

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.015

F10 蛋白及 mRNA 在部分正常组织及癌组织中的表达

付欣 李熹翀 周问渠 洪玮 邹东霆 王健 李冰[△]

(广州医科大学 广东 广州 510182)

摘要 目的:了解 F10 基因在部分正常组织及肿瘤组织中的表达情况。**方法:**利用原位杂交和免疫组化方法对 F10 在部分正常组织和肿瘤组织中的 mRNA 和蛋白表达情况进行分析。**结果:**F10 基因不仅在腺癌组织中表达呈阳性,在鳞癌组织中表现出较腺癌更强的强阳性,并且在正常组织中也有一定的表达。**结论:**F10 是一个在多种组织普遍表达的细胞内蛋白,其功能可能与物质转运相关。

关键词:F10 基因;腺癌;鳞癌;正常组织

中图分类号:R730.2;Q51;Q593 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5859-03

The Expression Analysis of F10 Protein and mRNA in Some Normal and Cancer Tissues

FU Xin, LI Xi-chong, ZHOU Wen-qu, HONG Wei, ZOU Dong-ting, WANG Jian, LI Bing[△]

(Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expression of F10 protein and mRNA in some normal and cancer tissues. **Methods:** In situ hybridization and immunohistochemistry were used to study the expression of F10 protein and mRNA in some normal and cancer tissues. **Results:** F10 gene was shown to be positive in adenocarcinoma, and higher in squamous cell carcinoma. Furthermore, F10 gene also had a certain expression in normal tissues. **Conclusions:** F10 is widely expressed in many tissues, and its function may be associated with material transport.

Key words: F10 gene; Adenocarcinoma; Squamous cell carcinoma; Normal tissues

Chinese Library Classification(CLC): R730.2; Q51; Q593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5859-03

前言

F10 基因是在研究葡萄胎的发病的分子机制过程中发现的一个新基因(genebank: AB196290)^[1-3],该基因主要定位于细胞质中一定的内质网或细胞核^[4]。曹晓敏等人^[5,6]的研究表明 F10 可促进细胞增殖,并且参与转录因子活性调节过程,而周瑾等利用原位杂交技术观察到 F10 在卵巢腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肝癌、胃癌及肺癌等腺癌中均呈阳性表达,此外,F10 基因在葡萄胎,侵袭性葡萄胎,绒癌中均呈阳性表达,且在這些组织中其表达呈现递增趋势。因此,前期研究认为 F10 是一个与腺癌特异性相关的基因^[7,9]。

但是这些研究结果都是基于 F10 与增殖或肿瘤形成相关的基础上进行的研究,并且对肿瘤组织的表达研究也仅限于 mRNA 水平。为此,本研究通过观察 F10 mRNA 及蛋白在部分正常组织及一些癌组织中的分布情况,以期通过基因及其产物在组织内的特异性分布来判断 F10 基因的功能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

组织芯片(来源于人,芯片批号 CC00-01-004、CC00-11-05,包括人的结肠、食道、胰腺等的正常组织和结肠、直肠、食道、子

宫、前列腺等器官的癌组织)购自陕西超英生物技术有限公司,DIG 标记的 UTP,anti-DIG 抗体、BCIP/NTB 购自罗氏公司,HRP-羊抗兔 IgG 购自北京中山公司,抗体稀释液、DAB 显色液购自 DAKO 公司,50× EDTA 抗原修复液(pH9.0)购自中杉金桥公司。F10 一抗由本中心制备并储存。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交检测组织中 F10 的 mRNA 表达 按照罗氏公司的地高辛 RNA 探针标记及检测试剂盒说明书标记 F10 的 mRNA 探针,并进行探针效率检测。组织芯片常规脱蜡水化处理后,按照罗氏原位杂交方法进行原位杂交^[10]:将组织芯片消化固定后,于 37℃ 预杂交 30 min。弃去芯片上的预杂交液,加上杂交液(内含探针),置湿盒中 42℃ 杂交过夜。同时以不加探针的杂交液孵浴小鼠的正常子宫组织切片作为阴性对照。杂交过夜的芯片按经梯度 SSC 洗涤后以 0.1% triton X-100 封闭 30 min;将 anti-DIG 抗体以 1:500 的比例稀释在封闭液中,室温孵育 1 h;用缓冲液洗去多余的二抗,然后以 1:50 稀释的 BCIP/NBT 显色液避光显色 1.5 小时。终止显色反应后用双蒸水冲洗。显微镜下观察。

1.2.2 免疫组化检测 F10 蛋白在组织中的表达 将芯片进行常规脱蜡,水化,并用 EDTA 抗原修复后,用 3%的 H₂O₂ 处理去除内源性的过氧化物酶。然后以 5%的 BSA 封闭 15 min 后加入制备的 F10 一抗^[11]4℃ 孵浴过夜。同时以 5%的 BSA 代替 F10 一抗孵浴小鼠的正常子宫组织切片作为阴性对照。用 PBS 洗去多余的一抗,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,37℃ 孵浴 1h,洗涤后以 DAB 显色液,反应终止后加入苏木精复染,梯度酒精

作者简介:付欣(1976-),女,博士研究生,助理研究员,主要研究方向:肺动脉高压,电话:13828496550,E-mail: fuxin76@126.com

△通讯作者:李冰,E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

(收稿日期:2014-03-28 接受日期:2014-04-25)

脱水透明,中性树胶封片。显微镜下观察。

2 结果

2.1 组织中 F10 的 mRNA 表达

2.1.1 探针标记效率检测 将标记的探针以 Roche 公司的探针标记与检测试剂盒进行检测,比较标准物与标记探针的着色程度可判断标记的 RNA 量,由结果可见探针的第一个点大致与标准物的第二个点着色(100 pg/μL)程度一致(图 1),探针在该点之前已经稀释了 250 倍,所以探针浓度为 100 pg/μL*250=25 ng/μL。

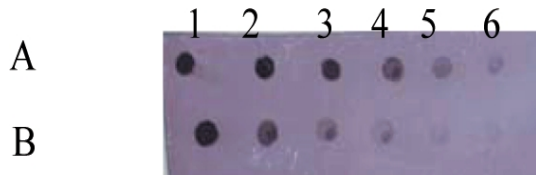


图 1 RNA 探针标记效率

Fig.1 The labeling efficiency of RNA probe

注:A:地高辛标准品由 1-6 标记效率分别为:1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、3pg/μL、1pg/μL、0.3pg/μL、0.1pg/μL; B:地高辛标记的 RNA 探针。

Note: A: DIG-DNA standard probe The numbers of 1 to 6 on the top indicate the DNA labeling efficiency of 1ng/μL, 100pg/μL, 10pg/μL, 3pg/μL, 1pg/μL, 0.3pg/μL and 0.1pg/μL; B: DIG-RNA probe. The labeling efficiency was estimated by comparison with DIG-DNA standard probe.

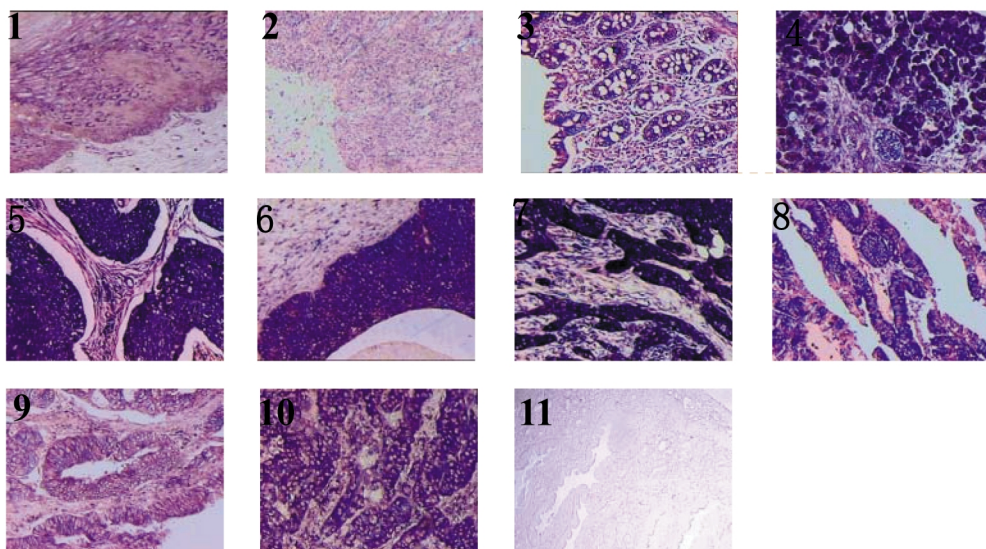


图 2 F10 mRNA 在组织中的表达(200×)

Fig.2 F10 mRNA expression in different tissues (200×)

注:器官及病理诊断:1:食道,正常组织;2:食道,增生;3:结肠,正常组织;4:胰腺,正常组织;5:食道,鳞状细胞癌;6:子宫,鳞状细胞癌;7:皮肤,鳞状细胞癌;8:结肠,腺癌;9:直肠,腺癌;10:前列腺,腺癌;11:阴性对照;阳性细胞染成深紫色。

Note: Organ and pathology diagnosis: 1: Esophagus, normal tissue; 2: Esophagus, hyperplasia; 3: colon, normal tissue; 4: pancreas, normal tissue; 5: Esophagus, squamous cell carcinoma; 6: uterus, squamous cell carcinoma; 7: skin, squamous cell carcinoma; 8: colon, adenocarcinoma; 9: rectum, adenocarcinoma; 10: prostate, adenocarcinoma; 11: uterus, the negative control without probes; The positive cells were showed in blue.

3 讨论

多细胞生物的器官、组织的分化,以及由此而产生的各种细胞的功能差异是真核细胞的典型特征。机体内不同细胞的

2.1.2 组织中 F10 mRNA 表达 以原位杂交方法对人来源的包括腺癌,鳞癌及正常组织在内的各种组织中的 F10 基因的 mRNA 表达情况进行分析,发现 F10 基因不仅在腺癌组织中表达呈阳性,在鳞癌组织中表现出较腺癌更强的强阳性,并且在正常组织中也有一定的表达,说明 F10 基因并不是一个肿瘤特异性的基因。具体结果如图 2 所示:(1)正常组织分布:复层扁平上皮细胞:食道和消化道黏膜呈弱阳性到中等强度阳性表达(图 2-1,2-2,2-3)。胰腺:胰腺细胞和胰岛细胞呈强阳性表达(图 2-4)。各种结缔组织中有部分散在的细胞呈阳性表达。(2)肿瘤组织的表达:各鳞癌细胞均呈强阳性表达(图 2-5,2-6,2-7)。各腺癌细胞呈中等强度表达(图 2-8,2-9,2-10)。(3)阴性对照:子宫:典型的阴性结果(2-11)。

2.2 组织中 F10 蛋白表达

原位杂交结果只能表现转录水平的基因表达状态,本研究利用制备的抗体,研究了 F10 蛋白水平的分布特点。结果与原位杂交结果基本一致,具体见图 3:(1)正常组织分布:复层扁平上皮细胞:食道粘膜强阳性表达,并具有细胞内极性分布特征(图 3-1,3-2)。消化道粘膜:具有中等强度阳性表达(图 3-3)。胰腺:胰腺细胞和胰岛细胞均呈强阳性表达(图 3-4)。(2)肿瘤组织的表达:各鳞癌细胞呈强阳性表达(图 3-5,3-6,3-7);各腺癌细胞呈中等强度表达(图 3-8,3-9,3-10)。在正常组织和肿瘤组织的间质细胞中均有散在的阳性表达细胞。(3)阴性对照:子宫:典型的阴性结果(图 3-11)。

性质、其所执行的特定功能是由于细胞内蛋白质的差异所决定的。作为某种蛋白功能研究的出发点,蛋白表达所在的组织或细胞的分布特征会提供功能判断的最重要依据,并同时是验证其功能的判断标准^[12,13]。因此,本研究利用原位杂交和免疫组化

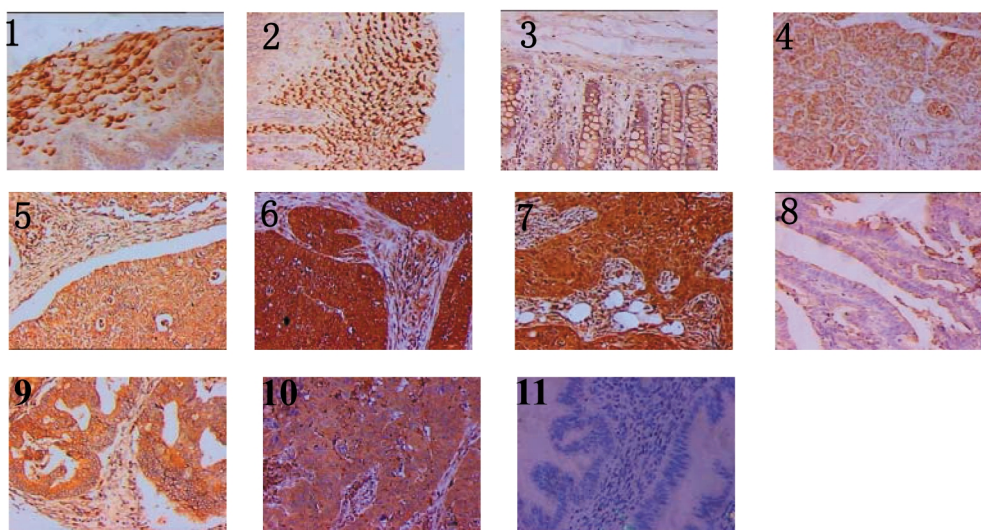


图3 F10 蛋白在组织中的表达(200*)

Fig.3 F10 protein expression in different tissues (200*)

注:器官及病理诊断:1:食道,正常组织;2:食道,增生;3:结肠,正常组织;4:胰腺,正常组织;5:食管,鳞状细胞癌;6:子宫,鳞状细胞癌;7:皮肤,鳞状细胞癌;8:结肠,腺癌;9:直肠,腺癌;10:前列腺,腺癌;11:子宫,阴性对照;阳性细胞染成棕色。

Note: Organ and pathology diagnosis: 1: Esophagus, normal tissue; 2: Esophagus, hyperplasia; 3: colon, normal tissue; 4: pancreas, normal tissue;

5: Esophagus, squamous cell carcinoma; 6: uterus, squamous cell carcinoma; 7: skin, squamous cell carcinoma; 8: colon, adenocarcinoma;

9: rectum, adenocarcinoma; 10: prostate, adenocarcinoma; 11: uterus, the negative control without probes; The positive cells were showed in brown.

Nucleoli were showed in blue.

的方法对 F10 基因的表达情况进行了分析。

本研究表明 F10 在组织中的 mRNA 和蛋白表达情况基本一致。根据 F10 在不同组织以及不同组织的病理情况下的表达分布情况,可以推断以下几个结论:(1)F10 在正常组织和癌组织(包括鳞癌和腺癌)中均有阳性表达,说明 F10 是在多种组织普遍表达的细胞内蛋白;(2)在食道粘膜和子宫颈粘膜的复层扁平上皮细胞中 F10 具有极性,上皮细胞是具有两极性的细胞,它的两极一极称为游离面,朝向身体表面或空腔器官的腔面,另一极称为基底面,朝向深部的结缔组织^[14-16];上皮组织内没有血管,所需营养依赖结缔组织中的血管透过基膜供给。同时肠道的吸收也是由肠腔直接向肠道细胞间进行的物质转运^[17,18]。F10 在复层扁平细胞的基底面以及肠道朝着肠腔面表达,二者均提示 F10 可能与物质的运输有关。(3)F10 在鳞癌组织中表达远高于在腺癌中的表达,提示 F10 与鳞癌的相关性较腺癌强,鳞癌组织和鳞状上皮细胞具有共性:细胞结合紧密,细胞与细胞间基质减少,细胞间的物质运输依靠两细胞间的直接转运方式。(4)各种腺体细胞相互之间的排列方式也是一种较紧密的结合,也可能是与上面分析的细胞间的运输方式相关。

综上所述,我们可以判断 F10 是一个在多种组织普遍表达的细胞内蛋白。且初步分析该基因可能与物质转运相关。本研究纠正了将 F10 功能局限在癌基因范围的狭窄认识,为下一步的研究提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] 李贵堂, 庞战军, 周瑾, 等. 葡萄胎发病相关新基因的克隆[J]. 广东医学, 2006, 27(1):22-24
- Li Gui-tang, Pang Zhan-jun, Zhou Jin, et al. Cloning of new genes associated with the pathogenesis of hydatidiform mole [J]. Guangdong Medical Journal, 2006, 27(1): 22-24

- [2] Fisher RA, Nowland ES. Gestational trophoblastic disease molecular and genetic studies[J]. J Reprod Med, 1998, 43(2):87
- [3] Habibian R, Surt U. Cytogenetics of trophoblasts from complete hydatidiform moles[J]. Cancer Genet Cylogenet, 1987, 29(2):27
- [4] 付欣, 周问渠, 邢福祺, 等. F10 基因与绿色荧光蛋白融合载体的构建及亚细胞定位[J]. 广州医学院学报, 2005, 33(5):1-5
- Fu Xin, Zhou Wen-qu, Xing Fu-qi, et al. Construction and subcellular localization of F10 incorporating GFP fusion protein vector [J]. Academic J of Guangzhou Medical College, 2005, 33(5): 1-5
- [5] 曹晓敏, 庞战军, 全松, 等. F10 基因对细胞中 PCNA 和 Cyclin D1 表达的影响[J]. 中山大学学报, 2009, 30 (1):6-9
- Cao Xiao-min, Pang Zhan-jun, Quan Song, et al. Effect of F10 Gene on Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Cyclin D1 [J]. Journal of Sun Yat-sen University(Medical Sciences), 2009, 30(1): 6-9
- [6] 曹晓敏, 庞战军, 全松, 等. 葡萄胎发病相关新基因 F10 功能的初步研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(5):722-724
- Cao Xiao-min, Pang Zhan-jun, Quan Song, et al. Function of F10 gene, a novel hydatidiform mole-related gene: a preliminary study [J]. J South Med Univ, 2008, 28(5): 722-724
- [7] 周瑾, 陈士岭, 邢福祺, 等. 葡萄胎发病新基因 F10 与滋养细胞肿瘤侵袭相关性研究[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(2):171-173
- Zhou Jin, Chen Shi-ling, Xing Fu-qi, et al. Association of the novel hydatidiform mole-related gene F10 with the invasiveness of trophoblastic tumor [J]. J First Mil Med Univ, 2005, 25(2): 171-173
- [8] 周瑾, 梁卫华, 李冰, 等. 葡萄胎发病新基因 F10 在不同肿瘤组织的表达[J]. 广东医学, 2005, 26 (5): 596-597
- Zhou Jin, Liang Wei-hua, Li Bing, et al. The expression of hydatidiform mole associated new gene F10 in different tumor tissues [J]. Guangdong Medical Journal, 2005, 26 (5): 596-597

(下转第 5854 页)

- 态性与冠心病的关系研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(3): 148-252
- Yan Sheng-kai, Li Xiu-ling, Xue Hong, et al. Relationship between coronary heart disease and EcoRI MspI polymorphisms of apolipoprotein B gene in Han nationality[J]. Chin J Lab Med, 2003, 26(3): 148-252
- [10] 白永生, 周丽萍, 白向东, 等. 载脂蛋白 B 基因 EcoRI 和 MspI 多态性与颈动脉粥样硬化的关系 [J]. 宁夏医学院学报, 2008, 30(2): 157-160
- Bai Yong-sheng, Zhou Li-ping, Bai Xiang-dong, et al. Study on the Relationship Between Carotid Atherosclerosis Diseases and EcoRI&-MspI Polymorphisms of Apolipoprotein B Gene[J]. Journal of Ningxia Medical College, 2008, 30(2): 157-160
- [11] 柴耀辉, 秦震, 姚景莉, 等. 载脂蛋白 B 基因信号肽插入 / 缺失多态性与动脉粥样硬化性脑梗塞关系的研究 [J]. 临床神经病学杂志, 1995, 8(2): 77-79
- Chai Yao-hui, Qin Zhen, Yao Jing-li, et al. Signal peptide insertion/deletion polymorphism of apolipoprotein B gene in relation to atherosclerotic cerebral infarction in Chinese [J]. Journal of Clinical Neurology, 1995, 8(2): 77-79
- [12] 陈保生, 赵元力, 成英. 藏族人群 apoB 基因 3' 等位基因的多态性及血脂水平的分析[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(7): 505-508
- Chen Bao-sheng, Zhao Yuan-li, Cheng Ying. Polymorphisms of apoB gene 3c VNTR alleles and analysis of lipid level in Tibetan population[J]. Nat l Med J China, 1999, 79(7): 505-508
- [13] 陈保生, 何平吕, 新跃, 等. 汉族人群及蒙古族人群 apoB 基因 3'VNTR 等位基因分布的研究 (简报)[J]. 中国医学科学院学报, 1995, 17(4): 280
- Chen Bao-sheng, He Pin-lv, Xin Yue, et al. The allele distribution of Han population and Mongolia population of apoB gene 3'VNTR[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 1995, 17(4): 280
- [14] 张乐, 曾艺, 杨期东, 等. 载脂蛋白 B 基因 3- VNTR 多态与长沙地区脑血管病的关系研究[J]. 实用预防医学, 2005, 12(1): 57-59
- Zhang Le, Zeng Yi, Yang Qi-dong, et al. An Analysis of 3-VNTR of apoB gene polymorphisms of cerebrovascular patients in the city of Changsha[J]. Practical Preventive Medicine, 2005, 12(1): 57-59
- [15] Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, et al. Polymorphism in apoB associated with increased low density lipoprotein levels in both genders in the general population[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(10): 5797-5803
- [16] Verduci E, Agostoni C, Biondi ML, et al. Apolipoprotein B gene polymorphism and plasma lipid levels in phenylketonuric children[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004, 71(2): 117-120
- [17] Jemaa R, El-Asmi M, Mebazaa A. VNTR3' polymorphism of apolipoprotein B gene in obese people[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2002, 60(5): 559-564
- [18] Bentzen J, Jorgensen T, Ferger M. The effect of six polymorphisms in the Apolipoprotein B gene on parameters of lipid metabolism in a Danish populations[J]. Clin Genet, 2002, 61(2): 126
- [19] Puri RD, Tewari S, Sinha N, et al. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene: association with plasma lipid concentration and coronary disease[J]. Indian Heart J, 2003, 55(1): 60-64
- [20] Lamia R, Asma O, Slim K, et al. Association of four apolipoprotein B polymorphisms with lipid profile and stenosis in Tunisian coronary patients[J]. Journal of Genetics, 2012, 91(1): 75-79
-
- (上接第 5861 页)
- [9] 曹晓敏, 庞站军, 全松, 等. F10 基因真核细胞稳定表达系统的构建与鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(1): 57-59
- Cao Xiao-min, Pang Zhan-jun, Quan Song, et al. Construction and identification of a stable eukaryotic expression system for F10 gene [J]. J South Med Univ, 2008, 28 (1): 57-59
- [10] 肖奎娟, 谢琪璇, 高桥祐司, 等. 小鼠早期胚胎的全胚原位杂交技术[J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2011, 32(6): 620-323
- Xiao Luan-juan, Xie Qi-xuan, Takahashi, et al. Whole-mount in situ hybridization for analysis of gene expression in mouse embryos of early developmental-stage embryos [J]. Journal of Jinan University (Medicine Edition), 2011, 32(6): 620-323
- [11] 付欣, 邹东霆, 周问渠, 等. F10 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9): 856-858
- Fu Xin, Zou Dong-ting, Zhou Wen-qu, et al. Prokaryotic expression of F10 and preparation of its polyclonal antibody [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2007, 23(9): 856-858
- [12] 张岚, 李庆章. 新基因功能研究的整体策略 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(5): 109-113
- Zhang Lan, Li Qing-zhang. Overall strategy for the study of new gene function[J]. China Animal Husbandry&Veterinary Medicine, 2011, 38(5): 109-113
- [13] 字友梅, 王少元. 新基因功能的研究策略 [J]. 医学综述, 2011, 17(10): 1478-1480
- Zi You-mei, Wang Shao-yuan. Advances in research methods for novel gene function[J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(10): 1478-1480
- [14] Knust E. Regulation of epithelial cell shape and polarity by cell-cell adhesion (Review)[J]. Molecular Membrane Biology, 2002, 19(2): 113-120
- [15] Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ, et al. New perspective on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity [J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 73-98
- [16] Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a002899
- [17] 高志光, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用[J]. 肠外与肠内营养, 2005, 12(5): 299-302
- Gao Zhi-guang, Qin Huan-long. The biological functions of intestinal epithelial tight junctions and its role in intestinal barrier [J]. Parenteral&Enteral Nutrition, 2005, 12(5): 299-302
- [18] Mine Y, Zhang JW. Surfactants enhance the tight-junction permeability of food allergens in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. Int Arch Allergy Immuno, 2003, 130(2): 135-142