

LTF 基因在多种肿瘤里的表达及机制研究

诸葛小菊 陈仁聘 卢光荣 黄智铭

摘 要 研究发现对大多数肿瘤来说,人体染色体 3p21.3 区域存在一群高密度分布的肿瘤抑制基因簇(TSGs),LTF 基因(lactotransferrin,LTF)是位于高频缺失区(CER1)的一员。LTF 的抗肿瘤机制是多种多样的,如通过调节 NK 细胞的活动,调节细胞 G_i 蛋白的表达,抑制肿瘤细胞的分化,增强其凋亡。在小鼠实验中,LTF 基因能抑制动物肿瘤模型中细胞的生长。研究认为 LTF 在鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胃癌、恶性胶质瘤、口腔鳞癌等多种肿瘤里表达下调,是抑癌基因或者候选抑癌基因。总结多种肿瘤,LTF 在肿瘤里表达下调的机制大致可分为基因水平相关和表观遗传学相关,前者包括杂合性缺失(loss of heterozygosity,LOH)和基因突变,后者包括启动子甲基化和组蛋白去乙酰化修饰相关,本文主要介绍 LTF 在多种肿瘤内失活和表观遗传学机制的联系。

关键词 LTF 基因 肿瘤 抑癌基因 表观遗传学 启动子甲基化

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

染色体缺失在多种肿瘤发生过程中是常见的,而且往往以一种非随机化的方式发生于某号染色体的一定区域。近来研究的热点区域 3p21 染色体片段上就有 3 个高频缺失区:CER1(3p21.3, Mb: 43.32 ~ 45.74)、CER2(3p22, Mb: 37.83 ~ 39.06)和 FER(3p14.3 ~ p21.2, Mb: 50.12 ~ 58.03),这些区域存在对大多数肿瘤来说可能有望成为其或者已经是抑癌基因的缺失基因,比如 LTF、LIMD1、RASSF1A、Blu 等^[1]。LTF 基因在多种肿瘤里的失活机制是多种多样的。本文就 LTF 在肿瘤内的作用和多种机制做一综述。

一、LTF 基因及其编码蛋白

近来研究发现 3p21.3 染色体上存在对大多数肿瘤来说的候选抑癌,LTF 亦是其中一员。LTF 基因位于 3p21.3 的 LUCA 区中的 CER1,这个区域在肺癌、鼻咽癌等多种肿瘤内表现为高频缺失区。

LTF 的 mRNA 长约 2.4kb,含 17 个外显子,编码乳铁转运蛋白,为转铁蛋白家族中的一员^[2]。1938 年 Sorensen 和 Sorensen 首次从牛乳中分离出牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin,BLF),1960 年 Groves 从人乳中首次分离出人乳铁蛋白(human lactoferrin,HLF)^[3]。HLF 完整的氨基酸序列由 703 个氨基酸残基组成,由一条多肽链折叠成两个球状小叶组成,每

个小叶带有一个铁结合位点^[2,4]。当一个铁离子结合到乳铁转运蛋白的同时伴随着两个碳酸氢根阴离子的结合^[5]。HLF 该蛋白为外分泌型,血浆 HLF 主要由中性粒细胞分泌,在人体支气管黏液、乳汁、泪液、唾液、胃液、精液、宫颈分泌物和鼻腔分泌物等多种体液中检测到。既往研究认为,乳铁转运蛋白仅被视为牛奶中抑菌的一种转铁蛋白,但近来的研究发现不止如此。LTF 除与抗菌、抗病毒、抗真菌、抗炎和促进免疫细胞生长相关,是人类固有免疫的重要成员之一等功能外,还与细胞增殖分化调节相关,有抗氧化、抗肿瘤作用^[6]。1994 年 Bezault 等^[7]发现 LTF 基因能抑制用甲基胆蒽诱导小鼠产生的纤维肉瘤和体外 NIH3T3 细胞株的生长,也能减少黑色素肉瘤在小鼠体内实验中的转移。自此 LTF 基因被视为重要的抑癌基因。有文献报道 LTF 的抗肿瘤的作用机制是多种多样的,可能与调节 NK 细胞活动,肿瘤化学预防活动,G_i 蛋白表达的调节,抑制细胞增殖,增强细胞凋亡相关^[8]。

在动物实验中,LTF 能抑制小鼠实体肿瘤的发展和代谢而起到抑癌作用^[9]。LTF 在多种肿瘤组织中表达下调,如鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、恶性胶质瘤、前列腺癌、口腔鳞癌等^[8,10]。LTF 失活的机制是多种多样的。在肿瘤里低表达的机制大致可分为基因水平相关和表观遗传学相关,前者包括杂合性缺失(loss of heterozygosity,LOH)和基因突变,后者包括启动子甲基化和组蛋白去乙酰化修饰相关。

二、LF 的抗肿瘤作用

与抗炎过程一样,LF 亦能在肿瘤内调节各种细

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院消化内科(诸葛小菊、陈仁聘、黄智铭);温州医科大学附属第二医院消化内科(卢光荣)

通讯作者:黄智铭,教授,电子信箱:zhugxj2010@126.com

胞因子的产生和表达。Zhang 等^[11]研究发现 LTF 转染鼻咽癌细胞株后,较多细胞停滞在 G₁ 期,而相对的 S 期、G₂ - M 期细胞减少,这提示在 LTF 介导的抑制细胞周期中存在着特殊的细胞周期调节机制。在动物实验中,用 HLF 重组体治疗小鼠的肿瘤模型发现,和安慰剂对比能 60% 的抑制小鼠上肿瘤的生长,增加有抑癌作用的细胞因子如 IL - 18,激活 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞^[12]。近来 Giuffrè 等^[13]通过对比观察 LF 在人肾细胞癌及癌旁组织的免疫表达发现 LF 有抗癌作用。同时,Wolf 等^[14]也有相同的结论,LF 在头颈部鳞状细胞癌内能抑制 T 细胞依赖的肿瘤的生长。

三、LTF 基因和鼻咽癌

Zhou 等^[15-17]在鼻咽癌组织,癌旁组织和鼻咽慢性炎症组织差异表达谱和组织芯片分析中发现,LTF 在鼻咽癌里表达显著下降,而在鼻咽癌旁和鼻咽慢性炎症组织中存在高表达,几乎所有的鼻咽部腺体均能检测到 LTF 蛋白的存在,证实 LTF 蛋白在腺体中高表达、为一细胞分泌性蛋白。而且,相对早期的 T I 期和 T II 期鼻咽癌 LTF 表达阳性率为 61.25%,而相对晚期的 T III 和 T IV 期鼻咽癌组织中 LTF 阳性率为 40.82%,并且与淋巴转移相关。提示其可能与鼻咽癌的侵袭转移和临床进展有关,为鼻咽癌候选易感基因,可作为鼻咽癌侵袭、转移和临床进展预测的分子靶标。亦有其他文献报道的 LTF 低表达现象,其用 RT - PCR 和 real - time PCR 方法研究发现 LTF 基因在 76% 的鼻咽癌组织中表达缺失或下调,同样支持 LTF 基因的低表达和淋巴转移相关,并提出 LTF 失活机制主要与启动子甲基化、突变和 LOH 有关。Zhang 等^[18]报道 LTF 基因在鼻咽癌组织和 7 种鼻咽癌细胞株中表达下调,而且在其 6 种细胞株下调与甲基化相关,另一种与 LOH 和基因突变相关。进一步研究发现,用去甲基化剂逆转细胞株甲基化情况后,LTF 可以重新表达上调,结果提示在鼻咽癌里 LTF 的抑癌机制和启动子甲基化高度相关,且可被逆转,由此推测 LTF 基因可能在鼻咽癌发生、发展中发挥了重要作用,是一个鼻咽癌的候选抑癌基因。另有文献报道 LTF 在鼻咽癌细胞株 CNEI.5 - SF 以及 HNEI 细胞中 L 能够延缓体外细胞株生长、抑制肿瘤形成^[19]。

四、LTF 和肺癌

Iijima 等^[10]系统的研究 LTF 在数种肺癌细胞株和原发非小细胞肺癌中的表达情况,发现 LTF 在 16/27(59%) 的小细胞肺癌(SCLC)细胞株内表达缺失;在非小细胞肺癌(NSCLC)亚型内表达缺失比例

分别是,腺癌 23/29(79%),鳞癌 4/5(80%),大细胞癌 3/5(60%),恶性间皮瘤 2/3(67%)。这一点与之前 Finkbeiner 等研究的结果 LTF 基因在 NSCLC 细胞株 9/12 中表达缺失一致。并且,使用去甲基化剂 5 氮杂胞苷处理其中的 4 中肺癌细胞系(NCI - H1299, - H1437, - H1666 和 - H2009)后,其 LTF 基因能恢复表达。这证明在肺癌内 LTF 也极有可能是抑癌基因,其表达失活机制与启动子甲基化相关,而且有被逆转修复的可能。Iijima 等^[10]的实验中选取其中被 5 氮杂胞苷处理后 LTF 能恢复表达的两个细胞系(NCI - H1299, NCI - H2009)和 5 氮杂胞苷处理后 LTF 未能恢复表达的一个细胞系 NCI - H1264,分别用亚硫酸盐修饰 DNA 测序方法分析 LTF 5'端 14 个 CpG 位点的甲基化情况,发现这前两个细胞系大多数位点都是高度甲基化,而 NCI - H1264 没有一个位点发现甲基化。测序结果发现 5'端的 14 个 CpG 位点中 3、4、5、6、11 是与 LTF 基因表达相关的常甲基化位点。做过同类研究的 Yang 报道 4、5、9、11、12 这 5 个 CpG 位点可能和 LTF 基因表达相关的常甲基化位点。综合两人的意见,4、5、11 这 3 个 CpG 位点有可能和 LTF 基因表达相关的常见甲基化位点。在肺癌中除启动子位点甲基化和 LTF 基因表达沉默相关外,还有一个重要的因素——组蛋白去乙酰化修饰。至于两者是否有协同作用,Maass 等报道联合使用去甲基化剂和组蛋白去乙酰化抑制剂与单用其中一种治疗并没有提高 LTF 基因的 mRNA 表达,这提示启动子甲基化和组蛋白的去乙酰化修饰两者在肺癌细胞株内影响 LTF 表达沉默的机制是独立的。此外,肺癌内 LTF 基因表达沉默从基因水平上说,也与基因突变相关。表观遗传学特别是 DNA 甲基化的改变是各种抑癌基因异常失活的重要机制,而相关甲基化位点的发现将为去甲基化靶点提供科学依据。

五、LTF 和前列腺癌等其他肿瘤

Shaheduzzaman 报道在前列腺癌肿瘤细胞内 LTF mRNA 表达下降和患者体内的 PSA 表达降低相关。在前列腺癌组织和前列腺癌 4 种细胞系内均发现 LTF 启动子下游 CpG 岛甲基化现象。在细胞实验中,LTF 蛋白的补给治疗可以减慢肿瘤细胞生长,细胞周期分析提示使用 LTF 蛋白治疗增加细胞凋亡。提示 LTF 有潜能运用于前列腺癌的化学预防,及成为其预后的生物相关分子标志物。

Sousa 通过蛋白质组学的方法研究正常胃黏膜,化生胃黏膜到胃癌这个过程蛋白表达的特征,

LTF 的蛋白在胃癌降低表达,这个差异在胃癌演化过程中是有意义的。研究认为,LTF 和 DMBT1 可以分别作为 SPEM 和 IM(肠型化生)的强分子标志物,且 LTF 的低表达和胃癌的预后差相关,与分期无关。但是 LTF 基因在胃癌的研究中缺乏较大样本(Sousa 实验中针对胃癌仅进行 3 个样本量的研究)的检验,其失活机制有待进一步研究。笔者通过细胞水平的验证,发现 LTF 基因在胃癌细胞株 SGC-7901、MGC-803、BGC-823 中其启动子区域是高甲基化的,且这种状态与 LTF mRNA 在胃癌细胞株中的低表达显著相关。LTF 能通过体内某些信号通路如 NF- κ B 来激活基因的表达。目前数据显示,大多数的肿瘤中 LTF 越低的表达和越差的预后相关,这也支持 LTF 在胃癌肿瘤中起一个保护角色的观点。人类大多数肿瘤是多基因遗传性的肿瘤,这表示肿瘤的发生不是单个基因决定的,是有多个基因多个步骤不同时间空间协同发生的,是个动态的过程。利用转录组学和蛋白组学方法检测到对鼻咽癌来说的重要功能基因 SPLUNC1、LTF、NOR1、BRD7、NAG7 和 LPLUNC1 等参与 Wnt/ β -catenin、ras/MEK/ERK、JNK、Rb/E2F、AKT、细胞周期、p53 通路、细胞外基质-受体相互作用、免疫反应相关通路以及酶活性通路。这表明包括 LTF 在内的抑癌基因等可能都是处于这个连锁反应的关键部位,个别基因的失活是有其他因素的诱导调控(这些因素可能是理化因素、生物因素环境因素等,也有可能是抑癌基因的时候或者癌基因的激活),也有可能成为下一步肿瘤演变中的推动力量。这提示如果控制肿瘤形成的关键靶点,可以切断其演变的进程。

综上所述,LTF 在多种肿瘤里表现为抑癌基因性质。LTF 在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用,如调节 NK 细胞活动,肿瘤化学预防活动, G_1 蛋白表达的调节,抑制细胞增殖,增强细胞凋亡。但是更多的研究发现,LTF 在多种肿瘤中呈现低表达,其表达失活的原因主要涉及基因水平和表观遗传学水平的调节机制。如 LTF 基因启动子区高甲基化,组蛋白去乙酰化修饰,杂合性缺失和基因突变。在接下来的研究中,我们应从多维度对 LTF 基因的抗肿瘤机制进行进一步的研究,同时靶向调控抑制其在肿瘤中的异常失活状态。

参考文献

- 1 Kost - Alimova M, Imreh S. Modeling non - random deletions in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2007,17(1):19 - 30
- 2 Metz - Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, *et al.* Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other-

- transferrins[J]. *Eur J Biochem*, 1984,145(3):659 - 676
- 3 韩柱,侯小康. 人乳铁蛋白异源表达的研究进展[J]. *河北化工*, 2010,33(10):26 - 28
- 4 Querinjean P, Masson PL, Heremans JF. Molecular weight, single - chain structure and amino acid composition of humanlactoferrin[J]. *Eur J Biochem*, 1971,20(3):420 - 425
- 5 Iyer S, Lonnerdal B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism[J]. *Eur J Clin Nutr*, 1993,47(4):232 - 241
- 6 Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review[J]. *Haematologica*, 1995,80(3):252 - 267
- 7 Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, *et al.* Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimentalmetastases in mice[J]. *Cancer Res*, 1994,54(9):2310 - 2312
- 8 Shaheduzzaman S, Vishwanath A, Furusato B, *et al.* Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancerprogression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007,6(7):1088 - 1095
- 9 Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, *et al.* Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimentalmetastases in mice[J]. *Cancer Res*, 1994,54(9):2310 - 2312
- 10 Iijima H, Tomizawa Y, Iwasaki Y, *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of LTF gene at 3p21.3 in lung cancers[J]. *Int J Cancer*, 2006,118(4):797 - 801
- 11 Zhang H, Feng X, Liu W, *et al.* Underlying mechanisms for LTF inactivation and its functional analysis innasopharyngeal carcinoma cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2011,112(7):1832 - 1843
- 12 Wang WP, Iigo M, Sato J, *et al.* Activation of intestinal mucosal immunity in tumor - bearing mice by lactoferrin[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000,91(10):1022 - 1027
- 13 Giuffre G, Barresi V, Skliros C, *et al.* Immunoexpression of lactoferrin in human sporadic renal cell carcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2007,17(5):1021 - 1026
- 14 Wolf JS, Li G, Varadhachary A, *et al.* Oral lactoferrin results in T cell - dependent tumor inhibition of head and necksquamous cell carcinoma in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(5):1601 - 1610
- 15 Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, *et al.* Lactotransferrin: a candidate tumor suppressor - deficient expression in humannasopharyngeal carcinoma and inhibition of NPC cell proliferation by modulatingthe mitogen - activated protein kinase pathway[J]. *Int J Cancer*, 2008,123(9):2065 - 2072
- 16 Xiong W, Zeng ZY, Xia JH, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngealcarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004,64(6):1972 - 1974
- 17 Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, *et al.* Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma bymicroarray analysis of subtracted cDNA libraries constructed by suppressionsubtractive hybridization[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2008,17(6):561 - 571
- 18 Zhang H, Feng X, Liu W, *et al.* Underlying mechanisms for LTF inactivation and its functional analysis innasopharyngeal carcinoma cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2011,112(7):1832 - 1843
- 19 翟艳辉,李莹,胡文,等. 染色体 3p21_3 缺失区域 11 个相关基因在非小细胞肺癌中的表达[J]. *中国肺癌杂志*, 2009,12(8):853 - 858
(收稿日期:2013 - 11 - 19)
(修回日期:2013 - 12 - 11)