

- and directed migration of cultured corneal epithelial cells in a small electric fields are serum dependent [J]. *J Cell Sci* 1996; 109: 1405-1414.
- [4] Korohoda W, Mycielska M, Janda E, et al. Immediate and long-term galvanotactic responses of *Amoeba proteus* to dc electric fields [J]. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 45(1): 10-26.
- [5] Banyard J, Zetter BR. The role of cell motility in prostate cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17(4): 449-458.
- [6] Nuccitelli R. Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues [J]. *Bioelectromagnetics* 1992; (1): 147-157.
- [7] Toso S, Piccoli A, Gusella M, et al. Altered tissue electric properties in lung cancer patients as detected by bioelectric impedance vector analysis [J]. *Nutrition* 2000; 16(2): 120-124.
- [8] McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential [J]. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 943-978.
- [9] 韩静, 惠延年, 韩泉洪, 等. 人视网膜色素上皮细胞在电场中定向移行的实验研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2004, 6: 3.
- [10] Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds [J]. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 1): 199-207.
- [11] Sauer H, Stanelle R, Hescheler J, et al. The DC electrical-field-induced Ca^{2+} response and growth stimulation of multicellular tumor spheroids are mediated by ATP release and purinergic receptor stimulation [J]. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 16): 3265-3273.

内外源性 p53 诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 RGS16 蛋白的表达

洪柳¹, 李青¹, 张静¹, 张丰¹, 陈广生¹, 林圣彩²

Expression of RGS16 protein induced by wide type p53 gene in rat glioma C6 cell line

HONG Liu¹, LI Qing¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Feng¹, CHEN Guang-sheng¹, LIN Sheng-cai²

¹Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; ²School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361000, China

【Abstract】 Objective To investigate whether wide type p53 could induce RGS16 protein expressing in rat glioma C6 cells. **Methods** A tier C6 cells were transfected with pEGFP-C3-wt p53 or treated by epirubicin (400ng/ml) respectively for 0h, 4h, 8h, 16h, 26h, 32h and 52h, the cells were fixed and the expression of p53 and RGS16 protein was detected by immunocytochemistry. **Results** After C6 cell was transfected with pEGFP-C3-wt p53, the expression of p53 was detected at 4h, 8h, 16h, 26h and 32h and RGS16 protein was detected only at 8h and 16h. After treated by epirubicin (400ng/ml), the expression of p53 was detected only at 26h, but none of RGS16 protein. **Conclusion:** Experiment in C6 cell showed the expression of RGS16 could be induced by wide type p53 in glioma C6 cells.

【Key words】 RGS16; p53; transfection; epirubicin; glioma

Modern Oncology 2008; 16(5): 0710-0712

【摘要】 目的: 探讨内外源性野生型 p53 是否可以诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 RGS16 表达。方法: 在大鼠胶质瘤细胞 C6 中, 分别转染 pEGFP-C3-wt p53 或以 400ng/ml 表阿霉素诱导内源性野生型 p53 表达, 于处理后 0h、4h、8h、16h、26h、32h 和 52h 收集细胞爬片, 固定后免疫细胞化学检测 p53 蛋白与 RGS16 蛋白表达。结果: 转染 pEGFP-C3-wt p53 后 4h、8h、16h、26h 和 32h 时均检测到 p53 蛋白表达, 在 8h 和 16h 时检测到 RGS16 蛋白表达; 在 400ng/ml 表阿霉素处理后, 仅在 26h 时检测到 p53 表达而始终未见到 RGS16 蛋白表达。结论: 内外源性野生型 p53 可以诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 RGS16 蛋白的表达。

【关键词】 RGS16 基因; p53 基因转染; 表阿霉素; 胶质瘤

【中图分类号】 R73-3 R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-4992-(2008)05-0710-03

【收稿日期】 2007-07-23

【作者单位】 ¹第四军医大学病理学教研室, 陕西 西安 710032
²厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361000

【作者简介】 洪柳 (1980-), 女, 河南新蔡人, 博士研究生, 主要从事脑肿瘤的病理学研究。

【通讯作者】 李青 (1955-), 女, 山东人, 教授, 博导, 主要从事胶质瘤的发生发展分子机制研究。

G 蛋白信号调节子 (regulators of G-protein signaling, RGS) 是近年发现的新蛋白质家族, 结构中含一保守的 RGS 结构域, 具有三磷酸鸟苷水解酶激活蛋白 (GTPase activating protein, GAP) 活性, 加速 Gα 水解 GTP, 负性调节 G 蛋白信号转导, 参与多种生理、病理过程^[1]。在 RGS 家族中发现 RGS16 可以被野生型 p53 诱导表达^[2]; 不同的细胞组织及处理条件下, p53 基因诱导 RGS16 mRNA 的表达水平不同, 这反映了 RGS16 基因表达存在依赖 p53 和非依赖 p53 机制的

复杂调解;在用阿霉素作为一种应激条件处理细胞时, RGS16只能在表达野生型 p53的细胞中表达,而不能在 p53突变或缺失的细胞中表达。我们曾检测到人胶质瘤中 RGS16与突变型 p53的表达呈负相关^[3],本研究拟通过转染外源性野生型 p53及表阿霉素诱导内源性野生型 p53的处理,检测大鼠胶质瘤细胞 C6中是否也存在这种诱导关系及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠胶质瘤细胞 C6 大肠杆菌 DH5 α 及质粒 pEGFP-C3-wt p53由本教研室保存;表阿霉素购自 Pharmacia 公司;兔抗 RGS16抗体由香港科技大学林圣彩教授惠赠;真核转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;SP 试剂盒、DAB 试剂、兔抗 p53抗体购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 转染 pEGFP-C3-wt p53于 C6细胞 ①细胞培养:将 2 \times 10⁵ 个生长状态良好的 C6细胞接种于 6孔板(板中先放入无菌玻片),在含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养。

②基因转染(脂质体法):将 pEGFP-C3-wt p53和 pEGFP-C3 分别转染大鼠胶质瘤 C6细胞,方法参照 Invitrogen 说明书。A、至细胞长满底部 70% 左右;B、分别在无菌 EP管中准备:A液(100 μ l 无血清 DMEM 培养液中含 4 μ g 质粒 DNA)与 B液(100 μ l 无血清 DMEM 培养液中含脂质体 8 μ l), A、B两液混合后室温孵育 20min; C、无血清培养液轻轻清洗细胞 2次,加 0.8ml 无血清培养液稀释 DNA-脂质体复合物,混合后加入 6孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 6h; D、换成含 10% 新生牛血清的完全培养液继续培养。

③爬片的固定:分别于转染后 0h、2h、4h、8h、16h、26h、

32h和 52h取出细胞爬片, 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min。

1.2.2 表阿霉素处理 C6细胞 ①细胞培养:将 2 \times 10⁵ 个生长状态良好的细胞接种于 6孔板(板中先放入无菌玻片),在含 10% 的新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养。

②表阿霉素处理:在细胞爬满板底的 70% 时,换成含 400ng/ml 表阿霉素的 RPMI 1640 全培养液培养(根据阿霉素、表阿霉素的分子量和摩尔浓度, 400ng/ml 表阿霉素的剂量与 0.5 μ mol/L 的阿霉素相当)。

③爬片的固定:分别于表阿霉素处理后 0h、2h、4h、8h、16h、26h 和 32h 取出细胞爬片,并按上述方法固定细胞爬片。

1.2.3 RGS16和 p53免疫细胞化学 具体步骤如下:① PBS 洗涤后,加 30ml/L H₂O₂ 室温 10min, PBS 洗涤 3次,每次 5min; ②加 10g/L Triton X-100 增加细胞膜的通透性,室温放置 10min,用 PBS 洗涤 3次,每次 5min; ③加正常山羊血清室温封闭 40min,甩去不洗,依次滴加兔抗 RGS16 抗体(1:50)和兔抗 p53 抗体(1:150), 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日复温 30min, PBS 洗涤 3次,每次 5min; ④加生物素标记的羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min, PBS 洗涤 3次,每次 5min; ⑤加 SP 复合物, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min, PBS 洗 3次,每次 5min, DAB 显色 5-10min, 苏木精衬染,按常规脱水透明及中性树脂封片。

2 结果

2.1 经转染 pEGFP-C3-wt p53 后的免疫细胞化学结果

2.1.1 p53 蛋白的免疫细胞化学结果 转染 pEGFP-C3-wt p53 后 4h 观测到 p53 蛋白阳性的 C6 细胞,表现为胞浆出现棕黄色颗粒。随时间延长, p53 阳性细胞数增多、棕黄色加深,阳性表达持续到 32h,于第 52h 检测时消失(见图 1A)。而转染 pEGFP-C3 的 C6 细胞未观测到 p53 蛋白表达。

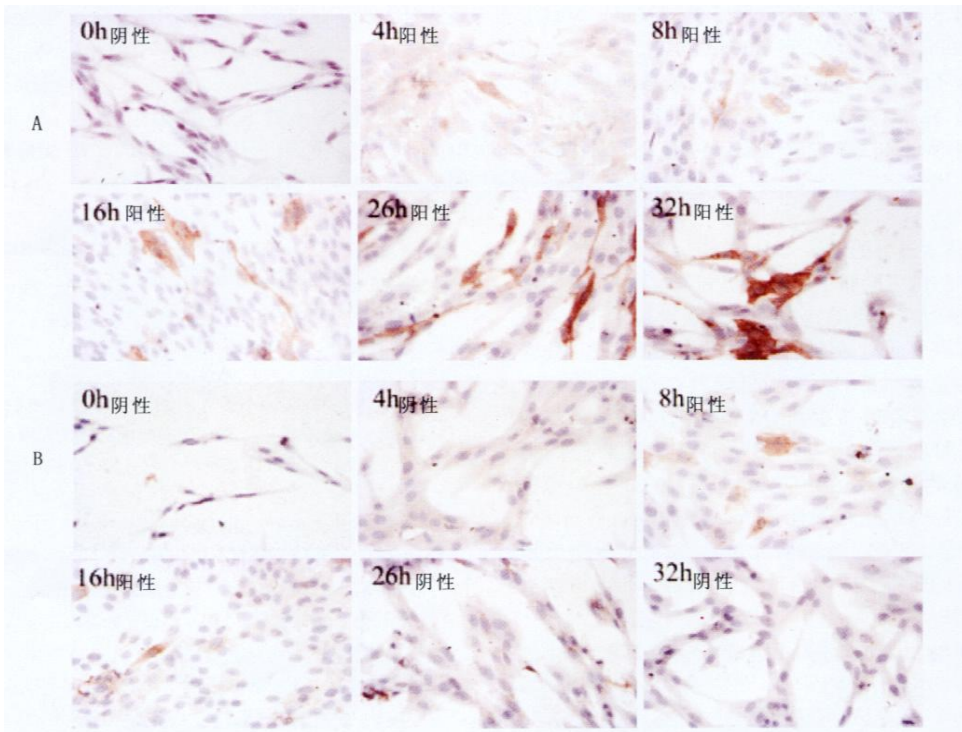


图 1 转染 pEGFP-C3-wt p53 后 p53 蛋白 (A) 和 RGS16 (B) 蛋白的表达

Fig1. Expression of p53(A) and RGS16(B) after transfected with pEGFP-C3-wt p53

2.1.2 RGS16蛋白的免疫细胞化学结果 仅于转染 pEGFP-C3-wt p53后 8h和 16h时观测到 C6细胞的 RGS16蛋白阳性表达, 表现为散在的个别细胞胞浆中出现棕黄色颗粒(见图 1B)。而转染 pEGFP-C3的 C6细胞未观测到 RGS16蛋白表达。

2.2 阿霉素处理后的免疫细胞化学结果

2.2.1 p53蛋白的免疫细胞化学结果 400ng/ml表阿霉素处理后仅于 26h时观察到 C6细胞的 p53蛋白弱阳性表达, 表现为胞浆出现棕色颗粒(见图 2A)。

2.2.2 RGS16蛋白的免疫细胞化学结果 400ng/ml表阿霉素处理后始终未观测到 RGS16蛋白阳性表达的 C6细胞(见图 2B)。

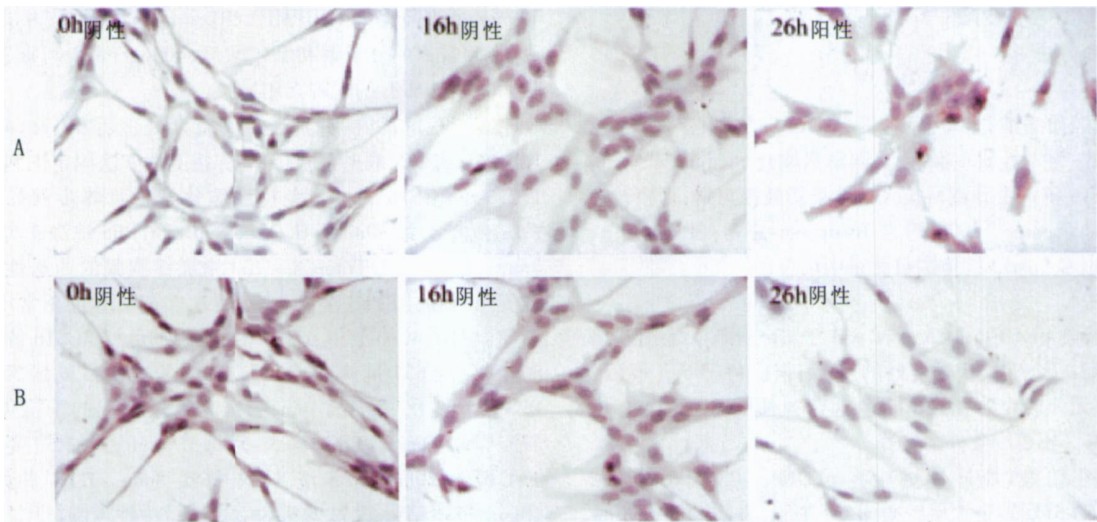


图 2 400 ng/ml表阿霉素处理后 p53蛋白(A)和 RGS16(B)蛋白的表达
Fig2 The expression of p53(A) and RGS16(B) after 400 ng/ml doxorubicin treatment

3 讨论

3.1 关于转染 pEGFP-C3-wt p53的结果

Buckbinder等^[2]在转染 wt p53后 4h到 52h间检测到 p53的 mRNA 表达, 于 4h到 16h间检测到 RGS16的 mRNA 表达。本实验在蛋白水平检测了转染 wt p53后 p53和 RGS16分子的表达情况, 同样显示了 p53可以诱导 RGS16表达及这一过程是 p53的早期事件。尽管 Buckbinder等报道 wt p53诱导后 RGS16和 p21^{WAF1}的 mRNA 在表达上一致, 但 p21^{WAF1}蛋白定位于细胞核和具有多种结构域参与调控细胞周期阻滞; 而我们发现转染 wt p53后诱导的 RGS16蛋白在胞浆中表达。这两种蛋白在细胞内的定位明显不同, 那么, RGS16基因的作用如何? 是否也参与与细胞周期调控? 有待进一步研究探讨。

3.2 关于表阿霉素诱导的结果

表阿霉素和阿霉素同属于蒽环类抗肿瘤抗生素, 其作用机制和抗肿瘤谱相似, 二者的结构区别只是氨基糖部分 4位的羟基由顺式变成了反式, 但这种立体结构的细微变化使表阿霉素疗效更为显著和毒副作用更低使其在临床上应用更为广泛。表阿霉素具有直接损伤 DNA 并抑制 DNA 和 RNA 合成, 对细胞周期各阶段均有作用从而达到抗肿瘤的目的^[4]。而 RGS16的过度表达将抑制 G蛋白偶联的丝裂原信号的传递及丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases MAPK) 信号活化。曾有研究显示, RGS16促进大鼠胶质瘤细胞 C6的细胞周期运行, 促进从 G₁期到 S期过渡^[5]。

实验中, C6细胞经 400ng/ml表阿霉素诱导后仅在第

26h观测到 p53蛋白的微弱表达, 始终没观测到 RGS16蛋白表达。其可能原因是: ①在不同的细胞、组织和处理条件下 RGS16的表达会有很大的差异, 它的表达是受依赖 p53和非依赖 p53的复杂机制调控的^[2]。②如果 C6细胞本身存在 p53的突变或缺失时, 也不能诱导出 RGS16的表达。③本实验中表阿霉素诱导后 p53蛋白本身就是弱表达, 所以 p53的表达量太少不足以诱导出 RGS16表达可能也是 RGS16蛋白未能表达的一个原因, 这从另一个侧面反映了 RGS16的表达与 p53相关。

总之, RGS16的表达确实是受到 p53的调控, 但是 RGS16在 p53下游信号通路中起的作用及是否也参与细胞周期的调控还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling [J]. Pharmacol Rev. 2002, 54(3): 527-559.
[2] Buckbinder L, Velasco-Miguel S, Chen Y, et al. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(15): 7868-7872.
[3] 洪柳, 李青, 陈广生, 等. RGS16与 p53在人胶质瘤中的表达及相关性研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(3): 248-251.
[4] 韩锐. 肿瘤的化学预防及药物治疗 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991: 267-268.
[5] 张丰, 李青, 章必成, 等. 过度表达 G蛋白调节子 16促进大鼠胶质瘤 C6细胞增殖 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(10): 950-952.