

基础研究 ·

G 蛋白调节子 16 对胶质瘤 C6 细胞周期的调节

张 丰 李 青 章必成 叶 菁 陈广生 王 莉 林圣彩

【摘要】目的 探讨 G 蛋白调节子 16(RGS16)对胶质瘤 C6 细胞周期的影响。方法 利用脂质体介导法将 RGS16 基因导入 C6 细胞中,在倒置显微镜下观察细胞形态变化和贴壁生长情况;免疫细胞化学法检测转染前后 RGS16 蛋白的表达情况;流式细胞仪检测转染 pCMV5-RGS16 和 pCMV5 质粒后每隔 12 h 后的细胞周期变化。结果 转染 pCMV5-RGS16 质粒 24 h 后 30.0% 细胞贴壁性降低,突起收缩,细胞变圆,72 h 之后细胞又恢复正常;RGS16 蛋白的表达呈时相性,36 h 时表达率最高(阳性率为 13.0%),72 h 表达终止;C6 细胞的各期细胞比例变化与 RGS16 蛋白表达对应,在 36 h 时 G₁ 期比例从转染前的 70.5% 降低到 60.2%,S 期比例从 20.9% 增加到 34.9%;在 48 h 时 G₁ 期增加到 76.2%,S 期减少到 11.4%;72 h 各期恢复到正常比例。对照组细胞转染前后形态变化不明显,RGS16 蛋白表达阴性,细胞周期变化不明显。结论 RGS16 能促进 C6 细胞周期的运行。

【关键词】 G 蛋白调节子 16;基因转染;细胞周期;脑胶质瘤

中图分类号:R739.41 文献标识码:A 文章编号:1001-5930(2002)01-0001-03

Regulation of Cell Cycle of Glioma C6 Cells by Regulator of G Protein Signaling 16

ZHANG Feng, LI Qing, ZHANG Bi-cheng, et al. Department of Pathology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi An, 710033

【Abstract】 Objective To study the effect of regulator of G protein signaling 16(RGS16) on the cell cycle of glioma C6 cell. **Methods** pCMV5-RGS16 was transfected into C6 cells by lipofectin. The morphological and adhesive changes of the cells were observed under an inverted microscope. Expression of RGS16 was examined by immunocytochemical method both before and after the transfection. Flow Cytometry was adopted to measure the fraction number changes of the cell cycle phase every 12 h. **Results** 24 hours after the transfection of pCMV5-RGS16 approximately 30.0% C6 cells grew round and their dendritic spine withdrew. RGS16 expressed wavyly with time. The highest positive rate reached at 13.0% after 36 h and was nondetectable after 72 h. Consistent with the expression of RGS16, the fraction number of G₁ phase reduced from 70.5% to 60.2% and that of S phase increased from 20.9% to 34.9% after 36 h; but after 48 h that of G₁ phase accumulated to 76.2% and that of S phase deduced to 11.4%; after 72 h the cell cycle returned to normal. In contrast, the control group did not express RGS16 and had nearly no changes of the morphology and the fraction number of each phase. **Conclusion** RGS16 might promote the progression of cell cycle of C6 cells.

【Key words】 Regulator of G protein signaling 16(RGS16); Gene transfection; Cell cycle; Glioma

(The Practical Journal of Cancer, 2002, 17: 001 ~ 003)

SST2 是最早发现的存在于低等真核生物酿酒酵母细胞中的 1 种 G 蛋白调节子(regulators of G protein signaling, RGS), 它能下调酿酒酵母细胞对蜕皮素的反应敏感性, 从而使因蜕皮素作用而停滞于细胞周期 G₁ 期的酿酒酵母细胞顺利进入 S 期, 恢复增殖状态^[1]。我们从小鼠垂体中克隆了 G 蛋白调节子 16(RGS16), 并发现其在酵母细胞中有类似 SST2 的功能^[2], 但 RGS16 对哺乳动物细胞周期的调节作用还未见报道, 因此我们将外源性基因 RGS16 导入 C6 细胞, 观察其对 C6 细胞的影响, 为确定 RGS16 在哺乳动物

细胞中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠胶质瘤 C6 细胞由本实验室保存, pCMV5-RGS16, pCMV5 和 RGS16 抗体由新加坡国立大学惠赠。脂质体为 Gibco 公司产品; 免疫组化试剂盒为武汉博士德公司产品; DNA-Prep 试剂盒为美国 Coulter 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因转染^[3] C6 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中常规培养, 细胞生长至对数期时以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板中。将 pCMV5-

作者单位: 710033 第四军医大学西京医院病理科(张 丰、李青、章必成、叶 菁、陈广生、王 莉), 117609 新加坡国立大学分子细胞生物学研究所(林圣彩)

RGS16 3 μg 和脂质体 10 μl 分别溶于无血清培养液 100 μl , 两溶液缓慢混匀, 室温放置 30 min, 加入无血清培养液 0.8 ml, 混匀后加入上述 6 孔培养板中, 常规培养 4 h 后, 每孔加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 3 ml, 12、24、36、48、60 和 72 h 后分别在倒置显微镜下观察细胞的形态变化。采用同样方法转染 pCMV5 空载体作为对照。只加脂质体每孔 10 μl 和未处理组各 3 孔作为阴性对照。阳性率计算: 阳性率 (%) = (RGS16 蛋白表达阳性的细胞数 / 总细胞数) \times 100%。

1.2.2 免疫细胞化学染色 转染同时制备细胞爬片, 转染后间隔 12 h 取出细胞爬片, PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min; 95% 乙醇固定 30 min, 加兔抗鼠 RGS16 抗体 (1:50), 4 过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入即用型羊抗兔抗体, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入 SABC 复合物, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木精衬染后封固观察。

1.2.3 细胞周期分析 6 组细胞各约 1×10^6 个, 经胰酶消化制成单细胞悬液, 离心 2 次, 每次 PBS 4 ml 洗涤。70% 乙醇固定, DNA 染色后用流式细胞仪检测细胞周期变化情况。

2 结果

2.1 细胞形态变化

转染 pCMV5-RGS16 24 h 后, 细胞贴壁性降低, 突起收缩, 细胞变圆, 72 h 后恢复正常。对照组未见明显变化。

2.2 免疫细胞化学染色

转染 pCMV5-RGS16 组 RGS16 蛋白表达阳性, 定位于细胞质和(或)细胞核, 并且 RGS16 的表达呈时间性, 12 h 开始表达, 36 h 到达高峰 (阳性率为 13.0%), 72 h 后终止表达。转染 pCMV5 组, 脂质体组和未处理组 RGS16 蛋白表达阴性。表明转染 pCMV5-RGS16 组的细胞有外源性基因 RGS16 的表达, 而其它 3 个对照组无 RGS16 的表达。

2.3 细胞周期分析

转染 pCMV5-RGS16 组 24 h 开始细胞周期 G_1 期减少, S 期细胞数目增加, 36 h 时 S 期比例达到高峰 (S 期比例为 13.0%), 72 h 恢复到正常比例, 这一结果与 RGS16 蛋白表达对应。pCMV5 组、脂质体组和未处理组细胞周期变化不明显, 见表 1。

表 1 流式细胞仪显示 RGS16 组细胞周期的细胞百分数变化

时间(h)	G_1 (%)	S (%)	G_2 (%)
0	70.5	20.9	8.6
12	69.1	21.7	8.2
24	63.0	28.9	8.1
36	60.2	34.9	4.9
48	76.2	11.4	12.4
60	74.2	19.0	6.8
72	69.8	21.0	8.2

3 讨论

RGS 蛋白家族是 1 组含有约 120 个氨基酸的 RGS 结构域的蛋白质。它们主要直接与 G 蛋白的 G_i 和 G_q 亚基结合, 通过上调 G 蛋白 亚基的 GTP 酶活性, 促进 G 蛋白 亚基和 亚基的结合, 从而负调节 G 蛋白的活性^[4]。低等真核生物酿酒酵母细胞在蜕皮素的作用下会暂时停滞于细胞周期 G_1 期, 但过一段时间之后, 即使仍有蜕皮素的持续作用, 酵母细胞也能走出 G_1 期进入 S 期, 恢复增殖状态。这是由于蜕皮素在抑制细胞周期运行的同时诱导 1 种 RGS 蛋白即 SST2 的表达, SST2 负调节 G 蛋白, 减弱或终止蜕皮素通过 G 蛋白传递到细胞核的信号, 使酵母细胞对蜕皮素脱敏而恢复细胞周期的正常进行。SST2 突变失活的酵母细胞比野生型酵母细胞对蜕皮素敏感 100 ~ 300 倍, 并且在蜕皮素的作用下细胞持续停滞于 G_1 期^[5,6]。我们发现 RGS16 能替代突变失活的 SST2 功能, 使酵母细胞走出 G_1 期, 恢复增殖状态^[2]。为了观察 RGS16 在哺乳动物细胞中的作用, 我们将 pCMV5-RGS16 瞬时转入 C6 细胞中, 发现 RGS16 在 12 h 开始表达, 36 h 到达高峰, 72 h 终止表达。与 RGS16 蛋白表达对应, C6 细胞周期在 12 h 时 G_1 期减少, S 期增高; 36 h 时 G_1 期减至最低峰, S 期增至最高峰; 48 h 时 G_1 期增加, S 期减至最低; 72 h 细胞周期恢复正常。因为 36 h 时 RGS16 表达率最高, 而此时 C6 细胞 G_1 期细胞比例下降, S 期比例升高, 类似 SST2 对酵母细胞的作用。48 h 的细胞周期结果可能是在 36 h 已进入 S 期的细胞能顺利经过 G_2 、M 期, 进入下一细胞周期的 G_1 期, 但由于细胞周期限制点 (restricted point, R point) 主要存在于 G_1 期, 使得进入 G_1 期的细胞暂时不能跨过 R 点, 所以宏观上表现为此期比例增加, 而 S 期细胞比例减少^[7]。72 h 后由于 RGS16 表达减少, 因此细胞周期又基本恢复正常。这表明 RGS16 确实可以调节 C6 细胞周期的运行。细胞贴壁性降低, 星状突

起收缩,细胞变圆,这可能是 RGS16 对 G_q 抑制导致细胞内钙离子的变化所致^[8],也可能是正在增殖分裂的细胞数增多的现象。

本实验首次发现了 RGS16 可以调节 C6 细胞周期的运行,也间接说明了 RGS 蛋白功能在进化上具有保守性。由于 SST2 下调 G 蛋白活性,从而减弱主要通过 RAS/RAF/MAPK 通路传递到细胞核内的信号,使 Cln1p-Cdc28 和 Cln2p-Cdc28 活化,促进细胞周期的运行^[5,9,10]。因此我们推测 RGS16 也可能通过间接调节 Cdc28 而调节 C6 细胞周期的运行。但由于哺乳动物细胞信号转导的复杂性以及胶质瘤 C6 细胞内基因突变造成信号转导通路与正常细胞之间的差异性^[11],因此也不能排除 RGS16 通过其它信号转导通路调节 C6 细胞周期的运行。这些工作还有待于进一步探索。

参考文献

- [1] Dohlman HG, Song J, Ma D, et al. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with G α 1 (the G protein alpha subunit) [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(9): 5194.
- [2] Chen C, Zheng B, Han J, et al. Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to G α proteins and inhibits pheromone signaling in yeast [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (13): 8679.
- [3] Zhang BC, Li Q, Ye J, et al. p38MAPK gene transfection can induce the apoptosis of glioma cells C6 [J]. *J Med Coll PLA*, 2001, 22(3): 211.
- [4] Burchett SA. Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(4): 1335.
- [5] Chen T, Kurjan J. *Saccharomyces cerevisiae* Mpt5p interacts with Sst2p and plays roles in pheromone sensitivity and recovery from pheromone arrest [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6): 3429.
- [6] Dohlman HG, Apaniesk D, Chen Y, et al. Inhibition of G protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15 (7): 3635.
- [7] Israels ED, Israels L G. The cell cycle [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(1): 88.
- [8] Zhang Y, Neo SY, Han J, et al. RGS16 attenuates galphaq-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(5): 2851.
- [9] Druey KM, Blumer KJ, Kang VH, et al. Protein, Nucleotide, OMIM Inhibition of G protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family [J]. *Nature*, 1996, 379(6567): 742.
- [10] Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, et al. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20(10): 408.
- [11] Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(2): 120.

(收稿日期 2001 - 06 - 25 修回日期 2001 - 10 - 10)

全国乳腺癌病理、临床学术会议征文通知

由中国抗癌协会乳腺癌专业委员会主办,江西省抗癌协会和江西省肿瘤医院承办的全国乳腺癌病理、临床学术会议,定于 2002 年 6 月在南昌市召开,主题为“21 世纪乳腺癌研究的最新成就及前景”。大会将邀请著名专家做报告,评选优秀论文并在全国性肿瘤杂志发表。大会被列为国家级继续教育项目,授继教学分 10 分。

征文内容:乳腺癌的病理分类及分子研究、基础研究、临床研究、早期诊断、综合治疗及中西医结合治疗等最新进展。

征文要求:论文须未公开发表过,全文 5000 字以内;中英文摘要(目的、方法、结果、结论)及关键词各 1 份 500 字;正文与摘要分开,另纸打印,单位盖章;寄交软盘(Word 软件编辑);注明第一作者姓名、单位、地址、邮编;自留底稿;截止日期为 2002 年 4 月 30 日;来稿请寄江西省南昌市北京东路 519 号江西省抗癌协会办公室收,邮政编码:330029,联系人:黎治平(13707917185)、周训俊(13707917057),联系电话:0791 - 8313664,传真:0791 - 8321742。

中国抗癌协会乳腺癌专业委员会
江西省抗癌协会
江西省肿瘤医院