

胃癌中高表达ATP/GTP结合蛋白1基因的筛选及验证

张宇川, 张尤历, 王文兵, 高广, 陆芬英

背景资料
目前, 恶性肿瘤已成为危害人类健康最严重的疾病之一。根据世界卫生组织的统计, 全球每年因为恶性肿瘤而死亡的人约有500余万。肿瘤的预防与治疗已成为与人类每一个家庭都密切相关的社会问题。在我国, 胃癌仍是最为常见的恶性肿瘤, 临床上以内镜和病理为主的胃癌诊断, 以手术和药物为主的治疗效果均不令人满意。因此, 寻找癌组织中表达特异的基因, 将为癌症的早期诊断和治疗靶基因提供分子理论支持。

张宇川, 张尤历, 陆芬英, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001
王文兵, 高广, 江苏大学生命科学院 江苏省镇江市 212001
作者贡献分布: 此课题由张宇川, 张尤历, 王文兵策划设计; 课题实验由张宇川, 高广及陆芬英操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王文兵提供; 本论文写作由张宇川和高广完成。
通讯作者: 张尤历, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科, zjyouli@yahoo.com.cn
电话: 0511-85011787 传真: 0511-85011787
收稿日期: 2007-11-04 修回日期: 2008-02-16

Screening and identification of ATP/GTP binding protein 1 gene expressed highly in gastric cancer

Yu-Chuan Zhang, You-Li Zhang, Wen-Bing Wang, Guang Gao, Fen-Yin Lu

Yu-Chuan Zhang, You-Li Zhang, Fen-Yin Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Wen-Bing Wang, Guang Gao, Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn
Received: 2007-11-04 Revised: 2008-02-16

Abstract

AIM: To investigate the molecular mechanism of gastric carcinogenesis, screen and validate the genes expressed differently in gastric cancer.

METHODS: Messenger RNA differential display polymerase chain reaction (DD-PCR) was employed to search differently expressed fragments, some of which were cloned and sequenced. By homologous analysis in GenBank, the corresponding homologous genes of those fragments were found. The corresponding genes of those differently expressed fragments were validated by real-time semi-quantitative and quantitative PCR.

RESULTS: By DD-PCR, one expressed sequence tag (EST) was identified to be ATP/GTP binding protein 1 (A/GTPBP1) gene. The result of real-time semi-quantitative and quantitative PCR

showed that the expression level of A/GTPBP1 gene in gastric cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues. The open reading frame (ORF) of A/GTPBP1 gene, which encodes 1186 amino acids, was 3561-base pair long. The molecular weight was about 84.4 kDa. Protein sequence similarity analysis showed that A/GTPBP1 was a member of the G protein family.

CONCLUSION: The over-expression of A/GTPBP1 gene in gastric cancer may play an important role in gastric carcinogenesis.

Key Words: Fluorescent differential display; Real-time quantitative polymerase chain reaction; Gastric cancer; ATP/GTP binding protein 1

Zhang YC, Zhang YL, Wang WB, Gao G, Lu FY. Screening and identification of ATP/GTP binding protein 1 gene expressed highly in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(7): 780-783

摘要

目的: 探讨胃癌中差异表达的基因在胃癌发生和发展的分子机制中的作用。

方法: 提取胃癌组织样本的总RNA, 通过荧光差异显示技术(DD-PCR)获得胃癌样品中差异的片段, 对这些片段进行克隆和测序。通过在GenBank中同源性检索, 查找与差异片段相对应的同源基因。利用半定量PCR及定量PCR方法验证该基因表达的差异性。

结果: 通过DD-PCR得到差异片段中的一个片段对应与人ATP/GTP结合蛋白1基因(A/GTPBP1)。半定量PCR及荧光定量PCR技术检测结果表明, A/GTPBP1基因在胃癌组织中的表达量高于其对应的癌旁组织。该基因的读码框长3561 bp, 编码1186个氨基酸, 分子质量为84.4 kDa, 蛋白质相似性分析表明该蛋白为G蛋白家族成员。

结论: A/GTPBP1在胃癌组织中异常高表达, 可能在胃癌发生过程中起调节作用。

关键词: 荧光差异显示; 定量聚合酶链反应; 胃癌;

同行评议者
黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

ATP/GTP结合蛋白1基因

张宇川, 张允历, 王文兵, 高广, 陆芬英. 胃癌中高表达ATP/GTP结合蛋白1基因的筛选及验证. 世界华人消化杂志 2008; 16(7): 780-783

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/780.asp>

0 引言

胃癌是最常见的癌症类型之一, 占癌症死因的第2位^[1-3]. 我国是世界上胃癌的高发国家之一. 目前, 分子生物学研究已发现很多基因, 如RAS基因家族、MYC基因家族和ERBB基因家族等与胃癌的发生、发展有关^[4-9]. 然而胃癌发生的确切分子生物学机制仍未阐明, 寻找胃癌中新的特异表达的基因对胃癌的基础与临床研究具有重要意义.

荧光差异显示技术(DD-PCR)是以多聚酶链式反应(PCR)和聚丙烯酰胺凝胶电泳两种技术为基础建立起来的, 具有简便、灵敏、省时等优点, 目前广泛应用于寻找表达特异基因的研究中^[10-14]. 本实验应用DD-PCR筛选到胃癌中差异表达的ATP/GTP结合蛋白1(A/GTPBP1)基因, 并利用半定量PCR、荧光定量PCR等方法对该基因的表达进行了验证, 初步认为与胃癌的发展有关.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌的癌组织及癌旁组织标本取自江苏大学附属医院外科手术. 荧光差异显示试剂盒购于Genhunter公司, 荧光定量PCR试剂盒购于TaKaRa公司, MMLV反转录试剂盒购于Promega公司, RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 cDNA的制备: 用TRIzol提取的方法提取胃癌及癌旁组织的总RNA, 采用GeneSpect III测定总RNA的浓度, 经DNase消化后用MML V反转录得到胃癌组织及癌旁组织的cDNA.

1.2.3 DD-PCR: 3种荧光引物(FHT12 A, FHT12 G, FHT12 C)与20种试剂盒中的随机引物做不同组合, 进行DD-PCR, PCR产物8 μ L上样于6%的聚丙烯酰胺凝胶, 1400 V恒压电泳5 h左右.

1.2.4 差异片段的克隆: 差异条带经切割和处理后作为模板, 进行二次PCR, 将产物连接于T载体. 连接产物转化大肠杆菌DH5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆. 阳性克隆经酶切鉴定后测序(由上海生物工程公司完成).

1.2.5 荧光定量PCR分析: 利用Primer5.0软件设计用于定量PCR的A/GTPBP1基因引物, 内参选用人 β -actin(GenBank登录号: AK225414), 检测A/GTPBP1基因在胃癌组织、癌旁组织中表达的差异. 引物序列为: A/GTPBP1: F-GCCTCCATTCAAAGAGCCTA, R-TACGCTGGTCCACAACGAAT; 内参 β -actin: F-GAGACCTCAACACCCAGCC, R-GGAGTACAGGTCTTTGCGGATG. 扩增片段长度分别为300 bp和512 bp. 反应条件为94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s. 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算基因相对拷贝数, 利用SPSS13.0软件对获得的数据进行分析.

1.2.6 半定量PCR分析: 为了对荧光定量PCR的结果进一步检验, 用做定量PCR的两对引物对不同模板cDNA分别作半定量PCR, 反应条件为94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 25个循环. 通过凝胶成像系统软件对所得电泳条带进行亮度分析.

2 结果

2.1 胃癌和癌旁组织总RNA的提取 提取的总RNA进行凝胶电泳结果显示, 28S和18S条带较为明显, 总RNA的完整性和质量较好. 采用Gene Spect III检测, A_{260}/A_{280} 值均在1.8-2.0之间, 结果与电泳结果一致, 达到反转录要求.

2.2 荧光差异显示结果及阳性差异片段的筛选 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果发现, 胃癌和癌旁组织中基因的表达存在差异性. 为进一步了解这些差异片段的信息, 将差异片段切出后, 进行二次扩增, 并对扩增到的片段进行克隆和序列分析. 将测序获得的序列在NCBI数据库中进行比对, 其中编号为W4的差异片段与GenBank中的A/GTPBP1基因同源性达到99%(GenBank登录号: AL157882). 该基因读码框为3561 bp, 编码1186个氨基酸. 根据氨基酸序列推测其为G蛋白家族的成员.

2.3 荧光定量PCR分析 应用12例胃癌标本对AGTPBP1基因在胃癌及癌旁组织的表达量进行检测. 应用SPSS13.0软件作定量分析. 结果表明, AGTPBP1基因在胃癌组织中的表达量高于其相应的癌旁组织, 其差异具统计学意义($P < 0.05$, 图1).

2.4 半定量PCR分析 为进一步验证A/GTPBP1基因在胃癌及癌旁组织中表达量的差异, 本研究中取四例胃癌组织标本对该基因进行半定量分析. A/GTPBP1基因在胃癌组织及癌旁组织中均

研发前沿
幽门螺杆菌与胃癌的发生关系极大, 且幽门螺杆菌分泌的毒素可导致细胞的变化, 但其毒素如何引起细胞基因表达的改变尚不清楚.

创新盘点
本文采用荧光差异显示法从癌变的内因-细胞内基因表达的变化, 尝试发现与胃癌发生特异性相关的基因, 该方法现在很少应用于东方人典型的癌症类型-胃癌中。

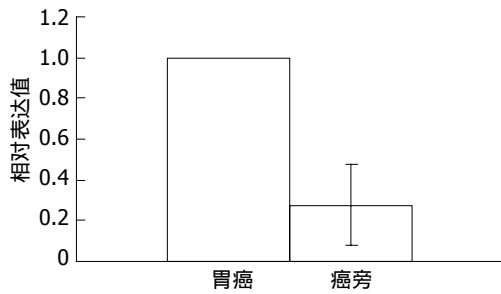


图1 A/GTPBP1基因在胃癌及癌旁组织差异表达。

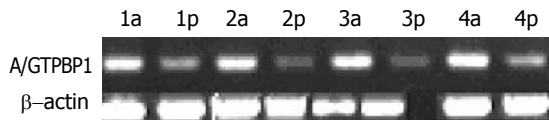


图2 A/GTPBP1基因在胃癌组织及癌旁组织中电泳图谱。1a-4a: 胃癌组织中A/GTPBP1基因电泳图; 1p-4p: 癌旁组织中A/GTPBP1基因电泳图。

有表达, 但在癌中的表达量高于旁组织(图2)。通过凝胶成像系统软件对所得电泳条带进行亮度和面积的分析, 然后用SSPS13.0软件处理, 得到直观的图像, A/GTPBP1基因在胃癌组织中的表达量高出癌旁组织约6倍(图2)。

3 讨论

目前, 恶性肿瘤已成为危害人类健康最严重的疾病之一。根据世界卫生组织的统计, 全球每年因为恶性肿瘤而死亡的人约有500余万。肿瘤的预防与治疗已成为与人类每一个家庭都密切相关的社会问题。在我国, 胃癌仍是最为常见的恶性肿瘤, 临床上以内镜和病理为主的胃癌诊断, 以手术和药物为主的治疗效果均不令人满意。20年来的研究进展证实, 肿瘤的发生、发展与基因的失活或高表达密切相关^[4-9]。因此, 寻找癌组织中表达特异的基因, 将为癌症的早期诊断和治疗靶基因提供分子理论支持。

本研究应用mRNA差异显示技术筛选到胃癌中高表达的基因A/GTPBP1。在GenBank中的同源性比较表明, 该基因位于人9号常染色体上, 读码框长3561 bp, 编码1186个氨基酸。ATP/GTP结合蛋白(A/G蛋白)是细胞膜受体与选择性效应器之间信号转导的重要蛋白质, A/G蛋白表达水平及其活性的变化相应地调节着细胞生理、生化及其相关基因的表达^[15-16]。肿瘤细胞具有很强的增殖能力, 恶性肿瘤细胞对人体的破坏主要是因为其具有高增殖力及浸润性, A/G蛋白表达水平的增高, 可以更多地激活cAMP系统, 诱导细胞的生长。目前已有研究表明, 甲状腺癌组

织中存在具有活性的突变Gs α (G蛋白的一个亚基)基因, 并认为甲状腺癌的发生可能与Gs α 基因的高表达有关^[17-19]。本研究筛选并应用多例胃癌标本验证发现ATP/GTP结合高于其相应的癌旁组织, 该基因的高表达可能与胃癌细胞中cAMP系统的信号转导调控密切相关, 推测其高表达特异性地与胃癌的发展有关。由于A/G蛋白包含多个亚基, 结构较复杂, 究竟是一个还是多个亚基的高表达参与了胃癌的发生、发展及A/GTPBP1基因在癌组织中的高表达是否具有普遍性等均有待进一步研究。

4 参考文献

- Yeole BB, Kumar AV. Population-based survival from cancers having a poor prognosis in Mumbai (Bombay), India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 175-182
- Tovar-Guzman V, Hernandez-Giron C, Barquera S, Rodriguez-Salgado N, Lopez-Carrillo L. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 2001; 32: 312-317
- Tsugane S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer* 2007; 10: 75-83
- van Lieshout EM, Roelofs HM, Dekker S, Mulder CJ, Wobbes T, Jansen JB, Peters WH. Polymorphic expression of the glutathione S-transferase P1 gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 586-589
- Yang YQ, Zhang LJ, Dong H, Jiang CL, Zhu ZG, Wu JX, Wu YL, Han JS, Xiao HS, Gao HJ, Zhang QH. Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer. *J Dig Dis* 2007; 8: 186-193
- Wang HL, Bai H, Li Y, Sun J, Wang XQ. Rationales for expression and altered expression of apoptotic protease activating factor-1 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5060-5064
- Taniguchi H, Fujiwara Y, Doki Y, Sugita Y, Sohma I, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Tomita N, Morishita R, Monden M. Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 1609-1617
- Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Nakamura A, Kajimura M, Sugimura H, Hishida A. Effects of interleukin-10 gene polymorphism on the development of gastric cancer and peptic ulcer in Japanese subjects. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1443-1449
- Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Bae HI, Park JY, Lee MH, Lee HC, Chung HY, Yu W. Investigation of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and its association with clinicopathologic characteristics in gastric cancer. *Oncology* 2006; 71: 266-272
- Con SA, Takeuchi H, Valerin AL, Con-Wong R, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Nishioka M, Mena F, Brenes F, Yasuda N, Araki K, Sugiura T. Diversity of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in Costa Rica: its relationship with atrophic gastritis and gastric cancer. *Helicobacter* 2007; 12: 547-552
- Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura

应用要点
新的相关基因A/G结合蛋白I的发现为深入研究其与胃癌的关系打下了基础, 同时该基因也可拓展到其他肿瘤类型中的研究。

- Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* 2007; 254: 42-53
- 12 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257: 967-971
- 13 Zhang XQ, Yang YQ, Liu BY, Jin XL, Li W, Tang KL, Zhang QH, Lin YZ, Zhu ZG. Gene expression profiling of diffuse-type gastric cancer by cDNA microarray. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 116-119
- 14 闻燕, 王文兵, 高广, 许文荣, 朱伟, 李峰. 食管癌中高表达的钙结合蛋白1基因的序列分析及意义. *江苏大学学报(医学版)* 2007; 17: 155-157
- 15 Xie GX, Palmer PP. How regulators of G protein signaling achieve selective regulation. *J Mol Biol* 2007; 366: 349-365
- 16 Appert-Collin A, Baisamy L, Diviani D. Regulation of g protein-coupled receptor signaling by a-kinase anchoring proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 2006; 26: 631-646
- 17 Harris A, Morgan JI, Pecot M, Soumare A, Osborne A, Soares HD. Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 578-596
- 18 Lania AG, Mantovani G, Spada A. Mechanisms of disease: Mutations of G proteins and G-protein-coupled receptors in endocrine diseases. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 681-693
- 19 吕朝晖, 陆菊明, 潘长玉, 罗国春. G蛋白 α 亚基mRNA在不同甲状腺疾病的表达. *中华内科杂志* 2003; 42: 103-105

同行评价
本文选题新颖, 目的明确, 方法合理, 结果可信, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 3.6 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-08)