

雌激素对转 STGC3 基因 CNE2 细胞系生长增殖的影响 *

胡 波 邱青朝 贺修胜 ** 罗 桥 唐国华 龙治峰 廖银花

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 为探讨雌激素对 STGC3 基因抑瘤的促进作用, 将重组的 pcDNA3.1(+)-STGC3 真核表达载体导入鼻咽癌细胞系 CNE2, 经 G418 筛选, RT-PCR 及蛋白质印迹检测 STGC3 的表达, 获得稳定高表达 STGC3 基因的 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞系. 采用细胞计数法, 检测雌二醇 (β -estradiol) 对体外培养 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞生长增殖的影响. 将 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞接种于裸小鼠前肢背部皮下, 观察分析雌性与雄性裸鼠成瘤的差别. 运用 RT-PCR、免疫组织化学及蛋白质印迹方法, 分别从 mRNA 及蛋白质水平, 分析 STGC3 基因在裸鼠移植瘤组织中的表达状况. 移植瘤组织病理切片检查, 观察瘤细胞形态学变化. 用流式细胞仪测定移植瘤组织的细胞周期分布. 研究结果表明: 细胞体外培养, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞经 β -estradiol 处理后, 其生长速度明显减缓 ($P < 0.05$); 裸鼠体内研究, 接种 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞实验组的移植瘤体积和重量均小于对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 实验组中, 雌性裸鼠组移植瘤体积和重量均小于雄性组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 雌性裸鼠组移植瘤生长最慢, 而对照组中雄性与雌性裸鼠组间瘤块的差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 接种 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞的雌性裸鼠组移植瘤, 阻滞于 G0/G1 期细胞数大于其他各组 ($P < 0.05$). 上述体内外研究结果显示, 雌激素可能具有增强 STGC3 基因对 CNE2 细胞系的生长抑制作用.

关键词 STGC3 基因, 雌激素, 鼻咽癌, CNE2 细胞系, 裸鼠

学科分类号 R739.63

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方及东南亚常见的恶性肿瘤之一, 其发生与遗传、环境等因素有关^[1, 2], 并涉及多种癌基因和/或抑癌基因的表达改变^[3, 4]. 世界上 80%左右的鼻咽癌发生在我国, 其年发病率为 3/100 000~5/100 000, 男性发病率高于女性(2:1~3:1)^[5]. STGC3 基因是本室从 NPC 高频率 LOH 位点 3p21 区域的 ESTs 着手, 所克隆的一个鼻咽癌相关新基因(GenBank 登录号为 AY078383). STGC3 基因, 在鼻咽癌细胞系 CNE2 和鼻咽癌活检组织中存在表达下调或缺失, 前期初步研究表明, 该基因可能为一个鼻咽癌抑瘤基因的候选者^[6~8], 并发现, 在种植 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞的 4 只裸鼠中, 2 只雌性裸鼠的移植瘤明显小于同组的 2 只雄性裸鼠, 这一结果提示, 雌激素可能具有促进 STGC3 基因对 CNE2 的生长抑制作用. 雌激素与肿瘤的关系, Jensen^[9]在 1966 年已有描述, 并提出了甾族激素的“二步机制”学说^[10, 11]: 甾族激素首先通过扩

散途径由细胞膜进入细胞浆并与特异性受体蛋白结合, 形成甾族激素-受体复合物, 并由胞浆进入胞核, 使核蛋白发生构象改变, 而形成与染色体具有高度亲和力的结合部位, 再与 DNA 结合, 激活某些基因, 加速其转录, 产生新的 mRNA, 在胞浆内合成新的蛋白质, 进而产生一系列相应的生物学效应. 因此, 本研究从体内外探讨雌激素能否增强 STGC3 基因对 CNE2 细胞的生长抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、表达载体和裸鼠. 鼻咽癌细胞系 CNE2 为低分化鼻咽鳞状细胞癌细胞系, 由中国预防医学

*国家自然科学基金(30470967), 湖南省自然科学基金(03Jy3029)和中国博士后科学基金(2004035652)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281510, E-mail: hexiusheng@hotmail.com

收稿日期: 2006-11-10, 接受日期: 2007-01-29

科学院建系, 并由本室培养提供, 以 RPMI 1640 (含 10% 小牛血清) 培养基, 置 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的二氧化碳培养箱培养. pcDNA3.1(+) 载体购自 Invitrogen 公司. Balb/c 裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 3~4 周龄, 体重 13~16 g, 动物质量合格证号为 SCX (沪) 2003-0003.

1.1.2 主要试剂. RPMI 1640、lipofectamine 2000 脂质体、G418 和 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; T4DNA 连接酶和 AMV 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; 雌二醇 (β -estradiol) 购自 Sigma 公司; TaqDNA 聚合酶和 dNTP 购自上海生物工程公司; BamH I 内切酶、Xho I 内切酶、 λ DNA/Hind III marker 和胰酶为华美生物工程公司产品; 兔抗人 STGC3 多克隆抗体由武汉博士德生物公司制备; 雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 单克隆抗体和 S-P 免疫组化试剂盒为福建迈新生物技术公司产品.

1.1.3 引物. 所用引物序列均经 Primer5.0 软件设计, 由大连宝生物公司合成. STGC3 引物: 上游引物, 5' CGGGATCCATGGTTCTTGTCTTCTTAT 3', 下游引物, 5' GCCCAAGCTTTTAGAGTAATA-AAAGATTTC 3', 其扩增片段为 460 bp; 内对照 β -actin 引物: 上游引物, 5' GGACCTGACTGACTACCTC 3', 下游引物, 5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3', 其扩增片段为 553 bp.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建. 设计 5' 端和 3' 端带 BamH I 和 Xho I 内切酶位点的引物, 以含 STGC3 基因 pBluescript 质粒 DNA 为模板, PCR 扩增 STGC3 基因编码区序列. PCR 产物及 pcDNA3.1(+) 质粒均经 BamH I 和 Xho I 双酶切, 酶切产物胶回收纯化, T4DNA 连接酶 14℃ 连接 16 h, 转化入感受态大肠杆菌 JM109. 重组质粒载体经 BamH I 和 Xho I 双酶切及测序鉴定.

1.2.2 细胞转染及稳定克隆的建立、鉴定. 参照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染. 当细胞融合度达 80% 时, 将重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-STGC3 转染到 CNE2 细胞中, G418 筛选抗性克隆 (筛选浓度 350 mg/L, 维持浓度 200 mg/L), 挑选单一抗性克隆扩大培养, RT-PCR 及蛋白质印迹检测 STGC3 的表达, 筛选出能够稳定、高效表达 STGC3 基因的细胞克隆, 建立稳定高效表达 STGC3 基因的传代细胞系, 命名为 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2. 同时, 建立转染 pcDNA3.1(+) 载体的细胞系 pcDNA3.1(+)/CNE2, 作为实验对照所用.

1.2.3 细胞生长曲线的测定. MTT 法筛选 β -estradiol 对 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞的最佳抑制浓度为 1 μ mol/L. 将 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 和 CNE2 细胞无血清培养 24 h, 使细胞同步化. 按 1×10^4 个 / 孔接种于 24 孔板内, 6 h 贴壁后加入终浓度为 1 μ mol/L 的 β -estradiol, 隔 24 h 每组取 3 孔细胞, 用标准计数板进行细胞计数, 取均值. 共检测 7 天, 以细胞数为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制生长曲线.

1.2.4 免疫细胞化学方法检测 CNE2 细胞 ER 的表达, 免疫组织化学方法检测裸鼠移植瘤组织中 STGC3 的表达. 操作步骤参照 S-P 试剂盒说明进行, 并摄像. 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.

1.2.5 裸鼠接种实验. 收集对数生长期的 CNE2、pcDNA3.1 (+)/CNE2、pcDNA3.1 (+)/STGC3/CNE2 三组细胞, 配成 1×10^7 个 / ml 单细胞悬液, 分别接种至雄性和雌性组裸鼠前肢背部皮下, 0.2 ml / 只 (相当于 2×10^6 个细胞), 每组 4 只, 共 6 组, 分别为 CNE2 雄、CNE2 雌、pcDNA3.1(+)/CNE2 雄、pcDNA3.1(+)/CNE2 雌、pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄及 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雌组. 接种后每天定时观察与记录裸鼠精神、饮食及排便等状况, 每 3 天用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 计算并比较肿瘤体积. 接种 4 周后, 裸鼠经乙醚麻醉, 处死, 取瘤称重, 计算抑瘤率. 一部分肿瘤组织用中性甲醛固定, 进行病理组织切片检查, 其余均液氮保存备用. 肿瘤体积 = 短径² $\times$ 长径 $\times$ 0.52, 抑瘤率 (%) = (空载体组瘤重 - 转染组瘤重) / 空载体组瘤重 $\times$ 100%.

1.2.6 RT-PCR 鉴定. 按 TRIzol 试剂说明程序, 分别抽提各组细胞和裸鼠移植瘤组织总 RNA, 逆转录反应参照 AMV 逆转录试剂盒说明, 在 20 μ l 体系中加 2 μ g 总 RNA 进行 cDNA 的合成. 以 STGC3 基因的上下游引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 先 95℃ 变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min. 以 β -actin 作为内对照, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后紫外透射仪下观察, 并摄像.

1.2.7 蛋白质印迹检测. 分别抽提各组细胞和裸鼠移植瘤组织总蛋白质, BCA 法蛋白质定量, 每孔加样 50 μ g 蛋白质, 经 8% SDS-PAGE 后转膜, 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入兔抗人 STGC3 一抗 (1 : 500), 4℃ 摇过夜, TBS-T 洗膜 3 $\times$ 5 min, HRP

标记羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, TBS-T 洗膜 3×5 min, ECL 发光剂曝光 1 min, 显影.

1.2.8 流式细胞仪(FCM)分析移植瘤组织的细胞周期分布. 分别取各组裸鼠移植瘤组织制备成单细胞悬液, 用 70%酒精固定, 细胞密度 1×10^6 个/ml, 4℃保存待用. 采用 PI 染色, 流式细胞仪检测细胞群体中处于各个细胞周期的细胞比例.

1.2.9 统计学分析. 应用统计学软件 SPSS11.5 for Windows 中 one-way ANOVA 进行比较分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 重组载体双酶切鉴定

重组载体经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后可得到约 460 bp 的目的片段(图 1).

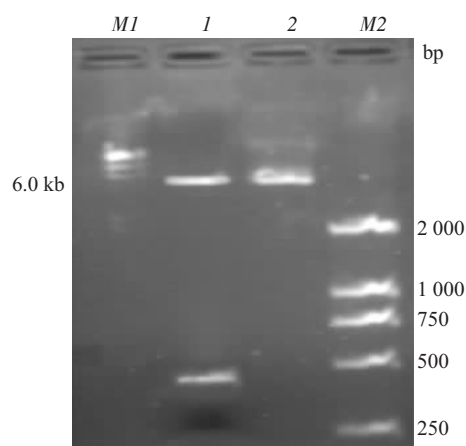


Fig. 1 Identification of recombinant by restrict endonucleases digestion

M1: λ DNA/*Hind* III marker; M2: DL2000 marker; 1: pcDNA3.1(+)-STGC3 cut with *Bam*H I/*Xho* I; 2: pcDNA3.1(+) cut with *Bam*H I/*Xho* I.

2.2 稳定表达 STGC3 基因细胞克隆的建立与鉴定

将 pcDNA3.1(+)载体和 pcDNA3.1(+)-STGC3 重组体分别转染 CNE2 细胞, 经 G418 筛选后, 挑选 24 个转染 pcDNA3.1(+)-STGC3 抗性 CNE2 细胞克隆, 及 3 个转染 pcDNA3.1(+)抗性 CNE2 细胞克隆, 扩大培养后, RT-PCR 及蛋白质印迹方法, 检测 STGC3 基因的表达, 以 β -actin 为内对照, 结果显示, 仅有 4 个克隆有 STGC3 表达, 其余克隆及转染空载体克隆均阴性(图 2, 图 3). 对 4 个阳性克隆细胞系进行生长曲线绘制, 用流式细胞仪检测细胞周期分布, 结果显示: 4 个阳性克隆细胞系的倍增时间与周期分布基本一致. 选取表达最强的 5 号

克隆细胞系用于下一步实验.

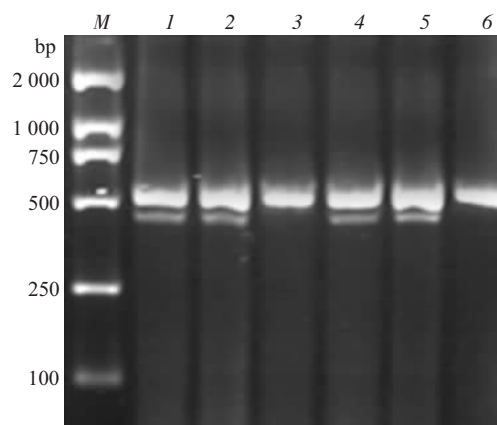


Fig. 2 Re-expression of STGC3 gene in CNE2 cells detected by RT-PCR

M: DL2000 marker; 1, 2, 3, 4, 5: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 clones; 6: pcDNA3.1(+)/CNE2 clones.

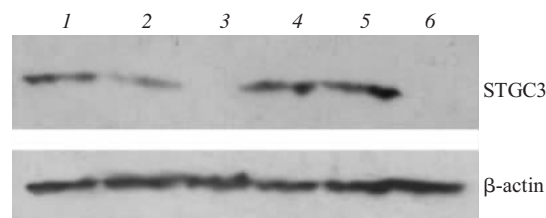


Fig. 3 Re-expression of STGC3 gene in CNE2 cells detected by Western blotting

1, 2, 3, 4, 5: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 clones; 6: pcDNA3.1(+)/CNE2 clones.

2.3 免疫细胞化学检测 CNE2 细胞中 ER 蛋白的表达

免疫细胞化学结果显示, ER 蛋白在 CNE2 细胞中定位于胞核和胞浆(图 4).

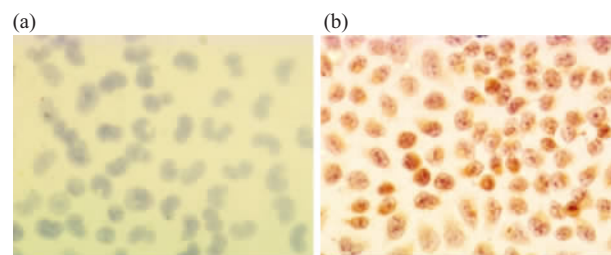


Fig. 4 ER expression in CNE2 cells by immunohistochemistry
(a) Negative control. (b) Positive expression (SP, 400×).

2.4 β -estradiol 对 pcDNA3.1 (+) /STGC3/CNE2 细胞生长的影响

绘制生长曲线和统计学分析结果显示: 转

STGC3基因 CNE2 细胞生长速度较未转 STGC3 基因 CNE2 细胞生长速度降低 ($P < 0.05$); β -estradiol 可使 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 细胞的生长速度明显减缓($P < 0.05$, 图 5), 而对未转 STGC3 基因 CNE2 细胞的生长速度无明显影响. 说明 STGC3 基因可抑制 CNE2 细胞生长, β -estradiol 能够增强 STGC3 基因对 CNE2 细胞的生长抑制作用.

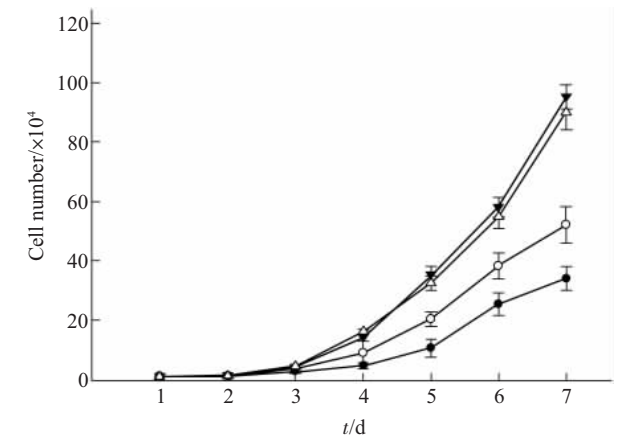


Fig. 5 Suppression effect of β -estradiol on pcDNA3.1 (+) /STGC3/CNE2 cells
○—○: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2; ●—●: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 treated with β -estradiol; $\triangle$ — $\triangle$: CNE2; $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$: CNE2 treated with β -estradiol.

2.5 裸鼠致瘤性实验

6 组裸鼠中, CNE2 雄、CNE2 雌组长出肿瘤最早(接种后 3 天), 肿块生长迅速, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雌组长出肿瘤最晚(接种后 5 天), 且肿块生长缓慢. 4 周后经乙醚麻醉处死裸鼠, 分离瘤块, 测量移植瘤大小, 称量其重量(图 6, 图 7). 统计学分析表明, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄、雌组分别与其他 4 对照组间移植瘤体积和重量差异有显著性意义 ($P < 0.05$); pcDNA3.1 (+)/STGC3/CNE2 雄、雌组间移植瘤体积和重量差异有显著性意义($P < 0.05$), 抑瘤率分别为 43.4%和 70.0%, 雌性鼠组移植瘤生长最慢; 其他 4 组雄性鼠和雌性鼠

组间的移植瘤体积和重量差异均无显著性意义 ($P > 0.05$, 表 1).

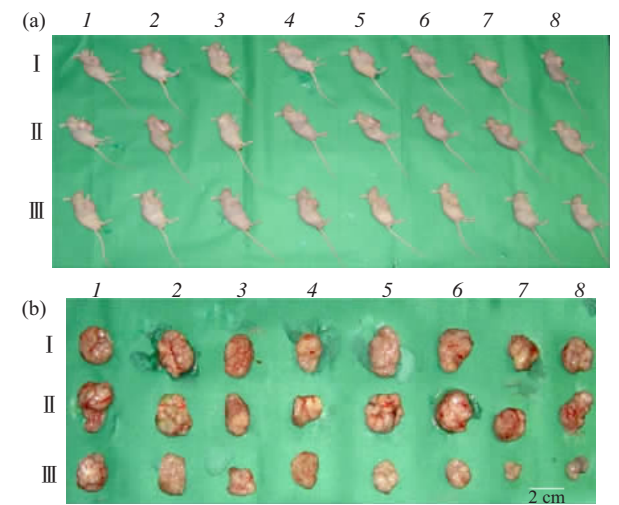


Fig. 6 Comparison of the nude mice and its transplanted tumors of six groups
1~4 of line I : CNE2/male; 5~8 of line I : CNE2/female; 1~4 of line II : pcDNA3.1 (+)/CNE2/male; 5~8 of line II : pcDNA3.1 (+)/CNE2/female; 1~4 of line III: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male; 5~8 of line III: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female.

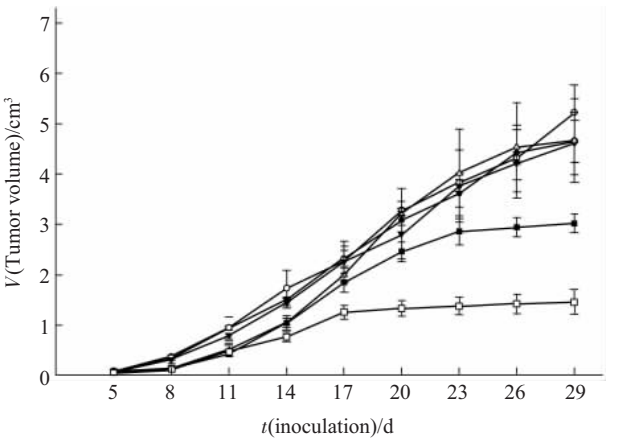


Fig. 7 Comparison of the growth rate of transplanted tumors in nude mice
●—●: CNE2/male; ○—○: CNE2/female; $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$: pcDNA3.1 (+) /CNE2/male; $\triangle$ — $\triangle$: pcDNA3.1(+)/CNE2/female; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male; $\square$ — $\square$: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female.

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

Groups	$v(\text{tumor})/\text{cm}^3$	$m(\text{tumor})/\text{g}$
CNE2/male	4.648 ± 0.840	3.18 ± 0.89
CNE2/female	5.216 ± 1.110	3.10 ± 0.40
pcDNA3.1(+)/CNE2/male	4.610 ± 1.234	3.65 ± 0.96
pcDNA3.1(+)/CNE2/female	4.662 ± 1.664	3.32 ± 0.54
pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male	3.024 ± 0.374	2.06 ± 0.41
pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female	1.462 ± 0.490	0.99 ± 0.52

$n=4, \bar{x} \pm s.$

2.6 裸鼠移植瘤组织形态学变化

6 组移植瘤组织经病理学切片检查, 均为低分化鳞状细胞癌, 并可见不同程度的病理性核分裂和嗜酸性坏死细胞, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄、

雌组较其他 4 组病理性核分裂细胞数少见, 而嗜酸性坏死细胞数则多见, 尤其以雌性鼠组最明显 (图 8).

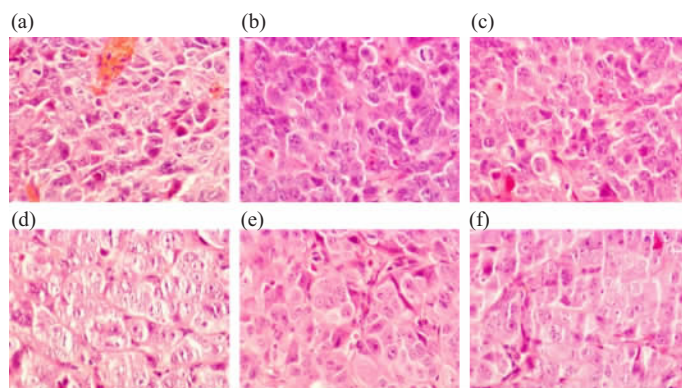


Fig. 8 H&E staining of the tumor tissue formed in the nude mice

(a) CNE2/male. (b) CNE2/female. (c) pcDNA3.1(+)/CNE2/male. (d) pcDNA3.1(+)/CNE2/female. (e) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male. (f) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female. The original magnification was 400 $\times$.

2.7 裸鼠移植瘤组织中 STGC3 基因 mRNA 的分析

采用 RT-PCR 检测各组移植瘤组织中 STGC3 基因 mRNA 的表达情况. 结果表明, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄、雌组均可见大小为 460 bp 的特异 STGC3 基因扩增产物条带, 其他 4 组未扩增出 460 bp 的特异产物 (图 9).

2.8 裸鼠移植瘤组织中 STGC3 蛋白的表达

免疫组织化学及蛋白质印迹方法分析各组移植瘤组织中 STGC3 蛋白表达情况. 结果显示, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄、雌组 STGC3 蛋白表达阳性, 其他 4 组表达均为阴性 (图 10, 图 11).

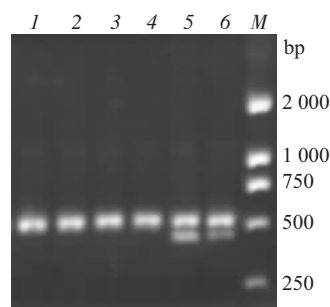


Fig. 9 STGC3 mRNA expression in the tumor tissue formed in nude mice

M: DL2000 marker; 1: CNE2/female; 2: CNE2/male; 3: pcDNA3.1(+)/CNE2/female; 4: pcDNA3.1(+)/CNE2/male; 5: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female; 6: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male.

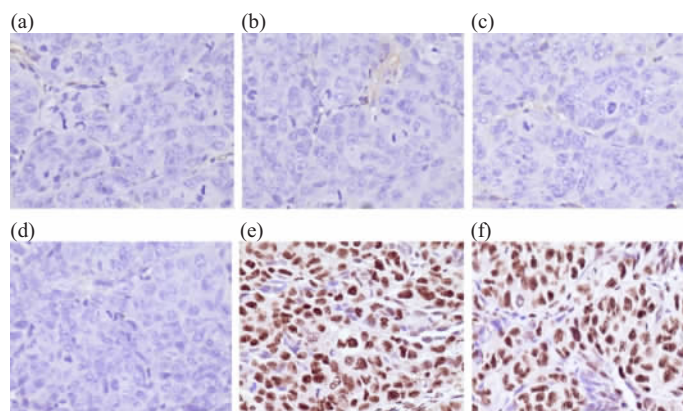


Fig. 10 STGC3 expression of transplanted tumor tissues in nude mice (Immunohistochemistry)

(a) CNE2/female. (b) CNE2/male. (c) pcDNA3.1(+)/CNE2/female. (d) pcDNA3.1(+)/CNE2/male. (e) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female. (f) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male. Magnification, 400 $\times$.

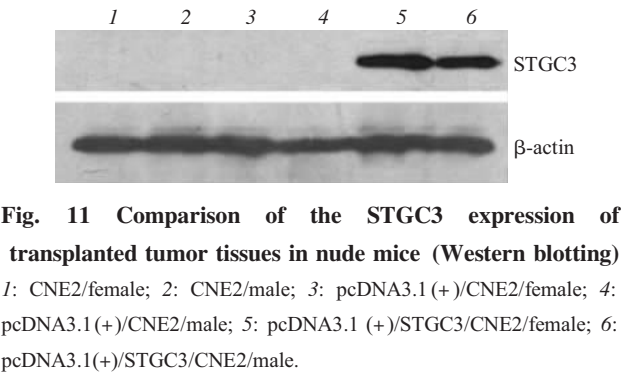


Fig. 11 Comparison of the STGC3 expression of transplanted tumor tissues in nude mice (Western blotting)
1: CNE2/female; 2: CNE2/male; 3: pcDNA3.1(+)/CNE2/female; 4: pcDNA3.1(+)/CNE2/male; 5: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female; 6: pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male.

2.9 细胞周期分析

FCM 检测各组移植瘤组织中细胞周期的分布情况. 结果显示, pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雄、雌组与其他组相比, G0/G1 期细胞比例明显升高, S 期细胞比例下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$, 图 12, 表 2), 尤其以 pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 雌组处于 G0/G1 期细胞数为最多, 提示雌激素可能增强 STGC3 基因抑制细胞进入 S 期, 而抑制 CNE2 细胞增殖.

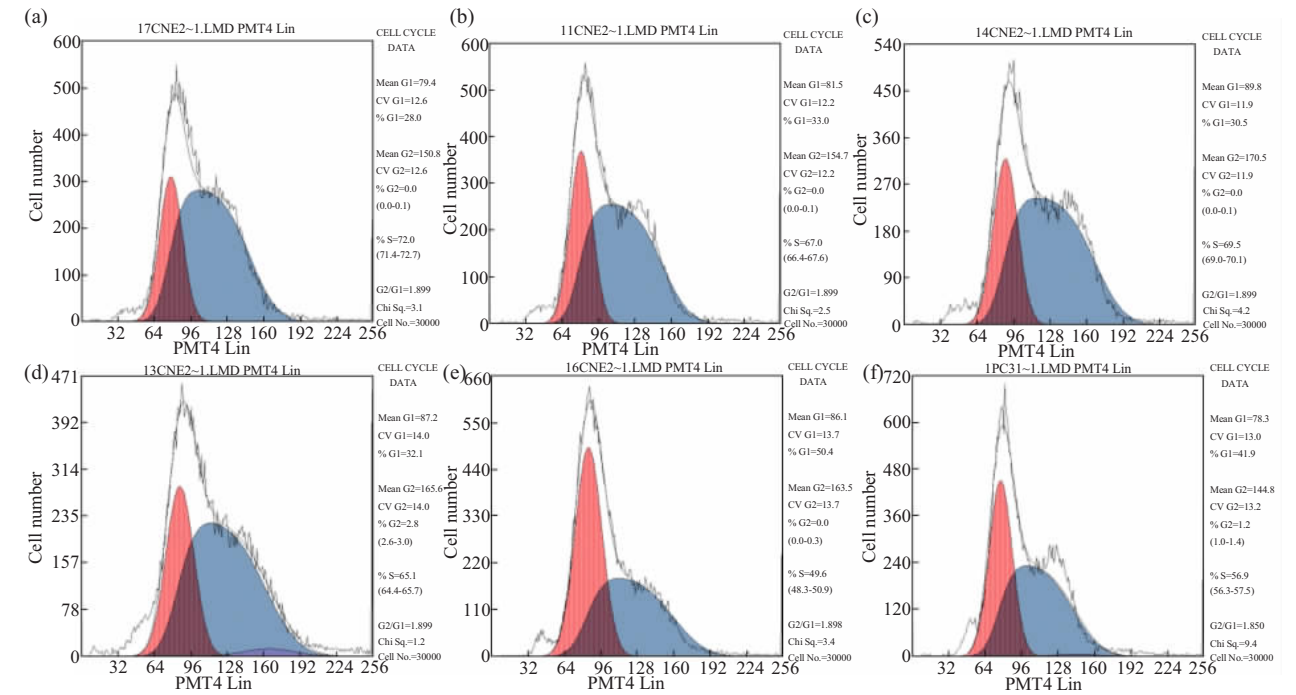


Fig. 12 Cell cycle analysis by flow cytometry
(a) CNE2/female. (b) CNE2/male. (c) pcDNA3.1(+)/CNE2/female. (d) pcDNA3.1(+)/CNE2/male. (e) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female. (f) pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male.

Table 2 Cell cycle distribution in tumor tissues			
Groups	G0/G1	S	%
CNE2/femal	28.7 ± 0.9	71.5 ± 1.3	1.0 ± 0.7
CNE2/male	31.7 ± 1.0	56.8 ± 1.5	0.6 ± 0.4
pcDNA3.1(+)/CNE2/female	30.3 ± 1.3	69.1 ± 0.8	0.9 ± 0.6
pcDNA3.1(+)/CNE2/male	31.6 ± 0.5	65.6 ± 1.4	1.2 ± 0.7
pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/female	50.7 ± 0.7	48.7 ± 1.2	0.8 ± 0.5
pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2/male	41.7 ± 0.6	55.4 ± 1.0	1.4 ± 0.9

$n = 4, \bar{x} \pm s.$

3 讨 论

STGC3基因为单外显子基因, 位于染色体 3p21, 开放阅读框为 438 bp, 编码一个由 146 个氨

基酸组成的 STGC3 蛋白, 定位于胞核与胞浆. 生物信息学预测分析, STGC3 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 个肉豆蔻酰化位点和 1 个层粘连

蛋白 G 结构域(Laminin G domain)^[7].

雌激素及其受体与肿瘤的关系, 是肿瘤学研究的热点之一. 有研究表明, 雌激素受体(ER)不仅存在于性激素靶器官肿瘤, 如乳腺癌、子宫癌、卵巢癌等恶性肿瘤中^[12~15], 在一些以往认为非靶器官肿瘤如食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌及头颈部恶性肿瘤等组织中也存在 ER^[16~18], 并且与各种恶性肿瘤的发生发展相关.

我们前期研究发现, 在种植转染 STGC3 基因的 CNE2 细胞组 4 只裸鼠中, 2 只雌性裸鼠的移植瘤肿块明显小于 2 只雄性裸鼠, 提示雌激素可能增强 STGC3 基因的抑瘤作用, 并且生物信息学显示, STGC3 含有一个 LG 结构域, 而蛋白质的 LG 结构域可与性激素结合^[19, 20]. STGC3 是否作为一种激素结合蛋白, 与其结合增强 STGC3 基因的抑瘤作用? 本实验免疫细胞化学检测 CNE2 细胞中 ER 表达呈阳性, 因此, 我们将 STGC3 基因转染入 CNE2 细胞, 使之重新恢复表达, 观察 β -estradiol 对转 STGC3 基因 CNE2 细胞生长的影响, 结果发现, 1 $\mu\text{mol/L}$ β -estradiol 可使其生长速度明显减缓, 分析可能原因有: 促进细胞凋亡, 使细胞进入 G0 期, 分裂细胞减少. 扩大裸鼠接种实验样本结果显示: 转基因组与其他各组相比较, 成瘤时间晚, 移植瘤生长缓慢, 移植瘤体积小, 瘤块重量轻($P < 0.05$), 尤其以转基因组中的雌性组最突出. 移植瘤病理学切片显示, 转基因组雌性裸鼠移植瘤组织细胞核分裂像最少, 而细胞嗜酸性坏死则多见, 但仍为低分化鳞状细胞癌, 结果表明, 未能完全逆转 CNE2 细胞的恶性表型, 说明肿瘤是一个多基因病, 在 NPC 发生发展中可能存在其他基因的参与. FCM 检测结果显示, 转基因组裸鼠移植瘤组织中 G0/G1 期细胞数增加, S 期细胞比例下降, 以转基因组雌性裸鼠最明显, 延缓细胞 G1→G0 期的进程, 从而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用. Jensen 等提出的甾族激素的“二步机制”学说, 认为雌激素首先通过扩散途径由细胞膜进入细胞浆, 并与特异性雌激素受体蛋白结合, 形成雌激素-雌激素受体复合物, 并由胞浆进入胞核, 使核蛋白发生构象改变, 而形成与染色体具有高度亲和力的结合部位, 与 DNA 结合, 激活基因的表达与加速转录, 从而发挥其生物学效应.

本研究体内、外实验结果表明, 雌激素可增强 STGC3 基因对 CNE2 细胞系的生长抑制作用, 但其确切的分子机制尚不十分清楚, 有待今后进一步

研究.

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 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
- 3 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
- 4 Peng D, Ren C P, Yi H M, *et al.* Genetic and epigenetic alterations of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in nasopharyngeal carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, **38** (5): 349~355
- 5 Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12** (6): 421~429
- 6 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.* *Chinese Journal of Cancer*, 2003, **22** (1): 1~5
- 7 贺修胜, 陈主初, 朱建华, 等. STGC3 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.* *Chinese Journal of Cancer*, 2004, **23** (10): 1110~1115
- 8 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.* *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, **33** (1): 39~44
- 9 Jensen E V. Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf*, 1966, **6**: 143~165
- 10 Jensen E V, Suzuki T, Kawashima T, *et al.* A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **59** (2): 632~638
- 11 Jensen E V. The contribution of “alternative approaches” to understanding steroid hormone action. *Mol Endocrinol*, 2005, **19** (6): 1439~1442
- 12 Duffy M J. Estrogen receptors: role in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006, **43** (4): 325~347
- 13 Brosens J J, Parker M G. Gene expression: Oestrogen receptor hijacked. *Nature*, 2003, **423** (6939): 487~488
- 14 Nilsson S, Makela S, Treuter E, *et al.* Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 2001, **81** (4): 1535~1565
- 15 Ikeda K, Inoue S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*, 2004, **67** (5): 435~442
- 16 Deroo B J, Korach K S. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 2006, **116** (3): 561~570
- 17 Harkonen P L, Makela S I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, **92** (4): 297~305
- 18 Stabile L P, Lyker J S, Gubish C T, *et al.* Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in

- non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects. *Cancer Res*, 2005, **65** (4): 1459~1470
- 19 Hohenester E, Tisi D, Talts J F, *et al*. The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell*, 1999, **4** (5): 783~792
- 20 Joseph D R, Baker M E. Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin, and *Drosophila* crumbs protein. *FASEB J*, 1992, **6** (7): 2477~2481

Effect of Estrogen on CNE2 Cell Line Transfected With STGC3 Gene*

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

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

Abstract To investigate the effect of estrogen to STGC3 gene on CNE2 cell line *in vitro* and *in vivo*. The recombinant pcDNA3.1 (+)/STGC3 plasmid was constructed and transfected into CNE2 cell line with lipofectamine 2000. CNE2 cell clones with stable STGC3 expression were obtained through G418 selection and identified by RT-PCR and Western blotting methods. The effect of β -estradiol on growth rate of pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 cell line was examined by cytometry. The pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 cell line was inoculated subcutaneously in nude mice. Tumorigenicity diversity was analyzed in female and male nude mice. STGC3 expression was detected in tumor xenografts in nude mice by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting methods. Cell morphologic changes were observed by microscope. Flow cytometry was used to analyze cell cycles. The results indicated that pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 cell growth rate decreased after treated with β -estradiol *in vitro*. There were significant differences in tumor size and mass between pcDNA3.1 (+)/STGC3/CNE2 and control cases ($P < 0.05$). Furthermore, tumor size and mass had significant differences between male and female nude mice in the STGC3 transfection cases and tumor growth rate of pcDNA3.1 (+)/STGC3/CNE2 in the female nude mice was the lowest in all cases ($P < 0.05$). No significant difference was found between male and female nude mice in other control cases ($P > 0.05$). There were more cells blocked in G0/G1 phase in tumor xenografts of pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2 cell line of the female nude mice case than that in other cases. Data above indicated that estrogen might enhance the effect of STGC3 to inhibit CNE2 cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.

Key words STGC3 gene, estrogen, nasopharyngeal carcinoma, CNE2 cell line, nude mice

*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: hexiusheng@hotmail.com

Received: November 10, 2006 Accepted: January 29, 2007