

MASPIN 在卵巢癌 SKOV3 细胞中表达调控机理的研究

马 瑛^{1,2}, 彭芝兰^{1△}, 陈 欣³, 李 曦³, 晏菊芳³

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 绵阳市中心医院 妇产科(绵阳 621000);

3. 成都地奥集团 筛选中心(成都 610041)

【摘要】 目的 构建并瞬时转染 P63 和 MASPIN 报告基因质粒,检测转染前后 MASPIN 启动子活性的改变,初步探讨在卵巢癌中 P63 对 MASPIN 表达的调控作用。**方法** 构建 MASPIN 报告基因质粒,并与 P63 质粒(TAP63、 Δ NP63)共转染卵巢癌 SKOV3 细胞,荧光素酶测定转染后 MASPIN 启动子活性的变化情况;P63 质粒体外瞬时转染卵巢癌 SKOV3 细胞,半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测转染后 MASPIN mRNA 表达水平的变化。**结果** 成功构建 MASPIN 报告基因质粒,并与 P63 质粒(TAP63、 Δ NP63)共转染 SKOV3 细胞,荧光素酶报告基因法检测发现 TAP63 转染组 MASPIN 启动子活性高于空载体组和 Δ NP63 组($P<0.05$),而后两组之间差异无统计学意义($P>0.05$);P63 质粒(TAP63、 Δ NP63)瞬时转染 SKOV3 细胞,RT-PCR 方法检测发现,TAP63 转染组 MASPIN mRNA 表达高于未转染组、空载体组和 Δ NP63 组($P<0.05$),而后 3 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TAP63 能增强 MASPIN 启动子转录活性及 MASPIN mRNA 的表达,MASPIN 可能是 TAP63 一个新的分子作用靶点。

【关键词】 卵巢癌 MASPIN P63 转录因子

The Regulation Mechanism of MASPIN Expression in Ovarian Carcinoma MA Ying^{1,2}, PENG Zhi-lan^{1△}, CHEN Xin³, LI Xi³, YAN Ju-fang³. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, China; 3. Department of Medicine Screening Center, Diao Group, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zhilanpeng@tom.com

【Abstract】 Objective To study the regulation of P63 on expression of MASPIN in ovarian cancer by observe MASPIN promoter activity changes before and after transient transfection of constructed P63 and MASPIN reporter gene plasmids. **Methods** The MASPIN reporter plasmid, fused with luciferase reporter gene, was constructed and transfected into SKOV3 cells together with P63 (TAP63, Δ NP63) express plasmid transiently. The MASPIN promoter activity was determined in both the transfected cells and controlled ones by Luciferase Assays and the transcription of MASPIN mRNA of them was evaluated with semi quantitative RT-PCR. **Results** The MASPIN reporter plasmid was successfully constructed and transiently transfected into SKOV3 cells together with P63 (TAP63, Δ NP63) expression plasmid. The data showed among the tested P63 splice variants, TAP63 remarkably activated MASPIN promoter transactivation ($P<0.05$). No significant difference in the activity level of MASPIN promoter was detected in the SKOV3-vector and SKOV3- Δ NP63 cells ($P>0.05$). The level of MASPIN mRNA expression was notably enhanced in SKOV3-TAP63 cell after transient transfected with TAP63 express plasmid ($P<0.05$), but no significant difference among the SKOV3, SKOV3-vector and SKOV3- Δ NP63 cell ($P>0.05$) was detected. **Conclusion** TAP63 can activate the transcription activity of MASPIN promoter, as well as regulate the expression of MASPIN. Put all together, these results suggested that MASPIN is a new molecular target of P63.

【Key words】 Ovarian carcinoma MASPIN P63 Regulating factors

MASPIN 基因于 1994 年由 Zou 等^[1]用消减杂交技术对正常乳腺组织和乳腺癌组织进行比较时发现,证实其为新的丝氨酸蛋白酶抑制剂基因,命名为 MASPIN (mammary serpin)。在人体的许多器

官中均检测到 MASPIN 有高水平表达^[2](如结肠、前列腺、甲状腺、乳腺等),而在相应的肿瘤细胞中表达下调或失表达,提示 MASPIN 的表达可能与抑制肿瘤进展有一定相关性^[3,4]。与上述研究结果相矛盾的是,在正常卵巢组织无 MASPIN 表达^[2],更有报道指出 MASPIN 在卵巢癌中表达上调,这显

△ 通讯作者, E-mail: zhilanpeng@tom.com

示了 *MASPIN* 与卵巢肿瘤进展关系的复杂化^[5]。因此,了解调控 *MASPIN* 表达的分子机制至关重要。

已有的结果显示,*MASPIN* 在肿瘤中的差异表达很大程度上源于后生性的改变,尤其是 *P53* 突变与转录因子甲基化可能是其中两个主要的机制^[6,7]。但是与在乳腺、前列腺肿瘤中不同,在卵巢癌中 *MASPIN* 表达上调,这提示 *MASPIN* 在卵巢癌中的调控机制可能与前两者不同。近来有研究指出在肺癌中 *P63* 对 *MASPIN* 的表达起主要调控作用^[8];而与在卵巢癌中表达水平类似,*MASPIN* 在肺癌中表达上调,那么是否 *P63* 对卵巢癌中 *MASPIN* 的表达调控也有类似作用?本研究通过构建 *MASPIN* 报告基因质粒,瞬时转染 *P63* 和 *MASPIN* 报告基因质粒,检测转染前后 *MASPIN* 启动子活性的改变,初步探讨在卵巢癌中 *P63* 对 *MASPIN* 表达的调控作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、高保真 pfu DNA 聚合酶、DNA marker DL2000、 λ EcoT14 I digest 购自 MBI, marker III 购自 TIANGEN, T4 DNA 连接酶购自 NEB, PCR 产物纯化试剂盒购自申能博彩生物科技有限公司,质粒纯化试剂盒为 Omega 公司产品,质粒小提中量试剂盒购自北京天为时代科技有限公司,荧光素酶底物试剂购自 Promega 公司,转染试剂梭华-SofastTM 购自厦门太阳马生物工程有限公司,其余试剂均为进口或国产分析纯。PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。细胞培养材料购自成都哈里公司。

Forma -80 °C 冰箱;BECKMAN 冷冻高速离心机;eppendorf 台式高速离心机;BIORAD 电泳槽,电泳仪;Hybaid PCR 仪;Kodak 凝胶成像系统及图像分析软件;Wallace Victor² 多功能发光检测仪(PerkinElmer 公司)。

1.2 质粒载体和宿主菌

pGL3-Basic 质粒购自 Promega 公司,重组质粒 pcDNA3-TAP63 和 pcDNA3- Δ NP63 由 Dr. Hyunsook Lee (Seoul National University, Seoul, Korea)赠送。大肠杆菌 JM109、正常人体前列腺组织由地奥集团药物筛选中心提供。

1.3 *MASPIN* 报告基因质粒的构建

1.3.1 人体组织标本基因组总 DNA 的提取 参

照《分子克隆实验指南》^[9]中的方法从人体前列腺组织中提取基因组总 DNA。

1.3.2 *MASPIN* 基因启动子区段的 PCR 扩增及产物的纯化和酶切 利用 Primer5.0 软件根据 *MASPIN* 启动子基因序列 (GenBank, NM_Ac036176, 序列 51421~51889) 设计引物,以人基因组总 DNA 为模板,用高保真 pfu DNA 聚合酶扩增 *MASPIN* 基因启动子及其调控序列区段。扩增启动子-284/+184 bp 区段的上游引物序列为:5'-AGACTCGAGATATTCTTACCTTGTATGGTTAAGTG-3';下游引物序列为:5'-ATCAAGCTTGAC AAGCTGCCAAGAGGCT-3'。划线处分别为 *Xho* I 和 *Hind* III 的酶切位点。扩增片段长度为 468 bp。PCR 反应条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 10 s,52 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 30 s,共循环 30 次,最后 72 °C 再延长 7 min。

用 PCR 产物纯化试剂盒按说明书的操作步骤将上述 PCR 扩增得到的产物纯化,取 5 μ L 纯化样品以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测纯化效果,以 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,37 °C 反应 6 h 后进行纯化并电泳检测纯化效果。

1.3.3 载体连接 采用 pGL3-Basic 载体进行重组质粒构建,连接反应体系为:1 μ L pGL3-Basic (50 ng/ μ L)、0.5 μ L T4 DNA 连接酶、1 μ L 10 $\times$ ligation buffer、1~7 μ L 纯化的酶切产物及适量的 Sterile H₂O,总反应体积为 10 μ L,16 °C 连接过夜。

1.3.4 转化 取 10 μ L 连接液加入 200 μ L 感受态菌液(参照《分子克隆实验指南》^[9]制备感受态细菌)中,混匀,冰浴 30 min,42 °C 90 s,立即冰浴 2 min,加入不含抗生素的 SOC 液体培养基 500 μ L,37 °C 轻微振摇 45 min,铺 200 μ L 菌液于 LB 固体培养基上(含氨苄青霉素 100 μ g/mL),37 °C 静置培养过夜。菌落长出后将平板置于 4 °C 保存待筛选。

1.3.5 重组子的筛选及鉴定 挑取平板上单菌落,接种于 96 孔板中 200 μ L LB 培养基内,37 °C 扩增 4 h,菌液直接用于 PCR 筛选。PCR 筛选得到阳性克隆 pGL3-maspp,将含阳性重组子的菌液以 1 mL : 100 mL 接种于 3 mL LB 培养基中,37 °C 250 r/min 摇床培养过夜,用质粒 DNA 小提中量试剂盒按说明书的操作步骤从过夜培养物中抽提阳性克隆质粒 DNA,对插入的外源片段分别进行 *Pst* I 和 *Bgl* I 单酶切鉴定,37 °C 反应 1 h,并通过测序进一步确证。

1.3.6 重组质粒的大量制备 按质粒提取试剂盒

说明进行重组质粒的大量制备和纯化,以 ddH₂O 溶解质粒,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外分光光度仪检测纯度及浓度。

1.4 P63 基因对 MASPIN 启动子活性的影响

1.4.1 细胞培养及转染 人卵巢癌细胞株 SKOV3 维持培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞密度达 50%~80%时,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基收集细胞并计数,以 24 孔细胞培养板转染,每孔接种 8×10⁴~2.0×10⁵ 个细胞,立即进行转染(用阳离子聚合物法介导 DNA 导入,参照转染试剂梭华-Sofast™的说明书进行)。

1.4.2 荧光素酶报告基因的检测 为了解 pGL3-maspp 能否驱动荧光素酶活性的表达,将 pGL3-Basic、pGL3-maspp 分别转染 SKOV3,以未转染 SKOV3 作对照。为了解 P63 基因对 MASPIN 启动子活性的影响,将重组载体 pcDNA3-TAP63 和 pcDNA3-ΔNP63 按 pcDNA3-TAP63 (pcDNA3-ΔNP63): pGL3-maspp=1 mol: 5 mol 的比例转染到 SKOV3 细胞中,以转染 pcDNA3: pGL3-maspp=1 mol: 5 mol 质粒的细胞作为对照。

转染后将细胞置于 37 ℃、5%CO₂ 孵育箱孵育 24~48 h 后,进行荧光素酶报告基因的检测。弃去培养基,用 PBS 洗两次,按每孔 40 μL 的量加入裂解液,室温作用 15 min 后,每孔加入 20 μL 荧光素酶底物试剂(含荧光素,ATP 等),震荡混匀后立即用 Wallace Victor² 读取 562 nm 波长下相对发光单位(RLU)信号。

1.5 半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 P63 对 MASPIN 表达的影响

细胞培养同 1.4.1。用阳离子聚合物法将重组载体 pcDNA3-TAP63、pcDNA3-ΔNP63、pcDNA3 空载体转染到 SKOV3 细胞中,以未转染的 SKOV3 细胞作为对照。转染方法参照转染试剂梭华-Sofast™的说明书进行。转染后将细胞置于 37 ℃、5%CO₂ 孵育箱孵育 48 h。

用 Trizol Reagent 提取 SKOV3 细胞总 RNA,取少量 RNA 以电泳鉴定完整性,以紫外分光光度法检测浓度和纯度。调整浓度存放于-70 ℃备用。

用于半定量 RT-PCR 分析的引物序列见表 1。RT-PCR 分析采用 TaKaRa 公司的 ONE STEP RT-PCR 试剂盒,依据说明进行。扩增条件见表 2。采用 Kodak 软件对 RT-PCR 条带进行光密度值分

析,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作系统内参。目的基因的表达指数=目的基因条带的光密度值/相应内参照条带的光密度值。

表 1 各种 PCR 引物和扩增片段长度
Table 1 Information of PCR primers used

	Sequence	Product length (bp)
MASPIN	F:5'-GGATCTCACAGATGGCCACTTTG-3' R:5'-CATACAGAACGTGGCCTCCATG-3'	208
TAP63	F:5'-ATGTCCCAGAGCACACAG-3' R:5'-AGCTCATGTTGGGGGCAC-3'	629
ΔNP63	F: 5'-TGCCCAGACTCAATTAGTG-3' R:5'-AGCTCATGTTGGGGGCAC-3'	440
GAPDH	F:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R:5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	485

表 2 扩增条件
Table 2 The PCR amplification condition

	Amplification condition
MASPIN	94 ℃,2 min;94 ℃ 10 s,58 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,30 cycles;72 ℃,10 min
TAP63	94 ℃,2 min;94 ℃ 10 s,58 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,30 cycles;72 ℃,10 min
ΔNP63	94 ℃,2 min;94 ℃ 10 s,58 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,30 cycles;72 ℃,10 min
GAPDH	94 ℃,2 min;94 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,20 cycles;72 ℃,10 min

1.6 统计学方法

3 组及以上资料的比较,首先进行方差齐性检验,方差齐者用多组计量资料的方差分析进行比较,两两比较采用 *q* 检验。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MASPIN 报告基因质粒的构建

2.1.1 人基因组总 DNA 提取纯化 如图 1 所示,提取的组织标本总 DNA 经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见清晰条带,DNA 完整无降解,前方无 RNA 存在。紫外分光光度仪测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 约为 1.8,可以用于实验。

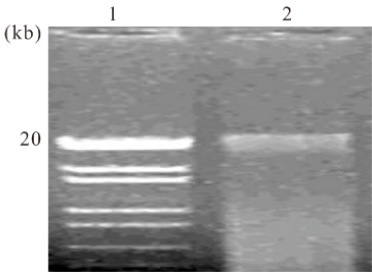


图 1 人基因组 DNA 凝胶电泳分析
Fig 1 Electrophoresis of genomic DNA from human prostate tissue
1: λEcoT14 marker; 2: Genomic DNA from human prostate tissue

2.1.2 MASPIN 基因启动子区段的克隆 如图 2

所示, *MASPIN* 基因启动子 -284/+184 bp 区段经 PCR 扩增的产物由琼脂糖凝胶电泳分析, 得到 460 bp 左右的产物。

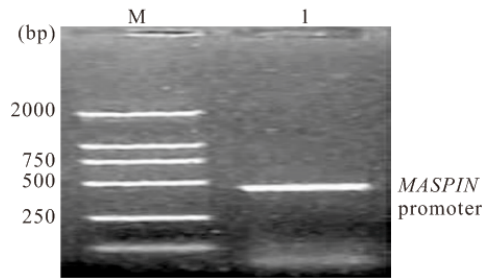


图 2 *MASPIN* 基因启动子区段 PCR 产物的凝胶电泳分析

Fig 2 Gel electrophoresis analysis of the PCR product of *MASPIN* promoter

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of *MASPIN* promoter

2.1.3 重组质粒的酶切及测序鉴定 重组质粒 pGL3-maspp 以 *Bgl* I 单酶切鉴定, 预期将切下 739 bp、3258 bp 和 1268 bp 的小片段, 若为空载体则会切下 3550 bp 和 1268 bp 的片段; 重组质粒 pGL3-maspp 以 *Pst* I 单酶切鉴定, 预期环状质粒将被切为 5.4 kb 的线性片段, 由于插入片段上仅有一个识别位点, 而载体上无此酶切位点, 空载体将不能被切开。如图 3 所示, 酶切结果与预期相符, 进一步测序表明重组质粒中插入的外源片段与预期序列完全一致。

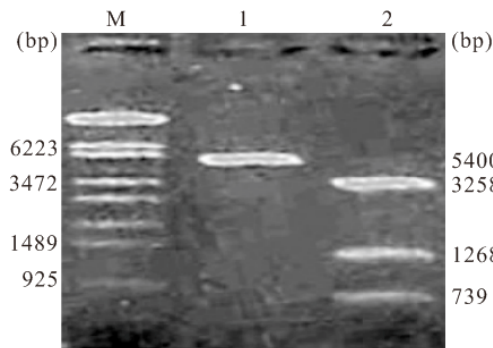


图 3 重组载体 pGL3-maspp 的酶切鉴定

Fig 3 Identification of recombinant plasmid of pGL3-maspp

M: λ EcoT14 marker; 1: pGL3-maspp cleaved with *Pst* I; 2: pGL3-maspp cleaved with *Bgl* I

2.2 P63 对 *MASPIN* 启动子活性的影响

2.2.1 *MASPIN* 报告基因质粒驱动荧光素酶表达的活性 SKOV3、SKOV3-pGL3、SKOV3-maspp 组的 RLU 值分别为 22.000 ± 5.000 、 30.000 ± 1.000 、 43.667 ± 6.506 。与 SKOV3、SKOV3-pGL3 组相比, SKOV3-maspp 组活性增高 ($P < 0.05$)。SKOV3 和 SKOV3-pGL3 组 *MASPIN* 启动子活性

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明 pGL3-maspp 能够成功驱动 *MASPIN* 启动子活性。

2.2.2 P63 基因对 *MASPIN* 启动子活性的影响 pcDNA3+pGL3-maspp、pcDNA3- Δ NP63+pGL3-maspp 和 pcDNA3-TAP63+pGL3-maspp 组 RLU 值分别为 36.000 ± 7.000 、 42.667 ± 4.510 和 61.667 ± 2.517 。与前两组相比, pcDNA3-TAP63+pGL3-maspp 组 *MASPIN* 启动子活性增高 ($P < 0.05$), pcDNA3+pGL3-maspp 和 pcDNA3- Δ NP63+pGL3-maspp 组 *MASPIN* 启动子活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 P63 对 *MASPIN* 表达的影响

结果显示 (图 4), SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3-TAP63、SKOV3- Δ NP63 组的 *MASPIN* mRNA 表达指数分别为 0.7798 ± 0.0203 、 0.7660 ± 0.1525 、 2.3333 ± 0.2930 、 0.8215 ± 0.0299 。SKOV3-TAP63 组 *MASPIN* mRNA 表达水平明显增高 ($P < 0.05$), SKOV3、SKOV3-pcDNA3、SKOV3- Δ NP63 组 *MASPIN* mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

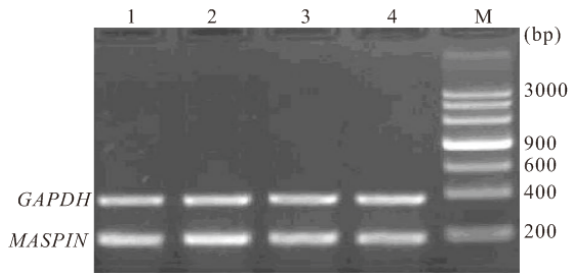


图 4 P63 质粒瞬时转染后 *MASPIN* mRNA 的表达

Fig 4 The expression of *MASPIN* mRNA after transient transfection of plasmid P63

1: SKOV3- Δ NP63; 2: SKOV3-TAP63; 3: SKOV3-pcDNA3; 4: SKOV3; M: Marker III

3 讨论

转录因子能识别并结合 DNA 序列特异位点, 通过 RNA 多聚酶 II、III 启动并激活基因转录活性。基因的启动子是含有对转录起始反应起关键作用的全部 DNA 序列。体外实验研究发现 *MASPIN* 基因启动子区域包含一系列转录因子的结合位点, 可能与调控 *MASPIN* 的表达有关, 包括 AP-1、*Ets*、*HRE*、*P53*。早期的研究证明, 在前列腺、乳腺肿瘤中, AP-1、*Ets*、*P53* 起着正反馈的调节作用, 而 *HRE*, 例如雄激素受体, 则为负反馈调节^[6,10]。*MASPIN* 在肿瘤进展过程中的失表达, 有可能是

因为在 MASPIN 启动子区域的 *Ets* 和 *APDNA1* 结合位点的转录活性缺失。近来又有大量的研究发现,在乳腺、胰腺、甲状腺、胃等肿瘤中, MASPIN 的特异性表达部分受到启动子区域胞嘧啶甲基化的控制;但有报道指出,野生型 *P53* 能够恢复由于 DNA 甲基化导致的 MASPIN 基因沉默,激发 MASPIN 的表达^[11,12],因此 MASPIN 表达的调控可能主要是在转录水平上。

MASPIN 在卵巢癌中表达上调,其分子机制到目前为止尚未完全弄清。Kim 等^[8]在对肺癌的研究发现, MASPIN 在肺癌组织和细胞株高表达,在转录水平上调控其表达的关键性因子是 *P63*,尤其是 *TAP63*;凝胶电泳迁移率变动分析 (EMSA) 和染色质分析, *P63* 蛋白的结合位点与 *P53* 在 MASPIN 启动子的结合位点一致;但是 Umekita 等^[13]研究发现在乳腺癌中 MASPIN 的表达与 *P63* 并无密切相关性,这也提示在卵巢癌、肺癌中, MASPIN 表达的调控机制与其他肿瘤不同, MASPIN 可能是 *P63* 的一个新的分子靶点,目前在卵巢癌中尚无相关的研究。

P63 与 *P53* 在结构和功能上有着高度的同源性。*P63* 基因定位于 3q27~29, 包含 15 个外显子, 2 个启动子,在人和鼠组织中广泛而有选择的表达。*P63* 基因在两个不同的启动子控制下,编码两类转录产物: *TAP63* 和 $\Delta NP63$, 又由于每种类型的 C 端不同剪切而各产生 3 种异构体, *TAP63 α 、*TAP63 β 、*TAP63 γ 和 $\Delta NP63\alpha$ 、 $\Delta NP63\beta$ 、 $\Delta NP63\gamma$ 。*TAP63* 的异构体均具有典型的转录活性区、DNA 结合区和寡核苷酸化区,功能与 *P53* 类似,可与 *P53* DNA 结合位点结合,能够显著地反式激活 *P53* 靶基因,诱导细胞周期阻遏和引发细胞凋亡,所以认为 *TAP63* 可能是一个候选的抑癌基因。 $\Delta NP63$ 异构体缺少 N 端转录激活区,不具有转录激活活性。但它仍可以与 DNA 结合,并以显性失活的方式抑制 *TAP63* 和 *P53* 依赖的靶基因的转录。目前还缺乏足够的证据确定 *P63* 在肿瘤发展过程中的作用,但 *P63* 与 *P53* 有着高度同源的 DNA 结合序列,至少可以确定 *P63* 可以作为转录因子起作用^[14,15]。***

报告基因是指其表达产物易被检测,且易与内源性背景蛋白相区别的基因。报告基因技术是通过把已确定的顺式调控序列剪接到报告基因上来控制基因的活性,这些反应元件可以对宿主细胞中基因调控和表达的变化起反应,从而就可以直观地“报道”细胞内与基因表达有关的信号级联。报告基因

技术可以用来分析基因上游区域顺式作用元件(如增强子和启动子)的活性^[16]。

为了研究卵巢癌中 MASPIN 基因的表达调控机制,本研究克隆了该基因 5'上游 468 bp 的调控序列,与荧光素酶报告基因重组后,分别与 *P63* 的两个亚型 *TAP63*、 $\Delta NP63$ 共转染卵巢癌细胞 SKOV3,荧光素酶活性分析结果表明构建的 MASPIN 报告基因质粒可驱动荧光素酶活性的表达;且 *TAP63* 对启动子活性有显著增强作用,而 $\Delta NP63$ 对启动子活性无明显影响($P>0.05$)。这表明 *TAP63* 对 MASPIN 启动子活性具有一定调节作用。为了进一步了解 *P63* 对 MASPIN 的作用,还通过瞬时转染 *TAP63*、 $\Delta NP63$ 表达质粒, RT-PCR 检测转染后 MASPIN mRNA 表达水平的变化,结果发现 *TAP63* 转染组的 MASPIN mRNA 表达水平较对照组明显增加,而 $\Delta NP63$ 转染组 MASPIN mRNA 表达水平与对照组比较则无明显变化($P>0.05$)。

研究表明,抑癌基因 *P53* 在人肿瘤细胞中有 50% 发生基因缺失和突变,其中卵巢癌中的突变高达 30%~79%^[17],而且在肿瘤组织中 MASPIN 的表达与突变型 *P53* 呈显著负相关^[3]。但 *P63* 基因在人肿瘤中却很少发生突变^[18],这也从另一方面解释了在卵巢癌中,可能由于 *P53* 的突变使得 MASPIN 的表达调控受到 *P63* 的影响。

从以上结果推测在卵巢癌中, MASPIN 的表达可能受到 *TAP63* 的调控, *TAP63* 是调节 MASPIN 表达的重要转录因子。这为从转录水平调节 MASPIN 的表达,进而增强其抑癌作用提供理论依据。本实验结果发现 MASPIN 基因的表达与 *TAP63* 密切相关,但由于缺乏 *P63* 亚型的相应抗体,没有从蛋白质水平研究 *P63* 亚型对 MASPIN 表达的影响,因此对于 *TAP63* 调控 MASPIN 表达的确切机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJC, *et al.* Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 1994; 263(5146): 526-529.
- 2 Pemberton PA, Tipton AR, Pavloff N, *et al.* Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. *J Histochem Cytochem*, 1997; 45(12): 1697-1706.
- 3 Song SY, Lee SK, Kim DH, *et al.* Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and

- microvessel density. *Dig Dis Sci*,2002;47(8):1831-1835.
- 4 Maass N, Teffner M, Rosel F, *et al.* Decline in the expression of the serpin proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol*,2001;195(3):321-326.
 - 5 Sood AK, Fletcher MS, Gruman LM, *et al.* The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2002;8(9):2924-2932.
 - 6 Zou Z, Gao C, Nagaich AK, *et al.* P53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem*, 2000;275(9):6051-6054.
 - 7 Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, *et al.* Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet*,2002;31(2):175-179.
 - 8 Kim S, Han J, Kim J, *et al.* Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. *Cancer Res*,2004;64(1):6900-6905.
 - 9 Sambrook J, Russell DW 主编. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002;8.
 - 10 Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive Ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1997;94(11):5673-5678.
 - 11 Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, *et al.* Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene*,2004;23(8):1531-1538.
 - 12 Oshiro MM, Watts GS, Wozniak RJ, *et al.* Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. *Oncogene*,2003;22(23):3624-3634.
 - 13 Umekita Y, Ohi Y, Souda M, *et al.* Maspin expression is frequent and correlates with basal markers in triple-negative breast cancer. *Diagn Pathol*,2011;6:36.
 - 14 Yang A, Kaghad M, Wang Y, *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 1998;2(3):305-316.
 - 15 Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and dehaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*,2001;20(25):3193-3205.
 - 16 Naylor LH. Reporter gene technology: the futhre looks bright. *Biochem Pharmacol*,1999;58(5):749-757.
 - 17 Erchuck A, Robert C. P53 based gene therapy of ovarian cancer magic bullet. *J Gynecol Oncol*,1995;59(2):169-171.
 - 18 De Laurenzi V, Melino G. Evolution of funotions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci*,2000;926(12):90-100.

(2012-07-13 收稿,2012-10-30 修回)

编辑 余琳

(上接第 14 页)

具体分子机制是否与上述提及的其他组织来源肿瘤中已阐明的机制一致,有待进一步深入探讨。本实验初次探讨了 ARHI 在胃癌中的作用,为我们研究胃癌发生发展机制提供了参考,同时为肿瘤靶向治疗的进一步研究提供新的潜在靶点。

参 考 文 献

- 1 邹小农, 段纪俊, 皇甫小梅等. 2004-2005 年全国死因回顾抽样调查胃癌死亡率分析. *中华预防医学杂志*,2010;44(5):390-397.
- 2 Yu YH, Xu F, Peng HQ, *et al.* NEOY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci*,1999;96(1):214-219.
- 3 Feng WW, Marquez R, Lu Z, *et al.* Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*, 2008;112(7):1489-1502.
- 4 Luo RZ, Fang XJ, Marquez R, *et al.* ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers. *Cancer Res*, 2005;65(15):6701-6710.
- 5 Dalai I, Missiaglia E, Barbi S, *et al.* Low expression of ARHI is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors. *Neoplasia*,2007;9(3):181-183.
- 6 Yang H, Lu XQ, Qian JM, *et al.* Imprinted tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis correlated with changes in DNA methylation in pancreatic cancer cells. *Mol Med Report*.2010;3(4):581-587.
- 7 Huang J, Lin Y, Li LH, *et al.* ARHI, as a novel suppressor of cell growth and downregulated in human hepatocellular carcinoma, could contribute to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog*,2009;48(2):130-140.
- 8 Badgwell DB, Lu Z, Le K, *et al.* The tumor-suppressor gene ARHI suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways. *Oncogene*,2012;31(1):68-79.
- 9 唐海灵, 胡益群, 杨奕轩等. 抑癌基因 ARHI 在人胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志*,2011;19(1):25-30.
- 10 Bao JJ, Le XF, Yuan J, *et al.* Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res*,2002;62(24):7264-7272.

(2012-07-18 收稿,2012-11-02 修回)

编辑 吕熙