

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00706

肾透明细胞癌组织中转录因子 19 基因选择性剪接异构体的类型和表达特点

钱 涛¹, 林丽萍³, 常文军², 曹廷虎¹, 徐兴兴², 杨印辉¹, 张宏伟², 侯建国^{1*}, 曹广文^{2*}

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433
3. 河北省邯郸市疾病预防控制中心, 邯郸 056008

[摘要] **目的** 探讨人肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是否存在与细胞生长调节相关的转录因子 19(TCF19)选择性剪接异构体, 探索其表达特点及其与 ccRCC 发生的关系。**方法** 通过选择性剪接数据库(alternative Splicing Database, ASD)对 TCF19 基因可能存在的选择性剪接异构体种类进行预测。设计可能存在的 5 种异构体引物, 采用 RT-PCR 技术, 在 32 例原发肾透明细胞癌的混合样本及癌旁组织的混合样本中分别检测预测异构体的表达, 并对电泳所获条带进行克隆、测序。应用 RT-PCR 定量检测在各个组织样本中异构体 TCF19-1、TCF19-3 在原发肾癌及癌旁组织的表达差异。**结果** ccRCC 组织中存在 2 种新型 TCF19 替换剪接异构体(TCF19-1、TCF19-3)。RT-PCR 检测结果发现这 2 种异构体在癌和癌旁组织中均表达, 但 TCF19-1 在原发癌组织中表达率高于癌旁组织($P < 0.001$); TCF19-3 在癌旁组织中的表达率与原发癌组织比较, 差异无统计学意义($P = 0.082$)。**结论** 首次发现 ccRCC 组织中存在 2 种 TCF19 选择性剪接异构体 TCF19-1 和 TCF19-3, 其中 TCF19-1 的表达可能与 ccRCC 有关。

[关键词] 转录因子类; 肾肿瘤; 选择性剪接; 异构体

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0706-05

Types of alternative splice variants of transcription factor 19 and their expression patterns in clear cell renal cell carcinoma tissues

QIAN Tao¹, LIN Li-ping³, CHANG Wen-jun², CAO Ting-hu¹, XU Xing-xing², YANG Yin-hui¹, ZHANG Hong-wei², HOU Jian-guo^{1*}, CAO Guang-wen^{2*}

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Center of Disease Control of Handan, Hebei Province, Handan 056008, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To study whether there is expression of the alternative splice variants of TCF19, a cell growth regulatory gene, in human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissues and their relationship with the development of ccRCC. **Methods** Alternative Splicing Database was used to predict the possible alternative splice variants of TCF19. Specific primers for amplifying the 5 predicted variants of TCF19 were designed and used to examine the corresponding variants in 32 ccRCC tissues and normal tissues adjacent to the tumors by RT-PCR technique. The amplicons were then cloned and sequenced. Quantitative RT-PCR was used to detect the expression differences of the variants between the primary renal cell carcinoma and adjacent tissues. **Results** Two new isoforms of TCF19 (TCF19-1 and TCF19-3) were identified in the ccRCC and the adjacent tissues. RT-PCR results showed that TCF19-1 expression was significantly higher in the primary ccRCC tissues than that in the adjacent normal tissues ($P < 0.001$). And the expression of TCF19-3 in the primary tumor was only slightly higher than that in the adjacent tissues ($P = 0.082$). **Conclusion** This study for the first time identifies the existence of two alternative splice isoforms of TCF-19, TCF19-1 and TCF19-3, in human ccRCC tissues, and the expression of TCF19-1 might be related to the development of ccRCC.

[Key words] transcription factors; kidney neoplasms; alternative splicing; isoforms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):706-710]

[收稿日期] 2010-03-23 **[接受日期]** 2010-05-11

[基金项目] 国家自然科学基金(30872562), 上海市教育委员会科研创新项目(08ZZ39). Supported by National Natural Science Foundation of China (30872562) and Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission(08ZZ39).

[作者简介] 钱 涛, 硕士. E-mail: qiantao144812@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871063, E-mail: smmuhoujianguo@yahoo.com.cn; Tel: 021-81871063; E-mail: gcao@smmu.edu.cn

肾细胞癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,约占成人恶性肿瘤的2%~3%,肾肿瘤的90%~95%^[1]。肾透明细胞癌(ccRCC)占肾细胞癌的60%~85%,其发病率在欧洲和美国每年以3%的速度增长^[2]。30%的患者在初诊时即发现转移,细胞因子免疫治疗的有效率约为15%^[3],2006年起NCCN、EAU将分子靶向药物作为转移性肾癌的一、二线治疗药物^[4-6],但代价昂贵。目前还没有ccRCC早期诊断和预后预测的方法。研究ccRCC组织中差异表达基因可能为ccRCC的诊断和预后预测提供新的生物标志。本实验室前期采用ccRCC患者原发癌和转移癌原代培养细胞进行cDNA Microarray分析^[7],结果提示TCF19是在ccRCC转移细胞中高表达的分子之一。进一步研究证实该基因在ccRCC组织高表达。TCF19是一种与细胞生长调节相关的基因,其作用主要在细胞周期G₁-S期^[8]。编码TCF19的基因位于6号常染色体短臂6p21.3上,基因全长为5.69 kb。目前既不清楚在ccRCC中是否存在或究竟存在何种异构体,也不清楚异构体在ccRCC组织中的表达方式。

基因mRNA的选择性剪接在发育阶段有不同的作用,而mRNA选择性剪接模式的改变常与某些

遗传疾病或肿瘤有关。目前发现某些选择性剪接在肿瘤细胞中发生频率较高^[9]。Wang等^[10]通过生物信息学分析,从26258个选择性剪接变异体中筛选出845个与人类肿瘤相关,且通过实验验证了某些选择性剪接异构体具有肿瘤类型特异性及组织特异性。虽然不同种类的肿瘤可能都存在某一基因的选择性剪接,但不同肿瘤类型大多存在着不同的选择性剪接模式。本研究通过生物信息学预测TCF19可能存在的选择性剪接异构体,采用RT-PCR在ccRCC组织中筛选新型选择性剪接异构体并进行Real-time定量检测,旨在探索TCF19选择性剪接异构体的存在及其表达与ccRCC发生的关系。

1 材料和方法

1.1 TCF19选择性剪接异构体的生物信息学分析 采用(Alternative Splicing Database, ASD,其网址为<http://www.ebi.ac.uk/asd/index.html>)对TCF19基因可能存在的选择性剪接异构体进行预测,并对预测序列进行Blast比对并与TCF19基因全长序列进行对照。针对差异序列应用Primer Premier 5.0及Oligo 6.0软件设计各个剪接异构体的RT-PCR引物,引物序列见表1。

表1 扩增5种异构体的引物序列、产物长度和退火温度

Tab 1 Primer sequences, amplicons, annealing temperature for amplification of 5 variants

Primer	Sequence(5'→3')	Amplicons(bp)	Annealing temperature θ/°C
TCF19-1	GGC TGG CAC TGC TTG AA(sense)	359	62
	CAC GTC CTA TGG CAC CTC(antisense)		
TCF19-3	GGC TGG CAC TGC TTG AA(sense)	252	62
	CAC GTC CTA TGG CAC CTC(antisense)		
TCF19-4	CAG GCT GGC ACT GCT TGA A(sense)	193	60
	GCA TCC ATT TCC TTT CCC ACT(antisense)		
TCF19-5	GGC TGG AAT TGA GTG ATG GA(sense)	164	60.5
	GGA ACA GGC AGG CTC TTT G(antisense)		
TCF19-6	GGC TGG CAC TGC TTG AA(sense)	155	62
	CAC GTC CTA TGG CAC CTC(antisense)		

1.2 标本来源 ccRCC原发肿瘤标本来源于2005年1月至2008年12月第二军医大学长海医院泌尿外科肾癌根治术后立即液氮保存的新鲜标本,选择经病理证实均为ccRCC的样本32例,其中男性22例,女性10例,平均年龄为52.8岁(36~78岁)。应用ccRCC原位组织及其配对的癌旁组织(离肿瘤3 cm左右的肾组织)以及实验室保存的7对含有转移组织的肾癌标本用于后续研究。

1.3 主要试剂 TRIzol试剂购自Invitrogen公司;RNA逆转录试剂盒(A3500)购自Promega公司;pMD18-T载体(D101A)及rTaq DNA聚合酶

(R10T1)均购自TaKaRa公司,DH5α感受态细胞(CB101)及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(DP209-02)、RT-PCR试剂盒购自北京天根生化技术有限公司。

1.4 样本RNA提取及反转录 细胞及组织RNA提取按Invitrogen公司TRIzol试剂说明书操作完成,将分别抽取32例ccRCC的原位癌组织及癌旁组织RNA,并在紫外分光光度仪UV7504上对所提取RNA进行纯度鉴定和定量。每例样本RNA各取3 μg分别按ccRCC和癌旁组织进行混合,分别取1 μg混合的RNA作为模板,按Reverse Transcription System试剂盒说明书进行反转录。

1.5 RT-PCR 及序列测定 分别取原发癌组织及癌旁组织的反转录产物 1 μ l 作为模板,加入含 1 U rTaq DNA 聚合酶、5 μ l 10 \times PCR Reaction buffer、20 pmol 引物、25 nmol dNTP 的 50 μ l 反应体系。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,95 $^{\circ}$ C 变性 45 s,退火 45 s (退火温度见表 1),72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,PCR 反应 25~30 个循环,最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,溴化乙啶染色,UV 灯下观察。PCR 产物纯化后的产物与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 α 感受态细菌,送北京天根生化科技有限公司测序。

1.6 TCF19 剪接异构体在组织中的存在和表达情况 根据 RT-PCR 及测序结果,针对存在的替换剪接异构体采用 RT-PCR 定量检测其分别在 32 例原位癌组织及相应癌旁组织中的表达情况。RT-PCR 引物(表 2)退火温度为 60 $^{\circ}$ C,内参的退火温度设定为 57 $^{\circ}$ C 时溶解曲线较好,为单峰且无杂峰。分别以 cDNA 模板 2 μ l、Master Mix 10 μ l、正反向引物 1.6 μ l 制成 20 μ l 的反应体系;预变性 2 min,变性、退火 30 s,于 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。收集数据进行统计分析。

表 2 Real-time PCR 引物序列及扩增长度

Tab 2 Primer sequences and amplification length for real-time PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Amplification length (bp)
GADPH	TCC TCT GAC TTC AAC AGC GAC AC(sense)	212
	TCT CTC TTC CTC TTG TGC TCT TGC(antisense)	
TCF19-1	GCG GTG GAT TCA TTG CCC TCG(sense)	265
	TGG GGA GCC TCC AAT CTG CAA (antisense)	
TCF19-3	CGC GGT GGA TTC ATT GCC CT (sense)	159
	TGG GGA GCC TCC AAT CTC TGT G (antisense)	

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,统计学处理采用中位数分析并做独立样本 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。RT-PCR 表达量计算公式如下: Δ Ct(癌)=JUN(Mean Ct) TCF19-1-参照基因 GAPDH (Mean Ct); Δ Ct(癌旁)=JUN(Mean Ct) TCF19-2-参照基因 GAPDH(Mean Ct); $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct(癌)- Δ Ct(癌旁);表达差异按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

TCF19 预测的 6 种异构体(图 1),我们首先排除预测异构体 2,因为其可能是异构体 1 的一部分。由于 TCF19-3 的引物上下游设在了外显子 1 和 2 内,故同样可以用来扩增 TCF19-1 和 TCF19-6 异构体,故在所设计的引物中第 1、3、6 对异构体采用了相同的引物,理论上假如预测的 5 种异构体均存在,则该引物对可扩增到 3 种长度的异构体,用电泳分析可将它们区分开来。其余的引物对分别只能扩增出特有的异构体片段。

2 结果

2.1 ASD 分析结果及引物的设计 针对 ASD 对

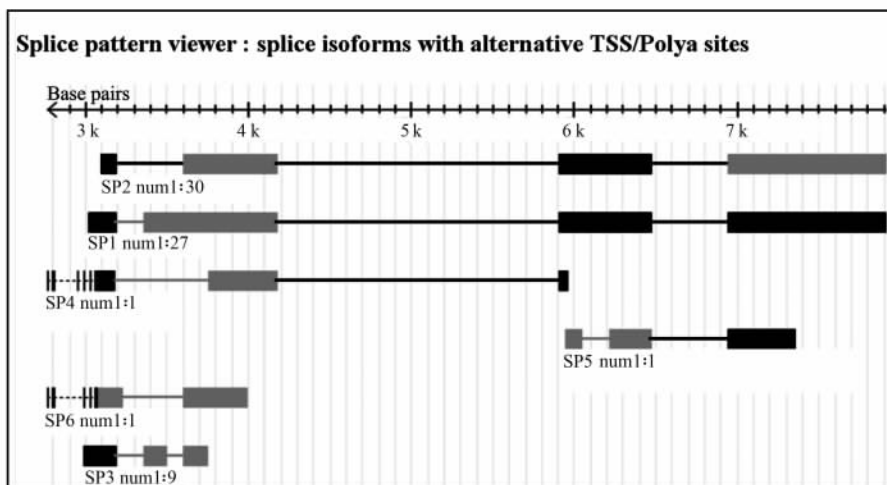


图 1 ASD 预测的 6 种 TCF19 异构体

Fig 1 Structures of six predicted splice variants of TCF19 via ASD

Four fragments represent the four exons of TCF19; the black were for the newly discovered fragment of exon

2.2 混合样本中各异构体的存在情况及克隆序列的分析 通过优化 PCR 条件,我们在混合转移组织(M)、混合原发肾细胞癌组织(R)及混合癌旁组织(L)中验证预测的异构体,如图2所示,引物对 TCF19-1、TCF19-3 扩增得到超过1条的电泳条带,可能存在异构体;若存在异构体 TCF19-1,则该引物扩增片段应为 359 bp,而图2中 TCF19-1 片段较大的条带应为从 DNA 中扩增的片段,可能是 RNA 提取时混有 DNA,从 DNA 中扩增的大小为 533 bp;若存在异构体 TCF19-3,则该引物扩增片段大小应为 252 bp;TCF19-4 只有1条电泳条带,不存在异构体,可能是其 DNA 的一部分;图中 TCF19-5 若存在该异构体,则预测片段大小应为 164 bp,而图2中片段较大,应为在正常 mRNA 中的扩增片段,大小约为 337 bp;重新反转录后在转移组织样本宽胶上重新电泳后确认 TCF19-5 并非异构体(图2B)。我们对 TCF19-1、TCF19-3 的 PCR 产物进行凝胶回收和

克隆测序。经克隆测序,TCF19-1 和 TCF19-3 的异构体扩增片段序列与 ASD 中提供的序列相同(图3)。

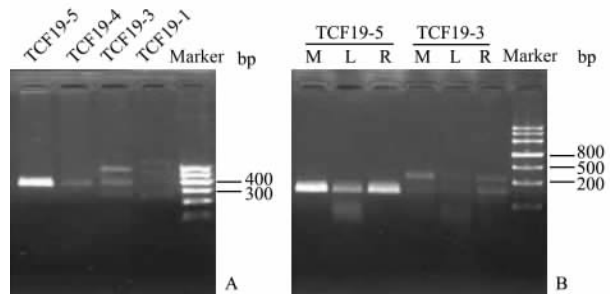


图2 PCR验证预测 TCF19-1、TCF19-3、TCF19-5 的异构体

Fig 2 Verification of predicted TCF19-1, TCF19-3 and TCF19-5 isoforms by PCR

M: Mixed tissues of RCC metastasis; R: Mixed primary RCC; L: Mixed adjacent normal kidney tissues

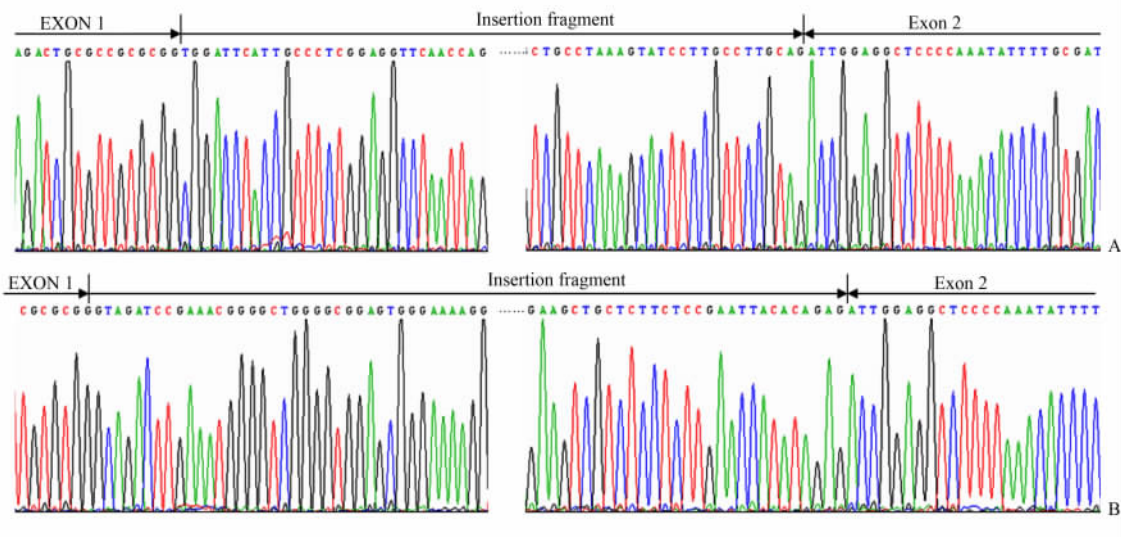


图3 TCF19-1(A)和 TCF19-3(B)异构体测序图

Fig 3 Sequences of alternative splice isoforms of TCF19-1(A) and TCF19-3(B)

2.3 TCF19 剪接异构体在 ccRCC 及其配对癌旁组织中的相对表达变化 经 RT-PCR 定量检测,TCF19-1 和 TCF19-3 在 ccRCC 和对应癌旁组织中均有表达。结果表明在 32 例肾透明细胞癌和相应的癌旁组织中,TCF19-1 在原位癌组织中的表达率(26/32)远高于癌旁组织(6/32),其表达率明显上调,TCF19-3 异构体在 32 例 ccRCC 癌旁组织相对于其原发灶的表达率上调。

荧光实时定量 PCR 发现,TCF19-1 异构体在 32 例 ccRCC 原发灶相对于其配对的癌旁组织的表达率明显上调($P < 0.001$),TCF19-3 异构体在 32 例 ccRCC 癌旁组织相对于其原发灶的表达差异无

统计学意义($P = 0.082$)。中位数分析图见图4。

3 讨论

本研究是在我们前期发现 TCF19 在 RCC 中高表达的基础上进行的研究。由于相同基因在不同组织中可能存在不同的选择性剪接异构体,可能发挥不同的功能。因此我们首先根据国际上通用的方法对 TCF19 可能的选择性剪接异构体进行了预测。从 TCF19 基因结构中预测出了 6 种理论上的选择性剪接异构体。进一步研究发现通过 PCR 的方法理论上能够扩增出其中的 5 种选择性剪接异构体。从结构上来看,异构体 2 可能是异构体 1 的一部分,

我们在本研究中没有研究异构体 2。应用混合 mRNA 发现 RCC 组织和癌旁组织中可能存在 2 种异构体 (TCF19-1、TCF19-3),应用序列分子证实存在 TCF19-1 和 TCF19-3。虽然不能排除其他可能的选择性剪接异构体的存在,但是这两种异构体是存在于 RCC 及癌旁组织中的主要选择性剪接异构体。

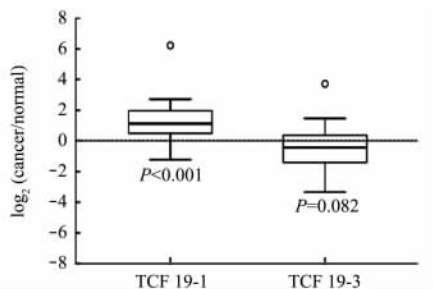


图 4 荧光实时定量 RT-PCR 检测 TCF19-1 和 TCF19-3 在 ccRCC 原发灶相对于癌旁组织的相对表达倍数

Fig 4 Relative expression fold of TCF19-1 and TCF19-3 in ccRCC tissues vs their adjacent renal tissues by quantitative RT-PCR

“o” indicates abnormal value. $n=32, \bar{x} \pm s$

我们随后应用定量 RT-PCR 的方法研究了 32 对手术切除的原发 ccRCC 组织和癌旁肾组织的表达状况,发现 TCF19-1 的表达在 ccRCC 中的表达水平高于癌旁肾组织 ($P < 0.001$)。该结果提示 TCF19-1 的结果与我们前期研究 TCF19 在 ccRCC 组织中高表达的结果相一致。但是 TCF19-3 的表达谱与我们前期的结果不一致,可能是同一种基因的不同剪接过程在 RCC 发生过程中可能起不同的作用。目前尚不清楚这 2 种异构体的具体功能,但是在各自的表达谱中可能推测出 TCF19-1 的表达可能与 ccRCC 的发生有一定关系。由于本研究中转移性 ccRCC 样本量太小,无法明确 TCF19-1 在 ccRCC 转移癌中的表达情况。因此,我们提出 TCF19-1,而不是 TCF19-3,可能与 ccRCC 的发生存在一定关系。

本研究指出,研究某种基因的表达在肿瘤发生发展中的作用,不能单纯研究这种基因表达,而且应该关注选择性剪接的存在和意义。由于选择性剪接是转录后加工过程的产物,研究某种基因的几种重要选择性剪接异构体的表达可能更加准确地预测某

种基因在肿瘤中发挥的作用。目前还没有关于 TCF19 在 ccRCC 中的研究报道,而且关于 TCF19 在肿瘤中作用的可借鉴资料也很少。本研究首次确定了 TCF19-1 在 ccRCC 中高表达。在此基础上后续研究应该注重研究 2 种 TCF19 选择性剪接异构体在 ccRCC 发生和转移中的作用,建立不同异构体的临床检测方法,研究 TCF19-1 表达水平与 ccRCC 术后生存期和肿瘤复发的关系,明确 TCF19 的选择性剪接异构体在 ccRCC 的发生、发展及转移机制有重要意义。

[参考文献]

- [1] 顾方六. 肾肿瘤[M]//吴阶平. 吴阶平泌尿外科学. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 889-917.
- [2] Liou L S, Shi T, Duan Z H, Sadhukhan P, Der S D, Novick A A, et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma[J]. BMC Urol, 2004, 4: 9.
- [3] 盛锡楠, 李峻岭, 郭军, 赵小慧, 朱军, 储大同. 重组人源化白细胞介素-2 治疗转移性肾癌的 III 期临床研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30: 129-133.
- [4] Escudier B, Hutson T, Stadler W M, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356: 125-134.
- [5] Motzer R J, Hutson T E, Tomczak P, Michaelson M D, Bukowski R M, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356: 115-124.
- [6] 周爱萍, 何志嵩, 于世英, 张沂平, 杜春霞, 孙永昆, 等. 索拉非尼治疗转移性肾癌的临床研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30: 10-14.
- [7] Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2008, 123: 1080-1088.
- [8] Krishnan B R, Jamry I, Chaplin D D. Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes[J]. Genomics, 1995, 30: 53-58.
- [9] Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Ledolter S, et al. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8: 2253-2259.
- [10] Wang Z, Lo H S, Yang H, Gere S, Hu Y, Buetow K H, et al. Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative splicing in human cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63: 655-657.

[本文编辑] 尹 茶