

研究报告

UBAP1 基因真核表达载体的构建
及对人鼻咽癌细胞生长的影响*

曾朝阳** 熊 炜** 周艳宏 李小玲
罗晓敏 唐 珂 李伟芳 钱 骏*** 李桂源***
(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为研究鼻咽癌相关新基因 UBAP1 的功能, 探讨其对鼻咽癌细胞生长特性的影响, 构建了 UBAP1 真核表达载体并转染到鼻咽癌细胞株 HNE1 中, 借助细胞生长曲线、软琼脂集落形成试验、裸鼠接种和流式细胞计数方法对转染细胞的生物学行为进行了检测. 结果显示, UBAP1 基因转染细胞生长速度明显减慢, 在软琼脂中集落形成率较对照组显著下降, 裸鼠接种试验显示, UBAP1 基因转染细胞 HNE1 生长速度受到抑制, 流式细胞计数分析发现, UBAP1 基因表达升高能延缓细胞由 G0-G1 期进入 S 期. 因此, UBAP1 基因的表达有助于 HNE1 恶性表型的逆转, 初步证明 UBAP1 是一个鼻咽癌相关的抑瘤基因.

关键词 鼻咽肿瘤, UBAP1 基因, 肿瘤抑制基因, 基因转染, 基因表达

学科分类号 R739.63

鼻咽癌是我国南方常见的恶性肿瘤^[1], 其发生与遗传因素相关^[2-5], 同时还涉及多个基因的表达异常^[6-13]. UBAP1 基因 (GenBank 登录号: AF222043) 是我们实验室在构建了鼻咽癌 9p21~22 的 LOH 精细缺失图谱的基础上^[14,15], 采用定位-候选克隆策略获得的一个鼻咽癌相关新基因^[16], 该基因 3' 非翻译区的一个 SNP 位点与鼻咽癌发病相关^[3], 且在鼻咽癌细胞系 HNE1 和鼻咽癌活检组织中存在明显的表达下调或缺失^[17], 因而很可能是一个鼻咽癌相关抑瘤基因. 本研究通过构建 UBAP1 基因的真核表达重组体, 建立稳定高表达 UBAP1 基因的 HNE1 细胞系, 进一步分析 UBAP1 基因功能及考察其重表达对鼻咽癌的恶性表型的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因、细胞株、表达载体和实验动物. I.M.A.G.E. cDNA 克隆(克隆 ID: 326360) 购自美国 Research Genetics Inc., 包含 2 701 bp 的 UBAP1 基因 cDNA 全长, 其中有一个 1 509 bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF). 表达载体 pcDNA3.1(+) 为 Clontech 公司产品. 鼻咽癌细胞系 HNE1 为本研究所建株^[18], 细胞用含 15% 小牛血清

的 1640 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 条件下培养. 裸鼠由中国科学院动物研究所提供, 在本校实验动物学部无菌饲养.

1.1.2 酶及主要试剂. 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, Taq 酶为华美公司产品, 质粒抽提、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜公司, G418 购自 Sigma 公司, DNA Marker 为大连宝生物公司产品.

1.2 方法

1.2.1 UBAP1 基因真核载体重组体的构建. 根据 UBAP1 基因的酶切图谱和 pcDNA3.1(+) 的多克隆酶切位点, 选用 *Bam*H I 和 *Not* I 作为克隆位点, 从 UBAP1 基因的完整阅读框架序列的两端设计含 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点的引物 (F: 5' ccgcgtggatccttctaataatggcttctaag 3'; R: 5' cgatgcggcgcgcctgtctcagctggctcc 3', 下划线序列为酶切位点),

* 国家自然科学基金资助项目 (30300063, 30300201, 30470955, 30330560), 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0761) 和湖南省科技厅重大专项 (05SK1001-1).

** 并列第一作者. *** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2005-03-22, 接受日期: 2005-06-30

直接从包含 UBAP1 基因 cDNA 全长的 I.M.A.G.E. 克隆扩增含 UBAP1 基因完整阅读框架的序列. 其 PCR 程序为: 95℃ 变性 5 min; 94℃ 50 s, 65℃ 60 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物经试剂盒纯化后用 *Bam*H I 和 *Not* I 酶过量酶切, 低熔点琼脂糖凝胶回收, 再与经 *Bam*H I 和 *Not* 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. 进一步地, 对阳性重组质粒进行测序, 分析 UBAP1 编码的正确性. 阳性重组质粒以 pcDNA3.1(+)/UBAP1 表示.

1.2.2 采用电穿孔法建立 pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染细胞. 转染前 24 h 将细胞 1:3 传代, 待细胞生长至 50%~80% 的汇合度时弃培养基, 以胰酶消化和离心收集细胞, 然后用冷无血清培养基洗细胞两遍, 电击时按每次 5×10^5 细胞和 80 μ g 环状质粒 DNA 混匀, 冰上放置 10 min. 使用 Bio-Rad 电击仪, 以 1 250 V 电压, 25 μ F 电容电击细胞. 电击后, 置培养皿内无血清培养基培养过夜, 次日换完全培养基. 用选择性培养基 (G418 浓度: 前 3 天为 250 mg/L, 以后为 500 mg/L) 培养, 隔天换液, 8~10 天左右出现抗性克隆, 12 天后挑单个克隆扩大培养, 从 24 孔板→6 孔板→25 ml 培养瓶, 建成稳定传代的转染细胞系.

1.2.3 阳性克隆中 UBAP1 基因的表达分析. 按照《分子克隆》实验指南^[9]进行总 RNA 的抽提及质量鉴定, 以 UBAP1 和 GAPDH 基因 cDNA 为探针, 对经 PCR 初步鉴定为阳性的细胞系分别进行斑点印迹分析, 筛选 UBAP1 基因表达增高的阳性克隆.

1.2.4 细胞计数和生长曲线绘制. 将 2×10^4 细胞接种于 24 孔板, 每隔 24 h 消化细胞计数, 重复 3 次, 取均值. 共检测 7 天, 再以细胞数为纵坐标, 间隔时间为横坐标绘出生长曲线, 计算对数生长期细胞的倍增时间.

1.2.5 MTT 法测定细胞增殖状态. 取对数生长期的 pcDNA3.1(+)/UBAP1 阳性细胞系、转 pcDNA3.1(+) 空白质粒的对照 HNE1 细胞及未转染的 HNE1 细胞系, 用含 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化后计数, 使细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 96 孔培养板接种, 各孔细胞数为 1×10^4 个/孔, 贴壁生长后, 加入 5 g/L 的 MTT (3,4,5-dimethylthiazol-2-yl,-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma 公司) 20 μ l 于各孔中, 再培养 4 h 后, 弃培养板中的培养液, 各孔加 100 μ l DMSO, 轻轻振动后, 用酶标仪 (波长

570 nm) 测定各孔的吸光度(A)值, 12 孔为 1 组, 以每组 12 个孔吸光度的平均值作为各组的平均吸光度值, 比较细胞的增殖状态.

1.2.6 软琼脂集落形成试验. 取 50 000 个转染 UBAP1 基因和空载体的 HNE1 细胞及未处理的 HNE1 细胞分别接种于 0.33% 的顶层 Agar 中 (50 mm 的平皿), 底层 Agar 浓度为 0.5%, 连续培养两周, 计算大于 50 个细胞的克隆数, 用随机取样法数出每一平皿 5 个 1 cm^2 内克隆数, 求出其平均克隆数, 乘以平皿底面积, 再除以每个平皿种植的细胞数, 即得出细胞集落形成率. 重复 3 次. 将每种细胞 3 个平皿的细胞集落形成率取均值, 为该种细胞的集落形成率.

克隆形成率(%)= 克隆数 / 接种细胞数 $\times 100\%$

1.2.7 裸鼠接种实验. 分别以 1×10^7 个/只的浓度转染 UBAP1 基因和空载体的 HNE1 细胞以及未处理的 HNE1 细胞, 接种至 5~6 周龄的裸鼠皮下, 注射体积为 0.2 ml, 每组为 3 只. 注射后每 3 天测一次肿瘤体积的大小. 4 周后处死小鼠, 测量肿瘤组织体积, 并用甲醛固定、石蜡包埋制成切片进行病理诊断.

1.2.8 流式细胞仪分析细胞周期的分布. 分别取生长状态良好、汇合至 70%~80% 的转染 UBAP1 基因、转染空白载体的 HNE1 细胞和未转染的 HNE1 细胞各 3 瓶, PBS 洗涤后, 70%乙醇固定. 流式细胞仪 (FACSort, Becton Dickinson) 检测细胞周期分布状况, 每次分析 1.0×10^4 个细胞, 应用 Cell Quest 等软件分析.

2 结 果

2.1 UBAP1 表达载体重组体构建

定向构建 pcDNA3.1(+)/UBAP1 真核表达重组体, 对阳性重组质粒进行测序分析, 图 1 示 UBAP1 编码序列和接头序列完全正确.

2.2 pcDNA3.1 (+) /UBAP1 重组体转染和克隆筛选

由于 UBAP1 基因在鼻咽癌细胞系 HNE1 中表达下调, 因此我们把含 UBAP1 的表达载体导入 HNE1 细胞中, 建立和鉴定有 UBAP1 基因表达上调的能稳定传代的转染细胞系, 以研究增加 UBAP1 基因的表达对鼻咽癌细胞恶性表型逆转的作用.

我们以 pcDNA3.1(+) 空表达载体为处理对照, 与构建好的 pcDNA3.1(+)/UBAP1 表达重组体分别导入 HNE1 细胞中, G418 筛选后, 约两周后可见

典型的抗性克隆. 挑选 5 个 pcDNA3.1(+)质粒和 6 个 pcDNA3.1(+)/UBAP1 质粒转染后 HNE1 抗性克隆, 扩大培养后, 用 PCR 鉴定转染克隆的阳性率. 采用我们设计的两对引物, 一对来源于载体序列, 产物大小为 239 bp; 一对的上游引物来源于载体序列, 下游引物则来源于目的基因, 产物大小为 401 bp. 结果显示 6 个抗性克隆 pcDNA3.1 (+) /UBAP1/HNE1 及 5 个抗性克隆 pcDNA3.1 (+) /HNE1 均为阳性(结果未显示).

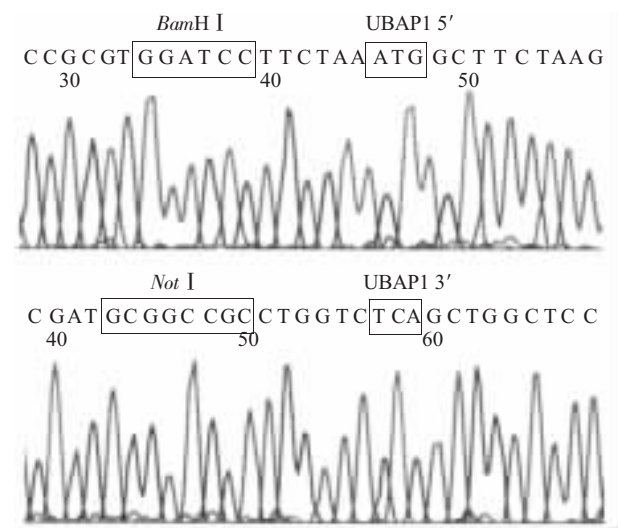


Fig.1 Partial sequence of pcDNA3.1 (+) /UBAP1 expression vector
BamH I , *Not* I digestion site and start/stop codon of UBAP1 ORF are shown in bold frame.

2.3 UBAP1 基因在 HNE1 中的重表达

为了确定上述转染细胞系中 UBAP1 基因的表达情况, 利用 RNA 斑点印迹的方法对部分转染细胞系中 UBAP1 的表达情况进行检测. 结果显示, 与鼻咽癌细胞系 HNE1 相比, 4 个转染细胞系有 3 个细胞系的 UBAP1 mRNA 表达明显升高, 其中 2 号细胞系表达丰度最高, 而 pcDNA3.1(+)/HNE1 细胞系中 UBAP1 基因的表达无明显变化(图 2). 这说明转入的 UBAP1 基因增加了 HNE1 中 UBAP1 mRNA 的表达, 空载体转染对靶细胞 HNE1 的 UBAP1 表达无明显影响.

2.4 pcDNA3.1 (+) /UBAP1 重组体转染对细胞增殖速度的影响

2.4.1 生长曲线. 对转染 UBAP1 基因的 HNE1 细胞株、空载体转染和未经转染的 HNE1 细胞分别描绘生长曲线, 用方差分析比较每组细胞每天的细胞计数均值, 与 pcDNA3.1(+)转染的 HNE1 和未转染

的 HNE1 细胞相比, pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染的 HNE1 细胞的生长速度明显减慢(图 3), UBAP1 基因对 HNE1 细胞生长的这种影响在第 6、7 天最明显($P < 0.05$). pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染组、空载体转染组和未经转染的 HNE1 组的倍增时间 (population double time, PDT)分别是 53.0 h、24.1 h 和 23.9 h. 光镜下观察细胞形态无明显变化.

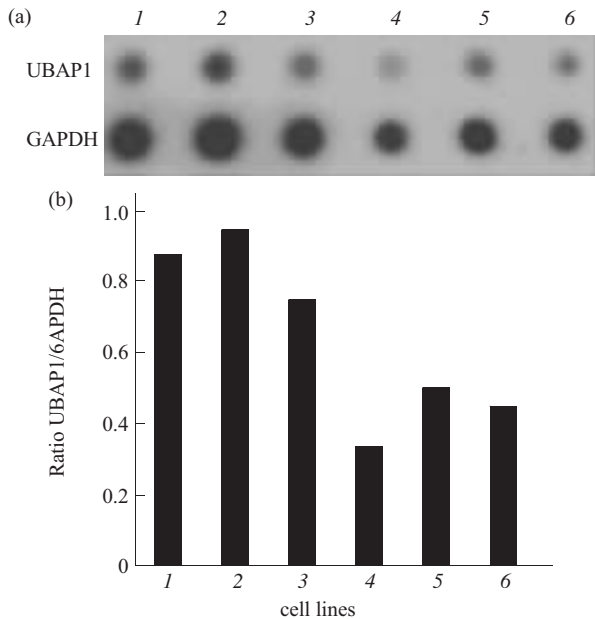


Fig.2 UBAP1 expression analysis
(a) RNA dot blot analysis. (b) Densitometric analysis of the ratio of intensity of UBAP1/GAPDH. 1~4: HNE1/pcDNA3.1/UBAP1; 5: pcDNA3.1/HNE1; 6: HNE1 cell lines.

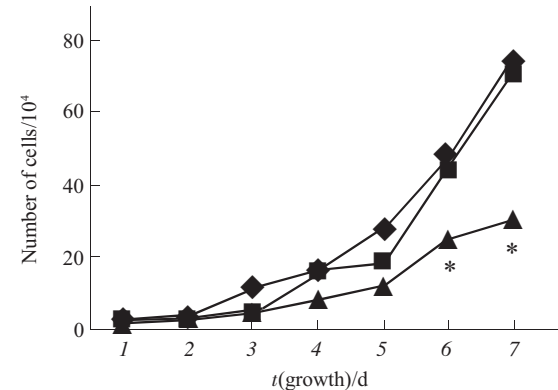


Fig.3 Growth curve of pcDNA3.1 (+) /UBAP1/HNE1 (▲—▲), pcDNA3.1 (+) /HNE1 (■—■), and HNE1 cells (◆—◆)

* $P < 0.05$, compared with pcDNA3.1(+)/HNE1 and HNE1 cells.

2.4.2 MTT 法. MTT 法是确定细胞增殖状态的有效方法, 我们除了利用生长曲线来考察 UBAP1 重表达对 HNE1 细胞生长的影响, 进一步地, 我们还采

用了 MTT 法确定 UBAP1 表达的增加对 HNE1 细胞增殖状态的影响. MTT 法其主要原理是活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶能代谢四甲基偶氮盐, 形成蓝色甲肼, 其形成的量与活细胞数和细胞增殖状态呈正相关. 但是 MTT 法存在灵敏性较差、重复性不佳的缺陷, 因此, 我们采用增多平行孔的方法来稳定 MTT 法. 结果如图 4 所示, 与未转染的 HNE1 和转染了空质粒的 HNE1 细胞相比, pcDNA3.1(+)

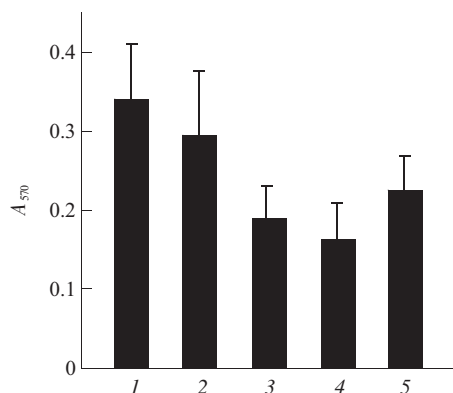


Fig.4 The stable expression of UBAP1 in HNE1 results in the cell proliferation arrest by MTT assay

1: HNE1; 2: HNE1 vector; 3: HNE1-UBAP1 clone#1; 4: HNE1-UBAP1 clone#2; 5: HNE1-UBAP1 clone#3.

/UBAP1 的 HNE1 细胞组 A 值明显减少, 尤其是 #2 阳性克隆. 表明 UBAP1 的重表达的确可以延缓细胞增殖.

2.5 软琼脂集落形成

50 000 个细胞中, pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染组、空载体转染组和未经转染的 HNE1 组其克隆形成率分别为 10.21%、31.48%和 33.2%. 从图 5 中也可以看出转染 UBAP1 基因的 HNE1 细胞克隆形成能力明显下降. 转染 UBAP1 基因后的 HNE1 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 HNE1 组明显降低 ($P < 0.05$).

2.6 致瘤性 (tumorigenicity)

接种空载体转染 HNE1 细胞和未经转染的 HNE1 裸鼠组在接种后平均 5 天后就可以长出明显的包块, 而 pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染组长出肿瘤的时间显著延长, 平均约 2 周左右. 同时瘤体肿瘤生长缓慢, 6 周时肿瘤体积明显小于其他两组细胞 (图 6), 说明 UBAP1 的重表达可以明显抑制 HNE1 细胞在裸鼠中的移植瘤生长能力. 但是 3 种肿瘤的病理切片均为低分化鳞癌, 没有明显的差别 (结果未显示).



Fig.5 Colony forming of HNE1 cells (a), HNE1 cells transfected by pcDNA3.1 (+) vector (b) and transfected by pcDNA3.1 (+) /UBAP1 (c)

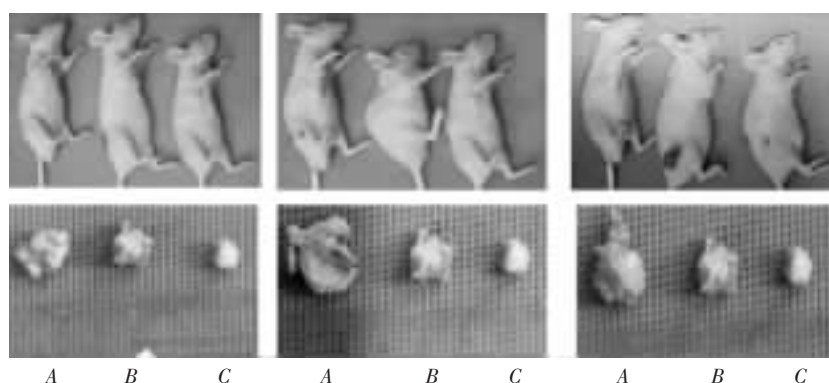


Fig.6 Effect of UBAP1 gene reexpression in HNE1 cells on tumor induction in nude mice

A: HNE1; B: pcDNA3.1(+)/HNE1; C: pcDNA3.1(+)/UBAP1/HNE1.

2.7 流式细胞术分析

为探讨 UBAP1 基因影响 HNE1 细胞生长速度的机制,用流式细胞仪检测了上述 3 组细胞的细胞周期分布状况,用方差分析比较 3 组细胞的凋亡百分率和不同周期时相的细胞百分比.结果表明:在转染了 UBAP1 基因的 HNE1 细胞中,细胞凋亡率无明显增高(图 7),而 pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染的 HNE1 细胞 DNA 合成前期 G1 和静止期 G0 的细胞

百分比空载体转染的细胞和未处理的 HNE1 明显增多,而 pcDNA3.1(+)/UBAP1 转染的 HNE1 细胞 DNA 合成期、DNA 合成后期 G2 及分裂期 M 的细胞百分比空载体转染细胞和未处理的 HNE1 明显减少(表 1).以上结果表明,UBAP1 基因可能通过参与细胞周期调控,通过抑制细胞进入 S 期而延缓 HNE1 细胞增殖.

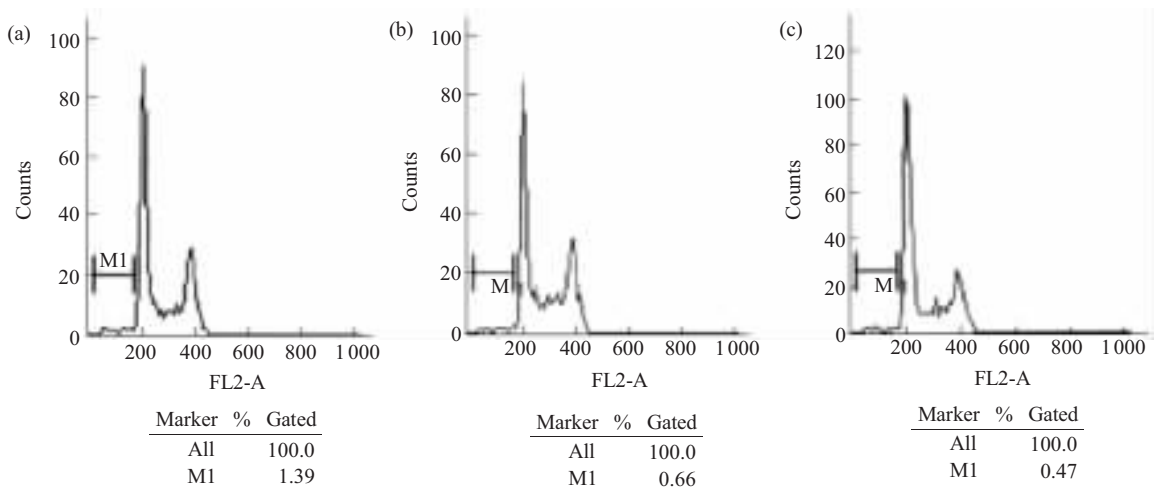


Fig.7 Apoptosis of UBAP1 transfected HNE1 (a) , HNE1/pcDNA3.1 (b) and HNE1 (c) cells detected by FCM

Table 1 Results of cell cycle analysis for UBAP1 transfected HNE1 cells and control cells by FCM

Group	G0/G1 /%	S /%	G2M /%
HNE1	39.96	36.96	23.09
pcDNA3.1(+)/vector	38.49	40.31	21.20
pcDNA3.1(+)/UBAP1	56.47*	26.16*	17.36

*P<0.05, compared with the control groups.

3 讨 论

UBAP1定位于染色体 9p21~22^[20],该区域的 LOH 已在多种肿瘤中有发现,我们的研究也表明,UBAP1 基因不仅在鼻咽癌中存在明显的表达下调,而且在脑瘤、乳腺癌和结直肠癌等多种肿瘤中存在显著的表达下调^[21,22].为了考察 UBAP1 基因是否具有抑制肿瘤细胞生长的功能,我们将 UBAP1 基因编码区 cDNA 重组插入带有强启动子和 G418 筛选的表达质粒 pcDNA3.1(+)中,阳性重组体通过电穿孔法导入鼻咽癌细胞系 HNE1,建立稳定表达的细胞系.通过 RNA 印迹并结合 GAPDH 作内对照分

析,结果显示,转染了 UBAP1 基因的 HNE1 细胞系,其表达较对照组显著增强,说明转染的 UBAP1 基因在 HNE1 细胞中能被有效地转录.细胞生长曲线和克隆集落形成实验显示:转染 UBAP1 基因后的 HNE1 细胞生长速度减慢,集落形成率降低,表明 UBAP1 基因具有延缓 HNE1 细胞增殖的作用.流式细胞术分析表明,UBAP1 的高表达可以延缓 G0-G1 期细胞进入 S 期和 G2-M 期,使细胞周期延长,但是没有诱导细胞发生明显的凋亡,推测 UBAP1 基因可能通过干预细胞周期而抑制 HNE1 细胞的增殖.我们最近利用 cDNA 微阵列技术检测转染 UBAP1 基因前后 HNE1 细胞基因表达谱的变化,也确实发现了几个细胞周期相关基因的表达改变^[23].

近代细胞生物学研究表明,体细胞在生殖分化和凋亡的生命过程中受到正负二类调控信号的精确控制.正信号促使细胞进入增殖周期,阻止其发生分化.而负信号则抑制细胞进入 S 期,促进其成熟分化.如调控失常,体细胞可能不发生分化而不断增殖.肿瘤的形成即源于细胞增殖和分化调控失常,

持续增殖, 不能及时分化和凋亡. 癌基因的调控属于正调节信号范围, 而对细胞增殖产生负调节作用的抑癌基因成为当前肿瘤研究的热点^[24]. 抑癌基因的确定应符合以下条件: a. 在恶性肿瘤的相应正常组织中这种基因必须正常表达; b. 在该恶性肿瘤中这种基因有功能失活或结构改变, 包括点突变, DNA 片段或全基因的缺失, 或表达缺陷; c. 将这种基因的野生型导入缺失这种基因的恶性肿瘤细胞内, 可部分或全部改变其恶性表型^[25].

一般认为, 肿瘤抑制基因(tumor-suppressor gene, TSG)可分为两类^[26]: I 类肿瘤抑制基因(class I), 即由于基因本身的突变、重排和 DNA 缺失而引起的功能失活的经典肿瘤抑制基因, 例如 p53、RB、DCC 等; II 类肿瘤抑制基因(class II), 即由于表达调节障碍(mRNA 水平)而引起功能丧失的抑癌基因, 即与正常组织相对而言, 在肿瘤组织低表达或不表达, 而且转基因实验能降低肿瘤的致瘤性或抑制转移能力的基因属于 II 类肿瘤抑制基因^[27]. 我们从差异表达入手所获得的 UBAP1 基因在 71% 的散发性鼻咽癌活检组织表达下调 / 缺失^[16], 转基因实验表明, UBAP1 基因能明显抑制 HNE1 的生长和降低其裸鼠致瘤性, 但我们的突变检测结果未能在鼻咽癌活检标本中发现该基因的突变(结果未报道). 因此, 我们认为 UBAP1 基因可能是鼻咽癌相关的 II 类肿瘤抑制基因.

生物信息学分析发现 UBAP1 基因包含 2 个进化上高度保守的 UBA 结构域, 属于泛素相关蛋白家族的新成员, 可能通过泛素途径参与了蛋白质的选择性降解(泛素 - 蛋白酶体选择性蛋白质需能降解机制的研究获 2004 年度诺贝尔化学奖^[28]), 近年研究发现, 泛素途径不仅参与了真核细胞内许多重要的生理生化过程, 它与人类许多疾病的发生发展也关系密切. 尤其是在肿瘤的发生发展中, 随着越来越多的泛素样物质及泛素相关基因的克隆和功能研究, 也显示了该途径在细胞恶性转化和癌变过程中有着不可忽视的作用^[29]. 最新的研究则表明, 泛素系统可以通过调节 cyclins、细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs) 的降解参与了对细胞周期演进的精确控制^[30], G1 和 S 期的许多重要调节因子都是泛素系统的靶底物. 在 G1 期和 S 期的关键蛋白的降解是 DNA 复制和细胞动态平衡保持的关键调节. 细胞必须通过分裂周期素的降解才能退出分裂期, 说明了水解对于控制 CDK 活性和驱动周期演进的重要性. 越来越多的研究表

明, 细胞复制不再只是一个简单的激酶级联反应, 相反, 磷酸化和水解是导致细胞分化的不可或缺的过程^[30]. 我们的研究也表明, UBAP1 的高表达可以延缓 G0/G1 期细胞进入 S 期和 G2/M 期, 使细胞周期延长. 推测 UBAP1 基因可能是通过干预细胞周期抑制 HNE1 细胞的增殖. 因此, 在研究 UBAP1 基因表达缺失的具体机制时, 除了需要研究其在基因水平的表达调控机制外, 更需要在蛋白质水平研究其与肿瘤发生发展的关系. 而明确 UBAP1 在泛素系统中地位和作用, 将有助于我们深入细致地了解 UBAP1 在参与细胞分化增殖方面的具体机制, 比如它是如何通过干预细胞周期演进, 进而对 HNE1 细胞的增殖产生抑制作用等关键问题.

参考文献

- 1 Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p31 linked to family nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Research*, 2004, **64** (6): 1972~1974
- 2 熊 炜, 曾朝阳, 肖炳葵, 等. 一个新硝基还原酶基因 NOR1 编码区单核苷酸多态及与鼻咽癌的关联分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 401~405
Xiong W, Zeng Z Y, Xiao B Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (3): 401~405
- 3 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 泛肽相关蛋白基因 UBAP1 单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 766~770
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 766~770
- 4 熊 炜, 曾朝阳, 李小玲, 等. NGX6 基因单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关性. *生物化学与生物物理学报*. 2002, **34** (4): 512~515
Xiong W, Zeng Z Y, Li X L, *et al.* *Acta Biochem Biophys*, 2002, **34** (4): 512~515
- 5 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 高频等位基因不平衡位点 D6S1581 与鼻咽癌的遗传易感性研究. *中华医学遗传学杂志*, 2003, **20** (4): 311~314
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* *Chin J Med Genetics*, 2003, **20** (4): 311~314
- 6 谭 琛, 李 江, 王洁如, 等. NAG7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 372~377
Tan C, Li J, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 372~377
- 7 向娟娟, 余 鹰, 王洁如, 等. 一个有假基因特点的鼻咽癌相关基因的分离和克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (1): 51~55
Xiang J J, Yu Y, Wang J R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (1): 51~55
- 8 彭 聪, 谭 琛, 张秋红, 等. 新基因 BRD7 对鼻咽癌蛋白质表达谱影响的初步研究. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (5): 721~725
Peng C, Tan C, Zhang Q H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**

- (5): 721~725
- 9 张必成, 周 鸣, 周后德, 等. 鼻咽癌差异表达基因 PROL4 特性分析. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (2): 262~265
Zhang B C, Zhou M, Zhou H D, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (2): 262~265
- 10 谭 琛, 李 江, 彭 聪, 等. cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因对鼻咽癌细胞基因表达谱的影响. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (1): 99~106
Tan C, Li J, Peng C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (1): 99~106
- 11 聂新民, 张必成, 向娟娟, 等. 鼻咽癌候选抑癌基因 BRD7 原核表达载体的构建及其表达. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (4): 631~634
Nie X M., Zhang B C, Xiang J J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (4): 631~634
- 12 湛凤凰, 江 宁, 曹 利, 等. 应用代表性差异分析法筛选人鼻咽癌候选抑癌基因. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26** (2): 165~169
Zhan F H, Jiang N, Cao L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 1999, **26** (2): 165~169
- 13 余 鹰, 谢 奕, 曹 利, 等. 一个新鼻咽癌抑癌候选基因的克隆及其功能初步分析. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (3): 319~324
Yu Y, Xie Y, Cao L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (3): 319~324
- 14 阳剑波, 唐湘娜, 邓龙文, 等. 鼻咽癌染色体 9p21~22 区域精细缺失图谱的构建. 中华肿瘤杂志, 1999, **21** (6): 419~421
Yang J B, Tang X N, Deng L W, *et al.* Chin J Oncol, 1999, **21** (6): 419~421
- 15 阳剑波, 宾亮华, 李忠花, 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 Z H, *et al.* Chin J Cancer, 2000, **19** (1): 6~9
- 16 Qian J, Yang J, Zhang X, *et al.* Isolation and characterization of a novel cDNA, UBAP1, derived from the tumor suppressor locus in human chromosome 9p21~22. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, **127** (10): 613~618
- 17 钱 骏, 王洁如, 向 秋, 等. 一个定位于染色体 9p21~22 的新基因 UBAP1 的克隆及在鼻咽癌中的表达分析. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17** (3): 299~305
Qian J, Wang J R, Xiang Q, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2001, **17** (3): 299~305
- 18 祝和成, 姚开泰, 李桂源, 等. 4 株鼻咽癌上皮细胞株的建立及其生物学特性. 湖南医科大学学报, 1992, **17** (2): 103~107
Zhu H C, Yao K T, Li G Y, *et al.* Bullet Hunan Med Univ, 1992, **17** (2): 103~107
- 19 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996. 345~355
Sambook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* Molecular Cloning. 2nd. Beijing: Science Press, 1996. 345~355
- 20 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 染色体 9p21~22 区域两个新的 SNPs 位点在湖南汉族人群中的多态分布. 中华医学遗传学杂志, 2003, **20** (3): 203~206
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* Chin J Med Genetics, 2003, **20** (3): 203~206
- 21 钱 骏, 张晓梅, 李小玲, 等. 应用 EST 策略鉴定人类新基因 UBAP1 的数字化差异表达图谱. 癌症, 2002, **21** (3): 1~5
Qian J, Zhang X M, Li X L, *et al.* Chin J Cancer, 2002, **21** (3): 1~5
- 22 钱 骏, 董 利, 张必成, 等. 表达序列标签数据库搜索鉴定小鼠 UBAP1 基因及其数字化表达分析. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (2): 323~327
Qian J, Dong L, Zhang B C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (2): 323~327
- 23 周艳宏, 曾朝阳, 熊 炜, 等. 鼻咽癌组织的显微切割及其 RNA 线性扩增. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32** (5): 463~467
Zhou Y H, Zeng Z Y, Xiong W, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32** (5): 463~467.
- 24 Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature, 2001, **411** (6835): 342~348
- 25 Macleod K. Tumor suppressor genes. Curr Opin Genet Dev, 2000, **10** (1): 81~93
- 26 Lee S W, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, **88** (7): 2825~2829
- 27 Hopkins P C, Whisstock J. Function of maspin. Science, 1994, **265** (5180): 1893~1894
- 28 郝春明, 赫荣乔. 蛋白质的选择性降解机制——2004 年诺贝尔化学奖部分工作介绍. 生物化学与生物物理学进展, 2004, **31** (11): 975~978
He C M, Hao R Q. Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (11): 975~978
- 29 Spataro V, Norbury C, Harris A L. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. Br J Cancer, 1998, **77** (3): 448~455
- 30 King R W, Deshaies R J, Peters J M, *et al.* How proteolysis drives the cell cycle. Science, 1996, **274** (5293): 1652~1659

Effect of UBAP1 Gene Transfection on The Growth of Nasopharyngeal Carcinoma Cells*

ZENG Zhao-Yang**, XIONG Wei**, ZHOU Yan-Hong, LI Xiao-Ling,
LUO Xiao-Min, TANG Ke, LI Wei-Fang, Qian Jun***, LI Gui-Yuan***
(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to study the effect of UBAP1 gene on UBAP1 down-regulated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE1, the pcDNA3.1 (+)/UBAP1 mammalian expression recombination was constructed and transfected into HNE1 cells. G418 was used to obtain the neomycin-resistant transformants of which indicated the vector was present in the HNE1 cells. The expression of UBAP1 gene was detected by RT-PCR and dot blot. The cytobiologic characterizations of the transfected HNE1 cells were probed by population double time (PDT), xenograft of nude mice and cell cycle analysis. The results showed that the PDT of HNE1 cells with expression of UBAP1 was longer than that of vector transfected HNE1 cells and untransfected HNE1 cells, and the most UBAP1 transfected cells went into phase G0-G1 compared with the two other cells. It also presented inhibiting the tumor formation in nude mice. Thus, these data suggested that UBAP1 gene plays an important role in the cell growth of HNE1, and might be a good candidate for tumor suppressor gene correlated with NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma, UBAP1 gene, tumor-suppressor gene, gene expression

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300063, 30300201, 30470955, 30330560), The Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0761) and The Special Foundation of Science & Technology Department of Hunan Province (05SK1001-1).

**These authors contributed equally in this work.

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

Received: March 22, 2005 Accepted: June 30, 2005