

NGX6 基因对人结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响 *

王晓艳¹⁾ 沈守荣^{1)**} 刘 芬¹⁾ 李晓玲²⁾ 范松青²⁾

(¹⁾中南大学湘雅三医院消化内科, 长沙 410013; ²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 NGX6 基因是新克隆的候选抑瘤基因, 研究表明 NGX6 重表达可抑制结肠癌细胞的增殖. 为进一步研究 NGX6 对细胞周期的影响, 采用流式细胞仪检测 NGX6 重表达对结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响, 发现 NGX6 重表达可增加 HT-29 细胞在 G0/G1 期的分布比例, 减少了 S, G2, M 期细胞数. 利用蛋白质印迹和流式细胞术分析 NGX6 转染前后 HT-29 细胞周期素 (cyclins) 和细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制物 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI) 的表达变化, 发现 NGX6 可下调 HT-29 细胞中 cyclin E、cyclin D1 的表达及上调 p27 的表达, 对 cyclin A 和 cyclin B 的表达无明显影响, p16 在三组结肠癌细胞中均无表达. 研究结果表明, NGX6 在 HT-29 细胞中通过下调 cyclin E、cyclin D1 和上调 p27 的表达, 阻滞细胞周期于 G0/G1 期, 从而发挥其在结肠癌中的抑瘤作用.

关键词 NGX6, HT-29 细胞, 细胞周期, 细胞周期素, 细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制物 (CKI)

学科分类号 R73

肿瘤发生与瘤基因的激活和抑瘤基因的失活有关, 结肠癌发病机制复杂, 目前尚未完全阐明. 我们研究小组采用定位候选克隆策略克隆的候选抑瘤基因 NGX6, 定位于 9p21~22 上^[1], 该区是公认的人类肿瘤高频杂合性缺失区. NGX6 由 10 个外显子组成, cDNA 全长 2 134 bp, 编码 338 个氨基酸. 生物信息学分析 NGX6 蛋白的 N 端含一个 EGF 样功能域, C 端有两个跨膜区, 有研究表明, NGX6 可抑制鼻咽癌细胞的增殖, 并可下调鼻咽癌细胞中增殖相关的重要蛋白质分子 EGFR 和 ERK 的磷酸化水平^[2]. 我们研究发现, NGX6 基因在人结肠癌组织中表达下调, 且在有转移的结肠癌组织中表达下调率(15/16)明显高于无转移的结肠癌组织(25/34, $P < 0.05$)^[3], 提示 NGX6 低表达和表达缺失参与了结肠癌的增殖和转移过程. 体内和体外实验进一步证实 NGX6 具有抑制结肠癌细胞增殖的作用^[4]. 肿瘤的发生与细胞周期功能紊乱有关, 本文通过研究 NGX6 对结肠癌细胞周期的影响来探讨其在结肠癌发生发展中的抑瘤功能, 该研究目前在国内外未见报道.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株. 三组结肠癌细胞株 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29. 其中 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/HT-29 分别为脂质体介导 NGX6/pcDNA3.1(+)重组体和 pcDNA3.1(+)转染低分化结肠癌细胞 HT-29, 经 G418 筛选、克隆鉴定而建立的稳定转染细胞株^[4].

1.1.2 主要试剂. 胎牛血清、高糖型 DMEM、胰酶、DMSO 购自华美生物工程公司; TritonX-100、琼脂糖、过硫酸胺、TEMED 购自 Sigma 公司; cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cyclin E、p27 和 p16 鼠单克隆抗体 IgG 及阴性对照的同型非特异性抗体, 购自 DAKO 公司; 聚丙烯酰胺、双丙烯酰胺为美国 Sigma 公司产品; ECL 发光试剂盒为美国 Pierce 公司产品.

*国家自然科学基金资助项目 (30370801) 和湖南省自然科学基金资助项目(03JJY2004, 04JJ3109).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-8618456, E-mail: shenshourong2003@hotmail.com

收稿日期: 2005-07-24, 接受日期: 2005-08-30

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 在含 12%胎牛血清的 DMEM 培养基, 5%的 CO₂, 37℃ 条件下培养 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 三组细胞株.

1.2.2 流式细胞术 DNA 含量分析法. 将对数生长期的 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 细胞(约 2×10⁶ 个)以 1×PBS 洗涤 2 次, 70%乙醇固定. 离心去除乙醇, PBS 洗涤 2 次, 0.1% Triton X-100 洗涤 1 次, 再以 50 mg/L 碘化丙锭(PI)和 100 mg/L RNase A 室温避光染色 30 min, 应用 FACSsort (Becton Dickson, 美国) 检测, CELLQuest 软件 (Becton Dickson, 美国) 分析.

1.2.3 流式细胞术双参数分析法. 取对数生长期的三组细胞各 2×10⁶ 个以 -20℃ 纯甲醇固定 30 min 后, 离心收集细胞; 0.25% Triton X-100 冰上处理 5 min, PBS 洗涤; 加入鼠抗人 cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cyclin E 抗体 4℃ 孵育过夜; 洗涤、离心, 加入标有 FITC 兔抗鼠的 IgG 抗体, 室温孵育 30 min; PBS 洗涤后, 用 50 mg/L PI 和 100 mg/L RNase A 室温避光染色 30 min; 同型对照采用 IgG 同型非特异性抗体以排除实验中的非特异性结合; 应用 FACSsort 流式细胞仪(Becton Dickson, 美国) 检测, CellQuest 软件(Becton Dickson, 美国)对上述所测细胞进行分析.

1.2.4 细胞总蛋白质的抽提和蛋白质浓度的测定. 取对数生长期的三组细胞, 以预冷的细胞裂解液 (50 mmol/L Tris·HCl pH 7.6, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% NP-40, 0.5 mg/L leupeptin, 10 mmol/L PMSF) 裂解细胞, 沸水浴中变性 5 min 后, 迅速置冰上 5 min. 最大功率脉冲超声粉碎 30 s, 4℃ 14 000 g 离心 10 min 去除细胞碎片, 吸取上清, 即为裂解液, -70℃ 贮存. 用 BCA 检测试剂测定蛋白质浓度.

1.2.5 蛋白质印迹检测. 取 100 μg 蛋白, 在不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 中分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 以 5%的蛋白质干粉 37℃ 封闭 1 h; 经与相应的一抗和二抗孵育后, ECL 发光法检测, X 光片曝光, 显影, 定影, 结果进一步用 Pharmacia Biotech 公司的 Image MasterTM 软件, 进行定量分析.

2 结 果

2.1 NGX6 基因对结肠癌细胞 HT-29 细胞周期和凋亡的影响

流式细胞术检测 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 三组细胞在细胞周期各时相的分布情况, 发现 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组 G0/G1 期细胞数为 61.84%, 与 pcDNA3.1(+)/HT-29 组的 38.09%相比明显升高, 而 S 和 G2/M 期细胞总数 (38.45%) 较对照组 (60.76%) 明显降低 (表 1), 表明 NGX6 基因可将结肠癌细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 延缓结肠癌细胞周期由 G0/G1 期向 S 期的进程. 研究还发现三组细胞凋亡率无明显差别.

Table 1 The effect of NGX6 gene on cell cycle distribution in HT-29 cells

Groups	G0/G1/%	S/%	G2/M/%
pcDNA3.1(+)/HT-29	38.09	22.95	37.81
pcDNA3.1(+)/NGX6/ HT-29	61.84	61.84	25.45

2.2 流式细胞仪检测 NGX6 基因对 HT-29 细胞中 cyclins 表达的影响

细胞周期的有序进行与细胞周期素(cyclins)、细胞周期素依赖性蛋白激酶 (cyclin- dependent-kinase, CDK) 和细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs) 时相性合成、降解的精细调控密切相关, cyclins 为正调节因子, CKI 为负调节因子. 本实验进一步采用流式细胞术检测 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 两组细胞 cyclin A、cyclin B、cyclin D1 和 cyclin E 的表达. 发现 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组 cyclin E 和 cyclin D1 的表达较 pcDNA3.1(+)/HT-29 组明显下调, 而 cyclin B 和 cyclin A 在两组中的表达无明显差别 (图 1, 表 2).

2.3 蛋白质印迹检测 NGX6 对 HT-29 细胞周期素表达的影响

进一步采用蛋白质印迹验证 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 三组细胞周期素的表达, 发现 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞中 cyclin E 和 cyclin D1 的表达较 pcDNA3.1(+)/HT-29 组明显下调, 分别为 pcDNA3.1(+)/HT-29 组表达量的 62%和 54.5%, 而

pcDNA3.1(+)/HT-29 与 HT-29 两对照组间 cyclin E 和 cyclin D1 的表达无明显差异, cyclin A 和 cyclin B 的表达在三组中无明显差异 (图 2), 该结果与流式细胞仪检测结果一致. 表明 NGX6 主要通过下调 cyclin E 和 cyclin D1 的表达而延缓细胞周期由 G0/G1 期向 S 期的进程.

Table 2 Analysis of cyclins expression in NGX6 transfected and non- transfected HT-29 cells by flow cytometry

Groups	%			
	cyclin E	cyclin D1	cyclin B	cyclin A
pcDNA3.1(+)/HT-29	91.07	64.61	56.78	75.44
pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29	67.08	39.64	41.08	64.90

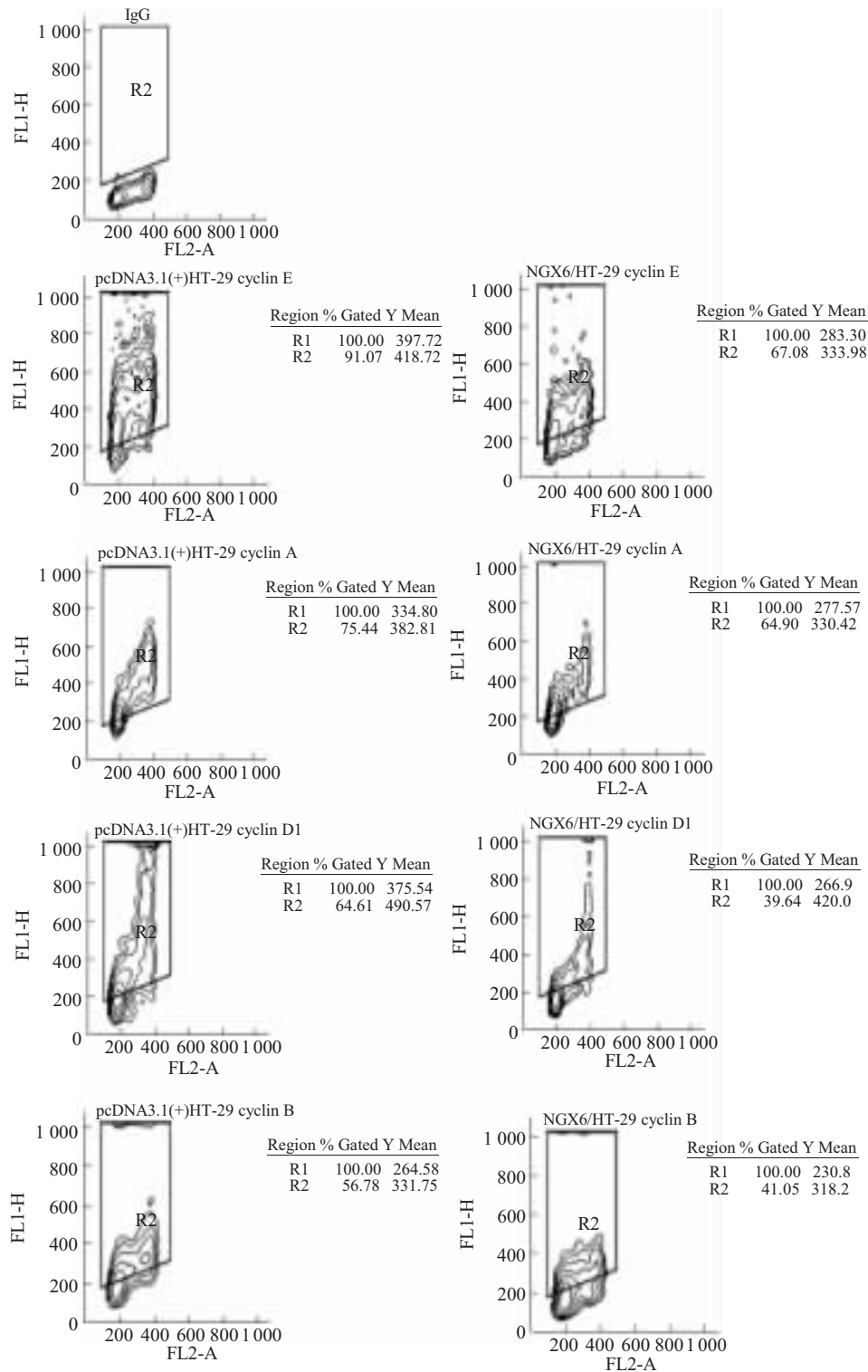


Fig. 1 Flow cytometry analysis of cyclins expression in NGX6 transfected and non- transfected HT-29 cells

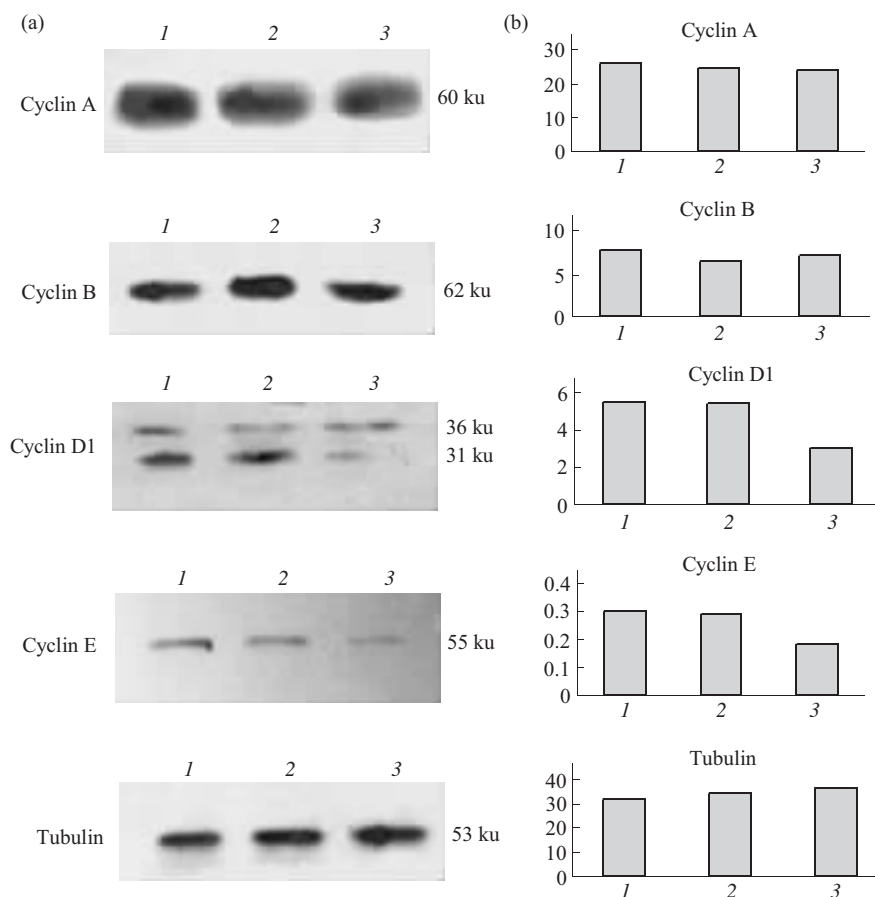


Fig. 2 Analysis of cyclins expression in NGX6 transfected and non-transfected HT-29 cells by Western blot

(a) The expression of cyclins analysed by Western blot, α -tubulin used as control. (b) Relative quantities of cyclins. The bar graphs above have numbered columns represent the quantities of cyclins expression in three experimental groups. 1: HT-29 cells; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29 cells; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells.

2.4 蛋白质印迹分析 NGX6 对 HT-29 细胞 p27 和 p16 表达的影响

pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组 p27 的表达较 pcDNA3.1(+)/HT-29 组明显上调, 为 pcDNA3.1(+)

/HT-29 组的 1.9 倍; p16 在 NGX6 转染前后的三组细胞中均无表达 (图 3), 提示 NGX6 上调 p27 表达是其阻滞细胞周期进程的机制之一。

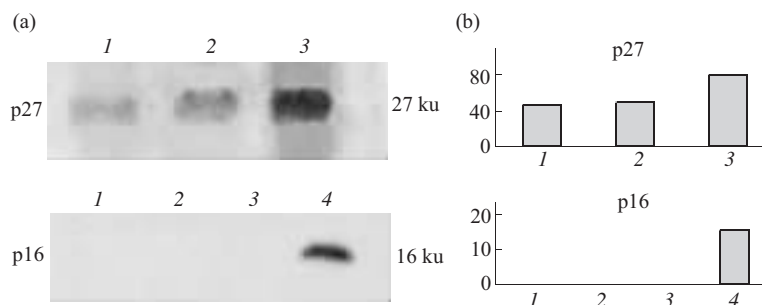


Fig. 3 The expression of p27, p16 in NGX6 transfected and non-transfected HT-29 cells detected by Western blot

(a) The expression of p27, p16 analysed by Western blot. (b) Relative quantities of p27, p16. 1, 2, 3 represent the quantities of p27, p16 expression in HT-29 cells, pcDNA3.1(+)/HT-29 cells, and pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells respectively, 4 represents the positive control of p16.

3 讨 论

典型的哺乳动物细胞周期分为 G0/G1、S、G2、M 四期, 各期间存在着一系列关键检测点, 如 G1/S、G2/M 等, 各检测点功能正常保证细胞周期的顺利进行. 其中 G1/S 检测点在细胞周期进程中起着关键作用, 决定细胞是否增殖. 细胞周期和检测点功能是否正常受 cyclins 和 CKIs 时相性合成和降解的精细调节. Cyclins 是细胞周期的正调节因子, cyclin D 和 cyclin E 分别与 CDK4/6 和 CDK2 形成复合物, 促使细胞由 G0/G1 进入 S 期, cyclin A 和 cyclin B 分别为 G2、S 期启动进行的必要条件. 研究表明, 一旦细胞通过 G1/S 检测点, 则基本能完成整个细胞分裂周期, 因此 cyclin D 和 cyclin E 是引起细胞增殖的关键因子^[5~8]. CKIs 为细胞周期的负调节因子, 包括 p27 等 KIP1 家族和 p16 等 INK4 家族. p16INK4a 能特异地与 cyclin D/CDK4/CDK6 复合物结合, 抑制其活性, 使细胞周期停滞于 G0/G1 期; p27 蛋白可以广泛抑制 cyclins 和 CDK 复合物的活性, 尤其是以抑制 cyclin E/CDK2 的活性为主, 阻滞细胞周期于 G1 期. 研究表明, cyclin D 和 cyclin E 过表达能缩短 G1 期时相, 加速细胞周期进程, 从而导致肿瘤发生^[9~11]. p16 表达缺失和 p27 的表达变化均可加速多种人类肿瘤的恶性演进^[12~14].

NGX6 是我们研究小组新近克隆的候选抑瘤基因, 体外和体内实验已证明 NGX6 具有抑制结肠癌细胞增殖和转移的作用. 为进一步明确 NGX6 的抑瘤功能, 我们采用流式细胞术分析 NGX6 重表达对人结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响, 结果表明, NGX6 重表达可增加 HT-29 细胞在 G0/G1 期的分布, 减少 S、G2、M 期的细胞数, 提示 NGX6 可将结肠癌细胞阻滞于 G0/G1 期, 延缓细胞周期由 G1 期向 S 期的进程. 研究还发现 NGX6 对三组细胞的凋亡无影响. 我们进一步采用流式细胞术和蛋白质印迹分析 NGX6 对 HT-29 细胞 cyclins 和 CKIs 表达的影响, 发现 NGX6 转染后 cyclin E 和 cyclin D1 表达明显下调, 而 cyclin A、cyclin B 的表达变化不大. CKIs 家族中重要成员 p27 在 NGX6 重表达后表达上调, 而 p16 在三组结肠癌细胞中均无表达. Cyclin E、cyclin D 和 p27 均为细胞周期 G1、S 期的重要调控因子, 上述检测结果表明 NGX6 的重表达主要影响了 G1、S 期细胞周期相关蛋白的表达, 此结果与 NGX6 阻滞结

肠癌细胞周期于 G0/G1 期的实验结果吻合. 根据上述结果, 结合目前细胞周期的研究进展, 我们认为 NGX6 通过下调 cyclin E 和 cyclin D1 的表达, 上调 p27 的表达, 延缓细胞周期由 G1 期进入 S 期, 从而抑制结肠癌细胞的失控性增殖, 而 CKI 家族重要成员 p16 未参与此调控过程.

肿瘤发生过程中瘤基因或抑瘤基因对细胞周期的调控是通过信号通路实现的. NGX6, EGFR 负性调控因子^[2], 延缓了结肠癌细胞周期由 G1 期向 S 期的进程, 抑制结肠癌细胞的增殖, 由此我们推测 NGX6 可能抑制了 EGFR 相关信号通路的活性而发挥细胞周期的阻滞作用, 目前 NGX6 对结肠癌细胞信号通路的调控作用正在进一步研究中.

参 考 文 献

- 1 Yang J B, Bin L H, Li Z H, *et al.* Refined localization and cloning of a novel putative tumor suppressor gene associated with nasopharyngeal carcinoma on chromosome 9p21 ~22. *Clin J Cancer*, 2000, **19** (1): 6~9
- 2 Wang L, Ma J, Li J, *et al.* NGX6 gene inhibits cell proliferation and plays a negative role in EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Cell Biochem*, 2005, **95**: 64~73
- 3 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 等. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 NGX6 的表达. *世界华人消化杂志*, 2002, **10** (8): 873~876
Zhang X M, Shen S R, Wang X Y, *et al.* *World Chin J Digest*, 2002, **10** (8): 873~876
- 4 王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 等. 抑瘤基因 NGX6 对结肠癌细胞生物学特性的影响. *世界华人消化杂志*, 2004, **12** (3): 574~579
Wang X Y, Shen S R, Liu H Y, *et al.* *World Chin J Digest*, 2004, **12** (3): 574~579
- 5 Farley J, Smith L M, Darcy K M, *et al.* Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a gynecologic oncology group study. *Cancer Res*, 2003, **63** (6): 1235~1241
- 6 Coradini D, Daidone M G. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004, **16** (1): 49~55
- 7 Liang B, Wang S, Yang X, *et al.* Expressions of cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and p57(KIP2) in human gastric cancer. *Chin Med J (Engl)*, 2003, **116** (1): 20~23
- 8 Schraml P, Bucher C, Bissig H, *et al.* Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol*, 2003, **200** (3): 375~382
- 9 Ioachim E, Michael M, Stavropoulos N E, *et al.* Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21 (Waf1/Cip1) and p27 (Kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Urol Int*, 2004, **73** (1): 65~73
- 10 Zhou Q, He Q, Liang L J. Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol*, 2003, **9** (11): 2450~2454
- 11 Gump J, Stokoe D, McCormick F. Phosphorylation of p16INK4A

- correlates with Cdk4 association. J Biol Chem, 2003, **278** (9): 6619~6622
- 12 Matsuda Y, Ichida T, Genda T. Loss of p16 contributes to p27 sequestration by cyclin D(1)-cyclin-dependent kinase 4 complexes and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2003, **9** (9): 3389~3396
- 13 Xiao Y, Monitto C L, Minhas K M, *et al.* Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. Clin Cancer Res, 2004, **10** (24): 8683~8686
- 14 Marches R, Uhr J W. Enhancement of the p27Kip1-mediated antiproliferative effect of trastuzumab (Herceptin) on HER2-overexpressing tumor cells. Int J Cancer, 2004, **112** (3): 492~501

Effects of NGX6 Gene on Cell Cycle in Colon Cancer Cell Line HT-29*

WANG Xiao-Yan¹⁾, SHEN Shou-Rong^{1)**}, LIU Fen¹⁾, LI Xiao-Ling²⁾, FAN Song-Qing²⁾

¹⁾Department of Gastroenterology, Xiangya Third Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾Cancer Research Institute, Xiangya Medical School of Center South University, Changsha 410013, China)

Abstract NGX6, a candidate of tumor suppressor genes, can inhibit the proliferation of colon cancer *in vivo* and *in vitro*. The uncontrolled proliferation of tumor cell closely related with the dysfunction of the cell cycle. Flow cytometry and Western blot were used to explore effects of NGX6 on cell cycle progression and the expression of cyclins, CKI(p27,p16) in colon cancer cell line HT-29. Flow cytometry (FCM) showed that the overexpression of NGX6 increased the proportion of HT-29 cells at G0/G1 phase and decreased that at S, G2 and M phase. Western blot and FCM indicated that NGX6 could down-regulate the expression of cyclin E, cyclin D1 and increase the p27 expression, while NGX6 has no significant effect on expression of cyclin A and cyclin B. The expression of p16 was not detected in all groups. These results demonstrated that NGX6 arrested cell cycle progression at G0/G1 phase by down-regulating the expression of cyclin E, cyclin D1 and up-regulating that of p27 to inhibit the proliferation of HT-29 cells.

Key words NGX6 gene, HT-29 cell, cell cycle, cyclins, cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI)

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30370801) and The Hunan Provincial Natural Sciences Foundation of China(03JJY2004 和 04JJ3109).

**Corresponding author . Tel: 86-731-8618456, E-mail: shenshourong2003@hotmail.com

Received: July 24 2005 Accepted: August 30 2005