

抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞凋亡的影响*

连平¹⁾ 郭勤¹⁾ 彭娅¹⁾ 肖志明¹⁾ 刘芬¹⁾ 王晓艳¹⁾ 沈守荣^{1)**} 李桂源²⁾

(¹⁾中南大学湘雅三医院消化内科, 长沙 410013; (²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 NGX6 基因是中南大学肿瘤研究所分子遗传室在对鼻咽癌研究中筛选克隆出的一个新基因。以稳定转染并表达 NGX6 基因的 HT-29 细胞为实验组, 转染空白质粒的 HT-29 细胞以及 HT-29 细胞为对照组, 利用 PI/Annexin-V 双染流式细胞仪检测结肠癌细胞的凋亡情况, 通过 EMSA 分析体外培养的结肠癌细胞及种植瘤细胞内核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活情况。研究表明: 在裸鼠结肠癌种植瘤中, 转染了 NGX6 基因的与未转染及空白载体组比较, 结肠癌细胞凋亡率明显增高; EMSA (electrophoretic mobility shift assay)分析体外培养的结肠癌细胞及种植瘤细胞内核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活情况, 发现转染了 NGX6 基因的细胞 NF- κ B 的激活均明显受到抑制。此研究说明, NGX6 基因具有诱导结肠癌细胞凋亡的能力, 其可能的机制是抑制了结肠癌细胞 NF- κ B 的激活。

关键词 结肠癌, NGX6 基因, 裸鼠, 凋亡

学科分类号 R73

结肠癌是最常见的人类恶性肿瘤之一, 在我国, 其发病率近年来也呈上升趋势。NGX6 基因是中南大学肿瘤研究所分子遗传室采用定位候选克隆策略克隆的候选抑瘤基因(基因登录号: AF188239)^[1,2], 将 NGX6 基因分别转染鼻咽癌和结肠癌细胞之后可以使鼻咽癌细胞和结肠癌细胞的恶性表型得到部分逆转^[3,4], 为进一步明确 NGX6 在结肠癌中的作用, 我们利用 PI/Annexin-V 双染流式细胞仪检测其对结肠癌凋亡的影响, 并通过 EMSA 实验分析其对 NF- κ B 激活的影响, 来探讨其在结肠癌发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

低分化结肠癌细胞系 HT-29 与转染空白质粒载体 pcDNA3.1(+)/HT-29 以及稳定转染 NGX6 基因的 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29, 用含 120 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基, 50 ml/L 的 CO₂, 37℃ 条件下培养; 4 周龄雄性 Balbc/c 裸鼠, 体重 18~22 g, 购自中国科学院上海药物研究所动物中心, 饲养于湘雅医学院动物学部, 无菌净化屏障系统内饲养; 随机引物标记盒、逆转录试剂盒、Taq 酶购自美国 Promega 公司; Trizol™ 试剂购自美国 GIBCOL 公司; 胎牛血清, DMEM 培养基购自华美

生物工程公司; Mouse anti-NGX6 购自 BD 公司; Rabbit anti-mouse IgG 购自 Sigma 公司; ECL 化学发光检测试剂盒、蛋白质浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司; TEMED, 尼龙膜, 硝酸纤维素膜购自 Amersham Pharmacia 公司; AO/EB 购自 Fluka 公司; 核蛋白抽提试剂盒购自 Chemicon 公司; [γ -³²P]ATP 购自北京福瑞生物工程公司核酸研究室; PI/Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自 Bender 公司; EMSA/Gel-Shift 试剂盒购自浙江碧云天公司; PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成;

a. 内对照 GAPDH 的引物: L, 5' TGACCTGTTCC-AAAGAGTCCCTG 3', R, 5' GCAGCTTCCAGCA-CATATCGACT 3', 扩增目的片段为 700 bp;

b. NGX6 基因的引物: L, 5' CAACAGCCTCAA-GATCATCAGCA 3', R, 5' GAGGAGGGGAGA-TTCAGTGTGGT 3', 扩增目的片段为 498 bp。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 实验. 利用 Trizol™ 试剂分别抽提

* 国家自然科学基金(30370801, 30770972), 湖南省自然科学基金(06JJY20068)和中南大学研究生学位论文创新工程(040144)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-8618457 E-mail: ssr_35403@163.com

收稿日期: 2008-01-23, 接受日期: 2008-05-23

HT-29、pcDNA3.1 (+)/HT-29 和 pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 三组细胞总 RNA, 用 DNase- I 消化 RNA 中的痕量 DNA, 按逆转录试剂盒操作程序进行逆转录, 然后先加 0.1 mmol/L NGX6 基因目的片段上、下游引物按下列参数进行 PCR: 94℃, 1 min; 57℃, 40 s; 72℃, 1 min; 5 个循环后加入 5 mmol/L GAPDH 上、下游引物混合液 1 μ l, 继续进行 25 个循环终止. PCR 结果的琼脂糖电泳照片用 TIPAS98 图像分析仪的图像分析系统进行灰度扫描.

1.2.2 Western blot. a. 按《分子生物学》步骤操作制备培养细胞的蛋白质, BCA 法测定蛋白质的浓度. b. 电泳: 每泳道上样 50 μ g, 先 80 V 2 h, 再 120 V 5 h, 4℃ 冷室中进行. c. 电泳结束后, 用湿转移法将蛋白质转移到硝酸纤维膜上. 湿转移法为 16 h, 4℃ 冷室中进行. d. 取下硝酸纤维膜用 S- 丽春红染色, 观察转膜效率. 3% 脱脂牛奶-TBS 封闭硝酸纤维膜, 室温下摇 1 h. 用 TBS 洗 2 次. e. 加入一抗(以 TBS 稀释, 浓度依抗体而定), 4℃ 摇过夜, TBS 洗 4 次, 每次 5 min. f. 加入二抗(以 TBS 稀释, 浓度依抗体而定), 室温摇 1~2 h, TBS 洗 4 次, 每次 5 min. g. 用 Pirece 公司的 ECL 试剂盒进行化学发光检测. X 光片压片、显影、定影.

1.2.3 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.

1.2.4 裸鼠成瘤实验. 取对数生长期的 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 三组癌细胞悬液 0.1 ml(5×10^7 /ml), 接种于 4 周龄裸鼠的前肢腋下, 定时观测裸鼠生长情况及移植瘤生长情况, 30 天后处死裸鼠, 测量裸鼠以及移植瘤重量, 并用甲醛固定, 石蜡包埋, 制成病理切片做 HE 染色.

1.2.5 流式细胞仪 PI/Annexin-V 双染法检测细胞凋亡率^[9]. a. 培养细胞. pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29、HT-29 细胞常规培养, 待对数生长期消化收集细胞, PBS 液 250 g 离心 5 min, 洗涤 1 次(种植瘤细胞取新鲜瘤组织块大小约 1 mm, 置于 PBS 液中剪碎, 边剪边在 PBS 液中搅动, 剪碎后用 200 目和 300 目尼龙网各过滤一次, 250 g 离心 5 min 去除上清液, PBS 液 250 g 离心 5 min 洗涤 2 次); b. 用结合液重悬细胞, 将细胞浓度调整至 5×10^6 /ml; c. 取 195 μ l 细胞悬液,

加 Annexin V-FITC 荧光染液, 混匀室温孵育 10 min; d. 250 g 离心 5 min, 用 190 μ l 结合液重悬细胞, 加 10 μ l 浓度为 20 mg/L 的 PI 荧光染液, 立即上机检测.

1.2.6 EMSA. a. 按核蛋白抽提试剂盒说明制备培养细胞的细胞核蛋白质. b. 以 5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3' 为序 3' TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G 5' 列制备 EMSA 探针. c. 按 EMSA/Gel-Shift 试剂盒说明进行 EMSA 结合反应: 用 0.5 $\times$ TBE 作为电泳液. 按照 10 V/cm 的电压预电泳 10 min. 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内. 在多余的某个上样孔内加入 10 μ l 稀释好的 1 $\times$ EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(蓝色), 用于观察电泳进行的情况. 按照 10 V/cm 的电压电泳. 确保胶的温度不超过 30℃, 如果温度升高, 需要适当降低电压. 电泳至 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝至胶的下缘 1/4 处, 停止电泳. d. 干胶仪器上干燥 EMSA 胶. 然后用 X 光片压片检测.

1.2.7 统计学处理. 应用 SPSS11.0 统计分析软件对所得数据进行相关检验, 检验水准 $P=0.05$.

2 结 果

2.1 NGX6 基因在转染细胞系 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 中的表达

NGX6 基因在结肠癌细胞系 HT-29 中低表达, 我们利用脂质体转染的方法将含 NGX6 基因的真核表达载体导入 HT-29 细胞中, 建立 NGX6 基因稳定高表达的转染细胞系以研究该基因对结肠癌 HT-29 细胞的影响. 图 1 为 RT-PCR 鉴定 NGX6 基因在转染细胞系 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 中表达的结果. NGX6 基因在 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29

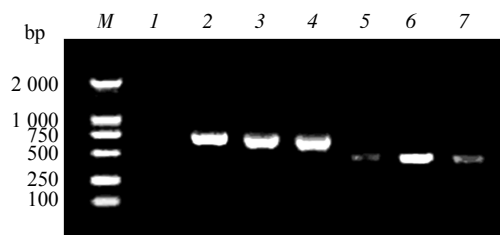


Fig. 1 RT-PCR analysis of NGX6 gene expression in HT-29

M: DL-2000; 1: H₂O, negative control; 2: HT-29 group; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group; 4: pcDNA3.1(+)/HT-29 group; 5: HT-29 group; 6: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group; 7: pcDNA3.1(+)/HT-29 group. 2, 3, 4 GAPDH: 700 bp; 5, 6, 7 NGX6: 498 bp.

细胞中表达量最高, 而 pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞和未转染的 HT-29 细胞表达量很少.

2.2 NGX6 基因在转染细胞系 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 中的蛋白质表达

Western blot 结果表明, 在转染细胞系 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 中 NGX6 基因蛋白质表达最高, pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞和未转染的 HT-29 细胞表达量很少(图 2).

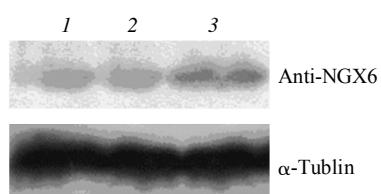


Fig. 2 Western blot of NGX6 in HT-29

1: HT-29 group; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29 group; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group. α -Tubulin was used as an internal control.

Table 2 Flow cytometric analysis of apoptosis in HT-29 cells

Group	Number of example	Living cell rate	Apoptosis cell rate	Dead cell rate
HT-29	10	94.97 $\pm$ 1.01	4.03 $\pm$ 0.26	1.03 $\pm$ 0.11
pcDNA3.1(+)/ HT-29	10	94.65 $\pm$ 0.96	3.96 $\pm$ 0.41	1.05 $\pm$ 0.09
pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29	10	95.53 $\pm$ 1.23	3.96 $\pm$ 0.37	0.98 $\pm$ 0.10

The comparison of living cell rate and apoptosis cell rate and dead cell rate in three groups of carcinoma cell, $P > 0.05$.

胞膜的磷脂双分子层排列整齐, 但是如果细胞损伤时, 磷脂双分子层的排列就会被打乱, 内层的可能会翻转到外层, Annexin-V 就可以检测到这种现象. 因此细胞处于凋亡或坏死时, Annexin-V 为阳性, 但是只有坏死的细胞 PI 是阳性. 所以, 用荧光标记的 annexin-V 与 PI 双染色, 可同时区分活细胞、凋亡早期和凋亡晚期或坏死细胞. PI/Annexin-V 双染流式细胞仪检测 HT-29、pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 三组细胞凋亡率无显著差别, 统计学分析无意义(表 2).

2.5 EMSA 分析 NGX6 对结肠癌 HT-29 细胞 NF- κ B 的影响

EMSA 结果表明, 转染了 NGX6 基因的 HT-29 细胞与未转染 NGX6 基因的 HT-29 细胞及转染空白载体的 HT-29 细胞相比, NF- κ B 激活明显受到抑制(图 3).

2.3 MTT 比色法检测 NGX6 对结肠癌细胞增殖的影响

Table 1 The comparison of MTT assay in three groups of carcinoma cells

Group	Number of example	MTT A Value
HT-29	9	0.81 $\pm$ 0.11
pcDNA3.1(+)/ HT-29	9	0.79 $\pm$ 0.07*
pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29	9	0.61 $\pm$ 0.04**

The comparison of HT-29 group with pcDNA3.1(+)/ HT-29 group. * $P > 0.05$. The comparison of pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 with HT-29 group and pcDNA3.1(+)/ HT-29 group. ** $P < 0.05$.

2.4 PI/Annexin-V 流式细胞仪检测 NGX6 对结肠癌 HT-29 体外培养细胞凋亡的影响

抗凝剂 annexin-V 与 PS 有很高亲和力, 可以和胞膜内的磷脂酰丝氨酸(PS)特异性结合. 正常细



Fig. 3 EMSA

1: Negative control (marked probe); 2: HT-29 nucleoprotein + marked probe; 3: HT-29 nucleoprotein + marked probe + 100 double unmarked probe; 4: HT-29 nucleoprotein + marked probe + 100 double unmarked mutation probe; 5: Positive control; 6: pcDNA3.1(+)/HT-29 nucleoprotein + marked probe; 7: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 nucleoprotein + marked probe.

2.6 NGX6 对结肠癌 HT-29 细胞种植瘤生长的影响

将 HT-29 组、PcDNA3.1(+)/HT-29 组、

PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组三组肿瘤细胞悬液以 0.1 ml(含 5×10^6 个肿瘤细胞) 分别接种于裸鼠腋前皮下. 至第 30 天处理裸鼠, 方差分析三组种植瘤重量 $P<0.05$, 有显著性差异(图 4 和表 3).

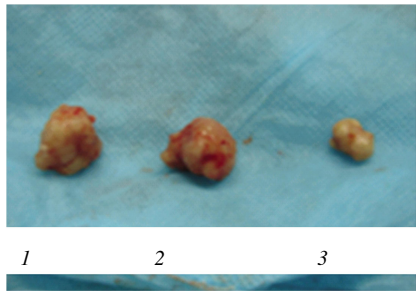


Fig. 4 The comparison of weight in three groups of xenograft tumor
1: HT-29 group; 2: pcDNA3.1 (+)/HT-29 group; 3: pcDNA3.1 (+)/NGX6/ HT-29 group.

Table 3 The comparison of weight in three groups of xenograft tumor xenograft		
Group	Number of example	Tumor weight
HT-29	6	1.06±0.11
pcDNA3.1(+)/ HT-29	6	1.10±0.10*
pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29	6	0.50±0.10**

The comparison of HT-29 with pcDNA3.1(+)/ HT-29, * $P>0.05$. The comparison of pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 with HT-29 and pcDNA3.1 (+)/ HT-29, ** $P<0.05$.

2.7 种植瘤 HE 染色病理结果
将结肠癌细胞接种于裸鼠腋前皮下后, 第 30 天取出种植灶(图 5), 经 HE 染色切片证实均为低分化结肠腺癌.

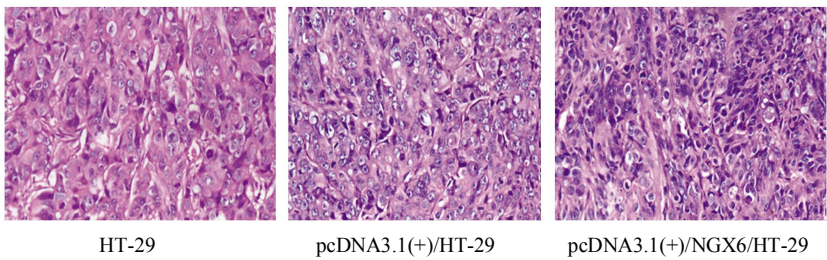


Fig. 5 HE-staining of three groups of xenograft tumor (×200)

2.8 PI/Annexin-V 流式细胞仪检测NGX6 对结肠癌 HT-29 细胞种植瘤凋亡的影响
凋亡是细胞内外综合因素作用的结果, 为探讨 NGX6 是否在体内环境下对结肠癌 HT-29 细胞种植瘤凋亡有影响, 因此将种植瘤组织分离为单个瘤细胞后, 用 PI/Annexin-V 双染流式细胞仪检测各组

细胞的凋亡率, 结果表明, pcDNA3.1(+)/NGX6/ HT-29 细胞在凋亡细胞率及死细胞率都较另两组高, 而活细胞率较两组低, 经统计学分析表明, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 细胞在凋亡率及活细胞率与另两组比较均具有统计学意义, 而在死细胞率上统计学分析 $P>0.05$ (表 4).

Table 4 Flow cytometric analysis of apoptosis in xenograft tumor cells				
Group	Number of Example	Living cell rate	Apoptosis cell rate	Dead cell rate
HT-29	6	76.82±1.01	10.61±0.26	12.57±0.11
pcDNA3.1(+)/ HT-29	6	77.71±0.96	10.06±0.41	12.23±0.09
pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29	6	63.92±1.23	19.36±0.37	16.71±0.10

The comparison of living cell rate and apoptosis cell rate in pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 with HT-29 and pcDNA3.1(+)/ HT-29, $P<0.05$. The comparison of living cell rate and apoptosis cell rate in pcDNA3.1(+)/HT-29 cell with HT-29, $P>0.05$. The comparison of dead cell rate in three groups of cell, $P>0.05$.

3 讨 论

到目前为止, 已经有近十万篇有关细胞凋亡的

实验报道, 实验证明, 几乎所有的促凋亡和抗凋亡蛋白的表达与各种肿瘤都存在联系. 皮肤基底细胞癌中存在很多的凋亡细胞, 这种细胞虽然分裂增殖

很快, 但肿瘤的生长却很缓慢. 肿瘤放 / 化疗时凋亡细胞明显增多, 提示诱导肿瘤细胞凋亡有可能成为治疗肿瘤的一种手段.

本实验利用已建立的稳定转染 NGX6 的 HT-29 细胞系进行研究^[4], RT-PCR 及 Western blot 检测证实 NGX6 基因稳定表达. 我们通过 MTT 法发现 NGX6 基因抑制结肠癌 HT-29 细胞的生长, 然而通过 PI/Annexin-V 双染流式细胞仪检测体外培养的三组细胞凋亡率却发现, 三组细胞间凋亡率无明显区别, 基本都是活细胞, 无统计学意义. 凋亡是细胞为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程. 结肠癌 HT-29 细胞是一种已经永生化的能体外培养的肿瘤细胞, 显然, 在体外优越的培养环境下, 也就是没有阻断细胞继续存活的因素存在时, 细胞凋亡的程序并没有启动, 这也说明, NGX6 基因并不直接诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡.

然而用 EMSA 方法分析 NGX6 基因对结肠癌 HT-29 细胞核转录因子 - κ B 的影响, 结果表明, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 细胞与 HT-29 细胞及 pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞比较, NF- κ B 激活明显受到抑制. NF- κ B 在结肠癌生长、发展及转移过程中有着重要的影响^[6~8]. 在肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)处理 NF- κ B 敲除结肠癌 HT-29 中发现, 其诱导肿瘤细胞凋亡率明显上升, 提示抑制 NF- κ B 有可能成为提高结肠癌治疗效果的重要手段^[9]. 脱氧胆酸(DCA)是结肠肿瘤的一个促进因子, 韩国学者 Lee 等^[10]研究发现, DCA 处理结肠癌 HT-29 细胞后, NF- κ B 持续激活的时间由正常的 30 min 延长至 8 h, 而且其表达水平与 DCA 的用量线性上调, 提示 NF- κ B 在 DCA 诱导结肠肿瘤发生发展过程中扮演着重要的角色. 在治疗方面, Rakitina 等^[11]研究表明, 由过氧化物酶受体 - γ 介导引起的人结肠癌细胞凋亡与 NF- κ B 的下调相一致, 细胞凋亡与 NF- κ B 以及 Bcl-2 水平的下调是同时发生的, 由此证明过氧化物酶受体 - γ 介导引起的人结肠癌细胞凋亡是由 NF- κ B 以及 Bcl-2 通路来完成的.

结肠癌是一种对放 / 化疗一般都不很敏感的肿瘤. 经过大量的临床实验研究, 结肠癌的化疗手段有着很大的改善, 对结肠癌化疗的 5-fluorouracil/folinic acid 方案正是 folinic acid 通过抑制 NF- κ B 的表达提高 5-fluorouracil 诱导细胞凋亡产生效应的^[12]. 最新的研究同样证明 NF- κ B 激活受抑制后肿瘤细胞对化疗药物的敏感性增加^[13].

将 HT-29、pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、

pcDNA3.1(+)/HT-29 三组细胞分别同时接种于裸鼠腋前皮下. PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组种植瘤较 HT-29 及 pcDNA3.1(+)/HT-29 组生长明显减慢, 种植瘤重量比较具有显著差异. 继续取三组种植瘤细胞以 PI/Annexin-V 双染流式细胞仪分别检测凋亡率, 结果表明, 在实验动物体内多因素的影响下, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 细胞与 HT-29 细胞及 pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞比较, 凋亡率明显增高, 死亡细胞也增多, 而相对应的活细胞率明显下降. 表明在动物体内多因素的影响下, 在有竞争力的环境下, NGX6 基因诱导了 HT-29 细胞凋亡, 从而抑制了肿瘤的生长. 在治疗肿瘤过程中, 诱导细胞凋亡与其直接的细胞毒作用同样重要, 多数药物和基因并不直接杀死细胞, 而是诱导肿瘤细胞凋亡. 如应用糖皮质激素就会降低放 / 化疗对结直肠癌诱导的凋亡而对治疗不利^[14], 而维甲酸在肿瘤治疗上的应用一方面诱导细胞的分化成熟, 另一方面则是通过诱导肿瘤细胞凋亡来实现的^[15].

NGX6 基因含有 1 个表皮生长因子样结构域, 这是该基因最重要的一个生物信息学特征^[2]. 含表皮生长因子样结构域的蛋白质在三维结构上具有相似性, 参与受体 - 配体间的交互作用. EGFR(表皮生长因子受体)是一种具有酪氨酸激酶活性的膜表面传感器, 普遍表达于人体的表皮细胞和基质细胞, 并在多种肿瘤中存在高表达. EGFR 活化后启动的信号通路主要有两条: a. PI3K-PKC-IKK 途径, 使 I- κ B α 磷酸化后导致 NF- κ B 移位至核内; b. Ras-Raf-Mek-Erk-MAPK 途径, 信号经 shc、grb2 传递, 最后经 c-jun、c-fos 传递到核内, 激活 AP-1. EGFR 的高表达可以促进肿瘤细胞的增殖、血管生成、侵袭和转移, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[6]. 在鼻咽癌的研究中已经发现 NGX6 基因负调控了 EGFR 通路^[17]. NGX6 基因抑制结肠癌 NF- κ B 激活可能的机制就是通过 EGFR 来完成的.

综上所述, NGX6 基因在体外优越的培养环境中虽然不能直接诱导结肠癌细胞凋亡, 但是 NGX6 基因明显抑制了 NF- κ B 激活, 并且在实验动物体内诱导了结肠癌裸鼠种植瘤细胞的凋亡, 抑制了结肠癌种植瘤的生长. 由此表明, NGX6 基因可能的机制是通过抑制 NF- κ B 激活诱导了肿瘤细胞凋亡, 此结果为证实 NGX6 基因是一个抑瘤基因提供一个强有力的证明. 但是对 NGX6 基因影响肿瘤细胞凋亡以及对肿瘤其他恶性行为影响更为详尽的机制有待以后进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 阳剑波, 唐湘娜, 邓龙文, 等. 鼻咽癌染色体 9p21~22 区域精细缺失图谱的构建. 中华肿瘤杂志, 1999, **21**(6): 419~421
Yang J B, Tang X N, Deng L W, *et al.* Chin J Oncology, 1999, **21**(6): 419~421
- 2 阳剑波, 宾亮华, 李忠花, 等. 精细定位和克隆 9p21~22 区域内鼻咽癌候选抑瘤基因. 癌症, 2000, **19**(1): 6~9
Yang J B, Bin L H, Li Z H, *et al.* Chin J Cancer, 2000, **19**(1): 6~9
- 3 李 江, 黄宇琛, 张秋红, 等. 鼻咽癌相关基因 NGX6 对鼻咽癌细胞周期的影响. 生命科学研究, 2002, **6**(4): 300~304
Li J, Huang Y C, Zhang Q H, *et al.* Life Science Research, 2002, **6**(4): 300~304
- 4 王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 等. 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, **2**(3): 574~579
Wang X Y, Shen S R, Liu H Y, *et al.* World Chin J Digestology, 2004, **2**(3): 574~579
- 5 Van Engeland M, Nieland L J, Ramaekers F C, *et al.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry, 1998, **31**: 1
- 6 Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature, 2006, **441**(7092): 431~436
- 7 Din F V, Dunlop M G, Stark L A. Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signalling and apoptosis. Br J Cancer, 2004, **91**(2): 381~388
- 8 Thoms H C, Dunlop M G, Stark L A. p38-mediated inactivation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer cells. Cancer Res, 2007, **67**(4): 1660~1669
- 9 Higai K, Ishihara S, Matsumoto K. NFkappaB-p65 dependent transcriptional regulation of glycosyltransferases in human colon adenocarcinoma HT-29 by stimulation with tumor necrosis factor alpha. Biol Pharm Bull, 2006, **29**(12): 2372~2377
- 10 Lee D K, Park S Y, Baik S K, *et al.* Deoxycholic acid-induced signal transduction in HT-29 cells: role of NF-kappa B and interleukin-8. Korean J Gastroenterol, 2004, **43**(3): 176~185
- 11 Rakitina T V, Vasilevskaya I A, O'Dwyer P J. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. Cancer Res, 2003, **15**:63(24): 8600~8605
- 12 Voboril R, Hochwald S N, Li J, *et al.* Inhibition of NF-kappa B augments sensitivity to 5-fluorouracil/folinic acid in colon cancer. J Surg Res, 2004, **120**(2): 178~188
- 13 Jazirehi A R, Vega M I, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. Cancer Res, 2007, **67**(3): 1270~1281
- 14 Zhang C, Kolb A, Mattern J, *et al.* Dexamethasone desensitizes hepatocellular and colorectal tumours toward cytotoxic therapy. Cancer Lett, 2006, **242**(1): 104~111
- 15 Jyoti B, Carlic K, Venkatesh D, *et al.* Novel retinoic acid metabolism blocking agents endowed with multiple biological activities are efficient growth inhibitors of human breast and prostate cancer cells *in vitro* and a human breast tumor xenograft in nude mice. J Med Chem, 2004, **47**(27): 6716~6729
- 16 Wood Burn J R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther, 1999, **82** (2~3): 241~250
- 17 Wang L, Ma J, Li J, *et al.* NGX6 gene inhibits cell proliferation and plays a negative role in EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. J Cell Biochem, 2005, **95**(1): 64~73

The Role of NGX6 Gene on Apoptosis of Human Colon Cancer*

LIAN Ping¹⁾, GUO Qin¹⁾, PENG Ya¹⁾, XIAO Zhi-Ming¹⁾, LIU Fen¹⁾,
WANG Xiao-Yan¹⁾, SHEN Shou-Rong^{1)**}, LI Gui-Yuan²⁾

(¹⁾The 3rd Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾Department of Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078)

Abstract The novel gene NGX6 is isolated by tumor laboratory of Central South University on studying nasopharyngeal carcinoma. NGX6 protein includes two transmembrane regions. There are an EGF-like domain signature and three potential N-glycosylation sites in the extracellular domain of it. The short cytoplasm contains a tyrosine residue that is a potential phosphorylation site by tyrosine kinase. Previous study on NGX6 showed: NGX6 was found down-regulated in colorectal carcinomas, and expression of NGX6 was down-regulated in the tumors with metastasis and related to the clinic stages by using the in situ hybridization and tissue array techniques. Transfection of NGX6 into colorectal carcinomas cells can induce the reversion of some malignant phenotypes (data obtained from cell cycle, cell growth rate curve, soft agar colony formation, nude mice injection analysis, *et al*), the changes of gene/protein expression profiles and the down-regulation of expression of phosphor-EGFR. Based on these studies, in an attempt to identify the function of NGX6-induced-apoptosis, the following experiments were designed. The NGX6-transfected HT-29 cell line was used as the test, empty-vector-transfected HT-29 cell line and untransfected HT-29 cell line were used as the control. The effect of NGX6 on apoptosis was detected by FCM cells were double-stained by PI/Annexin-V; the expression of NF- κ B was detected by EMSA. There is no difference of apoptosis between NGX6 transfected colon carcinoma cell and NGX6 untransfected colon carcinoma cell when cells are cultivated *in vitro*. But apoptosis level of NGX6 transfected colon carcinoma cell of xenograft tumor in nude mice is higher than that of NGX6 untransfected colon carcinoma cell. And the expression of NF- κ B is inhibited in NGX6 transfected colon carcinoma cell groups. These experiments showed NGX6 gene can induce apoptosis of colon cancer and inhibit the expression of NF- κ B.

Key Words colon cancer, NGX6 gene, nude mouse, apoptosis

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30370801, 30770972), Natural Science Foundation of Hunan(06JJY20068) and Post-graduate-thesis-progress Foundation of Central South University (040144).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-8618457, E-mail:ssr_35403@163.com

Received: January 23, 2008 Accepted: May 23, 2008