DPH2L 基因在细胞分化/凋亡中的降调节

——mRNA 差异显示的应用

刘桂中^① Nicoletta Ferrari^② Giovanni Levi^② 吴 旻^①

(^① 中国医学科学院肿瘤医院细胞生物室分子肿瘤学国家实验室, 北京 100021; ^② Laboratory of Molecular Biology, National Institute for Cancer Research, Genova, Italy)

摘要 为鉴定维甲酸诱导的人肺癌细胞分化/凋亡相关基因, 采用 mRNA 差异显示的方法对全反式维甲酸处理前后的人肺腺癌细胞系 GLC82 的 mRNA 表达模式进行了分析. 6 个 cDNA 片段被分离和克隆. 其中 1 个对应于序列已知而功能未知的人 DPH2L 基因. 该基因的 2.3 kb 全长 cDNA 最初是从人卵巢癌的关键缺失位点 17p13.3 上分离出来, 并被认为是—个候选的肿瘤抑制基因. 结果显示 DPH2L 是一个广泛表达的基因, 除已报道的 2.3kb 转录本外, 还有另外一个 1.7kb 的主要转录本. 在全反式维甲酸和 N-(4-羟苯)维甲酰胺 4HPR 诱导的几种肿瘤细胞的分化/凋亡过程中 DPH2L 呈降调节, 由此提示 DPH2L 可能并不起肿瘤抑制基因的作用, 相反, 它的降调节可能参与了从细胞生长到细胞分化或凋亡的转换过程.

关键词 差异显示 维甲酸 细胞分化 凋亡 肿瘤抑制基因

差异基因表达发生在发育、细胞生长、分化和癌变过程中, 因而是理解多种生物过程的分子基础. 差异表达的基因可通过比较稳定状态的 mRNA 浓度得以确定. 消减杂交(subtractive hybridization)^[1]和差异显示(mRNA differential display)^[2]是两种常用方法. 因为差异显示只需要少量 RNA 并能同时确定 mRNA 水平的上升和下降且很快得出结果, 近年来较为常用.

由于维甲类物质广泛参与细胞分化或凋亡, 而肿瘤是一个分化/凋亡紊乱的过程, 使得维甲类物质成为强有力的肿瘤化学预防药物^[3]. 我们以前已经发现全反式维甲酸可以诱导人肺腺癌细胞株 GLC82 细胞的分化和凋亡^[4]. 为更好地理解维甲酸对肺癌的诱导分化和凋亡作用的分子机制, 我们应用全反式维甲酸处理 GLC82 细胞, 并利用 mRNA 差异显示技术来克隆和鉴定参与全反式维甲酸诱导的分化和凋亡过程中的基因. 相似的策略如消减杂交技术也曾经在我室被用于鉴定维甲酸诱导的基因, 并且成功地克隆了几个新基因^[5,6]. 这证明体外诱导分化或凋亡与普遍基因表达分析技术的结合是阐明癌细胞再分化或凋亡的分子机制的有效方法.

1 材料与方—法

人肺腺癌细胞 GLC82 (本室存)、人肺癌细胞 Calu-6 生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基; 人肺癌细胞 A549、人肺癌细胞 Calu-1、HL-60 细胞、人神经母细胞瘤 SK-N-BE2(c) (后 5 种细胞均来自于 ATCC) 生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37℃, 5% CO₂ 中培养. 接种细胞 24 h 后, 分别用 10 μmol/L 的全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA), 10 μmmol/L 的 N-(4-羟苯)维甲酰胺[N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, 4HPR, 合成的维甲酸衍生物]处理. 对 HL-60 细胞来说, ATRA 和 4HPR 均为 1 μmol/L. 处理和不处理的细胞均每隔 48 h 换液.

根据产品说明书,用 TRIzol 试剂(GIBCO 公司)从对照细胞和 ATRA 或 4HPR 处理过的细胞中提取总 RNA. 第一链 cDNA 的合成和 mRNA 差异显示采用 Ito 等人^[7]所叙述的方法. PCR 产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,用比 EB 敏感 25 倍的荧光染料 SYBR Green I 染色(Molecular Probes Inc.)检测扩增 DNA 电泳带型. 切下的差异表达条带经再次扩增后克隆到“pGEM-T vector”(Promega 公司). DNA 序列分析同时采用自动测序和手工测序的方法进行(Sequenase 2.0 DNA Sequencing Kit, USB 公司).

分别取每一样品总 RNA 20 μ g 在 1% 琼脂糖/甲醛变性凝胶上电泳分离并转移至 Hybond 尼龙膜上(Amersham 公司). 探针标记、杂交及放射自显影均按产品说明书进行. 以 Gel Doc 1000 成像系统记录图像结果并用“Molecular Analyst”软件(BIO-RAD)进行定量分析. 用同一杂交膜上得到的 β -actin 杂交信号为标准来计算目的基因的相对信号强度. 为测定 DPH2L 基因在多种人类组织中的表达情况,依据产品说明书,我们用“Human RNA Master Blot”(Clontech 公司)进行了杂交.

按下述方法进行流式细胞光度术分析:300 $\times$ g 10 min 离心收获 5×10^5 细胞, PBS 洗细胞沉淀 1 次,加入 1 mL 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定细胞过夜. 离心收集细胞,以 PBS 洗细胞沉淀. 加入 500 μ L 含 3.4 mmol/L 柠檬酸钠, 50 μ g/mL 碘丙啶(propidium iodide), 100 μ g/mL RNaseA 的溶液重悬细胞沉淀,避光于室温下放置 30 min. 以标准程序用 FACScan 流式细胞光度计(Becton Dickinson 公司)对细胞进行分析.

2 结果

2.1 分化/凋亡过程特异基因的克隆

通过比较未处理细胞和 ATRA 处理细胞的 mRNA 差异显示模式,我们鉴定了 ATRA 诱导分化/凋亡过程中激活或抑制的基因. 我们用 20 对不同引物组合对 GLC82 的未处理细胞样品, ATRA 处理 8 h 样品, ATRA 处理 1 d 样品和 ATRA 处理 4 d 样品的 RNA 进行了 RT-PCR 扩增. 图 1 显示了部分的 PCR 产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺胶上的电泳. 6 个差异 DNA 条带被亚克隆. 通过对这 6 个 DNA 片段的序列分析并与 GenBank 数据库进行同源序列比较,发现其中 1 个克隆(我们命名为 RAb16)与人候选的肿瘤抑制基因 DPH2L 的 3' 末端非翻译区高度同源(同源性达 99%)(结果未显示),表明我们重新克隆了人的 DPH2L 基因片段.

2.2 DPH2L 基因在 GLC82 细胞分化/凋亡过程中的 Northern 印迹分析

DPH2L 基因最初报道为 2.3kb 的 mRNA 转录本,不过作者并未提供该基因的 Northern blot 印迹图谱^[8]. 我们通过 Northern blot 检测了 DPH2L mRNA 的分子大小. 图 2(a)显示用 RAb16 为探针杂交后的

图 1 RA 对 GLC82 细胞的 mRNA 表达模式的影响(部分 mRNA 差异显示图)

图中显示 4 组用不同引物对所扩增的 mRNA 电泳图,每组包括对照细胞样品(0), ATRA 处理 8 h 的样品(1), ATRA 处理 1 d 的样品(2), ATRA 处理 4 d 的样品(3). M 为 pBR322/HaeIII 分子量标准. 箭头指示的片段对应于人的 DPH2L 基因的 3' 非翻译区. 图上方标明所用引物

印迹图. 结果表明 DPH2L 基因在 GLC-82 细胞中有 2 个转录本. 次要的转录本(丰度较低)大约为 2.3 kb, 与以前报道的一致^[9]; 主要的转录本(丰度较高)约为 1.7 kb, 则未见报道.

当我们比较 DPH2L 基因在 GLC82 细胞的分化/凋亡过程中的表达水平时发现, DPH2L 基因的 2 个转录本(1.7 和 2.3kb)都受 ATRA 的降调节(图 2(b)、(c)), 进一步证实了差异显示的结果. 此外, 我们也观察到 DPH2L 基因在 4HPR 处理的 GLC82 细胞中表达降低(图 2(b)、(c)).

图2 DPH2L mRNA 的大小和在 GLC82 细胞中的表达

(a) Northern 杂交显示 DPH2L mRNA 的分子量大小; (b) Northern 杂交显示 DPH2L 基因在 ATRA 和 4HPR 处理的 GLC82 细胞中的表达; (c) DPH2L 基因的 1.7kb 主要转录本的相对表达水平

2.3 DPH2L 基因在其他肺癌细胞系、HL-60 细胞及神经母细胞瘤 SK-N-BE2(c) 细胞中的表达

为探讨 DPH2L 基因是否普遍参与细胞分化或凋亡过程, 我们用 ATRA 和 4-HPR 处理 3 种人肺癌细胞系(A549, Calu-1, Calu-6), HL-60 细胞和 SK-N-BE2(c) 细胞一定时间后, 分析了 DPH2L(图 3)的表达情况. 所有细胞系均以不同水平表达 DPH2L 基因, 或至少可检测到 1.7kb 片段的转录本. 处理 4 d 后的 Calu-6 细胞、HL-60 细胞及 SK-N-BE2(c) 细胞中, ATRA

降调节 DPH2L 基因的转录,而在 A549 细胞及 Calu-1 细胞中 DPH2L 基因的表达无明显改变. 4HPR 能下调 Calu-1, Calu-6, HL-60 及 SK-N-BE2(c)细胞中 DPH2L 基因表达,但对 A549 细胞中的 DPH2L 的表达几乎无影响.

图3 ATRA和4HPR对DPH2L在不同细胞中的表达影响

(a) DPH2L基因在ATRA和4HPR处理的3种不同人肺癌细胞系(A549, Calu-1, Calu-6), HL-60和人神经母细胞瘤SK-N-BE2(c)细胞中的表达情况; (b) DPH2L基因的1.7kb主要转录本的相对表达水平

2.4 流式细胞光度术分析: RA和4HPR对细胞周期分布及诱导细胞凋亡的影响

为理解在A549, Calu-1, Calu-6细胞中DPH2L受差异调节的原因,我们研究了ATRA和4HPR对A549, Calu-1, Calu-6细胞的影响. 用10 μ mol/L的ATRA及10 μ mol/L的4HPR分别处理上述细胞4d, 然后分析ATRA和4HPR对细胞周期分布及诱导凋亡的作用. 图4为3种细胞中DNA含量的流式分析. 结果表明, 就细胞周期分布和诱导凋亡而言, A549细胞对ATRA有抗性, 与已有报道相符^[9], 并且对4HPR也有抗性. 不过Calu-6细胞对ATRA^[10]和4HPR都敏感. Calu-1细胞对ATRA有抗性^[11,12], 然而对4HPR敏感. 3种肺癌细胞对ATRA和4HPR的不同反应性与DPH2L基因调节的不同有关, 即DPH2L基因只在生长阻抑的细胞中受到降调节.

图4 ATRA和4HPR处理4 d对人肺癌细胞A549, Calu-1, Calu-6细胞周期分布和凋亡诱导的影响
箭头显示亚二倍体DNA(即凋亡细胞)的百分比

2.5 DPH2L基因在多种人类组织中的表达

图5显示了用DPH2L基因3'非翻译区探针杂交“Human RNA Master Blot”(Clontech公司)的结果显示, DPH2L在“Human RNA Master Blot”中所有的组织中表达, 这表明DPH2L基因是一个管家基因(house-keeping gene), 在细胞的生化过程中可能起重要作用。

3 讨论

在本研究中, 我们用mRNA差异显示的方法鉴定参与由ATRA诱导人肺腺癌细胞GLC82的分化和凋亡过程中的基因, 并分离到6个差异cDNA片段。其中1个对应着人的DPH2L基因, 但其功能至今未见报道。

DPH2L cDNA最初从人卵巢癌的关键缺失区17p13.3分离得到, 为2.3kb的转录物, 编码363个氨基酸^[8]。大约80%(39/49)的散发性卵巢上皮肿瘤呈现出17p13.3的D17S30或D17S28座位的丢失, 或2个座位的同时丢失^[13]。染色体17p13.3具有肿瘤抑制功能的候选基因包括HIC-1(hypermethylated in cancer-1), DPH2L, PEDF(pigment epithelium-derived factor)。因为DPH2L位于D17S28缺失与D17S30缺失之间的重叠处, 而被认为是一个候选的肿瘤抑制基因。

(a)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	全脑	扁桃体	尾状核	小脑	大脑皮质	额叶	海马	延脑
B	枕叶	豆状核	黑质	颞叶	丘脑	丘脑下核	脊髓	
C	心	主动脉	骨骼肌	结肠	膀胱	子宫	前列腺	胃
D	睾丸	卵巢	胰腺	垂体腺	肾上腺	甲状腺	唾液腺	乳腺
E	肾	肝	小肠	脾	胸腺	周围白血球	淋巴结	骨髓
F	阑尾	肺	气管	胎盘				
G	胎脑	胎心	胎肾	胎肝	胎脾	胎胸腺	胎肺	
H	酵母总RNA 100ng	酵母tRNA 100ng	大肠杆菌rRNA 100ng	大肠杆菌DNA 100ng	Poly r(A) 100ng	人Cot 1 DNA 100ng	人DNA 100ng	人DNA 500ng

(b)

图5 DPH2L基因在各种人类组织中的表达

(a) DPH2L基因3'非翻译区探针对“Human RNA Master blot”(Clontech)的杂交结果; (b) Blot组方图显示各种人类组织在“Human RNA Master Blot”中的相对位置

尽管DPH2L的功能尚不清楚, 我们的结果却并不支持DPH2L是一个肿瘤抑制基因. 对DPH2L的表达情况的分析表明, 它在多种人类组织中表达. 在GLC82细胞中, ATRA和

4HPR 都能诱导生长抑制和凋亡^[4],而在处理过程中 DPH2L 同时受到降调节. 在 ATRA 处理 HL-60 细胞 4 d 后,伴随着 HL-60 粒细胞终末分化进程的发生^[14],我们观察到 DPH2L 的降调节;4HPR 处理 HL-60 1 d 后导致细胞凋亡^[15],DPH2L 的降调节也同时被检测到. 同样地,用 ATRA 处理 SK-N-BE2(c) 4 d 导致神经元细胞表型的分化,细胞更有极性,轴突更长(未显示观察结果);用 4HPR 处理 SK-N-BE2(c) 4 d,后者则出现了细胞凋亡^[16]. 在两种情况下,我们都发现了 DPH2L 的降调节. Calu-6 细胞在 ATRA 和 4HPR 的作用下出现生长抑制和细胞凋亡. 与此相应,发生了 DPH2L 的降调节. 与此对应,对 ATRA 和 4HPR 都有抗性的 A549 细胞,在 ATRA 处理时 DPH2L 水平保持不变,4HPR 处理也仅导致 DPH2L 的轻微的降调节. Calu-1 细胞对 ATRA 有抗性,而对 4HPR 有反应,而事实上我们观察到了 4HPR 引起的 DPH2L 基因的降调节而 ATRA 不影响其表达. 所有的证据都表明 DPH2L 的降调节可能参与了细胞由生长到分化或凋亡的转变过程,通常该过程涉及细胞生长的阻抑. 如果事实确实如此,以前认为 DPH2L 可能作为一个肿瘤抑制因子的假说^[8]看起来需重新考虑. 众所周知,当细胞经历分化或凋亡时,抑癌基因通常被活化或受到升转录调节. 进一步阐明 DPH2L 在控制细胞生化过程中的作用是理解其从细胞生长到分化或凋亡的转换过程中转录调节的基础.

与序列数据库的比较分析并未找到一个确定而功能已知的 DPH2L 的类似蛋白. 然而,其 N 末端 60 个氨基酸与酵母白喉酰胺(diphthamide)生物合成蛋白 2 (DPH2, diphthamide biosynthesis protein 2)有 60% 的同源性. 这表明 DPH2L(diphthamide biosynthesis protein 2 like, 白喉酰胺生物合成蛋白 2 样蛋白)和 DPH 可能共享催化或识别位点^[8]. 白喉酰胺[2,3-羟基酰-3-三甲胺基丙基组氨酸]是一种稀有的翻译后修饰的氨基酸,其功能不明,目前仅在真核蛋白合成中的延伸因子 EF-2(elongation factor 2)上发现^[17]. 它是 2 个重要的细菌毒素:白喉毒素(DT)和绿脓杆菌外毒素 A 的 ADP-核糖基化位点. 对 EF-2 白喉酰胺的 ADP 核糖基化导致 EF-2 在蛋白质合成中的转位作用丧失,既而导致细胞的最终死亡. 有研究显示在酵母中通过用其他 19 个氨基酸代替 EF-2 的 His699 组氨酸以使白喉酰胺的组氨酸前体突变而导致无功能的或即使有功能的 EF-2,活细胞的生长也比表达野生型 EF-2 的细胞为慢^[18~20]. 以上结果表明白喉酰胺的生物合成对蛋白质合成和细胞生长可能具有正效应. 如果人的 DPH2L 基因参与了胞内 EF-2 的白喉酰胺的合成,它就可能参与对细胞总蛋白合成的调节,并可解释此基因在细胞分化或凋亡中的降调节:DPH2L 的降调节可能通过下调 EF-2 中组氨酸残基的白喉酰胺合成来下调 EF-2 活性,从而使 DPH2L 参与细胞生长受到抑制的细胞分化或凋亡过程. 人们已发现对全蛋白合成的调节参与了细胞分化或凋亡. 例如全反式维甲酸对 HL-60 的促分化作用导致生长速率下降,与此同时,胞内 EF-2 浓度大幅度降低,并且 EF-2 激酶活性也逐渐降低^[21]. 或者 DPH2L 可能不参与白喉酰胺的合成途径,而在一未知的合成通路的蛋白复合物中提供 DPH2 样的相互作用. 我们的结果显示 DPH2L 是一个广泛表达的管家基因. 该基因可能并不起肿瘤抑制基因的作用,相反,它的降调节可能参与了从细胞生长到细胞分化或凋亡的转换过程. 进一步的工作将要确定在人类细胞中 DPH2L 基因是否参与了白喉酰胺的生物合成. 另外,我们的研究表明除了以前报道过的 2.3kb 的转录本外,DPH2L 还存在另外一个约 1.7kb 的主要转录本,并在我们所测试的所有细胞中都有表达. 此转录本的确定也是下一步工作的目标之一.

致谢 本课题为国家“攀登”计划和“八六三”高科技资助项目。

参 考 文 献

- 1 Lamar E E, Palmer E. Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exist in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell*, 1984, 37(1): 171~177
- 2 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967~971
- 3 Sporn M B, Roberts A B, Goodman D S. *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. New York: Raven Press, 1994
- 4 黎伯铨, 蔡 岩, 张雪燕, 等. 全反式维甲酸诱导人肺癌细胞的分化. *中华医学杂志*, 1995, 75(11): 683~685
- 5 冯 骆, 王秀琴, 吴 旻. 从人食管癌细胞系分离分化基因的新方法. *中国科学, B辑*, 1991, (10): 1 059~1 067
- 6 黎伯铨, 雷 薇, 蔡 岩, 等. 人肺癌细胞分化相关基因 cDNAs 的克隆. *中国科学, C辑*, 1997, 27(1): 89~96
- 7 Ito T, Kito K, Adati N, et al. Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett*, 1994, 351: 231~236
- 8 Phillips N J, Ziegler M R, Deaven L L. A cDNA from the ovarian cancer critical region of deletion on chromosome 17p13.3. *Cancer Lett*, 1996, 102: 85~90
- 9 van der leede B M, van den Brink C E, van der Saag P T. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor expression in retinoic acid-resistant human tumor cell lines. *Mol Carcinog*, 1993, 8(2): 112~122
- 10 Li Y, Dawson M, Agadir A, et al. Regulation of RAR β expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines: effect on growth inhibition and apoptosis induction. *Int J Cancer*, 1998, 75: 88~95
- 11 Wan H S, Dawson M I, Hong W K, et al. Enhancement of Calu-1 human lung carcinoma cell growth in serum-free medium by retinoids: dependence on AP-1 activation, but not on retinoid response element activation. *Oncogene*, 1997, 15(17): 2 109~2 118
- 12 Lee H Y, Dawson M I, Claret F X, et al. Evidence of a retinoid signaling alteration involving the activator protein 1 complex in tumorigenic human bronchial epithelial cells and non-small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(3): 283~291
- 13 Phillips N J, Ziegler M R, Radford D M, et al. Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer. *Cancer Res*, 1996b, 56(3): 606~611
- 14 Breitman T R, Selonick S E, Collins S J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2 936~2 940
- 15 Delia D, Aiello A, Lombardi L, et al. N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res*, 1993, 53: 6 036~6 041
- 16 Ponzoni M, Bocca P, Chiesa V, et al. Differential effects of N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res*, 1995, 55: 853~861
- 17 Bodley J W, Veldman, S A. Biosynthesis of diphthamide: ADP-ribose acceptor for diphtheria toxin. In: Moss J, Vaughn M eds. *ADP-Ribosylating Toxins and G Proteins*. Washington: American Society for Microbiology, 1990, 22~30
- 18 Phan L D, Perentesis J P, Bodley J W. *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 1993, 268(12): 8 665~8 668
- 19 Kimata Y, Kohno K. Elongation factor 2 mutants deficient in diphthamide formation show temperature-sensitive cell growth. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13 479~13 501
- 20 Foley B T, Moehring J M, Moehring T J. Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A. Genetic and biochemical analyses. *J Biol Chem*, 1995, 270(39): 23 218~23 225
- 21 Nilsson A, Nygard O. Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in differentiating and proliferating HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1268(3): 263~268

(1998-04-21 收稿, 1998-07-20 收修改稿)