论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0548-04

腺病毒介导GRIM19对恶性胶质瘤CHG-5细胞增殖及分化的影响

姚声涛[1],陈佳琳[2],黄 轶[3,4],郭 川[1],唐文渊[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经外科,[3]基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016;[4]附属儿童医院临床分子医学中心,重庆 400014;[2]贵州省遵义医院儿科,贵州 遵义 563002)

摘 要:目的 观察增强外源性GRIM19(genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19)基因表达对恶性胶质瘤CHG-5细胞生物学特性的影响,初步探讨其机制。**方法** 利用已成功构建的Ad-GRIM19腺病毒感染CHG-5细胞,通过形态学、细胞生长曲线、软琼脂克隆形成等观察增强GRIM19基因表达后CHG-5细胞形态、增殖和体外成瘤能力的变化,台盼蓝染色法检测细胞活力,Real-time PCR及Western blot检测STAT3与PCNA基因表达。**结果** Ad-GRIM19在体外感染CHG-5细胞后,明显改变CHG-5细胞生长形态,细胞增殖及体外成瘤减低,STAT3、PCNA基因表达下调。**结论** GRIM19过表达可显著抑制CHG-5细胞恶性表型,提示GRIM19基因在调控胶质瘤细胞分化程度及恶性生物学行为方面具有重要作用。

关键词: GRIM19;腺病毒,胶质瘤,CHG-5细胞

中图法分类号: R394.2;R730.23;R730.264 **文献标识码:** A

Effects of recombinant GRIM19 gene adenovirus on cell proliferation and differentiation of human glioma cell line CHG-5

YAO Sheng-tao[1], CHEN Jia-lin[2], HUANG Yi[3,4], GUO Chuan[1], TANG Wen-yuan[1] ([1]Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Falculty of Basic Medical Sciences, [4]Center for Clinic Molecular Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Pediatrics, Zunyi Hospital, Zunyi, Guizhou Province 563002, China)

Abstract: Objective To observe the effects of enhanced genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19 (GRIM19) expression on biological features of human malignant glioma cells *in vitro*. **Methods** Human glioma cell line CHG-5 were infected with Ad-GRIM19 and Ad-GFP (control). The infected and control glioma cells were analyzed for their morphological alterations and cell growth features by using WST-8, soft agar cloning-formation and other methods. Real-time PCR and Western blotting were employed to detect the mRNA and protein expressions of STAT3 and PCNA. **Results** Compared with control cells, CHG-5 cells transfected with Ad-GRIM19 demonstrated profound morphological alterations and marked cellular atypia. Cell proliferation rate and their tumorigenecity *in vitro* were also decreased. The mRNA and protein expressions of STAT3 and PCNA were downregulated. **Conclusion** Overexpression of GRIM19 gene has affected CHG-5 glioma cell morphology and decreased their growth and tumorigenecity, suggesting GRIM19 gene might play a key role in determining differentiation and certain malignant biological features of glioma cells.

Key words: GRIM19; adenovirus; CHG-5; glioma cell line

GRIM19 (genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19)作为线粒体呼吸链复合体的功能性组份参与维持线粒体的功能并具有抑制肿瘤细胞增殖、促细胞凋亡的重要作用[1-3]。近年来发现神经胶质瘤的发生、发展与STAT3过度表达与持续活化密切相关,STAT3信号途径有可能作为恶性脑胶质瘤干预治疗的一种有效分子标靶[4-6]。研究表明GRIM19是关键信号分子STAT3特异抑制分子[1-3],且随胶质瘤的诱导分化而表达上调[7]。但GRIM19在胶质瘤中的确切功能及意义仍不清楚。本研究利用前期已成功构

作者简介: 姚声涛,男,贵州省遵义市人,博士研究生,副主任医师,主要从事颅内肿瘤方面的研究。E-mail: zhuyf1027@163.com

通信作者: 唐文渊,E-mail:yy11111yy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-27;**修回日期:** 2008-11-11

建携带 GRIM19 基因的复制缺陷型腺病毒 Ad-GRIM19,增强外源性 GRIM19 在胶质瘤株 CHG-5 细胞株中的表达,观察胶质瘤细胞形态、增殖及体外成瘤性的变化,为进一步理解 GRIM19 基因功能与瘤细胞恶性行为的关系,以及 GRIM19 能否应用于胶质瘤诱导分化治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

脑胶质瘤 CHG-5 细胞株由第三军医大学西南医院病理学研究所提供。RT-PCR 反转录试剂盒(TaKaRa),SYBR Green I Master Mix(TOYOBO),脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen),DMEM 培养基、胎牛血清(GIBCO),BCA 法蛋白定量试剂盒、台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒(碧云天公司),鼠抗 GRIM19 单抗(BD),β-actin 鼠单抗、PCNA 鼠单抗、STAT3 兔多抗(Santa cruz),羊抗小鼠、羊抗兔 IgG/HRP 二抗(北京中杉),蛋白抽提 RIPA(上海申能博采),cell counting kit-8(CCK-8)、SuperSignal West Pico 化学发光底物 kit(Pierce),ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)。引物均在上海英骏公司合成。

1.2　Ad-GRIM19 重组腺病毒的构建与滴度测定

详见文献[8]。

1.3　Ad-GRIM19 及 Ad-GFP 腺病毒感染 CHG-5 胶质瘤细胞

取对数生长期 CHG-5 细胞以 5×10^5/孔的浓度接种于 6 孔板,培养至细胞密度达 80% 时,用无血清的 DMEM 轻柔漂洗,按感染复数(MOI)分别为 120 分别加入 Ad-GRIM19 重组腺病毒及 Ad-GFP 对照病毒与 1.0 ml 无血清的 DMEM 混合轻柔混匀,37 ℃孵育,每隔 20 min 轻柔混匀 1 次, 2 h 后补加 1.0 ml 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基,分别在培养 24、48、72 h 时观察细胞形态变化(以下各步病毒感染步骤均相同)。

1.4　台盼蓝染色观察细胞活力

将腺病毒按 1.3 所述方式感染 CHG-5 细胞。72 h 后弃培养基,按染色试剂盒说明书进行台盼蓝染色,倒置显微镜下成像观察染色结果。

1.5　WST-8 法(CCK8)分析细胞增殖变化

取对数生长期细胞以 1×10^3/孔接种于 96 孔板,病毒感染方式同 1.3,设 3 复孔,加病毒后分别培养 24、48、72、96、120 h 测前加入 CCK-8 试剂 10 μl/孔 37 ℃孵育 2 h。酶标仪(波长 490 nm)测定各孔的光密度值[D(490)],实验重复 3 次,绘制细胞增殖曲线。

1.6　细胞软琼脂克隆形成分析[9]

于 6 孔培养板内加入以含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基稀释的琼脂,底琼脂浓度为 0.5%,顶琼脂浓度为 0.3%。将上述各组细胞经病毒感染 12 h,消化成单个细胞台盼蓝染色计数,分别以 2×10^3/ml 密度接种, 每组设 3 个复孔, 于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 2 周,记录≥ 20 个细胞的克隆数。

克隆形成率 = 克隆形成数目/接种细胞数 × 100 %

1.7　Real-Time PCR 及 Western 免疫印迹检测 STAT3、PCNA 基因表达

TRIpure 法提取上述经病毒感染 CHG-5 细胞总 RNA,反转录成 cDNA。以 β-actin 基因作为内参,每份标本均行 3 复孔在 ABI 7500 进行定量 PCR 的检测与分析(引物序列见表 1)。反应条件为 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s 收集荧光信号,64 ℃ 行熔解曲线分析。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较各基因的表达差异。

ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 − 内参基因 Ct 值

ΔΔCt 值 = 目的组 ΔCt 值 − 对照组 ΔCt 值

$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{实验组} - (\Delta Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{对照组}$

细胞总蛋白按蛋白提取液 RIPA 说明书提取,BCA 法蛋白定量,取 20 μg 细胞总蛋白,10%~12% 变性 SDS-PAGE 电泳,半干转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶封闭,实验中所用抗体稀释比例均为 1∶1 000,4 ℃封闭过夜,TBST 洗膜,Goat anti-mouse IgG/HRP 二抗(1∶8 000)室温孵育,ECL 法显色成像。

表 1　PCR 引物序列表

基因		引物序列	产物长度(bp)
PCNA	正义链	5′-TCATTACACTAAGGGCCGAAG-3′	170
	反义链	5′-TTCACCAGAAGGCATCTTTAC-3′	
STAT3	正义链	5′-GAGGACTGAGCATCGAGCA-3′	85
	反义链	5′-CATGTGATCTGACACCCTGAA-3′	
β-actin	正义链	5′-CCAACCGCGAGAAGATGA-3′	98
	反义链	5′-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3′	

1.8　统计学分析

运用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　细胞形态学变化

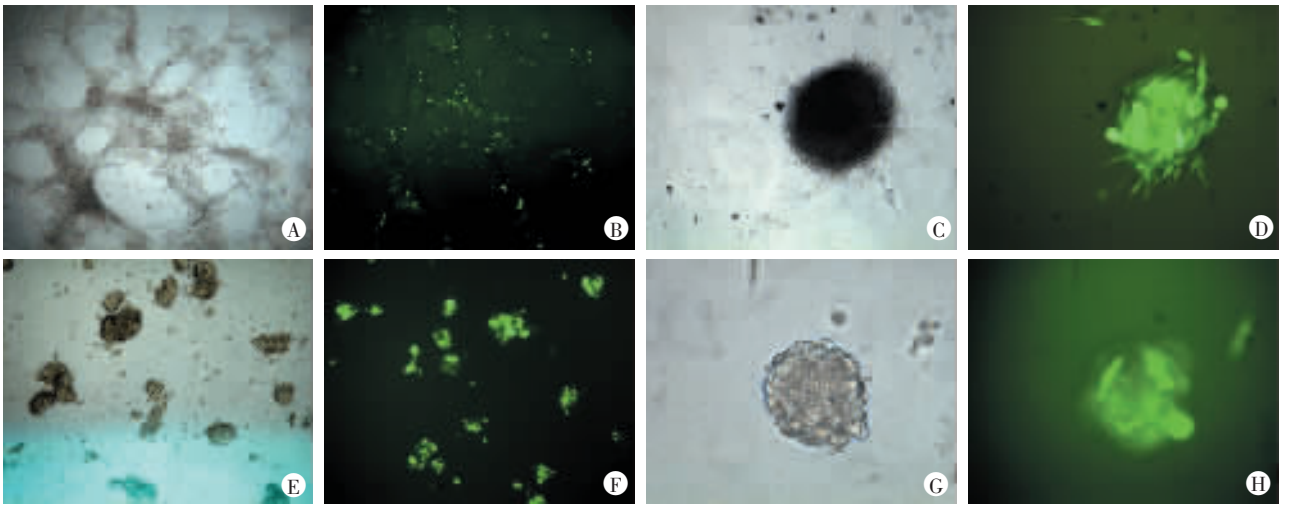
CHG-5 细胞经 Ad-GRIM19 病毒感染后 24 h 开始出现细胞形态改变,细胞开始回缩出现网格状空格变化,回缩细胞区中央细胞致密,而周边细胞疏松(图 1A、B)。48 ~ 72 h 细胞逐步变圆聚集成团形成球形(图 1E、F),其中少量球形细胞团中央区致密导致颜色较深,无法辨别细胞形态(图 1C、D);另有部分细胞团细胞清晰可见, 在外形上与胶质瘤干细胞类似(图 1G、H),72 h 后细胞团逐步脱壁漂浮,仍有少量单个贴壁细胞,但细胞由长梭状回缩呈圆形(图 1)。而经 Ad-GFP 对照病毒感染 72 h 时,细胞仍保持长梭状外形,未出现细胞聚集现象,但因生长过快基本融合成片(图 2)。

2.2　台盼蓝染色结果

Ad-GFP 对照及 Ad-GRIM19 重组病毒感染 48 h 后的 CHG-5 细胞均是台盼蓝拒染表明细胞膜完整,尤其是经 Ad-GRIM19 病毒感染后所形成细胞团并未死亡,仍然具有完整的细胞膜(图 3)。

2.3　细胞生长速度变化及生长曲线绘制

CHG-5 细胞分别经 Ad-GFP、Ad-GRIM19 重组病毒感染至 24 h,细胞生长速度基本一致,24 h 后 Ad-GRIM19 组生长速度明显减缓,72 h 达到平台期,之后还有下降趋势。而对照组 24 h 后增殖迅速,96 h 后达到平台期(图 4)。



A、B:经病毒感染24 h,细胞开始回缩出现网格状空格形态(×100);C、D:经病毒感染48~72 h,聚集的部分球形细胞团形态中央区致密、颜色较深(×200);E、F:经病毒感染48 h时细胞逐步变圆聚集成球形外形(×100);G、H:经病毒感染48~72 h,部分聚集成球形细胞团类似胶质瘤干细胞外形(×200);A、C、E、G:为光镜观察;B、D、F、H:为荧光显微镜观察

图1 Ad-GRIM19病毒感染后的CHG-5细胞光镜与荧光显微镜下形态学变化

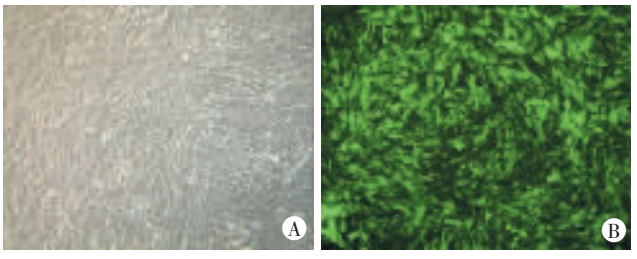
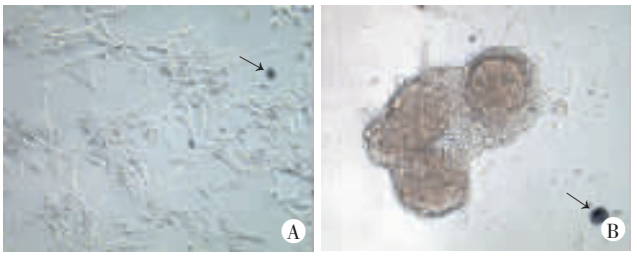


图2 Ad-GFP病毒感染CHG-5细胞72 h光镜(A)与荧光显微镜(B)下形态变化 (×200)



↑:死亡细胞

A:Ad-GFP组感染48 h后染色;B:Ad-GRIM19组感染48 h染色

图3 病毒感染后细胞台盼蓝染色光镜观察 (×200)

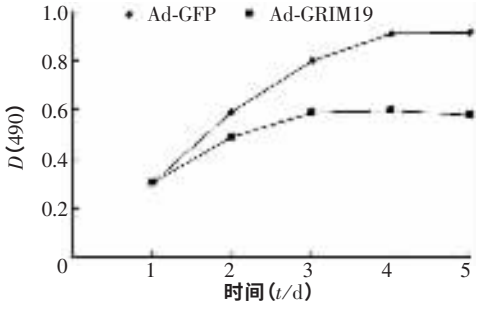


图4 病毒感染的CHG-5细胞生长曲线

2.4 细胞克隆形成率测定结果

各组CHG-5细胞均能在软琼脂内形成克隆,与对照组(57.8%)相比,Ad-GRIM19组CHG-5细胞克隆形成率(13.8%)的减少具有显著统计学意义($P<0.01$)。

2.5 STAT3、PCNA mRNA及蛋白表达

以β-actin为内对照,荧光定量PCR结果显示:与Ad-GFP对照病毒感染组相比,Ad-GRIM19重组病毒感染组中PCNA与STAT3基因mRNA水平明显下调(图5)。Western blot检测作为内参的β-actin蛋白在2组蛋白表达中基本一致,实验组中GRIM19蛋白表达上调显著,而STAT3与PCNA蛋白却明显减弱,结果与荧光定量PCR结果基本一致(图6)。

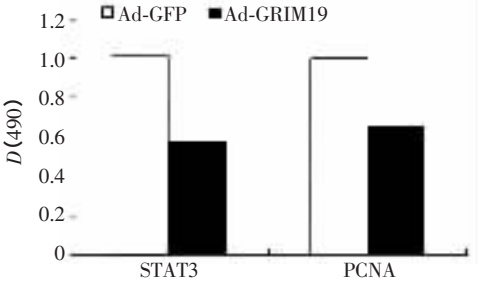
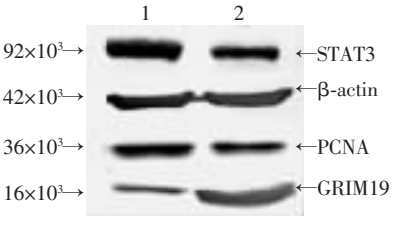


图5 CHG-5细胞经病毒感染后STAT3与PCNA基因转录差异



1:Ad-GFP组;2:Ad-GRIM19组

图6 Western blot检测STAT3与PCNA蛋白表达

3 讨论

GRIM19是新近由干扰素β(interferon beta, IFN-β)/全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)联合诱导

产生而命名的一种细胞死亡调控基因,除作为细胞线粒体呼吸链复合体亚单位的功能性组份外,还是 STAT3 的特异抑制分子,具有一定程度的抑瘤作用,且抑瘤效应具有剂量依赖性,但对正常细胞影响较小[1-3]。

脑胶质瘤是最常见的一种原发恶性脑肿瘤,患者术后平均生存期短, 易复发,迫切需要新的治疗方式来改善它的预后。有研究表明 GRIM19 表达与脑胶质瘤的分化关系密切,随胶质瘤的诱导分化,GRIM19 表达逐渐增强[1]。但 GRIM19 在胶质瘤中的具体功能及作用机制尚不清楚。外源性 GRIM19 在胶质瘤中的表达是否也具有诱导分化的作用也许进一步研究验证。

为解答上述疑问,本研究在前期成功构建携带 GRIM19 基因的复制缺陷型腺病毒以便能够将目的基因高效转导靶细胞[8];同时考虑到因 GRIM19 的较强的抑瘤效应很可能对用于病毒包装的正常细胞——人胚肾细胞 293 细胞出现细胞毒作用,在病毒载体构建的同时我们在 GRIM19 cDNA 起始密码子 ATG 前并未添加增强基因表达的 Kozak 序列。在病毒包装产毒长达 2 周的过程中,Ad-GRIM19 重组病毒并未对 293 细胞产生明显的细胞毒作用,同时也印证了国外研究关于 GRIM19 对正常细胞影响较小的报道[1,2]。

结果表明 Ad-GRIM19 腺病毒能高效感染 CHG-5 细胞,蛋白免疫印迹结果显示蛋白表达显著增高。进一步的检测显示感染后的 CHG-5 细胞形态发生明显改变,多数细胞丧失锚着依赖生长特性,易聚集形成细胞球体;细胞增殖速度减慢。提示外源性 GRIM19 基因具有诱导 CHG-5 细胞体外分化的功能。为排除聚集细胞球体已经死亡的可能,本实验结合台盼蓝染色与灵敏度高、细胞毒性极低的 WST-8 方法分别检测病毒感染后细胞膜的完整性及细胞增殖能力,结果显示细胞团胞膜完整,并非死亡;经 Ad-GRIM19 病毒感染后形成的细胞团是一种增殖抑制的表现,为后续实验的可靠性提供了保证。

肿瘤细胞在软琼脂中的克隆性生长可反映细胞的独立生存和主动移动能力, 在体内的致瘤能力具有较高的一致性是检测肿瘤恶性转化及恶性程度的常用指标。我们观察到实验组 CHG-5 细胞体外成瘤能力显著降低,形成克隆的数目及大小远远低于对照组,更进一步提示了 GRIM19 具有抑制 CHG-5 细胞的恶性演进的能力。

但令人不解的是,用 Ad-GRIM19 病毒感染 CHG-5 细胞聚集而形成的细胞团,与胶质瘤干细胞在外形上十分相似。有研究报道脑肿瘤干细胞体外分化过程中具有一定程度的回逆现象[10],且 CHG-5 细胞中还具有一定比例的 $CD133^+$ 干细胞[11,12]。起初我们怀疑这种变化可能是病毒作用加入的血清培养基与病毒共同作用所致,为此我们将不含血清的普通培养基以及收集细胞团用干细胞培养基培养均得到同样的实验结果(另文报道)。另外,本实验中 GRIM19 下调 STAT3 的作用,究竟是 GRIM19 直接下调 STAT3 表达导致细胞形态的变化,还是通过其他机制导致细胞形态学变化进而间接下调 STAT3 表达都需作进一步研究。

本研究初步证实了 GRIM19 基因能抑制人胶质瘤细胞系 CHG-5 增殖与体外成瘤,具有诱导胶质瘤细胞体外分化的功能,其作用机制可能与信号传导及转录活化因子 STAT3 及细胞增殖核抗原 PCNA 的下调有关。实验结果在一定程度上丰富了 GRIM19 基因与胶质瘤细胞分化的关系;同时也提示 GRIM19 基因本身有可能作为胶质瘤的抑制基因而发挥效应, 而且在调控胶质瘤细胞的分化程度和恶性行为方面具有重要作用,通过诱导分化或基因治疗等策略增强 GRIM19 基因表达在恶性胶质瘤的治疗具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Zhang J, Yang J, Roy S K, *et al*. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(16): 9342 - 9347.

[2] Lufei C, Ma J, Huang G, *et al*. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity *via* functional interaction [J]. EMBO J, 2003, 22(6): 1325 - 1335.

[3] Kalakonda S, Nallar S C, Lindner D J, *et al*. Tumor-suppressive activity of the cell death activator GRIM-19 on a constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6212 - 6220.

[4] Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, *et al*. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncogene, 2007, 26(17): 2435 - 2444.

[5] 张化明, 陈谦学, 邹志鹏, 等. 人脑胶质瘤中 STAT3 和 VEGF 表达的相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(5): 279 - 281.

[6] Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 97 - 105.

[7] 黄　强, 董　军, 王爱东, 等. 胶质瘤细胞分化与恶性进展相关分子研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(3): 227 - 232.

[8] 姚声涛, 黄　轶, 曾昭淳, 等. 细胞死亡调控基因 GRIM19 重组腺病毒的构建及在恶性胶质瘤 CHG-5 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23):2194 - 2197.

[9] 赵　雯, 史景泉, 卞修武, 等. 反义 GFAP 对人恶性胶质瘤细胞系 CHG-5 增殖及分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(18): 1622 - 1626.

[10] 王爱东, 黄　强, 董　军, 等. 脑肿瘤干细胞体外分化过程中的回逆现象分析[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(9): 872 - 877.

[11] 黄　强, 董　军, 朱玉德, 等. 人脑胶质瘤组织中分离与培养肿瘤干细胞[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(5):331 - 333.

[12] 尹昌林, 吕胜青, 唐　莉, 等. 免疫磁珠法分选人脑胶质瘤干细胞及其培养和鉴定[J]. 中国神经肿瘤杂志, 2007, 5(4): 251 - 256.

(编辑　王　红)