

稳定转染 NOR1 抑制 5-8F 细胞片状伪足形成和 Wnt 信号通路*

向波^{1, 2)} 王卫¹⁾ 李文娟¹⁾ 唐珂¹⁾ 曾朝阳¹⁾ 李小玲¹⁾ 李桂源^{1)**}

(¹⁾ 中南大学肿瘤研究所, 长沙 410008; ²⁾ 非可控炎症与肿瘤湖南省重点实验室, 长沙 410013)

摘要 细胞骨架是真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 不仅与保持细胞形态结构有关, 而且影响细胞黏附和细胞运动. NOR1 是从鼻咽癌中克隆得到的新基因, 在鼻咽癌组织和细胞系中表达下调. 本研究建立了 NOR1 稳定表达的鼻咽癌 5-8F 细胞系. 过表达 NOR1 引起高转移性鼻咽癌 5-8F 细胞形态改变, 抑制片状伪足形成、细胞表面积缩小、细胞聚集性增强. 扫描电镜检测发现, NOR1 抑制了 5-8F 细胞膜微绒毛的数量, 引起细胞膜表面改变. 细胞骨架染色发现, NOR1 过表达导致 5-8F 细胞 actin 骨架连续性破坏, 应力纤维增加. Realtime RT-PCR 检测发现, NOR1 引起 5-8F 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路分子 Wnt5A 受体 FZD5、FZD7 表达下调, 抑制了 β -catenin 蛋白入核. 提示 NOR1 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活, 破坏细胞骨架连续性, 抑制细胞膜微绒毛与伪足形成.

关键词 NOR1, 鼻咽癌, 片状伪足, Wnt 信号通路

学科分类号 Q24, R730

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00012

NOR1 是从鼻咽癌中克隆得到的新基因, 在鼻咽癌中表达下调^[1-3]. NOR1 基因编码区两个偶联的编码区单核苷酸多态性位点 (coding region single nucleotide polymorphism, cSNPs) 与鼻咽癌发病相关^[4]. 在鼻咽癌 HNE1 细胞中恢复 NOR1 表达, 可以抑制肿瘤细胞的生长与增殖能力^[1, 5]. 本研究建立了稳定表达 NOR1 的鼻咽癌高转移性 5-8F 细胞系, 观察发现 NOR1 引起 5-8F 细胞形态改变, 抑制片状伪足形成. 扫描电镜发现稳定转染 NOR1 引起 5-8F 细胞膜微绒毛减少. NOR1 抑制了 5-8F 细胞中 Wnt 信号通路受体分子 FZDs 的表达和 β -catenin 入核. 本研究提示, NOR1 可能通过抑制鼻咽癌细胞 Wnt 信号通路的活化, 影响细胞骨架, 抑制肿瘤细胞片状伪足与微绒毛形成.

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌(*E. coli*) JM109 为本室保存菌种; 鼻咽癌 5-8F 细胞系由中山大学肿瘤研究所建株; 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 5% CO₂,

37℃ 培养; 人胎脑 cDNA 文库、pIRES. neo3 质粒购自 Clontech 公司; Pyrobest DNA 聚合酶、dNTP、SYBR Premix DimerEraser、RNA free DNase I、限制性内切酶 *EcoRV*、*BamHI* 等购自大连宝生物公司 (TaKaRa); T4 DNA 连接酶、逆转录试剂盒 (reverse transcription system) 购自 Promega 公司; 脂质体 Lipofectamin2000、TRIzol 购自 Invitrogen 公司; Anti- β -catenin 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司; 核-胞浆蛋白制备试剂盒 (nuclear-cytosol extraction Kit) 购自 Pierce 公司; Anti-NOR1 多克隆抗体、FITC 标记的鬼比环肽 (phalloidin-FITC)、Cy3 标记的羊抗兔 IgG、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',

* 国家自然科学基金 (81000883, 81272254, 81102065, 30971147, 81171930, 30871282), 高等学校学科创新引智计划 (111-2-12), 湖南省科技计划 (2011FJ3111, 10JJ7003), 中南大学自由探索计划 (201012200017, 2011QNZT138) 和 中南大学研究生教育创新工程 (2010ssxt048, CX2011B051) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-84805383, E-mail: ligy@xyssm.net

收稿日期: 2012-01-07, 接受日期: 2012-03-07

6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 激光共聚焦显微镜 LSM5 PASCAL (Carl Zeiss 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 iQ5 real-time PCR detection systems (Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 IX51(Olympus 公司); 电子扫描显微镜 S4800 (Hitachi 公司).

1.2 方法

1.2.1 载体构建与稳定转染. 以人胎脑 cDNA 文库质粒为模板, PCR 扩增人 NOR1 基因全长开放阅读框(open reading frame, ORF). 上游引物序列 5' atcgatatcatggcatcaatgcagaagctgatctcagaggaggacctgagtgtcggtgcggacgcta 3', 携带 *EcoR* V 酶切位点, 其中下划线部分为 c-myc 标签编码序列. 下游引物序列为 5' acaggatccctataactcatccatcatggc 3', 携带 *Bam*H I 酶切位点. PCR 产物酶切后连接 pIRES.neo3 载体. 重组质粒经 *EcoR* V 和 *Bam*H I 酶切, 阳性克隆经测序证明 NOR1 基因正确插入, 命名为 pIRES-NOR1. pIRES.neo3 和 pIRES-NOR1 质粒采用 Lipofactamin 2000 转染 5-8F 细胞, 200 mg/L

G418 筛选 2 周, 所有 G418 抗性克隆消化后混合为池克隆扩大培养, 用于后续实验.

1.2.2 细胞形态观察. 用倒置显微镜观察稳定表达 NOR1 的 5-8F 细胞及空载体细胞, 选择代表性视野拍照记录活细胞的形态.

1.2.3 免疫荧光. 取对数生长期的 Ctrl/5-8F 和 NOR1/5-8F 细胞, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min, 用丙酮: 甲醇(1:1)固定, 0.25% Triton X-100 破膜, 10%正常羊血清封闭非特异性结合位点, β -catenin 抗体孵育过夜, 0.01 mol/L PBS 冲洗 4 次, 每次 10 min, Cy3 标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h, 0.01 mol/L PBS 冲洗 4 次, 每次 10 min, DAPI 染核 10 min, 激光共聚焦显微镜观察并照相.

1.2.4 Realtime RT-PCR. 取对数生长期的 Ctrl/5-8F 和 NOR1/5-8F 细胞, 采用 TRIzol 抽提总 RNA. 用 RNA free DNase I 37℃ 消化总 RNA, 苯酚/氯仿抽提. 消化后的 RNA 取 2 μ g 反转录制备 cDNA. 采用实时定量 PCR 仪扩增分析. 用于 realtime RT-PCR 扩增的引物序列见表 1.

Table 1 Primers used for realtime RT-PCR in this study

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size/bp	$t_m/^\circ\text{C}$
NOR1	tcaaggattcatccgagac	ctggccaagaaattcagctc	508	60
GAPDH	aacggatttggtcgtattgg	ttgatttggagggatctcg	233	55~60
FZD5	agctaaaatggccagagcaa	aattccccctgggaactatg	173	60
FZD7	gctgctttgttgaaagagg	gcagtacggaggagaaaaca	174	55~60

1.2.5 核-胞浆蛋白分离及 Western blotting. 取对数生长期的 Ctrl/5-8F 和 NOR1/5-8F 细胞, 用细胞刮子将细胞刮下, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min, 4℃ 800 *g* 离心 10 min, 弃上清. 采用核-胞浆蛋白制备试剂盒抽提胞核和胞浆组分蛋白质, 具体操作参考试剂盒说明. 对分离得到的胞浆蛋白与胞核蛋白用 BCA 法进行定量. 分别取 20 μ g 胞核蛋白、50 μ g 胞浆蛋白进行 SDS-PAGE. 采用 β -catenin 抗体检测 β -catenin 在胞浆与胞核中的表达.

1.2.6 荧光法观察微丝. 将细胞以适当密度接种于无菌处理的盖玻片, 培养过夜至细胞充分伸展, 取出盖玻片, PBS 漂洗后采用 4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min. 利用 0.25% Triton X-100 破膜 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 10%正常羊血清封闭 30 min, FITC 标记的鬼笔环肽室温避光染色 30 min, PBS 漂洗 3 次,

每次 5 min, 利用荧光显微镜观察细胞微丝形态并拍照.

1.2.7 扫描电镜(scanning electron microscopy) 观察. 取对数生长期的 Ctrl/5-8F 和 NOR1/5-8F 细胞, 用 0.25%胰酶消化细胞制备单细胞悬液, 4℃ 800 *g* 离心 10 min, 弃上清, 沉淀重悬于 0.01 mol/L PBS. 漂洗 2 次后离心, 细胞沉淀采用 2.5%戊二醛与四氧化锇双固定 2 h, 漂洗后用 2%氯化金浸渍染色 2 次, 每次 1.5 h. 充分漂洗后梯度酒精脱水, 干燥后扫描电子显微镜上镜观察照相.

2 结 果

2.1 NOR1 稳定转染 5-8F 细胞系的建立

PCR 扩增人 NOR1 基因全长 ORF, 两端携带 *EcoR* V 和 *Bam*H I 酶切位点. 纯化 PCR 产物和空白载体 pIRES.neo3 经 *EcoR* V 和 *Bam*H I 酶切, 酶

切产物回收, 连接后转化大肠杆菌 JM109, 抽提质粒经 *EcoRV* 和 *BamHI* 酶切鉴定. 随机选取酶切阳性克隆送测序, 获得 NOR1 ORF 正确插入的表达载体. 转染 5-8F 细胞, 200 mg/L G418 筛选 2 周后获得抗性克隆, 将所有抗性克隆(> 10 个)消化后混合为池克隆, 扩大培养. 抽提总 RNA, DNase 消化痕量 gDNA, 逆转录制备 cDNA, realtime RT-PCR 检测发现, 稳定转染 NOR1 基因的细胞 NOR1 mRNA 表达显著增加(图 1a). 抽提总蛋白, Western blotting 检测发现, NOR1 转染的 5-8F 细胞高表达 NOR1 蛋白, 而空白载体 pIRES.neo3 转染组无 NOR1 蛋白表达(图 1b), 结果表明 NOR1 稳定细胞系构建成功(图 1b).

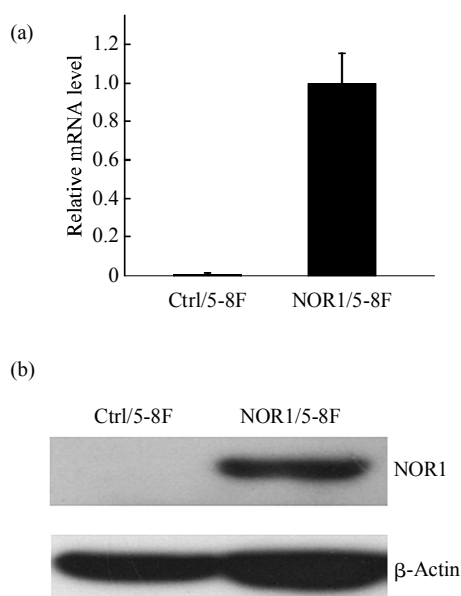


Fig. 1 Overexpression of NOR1 in 5-8F stably transfected cells

(a) The expression of NOR1 mRNA was analyzed by realtime RT-PCR in NOR1 stable transfected and control cell lines. GAPDH was used as internal control. (b) The exogenous expression of NOR1 protein was analyzed by Western blot analysis. β -Actin was used as a loading control.

2.2 稳定转染 NOR1 引起 5-8F 细胞形态改变

相差显微镜观察发现, 过表达 NOR1 引起 5-8F 细胞形态改变. 空载体转染的 5-8F 细胞扁平化(cell flattening), 细胞面积较大, 形成较多片状伪足(lamellipodia), 片状伪足边缘有较多的膜皱褶(membrane ruffles), 细胞分布较为分散. 稳定转染 NOR1 的 5-8F 细胞面积明显减小, 片状伪足和膜

皱褶减少, 细胞与细胞之间连接紧密, 成团生长(图 2).

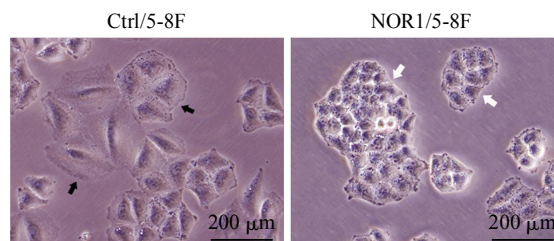


Fig.2 The morphological changes of 5-8F cells expressing NOR1

Ctrl/5-8F: 5-8F cells stably transfected with pIRES.neo3 vector; NOR1, 5-8F cells stably transfected with NOR1 gene(black arrows points to the lamellipodia in Ctrl/5-8F cells, white arrows points to intact cell-cell adhesion in NOR1/5-8F cells).

2.3 稳定转染 NOR1 引起 5-8F 细胞膜微绒毛减少

采用扫描电镜技术进一步研究 NOR1 对 5-8F 细胞膜结构的影响. 扫描电镜观察发现, 空载体转染的 5-8F 细胞膜表面具有丰富的微绒毛(microvillus), 且微绒毛较为粗壮, 微绒毛游离端膨大, 形成钝圆形轮廓(blunt rounded contours)(图 3). 稳定转染 NOR1 的 5-8F 细胞膜表面微绒毛数量显著减少, 且微绒毛形态细长、尖头(图 3).

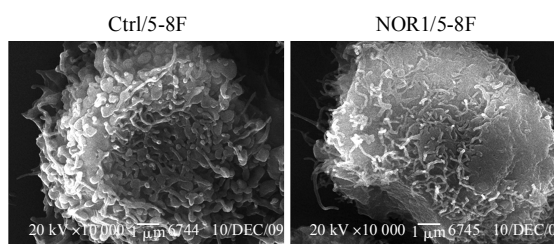


Fig. 3 The microvillus of 5-8F cells expressing NOR1 visualized by scan electron microscope

Ctrl/5-8F: 5-8F cells stably transfected with pIRES.neo3 vector; NOR1, 5-8F cells stably transfected with NOR1 gene.

2.4 稳定转染 NOR1 引起 5-8F 细胞骨架重新分布

稳定转染 NOR1 基因引起 5-8F 细胞形态的改变促使我们进一步观察 NOR1 对细胞骨架的影响. 鬼笔环肽(phalloidin)可以特异性结合细胞骨架的主要组分——肌动蛋白微丝(actin filament). 利用 FITC 标记的 phalloidin 染色细胞骨架, 荧光显微

镜观察发现, 空载体转染的 5-8F 细胞微丝向细胞周边延伸, 形成明显的片状伪足, 在伪足边缘具有膜皱褶结构(图 4). 与对照细胞相比, 转染 NOR1 基因的 5-8F 细胞的微丝发生了重新分布, 应力纤维(stress fiber)增加, 微丝无法向细胞周边延伸, 未见片状伪足和膜皱褶形成(图 4).

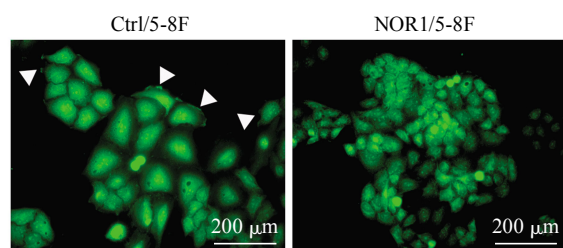


Fig. 4 The actin filament of 5-8F cells expressing NOR1 visualized by phalloidin-FITC

Ctrl/5-8F: 5-8F cells stably transfected with pIRES.neo3 vector; NOR1, 5-8F cells stably transfected with NOR1 gene (white arrows points to the membrane ruffles at the edge of lamellipodia in Ctrl/5-8F cells).

2.5 稳定转染 NOR1 抑制了 5-8F 细胞 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路是调节细胞骨架和伪足形成的重要途径^[6]. 为了探讨 NOR1 影响细胞骨架和片状伪足形成可能的分子机制, 我们随后检测了 NOR1 对 5-8F 细胞 Wnt 信号途径的影响. Realtime RT-PCR 检测发现, 稳定转染 NOR1 引起 Wnt 通路受体分子 FZD5、FZD7 表达下调(图 5a). 通过分离胞浆/胞核组分蛋白, Western blotting 检测发现, 稳定表达 NOR1 的 5-8F 细胞核蛋白中 β -catenin 表达显著降低(图 5b). 进一步采用免疫荧光共聚焦显微镜观察发现, 空载体转染的 5-8F 细胞中 β -catenin 同时分布在胞浆与胞核, 胞核中的 β -catenin 荧光强度较高(图 5c). 稳定转染 NOR1 的 5-8F 细胞中 β -catenin 的定位模式发生明显改变, 主要定位于胞浆, 核内的蛋白质减少(图 5c). 该结果表明稳定表达 NOR1 抑制了 Wnt 信号的活化.

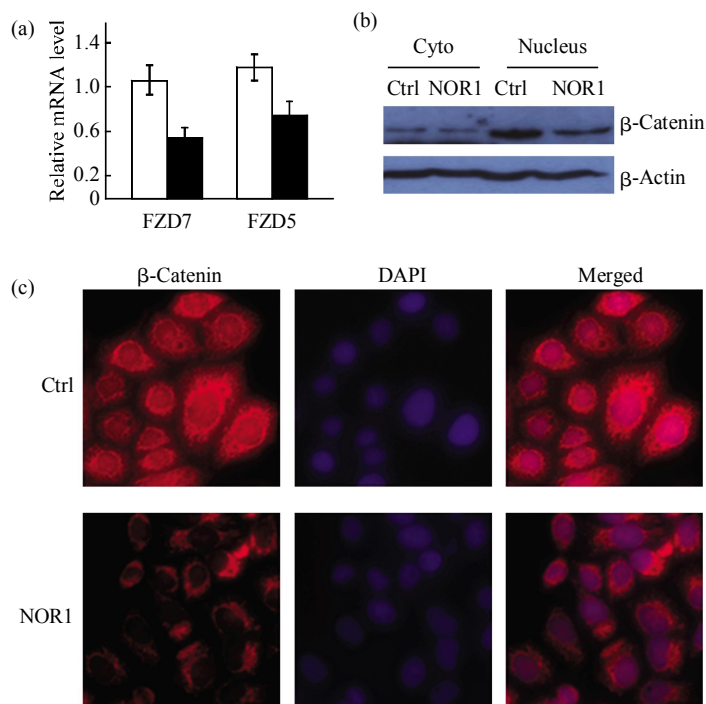


Fig. 5 Overexpression of NOR1 suppresses Wnt/ β -catenin signal activation in 5-8F cells

(a) The expression of FZD7, FZD5 mRNAs was analyzed by realtime RT-PCR in stable NOR1 and control cell lines. GAPDH was used as internal control. $\square$: Ctrl; $\blacksquare$: NOR1. (b) The expression of β -catenin protein in cytoplasm and nucleus was analyzed by Western blot analysis. β -Actin was used as a loading control. (c) The subcellular distribution of β -catenin protein visualized by immunofluorescence. Ctrl: 5-8F cells stably transfected with pIRES.neo3 vector; NOR1, 5-8F cells stably transfected with NOR1 gene.

3 讨 论

细胞骨架是真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 包括微管、微丝和中间丝。细胞骨架不仅与保持细胞形态结构有关, 而且影响细胞-细胞连接、细胞-细胞外基质连接和细胞运动^[7]。本研究利用基因转染的方法, 建立了稳定表达 NOR1 的鼻咽癌 5-8F 细胞系。首次发现稳定表达 NOR1 引起 5-8F 细胞形态改变, 抑制了 5-8F 细胞片状伪足、细胞膜表面微绒毛的形成和 Wnt 信号通路的活化。

片状伪足(lamellipodia)与微绒毛(microvillus)都是由细胞骨架组分——微丝参与构成的膜特化结构。片状伪足是平的、片状膜突起(membrane protrusions), 通常形成于迁移细胞的前缘, 由高度分支的肌动蛋白网络组成。微绒毛是上皮细胞游离面的细胞膜和细胞质伸出的微细指状突起, 内为纵行微丝。本研究分析了转染 NOR1 基因后 5-8F 细胞微丝的变化。结果发现, 对照细胞肌动蛋白纤维多呈网状排列, 呈现较多的片状伪足和膜皱褶结构。稳定转染 NOR1 后细胞微丝应力纤维增加, 网络状肌动蛋白纤维减少, 抑制了片状伪足和膜皱褶的形成。NOR1 引起微丝重新分布, 是其抑制片状伪足和微绒毛形成的原因。现在普遍认为片状伪足附着于基质是细胞迁移的主要驱动力^[8]。也有报道指出, 肿瘤细胞膜表面的微绒毛数量与肿瘤细胞的生长速度和转移能力正相关, 高转移能力的肿瘤细胞膜表面的微绒毛数量多于低转移能力的肿瘤细胞^[9]。NOR1 稳定转染抑制 5-8F 细胞片状伪足与微绒毛的形成, 提示其有可能影响肿瘤细胞的运动与迁移能力。

全基因组芯片筛查发现稳定表达 NOR1 引起 5-8F 细胞 Wnt 通路受体 FZD7、FZD5 分子表达下调(结果未显示)。根据这一线索, 我们在本研究中进一步分析了 NOR1 对 5-8F 细胞 Wnt 信号通路活化的情况。Realtime RT-PCR 检测表明 NOR1 引起 Wnt 受体 FZD7、FZD5 分子表达下调, 通过 Western blotting 和免疫荧光进一步证实 NOR1 抑制了 β -catenin 入核, 表明稳定转染 NOR1 的 5-8F 细胞中 Wnt 信号通路活化受到抑制。Wnt/Frizzled (Fz) 信号途径是控制细胞极性和运动的主要通路^[10]。De Calisto 等^[6]研究发现, 神经嵴细胞分层和 / 或迁移过程中, Wnt-钙途径活化有利于片状伪足和丝状伪足(filopodia)的形成。我们推测, NOR1 可能是通过抑制 Wnt 信号通路的过度活化, 调节细胞

骨架微丝重新分布, 抑制片状伪足和微绒毛的形成。Wnt 信号通路在鼻咽癌组织中过度活化^[11-13]。Wnt 通路的膜受体分子 FZD7、FZD5 以及关键信号传导分子 β -catenin 则在鼻咽癌组织中高表达^[13-15]。导致 Wnt 信号通路在鼻咽癌中过度激活的机制目前尚未完全明了, 有研究证实 Wnt 通路的抑制子 WIF1(Wnt inhibitory factor 1)在鼻咽癌组织中因启动子高甲基化而表达沉默^[11, 16]。EB 病毒则可以通过多种途径激活 Wnt/ β -catenin 通路^[17-19]。本研究提示, NOR1 可能是鼻咽癌细胞 Wnt 通路的负调控因子, NOR1 基因在鼻咽癌组织中表达下调 / 缺失, 可能促进了 Wnt 通路的异常活化。NOR1 负调控 Wnt 信号及其在鼻咽癌细胞运动迁移中的分子机制, 是我们下一步研究的内容。

愈来愈多的研究表明, 片状伪足及微绒毛参与了细胞的多种生命活动, 如肿瘤细胞的运动、代谢等过程。迄今关于细胞骨架及 Wnt 信号通路与肿瘤恶性行为之间的机制尚不完全清楚, 本研究为探讨 Wnt 信号通路在片状伪足及微绒毛形成中的机制提供了新模型。

参 考 文 献

- [1] Li W, Li X, Wang W, *et al.* NOR1 is an HSF1-and NRF1-regulated putative tumor suppressor inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis*, 2011, **32** (9): 1305-1314
- [2] Nie X, Zhang B, Li X, *et al.* Cloning, expression, and mutation analysis of NOR 1, a novel human gene down-regulated in HNE 1 nasopharyngeal carcinoma cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, **129**(7): 410-414
- [3] Xiang B, Yi M, Wang L, *et al.* Preparation of polyclonal antibody specific for NOR1 and detection of its expression pattern in human tissues and nasopharyngeal carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, **41**(9): 754-762
- [4] 熊 炜, 曾朝阳, 肖炳燚, 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
- [5] 聂新民, 桂 嵘, 李登清, 等. 新克隆的基因 NOR1 对鼻咽癌细胞株 HNE1 细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (8): 777-780
Nie X M, Gui R, Li D Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(8): 777-780
- [6] De Calisto J, Araya C, Marchant L, *et al.* Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development*, 2005, **132**(11): 2587-2597
- [7] Luna E J, Hitt A L. Cytoskeleton--plasma membrane interactions.

- Science, 1992, **258**(5084): 955–964
- [8] Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(5): 642–652
- [9] Ren J, Hamada J, Okada F, *et al.* Correlation between the presence of microvilli and the growth or metastatic potential of tumor cells. *Jpn J Cancer Res*, 1990, **81**(9): 920–926
- [10] Habas R, Dawid I B, He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/ Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev*, 2003, **17**(2): 295–309
- [11] Lin Y C, You L, Xu Z, *et al.* Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**(2): 635–640
- [12] Shi W, Bastianutto C, Li A, *et al.* Multiple dysregulated pathways in nasopharyngeal carcinoma revealed by gene expression profiling. *Int J Cancer*, 2006, **119**(10): 2467–2475
- [13] Zeng Z Y, Zhou Y H, Zhang W L, *et al.* Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Hum Pathol*, 2007, **38**(1): 120–133
- [14] Zeng Z, Zhou Y, Xiong W, *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate molecular markers in nasopharyngeal carcinoma using microdissection and cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, **133**(2): 71–81
- [15] Zheng Z, Pan J, Chu B, *et al.* Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and β -catenin in nasopharyngeal carcinoma: Close association with advanced disease stage and lymph node metastasis. *Hum Pathol*, 1999, **30**(4): 458–466
- [16] Chan S L, Cui Y, Van Hasselt A, *et al.* The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. *Lab Invest*, 2007, **87**(7): 644–650
- [17] Webb N, Connolly G, Tellam J, *et al.* Epstein-Barr virus associated modulation of Wnt pathway is not dependent on latent membrane protein-1. *PLoS One*, 2008, **3**(9): e3254
- [18] Wong A M G, Kong K L, Tsang J W H, *et al.* Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer*, 2012, **118**(3): 698–710
- [19] You S, Zhang F, Meng F, *et al.* EBV-encoded LMP1 increases nuclear β -catenin accumulation and its transcriptional activity in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol*, 2011, **32**(4): 623–630

NOR1 Regulates Morphogenetic Cell Behavior *in vitro* Coincident With Inhibition of a Non-canonical Wnt-signaling Cascade*

XIANG Bo^{1,2)}, WANG Wei¹⁾, LI Wen-Juan¹⁾, TANG Ke¹⁾, ZENG Zhao-Yang¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)**}

⁽¹⁾ Cancer Research Institute of Central South University, Changsha 410078, China;

⁽²⁾ Hunan Key Laboratory of Nonresolving Inflammation and Cancer, Changsha 410013, China)

Abstract Oxidored-nitro domain containing protein 1 (NOR1) is a candidate tumor suppressor gene that is down-regulated in nasopharyngeal carcinoma (NPC). In the present study, NOR1 stable transfected NPC 5-8F cells were established. As a result, the 5-8F cells expressing NOR1 showed dramatic morphological changes comparing with the control, such as less lamellipodia protrusions and membrane ruffles at the periphery of the cells. Ectopic expression of NOR1 in NPC 5-8F cells also inhibited microvillus formation on the surface of tumor cells due to filamentous actin rearrangement. Further more, realtime RT-PCR assay revealed that ectopic expression of NOR1 suppressed the expression level of FZD5 and FZD7, and then attenuated β -catenin nuclear translocation. This first report provides experimental proof to probe the function of NOR1 gene in the process of lamellipodia formation and the Wnt signaling in NPC cells.

Key words NOR1, nasopharyngeal carcinoma, lamellipodia, Wnt signaling pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00012

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81000883, 81272254, 81102065, 30971147, 81171930), 111-2-12 from the Programme of Introducing Talents of Discipline to Universities, The Natural Science Foundation of Hunan Province, P.R. China (2011FJ3111, 10JJ7003), The Free Exploration Program of Central South University of China(201012200017, 2011QNZT138) and The Graduate Innovation Foundation of Central South University of China (2010ssxt048, CX2011B051).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-84805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: January 7, 2012 Accepted: March 7, 2012