PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2011, 38(3): 248~253
www.pibb.ac.cn

STGC3 基因缺失突变对 CNE2 细胞生长增殖能力的影响 *

李 丽[1)] 贺修胜[1)**] 罗 桥[1)] 张志伟[1)] 姚旭炯[1)] 陈苏琼[1)]
李春成[1)] 王莉莉[1)] 段 蓉[1)] 陈主初[2)**]
([1)] 南华大学肿瘤研究所，衡阳 421001；[2)] 中南大学肿瘤研究所，长沙 410078)

摘要 为探讨鼻咽癌候选抑癌基因 STGC3 中层粘连蛋白 G 结构域(LG domain)对 CNE2 生长增殖能力的影响，应用基因定点突变技术将该结构域缺失，亚克隆至真核表达载体上，并将野生型及突变型 STGC3 稳定转染人鼻咽癌细胞系 CNE2，检测其对 CNE2 细胞系表型的影响，包括测定稳转细胞系的生长曲线、细胞集落形成能力和细胞周期分布．研究发现，LG domain 的缺失明显降低了 STGC3 的肿瘤抑制活性，使受其稳定转染的细胞系恶性度显著增强，提示该结构域在 STGC3 发挥肿瘤抑制功能中起着重要作用．

关键词 鼻咽癌，STGC3 基因，抑癌基因，层粘连蛋白 G 结构域
学科分类号 R73-3 **DOI**: 10.3724/SP.J.1206.2010.00543

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma，NPC)在中国南方各省及东南亚地区发病率较高，分布具有明显的地域性和种族性，是一个多基因影响的遗传性肿瘤[1-3]．STGC3 基因是从 NPC 高频率杂合性缺失(loss of heterozygosity，LOH)位点 3p21 区域的 ESTs 着手克隆的一个鼻咽癌相关基因(GenBank 登录号为 AY078383)．前期研究结果显示，STGC3 基因有抑制 CNE2 细胞增殖作用，并使其裸鼠成瘤能力降低，因此，该基因可能为鼻咽癌候选抑瘤基因．生物信息学分析显示，STGC3 基因编码的蛋白质 1～42 位氨基酸为一个层粘连蛋白 G 结构域(laminin G domain)[4-8]，含 G 结构域的层粘连蛋白在调节细胞的生长增殖、黏附等方面发挥重要作用[9]．本文研究了 STGC3 上 LG domain 对其自身抑瘤功能的影响，通过构建基因缺失突变重组体、建立稳定转染的细胞系并检测其生长增殖情况，探讨了该结构域对 STGC3 基因肿瘤抑制作用的影响．

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株．含 STGC3 基因编码区的 pcDNA3.1(+)-STGC3 重组质粒由南华大学肿瘤研究所构建．pcDNA3.1(+)质粒和菌株 DH5α 为南华大学肿瘤研究所保存．

1.1.2 细胞．人鼻咽癌细胞系 CNE2 为低分化鳞状细胞癌细胞系，由中国预防医学科学院建系，并由南华大学肿瘤研究所培养提供．以 RPMI 1640(含 10%新生牛血清)培养基，置 37℃ 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养．

1.1.3 主要试剂．Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4DNA 连接酶、AMV 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司；DNA Marker DL2000 为大连宝生物公司产品；胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司；Lipofectamine 2000 脂质体、TRIzol 试剂、G418、RPMI 1640 均购自 Invitrogen 公司；*Bam*HⅠ内切酶、*Hin*dⅢ内切酶为 Promega 公司产品．

* 国家自然科学基金(30470967), 湖南省自然科学基金(09JJ3071)和湖南省教育厅资助科研(08A060)资助项目．
** 通讯联系人．
贺修胜．Tel: 0734-8282207, E-mail: hexiusheng@hotmail.com
陈主初．Tel: 0731-84805447, E-mail: tcbl@xysm.net
收稿日期：2010-10-22，接受日期：2010-12-20

1.1.4 引物．所用引物序列均经 Primer 5.0 设计，由上海生工生物工程有限公司合成(表 1).

Table 1　Primer sequences and product size

Gene	Primer sequence	Product size/bp
STGC3	Sense: CGGGATCCATGGTTCTTGTTTCTTAT	460
	Antisense: GCCCCAAGCTTTTAGAGTAATAAAAGATTT	
β-Actin	Sense: GGACCTGACTGACTACCTC	553
	Antisense: CATACTCCTGCTTGCTGAT	
STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$	Sense:CCCAAGCTTGCCACCATGTCTCACTCTCATTTCCAGAC	321
	Antisense:CGGGATCCTTAGAGTAATAAAAGATTTCTAGAT	

1.2　方法

1.2.1 重组表达质粒的构建．我们先前的研究提示，LG domain 位于 STGC3 所编码蛋白的 1～42 位氨基酸，应用 PCR 定点突变方法将该结构域缺失掉，将突变成功的 STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ 亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+)的 *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ位点之间，构建成重组质粒 pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$. *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ双酶切，以鉴定重组载体是否含有该目的片段，将含有目的片段的阳性克隆质粒送上海生工生物工程有限公司测序.

1.2.2 细胞转染、筛选及鉴定．转染按 lipofectamine2000 试剂说明书进行，将质粒转染 CNE2 细胞，48 h 之后换用含 G418(350 mg/L)的选择性培养基筛选．经 G418 筛选培养 2～3 周后，获得稳定转染细胞系 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 和 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$. Trizol 抽提细胞总 RNA 后做 RT-PCR 鉴定 STGC3 基因的表达.

1.2.3 细胞生长曲线. 将 CNE2、CNE2/pcDNA3.1(+)、CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 和 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ (2×10^3) 4 组细胞接种于 96 孔板内，每组设 6 个平行孔，每隔 24 h 用 MTT 法对细胞数进行检测，每次重复测量 2 次，取平均值代表测量值，共检测 6 天，以测量值为纵坐标，间隔时间为横坐标绘制生长曲线.

1.2.4 细胞集落形成试验．取对数生长期的细胞，制成单细胞悬液，按 200 个 / 孔接种于 24 孔板中，轻轻摇晃培养板，使细胞分布均匀，常规培养 1～2 周，其间不换液，待培养板中出现肉眼可见的克隆时，吸去培养基，用 PBS 洗 2 次，甲醇固定 15 min 后，吉姆萨染色，室温放置 30 min，吸去染色液，用蒸馏水洗涤，将培养皿倒置于吸水纸上吸干水分并拍照．用肉眼直接计数克隆数，或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆.

1.2.5 流式细胞术测定细胞周期分布．分别收集上述 4 组细胞，制成单细胞悬液，PBS 洗 3 次，70% 预冷的乙醇 4℃ 固定，调整细胞浓度至 1×10^6 个 /ml 后待用．加入 PI 染液，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.

1.2.6 统计学分析．应用 SPSS 13.0 统计软件包进行 t 检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2　结　　果

2.1　重组载体双酶切鉴定及测序

重组载体构建示意图如图 1 所示，经 *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ双酶切后可得到约 321 bp 的目的片段(图 2)，测序证明序列正确.

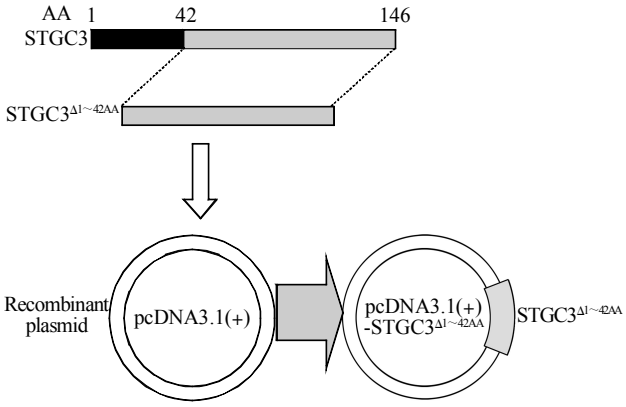

Fig. 1　Construction of the recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$

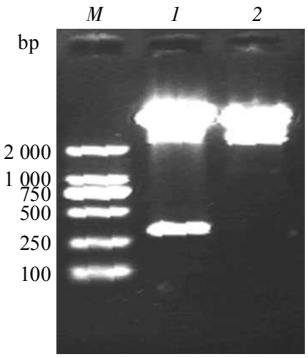

Fig. 2 Identification of recombinant by restrict endonucleases digestion

M: DL2000 marker; *1*: pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ cut with *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ; *2*: pcDNA3.1(+) cut with *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ.

2.2 转染细胞阳性克隆的鉴定

经 G418 筛选培养 2～3 周后，获得稳定转染细胞系，Trizol 抽提细胞总 RNA 后做 RT-PCR，扩增条带大小与预期值相符，如图 3 所示.

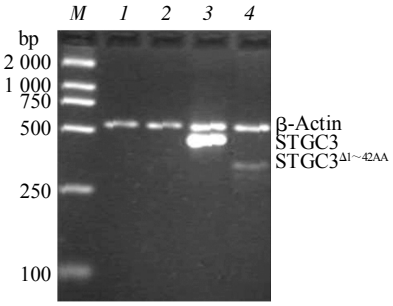

Fig. 3 STGC3 and STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ expression detected by RT-PCR

M: DL2000 marker; *1*: CNE2; *2*: CNE2/pcDNA3.1(+); *3*: CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3; *4*: CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$.

2.3 细胞生长曲线

将上述 4 种细胞以相同的数量接种后，用 MTT 法每天测量，连续检测 6 天，经绘制生长曲线和统计学分析，在细胞培养的前 2 天，各组细胞的增殖差异性并不明显，从第 3 天开始转染 STGC3 基因缺失突变体的细胞 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ 和转染野生型 STGC3 基因的细胞 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 的生长速度相对 CNE2 细胞和转染空载体 pcDNA3.1(+)细胞 CNE2/pcDNA3.1(+)减慢($P<0.05$)，但 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ 的生长速度快于 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 ($P<0.01$)，CNE2 细胞以及 CNE2/pcDNA3.1(+)细胞的生长速度无明显差异性(图 4).

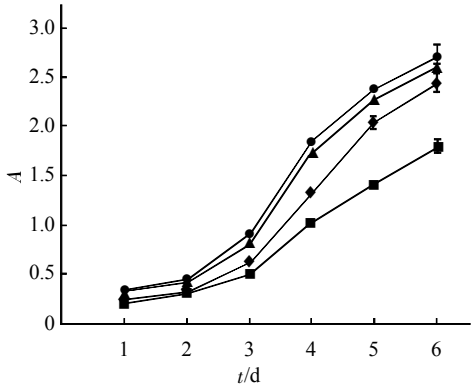

Fig. 4 Growth curves of the 4 cell lines

●—●: CNE2; ▲—▲: CNE2/pcDNA3.1(+); ■—■: CNE2/ pcDNA3.1(+)-STGC3; ◆—◆: CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$.

2.4 细胞集落形成试验

在相同的培养条件下，恶性细胞的集落形成能力可体现细胞恶性度的强弱[10]. CNE2 组、转空载体组、转野生型 STGC3 基因组和转 STGC3 基因缺失突变体组集落形成数分别为 184.0±7.3、177.5±5.9、97.5±10.1、142±9.3. 与两对照组相比，转基因组集落生长速度慢、数目少、体积小，克隆形成能力明显降低，转 STGC3 基因缺失突变体组与转野生型 STGC3 基因组相比，其在相同时间、相同培养条件下形成的细胞集落要大，并且数量也更多些，说明其集落形成能力要比 CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 强，差异均有显著性($P<0.01$, 图 5).

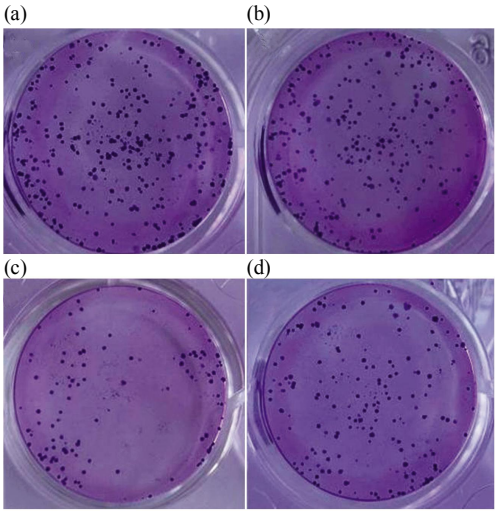

Fig. 5 Colony formation rates of 4 cell lines

(a) CNE2. (b) CNE2/pcDNA3.1(+). (c) CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3. (d) CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$.

2.5 细胞周期分析

采用流式细胞术检测上述 4 组细胞的周期分布情况，用方差分析比较上述 4 组细胞不同周期时相的细胞百分比(图 6，表 2). 结果显示，转野生型 STGC3 基因组与转 STGC3 基因缺失突变体组 G0/G1 期的细胞比例显著高于 CNE2 组和转空载体组($P < 0.01$)，但转 STGC3 基因缺失突变体组 G0/G1 期阻滞作用较转野生型 STGC3 基因组下降($P < 0.01$)，CNE2 组和转空载体组 G0/G1 期无显著差异，说明 STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ 细胞周期阻滞能力较 STGC3 降低.

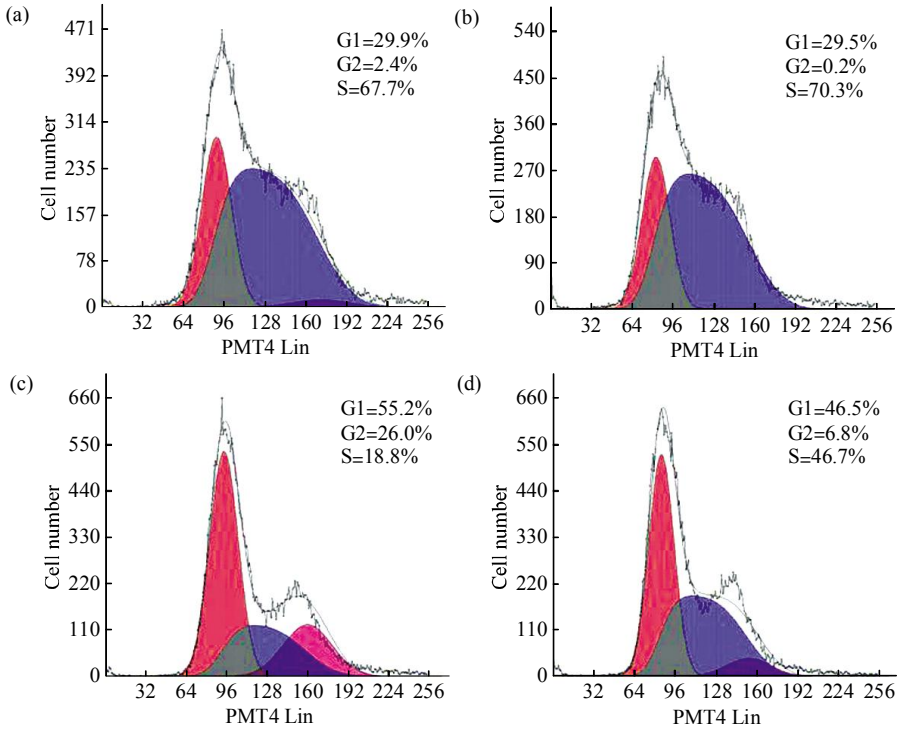

Fig. 6　Cell cycle analysis by flow cytometry

(a) CNE2. (b) CNE2/pcDNA3.1(+). (c) CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3. (d) CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$.

Table 2　The effect of STGC3 and STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ expression on the cell cycle of CNE2 cells

Group	G0/G1	S	G2/M
CNE2	29.0±1.6	67.8±1.07	3.3±0.74
CNE2/pcDNA3.1(+)	30.7±1.5	67.2±2.1	1.7±2.1
CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3	55.3±3.4	29.8±3.4	15±6.6
CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$	41.2±2.4	44.9±1.3	12.0±3.7

[1)] $P < 0.01$, CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 and CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ *vs* CNE2 and CNE2/pcDNA3.1(+). [2)] $P < 0.01$, CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ *vs* CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3. n=4, $\bar{x} \pm s$.

3 讨　　论

LG domain 位于层粘连蛋白链的 C 端，由 180～200 个氨基酸残基组成，通常串联排列，存在于许多细胞外蛋白和受体蛋白中. 层粘连蛋白 LG 组件含有许多作用位点，层粘连蛋白通过这些位点与其受体(如整合素、肝素等)相互作用，从而参与细胞外基质的构建、促进细胞黏附、增殖、分化等重要的生理过程[11-13]. Okazaki 等用重组蛋白和合成肽片段筛选出鼠 LG domain 的 4 个活性位点，并发现 LG 组件具有促进细胞黏附的功能[9]. 进一步的研究表明 LG 组件还与肿瘤细胞的浸润转移密切相关，如 Yokoyama 等[14]在 LG4 组件中发现了一种环状肽，这种肽对肿瘤细胞具有强的黏附性，并含有肝素结合位点. 国内外关于 LG domain 对细胞生长增殖影响深入研究的报道较少.

STGC3 基因是本课题组克隆的一个鼻咽癌相关抑癌基因，定位于染色体 3p21，cDNA 全长为 1 271 bp，开放阅读框为 441 bp，编码一个由 146 个氨基酸组成、分子质量为 16 ku 的蛋白质[4]. 我们的前期研究结果表明，STGC3 基因具有抑制鼻咽癌细胞恶性表型的作用[6-7]. 生物信息学分析显示，STGC3 基因编码的蛋白含有一个层粘连蛋白 G 结构域(laminin G domain)[4]，层粘连蛋白通过其 G 结构域(LG domain)与受体(LGR)结合经 Laminin 信号途径而发挥作用. Okazaki 等首先发现和证实含 G 结构域的层粘连蛋白在调节细胞的生长增殖、黏附等方面发挥重要作用[9]. 为了全面探讨 STGC3-LG domain 可能的功能活性，本实验采用脂质体转染的方式，将野生型和 LG domain 突变型 STGC3 导入 STGC3 表达阴性的人低分化鳞状细胞癌细胞 CNE2，通过筛选获得稳定高表达后，对转染细胞的增殖情况进行了观察，结果显示，STGC3 抑制 CNE2 细胞生长增殖(生长速度较慢，克隆形成能力降低，细胞周期阻滞)的作用在前期工作的基础上得到进一步肯定.

本试验将 STGC3 基因的 LG domain 缺失，观察突变型及野生型 STGC3 对细胞生长增殖的影响，研究发现，转突变型 STGC3 细胞生长速度较转野生型明显加快，集落形成速度快，集落大，克隆形成率增高，降低了该基因肿瘤抑制功能. 细胞集落形成是恶性肿瘤细胞的一个重要生长特性，LG domain 缺失之后减弱了 STGC3 对 CNE2 细胞恶性表型逆转作用，使其在平皿中生长的能力有所增加. 流式细胞仪分析结果表明，缺失 LG domain 可以促进细胞由 G0/G1 期进入 S 期和 G2/M 期，使细胞周期缩短，从而减弱了 STGC3 对 CNE2 细胞的周期阻滞作用. 我们的研究结果说明，该结构域是 STGC3 的肿瘤抑制功能所必需的. 至于 STGC3 基因的 LG domain 抑制 CNE2 细胞生长增殖能力的具体机制，有待于更深入地研究.

参 考 文 献

[1] Cui Y, Wang Y, Liu X, *et al*. Genotypic analysis of epstein-barr virus isolates associated with nasopharyngeal carcinoma in northern China. Intervirology, 2010, **54**(3): 131-138

[2] Chan A T. Nasopharyngeal carcinoma. Ann Oncol, 2010, **21**(7): 308-312

[3] 李桂源, 刘华英, 周 鸣, 等. 鼻咽癌癌变的分子机理. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(10): 922-931
Li G Y, Liu H Y, Zhou M, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(10): 922-931

[4] 贺修胜, 肖志强, 陈主初, 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, Xiao Z Q, Chen Z C, *et al*. Chin J Cancer, 2004, **23**(10): 1110-1115

[5] 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*. Chin J Cancer, 2003, **22**(1): 1-5

[6] 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*. Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(1): 39-44

[7] 邱青朝, 胡 波, 贺修胜, 等. Tet 调控 STGC3 基因表达的 CNE2 细胞系裸鼠成瘤实验性研究. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(4): 359-365
Qiu Q C, Hu B, He X S, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(4): 359-365

[8] He X S, Deng M, Yang S, *et al*. The tumor supressor function of STGC3 and its reduced expression in nasopharyngeal carcinoma. Cell Mol Biol Lett, 2008, **13**(3): 339-352

[9] Okazaki I, Suzuki N, Nishi N, *et al*. Identification of biologically active sequences in the laminin alpha 4 chain G domain. J Biol Chem, 2002, **277**(40): 37070-37078

[10] Dohn M R, Brown M V, Reynolds A B. An essential role for p120-catenin in Src- and Rac1-mediated anchorage-independent cell growth. J Cell Biol, 2009, **184**(3): 437-450

[11] Macdonald P R, Lustig A, Steinmetz M O, *et al*. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. J Struct Biol, 2010, **170**(2): 398-405

[12] Suzuki N, Hozumi K, Urushibata S, *et al*. Identification of α-dystroglycan binding sequences in the laminin α2 chain LG4-5 module. Matrix Biol, 2010, **29**(2): 143-151

[13] Timpl R, Tisi D, Talts J F, *et al*. Structure and function of laminin LG modules. Matrix Biol, 2000, 19(4): 309-317

[14] Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, *et al*. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. Biochemistry, 2004, **43**(42): 13590-13597

Effect of STGC3 Gene Deletion Mutant on The Growth of CNE2 Cells*

LI Li[1)], HE Xiu-Sheng[1)**], LUO Qiao[1)], ZHANG Zhi-Wei[1)], YAO Xu-Jiong[1)], CHEN Su-Qiong[1)], LI Chun-Cheng[1)], WANG Li-Li[1)], DUAN Rong[1)], CHEN Zhu-Chu[2)**]

([1)] *Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang* 421001,China;

[2)] *Cancer Research Institute, Central South University , Changsha* 410078, China)

Abstract To investigate the function of Laminin G domain (LG domain) of STGC3 in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2. Recombinant plasmids pcDNA3.1(+)-STGC3 and pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ were respectively transfected into CNE2 cells by liposome-mediated transfection. Therefore, the CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3 and CNE2/pcDNA3.1(+)-STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ cell lines of stable expression STGC3 were established. Here, it is reported that deletion of LG domain in this STGC3 reduces the tumor suppression activity of it, as demonstrated by drawing growth curve, experimenting plate clone formation as well as detecting cell cycle distribution. The results showed: the ability of STGC3$^{\Delta 1\sim 42AA}$ suppressing CNE2 cell proliferation was obviously decreased to compare with wild type STGC3 (n=4, $P < 0.05$). These results indicate that the LG domain is necessary for the tumor suppression activity of the STGC3.

Key words nasopharyngeal carcinoma, STGC3 gene, tumor suppressor gene, LG domain

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00543

---

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470967), The National Natural Sciences Foundation of Hunan (09JJ3071) and Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department(08A060).

**Corresponding author.

HE Xiu-Sheng. Tel: 86-734-8282207, E-mail: hexiusheng@hotmail.com

CHEN Zhu-Chu. Tel: 86-731-84805447, E-mail: tcbl@xysm.net

Received: October 22, 2010 Accepted: December 20, 2010