

NDRG2基因反转录病毒载体的构建及表达

欧剑锋¹, 任 晖², 王存邦¹, 白 海¹(解放军兰州军区兰州总医院, ¹血液病科, ²乳腺科, 甘肃省兰州市 730050)

文章亮点:

1 NDRG2 是一种新的抑癌候选基因, 其在很多肿瘤组织中呈低表达, 并且上调 NDRG2 在部分肿瘤细胞中的表达能够有效抑制肿瘤细胞的生长。但是有关 NDRG2 在血液恶性肿瘤尤其是人骨髓瘤中的表达和作用还未见报道。

2 实验首先构建成功携带 NDRG2 基因表达的反转录病毒载体, 经验证后包装为病毒备用; 其次将携带 NDRG2 基因表达的反转录病毒感染人骨髓瘤细胞系 U266 细胞; 最后嘌呤霉素压力筛选出稳定表达 NDRG2 基因的人骨髓瘤细胞株, 通过蛋白质免疫印迹检测肿瘤细胞株中 NDRG2 的蛋白表达含量。该实验为研究 NDRG2 在人骨髓瘤中的作用奠定了实验基础, 为 NDRG2 基因功能的进一步研究做了准备。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 骨髓瘤细胞; 基因; 基因转染; 反转录病毒载体; NDRG2 基因; 甘肃省自然科学基金

主题词:

多发性骨髓瘤; 基因; 转染; 逆转录病毒科

基金资助:

甘肃省自然科学基金项目(1010RJZA054)

摘要

背景: NDRG2(N-Myc Downstream Regulated Gene 2)是一个新的抑癌基因, 既可以增强经典抑癌通路的抗肿瘤效应, 又可以正常细胞的癌变起到监控。有关 NDRG2 在骨髓瘤发生中的功能和作用至今还未见报道。
目的: 构建 NDRG2 基因反转录病毒表达载体, 利用包装的病毒感染人骨髓瘤细胞系 U266, 检测 NDRG2 的表达情况。

方法: 设计与合成引物, 提取 U266 细胞的 RNA, 反转录和 PCR 扩增, 经 BamH I 和 Taq I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收进行连接转化, 并再次酶切鉴定; 并将构建的载体包装为反转录病毒, 感染 U266 细胞, 筛选出稳定表达 NDRG2 的 U266 细胞(U266-NDRG2)克隆扩大培养, 利用 Western blot 实验检测筛选到的 U266 细胞中 NDRG2 的表达。

结果与结论: 成功构建了携带 NDRG2 基因表达的重载体 pBaba-puro-NDRG2, 并包装为反转录病毒, 筛选到的 U266 细胞(U266-NDRG2)中 NDRG2 蛋白表达明显高于 U266-cherry 细胞和 U266 细胞。结果可见利用反转录病毒载体基因重组技术成功构建出携带相应基因的反转录病毒, 为研究 NDRG2 在人骨髓瘤中的作用奠定了实验基础。

欧剑锋, 任晖, 王存邦, 白海. NDRG2 基因反转录病毒载体的构建及表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(32):5209-5213.

Construction and expression of NDRG2 retroviral vector

Ou Jian-feng¹, Ren Hui², Wang Cun-bang¹, Bai Hai¹ (¹Department of Hematology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Department of Breast Surgery, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: N-Myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) is a new tumor suppressor gene, and it can either improve anti-tumor effect by classic pathway or monitor carcinogenesis. But there is yet no report addressing NDRG2 role in myeloma occurrence.

OBJECTIVE: Using pBaba-puro retroviral vector to construct recombinant vector which carrying NDRG2 gene and pack virus, then to screen U266 cells stably expressing NDRG2.

METHODS: Primers were designed and synthesized. RNA was extracted from U266 cells, and then applied to reverse transcription for the template and latter PCR amplification. After PCR amplification and digested by Taq I and BamHI, agarose gel electrophoresis was used to detect the correct fragments. We used the vectors to package the retrovirus and infected the U266 cells. The U266 cells stably expressing NDRG2 were screened and NDRG2 protein was detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The vector carrying NDRG2 was successfully constructed. The retrovirus was also packaged and infected U266 cells. The U266 cells stably expressing NDRG2 were screened. In these U266 cells, NDRG2 expression was increased significantly. The use of recombinant retrovirus vector technology can successfully construct a retrovirus carrying the corresponding gene which can be used for the following study on

欧剑锋, 男, 1968年生, 汉族, 2009年四川大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事血液疾病的基础和临床研究。

通讯作者: 白海, 博士, 主任医师, 解放军兰州军区兰州总医院血液病科, 甘肃省兰州市 730050

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.32.021

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)32-05209-05

稿件接受:2014-07-04

Ou Jian-feng, M.D., Attending physician, Department of Hematology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Corresponding author: Bai Hai, M.D., Chief physician, Department of Hematology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Accepted: 2014-07-04

NDRG2 function in human myeloma.

Subject headings: multiple myeloma; genes; transfection; retroviridae

Funding: the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 1010RJA054

Ou JF, Ren H, Wang CB, Bai H. Construction and expression of NDRG2 retroviral vector. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(32):5209-5213.

0 引言 Introduction

骨髓瘤又称浆细胞瘤, 是一种发生在骨髓浆细胞的常见恶性肿瘤。骨髓瘤主要是由具有合成和分泌免疫球蛋白的浆细胞发生恶变, 从而产生大量的免疫球蛋白或本周蛋白, 极易累及软组织^[1]。目前研究发现, 骨髓瘤的发生与放射等引起基因的突变或缺失有很大关系, 如果能明确关键的突变基因, 将对骨髓瘤的发生机制和治疗大有裨益^[2-3]。NDRG2 (N-Myc Downstream Regulated Gene 2)是解放军第四军医大学生化教研室首先报道的一个新的抑癌基因^[4]。目前已证实, NDRG2在多种肿瘤中发挥抑癌角色, 其不仅能够与p53形成正反馈环路介导肿瘤凋亡途径^[5-7], 而且NDRG2可以作为缺氧、DNA损伤后的应激启动因子在细胞发生癌变的早期、上皮细胞间质转化等过程中发挥监控和保护功能^[8-9]。由此可见, NDRG2既可以增强经典抑癌通路的抗肿瘤效应, 又可以对正常细胞的癌变起到监控, 其在基础研究和临床应用中有良好的发展空间。有关NDRG2在骨髓瘤发生中的功能和作用至今还未见报道, 如果能明确NDRG2在骨髓瘤中的作用, 那么对NDRG2功能的研究将有所帮助, 而且也可能为骨髓瘤的治疗提供靶点。本研究构建NDRG2基因反转录病毒表达载体, 利用包装的病毒感染人骨髓瘤细胞系U266, 检测NDRG2的表达情况, 为后续研究奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照细胞学实验。

时间及地点: 实验于2013年6月至2014年3月在解放军兰州军区兰州总医院血液科实验室完成。

材料: TechGene PCR扩增仪、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq DNA聚合酶、dNTP、含20 ng MgCl₂的Buffer、琼脂糖凝胶电泳仪、胶回收试剂盒均购自Tiangen天根生化科技有限公司。BamH I和Taq I限制性内切酶、T₄连接酶购于TakaRa公司。反转录病毒包装系统由Shuo Dong教授(Baylor College of Medicine)惠赠。293T、U266细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所, 由解放军兰州军区兰州总医院血液科实验室保存。LB固体培养基, 大肠杆菌DH5感受态细胞均由解放军兰州军区兰州总医院血液科实验室提供。NDRG2、 β -actin一抗以及相应二抗均购自Santa Cruz公司。

实验方法:

总RNA提取与反转录: 按照RNA提取试剂盒说明书操作, 提取U266细胞的总RNA, 经紫外分光光度计测定纯度和浓度合格后按照反转录试剂盒操作合成cDNA的第一条

链, -20 °C保存以备后用。

引物设计及PCR扩增: 根据GeneBank收录的NDRG2基因序列设计1对PCR扩增引物, 并设计加入BamH I和Taq I两种酶切位点, 引物序列为: 上游5'-GAG ATA TGC TCT TAA CCA CCC G-3', 下游5'-GCT GCC CAA TCC ATC CAA-3', 引物送上海生工公司合成。PCR扩增条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共35个循环, 72 °C延伸1 min。将PCR产物以琼脂糖凝胶电泳分离, 切取目的片段产物以胶回收试剂盒进行回收纯化处理。

反转录病毒载体构建: 用两种限制性内切酶同时对上步胶回收产物与载体pBabe-puro进行双酶切, 酶切体系20 μ L: 胶回收产物DNA或载体质粒6 μ L, 酶BamH I和Taq I各1 μ L, 缓冲液2 μ L, 水10 μ L(37 °C, 3 h)。酶切后的目的片段和载体DNA经琼脂糖凝胶电泳后, 根据正确的碱基片段大小胶回收。将胶回收产物进行连接反应, 连接体系10 μ L: 载体2 μ L, 目的基因片段6 μ L, 缓冲液1 μ L, T₄连接酶1 μ L(16 °C过夜)。将连接产物转化至大肠杆菌DH5感受态, 接种于含氨苄抗性的LB琼脂平板上, 37 °C培养过夜, 挑取单克隆菌落, 摇菌过夜并抽提质粒。酶切鉴定重组质粒, DNA电泳确定片段大小是否正确, 将鉴定正确的克隆送测序进一步确定。最后, 选择正确的克隆, 培养并提取质粒, -20 °C保存以备后用。

反转录病毒的制备及滴度测定: 将293T细胞以每孔 2×10^5 个(500 μ L)接种于24孔板, 并以无血清及无抗生素DMEM培养基培养过夜后使得细胞生长密度达到60%~80%; 提前提取反转录病毒载体质粒和非特异性对照质粒, 并定量备用; 按照脂质体使用说明书, 将各种质粒与脂质体配比混合后共转染293T细胞; 37 °C、体积分数为5% CO₂孵箱中培养18 h后更换完全DMEM培养基继续培养24 h, 并收集培养上清; 将293T细胞以每孔5 000个接种于6孔板中, 培养24 h后每孔加入适量病毒感染48 h, 通过流式细胞仪检测293T细胞红色荧光cherry阳性表达率, 根据公式计算病毒滴度: 滴度(TU/mL) = 1×10^5 (293T细胞数) \times cherry阳性表达率(%) \times 100/每孔病毒液的体积含量(μ L)。

感染并筛选稳定表达NDRG2的U266细胞: 将U266细胞以每孔 2×10^5 个(500 μ L)接种于24孔板, 正常培养; 每孔加入适量病毒感染48 h后使用含嘌呤霉素(4.0 mg)的培养基进行筛选, 每3 d更换含嘌呤霉素的完全培养基, 直至未被感染的细胞全部死亡时, 筛选结束; 对筛选克隆换正常培养基扩增培养, 即获得稳定表达NDRG2的U266细胞。



图2 反转录病毒感染 293T 细胞荧光检测图

Figure 2 The fluorescence detection of retroviral infection in 293T cells

图注: 图中 A 为明视野下 293T 细胞的照片($\times 40$); B, C 为荧光显微镜下 293T 照片, 红色荧光表示被感染的细胞($\times 40$)。

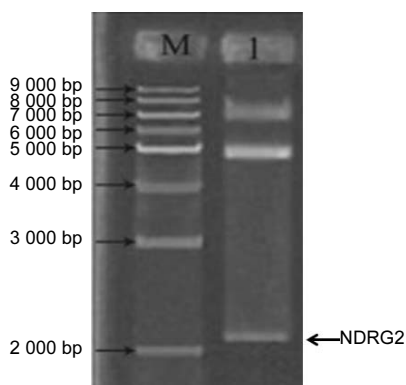


图1 NDRG2 基因反转录病毒表达载体酶切鉴定图

Figure 1 The restriction endonuclease figure of NDRG2 gene retroviral vector

图注: 泳道 M 为 1 kb 核酸标准分子质量, 泳道 1 为 pBabe-puro-NDRG2 酶切鉴定图, 从上到下依次是 pBabe-puro-CD74-NDRG2、pBabe-puro 和 NDRG2。

Western blot 检测 NDRG2 表达: 收集细胞样品, 检测 NDRG2 的蛋白表达水平。提取处理后的细胞总蛋白用含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液充分裂解, 然后用 BCA 法(pierce)进行蛋白定量, 取 50 μg 处理好的蛋白样品行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 100 V 恒压转移 2 h 后 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 将 NC 膜与抗体孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 再次洗膜 3 次, 每次 5 min, 利用 LI-COR Bioscience 的 Odyssey Infrared Imaging System 对靶分子的蛋白表达水平进行量化的检测, 分析结果。

主要观察指标: 构建载体的片段大小、病毒的滴度和对细胞的感染情况以及 NDRG2 在人骨髓瘤细胞 U266 中的表达。

2 结果 Results

2.1 NDRG2 基因反转录病毒表达载体的构建 将正常生长的 U266 细胞提取 RNA, RT-PCR 扩增得出 NDRG2 基因, 连接到 pBabe-puro 质粒后, 酶切鉴定 PCR 凝胶电泳图(图 1)。pBabe-puro 质粒约为 5.3 kb, NDRG2 基因大小约为 2.0 kb。

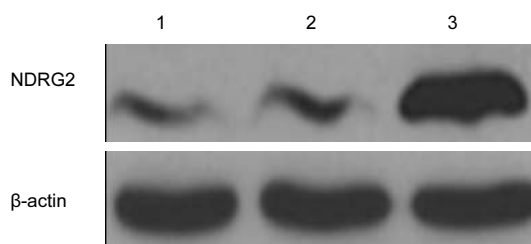


图3 Western blot 检测 NDRG2 在 U266 细胞中的表达

Figure 3 The expression of NDRG2 in U266 cells by western blot assay

图注: 泳道 1 为 U266 细胞组, 泳道 2 为 U266-cherry 组, 泳道 3 为 U266-NDRG2 组。

2.2 重组反转录病毒的包装和滴度测定 将正常生长的 293T 细胞铺于 24 孔板中, 待细胞生长密度达到 60%–80% 时进行共转染反转录病毒包装载体, 由于该载体携带 cherry 红色荧光蛋白, 故 48 h 后在荧光显微镜下观察可见大量红色荧光蛋白表达(图 2)。

将感染的 293T 细胞的培养上清收集, 用流式细胞仪检测 cherry 阳性表达率, 再利用 cherry 阳性细胞计数法测定病毒滴度约为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。

2.3 NDRG2 在人骨髓瘤细胞 U266 中的表达鉴定 将筛选出稳定表达 NDRG2 的 U266 细胞(U266-NDRG2)克隆扩大培养, 收集细胞并利用 Western blot 实验检测筛选到的 U266 细胞中 NDRG2 的表达(图 3), 可以看到, U266-NDRG2 细胞中 NDRG2 蛋白表达明显高于 U266-cherry 细胞和 U266 细胞。灰度扫描定量分析可见, U266 组为 1.00, U266-cherry 组为 1.03 ± 0.21 , U266-NDRG2 组为 4.23 ± 0.17 。

3 讨论 Discussion

随着人们对肿瘤分子水平发病机制的研究, 越来越多的致癌基因突变被发现, 加之靶向药物的开发与应用, 极大地推进了肿瘤个体化治疗的进展。因此, 解析肿瘤的发病机制, 明确相关致病靶分子, 对于提高肿瘤个体化治疗至关重要。人骨髓瘤是血液系统中浆细胞异常增生, 导致侵犯骨髓的一种恶性造血系统疾病。当人体浆

细胞发生癌变后, 会复制产生大量的恶性浆细胞, 称之为骨髓瘤细胞^[10]。这种恶性细胞会引起机体发生高钙血症、肾功能减退、贫血以及骨骼功能障碍等^[11]。化疗和放疗为骨髓瘤的主要治疗方式, 但是仍然有大部分的患者无法从治疗中获益。因此, 进一步理解骨髓瘤的发病机制, 研究关键致癌分子, 明确其在发病中的关键作用, 对于骨髓瘤的治疗和研究将大有裨益。

NDRG2基因是解放军第四军医大学的研究团队于1999年应用PCR消减杂交技术研究脑组织差异表达基因时所发现的一种含APC样结构域的新基因^[12]。NDRG2基因组全长9.33 kb, 其定位于染色体14q11.1, 含有16个外显子; mRNA全长为2 024 bp, 编码357个氨基酸。表达谱分析结果显示, NDRG2广泛表达于多种正常组织器官中, 尤其以心肌及脑组织表达含量最高^[13], 并且在多种肿瘤组织中低表达, 与肿瘤细胞恶性生物学行为及患者分期、侵袭程度和临床预后密切相关^[14-17]。

目前国内国际研究团队展开了许多针对NDRG2基因功能相关的研究, 主要围绕NDRG2的抗癌作用和机制方面做了大量的研究。NDRG2在肝癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺肿瘤、结直肠癌、膀胱癌等多种人体肿瘤中表达均低于正常组织, 上调NDRG2表达可显著抑制肿瘤细胞的增殖^[18-21]; NDRG2启动子区域的甲基化、突变及基因缺失在多种肿瘤细胞系中可见, 这是NDRG2在肿瘤中低表达的原因之一^[7, 22-26]; NDRG2受Myc基因的调控, 其表达水平与结直肠癌分化密切相关^[27-29]; NDRG2 mRNA水平可作为监测结直肠癌复发和评估患者预后的参考特征^[30]; NDRG2受缺氧应激调控, 在缺氧状态下缺氧诱导因子可通过直接结合NDRG2启动子区域3个缺氧反应元件(HREs)活化NDRG2表达, 并随之发生由胞浆向核内的转移, 进而调控相关基因的转录^[31-33]; NDRG2受到p53的直接调控, 并随之参与了p53依赖的细胞凋亡过程^[17, 34-35]; AKT抑制剂可减少热疗对胃癌细胞NDRG2磷酸化水平的增加作用, 提示热疗可能以AKT依赖的方式诱导了胃癌细胞中NDRG2的磷酸化^[36-38]。尽管如此, 有关NDRG2在造血系统疾病, 尤其是人骨髓瘤中的作用还未见报道。本研究主要构建了NDRG2基因反转录病毒表达系统, 包装病毒, 并且筛选稳定表达NDRG2基因的人骨髓瘤细胞系U266, 这将为NDRG2在人骨髓瘤中的作用研究奠定了基础。

反转录病毒介导的基因表达是20世纪80年代发展起来的一种高效基因转移技术, 它是借助反转录病毒载体与外源基因重组后, 经包装细胞系包装产生缺陷型重组反转录病毒进而感染靶细胞, 从而完成介导靶基因表达的目的^[39]。因此, 本研究也选用反转录病毒进行载体构建, 重组的反转录病毒载体导入包装细胞后, 可产生有感染能力的复制缺陷型病毒, 将介导NDRG2表达的病毒转染靶细胞人骨髓瘤细胞系U266, 并且筛选稳定表达NDRG2蛋白的细胞系, 可用于研究NDRG2在人骨髓瘤

发病中的作用。

本研究成功构建了NDRG2基因表达的反转录病毒载体, 包装病毒并感染细胞, 筛选获得NDRG2稳定表达的人骨髓瘤细胞系U266, 为后续实验研究做好铺垫。

作者贡献: 实验设计和实施为欧剑锋, 实验评估为任晖, 资料收集为王存邦。欧剑锋成文, 白海审核, 白海对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 骨髓瘤-又称浆细胞瘤, 是一种发生在骨髓浆细胞的常见恶性肿瘤, 主要是具有合成和分泌免疫球蛋白的浆细胞发生恶变, 从而产生大量的免疫球蛋白或本周蛋白, 对机体造成损伤。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Brioli A, Melchor L, Cavo M, et al. The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2014;165(4):441-454.
- [2] Kim JH, Goulston C, Sanders S, et al. Cytomegalovirus reactivation following autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma in the era of novel chemotherapeutics and tandem transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(11):1753-1758.
- [3] Hoctor VT, Campbell LJ. Hyperhaploid plasma cell myeloma. *Cancer Genet.* 2012;205(7-8):414-418.
- [4] Deng Y, Yao L, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer.* 2003;106(3):342-347.
- [5] Wang L, Liu N, Yao L, et al. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):239-250.
- [6] Li Y, Shen L, Cai L, et al. Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 2011;1382:252-258.
- [7] Cao W, Zhang JL, Feng DY, et al. The effect of adenovirus-conjugated NDRG2 on p53-mediated apoptosis of hepatocarcinoma cells through attenuation of nucleotide excision repair capacity. *Biomaterials.* 2014;35(3):993-1003.
- [8] Li L, Wang J, Shen X, et al. Expression and prognostic value of NDRG2 in human astrocytomas. *J Neurol Sci.* 2011;308(1-2):77-82.
- [9] Araya-Callis C, Hiemke C, Abumaria N, et al. Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;224(1):209-222.
- [10] Vigo F, Ciammella P, Valli R, et al. Extraskeletal multiple myeloma presenting with an atrial mass: a case report and a review of the literature. *J Med Case Rep.* 2012;6:236.
- [11] Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Prevention and treatment of myeloma bone disease. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012;7(4):249-257.
- [12] Deng Y, Yao L, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer.* 2003;106(3):342-347.

- [13] Hu XL, Liu XP, Deng YC, et al. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. *Cell Tissue Res.* 2006;325(1):67-76.
- [14] Skiriutė D, Steponaitis G, Vaitkienė P, et al. Glioma Malignancy-Dependent NDRG2 Gene Methylation and Downregulation Correlates with Poor Patient Outcome. *J Cancer.* 2014;5(6):446-456.
- [15] Zhou B, Tang Z, Deng Y, et al. Tumor suppressor candidate gene, NDRG2 is frequently inactivated in human glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep.* 2014;10(2):891-896.
- [16] Wu Z, Liao H, Su J, et al. Adenovirus-Mediated NDRG2 Inhibits the Proliferation of Human Renal Cell Carcinoma Cell Line OS-RC-2 in Vitro. *Cell Biochem Biophys.* 2014. [Epub ahead of print]
- [17] Furuta H, Kondo Y, Nakahata S, et al. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(4):1785-1791.
- [18] Hu XL, Liu XP, Lin SX, et al. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23):3518-3521.
- [19] Zhao H, Zhang J, Lu J, et al. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:303.
- [20] Ma YL, Qin P, Feng DY, et al. Estrogen regulates the expression of NdrG2 in astrocytes. *Brain Res.* 2014;1569:1-8.
- [21] Zhang ZG, Li G, Feng DY, et al. Overexpression of NDRG2 can inhibit neuroblastoma cell proliferation through negative regulation by CYR61. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(1):239-244.
- [22] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1):164-169.
- [23] Gao L, Wu GJ, Liu B, et al. Up-regulation of pVHL along with down-regulation of HIF-1 α by NDRG2 expression attenuates proliferation and invasion in renal cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(12):e84127.
- [24] Li Y, Liu C, Hou W, et al. Retrograde ductal administration of the adenovirus-mediated NDRG2 gene leads to improved sialaden hypofunction in estrogen-deficient rats. *Mol Ther.* 2014;22(5):908-918.
- [25] Feng L, Xie Y, Zhang H, et al. Down-regulation of NDRG2 gene expression in human colorectal cancer involves promoter methylation and microRNA-650. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406(4):534-538.
- [26] Ma J, Jin H, Wang H, et al. Expression of NDRG2 in clear cell renal cell carcinoma. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(7):1316-1320.
- [27] Shi H, Jin H, Chu D, et al. Suppression of N-myc downstream-regulated gene 2 is associated with induction of Myc in colorectal cancer and correlates closely with differentiation. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(6):968-975.
- [28] Kim YJ, Kang HB, Yim HS, et al. NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients. *Oncol Rep.* 2013;30(4):1890-1898.
- [29] Chu D, Zhang Z, Li Y, et al. Prediction of colorectal cancer relapse and prognosis by tissue mRNA levels of NDRG2. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(1):47-56.
- [30] Kim A, Kim MJ, Yang Y, et al. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis.* 2009; 30(6):927-936.
- [31] Wang L, Liu N, Yao L, et al. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):239-250.
- [32] Shon SK, Kim A, Kim JY, et al. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 385(2):198-203.
- [33] Park Y, Shon SK, Kim A, et al. SOCS1 induced by NDRG2 expression negatively regulates STAT3 activation in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;363(2):361-367.
- [34] Li Y, Xu N, Cai L, et al. NDRG2 is a novel p53-associated regulator of apoptosis in C6-originated astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. *PLoS One.* 2013;8(2):e57130.
- [35] Foletta VC, Prior MJ, Stupka N, et al. NDRG2, a novel regulator of myoblast proliferation, is regulated by anabolic and catabolic factors. *J Physiol.* 2009;587(Pt 7):1619-1634.
- [36] Tao Y, Guo Y, Liu W, et al. AKT inhibitor suppresses hyperthermia-induced NdrG2 phosphorylation in gastric cancer cells. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(4):394-404.
- [37] Tepel M, Roerig P, Wolter M, et al. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008;123(9):2080-2086.
- [38] Choi SC, Yoon SR, Park YP, et al. Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Exp Mol Med.* 2007;39(6):705-714.
- [39] Sokol M, Wabl M, Ruiz IR, et al. Novel principles of gamma-retroviral insertional transcription activation in murine leukemia virus-induced end-stage tumors. *Retrovirology.* 2014;11:36.