

## 研究快报

## NAG7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的影响\*

谭琛 李江 王洁如 彭聪 谢奕 曹利 李小玲 李桂源\*\*

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

**摘要** 为了探讨鼻咽癌表达下调基因 NAG7 对鼻咽癌细胞系 HNE1 生长的影响, 构建了 NAG7 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(+)/NAG7, 并采用脂质体转染技术将真核重组体 pcDNA3.1(+)/NAG7 质粒和真核空载体 pcDNA3.1(+) 质粒分别导入 HNE1 细胞, 经 G418 筛选后获得稳定转染细胞克隆, RT-PCR 和 RNA 印迹检测 NAG7 基因的表达, 并通过细胞生长曲线、裸鼠接种和流式细胞等方法对转染细胞的生物学行为进行检测。结果显示: 转染 NAG7 基因后, 基因表达增加, 细胞生长倍增时间较空载体转染和 HNE1 明显延长, 流式细胞技术检测表明, NAG7 可延缓细胞由 G0~G1 期进入 S 期; 裸鼠接种实验显示转染 NAG7 基因后的 HNE1 细胞致瘤性受到抑制。上述结果表明: NAG7 基因转染后鼻咽癌细胞生长受到抑制, 提示 NAG7 基因是一鼻咽癌相关的抑瘤基因候选者。

**关键词** NAG7 基因, 细胞转染, 基因表达, 裸鼠, 鼻咽癌

**学科分类号** R739, R730

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是东南亚及我国南方各省常见的一种恶性肿瘤, 其发生不仅有明显的地域性和家族集聚现象, 而且存在基因组不稳定的特性<sup>[1]</sup>。其病因涉及 EB 病毒感染、化学致癌物作用及多种癌基因与抑癌基因结构和功能的改变<sup>[2]</sup>。然而, 鼻咽癌发病的分子机制尚不清楚, 细胞和分子遗传学研究发现, 鼻咽癌基因组存在 3p13~26、9p21~22、7q31.3~33、11q13.3~24、13q14.3、13q32.34 和 14q 染色体的等位基因的高频率杂合性丢失<sup>[3]</sup>, 这一结果提示鼻咽癌的遗传不稳定性可能与这些区域存在遗传易感基因或抑瘤基因有关; 而在目前已发现的抑瘤基因中, p53 基因在鼻咽癌中突变率极低, 提示 p53 的遗传性改变在鼻咽癌的发展中作用不大<sup>[4]</sup>; p16 基因在鼻咽癌中无点突变, 但表达下调<sup>[5]</sup>, 而 RB、WAF1/p21、VHL 等抑瘤基因在鼻咽癌基因组中均没有突变和表达异常<sup>[6]</sup>。因此, 在鼻咽癌基因组中可能存在尚未发现的易感/抑瘤基因, 我室通过文库筛选结合生物信息学方法, 从 3p25.3~26.3 区域成功地克隆了与鼻咽癌相关的肿瘤抑制候选基因 NAG7, GenBank 登录号为 AF086709。NAG7 基因全长 cDNA 序列为 1 667 bp, 含一完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 94 个氨基酸, 其分子质量为 11 ku, 研究表明 NAG7 基因在鼻咽癌活检组织和鼻咽癌细胞系 HNE1 中

均表达下调<sup>[7]</sup>。为了深入探讨 NAG7 与鼻咽癌发生的关系, 我们通过构建 NAG7 基因真核表达重组体, 脂质体介导转染入 HNE1 细胞, 分析 NAG7 基因重表达水平及该基因对鼻咽癌细胞生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株、表达载体和裸鼠:** 鼻咽癌细胞系 HNE1 为本研究所 1992 年建株<sup>[8]</sup>, 细胞用含 10% 小牛血清的 1 640 培养基, 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养。pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司 (Madison, MI, USA), pcDNA3.1(+) 载体购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA)。Balb/c 裸鼠由中国科学院动物研究所提供, 本校动物学部无菌饲养。

**1.1.2 主要试剂:** 脂质体 (Lipofectin, Life Technologies), Geneticin (G418 sulfate, Life Technologies), Trizol reagent (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), Hybond-N 尼龙膜 (Clontech, Palo Alto, CA,

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (39700158) 和国家自然科学基金资助项目 (39800142, 30100105)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0731-4805446, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-12-17, 接受日期: 2002-01-23

USA), 同位素 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 购自北京亚辉公司, RT 试剂盒及标记试剂盒均购自 Promega 公司 (Madison, MI, USA), 其他常用化学药品、限制性内切酶、T4 连接酶、RPMI 1640、胶回收试剂盒等购自华美生物工程公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 NAG7 基因真核载体重组体的构建:** 从 cDNA 文库中筛选的 Lambda 克隆中经 PCR 扩增含 NAG7 阅读框的序列, 466 bp 的 cDNA 片段克隆入 pGEM-T Easy 载体; 根据 NAG7 基因的常见限制性酶切图谱, 选择 *Eco*R I 鉴定是否插入并获得带粘性末端的 cDNA 片段, 琼脂糖凝胶回收 NAG7 阅读框的序列, 同时用 *Eco*R I 消化 pcDNA3.1(+) 载体, 经 T4 连接酶将 NAG7 片段和 pcDNA3.1(+) 载体连接。Hind II 酶切鉴定 NAG7 基因的插入方向。

**1.2.2 NAG7 基因的脂质体转染:** 在 6 孔板中每孔接种  $2 \times 10^5$  个 HNE1 细胞, 含 10% 小牛血清培养细胞至生长密度为 60% ~ 80%。分别取 2  $\mu$ g pcDNA3.1(+) 质粒和重组体 DNA 稀释于 100  $\mu$ l 无血清培养基中, 再取 10  $\mu$ l 脂质体稀释于 100  $\mu$ l 无血清培养基中, 将稀释的 DNA 和脂质体混合后于室温放置 30 min; 再加 800  $\mu$ l 无血清培养基稀释, 混匀后加至经 Hanker's 液洗涤后的 HNE1 细胞中, 置 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 5 h 后, 每孔再加入 1 ml 含 20% 小牛血清的培养基继续培养。基因转染 48 h 后, 换含 G418 (筛选浓度 0.5 g/L, 维持浓度 0.25 g/L) 的选择培养基培养 10~12 d 至抗性克隆出现。14 d 后挑选单克隆扩大培养, 建立稳定传代的转染细胞系。

**1.2.3 总 RNA 的抽提及痕量 DNA 的消化:** 按 TrizolTM 试剂盒操作程序, 提取 HNE1 细胞和抗 G418 的空载体转染及 NAG7 基因转染的细胞总 RNA。先用 DNase I 消化 RNA 中的痕量 DNA, 紫外分光光度计测定其浓度。再取 2  $\mu$ g RNA 样品进行常规 PCR 扩增 GAPDH 基因目的片段, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测确无特异扩增条带以保证抽提 RNA 中的 DNA 消化完全。

**1.2.4 PCR 引物的设计和差异 RT-PCR:** 用 PCR Designer 1.03 (Research Genetics) 软件设计扩增目的片段引物, 由大连宝生物公司合成。GAPDH 的上下游引物分别为 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' 和 5'-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA-3', 其扩增片段为 598 bp; NAG7 的上下游引物分别为 5'-AATAATGACGTATGTTCCCA-

TAG-3' 和 5'-GAGGAAATGTACCACCCTACA-3', 其扩增片段为 466 bp。取消化后的 RNA 2  $\mu$ g, 按 RT 试剂盒操作步骤进行 RT 反应。50  $\mu$ l PCR 反应体系中含 KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.0, NAG7 基因特异引物 0.1 mmol/L, 模板 cDNA 5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 3 U, 等体积石蜡油覆盖。差异 PCR 的反应参数: 95℃ 变性 5 min, 94℃ 50 s, 57℃ 50 s, 72℃ 50 s, 反应 30 个循环, 72℃ 延长 10 min, 内对照 GAPDH 引物在第 5 个循环时加入。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.5 RNA 印迹 (Northern blot):** 按 TrizolTM 试剂盒操作程序提取 HNE1 细胞和抗 G418 的空载体转染及 NAG7 基因转染的细胞总 RNA。5  $\mu$ g RNA 经变性琼脂糖凝胶电泳分离后, 毛细管法转移至尼龙膜上。[ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 随机引物标记 NAG7 cDNA 探针, 68℃ 预杂交, 杂交过夜, 1  $\times$  SSC, 0.1  $\times$  SDS 60℃ 1 h 洗膜, 0.5  $\times$  SSC, 0.1  $\times$  SDS 30 min, 0.1  $\times$  SSC, 0.1  $\times$  SDS 30 min。-80℃ 放射自显影 4 d。洗膜后再与 GAPDH 探针杂交<sup>[9]</sup>。

**1.2.6 细胞生长曲线:** 将 HNE1 细胞和抗 G418 的空载体转染及 NAG7 基因转染的细胞无血清培养 24 h, 使细胞同步化。取  $2 \times 10^4$  细胞接种于 24 孔板, 每隔 24 h 消化 3 孔细胞并计数, 取均值。共检测 7 d, 以细胞数为纵坐标, 间隔时间为横坐标绘制生长曲线, 计算对数生长期细胞的倍增时间。

**1.2.7 裸鼠接种实验:** 4 周龄雄性 Balb/c 裸鼠 9 只随机分成 3 组, 将转染 NAG7 基因和空载体转染的 HNE1 细胞及未转染的 HNE1 细胞, 按  $1 \times 10^7$  个细胞/只, 0.2 ml 注射体积接种裸鼠皮下。注射后每 3 天检测一次肿瘤体积的大小。30 d 后处死, 分离肿瘤组织, 甲醛固定石蜡包埋并制成切片进行病理诊断。

**1.2.8 流式细胞仪 (FCM) 分析细胞周期:** 取生长状态良好、70% ~ 80% 融合期的转染 NAG7 基因和空载体转染的 HNE1 细胞及未转染的 HNE1 细胞各 5 瓶, Hanks 液洗涤后, 胰酶消化、离心收集细胞, 70% 预冷乙醇固定的细胞, -80℃ 保存备用。流式细胞仪检测时, 用 pH 7.4 的 PBS 洗涤乙醇固定的细胞, 离心后去除固定液, 加碘化丙锭 (PI) 染色液 (含 50 mg/L PI, 1 g/L Triton X-100, 100 g/L RNase) 混匀, 37℃, 避光 30 min 后, 应用流式细胞仪 FACStar (美国 BD 公司) 检测。每次分析  $1 \times 10^4$  个细胞, 并应用 Cell Quest 软件分析。

## 2 结 果

### 2.1 NAG7 表达载体重组体的鉴定

将克隆入 pEGM-T Easy 载体的 NAG7 基因经 *EcoR* I 酶切后, 非定向插入经 *EcoR* I 修饰后的 pcDNA3.1(+) 载体 (5.4 kb) 中, 转化后随机挑选 10 个重组克隆小量培养的抽提质粒 DNA, 选用 *Hind* III 酶切鉴定 NAG7 的插入及其方向. 因为在插入位点上游 51 bp 和 NAG7 基因片段第 329 bp 处各有一个 *Hind* III 酶切位点, 若酶切后出现 380 bp 和约 5.5 kb 的片段为正向插入, 若出现 193 bp 和约 5.7 kb 的片段则为反向插入. 正向插入 NAG7 的质粒将之命名为 pcDNA3.1(+)/NAG7. 如图 1 所示: 6 为正向插入的阳性克隆, 1 为反向插入克隆, 其余为阴性克隆.

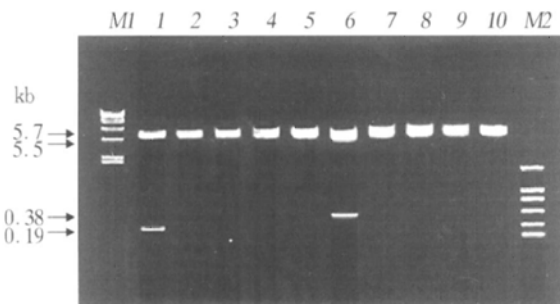


Fig. 1 Identification of recombination of NAG7 expressional vector

M1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; M2: PCR marker 2000; 1~10 were the 10 chosen clones and digested by *Hind* III respectively; 1 was the negative recombination including two fragments of 0.19 and 5.7 kb; 6 was the positive recombination of pcDNA3.1(+)/NAG7, which contained 0.38 and 5.5 kb fragments.

### 2.2 NAG7 基因的重表达分析

将 pcDNA3.1(+) 载体和 pcDNA3.1(+)/NAG7 重组体转染鼻咽癌细胞系 HNE1 中, 经 G418 筛选后, 挑选 7 个 pcDNA3.1(+)/NAG7 质粒转染和 3 个 pcDNA3.1(+) 空载体转染 HNE1 后的抗性克隆, 扩大培养后, 抽提细胞总 RNA, RT-PCR 和 Northern blot 检测 NAG7 基因的重表达, 并以 GAPDH 为内对照. RT-PCR 结果显示 7 个 pcDNA3.1(+)/NAG7 克隆中 1~6 号抗性克隆均有 466 bp 的扩增条带, 而 pcDNA3.1(+) 空载体转染的 3 个克隆未见 466 bp 的扩增条带, 未转染的 HNE1 细胞亦未见 466 bp 的条带 (图 2). 取 5 号抗性克隆进行 RNA 印迹分析亦证实 NAG7 基因转染后其表达上调 (图 3).

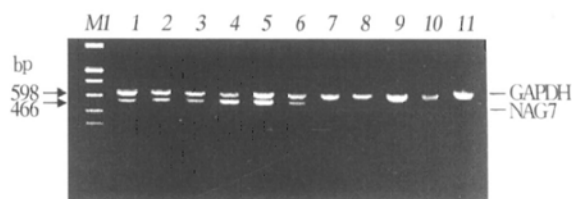


Fig. 2 Re expression of NAG7 gene in HNE1 cells and detected by RT-PCR

M1: DNA PCR marker 2000 (2000, 1000, 750, 500, 250, 100), 1~7 represented the clones of pcDNA3.1(+)/NAG7 transfected respectively and resisted the G418. 8~10 represented the clones of pcDNA3.1(+) vector transfected respectively and resisted the G418. 11 was the HNE1 cells. TR-PCR detection indicated that clone 1~6 possessed strong expression of NAG7 gene.

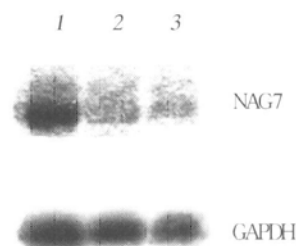


Fig. 3 Northern blotting analysis of the expression of HNE1 cells transfected with NAG7

Total RNA isolated from cells were run on gel, transferred onto nylon membrane, and probed with  $^{32}$ P-labeled NAG7 cDNA. The same filter was probed with the  $^{32}$ P-labeled GAPDH DNA. The expression level of NAG7 was up regulated in NAG7 transfected cells of HNE1. 1: pcDNA3.1(+)/NAG7/HNE1; 2: pcDNA3.1(+)/HNE1; 3: HNE1 cells.

### 2.3 NAG7 基因对 HNE1 细胞生长的影响

绘制 HNE1、pcDNA3.1(+) 和 pcDNA3.1(+)/NAG7 转染 HNE1 细胞的生长曲线 (图 4), 结果表明:

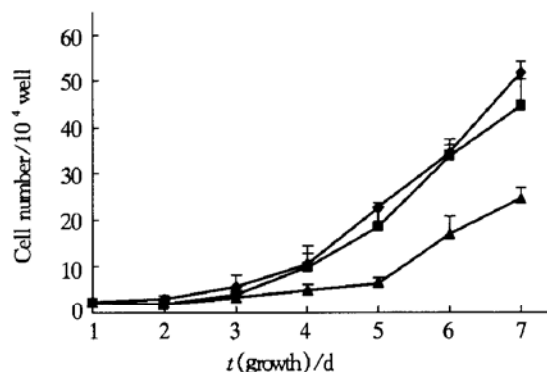


Fig. 4 The effect of NAG7 re expression on the growth of HNE1 cells

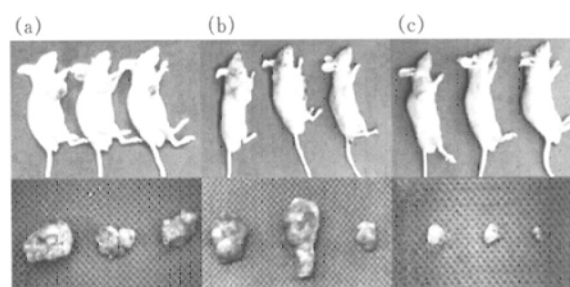
The growth rate of HNE1 cells transfected with NAG7 gene was obviously suppressed compared with the HNE1 cells or HNE1 cells transfected with pcDNA3.1 vector from the day 4 to day 7 ( $P < 0.05$ ).

◆—◆: HNE1; ■—■: HNE1+ pcDNA3.1(+); ▲—▲: HNE1+ pcDNA3.1(+)/NAG7.

pcDNA3.1(+ )空载体转染后对 HNE1 细胞生长影响不大, 而 pcDNA3.1(+ )/NAG7 转染 HNE1 细胞后, 其生长速度明显减慢, 从第 5 天起与 HNE1 细胞相比存在明显差异 ( $P < 0.05$ ). pcDNA3.1(+ )/NAG7 和 pcDNA3.1(+ )转染组及未转染 HNE1 组的细胞倍增时间 (population double time, PDT) 分别为 60.0、29.4 和 27.4 h.

## 2.4 裸鼠致瘤性实验

pcDNA3.1(+ )空载体转染组和未转染的 HNE1 在接种后平均 7 天可出现明显的肿块, 而 pcDNA3.1(+ )/NAG7 转染组接种后长出肿瘤时间明显延迟, 平均 14 d ( $P < 0.05$ ). 接种 30 d 后处死裸鼠, 分离肿瘤块, 发现 pcDNA3.1(+ )/NAG7 转染组瘤体积明显小于其他两组 (图 5). 将 3 组肿瘤进行病理切片, 均为中、低分化鳞癌, 无组间差异.

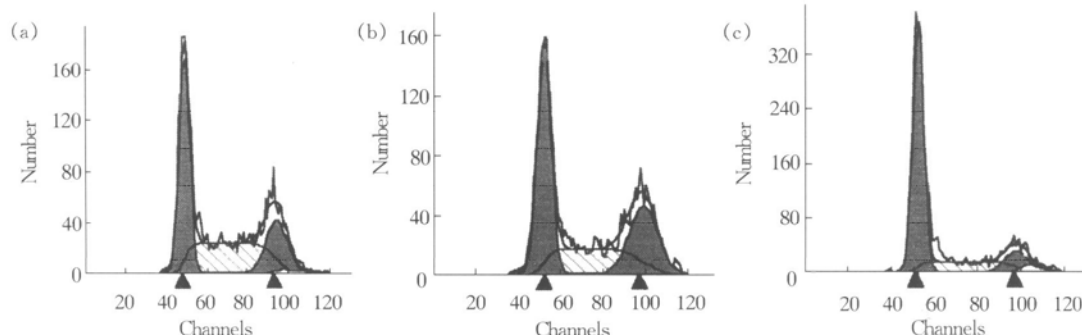


**Fig. 5 The effect of HNE1 cells transfected NAG7 gene on xenograft tumor in nude mice**

The sizes of xenograft tumor in nude mice (upper panel) and isolated xenograft tumors from nude mice at day 30 after the first day planted. (a) nude mice planted with HNE1 cells, (b) HNE1 cells transfected pcDNA3.1(+ ) vector, (c) pcDNA3.1(+ )/NAG7/HNE1. The sizes of xenograft tumor of planting pcDNA3.1(+ )/NAG7/HNE1 cells were smaller than that of other groups.

## 2.5 NAG7 基因对 HNE1 细胞周期的影响

图 6 表明: pcDNA3.1(+ )/NAG7 转染的 HNE1



**Fig. 6 The effect of NAG7 gene on cell cycle of HNE1 cells**

Most HNE1 cells transfected with NAG7 gene went into G0-G1 phase and less cells in S and G2-M phase compared with HNE1 cells and HNE1 cells transfected with pcDNA3.1(+ ) vector. (a) HNE1 cells. G0-G1: 40.39, G2-M: 20.13, S: 39.48. (b) pcDNA3.1(+ )/HNE1. G0-G1: 43.92, G2-M: 27.70, S: 28.38. (c) pcDNA3.1(+ )/NAG7/HNE1. G0-G1: 67.79, G2-M: 11.84, S: 20.37.

细胞 DNA 合成期 G1 和静息期 G0 的百分比 (67.79%) 较 pcDNA3.1(+ )空载体转染的细胞 (43.92%) 和未处理的 HNE1 (40.39%) 明显增高 ( $P < 0.05$ ), 而 pcDNA3.1(+ )/NAG7 转染的 HNE1 细胞 DNA 合成期和 DNA 合成后期 G2 及分裂期 M 的百分比 (S: 20.37%, G2-M: 11.84%) 较 pcDNA3.1(+ )空载体转染的细胞 (S: 28.38%, G2-M: 27.70%) 和未处理的 HNE1 (S: 39.48%, G2-M: 20.13%) 明显降低. 以上结果表明, NAG7 基因可能是通过参与细胞周期调控, 延缓细胞分裂而抑制 HNE1 细胞的增殖.

## 3 讨 论

目前普遍认为癌肿的发生是由于细胞内遗传改

变的积累所致<sup>[10]</sup>, 因此将肿瘤抑制基因 (tumor suppressor gene, TSG) 导入肿瘤细胞, 进而探讨肿瘤抑制基因的作用机理是研究基因功能的重要方法, Cheng 等<sup>[11]</sup>将 CDKN2A 基因导入 NPC HONE1 细胞发现具有明显的生长抑制作用. Zou 等<sup>[12]</sup>将一编码 Serpin 家族相关蛋白基因 Maspin 转染 MDA-MB-435 乳腺癌细胞, 发现可降低该细胞诱发肿瘤的能力及裸鼠移植瘤的形成, 因而推测 Maspin 基因具有抑制肿瘤的功能. NAG7 作为鼻咽癌相关基因, 在鼻咽癌及鼻咽癌细胞系中表达缺失<sup>[7]</sup>, 因此本实验将 NAG7 基因通过脂质体转染入鼻咽癌细胞株 HNE1 细胞中, 使之重表达, 结果亦发现 NAG7 基因可明显抑制 HNE1 细胞生长, 降低裸鼠致瘤性, 提示 NAG7 基因同样具有肿瘤

抑制作用, 是潜在的肿瘤抑制基因。

有学者认为肿瘤抑制基因可分为两类<sup>[13]</sup>, I 类肿瘤抑制基因 (class I), 即由于基因本身的突变、重排和 DNA 缺失而引起功能失活的经典肿瘤抑制基因, 如: p53、Rb、DCC 等; II 类肿瘤抑制基因 (class II), 即由于表达调节障碍 (mRNA 水平) 而引起功能丧失的抑瘤基因, 如: Cx 基因、 $\alpha$ -6 整合素<sup>[14]</sup>等, II 类肿瘤抑制基因的表达调控受 I 类肿瘤抑制基因调节。与正常组织相比, 在肿瘤组织低表达或不表达, 且转基因实验中能降低肿瘤的致瘤性或抑制肿瘤转移能力的基因属于 II 类肿瘤抑制基因<sup>[12]</sup>, 因此 NAG7 基因可归为鼻咽癌相关的潜在的 II 类肿瘤抑制基因。

NAG7 基因是通过何种途径抑制肿瘤生长的呢? Chow 等<sup>[15]</sup>通过将 p16INK4a 肿瘤抑制基因转染鼻咽癌细胞系 CNE1, 可引起 G0/G1 细胞周期捕获而抑制细胞生长, 且与 p16INK4a 表达水平呈正相关, 提示 p16INK4a 的恢复很可能是治疗 NPC 的重要途径。而本研究亦发现 NAG7 基因转染 HNE1 细胞后, G0-G1 期细胞数增加, 而 S 期和 M 期细胞数明显减少。我室以往研究还证实 NAG7 基因转染 HNE1 细胞后, 可引起蛋白质表达谱的改变<sup>[16]</sup>, 其中与细胞周期相关的生长捕获特异性蛋白表达上调, 该蛋白可影响 START 并阻止细胞进入 S 期<sup>[17]</sup>。这些研究均提示 NAG7 基因很可能是通过影响 HNE1 的细胞周期而发挥作用。目前, 我们正通过研究 NAG7 基因对 HNE1 细胞周期素的表达以试图探讨 NAG7 基因抑制肿瘤生长的机制。

### 参 考 文 献

- Li G Y, Yao K T, Fonald G. Sister chromatic exchange and nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1989, **43** (4): 613~618
- Choi P H, Suen M W, Huang D P, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: genetic changes, Epstein-Barr virus infection, or both. A clinical and molecular study of 36 patients. *Cancer*, 1993, **72** (10): 2873~2878
- Chen Y J, Ko J Y, Chen P J, *et al.* Chromosomal aberrations in nasopharyngeal carcinoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, **25** (2): 169~175
- Crook T, Nicholls J M, Brooks L, *et al.* High level expression of  $\Delta$ N-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene*, 2000, **19** (30): 3439~3444
- Sun Y, Hildesheim A, Lanier A E, *et al.* No point mutation but decreased expression of the p16/MTS1 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 1995, **10** (4): 785~788
- Lo K W, Huang D P, Lau K M. p16 gene alteration in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1995, **55** (10): 2039~2043
- 谢 奕, 邓龙文, 江 宁, 等. 定位于染色体 3p25.3 区域的新基因克隆及在鼻咽癌中的表达分析. *中华医学遗传杂志*, 2000, **17** (4): 225~228
- Xie Y, Deng L W, Jiang N, *et al.* *Chin J Med Genet*, 2000, **17** (4): 225~228
- 祝和成, 姚开泰, 李桂源, 等. 4 株鼻咽癌上皮细胞株的建立及其生物学特性. *湖南医科大学学报*, 1992, **17** (2): 103~105
- Zhu H C, Yao K T, Li G Y, *et al.* *Hunan Medical University Bulletin*, 1992, **17** (2): 103~105
- Lu L, Komada M, Kitamura N. Human Hrs, a tyrosine kinase substrate in growth factor-stimulated cells: cDNA cloning and mapping of the gene to chromosome 17. *Gene*, 1998, **213** (1~2): 125~132
- Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (3): 497~503
- Cheng Y, Stanbridge E J, Kong H, *et al.* A functional investigation of tumor suppressor gene activities in a nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 using a monochromosome transfer approach. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, **28** (1): 82~91
- Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, *et al.* Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 1994, **263** (5146): 526~529
- Islam M Q, Islam K. A new functional classification of tumor-suppressing genes and its therapeutic implications. *Bioessays*, 2000, **22** (3): 274~285
- Sager R, Anisowicz A, Neveu M, *et al.* Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J*, 1993, **7**: 864~970
- Chow L S, Wang X, Kwong D L, *et al.* Effect of p16INK4a on chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2000, **17** (1): 135~140
- 谭 琛, 李 江, 谢 奕, 等. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (4): 373~378
- Tan C, Li J, Xie Y, *et al.* *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 2001, **33** (4): 373~378
- Hayles J, Fisher D, Woollard A, *et al.* Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell*, 1994, **78** (5): 813~822

## Effect of NAG7 Gene Transfection on the Growth of Nasopharyngeal Carcinoma Cells<sup>\*</sup>

TAN Chen, LI Jiang, WANG Jie-Ru, Peng Cong, XIE Yi, CAO Li, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan<sup>\*\*</sup>

(Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract** In order to study the effect of NAG7 gene on NAG7 down-regulated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE1, the pcDNA3.1(+)/NAG7 mammalian expression recombination was constructed and transfected into HNE1 cells. G418 was used to obtain the neomycin-resistant transformants of which indicated the vector was present in the HNE1 cells. The expression of NAG7 gene was detected by RT-PCR and Northern blot. The cytobiologic characterizations of the transfected HNE1 cells were probed by population double time (PDT), xenograft of nude mice and cell cycle analysis. The results showed that the PDT of G418-resistant HNE1 cells with expression of NAG7 was longer than that of vector transfected HNE1 cells and untransfected HNE1 cells, and the more NAG7 transfected cells went into phase G0-G1 compared with the two other cells. It also presented inhibited the tumor formation in nude mice. Thus, these data suggested that NAG7 gene play an important role in the cell growth of HNE1, and might be a good candidate of tumor suppressor gene correlated with NPC.

**Key words** NAG7 gene, cell transfection, gene expression, nude mice, nasopharyngeal carcinoma

<sup>\*</sup> This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research of China (G199980510008) and The National Natural Science Foundation of China (39800142, 30100105).

<sup>\*\*</sup> Corresponding author. Tel: 86-731-4805446, E-mail: Ligy@public.cs.hn.cn

Received: December 17, 2001 Accepted: January 23, 2002