

# 抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响

王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 张晓梅, 彭 聪, 黄 河, 刘 芬, 李晓玲, 李桂源

王晓艳, 沈守荣, 刘芬, 中南大学湘雅三院消化内科 湖南省长沙市 410013  
刘华英, 彭聪, 黄河, 李晓玲, 李桂源, 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所  
湖南省长沙市 410078  
张晓梅, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410078  
王晓艳, 女, 1970-04-01 生, 河南省郑州市人, 汉族. 1993 年获山西医科大学学士学位, 2003 年获中南大学湘雅医学院博士学位, 主治医师. 主要从事  
消化道肿瘤发病机制研究.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30370801  
湖南省自然科学基金资助项目, No. 01JJY2102 和 03JJY2004  
项目负责人: 沈守荣, 410013, 湖南省长沙市桐梓坡路, 中南大学湘雅三院  
消化内科. ligy@xymu.net.  
电话: 0731-8618450  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-22

## Effects of tumor suppressor gene NGX6 on growth of human colon cancer cell line HT-29

Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Hua-Ying Liu, Xiao-Mei Zhang,  
Cong Peng, He Huang, Fen Liu, Xiao-Ling Li, Gui-Yuan Li

Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Fen Liu, Department of  
Gastroenterology, Third Xiangya Hospital, Central South University,  
Changsha 410013, Hunan Province, China  
Hua-Ying Liu, Cong Peng, He Huang, Xiao-Ling Li, Gui-Yuan Li, Institute  
of Cancer Research, Xiangya School of Medicine, Central South  
University, Changsha 410078, Hunan Province, China  
Xiao-Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital,  
Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.  
30370801, the Natural Science Foundation of Hunan, No.01JJY2102  
and No. 03JJY2004  
Correspondence to: Dr. Shou-Rong Shen, Department of Gastroenterology,  
Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan  
Province, China. ligy@xymu.net  
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-10-22

## Abstract

AIM: NGX6 is a novel tumor suppressor gene candidate, and the expression of NGX6 decreased in colon cancer specimen, which suggested that the down-regulation of NGX6 was closely related to tumorigenesis of colon cancer. This study was designed to explore effects of NGX6 on the cytobiological characteristics of human colon cancer cell line HT-29 and to elucidate the role of NGX6 in the colon cancer.

METHODS: The mammal expression vector of pcDNA3.1(+)/NGX6 was transfected into human colon cancer cell line HT-29 cells by liposome. The integration of the exogenous vector DNA and the expression of NGX6 were detected by dot blot and RT-PCR. Finally, the cytobiological characteristics of positive clone were analyzed by growth curves of cells, MTT, soft agar assay, FCM and xenograft.

RESULTS: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells grew slower than pcDNA3.1(+)/HT-29 and HT-29 cells ( $P < 0.05$ ), and the PDT of pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cell was 34.5 hours, which was significantly longer than that of pcDNA3.1(+)/

HT-29 cells (27.1 h) and HT-29 cells (23.0 h). FCM data showed that the overexpression of NGX6 blocked the progression of G1  $\rightarrow$  S phase in cell cycle, and it also presented decreased clonogenicity in soft agar assay and tumor formation in nude mice.

CONCLUSION: The re-expression of NGX6 can reverse the malignant phenotype of human colon cancer cell line HT-29. Therefore, NGX6 gene may be a good candidate of tumor suppressor gene associated with colon cancer.

Wang XY, Shen SR, Liu HY, Zhang XM, Peng C, Huang H, Liu F, Li XL, Li GY. Effects of tumor suppressor gene NGX6 on growth of human colon cancer cell line HT-29. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):574-579

## 摘要

目的: NGX6 是新克隆的候选抑瘤基因, 其在结肠癌组织中表达明显下调, 提示 NGX6 的差异表达与结肠癌发生有关. 本文通过研究 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生物学特性的影响以明确 NGX6 在结肠癌发生发展中的作用.

方法: 脂质体介导 pcDNA3.1(+)/NGX6 重组体转染低表达 NGX6 的人结肠癌细胞 HT-29, Dot blot 及 RT-PCR 方法检测外源性 NGX6 基因的表达, 借助生长曲线、MTT、软琼脂集落形成、流式细胞仪、裸鼠成瘤实验对 NGX6 转染前后人结肠癌细胞 HT-29 的生物学行为进行检测.

结果: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞生长速度比 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组明显减慢 ( $P < 0.05$ ), 其倍增时间为 34.5 h 比 pcDNA3.1(+)/HT-29 (27.1 h) 和 HT-29 (23.0 h) 延长; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组软琼脂集落形成率较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ ); 流式细胞仪检测 NGX6 高表达能延缓 HT-29 细胞周期由 G0/G1 期  $\rightarrow$  S 期的进程; 裸鼠成瘤实验表明 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组成瘤受抑.

结论: NGX6 的重表达可逆转人结肠癌细胞 HT-29 的恶性表型; NGX6 是极具前途的结肠癌相关抑瘤基因候选者.

王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 张晓梅, 彭聪, 黄河, 刘芬, 李晓玲, 李桂源. 抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):574-579

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/574.asp>

## 0 引言

结肠癌是最常见的人类恶性肿瘤之一<sup>[1-10]</sup>, 在北美和欧洲结肠癌是癌相关性死亡的主要原因<sup>[11]</sup>; 在我国其发病率正以每年 2.4% 的速度增长. 研究表明结肠癌中存在

EGF/EGFR 高表达, 其与结肠癌的恶性转化、增生、浸润及不良预后有密切关系<sup>[12-16]</sup>, 抗 EGF/EGFR 治疗可逆转结肠癌的恶性表型<sup>[17]</sup>. 生物信息学预测 NGX6 蛋白具有 EGF-like 结构域, 其可明显地抑制鼻咽癌细胞的增生, 提示 NGX6 可能具有负性调控 EGFR 的作用<sup>[18-20]</sup>. 文献报道 NGX6 基因低表达与结肠癌的发生、转移密切相关. 上述研究结果提示 NGX6 在结肠癌中可能通过影响 EGFR 的活性及表达而抑制结肠癌的发生和增生<sup>[21]</sup>. 为进一步明确 NGX6 在结肠癌中的作用, 我们建立了稳定表达 NGX6 的人结肠癌细胞 HT-29, 通过生长曲线、MTT、软琼脂集落形成、裸鼠成瘤实验, 分析 NGX6 基因对人结肠癌细胞 HT-29 生物学行为的影响, 以阐明其在结肠癌发生、发展、分化中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 低分化人结肠癌细胞 HT-29, 用含 120 ml/L 胎牛血清的 DMEM, 50 ml/L 的 CO<sub>2</sub>, 37 °C 条件下培养; pcDNA3.1(+)/NGX6 重组体为哺乳动物高效表达载体 (由湘雅医学院肿瘤研究所李江博士惠赠); Balb/c 裸鼠, ♂, 4 周龄, 购于中国科学院上海药物研究所动物中心, 在湘雅医学院动物学部无菌饲养; 随机引物标记试剂盒、反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、Taq 酶、限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 均购自美国 Promega 公司; 脂质体、TrizolTM 试剂、蛋白酶 K 和 RNA 酶为美国 GIBCOL 公司产品; DNA 抽提纯化试剂盒 (小量质粒快速抽提纯化试剂盒、大量质粒快速抽提纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒) 购自上海舜华生物工程有限公司; 同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京福瑞公司; 胎牛血清, DMEM 培养基购自华美生物工程公司; 三对引物由上海博亚生物技术有限公司合成: GAPDH 的两条引物为: L: 5' - CCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'; R: 5' - TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' 其扩增目的片段为 402 bp; NGX6: L: 5' - GTGCGTGTGGAAACATCATC-3'; R: 5' - TTTGGAACAGGTCACTGCTG-3', 其扩增目的片段为 520 bp; pCDNA3.1(+): L: 5' - TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT-3'; R: 5' - TCATTTGCAACCCAGAGTC-3', 扩增片段为 498 bp.

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒 DNA 的提取步骤** 按小量质粒快速抽提纯化试剂盒操作程序提取. 培养细胞基因组 DNA 抽提用刮棒将细胞收集入 1 mL 的 PBS 中, 按照《分子克隆实验指南》步骤操作. 培养细胞总 RNA 的提取按 TrizolTM 试剂盒 (GIBCOL 公司) 操作程序提取. 差异 RT-PCR: 先用 DNase-I 消化 RNA 中痕量的 DNA. 按反转录试剂盒操作程序作反转录反应, 反应体积 20  $\mu$ L, 模板 RNA 4  $\mu$ g, 反应结束后, 95 °C, 10 min 终止反转录反应. PCR 反应体系 50  $\mu$ L 中含 KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, Tris HCl 10 mmol/L, pH 8.0, 上下游引物 0.1 mmol/L, 模板 cDNA 5 M I, TaqDNA 聚合酶 3U, 石蜡油覆盖. 为客观地反映 mRNA 表达的相

对水平, 在 NGX6 及内对照 GAPDH 达到 PCR 平台期前结束 PCR. 采用下列参数进行差异 PCR: 94 °C, 50 s; 55-58 °C, 50 s; 72 °C, 50 s; 取 PCR 产物 5  $\mu$ L, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下照相. RT-PCR 产物琼脂糖电泳照片和 Dot blotX 光片结果用 TIPAS98 图像分析仪进行灰度扫描, 测定产物条带面积的积分光密度 A 值 (IA). NGX6 的相对量 (IA 比值) = NGX6 的 IA / 内对照 GAPDH 的 IA.

**1.2.2 质粒 DNA 的转染** 在 6 孔板中, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个 HT-29 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 40-60% 融合期. 取重组体 DNA 4  $\mu$ g 及脂质体 10  $\mu$ L 转染细胞, 24 h 后更换完全培养基继续培养. 48 h 后, 用选择性培养基 (G418 浓度: 1-3 d 为 250 mg/L, 以后为 550 mg/L) 筛选抗性克隆, 18 d 后挑单个克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系.

**1.2.3 DNA 探针的制备** 以 NGX6 cDNA 为模板, PCR 扩增 NGX6 的产物, PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为标记物, 采用随机引物标记试剂盒分别标记 NGX6 及 GAPDH 基因的探针, 标记 DNA 量为 50-100 ng, 探针的比放射活性大于  $1 \times 10^8$  cpm/g. Sephadex G-50 柱纯化探针. 探针杂交: 将 total RNA 10  $\mu$ g 通过多孔过滤加样器加样于尼龙膜上, 凉干尼龙膜, 1.5 J/cm<sup>2</sup> 紫外线将 RNA 与尼龙膜交联, 真空凝胶干燥仪上 80 °C 干烤 2 h. 同一张膜先后与 NGX6 探针和 GAPDH 探针杂交, -70 °C 放射自显影 3 d; 取 X 光片显影, 定影.

**1.2.4 细胞生长** 将 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞各取  $1 \times 10^4$  个接种于 24 孔板内, 每隔 24 h 消化 3 孔细胞计数, 每孔计数 3 遍, 取均值. 共记数 8 d, 以细胞数为纵坐标, 时间为横坐标绘出生长曲线. 数据分别采用 t 检验和配伍组多样本间均数比较处理, 并计算生长期细胞的倍增时间. 四唑盐 (MTT) 比色法: 按《细胞培养》步骤操作, 酶联免疫检测仪上测定各孔 490 nm 波长处的吸光度 A 值, 数据经统计学软件 SPSS 11.0 处理. 软琼脂集落形成: 配制 5 g/L 的底层琼脂, 凝固后将含单细胞的 3.3 g/L 顶层琼脂培养液接种于底层琼脂上, 每种细胞接种 5 皿, 接种密度为  $2.0 \times 10^4$  细胞 / 平皿. 在含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的 37 °C 生化培养箱中培养 15 d, 计算平均集落形成率, 数据经统计学软件 SPSS 11.0 处理. 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数  $\times 100\%$ . 流式细胞术: 取生长状态良好、融合至 70-80% 的 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29 三组细胞 PBS 洗涤, 700 mL/L 乙醇固定, 调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$  /L, 加入 PI 染液, 流式细胞仪分析细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例及细胞凋亡的百分率. 裸鼠成瘤: 以  $3 \times 10^7$  个细胞 / 只裸鼠的浓度, 将 HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29 三组细胞接种于 4 周龄裸鼠的前肢腋下, 每组 3 只, 每隔 3 d 测量裸鼠移植瘤体

积的大小. 30 d后处死裸鼠, 测量移植瘤体积及重量, 并用甲醛固定石蜡包埋制成病理切片做 HE 染色.

## 2 结果

2.1 双酶切鉴定 NGX6/pcDNA3.1(+)重组体 EcoR I 和 Xho I 双酶酶切 5 组转化细菌 JM109 的重组体, 均切出 5.4 Kb 的 pcDNA3.1(+)载体的及 2.1 Kb 的 NGX6 片段 (图 1), 表明重组体均含 NGX6 阅读框架的全长.

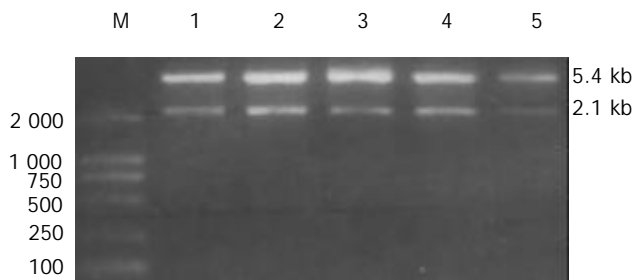


图1 重组体质粒双酶切鉴定结果. M: DL2000Marker; 1-5 为载体重组体酶切后产物均为阳性克隆.

2.2 NGX6 基因重组体的脂质体转染和克隆筛选 分别挑选 11 个转染 pcDNA3.1(+)/NGX6 及 4 个转染 pcDNA3.1(+) 的抗性克隆扩大培养, RT-PCR 和 Dot blot 鉴定克隆的阳性率, 11 个 pcDNA3.1(+)/NGX6 克隆中 2 个克隆(+2、+10 号)灰度扫描 IA 值与空白组的 IA 值之比大于 1.5 (图 2); 4 个转染 pcDNA3.1(+) 的抗性克隆中 -4 和 -6 号质粒的表达量高 (图 3). 点杂交鉴定结果与 RT-PCR 结果一致 (图 4). 以下实验分别选 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组的 +10 号克隆为阳性组、pcDNA3.1(+)/HT-29 的 -6 号克隆和 HT-29 组为阴性对照组.

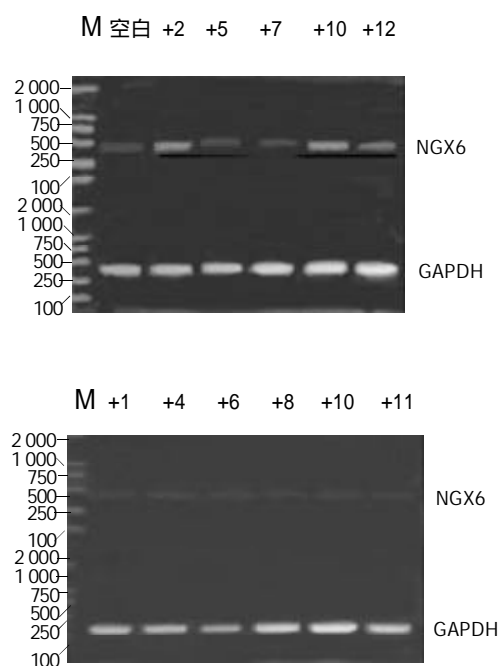


图2 pcDNA3.1(+)/NGX6 转染 HT-29 细胞抗性克隆的 RT-PCR 鉴定结果. M: DL 2 000 marker;空白为未转染的 HT-29 克隆; +2~+12 为转染 pcDNA3.1(+)/NGX6 重组体的克隆, 其中 +2, +10 为阳性克隆.

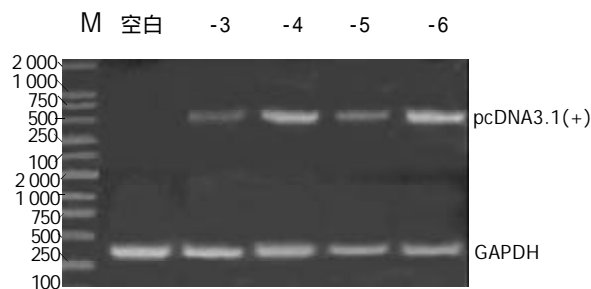


图3 pcDNA3.1(+)转染 HT-29 细胞抗性克隆的 RT-PCR 鉴定结果. M: DL 2000 marker; 空白: 为未转染 HT-29 组; -3~-6 为 pcDNA3.1(+) 转染组均阳性; -4, -6 克隆 pcDNA3.1(+) 表达量高.

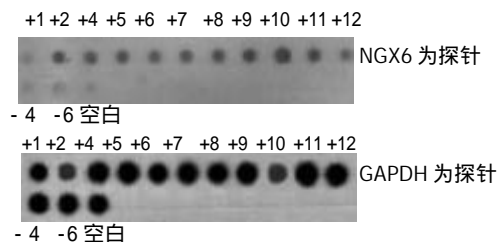


图4 pcDNA3.1(+)/NGX6 和 pcDNA3.1(+)转染的 HT-29 抗性克隆分别以 NGX6, GAPDH 为探针的点杂交鉴定结果.

2.3 NGX6 对 HT-29 细胞生物学性状的影响 绘制 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞的生长曲线 (图 5), 结果表明 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞的生长速度比 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组明显降低,  $t$  检验和方差分析 ( $P < 0.05$ ). 根据公式  $T_0 = t \times \log 2 / (\log NT - \log N_0)$  得出 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的倍增时间分别为 34.5 h、27.1 h 和 23.0 h (图 6). 酶联免疫检测仪测定 96 孔板中 3 组细胞分别在 490 nm 波长处的吸光度, 结果表明 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的吸光值明显较 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组高, HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组吸光度  $\text{mean} \pm \text{SD}$  分别为  $0.67 \pm 0.07$ ,  $0.64 \pm 0.05$ ,  $0.50 \pm 0.04$ , 统计学分析 ( $t$  检验和方差分析) ( $P < 0.05$ ), 表明 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞生长速度较另外两组明显减慢. pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的平均集落形成率分别为 4.11%、10.54% 和 9.69%, 阳性组克隆形成率明显降低 ( $P < 0.05$ ) (图 7), 且 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组集落生长速度较 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组慢, 集落体积小, 克隆存活时间缩短. 上述结果表明在体外 NGX6 基因能抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增生. 流式细胞仪检测结果显示 3 组细胞凋亡率无明显差别; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组 G1/G0 期细胞分布的百分比分别为 61.8%、38.1% 和 40.85%, 3 组细胞 S 期的百分比分别为 13.0%、23.0% 和 23.8%, 表明 NGX6 转染后能延缓 HT-29 细胞周期由 G1  $\rightarrow$  S 期的进程. 将 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞分别注射 3 组裸鼠, 每组 3 只, 每只裸鼠接种  $3 \times 10^7$  个肿瘤细胞, 4-5 d 可见到皮下

包块, HT-29 和 pcDNA3.1(+)/HT-29 组肿块生长速度较快, 且于 15 d 时肿块坏死脱落; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组的肿块生长较慢, 瘤体从 24 d 开始坏死(图 8). 3 组移植瘤石蜡切片 HE 染色显示均为低分化腺癌, 无组间差别. pcDNA3.1(+)/HT-29 组移植瘤 HE 染色发现肿瘤包膜断裂, 瘤体内有血管瘤栓形成, 而 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组血管壁结构完整, 未见瘤细胞浸润(图 9).

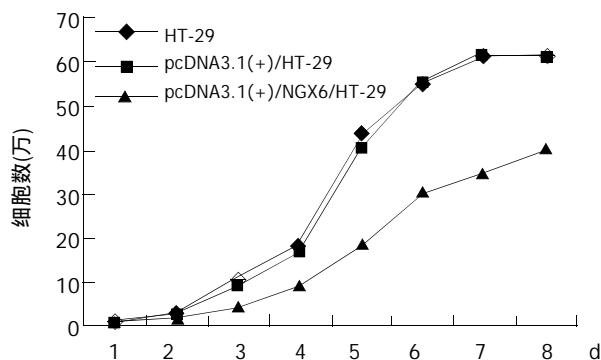


图 5 NGX6 基因转染前后的 HT-29 细胞生长曲线.

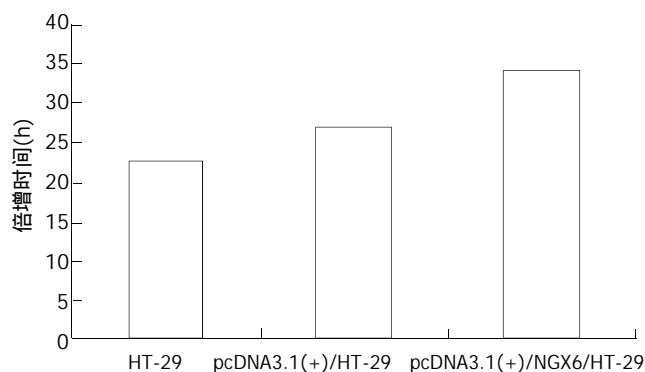


图 6 NGX6 转染对结肠癌细胞 HT-29 倍增时间的影响.

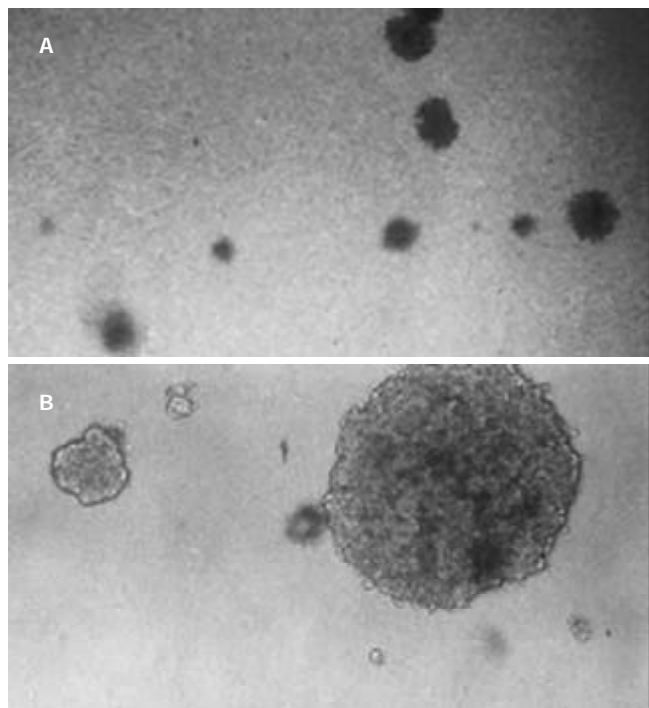


图 7 NGX6 转染前后 HT-29 细胞的软琼脂集落形成. A: HT-29 组( $\times 100$ ); B: HT-29 组( $\times 400$ ); C: pcDNA3.1(+)组( $\times 100$ ); D: pcDNA3.1(+)组( $\times 400$ ); E: pcDNA3.1(+)/NGX6 组( $\times 100$ ); F: pcDNA3.1(+)/NGX6 组( $\times 400$ ); G: HT-29 和 pcDNA3.1(+)/HT-29 组克隆数多, 体积大; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组克隆数明显减少, 体积小.

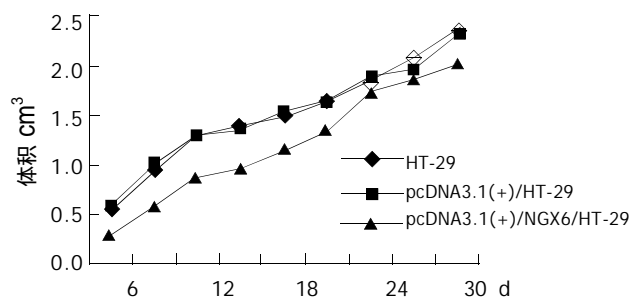


图 8 NGX6 转染前后裸鼠移植瘤体积变化.



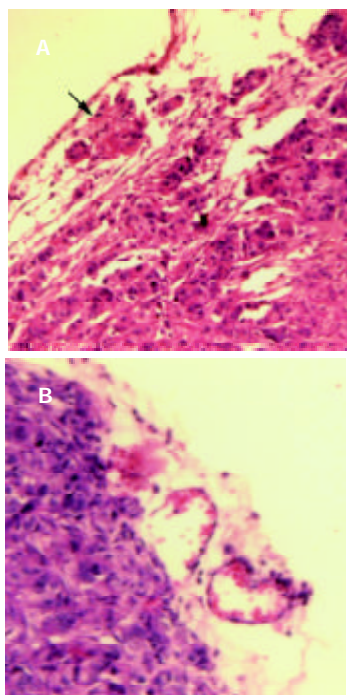


图9 pcDNA3.1(+)/HT-29和pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组移植瘤HE ( $\times 200$ ); A pcDNA3.1(+)/HT-29组移植瘤可见瘤体包膜断裂、不完整, 箭头所示处血管瘤栓形成; B pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组移植瘤内血管壁完整, 未见瘤细胞侵犯。

### 3 讨论

结肠癌的发生涉及到瘤基因的激活和抑瘤基因的失活<sup>[22-23]</sup>. Vogelstein实验室建立了经典的“APC  $\rightarrow$  K-ras  $\rightarrow$  DCC  $\rightarrow$  p53  $\rightarrow$  nm23”的结肠癌发病机制模式<sup>[24]</sup>, 但结肠癌的发生存在多样性<sup>[25]</sup>. NGX6基因(AF188239)是新克隆的候选抑瘤基因, 生物信息学预测NGX6位于染色体的9p11.1-12区域, cDNA全长2.1 Kb, 基因编码338个氨基酸, 具有两个跨膜结构, 一个EGF-like domain, 多个N-糖基化位点和多个酪氨酸磷酸激酶位点<sup>[26]</sup>. EGFR与结肠癌的恶性转化、增生、浸润及不良预后有密切关系<sup>[27-31]</sup>. 最近Williams在结肠癌中克隆了2个具有EGF-like domain的新基因, 其明显地能抑制结肠癌的增生<sup>[32]</sup>. 上述研究提示NGX6是否通过影响结肠癌中EGFR的活性发挥抑瘤作用? 已有研究表明NGX6表达变化与结肠癌的发生、转移呈负相关<sup>[33]</sup>. 为进一步明确NGX6对结肠癌增生的影响, 将NGX6基因通过脂质体介导转染入NGX6低表达的人结肠癌细胞系HT-29, 建立NGX6稳定表达的人结肠癌细胞系, 探讨NGX6在结肠癌发生、发展中的作用. 结果显示pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组结肠癌细胞较pcDNA3.1(+)/HT-29和HT-29组细胞生长缓慢, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞的倍增时间(34.5 h)比pcDNA3.1(+)/HT-29和HT-29组倍增时间(27.1 h和23.0 h)延长; 软琼脂集落形成实验发现pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组克隆形成率较对照组降低, 克隆体积减小, 克隆存活时间缩短, 强烈表明NGX6重表达可明显地抑制人结肠癌细胞HT-29的克隆形成力. 裸鼠成瘤实验显示pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组的移植瘤体积

有所缩小, 但统计学无明显差别, 可能与每只裸鼠接种瘤细胞数量较多、实验动物较少或与肿瘤在裸鼠体内生长环境复杂, 尚受到其他生长因子刺激有关. 移植瘤病理切片HE染色示3组均为低分化腺癌, 无组间差异. 值得关注的是, pcDNA3.1(+)/HT-29组的病理切片中发现有血管瘤栓形成, 瘤体包膜断裂; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组无此现象. 已有研究表明NGX6在有转移的结肠癌组织中较无转移的结肠癌组织中表达明显下调, 上述结果提示NGX6可能具有抑制结肠癌转移的作用.

肿瘤是一种细胞周期性疾病<sup>[34]</sup>. 细胞周期能否启动进入细胞增生, 其主要在于能否通过G1/S检测点, 细胞一旦通过该检测点, 即使在缺乏生长因子刺激条件下, 细胞也能在cyclins和CDK的驱动下完成该细胞周期<sup>[35]</sup>, 所以G1/S检测点在肿瘤增生中发挥着关键的作用<sup>[36-39]</sup>. 为明确NGX6对结肠癌细胞周期的影响, 采用流式细胞仪检测NGX6转染前后人结肠癌细胞HT-29在细胞周期中的分布, 发现pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞在G0/G1期的细胞数明显增加, S期减少. NGX6转染后G0/G1期与S期细胞数的比值为转染前比值的2.24倍, 形成G0/G1期阻滞, 表明NGX6明显延缓人结肠癌细胞HT-29细胞周期由G1  $\rightarrow$  S期的进程, 纠正细胞的失控性增长, 逆转人结肠癌细胞的恶性表型. 综上所述, 新候选抑瘤基因NGX6可抑制人结肠癌细胞系HT-29增生. NGX6符合抑瘤基因的基本条件: (1)基因在相应的正常组织中表达; (2)在肿瘤组织中有该基因功能失活或结构改变或表达缺陷; (3)将基因野生型导入基因异常的肿瘤细胞内, 可全部或部分改变其恶性表型. 因此NGX6为新的结肠癌相关抑瘤基因. 同时研究还发现NGX6可能具有结肠癌转移抑制作用, 正在进行进一步的研究以明确NGX6在结肠癌转移中的作用.

### 4 参考文献

- 1 Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- 2 Ji CY, Smith DR, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:216-223
- 3 谢正勇, 卿三华. 国人青年结肠癌解剖部位分布及临床病理特点. *世界华人消化杂志* 2003;11:1050-1053
- 4 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1976-1980
- 5 Yan W, Wang WL, Zhu F, Chen SQ, Li QL, Wang L. Isolation of a novel member of small G protein superfamily and its expression in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1719-1724
- 6 Cai KL, Wang GB, Xiong LJ. Effects of carbon dioxide and nitrogen on adhesive growth and expression of E-cadherin and VEGF of human colon cancer cell CCL-228. *World J Gastroenterol* 2003;9:1594-1597
- 7 Zhu JW, Yu BM, Ji YB, Zheng MH, Li DH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:153-157
- 8 袁耀宗, 王琴, 徐家裕, 周文达, 俞莺莺, 罗伟. 抗结肠直肠癌单克隆抗体测定胃、肠癌患者血清中癌相关抗原. *新消化病学* 1995;3:3-4

- 9 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇. DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:1645-1646
- 10 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青. 胃泌素拮抗剂增加 C D 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1385-1388
- 11 Clarke LE, Leitzel K, Smith J, Ali SM, Lipton A. Epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of patients with pancreatic, lung, and colon carcinomas detected by RT-PCR. *Int J Oncol* 2003;22:425-430
- 12 王青, 吴金生, 高德明, 赖大年, 马庆久. EGF 受体和转化生长因子  $\alpha$ -mRNA 在人大肠癌组织的表达意义. 世界华人消化杂志 1999;7:590-592
- 13 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 人结肠癌中 EGFR、EGF 及 TGF- $\alpha$  的基因表达. 中国医学科学院学报 1994;16:259
- 14 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 表皮生长因子受体单克隆抗体抗人结肠癌 LST174 的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:841
- 15 Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003;97:960-968
- 16 Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American joint committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-1346
- 17 Gainet M, Guardiola E, Dufresne A, Pivot X. Epidermal growth factor receptors (EGFR): a new target for anticancer therapy. *Cancer Radiother* 2003;7:195-199
- 18 Xiong W, Zeng ZY, Li XL. Single-nucleotide polymorphisms in NGX6 gene and their correlation with nasopharyngeal carcinoma. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002;34:512-515
- 19 李江, 谭琛, 向秋. 用双向电泳和质谱技术检测 NGX6 转染后人鼻咽癌细胞表达差异的蛋白质. 生物化学与生物物理进展 2001;28:573-578
- 20 李小玲, 李江, 黄宇琛. 人鼻咽癌相关基因 NGX6 在大肠杆菌中的诱导表达及纯化. 生命科学研究 2003;7:151-155
- 21 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 NGX6 的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:873-876
- 22 许昌泰, 闫小君. p53 抗癌基因和消化系统肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:77-79
- 23 Watanabe N. Oncogene and tumor suppressor gene. *Rinsho Byori* 2002;123(Suppl):131-136
- 24 Zajac V, Tomka M, Ilencikova D, Majek P, Stevurkova V, Kirchhoff T. A double germline mutations in the APC and p53 genes. *Neoplasma* 2000;47:335-341
- 25 Vecsey-Semjen B, Becker KF, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E, Huber LA. Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene* 2002;21:4646-4662
- 26 谢奕, 宾亮华, 阳剑波. 一个在鼻咽癌中表达下调的新基因 NAG-7 的克隆及其特征分析. 中华医学杂志 2001;114:530-534
- 27 Takahashi Y, Ellis LM, Wilson MR, Bucana CD, Kitadai Y, Fidler IJ. Progressive upregulation of metastasis-related genes in human colon cancer cells implanted into the cecum of nude mice. *Oncol Res* 1996;8:163-169
- 28 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:3-9
- 29 Radinsky R, Risin, Fan, Dong, Bielenberg, Bucana, Fidler. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:19-31
- 30 De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, Peeters PM, Slooff MJ, De Vries EG. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 1998;28:971-979
- 31 Parker C, Roseman BJ, Bucana CD, Tsan R, Radinsky R. Preferential activation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma liver metastases in nude mice. *J Histochem Cytochem* 1998;46:595-602
- 32 Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999;59:4083-4089
- 33 Zhang XM, Wang XY, Sheng SR, Wang JR, Li J. Expression of tumor related genes NGX6, NAG 7 BRD7 in gastric cancer and colonorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1729-1733
- 34 金顺钱, 詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 35 曾益新. 肿瘤学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999:108-109
- 36 Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS* 2003;111:252-265
- 37 Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002;1:103-110
- 38 Michalides RJ, van de Brekel M, Balm F. Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck* 2002;24:694-704
- 39 Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-231