

# 人胃癌组织中分子伴侣蛋白的表达及检测

曲晶磊, 徐惠绵, 阎影, 唐冰, 贾兰玲

曲晶磊, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科  
辽宁省沈阳市 110001  
阎影, 贾兰玲, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所  
辽宁省沈阳市 110001  
唐冰, 中国医科大学附属第一医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110001  
曲晶磊, 女, 1978-03-03 生, 辽宁省营口市人, 汉族, 2002 年中国医科大学  
硕士, 主要从事肿瘤免疫及肿瘤免疫治疗方面的研究。  
国家自然科学基金项目资助, No.30370640  
通讯作者: 徐惠绵, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科  
大学附属第一医院肿瘤外科, dirui33@hotmail.com  
电话: 024-23256666-6227  
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-13

## Expression of chaperone proteins in human gastric cancer

Jing-Lei Qu, Hui-Mian Xu, Ying Yan, Bing Tang, Lan-Ling Jia

Jing-Lei Qu, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Ying Yan, Lan-Ling Jia, Cancer Institute, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Bing Tang, Department of Anaesthesiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370640  
Correspondence to: Dr. Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province China. dirui33@hotmail.com  
Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-13

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of GRP94/gp96 and calreticulin (CRT) in gastric cancer, and to extract and identify the chaperone-rich cell lysates (CRCL).

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect GRP94/gp96 and CRT expression, and the relationship between the levels of expression and the pathological factors were analyzed. Isoelectric focusing technique was used to separate CRCL from the tumor tissue homogenate. The molecular weight and quality of the purified CRCL were identified by SDS-PAGE and Western blot.

**RESULTS:** The positive rates of GRP94/gp96 and CRT expressive were 86.3% and 84.3% in gastric cancer, respectively, whereas they were 37.3% and 43.1% in cancer-adjacent tissues. The rates were markedly higher in gastric cancer than those in the cancer-adjacent tissues ( $\chi^2 = 25.946, 18.704$ , both  $P < 0.01$ ). The levels of GRP94/gp96 expression in gastric cancer were correlated with

the differentiation, infiltration and lymph metastasis of the cancer and the levels of CRT expression were correlated with the size of tumor and lymph metastasis. Western blot showed that the isolated CRCL contained four kinds of chaperone proteins: GRP94/gp96, HSP90, HSP70 and CRT. The pH value ranged from 4.8 to 5.6 (lane 5-11). These chaperone proteins clustering along the pH gradient were very typical and reproducible, and the distributions of the proteins and the pH range were accordant among the tissues of different types.

**CONCLUSION:** GRP94/gp96 and CRT are stably expressed in gastric cancer and the levels of expression are correlated with the occurrence, carcinogenesis, and biological behavior of gastric cancer.

**Key Words:** Chaperone protein; Chaperone-rich cell lysate; Immunohistochemistry; Gastric cancer

Qu JL, Xu HM, Yan Y, Tang B, Jia LL. Expression of chaperone proteins in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(15):1809-1813

## 摘要

**目的:** 检测人胃癌组织中 GRP94/gp96, CRT 的表达, 分离并鉴定富含分子伴侣的细胞裂解物(CRCL), 为研制和开发肿瘤来源的分子伴侣疫苗奠定基础。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测人胃癌组织中 GRP94/gp96 和 CRT 的表达及其表达程度与胃癌病理因素的关系; 等电聚焦技术从人胃癌组织匀浆中分离 CRCL, 经电泳及 Western blot 进行蛋白分子质量及性质鉴定。

**结果:** 癌组织中 GRP94/gp96 和 CRT 表达的阳性率分别为 86.3% 和 84.3%; 而癌旁非癌组织中的阳性率分别为 37.3% 和 43.1%, 癌组织表达程度显著高于癌旁非癌组织 ( $\chi^2 = 25.946, 18.704, P < 0.01$ ); 癌组织中 GRP94/gp96 的表达程度与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关, CRT 的表达程度与肿瘤大小及淋巴结转移有关。分离的 CRCL 经鉴定为 HSP70, HSP90, GRP94/gp96, CRT。并且这些分子伴侣蛋白沿 pH 梯度集中分布于 5-11 号收集管中, 其余管中未见明显表达。pH 跨度为 4.8-5.6。不同组织类型中分子伴侣蛋白的分布及 pH 跨度具有一致性。

**结论:** 胃癌组织中稳定表达 GRP94/gp96 和 CRT, 其

表达程度与胃癌的发生、发展及其生物学行为有关。

**关键词:** 分子伴侣蛋白; 富含分子伴侣的细胞裂解物; 免疫组化; 胃癌

曲磊磊, 徐惠绵, 阎影, 唐冰, 贾兰玲. 人胃癌组织中分子伴侣蛋白的表达及检测. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1809-1813  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1809.asp>

## 0 引言

开发新型有效的抗肿瘤疫苗已成为肿瘤免疫治疗的主要目标. 研究表明, 从肿瘤细胞中提取分子伴侣蛋白如 HSP70, HSP90, GRP94/gp96 和钙网蛋白(calreticulin, CRT)制成的肿瘤疫苗能有效的激活抗原特异性 T 细胞免疫反应<sup>[1-3]</sup>. 随着纯化的肿瘤来源的分子伴侣蛋白作为抗肿瘤疫苗的研究进展, 人们将注意力集中于富含分子伴侣的细胞裂解物(chaperone-rich cell lysates, CRCL)在肿瘤免疫治疗中的应用. CRCL 是通过液相等电聚焦(free solution-isoelectric focusing, FS-IEF)技术从肿瘤组织匀浆中分离获得的富含大量分子伴侣蛋白的高产疫苗. Graner *et al*<sup>[5-7]</sup>发现用从小鼠白血病/淋巴瘤中提取的 CRCL 对荷瘤小鼠进行治疗, 其治疗效果优于单一成分分子伴侣疫苗. 由于肿瘤的自身免疫原性, 所以富含分子伴侣的肿瘤疫苗必须从自身肿瘤组织中提取制备. 为了应用自体肿瘤来源的 CRCL 进行人体疫苗试验, 我们首先采用免疫组织化学方法检测 GRP94/gp96 和 CRT 在人胃癌组织中的表达及其表达程度与胃癌病理因素的关系, 并采用等电聚焦技术探讨建立从人胃癌组织中分离纯化 CRCL 的方法.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2002-12/2003-11 中国医科大学附属第一医院行胃癌切除手术病例 51 例. 男 27 例, 女 24 例. 每例取癌组织及距癌肿 3 cm 以上的癌旁非癌组织作对照. 用于 HE 及免疫组化染色的组织均经 16 g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 厚 4  $\mu$ m 连续切片. 用于 CRCL 提取分析的新鲜组织于术中切除后立即从原发肿瘤组织中取直径约 1.5-2.0 cm 组织块, -70℃ 低温冰箱保存备用.

**1.2 方法** 免疫组织化学染色采用 SP 试剂盒法(迈新公司), 石蜡切片常规脱蜡至水, 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中高温高压抗原修复 2 min, 一抗孵育, 4℃ 过夜; DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片. 大鼠抗人 GRP94/gp96 及小鼠抗人 CRT (Stressgen 公司产品)工作浓度分别为 1:30 和 1:200. 阴性对照以 PBS 缓冲液代替一抗. 单盲法光学显微镜下进行观察. 判定标准: GRP94/gp96 和 CRT 主要表达在细胞质内, 呈棕

黄色颗粒. 每个视野至少观察 100 个细胞, 以阳性细胞数  $\geq 10\%$  作为阳性判断标准, 进而根据阳性细胞百分率分为弱阳性(+): 阳性细胞数为 10-30%; 阳性(++): 阳性细胞数为 30-70%; 强阳性(+++): 阳性细胞数  $\geq 70\%$ . 另将人胃癌组织称质量, 剪碎, 加入 3-5 倍体积的匀浆缓冲液(50 mmol/L Tris/Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L 叠氮钠, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin, 10 g/L TritonX-100), 匀浆器中匀浆. 充分裂解后, 以 10 000 g, 4℃ 离心 30 min, 取上清; 以 100 000 g, 4℃ 二次离心 60 min, 取上清备用. Bradford 法测定样品液中蛋白质的浓度, 以牛血清白蛋白作为标准品. 装配液相等电聚焦仪(Rotofor IEF Cell, Bio-Rad 公司产品), 阳极舱填充 0.1 mol/L  $H_3PO_4$ , 阴极舱填充 0.1 mol/L NaOH. 将样品按 20 g/L 浓度加入两性电解质(pH 范围为 3-10 和 4-6, 二者之比 1:2), 用 5 mol/L 尿素稀释至 18 mL, 加入等电聚焦仪的聚焦室内. 聚焦在 4℃ 冷却循环水浴, 12 W 的功率下运行 5 h, 用真空泵将样品收集到 20 个收集管中. 弃去 1, 20 号管(因其靠近两极, pH 值偏离较大), 余 18 管样品用去离子水稀释至 18 mL, 加入聚焦室内, 二次聚焦. 收集样品, pH 计测定样品 pH 值, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE (Mini-Protein 电泳槽, Bio-Rad 公司产品), 考马斯亮蓝 S-250 染色, 检测蛋白分离效果. 标准分子量为 Low Protein Standard (Bio-Rad). 将 CRCL 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 后, 用电转移法转移至硝酸纤维素膜 (Bio-Rad) 上. 分别以抗小鼠 HSP70 单抗、抗小鼠 HSP90 单抗、抗大鼠 GRP94/gp96 单抗、抗小鼠 CRT 单抗 (Stressgen 公司产品) 为一抗, 过氧化物酶标记的抗小鼠或大鼠 IgG (1:200, 武汉博士德公司产品) 为二抗, 进行 Western blot 检测 (Western blot 检测试剂盒, 为武汉博士德公司产品), DAB 显色, 观察结果.

**统计学处理** 应用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 根据实验资料要求, 选用  $\chi^2$  检验进行数据分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有显著性.

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学结果** 蛋白主要表达于细胞质, 呈棕黄色染色. GRP94/gp96 和 CRT 在胃癌组织中的表达多为阳性甚至强阳性(图 1AB), 阳性率分别为 86.3% (44/51) 和 84.3% (43/51); 而在癌旁非癌组织中多为阴性或弱阳性表达(图 1CD), 阳性率分别为 37.3% (19/51) 和 43.1% (22/51). 癌组织表达程度显著高于癌旁非癌组织, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 25.946, 18.704, P < 0.01$ ). 癌组织中 GRP94/gp96 的表达程度与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关, CRT 的表达

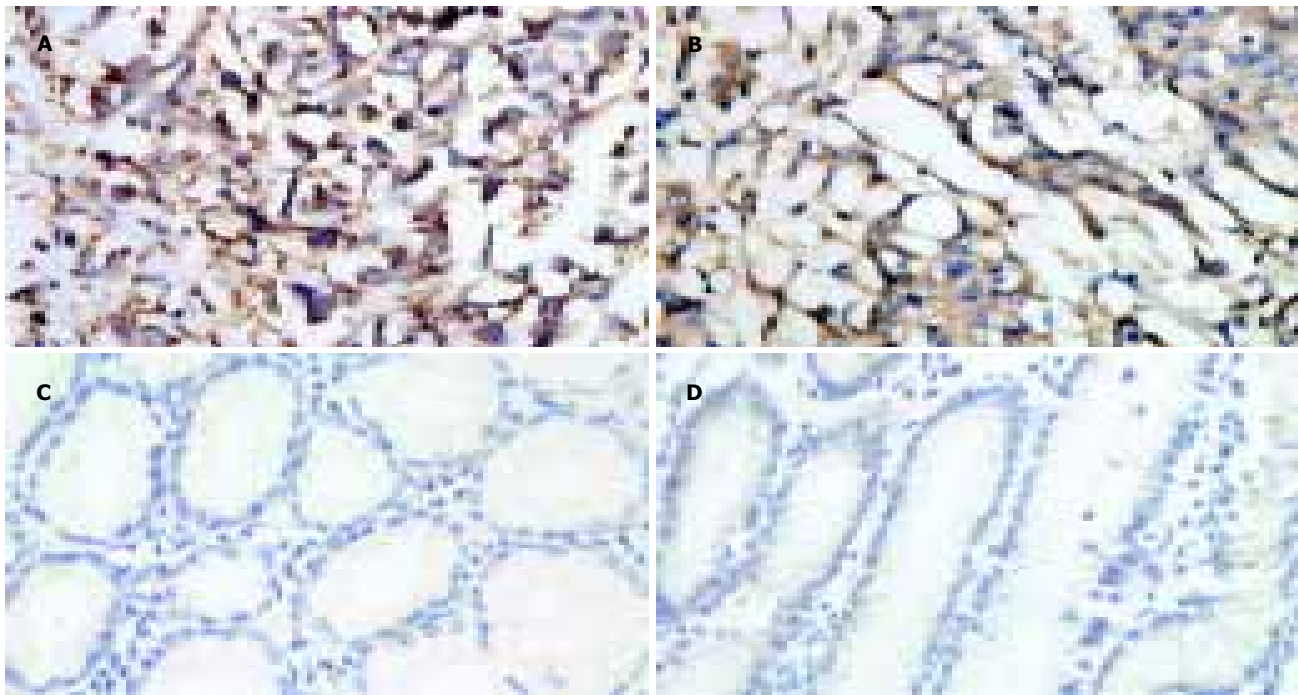


图1 胃组织 GRP94/gp96 和 CRT 的表达(SP × 400). A: GRP94/gp96, 低分化腺癌, 强阳性; B: CRT, 中分化腺癌, 强阳性; C: GRP94/gp96, 癌旁非癌组织, 阴性; D: CRT, 癌旁非癌组织, 弱阳性.

程度与肿瘤大小及淋巴结转移有关(表 1).

2.2 CRCL 检测 经液相等电聚焦系统分离后, 肿瘤组织中的蛋白质按各自的等电点聚焦于不同的位置, 分别收集于 20 个收集管中, 弃去 1, 20 号管. 经 SDS-PAGE 分离后, 考马斯亮蓝 S-250 染色, 可以看到同一分子质量的蛋白质仅在相邻的部位表达, 且表现为量的不同(图 2). 经特异性的 Western blot 鉴定, 证实被聚焦的目的蛋白中富含 GRP94/gp96, HSP90, HSP70, CRT, 并且这些分子伴侣蛋白沿 pH 梯度集中分布于 5-11 号收集管中, 其余管中未见明显表达(图 2, 3). pH 跨度为 4.8-5.6(图 2). 不同组织类型中分子伴侣蛋白的分布及 pH 跨度具有一致性. 1 g 胃癌组织经液相等电聚焦分离后可产生 1-2 mg 的分子

伴侣疫苗. 改变 FS-IEF 两性电解质的比例不能增强分离效果, 只能使总体蛋白沿 pH 梯度左右移动, 提示分子伴侣蛋白以复合物的形式被分离, 因而不表现为个体蛋白的特性.

3 讨论

从肿瘤细胞中分离纯化出来的 CRCL 是一种很有潜力的自体肿瘤疫苗, 能够激活肿瘤细胞中分子伴侣-肿瘤抗原肽复合物免疫应答. 已经证实, 分子伴侣家族的 HSP70, HSP90, GRP94/gp96 和 CRT 具有免疫活性<sup>[1-5]</sup>. 用肿瘤来源的 CRCL 免疫小鼠后, 其能被抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)摄取和加工, 并将相关的肿瘤抗原肽提呈给细胞毒 T 淋巴细胞

表1 GRP94/gp96 和 CRT 表达与胃癌病理因素的关系

病理因素	n	GRP94/gp96 染色强度				阳性率(%)	CRT 染色强度				阳性率(%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
肿瘤大小(cm): ≤ 5	27	5	9	8	5	81.5	1	3	10	13	96.3
>5	24	2	4	7	11	91.7	7	11	5	1	70.8 <sup>a</sup>
分化程度:分化型	21	6	10	4	1	71.4	5	6	6	4	76.2
未分化型	30	1	3	11	15	96.7 <sup>a</sup>	3	8	9	10	90.0
浸润:黏膜, 黏膜下层	16	5	7	4	0	68.8	4	6	4	2	75.0
肌层, 浆膜层	35	2	6	11	16	94.3 <sup>a</sup>	4	8	11	12	88.6
淋巴结转移:-	22	6	9	5	2	72.7	7	10	5	0	68.2
+	29	1	4	10	14	96.6 <sup>a</sup>	1	4	10	14	96.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05.

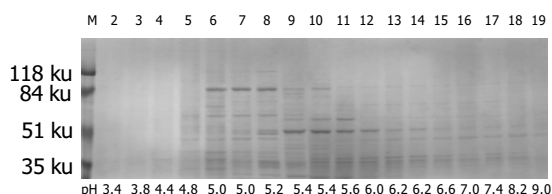


图2 CRCL的SDS-PAGE(考马斯亮蓝染色).

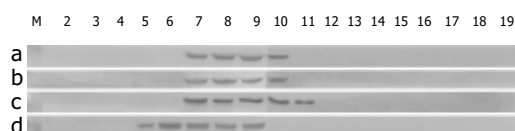


图3 CRCL 组分的免疫印迹杂交. (a-GRP94/gp96; b-HSP90; c-HSP70 d-CRT).

(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 从而引发保护性的或治疗性的免疫反应<sup>[8]</sup>. 我们采用等电聚焦技术从肿瘤组织匀浆中分离获得了CRCL, 经电泳及Western blot 鉴定为HSP70, HSP90, GRP94/gp96, CRT; 克服了提纯某一单一成分分子伴侣蛋白所需周期长、费用高且产量不足的缺点, 便于临床推广应用. 鉴于自体肿瘤来源的分子伴侣蛋白在肿瘤患者的瘤苗试验, 我们应用免疫组化技术对胃癌和癌旁非癌组织中的分子伴侣蛋白GRP94/gp96和CRT的表达进行了分析. 有充分的证据证明肿瘤来源的分子伴侣制剂的免疫原性是由于与分子伴侣结合的内源性抗原肽的不同序列. 由于肿瘤的自身免疫原性, 所以含有CRCL的肿瘤疫苗必需针对每例患者, 从其自身肿瘤组织中提取制备. 因此, 了解分子伴侣蛋白在人类普遍发生的肿瘤中的表达水平很有意义. 由于近年来国内外对HSP70, HSP90在癌组织中的表达报道较多<sup>[9-13]</sup>, 因此本文以胃癌为例, 对GRP94/gp96和CRT的稳定同源的表达进行了报道. 本研究发现胃癌时GRP94/gp96和CRT呈递增之势, 癌组织中GRP94/gp96和CRT表达程度显著高于癌旁非癌组织. GRP94/gp96的表达程度随细胞分化程度降低、浸润深度增加及淋巴结转移而增高, 而CRT的表达则与肿瘤大小及淋巴结转移有关. 对这种结果的一种可能性解释就是肿瘤细胞有高表达的选择性趋势. 实验性研究已经表明肿瘤细胞中HSP70和GRP94/gp96的表达有助于他们的肿瘤原性. 临床上, 已经发现卵巢癌的高表达和乳腺癌的HSP70和HSP90的高表达都与肿瘤的进程有关<sup>[14-15]</sup>. 分子伴侣蛋白能够促进肿瘤原性的一个明显的原因就是他们对应激因子如葡萄糖缺乏、缺氧、酸中毒等应激因素起到一种保护作用, 这些应激因素普遍存在于肿瘤细胞快速生长的恶劣环境中<sup>[16]</sup>. 我们发现肿瘤结节≤5 cm的癌组织中CRT的表达增强, 可以用CRT能产生抑制血管生成的作用来解释. 近来, 有报道CRT和其蛋白片断(1-180 aa)—vasostatin是肿瘤生长的细胞抑制剂<sup>[17-18]</sup>.

肿瘤的生长依靠充足的血供, CRT抑制血管生成很可能有助于抑制肿瘤结节的生长. 因此, 应用CRT肿瘤疫苗可通过增强抗肿瘤免疫反应和抗血管生成作用而潜在地引发抗肿瘤效应.

总之, 胃癌组织中GRP94/gp96和CRT的表达程度与其生物学行为有关. 癌细胞中GRP94/gp96和CRT的高表达具有不可缺少的作用, 其作用大概是在肿瘤微环境的恶劣条件下起保护作用. 然而, 由于分子伴侣疫苗利用了宿主APC对分子伴侣-肽复合物的加工和分子伴侣-肿瘤相关抗原肽的提呈, 所以分子伴侣对肿瘤细胞起保护作用与其制剂的免疫原性显然不相矛盾. 由于肿瘤来源的分子伴侣本身不具有抗原性, 而是作为肿瘤多肽抗原的载体, 具有免疫递呈功能, 其结合的多肽为肿瘤细胞表达的特异性抗原, 含有多个活化CTL的抗原表位, 可活化多克隆的CTL, 产生对几乎所有肿瘤细胞的杀伤, 因此分子伴侣蛋白为理想的分子水平的肿瘤疫苗. 进一步研究分子伴侣蛋白的特性, 将有助于发展以分子伴侣蛋白为基础的新的肿瘤疫苗.

#### 4 参考文献

- 1 Srivastava PK, Amato RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001;19:2590-2597
- 2 Nair S, Wearsch PA, Mitchell DA, Wassenberg JJ, Gilboa E, Nicchitta CV. Calreticulin displays in vivo peptide-binding activity and can elicit CTL responses against bound peptides. *J Immunol* 1999;162:6426-6432
- 3 Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 2003;101:4485-4491
- 4 Feng H, Zeng Y, Graner MW, Likhacheva A, Katsanis E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. *Blood* 2003;101:245-252
- 5 Graner M, Raymond A, Romney D, He L, Whitesell L, Katsanis E. Immunoprotective activities of multiple chaperone proteins isolated from murine B-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:909-915
- 6 Graner MW, Zeng Y, Feng H, Katsanis E. Tumor-derived chaperone-rich cell lysates are effective therapeutic vaccine against a variety of cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:226-234
- 7 Graner M, Raymond A, Akporiaye E, Katsanis E. Tumor-derived multiple chaperone enrichment by free-solution isoelectric focusing yields potent antitumor vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:476-484
- 8 Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14:45-51
- 9 Lebre T, Watson RW, Molin V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 2003;98:970-977
- 10 孙水平, 吴胜利, 耿智敏, 牛新捷, 杨威. 肝细胞肝癌中HSP90α的表达及意义. *中国普外基础与临床杂志* 2003;10:243-245
- 11 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002;74:222-226

- 12 蒋业贵, 王宇明, 李奇芬. 热休克蛋白 70 在非肿瘤细胞中的表达及其意义. 免疫学杂志 2002;18:64-66
- 13 王树东. 热休克蛋白与人肺癌发生、发展及生物学行为的关系. 中国临床康复 2003;7:1650-1651
- 14 Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implication. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-574
- 15 Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 1993;11:891-898
- 16 张新晨, 杨维良. 葡萄糖调节蛋白在肿瘤细胞中的表达及意义. 中华普通外科杂志 2003;18:501-502
- 17 Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 1998;188:2349-2356
- 18 Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, Wu TC. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 2001;108:669-678

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国生物医学基金论文摘要网站开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

### 2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

### 3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)