

· 基础研究 ·

Neuronatin 在人体常见肿瘤中的表达及对肿瘤细胞增殖的影响 *

郭朝平 李惠明 韦 芳 刘 阳 祝 峰 傅 强 王煜非 王慧萍[△]

(上海交通大学附属第一人民医院实验中心 上海 201620)

摘要 目的 研究印记基因 Neuronatin (NNAT) 在人体常见肿瘤中的表达情况及其两种编码产物 NNAT α 和 NNAT β 对肿瘤细胞增殖的影响。方法 运用组织芯片免疫组化技术对一些人体常见肿瘤及其对应正常组织中 NNAT 的表达进行系统检测,同时利用腺病毒载体技术,将 NNAT α 和 NNAT β 分别导入人结肠癌细胞系 SW620,并用实时细胞分析仪和平板克隆实验分析细胞增殖能力的变化。结果 ①免疫组化结果显示 NNAT 在食道鳞癌,结肠腺癌,直肠腺癌,胰腺腺癌,乳腺非特殊性浸润性导管癌,宫颈鳞癌,子宫内膜癌,膀胱移行上皮癌,肺鳞癌,皮肤鳞癌以及前列腺腺癌 11 种肿瘤组织,肾上腺,皮肤,睾丸,脑,骨骼肌,胰腺 6 种正常人体组织,以及慢性结肠黏膜炎与慢性肝炎 2 种炎症组织中呈阳性。②体外细胞增殖实验结果显示,NNAT α 对人结肠癌肿瘤细胞增殖有一定的抑制作用。结论 NNAT 基因在多种人体肿瘤组织中表达,其 α 片段的表达对于结肠癌细胞系 SW620 增殖具有轻微抑制作用。

关键词 Neuronatin 肿瘤 组织芯片 增殖抑制

中图分类号 R730.22 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 18-3401-06

The Expression of Neuronatin in Common Tumor and its Effect on Proliferation of Tumor Cell*

WU Zhao-ping, LI Hui-ming, WEI Fang, LIU Yang, ZHU Feng, FU Qiang, WANG Yu-fei, WANG Hui-ping[△]

(Experimental Central, First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201620, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the Neuronatin (NNAT) expression in varied common human tumor tissue, and the effect of α and β fragments of NNAT gene on proliferation of tumor cell. **Methods:** Issue microarray technology and immunohistochemistry were used. And adenoviral vector carrying α and β fragments of NNAT gene were employed with clone formation experiment and real time cell analyser. **Results:** NNAT express in 11 kinds of tumor, which include esophageal squamous carcinoma, colon adenocarcinoma, rectal adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, specificity of infiltrating ductal carcinoma, cervical squamous cell carcinoma, endometrial carcinoma, transitional cell carcinoma of bladder, lung squamous carcinoma, skin squamous carcinoma and prostate adenocarcinoma, 6 kinds of normal tissue include adrenal, skin, testis, brain and skeletal muscle, pancreas and 2 kinds of chronic inflammatory tissue, colitis and hepatitis tissue. In vitro, experiment results show that α fragment of NNAT suppress slightly the proliferation of tumor cell. **Conclusion:** NNAT express in many humor, and NNAT α suppress the colon tumor cell line SW620 cell's proliferation slightly.

Key words: Neuronatin; Tumor; Tissue microarray; Proliferation suppression

Chinese Library Classification: R730.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 18-3401-06

前言

Neuronatin (NNAT) 是一个父本来源的印记基因 (imprinted gene), 全长 3973bp, 含有三个外显子和两个内含子^[1]。它的 mRNA 有 α 和 β 两种剪切形式, 具有相同的开放阅读框, 前者编码 81 个氨基酸, 后者编码 54 个氨基酸, 两者的差别在于 β 形式缺少中间的一个外显子^[2]。

NNAT 是一个具有促神经分化的作用的基因, 在机体胚胎期以及出生后早期伴随着神经发育而大量表达, 但在成熟机体中仅在垂体前叶^[3]和皮肤组织有较高表达^[4]。由于肿瘤的发生发展与细胞分化受阻有关, 因此 NNAT 与肿瘤之间的关系越来

越受到研究人员的关注。目前不仅已发现 NNAT 在成神经管细胞瘤^[5], 成神经细胞瘤^[6], 肺癌^[7], 脂肪瘤^[8], 以及皮肤癌^[4]组织中表达, 而且有研究认为白血病的发生与 NNAT 基因过甲基化有着一定的关系^[9]。而 NNAT 对于肿瘤细胞增殖的影响目前还存在争论: 报道显示 NNAT 对于成神经管细胞瘤细胞的增殖起促进作用^[5], 而对垂体腺瘤^[10]与非小细胞肺癌细胞^[8]起抑制作用。

为了更系统的研究 NNAT 在肿瘤中的表达情况, 本研究中我们利用组织芯片技术, 对 NNAT 在一些人体常见肿瘤及其对应正常组织的表达进行系统检测, 同时利用腺病毒载体技术研究其两种不同的剪切片段 NNAT α 和 NNAT β 对于结肠

* 基金项目 国家自然科学基金项目(面上项目 30672440); 上海市自然科学基金资助项目 (09ZR1425000)

作者简介 郭朝平 (1984), 男, 上海交通大学医学院硕士研究生, 主要研究方向 肿瘤的发病机制及肿瘤的基因治疗

[△]通讯作者 王慧萍, Tel: 021-37798756, E-mail: tywhp9618@msn.com

(收稿日期 2012-03-10 接受日期 2012-04-05)

癌细胞系 SW620 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要试剂 兔抗人 NNAT 单克隆抗体 (抗 NNAT α 与 NNAT β 两种编码蛋白) (ab30332) 购置于 Abcam 公司, EnVisionTM 羊抗兔即用型抗体(KC-RB-035)为上海康城公司产品。腺病毒包装系统 AdMax 购于加拿大 Microbix 公司, Trizol 购于美国 Invitrogen 公司, Reverse Transcription System (A3500) 试剂盒和 SYBR@Green I (DRR041A) 试剂盒分别购置于 Promega 和 TaKaRa 公司。实时细胞分析仪为罗氏公司产品, PCR 仪 (CFD3220) 与凝胶成像仪 (Universal Hood II) 均为 Bio-Rad 公司产品。

1.1.2 组织标本 人体常见肿瘤组织芯片购置于西安奥美生物科技有限公司, 芯片包含脑, 食道, 胃, 肝脏, 结肠, 直肠, 肺, 膀胱, 心脏, 肾脏, 甲状腺, 胰腺, 宫颈, 皮肤, 乳腺, 卵巢, 前列腺以及睾丸 18 种组织的常见肿瘤标本各 3 例, 共 54 个标本均来自于西安奥美生物科技有限公司标本库。人体正常组织芯片与生殖系统肿瘤芯片购置于上海芯超生物科技有限公司。其中人体正常组织芯片包含肾上腺 (4), 大脑 (2), 小脑 (2), 直肠 (2), 结肠 (2), 小肠 (4), 胃 (4), 肾脏 (4), 肝脏 (4), 肺 (4), 胰脏 (4), 卵巢 (4), 睾丸 (4), 前列腺 (4), 子宫 (4), 甲状腺 (4), 骨骼肌 (4), 皮肤 (4), 心脏 (2) 以及脾脏 (3) 20 个不同组织共 69 个样本。生殖系统肿瘤芯片包含前列腺癌 (10), 乳腺癌 (7), 卵巢癌 (7), 子宫肿瘤 (7), 4 种不同组织肿瘤共 31 个肿瘤样本, 每个肿瘤样本配以相应的癌旁组织, 共 62 个点。癌旁组织中, 前列腺为结节性增生组织, 其它均为正常组织。其标本均来自上海芯超生物科技有限公司。肿瘤均取自中央非坏死部位, 标本取出后迅速以中性甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋保存。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制作 人体常见肿瘤组织芯片由西安奥美生物科技有限公司制备。人体正常组织芯片与生殖系统肿瘤组织芯片由生物芯片上海国家工程研究中心, 上海芯超生物科技有限公司制备。所有供体组织蜡块常规病理切片后进行 HE 染色, 由病理专家做二次诊断, 并在 HE 上根据典型病理部位做标记。阵列制作: 应用组织芯片制作仪 (Beecher Instruments 公司) 在受体蜡块 (空白蜡块) 上打孔 (2.0 mm), 然后根据 HE 切片上标记的典型病理部位在供体组织蜡块的相应位置获取所需组织芯, 放入受体蜡块阵列孔中, 并记录组织编号。重复上述步骤制成 3 块阵列块 (54 点, 69 点和 62 点)。切片机 (德国 Leica 公司) 以 4 μ m 厚度连续切片, 制成组织芯片切片, 所得组织芯片的每个点均经过病理诊断。

1.2.2 免疫组化染色 采用 EnVision 二步法行免疫组化染色: 100%二甲苯脱蜡 2 次, 每次 10 min 梯度乙醇水化: 100%乙醇 2 次, 95%乙醇 1 次, 75%乙醇 1 次, 每次 5 min 柠檬酸微波修复 15 min; 一抗兔抗人 NNAT 单克隆抗体 1:200 稀释, 37 $^{\circ}$ 孵育 2 h, 二抗羊抗兔即用型抗体室温孵育 45 min, DAB 镜下染色, 苏木素复染, 盐酸酒精分化。结果判断: 以细胞中质出现黄色或棕色染色视为表达阳性。

1.2.3 病毒载体的构建及功能鉴定 分别将编码 NNAT α 和

NNAT β 的片段插入到腺病毒穿梭质粒 pDC315 多克隆位点处产生质粒 pDC315-NNAT α 和 pDC315-NNAT β 将增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence, EGFP) 完整表达框 (包括 CMV 启动子, EGFP 编码序列, SV40 polyA 尾) 插入到腺病毒骨架质粒 pBHGlox Δ E1,3 Cre 的 E3 区, 产生质粒 pBHGlox Δ E1,3 Cre-EGFP 最后分别将腺病毒骨架质粒 pBHGlox Δ E1,3 Cre-EGFP 和腺病毒穿梭质粒 pDC315-NNAT α , pDC315-NNAT β 或 pDC315 共转染腺病毒包装细胞 HEK293, 在 HEK293 中同源重组后获得 3 种 5 型复制缺陷型腺病毒, 分别命名为 AdNNAT α , AdNNAT β 和 AdGFP。扩增病毒并用空斑法测定病毒滴度备用。分别用上述三种病毒 10MOI 感染人结肠癌细胞系 SW620 细胞, 以无病毒感染的细胞作为空白对照, 于感染后 24 小时按 Trizol 法分别提取 4 组细胞总 RNA, 并按照说明书步骤进行逆转录, 然后以 cDNA 为模板进行 NNAT 基因扩增, 上游引物 5'-tcacggcgtgtacatctt-3', 下游引物 5'-cgtgtatgccagcttctg-3', 扩增条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2min, 变性 94 $^{\circ}$ C 10s, 退火 64 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 20s, 30 个循环。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测产物做功能鉴定。

1.2.4 细胞培养 人结肠癌细胞系 SW620 购置于中科院细胞库。培养液为含 10%小牛血清的 L-15 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养, 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.5 细胞增殖实验 SW620 消化后以 5×10^3 /孔铺种于实时细胞增殖检测仪专用的细胞培养孔板 (每个孔面积与 96 孔板的培养孔面积相当), 共铺种 12 孔。约 24 小时后 AdNNAT α 、AdNNAT β 和 AdGFP 三种病毒均以及 5×10^4 PFU/孔的病毒量感染细胞, 每种病毒感染 4 个复孔, 培养细胞直至其停止增殖。整个实验中细胞的增殖情况过程通过实时细胞分析仪对细胞活力的检测记录。

1.2.6 平板克隆实验 SW620 分别在感染 AdNNAT α 、AdNNAT β 和 AdGFP 三种病毒 24 小时后消化计数, 以 100 个/孔铺种于 24 孔板, 每个病毒组设 4 个复孔。培养大约 2 周至肉眼观察到克隆, 中性福尔马林固定后苏木素染色, 显微镜下克隆计数 (细胞数大于 50 为一个克隆), 并计算克隆形成率 (克隆形成率 = 克隆数 / 细胞接种数 $\times$ 100%)。

1.3 统计学处理

用 SPSS16.0 统计学软件进行数据分析, 采用单因素方差分析法检验三组细胞克隆形成的组间差异。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 组织芯片的免疫组化实验

2.1.1 NNAT 在人体常见肿瘤中的表达情况 在 18 种不同人体组织的常见肿瘤中, 9 种组织的肿瘤与 NNAT 抗体反应呈阳性 (表 1, 图 1)。这 9 种肿瘤为食管鳞癌 3/3, 结肠腺癌 1/3, 直肠腺癌 1/3, 胰腺腺癌 1/3, 肺鳞状细胞癌 1/3, 皮肤鳞状细胞癌 3/3, 膀胱泌尿上皮癌 2/3, 宫颈鳞癌 2/3, 乳腺非特殊性浸润性导管癌 1/3。

2.1.2 NNAT 在人体正常组织中的表达情况 在 20 个不同的正常人体组织中 (表 1, 图 2), 肾上腺 (3/4), 睾丸 (4/4), 皮肤 (4/4), 骨骼肌 (4/4) 脑 (4/4), 胰腺 (3/4) 6 种正常组织与 NNAT

抗体反应呈阳性,结肠 (1/1) 与肝脏(4/4)表达也呈阳性,但二者标本为炎性组织而非正常组织,其中结肠为结肠粘膜慢性炎症组织,肝脏为慢性肝炎组织。

2.1.3 NNAT 在生殖系统肿瘤与癌旁中的表达情况 在 5 种常

见的生殖系统肿瘤中 (表 2,图 3) ,其中前列腺腺癌 (3/10) 子宫颈鳞癌 (2/3) 和子宫内膜癌 (1/4) 3 种肿瘤组织与 NNAT 抗体呈阳性反应,而卵巢肿瘤与乳腺癌均为阴性。所有的癌旁组织标本表达均未发现表达阳性病例。

表 1 人体常见肿瘤组织与正常人体组织的 NNAT 免疫组化实验结果

Table 1 Immunohistochemistry for NNAT in human common tumor tissue microarray and normal human tissue microarray

Organization	Tumor microarray		Normal tissue microarray	
	Specimen quantity	Positive samples	Specimen Quantity	Positive samples
Esophagus	3	3 ^a	0	0
Stomach	3	0	4	0
Colon	3	1 ^a	2	1 ^b
Rectum	3	1 ^a	2	0
Liver	3	0	4	4 ^c
Pancreas	3	1 ^a	4	3
Galactophore	3	1 ^a	0	0
Cervix	3	2 ^a	4	0
Ovary	3	0	4	0
Prostate	3	0	4	0
Testicle	3	0	4	4
Bladder	3	2 ^a	0	0
Kidney	3	0	4	0
Throid gland	3	0	4	0
Lung	3	1 ^a	4	0
Heart	3	0	4	0
Skin	3	3 ^a	4	0
Brain	3	0	4	4
Small intestine	0	0	4	0
Adrenal gland	0	0	4	3
Spleen	0	0	3	0
Skeletal muscle	0	0	4	4

Nota: a, The positive tumor tissue are esophageal squamous carcinoma, colon adenocarcinoma, rectal adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, Non specificity of infiltrating ductal carcinoma, cervical squamous cell carcinoma, transitional cell carcinoma of bladder, lung squamous carcinoma, and skin squamous carcinoma; b, Chronic clolitis tissue; c, Chronic hepatipic tissue.

表 2 生殖系统肿瘤的 NNAT 免疫组化实验结果

Table 2 Immunohistochemistry for NNAT in reproductive system neoplasm microarray

Organization	Tumor tissue		Adjacent tissue	
	Specimen quantity	Positive samples	Specimen quantity	Positive samples
Prostate adenocarcinoma	10	3	10 ^b	0
Non specificity of infiltrating ductal carcinoma	7	0	7	0
Ovarian carcinoma	7	0	7	0
Cervical squamous carcinoma	3	1	3	0
Endometrial carcinoma	4	2	4	0

Note: a. Ovarian carcinoma included ovarian adenocarcinoma (3 samples), ovarian papillary serous cystadenocarcinoma (2 samples), ovarian serous papillary adenocarcinoma(1 sample), ovarian dysgerminoma (1 sample). b. Benign prostate hyperplasia.

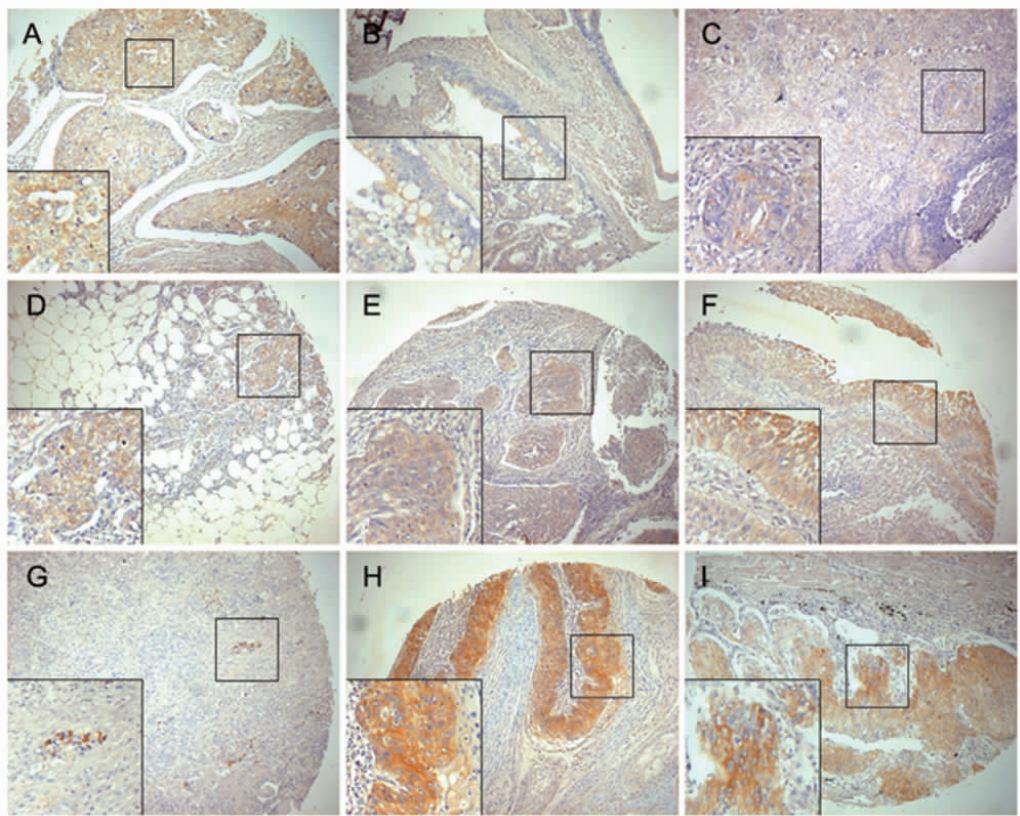


图1 人体常见肿瘤组织芯片中 NNAT 免疫组化染色呈阳性的肿瘤组织 :A.食道鳞癌 B.结肠腺癌 C.直肠腺癌 D.非特异性浸润性乳腺癌 E.宫颈鳞癌 F.膀胱移行上皮癌 G.胰腺腺癌 H.皮肤鳞癌 J.肺鳞癌。(免疫组化 Envision 二步法,× 100)

Fig.1 Micrographes of NNAT positive tumor tissues in human common tumor tissue microarray: A. esophageal squamous carcinoma, B. colon adenocarcinoma, C. rectal adenocarcinoma D. non specificity of infiltrating ductal carcinoma, E. cervical squamous cell carcinoma, F. transitional cell carcinoma of bladder, G. pancreatic adenocarcinoma, H. skin squamous carcinoma, J. lung squamous carcinoma. (Elivision™ two-step immunohistochemical method,× 100)

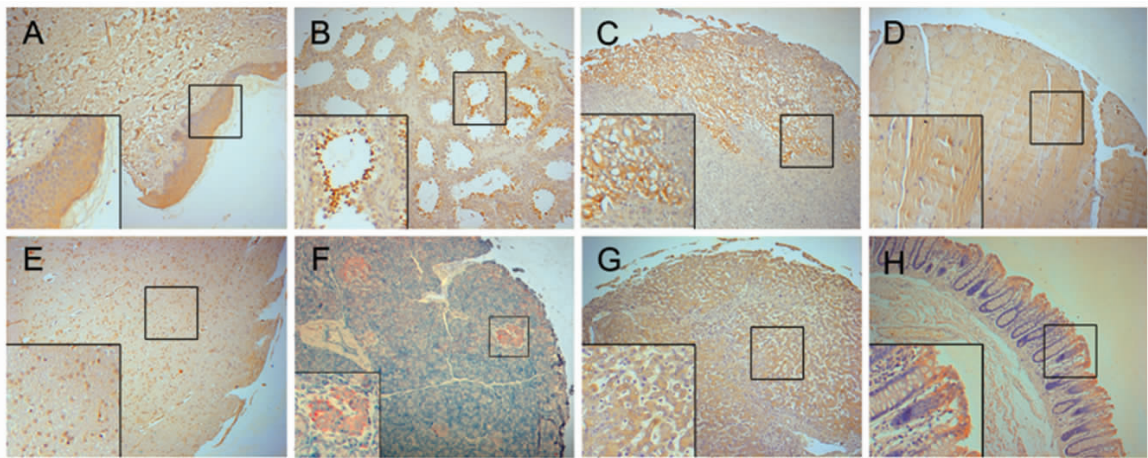


图2 人体正常组织芯片中 NNAT 表达阳性的组织 :A.皮肤 B.睾丸 C.肾上腺 D.骨骼肌 E.脑 F.胰脏 G.肝脏 H.结肠。G.为慢性肝炎组织 H.结肠粘膜慢性炎症组织。(免疫组化 Envision 二步法,× 100)

Fig.2 Micrographes of NNAT positive tumor tissue in normal human tissue microarray: A.skin, B.testicle, C.adrenal gland, D. skeletal muscle, E. brain F. pancreas, G. chronic hepatic tissue, H.chronic colitis tissue. (Elivision™ two-step immunohistochemical method,× 100)

2.2 病毒载体功能的 PCR 鉴定

凝胶成像结果显示 (图 4),AdNNAT α 组 PCR 产物条带在 100-250bp 之间,AdNNAT β 组 PCR 产物条带位置靠近但小于 100bp, 与理论上大小相符 (NNAT α 为 152bp,NNAT β 为 71bp),证明 AdNNAT α 和 AdNNAT β 感染的两组 SW620 细胞

能分别转录 NNAT α 和 NNAT β 两种不同形式的基因片段,而空白病毒对照组 AdGFP 与无病毒空白对照组 SW620 细胞均无 NNAT 基因转录。结果不仅证明 AdNNAT α 和 AdNNAT β 能够成功将 NNAT α 和 NNAT β 两种基因转导入 SW620 细胞,而且证明 SW620 细胞自身不表达 NNAT 基因。

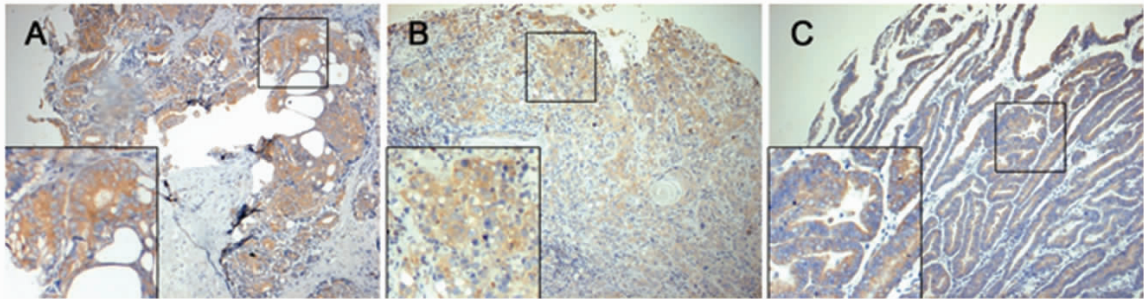


图 3 生殖系统肿瘤中 NNAT 表达阳性的组织 :A.前列腺腺癌 B.子宫鳞状细胞癌 C.子宫内膜癌。(免疫组化 Envision 二步法,× 100)

Fig.3 Micrographes of positive tumor tissue in human reproductive system tumor tissue microarray: A. prostate adenocarcinoma, B. cervical squamous carcinoma, C. endometrial carcinoma. (Elivision™ two-step immunohistochemical method, × 100)

2.3 细胞增殖实验

通过实时细胞分析仪检测数据可以看出(图 5),在病毒感染之前,3 组代表细胞增殖能力的指标——细胞指数数值基本一致,而在病毒感染之后,各组的细胞指数数值差别逐渐增大,其中 AdNNATβ 和 AdGFP 组细胞指数较为接近,而 AdNNATα 组细胞指数数值较前两组增长明显缓慢,3 组细胞均在铺板后 90 小时进入增殖平台期。可以看出,AdNNATα 组细胞增

殖有被抑制的趋势。

2.4 平板克隆实验

于细胞分板接种后两周固定、染色并在显微镜下计数 3 组细胞克隆数(图 6),计算其克隆形成率,AdNNATα、AdNNATβ 和 AdGFP 组分别为 (72.5± 4.4) % , (86.5± 1.2) % , (89.75± 2.7) %。其中 AdNNATα 感染组相比较 AdNNATβ 和 AdGFP 组克隆数明显较低且具有统计学意义(F=34.86,P=0.00<0.05)。

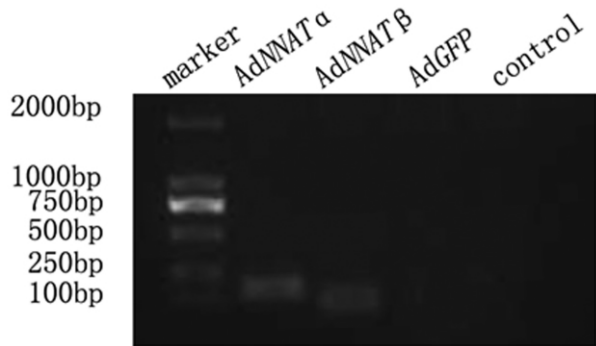


图 4 组 SW620RT-P CR 的 DNA 凝胶成像照片

Fig.4 DNA electropherogram of RT-PCR for four groups of SW620 cell

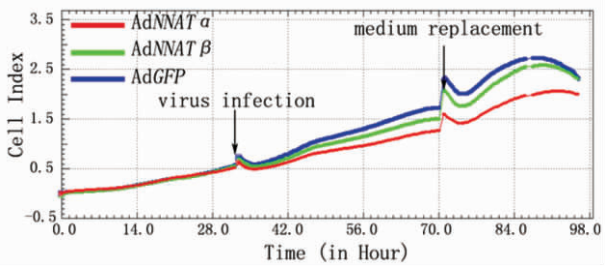


图 5 实时细胞仪所记录的 3 组 SW620 细胞生长曲线

Fig.5 The curve of SW620 cells' proliferation which was infected with three kind of adenovirus.

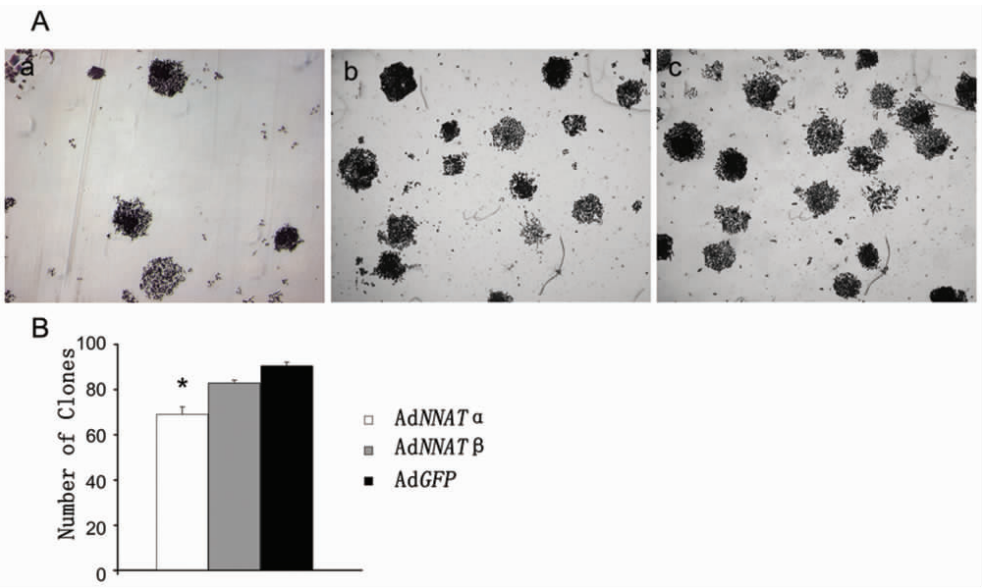


图 6 克隆形成实验结果 :A. 平板克隆实验的孔板照片。图 a,b,c 分别是 AdNNATα、AdNNATβ 和 AdGFP 组的克隆显微照片(× 100)。B.平板克隆形成实验直方图。相对于 AdGFP 组,NNATα 组细胞克隆形成的抑制达 35%(P<0.05)

Fig.6 Analysis of the plate clone formation assay. A. The micrographs of clone formation. Picture a,b,c were groups of AdNNATα, AdNNATβ and AdGFP(× 100). B. The histogram analysis of the plate clone formation assay. The group of AdNNATα is significant low than other groups (P<0.05)

3 讨论

组织芯片的免疫组化实验结果显示,20 种不同肿瘤组织中 11 种肿瘤组织表达呈阳性,它们分别是食道鳞癌,结肠腺癌,直肠腺癌,胰腺腺癌,肺鳞癌,皮肤鳞癌,膀胱移行上皮癌,前列腺腺癌,乳腺非特殊性浸润性导管癌,宫颈鳞癌以及子宫内膜癌。其中肺鳞癌在 Teruhito Uchihara 等人的研究中有过报道^[11]。而 Long Dugu 等发现 NNAT 在皮肤正常组织中的鳞状上皮基底,汗腺,皮脂腺等腺体以及病变组织如佩吉特病、皮脂腺增生、汗管瘤以及皮脂腺腺癌等中表达^[4]。但没有关于 NNAT 在皮肤鳞状细胞癌中报道。本实验中 2 例皮肤鳞状细胞标本皆表达强阳性,而 1 例皮肤皮脂腺癌表达为阴性。虽然有过关于 NNAT 基因表达与胰腺 β 细胞分泌相关的报道^[12],但是没有其在正常胰腺组织以及胰腺癌中表达的报道。NNAT 在食道鳞癌,结肠腺癌,直肠腺癌,胰腺腺癌,皮肤鳞癌,膀胱移行上皮癌,前列腺腺癌,乳腺非特殊性浸润性导管癌,宫颈鳞癌以及子宫内膜癌 10 种肿瘤中的表达先前没有相关报道。

正常组织中,肾上腺,皮肤,睾丸,脑,骨骼肌,胰腺 NNAT 表达呈阳性,其中 NNAT 在皮肤,脑组织中的表达有过报道^[3],而在其它 4 种组织中的表达均未见报道。NNAT 在肾上腺和胰腺组织中表达,可能与其神经性和内分泌性有关。而在睾丸内,NNAT 表达于生精小管内的精子细胞,可能与精子细胞的原始性有关。此外,慢性结肠黏膜炎组织与慢性肝炎组织中 NNAT 表达也呈阳性,说明该基因与炎症存在一定关系,这与 Nino Mzhavia 的实验结论有一定程度的相似^[13]。

从整个组织芯片免疫组化结果来看,NNAT 在绝大部分正常成人组织中不表达,而倾向于在肿瘤组织中表达,这可能与肿瘤细胞是一类分化异常细胞,而 NNAT 基因具有早期促分化作用有关。我们推测肿瘤细胞的异常分化可能通过体内某些机制使 NNAT 基因的表达重新开启,NNAT 在肿瘤细胞中表达,可能具有抑制肿瘤细胞增殖、促进分化的作用。体外实时细胞增殖检测以及细胞克隆形成试验显示,NNAT α 片段对人结肠癌细胞系 SW620 有一定抑制作用,这一结果在一定程度上验证了我们的推测。从先前关于 NNAT 在肿瘤中表达的情况来看,NNAT 表达于鳞癌或腺癌的倾向性不够明确。在非小细胞肺癌的研究中,NNAT 在鳞癌中的表达率比腺癌高^[14],而其它有关 NNAT 的研究报道均为在腺癌中表达。我们的实验结果显示,NNAT 倾向于在鳞癌中表达。其在食管鳞癌 (3/3),宫颈鳞癌 (2/3),肺鳞癌 (1/3) 以及皮肤鳞癌 (2/2) 4 种鳞癌中表达的比例要比在结肠腺癌 (1/3),直肠腺癌 (1/3),胰腺腺癌 (1/3) 前列腺腺癌 (3/13) 4 种腺癌中要高。并且鳞癌中的 NNAT 表达强度也要比腺癌中高。

本研究新发现 NNAT 在 10 种肿瘤组织,4 种正常组织,以及 2 种炎症组织中表达,并证明 NNAT 基因 α 片段对结肠癌

肿瘤细胞增殖有一定的抑制效果,但对于 NNAT 的表达与肿瘤之间明确的关系,以及 NNAT 基因表达作用于肿瘤细胞的机制都有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Tani F, Kuroiwa Y, Wakana S, et al. Pe95/Neuronatin is an imprinted gene located on sub-distal chromosome 2 in the mouse [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3428-3432
- [2] Joseph R, Dou D, Tsang W. Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene [J]. Brain Res, 1995, 690:92-98
- [3] Usui H, Morii K, Tanaka R, et al. cDNA Cloning and mRNA Expression Analysis of the Human Neuronatin [J]. Mol Neurosci, 1997, 9(1): 55-60
- [4] Dugu L, Takahara M, Tsuji G. Abundant expression of neuronatin in normal eccrine, apocrine and sebaceous glands and their neoplasms [J]. Dermatol, 2010, 37(9):846-848
- [5] Siu IM, Bai R, Gallia GL. Coexpression of neuronatin splice forms promotes medulloblastoma growth [J]. Neuro Oncol, 2008, 10(5): 716-724
- [6] Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, et al. High Expressions of Neuronatin Isoforms in Favorable Neuroblastoma [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2007, 29(8):551-556
- [7] Zhong S, Fields CR, Su N, et al. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer [J]. Oncogene, 2007,26(18):2621-2634
- [8] Thelin-JSanum S, Lassen C, Panagopoulos I, et al. Identification of genes differentially expressed in TLS-CHOP carrying myxoid liposarcomas [J]. Int J Cancer, 1999, 83(1):30-33
- [9] Kuerbitz SJ, Pahys J, Wilson A, Compitello N, Gray TA. Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(4):559-564
- [10] Revill K, Dudley KJ, Clayton RN. Loss of neuronatin expression is associated with promoter hypermethylation in pituitary adenoma [J]. Endocr Relat Cancer, 2009, 16(2):537-548
- [11] Okubo C, Minami Y, Tanaka R, et al. Analysis of Differentially Expressed Genes in Neuroendocrine Carcinomas of the Lung [J]. Thorac Oncol, 2006, 1(8):780-786
- [12] Joe MK, Lee HJ, Suh YH, et al. Crucial roles of neuronatin in insulin secretion and high glucose-induced apoptosis in pancreatic beta-cells [J]. Cell Signal, 2008, 20(5):907-915
- [13] Mzhavia N, Yu S, Ikeda S, et al. Neuronatin: A New Inflammation Gene Expressed on the Aortic Endothelium of Diabetic Mice [J]. Diabetes, 2008, 57(10):2774-2783
- [14] Uchihara T, Okubo C, Tanaka R, et al. Neuronatin expression and its clinicopathological significance in pulmonary non-small cell carcinoma [J]. Thorac Oncol, 2007, 2(9): 796-801