

研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2002)24-2229-04

## p38MAPK和 RGS16 对大鼠胶质瘤 C6 细胞凋亡和细胞周期的影响

张 丰<sup>1</sup>, 李 青<sup>1</sup>, 王映梅<sup>1</sup>, 王 莉<sup>1</sup>, 林圣彩<sup>2</sup><sup>1</sup> 第四军医大学西京医院病理科, 陕西 西安 710033, <sup>2</sup> 香港科技大学生物化学教研室, 香港 00853)

关键词: p38MAPK; RGS16; 转染; 细胞周期

中图分类号: 739.41 文献标识码: A

**摘要:** 目的 探讨 p38MAPK 和 RGS16 对大鼠胶质瘤 C6 细胞的生物学特性的影响。方法 利用脂质体介导法将 p38MAPK 和 RGS16 基因分别或共转染导入 C6 细胞中; 用 p38MAPK 抑制剂 SB-202190 处理处于对数生长期的转染和未转染 p38MAPK 的 C6 细胞, 24 ~ 36 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态变化和贴壁情况; 免疫细胞化学法检测转染前后 p38MAPK 和 RGS16 蛋白的表达情况; 流式细胞仪检测细胞周期变化和细胞是否有凋亡发生。结果 转染 pCMV5-p38 和/或 pCMV5-RGS16 质粒 36 h 后 30 % 细胞贴壁性降低, 突起收缩, 细胞变圆; p38MAPK 和 RGS16 蛋白均表达阳性; 转染 pCMV5-p38 组出现 33.8 % 的凋亡峰, 细胞周期结果显示 G1 期细胞百分数增加 17 %, 而 S 期细胞百分数减少 14 %; 转染 pCMV5-RGS16 组无凋亡发生, 细胞周期结果显示 G1 期细胞百分数减少 10 %, 而 S 期细胞百分数增加 14 %; 共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 组未出现的凋亡峰, 细胞周期结果显示 G1 期和 S 期细胞百分数变化与未处理组之间没有明显差别; 但共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5 组出现的凋亡峰, 细胞周期结果显示 G1 期和 S 期细胞百分数变化与转染 pCMV5-p38 组之间很接近; SB-202190 处理的未转染组细胞周期结果显示 G1 期细胞百分数减少 18 %, 而 S 期细胞百分数增加 18 %; SB-202190 能对抗 pCMV5-p38 对 C6 细胞周期的影响。结论 p38MAPK 可以抑制大鼠胶质瘤 C6 细胞周期运行和诱导其凋亡; RGS16 和 SB202190 有拮抗 p38MAPK 作用, 并且可以促进 C6 细胞增殖。

### Impact of p38MAPK and RGS16 to the apoptosis and cell cycle of the glioma C6 cells

ZHANG Feng<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, WANG Ying-Mei<sup>1</sup>,

收稿日期: 2002-09-10; 修回日期: 2002-10-10

基金项目: 高等学校骨干教师资助计划项目; 留学归国人员科研启动基金项目 ([1999]747 号)

通讯作者: 李 青. Tel. (029) 3373501 Email. liqing @fmmu.edu.cn

作者简介: 张 丰 (1975-), 男 (汉族), 山西省稷山县人. 硕士生 (导师 李 青). Tel. (029) 3374541 Ext. 119 Email. cypress1975 @263.net.cn

WANG Li<sup>1</sup>, LIN Sheng-Cai<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China,<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Science & Technology University of Hong Kong, Hong Kong 00853, China**Key words:** p38MAPK; RGS16; transfection; cell cycle

**Abstract:** **AIM** To study the effects of p38MAPK and RGS16 on the biological characteristics of glioma C6 cells. **METHODS** pCMV5-p38 and pCMV5-RGS16 were respectively or jointly transfected into C6 cells by lipofectin. SB-202190 was used to treat the transfected and nontransfected pCMV5-p38 C6 cells. The morphological and adhesive changes of the cells were observed under an inverted microscope. Expression of p38 and RGS16 was examined by immunocytochemical method both before and after the transfection. Flow Cytometry was employed to measure the fraction number changes of the cell cycle phase and to detect whether p38 and/or RGS16 could induce apoptosis of C6 cells. **RESULTS** 36 hours after the transfection of pCMV5-p38 and/or pCMV5-RGS16 approximately 30 % of C6 cells grew round, 40 % expressed p38MAPK and 13 % RGS16. In addition, flow cytometry showed that the transfected p38MAPK induced apoptosis rate of C6 cells was 33.8 % and the fraction number of G1 phase increased by 17 % and that of S phase decreased by 14 %. RGS16 didn't induce C6 cells to apoptosis but decreased the fraction number of G1 phase by 10 % and increased that of S phase by 14 %. The jointly transfected pCMV5-p38 and pCMV5-RGS16 group had no obvious effects on the cell cycle of C6 cells but the jointly transfected pCMV5-p38 and pCMV5 group induced a apoptosis peak and had nearly similar effects on the cell cycle of C6 cells to those of transfected pCMV5-p38 group. SB-202190 decreased the fraction number of G1 phase of the nontransfected groups by 18 % and increased that of S phase by 18 %. SB-202190 offset the effects of pCMV5-p38 on the cell cycle. **CONCLUSION** p38MAPK not only induces apoptosis of glioma C6 cells but also retards their cell cycle progress; RGS16 and SB-202190 can resist the effects of p38MAPK on C6 cells and promote C6 cell cycle.

## 0 引言

丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是参与细胞增殖、分化和凋亡的重要信号转导分子<sup>[1]</sup>, 其家族成员 p38MAPK 除参与细胞的生长、发育外, 主要参与细胞的应激反应, 紫外线照射、细胞外高渗透压和细菌毒素等都可以激活 p38MAPK 并能促进其蛋白表达<sup>[2]</sup>. G 蛋白调节子 (regulators of G protein signaling, RGS) 是参与 G 蛋白信号转导的一个大家族, 主要功能是负调节 G<sub>i</sub> 和 G<sub>q</sub> 亚基, 其成员超过 20 种<sup>[3]</sup>. 1997 年我们<sup>[4]</sup>在小鼠垂体内克隆了 RGS16, 发现 RGS16 能抑制血小板激活因子对 p38MAPK 的激活作用<sup>[5]</sup>. 最近我们<sup>[6]</sup>发现 RGS16 可以促进 C6 细胞周期的运行, 但其机制还不清楚, 因此我们将外源性基因 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 共转染导入 C6 细胞; 同时用 p38MAPK 的抑制剂 SB-202190 处理转染 pCMV5-p38 前后 C6 细胞, 观察它们对细胞的影响, 为探索 p38MAPK 和 RGS16 蛋白之间的关系以及 p38MAPK 在 C6 细胞中的作用提供依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠胶质瘤细胞 C6: 本室保存; pCMV5-p38, pCMV5-RGS16 和 pCMV5 质粒以及 p38MAPK 和 RGS16 抗体: 新加坡国立大学林圣彩教授惠赠; 脂质体: Gibco 公司; 免疫组化试剂盒: 武汉博士德公司; SB-202190: Calbiochem 公司; DNA-Prep 试剂盒: 美国 Coulter 公司; 普通倒置显微镜: 上海光学仪器六厂, 37X 型; 流式细胞仪: 美国 Coulter 公司, EPICS-ELITE-ESP 型.

### 1.2 方法

**1.2.1 基因转染<sup>[7]</sup>** C6 细胞在含 150 mL L<sup>-1</sup> 小牛血清的 RPMI1640 培养液中常规培养, 细胞生长至对数期时以 1 × 10<sup>5</sup>/孔接种于 6 孔培养板. 将 pCMV5-p38, pCMV5-RGS16 和 pCMV5 质粒各 3 μg 与脂质体 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; 同样方法共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 各 3 μg; pCMV5-p38 和 pCMV5 各 3 μg 共转染作为对照. 常规培养 4 h 后, 每孔加入含 150 mL L<sup>-1</sup> 小牛血清的 RPMI1640 培养液 2 mL. 只加脂质体每孔 10 μL 和未处理组各 3 孔作为阴性对照.

**1.2.2 SB-202190 处理<sup>[8]</sup>** 依照上述方法转染 pCMV5-p38, 常规培养 4 h 后, 每孔加入 150 mL L<sup>-1</sup> 小牛血清 RPMI1640 培养液 2 mL, 同时加入 SB-202190

始终浓度为 10 μmol L<sup>-1</sup>, 轻轻摇匀, 继续培养.

**1.2.3 免疫细胞化学染色** 转染同时制备细胞爬片, 转染后 36 h 取出, PBS 洗涤 2 次 × 3 min; 950 mL L<sup>-1</sup> 乙醇固定 30 min, 加兔抗鼠 p38MAPK 或 RGS16 抗体 (1:50), 4 过夜, PBS 洗涤 3 次 × 5 min; 加入既用型羊抗兔, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次 × 5 min; 加入 SABC 复合物, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次 × 5 min; DAB 显色, 苏木精衬染. 蛋白表达阳性率计算: 在随机一显微镜视野下, 阳性率 = 蛋白表达阳性的细胞数 × 100% / 总细胞数.

**1.2.4 细胞周期和凋亡分析<sup>[9]</sup>** 36 h 后取各组细胞各约 1 × 10<sup>6</sup> 个, 经胰酶消化制成单细胞悬液, 2000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 次, 每次 PBS 4 mL 洗涤. 700 mL L<sup>-1</sup> 乙醇固定, DNA 染色后用流式细胞仪检测细胞周期变化和是否有凋亡峰出现.

## 2 结果

**2.1 细胞形态变化** 转染 pCMV5-p38 和/或 pCMV5-RGS16 36 h 后, 倒置显微镜下显示细胞贴壁性降低, 突起收缩, 细胞变圆. 对照组未见明显变化 (Fig 1).

**2.2 免疫细胞化学** 转染 pCMV5-p38、共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 以及共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5 组 p38MAPK 蛋白表达阳性 (阳性率均为 40%, Fig 2); 转染 pCMV5-RGS16、共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 组 RGS16 蛋白表达阳性 (阳性率均为 13%, Fig 3); SB-202190 对转染 pCMV5-p38 的蛋白表达无影响; 转染 pCMV5 组、脂质体组和未处理组 p38MAPK 和 RGS16 蛋白表达阴性.

**2.3 细胞周期和凋亡分析** 转染 pCMV5-p38 组出现 33.8% 的凋亡峰, 细胞周期结果显示 G<sub>1</sub> 期细胞百分数增加 17%, 而 S 期细胞百分数减少 14%; 转染 pCMV5-RGS16 组无凋亡发生, 细胞周期结果显示 G<sub>1</sub> 期细胞百分数减少 10%, 而 S 期细胞百分数增加 14%; 共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 组未出现凋亡峰, 细胞周期结果显示 G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞百分数变化与未处理组之间无明显差别; 但共转染 pCMV5-p38 和 pCMV5 组出现的凋亡峰, 细胞周期结果显示 G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞百分数变化与单转染 pCMV5-p38 组之间很接近; SB-202190 处理的未转染组细胞周期结果显示 G<sub>1</sub> 期细胞百分数减少 18%, 而 S 期细胞百分数增加 18%; SB-202190 对转染 pCMV5-p38 实验组的细胞周期无明显影响; 转染 pCMV5 组、脂质体组和未处理组细胞周期变化不明显, 也无凋亡峰出现 (Tab 1).

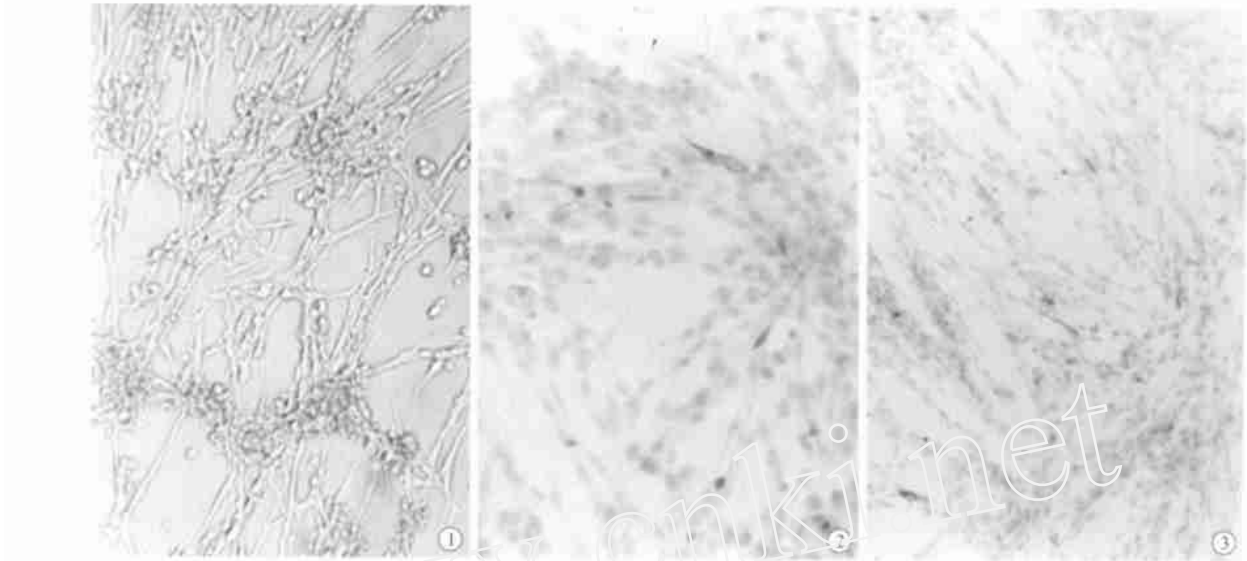


图 1 转染 pCMV5-p38 和/或 pCMV5-RGS16 36 h 后 C6 细胞形态变化

Fig 1 C6 cells grew round and their dendritic spine withdrew 36 h after transfection of pCMV5-p38 and/or pCMV5-RGS16 ×100

图 2 转染 pCMV5-p38 36 h 后 C6 细胞质和胞核 p38MAPK 蛋白表达阳性

Fig 2 Positive expression of p38MAPK in cytoplasm and nucleus of C6 cells 36 h after transfection of pCMV5-p38 SABC ×200

图 3 转染 pCMV5-RGS16 36 h 后 C6 细胞质和胞核 RGS16 蛋白表达阳性

Fig 3 Positive expression of RGS16 in cytoplasm and nucleus of C6 cells 36 h after transfection of pCMV5-RGS16 SABC ×200

表 1 流式细胞仪检测各组细胞周期变化

Group	G1	S	G2
Normol	70	21	9
Lipofectin	73	19	8
pCMV5	73	18	9
pCMV5-p38	87	7	6
pCMV5-p38 + pCMV5	84	2	14
pCMV5-RGS16	60	35	5
pCMV5-p38 + pCMV5-RGS16	66	23	11
SB-202190	52	39	9
SB-202190 + pCMV5-p38	68	21	11

### 3 讨论

MAPK 蛋白激酶是细胞内重要的信号蛋白分子,参与细胞的增殖、分化和凋亡等生理病理过程。在哺乳动物细胞中,实验证实有四条 MAPK 信号传导通路,即 ERK 通路、JNK/SAPK 通路、ERK5/BMK1 通路和 p38MAPK 通路<sup>[1]</sup>。ERK 通路在生长因子相关的刺激引起的细胞增殖反应中起着重要的作用<sup>[10]</sup>,而 p38MAPK 主要接受紫外线、高渗透压和细菌毒素等损伤性因素激活和调节,参与应激反应<sup>[2]</sup>。已有实验证实,在一定条件下一些细胞的 ERK 通路的信号与 p38MAPK 通路的信号相互拮抗<sup>[11]</sup>。

由于基因的突变,大部分胶质瘤细胞都过表达 EGF, IGF 和 PDGF 等生长因子和其受体<sup>[12]</sup>,这些因子的信号主要通过 ERK 通路传导到细胞核引起细胞增殖反应<sup>[13]</sup>。哺乳动物细胞增殖时的细胞周期的主要“限制点”在 G1 期,细胞要跨过 G1 期的“限制点”需要细胞外增殖信号的持续不断的刺激,同时要求抑制细胞周期的抑制因子失活或被降解,但是细胞一旦跨过 G1 期就不再需要细胞外增殖信号的刺激,最终能顺利的通过 S, G2 和 M 期<sup>[14]</sup>。为保证细胞分裂时遗传物质的完整性和稳定性,细胞周期的运行受严密的监测和调控,G1 期“监测点”主要由 p53 起中心作用,细胞处于应激状态时,p53 被激活并活化其他一些细胞周期抑制因子如 p21CIP1 和 GADD45 等,阻止细胞停止于 G1 期或使细胞发生凋亡<sup>[15]</sup>。一些应激信号比如紫外线照射,可以激活 p38MAPK,活化的 p38MAPK 磷酸化 p53,导致 p53 依赖的细胞凋亡或细胞周期抑制,而 p38MAPK 被抑制后则不能发生 p53 依赖的凋亡<sup>[16]</sup>。SB-202190 是一种吡啶咪唑化合物,它能特异地和 ATP 竞争与 p38MAPK 的家族成员 p38 和 p38 的结合,是 p38 和 p38 的特异抑制剂,但它不能抑制 p38MAPK 的其他家族成员<sup>[8]</sup>,在本实验中我们用它特异阻断 p38MAPK 间接观察 p38MAPK 对 C6 细胞的作用,我们发现单独转染 pCMV5-p38 可以诱导 C6 细胞凋亡,而转染 pCMV5-p38 的同时用 p38MAPK

的抑制剂 SB-202190 能明显抑制细胞凋亡发生. 这说明 p38MAPK 确实参与细胞凋亡反应.

RGS 蛋白家族是一组含有约 120 个氨基酸的 RGS 结构域的蛋白质, 它们主要直接负调节 G 蛋白的  $G_i$  和  $G_q$  亚基, 并间接负调节 G 蛋白对 MAPK 的激活<sup>[3]</sup>. 1997 年我们<sup>[4]</sup>克隆了 RGS16 并发现其可以代替酵母细胞中一种 RGS 蛋白 SST2 的功能, 使停滞于 G<sub>1</sub> 期的酵母细胞恢复增殖状态. 后来我们<sup>[5]</sup>又发现 RGS16 可以减弱血小板激活因子对 p38MAPK 的激活作用; 并且在 CEM 细胞中蛋白激酶 C 可以通过上调 TNF- $\alpha$  而诱导 RGS16 的表达<sup>[17]</sup>, 另外有人发现 TNF- $\alpha$  抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的信号部分通过激活 p38MAPK 和 p53 起作用<sup>[18]</sup>; Buckbinder 等<sup>[19]</sup>曾发现 p53 可以诱导 RGS16 的表达. 因此我们推测 p38MAPK, p53 和 RGS16 之间可能存在一种反馈关系, 即细胞在受到强烈的损伤信号刺激时, 会通过调节 RGS16 蛋白的表达来减弱传入细胞内的损伤信号. 这与加强 ERK 的信号可以减轻细胞凋亡类似<sup>[11]</sup>. 在本实验中, 我们将 pCMV5-p38 和/或 pCMV5-RGS16 共转染入 C6 细胞, 免疫细胞化学显示 p38MAPK 和/或 RGS16 蛋白表达阳性, 这表明基因转染成功. 单独转染 pCMV5-p38 诱发 33.8% 的 C6 细胞凋亡和 G<sub>1</sub> 期抑制 (G<sub>1</sub> 期细胞百分数增加了 17%, 而 S 期减少了 14%), 这可能是 p38MAPK 激活了 p53, 使细胞或凋亡, 或不能跨过“限制点”而停滞于 G<sub>1</sub> 期; SB-202190 处理的转染 p38MAPK 实验组与 pCMV5-p38 和 pCMV5-RGS16 共转染组都无凋亡发生, 并且细胞周期变化也不明显, 这表明 RGS16 有类似 SB-202190 的功能, 拮抗 p38MAPK; 只转染 pCMV5-RGS16 和只加入 SB-202190 的实验组显示 G<sub>1</sub> 期细胞百分数分别减少 10% 和 18%, 而 S 期分别增加 14% 和 18%, 这可能是在一般情况下, C6 细胞内也有少量的 p38MAPK 的表达, 但不能用免疫细胞化学方法检测出来, 用 RGS16 和 SB-202190 抑制了这些 p38MAPK, 使其下游的 p53 失活, 从而促进 C6 细胞顺利地通过 G<sub>1</sub> 期的 p53“检测点”进入 S 期.

本研究表明: RGS16 和 SB-202190 可以拮抗 p38MAPK 引起的凋亡和对细胞周期的影响; RGS16 和 SB-202190 可能通过抑制 p38MAPK 促进胶质瘤 C6 细胞周期的运行. 从另一方面来看, 细胞的生理功能受细胞内外正负信号的共同调控, 当一方面的信号被阻止时, 另一方面的信号就会起主导作用. 在本实验中, 我们抑制了 p38MAPK 而可能间接加强了通过 ERK 的信号, 从而促进 C6 细胞周期的运行.

## 参考文献:

- [1] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. *Nature*, 2001; 410(6824): 37-40.
- [2] Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: The role of stress-activated kinases, JNK and p38 [J]. *Cell Signal*, 2001; 13(5): 299-310.
- [3] Burchett SA. Regulators of Gprotein signaling: A bestiary of modular protein binding domains [J]. *J Neurochem*, 2000; 75(4): 1335-1351.
- [4] Chen C, Zheng B, Han J, Lin SC. Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to G $\alpha$  proteins and inhibits pheromone signaling in yeast [J]. *J Biol Chem*, 1997; 272(13): 8679-8685.
- [5] Zhang Y, Neo SY, Han J, Yaw LP, Lin SC. RGS16 attenuates galphaq dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor [J]. *J Biol Chem*, 1999; 274(5): 2851-2857.
- [6] Zhang F, Li Q, Zhang BC, Ye J, Chen GS, Wang L, Lin SC. Promotion of glioma C6 cells proliferation by overexpressed RGS16 [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2002; 23(10): 950-952.
- [7] Zhang BC, Li Q, Ye J, Wang YM. p38MAPK gene transfection can induce the apoptosis of glioma cells C6 [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2001; 22(3): 211-213.
- [8] Nomura M, Kaji A, Ma WY, Zhong S, Liu G, Bowden GT, Miyamoto KI, Dong Z. Related articles. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation [J]. *J Biol Chem*, 2001; 276(27): 25558-25567.
- [9] Yuan JL, Chai YB, Hui HX, Wang CJ, Yu MS. Effects of transfected p16 gene on human bladder carcinoma cell cycle [J]. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2001; 22(4): 330-334.
- [10] Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G<sub>1</sub> phase cell cycle machinery [J]. *Bioessays*, 2000; 22(9): 818-826.
- [11] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. *Science*, 1995; 270(5240): 1326-1331.
- [12] Westermark B, Nister M, Heldin CH. Growth factors and oncogenes in human malignant glioma [J]. *Neurol Clin*, 1985; 3(4): 785-799.
- [13] Shinohara H, Yagita H, Ikawa Y, Oyaizu N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation [J]. *Cancer Res*, 2000; 60(6): 1766-1772.
- [14] Fueyo J, Gomez-Manzano C, Liu TJ, Yung WK. Delivery of cell cycle genes to block astrocytoma growth [J]. *J Neurooncol*, 2001; 51(3): 277-287.
- [15] Bartek J, Lukas J. Pathways governing G<sub>1</sub>/S transition and their response to DNA damage [J]. *FEBS Lett*, 2001; 490(3): 117-122.
- [16] Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation [J]. *EMBO J*, 1999; 18(23): 6845-6854.
- [17] Tong CW, Zhang Y, Neo SY, Lin SC. Specific induction of RGS16 (regulator of Gprotein signaling 16) mRNA by protein kinase C in CEM leukaemia cells is mediated via tumor necrosis factor in calcium sensitive manner [J]. *Biochem J*, 2000; 352(3): 747-753.
- [18] Rokhlin OW, Gudkov AV, Kwek S, Glover RA, Gewies AS, Cohen MB. p53 is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP [J]. *Oncogene*, 2000; 19(15): 1959-1968.
- [19] Buckbinder L, Migul SV, Chen Y, Xu NZ, Talott R, Gelbert L, Gao J, Seizinger BR, Gutkind JS, Kly N. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(15): 7868-7872.

编辑 王睿