

# Tet调控 STGC3 基因表达 CNE2 细胞系的建立及其功能初步研究\*

邓敏 贺修胜\*\* 罗桥 赵帅 曾超 李艳兰

(南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

**摘要** 利用 Tet-on 调控系统, 建立受强力霉素诱导 STGC3 基因表达的 CNE2 细胞系, 为进一步研究 STGC3 的功能提供了一个理想的实验平台. 先后将调控质粒 pTet-on 和反应质粒 pTRE-STGC3 转入 CNE2 细胞, 并用 G418 和潮霉素分别进行两轮筛选, 运用 RT-PCR 选择对强力霉素诱导敏感的细胞克隆. 用不同浓度强力霉素诱导 CNE2/Tet/pTRE-STGC3 细胞, RT-PCR 检测 STGC3 的表达, 确定强力霉素的最佳诱导浓度. 采用此浓度的强力霉素分别诱导 CNE2、CNE2/Tet/pTRE、CNE2/Tet/pTRE-STGC3 三组细胞, 测定细胞的生长曲线、克隆形成率和细胞周期分布. 诱导 STGC3 基因高表达, CNE2 细胞增殖速度显著减慢 ( $P < 0.05$ ), 克隆形成能力显著降低 ( $P < 0.01$ ); 流式细胞仪检测结果显示, 瘤细胞群体中处于 G0/G1 期细胞数增加, 细胞阻滞于 G0/G1 期. Tet 调控 STGC3 基因表达 CNE2 细胞系的成功建立, 为进一步研究 STGC3 基因的功能提供一个理想的细胞模型.

**关键词** 鼻咽癌, STGC3 基因, Tet-on 基因表达系统

**学科分类号** R73-3

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 在中国南方各省及东南亚地区发病率较高, 属常见上皮源性恶性肿瘤之一, 其发生具有明显地域性和家庭聚集现象. 目前研究表明, NPC 的发生与 EBV 感染、饮食、地理及遗传等多种因素有关, 是遗传和环境等诸多因素相互协同作用所致<sup>[1~3]</sup>. 现代分子肿瘤学研究证实, NPC 在多条染色体存在高频率杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 位点: 3p14~25、11q、13q 等<sup>[6~10]</sup>, 尤其是 3p21~26 区域杂合性丢失高达 66.70%, 提示这些区域可能存在某种或某些未知的与 NPC 发生发展密切相关的抑瘤基因. 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). 前期初步研究结果显示, 该基因可能为一个鼻咽癌候选抑瘤基因<sup>[11,12]</sup>. 为了阐明 STGC3 基因功能, 本研究运用 Tet-on 基因表达系统, 建立受强力霉素调控 STGC3 基因表达的鼻咽癌细胞系 CNE2, 为进一步研究 STGC3 基因的功能提供一个理想的细胞模型.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌株.** 含 STGC3 基因编码区的 pcDNA3.1 (+)-STGC3 重组质粒由本室构建. pTet-on 和 pTRE 质粒由中南大学肿瘤研究所贺智敏博士惠赠. 菌株 JM109 为本室保存.

**1.1.2 细胞.** 鼻咽癌细胞系 CNE2 为低分化鼻咽鳞状细胞癌细胞系, 由中国预防医学科学院建系, 并由本室培养提供. 以 RPMI 1640 (含 10% 新生牛血清) 培养基, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱培养.

**1.1.3 主要试剂.** TRIzol 试剂、T4DNA 连接酶、AMV 逆转录试剂盒购自 Promega 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

\*国家自然科学基金(30470967)、湖南省自然科学基金(03Jjy3029)、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: 2005-06-28, 接受日期: 2005-07-31

质体、G418、RPIM1640 均购自 Invitrogen 公司；强力霉素(doxycycline, Dox)、潮霉素(hygromycin)为 Roche 公司产品；*Bam*H I 内切酶、*Hind* III 内切酶、 $\lambda$ DNA/*Hind* III marker、胰酶为华美生物工程

公司产品；TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司。

**1.1.4** 引物. 所用引物序列均经 Primer5.0 设计, 由大连宝生物公司合成 (表 1).

**Table 1 Primer sequences and product size**

Gene	Primer sequence	Product size
STGC3	sense 5' CGGGATCCATGGTTCTTGTTCCTTAT 3' antisense 5' GCCCCAAGCTTTAGAGTAATAAAAAGATTTC 3'	460 bp
$\beta$ -actin	sense 5' GGACCTGACTGACTACCTC 3' antisense 5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3'	553 bp
GAPDH	sense 5' GGACCTGACTGACTACCTC 3' antisense 5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3'	393 bp
Neo <sup>r</sup>	sense 5' ACCGTGGAGAAGAGCTACGA 3' antisense 5' GTACTTGCCTCAGAAGGAG 3'	593 bp
rtTA	sense 5' TGGGAGTTTGTGTTTGGCAC antisense 5' ATGGCTAAGGCGTCGAG	380 bp

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组质粒的构建.

a. 感受态的制备及质粒的转化. 细菌 JM109 感受态的制备及质粒抽提、转化参照分子克隆实验指南进行<sup>[13]</sup>.

b. pTRE-STGC3 重组质粒的构建 设计 5' 端和 3' 端带 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶位点的引物, 以 pcDNA3.1(+)-STGC3 重组质粒 DNA 为模板, PCR 扩增 STGC3 基因阅读框序列. PCR 产物及 pTRE 质粒均经双酶切、酶切产物胶回收. 然后用 T4DNA 连接酶, 15°C 连接 16 h, 并转化入感受态大肠杆菌 JM109. *Bam*H I /*Hind* III 双酶切, 以鉴定载体是否含有目的片段. 将含有目的片段的阳性克隆质粒送上海生工生物工程公司测序.

**1.2.2** 细胞转染、筛选及鉴定. 按 lipofectamine 2000 试剂说明书进行转染, 先进行第一轮转染, 将 pTet-on 质粒转染 CNE2 细胞, 用 400 mg/L G418 筛选 2 周后, 挑取细胞克隆, RT-PCR 分别检测 Neo<sup>r</sup> 和 rtTA 的表达, 选取 CNE2/Tet 细胞进行下一轮转染.

按上述方法将重组质粒 pTRE-STGC3 和空白 pTRE 载体分别导入 CNE2/Tet 细胞, 用 200 mg/L 潮霉素筛选两周, 挑取阳性克隆, 加入 0 mg/L 和 1 mg/L Dox 诱导 48 h 后, RT-PCR 鉴定 STGC3 基因的表达, 然后分别以 0 mg/L、0.001 mg/L、

0.01 mg/L、0.1 mg/L、1 mg/L、3 mg/L、6 mg/L 的 Dox 诱导 48 h 后, RT-PCR 确定 Dox 最佳诱导浓度.

**1.2.3** 生长曲线的测定. 将 CNE2、CNE2/Tet/pTRE、CNE2/Tet /pTRE-STGC3 三组细胞均加 3 mg/L 的 Dox 诱导, 进行细胞增殖情况计数. 按  $1 \times 10^4$  个 / 孔接种于 24 孔板内, 每隔 24 h, 每组细胞取 3 孔进行细胞计数. 共检测 7 天, 以细胞数为纵坐标, 间隔时间为横坐标绘制生长曲线.

**1.2.4** 软琼脂集落形成实验. 在 6 孔板上, 铺底层和上层琼脂, 将上述三组细胞每组接种 3 孔, 每孔 500 个细胞, 均加 3 mg/L 的 Dox 诱导, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱培养 10~14 天, 计数细胞集落, 并计算克隆形成率.

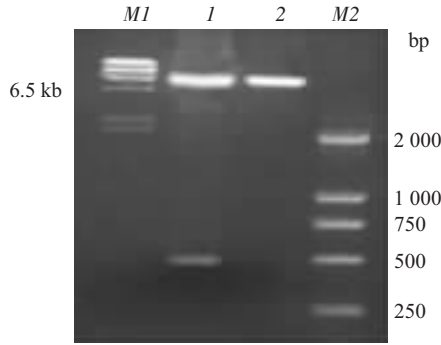
**1.2.5** 流式细胞术测定细胞周期分布. 分别收集上述三组细胞, 并用 75% 酒精固定. 调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个 / ml 后待用. 加入 PI 染液, 流式细胞仪测定细胞的荧光强度, 数据经计算机软件分析, 得出细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例 (实验重复 3 次).

## 2 结 果

### 2.1 重组载体双酶切鉴定及测序

重组载体经 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切后可得到约 441 bp 的目的片段 (图 1), 经测序发现与 GenBank

报道序列完全一致。

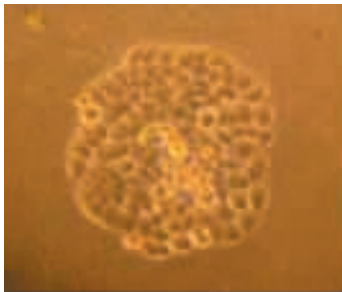


**Fig. 1 Identification of recombinant by restrict endonucleases digestion**

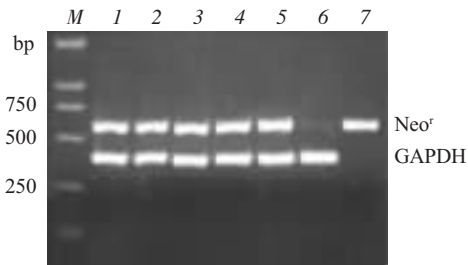
M1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; M2: DL2000 marker; 1: pTRE-STGC3 cut with *Bam*H I /*Hind* III; 2: pTRE cut with *Bam*H I /*Hind* III.

**2.2 CNE2/Tet-on 阳性克隆的鉴定**

挑取阳性克隆(图 2), RT-PCR 检测 *Neo<sup>r</sup>* 和

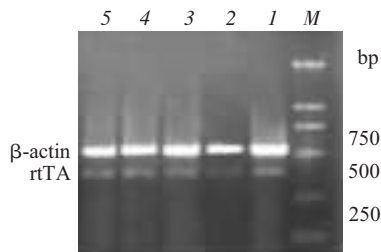


**Fig. 2 CNE2/Tet-on positive cell clone**



**Fig. 3 *Neo<sup>r</sup>* expression detected by RT-PCR**

M: DL2000 marker; 1~5: No. 1~5 cell clones, respectively; 6: CNE2; 7: pTet-on.



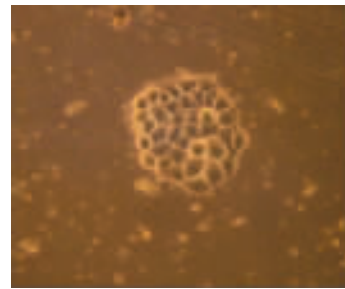
**Fig. 4 *rtTA* expression detected by RT-PCR**

M: DL2000 marker; 1~5: No. 1~5 cell clones, respectively.

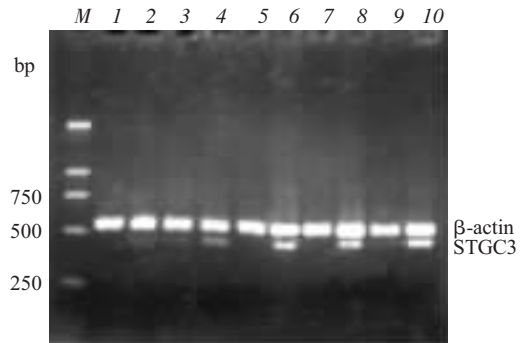
*rtTA* 的表达, 结果显示挑取的细胞克隆中 *Neo<sup>r</sup>* 基因 *rtTA* 均有不同程度的表达(图 3 和图 4). 其中 CNE2/Tet-on-1 细胞克隆表达较高, 因此我们选择其进行后续实验。

**2.3 CNE2/Tet /pTRE-STGC3 阳性克隆的鉴定**

挑取的细胞克隆(图 5)经 Dox 诱导后, RT-PCR 结果显示所有细胞克隆均有不同程度的 STGC3 表达. 其中 4 号克隆在加入 Dox 诱导时有较高的表达, 而不加入 Dox 时无表达(图 6), 我们选择 CNE2/Tet/TRE-STGC3-4 做后续实验. 以不同浓度 Dox 诱导后, STGC3 基因的表达呈现出明显的浓度依赖性, 加入 3 mg/L Dox 时表达最高(图 7). 因此 Dox 的最佳诱导浓度为 3 mg/L.

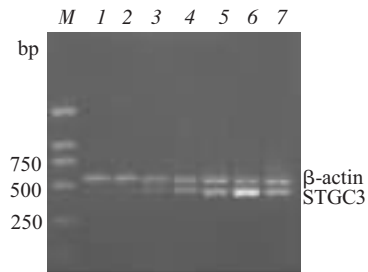


**Fig. 5 CNE2/Tet /pTRE-STGC3 positive cell clone**



**Fig. 6 STGC3 expression detected by RT-PCR**

M: DL2000 marker; 1:CNE2; 2: CNE2/Tet/ pTRE; 3,5,7,9: No. 1,2,3,4 CNE2/Tet /pTRE-STGC3 clones without Dox treatment; 4,6,8,10 : No. 1,2,3,4 CNE2/Tet /pTRE-STGC3 clones with Dox treatment.

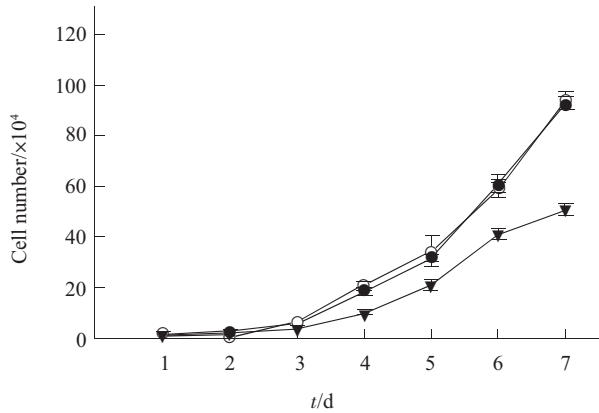


**Fig. 7 STGC3 expression of CNE2/Tet/pTRE-STGC3 with different concentration of Dox induction**

M: DL2000 marker; 1: 0 mg/L; 2: 0.001 mg/L; 3: 0.01 mg/L; 4: 0.1 mg/L; 5: 1 mg/L; 6: 3 mg/L; 7: 6 mg/L.

### 2.4 生长曲线

以相同细胞数量接种后, 连续 7 天每隔 24 h



**Fig. 8 Effect of STGC3 expression on CNE2 cells proliferation**  
 ●—●: CNE2; ○—○: Vector; ▼—▼: STGC3.

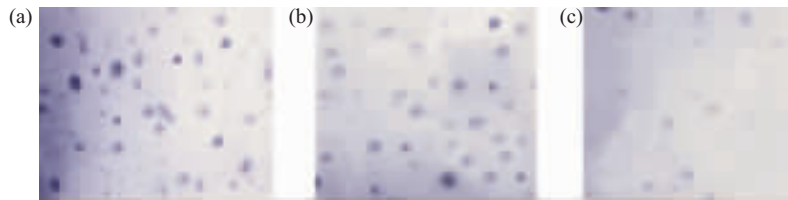
计数, 经绘制生长曲线和统计学分析, 转基因组 (高表达 STGC3) 较 CNE2 组和转载体组生长速度减慢, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 8)。

### 2.5 软琼脂集落形成实验

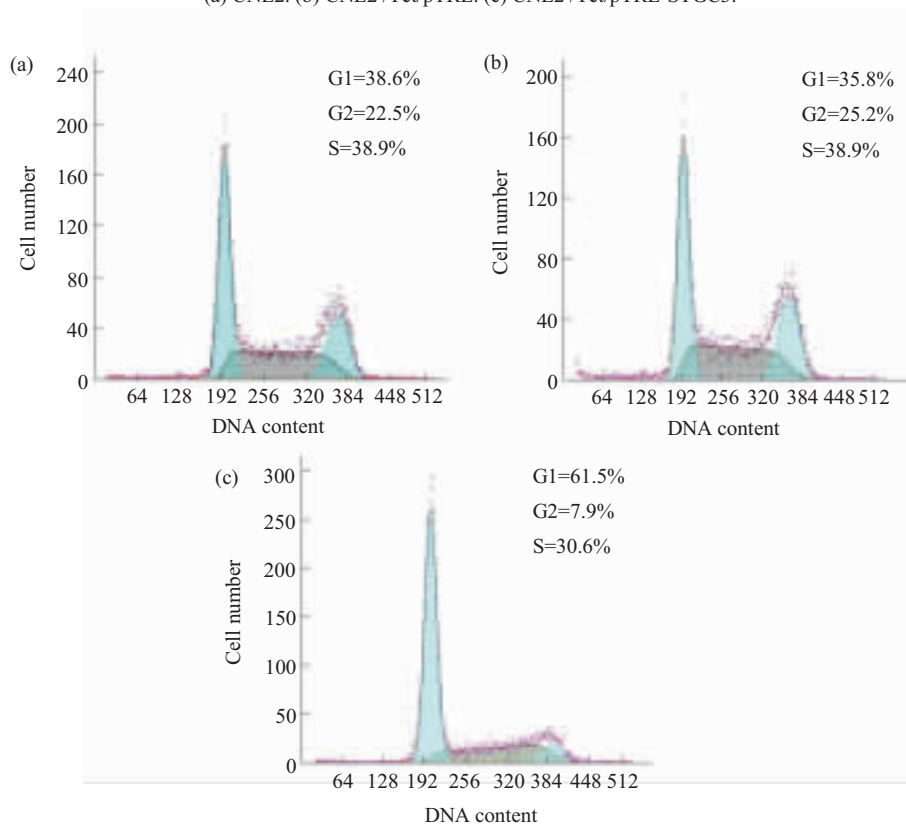
结果显示 CNE2 组、空载体组、转 STGC3 基因组克隆形成率分别为  $(36 \pm 2.5)\%$ 、 $(34 \pm 3.1)\%$ 、 $(10 \pm 2.7)\%$ , 转 STGC3 基因组克隆形成能力较两对照组显著降低, 差异均有显著性 ( $P < 0.01$ , 图 9)。

### 2.6 细胞周期分析

采用流式细胞术检测上述三组细胞的周期变化情况 (图 10, 表 2), 结果显示 CNE2/Tet /pTRE-STGC3 组与两对照组相比, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例明显升高, S 期细胞比例下降, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 说明 STGC3 表达能使 CNE2 细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。



**Fig. 9 Colony forming of CNE2 cells in soft agar**  
 (a) CNE2. (b) CNE2 /Tet/pTRE. (c) CNE2 /Tet/pTRE-STGC3.



**Fig. 10 Cell cycle analysis by flow cytometry**  
 (a) CNE2. (b) CNE2/Tet/pTRE. (c) CNE2/Tet/pTRE-STGC3.

**Table 2 Effect of STGC3 expression on the cell cycle of CNE2**

Group	G0/G1	S	G2/M
CNE2	38.4±1.5	35.8±2.1	23.9±2.5
CNE2/pTRE/Tet	36.7±0.9	38.2±1.2	25.4±2.3
CNE2/Tet/pTRE-STGC3	62.5±2.7	29.9±1.6	7.3±0.8

$n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , % . CNE2/Tet/pTRE-STGC3 vs CNE2,  $P < 0.05$ ; CNE2/Tet/pTRE-STGC3 vs CNE2/Tet/pTRE,  $P < 0.05$ .

### 3 讨 论

STGC3基因是本实验室所克隆的一个鼻咽癌相关新基因, 定位于3p21, 全长cDNA为1271 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<sup>[1]</sup>. 前期实验研究结果表明, STGC3在人多种正常组织均有表达, 而在原发性鼻咽癌、鼻咽癌细胞系及其他8种肿瘤细胞系中表达下调, 提示该基因的表达下调, 可能与多种肿瘤发生发展相关; 该基因编码蛋白质定位于胞核与胞浆, 提示STGC3可能与细胞分裂增殖及基因转录有关<sup>[11,12]</sup>. 为进一步研究STGC3的功能, 本研究采用四环素(tetracycline, Tet)基因表达系统, 构建了具有调控STGC3基因表达的CNE2细胞系.

四环素调控的基因表达系统是由Gossen等首先构建<sup>[14,15]</sup>. Tet-on系统由pTet-on和pTRE两种质粒组成, 其中pTet-on是系统的调控成分, 其CMV启动子调控反义四环素转录激活子(rtTA)的表达. pTRE是含TRE的载体质粒, 下游存在多克隆位点, 可通过重组技术插入外源基因. 在四环素及其衍生物存在的条件下, rtTA结合四环素反应元件(tetracycline response element, TRE)被激活转录, 从而表达目的基因. 与目前所用的其他真核基因表达系统比较, 该系统具有严密性、特异性、高效性等优点, 被认为是目前最理想的真核基因表达调控系统模型. 为了防止构成表达带来的误差与干扰, 本研究选用STGC3表达缺失的人低分化鼻咽鳞状细胞癌细胞系CNE2<sup>[10]</sup>, 为外源表达STGC3细胞系. 本实验室前期已成功地建立了高表达STGC3基因的细胞系, 即pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2细胞系, 但不能对STGC3基因表达进行有效的调控. 本研究率先构建了以Dox诱导的Tet调控的STGC3表达细胞模型即CNE2/Tet/pTRE-STGC3, 为进一步研究STGC3基因的功能提供一个理想的模型. 该细胞模型具有低背景、高诱导表达的特性, 随着Dox

诱导浓度的升高, STGC3表达量相应升高, 呈现明显量-效关系. 当加入3 mg/L Dox诱导时, STGC3表达量最高, 表明Dox的最佳诱导浓度为3 mg/L. 本研究结果证实, 使用3 mg/L Dox诱导pcDNA3.1(+)/STGC3/CNE2细胞STGC3高表达后, CNE2细胞生长速度明显减慢, 克隆形成能力降低, 提示STGC3可能具有抑制肿瘤细胞生长增殖的作用. 分析可能的原因主要有: 促进细胞凋亡; 使细胞进入G0/G1期, 细胞分裂增殖减少; 诱导细胞死亡. 本实验采用流式细胞仪检测STGC3基因高表达对CNE2细胞周期的影响, 结果显示STGC3基因高表达, CNE2细胞群体中G0/G1期细胞比例明显升高, S期细胞比例明显下降, 肿瘤细胞被阻滞在G0/G1期, 因而推测STGC3抑制鼻咽癌细胞CNE2增殖, 可能与转基因CNE2细胞周期阻滞有关. 但是有关STGC3抑制CNE2细胞增殖的确切分子机制仍不清楚, 有待进一步研究.

### 参 考 文 献

- Zheng X, Christensson B, Drettner B. Studies on etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol*, 1993, **113** (3): 455~457
- 熊 炜, 曾朝阳, 沈守荣, 等. 鼻咽癌高频等位基因不平衡位点D6S1581与鼻咽癌的传易感性研究. *中华医学遗传学杂志*, 2003, **20** (4): 311~314  
Xiong W, Zeng Z Y, Shen S R, *et al.* Chinese Journal of Medical Genetics, 2003, **20** (4): 311~314
- Ward M H, Pan W H, Cheng Y J, *et al.* Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Int J Cancer*, 2000, **86** (5): 603~609
- Krishna S M, James S, Kattoor J, *et al.* Serum EBV DNA as a biomarker in primary nasopharyngeal carcinoma of Indian origin. *Jpn J Clin Oncol*, 2004, **34** (6): 307~311
- Yang X R, Diehl S, Pfeiffer R, *et al.* Evaluation of risk factors for nasopharyngeal carcinoma in high-risk nasopharyngeal carcinoma families in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, **14** (4): 900~905
- Shao J Y, Wang H Y, Huang X M, *et al.* Genome-wide allelotyping analysis of sporadic primary nasopharyngeal carcinoma from Southern China. *Int J Oncol*, 2000, **17**:1267~1275
- Deng L, Jing N, Tan G, *et al.* A common region of allelic loss on chromosome region 3p25.3~26.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, **23** (1): 21~22
- Shao J, Li Y, Wu Q, Liang X, *et al.* High frequency loss of heterozygosity on the long arms of chromosomes 13 and 14 in nasopharyngeal carcinoma in Southern China. *Chin Med J (Engl)*, 2002, **115** (4): 571~575
- Hui A B, Lo K W, Leung S F, *et al.* Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 11 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*

- Res, 2001, **23** (2): 132~134
- 10 Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al.* A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to family nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2004, **64** (6): 1972~1974
- 11 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, Zhen Z C, Tian F, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2003, **22** (1): 1~5
- 12 贺修胜, 陈主初, 朱建华, 等. 染色体 3p21 区鼻咽癌相关新基因的克隆及功能步分析. *癌症*, 2004, **23** (10): 1110~1115  
He X S, Zhen Z C, Zhu J H, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2004, **23** (10): 1110~1115
- 13 Sambrook J, Russell D W. 黄培堂, 等译著. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002.8  
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 2002.8
- 14 Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (12): 5547~5551
- 15 Gossen M, Freundlieb S, Bender G, *et al.* Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, **268** (5218): 1766~1769

## Tet Regulating Expression System Establishment and Functional Analysis of Novel Gene STGC3 in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line CNE2\*

DENG Min, HE Xiu-Sheng\*\*, LUO Qiao, ZHAO Shuai, ZENG Chao, LI Yan-Lan

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

**Abstract** In an attempt to establish the functional expression of STGC3 with doxycycline (Dox) induced Tet-on regulating system in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2, an ideal experimental platform was provided for further studies of STGC3. pTet-on regulating plasmid was transfected into CNE2, and stable expression of Tet-on was established in CNE2 through G418 select. Then the response plasmid of recombinant pTRE-STGC3 was steadily transfected into positive CNE2/Tet-on cells with hygromycin screen. Dox was used to induce the expression of STGC3 and a cell clone sensitive to Dox was selected. The best-induced concentration was determined with different concentration of Dox induction. Growth curves, clone formation rate and cell cycle distribution were detected after STGC3 gene up-regulated expression with Dox induction. The growth capacity and clone formation potential of CNE2/Tet /pTRE-STGC3 was significantly suppressed, compared with the controls ( $P < 0.05$ ). FCM analysis indicated that G0/G1 phase cell rate of CNE2/Tet /pTRE-STGC3 was markedly higher than that of the controls and CNE2/Tet/pTRE-STGC3 cells were arrested in G0/G1 phase of cell cycle. Functional expression of STGC3 under Dox induced Tet-on regulation system was successfully established in CNE2, which provided an ideal experimental platform for further functional study of STGC3.

**Key words** nasopharyngeal carcinoma, STGC3 gene, Tet-on gene expression system

\*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: June 28, 2005 Accepted: July 31, 2005