

# 抗 hARD1 抗血清制备及其初步肿瘤免疫组化分析

余敏<sup>1#</sup>, 黄超<sup>1#</sup>, 向明钧<sup>1</sup>, 赖建华<sup>1</sup>, 杨慧<sup>2</sup>, 马明星<sup>1</sup>, 谭德勇<sup>1</sup>

1 云南大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室, 昆明 650091

2 云南省第一人民医院病理科, 昆明 650032

**摘要:** 人 ARD1(human arrest defective 1, hARD1)基因被确定具有 N-乙酰基转移酶活性, 但其生理学功能并不清楚。为了探讨 hARD1 基因与肿瘤的关系, 检测 hARD1 蛋白在不同肿瘤中的表达, 克隆了 hARD1 基因并进行原核表达, 利用镍离子螯合(His-bind)柱层析纯化, 得到纯度达 95%以上的 hARD1 蛋白。以纯化的重组蛋白免疫小鼠, 制备了抗 hARD1 蛋白的抗血清。利用抗 hARD1 多抗血清检测常见的临床肿瘤病理组织, 发现 hARD1 蛋白在乳腺肿瘤、前列腺癌, 以及肺癌中有较高频率的表达, 其中乳腺肿瘤中的表达频率最高, 达到 70%, 远高于其他肿瘤组织。表明 hARD1 蛋白的高表达可能是乳腺肿瘤组织的一个标志, 为进一步揭示 hARD1 与乳腺肿瘤的关系奠定了基础。

**关键词:** hARD1 基因, 免疫组化分析, 肿瘤

## hARD1 Antiserum Preparation and Primary Immunohistochemical Analysis of hARD1 in Tumor Tissues

Min Yu<sup>1#</sup>, Chao Huang<sup>1#</sup>, Mingjun Xiang, Jianhua Lai<sup>1</sup>, Hui Yang<sup>2</sup>, Mingxing Ma<sup>1</sup>, and Deyong Tan<sup>1</sup>

1 Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China

2 Department of Pathology, First Peoples Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China

**Abstract:** Human arrest defective 1(hARD1) is an acetyltransferase; its physiological significance remains unclear. To explore the relationship between ARD1 protein and tumors, we detected the hARD1 protein in tumor tissues *in vivo*. We cloned hARD1 gene from Hela cell and construct recombinant plasmid pET28b-hARD1. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pysS. hARD1 protein was expressed by inducing with IPTG(1 mmol/L) and purified up to 95% through Ni<sup>2+</sup> chelation affinity chromatography. We used the purified hARD1 protein as antigen immunized the Balb/c mice and obtained the hARD1 specific polyclonal antiserum. Through immunohistochemical analysis of different tumor tissues *in vivo*, we found that hARD1 expressed at high frequency in breast cancer, prostate cancer and lung cancer, especially, hARD1 expression frequency in breast cancer was up to 70%, which is higher than in the other tumors. These results indicate that the high expression level of hARD1 could be an indicator of the breast cancer. This new finding would be a foundation to further explore the relationship between breast tumor and hARD1.

**Keywords:** hARD1 gene, immunohistochemical analysis, tumors

**Received:** November 12, 2007; **Accepted:** December 10, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30360040, 30760057) and Science & Technological Key Project of Yunnan Province (No. 2006SG09).

**Corresponding author:** Deyong Tan. Tel: +86-871-5032061; Fax: +86-871-5032061; E-mail: dytan@ynu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos. 30360040, 30760057), 云南省科技厅攻关项目(No. 2006SG09)资助。

# They are the co-first authors.

#为共同第一作者。

ARD1(Arrest defective 1)最初在酵母细胞中被发现,是N-乙酰基转移酶NatA的一个亚基,另一个亚基是Nat1<sup>[1]</sup>。ARD1在酵母细胞中能够形成同二聚体或与NAT1组成异二聚体<sup>[2]</sup>。NAT1和ARD1中任何一个亚基的缺失都导致NatA活性丧失,致使酵母表现出多种异常表型,包括结合型决定座位(HML)的重组抑制,在贫营养状态下不能进入G0期以及染色体不稳定<sup>[1,3-5]</sup>。ARD1缺陷的菌株N末端为Ser、Ala、Gly、Thr的许多蛋白质不能被正确乙酰化<sup>[6]</sup>。在低等真核生物中,ARD1对于N-乙酰基转移酶NAT的活性表达是必需的<sup>[1,3]</sup>。Naoaki等<sup>[7]</sup>的研究表明,ARD1基因是一个进化保守序列,组成NAT的ARD1亚基在哺乳动物细胞内能够独立作为乙酰基转移酶发挥作用,因此推测ARD1可能是一种新的乙酰基转移酶<sup>[8,9]</sup>。

人ARD1(hARD1)基因与酵母的ARD1基因具有高度同源性,定位于人的Xq28区域,全长5019 bp,含有7个外显子,编码235个氨基酸,蛋白质分子量预测为26.5 kD<sup>[10]</sup>。研究报道它对缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )的稳定作用有影响<sup>[11-13]</sup>,RNAi技术干扰NATH或hARD1基因表达能诱导Hela细胞凋亡<sup>[14]</sup>。最近的研究发现在肺癌细胞中,hARD1可能通过激活 $\beta$ -catenin的活性,从而增强 $\beta$ -catenin与转录因子TCF4的结合,增强ClyclinD1的转录活性,进而促进细胞的增殖<sup>[15]</sup>。由此可见,hARD1蛋白的表达可能与肿瘤细胞的增殖调控有关。但hARD1蛋白与肿瘤发生的关系并没有明确的结论。本研究克隆了hARD1基因,并在大肠杆菌中表达hARD1重组蛋白,以表达的纯化蛋白免疫小鼠制备抗hARD1蛋白的抗血清,并进行临床肿瘤病理组织的免疫组织化学分析,探讨hARD1表达与肿瘤的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒和菌株: pET28b质粒购自Novagen公司; BL21(DE3)、HB101菌株和Hela细胞株, MCF-7细胞株由本实验室保存; pMD18-T载体购自TaKaRa(大连)公司。

试剂: RNA抽提试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司; 逆转录试剂盒购自Bio Basic Inc.; 连接试剂盒和限制性内切酶购自

TaKaRa(大连)公司; 引物由上海博亚公司合成; His-Bind镍亲和层析柱购自Novagen公司, ABC(AP)试剂盒购自华美生物工程公司, SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。其他试剂均为进口或国产的分析纯。临床肿瘤样本由云南省第一人民医院病理科提供,按常规病理检测确定,所有样本均为原发性肿瘤。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 hARD1基因的克隆

(1) RT-PCR扩增目的基因: 按常规方法培养Hela细胞,提取Hela细胞总RNA,按逆转录试剂盒说明合成cDNA第一条链。参考GenBank(NM\_003491)hARD1基因序列及表达载体pET-28b多克隆位点,应用Primer5软件设计引物。在引物5'端带有Nde I和3'端带有Hind III酶切位点接头以便克隆到原核表达载体上。上游引物: 5'-CATATGAACA TCCGCAATGCGAGGCCA-3'; 下游引物: 5'-AAGC TTACTAAGGCTCTAGGAGGCTGAGTCGGA-3'。以逆转录产物为模板扩增hARD1编码框序列。扩增条件: 94°C预变性2 min; 94°C 20 s, 58°C 20 s, 72°C 90 s, 35个循环; 72°C延伸5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,并对PCR扩增产物进行胶回收。

(2) PCR产物的克隆与测序: 将胶回收产物和pMD18-T载体以5:1的比例混合,用T4 DNA连接酶16°C连接过夜,转化HB101感受态,涂布于含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上。挑取阳性克隆于3 mL LB抗性培养基中培养,抽提质粒DNA,用PCR方法鉴定重组克隆,选取含目的片段的单克隆送上海生工生物技术有限公司测序。所获得的重组质粒命名为pMD18-hARD1。

(3) pET28b-hARD1表达质粒的构建: 将pMD18-hARD1质粒和pET28b载体分别用Nde I和Hind III限制性内切酶消化,酶切产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳分离并分别回收酶切产物hARD1基因片段和pET-28b载体片段。将回收产物以5:1的比例混合,用T4 DNA连接酶16°C连接过夜,构建表达质粒pET28b-hARD1,转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态,涂布于含50 mg/L卡那霉素的LB平板上,37°C培养过夜。挑选菌落,抽提质粒DNA,经酶切鉴定筛选阳性单克隆并送上海生工生物技术有限公司测序。

### 1.2.2 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

(1) 重组蛋白的诱导表达: 将测序正确的重组菌株在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上划单克隆, 挑选单菌落接种于 3 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养过夜。次日分别按 1:100 的比例接种于两瓶含有 50 mg/L 卡那霉素的 20 mL LB 液体培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  0.6~0.8, 于其中一瓶加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 3~5 h, 分别离心收集菌体。按常规方法制备蛋白样品, 选用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝染色, 用凝胶图象分析系统扫描凝胶并测算蛋白产量。

(2) 包涵体的分离: 将诱导后的菌液离心, 收集菌体, 加入 2 mL 缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCL, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl 和 5% 甘油, pH 8.0) 和 100  $\mu$ L 溶菌酶 (10 mg/mL) 于摇床上 37°C 反应 30 min。在裂解液中加入终浓度为 2% 的脱氧胆酸钠盐(DOC), 静置 10 min 后低温进行超声波破碎。将菌体裂解液 10 000 r/min 离心 5 min, 保留上清, 沉淀用 10 mL 盐酸胍 (2 mol/L) 洗涤, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀再用 9 倍体积缓冲液 B (2 mol/L 盐酸胍, 0.5% TritonX-100 和 10 mmol/L EDTA) 洗涤, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用缓冲液 C (8 mol/L 尿素, 10 mmol/L 咪唑, 0.1 mol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl) 溶解后 10 000 r/min 离心 10 min, 上清即为分离溶解后的包涵体。

(3) 重组蛋白的纯化: 用 3 倍柱体积缓冲液 C 平衡 His-Bind Column 后, 按照 Ni-IDA agarose 的容量 (10 mg/mL) 将溶解的包涵体上柱, 分别用含 30 mmol/L, 150 mmol/L 咪唑的缓冲液冲洗 Ni 柱, 收集洗脱液。将洗脱液进行 12% SDS-PAGE 分析, 检测纯化效果。纯化的 hARD1 蛋白质浓度测定后, -20°C 保存。

(4) 质谱鉴定: 纯化的 hARD1 蛋白经 12% SDS-PAGE 后, 用考马斯亮蓝染色。将含有蛋白的条带切下, 送上海基康生物技术公司进行质谱分析。

### 1.2.3 抗血清制备及检测

(1) 抗血清制备: 将纯化后的 hARD1 蛋白进行 12% SDS-PAGE 后采用考马斯亮蓝染色, 将 hARD1 对应的条带切下, 按 1:1 比例(重量体积比)加入 1×PBS 缓冲液, 低温研磨破碎并用 1×PBS 缓冲液稀

释, 将稀释液免疫 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。第一次免疫时蛋白与等量弗氏完全佐剂充分混合, 进行皮下多点注射, 10 d 后蛋白与等量弗氏不完全佐剂充分混合对小鼠进行腹腔注射, 20 d 后再与同样剂量加强免疫 1 次。取血前 4 d 对小鼠断尾取血测定抗体效价, 符合要求后再加强免疫 1 次, 2 d 后进行眼眶取血, 分离血清后分装, -20°C 保存。

(2) Western blotting 检测: 取 25 mL 正常培养 Hela 细胞 1 瓶, 用 0.25% 胰酶消化, 10 000 r/min 离心收集细胞, 加入 100  $\mu$ L RIPA 细胞裂解液, 0.5  $\mu$ L PMSF(100 mmol/L), 冰上放置 30 min, 加 100  $\mu$ L 2×上样缓冲液, 混匀, 按常规方法进行 SDS 电泳, 转膜。将抗血清稀释 1500 倍, 采用 ABC(AP)试剂盒按说明书进行 Western blotting 分析。

(3) 抗血清预吸收实验: 为了确定抗血清的特异性, 将纯化的 hARD1 蛋白进行 12% SDS-PAGE 并转移到硝酸纤维素膜上, 将转移后的膜按泳道剪成小条。取抗 hARD1 抗血清 3 份, 每份 20  $\mu$ L, 其中一份为对照, 不加蛋白样品, 另两份分别加入 75  $\mu$ g 纯化的 hARD1 蛋白和 100  $\mu$ g pET-28 空白质粒转化的宿主菌蛋白裂解液, 用含有 1% BSA 的 TBS 调整总体积为 100  $\mu$ L, 4°C 过夜, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 分别与含重组 hARD1 的转移膜进行 Western blotting 检测, 方法同于常规 Western blotting 方法。

### 1.2.4 细胞及临床组织免疫化学检测

(1) MCF-7 细胞免疫化学检测: 将干净的盖玻片置于 6 孔培养板中, 按常规方式接种 MCF-7 细胞到培养孔中, MEM 培养基, 10% 胎牛血清, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 使细胞附着在盖玻片上。取出盖玻片, 用固定液(30% PBS+45% 丙酮+10% 甲醛)固定后, 按常规方法进行细胞免疫化学检测。

(2) 肿瘤组织免疫化学检测: 肿瘤组织石蜡切片由云南省第一人民医院病理科进行鉴定, 按病理免疫组织化学检测要求制片, 用 SP 试剂盒检测, 抗血清稀释 500 倍, 操作步骤参照试剂盒说明书进行。免疫组织化学结果由病理学专业人员按病理学判断标准进行结果判断,  $\chi^2$  统计方法进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 hARD1 cDNA 的克隆

从 Hela 细胞中抽提总 mRNA, 逆转录后 PCR 扩

增 hARD1 基因编码区, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物与目的基因 (705 bp) 大小一致。将 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上, 得到重组质粒 pMD18-hARD1。转化 HB101 菌株, 随机挑取 5 个 Amp 抗

性克隆。经菌液 PCR 检测, 获得 3 个阳性克隆, 并将 3 个阳性克隆测序, 测序结果与原始序列比对, 克隆序列与 GenBank 收录的序列 (NM\_003491) 一致, 并包含完整阅读框 (Fig. 1)。

```

1  atgaacatccgcaatgagccagaggaacctaataatgaacatgcagcactgcaacccctctgctgcccagaaactaccagatgaaatac
   M N I R N A R P E D L M N M Q H C N L L C L P E N Y Q M K Y
91  tactttaccatggcctttctgccccagctctcttacattgctgaggacgagaatgggaagattgtggggatgtctggccaaaatg
   Y F Y H G L S W P Q L S Y I A E D E N G K I V G Y V L A K M
181  gaagaggaccacagatgatgtgccccatggacatatcacctcactggctgtgaagcgttccaccggcgccctgctgctcagaaactg
   E E D P D D V P H G H I T S L A V K R S H R R L G L A Q K L
271  atggaccaggcctctcagccatgatagagaacttcaatgccaaatatgtctccctgcattgcaggaagagtaaccggggccgcctgcac
   M D Q A S R A M I E N F N A K Y V S L H V R K S N R A A L H
361  ctctattccaacacccctcaactttcagatcagtggaagtggagcccaataactatgcagatggggaggagcgcctatgccatgaagcgggac
   L Y S N T L N F Q I S E V E P K Y Y A D G E D A Y A M K R D
451  ctcaactcagatggccgacgagctgaggaggcaacctggagctgaaagagaagggcaggcagctgggtgctgggtgcatcgagaacaaggatg
   L T Q M A D E L R R H L E L K E K G R H V V L G A I E N K V
541  gagagcaaaaggcaattcacctccagctcaggagaggcctgtgcgaggagaaaggcctggctgcccaggatagtggtggggacagcaag
   E S K G N S P P S S G E A C R E E K G L A A E D S G G D S K
631  gacctcagcgaggtcagcgagaccacagagacacagatgtcaaggacagctcagaggcctccgactcagcctcctag
   D L S E V S E T T E S T D V K D S S E A S D S A S

```

图 1 hARD1 基因的核苷酸序列和氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequence of hARD1 gene

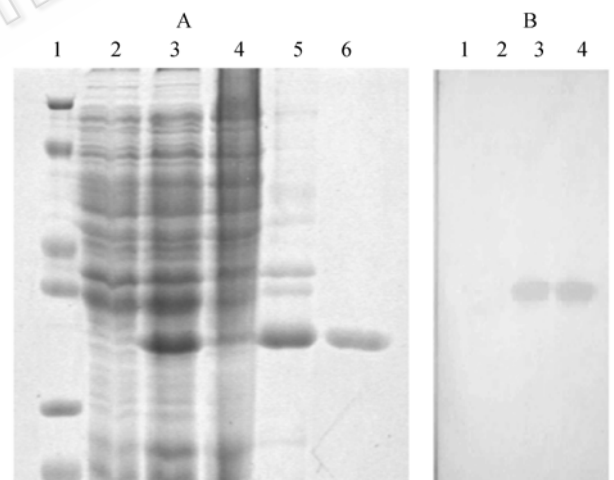
## 2.2 hARD1 重组蛋白的表达与纯化

将已克隆的质粒 pMD18-hARD1 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 消化, 获得 hARD1 基因片段, 再亚克隆到 pET-28b 载体上, 得到重组质粒 pET28b-hARD1, 转化 BL21(DE3) 细胞。

抽提重组质粒 DNA, 经 *Nde* I / *Hind* III 双酶切后电泳检测, 结果显示酶切产物与 pET-28b 载体和 hARD1 基因片段大小一致。

pET28b-hARD1 转化菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝染色后分析, 在分子质量约 26 kD 附近诱导菌有一明显蛋白条带, 而非诱导菌没有 (Fig. 2), 这与 His-hARD1 融合蛋白分子量相符。表明诱导表达成功。电泳分析显示, 表达产物主要以包涵体形式存在, 在裂解液的上清液中也有微弱的表达产物 (Fig. 2)。凝胶图像扫描分析表明, 表达产物约占全菌总蛋白的 15%。

为了纯化 hARD1 蛋白, 将包涵体经洗涤、溶解后再上  $\text{Ni}^{2+}$  纯化柱。将洗脱液进行 12% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。纯化产物除 hARD1 特异条带外, 基本无其他条带 (Fig. 2)。凝胶成像分析, hARD1 纯



1: marker; 2: no induced; 3: induced by Western map with Ab IPTG; 4: induced, plasma; 5: inclusion 1: marker; 2: no induced; body; 6: purified product 3: induced; 4: plasma

图 2 hARD1 重组蛋白的表达及纯化

Fig. 2 Expression and purification of recombinated hARD1 protein

Protein marker: protein molecular mass marker; No IPTG: pET28b-Ard1 without IPTG induction; IPTG: pET28b-Ard1 protein induced with 1 mmol/L IPTG; Supernatant: supernatant of pET28b-Ard1 protein lysate, induced with 1 mmol/L IPTG; Precipitation: precipitation of pET28b-Ard1 protein lysate induced with 1 mmol/L IPTG (washed twice); Purified ARD1: purified ARD1 protein

度达 95% 以上。纯化蛋白经质谱分析, 肽段序列有 25%(59/235)与 hARD1 肽链序列一致, 并且没有其他蛋白的肽段序列出现, 表明表达产物为 hARD1 蛋白, 并且纯化产物达到很高的纯度。

2.3 抗血清制备及鉴定

纯化的 hARD1 蛋白经 SDS-PAGE 后用考马斯亮兰染色, 回收 hARD1 蛋白的凝胶条带, 免疫小鼠, 获得了 hARD1 抗血清。抗血清进行 Western blotting 分析, 结果显示所获得的抗血清仅与诱导的 pET28b-hARD1 转化菌裂解液以及纯化的重组 hARD1 蛋白反应, 着色清晰(Fig. 3A)。用 HeLa 细胞裂解液进行 Western blotting 检测, 在相应分子量的位置可见抗体染色条带(Fig. 3B)。用过量的重组 hARD1 蛋白预吸收的抗血清不能与 hARD1 蛋白反应, 而过量的含有 His 标签的宿主细胞裂解液预吸收的抗血清与 hARD1 蛋白有反应(Fig. 3C)。用抗血清与培养的 MCF-7 细胞进行细胞免疫检测, 可以看到明显的染色信号, 而未免疫的对照血清没有染色信号(Fig. 3D)。上述检测结果表明所得抗血清对重组 hARD1 蛋白和细胞内源性 hARD1 蛋白都有特异性反应。

2.4 肿瘤组织中 hARD1 蛋白的免疫组织化学分析

用已制备的抗 hARD1 抗血清对临床肿瘤病理

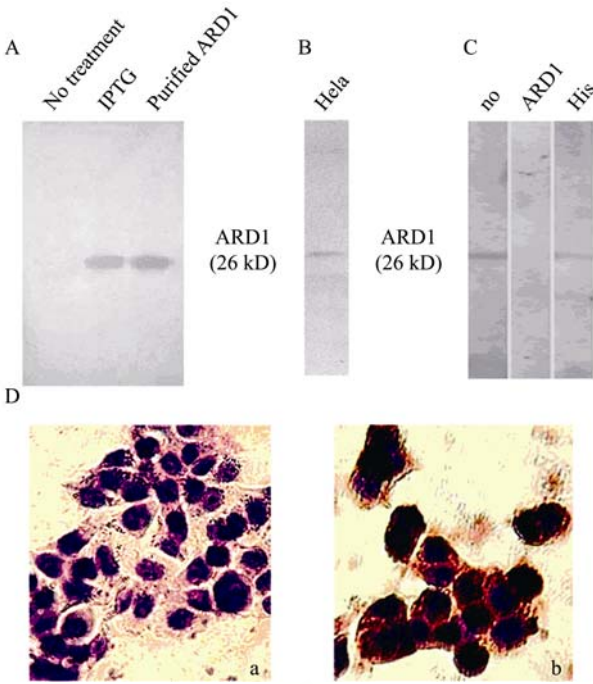


图 3 抗 hARD1 抗血清特异性检测

Fig. 3 Specificity of anti-hARD1 antiserum

A: specificity of anti-ARD1 antiserum in Western blotting assay on protein extracts from ARD1 transformed *E. coli*. ARD1 expression was induced upon IPTG for 5 h. Purified ARD1 protein served as control. B: the ARD1 protein of HeLa cell extract; C: preadsorption control by Western blotting analysis. Anti-ARD1 antiserum was preadsorbed without antigen(no), or with an excess of purified ARD1-His-tagged protein (ARD1) or with an excess of empty vector-transformed host cell lysate(His). D: immunocytochemistry assay of MCF7 cells reacted with control serum(a) and with anti-ARD1 antiserum(b)

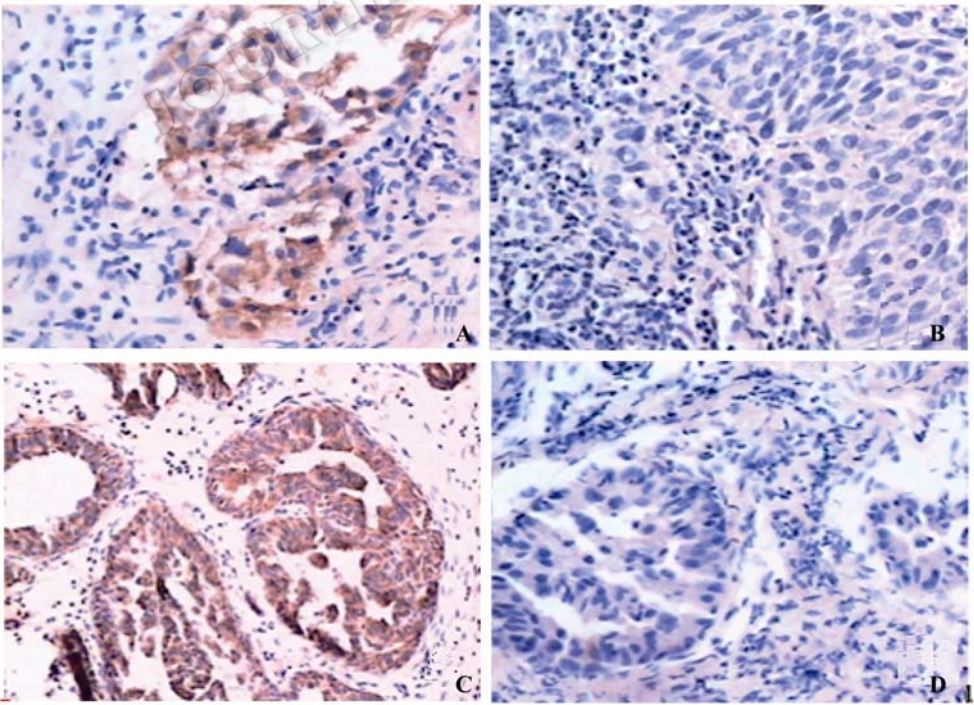


图 4 hARD1 蛋白在肿瘤组织中的免疫组化分析

Fig. 4 hARD1 immunohistochemical stain of tumors tissues

A, C: breast cancer tissue; B, D: breast tissue without cancer



组织进行免疫组织化学检测,发现 hARD1 基因在乳腺肿瘤组织中有表达(Fig. 4A, 4C),而在非肿瘤的乳腺组织中没有表达(Fig. 4B, 4D)。对 115 例不同类型肿瘤样本进行同样的分析,结果发现 hARD1 蛋白在乳腺肿瘤中的表达频率最高,达到 70%,在前列腺癌中阳性率达 66.7%,甲状腺癌和肺癌中阳性率分别为 36.4%和 33.3%,而在其他肿瘤(子宫内膜癌、卵巢癌、肝癌、肠癌等)中阳性率较低,只达到 10%~20%(Table 1)。进一步分析表明:与各种肿瘤样本的平均阳性率相比,在乳腺肿瘤样本中 hARD1 染色阳性率达到极显著差异( $P<0.0001$ )。虽然前列腺癌中的阳性率达到 66.7%,胆囊癌中的阳性率达到 50%,但由于样本量较少,其阳性率有待进一步验证。除此之外,其他类型的肿瘤样本中 hARD1 阳性率都较乳腺肿瘤的低。

表 1 hARD1 蛋白在不同肿瘤中的表达频率  
Table 1 hARD1 expression frequency in the different cancer

Tumor type	Sample number	Positive sample number	Positive sample expression ratio (%)
Endometrial cancer	11	1	9
Thyroid carcinoma	11	4	36.4
Ovarian cancer	9	1	11
Hepatoma	5	1	20
Intestines cancer	10	2	20
Lung cancer	14	4	33.3
Renal carcinoma	5	1	25
Prostatic carcinoma	3	2	66.7
Stomach cancer	10	2	20
Gallbladder carcinoma	6	3	50
Brain tumor	12	2	16.7
Lymphadenoma	12	3	25
Breast cancer	10	7	70

### 3 讨论

hARD1 基因是近年才被关注的一个基因,为研究 ARD1 的功能,我们克隆了人 ARD1 基因(hARD1),并在大肠杆菌中成功地表达了 hARD1 重组蛋白,制备了特异性很好的抗血清,这些工作为 ARD1 基因及其蛋白的功能研究奠定了良好的基础。

我们通过免疫组织化学检测了 hARD1 在各种人肿瘤组织中的表达,发现在人类常见的 13 种肿瘤

中, hARD1 基因在乳腺肿瘤样本中的表达频率远远高于其他肿瘤。 $\chi^2$  分析表明, hARD1 基因在乳腺肿瘤中的表达明显高于其他肿瘤组织( $P<0.0001$ ),表达 hARD1 蛋白的组织为乳腺肿瘤的可能性很高( $OR=6.647$ )。因此, hARD1 蛋白的表达可能是乳腺肿瘤组织的一个潜在标志。

同时, hARD1 与乳腺肿瘤的关系也得到生物信息学分析的验证。将 hARD1 基因的 cDNA 序列输入到 NCBI 基因数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行 SAGE 分析,其中一个 Tag 序列 AAGCGGGACC 在乳腺癌细胞系 ZR75-1 中的表达强度达到百万分之 289(12/41401),而经乳腺癌治疗药物 tamoxifen 处理的 ZR75-1 细胞中的表达强度只有百万分之 194(10/51417) (Fig. 5)。由于 tamoxifen 是一种乳腺癌治疗药物,它对乳腺癌细胞中 ARD1 表达的影响间接地反映了 hARD1 与乳腺癌的关系。

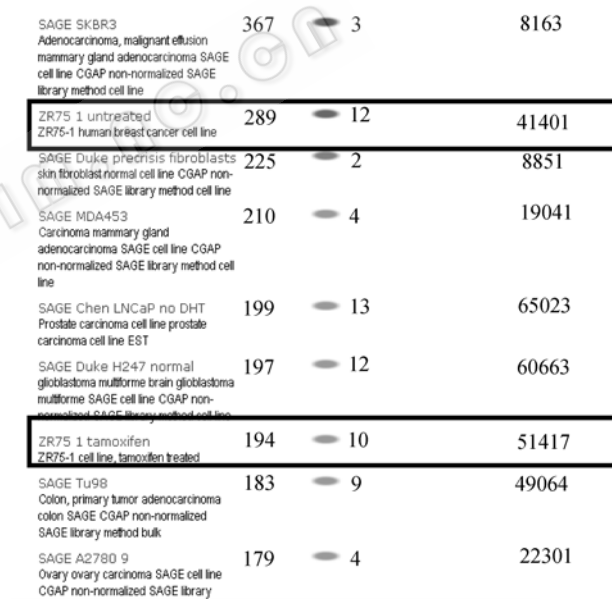


图 5 hARD1 cDNA 的 SAGE 分析  
Fig. 5 The SAGE map of hARD1 cDNA

乳腺癌是女性肿瘤中发病率最高的肿瘤,占有所有肿瘤的 23%,据世界范围内的统计,乳腺癌的发病率每年仍按 5%的速度增长。尽管乳腺癌的治疗水平在不断提高,但仍有四分之一患者死亡<sup>[16]</sup>。因此,及早诊断对乳腺癌的治疗具有重要的意义。目前普遍认为人表皮生长因子受体(Herb2)以及雌激素和孕激素水平对乳腺癌的预后和合适的治疗方案制定有一定的帮助<sup>[17]</sup>,但 Herb2 在乳腺癌中的过强表达率只有 15%~25%<sup>[18]</sup>,因此,寻找新的乳腺癌标志蛋白

是很有必要的。本研究发现乳腺肿瘤中 hARD1 基因表达频率达 70%, 对 hARD1 与乳腺肿瘤的相关性进行深入研究对了解乳腺癌的发病机制, 诊断治疗研究都有重要价值。本研究仅仅是 hARD1 基因与乳腺肿瘤关系研究的开始, 要进一步揭示 hARD1 基因与乳腺肿瘤, 尤其是与乳腺癌的关系还有大量的工作需要进一步进行。

乙酰化普遍发生于真核生物的各种蛋白质中, 属于转译后修饰, 在各种不同的真核生物蛋白质中大约 85% 存在乙酰化修饰, 它对蛋白质的稳定性和活性产生重大影响<sup>[19]</sup>。hARD1 基因已被确定是一个乙酰化酶, 但它的作用靶分子还不明确。本研究发现它与乳腺肿瘤的发生有密切关系, 这为寻找 hARD1 作用靶分子的研究提供了启示, 同时也暗示细胞内蛋白的乙酰化与肿瘤的发生有密切关系, 为研究肿瘤发病机制提供了一条新的途径。

**致谢:** 本研究工作中, 云南大学单克隆抗体研究中心在抗血清制备方面提供了技术方面的帮助; 云南省第一人民医院病理科李琳主任在病理样本的鉴定方面作了大量工作, 孙桂林进行了细胞培养工作; 蒋琳在抗血清制备方面给予了帮助; 云南师范大学附属中学吴松镝同学参与了本研究工作, 在此一并表示感谢!

## REFERENCES

- [1] Whiteway M, Szostak JW. The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell*, 1985, **43**: 483–492.
- [2] Park EC, Szostak JW. ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has N-terminal acetyl-transferase activity. *EMBO J*, 1992, **11**: 2087–2093.
- [3] Mullen JR, Kayne PS, Moerschell RP, *et al.* Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J*, 1989, **8**(7): 2067–2075.
- [4] Whiteway M, Freedman R, Van Arsdel S, *et al.* The yeast ARD1 gene product is required for repression of cryptic mating-type information at the HML locus. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**: 3713–3722.
- [5] Lee FJ, Lin LW, Smith JA. N-acetylation is required for normal growth and mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 5795–5802.
- [6] Polevoda B, Norbeck J, Takakura H, *et al.* Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1999, **18**: 6155–6168.
- [7] Naoaki Sugiura, Suzanne M Adamms, Roderick A Corriveau. An evolutionarily conserved N-terminal acetyltransferase complex associated with neuronal development. *J Biol Chem*, 2003, **278**(41): 40113–40120.
- [8] Thomas Arnesen, Dave Anderson, Christian Baldersheim. Identification and characterization of the human ARD1-NATH protein acetyltransferase complex. *Biochem J*, 2005, **386**(3): 433–443.
- [9] He YG, Xie YF, Chen Y, *et al.* Cloning and expression of a new human N-acetyl-transferase gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, **34** (3): 353–357.  
何云刚, 谢永芳, 陈瑶, 等. 一个新的人 N-乙酰基转移酶基因的克隆. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**(3): 353–357.
- [10] Tribioli C, Mancini M, Plassart E, *et al.* Isolation of a new gene indistal Xq28: transcriptional map and identification of a human homologue of the ARD1 N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genetics*, 1994, **3**: 1061–1067.
- [11] Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, *et al.* Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated Acetylation. *Cell*, 2002, **111**: 709–720.
- [12] Bilton R, Mazure N, Trottier E, *et al.* Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem*, 2005, **280**(35): 31132–31140.
- [13] Fisher TS, Etages SD, Hayes L, *et al.* Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference. *J Biol Chem*, 2005, **280**(18): 17749–17757.
- [14] Arnesen T, Gromyko D, Pendino F, *et al.* Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene*, 2006, **25**(31): 4350–4360.
- [15] Lim JH, Park JW, Chun YS. Human arrest defective 1 acetylates and activates beta-catenin, promoting lung cancer cell proliferation. *Cancer Res*, 2006, **66**(22): 10677–10682.
- [16] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2006, **56**: 106–130.
- [17] Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, *et al.* Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncogene*, 2006, **11**: 4–12.
- [18] Papaldo P, Fabi A, Ferretti G, *et al.* A phase II study on metastatic breast cancer patients treated with weekly vinorelbine with or without trastuzumab according to HER2 expression: changing the natural history of HER2-positive disease. *Ann Oncol*, 2006, **17**: 630–636.
- [19] Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, **9**: 40–48.