

LPLUNC1 基因对鼻咽癌细胞 HNE1 生长增殖的抑制作用研究*

杨一新^{1,2)**} 杨云波^{3)**} 李小玲¹⁾ 彭 聪¹⁾ 郭 勤⁴⁾ 沈守荣⁴⁾ 李桂源^{1)***}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾广州医学院生物化学教研室, 广州 510082;

³⁾中南大学药学院, 长沙 410078; ⁴⁾中南大学湘雅三医院, 长沙 410078)

摘要 LPLUNC1 在正常的鼻咽组织及人胚鼻咽组织中高表达, 而在 71% 的鼻咽癌中表达下调或缺失, 是与鼻咽癌的发生发展密切相关的新基因. 通过研究 LPLUNC1 基因对鼻咽癌细胞系 HNE1 的影响, 进一步确定其与鼻咽癌发生发展的关系. 将 LPLUNC1 基因全长 cDNA 克隆入 pcDNA3.1(+) 真核表达载体中, 通过脂质体介导稳定转染入 LPLUNC1 低表达鼻咽癌细胞系 HNE1 中, 通过 RT-PCR 及 RNA 印迹筛选 LPLUNC1 高表达的细胞株, 并利用细胞生长曲线、MTT、BrdU 掺入、流式细胞仪检测、软琼脂集落形成实验及裸鼠成瘤等实验, 研究了 LPLUNC1 对鼻咽癌细胞系 HNE1 细胞生长、增殖的影响. 结果发现, 稳定转染 LPLUNC1 的 HNE1 细胞的生长速度明显减慢, 在 MTT 与 BrdU 掺入实验发现 LPLUNC1 可明显地抑制鼻咽癌细胞的增殖, 并且通过流式细胞仪检测也发现, LPLUNC1 基因可明显延缓 HNE1 细胞的细胞周期进程, 使 G0/G1 期细胞增多而 S 期细胞相对减少. 进一步通过软琼脂集落形成及裸鼠成瘤实验发现, LPLUNC1 稳定转染后的 HNE1 细胞集落形成率与集落的大小均小于空白载体细胞, 同时能明显地抑制 HNE1 细胞的体外成瘤. 结果表明, LPLUNC1 基因能明显抑制鼻咽癌细胞 HNE1 的生长增殖, 是鼻咽癌发生发展中的重要候选抑瘤基因之一.

关键词 LPLUNC1 基因, 鼻咽癌, HNE1, 基因转染, 基因功能

学科分类号 R730.23

LPLUNC1 基因是中南大学肿瘤研究所采用联合抑制性消减杂交和 cDNA microarray 技术分离鼻咽癌差异表达基因的方法, 克隆的鼻咽组织特异性表达新基因, 属于 BPI/PLUNC 超基因家族的重要成员之一^[1~4]. BPI/PLUNC 超基因家族位于染色体 20q 约 300 kb 的区域, 已有的研究表明, 该基因家族成员中 SPLUNC1、BPI、BASE 等基因与鼻咽癌、非小细胞肺癌、乳腺癌及肿瘤的新生血管生成相关^[5~9]. LPLUNC1 基因定位于染色体 20q 11.21~20q11.22, 包含 16 个外显子和 15 个内含子, cDNA 全长 1 684 bp, 编码 484 个氨基酸、分子质量约为 52.4 ku 的蛋白质, 生物信息学预测 LPLUNC1 蛋白含有 2 个 BPI (bactericidal permeability-increasing protein) 结构域. 我们应用 RT-PCR 和 RNA 印迹分析表明, LPLUNC1 基因在鼻咽癌上皮细胞株 HNE1、HNE2、5-8F 以及 71% (33/48) 的鼻咽癌活检标本中表达下调^[10]. 同时我们应用多组织 RNA 印迹膜证实该基因仅在鼻咽部表

达, 是鼻咽组织特异性表达的基因, 这些都提示 LPLUNC1 可能在鼻咽癌的发生发展中起非常重要的作用.

本实验旨在研究 LPLUNC1 基因对鼻咽癌细胞 HNE1 的影响, 说明 LPLUNC1 是抑制鼻咽癌发生发展的重要基因之一.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与实验动物. HNE1 是本所构建的低分化鼻咽癌上皮细胞系, 以 RPMI 1640 加 10% 的小牛血清培养基, 95% 的湿度、5% 的 CO₂、37℃ 条件下培养. 裸鼠购自中国科学院动物研究所, 在中

*国家自然科学基金资助项目(30300201, 30470955).

** 并列第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805446, Fax: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2006-09-27, 接受日期: 2006-11-02

南大学动物学部无菌饲养。

1.1.2 酶及主要试剂. 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自美国 Promega 公司, Taq 酶、DNA marker 由大连宝生物工程公司提供, RPMI1640 购自美国 GIBCO/BRL 公司, 小牛血清购自中国 SABC 公司, G418 与脂质体购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 LPLUNC1 真核表达载体的构建. LPLUNC1 基因是以 cDNA 文库为模板, 根据 LPLUNC1 基因与 pcDNA3.1(+)载体的酶切图谱, 以 F 端: 5'-AA-GCGGCCGCATGGCCGGCCCGTGGACCTTCAC-CCTT 3' (*Not* I); R 端: 5'-TATCTAGATCAC-TGGGAGACAGGAGAGGTGGGTTT 3' (*Xba* I) 引物经 PCR 扩增将 LPLUNC1 基因 cDNA 全长定向克隆入 pcDNA3.1(+)真核表达载体中, 经酶切与测序鉴定正确后备用。

1.2.2 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 稳定转染细胞系的构建. 接种 2×10^5 HNE1 细胞于 6 孔板中, 完全培养基中细胞生长至 50%~70%融合期。采用脂质体介导的基因转染方法, 将 pcDNA3.1(+)空白载体与构建好的重组表达载体 pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 分别转染 HNE1 细胞。500 mg/L 的 G418 选择性培养基筛选 2 周后, 可见明显的抗性克隆, 挑选 6 个 pcDNA3.1(+) 空白载体与 20 个 pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 抗性克隆, 扩大培养后用 RT-PCR 及 RNA 印迹鉴定 LPLUNC1 高表达的细胞株。

1.2.3 阳性克隆中 LPLUNC1 的表达分析. 采用 Trizol 进行 RNA 的提取并进行质量鉴定, RT-PCR 反应采用 LPLUNC1 引物为 F: 5'-TAGTGCCATC-CCTGCCCAAT 3', R: 5'-TGCTTGACTTCAGC-CGATGG 3'; 反应条件: 94℃, 50 s; 59℃, 50 s; 72℃, 1 min; 28 个循环后 72℃延伸 10 min。同时点杂交与 RNA 印迹采用同样的引物来检测 LPLUNC1 的表达, 按参考文献[11]实验方法进行。

1.2.4 细胞计数与生长曲线的绘制. 分别将 2×10^4 个 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 阳性克隆细胞、HNE1/pcDNA3.1(+) 空白载体细胞及未处理的 HNE1 细胞接种于 24 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细胞生长曲线。

1.2.5 MTT 实验. 在 96 孔板中分别接种

HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 阳性克隆细胞、HNE1/pcDNA3.1(+) 空白载体细胞及未处理的 HNE1 细胞, 每孔接种 1×10^4 个细胞, 37℃培养 72 h 后, 细胞融合度达 80%左右, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ l, 继续培养 4 h, 中止培养, 弃培养基, 每孔加入 150 μ l DMSO, 室温振荡混匀 30 min, 使结晶物成分的溶解, 选择 490 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔的吸光度值并记录结果。每组细胞设阴性对照 1 孔, 11 个平行孔。并重复进行 3 次实验。

1.2.6 BrdU 掺入实验与免疫组织细胞化学分析. 在预先放有盖玻片的 6 孔板中每孔接种 1×10^5 个细胞, 37℃培养 12 h, 细胞融合达 60%左右, 加入终浓度为 30 nmol/L BrdU 于培养基中, 继续培养 16 h 后, 中止培养, 用抗 BrdU 的抗体进行免疫组织细胞化学分析: 用 1:1 混合的甲醇: 丙酮室温固定并用抗原修复液煮玻片 20~30 min 暴露核抗原, 3%过氧化氢去除内源性过氧化氢酶的作用及 0.25%的 TritonX-100 破膜、封闭后, 滴加 1:100 稀释的鼠抗 BrdU 抗体, 4℃过夜, 滴加 1:1 000 稀释的羊抗鼠二抗, 37℃孵育 1~2 h, DAB 显色, 苏木素复染, 封片并在显微镜下观察并记录分析结果。

1.2.7 软琼脂集落形成试验. 配制 0.6%的底层琼脂, 取 4 ml 均匀铺于 60 mm 平皿内, 置 4℃10 min, 凝固后将含单细胞的 0.33%顶层琼脂培养液接种于底层琼脂上, 每种细胞接种 5 个平皿, 接种密度为 2.0×10^4 /平皿。在含 5% CO₂ 的 37℃生化培养箱中培养 15 天, 计数平均集落形成率。

1.2.8 裸鼠致瘤实验. 4 周龄雄性 Balb/c 裸鼠 9 只随机分成 3 组, 将转染 LPLUNC1 基因和空载体转染的 HNE1 细胞及未转染的 HNE1 细胞, 按 1×10^7 个/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 天后处死, 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。

1.2.9 流式细胞分析. 分别取生长状态良好的 HNE1 细胞、转染空白载体和转染 LPLUNC1 基因的细胞各 3 瓶用含 0.5%小牛血清的培养基培养使细胞同步化, 然后换用完全培养基待细胞融合至 70%~80%, PBS 洗涤, 70%乙醇固定。调节细胞浓度至 1×10^6 /ml 后待用。加入 PI 染液, 在流式细胞仪测定细胞的荧光强度, 数据经计算机软件分析, 得出细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1 (+) -LPLUNC1 重组体的构建与鉴定

LPLUNC1 基因经 *Not* I 和 *Xba* I 修饰后定向克隆入 pcDNA3.1(+)载体中, 转化后随机挑选 6 个重组克隆, 少量培养抽提质粒, 选用 *Bam*H I 酶切鉴定阳性克隆. 因为在载体多克隆位点 *Not* I 上游

和 LPLUNC1 基因编码区第 1 216 碱基处各有一个 *Bam*H I 酶切位点, 所以正向插入可以酶切出 1.2 kb 的插入片段. 如图 1a 所示, 3 个克隆为阳性克隆, 3 个克隆为阴性克隆. 对正向插入克隆质粒测序分析表明, 该插入序列与预期一致(图 1b), 说明 pcDNA3.1(+)/LPLUNC1 真核表达载体的构建是成功的.

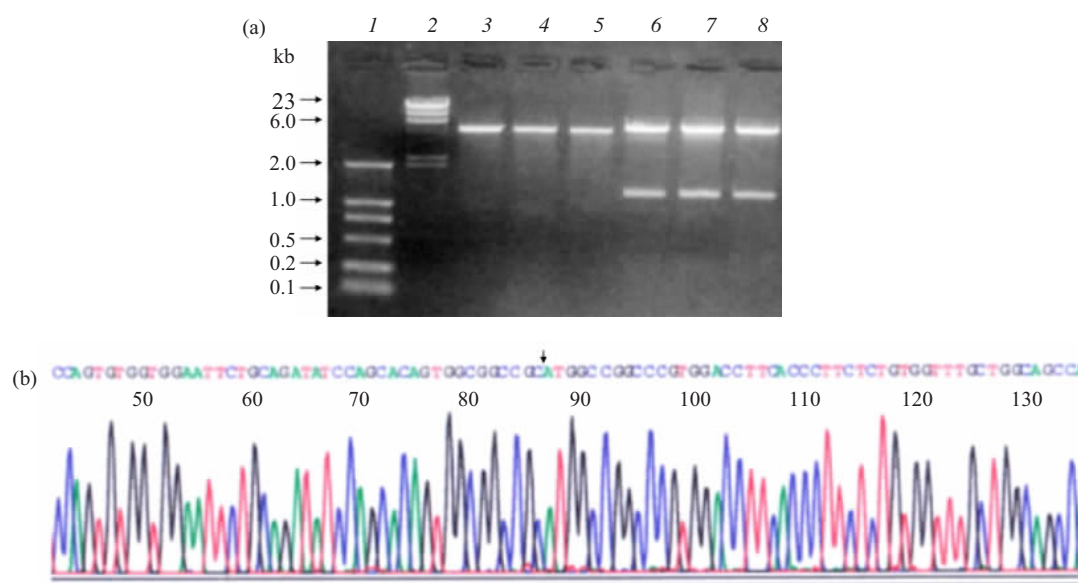


Fig. 1 The construction of pcDNA3.1 (+) /LPLUNC1 plasmid

(a) 1: DL2000 DNA markers; 2: λ DNA/*Hind* III markers; 3~5: Negative clones; 6~8: Positive clones. (b) Sequencing of the pcDNA3.1(+)/LPLUNC1 plasmid.

2.2 HNE1/pcDNA3.1 (+) -LPLUNC1 稳定转染细胞系的构建, 阳性克隆的筛选与鉴定

为了研究 LPLUNC1 对鼻咽癌细胞系 HNE1 恶性表型的影响, 我们将构建的 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 稳定转染细胞系, 同时利用 HNE1/pcDNA3.1(+)空白载体稳定转染细胞系作为对照细胞. 经 RT-PCR、点杂交及 RNA 印迹确定稳定转染细胞系中 LPLUNC1 高表达的细胞克隆. 我们将总 RNA 提取后进行 RT-PCR 实验, 确定 LPLUNC1 的表达, 结果发现, 1~6、8 号克隆为阳性克隆, 而以 1、2、6 号克隆表达量最高(图 2a). 进一步的点杂交与 RNA 印迹实验均表明, 2、6 号克隆中 LPLUNC1 表达量最高, 而内对照 GAPDH 在各个克隆中表达差异不明显. 选用 2、6 号克隆进行下一步实验(图 2b, c).

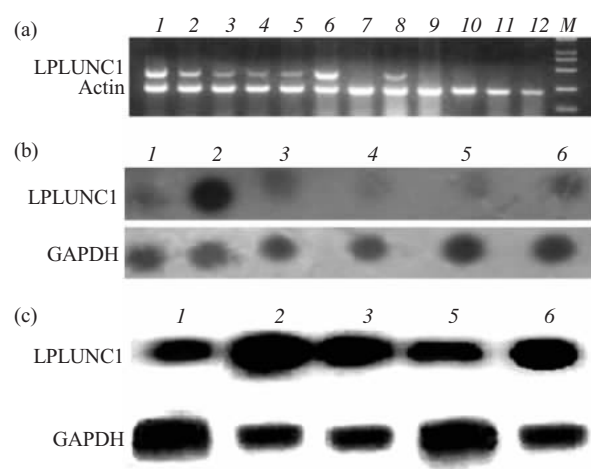


Fig. 2 LPLUNC1 expression analysis

(a) RT-PCR analysis. 1~10: HNE1/pcDNA3.1 (+)-LPLUNC1, 11: HNE1/pcDNA3.1(+), 12: HNE1, M: DL2000. (b) Dot-blot analysis. 1~6: HNE1/pcDNA3.1 (+)-LPLUNC1. (c) Northern-blot. 1~6: HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1.

2.3 LPLUNC1 抑制鼻咽癌细胞 HNE1 的生长与增殖

2.3.1 细胞生长曲线. 以未转染的细胞 HNE1 和 HNE1/pcDNA3.1(+) 细胞为对照, 以稳定转染的 LPLUNC1 重表达 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 细胞克隆为实验组, 均以相同的细胞数接种后, 连续 7 天每隔 24 h 计数, 绘制 HNE1、HNE1/pcDNA3.1(+) 和 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 细胞的生长曲线. 结果表明: HNE1/pcDNA3.1(+) 空载体转染后对 HNE1 细胞生长影响不大, 而 LPLUNC1 转染 HNE1 细胞后, 其生长速度明显减慢, 从第 5 天起与对照组细胞相比存在明显差异 ($P < 0.01$) (图 3a).

2.3.2 MTT 实验. 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可使外源性的 MTT 还原为紫蓝色的结晶物并沉积

在细胞中, 而死细胞无此功能, 因此, 我们通过 MTT 实验检测琥珀酸脱氢酶的活力来间接地反映细胞的活力. 结果表明: LPLUNC1 可明显地抑制鼻咽癌细胞 HNE1 的生长(图 3b).

2.3.3 BrdU 掺入实验. 我们将 LPLUNC1 稳定转染细胞与载体稳定转染细胞分别接种于预先铺有盖玻片的六孔板中, 完全培养基中培养 8 h 后, 加入 BrdU 至终浓度为 30 nmol/L, 16 h 后, 固定细胞, 用针对 BrdU 的抗体进行免疫组织化学检测细胞的增殖状态. 高倍显微镜下随机取 5 个视野, 计数并对结果进行统计分析. 结果表明, LPLUNC1 稳定转染细胞 BrdU 掺入明显少于空白载体转染组细胞, 说明 LPLUNC1 可明显地抑制鼻咽癌细胞增殖 (图 3c, d).

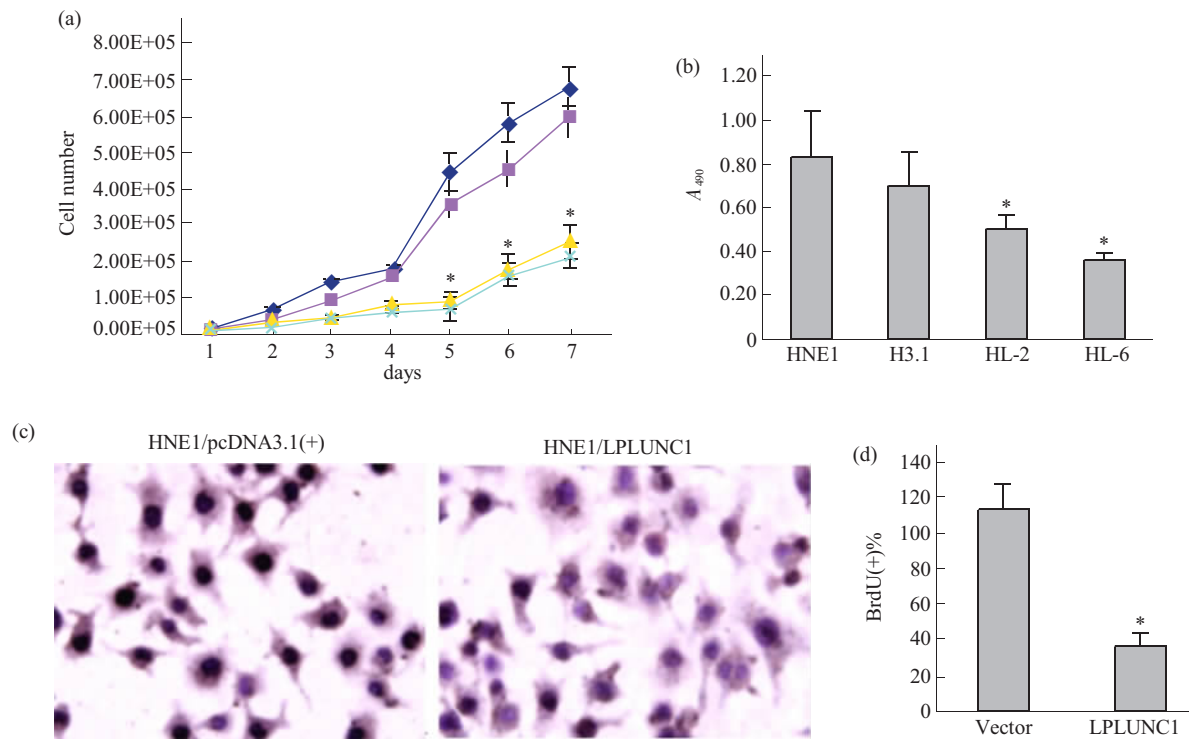


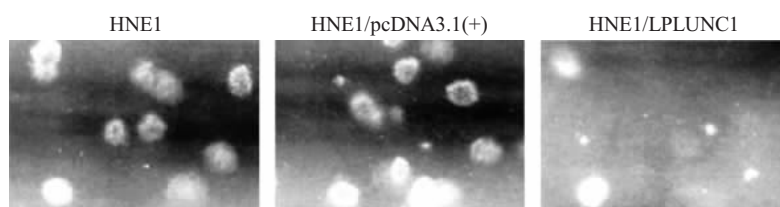
Fig. 3 LPLUNC1 inhibited the HNE1 cell growth and proliferation

(a) Cell growth curve of HNE1 and LPLUNC1 stable transfection HNE1 cells. ◆◆: HNE1; ■■: HNE1-3.1; ▲▲: HL-2; ××: HL-6. (b) MTT analysis. (c) BrdU labeling assay. (d) The percent of positive BrdU labeling cells.

2.4 软琼脂集落形成实验

将 2×10^4 个细胞接种于预先铺有底层琼脂的 60 mm 的培养皿中, 每组细胞重复 5 次, 发现 LPLUNC1 稳定转染的 HNE1 细胞的集落生长速度

较 HNE1 细胞和空白载体转染的对照组慢(图 4), 14 天后计数各培养皿中的克隆形成数, 统计学分析显示, LPLUNC1 基因转染后, 克隆形成率明显降低, 与对照组相比有明显差异($P < 0.01$) (表 1).

**Fig. 4 Soft agar analysis**

Quintuple plates were seeded with 2×10^4 cells and colonies ($\geq 30 \mu\text{m}$) were counted 14 days later.

Table 1 Results of LPLUNC1 stable transfected HNE1 cells and control cells by soft agar

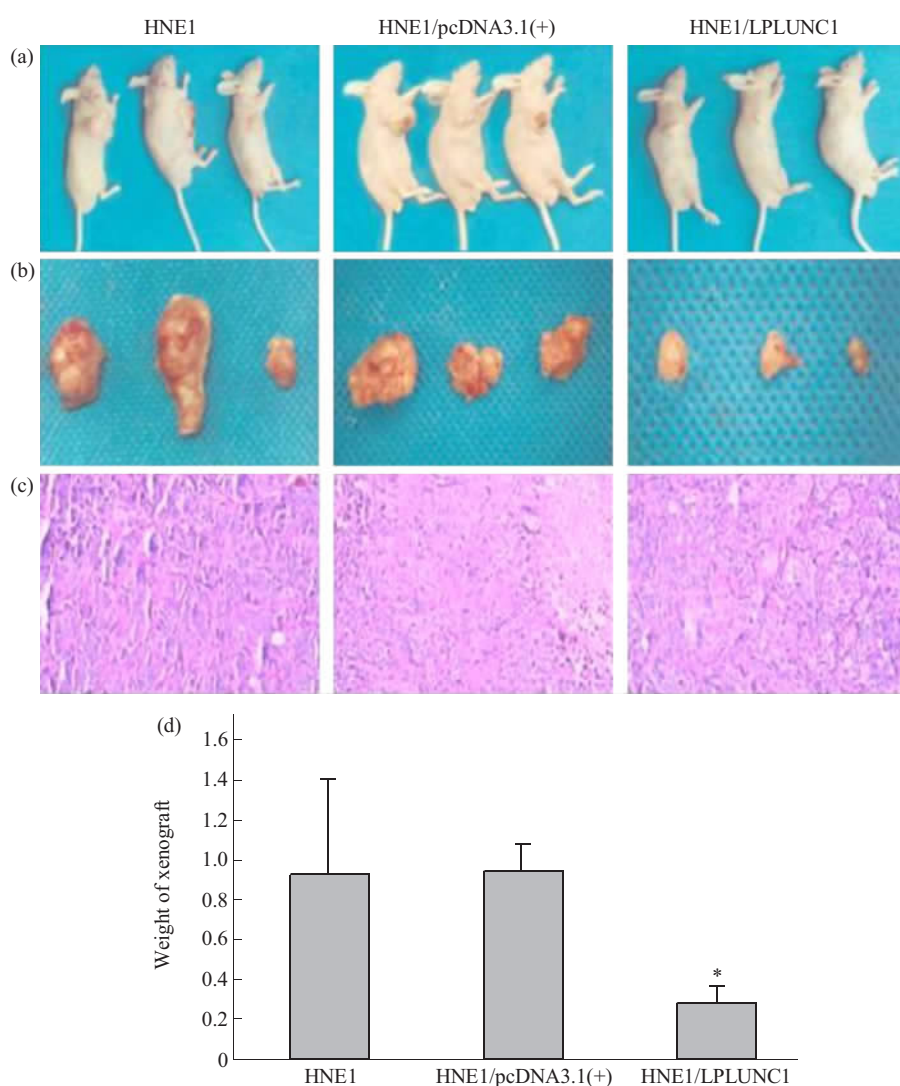
Groups	No. of colonies ($\times 10^3$)
HNE1	76 ± 11
HNE1/pcDNA3.1(+)	68 ± 9
HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1	$19 \pm 3^*$

Each number represents the average of quintuple determination expressed as $\bar{x} \pm s$. $*P < 0.01$.

2.5 LPLUNC1 抑制鼻咽癌细胞的成瘤性

为了进一步研究 LPLUNC1 对鼻咽癌发生发展的影响, 我们利用裸鼠致瘤性实验研究了 LPLUNC1 对鼻咽癌细胞 HNE1 的体内成瘤性的影响 (图 5).

分别将 2×10^7 个 HNE1/pcDNA3.1(+) 和 HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 细胞随机接种裸鼠, 每组

**Fig. 5 Delayed onset and suppression of tumorigenesis by HNE1 cells stable transfected with LPLUNC1**

The mice were killed after 4 weeks, tumors were excised, and tumor mass was determined. (a) Nude mice groups. (b) Xenograft groups. (c) HE staining. $\times 100$. (d) Weight of xenograft. Each data point represents the $\bar{x} \pm s$ for each group of mice, $*P < 0.01$.

3只. HNE1/pcDNA3.1(+)组在接种后平均 10 天可出现明显的肿块, 而 HNE1/pcDNA3.1(+) - LPLUNC1 转染组接种后长出肿瘤时间明显延迟, 且瘤体积极明显小于对照组. 在接种后的 7 天开始每隔 3 天测量裸鼠的重量、瘤体的大小并绘制瘤体大小的生长曲线(图 5a). 接种 40 天后处死裸鼠, 分离肿瘤块, 发现 pEGFP-C2/LPLUNC1 转染组瘤体积极明显小于对照组(图 5b), 裸鼠处死后, 对裸鼠进行大体解剖, 未发现裸鼠的肺、胃、肝、肠等器官有肉眼可见的结节或肿块形成. HNE1/pcDNA3.1(+)对照组的的移植瘤有向周围肌层浸润并与周围组织粘连, 石蜡包埋切片, HE 染色, 镜下观察, 构成肿块的细胞形态不规则, 多型, 核大, 染色深, 细胞排列密集, 组织结构紊乱, 符合低分化磷癌. 而 LPLUNC1 重表达组的移植瘤体积小, 未见周围组织浸润, 且

HE 染色显示其恶性程度要小于空白载体转染组 (图 5c).

2.6 LPLUNC1 可延缓鼻咽癌细胞的细胞周期进程

利用流式细胞仪分别检测 HNE1 细胞、转染空白载体和转染 LPLUNC1 基因的细胞的各组细胞中各时相细胞的比例. 结果发现, LPLUNC1 可引起 HNE1 细胞周期分布发生明显的改变: DNA 合成前期 G1 期细胞明显增加, DNA 合成期 S 期和 DNA 合成后期 G2 期及分裂期 M 期细胞则相应减少 (图 6). HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 组 G0/G1 期、S 期细胞数分别为: 69.93 ± 3.48 、 19.17 ± 1.65 ; HNE1/pcDNA3.1(+)组为: 53.67 ± 3.06 、 31.57 ± 1.96 . 统计分析显示 LPLUNC1 转染组 G0/G1 期、S 期与对照组存在明显差异 (表 2).

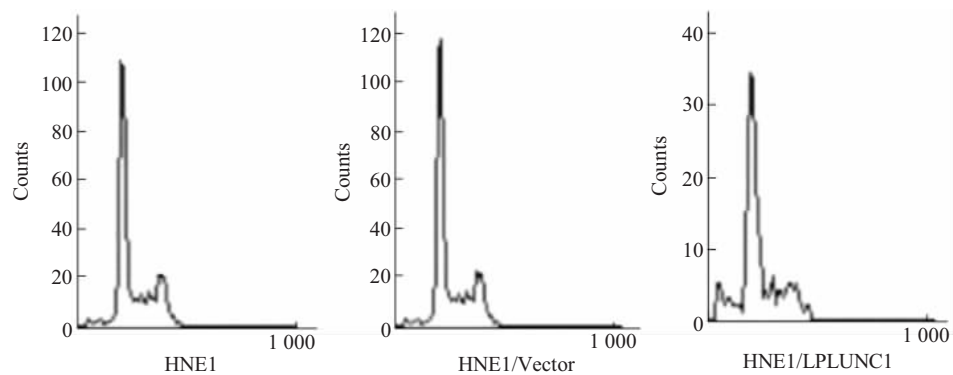


Fig .6 Cell cycle analysis for LPLUNC1 stable transfected HNE1 cells and control cells by FCM

Table 2 Results of cell cycle analysis for LPLUNC1 stable transfected HNE1 cells and control cells by FCM

Groups	G0-G1/%	S/%	G2-M/%
HNE1	52.31 ± 2.66	32.57 ± 2.05	14.54 ± 1.95
HNE1/pcDNA3.1(+)	53.67 ± 3.06	31.57 ± 1.96	14.86 ± 1.32
HNE1/pcDNA3.1(+)-LPLUNC1	$69.93 \pm 3.48^*$	$19.17 \pm 1.65^*$	9.63 ± 0.65

* $P<0.01$ compared with control group.

3 讨 论

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma) 是一种具有显著种族和地域分布特点的上皮源性恶性肿瘤, 好发于我国南方各省及东南亚地区, 而在我国北方和欧美人中少见. 其发病率在我国的南方各省约为 25/100000~50/100000, 是西方国家的 100 倍. 越来越多的研究表明, 鼻咽癌的病因与多种因素相关,

包括病毒感染、遗传因素和环境因素等^[1~4,12~15]. 统计学资料分析表明, 鼻咽癌不仅有家族聚集现象, 10%的鼻咽癌患者有癌家族史, 而且存在基因组不稳定现象, 说明遗传易感性 / 遗传倾向可能是鼻咽癌发病的一个重要因素. 目前已知的抑瘤基因中(如 p53、Rb、Rb2、WAF1/CIP1/p21、VHL 等)还未发现与鼻咽癌密切相关的基因^[16~19]. 因此, 分离和克隆鼻咽癌基因组中的遗传易感基因或抑瘤基因是阐

明其遗传易感机理和确定其防治策略的关键. 中南大学肿瘤研究所自 1998 年以来相继克隆了与鼻咽癌发生发展密切相关的系列基因如 NGX6、BRD7 等, 它们可能在鼻咽癌发生发展的不同阶段中起作用^[20~24].

我们以人鼻咽组织为检测子, 以食管、肺、胃、肝、心、脾、肾、肌肉、皮肤等组织的混合 cDNA 作为驱赶子, 进行抑制性消减杂交. 为进一步分离鉴定鼻咽癌特异相关的瘤基因 / 抑瘤基因, 在人胚鼻咽上皮与鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 之间、正常成人鼻咽组织和鼻咽癌活检组织之间进行了 4 次抑制性消减杂交, 获得了 4 个鼻咽癌相关的消减 cDNA 文库, 继而制备成 cDNA microarray 膜, 进行了 cDNA microarray 杂交, 差异表达点的序列测定. 通过 RT-PCR 和 76 种组织表达阵列杂交, 获得了在鼻咽和气管相对特异性表达而在鼻咽癌表达下调的基因 LPLUNC1. 包含 16 个外显子和 15 个内含子, cDNA 全长 1 684 bp, 编码 484 个氨基酸、分子质量约为 52.4 ku 的蛋白质, 生物信息学预测 LPLUNC1 蛋白含有 2 个 BPI(bactericidal permeability-increasing protein)结构域. LPLUNC1 基因定位于染色体 20q 11.21~20q11.22, 属于 BPI/PLUNC 超基因家族的重要成员之一. BPI/PLUNC 超基因家族位于染色体 20q 约 300 kb 的区域, 已有的研究表明, 该基因家族成员中 BPI 等基因于非小细胞肺癌、乳腺癌及肿瘤的新生血管生成相关^[5~9]. He 等^[25]通过 BPI/PLUNC 超基因家族中 SPLUNC1 进行 SNP 检测, 发现 SPLUNC1 基因与鼻咽癌的发生存在明显的相关性.

我们在以往的研究中应用 RT-PCR 和 RNA 印迹杂交等分析结果表明, LPLUNC1 在鼻咽癌上皮细胞株 HNE1、HNE2、5-8F 以及 71%(33/48)的鼻咽癌活检标本中表达下调, 推测 LPLUNC1 基因可能是抑制鼻咽癌发生的关键基因之一^[10]. 因此, 为了进一步研究 LPLUNC1 基因与鼻咽癌发生发展的关系, 我们将 LPLUNC1 基因 cDNA 全长经 PCR 扩增后, 定向克隆入真核表达载体, 经脂质体介导将其转染入 LPLUNC1 基因低表达的鼻咽癌细胞系 HNE1 细胞中, G418 筛选后获得高表达 LPLUNC1 的 HNE1 稳定转染细胞系. 进一步的细胞生长曲线、MTT 及 BrdU 等实验均表明, LPLUNC1 的表达可抑制鼻咽癌细胞的生长与增殖, 同时软琼脂集落形成实验与裸鼠致瘤实验也说明 LPLUNC1 可降低鼻咽癌细胞系的体外致瘤性. 这些都充分地说明了

LPLUNC1 基因是参与鼻咽癌发生发展的重要相关基因, 可能是与鼻咽癌相关的易感基因之一. 但 LPLUNC1 基因具体参与了鼻咽癌发生发展的哪些进程及通过影响哪些信号传导通路而发挥功能均需进一步的研究.

癌症的发生通常是由于细胞的无限增殖, 机体由于某种原因导致细胞周期发生紊乱, 是疾病特别是癌症发生的重要的分子基础. 因此, 癌症往往被人们称作细胞周期病^[26]. 细胞周期进程是一个由众多分子参与的严格调控的过程, 通常受到信号传导途径和反馈环路的精确调控, 其正常与否和细胞以及个体的生长、分化、衰老和癌变密切相关^[27]. 细胞周期的调控可分为外源性和内源性调控, 外源性调控主要是细胞因子以及其他外界刺激引起的, 而内源性调控主要是通过细胞周期蛋白(cyclin)-细胞周期蛋白依赖蛋白激酶(CDK)-细胞周期蛋白依赖抑制蛋白(CDI)进行网络调控来实现的^[28~30]. 我们应用流式细胞分析结果也表明, LPLUNC1 可使鼻咽癌细胞的细胞周期分布发生明显的改变: DNA 合成前期 G1 期细胞明显增加, DNA 合成期 S 期和 DNA 合成后期 G2 期及分裂期 M 期细胞则相应减少, 说明 LPLUNC1 通过抑制鼻咽癌细胞的细胞周期 G1~S 期进程而抑制鼻咽癌的发生发展. 但 LPLUNC1 延缓鼻咽癌细胞周期进程的分子机制尚需进行进一步的研究.

综上所述, 目前我们的研究结果表明, LPLUNC1 转染鼻咽癌细胞后, 其细胞生长速度和细胞增殖明显减慢, 且 LPLUNC1 可使鼻咽癌细胞的集落形成减少并降低了其裸鼠成瘤性, 同时 LPLUNC1 还能延缓鼻咽癌细胞的细胞周期进程. 因此, LPLUNC1 基因是参与鼻咽癌发生发展的重要基因之一, 是鼻咽癌防治及分子诊断的重要靶点.

参 考 文 献

- 1 Bingle C D, Craven C J. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol.* 2004, **25** (2): 53~55
- 2 Bingle C D, Gorr S U. Host defense in oral and airway epithelia: chromosome 20 contributes a new protein family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004, **36** (11): 2144~2152
- 3 Bingle C D, Craven C J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet.* 2002, **11** (8): 937~943
- 4 Zhou H D, Li G Y, Yang Y X, *et al.* Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability

- increasing protein domain. *Mol Immunol*, 2006, **43** (11): 1864~1871
- 5 van der Schaft D W, Toebe E A, Haseman J R, *et al.* Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis *via* induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood*, 2000, **96** (1): 176~181
 - 6 Mitas M, Hoover L, Silvestri G, *et al.* Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood. *J Mol Diagn*, 2003, **5** (4): 237~242
 - 7 Egland K A, Vincent J J, Strausberg R, *et al.* Discovery of the breast cancer gene BASE using a molecular approach to enrich for genes encoding membrane and secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (3): 1099~1104
 - 8 Bingle L, Cross S S, High A S, *et al.* SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. *J Pathol*, 2005, **205** (4): 491~497
 - 9 Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, *et al.* Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2001, **91** (4): 433~437
 - 10 Zhang B, Nie X, Xiao B, *et al.* Identification of tissue-specific genes in nasopharyngeal epithelial tissue and differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, **38** (1): 80~90
 - 11 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 2002. 362~373
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press, 2002. 362~373
 - 12 Burgos J S. Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. *Med Oncol*, 2005, **22**(2): 113~121
 - 13 Lo K W, To K F, Huang D P. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell*, 2004, **5** (5): 423~428
 - 14 Xiong, W, Zeng, Z Y, Xia, J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2004, **64** (6): 1972~1974
 - 15 Lin C T, Chan W Y, Chen W, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma and retinoblastoma gene expression. *Lab Invest*, 1992, **67** (1): 56~70
 - 16 Sun Y, Hegamyer G, Colburn N H. Nasopharyngeal carcinoma shows no detectable retinoblastoma susceptibility gene alterations. *Oncogene*, 1993, **8** (3): 791~795
 - 17 Sun Y, Hildesheim A, Li H, *et al.* No point mutation but a codon 31ser → arg polymorphism of the WAF-1/CIP-1/p21 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC): the polymorphism distinguishes Caucasians from Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1995, **4** (3): 261~267
 - 18 Sun Y, Hildesheim A, Li H, *et al.* The von Hippel-Lindau (VHL) disease tumor-suppressor gene is not mutated in nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*, 1995, **61** (3): 437~438
 - 19 Claudio P P, Howard C M, Fu Y. Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2000, **60** (1): 8~12
 - 20 余鹰, 谢奕, 曹丽, 等. 一个新鼻咽癌抑瘤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): 319~324
Yu Y, Xie Y, Cao L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27**(3): 319~324
 - 21 Peng C, Zhou J, Liu H Y, *et al.* The transcriptional regulation role of BRD7 by binding to acetylated histone through bromodomain. *J Cell Biochem*, 2006, **97** (4): 882~892
 - 22 谭琛, 李江, 王洁如, 等. NAG7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 372~377
Tang C, Li J, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 372~377
 - 23 Ma J, Zhou J, Fan S, *et al.* Role of a novel EGF-like domain-containing gene NGX6 in cell adhesion modulation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2005, **26** (2): 281~291
 - 24 Zhou J, Ma J, Zhang B C, *et al.* BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1-S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways. *J Cell Physiol*, 2004, **200** (1): 89~98
 - 25 He Y, Zhou G, Zhai Y, *et al.* Association of PLUNC gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet*, 2005, **42** (2): 172~176
 - 26 Sherr C J. Cancer cell cycles. *Science*, 1996, **274** (5293): 1672~1677
 - 27 Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6** (5): 369~381
 - 28 Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, **411** (6835): 342~348
 - 29 Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 1998, **12** (15): 2245~2262
 - 30 Johnson D G, Walker C L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, **39** (1): 295~312

The Study of LPLUNC1 Gene Inhibit Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line HNE1 Growth and Proliferation*

YANG Yi-Xin^{1,2)*}, YANG Yun-Bo^{3)*}, LI Xiao-Ling¹⁾,
PENG Cong¹⁾, GUO Qin⁴⁾, SHEN Shou-Rong⁴⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

¹⁾Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾Department of Biochemistry Guangzhou Medical College, Guangzhou 510082, China;

³⁾Pharmacology School of Central South University, Changsha 410078, China;

⁴⁾The Third-Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract LPLUNC1 is a newly cloned gene and was found down-expressed in 71% NPC biopsies but high-expressed in normal adult and fetal nasopharyngeal epithelial tissue, which indicates that it may play an important role in the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. The object of the research is to study the effect of LPLUNC1 on nasopharyngeal carcinoma cells. The full length of LPLUNC1 cDNA was cloned into the pcDNA3.1(+) vector, then the pcDNA3.1(+)-LPLUNC1 plasmid was stably transfected into the NPC cell line HNE1 cells using lipofectamine. After being selected with G418 and detected with RT-PCR and Northern-blot, the stable transfectants of LPLUNC1 over-expression were constructed. Cell growth curve, MTT, BrdU labeling, flow cytometry, soft agar and nude mice were performed to study the effects of LPLUNC1 over-expression on HNE1 cells. The results showed that HNE1 cells with over-expression of LPLUNC1 grew slower significantly than that of the control. MTT and BrdU labeling assay showed that LPLUNC1 inhibited the HNE1 cell proliferation. And LPLUNC1 gene can delay G1-S phase cell cycle progression of HNE1 cells. Furthermore, LPLUNC1 was found that it decreased the HNE1 clonogenicity in soft agar and inhibited the tumor formation in nude mice obviously. In conclusion, LPLUNC1 can suppress the malignant phenotype of HNE1 and plays an important role in inhibiting the tumorigenesis and development of NPC.

Key words long- palate lung and nasal epithelium clone 1, nasopharyngeal carcinoma, HNE1, gene transfection, gene function

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300201, 30470955).

**These authors contributed equally in this work.

***Corresponding author . Tel: 86-731-4805446, Fax: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: September 27, 2006 Accepted: November 2, 2006