

· 基础研究 ·

p73 基因在鼻咽癌组织中的表达及突变分析

杨旭^{1,2}, 雷科¹, 龚静蓉¹

(1. 复旦大学附属上海市第五人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200240; 2. 上海市徐汇区中心医院耳鼻咽喉科, 上海 200031)

摘要: **目的** 研究鼻咽癌组织中 p73 基因的表达和突变。**方法** 运用实时定量逆转录聚合酶链反应技术 (real time quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction, RQ-RT-PCR) 检测鼻咽癌和鼻咽炎组织中 p73 基因的表达, 应用单链构象多态性分析技术 (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) 检测 p73 基因的突变。**结果** 58 例鼻咽癌组织中 p73 基因表达水平经内参校正后为 3.56 ± 3.14 , 与鼻咽组 (1.93 ± 1.39) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。p73 基因的表达与鼻咽癌临床分期有关, III、IV 期高于 I、II 期, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SSCP 检测发现 1 例鼻咽癌组织出现 p73 基因突变, 突变率 1.72%; 鼻咽炎组织未发现突变。**结论** 鼻咽癌组织中存在 p73 基因的过表达现象, p73 基因的异常表达及突变与鼻咽癌的发生发展存在一定的关系。

关键词: 鼻咽癌; p73 基因; 基因突变; 基因突变实时定量逆转录聚合酶链反应; 单链构象多态性分析

中图分类号: R739.63; R730.231 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2011)04-0248-04

Expression and mutation of p73 gene in nasopharyngeal carcinoma

YANG Xu, LEI Ke, GONG Jing-rong

(Department of Otorhinolaryngology, Shanghai Xuhui Center Hospital, Shanghai 200031, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and mutation of p73 gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** The expression of p73 mRNA was detected by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RQ-RT-PCR), and then the mutation of this gene was analyzed by PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP). **Results** The expression level of p73 mRNA in 58 NPC specimens (3.56 ± 3.14) was significantly higher than that in 23 of chronic nasopharyngitis (1.93 ± 1.39) ($P < 0.01$). The expression level of this gene was correlated with the clinical stage of NPC. The Δ CT values of III, IV stages were lower than those of I, II stages ($P < 0.05$) while the RQ values of III, IV stages were higher than those of I, II stages ($P < 0.05$). The SSCP results showed mutation of p73 gene in one NPC specimen (1.72%) and none in chronic nasopharyngitis specimens. **Conclusion** The p73 gene is over-expressed and mutated in NPC tissues, which might be associated with the development of NPC.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; p73 gene; Gene mutation; Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; PCR-single strand conformation polymorphism

鼻咽癌是我国南方常见的恶性肿瘤, 通过综合治疗其 5 年生存率在 50% ~ 60%。p73 基因是 Kaghad 等^[1] 在神经母细

胞瘤 (COS) 细胞 cDNA 文库中利用胰岛素中介体 (TRS-1) 结合区和互补寡核苷酸杂交中偶然发现的, 定位于人染色体 1p36.2-36.3。p73 基因定位于此区域, 人们将其作为一个候选的抑癌基因。研究表明 p73 基因过表达时能抑制细胞生长和诱导调

基金项目: 上海市闵行区科委资助 (项目编号: 2008MH058)。
作者简介: 杨旭, 女, 副主任医师。
通讯作者: 杨旭, Email: lileyyang@126.com.

亡^[2]。本研究采用 RQ-RT-PCR、SSCP 技术检测鼻咽癌组织和鼻咽黏膜慢性炎症组织中 p73 mRNA、p73 基因的突变,探讨 p73 基因在鼻咽癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集复旦大学附属上海市第五人民医院取活检的鼻咽癌组织标本 58 例,其中男 45 例,女 13 例;年龄 19~86 岁,平均年龄 41.3 岁。鼻咽黏膜慢性炎症组织标本 23 例,年龄 21~56 岁;平均年龄 39.2 岁。所有标本均经资深病理专家阅片并确诊其组织学类型,病理类型根据 1991 年 WHO “上呼吸道疾病和耳肿瘤的组织学分类”内容将鼻咽癌分型如下:①角化性鳞状细胞癌或鳞状细胞癌(分化好的、中等角化性鳞状细胞癌和分化差的鳞状细胞癌)25 例。②非角化性癌(分化型非角化性癌、未分化癌、鼻咽型未分化、泡状核细胞癌或大圆形细胞癌的)33 例。根据中国 2008 鼻咽癌分期标准期 I 期 11 例,II 期 13 例,III 期 29 例,IV 期 5 例。其中 38 例有颈淋巴结转移,20 例无淋巴转移。所有患者活检前均未作放、化疗。取材后标本置 -70℃ 低温冰箱编号保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

取 100 mg 组织置冰上机械匀浆后参照 TRIZAL (Invitrogen) 方法提取总 RNA,并将其溶解于 DEPC 处理水中,用紫外微量分光光度计定量后置 -20℃ 冰箱编号保存备用。

1.3 RQ-RT-PCR 反应

引物由上海生工合成,序列为 p73 F: 5'-AACGCTGCCCCAACCACGAG-3', p73 R: 5'-GCCGGTTCATGCCCCCTACA-3', 目的产物大小 231 bp; 内参照 β -actin R: 5'-GAGC-TACGAGCTGCCTGA CG-3', β -actin F: 5'-CCTAGAAGCATTTCGCGTGG-3', 目的产物大小 416 bp。采用 promega 公司 RT-PCR 试剂盒进行 RT, 合成好的第一链 cDNA 用来做 PCR 的模板。RQ-PCR 反应总体积 20 μ l, 2 \times SYBR premixture 10 μ l (购自东洋纺), 不含 RNA 酶的蒸馏水 8.2 μ l, Primer F 0.4 μ l, Primer R 0.4 μ l, cDNA 1 μ l。采用美国 Applied

Biosystem 公司 7300 PCR 仪检测, PCR 反应的循环参数: 95℃ 10 min, 95℃ 45 s + 60℃ 45 s + 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 5 min。

1.4 SSCP 检测

选取 p73 基因 mRNA 阳性的 PCR 扩增产物进行 cDNA 纯化, 5 μ l 纯化产物与 15 μ l 变性液 (0.2 ml 0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 10 mg 溴酚蓝, 10 mg 二甲苯青, 10 ml 甲酰胺) 混合, 99℃ 变性 15 min 后, 冰上淬冷 5 min。丙烯酰胺 28.5 g, N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 1.5 g, 加水配制成 30% 的丙烯酰胺母液。取丙烯酰胺母液 33 ml, 10 \times TBE 10 ml, 加 ddH₂O 至 90 ml 搅拌溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤, 加入催化剂过硫酸铵 (25%) 50 μ l, TEMED 50 μ l, 轻摇混匀, 立即灌胶。凝固后至少 30 min 上样使用。4℃ 100 V 条件下电泳 2~3 h, 待溴酚蓝迁移至凝胶底部为止。将 PAGE 板用去离子水洗 2 次, 浸入 10% 乙醇和 0.5% 冰醋酸溶液固定 10 min。去离子水洗 2 次, 浸入 0.2% AgNO₃ 溶液中 30 min, 用去离子水洗 3~5 次, 浸入 1.5% NaOH 和 0.4% 甲醛溶液中显色 7 min, 用去离子水洗 2 次终止显色。用 hp scanjet 5470c 扫描。

1.5 结果判定

根据溶解曲线计算基因的相对含量, 以评价 p73 基因的表达水平。PCR 产物进行 SSCP 分析时, 以凝胶中出现异常泳动的电泳带计为 p73 基因存在突变。

1.6 统计学处理

数据采用 *t* 检验, 经 SPSS13 统计软件包分析处理。

2 结果

2.1 RQ-RT-PCR p73 基因表达

用 Syber Green 方法做完 PCR 后, 用来判断产物是否相对专一。扩增反应完成后, 通过逐渐增加温度同时监测每一步的荧光信号来产生溶解曲线, 随着反应中双链 DNA 变性, 荧光染料又回复到游离状态导致荧光信号降低, 用荧光信号改变负的一次对数与温度作图, 在扩增产物的溶解温度上有一特征峰 (*T_m*, DNA 双链解链 50% 的温度)。开始加热, 信号变化不大, 所以几乎是平的, 接近 *T_m* 时, 变化突然加大, 所以出现峰值。再升温,

产物全部解离后又成一条曲线(图 1)。根据溶解曲线计算 ΔCT , CT 值代表扩增产物达到设定阈值所经历的循环数。溶解曲线横坐标代表温度,纵坐标代表荧光信号的变化。假设两个样品的内参的 CT 值一样,那么内参某个样品的目的基因的含量越高,其 CT 值就越小,目的基因与内参 CT 值的差值就越小。每个样品的表达量是用目的基因“Target”的 CT 值减去内参“ENDO”的 CT 值,得到一个数据,即 ΔCT ,这个值代表了目的基因的相对含量。

该值越小,目的基因的表达量越高。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。该法是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的一种简便方法。数据分析时用 $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ 代表基因的相对表达量(RQ), $\Delta CT = \text{目的基因 } CT \text{ 值} - \text{内参基因 } CT \text{ 值}$, $\Delta\Delta CT = \text{待测样本 } \Delta CT - \text{标准 } \Delta CT$ 。鼻咽癌组 ΔCT 显著低于鼻咽炎组 ($P < 0.01$), RQ 显著高于鼻咽炎组 ($P < 0.01$)。p73 基因的表达与临床分期有关,Ⅲ、Ⅳ期表达高于Ⅰ、Ⅱ期。见表 1。

表 1 p73 基因表达

组别	例数	ΔCT (循环数)			RQ(基因表达量)		
		$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i> 值	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i> 值
鼻咽炎组	23	6.10 ± 1.63	-3.21	<0.01	1.93 ± 1.39	2.79	<0.01
鼻咽癌组	58	5.14 ± 1.19			3.56 ± 3.14		
Ⅰ、Ⅱ期	24	5.57 ± 1.12	2.42	<0.05	2.34 ± 1.63	-2.63	<0.05
Ⅲ、Ⅳ期	34	4.83 ± 1.16			4.43 ± 3.65		

2.2 SSCP 检测 p73 基因突变

1 例鼻咽癌组织出现 p73 基因 PCR 产物异常涌动带,突变率 1.72%;鼻咽炎组织未发现异常涌动带(图 2)。

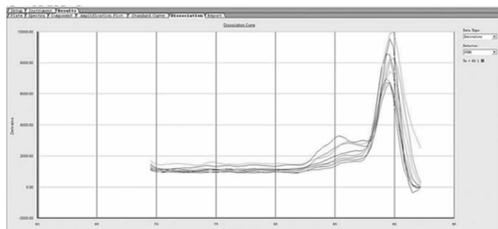


图 1 溶解曲线

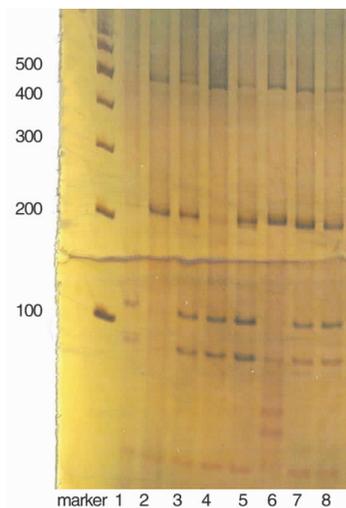


图 2 SSCP 检测 p73 基因突变

1, 2 为鼻咽炎组;3~8 为鼻咽癌组,其中样本 6 出现异常泳动带

3 讨论

p73 基因是近年发现的与 p53 基因同家族的新基因,其编码蛋白与 p53 极其相似,也可与 p53 的特殊结合位点相结合,激活其目的基因,导致细胞凋亡,被认为是一候选的抑癌基因。p73 基因在多种肿瘤组织中高表达^[3],在鼻咽癌发生发展中的作用尚不明确。本研究通过检测鼻咽癌与鼻咽炎组织中 p73 基因的表达及基因突变情况,以探讨 p73 基因在鼻咽癌发生发展中的作用。

本研究采用 RQ-RT-PCR 方法对 58 例鼻咽癌与 23 例鼻咽炎组织进行了 p73 基因表达水平的检测,鼻咽癌组织中 ΔCT 显著低于鼻咽炎组织 ($P < 0.01$), RQ 值显著高于慢性炎症组织 ($P < 0.01$),表明鼻咽癌组织中 p73 基因的表达明显高于鼻咽炎组织。说明 p73 基因的过度表达在鼻咽癌发生发展中发挥了一定的作用。p73 基因的表达水平与鼻咽癌的临床分期有关, ΔCT 值Ⅲ、Ⅳ期低于Ⅰ、Ⅱ期 ($P < 0.05$), RQ 值Ⅲ、Ⅳ期高于Ⅰ、Ⅱ期 ($P < 0.05$)。这说明 p73 基因的异常表达可能参与了鼻咽癌的进展。Kaghad 等^[1]发现在健康人血细胞及神经母细胞瘤株中 p73 基因是单等位基因表达,而黄立军等^[4]在肺癌中发现癌组

织中 p73 基因多为双等位基因表达,推测其等位基因可能在肿瘤发生中起作用。吴建农等^[5]检测 35 例鼻咽癌和癌旁组织中 p73 基因的表达,其在鼻咽癌组织表达明显高于癌旁组织,等位基因表达分析示 p73 基因在 14 例杂合性鼻咽癌标本中检出 10 例存在 G/C: A/T 双等位基因表达,在癌旁组织中皆为 G/C 表达,未见 A/T 表达。Tokuchi 等^[6]用半定量 RT-PCR 法检测 60 例原发性肺癌和正常组织中 p73 的表达,发现 87% (52/60) 的肿瘤组织比正常肺组织的 p73 表达高 2 倍,用 Southern 印迹分析 3 例典型病例,未见 p73 扩增,认为 p73 过度表达不是由于基因扩增所致。鼻咽癌组织中 p73 mRNA 高水平表达,鼻咽癌组织中 p73 基因表达增高的原因可能有两种:一是鼻咽癌发生过程中 p73 基因的改变或促进 p73 基因表达的因子激活;二是 p73 沉默的等位基因的表达激活。

目前有限的研究表明,p73 基因极少突变。吴建农等^[5]运用 SSCP 技术检测 35 例鼻咽癌和癌旁组织,未发现 p73 基因突变。Ichimiya 等^[7]检测原发神经母细胞瘤 p73 基因表达与突变,用 PCR-SSCP 法分析 140 例神经母细胞瘤患者中有 2 例出现错义突变。本研究 SSCP 检测发现 1 例鼻咽癌组织出现 p73 基因 PCR 产物异常涌动带(突变率 1.72%),鼻咽炎组织未发现异常涌动带。研究证实鼻咽癌组织 p73 存在极低水平的突变,基因突变不一定是 p73 基因影响鼻咽癌发展的主要因素。

已有文献阐明 p53 发挥肿瘤抑制作用基于:①其特殊 DNA 结合序列 p53 应答因子(p53-responsive elements:p53 REs)。②转录激活目的基因表达特殊的细胞周期控制蛋白,p21、MDM2、GADD45、14-3-3。③细胞凋亡调节物,PIG3、Bcl2、Bax、Puma、NOXA^[8]。全长的 p73 基因(TAp73)能够发挥野生 p53 类似的功能,其机制在于带有转录激活域(TA)的 p73 异构体能够与 p53 Res 的 DNA 区结合激活目的基因转录,诱导细胞周期阻滞或者凋亡^[8,9]。ΔNp73(去氨基端的异构体,缺失转录激活域 TA)

则发挥相反功能^[10]。推测鼻咽癌组织中 p73 以其异构体 ΔNp73 发挥主导作用,抑制鼻咽癌细胞周期阻滞或者凋亡。

总之,运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应技术(RQ-RT-PCR)测试鼻咽癌和鼻咽炎组织 p73 基因的表达;单链构象多态性分析技术(SSCP)检测 p73 基因的突变情况,提示 p73 在鼻咽癌组织中基因和蛋白高度表达,并伴随鼻咽癌发展表达增强;p73 基因存在低水平突变。本研究认为,p73 基因在鼻咽癌的发生、发展过程中行使重要的功能,可能以其异构体 ΔNp73 形式发挥促癌作用。

参考文献:

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [J]. *Cell*, 1997, 90(4): 809-819.
- [2] Melino G, Bernassola F, Ranalli M, et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8076-8083.
- [3] Alsafadi S, Tourpin S, André F, et al. P53 Family: At the Crossroads in Cancer Therapy [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16(32): 4328-4344.
- [4] 黄立军,王云杰,崔大祥,等. p73 基因在肺癌组织中的表达 [J]. *癌症*, 2001, 20(1): 49-52.
- [5] 吴建农,刘敏,李清,等. p73 基因在鼻咽癌及癌旁组织中的表达及突变 [J]. *江苏医药*, 2008, 34(3): 245-247.
- [6] Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, et al. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(10): 1623-1629.
- [7] Ichimiya S, Nakagawara A, Sakuma Y, et al. p73: structure and function [J]. *Pathol Int*, 2000, 50(8): 589-593.
- [8] Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 275-283.
- [9] Willis A C, Pipes T, Zhu J, et al. p73 can suppress the proliferation of cells that express mutant p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(35): 5481-5495.
- [10] Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers [J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(3): 182-191.

(修回日期:2011-04-29)