

外源性 RGS16 基因稳定转染对胶质瘤 C6 细胞生长的影响

洪柳¹, 李青¹, 陈广生¹, 张丰¹, 聂蕾¹, 林圣彩²

Effect of Exogenous RGS16 Gene Transfection on Growth of Glioma Cell Line C6

HONG Liu¹, LI Qing¹, CHEN Guang-Sheng¹, ZHANG Feng¹, NIE Lei¹, LIN Sheng-Cai²

1. 第四军医大学
西京医院
病理科,
陕西 西安 710032
2. 厦门大学
生命科学学院,
福建 厦门 361000

1. Department of Pathology,
Xijing Hospital,
The Fourth Military Medical
University,
Xi'an, Shaanxi, 710032,
P. R. China
2. School of Life Science,
Xiamen University,
Xiamen, Fujian, 361000,
P. R. China

通讯作者: 李青

Correspondence to: LI Qing

Tel: 86-29-84774538

E-mail: liqing@fmmu.edu.cn

基金项目: 军队医药卫生科研基金
金项目 (No. 02ma04)

Grant: Funds for Medical
Research of the Army
(No. 02ma04)

收稿日期: 2005-02-01

修回日期: 2005-03-31

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Wild type p53 could induce RGS16 mRNA expression, and RGS16 protein is related with carcinogenesis of glioma. This study was designed to investigate the effects of exogenous RGS16 gene transfection on the growth of rat glioma cell line C6. METHODS: A eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP-RGS16 was constructed, and transfected into C6 cells. The cells were selected by G418. The expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) was observed under fluorescent microscope, and the expression of RGS16 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry. The effects of RGS16 gene on cell cycle progression, cell growth, and proliferation of C6 cells were measured by flow cytometry, cell growth curve, and clonogenic assay in plate. RESULTS: C6-RGS16 and C6-GFP cells, which separately expressed RGS16 and pIRES2-EGFP vector, were constructed successfully. S phase proportion was significantly higher in C6-RGS16 cells than in C6-GFP and C6 cells (28.5% vs. 18.9% and 14.3%, $P < 0.05$); C6-RGS16 cells grew faster than C6-GFP and C6 cells. The clone formation rate was significantly lower in C6-RGS16 cells than in C6-GFP and C6 cells (12% vs. 25% and 25%, $P < 0.05$). CONCLUSION: Exogenous RGS16 gene could promote cell cycle progression of glioma C6 cells from G₁ phase to S phase, and accelerate cell growth, but can't increase the clone formation. KEYWORDS: RGS16 gene; Gene transfection; Cell growth; Glioma; C6 cell; Rat

【摘要】背景与目的: 有研究表明野生型 p53 可以诱导 RGS16 表达, 而 RGS16 可能与胶质瘤的发生有关。本研究旨在探讨 RGS16 基因转染对大鼠胶质瘤 C6 细胞生长的影响。方法: 构建真核表达载体 pIRES2-EGFP-RGS16, 脂质体法转染 C6 细胞, 经 G418 筛选后荧光显微镜观察细胞中增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的表达, RT-PCR 证实 RGS16 的 mRNA 表达, 免疫细胞化学方法检测细胞中 RGS16 蛋白表达。最后利用流式细胞仪、生长曲线、平板克隆形成等方法研究 RGS16 基因对胶质瘤细胞周期、生长及增殖的影响。结果: 成功构建了稳定表达 RGS16 和表达空载体的细胞系 C6-RGS16、C6-GFP。C6-RGS16、C6-GFP 和 C6 经流式细胞仪检测 S 期的细胞比例分别为 28.5%、18.9% 和 14.3% ($P < 0.05$); 生长曲线表明 C6-RGS16 生长的速度明显快于 C6-GFP 及 C6, 但其平板克隆形成率分别为 12%、25% 和 25% ($P < 0.05$)。结论: RGS16 促进 C6 细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡, 加快细胞生长速度, 但是并不促进细胞克隆形成。关键词: RGS16 基因; 基因转染; 细胞生长; 胶质瘤; C6 细胞; 大鼠
中图分类号: R739.41 文献标识码: A
文章编号: 1000-467X(2006)01-0051-05

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, 结构中包含一个保守的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G 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20余种RGS家族中发现RGS16可以被野生型p53诱导表达^[2]。在大鼠胶质瘤C6细胞中我们也证实了瞬时转染野生型p53能够诱导RGS16蛋白表达。此外, 我们有实验发现RGS16在人胶质瘤细胞的胞浆、胞突中高表达(表达率为88.10%), 而在瘤旁正常脑组织胶质细胞中未见表达, 提示RGS16可能与胶质瘤的发生有关^[3]。本研究旨在建立稳定表达RGS16基因的神经胶质瘤细胞模型C6-RGS16, 研究RGS16对大鼠胶质瘤C6细胞的生物学影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

大鼠胶质瘤C6细胞、大肠杆菌DH5及载体pIRES2-EGFP均由本教研室保存。质粒pBKS-RGS16、兔抗RGS16抗体由厦门大学林圣彩教授惠赠。各种内切酶及T4连接酶、购自TaKaRa公司, 质粒快速提取试剂盒及胶回收试剂盒购自上海华舜公司, 真核转染试剂Lipofectamine™ 2000、Trizol总RNA提取及反转录试剂SuperScript™购自Invitrogen公司, G418购自Promega公司, SABC试剂盒及DAB显色液购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C6细胞在含10%小牛血清的RPMI-1640培养液, 37℃, 5% CO₂条件下培养, 免疫细胞化学显示C6细胞无RGS16蛋白表达。

1.2.2 质粒构建及转染 用Sma^I、Xho^I双酶切质粒pBKS-RGS16后将所得目的片段RGS16插入pIRES2-EGFP中的Sma^I与Xho^I酶切位点之间, 构建重组质粒pIRES2-EGFP-RGS16, 用Sma^I、Xho^I双酶切鉴定。采用脂质体介导的方法将pIRES2-EGFP-RGS16和空载体pIRES2-EGFP各5 μg分别转染C6细胞, G418 (2 g/L) 筛选8~10天至空白对照孔中的C6细胞完全死亡, 更换G418浓度(1 g/L)继续筛选直至细胞克隆形成, 挑选单克隆, 分别获得稳定表达pIRES2-EGFP-RGS16和空载体pIRES2-EGFP的细胞C6-RGS16和C6-GFP。以未转染的C6细胞为空白对照。

1.2.3 RGS16基因表达的鉴定 (1) 增强型绿色

荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达的检测: 将细胞爬片用PBS洗涤2次, 40 g/L多聚甲醛固定20 min, 再用PBS洗涤2次, 最后以蒸馏水洗3~4次, 滴加500 ml/L甘油缓冲液封片, 于荧光显微镜下观察阳性细胞。

(2) RT-PCR检测RGS16的mRNA表达: 提取约5×10⁶个C6-RGS16细胞, 按分子克隆Trizol总RNA提取法^[4]提取细胞总RNA, 取5 μl用紫外分光光度仪测定样品浓度, 提取的RNA按试剂盒说明书逆转录合成cDNA, 反转录过程中设立no-RT对照及阳性对照。按上游引物: 5'-CGCATGTGCCG CACCCTAGCC-3'; 下游引物: 5'-CGCTCAAGTGTGT GAAGGCTCAGC-3', 进行PCR扩增, 反应参数为: 94℃预变性5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共30个循环; 72℃延伸7 min; 4℃保存。取PCR反应产物10 μl, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时以-actin为内对照, 以C6-GFP、C6为空白对照。

(3) RGS16蛋白表达的检测: 将细胞爬片同上处理。PBS洗涤后, 加30 ml/L H₂O₂室温10 min, 再以蒸馏水洗涤3次, 每次5 min。加10 g/L Triton X-100, 室温放置10 min, 用PBS洗3次, 每次3 min。洗涤后, 加正常山羊血清室温封闭40 min, 甩去不洗, 依次滴加1:50的兔抗RGS16抗体, 4℃过夜。次日复温30 min, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤3次, 每次5 min; 加生物素标记的羊抗兔IgG于37℃孵育40 min, PBS洗涤3次, 每次5 min。加SABC复合物, 同上孵育及洗涤后, 用DAB显色5~10 min, 以苏木精衬染, 按常规脱水透明及中性树脂封片。结果判定: 以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应, 标本中无阳性反应细胞或阳性反应细胞<5%者判断为阴性, 标本阳性反应细胞数>5%者判断为阳性。

1.2.4 细胞周期分析 (1) 流式细胞仪分析: C6-RGS16、C6-GFP及C6三组细胞经胰酶消化成单细胞后各取约1×10⁶个, PBS洗2次, 70%乙醇固定, 碘化丙啶染色, 流式细胞仪进行细胞周期定量分析。(2) 细胞生长曲线测定: 对数生长期的三组细胞, 胰酶消化后以每孔3×10³个接种于12孔培养板, 各接种24孔, 每日各取3孔倒置显微镜下观察计数, 绘制生长曲线。

1.2.5 细胞平板克隆形成实验 取对数生长期的上述三组细胞, 经胰酶消化成单细胞悬液, 计数后以每孔100个细胞接种于6孔板, 连续培养14天, 甲醇固定, 吉姆萨染色, 并计算克隆形成率(克

隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%)。

2 结果

2.1 pIRES2-EGFP-RGS16 基因真核表达载体的构建

以 Sma^I、Xho^I 双酶切质粒 pBKS-RGS16 得到约 606 bp 的 RGS16 目的片段(图 1), 将目的片段与空载体 pIRES2-EGFP 成功连接, 重组质粒 pIRES2-EGFP-RGS16 经 Sma^I、Xho^I 双酶切鉴定, 可见约 606 bp 的 RGS16 目的片段(图 2)。

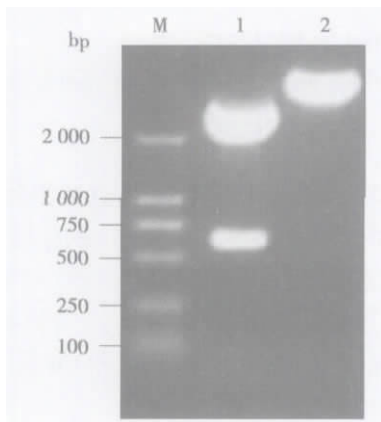


图 1 pBKS-RGS16 和 pIRES2-EGFP 的双酶切琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Restrictive enzyme digestion analysis of pBKS-RGS16 and pIRES2-EGFP by agarose gel electrophoresis

Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1: pBKS-RGS16 digested by Sma^I and Xho^I; lane 2: pIRES2-EGFP digested by Sma^I and Xho^I.

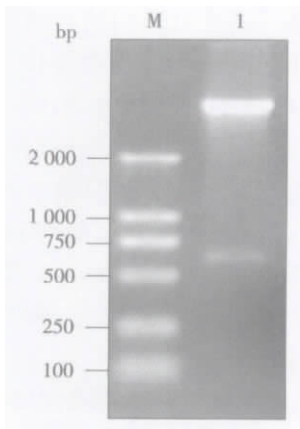


图 2 重组质粒 pIRES2-EGFP-RGS16 的酶切鉴定

Figure 2 Restrictive enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pIRES2-EGFP-RGS16

Lane M: DL2000 DNA marker; lane 1: pIRES2-EGFP-RGS16 digested by Sma^I and Xho^I.

2.2 稳定表达 RGS16 细胞系 C6-RGS16 的建立

2.2.1 EGFP 在 C6 细胞中的表达 荧光显微镜下观察, C6-RGS16 与 C6-GFP 细胞的胞浆及胞核均可见特异性的绿色荧光蛋白表达(图 3)。

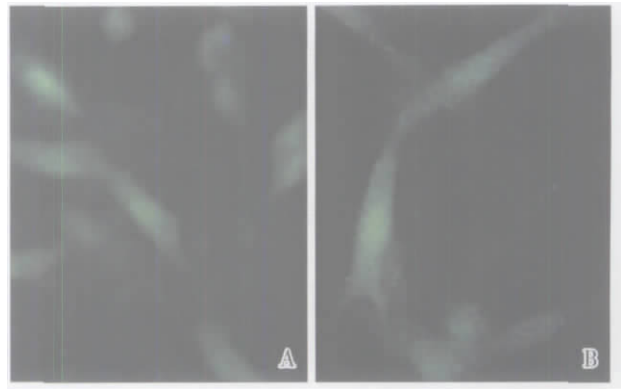


图 3 绿色荧光蛋白在 C6-RGS16(A) 和 C6-GFP(B) 细胞中的表达 (×200)

Figure 3 Expression of green fluorescent proteins in C6-RGS16 cells (A) and C6-GFP cells (B) observed under fluorescent microscope (×200)

2.2.2 RGS16 mRNA 的表达 从 C6-RGS16 中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见一条约 606 bp 的 DNA 条带(图 4), 而 C6-GFP、C6 细胞中均未见到。

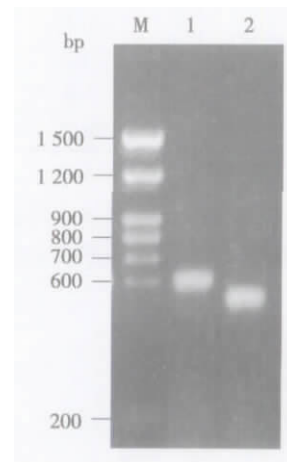


图 4 C6-RGS16 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Figure 4 RT-PCR product of C6-RGS16 analyzed by agarose gel electrophoresis

Lane M: 100 bp DNA ladders IX; lane 1: RGS16; lane 2: -actin.

2.2.3 RGS16 蛋白的表达 免疫细胞化学染色显示, 稳定转染 pIRES2-EGFP-RGS16 的 C6 细胞胞浆中显示棕黄色颗粒, 表明 RGS16 蛋白在 C6 中得到表达(图 5), 而 C6-GFP、C6 细胞中均未见表达。

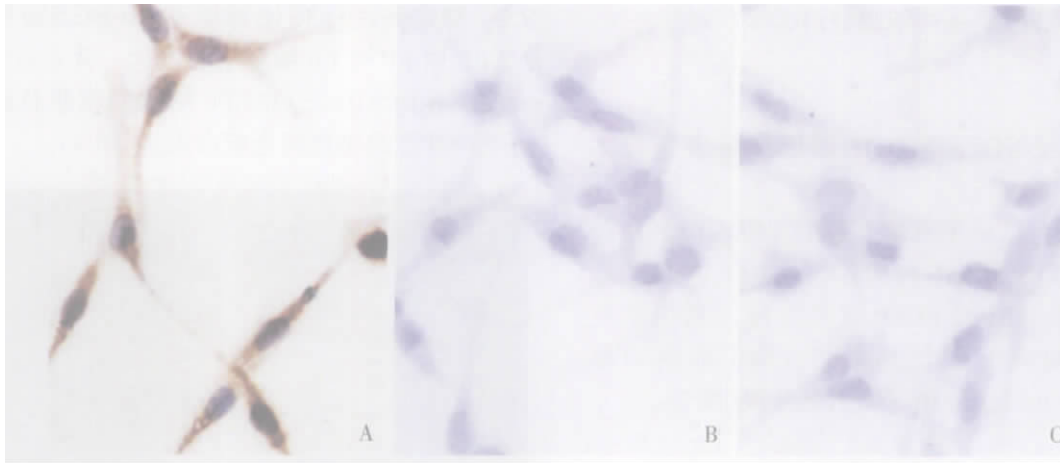


图 5 RGS16 在 C6-RGS16(A)、C6-GFP(B) 和 C6(C) 细胞中的表达 (SABC×200)

Figure 5 Expression of RGS16 in C6-RGS16 cells (A), C6-GFP cells (B), and C6 cells (C) detected by immunocytochemistry (SABC ×200)

2.3 RGS16 基因对细胞周期的影响

2.3.1 流式细胞仪检测细胞周期变化 C6-RGS16、C6-GFP 和 C6 处于 S 期的细胞比例分别为 28.5%、18.9%、14.3%，C6-RGS16 明显高于 C6-GFP 及 C6 ($P<0.05$, 表 1)。

表 1 流式细胞仪显示细胞周期变化

Table 1 Cell cycle distribution detected by flow cytometry

Cell line	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ (%)
C6	79.9	14.3	5.7
C6-GFP	72.0	18.9	9.1
C6-RGS16	62.8	28.5	8.7

2.3.2 细胞生长曲线 从第 3 天起 C6-RGS16 生长速度明显快于 C6-GFP 及 C6 细胞(图 6)。

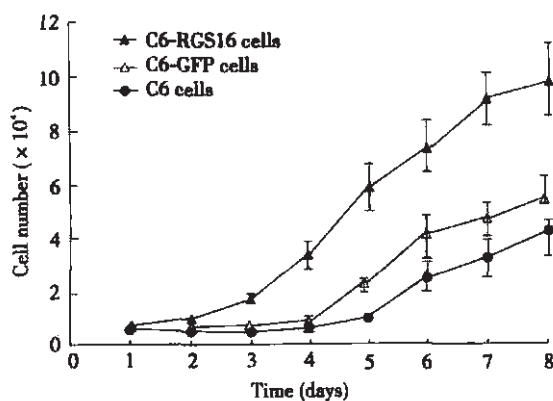


图 6 三种细胞生长曲线

Figure 6 Growth curves of C6-RGS16, C6-GFP, and C6 cells

2.4 RGS16 基因对细胞克隆形成能力的影响

C6-RGS16、C6-GFP、C6 三组细胞培养 14 天后,可见细胞集落形成,吉姆萨染色,计算克隆形成率分别为 12%、25%、25%。² 检验显示,C6-RGS16 的克隆形成率较 C6-GFP 和 C6 低,差异有显著性 ($P<0.05$)。

3 讨论

RGS16 的 cDNA 是 1996 年 Chen 等^[5]首次从小鼠的垂体中分离,定位于 1q25-q31^[6],全长 606 bp,含 5 个外显子,编码 202 个氨基酸^[7]。RGS 家族是新近发现的一大类蛋白质,研究表明 RGS 蛋白不仅依靠 RGS 结构域发挥三磷酸鸟苷水解酶激活蛋白 (GTPase activating protein, GAP) 作用抑制 G 蛋白信号,更是 G 蛋白信号的调节子与整合子,在生理、病理过程中发挥重要作用^[1]。在 RGS 家族的 20 余种分子中发现 RGS16 可以被野生型 p53 所诱导表达^[2]。p53 基因是目前研究比较明确的一种参与细胞周期调控的抑癌基因,编码一个分子量为 53 ku 的核内蛋白,能与 DNA 结合而起着转录调节因子的作用,将 DNA 受损的细胞阻滞于 G₁ 期,直至 DNA 损伤被修复,否则启动细胞凋亡机制清除细胞^[8]。

我们在大鼠胶质瘤 C6 细胞中瞬时转染野生型 p53,也证实了野生型 p53 能够诱导 RGS16 蛋白的表达。此外,我们的免疫组织化学结果显示 RGS16 在人胶质瘤细胞的胞浆、胞突中高表达(表达率为 88.10%),而在瘤旁正常脑组织胶质细胞中未见表达,二者有显著性差异^[3],提示 RGS16 可能

与胶质瘤的发生有关。还有研究表明 RGS16 参与对 p38 通路活化的负调节^[9], 但 RGS16 对细胞生物学的影响尚无研究, 为此我们构建真核表达载体 pIRES2-EGFP-RGS16, 脂质体法转染大鼠胶质瘤 C6 细胞, 筛选稳定表达 RGS16 的细胞 C6-RGS16, 再检测其生物学特性。流式细胞仪结果表明 RGS16 促进细胞从 G₁ 期到 S 期的过渡, 这与 RGS16 瞬时转染的结果一致^[10]。细胞计数绘制生长曲线结果再次提示 RGS16 促进细胞周期运行。但是平板克隆形成实验显示 C6-RGS16 较 C6-GFP 及 C6 的克隆形成率低, 表明细胞克隆形成能力减低。细胞生长速度加快但克隆形成能力却没有增加, 我们考虑为虽然细胞分裂加快、周期运行加速, 但细胞分裂后形成干细胞的比例不增加, 故而出现了克隆率没有增加的结果。有人针对某些肿瘤与其同源的正常组织具有基本相同的有丝分裂率, 而某些正常组织(如: 小肠) 却比某些肿瘤的有丝分裂率高^[11, 12] 的现象, 提出了器官、肿瘤的生长(即细胞生成与死亡的比率) 不依赖于细胞的有丝分裂率, 而是由干细胞产生的一些因子所控制的假说^[13]。即细胞是否能形成克隆不是由细胞的有丝分裂率决定, 而是由细胞群体中干细胞的量所决定的。至于 RGS16 是否与细胞分裂中干细胞的形成有关, 有待于进一步研究分析。

综上所述, RGS16 促进细胞周期运行的结果是肯定的。它虽然可以被野生型 p53 诱导表达但与 p53 阻滞细胞周期的作用不一致, 推测 p53 可以诱导 RGS16 的转录表达, 但 RGS16 不是 p53 发挥抑制细胞周期诱导凋亡作用的下游分子。

[参 考 文 献]

- [1] HOLLINGER S, HEPLER J R. 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 USA*, 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] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 518-522.
- [5] 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): 8679-8685.
- [6] SNOW B E, ANTONIO L, SUGGS S, et al. Cloning of a retinally abundant regulator of G-protein signaling (RGS-r/RGS16): genomic structure and chromosomal localization of the human gene [J]. *Gene*, 1998, 206(2): 247-253.
- [7] CHEN C K, WIELAND T, SIMON M I. RGS-r, a retinal specific RGS protein, binds an intermediate conformation of transducin and enhances recycling [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 12885-12889.
- [8] GOTTLIEB T M, OREN M. p53 in growth control and neoplasia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1287(2-3): 77-102.
- [9] ZHANG Y, NEO S Y, 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): 2851-2857.
- [10] 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.
- [11] BASERGA R, HENEGAR G C, KISELESKI W E. Uptake of tritiated thymidine by human tumors in vivo [J]. *Lab Invest*, 1962, 11(5): 360-364.
- [12] BASERGA R, KISELESKI W E. Comparative study of the kinetics of cellular proliferation of normal and tumorous tissues with the use of tritiated thymidine. I. Dilution of the label and migration of labeled cells [J]. *Natl Cancer Inst*, 1962, 28(2): 331-339.
- [13] PREHN R T. Many growth factor may not be growth factors [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(3): 501-507.

[编辑及校对: 庄爱华]