and *NDRG2* ( $r_2 = -0.472$ ,  $P < 0.01$ ) genes. **Conclusion:** Both *NDRG1* and *NDRG2* promoters are hypermethylated, resulting in decreased *NDRG1* and *NDRG2* protein expression, in LSCC tissue. This observation suggests that anti-methylation of CpG island in the promoter region of the *NDRG1* and *NDRG2* genes may offer a novel therapeutic strategy for LSCC.

[ **Key words** ] laryngeal squamous cell carcinoma; *NDRG1*; *NDRG2*; promoter methylation

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 658-664 ]

喉癌(carcinoma of larynx)是头颈部常见的恶性肿瘤,在我国东北地区高发,其发病率约占全身恶性肿瘤的5.7%~7.6%,约占耳鼻咽喉恶性肿瘤的7.9%~35%,发病率有逐年升高的趋势<sup>[1]</sup>。*N-myc*下游调节基因1(*N-myc* downstream regulated gene 1, *NDRG1*)又被称为分化相关基因(differentiation related gene 1, *Drg1*)和钙激活蛋白基因(calcium activated protein, *Cap43*)<sup>[2]</sup>。其表达水平是随着生长、发育的过程而不断变化的,提示该基因可能在各种组织的生长及分化过程中起着重要的作用。与*NDRG1*不同,*NDRG2*并不受*N-myc*调节,因*NDRG2*与*NDRG1*有57%的同源性,因此推测*NDRG2*也参与细胞的生长和分化。研究<sup>[3]</sup>表明,*NDRG2*与细胞的凋亡有关。绝大多数DNA甲基化发生在5'-CpG-3'二核苷酸,通常在基因启动子区中CpG序列密度很高,形成CpG岛<sup>[4]</sup>。健康人基因组中,CpG岛中的CpG位点通常处于非甲基化状态,而在CpG岛外的CpG位点则通常是甲基化的,这种甲基化形式在细胞分裂过程中可稳定地保留<sup>[5]</sup>。*NDRG1*及*NDRG2*基因在多种组织中均有表达,它们启动子区可发生甲基化而失活,与多种肿瘤的发生和发展相关。关于在喉癌中两者甲基化情况及其蛋白表达的报道较少。因此本研究检测喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)组织中*NDRG1*及*NDRG2*基因启动子区甲基化状态和蛋白表达的情况,探讨两者的甲基化状态及蛋白表达与喉癌发生、发展的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象和标本来源

纳入标准:病例资料完整,术前未行放、化疗行手术切除,所有的肿瘤组织均经病理学确诊为鳞状细胞癌,癌旁组织及喉部正常黏膜均经病理证实为炎症或正常黏膜。

45例LSCC组织及18例相应癌旁组织(距瘤灶切缘至少0.5cm)取自2010年1月至2011年12月

于河北医科大学附属第四医院耳鼻咽喉头颈外科住院手术的LSCC患者,其中男性44例,女性1例;年龄范围46~76岁,中位年龄63岁;有淋巴结转移的20例,无淋巴结转移的25例(有无淋巴结转移依据术后病理而定);病理学分级:G<sub>1</sub>组7例,G<sub>2</sub>组30例,G<sub>3</sub>组8例;LSCC分型:声门上型14例,声门型24例,声门下型7例;吸烟量>400(年×支/日)者40例,≤400者5例;临床分期采用国际抗癌协会(UICC)TNM分类标准(2002):I、II期21例,III、IV期24例。

### 1.2 主要试剂

Wizard DNA纯化试剂盒购自Promega公司,*NDRG1*(bs-1584R,0.2ml)及*NDRG2*(bs-1998R,0.2ml)购自博奥森公司,免疫组化系列工作液试剂及DAB显色液均购自北京中杉金桥生物技术开发公司。

### 1.3 甲基化特异性PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测LSCC组织中*NDRG1*及*NDRG2*的甲基化状态

采用蛋白酶K、酚-氯仿法抽提新鲜组织中的DNA;正常对照标本取自健康人PBMC,经过甲基转移酶M.Sss I作用,作为甲基化基因对照(阳性对照),以无菌去离子水代替反应体系中的DNA模板。基因组DNA经过亚硫酸氢盐修饰后原来未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不能被修饰。根据此原理设计该基因的甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物,进行PCR扩增。将处理后的DNA作为模板(2μl),加入甲基化(非甲基化)特异性上、下游引物(各取10μmol/L的引物溶液0.5μl)和预混体系(10μl)进行PCR,反应体系总体积为20μl,所用引物序列及产物片段的大小见表1。*NDRG1*反应条件为95℃预变性10min;95℃变性45s,51.7℃退火45s,72℃延伸45s,40个循环;72℃延伸7min。*NDRG2*反应条件为95℃预变性10min;95℃变性45s,51.5℃退火45s,72℃延伸70s,38个循环;72℃延伸7min。扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,采用凝胶成像系统进行图像

分析处理。

甲基化特异性 PCR 检测结果的判定<sup>[6]</sup>: (1) 只有甲基化特异性引物扩增出来的目的条带, 而非甲基化引物无目的条带, 称为完全甲基化, 计为甲基化; (2) 甲

基化和非甲基化特异性引物均扩增出相应的目的条带, 为半甲基化, 计入甲基化; (3) 只有非甲基化特异性引物扩增出来的目的条带, 计为非甲基化。

表 1 *NDRG1*、*NDRG2* 甲基化及非甲基化引物序列与产物片段大小以及退火温度

Tab. 1 Methylated, unmethylated primers, annealing temperatures and products sizes of the *NDRG1*, *NDRG2*

Gene	Primer purpose	Primer sequence(5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature( t/°C )
<i>NDRG1</i>	M	F- ACGAGCGCGTATATGAATACGT R- GCCTATTACGCAAACAATCGT	172	51.7
	U	F- TGTATGAGTGTGTATATGAATATGT R- ACCACCTATTACACAAACAATCAT	178	54
<i>NDRG2</i>	M	F- TAGTGGTAAATTTATTCGGGTATCG R- CAAAAACGAAATTAACCCTACGA	214	51.5
	U	F- GGTAAATTTATTTGGGTATTGA R- CAAAAACAAAATTAACCCTACAAA	210	53

M: Methylated; U: Unmethylated; F: Forward; R: Backward

1.4 免疫组织化学方法检测 LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡至水, 3% 甲醇 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶, 微波修复 15 min。依次加入一抗及相应生物素化二抗和辣根过氧化物酶标记的三抗, DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 常规脱水, 透明, 中性树胶封片。PBS 取代一抗作为空白对照, 其余步骤同上。免疫组织化学结果判定: *NDRG1*、*NDRG2* 蛋白阳性信号均为黄-棕黄色颗粒, 定位于鳞状上皮细胞的细胞质和(或)细胞膜。由 3 名有经验的临床病理医师阅片, 按照阳性细胞所占百分比与着色强度采用半定量积分法判断结果<sup>[7]</sup>: (1) 根据阳性细胞所占百分比评分, 阳性细胞数 ≤ 5% 为 0 分, 6% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 则为 4 分。(2) 根据着色强度进行评分, 无显色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。取(1)和(2)项评分的乘积作为染色结果的评判标准: 积分 ≤ 2 分定义为阴性表达, 积分 > 2 分定义为阳性表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件, 计数资料以百分比表示,  $\chi^2$  检验分析 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因的蛋白表达及甲基化情况与 LSCC 临床参数的关系, 当四格表资料  $n < 40$  或  $T < 1$  时改用和 Fisher 确切概率法, 相

关性分析用 Spearman 等级相关分析, 采用双侧检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 LSCC 组织中 *NDRG1*、*NDRG2* 甲基化状况及其与临床特征的关系

MSP 检测结果(图 1, 表 2)显示, 在 LSCC 组织中 *NDRG1* [ 66.7% ( 30/45 ) vs 33.3% ( 6/18 ),  $\chi^2 = 5.833, P = 0.016$  ] 和 *NDRG2* [ 53.3% ( 24/45 ) vs 22.2% ( 4/18 ),  $\chi^2 = 5.040, P = 0.025$  ] 的甲基化率显著高于癌旁组织。*NDRG1* 和 *NDRG2* 在伴有淋巴结转移的 LSCC 组织中基因启动子区 CpG 岛的甲基化发生率显著高于无淋巴结转移组(均  $P < 0.05$ ), 在 I、II 期 LSCC 组织中甲基化发生率显著高于 III、IV 期 LSCC 组织(均  $P < 0.05$ )。*NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子区甲基化发生率在不同病理分级、临床分型、吸烟史、年龄和性别组间没有显著差异(  $P > 0.05$  )。

2.2 LSCC 组织中 *NDRG1*、*NDRG2* 蛋白的表达水平及其与临床特征的关系

在 45 例 LSCC 组织及 18 癌旁组织中分别检测了 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白的表达情况, *NDRG1* 蛋白 [ 37.8% ( 17/45 ) vs 88.9% ( 16/18 ),  $\chi^2 = 13.465, P = 0.000$  ] 和 *NDRG2* 蛋白 [ 33.3% ( 15/45 ) vs

83.3% (15/18),  $\chi^2 = 12.886, P = 0.000$ ] 在 LSCC 组织中的阳性表达率显著低于癌旁组织(图 2); 两者在伴有淋巴结转移的 LSCC 病例组中的阳性表达率显著低于无淋巴结转移的 LSCC 病例组(均  $P < 0.05$ ), 在 I、II 期 LSCC 病例组的阳性表达率显著高于 III、IV 期 LSCC 病例组(均  $P < 0.05$ )。 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白阳性表达率与病理分级、临床分型、吸烟史、年龄和性别无关(均  $P > 0.05$ ) (表 3)。

2.3 *NDRG1* 和 *NDRG2* 甲基化与其蛋白表达之间的相关性

经 Spearman 相关性分析, *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子甲基化与蛋白表达均密切相关, 且呈负相关( $r_1 = -0.713, P < 0.01; r_2 = -0.472, P < 0.01$ ) (表 4)。

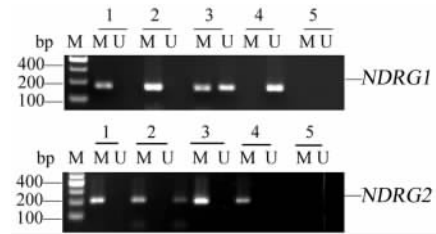


图 1 LSCC 组织中 *NDRG1*、*NDRG2* 基因启动子区甲基化状态

Fig. 1 Methylation status of CpG island in the promoter region of *NDRG1* and *NDRG2*  
 1: Positive control; 2-4: LSCC tissues and adjacent non-neoplastic tissues has three cases: methylated, unmethylated and hemi-methylated; 5: Blank control; MA: DNA marker; M: Methylated; U: Unmethylated

表 2 *NDRG1* 及 *NDRG2* 甲基化与临床参数的关系

Tab. 2 Correlations between *NDRG1* and *NDRG2* methylation and clinical characters in cancerous tissues

Group	N	<i>NDRG1</i> methylation			<i>NDRG2</i> methylation		
		n(%)	$\chi^2$	P	n(%)	$\chi^2$	P
Age(t/a)							
≤63	24	18(75.0)			14(58.3)		
>63	21	12(57.1)	1.607	0.226	10(47.6)	0.517	0.556
Gender							
Male	44	29(65.9)			23(52.3)		
Female	1	1(100.0)	0.511	1.000	1(100.0)	0.895	1.000
Differential degree							
G1	7	5(71.4)			2(28.6)		
G2	30	20(66.7)			16(53.3)		
G3	8	5(62.5)	0.134	0.935	6(75.0)	3.355	0.187
Clinical classification							
Supraglottic	14	9(64.3)			9(64.3)		
Glottic	24	14(58.3)			12(50.0)		
Subglottic	7	5(71.4)	0.441	0.802	3(42.9)	1.102	0.576
Smoking history							
≤400	5	5(100.0)			2(40.0)		
>400	40	25(62.5)	2.813	0.153	22(55.0)	0.402	0.652
Lymph node metastasis							
Yes	20	17(85.0)			14(70.0)		
No	25	13(52.0)	5.445	0.020	10(40.0)	4.018	0.045
Clinical stage							
I + II	21	10(47.6)			7(33.3)		
III + IV	24	20(83.3)	6.429	0.011	17(70.8)	6.328	0.012

### 3 讨论

1997 年发现的 *NDRG1*<sup>[8]</sup> 与 1999 年发现的 *NDRG2*<sup>[9]</sup> 属于同一家族,与随后陆续发现的 *NDRG3* 和 *NDRG4* 组成 *NDRG* 家族。此家族成员的氨基酸序列同源性很高,约为 57% ~ 65%<sup>[10]</sup>。虽然此家族成员具有较高的氨基酸序列同源性,但其各自分布却具有组织特异性。*NDRG2* 在包括神经胶质瘤和乳腺癌<sup>[11-13]</sup>、肝癌<sup>[14-15]</sup>、结肠癌<sup>[16]</sup>、胃癌<sup>[17]</sup>、脑膜瘤<sup>[18]</sup> 等多种肿瘤中低表达或者不表达,并且 *NDRG2* 的表达水平与肿瘤恶性程度成负相关,因此 *NDRG2* 被认为一定程度地抑制肿瘤组织的生长。

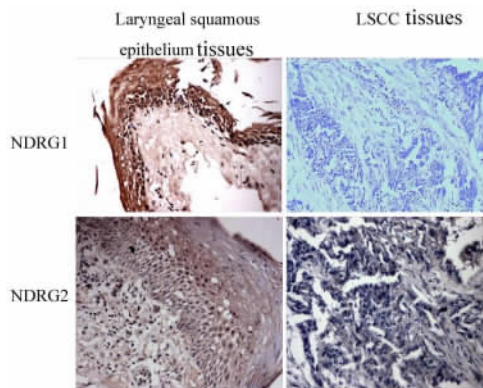


图 2 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白在癌旁正常组织和 LSCC 组织中的表达( ×200 )

Fig. 2 Expressions of *NDRG1* and *NDRG2* protein in normal laryngeal squamous epithelium and LSCC( ×200 )

表 3 LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白表达与临床参数的关系

Tab. 3 Correlations between *NDRG1* and *NDRG2* protein expression and clinic parameters in LSCC tissues

Group	N	NDRG1 protein			NDRG2 protein		
		n( % )	$\chi^2$	P	n( % )	$\chi^2$	P
Age ( t/a )							
≤63	24	9( 37.5 )			7( 29.2 )		
>63	21	8( 38.1 )	0.002	1.000	8( 38.1 )	0.402	0.546
Gender							
Male	44	17( 38.6 )			14( 31.8 )		
Female	1	0( 0.0 )	0.621	1.000	1( 100.0 )	2.045	0.333
Differential degree							
G1	7	5( 71.4 )			4( 57.1 )		
G2	30	10( 33.3 )			7( 23.3 )		
G3	8	2( 25.0 )	4.103	0.129	2( 25.0 )	2.949	0.229
Clinical classification							
Supraglottic	14	6( 42.9 )			4( 28.6 )		
Glottic	24	11( 45.8 )			10( 41.7 )		
Subglottic	7	2( 28.6 )	0.689	0.709	1( 14.3 )	2.912	0.334
Smoking history							
≤400	5	2( 40.0 )			3( 60.0 )		
>400	40	15( 37.5 )	0.012	1.000	12( 30.0 )	1.800	0.315
Lymph node metastasis							
Yes	20	4( 20.0 )			3( 15.0 )		
No	25	13( 52.0 )	4.840	0.028	12( 48.0 )	5.445	0.020
Clinical stage							
I + II	21	12( 57.14 )			11( 52.4 )		
III + IV	24	5( 20.8 )	6.282	0.012	4( 16.7 )	6.429	0.011

表 4 *NDRG1*、*NDRG2* 启动子甲基化与蛋白表达的关系Tab. 4 Relationship between methylation of *NDRG1* and *NDRG2* gene promoter and their protein expression in LSCC tissues

Gene	Methylation	Protein expression		<i>r</i>	<i>P</i>
		+	-		
<i>NDRG1</i>	+	4	26	0.713	0.000
	-	13	2		
<i>NDRG2</i>	+	3	21	0.472	0.001
	-	12	9		

肿瘤细胞的形成与两个相对的事件有关,即全基因组的低甲基化和启动子 CpG 岛的高甲基化。王立玮等<sup>[19]</sup>采用基因芯片技术进行 *NDRG1* 基因甲基化水平定量检测,发现在 33 例乳腺癌和相应癌旁正常组织中甲基化发生分别为 40.76% 和 22.41%。有研究<sup>[20]</sup>发现,*NDRG2* 启动子区包含 426 bp 的 CpG 岛,其在脑胶质瘤、肝癌、胃癌以及肺癌细胞中的低表达可能与基因突变和基因的启动子区甲基化有关。本研究发现,在 LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化发生率均高于癌旁正常组织中的甲基化发生率。恰恰相反,在 LSCC 组织中 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白却呈低表达状态,而且两者的这种高甲基化和低蛋白表达均与淋巴结转移及临床分期有关,提示 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因的高甲基化及蛋白的低表达与 LSCC 的发生发展和转移有关。贺付成等<sup>[21]</sup>系统检测了食管癌高发区的正常食管组织、癌旁组织及食管鳞癌组织 *NDRG1* mRNA 及蛋白表达情况发现:*NDRG1* mRNA 及蛋白在食管癌中呈低表达状态,并且与食管鳞癌的分级及有无淋巴结转移无关,提示 *NDRG1* 的表达降低可能与食管鳞癌的发生发展有关。还有研究<sup>[22]</sup>发现,*NDRG2* 蛋白的表达缺失能够上调肿瘤的浸润性生长、淋巴结转移及复发。并且 *NDRG2* 表达阴性的肝透明细胞癌细胞经常侵袭至附近表达 *NDRG2* 的正常组织中,提示 *NDRG2* 能够抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。本研究还发现,启动子区甲基化与蛋白表达呈负相关,提示 *NDRG1* 及 *NDRG2* 基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化可能是抑制 *NDRG1* 及 *NDRG2* 蛋白表达的机制之一,两者的高甲基化及低蛋白表达可能共同参与 LSCC 的发生和发展,在 LSCC 组织中发挥着协同抑癌基因的作用。

有研究者<sup>[23]</sup>推测,*NDRG1* 抑制肿瘤生长和转移的机制有:(1)*NDRG1* 作为 *P53* 的下游调节基因,

协同 *P53* 促进细胞的分化、成熟及凋亡;(2)*NDRG1* 的过表达能够下调 VEGF 及 IL-8 的表达,从而抑制新生血管的生成,抑制肿瘤的转移;(3)改变肿瘤细胞间的黏附力及抑制细胞外基质的降解。*NDRG1* 的表达与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 的活性呈负相关,其高表达或许能够抑制细胞外基质的降解、抑制肿瘤细胞的转移。与 *NDRG2* 抑制肿瘤生长、转移及发展有关的可能机制:(1)*NDRG2* 通过位于丝氨酸残基的 C-jun 来调控细胞内的信号转导,下调活化蛋白-1(AP-1)和细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)的表达进而控制细胞的分裂周期,最终导致癌细胞周期停滞在 G<sub>1</sub>/S 期<sup>[24]</sup>;(2)*NDRG2* 能够诱导骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)-4 的分泌,抑制 MMP-9 的表达,从而抑制细胞外基质的降解、抑制肿瘤细胞转移;(3)*NDRG2* 的表达能够降低 T-细胞因子/淋巴强化因子的转录活性和细胞内 β-连环蛋白的表达水平<sup>[25]</sup>,显示出 *NDRG2* 能够衰减 TCF/β-连环蛋白的信号转导,通过抑制 WNT 通路来抑制肿瘤细胞的转移。

*NDRG1*、*NDRG2* 启动子区域的异常甲基化可能是 LSCC 形成过程中的一个早期事件,可以作为 LSCC 发生的预警信号,对可能发展为 LSCC 的高危人群进行甲基化检测,对 LSCC 患者的早期诊断有潜在的意义。对已经确诊的患者,对其进行基因的甲基化检测能够为判断 LSCC 是否发生局部浸润及远处转移提供分子学依据。

#### [参考文献]

- [1] 杜灵彬,毛伟敏,陈万青,等. 中国 2003-2007 年喉癌发病率和死亡率分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(4): 395-398.
- [2] Zhou D, Salnikow K, Costa M. Cap43, a novel gene specifically induced by Ni<sup>2+</sup> compounds [J]. Cancer Res, 1998, 58(10): 2182-2189.
- [3] 吴国强,刘新平,王立峰,等. *NDRG2* 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的诱导作用 [J]. 细胞与免疫学杂志, 2003, 19(4): 357-360.
- [4] Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(3): 223-231.
- [5] Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology [J]. Clin Biochem, 2004, 37(7): 595-604.
- [6] Glickman JF, Flynn J, Reich NO. Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230(2): 280-284.
- [7] Franklin S, Pho T, Abreo FW, et al. Detection of the proto-onco-

- gene Eif4e in larynx and hypopharynx cancer [ J ]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1999, 125(2):177-182.
- [ 8 ] Fang BA, Park KC, Kalinowski DS, et al. Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy [ J ]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845(1): 11-19.
- [ 9 ] 邓艳春, 药力波, 刘新平, 等. 人脑内一含有 ACP 样结构域新基因的发现 [ J ]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1):72-76.
- [ 10 ] Qu X, Zhai Y, Wei H, et al. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family [ J ]. Mol Cell Biochem, 2002, 229(1/2): 3544.
- [ 11 ] Lorentzen A, Lewinsky RH, Bornholdt J, et al. Expression profile of the N-myc downstream regulated gene 2 ( NDRG2 ) in human cancers with focus on breast cancer [ J/OL ]. BMC Cancer, 2011, 11: 14. [ 2014-04-25 ]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/14>.
- [ 12 ] Ma J, Liu W, Yan X, et al. Inhibition of endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis by up-regulating NDRG2 expression in breast cancer cells [ J ]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32368.
- [ 13 ] Oh SS, Kim D, Kim DH, et al. NDRG2 correlated with favorable recurrence-free survival inhibits metastasis of mouse breast cancer cells via attenuation of active TGF- $\beta$  production [ J ]. Carcinogenesis, 2012, 33(10): 1882-1888.
- [ 14 ] Ventura-Holman T, Mamoon A, Subauste MC, et al. The effect of oncoprotein v-erbA on thyroid hormone-regulated genes in hepatocytes and their potential role in hepatocellular carcinoma [ J ]. Mol Biol Rep, 2011, 38(2): 1137-1144.
- [ 15 ] Zheng J, Li Y, Yang J, et al. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression [ J ]. BMC Cancer, 2011, 11(251): 1-9.
- [ 16 ] Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, et al. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma [ J/OL ]. BMC Cancer, 2007, 7: 192. [ 2014-04-25 ]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/192>.
- [ 17 ] Chang X, Li Z, Ma J, et al. DNA methylation of NDRG2 in gastric cancer and its clinical significance [ J ]. Dig Dis Sci, 2013, 58(3): 715-723.
- [ 18 ] Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, et al. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma [ J ]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7121-7126.
- [ 19 ] 王立玮, 周东蕊, 房汝敬, 等. 乳腺癌中 NDRG-1 基因甲基化状态研究 [ J ]. 现代医学, 2008, 36(2): 79-83.
- [ 20 ] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(1): 164-169.
- [ 21 ] 贺付成, 张岚, 高冬玲, 等. 食管癌组织中 NDRG1 mRNA 和蛋白的表达 [ J ]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(3): 395.
- [ 22 ] Kim YJ, Yoon SY, Kim JT, et al. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma [ J ]. Carcinogenesis, 2009, 30(4): 598-605.
- [ 23 ] Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, et al. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/ NDRG1/ Drg-1 through modulation of angiogenesis [ J ]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6233-6242.
- [ 24 ] Kim YJ, Yoon SY, Kim JT, et al. NDRG2 suppresses cell proliferation through down-regulation of AP-1 activity in human colon carcinoma cells [ J ]. Int J Cancer, 2009, 124(1): 7-15.
- [ 25 ] Shon SK, Kim A, Kim JY, et al. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(2): 198-203.
- [ 收稿日期 ] 2014-05-25 [ 修回日期 ] 2014-10-20  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1* (人)、病毒癌基因 *v-raf-1* (鼠)、抑癌基因 *p53* (鼠) 等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind III*、*BamH I*、*Sal I* 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外), 例如长度 *l*、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体, 例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)