



王芳, 昆明医科大学基础医学院病理学与病理生理学系, 教授, 硕士生导师, 医学硕士.

中华医学会云南病理学分会会员, 从事教学、科研及医检工作 30 年. 主持和参与国家自然科学基金 3 项, 云南省科技厅自然科学基金 4 项, 云南省教育厅基金 12 项; 获云南省科技进步奖 3 项; 4 次获昆明医科大学优秀教师, 2 次获昆明医科大学青年教师讲课比赛伯乐奖等荣誉. 发表论文 82 篇, 北大版核心期刊 29 篇; 参与出版病理学教材 2 部; 参与翻译病理学专业著作 2 部.

N-myc 下游调节基因 1 - NDRG1

N-myc 下游调节基因 1 (N-myc downstream regulated gene 1, NDRG1) 属于 NDRG 家族, α/β 水解酶超家族, 但无水解酶催化位点. 研究表明^[1], 该基因与细胞生长发育^[2]、肿瘤细胞生长和转移均有关, 同时还参与了应激反应^[3]、脂类的生物合成、髓鞘的形成以及组织的缺氧过程等; 可被多种分化调节剂诱导表达, 譬如在诱导分化剂维甲酸、巴豆油、佛波酯等的作用下, NDRG1 mRNA 及蛋白表达上调^[4]. 因而对该基因的深入研究, 可进一步阐明肿瘤诱导分化治疗的分子生物学机制.

1 基因的发现及结构

1997 年, 荷兰学者 van Belzen 等^[5]在寻找与细胞分化有关的分子遗传学方面的标记物时, 观察了结肠癌细胞株 HT29-D4 体外诱导分化过程中基因表达的变化, 并用改良的差异显示法, 克隆到一个新的 cDNA (Genebank Accession No. X92845), 并推算出其编码的氨基酸序列 (PIR Accession No. CAA63430). Northern 印迹杂交分析发现, 该基因 mRNA 在结肠上皮细胞分化过程中上调, 而在结/直肠肿瘤中表达下调, 提示该基因与细胞的分化有关, 遂将此命名为分化相关基因 (differentiation related gene 1, Drg1).

该基因也被其他多个学者^[6]相继独立发现和分离, 因此其名称颇多. 在人类中有: cap43 (calcium activated protein, 钙激活蛋白)、rit42 (reduced in tumor, 42KDa)、PROXY-1 (Protein Reg-

ulated by OXYen-1, 氧调节蛋白); 在小鼠中有: 小鼠 Ndr1、TDD5; 在大鼠中有: Bdm1. 因此, Drg1 是一个在各种有机体进化中高度保守的蛋白质, 提示它与某些重要的细胞功能密切相关.

该基因后被人类基因组组织 (human genome organization, HUGO) 基因命名委员会正式命名为 NDRG1 (N-myc Downstream Regulated Gene 1).

研究发现, NDRG1 基因定位于人染色体 8q24.3, 长约 60 kb, 包含 16 个外显子和 15 个内含子. 其中含有一个与第 1 外显子和第 1 内含子 5' 端重叠的 CpG 岛, 且在第 1 外显子的上游 39 bp、65 bp 和 81 bp 处还分别含有一个 TATA 盒的启动子、一个类似于鼠 Ndr1 基因 N-myc 结合区域的 GC 盒和一个具少量 TATA 的增强子.

NDRG1 基因转录从第 123 位核苷酸开始, 其 mRNA 全长约 3 kb, 后者包含一个 1182 bp 的编码区域, 编码蛋白产物含有 394 个氨基酸. NDRG1 蛋白分子量为 43 kDa.

2 基因的作用

2.1 与细胞生长、发育的关系

多项研究^[2,5]显示 NDRG1 在人体多种组织中 (如心、脑、肺、肝、肾、骨骼肌、小肠、胰腺、前列腺等) 广泛表达, 从而提示该基因在各种组织细胞的生长过程中可能起着重要作用.

2.2 参与应激反应

有研究^[9]认为, 在内质网发生应激反应时, NDRG1 在人脐静脉内皮细胞株 (HUVEC) 中的表

达增加,且观察到 NDRG1 在 7 个或更多的位点上被部分的磷酸化.当细胞内 cAMP 增加时,磷酸化反应增多,其中蛋白激酶 A 能在体外直接地使重组的 NDRG1 磷酸化;而当蛋白激酶 A 抑制剂和钙调蛋白激酶抑制剂作用时,磷酸化反应则被抑制.同时还发现,在早期的对数增长期,磷酸化形式很多见,然后随细胞生长密度的增加而逐渐下降.提示 NDRG1 是磷酸化的内质网应激反应蛋白.

2.3 对激素敏感

Tu 等^[9]应用 DDPCR 技术显示 NDRG1 的表达可被睾酮、二氢睾酮在 mRNA 水平上不同程度的抑制;动物实验也证实,在二氢睾酮作用后 8 h, NDRG1 mRNA 水平可降至基础水平,从而提示 NDRG1 可能是雄激素作用的靶基因. NDRG1 有望成为判断恶性肿瘤中激素类药物疗效的分子标记物.

2.4 与组织缺氧有关

Cangul 等^[7]采用短期缺氧处理多种不同肿瘤细胞株,观察对 NDRG1 表达的影响,发现在含 0.5% O₂ 培养的肺癌细胞株 A549 中,其 mRNA 水平于 4 h 后开始上调,一直保持到 18 h,蛋白水平也同样升高,且恢复正常氧含量后,其蛋白水平仍保持至少 16 h 的升高状态.研究发现,当缺氧的空气中含 30% 的一氧化碳时,该基因的表达则不再升高,提示缺氧时 NDRG1 的表达上调可能是通过血红蛋白依赖的方式,故对 NDRG1 表达量及免疫组化定位的分析也许在评价组织是否缺氧方面有其潜在的用途.

2.5 维持外周轴突的功能完整

Okuda 等^[8]建立了一个敲除 NDRG1 基因的小鼠模型,组织学分析发现神经鞘细胞功能丧失,外周神经脱髓鞘,表明 NDRG1 在维持外周轴突的功能完整方面起着十分重要的作用.

2.6 与肿瘤的关系

2.6.1 抑制肿瘤细胞的生长 研究^[4]发现,在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织如乳腺癌、前列腺癌中, NDRG1 基因都呈低表达,而该基因的过表达则可抑制肿瘤细胞的生长.将 NDRG1 cDNA 导入人类肿瘤细胞株中,在体内外均可抑制肿瘤细胞的生长.

同时,在与细胞周期关系的研究中,观察到正常细胞中 NDRG1 mRNA 的浓度呈周期性的变化,其中在 G1 和 G2-M 期达高峰,在 S 期呈低表达;而肿瘤细胞则缺乏 NDRG1 mRNA 的双期表达,在整个肿瘤细胞周期中都呈均匀一致的表

达. p53 基因可调控细胞周期和诱导细胞凋亡,维持基因组和细胞稳定,从而抑制肿瘤生长.

2.6.2 与肿瘤细胞分化和转移的关系 目前, NDRG1 在肿瘤组织中的作用尚存在争议.许多研究发现,与原发瘤相比, NDRG1 基因在前列腺癌^[4]、宫颈癌^[4]、大肠癌细胞株 HT-29^[9]、食管癌^[4]和胃癌^[10]等中呈低表达,提示 NDRG1 基因的作用机理可能是通过诱导肿瘤细胞分化或部分逆转肿瘤细胞的转移表型来抑制肿瘤的转移.因此, NDRG1 可作为转移抑制基因^[11]和早期预测肿瘤转移的分子生物学指标之一. Blaes JM^[12]等还认为 NDRG1 可作为确定 WHO 分类系统中的 II 级神经胶质瘤患者不做术后介入治疗,而采取早期就接受基因毒性治疗的一个新的生物学标志.然而,也有研究显示 NDRG1 在肝癌^[13]、肺癌^[14]、膀胱癌^[15]、结直肠癌^[16]等中 NDRG1 表达上调,促进肿瘤转移.

3 作用机制

3.1 PPAR γ /RXR 转录因子途径^[4]

PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , 过氧化酶体增殖激活受体 γ)是核受体超家族的一个成员,包括类固醇受体、甲状腺激素受体、维生素 D 受体、维甲酸 X 受体. PPAR γ 配体包括多不饱和脂肪酸(如亚麻酸、前列腺素 J₂)和合成性的抗糖尿病药物(如噻唑烷乙基吗啡、曲格列酮等).尽管 PPAR γ 与 RXR (Retinoid X Receptor, 维甲酸 X 受体等)形成二聚体,但它仍作为转录因子发挥作用,调控着许多细胞的分化,包括脂肪细胞和结肠上皮细胞.因此, PPAR γ 和 RXR 配体激活 NDRG1 的发现,提示 NDRG1 可能是 PPAR γ /RXR 分化路径的下游作用靶点.

3.2 DNA 甲基化路径

众所周知, DNA 甲基化状态的改变可引起基因结构和功能的异常,导致细胞发生癌变.最重要的甲基化碱基是胞嘧啶,通常发生在 CpG 岛区域. CpG 岛甲基化可抑制启动子序列的基因表达,而 Aza (5'-氮杂-2'-脱氧胞核苷)对 DNA 甲基化的抑制则可诱导许多细胞系类型包括结肠癌细胞系的分化.有研究^[11,17]说明 NDRG1 基因受 DNA 甲基化调控.

3.3 组蛋白去乙酰化途径^[4]

由三丁酸甘油酯、TSA (一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂)对组蛋白去乙酰化酶的抑制显示,可

诱导 NDRG1 的表达以及许多不同类型细胞株的分化。

3.4 Myc 信号转导通路

Lai 等^[18]研究复氧后 NDRG1 下调与肿瘤迁移的关系,先后在 0.5%O₂ 以及复氧状态下培养乳腺癌 MCF-7 细胞 24 h,发现 53.1% 基因表达上调,46.9% 基因表达下调,证实 NDRG1 可通过 Myc 信号转导通路影响细胞的迁移。

3.5 ERK 通路

Dixon 等^[19]在研究前列腺癌时认为静默 NDRG1 的表达可使致瘤性的 AKT、ERK1/2 和 SMAD2L 的磷酸化增强而 PTEN 的水平降低,而 NDRG1 过表达则导致相反的结果,因此,静默 NDRG1 可有效地削弱 Dp44mT 抑制 p-SMAD2L 和 p-ERK1/2 水平的能力,从而认为 NDRG1 在前列腺癌通过 PI3K/AKT、ERK 通路上的选择性靶点 Dp44mT 介导的肿瘤抑制方面具有重要作用。

3.6 ER- α 依赖通路

Fotovati 等^[20]在研究乳腺癌中 17 β -雌二醇 (E₂) 对 NDRG1 表达的影响时发现,NDRG1 的表达与雌激素受体 (ER- α) 水平存在负相关关系,提示雌激素 E₂ 使 NDRG1 表达下调可能通过 ER- α 依赖的通路。

4 影响 NDRG1 作用的部分因素

4.1 低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)

HIF-1 是一种异二聚体结合 DNA 的蛋白质因子,主要由 HIF-1 α 、HIF-1 β 两个亚基组成。Wang 等^[21]通过克隆 HIF-1 α CDS 和 NDRG1 启动子,将构建的质粒 pCDNA3.0-Hif-1 α 和 pGL3-basic-NDRG1 转染至肺癌 A549 细胞中,荧光素酶活性测定显示 HIF-1 α 与 NDRG1 启动子结合并激发其表达,在 NDRG1 启动子 -1202 ~ -450 区是 HIF-1 α 结合的重要部位。

4.2 早期生长反应因子 (early growth response gene-1, Egr-1)

Egr-1 是即刻早期反应基因 (IEGS) 家族重要成员,是一种含有 3 个锌指结构的转录因子。近期研究报道,低氧诱导 NDRG1 基因的表达通过 Egr-1 / Sp1 重叠结合域调节。

4.3 真核翻译起始因子 3a (eukaryotic initiation factor 3 subunit a, eIF3a)

eIF3a 是 eIF3 的 13 个亚基中最大的一个,参与 mRNA 翻译的起始过程及细胞周期的调控。

Lane 等^[22]发现 eIF3a 调节 NDRG1 基因与铁减少有关,通过构建稳定转染的 TET-off MCF7 乳腺癌细胞,克隆全长 eIF3a-S 或 eIF3a-AS 序列,RT-PCR 及 Western 实验表明经铁螯合剂处理的 eIF3a-S 转染细胞上调 NDRG1 水平。

4.4 E-钙黏蛋白

Song 等^[23]在前列腺癌研究中发现 NDRG1 受 E-钙黏蛋白调控,E-钙黏蛋白主要介导同质细胞间的黏附,使癌细胞间密切联系,其在癌组织中的下调导致 NDRG1 的表达下降,改变了细胞黏附力,影响患者的预后。

4.6 铁离子

铁螯合剂^[22] (譬如 Dp44mT, DpC) 可上调肿瘤细胞内 NDRG1,使细胞 NDRG1 mRNA 和蛋白表达增加。Kovacevic 等^[24]采用 DFO 和 Dp44mT 螯合剂作用于 MIAPaCa-2、PANC-1、CFPAC-1 胰腺癌细胞,37 °C 孵育 24 h,发现 NDRG1 表达被明显上调。

4.7 钙离子

有研究^[7]认为细胞内游离钙浓度升高可诱导 NDRG1 基因表达。

4.8 VHL 基因

有研究表明,VHL 对 NDRG1 的调控与其它基因不同,不是直接影响 NDRG1 的表达,而是通过 HIF-1 途径。VHL 可诱导 HIF-1 降解,进而降低 NDRG1 水平。

4.9 PTEN 基因

有研究^[24]认为 NDRG1 基因的过表达可提高 PTEN 的表达水平,推断 PTEN 基因和 NDRG1 基因在表达上存在相互作用。

5 展望

70 年代后期,Sachs 发现在某些能够抑制增殖和诱导分化的物质作用下,鼠白血病细胞系的分化受阻有时是可逆的,因而提出了诱导分化治疗的概念。该治疗手段的根本机制是“推动”低分化的肿瘤细胞回到成熟或分化的遗传学途径上来,从而逆转肿瘤细胞的恶性表型。由于一些分化诱导剂可用于诱导 NDRG1 基因的表达,因而有望开辟部分恶性肿瘤 (NDRG1 表达降低的肿瘤) 细胞尤其是实体瘤分化诱导治疗的新途径。

目前,NDRG1 对于肿瘤的发生发展起抑制或促进作用尚存在争议,因此,尽快明确 NDRG1 在肿瘤进展中的表达调控及作用机制,进一步深入研究新的影响 NDRG1 基因的作用因素,为肿瘤的

诱导分化治疗提供新的依据, 将成为今后的研究热点.

[参考文献]

- [1] FANG B A, KOVACEVIC Z, PARK K C, et al. Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845 (1): 1 - 19.
- [2] LARKIN J, CHEN B, SHI X H, et al. NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury [J]. *Endocrinology*, 2014, 155 (3): 1 099 - 1 106.
- [3] SAHNI S, BAE D H, LANE DARIUS J R, et al. The metastasis suppressor, N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), inhibits stress-induced autophagy in cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (14): 9 692 - 9 709.
- [4] 王震, 王国英, 王芳. 分化相关基因NDRG1基因与肿瘤 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32 (2): 162 - 164.
- [5] VAN BELZEN N, DINJENS W N, DIESVELD M P, et al. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms [J]. *Lab Invest*, 1997, 77 (1): 85 - 92.
- [6] TU L C, YAN X, HOOD L, et al. Proteomics analysis of the interactome of N-myc downstream regulated gene 1 and its interactions with the androgen response program in prostate cancer cells [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6 (4): 575 - 588.
- [7] CANGUL H. Hypoxia up-regulates the expression of the NDRG1 gene leading to its over-expression in various human cancers [J]. *BMC Genet*, 2004, 5: 27.
- [8] OKUDA T, HIGASHI Y, KOKAME K, et al. NdrG1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (9): 3 949 - 3 956.
- [9] 刘瑛瑛, 王芳, 邹英鹰, 等. NDRG1基因转染对HT-29人结肠癌细胞株增殖, 侵袭和迁移能力的影响 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2011, 26 (2): 139 - 143.
- [10] CHANG X J, ZHANG S L, MA J G, et al. Association of NDRG1 gene promoter methylation with reduced NDRG1 expression in gastric cancer cells and tissue specimens [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 66 (1): 93 - 101.
- [11] BAE D H, JANSSON P J, HUANG M L, et al. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66 (11): 911 - 917.
- [12] BLAES J, WEILER M, SAHM F, et al. NDRG1 prognosticates the natural course of disease in WHO grade II glioma [J]. *J Neurooncol*, 2014, 117 (1): 25 - 32.
- [13] CHENG J, XIE H-Y, XU X, et al. NDRG1 as a biomarker for metastasis, recurrence and of poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Letters*, 2011, 310 (1): 35 - 45.
- [14] WANG D, TIAN X, JIANG Y, et al. NDRG1/Cap43 over-expression in tumor tissues and serum from lung cancer patients [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138 (11): 1 813 - 1 820.
- [15] ZHANG S B, SONG S P, LI B, et al. Expression of n-myc downstream-regulated gene 1 in primary gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathological features and clinical outcome [J]. *Med Oncol*, 2012, 29 (3): 1 866 - 1 872.
- [16] 王震, 王芳, 魏万里, 等. NDRG1基因在结直肠癌发生发展过程中的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33 (3): 264 - 265.
- [17] HAN L L, HOU L, ZHOU M J, et al. Aberrant NDRG1 methylation associated with its decreased expression and clinicopathological significance in breast cancer [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 52 - 59.
- [18] LAI L C, SU Y Y, CHEN K C, et al. Down-regulation of NDRG1 promotes migration of cancer cells during reoxygenation [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (8): 24 375 - 24 381.
- [19] DIXON K M, LUI G Y L, KOVACEVIC Z, et al. Dp44mT targets the AKT, TGF-beta and ERK pathways via the metastasis suppressor NDRG1 in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108 (2): 409 - 419.
- [20] FOTOVATI A, FUJII T, YAMAGUCHI M, et al. 17Beta-estradiol induce down-regulation of Cap43/NDRG1/Drg-1, a putative differentiation related and metastasis suppressor gene, in human breast cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (10): 3010 - 3018.
- [21] WANG Q, LI LH, GAO G D, et al. HIF-1 alpha up-regulates NDRG1 expression through binding to NDRG1 promoter, leading to proliferation of lung cancer A549 cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40 (5): 3 723 - 3 729.
- [22] LANE D J, SALETTA F, SURYO RAHMANTO Y, et al. N-myc downstream regulated 1 (NDRG1) is regulated by eukaryotic initiation factor 3a (eIF3a) during cellular stress caused by iron depletion [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (2): 57 273 - 57 287.
- [23] SONG Y, ODA Y, HORI M, et al. N-myc downstream regulated gene-1/Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41 (2): 214 - 222.
- [24] KOVACEVIC Z, CHIKHANI S, LUI G Y, et al. The iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 Targets NEDD4L, PTEN, and SMAD4 and Inhibits the PI3K and ras signaling pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18 (8): 874 - 887.

(2014-05-12 收稿)