

# 鼻咽癌相关基因 *BRD7* 对鼻咽癌细胞 CNE1 的影响 \*

彭 聪<sup>1)\*\*</sup> 李小玲<sup>1)\*\*</sup> 周 鸣<sup>1)</sup> 刘华英<sup>1)</sup> 王莉莉<sup>1)</sup> 张秋红<sup>1)</sup>  
杨一新<sup>1)</sup> 吴尚辉<sup>2)</sup> 黄柏英<sup>2)</sup> 熊 炜<sup>1)</sup> 李桂源<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup>中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078;

<sup>2)</sup>中南大学现代分析测试中心细胞生物研究室, 长沙 410078)

**摘要** 为了研究 *BRD7* 基因对鼻咽癌细胞 CNE1 的影响, 通过脂质体转染方法, 将 *BRD7* 基因导入 NPC 细胞株 CNE1 细胞中. 通过细胞生长曲线发现该基因能够抑制 CNE1 细胞的生长. 为了探讨可能的作用机制, 进而采用蛋白质组技术研究该基因对鼻咽癌蛋白质表达谱的影响, 从而研究该基因在 CNE1 中的地位和作用. 通过对过表达 *BRD7* 基因后鼻咽癌细胞系 CNE1 的蛋白质表达谱改变的研究, 鉴定出 19 个差异表达蛋白, 这些蛋白质包括: BCCIP (BRCA2 and CDKN1A (p21 (Waf1/Cip1))), FHL2 (four and a half LIM domains 2), Chloride channel regulatory protein; Hin-1 (high-in-normal-1), WISP-1 (connective tissue growth factor related protein), SREC-4 (scavenger receptor expressed by endothelial cells-2), folate receptor. 这些差异蛋白涉及到基因表达调控、细胞黏附等众多的事件. 从另一个侧面研究了 *BRD7* 基因与鼻咽癌的关系, 扩展了 *BRD7* 基因的研究范围, 并进一步充实了该基因做为鼻咽癌候选抑瘤基因的证据.

**关键词** *BRD7* 基因, CNE1 细胞, 生长曲线, 双向电泳, MAIDL-TOF-MS

**学科分类号** R739

*BRD7* 是我室余鹰等<sup>[1]</sup>采用混合探针文库筛选鼻咽癌差异表达基因时获得、在鼻咽癌活检组织中表达下调 / 缺失的基因 (GenBank 登陆号为 AF152604). *BRD7* 蛋白在 129~237 位氨基酸处包含一保守功能域——溴区结构域 (bromodomain), 是一新的 bromodomain 蛋白.

溴区结构域是由约 110 个氨基酸组成的, 在进化上高度保守的功能结构域<sup>[2]</sup>, bromodomain 可特异性地与组蛋白末端乙酰化的赖氨酸位点结合, 并将核内的组蛋白乙酰化信号传递给转录相关的蛋白质复合物, 通过改变染色质的构象, 从而参与基因转录调控<sup>[3-8]</sup>.

为了研究该基因对鼻咽癌细胞 CNE1 的影响, 我们在构建 *BRD7* 的真核表达载体 *BRD7*/pcDNA 3.1(+) 的基础上, 通过脂质体转染方法, 将 *BRD7* 基因导入 NPC 细胞株 CNE1 细胞中, 并以 CNE1 细胞为对照, 通过 RT-PCR 和 RNA 印迹方法检测 *BRD7* 基因的表达水平, 挑选出 *BRD7* 基因高表达的细胞克隆为研究对象, 运用细胞生长曲线研究该基因对 CNE1 细胞的生长影响, 运用双向电泳结合质谱, 研究重表达 *BRD7* 后对鼻咽癌细胞株 CNE1

蛋白质表达谱的改变, 通过对差异蛋白质点的鉴定, 从而探讨该基因的可能的作用机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1** 低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞系 HNE1 为中南大学肿瘤研究所构建.

**1.1.2** pcDNA3.1(+) 载体为哺乳动物高效表达载体 (Invitrogen 公司). pcDNA3.1(+)/*BRD7* 载体由我室构建.

**1.1.3** 随机引物标记盒、反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Promega 公司, TRIZOL™ 试剂购自美国 GIBCOL/BRL 公司. 同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京福瑞生物工程公司.

\*湖南省自然科学基金资助项目(04JJ3097), 国家自然科学基金资助项目(30400528).

\*\* 并列第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

收稿日期: 2005-03-07, 接受日期: 2005-03-31

**1.1.4** 引物由大连宝生物有限公司合成. 左引物为 5' cgt gga tcc gaa gaa gta gaa cag aca 3', 右引物为 5' att ccc ggg gaa tta ttt cct ggc taa 3'.

**1.1.5** 蛋白质组研究所用试剂. 固相 pH 梯度干胶条(pH 3~10 L, 18 cm)等购自 Pharmacia 公司; 丙烯酰胺(acrylamide)、亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、银染试剂为国产分析纯; 乙腈(ACN)为国产色谱纯; 其他试剂为国产分析纯试剂.

**1.1.6** 仪器. IPGphor 电泳单元及双向电泳附件、等电聚焦系统、IPGPhor 电泳系统购自 Pharmacia 公司; 垂直平板电泳系统、循环水浴箱、PDQuest 2-D 胶分析系统为 Bio-Rad 公司产品.

## 1.2 方法

**1.2.1** pcDNA3.1(+)/BRD7/CNE1 稳定表达系的建立. 在 6 孔板中, 每孔接种  $2 \times 10^5$  个 HNE1 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 80% 汇合期, 将重组体 DNA 和脂质体混合, 加到细胞中培养 12 h 后, 用 Hank's 液洗涤转染中的细胞后, 加入完全培养基继续培养. 细胞转染 48 h 后, 用选择性培养基(G418 浓度: 1~3 天为 250 mg/L, 以后为 550 mg/L)培养, 隔天换液, 8~10 天左右出现抗性克隆, 14 天后挑单个克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系.

**1.2.2** 阳性克隆 RT-PCR 鉴定按《分子克隆》操作.

**1.2.3** RNA 斑点杂交按分子克隆操作.

**1.2.4** 转基因细胞 CNE1 生长曲线的绘制. 为了初步确定 BRD7 基因对肿瘤细胞的效应, 分别将 BRD7/pcDNA3.1(+)阳性克隆细胞、空白质粒对照 CNE1 细胞及未转染的 CNE1 细胞各  $1 \times 10^5$  个接种于 6 孔板内, 每隔 24 h 消化细胞计数, 每次每种细胞计数 3 孔, 取均值. 共检测 7 天, 以细胞数为纵坐标, 间隔时间为横坐标绘出生长曲线. 数据经统计学软件 SPSS 处理, 采用多组样本均数间的比较.

**1.2.5** 蛋白质抽提与定量. 细胞培养至对数生长期, 弃掉培养液, 用胰酶消化, 加入裂解液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT), 液氮反复冻融后, 加入 RNase (20 g/L) 4℃ 放置 15 min、13 000 r/min、4℃ 离心 30 min, 收集上清液, 样品存放 -70℃. 蛋白质定量按文献[9]所述的 Bradford 方法操作. 确保每一次样品上样量为 200  $\mu$ g.

**1.2.6** 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳. 采用 IPGphor 等电聚焦系统, 把干胶条置于胶条盒中放

置在 IPGphor 电泳仪上水化 (水化液组成为: 8 mol/L 尿素, 0.5% CHAPS, 2.8 g/L DTT 及痕量溴酚蓝) 15~18 h, 水化完毕按 500 V, 1 000 V 各 1 h, 8 000 V 5 h 等电聚焦. 聚焦结束后取出胶条, 加入平衡液 A (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 0.1% DTT) 振荡平衡 15 min, 再换平衡液 B (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 1.5% 碘乙酰胺) 振荡平衡 15 min, 取出胶条滤干, 准备第二向电泳.

**1.2.7** 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 按照文献[9]所述的方法进行, 采用分离胶浓度为 15% 的不连续 SDS-PAGE 垂直平板电泳.

**1.2.8** 银染. 按银染试剂盒操作手册操作.

**1.2.9** 图像分析. 通过 melane-4 分析软件系统分别比较 3 次重复结果图谱, 将 CNE1 和转染 BRD7 的细胞进行匹配分析, 获得 BRD7 基因转染所致的蛋白质差异表达变化, 将这些蛋白质点在双向电泳凝胶图谱上标出.

**1.2.10** 蛋白质原位酶解按 Bergman 等的方法进行.

**1.2.11** MADLI-TOF 肽质指纹图. a. 在样品中加入 10  $\mu$ l 0.1% TFA 水溶液, 振荡, 使样品充分溶解, 再用美国 Millipore 公司的 10  $\mu$ l ZipTip™ C18 器嘴脱盐. b. 质谱分析制备好的样品使用美国 BRUKER 公司的 ProFlex™ III MADLI-TOF 质谱仪进行分析.

## 2 结 果

### 2.1 pcDNA3.1 (+) /BRD7 重组体转染、克隆筛选与鉴定

BRD7 基因在鼻咽癌细胞系 CNE1 中表达下调, 我们运用转基因技术将 pcDNA3.1(+)/BRD7 导入 CNE1 细胞, 建立稳定传代的转染细胞系. pcDNA3.1(+)/BRD7 重组体通过脂质体转染 HNE1 细胞后, 经 G418 筛选, 挑选 14 个 pcDNA3.1(+)/BRD7/CNE1, 3 个 pcDNA3.1(+)/CNE1 重组体转染的抗性克隆, 扩大培养建立为稳定的转染细胞系. 我们抽提细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 和 RNA 斑点杂交方法检测该基因的重表达, 并以 GAPDH 为内对照. RT-PCR 结果显示, 14 个 pcDNA3.1(+)/BRD7/CNE1 克隆中 2、3、4、6、7、9、10、11、14 号抗性克隆有较强的 325 bp 扩增条带, 而未转染的 CNE1 细胞及空白载体转染组未见 325 bp 的明显扩增条带 (图 1), 进而我们将 7 个阳性克隆进行 RNA 斑点杂交, 杂交结果与 RT-PCR 相一致

(图 2), 经灰度扫描分析, 3 号克隆的 *BRD7*/*GAD* 的比值最大, 说明 3 号克隆的 *BRD7* 基因表达最强, 故选 3 号克隆为我们的实验细胞.

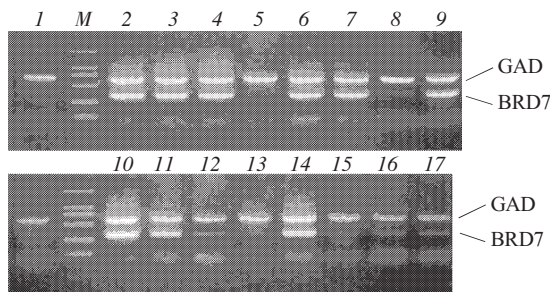


Fig.1 Results of RT-PCR

The probe of *BRD7* were detected in 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 14, but not detected in CNE1 and pcDNA3.1(+)/CNE1. The results showed the *BRD7* had been over-expressed. 1: CNE1; M: DL2000 marker; 2~7, 9~17: CNE1/pcDNA3.1(+)/*BRD7*; 8: CNE1/pcDNA3.1(+).

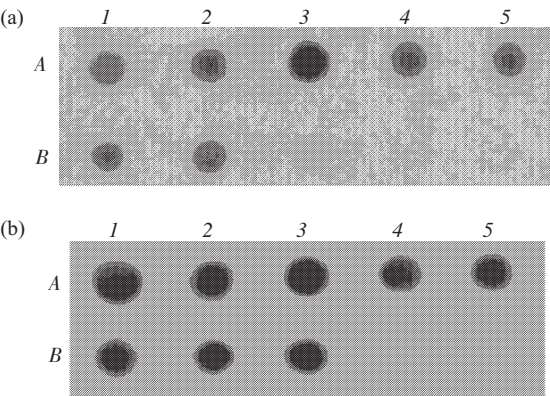


Fig.2 Results of dot-blot

(a) The positive clone hybridize with probe of *BRD7*. (b) The same membrane hybridize with probe of *GAD*. A1~A5, B1~B2: pcDNA3.1(+)/*BRD7*/CNE1; B3: CNE1.

2.2 *BRD7* 基因的重表达对 CNE1 细胞生长抑制实验

为了研究 *BRD7* 基因对 CNE1 细胞生长曲线的影响, 我们以未转染的细胞 CNE1 和 pcDNA3.1(+)/CNE1 细胞为对照, 以稳定表达 *BRD7* 基因的 pcDNA3.1(+)/*BRD7*/CNE1 细胞克隆为实验组, 均以相同的细胞数接种后, 连续 6 天每隔 24 h 计数, 每组每次计数 3 个孔所得  $\bar{x} \pm s$  见表 1, 绘制 HNE1、pcDNA3.1(+)/CNE1 和 pcDNA3.1(+)/*BRD7*/CNE1 细胞的生长曲线, 结果表明: pcDNA3.1(+)空载体转染后对 CNE1 细胞生长影响不大, 而 pcDNA3.1(+)/*BRD7* 转染 CNE1 细胞后, 其生长速度明显减慢(图 3), 从第 5 天起与 CNE1 细胞相比存在明显差异( $P < 0.001$ ).

Table 1 *BRD7* effect on HNE1 cell growth

| t/day | Cell numbers/ $10^4$ |                  |                               |
|-------|----------------------|------------------|-------------------------------|
|       | CNE1                 | pcDNA3.1(+)/CNE1 | pcDNA3.1(+)/CNE1/ <i>BRD7</i> |
| 1     | 1.00                 | 1.00             | 1.00                          |
| 2     | 1.13 $\pm$ 0.20      | 1.12 $\pm$ 0.21  | 1.03 $\pm$ 0.07               |
| 3     | 2.42 $\pm$ 0.78      | 2.44 $\pm$ 0.60  | 1.89 $\pm$ 0.36               |
| 4     | 6.10 $\pm$ 0.86      | 5.26 $\pm$ 2.07  | 3.36 $\pm$ 0.60               |
| 5     | 12.62 $\pm$ 3.23     | 11.44 $\pm$ 3.56 | 5.70 $\pm$ 1.97               |
| 6     | 24.28 $\pm$ 5.70     | 22.68 $\pm$ 3.44 | 8.56 $\pm$ 4.39               |
| 7     | 33.24 $\pm$ 3.77     | 29.76 $\pm$ 3.10 | 10.85 $\pm$ 4.41              |

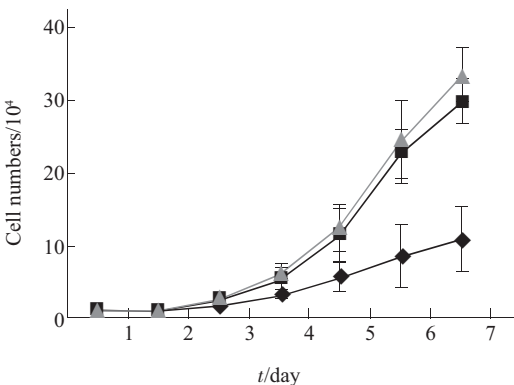


Fig.3 *BRD7* inhibits HNE1 cell growth

◆—◆: CNE1/pcDNA3.1(+)/*BRD7*; ■—■: CNE1/pcDNA3.1(+); ▲—▲: CNE1.

2.3 转染 *BRD7* 的 CNE1 细胞的 L-D 制备分析

抽提 CNE1 和 pcDNA3.1(+)/*BRD7*/CNE1 细胞的总蛋白质, 进行蛋白质定量, 确保每一次上样量为恒定在 300  $\mu$ g. 经双向电泳, 采用 melane4 软件分析 3 次重复实验, 发现银染后二维凝胶图上可识别的蛋白质斑点约有 700 个, 主要分布在等电点 4.0 到 7.5, 在 *BRD7* 基因过表达后, 90%~95% 的蛋白质表达与对照组一致, 5%~10% 的蛋白质为差异表达. 说明 *BRD7* 基因的过表达可导致 CNE1 细胞蛋白质表达谱的改变. 经匹配分析后, 我们确立了 13 个受 *BRD7* 基因转染影响表达明显上调的差异表达蛋白质点, 确立了 14 个明显下调的差异蛋白质点. 结果见图 4. 图 5 显示的是部分差异表达蛋白的具体分析结果, 其中右边显示的是采用双向分析软件 melane-4 对相应蛋白质点的蛋白表达量的三维模拟图.

2.4 差异蛋白质点的质谱分析

将 27 个差异表达的蛋白质点从二维凝胶中切下, 进行蛋白质胶内原位消化、酶解后的肽混合物经 MALDI-TOF-MS 分析, 获得了 19 个比较可靠的结果, 其中图 6 是下调蛋白质斑点 PD9 斑点的肽质指纹图, 详细结果见表 2 和表 3.

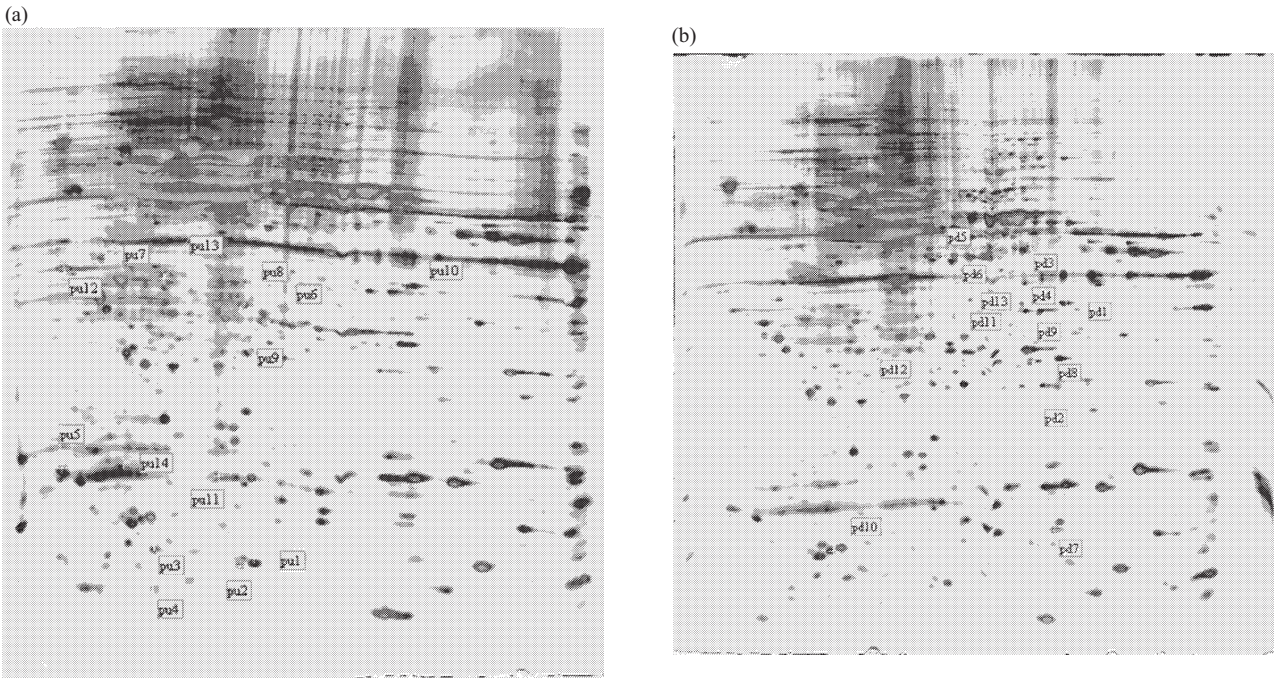


Fig.4 Differential expression proteins

(a) Identify up-regulated expression proteins after transfected *BRD7*. (b) Identify down-regulated expression proteins after transfected *BRD7*.

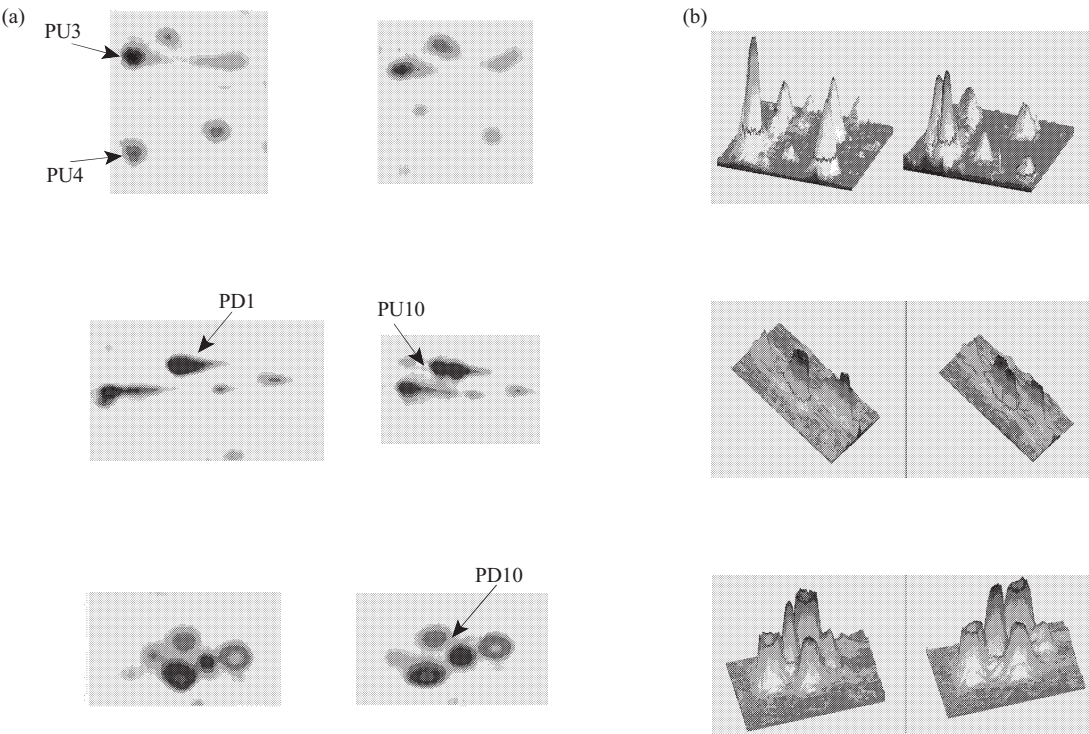
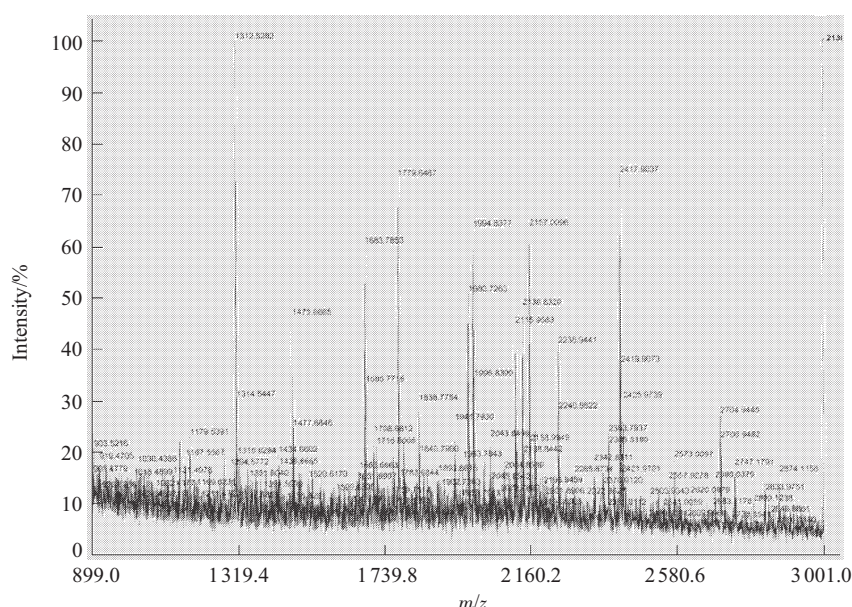


Fig.5 Analysis of some differential expression proteins

(a) Analysis of up-regulated protein PU3,PU4,PU10 and down-regualted protein PD1,PD10.  
(b) 3-D analysis of differential proteins by melane4.



### 3 讨 论

肿瘤发生是一个多因素累积的最终结果, 就从基因的层面而言, 肿瘤的发生涉及到癌基因的激活与抑癌基因的失活. *BRD7* 基因作为我室克隆的 NPC 相关基因, 它在 NPC 及 NPC 细胞系中表达明显下调, 并且证实该基因能够部分逆转 HNE1 细胞的恶性表型<sup>[10-12]</sup>, 为了充分了解该基因与 NPC 之间的联系, 我们扩展该基因的研究范围, 将 *BRD7* 基因转入到鼻咽癌细胞株 CNE1 中, 研究该基因过表达后对 CNE1 生物学行为的影响, 结果显示: pcDNA3.1(+)空载体转染后对 CNE1 细胞生长影响不大, 而 pcDNA3.1(+)/*BRD7* 转染 CNE1 细胞后, 其生长速度明显减慢, 并且从第 5 天起与 CNE1 细胞相比存在明显差异( $P < 0.001$ ), 这说明 *BRD7* 基因不仅能够抑制 HNE1 细胞的生长, 而且对于 CNE1 细胞有着同样的生物学效应.

*BRD7* 基因能够部分抑制 CNE1 细胞的生长, 为了进一步探讨其可能的作用机制, 我们采用双向电泳技术研究 *BRD7* 基因转染 CNE1 细胞前后, CNE1 细胞蛋白质表达谱的改变, 同时采用质谱技术对差异蛋白质点的鉴定, 从而了解 *BRD7* 基因作用 CNE1 细胞的可能途径. 通过研究, 我们鉴定出 9 个表达明显上调的蛋白质点: 指环蛋白 CKBBP1, T 细胞受体 VJ 链, 钙结合蛋白, FHL2 蛋白, 纤维连接蛋白, 氯通道调节蛋白, HIN-1 蛋白.

BCCIP(BRCA2 and CDKN1A(p21(Waf1/Cip1)) interacting protein)是近年来克隆的一个新基因<sup>[13]</sup>, 有研究表明: BCCIP alpha 能够抑制肿瘤细胞的生长, 其机制主要是通过提高 P21 对 CDK 的抑制能力<sup>[14]</sup>.另外的研究表明: BCCIP 对 P21 的调控主要是通过 P53 完成的, 该基因能够调节 P53 的转录活性<sup>[15]</sup>. FHL2(four and a half LIM domains 2)是 LIM 家族成员之一<sup>[16]</sup>, LIM 结构域的主要作用是参与蛋白质之间的相互作用, 在信号转导、细胞分化和细胞骨架的形成中都发挥着重要的作用. Fibronectin(纤维连接蛋白)是一种细胞间的锚定蛋白, 它可通过互相之间粘性部分形成丝状的纤维把相邻细胞连接起来. Fibronectin 蛋白在胚胎发育、创伤愈合等方面发挥着重要的作用. Chloride channel regulatory protein 是 1995 年克隆的细胞容积依赖性的氯离子通道激活调节蛋白<sup>[17]</sup>, 研究显示: 该基因在鼻咽癌

细胞 CNE-2z 胞浆中表达, 而不像其他氯离子调节蛋白在细胞膜上表达, 并且该基因在细胞中的表达水平及分布呈细胞周期依赖性, G1 期表达较低, S 期表达最高, M 期表达中等, 说明该基因参与了细胞周期的调节<sup>[18,19]</sup>. Hin-1(high-in-normal-1)是利用基因表达系列分析(SAGE)发现一个在乳腺癌细胞中表达量下调的基因, 研究显示 HIN-1 是一种肿瘤抑制候选基因, 并通常在乳癌产生的最早阶段是失活的<sup>[20]</sup>.最近研究显示: Hin-1 在鼻咽癌中表达下调, 其主要机制可能是由于其启动子区域高甲基化所导致的<sup>[21]</sup>.

同时, 我们还鉴定出 10 个明显表达下调的蛋白点, 包括: 淋巴细胞相关的死亡受体 4, 结蒂组织组织生长因子相关蛋白 1(connective tissue growth factor related protein WISP-1), Nit 蛋白 2, 内皮细胞清道夫受体 4(scavenger receptor expressed by endothelial cells-4,SREC-4), 辅脂酶(colipase), 叶酸受体(folate receptor), 磷酸甘油脂变位酶 2(phosphoglycerate mutase 2), 类似 TRAF 结合蛋白(similar to TRAF-binding protein domain), follistatin-related protein (FRP).

WISP-1 属于 CCN 家族成员之一, 该家族蛋白质具有重要的功能, 主要功能涉及到细胞的有丝分裂、黏附、凋亡、细胞基质的形成、细胞生长等方面. WISP-1 与 WNT 通路有着密切的关系, 该基因在乳腺癌、结肠癌等肿瘤中有基因扩增, 并且有证据表明该基因还能够调节肿瘤细胞的生长与侵袭转移<sup>[22]</sup>. 叶酸受体在多数肿瘤细胞中超表达, 正常组织细胞中的含量受到限制, 这些肿瘤包括卵巢癌、脑癌、肾癌、乳腺癌、骨髓癌和肺癌, 并且叶酸受体的浓度随着癌症恶化程度的增加而增加. 叶酸可与低分子质量的药物或大分子质量的共轭化合物连接, 这些共价结合的叶酸衍生物与叶酸受体的亲和力几乎不受影响, 都可靶向具有叶酸受体的肿瘤细胞. 因此, 可以通过将叶酸与放射性核素或治疗药物连接, 靶向癌细胞的叶酸受体, 从而达到诊断和治疗的目的<sup>[23,24]</sup>.

本文研究了 *BRD7* 基因对鼻咽癌细胞 CNE1 的影响, 并且进行了初步的机制探讨. 这一研究从另一个侧面研究了 *BRD7* 基因与鼻咽癌的关系, 并进一步充实了该基因做为鼻咽癌候选抑瘤基因的证据. 从本研究的结论来看, *BRD7* 能够部分抑制 CNE1 细胞的生长, 这与以前该基因对 HNE1 细胞生长的影响一致, 充分说明 *BRD7* 能够抑制鼻咽癌

的生长. 对于机制的探讨, 本研究同样采用蛋白质组学的方法筛选基因转染前后差异表达蛋白, 与先前研究相比, 除了筛选到差异表达蛋白 SREC-4<sup>[25]</sup> 相一致, 并没有筛选到更多相一致的差异表达蛋白, 这是本研究的遗憾之处. 分析其原因, 一方面可能是由于研究方法本身的局限性所导致的, 另一方面, 虽然 CNE1 与 HNE1 都属于鼻咽癌细胞, 并且转染 *BRD7* 基因后, 都能抑制这两株细胞生长的生物学效应, 但产生效应的作用机制可能各有所不同, 这也许回到了哲学上所说的“个性”与“共性”的问题. 对于筛选出来的差异表达蛋白, 我们将进行进一步的研究鉴定.

**致谢:** 该文章的完成得到了湖南师范大学生命科学院梁宋平教授领导的实验室的大力支持, 在这里表示由衷的感谢!

### 参 考 文 献

- 余 鹰, 谢 奕, 张必成, 等. 应用混合探针文库筛选法克隆多个肿瘤差异表达基因. 癌症, 2000, **19** (7): 709~712  
Yu Y, Xie Y, Zhang B C, *et al.* Chin J Cancer, 2000, **19**(7): 709-712
- Imhof A, Yang X J, Ogryzko V V, *et al.* Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. Curr Biol, 1997, **7**: 689~692
- Tamkun J W, Deuring R, Scott M P, *et al.* Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. Cell, 1992, **68** (3): 561~572
- Jenmougin F, Wurtz J M, Le Douarin B, *et al.* The bromodomain revisited. Trends Biochem Sci, 1997, **22**: 151~153
- Filetici P, Omghi P, Ballario P. The bromodomain: a chromatin browser. Frontiers in Bioscience, 2001, **6**: 866~876
- Dyson M H, Rose S, Mahadevan L C, *et al.* Acetylsine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. Frontiers in Bioscience, 2001, **6**(1): 853~865
- Horn P J, Peterson C L. The bromodomain: a regulator of ATP-dependent chromatin remodeling. Frontiers in Bioscience, 2001, **6**(1): 1019~1023
- Gerald V D. Bromodomain motifs and “scaffolding”. Frontiers in Bioscience, 2001, **6**(1): 1065~1068
- 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 颜子颖, 王海林 译, 金冬雁校. 精编分子生物学实验指南. 科学出版社, 1998. 332~333  
Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* by translated Yan Z Y *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. Press Science, 1998. 332~333
- 余 鹰, 谢 奕, 李桂源, 等. 一个新鼻咽癌抑癌候选基因的克隆及其功能初步分析. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (3): 319~323  
Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (3): 319~323
- 余 鹰, 朱诗国, 李桂源, 等. *BRD7* 基因转染对鼻咽癌细胞生长的抑制作用. 癌症, 2001, **20** (6): 4~10  
Yu Y, Zhu S G, Li G Y, *et al.* Chin J Cancer, 2001, **20** (6): 4~10
- 余 鹰, 朱诗国, 李桂源, 等. *BRD7* 单核苷酸多态性及其鼻咽癌易感性分析. 生物化学与生物物理进展, 2000, **28** (4): 568~572  
Yu Y, Zhu S G, Li G Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, **28** (4): 568~572
- Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (26): 16899~16903
- Liu J M, Yuan Y, Huan J, *et al.* Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIP alpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2. Oncogene, 2001, **20** (3): 336~345
- Meng X, Lu H, Shen Z. BCCIP functions through p53 to regulate the expression of p21Waf1/Cip1. Cell Cycle, 2004, (11): 1457~1462
- Amaar Y G, Thompson G R, Linkhart T A, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). J Biol Chem, 2002, **277** (14): 12053~12060
- Anguita J, Chalfant M L, Civan M M, *et al.* Molecular cloning of the human volume-sensitive chloride conductance regulatory protein, pICln, from ocular ciliary epithelium. Biochem Biophys Res Commun, 1995, **208** (1): 89~95
- Chen L X, Wang L W, Tim J C. *et al.* Cell cycle-dependent expression of volume-activated chloride currents in nasopharyngeal carcinoma cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, **283** (4): C1313~C1323
- Wang L W, Chen L X, Tim J C. CIC-3 expression in cell the cell cycle of nasopharyngeal carcinoma cells. Acta Physiological Sinica, 2004, **56** (2): 230~236
- Krop I E, Sgroi D, Polyak D A K, *et al.* HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. Pro Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (17): 9796~9801
- Wong T S, Kwong D L W, Yuen A P W, *et al.* Promoter hypermethylation of high-in-normal 1 gene in primary nasopharyngeal carcinoma. Clinical Cancer Research, 2003, **9** (8): 3042~3046
- Pennica D, Swanson T A, Welsh J W, *et al.* *WISP* genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in Wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. Pro Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (25): 14717~14722
- Lu Y, Low P S. Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: review of recent advances and future prospects. J Control Release, 2003, **91** (1~2): 17~29
- Figini M, Ferri R, Mezzananza D, *et al.* Reversion of transformed phenotype in ovarian cancer cells by intracellular expression of anti folate receptor antibodies. Gene Ther, 2003, **10** (12): 1018~1025
- 彭 聪, 梁宋平, 谭 琛, 等. 运用蛋白质组学技术对鼻咽癌候选抑癌基因 *BRD7* 的研究. 生物化学与生物物理学报, 2003, **35** (9): 816~822  
Peng C, Liang S P, Tan C, *et al.* Acta Biochim Biophys Sin, 2003, **35** (9): 816~822

## Study of NPC-related Gene *BRD7* Effect on NPC Cell Line CNE1\*

PENG Cong<sup>1)\*\*</sup>, LI Xiao-Ling<sup>1)\*\*</sup>, ZHOU Ming<sup>1)</sup>, LIU Hua-Ying<sup>1)</sup>, WANG Li-Li<sup>1)</sup>, ZHANG Qiu-Hong<sup>1)</sup>, YANG Yi-Xin<sup>1)</sup>, WU Shang-Hui<sup>2)</sup>, HUANG Bo-Ying<sup>2)</sup>, XIONG Wei<sup>1)</sup>, LI Gui-Yuan<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

<sup>2)</sup>Department of Cell Biology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract** In order to study effect of *BRD7* gene on NPC cell line CNE1, *BRD7* was introduced into CNE1 cells by liposome transfection. *BRD7* transfected cells were resulted in a declined growth curve. To account for the mechanism of this gene function on CNE1, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-D PAGE) and MALDI-TOF were performed. After image analysis and MALDI-TOF identification, 19 differential expression proteins were identified. These proteins included BCCIP(BRCA2 and CDKN1A (p21 (Waf1/Cip1))), FHL2(four and a half LIM domains 2), Chloride channel regulatory protein, Hin-1 (high-in-normal-1), WISP-1 (connective tissue growth factor related protein), SREC-4(scavenger receptor expressed by endothelial cells-2), folate receptor, which involved in transcription regulation, adherence and so on. The study extended the research field of *BRD7* and reinforced the evidences that *BRD7* act as a NPC-related candidate suppressor gene.

**Key words** *BRD7* gene, CNE1, growth curve, two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF-MS

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of Hunan (04JJ3097) and The National Natural Sciences Foundation of China(30400528).

\*\* PENG Cong and LI Xiao-Ling contributed equally to this paper.

\*\*\*Corresponding author . Tel: 86-731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

Received: March 7, 2005 Accepted: March 31, 2005