

# 鼻咽癌相关新基因 NPCEDRG 表达 对 CNE2 细胞生长的影响\*

阳 帅<sup>1, 2)</sup> 胡 华<sup>3)</sup> 邓 敏<sup>1)</sup> 董娟慧<sup>1)</sup> 王 妍<sup>1)</sup> 罗 桥<sup>1)</sup> 贺修胜<sup>1)\*\*</sup> 陈主初<sup>4)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> 南华大学肿瘤细胞与分子病理重点实验室, 衡阳 421001; <sup>2)</sup> 南华大学附属第一医院病理科, 衡阳 421001;

<sup>3)</sup> 南华大学附属第二医院病理科, 衡阳 421001; <sup>4)</sup> 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 NPCEDRG 的功能, 探讨其对鼻咽癌细胞生长特性的影响, 利用 Tet-on 调控系统, 建立受强力霉素(deoxycycline, Dox)诱导 NPCEDRG 基因表达的 CNE2 细胞系. 运用 RT-PCR 选择背景表达低、诱导活性高的细胞克隆, 以不同浓度 Dox 诱导 CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 细胞, 确定 Dox 的最佳诱导浓度. 借助形态学观察、细胞生长曲线、软琼脂克隆形成试验和流式细胞仪分析等方法, 对 Dox 诱导 NPCEDRG 高表达后 CNE2 细胞的生物学行为进行了检测. 结果显示, NPCEDRG 高表达后 CNE2 细胞增殖速度显著减慢( $P < 0.05$ ), 克隆形成能力显著降低( $P < 0.01$ ), 瘤细胞群体中处于 G0/G1 期细胞数增加, S 期细胞数减少, 细胞阻滞于 G0/G1 期. Tet 调控 NPCEDRG 基因表达 CNE2 细胞系成功建立, 恢复 NPCEDRG 表达能部分逆转 CNE2 的恶性表型, 证明 NPCEDRG 是一个鼻咽癌相关的抑癌基因.

**关键词** 鼻咽癌, NPCEDRG 基因, 抑癌基因, Tet 系统, 基因表达

**学科分类号** R73-3

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00492

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的分布具有明显的种族性和地区性<sup>[1]</sup>, 全球范围以黄种人发病率最高, 尤其是在中国南方和国外中国南方移民及后裔中发病率极高, 提示 NPC 是一个多基因影响的遗传性肿瘤<sup>[2]</sup>. 鼻咽癌表达下调基因(NPCEDRG 基因, GenBank 登陆号为 AF538150)是新近克隆的一个鼻咽癌相关新基因, 定位于 3p21.3, 该点存在于湖南家族性鼻咽癌的遗传易感区 3p21.31~21.2 区域内<sup>[3]</sup>. 前期初步研究显示, NPCEDRG 基因在正常人多种组织中表达, 而在原发性鼻咽癌、鼻咽癌细胞系及多种肿瘤细胞系中表达下调或无表达, 基因转染实验显示, 该基因有抑制肿瘤细胞增殖的作用, 因此, 该基因可能为一个鼻咽癌候选抑癌基因. Tet 系统由于能人为地模拟生理或病理状态调控目的基因的表达, 并具有严密性、特异性、高效性等优点, 被广泛用于基因功能研究<sup>[4-9]</sup>. 本研究在前期研究的基础上, 运用 Tet-on 基因表达系统, 建立强力霉素调控 NPCEDRG 基因表达的鼻咽癌 CNE2 细胞系, 进一步分析 NPCEDRG 基因的功能并观察其重表达对鼻咽癌细

胞恶性表型的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒.** pRevTet-On 和 pRevTRE 质粒由中南大学肿瘤研究所贺智敏博士惠赠, 含 NPCEDRG 基因编码区的 pRevTRE-NPCEDRG 重组质粒由南华大学肿瘤细胞与分子病理重点实验室构建<sup>[10]</sup>.

**1.1.2 细胞.** 人鼻咽癌 CNE2 细胞系为低分化鳞状细胞癌细胞系, 由中国预防医学科学院建系, 生长培养基为含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养. 细胞呈上皮样, 贴壁生长.

**1.1.3 主要试剂.** Taq DNA 聚合酶、dNTPs(上海

\* 国家自然科学基金(30470967), 湖南省自然科学基金(03Jjy3029)和中国博士后科学基金(2004035652)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

贺修胜. Tel: 0734-8281510, E-mail: hexiusheng118@yahoo.com.cn

陈主初. Tel: 0731-4805447, E-mail: tcbl@xysm.net

收稿日期: 2009-08-15, 接受日期: 2010-01-05

生工生物技术公司); 质粒小量抽提试剂盒(TaKaRa 公司); TRIzol 试剂、AMV 逆转录试剂盒(Promega 公司); Lipofectamine 2000 脂质体、G418(Invitrogen

公司); 强力霉素、潮霉素(Roche 公司).

**1.1.4** 引物. 应用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 由大连宝生物公司合成.

**Table 1 Primer sequences and product size**

Gene	Primer sequence	Product size/bp
NPCEDRG	Forward: 5' CCGGATCCATGTCCCGCTTTT 3'	529
	Reverse: 5' CGGCCAAGCTTTTACCTAGGGTGAG 3'	
GAPDH	Forward: 5' GGACCTGACTGACTACCTC 3'	393
	Reverse: 5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3'	
$\beta$ -Actin	Forward: 5' GGACCTGACTGACTACCTC 3'	553
	Reverse: 5' CATACTCCTGCTTGCTGAT 3'	
Neo <sup>r</sup>	Forward: 5' AGACAATCGGCTGCTCTGAT 3'	593
	Reverse: 5' AGCCAACGCTATGTCCTGAT 3'	
rtTA	Forward: 5' CGCTAAAGAAGAAAGGAAACA 3'	288
	Reverse: 5' GCGGGGAGAAAGGACAGG 3'	

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞转染及筛选.

采用 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂进行转染, 具体操作按试剂说明书进行. 先进行第一轮转染, 将 pTet-on 质粒转染 CNE2 细胞. 转染 48 h 后加 300 mg/L G418 筛选, 1 周后有限稀释法挑取细胞克隆, RT-PCR 分别检测 Neo<sup>r</sup> 和 rtTA 的表达, 选取高表达 rtTA 的 CNE2/Tet 细胞进行下一轮转染.

按上述方法将重组质粒 pRevTRE-NPCEDRG 和空 pTRE 载体分别导入 CNE2/Tet 细胞, 用 200 mg/L 潮霉素筛选, 有限稀释法挑取阳性克隆. 加入 0  $\mu$ g/L 和 1 000  $\mu$ g/L Dox 诱导 48 h 后, RT-PCR 鉴定 NPCEDRG 基因的表达, 选取对 Dox 敏感的细胞克隆. 分别以 0  $\mu$ g/L、1  $\mu$ g/L、10  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L、500  $\mu$ g/L、1 000  $\mu$ g/L、3 000  $\mu$ g/L、5 000  $\mu$ g/L、10 000  $\mu$ g/L 的 Dox 诱导 48 h 后, RT-PCR 法检测 NPCEDRG mRNA 表达, 选择诱导活性最高的浓度作为最佳 Dox 诱导浓度.

**1.2.2** RT-PCR 鉴定克隆. 按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA, 利用 AMV 逆转录试剂盒生成全长第一链 cDNA, 步骤为: 取 2  $\mu$ g 总 RNA 短暂离心, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 短暂摇匀, 放置冰上 5 min; 再加入 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10 $\times$ RT 缓冲液 2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 混合液 2  $\mu$ l, RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ l, AMV 逆转录酶 15U, Oligo(dT)15 引物 1  $\mu$ l, 用去 RNA 酶水补至 20  $\mu$ l, 混匀后置 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;

升温至 95 $^{\circ}$ C, 5 min 后, 再 4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; -20 $^{\circ}$ C 冻存. 以此 cDNA 为模板, 特异 PCR 引物扩增目的片段.

**1.2.3** HE 染色细胞形态学观察. CNE2、CNE2/Tet/TRE、CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 三组细胞, 分别按  $4 \times 10^5$  个 / 孔细胞密度接种于置有盖玻片的 6 孔板中, 均加 3 000  $\mu$ g/L Dox 诱导 48 h 后, 取出有细胞贴壁生长的盖玻片, PBS 洗 2 遍. 用 95% 乙醇固定 30 min, PBS 洗 2 遍, 常规 HE 染色, 于显微镜下观察细胞形态学的改变.

**1.2.4** 细胞生长曲线测定. CNE2、CNE2/Tet/TRE、CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 三组细胞, 按  $8 \times 10^3$  个 / 孔接种于 24 孔板内, 细胞贴壁后加 3 000  $\mu$ g/L Dox 持续诱导, 进行细胞增殖情况计数. 每隔 24 h, 每组细胞取 3 孔进行细胞计数, 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制生长曲线.

### 1.2.5 软琼脂集落形成试验.

在 6 孔板上, 铺 0.6% 底层琼脂和 0.3% 顶层琼脂, 取对数生长期的上述三组细胞, 每组接种 3 孔, 每孔 1 000 个细胞, 琼脂表面加入少量 RPMI 1640 培养液, 保持湿度. 琼脂及表面液体培养基中均含 3 000  $\mu$ g/L 的 Dox, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱培养 10 天, 计数所有细胞集落, 并计算克隆形成率.

克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数  $\times$  100%.

**1.2.6** 流式细胞仪检测细胞周期分布. 分别收集上述三组细胞, 调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/ml, 75% 乙醇固定过夜. 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).

**1.2.7** 统计学方法. 本研究的所有结果均采用 SPSS13.0 软件分析包进行统计学分析, 所有试验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  的形式表达. 三组细胞之间的生长曲线细胞计数, 软琼脂集落形成率及细胞周期分布等各项指标的差异性比较, 均采用单因素方差分析.  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 稳定表达 rtTA 的 CNE2/Tet 细胞系的建立

转染并 G418 筛选 2 周后, 有限稀释法挑选数

个单细胞克隆(图 1), 扩大培养, RT-PCR 检测各细胞克隆 Neor<sup>r</sup> 及 rtTA mRNA 表达. 结果显示, 各细胞克隆均在不同水平表达 Neor<sup>r</sup> 及 rtTA. 其中 CNE2/Tet-2 细胞克隆 rtTA 表达较高(图 2), 因此我们选择其进行后续实验并命名为 CNE2/Tet 细胞.

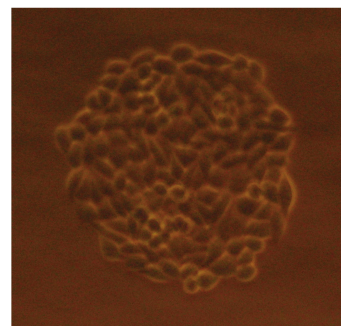


Fig. 1 CNE2/Tet cell monoclone ( $\times 100$ )

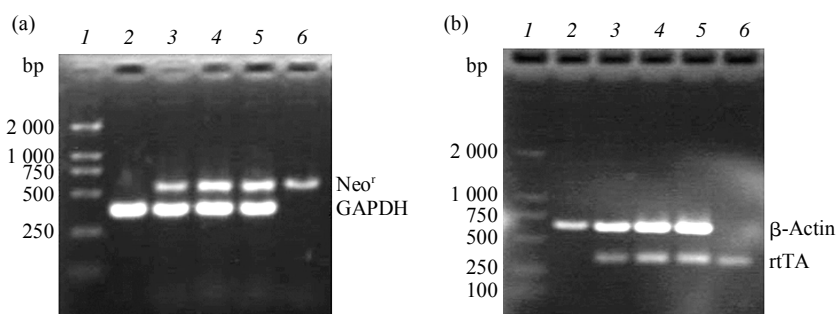


Fig. 2 Neor<sup>r</sup> and rtTA expression as detected using RT-PCR analysis

Neor<sup>r</sup> and rtTA transcripts were detected in cells transfected with the pRevTet-on plasmid. (a) Neor<sup>r</sup> expression. (b) rtTA expression. 1: DL2000 marker; 2: CNE2 cells; 3~5: Representative positive CNE2/Tet-on cell clones 1~3, which express rtTA and Neor<sup>r</sup>; 6: pTet-on plasmid.

### 2.2 Tet-on 系统调控 NPCEDRG 稳定表达 CNE2 细胞系的建立

挑选经潮霉素筛选 2 周后的 CNE2/Tet/TRE 和 CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 细胞克隆(图 3, 分别以 TRE 和 AF-TRE 表示), 以  $1000 \mu\text{g/L}$  Dox 分别处理各细胞克隆, RT-PCR 法检测处理前后 NPCEDRG 基因 mRNA 的表达. 结果表明, CNE2 和转空白载体组细胞在处理前后均未检测到 NPCEDRG 表达, 而 CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 细胞各克隆在 Dox 诱导后均有不同程度的 NPCEDRG 表达. 其中 3 号克隆(AF3)在加入 Dox 诱导时有较高的表达, 而在不加入 Dox 时无表达(图 4), 表明 3 号克隆(AF3)具有高诱导活性、低背景表达的特性, 因

此我们选择 3 号克隆作为后续 NPCEDRG 基因功能研究的细胞.

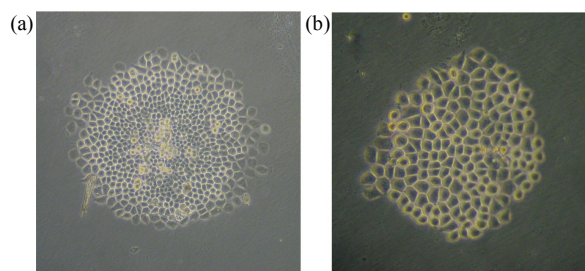
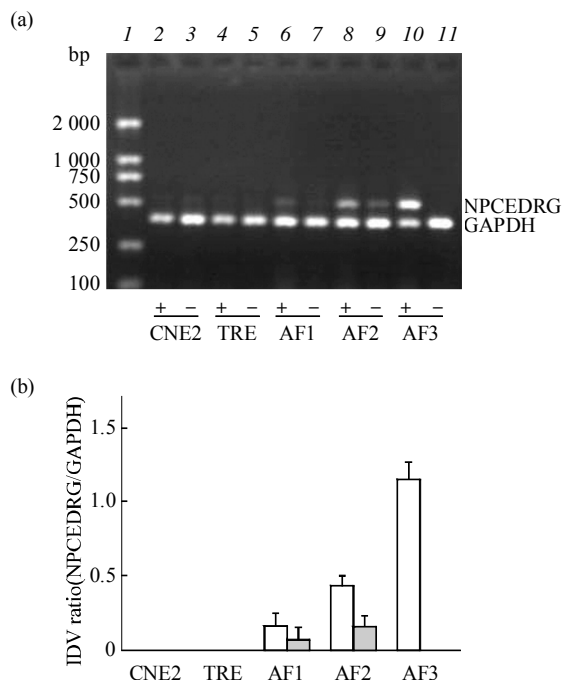


Fig. 3 Cell mono clones selected with hygromycin ( $\times 100$ )  
(a) CNE2/Tet/TRE cell monoclone. (b) CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cell monoclone.

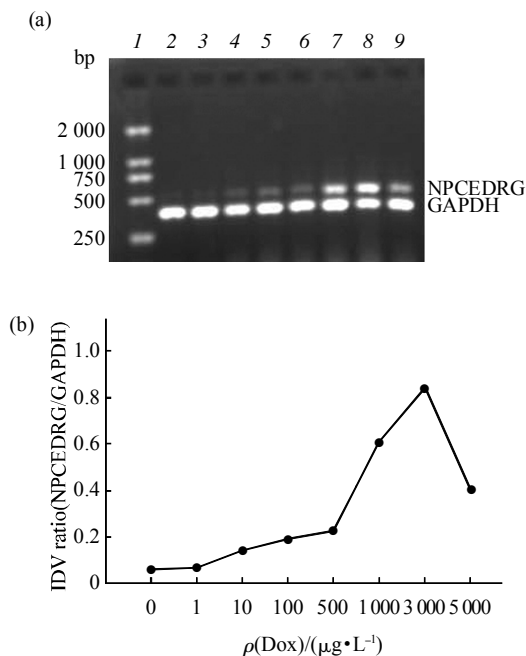


**Fig. 4 The expression of NPCEDRG in different cell clones as detected by RT-PCR**

(a) NPCEDRG expression. (b) The NPCEDRG differential expression levels with or without DOX. 1: DL2000 marker; 2, 3: CNE2 cells (Dox+, Dox-); 4, 5: CNE2/Tet/TRE cells (Dox+, Dox-); 6, 7: CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG-1 clone (Dox+, Dox-); 8, 9: CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG-2 clone (Dox+, Dox-); 10, 11: CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG-3 clone (Dox+, Dox-). Clone 3 was best sensitive to Dox. Clone 2 vs clone 1,  $P < 0.05$ ; clone 3 vs clone 1 and 2,  $P < 0.01$ . □: +Dox; ▢: -Dox.

以不同浓度 Dox 诱导 CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 细胞, NPCEDRG 表达随着 Dox 浓度的增加而呈浓度依赖性增强. Dox 浓度在 0~500  $\mu\text{g/L}$  范围内时, NPCEDRG 表达量随 Dox 浓度增大而升高的幅度较小. 而 Dox 浓度超过 500  $\mu\text{g/L}$  时, NPCEDRG 表达量随 Dox 浓度增大时的变化幅度明显增大. Dox 浓度为 3000  $\mu\text{g/L}$  时 NPCEDRG 表达最高, 但当 Dox 的浓度达到 5000  $\mu\text{g/L}$ , 其表达水平反而下降(图 5), 当 Dox 的浓度达到 10000  $\mu\text{g/L}$  时,

CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG 细胞逐渐死亡(结果未显示), 因此确定 Dox 的最佳诱导浓度为 3000  $\mu\text{g/L}$ .

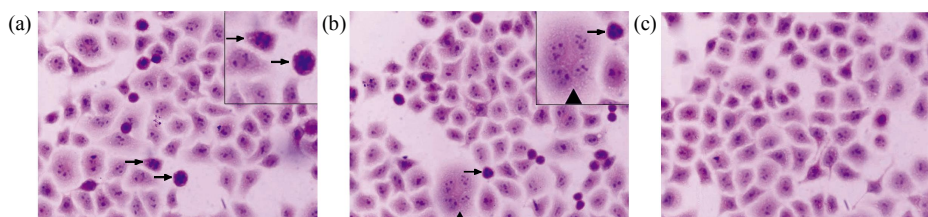


**Fig. 5 NPCEDRG expression of CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cells with different concentration of Dox induction**

(a) NPCEDRG expression. 1: DL2000 marker; 2~9: CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cells with different concentration of Dox induction (from 0 to 5000  $\mu\text{g/L}$ ). 2: 0  $\mu\text{g/L}$ ; 3: 1  $\mu\text{g/L}$ ; 4: 10  $\mu\text{g/L}$ ; 5: 100  $\mu\text{g/L}$ ; 6: 500  $\mu\text{g/L}$ ; 7: 1000  $\mu\text{g/L}$ ; 8: 3000  $\mu\text{g/L}$ ; 9: 5000  $\mu\text{g/L}$ . (b) The relationship between NPCEDRG expression levels and Dox concentration.

### 2.3 细胞形态学观察

三组细胞经 3000  $\mu\text{g/L}$  Dox 诱导后常规 HE 染色, 显微镜下观察细胞形态. CNE2 和转空载体组细胞体积小、胞浆少、胞核大、染色深、有较多的巨核、核仁多且明显、核分裂多见、细胞生长旺盛, 较多细胞处于分裂期; 转基因(高表达 NPCEDRG)细胞大、胞浆丰富、细胞核变小、染色变淡、核仁数量减少、少见核分裂, 分裂期细胞所占比例小(图 6).



**Fig. 6 Alteration of cell morphology in CNE2 cells (HE $\times$ 400)**

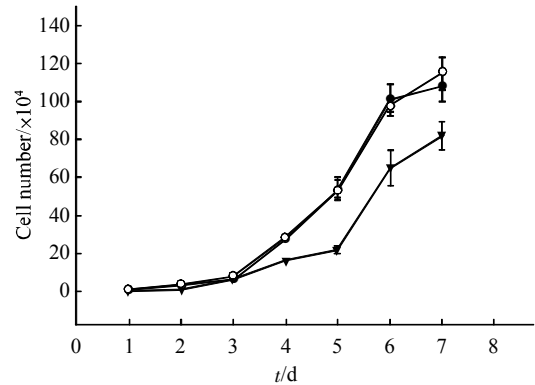
(a) CNE2 cells. (b) CNE2/Tet/TRE cells. (c) CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cells. ▲: Polycaryotic tumor giant cell; →: Abnormal mitoses.

## 2.4 生长曲线

将三组细胞以相同细胞密度接种后, 均加 3 000  $\mu\text{g/L}$  Dox 诱导, 连续 7 天, 每隔 24 h 计数, 每组每次计数 3 个孔所得结果为  $\bar{x} \pm s$ , 绘制三组细胞的生长曲线. 结果表明: 转基因组经 Dox 诱导后(高表达 NPCEDRG)较 CNE2 组和转空载体组生长速度明显减慢, 差异均有显著性( $P < 0.05$ , 图 7).

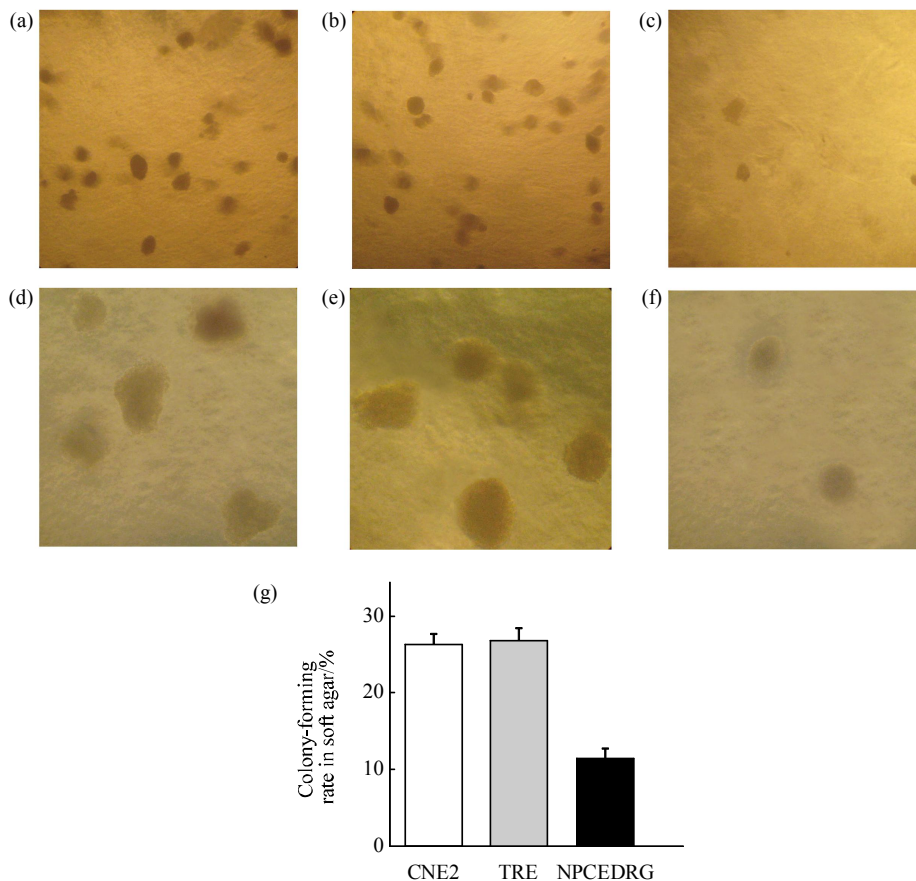
## 2.5 软琼脂集落形成试验

转 NPCEDRG 基因组能在软琼脂中形成集落, CNE2 组、转空载体组、转 NPCEDRG 基因组克隆形成率分别为(26.3  $\pm$  2.3)%、(27.1  $\pm$  3.4)%、(11.4  $\pm$  2.6)%, 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, 差异均有显著性( $P < 0.01$ , 图 8).



**Fig. 7 The effect of NPCEDRG exogenous expression on CNE2 cell proliferation**

The CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cells grew significantly more slowly than the CNE2 parental and empty vector-transfected cells. CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2,  $P < 0.05$ ; CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2/Tet/TRE,  $P < 0.05$ . ●—●: CNE2; ○—○: TRE; ▼—▼: NPCEDRG.



**Fig. 8 The colony-forming ability of CNE2 cells in soft agar**

The colony-forming ability in soft agar in the presence of Dox was examined as a measure of anchorage-independent growth. Two weeks after plating, positive colonies were photographed. The values represent the mean percentage of colonies formed. (a), (d) CNE2. (b), (e) CNE2/Tet/TRE. (c), (f) CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG. (g) The colony-forming rate for each group. CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2,  $P < 0.01$ ; CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2/Tet/TRE,  $P < 0.01$ . a~c:  $\times 40$ ; d~f:  $\times 100$

## 2.6 细胞周期分布

为探讨 NPCEDRG 对 CNE2 细胞生长抑制的

机制, 用流式细胞仪检测了上述三组细胞的细胞周期分布状况, 用方差分析比较上述三组细胞不同周



期时相的细胞百分比. 结果表明: 转 NPCEDRG 组与两对照组相比, 细胞群体中 G0/G1期细胞比例明显升高, S 期细胞比例下降, 细胞生长分数

(G2%+S%)明显降低, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 说明 NPCEDRG 高表达后能使 CNE2 细胞阻滞于 G0/G1 期(图 9, 表 2).

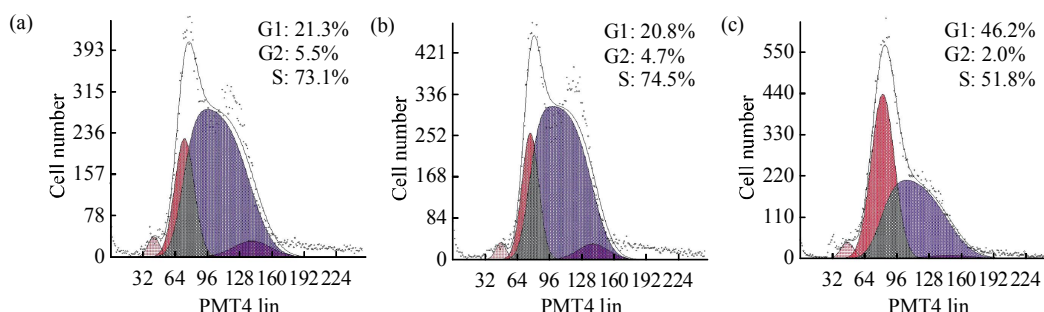


Fig. 9 Cell cycle analysis by flow cytometry

(a) CNE2 cells. (b) CNE2/Tet/TRE cells. (c) CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG cells.

Table 2 The effect of NPCEDRG expression on the cell cycle of CNE2 cells

Group	G0/G1	S	G2/M	%
CNE2	21.2 ± 3.0	74.4 ± 4.2	4.4 ± 1.4	
CNE2/Tet/TRE	21.1 ± 0.6	74.8 ± 0.3	4.1 ± 0.8	
CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG	44.9 ± 1.3 <sup>1,2)</sup>	53.5 ± 1.6 <sup>1,2)</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>1,2)</sup>	

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , CNE2/Tet/TRE-NPCEDRG vs CNE2/Tet/TRE.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .

### 3 讨 论

NPCEDRG 基因定位于染色体 3p21, 该区域被定为是湖南鼻咽癌遗传易感区, 并且已在该区域发现多个与鼻咽癌及其他肿瘤相关的肿瘤抑制基因<sup>[3, 11-14]</sup>. 我们前期研究也表明, NPCEDRG 具有抑制鼻咽癌细胞生长的作用, 并初步将其定位为 II 类肿瘤抑制基因, 同时该基因还可能与白血病的发生发展相关. Tet 系统能人为地模拟生理或病理状态调控目的基因的表达, 有利于真实反映目的基因的功能, 并且该系统对目的基因表达的调控具有严密性、特异性、高效性等优点, 因而被广泛采用. 本实验利用 Tet 系统调控 NPCEDRG 基因在鼻咽癌细胞中的表达, 有利于阐明 NPCEDRG 基因抑制肿瘤细胞生长的机制. 本实验所建细胞系对 Dox 诱导敏感, NPCEDRG 的表达受 Dox 的严密调控, 3 000  $\mu\text{g/L}$  Dox 浓度不仅能避免高浓度 Dox (> 5 000  $\mu\text{g/L}$ )造成的细胞毒性, 而且对该细胞系具有最佳诱导效果. Dox 诱导转基因组细胞高表达 NPCEDRG 后, 细胞恶性程度降低, 并有诱导细胞向成熟方向分化的趋势. 转基因组细胞高表达

NPCEDRG 后, 生长速度明显减慢, 集落形成速度慢、集落小, 克隆形成率降低, 表明 NPCEDRG 基因具有抑制 CNE2 细胞增殖的作用. 停泊非依赖性生长是恶性肿瘤细胞的一个重要生长特性, NPCEDRG 高表达后能使 CNE2 细胞在软琼脂中生长的能力降低, 证明其恶性表型被部分逆转. 流式细胞仪分析结果表明, NPCEDRG 高表达可以延缓细胞由 G0/G1 期进入 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(结果未显示). 结合前期蛋白质表达谱分析结果, NPCEDRG 高表达后引起 CNE2 蛋白表达谱发生改变, 一些与凋亡、细胞免疫、分裂增殖、信号传导有关的蛋白质表达上调, 推测 NPCEDRG 基因可能通过干预细胞周期, 抑制细胞进入 S 期, 而抑制 CNE2 细胞的增殖, 促进其成熟分化. NPCEDRG 基因对细胞增殖产生负调节作用, 是一个鼻咽癌相关的抑癌基因. 根据李桂源等<sup>[15]</sup>提出的鼻咽癌发病易感基因群主导的多阶段性多米诺骨牌效应分子机制假说, NPCEDRG 基因来源于湖南鼻咽癌遗传易感区, 与鼻咽癌的发生发展关系密切, 可能作为易感基因之一参与鼻咽癌发生发展过程中的诸多分子

事件. 基因变异是疾病发生的分子基础, 包括基因结构变异和基因表达变异两种. NPCEDRG 基因在鼻咽癌中存在表达下调, 但其是否还存在基因结构变异及其对鼻咽癌作用的确切分子机制等问题还有待进一步研究.

### 参 考 文 献

- [1] Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* JT - *Lancet*, 2005, **365**(9476): 2041-2054
- [2] Lo K W, To K F, Huang D P. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* JT-Cancer Cell, 2004, **5**(5): 423-428
- [3] 关勇军, 贺修胜, 候德富, 等. 一个鼻咽癌相关 EST 的鉴定及其全长 cDNA 序列分析. *生命科学研究*, 2006, **10**(2): 173-177  
Guan Y J, He X S, Hou D F, *et al.* *Life Science Research*, 2006, **10**(2): 173-177
- [4] He X S, Deng M, Yang S, *et al.* The tumor suppressor function of STGC3 and its reduced expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol Biol Lett*, 2008, **13**(3): 339-352
- [5] Chida J, Amagai A, Tanaka M, *et al.* Establishment of a new method for precisely determining the functions of individual mitochondrial genes, using Dictyostelium cells. *BMC Genet*, 2008, **9**(1): 25
- [6] Shockett P, Schatz D. *Current Protocols in Cell Biology*. USA: John Wiley & Sons Press, 2005: 20.8.1-20.8.10
- [7] Liu B, Wang S, Brenner M, *et al.* Enhancement of cell-specific transgene expression from a Tet-Off regulatory system using a transcriptional amplification strategy in the rat brain. *J Gene Med*, 2008, **10**(5): 583-592
- [8] Goto E, Mito-Yoshida M, Uematsu M, *et al.* An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals. *PLoS ONE*, 2008, **3**(1): e1490
- [9] Gossen M, Bujard H. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* JT-BioTechniques, 1995, **19**(2): 213-216; 216-217
- [10] 阳 帅, 贺修胜, 蒋俊豪, 等. 鼻咽癌相关新基因 NPCEDRG 真核诱导表达载体的构建及鉴定. *南华大学学报(医学版)*, 2008, **36**(2): 162-165  
Yang S, He X S, Jiang J H, *et al.* *J Nanhua University(Medical Edition)*, 2008, **36**(2): 162-165
- [11] 彭 宏, 赵 彤, 姚开泰. 3 号染色体短臂 21-22 区域新基因在鼻咽癌组织中的差异表达. *第一军医大学学报*, 2005, **25**(8): 942-946; 950  
Peng H, Zhao T, Yao K T. *J First Mil Med Univ*, 2005, **25**(8): 942-946; 950
- [12] 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
- [13] Tommasi S, Dammann R, Jin S G, *et al.* RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene*, 2002, **21** (17): 2713-2720
- [14] Wistuba I I, Behrens C, Virmani A K, *et al.* High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*, 2000, **60**(7): 1949-1960
- [15] 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

## Effect of The Novel Gene NPCEDRG Associated With NPC on The Growth of CNE2 Cells\*

YANG Shuai<sup>1,2)</sup>, HU Hua<sup>3)</sup>, DENG Min<sup>1)</sup>, DONG Juan-Hui<sup>1)</sup>, WANG Yan<sup>1)</sup>,  
LUO Qiao<sup>1)</sup>, HE Xiu-Sheng<sup>1)\*\*</sup>, CHEN Zhu-Chu<sup>4)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>2)</sup> Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>3)</sup> Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>4)</sup> Institute of Oncology, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract** To investigate the inhibitory function of NPCEDRG, a novel tumor suppressor gene, in nasopharyngeal carcinoma (NPC), Tet-on system was introduced. Two plasmids were co-transfected into CNE2 cells, then a transgene CNE2 cell line, which had rapidly inducible and reversible expression of NPCEDRG, was obtained after two selections with G418 or hygromycin. NPCEDRG mRNA expression was detected *via* RT-PCR assay. Dox was used to induce the expression of NPCEDRG and a cell clone sensitive to Dox was selected. The best-induced concentration was determined with different concentration of Dox induction. Cell morphology observation, growth curves, clone formation rate and cell cycle distribution were detected after NPCEDRG restoration expression with Dox induction. After the restoration of NPCEDRG expression, the degree of CNE2 differentiation was higher than ever, the growth capacity and clone formation potential of CNE2 cells in soft agar were significantly suppressed, and the cell percentage in G0/G1 phase increased, while percentage of cells entering the S and G2 phase decreased. This data indicates that an abnormality of NPCEDRG expression is associated with nasopharyngeal carcinogenesis and that it may play an important role in inducing cell differentiation, controlling cell growth and regulating the cell cycle.

**Key words** nasopharyngeal neoplasm, NPCEDRG, gene expression, Tet-on system

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00492

---

\*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.

HE Xiu-Sheng. Tel: 86-734-8281510, E-mail: hexiusheng118@yahoo.com.cn

CHEN Zhu-Chu. Tel: 86-731-4805447, E-mail: tcb1@public.cs.hn.cn

Received: August 15, 2009 Accepted: January 5, 2010