

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2002)10-0950-03

## 过度表达 G 蛋白调节子 16 促进大鼠胶质瘤 C6 细胞增殖

张 丰<sup>1</sup>, 李 青<sup>1</sup>, 章必成<sup>1</sup>, 叶 菁<sup>1</sup>, 陈广生<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> 新加坡国立大学分子细胞生物学研究所, 新加坡 117609)

关键词: 调节子; G 蛋白; 转染; 细胞周期

中图分类号: R739.41 文献标识码: A

**摘要:** 目的 探讨 G 蛋白调节子 16(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 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情况; <sup>3</sup>H-TdR 法检测 C6 细胞在转染不同梯度 pCMV5-RGS16 和 pCMV5 质粒后的增殖情况; 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 36 h 后细胞周期变化和细胞是否有凋亡发生 结果 转染 pCMV5-RGS16 质粒 24 h 后 30% 细胞贴壁性降低, 突起收缩, 细胞变圆; RGS16 蛋白表达阳性; <sup>3</sup>H-TdR 法检测显示 C6 细胞增殖速度与转染 pCMV5-RGS16 的量呈正相关; 细胞周期结果显示 G1 期细胞百分数减少 10%, 而 S 期细胞百分数增多 14%; 未发现 RGS16 与凋亡有直接关系 结论 RGS16 可能促进 C6 细胞的增殖

### Promotion of glioma C6 cells proliferation by overexpressed RGS16

ZHANG Feng<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, ZHANG Bi-Cheng<sup>1</sup>, YE Jing<sup>1</sup>, CHEN Guang-Sheng<sup>1</sup>, 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>Institute of Molecular & Cell Biology, National University of Singapore, Singapore 117609

**Keywords:** regulator; G proteins; transfection; cell cycle

收稿日期: 2001-11-20; 修回日期: 2001-12-20

基金项目: 高等学校骨干教师计划资助

通讯作者: 李 青 Tel (029) 3376957 Email Lqing@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

**Abstracts:** **AM** To study the effect of RGS16 on the biological characteristics of glioma C6 cells **METHODS** pCMV5-RGS16 was transfected into C6 cells by lipofectin. The morphological and adhesive changes of the cells were observed under an inverted microscope. Proliferation of C6 cells was measured by <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) assay after gradient transfections of pCMV5-RGS16 and pCMV5. Expression of RGS16 was examined by immunocytochemical method both before and after the transfection. Flow cytometry was adopted to measure changes in the fraction number of the cell cycle phase and to detect whether RGS16 could induce apoptosis of C6 cell. **RESULTS** 24 hours after the transfection of pCMV5-RGS16 approximately 30% of C6 cells grew round and 13% expressed RGS16; 36 h later the positive relationship between the proliferation of C6 cells and the gradient transfections of pCMV5-RGS16 was displayed by <sup>3</sup>H-TdR assay. Flow cytometry showed that the fraction number of G1 phase of C6 cells reduced by 10% and that of S phase accumulated by 14% and RGS16 could not induce apoptosis of C6 cells. **CONCLUSION** RGS16 might promote the proliferation of C6 cells

### 0 引言

G 蛋白在丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 引起细胞增殖和分化的信号转导过程中起重要调控作用<sup>[1]</sup>. G 蛋白调节子 (regulators of G protein signaling, RGS) 是近年来新发现的参与 G 蛋白信号转导的一个大家族, 主要功能是负调节 G $\alpha$ i 和 G $\alpha$ q 亚基, 其成员超过 20 种<sup>[2]</sup>. 1997 年我们<sup>[3]</sup> 在小鼠垂体内克隆了 RGS16, 并发现其在肝、垂体和脑组织内表达丰富. 最近发现 RGS16 可能参与细胞的应激反应<sup>[4-7]</sup>. 根据文献检索 RGS16 在胶质瘤中的作用尚未见报道, 因此, 我们将外源性基因 RGS16 导入 C6 细胞, 观察其对细胞的影响, 为确定 RGS16 蛋白的功能和其在 C6 细胞信号转导中的作用提供依据

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠胶质瘤细胞 C6: 本室保存; pCMV 5-RGS16, pCMV 5 和 RGS16 抗体: 新加坡国立大学林圣彩教授惠赠; 脂质体: Gibco 公司;  $^3\text{H}$ -TdR: 上海原子能研究所; 免疫组化试剂盒: 武汉博士德公司; DNA-Prep 试剂盒: 美国 Coulter 公司

### 1.2 方法

**1.2.1 基因转染<sup>[8]</sup>** C6 细胞在含  $150\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  小牛血清的 RPM 11640 培养液中常规培养, 细胞生长至对数期时以  $1 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔培养板。将 pCMV 5-RGS16  $3\ \mu\text{g}$  和脂质体  $10\ \mu\text{L}$  分别溶于无血清培养液  $100\ \mu\text{L}$ , 两溶液缓慢混匀, 室温放置 30 min, 加入无血清培养液  $0.8\ \text{mL}$ , 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  $150\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  小牛血清的 RPM 11640 培养液  $2\ \text{mL}$ 。同样方法转染 pCMV 5 作为对照。只加脂质体每孔  $10\ \mu\text{L}$  和未处理组各 3 孔作为阴性对照。阳性率计算: 在随机一显微镜视野下, 阳性率 = RGS16 蛋白表达阳性的细胞数  $\times 100\%$  / 总细胞数。转染 24 h 后分别在倒置显微镜下观察细胞的形态变化。

**1.2.2  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法<sup>[9]</sup>** 取对数生长期细胞, 消化后制成  $1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$  细胞悬液, 按每孔  $100\ \mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板, 培养 4 h, 细胞贴壁。将 pCMV 5-RGS16 和 pCMV 5 质粒分别按 4 组不同梯度 (90, 180, 270, 360 ng/孔), 与  $0.8\ \mu\text{L}$  脂质体分别溶于  $25\ \mu\text{L}$  无血清培养液, 每个梯度 3 孔, 两溶液缓慢混匀, 室温放置 30 min, 混匀后加入上述已接种细胞的 96 孔培养板中, 24 h 后每孔加  $^3\text{H}$ -TdR  $1.85 \times 10^4\ \text{Bq}$  ( $50\ \mu\text{L}$ ), 继续培养 12 h, 吸取上清液, PBS 洗涤 3 次后测  $^3\text{H}$ -TdR 掺入率。

**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  $\times 3\ \text{min}$ ;  $950\ \text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇固定 30 min, 加兔抗鼠 RGS16 抗体 (1:50), 4 $^\circ\text{C}$  过夜, PBS 洗涤 3 次  $\times 5\ \text{min}$ ; 加入即用型羊抗兔, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次  $\times 5\ \text{min}$ ; 加入 SABC 复合物, 室温放置 30 min, PBS 洗涤 3 次  $\times 5\ \text{min}$ ; DAB 显色, 苏木精衬染。

**1.2.4 细胞周期和凋亡分析** 36 h 后取 4 组细胞各约  $1 \times 10^6$  个, 经胰酶消化制成单细胞悬液, 离心 2 次, 每次 PBS  $4\ \text{mL}$  洗涤。  $700\ \text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$  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。

统计学处理: 采用 *t* 检验进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 细胞形态变化** 转染 pCMV 5-RGS16 24 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  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法** 转染 pCMV 5-RGS16 组放射值随转染质粒 DNA 量的增加而明显升高。转染 pCMV 5 组放射值变化不明显。统计表明两组之间有显著差异 ( $P < 0.01$ , Tab 1)。

表 1 pCMV 5-RGS16 组和 pCMV 5 组不同梯度的  $^3\text{H}$ -TdR 值  
Tab 1  $^3\text{H}$ -TdR values of pCMV 5-RGS16 group and pCMV 5 group  
( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Group	90ng	180ng	270ng	360ng
PCMV 5	$740 \pm 13$	$690 \pm 42$	$780 \pm 14$	$709 \pm 29$
PCMV 5-RGS16 <sup>b</sup>	$733 \pm 12$	$899 \pm 32$	$1037 \pm 26$	$1209 \pm 19$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs pCMV 5

**2.3 免疫细胞化学** 转染 pCMV 5-RGS16 组 RGS16 蛋白表达阳性 (阳性率 13%, Fig 2); 转染 pCMV 5 组脂、质体组和未处理组 RGS16 蛋白表达阴性。

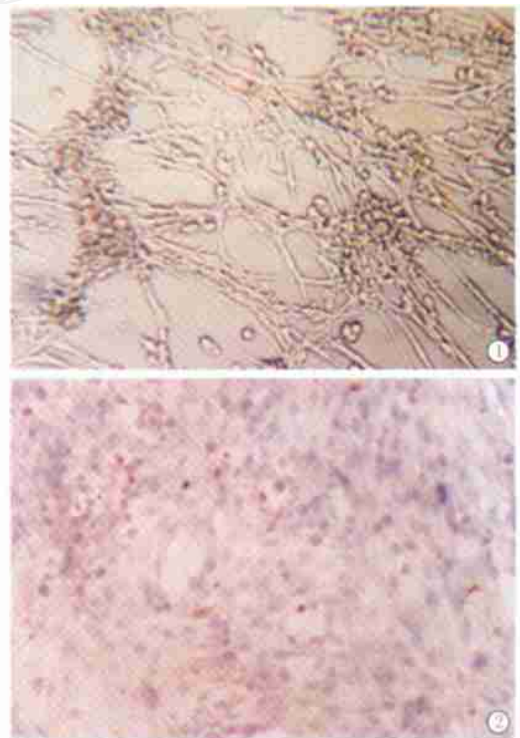


图 1 转染 pCMV 5-RGS16 24 h 后 C6 细胞形态变化

Fig 1 Morphological and adhesive changes of the cells 24 h after transfection of pCMV 5-RGS16  $\times 100$

图 2 转染 pCMV 5-RGS16 36 h 后 C6 细胞 RGS16 蛋白表达阳性

Fig 2 Expression of RGS16 in C6 cells 36 h after transfection of pCMV 5-RGS16 SABC  $\times 100$

2.4 细胞周期和凋亡分析 转染 pCMV 5-RGS16 组细胞周期 G1 期细胞比例减少, S 期增多。pCMV 5 组、脂质体组和未处理组细胞周期变化不明显 (Tab 2)。未发现有凋亡峰出现

表 2 流式细胞仪检测各组细胞周期

Tab 2 Cell cycle assay by cytometry

Group	G1	S	G2
Normal	0.70	0.21	0.09
Lipofectin	0.73	0.19	0.08
PCMV 5	0.73	0.18	0.09
PCMV 5-RGS16	0.60	0.35	0.05

### 3 讨论

RGS 蛋白家族是一组含有约 120 个氨基酸在进化上很保守的 RGS 结构域的蛋白质。它们主要直接与 G 蛋白的 G $\alpha$ i 和 G $\alpha$ q 亚基结合, 通过上调 G 蛋白  $\alpha$  亚基的 GTP 酶活性, 促进 G 蛋白  $\alpha$  亚基和  $\beta\gamma$  亚基的结合, 从而负调节 G 蛋白的活性, 并间接负调节 G 蛋白对 MAPK 的激活<sup>[2]</sup>。1997 年我们<sup>[3]</sup>在小鼠垂体克隆了 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 G1 期的酵母细胞恢复增殖状态。后来我们<sup>[4]</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>[5]</sup>。Buckbinder 等<sup>[6]</sup>和 Beadling 等<sup>[7]</sup>曾分别发现 p53 和 L-2 也可以诱导 RGS16 的表达。因此我们推测 RGS16 可能参与细胞的凋亡和应激反应。我们将 pCMV 5-RGS16 转入 C6 细胞后, 发现细胞贴壁性降低, 星状突起收缩, 细胞变圆; 36 h 后 RGS16 蛋白表达阳性; <sup>3</sup>H-TdR 掺入法结果显示 RGS16 明显促进 C6 细胞的增殖; 流式细胞仪结果表明 RGS16 促进了 G1 期的细胞加快向 S 期过渡, 使 G1 期细胞百分数下降而 S 期细胞百分数增加; 但实验结果未发现 RGS16 与凋亡的直接关系。

本研究表明, RGS16 可以促进胶质瘤 C6 细胞的增殖, 有类似 SST2 在酵母细胞中的作用<sup>[3]</sup>。由于 SST2 通过下调 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, 促进细胞增殖<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>, 因此也不能

排除 RGS16 通过其他信号转导通路调节 C6 细胞周期的运行。由于本实验未发现 RGS16 与凋亡的关系, 因此 RGS16 与 p53, p38MAPK, TNF- $\alpha$  以及 L-2 之间的关系在细胞增殖和凋亡中的作用还有待于进一步探索。

### 参考文献:

- [1] Gudemann T, Grosse R, Schultz G. Contribution of receptor/G-protein signaling to cell growth and transformation [J]. *Nature Reviews Clinical Pharmacology*, 2000; 3(1): 345-362.
- [2] Burchett SA. Regulators of G protein signaling: A bestiary of modular protein binding domains [J]. *J Neurochem*, 2000; 75(4): 1335-1351.
- [3] Chen C, Zheng B, Han J, Lin SC. Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to G-proteins and inhibits pheromone signaling in yeast [J]. *J Biol Chem*, 1997; 272(13): 8679-8685.
- [4] Zhang Y, Neo SY, Han J, Yaw LP, Lin SC. RGS16 attenuates G-protein-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor [J]. *J Biol Chem*, 1999; 274(5): 2851-2857.
- [5] Tong CW, Zhang Y, Neo SY, Lin SC. Specific induction of RGS16 (regulator of G-protein signaling 16) mRNA by protein kinase C in CEM leukemia cells is mediated via tumor necrosis factor  $\alpha$  in a calcium-sensitive manner [J]. *Biochem J*, 2000; 352(3): 747-753.
- [6] 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.
- [7] Beadling C, Druey KM, Richter G, Kehrl JH, Smith KA. Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1999; 162(5): 2677-2682.
- [8] Pan Y, Huang W, Ai YF. Interaction of proliferation between vascular endothelial cell and smooth muscle cell of rabbits *in vitro* [J]. *Dixi Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2001; 22(1): 12-15.
- [9] Zhang BC, Li Q, Ye J, Wang YM. p38MAPK gene transfection can induce the apoptosis of glioma cells C6 [J]. *Dixi Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 2001; 22(3): 211-213.
- [10] 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): 3429-3439.
- [11] Holland EC. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models [J]. *Nat Rev Genet*, 2001; 2(2): 120-129.

编辑 王 睿