

Tet调控 STGC3 基因表达的 CNE2 细胞系裸鼠成瘤实验性研究*

邱清朝 胡 波 贺修胜** 罗 桥 龙治峰 唐国华 廖银花

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 STGC3 基因是一个新近克隆的肿瘤相关基因, 前期的体外实验研究结果表明, STGC3 基因在 CNE2 鼻咽癌细胞系高表达, 可明显抑制 CNE2 的生长增殖. 采用 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞系接种于裸鼠皮下, 以强力霉素(Dox)诱导 STGC3 基因高表达, 观测 STGC3 基因高表达对 CNE2 裸鼠体内成瘤的影响, 并探讨其可能作用机制. 运用 RT-PCR、蛋白质印迹及免疫组织化学方法, 分别从 mRNA 和蛋白质水平, 分析瘤组织中 STGC3 基因的表达; 用流式细胞仪检测移植瘤组织内肿瘤细胞的凋亡情况; 用免疫组织化学方法, 检测移植瘤组织凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达. 研究结果显示, STGC3 蛋白表达主要定位于细胞核内, Dox 诱导 STGC3 基因在 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞系高表达, Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞系裸鼠体内成瘤受到明显抑制, 与对照组比较, 移植瘤成瘤时间晚、生长慢、肿块小、细胞凋亡率高, Bax 蛋白表达增强, Bcl-2 蛋白表达减少, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$). 此体内实验研究结果与前期体外实验结果一致, 进一步证明 STGC3 基因对肿瘤细胞生长具有抑制作用.

关键词 鼻咽癌, STGC3 基因, 裸鼠, Tet-on 调控表达系统

学科分类号 R73-3, R730.231, R739.6

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)在世界大多数国家少见, 而在我国南方与东南亚地区的发病率相对较高, 尤其以湖南、广东、广西、福建、香港及台湾为突出. 流行病学研究显示, 鼻咽癌发病有明显的地域和种族差异, 10%的鼻咽癌患者有家族史^[1~4]. 肿瘤分子遗传学研究表明, 在鼻咽癌患者染色体 3p、9p、7q3 及 11q 等区域存在高频率杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)^[5~7]. 这些结果提示, 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, 恢复抑瘤基因的表达, 可直接或间接地抑制或杀伤肿瘤细胞, 从而达到肿瘤基因治疗的目的. STGC3 基因是本研究小组从 NPC 高频率 LOH 位点 3p21 区域的 ESTs 着手, 所克隆的一个 NPC 相关新基因(GenBank 登录号为 AY078383), 为单外显子基因, 精细定位于染色体 3p21, 其开放阅读框(ORF)为 438 bp, 编码一个由 146 个氨基酸组成、分子质量约为 16 ku、富含亮氨酸和丝氨酸的蛋白质. STGC3 蛋白含有 1 个糖基化位点, 1 个蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点, 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 3 个肉豆蔻酰化位

点, 1 个层粘连蛋白 G 结构域(laminin G domain)^[8]. 前期的体外实验研究结果显示, STGC3 基因高表达, 可明显抑制 CNE2 细胞的生长, 表明该基因可能为一个新的 NPC 候选抑瘤基因^[9,10]. 本研究采用 Tet-on 调控系统, 利用已成功建立的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞模型, 以强力霉素(Dox)诱导 STGC3 基因高表达, 观察 STGC3 基因在 CNE2 的高表达对裸鼠体内成瘤的影响, 并分析其可能机制, 进一步从体内验证 STGC3 基因的抑瘤作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. CNE2、Tet/pTRE/CNE2 和 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 3 组 NPC 细胞系, CNE2 为低表达

*国家自然科学基金资助项目(30470967), 湖南省自然科学基金资助项目(03Jjy3029), 中国博士后基金资助项目(2004035652).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281510, E-mail: hexiusheng118@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-15, 接受日期: 2006-10-28

STGC3基因的低分化鳞状上皮细胞癌细胞系, Tet/pTRE/CNE2为转载体细胞系, Tet/pTRE-STGC3/CNE2为转目的基因细胞系, 以脂质体介导质粒转染, 经G418筛选、克隆鉴定, 再将pTRE-STGC3和pTRE转染Tet/CNE2细胞, 经潮霉素筛选, 克隆鉴定, Dox最佳浓度确定而建立的稳定转染细胞系。

1.1.2 裸鼠. 3~4周龄雄性Balb/c裸鼠24只, 购自中国科学院上海实验动物中心(质量合格证号为SCXK(沪)2003-0003)。饲养于SPF级饲养室, 保持24h通风, 换气。

1.1.3 引物. 所用引物均经Primer5.0设计, 由大连宝生物公司合成. STGC3, 上游引物5' CGGGATCCATGGTTCTTGTCTTAT 3', 下游引物5' GCCCAAGCTTTTAGAGTAATAAAAGATTTC 3', 扩增产物长度为460 bp, β -actin, 上游引物5' GGACCTGACTGACTACCTC 3', 下游引物5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3', 扩增产物长度为553 bp。

1.1.4 酶与主要试剂. 高保真Taq酶和dNTP购自上海生工生物公司, AMV逆转录试剂盒购自Promega公司, 胰蛋白酶为华美生物工程公司产品, TRIzol试剂和RPMI 1640购自Invitrogen公司, DNA Marker DL2000为大连宝生物公司产品, 强力霉素(doxycycline, Dox)为Roche公司产品, SPF级裸鼠繁殖料购自科澳协力饲料有限公司, 兔抗人STGC3多克隆抗体由武汉博士德生物公司制备, 鼠抗人抗体Bcl-2, Bax为Santa Cruz公司产品, S-P免疫组化试剂盒为福建迈新生物技术公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. RPMI 1640(含10%新生牛血清)培养基, 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的二氧化碳培养箱培养. 分别收集对数期生长的细胞, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 吹打离心后用PBS洗1次, 再离心后用PBS重悬, 浓缩, 并吹打成单细胞悬液, 将各组细胞转移至一新的培养瓶中, 台盼蓝染色计数, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

1.2.2 裸鼠接种实验. 接种实验在百级无菌室中进行, 24只裸鼠随机分成4组, 每组6只, 分别为CNE2组、Tet/pTRE/CNE2组和Tet/pTRE-STGC3/CNE2组, 各组用Dox 20 mg/kg腹腔注射, 每天1次诱导^[1], Tet/pTRE-STGC3/CNE2组(等体积PBS腹腔注射, 每天1次诱导)。将上述3种细胞用5号针头反复吹打成单细胞悬液, 以

0.2 ml/只, 即 2×10^6 个/只, 接种于裸鼠右背皮下, 接种后裸鼠均给予自由给水, 饮食, 无菌饲养。

1.2.3 裸鼠体内成瘤观察. 每天1次, 记录皮下肿瘤出现的时间. 3天1次测量裸鼠体重和移植瘤大小, 用电子天平称量裸鼠体重, 用0~125 mm规格的游标卡尺测量移植瘤的最大直径(L)和最小直径(W), 用体积公式 $V = W^2 \times L \times 0.52$ 计算移植瘤体积. 抑瘤率(%)=(空载体组瘤重-转染组瘤重)/空载体组瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.4 移植瘤组织HE染色. 取经中性福尔马林充分固定的移植瘤组织, 切取最大面, 厚度2~3 mm, 以70%、80%、90%、95%、95%、100%、100%梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜观察, 摄像。

1.2.5 半定量RT-PCR检测. 取移植瘤组织200 mg, 抽提总RNA, 操作按照TRIzol抽提总RNA操作步骤进行. 分别取各组移植瘤组织总RNA 2 μ g, 按AMV逆转录试剂盒操作步骤进行RT反应. 以STGC3基因的上下游引物进行PCR扩增, 反应条件为: 95℃变性5 min, 94℃1 min, 56℃50 s, 72℃1 min, 30个循环, 72℃延伸5 min. 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测STGC3基因460 bp的目的产物, 以 β -actin为内参照, 检测各组移植瘤组织STGC3基因mRNA表达水平。

1.2.6 蛋白质印迹检测. 取裸鼠移植瘤组织200 mg, 按组织和细胞裂解液1:5的比例加入1 ml裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.001 mol/L EDTA pH 8.0, 1 mg/L Leupatin, 100 mg/L PMSF), 匀浆器匀浆提取总蛋白, BCA法蛋白质定量. 取50 μ g总蛋白, 100℃, 变性5 min; 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V, 1.5 h; 电转移至硝酸纤维素膜90 V, 1.5 h; 5%脱脂奶粉室温封闭, 摇1 h; 一抗(兔抗人1:100), 4℃摇过夜; TBS-T洗膜 $\times 3$ 次; 二抗(羊抗兔1:500)HRP标记, 室温摇1 h; TBS-T洗膜 $\times 3$ 次; ECL发光剂1 min; X光片曝光1 min, 洗片, 显影, 定影. 阅片, 比较分析各组移植瘤STGC3蛋白的表达水平。

1.2.7 细胞凋亡率测定. 分别取上述4组裸鼠移植瘤组织, 制备成单细胞悬液, 75%酒精固定, 调节细胞浓度至 1×10^6 /ml保存于4℃待用. PI染色, 经流式细胞仪, 测定细胞群体中的凋亡细胞数, 计算细胞凋亡率。

1.2.8 免疫组织化学方法检测裸鼠移植瘤组织中

STGC3、Bcl-2 和 Bax 的表达. 取 4 组移植瘤组织标本制作石蜡切片, 厚 4 μm , 操作步骤参照 SP 试剂盒说明进行, 一抗工作浓度均为 1 : 100, DAB 显色, 图像采集. 以已知的阳性片作为阳性对照, 以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照. 每张切片随机取 5 个高倍视野, 并将图象输入 PIPS-2020 高清晰度彩色病理图文分析系统, 进行染色强度 (平均吸光度) 分析.

1.2.9 统计学分析. 应用统计学软件 SPSS10.0 for Windows 中 one-way ANOVA 进行比较分析, 确定 $P < 0.05$, 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 诱导 STGC3 基因高表达对 CNE2 细胞裸鼠体内成瘤的影响

CNE2、Tet/pTRE/CNE2 和 PBS 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞组, 在接种后的第 3

天均长出明显的肿块. 而 20 mg/kg Dox 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞组, 则在第 5 天才出现肿块, 而且移植瘤生长速度也明显较其他 3 组缓慢, 于第 4 周时体积和重量明显小于其他 3 组($P < 0.05$) (表 1), 抑瘤率为 43.8%, 成瘤率为 100%. 瘤块体积生长曲线显示, Dox 诱导 STGC3 高表达, 可明显抑制 CNE2 在裸鼠体内的生长增殖(图 1), 但对其成瘤率, 并无影响, 4 组 24 只裸鼠均有肿瘤形成.

Table 1 Comparison of mass and volume of the transplanted tumors in nude mice

Groups	$v(\text{tumor})/\text{cm}^3$	$m(\text{tumor})/\text{g}$
CNE2+DOX	4.923 ± 0.895	2.86 ± 0.83
Tet/pTRE/CNE2+DOX	4.126 ± 1.310	2.76 ± 0.73
Tet/pTRE -STGC3/CNE2+PBS	3.884 ± 1.483	2.72 ± 0.73
Tet/pTRE -STGC3/CNE2+DOX	2.320 ± 0.621	1.74 ± 0.66

$\bar{x} \pm s$.

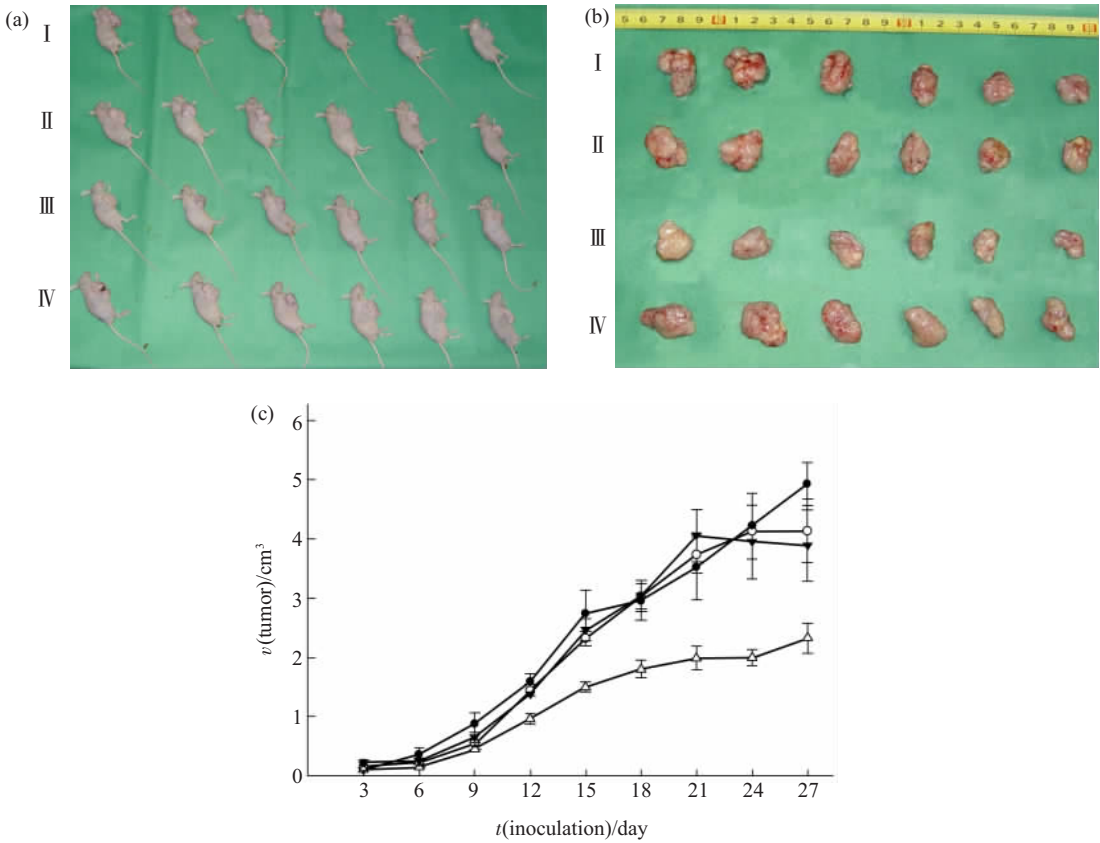


Fig. 1 Comparison of the growth condition of the transplanted tumors in nude mice

(a) The nude mice of the four groups. (b) Comparison of the transplanted tumors. (c) The growth curves of the transplanted tumors. I and ●—●: CNE2 cells induced by Dox; II and ○—○: Tet/pTRE/CNE2 cells induced by Dox; III and △—△: Tet/pTRE/CNE2-STGC3 cells induced by Dox; IV and ▼—▼: Tet/pTRE/CNE2-STGC3 cells induced by PBS.

2.2 裸鼠移植瘤形态学观察

4组移植瘤组织切片均显示为低分化鳞状细胞癌, 均有不同程度的病理性核分裂和嗜酸性坏死, 20 mg/kg Dox 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞大小形态较一致, 细胞体积变小, 核浆比例减小, 核仁数目、病理性核分裂及血管数较其他3组为少, 而纤维组织增多, 嗜酸性坏死增多(图2).

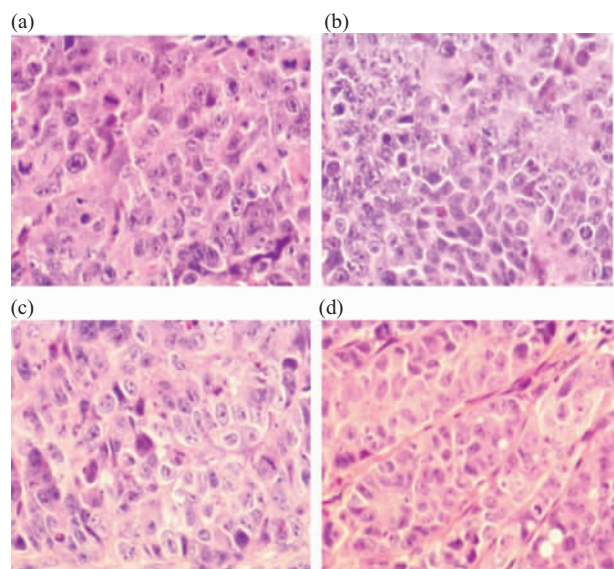


Fig. 2 H&E staining of the tumors formed in nude mice

(a) CNE2 cells induced by Dox. (b) Tet/pTRE/CNE2 cells induced by Dox. (c) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by PBS. (d) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by Dox. The original magnification was 400x.

2.3 裸鼠移植瘤 STGC3 基因 mRNA 表达水平的检测

RT-PCR 检测结果显示: 20 mg/kg Dox 诱导的

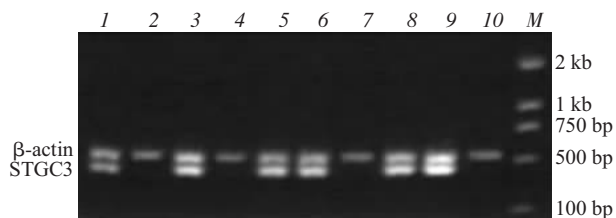


Fig. 3 Dox induced a high level of STGC3 mRNA expression in Tet/ pTRE-STGC3/CNE2 cell line

RNA was harvested from tumor tissue of the nude mice and RT-PCR was performed using STGC3- and β -actin-specific primers. $n=6$ for each group. 1,3,5,6,8,9: No1,2,3,4,5,6 nude mice of Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by Dox group; 2: CNE2 cells induced by Dox group; 4, 7: Tet/pTRE/CNE2 cells induced by Dox group; 10: Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by PBS group; 11: DNA marker DL2000.

Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞组, STGC3 基因 mRNA 高表达, 而在 CNE2、Tet/pTRE/CNE2 及 PBS 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞组, STGC3 mRNA 表达缺失(图3).

2.4 裸鼠移植瘤 STGC3 蛋白质表达水平的检测

蛋白质印迹检测结果显示: 20 mg/kg Dox 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 细胞组 STGC3 蛋白表达阳性, 而对照组 STGC3 蛋白表达呈阴性(图4).

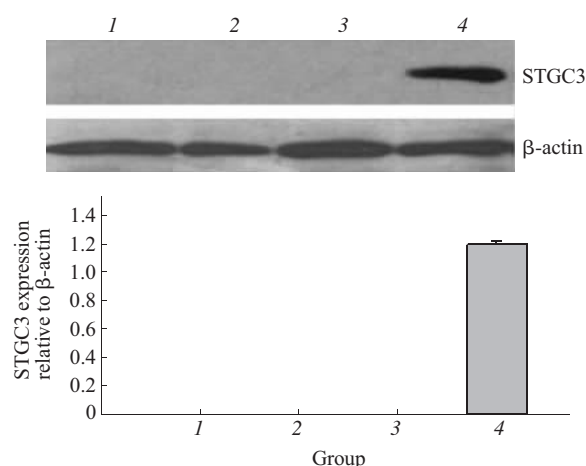


Fig. 4 High STGC3 protein levels are present in Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cell line treated with Dox

Protein was harvested from tumor tissue in nude mice, and Western blotting analysis performed using anti-STGC3 and anti- β -actin antibodies. Relative STGC3 expression was determined by densitometry relative to a β -actin control. 1: CNE2 cells induced by Dox; 2: Tet/pTRE/CNE2 cells induced by Dox; 3: Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by PBS; 4: Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by Dox.

2.5 裸鼠移植瘤细胞凋亡率

流式细胞仪检测细胞凋亡: Dox 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 组细胞凋亡率为 $(11.4 \pm 1.2)\%$, 而 Dox 诱导的 CNE2、Tet/pTRE/CNE2 以及 PBS 诱导的 Tet/pTRE-STGC3/CNE2 组的凋亡率分别为 $(2.5 \pm 0.8)\%$ 、 $(1.5 \pm 0.6)\%$ 和 $(1.7 \pm 1.2)\%$, 实验组较其他3个对照组凋亡率明显上升, 差异有显著性 ($P < 0.01$) (图5).

2.6 STGC3, Bcl-2 和 Bax 蛋白在裸鼠移植瘤组织中的表达

免疫组织化学结果显示: 20 mg/kg Dox 诱导的

Tet/pTRE-STGC3/CNE2细胞组 STGC3 蛋白表达阳性, 主要定位于细胞核, 对照组 STGC3 蛋白表达呈阴性; STGC3 基因高表达, 导致 Bcl-2 表达减少及 Bax 表达增加 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 比值降低 (图 6, 表 2).

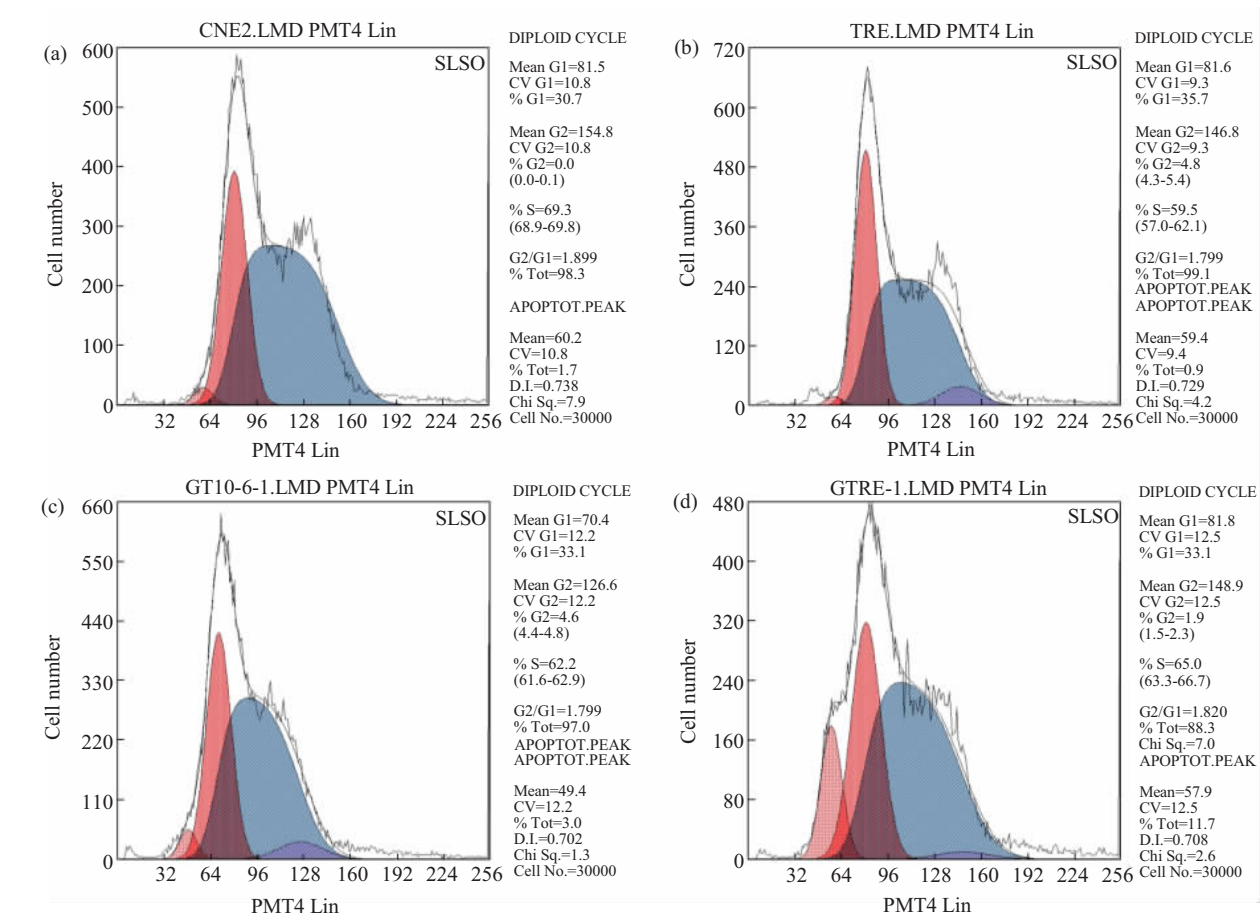


Fig. 5 Flow cytometry analysis of the cells from the tumor tissue formed in the nude mice (a) CNE2 cells induced by Dox. (b) Tet/pTRE/CNE2 cells induced by Dox. (c) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by PBS. (d) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by Dox.

Groups	Optical density		
	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
CNE2+DOX	48.6 ± 7.6	16.2 ± 3.6	3.00
Tet/pTRE/CNE2+DOX	47.4 ± 6.1	14.2 ± 1.5	3.34
Tet/pTRE-STGC3/CNE2+PBS	49.4 ± 6.4	15.6 ± 2.4	3.17
Tet/pTRE-STGC3/CNE2+DOX	19.2 ± 3.7	51.4 ± 11.5	0.37

$\bar{x} \pm s.$

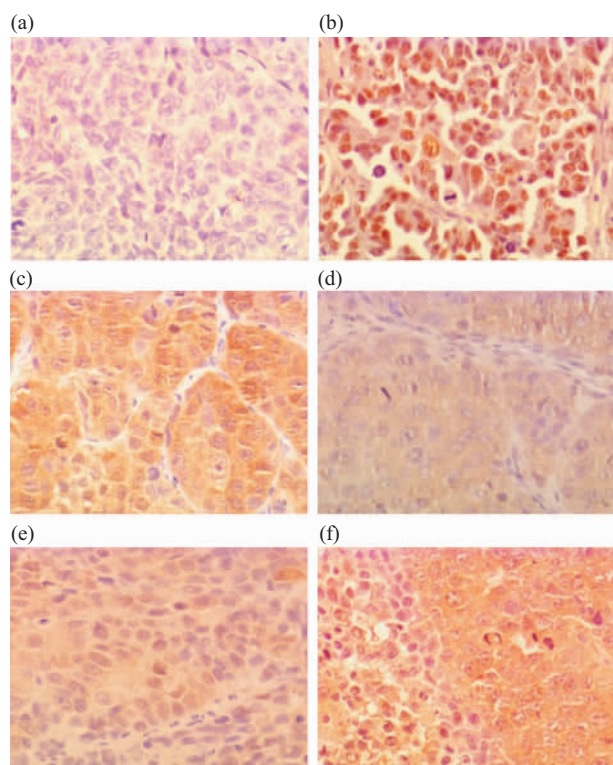


Fig. 6 Immunohistochemistry analysis of tumor sections

(a) and (b) STGC3 expression. (c) and (d) Bcl-2 expression. (e) and (f) Bax expression. (a), (c) and (e) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by PBS. (b), (d) and (f) Tet/pTRE-STGC3/CNE2 cells induced by Dox. The original magnification was 400 $\times$.

3 讨 论

STGC3基因是本实验室所克隆的一个鼻咽癌相关新基因,定位于3p21,全长cDNA为1 271 bp,开放阅读框为438 bp,编码一个由146个氨基酸组成,分子质量为16 ku的蛋白质^[9].我们的前期实验研究表明,STGC3在人多种正常组织均有表达,而在原发性鼻咽癌、鼻咽癌细胞系及其他8种肿瘤细胞系中表达下调,提示该基因的表达下调,可能与多种肿瘤发生发展相关,该基因编码蛋白质定位于胞核与胞浆,提示STGC3可能与细胞分裂增殖及基因转录有关^[8, 9].我们并采用四环素(tetracycline, Tet)基因表达系统,构建了调控STGC3基因表达的CNE2细胞系,该细胞模型具有低背景,高诱导表达的特性^[10].本研究进一步从体内探讨诱导STGC3高表达对CNE2裸鼠成瘤影响.

本实验结果显示,在裸鼠体内,Dox诱导STGC3基因在Tet/pTRE-STGC3/CNE2细胞系高表达,使CNE2细胞的成瘤性降低,表现为成瘤时间晚及瘤块生长缓慢.生长曲线显示,STGC3基因在

肿瘤发生的早期作用较弱,但随着肿瘤的进一步发展,其抑瘤作用逐渐增强.移植瘤组织病理切片光镜观察显示,实验组肿瘤细胞大小形态较一致,细胞体积变小,核浆比例减小,病理性核分裂减少,嗜酸性坏死增多,纤维组织增多,仍为低分化鳞状细胞癌,未能完全逆转其分化.结果提示,单个基因虽然可抑制肿瘤生长,部分降低其恶性,但不能完全逆转,表明肿瘤的发生发展是一个多基因参与的病理过程和结果^[12].实验研究发现,细胞是否发生凋亡,取决于细胞内的促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的比值, Bcl-2/ Bax 比值低的细胞较 Bcl-2/ Bax 比值高的细胞容易发生凋亡, Bcl-2/Bax 比例还可作为一项有意义的临床预后指标^[13].本研究流式细胞仪及免疫组织化学检测结果提示, STGC3 抑制移植瘤生长,可能是 STGC3 高表达,引起 CNE2 细胞 Bcl-2 蛋白表达减少及 Bax 蛋白表达增加,导致 Bcl-2 与 Bax 比值下降,而促进 CNE2 细胞凋亡.

随着对肿瘤细胞凋亡调控相关机制的深入认识,将凋亡活化相关的基因导入肿瘤细胞,诱导其凋亡,是肿瘤基因治疗中最诱人的策略之一.有研究报道,导入野生型 p53 基因可有效抑制肿瘤细胞增殖,恢复野生型 p53 的功能,可以使急性淋巴瘤细胞系失去裸鼠体内致瘤能力^[14]. Rb 基因功能的恢复,可以使视网膜母细胞瘤及骨肉瘤细胞系的生长速度、软琼脂集落形成率及裸鼠体内致瘤性明显下降^[15].另外 FasL 和 p73 基因治疗也正在研究中^[16, 17].本研究成功地建立了转染 STGC3 基因的 CNE2 细胞系裸鼠移植瘤模型,恢复 STGC3 基因在 CNE2 的高表达, CNE2 细胞凋亡率升高,裸鼠体内成瘤受抑制,表明 STGC3 基因可能是一个凋亡活化相关的新基因,本实验结果将为鼻咽癌临床基因治疗提供新的实验依据^[18].但 STGC3 基因抑瘤的确切分子机制有待进一步研究,我们将采用免疫共沉淀及蛋白质组学等方法,筛选和鉴定与 STGC3 蛋白相互作用的蛋白质分子,阐明 STGC3 基因在鼻咽癌发生发展中的作用与机制.

参 考 文 献

- 1 Zeng Z, Zhou Y, Zhang W, *et al.* Family-based association analysis validates chromosome 3p21 as a putative nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus. *Genet Med*, 2006, **8** (3):156~160
- 2 Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12** (6): 421~429
- 3 Loh K S, Goh B C, Lu J, *et al.* Familial nasopharyngeal carcinoma in a cohort of 200 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006, **132** (1): 82~85

- 4 Guo X C, Scott K, Liu Y, *et al.* Genetic factors leading to chronic Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in South East China: study design, methods and feasibility. *Hum Genomics*, 2006, **2** (6): 365~375
- 5 Lo K, Huang P W, Lee C K. Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, 1997, **110** (7): 548~549
- 6 Yau W L, Lung H L, Zabarovsky E R, *et al.* Functional studies of the chromosome 3p21.3 candidate tumor suppressor gene BLU/ZMYND10 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 2006, **119** (12): 2821~2826
- 7 Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to family nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2004, **64** (6): 1972~1974
- 8 贺修胜, 陈主初, 田芳, 等. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症*, 2003, **22** (1): 1~5
He X S, Chen Z C, Tian F, *et al.* *Chin J Cancer*, 2003, **22** (1): 1~5
- 9 贺修胜, 陈主初, 朱建华, 等. 染色体 3p21 区鼻咽癌相关新基因的克隆及功能初步分析. *癌症*, 2004, **23** (10): 1110~1115
He X S, Chen Z C, Zhu J H, *et al.* *Chin J Cancer*, 2004, **23** (10): 1110~1115
- 10 邓敏, 贺修胜, 罗桥, 等. Tet 调控 STGC3 基因表达 CNE2 细胞系的建立及其功能初步研究. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (1): 39~44
Deng M, He X S, Luo Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33** (1): 39~44
- 11 Zeng J, Li Z B, Luo S Q, *et al.* Retrovirus-mediated tk gene therapy of implanted human breast cancer in nude mice under the regulation of Tet-On. *Cancer Gene Therapy*, 2006, **13** (3): 290~297
- 12 Maeda K, Hobbs R M, Merghoub T, *et al.* Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature*, 2005, **433** (20): 278~285
- 13 Xie X, Clausen O P, de Angelis P, *et al.* The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*, 1999, **86** (6): 913~920
- 14 Roth J A, Nguyen D, Lawrence D D, *et al.* Retrovirus-mediated p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med*, 1996, **2** (9): 985~991
- 15 Windle J J, Albert D M, O'Brien J M, *et al.* Retinoblastoma in transgenic mice. *Nature*, 1990, **343** (6259): 665~669
- 16 ElOjeimy S, McKillop J C, El-Zawahry A M, *et al.* FasL gene therapy: a new therapeutic modality for head and neck cancer. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13** (8): 739~745
- 17 Das S, Somasundaram K. Therapeutic potential of an adenovirus expressing p73 beta, a p53 homologue, against human papilloma virus positive cervical cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther*, 2006, **5** (2): 210~217
- 18 Krishna S M, James S, Kattoor J, *et al.* Serum EBV DNA as a biomarker in primary nasopharyngeal carcinoma of Indian origin. *Jpn J Clin Oncol*, 2004, **34** (6): 307~311

Tumorigenicity Investigation of CNE2 Cell Line STGC3 Expression Induced by Tet-on System in Nude Mice*

QIU Qing-Chao, HU Bo, HE Xiu-Sheng**, LUO Qiao, LONG Zhi-Feng, TANG Guo-Hua, LIAO Yin-Hua

(Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract STGC3, a novel tumor related gene, was cloned recently. The previous studies indicated that STGC3 can inhibit the proliferation of CNE2 cell line *in vitro*. To examine the effect of STGC3 on the tumorigenicity of CNE2 cell line and explore its mechanism in nude mice. The Tet/pTRE/CNE2-STGC3 cell line was planted under the front leg skin of nude mice and induced by doxycycline (Dox). The mRNA and protein level of STGC3 in transplanted tumor tissues were detected with RT-PCR and Western Blotting. The apoptosis ratio of the tumor cell was analyzed with flow cytometry. STGC3, Bcl-2 and Bax proteins were examined by immunohistochemistry method. The results indicated that high level of STGC3 expression can inhibit tumorigenicity of CNE2 cell line in nude mice. Tumor grew slowly, later and smaller. Cell apoptotic percentage increased. Bcl-2 protein expression was down-regulated and Bax protein expression was up-regulated in Tet/pTRE/CNE2-STGC3 cell line ($P < 0.01$). The data indicated that STGC3 had a role as a tumor suppressor gene *in vivo*, which was in line with the results *in vitro*.

Key words nasopharyngeal carcinoma, STGC3 gene, nude mice, Tet-on regulating expression system

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470967), The National Natural Sciences Foundation of Hunan (03Jjy3029) and The National Science Fund of China for Post-Doctor (2004035652).

**Corresponding author. Tel: 86-734-8281510, E-mail: hexiusheng118@yahoo.com.cn

Received: September 15, 2006 Accepted: October 28, 2006