

· 基础研究 ·

TSG101在肺癌组织和细胞系中的表达及意义

蔡存伟 张道荣 陆平 高艳华 常家辉

【摘要】 背景和目的 在小鼠NIH3T3成纤维细胞中通过随机纯合子敲除法证实,破坏肿瘤易感基因*TSG101* (Tumor Susceptibility Gene101)导致裸鼠的自发性肺转移性肿瘤,从而*TSG101*作为候选的肿瘤抑制基因被认识。随后,越来越多的研究证实*TSG101*并非是严格意义上的肿瘤抑制基因,在原发乳腺癌并没有检测到基因内部的序列的丢失或异常,相反发现存在异常的*TSG101*选择性剪接体。本研究旨在研究肺癌细胞系和组织中*TSG101*的表达情况,分析*TSG101*及异常的*TSG101*选择性剪接体在肺癌的发生发展过程中可能所起的作用。方法 采用免疫组织化学方法(SP法)检测79例肺鳞癌和肺腺癌组织及相应癌旁正常肺组织中*TSG101*的表达情况。采用RT-PCR实验分析,检测出在7种肺癌细胞系中野生型和异常剪接转录产物表达情况。采用Western Blot方法检测肺癌细胞系中蛋白质表达情况。结果 *TSG101*在肺鳞癌和肺腺癌中的蛋白水平显著低于其在相应正常肺组织中的表达。七种细胞系中普遍存在由于异常的选择性剪接而缩短的*TSG101*转录产物,和野生性转录产物同时表达。通过统计学分析发现在小细胞肺癌细胞系中存在更多的异常的转录产物。通过Western Blot分析同样发现小细胞肺癌细胞系同样与其他非小细胞肺癌细胞系在蛋白水平上存在差异。结论 尽管在非小细胞肺癌中作为候选的肿瘤抑制因子,但是普遍存在的*TSG101*异常转录产物也许和肺癌的类型相关,可作为肺癌恶性进展的生物学标志。

【关键词】 肺肿瘤 TSG101蛋白 选择性剪接体

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.02.012

Expression and its significance of TSG101 in lung cancer tissue and lung cancer cell lines

CAI Cunwei¹, ZHANG Daorong, LU Ping, GAO Yanhua, CHANG Jiahui

¹Department of Pathology, China Medical University, Shenyang Liaoning 110001; The 5th Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Daqing, 163453, China

Corresponding Author: Zhang Daorong, E-mail: cmu_zhangdaorong@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective It has been proven that *TSG101* is a candidate tumor suppressor gene whose deletion in NIH3T3 cells leads to spontaneous lung metastases in nude mice. Aberrant transcripts of *TSG101* have been identified in primary breast carcinomas without evidence of intragenic deletions. To investigate the possible role of *TSG101* and aberrant transcripts of *TSG101* in lung cancer, we performed transcript analysis and protein analysis in lung cancer cell lines and lung cancer tissue. **Methods** Immunohistochemical method (S-P method) was used to detect the expression of *TSG101* in 79 human squamous carcinoma and adenocarcinoma cases with the neighboring noncancerous tissue. RT-PCR was adopted to detect a common shortened *TSG101* transcript because of aberrant alternative splicing and the wild-type transcript in lung cancer lines. Western Blot method was adopted to detect the expression of *TSG101* protein in lung cell cells. **Results** The expression of *TSG101* protein in tumor tissues was significantly lower than that in the neighboring noncancerous tissue. Reverse transcriptase RT-PCR analysis detected a common shortened *TSG101* transcript because of aberrant alternative splicing, which was co-expressed with the wild-type transcript in seven lung cancer lines. Although shortened transcript was detected in all of lung cell cells being involved in our experiment, there is more aberrant transcripts in small cell lung cancer (SCLC) lines. Western blot analysis have detected the same differences in protein level. **Conclusion** *TSG101* is a candidate tumor suppressor in non small cell lung cancer. However the common *TSG101* aberrant transcript may be associated with types of lung cancer, and can be used as valuable biomarkers to evaluate lung cancer poor prognosis.

【Key Words】 Lung neoplasms TSG101 protein Alternative splicing

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学基础医学院病理教研室(蔡存伟,张道荣,高艳华,常家辉);163453,齐齐哈尔医学院附属五院大庆市龙南医院病理科(陆平)(通讯作者:张道荣,E-mail: cmu_zhangdaorong@hotmail.com)

在小鼠成纤维细胞3T3细胞随机灭活肿瘤易感基因*TSG101* (Tumor Susceptibility Gene 101) 导致致瘤性转化^[1]。随后在乳腺癌研究中发现,存在多种*TSG101* 基因的突变体,后来证实这些所谓的突变体是由外显子跳跃 (skipping) 产生的剪接变异体^[2],而没有基因内部缺失的证据。近年来的研究表明,与癌旁的正常组织相比,在多种人类肿瘤包括乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌和胃肠道肿瘤中*TSG101*异常剪接体出现的频率增加。本实验通过免疫组织化学方法、RT-PCR和Western blot方法检测肺癌细胞和组织中*TSG101*表达的水平,并特异检测*TSG101*的剪接变异体,探讨*TSG101*在肺癌的发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 收集79例肺癌组织,取自中国医科大学附属第一医院2005-2007年手术切除标本。组织均经4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,厚4 μm连续切片,进行免疫组化染色。其中鳞癌48例,肺腺癌31例;中、高分化51例,低分化28例;淋巴结转移阳性者45例,淋巴结转移阴性者34例。

7种本研究室保存的肺癌细胞系,SK和QG为肺鳞癌细胞系,661和460是大细胞肺癌细胞系,SPC和LTE是肺腺癌细胞系,446为小细胞肺癌细胞系。含有10%的胎牛血清和1%青链霉素的DMEM高糖培养基,5%CO₂、37 ℃恒温孵箱中孵育。

1.2 主要试剂 购买浓缩型鼠抗人TSG101单抗 (Santa Cruz公司),即用型S-P超敏免疫组化试剂盒和3-3'二氨基联苯胺 (3-3'Diaminobenzidine DAB) 显色试剂盒均购自福建迈新生物技术有限公司,浓缩型辣根酶标记山羊抗小鼠 (ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

RNA抽提试剂盒Trizol购自Invitrogen公司,RT-PCR反应试剂盒购自大连TakaRa公司,引物序列合成由大连TakaRa公司完成。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 79例肺鳞癌和肺腺癌均行TSG101 (1:200) 单抗免疫组织化学染色。染色方法按说明书进行。以磷酸缓冲液 (Phosphate Buffered Saline PBS) 代替一抗作为阴性对照,TSG101阳性切片作为阳性对照。

1.3.2 RT-PCR 细胞长到对数生长期时收集细胞,利用Triol (Invitrogen) 提取细胞系总的RNA,利

用RT-PCR检测TSG101mRNA序列及其剪接变异体。用于RT-PCR检测全长序列的引物,上游序列5'-GTCATGGCGGTGTCGGAG-3',下游序列是5'-AGCAGTCCCAACATTCAGCAC-3'另外设计特异检测剪接变异体的引物,上游序列5'-TCTCCCTTATACAAACAGATCCTGA-3'下游序列5'-GTCTATCAGCCCTTCACAA-3'。反转录的质量通过 β -actin来检测,引物上游5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3',下游5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3'。RT-PCR反应按说明书进行。最后经琼脂糖凝胶电泳后保存图像。

1.3.3 Western Blot 细胞长到对数生长期时收集细胞,从培养细胞内提取细胞胞质蛋白,经SDS-PAGE电泳分离后,把蛋白转移到PVDF膜上。TTBS (TBS, 50 g/L 脱脂奶粉) 封闭PVDF膜后,加入鼠抗人TSG101单克隆抗体 (1:200),4 ℃孵育过夜,TBS漂洗后,加辣根酶标记山羊抗小鼠二抗 (1:2000) 温育120 min,最后用DAB显色。

1.4 结果判定

1.4.1 免疫组织化学染色结果判定 细胞内呈现棕黄色细小颗粒者为阳性染色。TSG101蛋白定位于肺泡上皮细胞浆 (胞核) 或癌细胞浆 (胞核) 内,参考陆平等^[3]免疫组化评分标准,每张切片在400倍镜下观察5个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,共计500个细胞。阳性细胞数 10%为1分,11%-50%为2分,50%-75%为3分,>75%为4分;再按染色强度评分:无色为0,淡色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;最后按照乘积分数分为4个等级:“-”(0,1,2),“+”(3,4)“++”(6,8)“+++”(9,12)。TSG101染色结果判定:分数 ≥ 3 定为阳性,<3为阴性。

1.4.2 RT-PCR 结果判定 用图像分析仪测定各图象的光密度值,利用平均光密度值进行分析。

1.4.3 Western Blot结果判定 将显色后的膜阴干,用图像分析仪测定各样品显色的灰度,利用灰度值进行分析。

1.5 统计学分析 应用SPSS13.0统计软件进行数据处理,采用 χ^2 检验分析免疫组化结果,采用t检验分析Western Blot图像灰度值和RT-PCR图象的平均光密度值, $P < 0.05$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 尽管在正常对照的癌旁

组织强表达,但是在低分化的肺鳞癌和肺腺癌中微弱或无表达,在高中分化的肺鳞癌和肺腺癌中低表达,并且主要在胞浆中表达,并且发现在间质也有表达(图1)。

TSG101的表达水平与肺癌组织分化($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.05$)等临床病理参数有显著关系,随着淋巴结转移的增加,TSG101的阳性率下降(表1)。

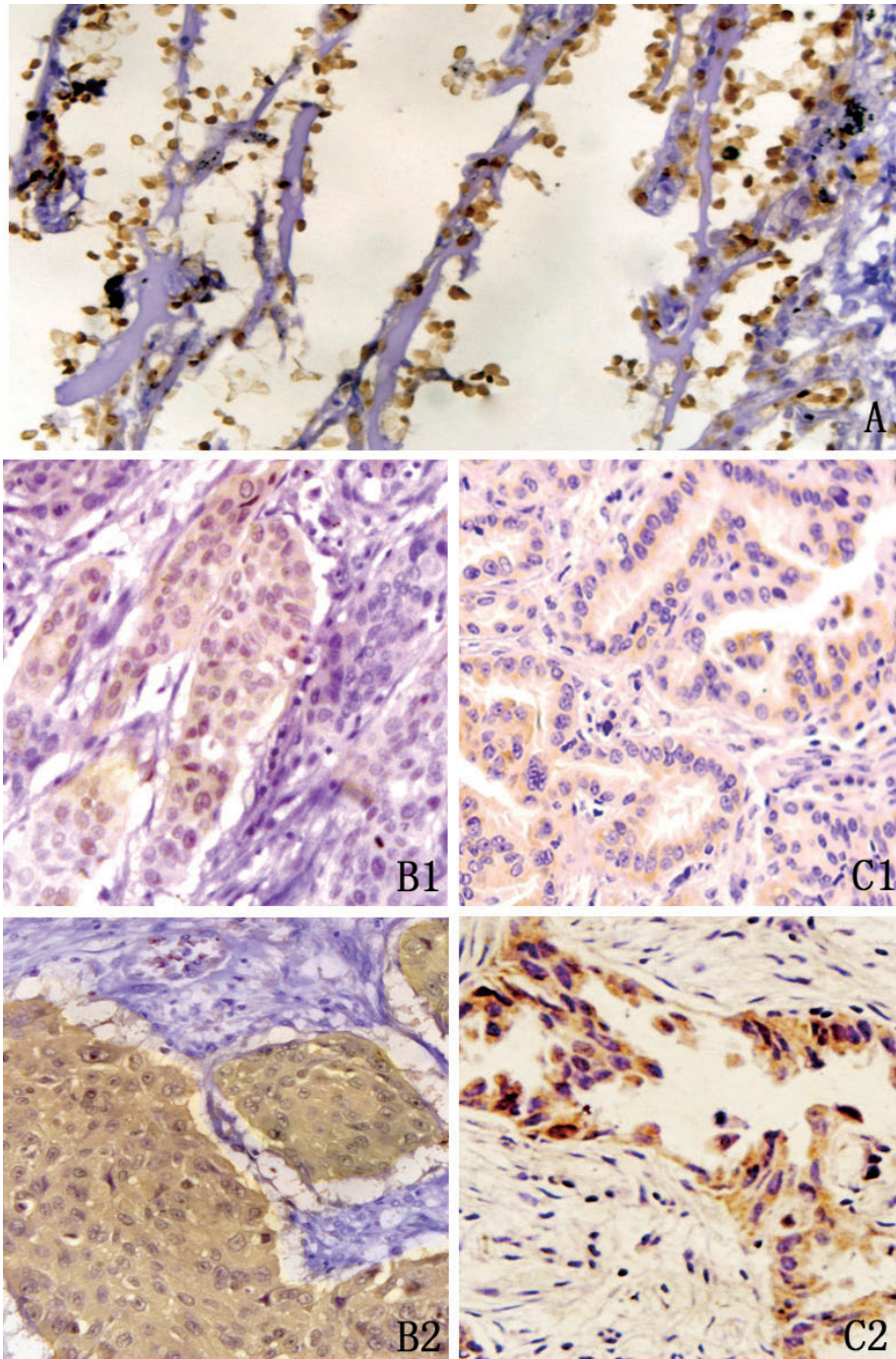


图 1 TSG101蛋白在正常肺组织和肺癌中的表达(SP法,原始放大倍数 $\times 400$)

Fig 1 TSG101 expression by immunohistochemistry (SP method, original magnification $\times 400$)

A: in normal alveolar epithelium;

B1: in cytoplasm and nucleus of poorly differentiated squamous cell carcinoma cells;

B2: in cytoplasm and nucleus of well-differentiated squamous cell carcinoma cells;

C1: in cytoplasm and nucleus of poorly differentiated adenocarcinoma cells;

C2: in cytoplasm and nucleus of well-differentiated squamous cell carcinoma cells

表 1 TSG101在肺鳞癌、腺癌中的表达及与淋巴结转移的关系

Tab 1 Relationship between expressions of TSG101 and clinicopathological characteristics of lung cancer

Characteristic	n	TSG101			
		+	-	χ^2	P value
Histology				2.79	>0.05
Squamous cell carcinoma	48	25	23		
Adenocarcinoma	31	22	9		
Differentiation				4.98	<0.05
Poor	28	12	16		
Well-moderate	51	35	16		
Lymphnode metastasis				4.88	<0.05
N0	34	25	9		
N1-3	45	22	23		

2.2 RT-PCR 结果 利用检测全长序列引物进行RT-PCR反应,发现除了有全长产物外,在488 bp处发现有剪接变异体的产物,并且小细胞肺癌细胞含量较多(图2),与Maxxwell研究^[4]的TSG101 154-1054一致。并且小细胞肺癌细胞系446与其他非小细胞肺癌细胞系相比,全长产物较少,而缩短的剪接变异产物相对较多,经统计学分析,具有统计学意义。

为了进一步确定缩短的剪接变异体的类型,在跨过剪接点设计引物特异检测TSG101 154-1054,同样

发现有预期产物出现(图3)。同样经过统计学发现,小细胞肺癌细胞系与非小细胞肺癌细胞系相比,具有统计学意义。

2.3 Western Blot结果 七种肺癌细胞系细胞中均有TSG101蛋白表达,但是小细胞肺癌细胞系表达较其他非小细胞肺癌细胞系表达明显较低(图4)。

3 讨论

前体mRNA剪接是精密和普遍存在的转录修饰过

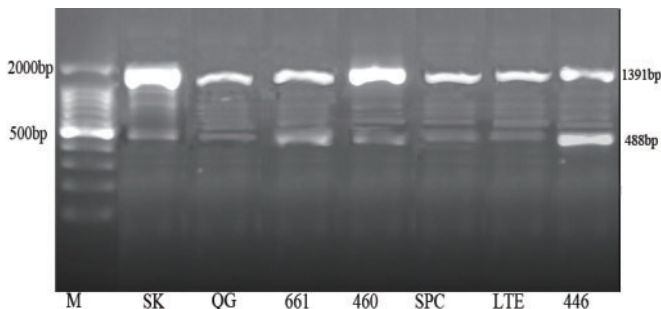


图 2 RT-PCR检测七种人肺癌细胞系TSG101基因表达情况
Fig 2 Result of RT-PCR for expressions of TSG101 in seven lung cancer cells

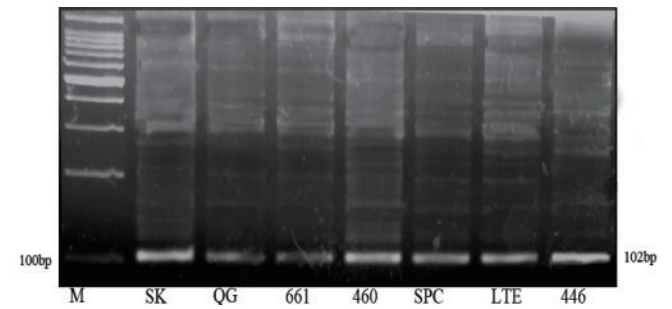


图 3 TSG101缩短的mRNA剪接变异体表达情况
Fig 3 Result of RT-PCR for shortened TSG101 mRNA in seven lung cancer cells

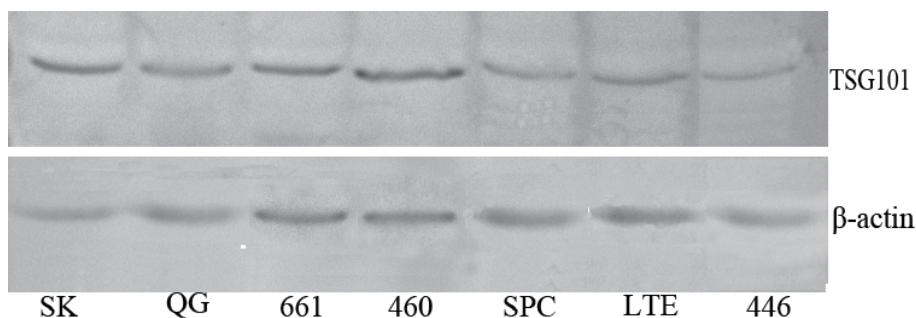


图 4 七种肺癌细胞系中TSG101蛋白的表达情况
Fig 4 Western blot for TSG101 in seven lung cancer cells

程,剪接过程的异常是引起癌症的自然来源之一。RNA剪接保真性的放松与肿瘤性发生和胚胎发育相关^[5],在肿瘤进展过程中剪接过程常常发生保真性的丢失,肿瘤抑制基因能够被这种异常的剪接形式所影响。肿瘤抑制基因内在剪接位点的突变常常引起外显子跳跃事件,所产生的异常转录体编码的截短的蛋白质。

肿瘤抑制基因*TSG101*(tumour susceptibility gene101)最初是由Li^[1]等于1996年通过随机纯合子敲除法(Random Homozygous Knock Out, RHKO)在小鼠NIH3T3成纤维细胞中发现,破坏该基因纯合子的功能导致细胞发生转化,恢复该基因的功能,细胞则恢复正常生长。随后*TSG101*被作为候选的肿瘤抑制基因进行研究。我们的免疫组织化学染色结果也显示,*TSG101*在肺鳞癌和肺腺癌中的蛋白水平显著低于其在相应正常肺组织中的表达,并且和淋巴结转移呈负相关,提示*TSG101*在肺鳞癌和肺腺癌发生过程中作为潜在的肿瘤抑制基因而存在。

然而,Maxxwell等^[4]在乳腺癌的研究中没有发现基因内部丢失或突变的证据,但是发现存在异常剪接转录体,主要包括五种截短的转录产物,缺失的范围分别为154-1054bp、132-729bp、132-637bp、132-446bp和284-1054bp。尽管异常*TSG101*剪接体在正常组织中也能够被发现,但是与癌旁的正常组织相比,在多种肿瘤包括乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌和胃肠道肿瘤中*TSG101*异常剪接体出现的频率增加。我们利用RT-PCR分析不同组织学类型的肺癌细胞系基因转录情况,同样发现相当于900 bp(154-1054)的丢失的异常选择性剪接体存在。

Ferrer M等^[6]报道说在77%的伯基特淋巴瘤细胞系中发现一种新的编码17-kD蛋白的变异的剪接体,缺少双螺旋(亮氨酸拉链)结构域,但是部分地保留氨基末端泛素化抑制剂区域。这种剪接变异体只在肿瘤中表达,提示参与原发性侵袭和转化的淋巴瘤亚型的发病机制。研究者通过核酸分析新的片段证实,外显子3的283和外显子9的1055核苷酸连接,与乳腺癌中E类型缺失一致。

我们的Western blot的结果没有发现截短的蛋白质,可能的原因是截短的蛋白质不存在野生型蛋白质的抗原表位。尽管我们没有发现截短的蛋白质,我们推测A类型的异常剪接体所编码的蛋白质由于缺失区域位于羧基端,丢失了羧基末端双螺旋结构(亮氨酸拉链)介导的蛋白和蛋白相互作用及随后丢失的转录调节作用^[8],提示

变异的转录产物编码的截短的蛋白质不具有转录抑制功能。

我们的结果显示,恶性程度较高的小细胞肺癌细胞系与其他类型的肺癌相比,全长的mRNA序列和TSG101蛋白水平下降,并且检测出较高水平的缩短的剪接变异体,与Yun^[9]的研究一致,表明TSG101在肿瘤的不同亚型中发挥不同作用,证实了mRNA的选择性剪接可以引起正常野生型蛋白质表达的下调^[10],并且也说明*TSG101* 154-1054代表一种肿瘤发展的标记^[11],可能参与肺癌亚型的恶性进展。

Kenneth H^[12]在果蝇细胞中研究发现,*TSG101*基因的突变可以引起周围野生型细胞JAT-STAT信号的活化,进而引起过分生长。评价TSG101对于肺癌细胞的生长调节特性,可能需要更复杂的、同时由野生型和突变型细胞、也许必须是来自不同的细胞类型的细胞组成的混合培养系统来进行。总之,肿瘤的发生、发展是一复杂的病理过程,需要多种抑癌基因与癌基因的参与,*TSG101*基因的剪接变异体在肿瘤发生发展中的作用的阐明,将为人类肿瘤的发生机制及早期诊断提供重要的线索,为肿瘤的防治提供希望。

参 考 文 献

- 1 Li L, Cohen SN. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell*, 1996, 85(3): 319-329.
- 2 Waqner KU, Dierisseau P, Rucker EB 3rd, et al. Genomic architecture and transcriptional activation of the mouse and human tumor susceptibility gene TSG101: common types of shorter transcripts are true alternative splice variants. *Oncogene*, 1998, 17(21): 2761-2770.
- 3 Lu P, Zhang DR, Gao YH, et al. Expression and significance of TSG101, P21 and P300/CBP in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Chin J Lung Cancer*, 2007, 10(3): 196-202. [陆平, 张道荣, 高艳华, 等. TSG101与P21及P300/CBP在肺鳞癌和肺腺癌中的表达及意义. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(3): 196-202.]
- 4 Lee MP, Feinberg AP. Aberrant Splicing but not Mutations of TSG101 in Human Breast Cancer. *Cancer Res*, 1997, 57(15): 3131-3134.
- 5 Li L, Liao J, Ruland J, et al. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1619-1624.
- 6 Ferrer M, Lopez-Borges S, Lazo PA. Expression of a new isoform of the tumor susceptibility TSG101 protein lacking a leucine zipper domain in Burkitt lymphoma cell lines. *Oncogene*, 1999, 18(13): 2253-2259.

- 7 Ferrer M, Hernández S, Campo E, et al. Loss of the TSG101 leucine zipper domain in aggressive non-Hodgkins lymphoma. *Leukemia*, 2000, 14(11): 2014-2016.
- 8 Lupas A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(10): 375-378.
- 9 Oh Y, Protor M, Fan YH, et al. TSG101 is not mutated in lung cancer but a shortened transcript is frequently in samal cell lung cancer. *Oncogene*, 1998, 17(9): 1141-1148.
- 10 Bennett NA, Patillo RA, Lin RS, et al. TSG101expression in gynaecological tumors;relationship to cyclinD1, cyclinE, p53 and p16 proteins. *Cell Mol Biol*, 2001, 47(7): 1187-1193.
- 11 R.Klaes, M.Kloor, F.Wileke. et al. Significant Increase of a Specific Variant TSG101 Transcript during the Progression of Cervical Neoplasia. *Eur J Cancer*, 1999, 35(5): 733-737.
- 12 Kenneth H. Moberg, Suzanne Schelble, et al. Mutations in erupted, the Drosophila ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell*, 2005, 9(5): 699-710.

(收稿: 2007-12-13 修回: 2008-02-28)
(本文编辑 李博)

· 启事 ·

根据中国科学技术信息研究所2007年版《中国科技期刊》引证报告(核心版)2006肿瘤学类期刊影响因子排序表如下(前10名):

代码	期刊名称	影响因子		
		数值	学科排名	离均差率
G179	中华肿瘤杂志	1.217	1	1.93
G251	中华放射肿瘤学杂志	1.047	2	1.52
G011	癌症	0.778	3	0.87
G320	中国肺癌杂志	0.507	4	0.22
G184	肿瘤	0.429	5	0.03
G133	中国肿瘤临床	0.412	6	-0.01
G538	中国癌症杂志	0.410	7	-0.01
Q910	临床肿瘤学杂志	0.366	8	-0.12
G549	癌变·畸变·突变	0.329	9	-0.21
G857	中国骨肿瘤骨病	0.289	10	-0.30

经本刊主办单位中国抗癌协会、中国防痨协会研究决定,并报请国家新闻出版总署批准(新出报刊【2007】255号文),《中国肺癌杂志》办刊地自2007年第4期开始变更为天津市;原刊号CN51-1597/R注销,新编国内统一连续出版物刊号为CN12-1395/R;新的编辑部地址为:天津市和平区南京路228号天津医科大学总医院图书馆;邮政编码:300020;联系电话:022-27219219,022-27219052。

本刊的办刊宗旨、办刊原则、指导思想均不变。邮发代码为6-230。感谢广大读者和作者长期以来对本刊的支持和厚爱,并希望继续得到广大读者和作者的支持。

来稿请直接寄:300020,天津市和平区南京路228号《中国肺癌杂志》编辑部。E-mail投稿信箱为:cnlungca@yahoo.com.cn。

特此公告

本刊编辑部
2008年1月18日