

Ndrp2 基因表达对胃癌细胞增殖调控及其机理的研究*

刘新平 邓艳春 韩 炯 李 剑 王吉村 李 莹 药立波**

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 为研究 Ndrp2 基因在人类肿瘤发生发展中的作用, 以不表达 Ndrp2 基因的胃癌细胞系 HGC-27 和表达 Ndrp2 基因的胃癌细胞系 SGC-7901 作为对比材料, 以 Ndrp2 基因转染 HGC-27 胃癌细胞系, 以及用 Ndrp2 的反义寡核苷酸封闭 SGC-7901 胃癌细胞系中 Ndrp2 基因的表达. 发现 Ndrp2 可以抑制 HGC-27 胃癌细胞的软琼脂集落形成, 有一定诱导细胞凋亡的作用, 对细胞周期蛋白 E 的表达有明显下调作用. 当封闭了 SGC-7901 胃癌细胞中 Ndrp2 基因表达的软琼脂集落形成受到抑制, 流式细胞仪检测发现此时的 SGC-7901 细胞周期被阻滞在 G1 期, 细胞周期蛋白 D1 和 E 表达下调. Ndrp2 基因对两种肿瘤细胞中的细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 P38 的表达也有不同的影响.

关键词 Ndrp2 基因, 反义寡核苷酸, 肿瘤, 细胞周期蛋白

学科分类号 Q73

人 Ndrp2 (N-myc downstream regulated gene 2) 基因是本实验室用锚定引物 PCR 方法从正常成人脑 cDNA 文库中克隆到的一个新基因, 基因库登录号为 AF159092, 它的 mRNA 全长 2.2 kb, 具有编码 357 个氨基酸残基的完整读码框, 分子质量为 41 ku. 我们在对其进行组织分布研究时发现, 该基因是一个在人体多种正常组织高表达 (72 种正常组织), 而在某些肿瘤组织不表达或低表达的差异表达基因^[1]. 为了搞清这种差异表达在肿瘤发生发展过程中的原因和意义, 我们在采用 RT-PCR 方法对多种肿瘤细胞系进行普查的基础上, 选择了对 Ndrp2 基因表达有截然不同结果的两种来自胃部肿瘤的细胞系——HGC-27 (一种未分化的胃粘液腺癌细胞系) 和 SGC-7901 (一种分化的上皮样胃癌细胞系), 作为研究 Ndrp2 基因功能的对比材料, 通过对 Ndrp2 基因转染和反义寡核苷酸封闭实验, 观察了 Ndrp2 基因对胃癌细胞集落形成能力、细胞周期、细胞周期蛋白的影响以及对细胞内某些与应激有关的信号转导分子的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

HGC-27 胃癌细胞系, SGC-7901 胃癌细胞系以及小鼠 NIH3T3 细胞系为本教研室保存. 提取总 RNA 试剂——Trizol、反转录酶 (RNaseH⁻ reverse transcriptase) 为 GibcoBRL 产品. PCR 酶为 Takara LA TagTM 公司产品. 人 Ndrp2 单克隆抗体为本校免疫教研室制备. 兔抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP)

二抗, 羊抗兔 IgG-HRP 二抗为 SANTA CRUZ 公司产品. 化学发光检测试剂盒 (chemiluminescent substrate kit) 为 PIERCE 公司产品, RPMI 1640 细胞培养基购自 GibcoBRL 公司, 基因转染试剂 LipofectAmine 2000 购自 Invitrogen 公司, 小牛血清为杭州四季青生物工程公司. 硫代磷酸化 Ndrp2 反义寡核苷酸在北京赛百盛生物工程公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及形态观察: 含 10% 小牛血清的 1640 培养液常规培养肿瘤细胞系, 倒置相差显微镜观察两种细胞株生长状态特征.

1.2.2 反转录 PCR 检测不同细胞株 Ndrp2 基因表达的情况: 将细胞株 HGC-27, MGC-803, SGC-7901 以及 NIH-3T3 培养在含 10% 小牛血清的 1640 中, 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养 72 h, 细胞形态正常无污染. 一瓶细胞 (1 × 10⁷ 细胞) 加 1 ml Trizol 裂解液充分摇匀, 室温 5 min 后在一次性注射器中反复抽吸十几次, 室温 5 min, 加 200 μl 氯仿, 混匀, 室温 5 min. 4℃ 离心, 12 000 g 15 min, 将上清转入新管, 加 5 ml 异丙醇, 混匀, 室温 10 min, 4℃ 离心, 12 000 g, 10 min. 去上清, 加 1 ml 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 4℃ 离心, 12 000 g, 5 min. 去上清, 沉淀物加去离子水溶解, 读取 A₂₆₀

* 国家自然科学基金 (30070773)、国家杰出青年科学基金 (39825113) 和全军医药卫生科研基金 (01MA185) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 029-3374514, E-mail: lxp325@sohu.com

收稿日期: 2002-07-17, 接受日期: 2002-09-12

值定量后, 每个样品取 1 μg 量的细胞总 RNA 进行反转录. 20 μl 体系中加入 oligo dT (500 mg/L) 1 μl , 细胞总 RNA 1 μg , dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl , 加水至 12 μl , 65 $^{\circ}\text{C}$, 5 min. 冰浴 2 min, 短时离心后加入 $5\times$ 反应缓冲液 4 μl , 0.1 mol/L DTT 2 μl , RNaseOUT 重组核糖核酸酶抑制剂 (40 U/ μl) 1 μl , 混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 加反转录酶 1 μl (200 U/ μl), 42 $^{\circ}\text{C}$, 50 min, 70 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 终止反应. PCR 反应在 25 μl 体系中加入 $10\times$ 反应缓冲液 2.5 μl , dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl , 模板 (cDNA) 2 μl , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl , PCR Taq 酶 1 U, 补水至 25 μl . PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 4 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 70 $^{\circ}\text{C}$, 4 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 68 $^{\circ}\text{C}$, 4 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min 后结束. 用 G3PDH (3-磷酸甘油醛脱氢酶) cDNA 作为 PCR 反应内参照, 以证实所用模板质量.

1.2.3 Ndr2 基因转染实验: 将人 Ndr2 cDNA 基因克隆入真核表达载体 pcDNA3 中, 酶切鉴定正确后提取质粒 DNA (PcDNA3-Ndr2) 进行转化实验, 不表达 Ndr2 基因的胃癌细胞系 HGC-27 培养至对数期. 分瓶培养并分别转化 PcDNA3-Ndr2 质粒和 PcDNA3 质粒 (对照), 转染按公司说明书进行, 转染时间分别为 24 h, 36 h 和 48 h, 裂解液收集细胞, 蛋白质定量后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用.

1.2.4 Ndr2 反义寡核苷酸封闭实验: 以人 Ndr2 基因翻译起始码前 2 个核苷酸设计 Ndr2 反义寡核苷酸序列: 3' GGTACCGCCTCGACGTC 5', 和正义寡核苷酸序列: 5' CCATGGCGGA GCTGCAG 3'. 反转录 PCR 证明 SGC-7901 胃癌细胞系表达 Ndr2 基因. 将此细胞培养后分成六组, 分别加入 Ndr2 反义寡核苷酸和 Ndr2 正义寡核苷酸 (终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$), 以及对照试剂各两组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后补加一次寡核苷酸, 48 h 后分别收集培养细胞, 计数后接种六孔板, 进行蛋白质印迹和流式细胞仪测定^[2].

1.2.5 肿瘤细胞的集落形成实验: SGC-7901 细胞和 HGC-27 细胞常规培养至 70% 长满. SGC-7901 细胞分成二瓶, 分别加入硫代磷酸化的 Ndr2 反义寡核苷酸和正义寡核苷酸, 至终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 孵箱培养 24 h. HGC-27 细胞培养后分为三组, 分别加入质粒 PcDNA3-Ndr2 10 μg 、PcDNA 10 μg 和空白对照, 按脂质体转染说明书进

行转染, 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 孵箱培养 24 h、36 h、48 h. 将正义寡核苷酸和反义寡核苷酸处理的 SGC-7901 细胞及转染 Ndr2 基因的 HGC-27 细胞进行细胞计数后, 接种在底层铺有 0.5% 琼脂-1640 的六孔板中, 5000 个/孔, 继续培养^[3].

1.2.6 蛋白质印迹检测不同肿瘤细胞系中 Ndr2 的表达: 收集 Ndr2 基因转染的 HGC-27 细胞和 Ndr2 反义寡核苷酸封闭的 SGC-7901 细胞, PBS 漂洗, 加 $1\times$ SDS 上样缓冲液裂解, 蛋白质定量, 取 15 μg 蛋白质总量的样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 后将凝胶转移至 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗用 1:500 稀释的抗 Ndr2 单克隆抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 洗涤后, 加 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:3000 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 漂洗后于暗室内加增强化学发光 (ECL) 试剂, 在 X 光片上自显影. 各种细胞周期素 (cyclinD1, D3, E) 和 MAPK/ERK、P38 的蛋白质印迹实验同上操作.

1.2.7 流式细胞仪检测: 胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗涤, 75% 乙醇固定. 0.05% 碘化丙啶 (PI) 染液染色 30 min, 上机检测.

2 结果

2.1 不同肿瘤细胞系中 Ndr2 基因表达状态不同

用反转录 PCR 方法检测了多种肿瘤细胞系中 Ndr2 基因的表达, 发现同是胃癌细胞系对 Ndr2 表达却不同. SGC-7901 胃癌细胞中有 Ndr2 基因的表达, 而 HGC-27 和 MGC-803 却不表达 Ndr2 基因. 在反复三次实验无误的情况下, 我们认为 Ndr2 基因在不同分化程度和不同细胞来源的肿瘤细胞系中表达是不同的 (图 1).

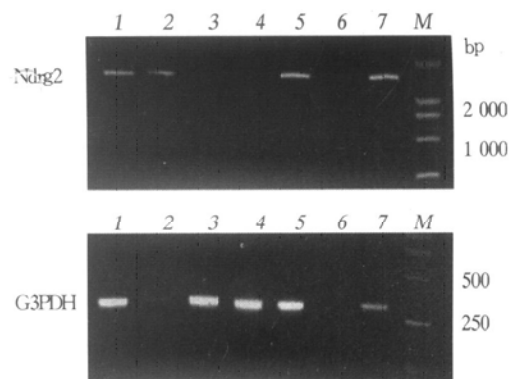


Fig. 1 RT-PCR identification of Ndr2 gene expressed in different tumor cell line

M: molecular mass marker; G3PDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 1: BT325; 2: MDA-MB231; 3: HGC-27; 4: MGC-803; 5: SGC-7901; 6: NIH3T3; 7: SkBr.

2.2 构建 Ndr g2 基因的真核表达载体

人 Ndr g2 cDNA 基因 1 200 kb 克隆入真核表达载体, 构建了 pcDNA-Ndr g2 质粒. 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定及序列测定证实构建成功.

2.3 Ndr g2 基因表达效果的检测

反转录 PCR 证实 HGC-27 胃癌细胞系不表达 Ndr g2 基因. 重组质粒 pcDNA-Ndr g2 及对照质粒 pcDNA 分别瞬时转染 HGC-27 细胞, 培养 24 h、36 h 和 48 h 后分别收集细胞, 获得了瞬时表达 Ndr g2 基因的 HGC-27 细胞. 将人工合成的硫代磷酸化的 Ndr g2 反义寡核苷酸, 加入经反转录 PCR 证实有 Ndr g2 基因表达的 SGC-7901 细胞培养液中, 培养 24 h、36 h 及 48 h 后, 获得了 Ndr g2 基因表达被封闭的 SGC-7901 细胞. 作蛋白质印迹实验, 证实 Ndr g2 转染 HGC-27 细胞及封闭 Ndr g2 基因在 SGC-7901 细胞中的表达效果是明确的 (图 2).

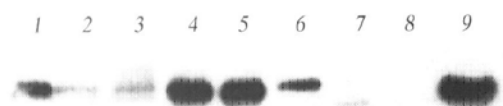


Fig. 2 Western blotting analysis of effect of Ndr g2 gene blocked on SGC-7901 cells and transfected HGC-27 cells

1, 9: Ndr g2 gene expressed in SGC-7901 cells (1, load 5 μ l, 9, load 15 μ l); 2, 3: Ndr g2 gene expression in SGC-7901 cells blocked with antisense oligonucleotide 24 h and 36 h; 4, 5, 6: pcDNA-Ndr g2 plasmid transfected into HGC-27 cells 24 h, 36 h and 48 h respectively; 7: Ndr g2 gene not expressed in HGC-27 cells; 8: pcDNA plasmid (control) transfected into HGC-27 cells.

2.4 Ndr g2 反义寡核苷酸抑制胃癌细胞的增殖

SGC-7901 胃癌细胞经 Ndr g2 反义寡核苷酸及正义寡核苷酸作用后, 接种在 6 孔板的琼脂-1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 孵箱分别培养 7、8、10、11、12 及 14 天. 于不同培养天数在倒置显微镜下观察, 8 个以上的细胞定为一个集落, 计数每个视野的细胞集落数, 随机计数 10 个视野中细胞集落数的总和 (图 3).

结果表明: 表达 Ndr g2 基因的 SGC-7901 胃癌细胞系, 经用 Ndr g2 反义寡核苷酸封闭后与 Ndr g2 正义寡核苷酸封闭相比较, 细胞集落形成数明显减少 (图 3) 并且细胞集落的大小也明显变小 (图 4). 说明在 SGC-7901 胃癌细胞中 Ndr g2 有促进其增殖作用, 当其表达被阻断后, 细胞集落形成数减

少, 显示 Ndr g2 基因产物在 SGC-7901 胃癌细胞中的作用可能是一种正调控.

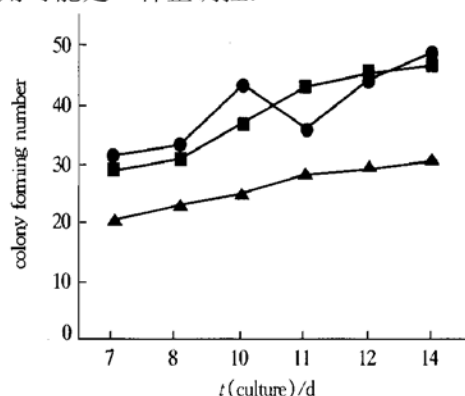


Fig. 3 Effect of Ndr g2 gene antisense oligonucleotide on colony forming numbers in SGC-7901 cells

●—●: control; ■—■: sense; ▲—▲: antisense.

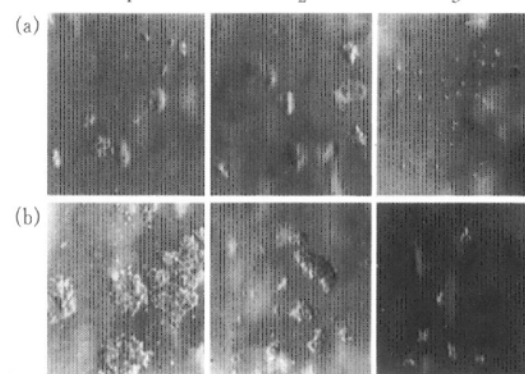


Fig. 4 Colony forming of SGC-7901 cells in soft agar

(a) SGC-7901 cells cultured for 6 d. (b) SGC-7901 cells cultured for 14 d. 1: control; 2: treated with Ndr g2 sense oligonucleotide; 3: treated with Ndr g2 antisense oligonucleotide.

流式细胞仪显示用反义寡核苷酸封闭 Ndr g2 基因后, SGC-7901 细胞阻滞在 G1 期的细胞数达 60% 以上 (表 1). 此时细胞周期蛋白 D1 和 E 的表达也相应降低 (图 5 和图 6), 说明 Ndr g2 的表达是 SGC-7901 细胞从 G1 期进入 S 期所需要的.

Table 1 Comparing result of flowcytometry in SGC-7901 cell

Cell cycle	t/h	No treated cells	Sense oligo treated cells	Antisense oligo treated cells
G0-G1	24	33.42%	45.07%	60.12%
	36	35.75%	32.65%	65.38%
G2-M	24	35.05%	19.57%	7.97%
	36	34.55%	23.83%	11.38%

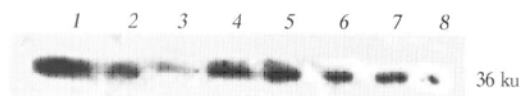


Fig.5 Western blotting analysis of cyclin D1 expression

1: SGC-7901 cells; 2, 3: SGC-7901 cells treated with antisense oligonucleotide 24 h, 36 h, respectively; 4: SGC-7901 cells treated with sense oligonucleotide 24 h; 5: HGC-27 cells; 6: HGC-27 cells transfected with pcDNA (control); 7, 8: HGC-27 cells transfected with pcDNA-Ndr2 24 h, 36 h, respectively.



Fig.6 Western blotting analysis of cyclin E expression

1: HGC-27 cells; 2: cells transfected pcDNA (control); 3, 4, 5(6): cells transfected pcDNA-Ndr2 24 h, 36 h, 48 h respectively; 7: SGC-7901 cells; 8: cells blocked with Ndr2 sense oligonucleotide; 9, 10, 11: cells blocked with Ndr2 antisense oligonucleotide 24 h, 36 h, 48 h respectively.

2.5 Ndr2 转染 HGC-27 胃癌细胞结果

用 pcDNA-Ndr2 及 pcDNA 分别转染 HGC-27 胃癌细胞 5 h 后, 接种于琼脂-1640 培养基的 6 孔板中, 于不同培养天数计数细胞集落形成, 同时进行流式细胞仪检测细胞周期的变化 (图 7)。

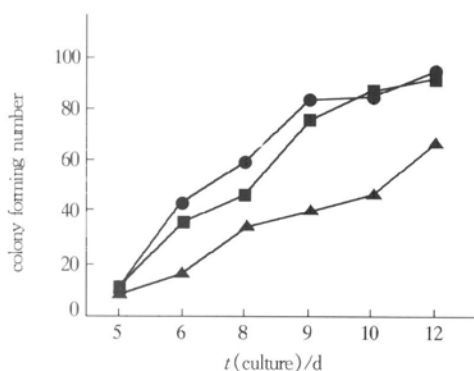


Fig.7 Effect of pcDNA-Ndr2 gene transfected into HGC-27 cells on colone forming numbers

●—●: control; ■—■: pcDNA; ▲—▲: pcDNA-Ndr2.

结果表明: 当 Ndr2 转染 HGC-27 胃癌细胞后, 与对照相比有明显抑制肿瘤细胞集落形成的能力 (图 8)。流式细胞仪结果显示, 转染的细胞有一定的细胞凋亡 (3.58%) 但没有明显的细胞周期阻滞 (图未显示)。蛋白质印迹显示细胞周期蛋白 E 的表达下调 (图 6 中 3, 4, 5) 而细胞周期

蛋白 D1 的表达变化不明显 (图 5 中 6, 7, 8)。

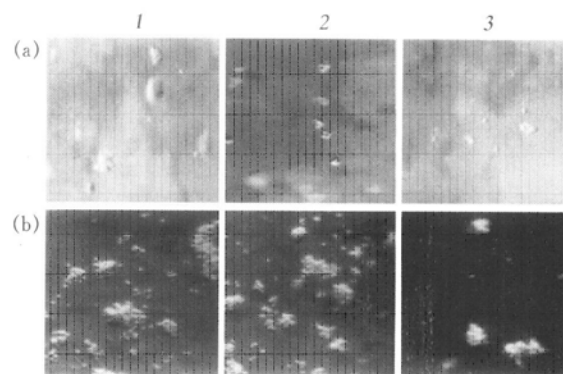


Fig.8 Colony forming of HGC-27 cells in soft agar

(a) HGC-27 cells cultured for 6 d. (b) HGC-27 cells cultured for 14 d. 1: control; 2: transfected with pcDNA; 3: transfected with pcDNA-Ndr2 plasmid.

2.6 Ndr2 基因的表达可以下调 ERK 及 P38 的表达

当 HGC-27 胃癌细胞系转染了 Ndr2 基因, 并在细胞内进行了瞬时表达后, 发现 ERK 和 P38 的表达下调并具有时间依赖性 (图 9 中 3, 4, 5 和图 10 中 3, 4), 而 SGC-7901 胃癌细胞中 Ndr2 基因的表达被反义寡核苷酸封闭后, ERK 和 P38 信号分子的表达变化不明显。

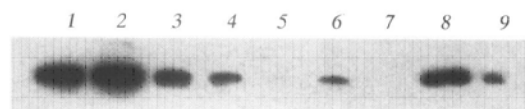


Fig.9 Western blotting analysis of ERK expression

1: HGC-27 cells; 2: cells transfected with pcDNA (control); 3, 4, 5: cells transfected with pcDNA-Ndr2 24 h, 36 h, 48 h, respectively; 6: SGC-7901 cells; 7: cells blocked with Ndr2 sense oligonucleotide; 8, 9: cells blocked with Ndr2 antisense oligonucleotide 24 h, 36 h, respectively.

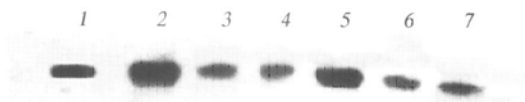


Fig.10 Western blotting analysis of p38 expression

1: HGC-27 cells; 2: cells transfected with pcDNA (control); 3, 4: cells transfected with pcDNA-Ndr2 24 h, 36 h, respectively; 5: SGC-7901 cells; 6: cells blocked 24 h with Ndr2 sense oligonucleotide; 7: cells blocked 24 h with Ndr2 antisense oligonucleotide.

3 讨 论

人的 Ndr2 基因家族是近几年陆续发现的, 包

括4个成员, Ndr_g1, Ndr_g2, Ndr_g3和Ndr_g4. 它们有57%~65%的氨基酸同源性, 由于Ndr_g1在小鼠胚胎受N-myc和c-myc的抑制而得名^[4], 而Ndr_g2和Ndr_g3并不受N-myc的调节. 它们在人体内的组织分布各不相同, 目前对它们在细胞中的功能不完全清楚^[5]. 人的Ndr_g2基因是我们实验室1999年首先发现的. 在进行组织分布研究时发现Ndr_g2基因在大多数正常组织中表达, 而在许多肿瘤组织和肿瘤细胞系中表达明显降低或不表达^[6]. 为了研究Ndr_g2基因的表达与肿瘤发生发展的关系, 我们选择了两种胃癌细胞系, 它们对Ndr_g2的表达截然不同. HGC-27胃癌细胞系是一种未分化的胃粘液腺癌, 经多次反转录PCR证实它不表达Ndr_g2基因, 而SGC-7901是一种分化的上皮型胃癌细胞系, 经反转录PCR证实, 它表达Ndr_g2基因. 由于这两种肿瘤细胞系的细胞来源类型不同, 分化程度不同, 对Ndr_g2基因的表达也不同, 无论Ndr_g2基因是肿瘤细胞发生发展的因或果, 利用这两种肿瘤细胞系作为研究Ndr_g2基因功能的对比材料都是有意义的.

正常贴壁细胞必须附着在固体基质上才能生长, 并具有接触抑制特性, 肿瘤细胞丧失了这种特性, 能在软琼脂培养基中进行停泊非依赖性生长并形成细胞集落, 这种细胞集落形成的大小和数量可以反应肿瘤细胞增殖的速度及恶性程度^[3]. 我们将人Ndr_g2基因cDNA克隆到真核表达载体, 构建了pcDNA-Ndr_g2, 转染不表达Ndr_g2基因的HGC-27胃癌细胞系, 细胞软琼脂集落形成实验, 与空白和对照组相比发现转染Ndr_g2基因后, 形成细胞集落的大小及数量(图7, 12天实验组为62个, 对照组为94个)有明显的差异, 转染Ndr_g2基因24h, 48h后, 细胞周期蛋白E的表达明显下调(图6中3, 4, 5)而细胞周期蛋白D1表达变化不明显(图5中6, 7, 8). 说明Ndr_g2基因的表达产物在HGC-27胃癌细胞中具有抑制其生长增殖的功能, 而这种抑制作用可能与细胞周期蛋白E的表达下调有某种关系. 因为周期蛋白E表达在G1晚期, 它激活Cdk2, 是DNA复制开始的关键性激酶. 此时细胞可以进入S期, 所以转染Ndr_g2基因的HGC-27胃癌细胞在流式细胞仪测定中没有观察到G1期阻滞现象(资料未显示). 当SGC-7901胃癌细胞中的Ndr_g2基因被反义寡核苷酸封闭后, 我们看到细胞集落形成数明显减少(图3, 14天实验组为31个, 对照组为49个), 封

闭24h, 36h后细胞周期蛋白D1(图5中2, 3)和E的表达下调明显(图6中8, 9, 10, 11). 此时细胞周期测定发现封闭组24h和36h的G1期细胞数分别为60%和65%, 明显高于对照组的45%和32%, 表现出典型的细胞周期被阻滞在G1期现象(表1). 因为细胞周期蛋白D1在G1早期依赖生长因子或其他因素的刺激而持续表达, 当依赖因素被除去, 细胞周期蛋白D1水平立即下降, 细胞不能进入S期, 而被阻滞在G1期^[7]. 这说明Ndr_g2基因在SGC-7901胃癌细胞中促进细胞增殖与周期蛋白D1和E的表达有关. 推测Ndr_g2可能通过影响细胞周期蛋白调控细胞的增殖与生长.

促分裂源活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族信号系统为细胞内多种信号途径的会聚点, 属于丝/苏蛋白激酶, 包括4个亚族: MAPK/ERK1, 2, JNK/SAPK, ERK5/BMKL和P38 MAPK. MAPK是哺乳动物细胞对外界刺激起反应的重要激酶, 它们介导细胞生长、分化、细胞周期、细胞凋亡以及应激反应等多种细胞过程. Ndr_g2基因转染HGC-27胃癌细胞后, 蛋白质印迹实验证实细胞内ERK及P38的表达下调. 说明Ndr_g2基因的信号转导途径与这些分子有关. 通过它们的作用将信号转导到细胞核, 调控HGC-27胃癌细胞的增殖与分化.

从这些现象来看Ndr_g2基因在SGC-7901胃癌细胞中起正调控的作用, 促进细胞的增殖与分化. 而在HGC-27胃癌细胞系中Ndr_g2基因是一种负调控, 抑制细胞的增殖与分化, 这种截然相反的作用是否因为在细胞类型和分化程度都不同的肿瘤细胞中Ndr_g2的作用不同? 还必须有其他实验加以证实.

参 考 文 献

- 1 邓艳春, 药立波, 刘新平, 等. 人脑内一含有ACP样结构域新基因的发现. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1): 72~76
Deng Y C, Yao L B, Liu X P, et al. Prog Biochem Biophys, 2001, 28(1): 72~76
- 2 Jean C, Larcher M, Jean L V. Growth inhibition of nie-115 mouse neuroblastoma cells by c-myc or n-myc antisense oligodeoxynucleotides causes limited differentiation but is not coupled to neurite formation. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 185(3): 915~924
- 3 Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent, phosphatidylinositol 3 kinase, and mitogen-activated protein kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma cells from anoikis. Cancer Res, 2001, 61(6): 2439~2444
- 4 Okuda T, Kondoh H. Identification of new genes Ndr2 and Ndr3

- which are related to Ndr1/RTP/Drg1 but show distinct tissue specificity and response to N-myc. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266** (1): 208~ 215
- 5 Zhou R H, Kokame K, Tsukamoto Y, *et al.* Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. *Genomics*, 2001, **73** (3): 86~ 97
 - 6 李 剑, 刘新平, 林树新, 等. 一种新的抑癌候选基因—NDR2 在人类正常组织及相应肿瘤中的表达. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (1): 223~ 227
 - Li J, Liu X P, Lin S X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (2): 223~ 227
 - 7 Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2690~ 2698

Effect of NdrG2 Gene Expression on Gastric Carcinoma Cell Proliferation^{*}

LIU Xin-Ping, DENG Yan-Chun, HAN Jiong, LI Jian, WANG Ji-Cun, LI Ying, YAO Li-Bo^{**}

(The Forth Military Medical University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an 710032, China)

Abstract In previous study, a PCR-based subtractive hybridization method was used to isolate the human N-myc downstream regulated gene2 (NdrG2) located at chromosome 14q11.2. NdrG2 is low expressed in various tumor tissues. NdrG2 tissue expression pattern suggests that its expression level is inversely related to cell proliferation rate. To investigate tumor suppressor activity of NdrG2 gene, it was transiently transfected to an undifferentiated gastric mucous gland carcinoma cell line HGC-27 which not expresses this gene itself confirmed by RT-PCR. It was found that the products of this gene may suppress the colony formation of gastric carcinoma cells in soft agar and induced apoptosis, as well as downregulated expression of cyclin D1 and cyclin E, but not affected cell cycle change in flowcytometry analysis. In addition, the antisense oligonucleotide of NdrG2 gene was designed and added to the cultured differentiated gastric epidermal carcinoma cell line SGC-7901 which expressed this gene itself confirmed by RT-PCR. It was observed that the numbers of colony formation of SGC-7901 cell in soft agar decreased after NdrG2 gene expression blocked by antisense oligonucleotide compared with sense oligonucleotide. In this case SGC-7901 cell cycle was arrested in G1 phase. These results may be related to the low expression of cyclin D1 and cyclin E in gastric carcinoma cell line SGC-7901. The results suggest that NdrG2 gene may be of obviously key role in various differential stage gastric carcinoma cells.

Key words N-myc downstream regulated gene 2 (NdrG2), gastric carcinoma, RT-PCR, cyclin

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39870718, 30070773) and Military Medical Science Foundation of China (01MA185).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-29-3374514, E-mail: lxp325@sohu.com

Received: July 17, 2002 Accepted: September 12, 2002