

# NGX6 基因对高转移鼻咽癌 细胞株 5-8F 细胞的影响\*

王莉莉<sup>1,2)</sup> 张秋红<sup>1)</sup> 马健<sup>1)</sup> 彭聪<sup>1)</sup> 曹利<sup>1)</sup> 唐珂<sup>1)</sup> 李小玲<sup>1)</sup> 李桂源<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; <sup>2)</sup>中南大学基础医学院微生物学教研室, 长沙 410078)

**摘要** NGX6 是一个新克隆的鼻咽癌候选抑瘤基因. 为进一步研究其功能, 在构建 NGX6 的真核表达载体 NGX6/pcDNA3.1(+)基础上, 通过脂质体转染方法将 NGX6 基因导入鼻咽癌细胞株 SUNE-1 的亚株 5-8F 细胞 (具有高成瘤高转移潜能) 中, 并用 RT-PCR 和 RNA 印迹鉴定, 建立了稳定表达 NGX6 基因的 5-8F 细胞系. 借助细胞生长曲线、软琼脂集落形成实验对转染细胞的生物学行为进行了检测, 同时采用包含 1 176 个与肿瘤学相关的基因 cDNA 微阵列, 分析了 NGX6 基因转染对 5-8F 细胞基因表达谱的影响. 结果显示: 转染了 NGX6 基因的 5-8F 细胞的生长速度明显减慢, 在软琼脂中集落形成率较对照组显著下降 ( $P < 0.05$ ), 发现 NGX6 基因的转染能够上调 5-8F 细胞中 p19、catenin  $\alpha 2$ 、desmoglein 1 等基因的表达, 同时下调 EphB4、TIE2、vitronectin 等基因的表达. 综上所述, NGX6 基因可以抑制 5-8F 细胞的恶性生物学行为, 并影响一些与细胞周期、细胞黏附和血管生成有关的基因的表达. 上述结果为鼻咽癌转移分子机制的阐明提供了重要的线索.

**关键词** NGX6 基因, 鼻咽癌, 肿瘤转移, cDNA 微阵列

**学科分类号** R73

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是好发于东南亚及我国南方各省区的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 其病因涉及 EB 病毒感染、化学致癌物作用及多种癌基因与抑癌基因结构和功能的改变. 鼻咽癌临床病理特点为低度分化和高转移性, 以颈部淋巴结转移为首发症状就诊的病例可高达 78.9%, 而转移的发生预示着预后不良, 故鼻咽癌转移机制的阐明及防治有重要意义. 我室从 9p 区域采用 EST 介导的定位候选克隆方法克隆了与鼻咽癌相关的肿瘤抑制候选基因 NGX6<sup>[2]</sup>, GenBank 登录号为 AF188239. 对该基因初步的功能研究显示, NGX6 在鼻咽癌活检组织、鼻咽癌上皮细胞株 (HNE1) 中表达下调甚至缺失(25 例活检样本中, 12 例表达下调, 下调比例为 50%~80%, 9 例表达缺失, HNE1 细胞中表达缺失), 而在正常鼻咽组织和原代培养的鼻咽上皮细胞中存在明确的表达. 已有研究采用 RT-PCR、RNA 印迹 (Northern blot) 方法分析了 NGX6 在结肠癌组织中的表达, 令人感兴趣的是发现 NGX6 表达与结肠癌的转移呈负相关<sup>[3]</sup>.

cDNA 微阵列是系统、全面探索基因组功能的新方法, 具有高通量的特点, 可同时比较不同标本的基因表达差异. SUNE-1 是鼻咽癌组织来源的 EBV 阳性细胞株, 为典型低分化鳞癌细胞. 从

SUNE-1 中克隆了 11 种亚株, 宋立兵等<sup>[4]</sup>对 SUNE-1 亚细胞株 5-8F 进行了异质性研究证实: 5-8F 为具有高成瘤、高转移潜能细胞株. 本研究分析 NGX6 基因转染对 5-8F 细胞生物学行为的影响, 并利用 cDNA 微阵列分析了 NGX6 基因转染对 5-8F 细胞基因表达谱的影响, 为我们阐明鼻咽癌转移的机制提供了重要的依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RPMI1640 购自美国 PROMEGA 公司, 小牛血清购自中国华美生物工程有限公司, 脂质体购自美国 GIBCO/BRL 公司. pcDNA3.1(+) 载体为 Invitrogen 公司的产品. 5-8F 细胞株具有高成瘤高转移特性, 是鼻咽癌细胞株 UNE1 细胞的亚型, 为中山医科大学肿瘤所建系<sup>[4,5]</sup>. RNA 酶为美国 GIBCO/BRL 公司产品. 随机引物标记盒、逆转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Promega

\*国家十五科技攻关项目(2002BA711A08, 2002BA711A03)和国家自然科学基金资助项目(30330560, 30271403, 30200160, 30300064).

\*\* 通讯联系人.

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

收稿日期: 2005-01-17, 接受日期: 2005-02-28

公司, TRIZOL™ 试剂购自美国 GIBCOL/BRL 公司. DNA 分子质量标准购自大连宝生物工程有限公司. 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司, BCA 蛋白测定试剂, 化学发光试剂均购自 Pierce Chemical Co. Rockford 公司. p19、catenin $\alpha$ 2、desmoglein 1、EphB4、TIE2、vitronectin、 $\alpha$ -tubulin 抗体、抗鼠 IgG-HRP 及抗兔 IgG-HRP 标记抗体均购自 Santa Cruz 公司. 蛋白质低分子质量标准购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所. 聚丙烯酰胺, 双丙烯酰胺为美国 Sigma 公司的产品, 琼脂糖为中国 SABC 公司进口分装产品. 引物由大连宝生物工程有限公司合成: NGX6, 5' TGA CCT GTT CCA AAG AGT CCC TG 3', 5' GCA GCT TCC AGC ACA TAT CGA CT 3', 其扩增目的片段为 486 bp; GAPDH 的两条引物为, 5' CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA 3', 5' GAG GAG GGG AGA TTC AGT GTG GT 3', 其扩增目的片段为 700 bp;  $\beta$ -actin 的两条引物为, 5' TCC GTG GAG AAG AGC TAC GA 3', 5' GTA CTT GCG CTC AGA AGG AG 3', 扩增片段为 309 bp. cDNA 微阵列膜购自美国 Clontech 公司. 同位素  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP 购自北京福瑞公司.

## 1.2 方法

**1.2.1** NGX6 基因 cDNA 表达重组体转染 5-8F 细胞及其稳定表达株系的建立. 5-8F 用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养. 含有人 NGX6 基因全长 cDNA 的真核表达载体用 pcDNA3.1(+) 质粒构建, 酶切位点是 *Eco*R I 和 *Xho* I. 抽提质粒 DNA, 无菌处理后采用脂质体转染的方法转染 5-8F 细胞, 细胞转染 48 h 后, 用选择性培养基 G418 (500 mg/L) 培养 3 周, 挑选抗性克隆, 扩大培养, 建成稳定高表达 NGX6 基因的 5-8F/NGX6 细胞系. 作为对照, 同时也转染了空白载体 pcDNA3.1(+) 到 5-8F 细胞中. 用 RT-PCR 实验及 RNA 印迹检测阳性细胞克隆与空白载体转染的细胞 5-8F/pcDNA3.1(+) 以及 5-8F 中的 NGX6 mRNA 表达水平.

**1.2.2** RT-PCR 及 RNA 印迹实验. 按 TRIZOL™ 试剂盒 (GIBICOL/BRL 公司) 操作程序提取培养细胞的 RNA. 所得逆转录产物 cDNA 用于 PCR 扩增 NGX6 基因,  $\beta$ -actin 基因作为 RT-PCR 内对照, GAPDH 基因作为 RNA 印迹内对照. RNA 印迹参照《分子克隆实验指南》<sup>[6]</sup>进行.

**1.2.3** 转基因细胞 5-8F 生长曲线的绘制. 分别将转

染 NGX6 的 5-8F 细胞、质粒对照 5-8F 细胞及空白对照 5-8F 细胞各  $1 \times 10^4$  个 / 孔接种于 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生长曲线. 数据经统计学软件 SPSS 处理, 采用多组样本均数间的比较.

**1.2.4** 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 皿, 接种密度为  $2.0 \times 10^4$  / 皿. 在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 生化培养箱中培养 15 天, 计数平均集落形成率. 数据经统计学软件 SPSS 8.0 处理, 采用多组样本均数间的比较.

### 1.2.5 cDNA 微阵列实验.

cDNA 微阵列膜为美国 Clontech 公司产品, 包含 1 176 个基因 cDNA, 主要包括看家基因、癌基因及抑癌基因、细胞-细胞粘附受体、生长因子、细胞外间质蛋白、细胞表面抗原、细胞因子等类型, 可应用于癌细胞运动和侵袭、细胞黏附和信号转导等的研究.

根据 Atlas Cell Interaction cDNA Array 试剂盒说明书进行, 取 4  $\mu$ g NGX6-1/5-8F、NGX6-2/5-8F 和 vector/5-8F 细胞总 RNA 进行  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP 标记, 将制备的探针纯化. 将杂交液加入 cDNA Array 于 68℃ 预杂交 30 min, 加入已标记纯化的探针, 68℃ 杂交过夜洗膜, Kodak 胶片-70℃ 感光 3 天, 显影、定影. 在图象分析仪 (FujiFilm Thermal Imaging System FTI-500, Pharmacia Biotech 公司) 中, 应用 Image master VDS 软件, 以看家基因 tubulin 杂交信号密度为校对值, 观测其他信号与其比值为各基因的相对吸光度值.

### 1.2.6 蛋白质提取和蛋白质印迹分析.

转染 NGX6 的 5-8F 细胞、质粒对照 5-8F 细胞及空白对照 5-8F 细胞孵育 24 h, 用 1×PBS 洗 3~4 次, 细胞裂解液 (radioimmunoprecipitation buffer) RIPA (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 1×蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L 钒酸钠) 冰上裂解 30~60 min. 13 000 r/min 离心去细胞碎片, 留含全蛋白质的上清液, 用 BCA 试剂测定蛋白质浓度.

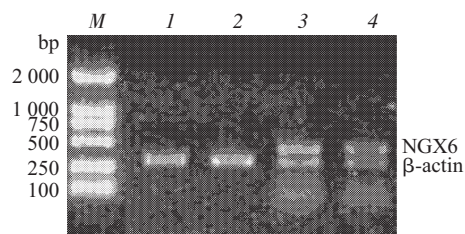
取各组细胞 50  $\mu$ g 总蛋白进行不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉加 PBST 在室温下封闭

1~2 h, 加入一抗, 过夜孵育, 洗膜, 加入相应 IgG-HRP 二抗, 孵育 1 h, ECL 化学发光检测, 以  $\alpha$ -tubulin 作为内对照。

## 2 结 果

### 2.1 稳定转染 NGX6 基因的 5-8F 细胞株的建立

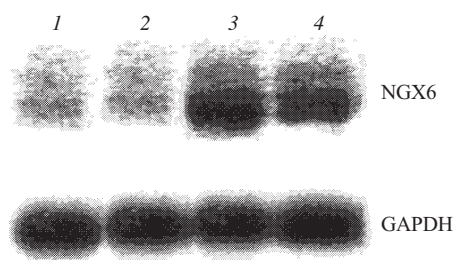
利用脂质体转染的方法把含 NGX6 基因的的表达载体导入 5-8F 细胞中, 利用 RT-PCR 和 RNA 印迹对转染细胞系中的 NGX6 表达情况进行检测。结果显示: 有 2 个阳性克隆的 NGX6 mRNA 表达水平明显高于 5-8F 细胞系及 5-8F/pcDNA3.1(+) 细胞系(图 1 和图 2)。



**Fig.1 Expression detection of NGX6 gene in NGX6 transfectant and control cells by RT-PCR**

M: DL2000 marker; 1: 5-8F; 2: 5-8F/pcDNA3.1(+); 3,4: 5-8F/NGX6.

The  $\beta$ -actin was used as an internal control.

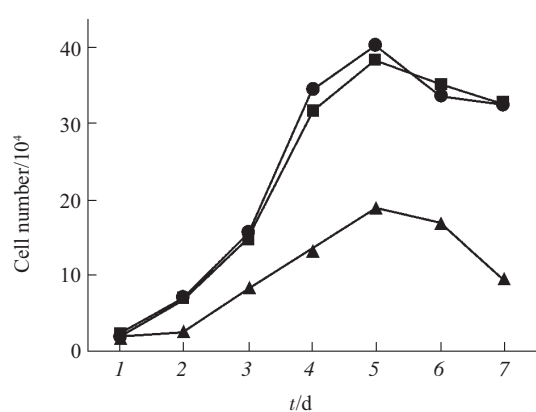


**Fig.2 Northern blot analysis of NGX6 transfectant and control cells**

Part of NGX6 cDNA, 1.1 kb, containing open reading frame, was used as a probe. 1: 5-8F; 2: 5-8F/pcDNA3.1(+); 3,4: 5-8F/NGX6. The housekeeping gene GAPDH probe was used as an internal control.

### 2.2 细胞生长曲线

分别将 5-8F/NGX6 阳性克隆细胞、5-8F/pcDNA3.1(+) 空白质粒对照细胞及未转染的 5-8F 细胞各  $1 \times 10^4$  个接种于 24 孔板内, 连续细胞计数 7 天, 绘制出生长曲线(图 3), 用方差分析比较每组细胞每天的细胞计数均值, 结果表明: 转染 NGX6 基因的 5-8F 细胞的生长速度比空白对照组和 5-8F 组明显降低 ( $P < 0.05$ )。

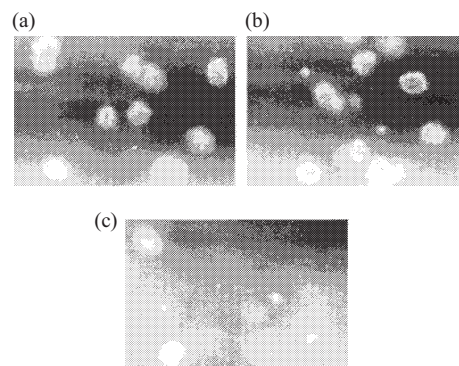


**Fig.3 Cell growth curve assay of NGX6 transfectant and control cells**

●—●: 5-8F; ■—■: 5-8F/pcDNA3.1(+); ▲—▲: 5-8F/NGX6.

### 2.3 软琼脂集落形成实验

软琼脂集落形成实验亦表明: 转染 NGX6 基因后的 5-8F 细胞软琼脂集落生长速度较慢, 形成的集落较小, 平均集落形成率较空白质粒对照组和 5-8F 组明显降低,  $P < 0.05$  (图 4, 表 1)。上述结果显示 NGX6 基因能延缓 5-8F 细胞的增殖。



**Fig.4 Soft agar colonization assay**

Assays were performed in parallel on all cells under identical culture conditions. (a) photograph of 5-8F; (b) photograph of 5-8F / pcDNA3.1 (+); (c) photograph of 5-8F /NGX6.

**Table 1 Anchorage-independent colony formation by 5-8F cells**

| Cells              | No. of colonies / $10^2$ |
|--------------------|--------------------------|
| 5-8F               | $68 \pm 13$              |
| 5-8F / pcDNA3.1(+) | $59 \pm 8$               |
| 5-8F/NGX6          | $12 \pm 2^*$             |

Triplicate plates were seeded with  $2 \times 10^4$  cells each and colonies were counted 14 days later. Each number represents the average of triplicate determination expressed as  $\bar{x} \pm s$ .  $^*P < 0.05$ .

2.4 NGX6 基因转染对 5-8F 细胞表达谱的影响

用 cDNA 微阵列分析 3 组细胞的基因表达谱：5-8F/pcDNA3.1(+) 及两组 NGX6 高表达的 5-8F 细胞. 两组 NGX6 高表达的 5-8F 细胞的基因表达非常

相似，它们之间的 Pearson 相关系数为 0.936，相关性具有统计学意义. 选用两组阳性细胞来进行实验，是考虑到在进行基因转染实验时会有许多随机事件发生，某些结果可能并不是由基因转染导致，

Table 2 Differentially genes in 5-8F cell after NGX6 transfection

| Gene name                                                                               | Rate+/- | 5-8F/pcDNA3.1(+) | 5-8F/NGX6 + |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------|-------------|
| Up-regulated genes                                                                      |         |                  |             |
| NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3                                         | 2.88    | 55               | 158         |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)                               | 3.71    | 13               | 48          |
| Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate                            | 3.47    | 89               | 309         |
| Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha                                              | 2.92    | 70               | 204         |
| Transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4)                       | 3.06    | 60               | 184         |
| Transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)           | 3.17    | 30               | 95          |
| Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2                                          | 3.89    | 337              | 1 310       |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5                                    | 3.53    | 27               | 95          |
| Desmoglein 1                                                                            | 2.41    | 61               | 147         |
| Interferon, gamma                                                                       | 2.26    | 45               | 102         |
| Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)                        | 3.11    | 641              | 1 993       |
| Keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)                      | 2.39    | 726              | 1 735       |
| Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)                                                | 2.76    | 34               | 94          |
| Down-regulated genes                                                                    |         |                  |             |
| Mitogen-activated protein kinase 12                                                     | 0.34    | 105              | 36          |
| Proliferation-associated 2G4, 38 ku                                                     | 0.30    | 44               | 13          |
| v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog                                      | 0.38    | 397              | 151         |
| TNF receptor-associated factor 3                                                        | 0.29    | 152              | 44          |
| Histone 1, H4b                                                                          | 0.32    | 37               | 12          |
| EphB4                                                                                   | 0.37    | 328              | 121         |
| Chromogranin B (secretogranin 1)                                                        | 0.49    | 137              | 67          |
| G protein-coupled receptor 4                                                            | 0.43    | 438              | 188         |
| TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal) | 0.34    | 72               | 24          |
| B-cell growth factor 1, 12 ku                                                           | 0.28    | 167              | 47          |
| Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein             | 0.35    | 291              | 102         |
| Interleukin 6 (interferon, beta 2)                                                      | 0.33    | 145              | 48          |
| Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)                                            | 0.42    | 341              | 143         |
| Wingless-type MMTV integration site family, member 5A                                   | 0.36    | 87               | 31          |
| Interleukin 10                                                                          | 0.47    | 73               | 34          |
| Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)                                         | 0.31    | 223              | 69          |
| Vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)               | 0.39    | 576              | 225         |
| Fatty acid synthase                                                                     | 0.41    | 335              | 137         |
| Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1                                       | 0.45    | 95               | 43          |
| Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67                                         | 0.30    | 194              | 58          |



而是实验本身某些未知随机事件引起. 两组阳性克隆细胞与 5-8F/pcDNA3.1(+) 相比, 在大多数基因点上同时上调和下调, 但也有某些矛盾结果出现, 因此, 我们只选择那些在两个阳性克隆中同时表达上调和下调的基因进行分析 (图 5), 表 2 列出了微阵列技术鉴定出的 33 个差异表达基因, 其中 13 个是受 NGX6 基因转染影响而表达水平上调, 20 个下调.

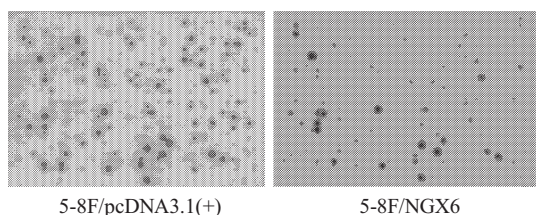


Fig.5 The original cDNA array image of NGX6 transfectant and control cells

## 2.5 蛋白质印迹鉴定 NGX6 基因转染前后的差异表达基因

稳定转染 NGX6 基因的 5-8F 细胞 p19、catenin  $\alpha$ 2、desmoglein 1 的表达较未处理的 5-8F 细胞明显上调; EphB4、TIE2、vitronectin 的表达较未处理的 5-8F 细胞明显下调. pcDNA3.1(+) 空载

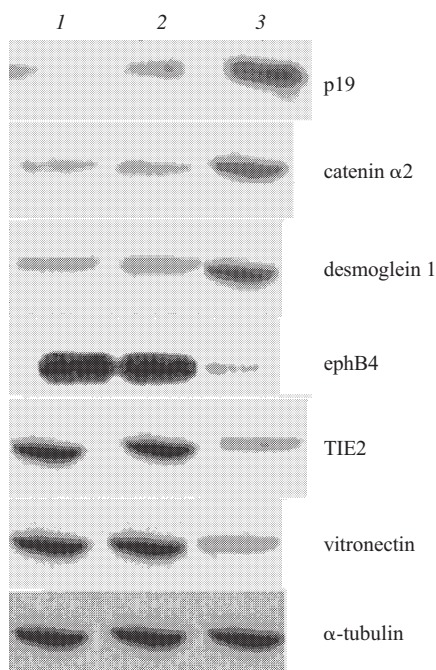


Fig.6 Western blotting analysis of p19, catenin  $\alpha$ 2, desmoglein 1, EphB4, TIE2, vitronectin  $\alpha$ -tubulin is internal control.

1: 5-8F; 2: 5-8F/pcDNA3.1(+); 3: 5-8F/NGX6.

体转染的细胞几种蛋白质表达较未处理的 5-8F 细胞无明显变化(图 6), 这结果与 cDNA 微阵列的结果相符.

## 3 讨 论

转移是恶性肿瘤重要的生物学特性, 是肿瘤患者死亡的主要原因之一, 也是临床防治中的难题, 但由于是涉及多基因参与、多条信号通路联系、多种调节机制的复杂过程, 故其发生机制仍不清楚.

NGX6 作为我室在 9p 高频缺失区新克隆的鼻咽癌相关基因, 它在鼻咽癌细胞系中表达明显下调, 而且发现 NGX6 表达与结肠癌的转移呈负相关<sup>[9]</sup>. 鼻咽癌具有高转移特点, 其早期可能无自觉症状, 而以转移灶出现就诊. 那么 NGX6 是否具有抑制鼻咽癌转移的功能呢? 为进一步寻找 NGX6 基因的功能线索, 我们将 NGX6 转染到表达下调的高转移鼻咽癌细胞株 5-8F 中, 发现重表达 NGX6 的 5-8F 细胞株的细胞生长速率较对照组有明显的减慢, 软琼脂集落形成数较对照组减少, 表明 NGX6 具有抑制鼻咽癌恶性生物学行为的作用. 我们还通过 cDNA 微阵列分析了 NGX6 基因转染对高转移鼻咽癌细胞 5-8F 基因表达谱的影响, 发现一些受 NGX6 影响而发生改变的基因, 表明 NGX6 可能通过影响这些相关基因的表达而改变鼻咽癌恶性生物学行为. 共计有 33 个基因的表达水平受 NGX6 的影响而发生改变, 其中, p19、catenin  $\alpha$ 2、desmoglein 1、vitronectin、TIE2、EphB4 引起了我们的注意.

p19 基因是新近报道的肿瘤抑制基因, 它与肿瘤的发生及细胞的衰老有一定的相关性. p19 是 Ink4 (细胞周期蛋白依赖性激酶 4 抑制因子) 家族成员, 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CDK inhibitor, CKI) 对细胞周期起负调控作用, Ink4 包括 P16<sup>ink4a</sup>、P15<sup>ink4b</sup>、P18<sup>ink4c</sup>、P19<sup>ink4d</sup>, 特异性抑制 cdk4/cyclin D1、cdk6/cyclin D1 复合物. 能与 Cdk4 及 Cdk6 形成双重复合物抑制其激酶活性, 从而抑制 Rb 磷酸化, 不能释放 E2F. p19 基因在转染 NGX6 后表达上调, 提示可能由于 NGX6 上调 p19 基因抑制细胞周期从而抑制鼻咽癌肿瘤细胞生长.

瘤细胞黏附能力改变 (黏附 / 失黏附) 是肿瘤侵袭和转移不同阶段的重要现象. 一些与细胞黏附有关的基因改变如 catenin  $\alpha$ 2、desmoglein 1 在转染 NGX6 后表达上调, vitronectin 表现为下调. catenin  $\alpha$ 2 在 NGX6 转染的刺激下表达上调.

Cadherin/Catenin 复合体对维持上皮细胞的正常形态结构及细胞间的连接发挥着重要作用, 介导细胞间的黏附与通讯, 体内、体外实验已经证实它是一个肿瘤侵袭抑制因子, 在多种肿瘤中它都发挥抑制肿瘤侵袭的作用. 它的功能机制不仅是通过细胞-细胞之间的黏附, 而且还包括将一些与细胞运动相关的信号传递到细胞内的某些分子<sup>[7]</sup>. Desmoglein 1 在 NGX6 转染的刺激下表达上调. 细胞间连接是维持细胞形态和组织结构完整性的关键结构, 粘附连接和桥粒是表皮角质形成细胞的两个最主要细胞间连接, 其中的任何一个有缺陷, 都可能导致表皮结构或生物学特性发生改变<sup>[8,9]</sup>. 桥粒芯糖蛋白 (desmoglein, Dsg) 是桥粒的一种主要跨膜蛋白, 存在三种基因型, Dsg1 的表达下调可能在角质形成细胞的分化及其肿瘤的发生中有一定的作用<sup>[10]</sup>. 人玻璃粘连蛋白 (vitronectin, VN) 表达下调. 玻璃粘连蛋白是细胞表面  $\beta 3$  整合素族的配基之一, 二者的结合能够促进细胞的黏附. 细胞与细胞间基质的附着是细胞生存与增殖所必需的, 这种附着主要由 integrin 家族的粘附分子来介导. 结果提示, NGX6 可能通过影响与细胞黏附相关基因的表达, 在肿瘤的侵袭转移当中发挥一定的抑制性作用.

实体肿瘤的发生、发展、侵袭、转移及复发需要持续的肿瘤新生血管. 迄今许多研究表明, 肿瘤新生血管越多, 肿瘤生长增殖越快, 发生转移的几率就越高. 因此, 实体瘤转移形式亦为血管依赖性<sup>[11]</sup>. Webb<sup>[12]</sup>认为, 所有参与调节肿瘤血管形成的因子均可调控肿瘤的转移. 在转染 NGX6 后, 与血管形成有关的基因 Tie2 和 EphB4 均表现为下调. Tie2 是除血管内皮生长因子 (VEGF) 以外一个新的几乎完全是由血管内皮细胞表达的酪氨酸激酶受体. 有研究发现, 血管生成素 /Tie2 对肿瘤的血管生成发挥重要的调节作用. Tie2 促使肿瘤血管发芽, 促进血管延长和肿瘤血管与供体血管间形成联系, 而阻断 Tie2 效应则明显抑制肿瘤的增长、肿瘤血管形成及肿瘤细胞介质引起的大鼠角膜血管生成. Tie2 在正常乳腺和少数血管良性肿瘤中缺乏表达, 而在乳腺癌中表达显著, 尤其在肿瘤周围的新生血管区、肿瘤和炎性细胞浸润的交界区, Tie2 表达最强烈, 肿瘤 Tie2 阳性血管 / 微血管比率也高于正常组织. 因而有研究认为 Tie2 是肿瘤良恶性的标记, 是肿瘤预后和治疗效果的评价指标. Eph 受体酪氨酸激酶形成了迄今所知的最大的生长因子受体家族, 以同样多种类的 ephrins 作为它们的配基. 研

究表明, 多种 Eph 受体及相应 ephrin 配体参与了胚胎血管发育及其后的血管生成进程, 其中以 EphB4/ ephrin2 在血管生成中的作用尤为引人注目. EphB4 受体及 ephrin2 配体在多种肿瘤组织中呈扩增和(或)过表达, 但它们在肿瘤发生、演进以及肿瘤血管生成中的作用及调控机制目前尚不清楚. NGX6 转染后 Tie2 和 EphB4 表达的下调提示, NGX6 可能通过抑制肿瘤血管的生成在肿瘤侵袭转移当中发挥抑制性作用.

综上所述, NGX6 可以抑制 5-8F 细胞的生长, 转染后能够影响一些与细胞周期、细胞粘附和血管生成等相关基因的表达, 这些结果说明 NGX6 可能通过影响细胞周期, 细胞黏附和血管形成, 而在鼻咽癌的转移中发挥一定的抑制性作用, 其分子机制有待进一步的研究. NGX6 作为我室独立克隆的新基因, 通过对其功能的深入研究, 将为鼻咽癌转移机制的阐明提供重要的线索.

## 参 考 文 献

- Hildesheim A, Levin P. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev*, 1993, **15** (3): 466-485
- 阳剑波, 宾亮华, 李桂源, 等. 精细定位和克隆 9p21-22 区域内鼻咽癌候选抑癌基因. *癌症*, 2000, **19** (1): 6-9  
Yang J B, Bin L H, Li G Y, *et al.* *Chin J Cancer*, 2000, **19** (1): 6-9
- 张晓梅, 王晓艳, 沈守荣, 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, Wang X Y, Shen S R, *et al.* *World J Gastroenterol*, 2002, **10** (8): 873-876
- 宋立兵, 汪慧民, 曾木圣, 等. 鼻咽癌细胞株 SUNE-1 异质性研究. *癌症*, 1998, **17** (5): 324-327  
Song L B, Wang H M, Zeng M S, *et al.* *Chin J Cancer*, 1998, **17** (5): 324-327
- 宋立兵, 鄢 践, 汪慧民, 等. 鼻咽癌细胞亚株不同成瘤与转移潜能的分子机制. *癌症*, 2002, **21** (2): 158-162  
Song L B, Yan J, Wang H M, *et al.* *Chin J Cancer*, 2002, **21** (2): 158-162
- Sambrook J, Russell D W. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002. 549-552  
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Science Press, 2002. 549-552
- Debruyne P, Vermeulen S, Mareel M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999, **62** (4): 393-402
- Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, *et al.* Biological evaluation of undifferentiated carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol*, 2000, **7**: 204-229
- Chow V, Yuen A P, Lam K Y, *et al.* A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha,

- beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, **127**: 59~63
- 10 Harada H, Iwatsuki K, Ohtsuka M, *et al.* Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. *Acta Derm Venereol* (Stockh), 1996, **76**:417~420
- 11 Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis not yet for prescription. *Z Kardiol*, 2000, **89** (3): 239~244
- 12 Webb C P, van de Woude G F. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neuro Oncol*, 2000, **50** (12): 71~87

## Role of NGX6 in Nasopharyngeal Carcinoma With High Ability of Metastasis Cell Line 5-8F\*

WANG Li-Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiu-Hong<sup>1</sup>, MA Jian<sup>1</sup>, PENG Cong<sup>1</sup>, CAO Li<sup>1</sup>,  
TANG Ke<sup>1</sup>, LI Xiao-Ling<sup>1</sup>, LI Gui-Yuan<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, Basical School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)*

**Abstract** NGX6 is a candidate tumor suppressor gene which was isolated by location candidate cloning strategy. In order to explore the effect of NGX6, the mammal expression vector of NGX6/pcDNA3.1(+) was transfected into 5-8F cell (with high ability of metastasis) by liposome. The integration of the exogenous vector DNA and the expression of NGX6 were detected by Northern blot and RT-PCR respectively. The cytobiological characterization of positive clone was analyzed by growth curves of cells and soft agar assay. cDNA array techniques were used to profile the potential targets of NGX6. The results showed that 5-8F cells with overexpression of NGX6 grew slower than that of control, and NGX6 could influence the expression of cell cycle, cell adhesion and angiopoiesis molecules, such as up-regulating p19, catenin  $\alpha$ 2, desmoglein 1, down-regulating EphB4, TIE2, vitronectin. These data revealed that NGX6 might play a role in tumor metastasis in nasopharyngeal carcinoma (NPC).

**Key words** NGX6 gene, nasopharyngeal carcinoma, tumor metastasis, cDNA microarray

---

\*This work was supported by grants from The Special Funds of Major State Basic Research of China(2002BA711A03, 2002BA711A08 ) and The National Natural Sciences Foundation of China (30330560, 30271403, 30200160, 30300064).

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

Received: January 17, 2005 Accepted: February 28, 2005