

新克隆的基因 NOR₁ 对鼻咽癌细胞株 HNE₁ 细胞生长的影响 *

聂新民¹⁾ 桂 嵘¹⁾ 李登清¹⁾ 周 鸣²⁾ 黄祖发^{1)**} 李桂源²⁾

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

摘要 NOR₁ 是与鼻咽癌密切相关的抑瘤 / 易感基因候选者之一, 将 NOR₁ 基因的全长 cDNA 片段亚克隆至 pcDNA3.1(+) 的表达载体中, 通过脂质体介导转染入鼻咽癌细胞系 HNE₁, RT-PCR、RNA 印迹方法筛选高效表达 NOR₁ 的细胞株, 并借助细胞生长曲线、软琼脂生长集落形成大小试验、流式细胞仪对转染细胞的生物学行为进行检测. 结果发现转染了 NOR₁ 基因的 HNE₁ 细胞生长速度明显减慢, 在软琼脂中的集落形成较对照组明显减小. 流式细胞仪分析表明, NOR₁ 可以延缓细胞由 G0/G1 期进入 S 期. 结果表明 NOR₁ 基因可能在抑制鼻咽癌的发生发展中起重要作用, 为进一步研究 NOR₁ 的功能研究打下基础.

关键词 鼻咽肿瘤, NOR₁ 基因, 细胞转染

学科分类号 R739.63

鼻咽癌是一种高发于我国南方及东南亚地区的头颈部恶性肿瘤, 其病因涉及到遗传因素、EB 病毒的感染、饮食和某些环境中的化学致癌物的作用等. 在运用 cDNA microarray 考察鼻咽癌组织与正常鼻咽上皮组织差异表达基因的基础上^[1], 我们发现 ESTW95442 在鼻咽癌组织中存在明显的表达下调, 随后, 运用生物信息学和分子生物学试验相结合的方法克隆出了该 EST 所代表的新基因 NOR₁ (GenBank 登陆号为 AF462348)^[2]. 本文旨在通过构建其真核表达载体并进行基因转染鼻咽癌细胞系 HNE₁ 对 NOR₁ 的功能进行研究, 为进一步探索 NOR₁ 在鼻咽癌发生发展过程中所起的作用奠定了扎实的基础.

1 材 料

1.1 材料

低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞系 HNE₁ 为中南大学肿瘤研究所所建株. RPMI1640 购自美国 Promega 公司, 小牛血清购自中国 SABC 公司, 脂质体购自美国 GIBCO/BRL 公司.

1.2 方法

1.2.1 载体构建和鉴定. 根据 NOR₁ 基因的酶切位点图谱和 pcDNA3.1(+) 的多克隆酶切位点, 选用 BamH I 和 Xho I 作为克隆位点, 再从 NOR₁ 基因的完整阅读框架序列两端设计含 BamH I 和 Xho I 酶切位点的引物, 扩增含 NOR₁ 基因完整阅读框架的序列. 扩增产物纯化后用 BamH I 和 Xho I 酶过

量酶切, 低熔点琼脂糖凝胶回收, 与经 BamH I 和 Xho I 双酶切后的 pcDNA3.1(+) 质粒重新连接、转化 JM109 菌后, 双酶切鉴定阳性重组克隆. 进一步对阳性克隆重组质粒进行测序分析 NOR₁ 编码的正确性.

1.2.2 pcDNA3.1 (+)/NOR₁ 重组体转染和克隆筛选. 以 pcDNA3.1 (+) 表达载体转染为对照组, 将构建好的表达重组体 pcDNA3.1 (+)/NOR₁ 采用脂质体介导的基因转染方法导入 HNE₁ 细胞中, G418 筛选 2 周后, 可见典型的抗性克隆. 挑选 3 个 pcDNA3.1 (+) 质粒转染和 4 个 pcDNA3.1 (+)/NOR₁ 质粒转染后 HNE₁ 抗性克隆, 扩大培养后, 用 RT-PCR 和 RNA 印迹方法鉴定阳性克隆.

1.2.3 生长曲线. 分别将 HNE₁/pcDNA3.1(+)/NOR₁ 转染阳性克隆细胞、HNE₁/pcDNA3.1(+) 空白质粒对照及未转染任何外源基因的 HNE₁ 细胞各 2×10⁴ 个接种于 24 孔板内, 待细胞生长 2 天后, 接着连续 7 天进行细胞计数, 绘制生长曲线, 用方差分析比较每组细胞每天的细胞计数均值.

1.2.4 克隆集落形成. 分别取生长状态良好的 pcDNA3.1(+)/NOR₁ 转染组、空载体转染组和未经

*国家高技术“863”计划 (2001AA221031), 国家自然科学基金 (30300383)、中国博士后科学基金 (2004035206) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-8618440, E-mail: niexinmin7440@hotmail.com

收稿日期: 2005-02-03, 接受日期: 2005-04-30

转染任何基因的 HNE₁ 细胞组各约 20 000 个细胞, 按照细胞培养操作手册进行软琼脂集落形成试验。

1.2.5 细胞周期分析. 为探讨 NOR₁ 基因对 HNE₁ 细胞生长速度的影响, 分别取生长状态良好、融合至 70%~80% 的转染 NOR₁、转染空白载体和未转染基因的 HNE₁ 细胞各 3 瓶, PBS 洗涤后, 70% 的乙醇固定, 用 FACScan 流式细胞仪 (英国 Becton Dickinson 公司制造) 每次分析 1.0×10^4 个细胞检测 3 组细胞的细胞周期分布状况。

1.2.6 统计学分析. 所有数据分析均采用 SPSS 软件中的 *t* 检验, 当 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

随机挑取转化阳性菌落, 抽提质粒用 *Bam* I ,

Xho I 双酶切鉴定, 结果表明得到约 1.25 kb 的 NOR₁ 基因编码区扩增片段和约 5.4 kb 的 pcDNA3.1(+)质粒带, 结果见图 1. 将其测序, 结果见图 2, 结果表明已经成功插入目的片段。

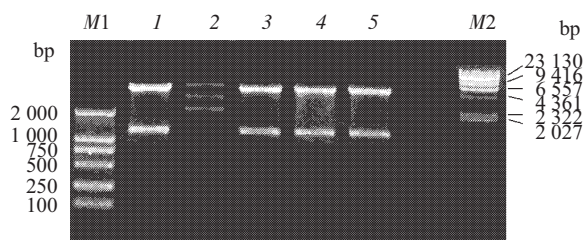


Fig.1 Identification of pcDNA3.1 (+) /NOR₁ recombinant vector by the digestion of *Bam*H I and *Xho* I

M1: DL2000 markers, 1,3,4,5: positive clone; 2: negtive clone; M2: λ DNA/*Hind* III marker.

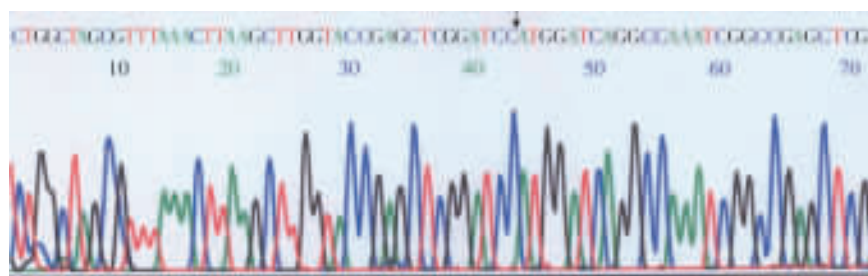


Fig.2 Part sequence of the 5' terminal of pcDNA3.1 (+) /NOR₁ plasmid

The arrow indicate the initiation codon of the NOR₁ gene.

2.2 重组质粒转染后阳性克隆的筛选

挑出转染后抗性克隆经 RT-PCR 初步筛选 (图 3), 阳性克隆中 NOR₁ 基因表达增高明显的克隆进一步用 RNA 印迹验证 (图 4). 结果发现对照组 NOR₁ 基因几乎没有表达, 而 4 号阳性克隆 NOR₁ 表达较高, 故被选作下一步试验。

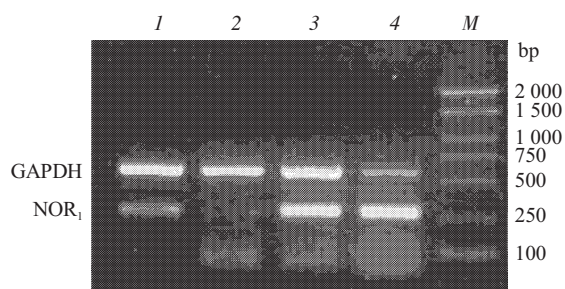


Fig.3 Identification of the plasmid pcDNA3.1 (+) /NOR₁ transfection HNE₁ cell line by RT-PCR

M: DL2000 marker; 1,3,4: positive clone; 2: negtive clone.

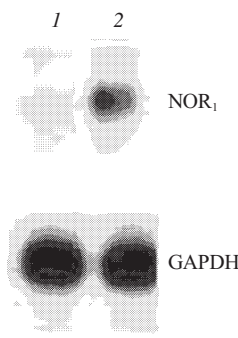


Fig.4 Northern blot analysis of NOR₁ reexpression in HNE₁ cell line

1: pcDNA3.1(+) transfected HNE₁ cell line clone; 2: pcDNA3.1(+)/NOR₁ transfected 4# positive clone.

2.3 生长曲线

细胞计数后结果表明: 与 pcDNA3.1(+)转染后 HNE₁ 和未转染的 HNE₁ 细胞相比, 转染 NOR₁ 基因的 HNE₁ 细胞, 其生长速度明显减慢, NOR₁ 基

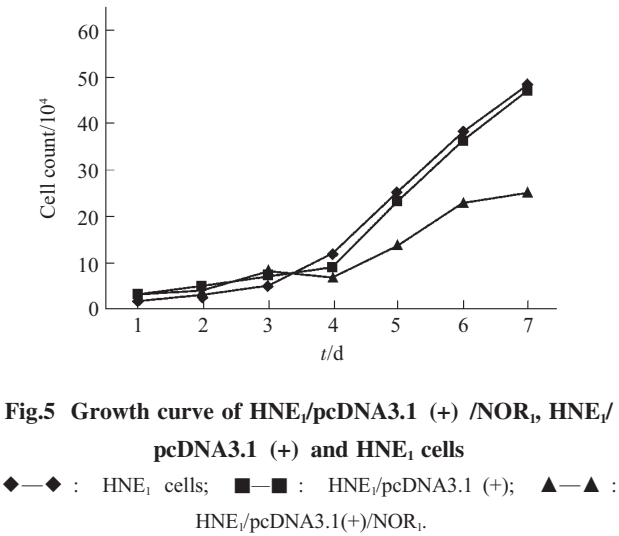


Fig.5 Growth curve of HNE₁/pcDNA3.1 (+) /NOR₁, HNE₁/pcDNA3.1 (+) and HNE₁ cells
◆—◆ : HNE₁ cells; ■—■ : HNE₁/pcDNA3.1 (+); ▲—▲ : HNE₁/pcDNA3.1(+)/NOR₁.

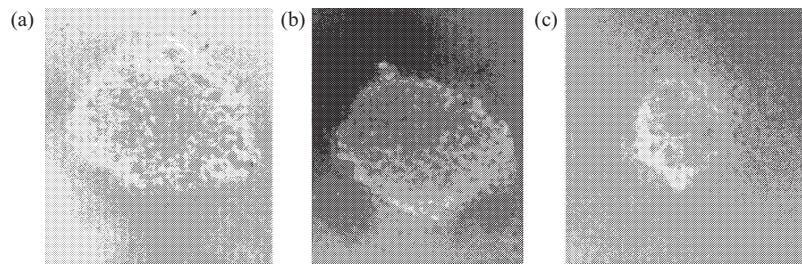


Fig.6 Soft agar colony forming of HNE₁ cells transfected by pcDNA3.1/NOR₁
(a) HNE₁; (b) pcDNA3.1/ HNE₁; (c) pcDNA3.1/NOR₁/ HNE₁.

Table 1 Cell cycle analysis of NOR₁ gene transfected HNE₁ cell line

Group	G0/G1(%)	S(%)	G2M(%)
HNE ₁	31.0	59.1	9.9
pcDNA3.1(+)/HNE ₁	34.3	52.8	12.9
NOR ₁ -pcDNA3.1(+)/HNE ₁	46.7*	41.7*	11.5

*P<0.05, compared with the control group.

3 讨 论

统计学资料表明，鼻咽癌不仅有家族聚集现象，10% 的鼻咽癌患者具有癌家族史，而且存在基因组不稳定现象，这些结果均表明遗传易感性 / 遗传倾向可能是鼻咽癌发病的重要因素^[3]。细胞与分子遗传学研究发现，鼻咽癌基因组中存在高频率 1p、3p13~26、4q、7q31.1~33、11q13.3~24、13q14.3、13q32.34 和 14q 染色体的等位基因杂合性缺失。在鼻咽癌高发区的中国广东籍患者中，有半数患者中发现 4q 增多和 1p 丢失^[4-8]。鼻咽癌基因组的不平衡，说明在这些区域可能存在

因对 HNE₁ 细胞的生长影响从第 4 天起开始明显 (P<0.05)。结果见图 5。

2.4 集落形成试验

软琼脂集落形成试验可以看出，转染 NOR₁ 基因的 HNE₁ 细胞软琼脂集落生长速度较慢，形成的集落明显较空白组与对照组小，结果见图 6。

2.5 细胞周期分析

流式细胞仪对转染 NOR₁ 基因的 HNE₁ 细胞进行细胞周期分析，结果见表 1。结果表明，NOR₁ 基因的表达可以延缓 HNE₁ 细胞由 G0/G1 期进入 S 期。

多个与鼻咽癌发生、发展相关的肿瘤易感基因或肿瘤抑制基因。

本试验通过对新克隆的基因 NOR₁ 转染后对鼻咽癌细胞株 HNE₁ 细胞生长的影响，发现 NOR₁ 转染后 HNE₁ 细胞生长速度明显减慢，NOR₁ 基因表达的升高可以延缓 HNE₁ 细胞由 G0/G1 期进入 S 期，且在软琼脂中集落形成大小较对照组明显减小。这些结果提示 NOR₁ 基因是一个强有力的鼻咽癌抑瘤基因候选者，为下一步的研究打下了一定的基础。

参 考 文 献

- 1 Zhang B C, Nie X M, Li G Y, *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
- 2 Nie X M, Zhang B C, Li G Y, *et al.* Cloning, expression and mutation analysis of NOR₁, a novel human gene down-regulated in HNE₁ nasopharyngeal carcinoma cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, **129** (7): 410~414
- 3 Li G Y, Yao K T, Ronald G. Sister chromatid exchange and

- nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1989, **43** (4): 613~618
- 4 鄢 践, 方 嫵, 曾益新, 等. 原发性鼻咽癌中高频率的 4q 增多和 1p 丢失. *中华肿瘤杂志*, 2001, **23** (3): 208~210
Yan J, Fang Y, Zeng Y X, *et al.* *Chin J Oncol*, 2001, **23** (3): 208~210
 - 5 郭 颖, 方 嫵, 梁启万, 等. 47 例鼻咽癌遗传变异的研究. *癌症*, 1995, **18**:5~8
Guo Y, Fang Y, Liang Q W, *et al.* *Chin J Cancer Res*, 1995, **18**: 5~8
 - 6 Deng L W, Jiang L, Li G Y, *et al.* A common region of allelic loss on chromosome region on 3p25.3~26.2 in nasopharyngeal carcinoma. *Gene, Chromosome & Cancer*, 1998, **23** (1): 21~25
 - 7 Tsang Y S, Lo K W, Leung S F, *et al.* Two distinct regions of deletion on chromosome 13q in primary nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1999, **83** (3): 305~308
 - 8 Mutirangura A, Pornthanakasem W, Sriuranpong V, *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 14 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1998, **78** (2): 153~156

The Effects of NOR₁ on Cells From Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line HNE₁*

NIE Xin-Min¹⁾, GUI Rong¹⁾, LI Deng-Qing¹⁾, ZHOU Ming²⁾, HUANG Zu-Fa^{1)**}, LI Gui-Yuan²⁾

¹⁾The Third Xiang-Ya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾Cancer Research Institute of Xiang-Ya Medical School of Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract NOR₁ is one of the candidate tumor suppressor genes associated with nasopharyngeal carcinoma (NPC). The mammal expression vector of NOR₁, pcDNA3.1(+)/NOR₁ was constructed and was introduced into HNE₁ cell to explore the effect of NOR₁ gene on HNE₁. The integration of the exogenous vector DNA and the reexpression of NOR₁ were detected by RT-PCR and Northern blot respectively. Finally, the cytobiological characterization of positive clone was analyzed by cell growth curves analysis, soft agar assay, cytometry. The growth of HNE₁ cells transfected with NOR₁ gene was dramatically inhibited compared with the parent HNE₁ cells. Flow cytometric data showed that more NOR₁ transfected cells went into G0/G1 phase than controls, and it also presented decreased clonogenicity in soft agar. The research indicated that the NOR₁ could play a critical role in the progression of NPC due to its results providing a basis study of the function of it.

Key words nasopharyngeal carcinoma, NOR₁ gene, cell transfection

*This work was supported by grants from The State High Technology R&D Project of China (2001AA221031), The National Natural Sciences Foundation of China (30300383) and China Postdoctoral Foundation (2004035206).

**Corresponding author. Tel: 86-731-8618440, E-mail: niexinmin7440@hotmail.com

Received: February 3, 2005 Accepted: April 30, 2005