

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01004

NR4A2 基因及其选择性剪接异构体与胃癌发生及转移的关系

刘小康¹, 林丽萍², 常文军², 顾立强¹, 曹广文^{2*}, 马立业^{1*}

- 1. 第二军医大学长海医院普外一科, 上海 200433
- 2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**检测胃癌中 NR4A2(又称 Nurr1)基因的表达,从 NR4A2 调控机制出发寻找相关选择性剪接异构体,探讨其与胃癌发生和转移的关系。**方法:**通过选择性剪接数据库(ASD)预测 NR4A2 基因可能存在的选择性剪接异构体,半定量 PCR 检测 NR4A2 及异构体的表达,基因测序技术鉴定新的剪接异构体;实时定量 PCR 检测 41 例样本中 NR4A2 及剪接异构体的表达水平;免疫组织化学方法检测 28 例样本中 NR4A2 蛋白表达。**结果:**NR4A2 基因在胃癌原位、癌旁、转移组织中均有表达,确定了 2 种剪接异构体 NR4A2-I 和 NR4A2-II。实时定量 PCR 检测 41 例样本中 NR4A2 及 2 种异构体在癌旁组织表达水平高于原位癌 ($P=0.017, P=0.007, P=0.004$);在肝转移灶中表达水平低于原位癌 ($P=0.001, P=0.018, P=0.016$),差异有统计学意义。免疫组化检测发现癌旁组织中 NR4A2 表达阳性率高于原位癌及转移灶,但差异无统计学意义 ($P=0.672$)。**结论:**胃癌原位、癌旁和转移组织中至少存在 NR4A2 基因的 2 种剪接模式;NR4A2 及异构体的表达变化与胃癌发生和转移相关。

[关键词] NR4A2;Nurr1;胃肿瘤;剪接异构体

[中图分类号] R 730.45 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1004-05

NR4A2 and its splicing variants contribute to tumorigenesis and metastasis of gastric cancer

LIU Xiao-kang¹, LIN Li-ping², CHANG Wen-jun², GU Li-qiang¹, CAO Guang-wen^{2*}, MA Li-ye^{1*}

- 1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of NR4A2(Nurr1) and its splicing variants in gastric cancer, and to evaluate their potential association with the pathogenesis and metastasis of gastric carcinoma. **Methods:** Alternative Splicing Database (ASD) was used to predict the possible splicing variants of NR4A2; they were identified by gene sequencing technique and their expression was detected by semi-quantitative PCR. The mRNA expression of NR4A2 and its splicing variants in tumor and the corresponding adjacent-tumor tissues ($n=41$) were determined by real-time PCR. Meanwhile, immunohistochemistry was employed to examine the protein levels of NR4A2 in the tumor tissues ($n=28$). **Results:** The expression of NR4A2 mRNA was observed in the primary tumor tissues, adjacent tumor tissues, and metastatic tissues. Two splicing variants of NR4A2 were discovered; NR4A2-I and NR4A2-II. The mRNA expression of NR4A2, NR4A2-I, and NR4A2-II in the adjacent-tumor tissue was significantly higher than that in the primary tumor tissue ($P=0.017, P=0.007, and P=0.004$), and that in the hepatic metastatic tissue was significantly lower than that in the primary tumor tissue ($P=0.001, P=0.018, P=0.016$). Meanwhile, immunohistochemistry showed that the positive rate of NR4A2 protein was higher in adjacent-tumor tissue than that in both tumor tissues and metastatic tissues, but with no significant differences. **Conclusion:** At least there are 2 splicing variants of NR4A2 in the gastric tumor, adjacent-tumor, and metastatic tissues; NR4A2 and the novel splicing variants may contribute to the pathogenesis and metastasis of gastric malignancy.

[KEY WORDS] NR4A2;Nurr1;gastric carcinoma;alternative splicing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1004-1008]

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,外科治疗是胃癌目前的主要治疗手段,术后复发及广泛转移是胃癌外科治疗最棘手的问题之一,早期诊断及早期手术是降低胃癌病死率的关键^[1]。研究胃癌的侵袭转

[收稿日期] 2009-02-19 **[接受日期]** 2009-06-01

[作者简介] 刘小康,硕士生,主治医师. E-mail: xiaokangdc@126.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel:021-81873337, E-mail: malydr@163.com; Tel:021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

移,对于提高胃癌患者生存率至关重要。本实验室前期应用胃癌手术标本进行了 cDNA 表达芯片分析(GEO:GSM253487 to GSM253498),结合生物信息学的方法预测了 NR4A2 基因与胃癌转移相关^[2]。NR4A2(又称 Nurr1)属于孤儿核受体,定位于染色体 2q22-23,以单拷贝形式存在,全长 8.3 kb,有 8 个外显子,7 个内含子^[3]。人类 NR4A2 基因结构高度保守,通过选择性剪接进行基因表达的调控^[4]。Ichinose 等^[5]发现 Nurr1 基因有 2 种剪接异构体:a 型编码产生 455 个氨基酸,作为不依赖于 Nurr1 配基的转录因子;b 型编码产生 580 个氨基酸。国内 Xu 等^[6]发现外显子 5 产生新的剪接亚型 Nurr1-c,编码产生 573 个氨基酸。选择性剪接是真核生物的一种基本而又重要的调控机制,它精细协调基因的功能,高效调节基因的定量表达以及蛋白功能的多样化。随着 NR4A2 的研究逐步深入,越来越多的证据表明 NR4A2 与肿瘤的关系密切^[7]。NR4A2 的选择性剪接在胃癌中的研究目前尚未见相关报道。本研究旨在探讨 NR4A2 及其选择性剪接异构体表达与胃癌发生和转移的关系。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选取第二军医大学长海医院普外一科 2006 年 12 月至 2008 年 9 月手术切除的胃癌标本 41 例,男性 31 例,女性 10 例,年龄 41~76(56.7±18.6)岁,所有患者术前均未行放化疗,所有样本均配对选取原位癌、癌旁正常组织及转移灶(淋巴结转移 33 例,肝转移 8 例)。离体新鲜组织标本液氮冷冻后于-80℃冰箱保存。全组肝转移 8 例(19.5%),淋巴结转移 33 例(80.5%)。中分化腺癌 12 例(29.3%),低分化腺癌 24 例(58.5%),黏液癌 5 例(12.2%)。

1.2 主要试剂 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;RNA 反转录试剂盒购自 Promega 公司;pMD18-T 载体(D101A)、rTaq DNA 聚合酶(R10T1)、SYBR premix Taq(perfect real-time)均购自 TaKaRa 公司,DH5 α 感受态细胞(CB101)购自北京天根生化科技有限公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自美国 AXYGEN 公司,兔抗人 NR4A2 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,EnVision 试剂盒购自丹麦 Dako 公司。实验室所用引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取及反转录 组织总 RNA 提取按 TRIzol 试剂说明书操作完成,用紫外分光光度计 UV7504 对所提取 RNA 进行纯度鉴定和定量。取 2 μ g RNA 为模板,按 Reverse-Transcription Sys-

tem 说明进行反转录。

1.4 生物信息学分析 采用 ASD 数据库对 NR4A2 基因可能存在的选择性剪接异构体进行预测,Primer Premier5.0 软件设计引物。

1.5 RT-PCR 及序列测定 分别以原位癌组织、癌旁组织及转移组织的反转录产物 1 μ l 作为模板,1 U rTaq DNA 聚合酶,5 μ l 10 \times PCR Reaction buffer,20 pmol 引物、25 nmol dNTP,总体积 50 μ l。反应程序为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 45 s,退火 45 s,72℃ 延伸 60 s,30~35 个循环;最后于 72℃ 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 25 min。溴化乙锭染色,UV 灯下观察。PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细菌,经氨苄青霉素 α 筛选,挑选单个克隆并培养,取 500 μ l 克隆菌液送北京天根生化科技有限公司测序。

1.6 SYBR Green I-real-time-PCR 选择 41 例配对胃癌组织样本(其中 8 例为肝转移灶),引物序列 NR4A2 (S-5'-GAG ATG ACA CCC AGC ATA TCC A-3', A-5'-CCT GTG CAA GAC CAC CCC ATT-3', 52℃), NR4A2-I (S-5'-GTT GGA GGA GAA TTC AAC-3', A-5'-CGA TTA GCA TAC AGG TCC-3', 49℃), NR4A2-II (S-5'-CCG AGT TAC AGG CGT TTT CGA GG-3', A-5'-CAG ACG CGG AGA ACT CCT AAG GA-3', 54℃), GAPDH 作为标准内参照引物。取 2 μ l RNA 为模板,反应体系:PCR MIX 10 μ l、水 6 μ l、引物 2 μ l、模板 2 μ l。采用 LightCycler[®] 480 PCR 仪进行实时荧光定量检测,PCR 条件为 95℃ 30 s 热启动,然后 95℃ 30 s,58℃ 退火 5 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,72℃ 单次检测荧光。PCR 反应完成后,进行熔解曲线分析,缓慢升温至 95℃,温度转换率为 0.11℃/s。

1.7 免疫组织化学染色 选择 28 对配对样本(包括胃癌原位组织、癌旁组织和转移灶),采用免疫组化 EnVision 二步法检测 NR4A2 蛋白表达。阳性判断标准:细胞核内有棕黄色颗粒为阳性细胞,每高倍镜视野阳性细胞数 $\geq 20\%$ 为(+), $\geq 75\%$ 为(++)。+~++ 均为阳性表达。

1.8 统计学处理 所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件包分析,对计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。为克服系统误差,real-time PCR 结果以单份标本检测值与内参的比值,经 log₂ 转换后表示基因的表达水平,绘制箱图显示上下调状态。*P*<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ASD 分析结果及引物序列 ASD 共预测出 5 种异构体(图 1),Primer Premier 5.0 软件设计各个剪接异构体的引物(表 1)。

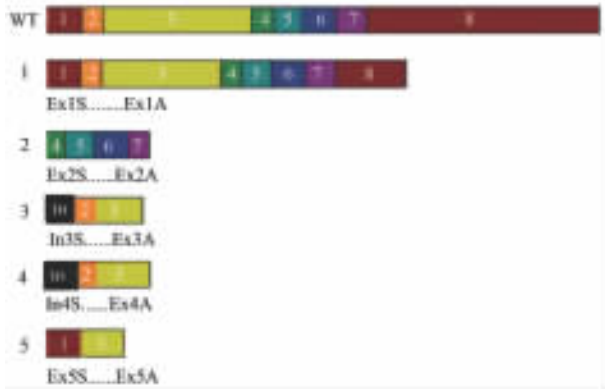


图 1 NR4A2 及 ASD 预测的 5 种异构体比例图示及引物设计区域

Fig 1 Proportion chart of wild-type(WT) NR4A2 and five NR4A2 splicing variants deduced by ASD

Different numbers indicate different exons;In indicates introns

表 1 引物序列和产物长度

Tab 1 Primer sequence and condition of PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Expected-PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)
NR4A2 (WT)	CACAGGTTGCAATGGCTTGG (Sense) TCAATTATTGCTGGCGGTGG (Antisense)	565	55
NR4A2-I	AACGGCTGTAAGTGG (Sense) AGTCCGSCATCATCTC (Antisense)	195	54
NR4A2-II	AAACCGAAGAGCCACAG (Sense) GCRCGAGAGCCAGAAATG (Antisense)	420	51.5
NR4A2-III	TTCTTCAGTTTATGGCTTGC (Sense) CGTAGCCTGTGCTGTAGTTS (Antisense)	495	55
NR4A2-IV	ATGCTGCTCTGGGTTTG (Sense) CCGASTTACAGCCGTTT (Antisense)	285	57
NR4A2-V	TCCGTGAGGTGTCCGGTTC (Sense) GTGCCAGTATTTCAGTGTCTG (Antisense)	274	59.5

2.2 RT-PCR 结果 将组织样本按原位癌、癌旁组织、淋巴结转移、肝脏转移配对,检测 NR4A2 及 5 种选择性剪接异构体表达,发现 NR4A2 在原位癌、癌旁及转移灶中均有表达(图 2)。由于引物上下游结合区域为缺失区域的两端,故 PCR 扩增结果为 2 条条带,即野生型与异构体,其中野生型条带为 505 bp。ASD 预测的异构体中 Ex2S/Ex2A、Ex5S/Ex5A 有表达,扩增的 PCR 产物片段与预测基本一致。

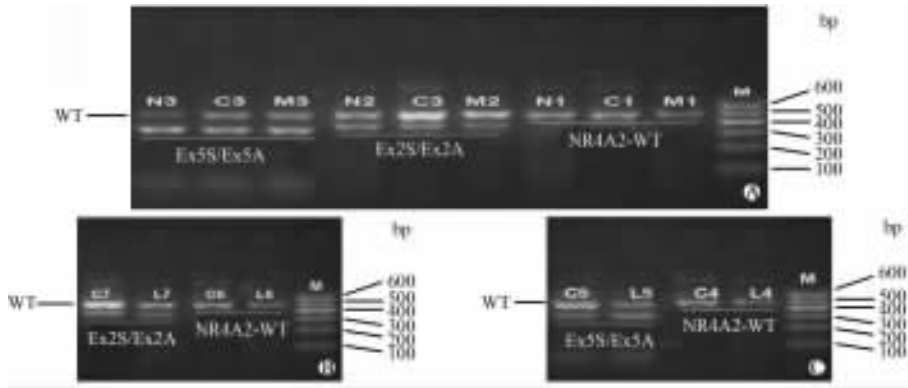


图 2 NR4A2 及 2 种异构体在胃癌中的表达

Fig 2 Expressions of NR4A2 and its splicing variants in gastric cancer tissues

A: The expressions of NR4A2(WT) and splicing variants in paired gastric cancer tissues; B: The expressions of NR4A2 and splicing variants Ex2S/ Ex2A in primary cancer tissues and liver metastatic tissue; C: The expressions of NR4A2 and splicing variants Ex5S/ Ex5A in primary cancer tissues and liver metastatic tissue (C1,C3-C7:Primary cancer tissues; N1-N3:Tumor-adjacent tissues; M1-M3:Lymph node metastasis; L4-L7:Liver metastasis; M:Marker)

2.3 剪接异构体的序列分析 将上述剪接异构体扩增的 PCR 产物片段进行测序分析,结果表明 Ex2S/Ex2A 扩增片段序列与 ASD 中提供的序列相同,如图 3 中显示 NR4A2 外显子 7 起始部位 54 bp 左右的碱基缺失,且该异构体不能由 DNA 污染产生,将该异构体命名为 NR4A2- I; Ex5S/Ex5A 扩增片段显示外显子 2 全部缺失,将该异构体命名为 NR4A2- II。

2.4 NR4A2 及其异构体在配对组织中的表达 实

时定量 PCR 检测发现 NR4A2、NR4A2- I 及 NR4A2- II 在 41 例癌旁组织中表达水平高于配对原位癌($P=0.017, P=0.007, P=0.01$);在 8 例胃癌肝转移样本中表达水平低于配对原位癌($P=0.001, P=0.004, P=0.016$)。图 4 中纵轴为上调或下调倍数的对数值,大于 0 表示上调,小于 0 表示下调,横轴代表所验证基因。每个箱图从上到下依次代表所测样本组变化倍数的 95%、75%、50%、25%和 5%分位数,上方圆圈为异常值。

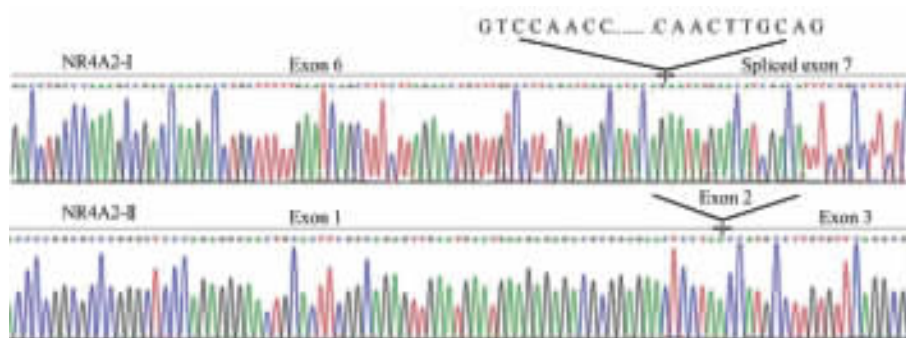


图 3 NR4A2- I 和 NR4A2- II 测序结果

Fig 3 Sequencing results of NR4A2 type I and type II

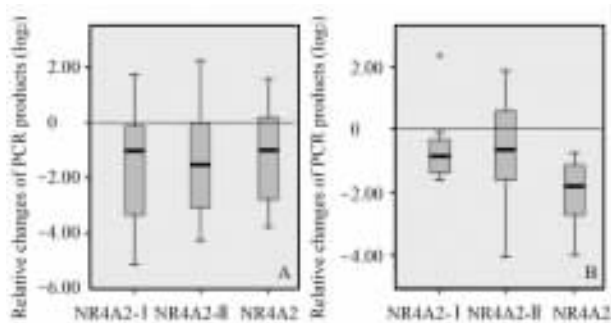


图 4 NR4A2 及 2 种异构体在原位癌(A)和肝转移灶(B)中的下调倍数

Fig 4 Down-regulation of NR4A2 and splicing variants in primary cancer(A) and hepatic metastatic focus(B)

A: n=41, $\bar{x} \pm s$; B: n=8, $\bar{x} \pm s$

2.5 NR4A2 蛋白在胃癌组织中的表达 NR4A2 蛋白在不同组织中的阳性表达如图 5 所示。按判定标准 NR4A2 在 28 例胃癌原位、癌旁组织、转移灶(其中 8 个肝转移灶)的阳性率分别为 40%、50%、33%，差异无统计学意义($\chi^2=1.543, P=0.672$)。

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特征,同时也是肿瘤治疗失败和患者死亡的主要原因。胃癌目前仍然以手术治疗为主,但术后复发是最棘手的问题之一。可能的原因是原位癌分泌一些抗肿瘤因子,切除原位癌后降低这些因子的产生,转移癌容易形成^[8]。研究肿瘤早期诊断分子标志物的策略是通过基因芯片



图 5 NR4A2 在不同组织中的表达

Fig 5 Examination of NR4A2 protein expression in different tissues of gastric carcinoma(EnVision)

A: Primary cancer tissues; B: Tumor-adjacent tissues; C: Lymph node metastasis; D: Liver metastasis. Original magnification: $\times 400$

方法从原位癌和癌旁正常组织中筛选差异表达基因,在肿瘤中高表达或低表达的基因及其产物就可能是肿瘤新的标志物。同时在肿瘤转移癌中高表达或低表达的基因在对应的原位癌中表达可呈现相似的表达谱^[9],提示应用肿瘤转移相关基因可以作为标志物指示肿瘤发生和转移。本实验室在 2007 年应用胃癌原发和转移灶手术标本 cDNA 表达芯片分析(GEO: GSM253487 to GSM253498),获得了 272 条原位胃癌和转移胃癌之间差异表达基因,其中下调表达 117 条,上调表达 95 条。我们利用共表达基

因往往具有相类似的生物学功能;蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)密切者至少分享一个主要生物学功能的原理^[10-11],利用生物信息学方法预测出胃癌转移相关新基因 NR4A2^[2]。

NR4A2(Nurr1)基因是类固醇/甲状腺激素孤儿核受体超家族成员,对中脑多巴胺能神经元的发育、存活和成熟后的表型维持发挥重要作用^[12]。近年来有研究发现 NR4A2 有促进细胞增殖或促凋亡的作用。Ke 等^[13]对 HeLa 细胞系的研究中发现,NR4A2 基因沉默,表达下调后促进细胞凋亡,具有一定的致

瘤性,可以作为恶性肿瘤治疗新的靶点。同样,Holla等^[14]在结直肠癌研究中发现,NR4A2参与COX-2通路起到促进肿瘤发展的作用。本研究通过对41例配对胃癌组织样本进行实时定量PCR检测发现,NR4A2基因表达下调胃癌的发生与转移相关。尽管蛋白表达未得出确切结论,但癌旁正常组织阳性率较高,其趋势与实时定量PCR结果。

选择性剪接是真核生物的一种基本而又重要的调控机制,现有资料表明,至少40%的人类基因存在选择性剪接^[15-16]。有研究显示许多情况下选择性剪接产生的亚型,其蛋白功能会发生明显改变,甚至产生拮抗作用,而肿瘤组织中的选择性剪接亚型的数量显著高于正常组织^[17-19],均提示异常的选择性剪接与肿瘤发生相关。Lu等^[20]报道cyclin D1基因经选择性剪接产生独特的异构体cyclin D1b,该异构体作为癌基因在许多食管癌细胞系及原发食管癌中表达。Lee等^[21]报道了肿瘤转移抑制基因KAI1的一种选择性剪接异构体,其抑制肿瘤转移的功能失活。

NR4A2基因结构高度保守,可通过选择性剪接进行基因表达的调控^[6-7]。本研究通过ASD数据库对NR4A2进行生物信息学分析,该数据库系统地收集了关于选择性剪接外显子、内含子方面的数据并给予注释,许多资源是从文献中收集获得,数据经实验室证明,具有很高的可信度。本次试验结果显示只有Ex2S/Ex2A、Ex5S/Ex5A有条带扩增,片段大小分别约为420 bp和274 bp,与ASD预测序列一致,条带经克隆测序,与预期相符。本研究中预测的几种异构体中仅有2种得到证实,可能是由于ASD收集了不同组织来源组织克隆文库的EST,预测结果并非针对胃癌,当然也不排除引物设计本身的问题。两种剪接异构体在胃癌不同组织样本中均有表达,实时定量PCR检测证实两种异构体表达下调胃癌的发生与转移相关。

综上,本研究通过对胃癌原位、癌旁、转移组织中NR4A2及其异构体表达水平的检测,发现其表达水平的变化与胃癌的发生及转移密切相关,就NR4A2而言,在消化道肿瘤方面的研究处于起步阶段,对于其功能调控而言,是否存在表观遗传学改变或者存在某种配体调控,仍需要进一步探索。

[参考文献]

- [1] Leung W K, Wu M S, Kakugawa Y, Kim J J, Yeoh K G, Goh K L, et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9: 279-287.
- [2] Chang W, Ma L, Lin L, Gu L, Liu X, Cai H, et al. Identification of novel hub genes associated with liver metastasis of gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009 Jun 30. [Epub ahead of print]
- [3] Torii T, Kawarai T, Nakamura S, Kawakami H. Organization of human orphan nuclear receptor Nurr1 gene[J]. *Gene*, 1999, 230: 225-232.
- [4] Le W D, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel S H, Smith R G, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 85-89.
- [5] Ichinose H, Ohye T, Suzuki T, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Hagino Y, et al. Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNA[J]. *Gene*, 1999, 230: 233-239.
- [6] Xu P Y, Le W D. Novel splicing variant of the human orphan nuclear receptor gene[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2004, 117: 899-902.
- [7] Li Q X, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F. NR4A1, 2, 3—an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis[J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21: 533-540.
- [8] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.
- [9] Ramaswamy S, Ross K N, Lander E S, Golub T R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 49-54.
- [10] Vazquez A, Flammini A, Maritan A, Vespignani A. Global protein function prediction from protein-protein interaction networks[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 697-700.
- [11] Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, De Smet F, et al. Gene prioritization through genomic data fusion[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 537-544.
- [12] Burbach J P, Smits S, Smidt M P. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 991: 61-68.
- [13] Ke N, Claassen G, Yu D H, Albers A, Fan W, Tan P, et al. Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 8208-8212.
- [14] Holla V R, Mann J R, Shi Q, DuBois R N. Prostaglandin E₂ regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2676-2682.
- [15] Ast G. How did alternative splicing evolve[J]? *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 773-782.
- [16] Cartegni L, Chew S L, Krainer A R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 285-298.
- [17] Xu Q, Lee C. Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences[J]. *Nucleic Acid Res*, 2003, 31: 5635-5643.
- [18] Matsushita K, Tomonaga T, Shimada H, Shioya A, Higashi M, Matsubara H, et al. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor in carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 1409-1417.
- [19] Garneau D, Revil T, Fiset J F, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 22641-22650.
- [20] Lu F, Gladden A B, Diehl J A. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 7056-7061.
- [21] Lee J H, Seo Y W, Park S R, Kim Y J, Kim K K. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 7247-7255.