

结肠癌中 NGX6 抑制 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 信号通路的研究*

王晓艳^{1,2)} 沈守荣^{1)**} 刘 芬¹⁾ 彭 娅¹⁾ 李桂源²⁾ 范松青³⁾

(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;

³⁾中南大学湘雅二院病理科, 长沙 410011)

摘要 候选抑瘤基因 NGX6 具有抑制结肠癌增殖和转移的作用, 研究表明其为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的负性调控因子, 并可下调 JNK 通路中重要分子 MADD(MAP-kinase activating death domain)的表达, 其抑瘤机制是否与抑制 EGFR 介导的 JNK 信号通路的活性有关? 在已建立的转染 NGX6 的细胞模型基础上, 借助蛋白质印迹(Western blot)和免疫组化方法在细胞和组织水平检测 NGX6 转染前后 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 信号通路中重要蛋白质的表达。结果表明, NGX6 转染后结肠癌细胞 HT-29 在裸鼠体内成瘤明显受抑, 差异有统计学意义。Western blot 结果显示, 在结肠癌细胞中 NGX6 可明显下调 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达; 进一步采用 Western blot 和免疫组化法验证 NGX6 在体内对上述关键分子表达的影响, 发现 NGX6 可抑制裸鼠移植瘤组织中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达, 与体外结果一致。上述研究表明, NGX6 在结肠癌中主要通过抑制 EGFR 介导的 JNK 通路的活性而发挥其抑瘤作用, 该研究为深入探讨 NGX6 的机制提供了重要的实验依据。

关键词 结肠癌, NGX6 基因, EGFR, JNK 信号通路

学科分类号 Q257, R735

NGX6 基因(GenBank: AF188239)是我们自主克隆的候选抑瘤基因, 生物信息学预测 NGX6 位于染色体的 9p21~22 区域, cDNA 全长 2 134 bp, 基因编码 338 个氨基酸, 具有两个跨膜结构, 一个 EGF 样功能域, 多个 N-糖基化位点和多个酪氨酸磷酸激酶位点^[1]。初步研究表明, NGX6 在 73.5% 的结肠癌组织及 93.8% 有转移的结肠癌组织中表达下调或缺失, 提示 NGX6 可能具有抑制结肠癌增殖、转移的功能^[2], 该结果在细胞水平和裸鼠移植瘤水平得到了进一步证实^[3]。应用基因芯片和基因差异表达分析技术研究发现, NGX6 可下调结肠癌细胞 HT-29 中 JNK / SAPK 通路中的重要激活蛋白 MADD 表达 3 倍以上, 并可抑制 EGFR 和 cyclin D1 的表达, 延缓结肠癌细胞周期由 G0/G1 期到 S 期的进程^[4]。相关研究也发现 NGX6 在鼻咽癌中可抑制 EGFR 的活化, 而其突变体(1~183AA)失去此抑制功能, 表明 NGX6 具有负性调控 EGFR 活性的功能。上述结果提示, NGX6 是否通过影响 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 信号通路

发挥其抑瘤作用。

本文首先在结肠癌细胞中采用蛋白质印迹(Western blot)检测 NGX6 转染前后 EGFR 介导的 JNK 信号通路中关键蛋白的表达变化, 然后, 应用 Western blot 和免疫组化法在裸鼠移植瘤组织中进一步验证。该研究为 NGX6 负性调控 EGFR 相关信号通路的机制研究提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、胰酶、DMSO 购自华美生物工程有限公司; 聚丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TritonX-100、过

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB910503), 国家自然科学基金(30500238, 30370801, 30770972), 教育部博士学科点专项科研基金(20040533062), 中国博士后科学基金(20060400266), 湖南省自然科学基金(06JJZ0068)和湖南省科技计划(2007FJ3123)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 0731-8618457, E-mail:ssr-35403@163.com

收稿日期: 2007-10-15, 接受日期: 2008-01-17

硫酸铵、TEMED 购自 Sigma 公司; Phospho-JNK: 9251S 兔多克隆抗体购自 Cell Signaling Technology, Inc 公司; c-Jun: sc-1694 兔多克隆抗体 Ig, cyclin D1: DCS-6 鼠单克隆抗体 IgG1 购自 DAKO 公司; EGFR、K-ras 均为兔多克隆抗体, 二抗: 抗兔、抗鼠用于 Western blot 和免疫组化实验, 均购自中国博士德公司; ECL 发光试剂盒为美国 Pierce 公司产品; pcDNA3.1(+) 载体购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞株和培养条件

低分化结肠癌细胞株 HT-29 由湘雅医学院细胞中心提供。pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 为前期工作中构建的稳定表达细胞株。用含 120 ml/L 胎牛血清的 DMEM, 50 ml/L CO₂, 37℃ 条件下培养。

1.3 裸鼠培养和接种

裸鼠, 雄性, 鼠龄 4 周, 体重 15~18 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, SPF 级饲养。取 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 三组细胞分别皮下接种于裸鼠右前肢腋下, 每组 3 只, 每只裸鼠接种 3×10^7 个肿瘤细胞。观察移植瘤生长及转移情况, 定期用游标卡尺测量肿瘤大小。

1.4 细胞总蛋白抽提

取对数生长期的细胞, PBS 清洗 2~3 次, 置冰上加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 400 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% NP40, 0.5 mg/L leupeptin, 0.5 mg/L aprotinin, 0.5 mg/L pepstatin, 1 mmol/L PMSF), 收集裂解细胞, 沸水中变性 5 min 后, 冰上骤冷, 4℃ 下 10 000 r/min 离心, 取上清于 -70℃ 贮存。用 BCA 检测试剂测定蛋白质浓度。

1.5 组织总蛋白抽提

取少量新鲜裸鼠移植瘤组织, 剪碎后置于匀浆器中, 加入裂解液(含 PMSF)进行匀浆, 冰上操作。之后将裂解液移至 1.5 ml 离心管中, 4℃ 下 10 000 r/min 离心, 取上清于 -70℃ 贮存。用 BCA 检测试剂测定蛋白质浓度。

1.6 Western blot 分析

取各组细胞或组织蛋白 50 μ g 在不连续 SDS-PAGE 胶电泳, 分离蛋白质样本和分子质量标准, 将蛋白质样本转膜, 5% 的蛋白质干粉液封闭 1 h。0.02 mol/L PBST 洗膜 2 次, 与按比例稀释的一抗 37℃ 孵育 2 h。洗膜。与按比例稀释的酶标二抗

37℃ 孵育 30 min。洗膜, ECL 发光法检测, X 光片曝光, 显影, 定影。

1.7 SP 免疫组化法

置组织切片于 60℃ 烤箱 20 min。二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 3% H₂O₂ 室温孵育 30 min。切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 置微波炉内加热修复抗原 10 min。10% 正常羊血清封闭, 室温孵育 20 min。滴加一抗工作液, 放于湿盒内, 4℃ 冰箱孵育过夜。即用型兔抗鼠二抗工作液 37℃ 温箱孵育 30 min。DAB 显色试剂显色。脱水, 中性树胶封片。以磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)分别代替一抗和二抗作阴性对照。

染色结果判断标准: 参照 Fromowitz 方法^[9]在高倍镜下对着色反应作如下评分: a. 无着色为 0, 淡黄色为 1, 棕黄色为 2, 棕褐色为 3; b. 阳性范围: 小于 5% 为 0, 5%~25% 为 1, 26%~50% 为 2, 51%~75% 为 3, 75%~100% 为 4。两项结果相加, 小于 2 为阴性(-), 2~3 为弱阳性(+), 4~5 为中度阳性(++), 6~7 为强阳性(+++)。

1.8 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计学处理, 所测量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\bar{x}$ 比较采用多样本均数方差分析, $P < 0.05$ 为统计学差异有显著性。

2 结 果

2.1 在细胞水平采用 Western blot 检测 NGX6 转染前后 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达变化

EGFR 在大多数人类上皮源性肿瘤中高表达, 其与配体结合后, 活化 Ras 蛋白, 启动和激活 MAPK 信号传导通路的磷酸化级联反应, 刺激肿瘤的增殖和转移。本研究发现, 在 NGX6 重表达细胞 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 中 EGFR 和 K-ras 的表达量较 NGX6 未转染细胞 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 明显降低, 分别为 pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞表达量的 56.3% 和 65.0%。MAPK 通路中的 JNK 通路参与 Ras 介导的核转录因子 c-Jun 的磷酸化过程, c-Jun 是核转录因子 AP-1 家族的主要成员, 其被 p-JNK 磷酸化激活后形成同源或与 Fos 等转录因子形成异源二聚体调控下游靶基因的表达, 影响细胞周期的进展和肿瘤的增殖、侵袭。本研究发现与 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 细胞比较, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 细胞中 p-JNK、c-Jun 及其下游靶基因 cyclin D1 表达明显下调, 分别为 pcDNA3.1(+)/

HT-29 细胞的 66.3 %、61.2 %和 62.0 % (图 1), 结果表明, 结肠癌中 NGX6 在细胞水平具有抑制

EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 通路活性的作用.

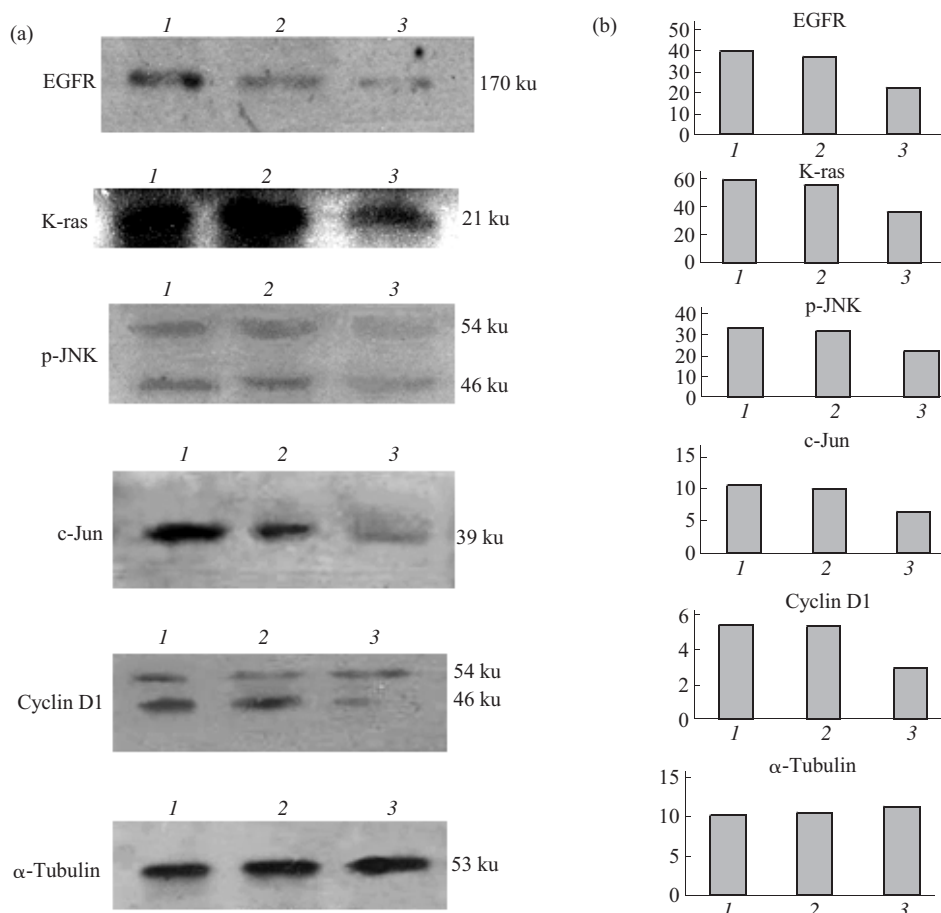


Fig. 1 The analysis of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in NGX6- transfected cells and non-transfected cells by Western blot

(a) The expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 analyzed by Western blot, α -tubulin used as control. 1: HT-29; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29. (b) The bar graphs above represent the relative quantities of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1. 1: HT-29 cells; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29 cells; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells. These results revealed the expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 were reduced in pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells, compared with other two groups.

2.2 在组织水平采用 Western blot 和免疫组化法研究 NGX6 转染前后 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达变化

2.2.1 裸鼠移植瘤实验. 为进一步探讨体内微环境中 NGX6 对 HT-29 结肠癌细胞增殖能力的影响, 将 HT-29、pcDNA3.1 (+)/HT-29、pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 三组细胞分别以每只裸鼠 3×10^7 个肿瘤细胞接种于裸鼠右前肢皮下, 每组 3 只, 观察裸鼠瘤体体积的大小. 30 天后处死裸鼠, 剥离瘤组织, 测量瘤体体积. 结果显示, NGX6 转染后裸鼠移植瘤体积较 NGX6 未转染组减小, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2), 表明 NGX6 可抑制裸鼠移植瘤的形成.

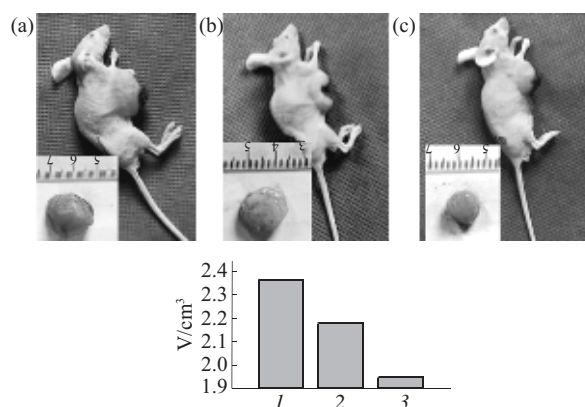


Fig. 2 The growth of xenografts of NGX6-transfected and non-transfected HT-29 cells in nude mice

(a) Xenograft formed by HT-29 cells. (b) Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/HT-29 cells; (c) Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells. The result showed that the tumor size of NGX6-transfected xenografts in nude mice were reduce, compared with non-transfected xenografts ($P < 0.05$). 1: HT-29 cells; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29 cells; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells.

2.2.2 Western blot 分析 NGX6 转染对裸鼠移植瘤中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 表达的影响. 为探究 NGX6 在体内环境中对 EGFR 介导的 JNK 通路的影响, 进一步采用 Western blot 分析 NGX6 转染前后裸鼠移植瘤中 EGFR、K-ras、

p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达, 发现 pcDNA3.1(+)/NGX6/ HT-29 组移植瘤中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 表达下调, 分别为 pcDNA3.1(+)/HT-29 组的 44.6%、45.7%、38.3%、34.4% 和 45.6% (图 3).

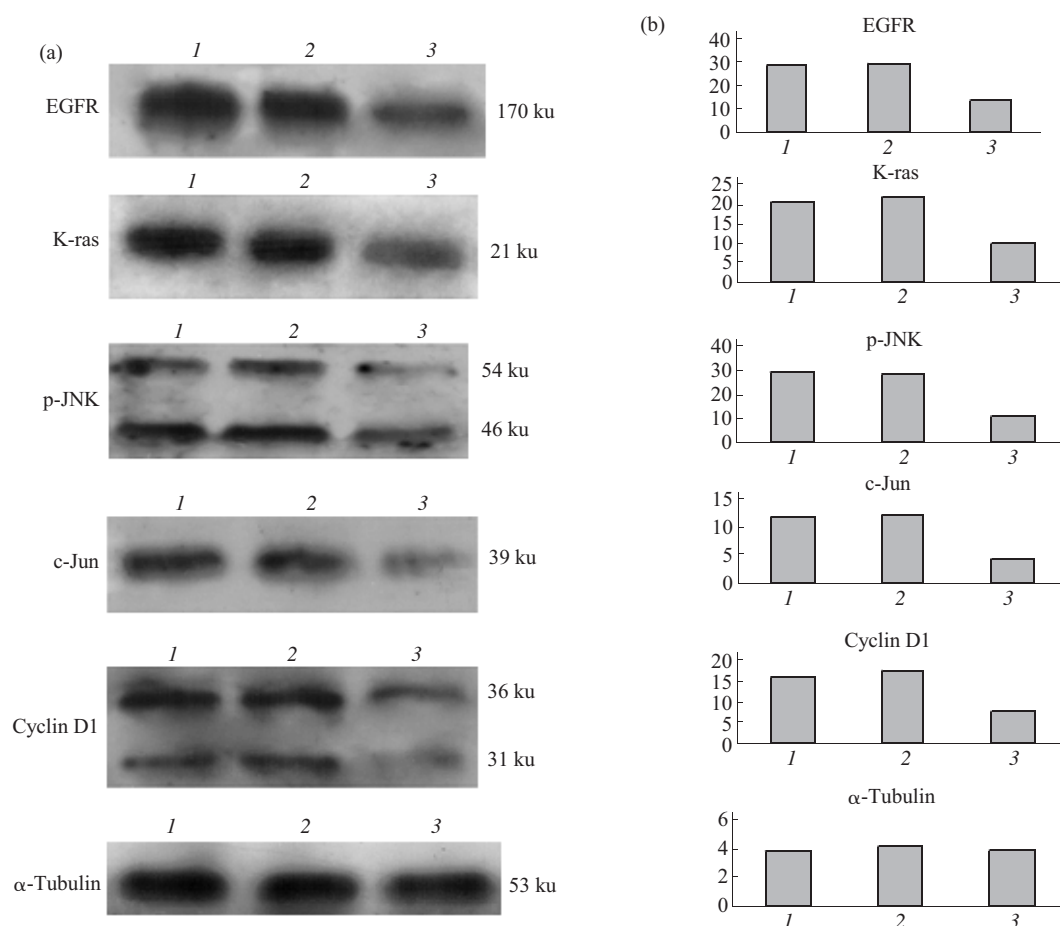


Fig. 3 Analysis of expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in NGX6-transfected and non-transfected xenografts by Western blot

(a) The expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 analyzed by Western blot, α-tubulin used as control. 1: HT-29; 2: pcDNA3.1(+)/HT-29; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29. (b) The bar graphs above represent relative quantities of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1. 1: Xenograft formed by HT-29 cells; 2: Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/HT-29 cells; 3: Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells. These results indicated that the expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 were down-regulated in NGX6-transfected xenograft, compared with non-transfected xenografts.

2.2.3 免疫组化法验证 NGX6 转染对裸鼠移植瘤中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 表达的影响. 采用免疫组化法验证 NGX6 重表达对裸鼠移植瘤中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 表达的影响, 结果显示, HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 组移植瘤中 EGFR 表达水平为 +++, 而 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组为 +~++; HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 组移植瘤中 Ras 表达量为 ++, 而 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组为 -~+; NGX6 转染后 p-JNK 的表达量由转染前的 +++ 下调至 +;

核转录因子 c-Jun 在 NGX6 转染后表达量由转染前的 ++ 下调为 -~+; cyclin D1 在 NGX6 转染后表达水平为 +~++, 而 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组为 +++ (图 4). 上述研究结果表明, NGX6 重表达可下调裸鼠移植瘤中 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 等 JNK 通路中关键分子的表达, 进一步证实了 NGX6 在体内水平具有抑制 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 通路活性的作用, 与体外水平分析结果一致.

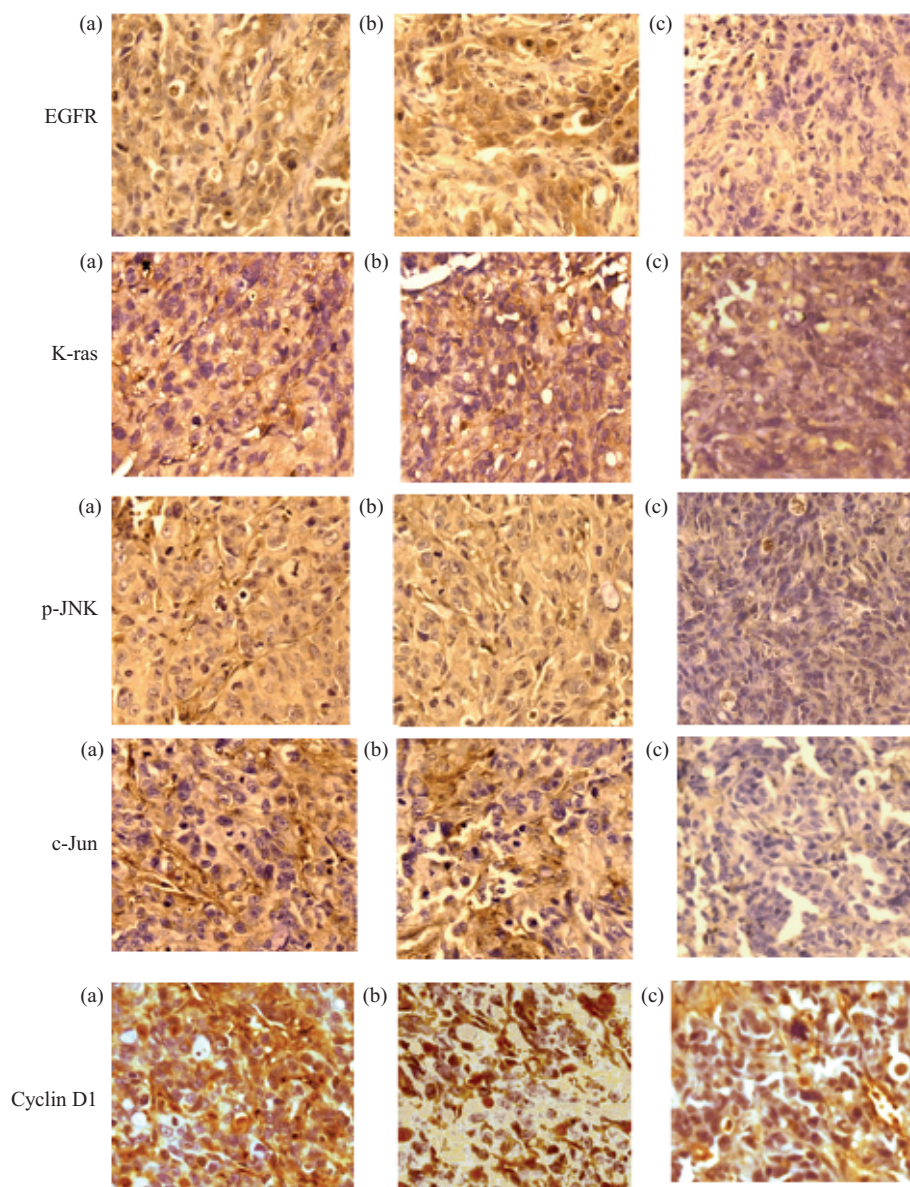


Fig. 4 Expressions of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in NGX6-transfected and non-transfected xenografts in nude mice analyzed by immunohistochemistry

(a) Xenograft formed by HT-29 cells. (b) Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/HT-29 cells. (c) Xenograft formed by pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 cells; These results revealed that NGX6-transfected xenograft in nude mice expressed lower level of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 than non-transfected xenografts.

3 讨 论

结肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一，大量研究表明，EGF/EGFR 在结肠癌中高表达，并与其增殖、转移等恶性生物学行为密切相关^[6-9]。EGF 与胞膜受体 EGFR 结合形成二聚体后激活下游信号通路，促进细胞的恶性增殖及转移，EGFR 下游最重要的增殖相关的信号通路是 Ras 为中心的 MAPKs 通路。MAPKs 通路包括 4 条：细胞外信号调节蛋

白激酶 (ERK)p42/p44 通路、SAPK/JNK 通路、p38MAPK 通路和 ERK5/大丝裂原活化蛋白激酶 1 (BMK1) 通路。这些通路参与了细胞生长、增殖、分化和凋亡等多种病理生理过程。其中 JNK/SAPK 通路在结肠癌的增殖和凋亡过程中发挥着重要的作用^[10, 11]。其经典通路是：生长因子与其受体结合后，胞膜受体的酪氨酸激酶被激活，受体上磷酸化的酪氨酸与生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2) 的 SH2 结构域相结合，而 Grb2 的 SH3 结构域则同时与鸟

昔酸交换因子 SOS(Son of Sevenless)结合, 后者激活鸟苷酸结合蛋白 Ras. 激活的 Ras 进一步活化 JNK/SAPK 的上游分子 JNK kinase(JNKK), 促进 JNK/SAPK 的活化和转录因子 c-Jun 氨基端 63 及 73 位的丝氨酸残基磷酸化, 导致 c-Jun 转录活性增强^[12, 13]. c-Jun 在下游靶基因 cyclin D1 启动子上有两个结合位点, c-Jun 可激活并启动 cyclin D1 的表达^[14], 调控 G0/G1 向 S 期的行进, 促进细胞周期的进程, 加速肿瘤的增殖^[15].

NGX6 基因是本研究小组采用定位候选克隆策略自主克隆的候选抑瘤基因, 前期研究结果已证实其在组织和细胞水平均可抑制结肠癌的增殖和转移, 但其机制尚不明确. NGX6 逆转肿瘤恶性生物学特征的过程是一个复杂事件, 涉及到多基因表达和多信号传导通路活性的变化. 本研究组进一步采用基因转染、基因芯片技术及 Western blot 等技术分析其可能调控的信号传导通路, 发现 NGX6 具有负性调控 EGFR 活性以及下调 JNK/SAPK 通路中的重要激活蛋白 MADD(MAP-kinase activating death domain) 和细胞周期蛋白 cyclin D1 表达的生物学功能, cyclin D1 是 c-Jun 下游重要的靶基因之一, 上述种种迹象强烈提示, NGX6 可能主要通过抑制 EGFR/ K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 通路的活性, 延缓结肠癌细胞周期由 G0/G1 期到 S 期的进程, 而发挥其抑瘤功能.

为明确这一机制, 本研究首先在细胞水平分析了 NGX6 对 EGFR 介导的 JNK 信号通路上关键蛋白分子 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达影响, 发现 NGX6 转染后这些分子均表达下调. 进一步在体内水平验证, 发现 NGX6 转染后移植瘤增殖明显受抑, 瘤组织内 EGFR、K-ras、p-JNK、c-Jun 和 cyclin D1 的表达受抑, 此结果与细胞水平的研究结果一致. 本研究表明候选抑瘤基因 NGX6 在人结肠癌中主要通过抑制 EGFR/ K-ras/JNK/c-Jun/ cyclin D1 通路的活性而逆转其恶性生物学特征, 为进一步阐明 NGX6 在结肠癌发生发展中的作用机制提供了新的线索和佐证.

参 考 文 献

- 1 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**(5): 530~534
Xie Y, Bin L H, Yang J B. Chin Med J, 2001, **114**(5): 530~534
- 2 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 等. 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**(8): 873~876
Zhang X M, Shen S R, Wang X Y, *et al.* World Chinese Journal of Digestology, 2002, **10**(8): 873~876
- 3 王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 等. 抑瘤基因 NGX6 对结肠癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志, 2004, **12**(3): 574~579
Wang X Y, Shen S R, Liu H Y, *et al.* World Chinese Journal of Digestology, 2004, **12**(3): 574~579
- 4 王晓艳, 沈守荣, 刘芬, 等. NGX6 基因对人结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响. 生物化学及生物物理进展, 2006, **33**(1): 45~50
Wang X Y, Shen S R, Liu F, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, **33**(1): 45~50
- 5 Fromowitz F B, Voila M V, Chao S, *et al.* Ras P21 expression in the progression of breast cancer. Humanpathol, 1987, **18**(12): 1268~1275
- 6 Schmelz E M, Xu H, Sengupta R, *et al.* Regression of early and intermediate stages of colon cancer by targeting multiple members of the EGFR family with EGFR-related protein. Cancer Res, 2007, **67**(11): 5389~5396
- 7 Banu N, Buda A, Chell S, *et al.* Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy. Cell Prolif, 2007, **40**(5): 768~779
- 8 Bralet M P, Paule B, Falissard B, *et al.* Immunohistochemical variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver metastases from colonic carcinomas. Histopathology, 2007, **50**(2): 210~216
- 9 Azuma M, Danenberg K D, Iqbal S, *et al.* Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer, 2006, **6**(3): 214~218
- 10 Ogunwobi O O, Beales I L. The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. Int J Colorectal Dis, 2007, **22**(4): 401~409
- 11 Grösch S, Tegeder I, Schilling K, *et al.* Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. FASEB J, 2003, **7**(10): 1316~1318
- 12 Cui J, Zhang M, Zhang Y Q, *et al.* JNK pathway: diseases and therapeutic potential. Acta Pharmacol Sin, 2007, **28**(5): 601~608
- 13 Minden A, Lin A, Smeal T, *et al.* c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinase. Mol Cell Biol, 1994, **14**: 6683
- 14 Bakiri L, Lallemand D, Ella B W, *et al.* Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. EMBO J, 2000, **19**(9): 2056~2068
- 15 Sherr CJ. D-type cyclins. Trends Biochem Sci, 1995, **20**(5): 187~190

Inhibitory Effects of NGX6 Gene on EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 Signal Pathway in The Colon Cancer *

WANG Xiao-Yan^{1,2}, SHEN Shou-Rong^{1**}, LIU Fen¹, PENG Ya¹, LI Gui-Yuan², FAN Song-Qing³

¹Department of Gastroenterology, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

²Cancer Research Institute, Xiangya Medical school of Central South University, Changsha 410078, China;

³Department of Pathology, the Second Xiangya Hospital; Central South University; Changsha 410011, China)

Abstract Previous studies indicated that NGX6, an EGFR negative regulating gene, can reverse the malignant phenotype of the colon cancer and down-regulate the expression of MADD(MAP-kinase activating death domain) which is an essential protein in the JNK pathway. All these results implied that whether NGX6 inhibits tumor growth by inactivating the EGFR-mediated JNK pathway? Western blot and immunohistochemistry were performed to detect the expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in the colon cancer cell line and in the tissue of xenografts in nude mice, aiming at deciphering the effects of NGX6 on EGFR/ K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 pathway both *in vitro* and *in vivo*. The results showed that NGX6 re-expression considerably suppressed the growth of xenografts in the nude mice. Data from Western blot revealed that NGX6 significantly down-regulated the expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in the colon cancer cells. And the further analysis by immunohistochemistry and Western blot *in vivo* indicated that NGX6 decreased the expression of EGFR, K-ras, p-JNK, c-Jun and cyclin D1 in the xenografts in nude mice, which were consistent with *in vitro* observations. Such evidences suggest that the major mechanism of NGX6 in colon cancer is negatively regulating EGFR-mediated JNK pathway, laying the experimental basis for further elucidating the mechanism of NGX6 gene.

Key words colon cancer, NGX6 gene, EGFR, JNK pathway

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2006CB910503), The National Natural Sciences Foundation of China (30500238, 30370801, 30770972), The Research Fund for the Doctoral Program of Ministry of Education(20040533062), China Postdoctoral Science Foundation(20060400266), Hunan Provincial Natural Sciences Foundation(06JJZ0068) and Hunan Province S & T Plan Projects(2007FJ3123).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-731-8618457, E-mail:ssr-35403@163.com

Received: October 15, 2007 Accepted: January 17, 2008