

cap43 基因在肿瘤病理诊断中的研究进展

李晶晶,李 巍综述,李国利审校

关键词:cap43 基因;肿瘤;病理诊断

中图分类号:R730.4 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)12-0977-03

0 引言

恶性肿瘤难以根治的一个非常重要的原因在于难以早期发现和早期诊断。随着免疫学技术与分子生物学技术的发展和进步,肿瘤的免疫学诊断和基因诊断为肿瘤的早期诊断提供了可能。目前,发现了许多基因和基因产物对肿瘤诊断有所帮助。本文主要介绍一个新的热点基因——cap43 基因在肿瘤诊断中的研究进展。

1 cap43 基因的发现

1998 年 Salnikow 等^[1]在研究镍化合物致癌机制过程中,采用差异显示技术从人的支气管肺泡上皮细胞 A549 中分离得到了一段新的基因。这个基因就是 cap43(calcium associated protein 43, cap43)。在研究过程中发现镍化合物有致癌作用,这个过程主要通过各种途径引起细胞与核酸的损害,从而影响基因的表达,使得 cap43 产生。此外,低氧也可以依赖于低氧诱导转录因子 1(HIF-1)途径产生 cap43 基因^[2]。

2 cap43 基因的结构

cap43 基因又称为 NDRG1, NDRG 家族包括 NDRG1、NDRG2、NDRG3 和 NDRG4 四个成员,有 57%~65% 相同的氨基酸,其中, NDRG4 比较专一地分布于脑和心脏。其他的在体内分布相对广泛^[3]。此外, cap43 基因又称为 RTP/Drg-1/rit42。cap43 基因定位于人类染色体 8q24, 全长 47 156 bp, 有 15 个外显子, 14 个内含子, 编码的 mRNA 为 3 000 bp。cap43 mRNA 3' 端有 1 759 bp 的非翻译区, 翻译区编码 394 个氨基酸残基, 相对分子量为 43, 000, 等电点为 5.3。在羧基端有一个含有 10 个氨基酸的重复序列, 这 10 个氨基酸为 TRSRSH TSEG, 一共重复 3 次。最新研究发现^[4]镍与 cap43 蛋白的结合位点分别在 20 个氨基酸 TRSRSH TSEG-TRSRSH TSEG [Thr (341)-Arg-Ser-Arg-Ser-His

(346)-Thr-Ser-Glu-Gly-Thr-Arg-Ser-Arg-Ser-His (356)-Thr-Ser-Glu-Gly(360)]组成的肽链和 30 个氨基酸 TRSRSH TSEG-TRSRSH TSEG(Thr (341)-Arg-Ser-Arg-Ser-His (346)-Thr-Ser-Glu-Gly-Thr-Arg-Ser-Arg-Ser-His (356)-Thr-Ser-Glu-Gly-Thr-Arg-Ser-Arg-Ser-His (366)-Thr-Ser-Glu-Gly(370)-peptide2)组成的肽链上。cap43 蛋白富含丝氨酸和苏氨酸(16%), 其为蛋白激酶的良好底物, 有 3 个蛋白激酶 C 的蛋白磷酸化位点, 3 个酪蛋白激酶 位点和 1 个酪氨酸激酶位点。

3 cap43 基因的调控

cap43 是在水溶性以及非水溶性复合物作用下大量的产生^[5], 这些复合物引起 cap43 蛋白的表达是通过磷脂酰肌醇(-3) 激酶(PF3 K)相关性通路完成的, 通过抑制 PF3 K 的通路可以抑制 cap43 蛋白的表达^[6]。目前研究发现, 调节 cap43 基因表达的因素主要有以下几方面:

3.1 细胞内游离钙离子

Salnikow^[2]等研究镍化合物产生 cap43 过程中发现, 游离钙离子载体 A23187 刺激 cap43 基因的大量表达。另外, BAPTA-M, 一种体内游离钙离子的特殊螯合剂能够降低 cap43 基因的表达。这说明细胞内游离钙离子的含量对于 cap43 的产生具有很大的影响, 钙离子在镍化合物诱导该基因的转录、表达的机制中起着非常重要的作用。进一步研究发现钙离子实际上是镍化合物诱导 cap43 基因表达过程中的第二信使。另外一种重金属离子螯合剂 TPEN 与镍有很高的亲和力, 而对钙离子亲和力相对较低, 它并不能降低 cap43 的表达, 这就表示细胞内游离钙离子升高是诱导 cap43 基因表达的主要原因。

3.2 细胞缺氧

Park H^[7]对乳腺癌细胞株研究, 发现在低氧条件下(1%), 8 个小时后出现 cap43 基因的表达和上调。Salnikow 等^[8]研究发现, 低氧可以引起低氧转录因子(HIF-1)的增加, 从而引起低氧诱导基因 cap43 以及血管内皮生长因子 VEGF 等基因的增

收稿日期:2006-12-04;修回日期:2007-01-10
作者单位:225001 江苏扬州大学医学院病理学教研室
作者简介:李晶晶(1982-),女,硕士在读,主要从事肿瘤病理学诊断研究

加。同时,C-Jun 蛋白水平的表达增加并且磷酸化。采用蛋白激酶抑制剂 K252a 阻断 C-Jun 蛋白表达以及激活因子蛋白-1 (AP-1) 受体表达,可以显著抑制缺氧诱导基因 VEGF 和 cap43 的表达。对 VEGF-Luc 启动子缺失结构进行研究发现,AP-1 结合位点启动钙离子诱导 VEGF-Luc 表达。AP-1 位点缺失可阻断钙离子诱导相关基因转录,仅部分阻断缺氧诱导基因转录,降低缺氧诱导基因 cap43 的转录、表达。由此可见,缺氧使得细胞内钙离子升高,激活 HIF-1 依赖的信号传导途径,包括 AP-1 启动转录、表达,HIF-1 和 AP-1 共同调控缺氧状态下诱导 cap43 基因表达。

3.3 雌激素

Fotovati A 等^[9]通过对乳腺癌细胞株的研究,在部分细胞株内转染进雌激素受体- (ER-) cDNA 创造出 ER- 过表达的状态。免疫组化发现 8 个细胞株中,4 个高表达 ER- 的细胞株, cap43 低表达。相反,4 个低表达 ER- 的细胞株,高表达 cap43 ($n = 96$)。在 ER- 高的细胞株,E2 (雌二醇) 治疗后降低了 cap43 的量。但是,低表达 ER- 的细胞株 cap43 蛋白的量却没有变化。加入雌激素抑制剂,就没有下调 cap43 的作用了。统计结果表明 cap43 的表达与 ER- 的表达呈负相关 ($P = 0.0374$),提示 E2 具有下调 cap43 的作用,并且这个作用是通过 ER- 依赖途径实现的。

3.4 其他因素

Piquemal D^[10]等利用差异显示方法在骨髓单核细胞 U937 细胞上发现,当细胞处于生长停滞或终末分化的时候, cap43 的 mRNA 量开始显著上调。并且发现使用巴豆油酸,类视黄醇以及 1,25-(OH)₂ 维生素 D₃ 可以上调 cap43 蛋白的量,在乳腺癌的 MCF-7 细胞中发现 cap43 蛋白的量在运用类视黄醇以及抗雌激素药 ICI182,780 后显著增加。小鼠 C2 肌细胞的 cap43 同源性蛋白的量在使用维甲酸后显著上调。对前列腺癌的 LNCaP 细胞进行差异显示的方法研究^[11],发现利用雄激素处理过的 LNCaP 细胞中 cap43 的表达量比正常前列腺细胞高达 14 倍之多。但是在雄激素受体无效型的肿瘤细胞中,表达仅仅稍微高一些,说明 cap43 的表达受雄激素影响。利用 western blot 分析显示^[12] cap43 在脐静脉上皮细胞受到应激压力的时候表达,有 7 个部位发生磷酸化,磷酸化是可逆的,且随着细胞内 cAMP 的量增加而增加,可受蛋白激酶 A 抑制剂和钙调蛋白抑制剂的抑制。磷酸化的形式在早期的对数生长期非常丰富,然后随着细胞密度的增加而降低。这些实验证明 cap43 是一个磷酸化应激反应蛋

白。而且它的磷酸化与细胞生长有关。

此外,现在认为 cap43 基因的表达与应激反应、动脉粥样硬化、致癌作用、分化以及 N-myc 途径有关。最新研究^[13]还显示维生素 C 的缺失可以诱导 cap43 的表达,VHL 肿瘤抑制基因转入肾细胞癌中也能够下调 cap43 蛋白的表达^[14]。

4 cap43 基因与肿瘤的病理诊断

cap43 基因是镍化合物在致癌过程中产生的,因此,在致癌过程中有重要作用。研究发现^[15]在正常组织中 cap43 的表达量非常低,而在许多肿瘤中都有表达。最早在人肺癌细胞株 A549 中发现 cap43 蛋白的上调。差异显示计数发现,人肺癌细胞株 A549 中 cap43 基因的转录、表达水平超过正常细胞的 30 倍。Ulrix W^[11]等发现前列腺癌 LN-CaP 细胞中 cap43 基因的表达增加。Park H^[17]等运用 RT-PCR 方法,在乳腺癌的细胞株中发现 cap43 基因表达上调。Nishie A^[16]等通过消减杂交显示 9 个基因在肾细胞癌中表达,分别为 cap43 基因、雄激素 4、富含半胱氨酸的隐匿产酸蛋白 (SPARC)、血浆铜蓝蛋白、血清淀粉样物质 A、骨桥接素、热休克蛋白 90、LOT1 和酪氨酸激酶。其中, cap43 在肾细胞癌中高表达。原位杂交方法测试 10 例肾细胞癌,发现在巨噬细胞浸润的肾细胞癌中, cap43 表达显著增强,提示肾细胞癌 cap43 基因高表达与巨噬细胞浸润有一定关系。此外,在肾脏非癌性区域的肾小管上皮细胞中也发现 cap43 的表达。Salnikow 等^[17]研究发现 cap43 基因在前列腺癌的一个 PC-3M 的细胞株中表达最强,同时发现这些前列腺癌的细胞丢失了 p53 基因,因此,认为前列腺癌细胞中 cap43 基因与 p53 基因之间存在一定的相关性。Nimmrich 等^[18]采用差异显示逆转录 PCR 和 Northern 杂交技术研究结肠癌细胞株 SW480 和 HCT116,并以正常黏膜上皮细胞 NCM460 作为对照,发现 7 个基因表达显著上调, cap43 基因表达水平显著高于胆囊收缩素基因、钙调蛋白结合蛋白基因、甲胎蛋白基因等其余 6 个基因。然而,目前也有一些研究发现 cap43 基因在结肠癌中表达下调。Fotovati A^[9]等运用免疫组化方法还发现, cap43 基因的表达在乳腺癌中与肿瘤的病理分级有明显相关性 ($P = 0.0387$)。王洛伟等^[19]通过 RT-PCR 方法发现在胰腺癌中 cap43 基因表达显著上调,其在肿瘤组织和癌旁正常组织的表达有统计学意义 ($P < 0.001$),Northern 杂交显示 cap43 在肿瘤组织中表达显著上调。新近研究^[20]还显示 cap43 能够抑制胰腺癌的转移,但具体作用机制还不明了。cap43

在胰腺癌中表达显著增加,而过表达却能使肿瘤在活体内的生长率显著降低,肿瘤的血管生成明显减少。cap43 过表达的肿瘤中 VEGF 和 IL-8 也明显减少。免疫组化实验证明 65 例胰腺癌病人中, cap43 的过表达与肿瘤微血管密度呈明显的相关性 ($P=0.0001$)。因此,认为 cap43 在胰腺癌的血管生成中起着关键性的作用。

5 小结与展望

cap43 基因是由镍复合物诱导产生的一种新型基因,受到缺氧或细胞内游离钙离子增多等因素的影响而表达增加,乳腺癌癌细胞中雌激素可以抑制其表达,前列腺癌细胞中雄激素可以促进其表达。在正常组织中, cap43 的表达量非常低,而在肺癌、脑肿瘤、黑色素瘤、肝脏肿瘤、前列腺癌、乳腺癌和肾细胞癌中, cap43 蛋白过量表达。cap43 蛋白和 mRNA 的稳定性,使得 cap43 基因成为一种新的重要的癌基因标记。目前,对 cap43 基因在许多肿瘤中表达情况还不清楚,对其在致癌过程中的作用机制以及在肿瘤病理诊断中的意义还有待进一步探索。相信,随着人们对 cap43 基因研究的不断深入,作为新癌基因标记之一的 cap43 基因定将在临床肿瘤病理诊断中发挥着越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Zhou D, Salnikow K, Costa M. Cap43, a novel gene specifically induced by Ni^{2+} compounds[J]. Cancer Res, 1998, 58: 2182-2189.
- [2] Salnikow K, Blagosklonny MV, Ryan H, et al. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress[J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 38-41.
- [3] Zhou RH, Kokame K, Tsukamoto Y, et al. Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart[J]. Genomics, 2001, 73(1): 86-97.
- [4] Zoroddu MA, Peana M, Kowalik-Jankowska T, et al. Nickel (II) binding to Cap43 protein fragments[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(6): 931-939.
- [5] Salnikow K, Kluz T, Costa M. Role of Ca^{2+} in the regulation of nickel-inducible Cap43 gene expression[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 160(2): 127-132.
- [6] Li J, Davidson G, Huang Y, et al. Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/ Akt-dependent, p70 (S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal C141 cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(1): 94-101.
- [7] Park H, Adams MA, Lachat P, et al. Hypoxia induces the expression of a 43-kDa protein (PROXY-1) in normal and malignant cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276(1): 321-328.
- [8] Salnikow K, Kluz T, Costa M, et al. The regulation of hypoxic genes by calcium involves cJ un/ AP21 , which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 1734-1741.
- [9] Fotovati A, Fujii T, Yamaguchi M, et al. 17 β -estradiol induces down-regulation of Cap43/NDRG1/Drg-1, a putative differentiation-related and metastasis suppressor gene, in human breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(10): 3010-3018.
- [10] Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, et al. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1450(3): 364-373.
- [11] Ulrich W, Swinnen JV, Heyns W, et al. The differentiation-related gene 1, Drg1, is markedly upregulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells[J]. FEBS Lett, 1999, 455(1-2): 23-26.
- [12] Agarwala KL, Kokame K, Kato H, et al. Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(3): 641-647.
- [13] Karaczyn A, Ivanov S, Reynolds M, Zhitkovich A, et al. Ascorbate depletion mediates up-regulation of hypoxia-associated proteins by cell density and nickel[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(5): 1025-1035.
- [14] Masuda K, Ono M, Okamoto M, et al. Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells[J]. Int J Cancer, 2003, 105(6): 803-810.
- [15] Cangul H, Salnikow K, Yee H, et al. Enhanced overexpression of an HIF-1/hypoxia-related protein in cancer cells[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(5): 783-788.
- [16] Nishie A, Masuda K, Otsubo M, et al. High expression of the Cap43 gene in infiltrating macrophages of human renal cell carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 2145-2151.
- [17] Salnikow K, Costa M, Figg WD, et al. Hyperinducibility of hypoxia-responsive genes without p53/p21-dependent checkpoint in aggressive prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(20): 5630-5634.
- [18] Nimrich I, Erdmann S, Melchers U, et al. Seven genes that are differentially transcribed in colorectal tumor cell lines[J]. Cancer Lett, 2000, 160: 37-43.
- [19] 王洛伟, 李兆申, 许国铭, 等. 肿瘤相关基因 cap43 在胰腺癌中的表达及意义[J]. 胰腺病学, 2005, 5(4): 207-209.
- [20] 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.

[编辑: 贺文; 校对: 马福元]