文章编号:1000-5404(2011)23-2499-04

论著

ING4蛋白对人胶质瘤U251细胞增殖及凋亡的影响

邓跃飞,雷炳喜,赵义营,牛江涛 (510120 广州,中山大学附属孙逸仙纪念医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨ING4(inhibitor of growth family 4)蛋白对人胶质瘤U251细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 用PEI转染ING4蛋白过表达(pEGFP-C2/ING4转染组)及阴性对照载体(pEGFP-C2转染组)至人胶质瘤U251细胞,G418筛选后建立ING4蛋白稳定表达细胞株;RT-PCR、免疫组化、Western blot检测ING4蛋白的表达,MTT法和Hochest法检测U251细胞的增殖和凋亡。**结果** pEGFP-C2/ING4转染组和pEGFP-C2转染组转染U251细胞效率分别为84%和82%;RT-PCR、免疫组化、Western blot均检测到pEGFP-ING4转染组ING4的强表达;与pEGFP-C2转染组和空白对照组相比,pEGFP-C2/ING4转染组的U251细胞72 h后生长抑制率和凋亡率有统计学差异($P<0.05$)。**结论** ING4蛋白对胶质瘤U251细胞有显著的增殖抑制和诱导凋亡作用。

[关键词] ING4;U251细胞;细胞转染
[中图法分类号] R394-33; R730.23; R730.264 [文献标志码] A

Effect of ING4 protein on proliferation and apoptosis in human U251 glioma cells

Deng Yuefei, Lei Bingxi, Zhao Yiying, Niu Jiangtao (Department of Neurosurgery, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510120, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigated the effect of inhibitor of growth family 4 (ING4) protein on proliferation and apoptosis in human U251 glioma cells. **Methods** Human U251 glioma cells were transfected with plasmid pEGFP-C2/ING4 (ING4 protein group) and plasmid pEGFP-C2 (pEGFP-C2 group) *via* PEI, respectively, and the non-transfected U251 cells were used as blank control (blank group). Positive cells were screened by G418 to establish a cell strain with stable expression of ING4 protein. ING4 protein expression was detected by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting, while proliferation and apoptosis of transfected and non-transfected human U251 glioma cells were detected by MTT assay and Hochest staining. **Results** The efficiency of pEGFP-C2/ING4 and pEGFP-C2 tranfection into human U251 glioma cells were 84% and 82%, respectively. RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting showed significant up-regulation of ING4. Compared with the pEGFP-C2 group and blank group, the growth inhibition rate and apoptotic rate of human U251 glioma cells after 72 h transfection in the pEGFP-C2/ING4 group were significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** ING4 protein can significantly inhibit proliferation and induce apoptosis in human U251 glioma cells.

[**Key words**] inhibitor of growth family 4; U251 cells; cell transfection

Supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2007B031514001). Corresponding author: Deng Yuefei, Tel: 86-20-81332013, E-mail: fly040@sohu.com

有研究发现生长抑制因子4(inhibitor of growth family member 4,ING4)基因在抑制肿瘤生长、促进肿瘤凋亡、恢复细胞间的接触抑制、影响细胞周期进程、抑制肿瘤血管生成等方面均有重要作用[1-3]。本实验通过将前期成功构建的pEGFP-C2/ING4质粒转染人胶质瘤U251细胞,构建稳定高表达ING4蛋白的细胞株,观察ING4蛋白的稳定高表达对U251细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒pEGFP-C2和G418购自美国Invitrogen公司,pEGFP-C2/ING4质粒由本课题组前期构建保存[4],U251细胞株为本院医学研究中心冻存;聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)购自

[基金项目] 广东省科技计划项目基金(2007B031514001)
[通信作者] 邓跃飞,电话:(020)81332013,E-mail:fly040@sohu.com

南京慧基生物技术有限公司;兔抗人 ING4 抗体购自美国 PTG 公司,羊抗兔 IgG 和即用型 SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;DMSO 购自 Sigma 公司,MTT 购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及转染后鉴定 按 Genescort 说明书 PEI 按 1∶1比例向 U251 细胞分别转染质粒 pEGFP-C2/ING4(阳性对照组)和空载体 pEGFP(阴性对照组),未转染质粒的 U251 细胞作为空白对照。pEGFP-C2 和 pEGFP-C2/ING4 质粒因携带增强绿色荧光蛋白(GFP)基因表达框,导入细胞后会发出绿色荧光,转染 48 h 后荧光显微镜观察质粒的转染效率及荧光效果。

1.2.2 转染细胞筛选、阳性克隆及建立细胞株 转染 48 h 后选择荧光强度最强的 pEGFP-C2 和 pEGFP-C2/ING4 组细胞进行后续实验:胰酶消化所选择的 2 组细胞制备成细胞悬液,接种细胞于新 24 孔板继续培养 24 h,按 800 μg/ml 浓度加入 G418 筛选试剂进行筛选。48 h 后荧光显微镜观察荧光强度,选择荧光强度高的孔进行单克隆,并将荧光强度高的单个克隆细胞扩大培养,建立稳定转染 pEGFP-C2 和 pEGFP-C2/ING4 的细胞株。

1.2.3 Western blot 检测 U251 细胞 ING4 蛋白的表达 将建株成功的 U251-C2、U251-C2/ING4 及 U251 细胞分别收集起来,按蛋白提取说明书分别提取 3 组细胞总蛋白,经过 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭,孵育抗 ING4 抗体(1∶500),孵育二抗(1∶6 000),染色、曝光,采用蛋白免疫印迹法检测 3 株细胞株中 ING4 蛋白的表达。

1.2.4 MTT 法检测 U251 细胞的增殖 3 组细胞分别消化后,10% 新生牛血清培养液配成单细胞悬液,以每孔 1×10^4 细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl,每组 3 个复孔。呈色:细胞培养 1 ~ 5 d,在第 1、3、5 天的同一时间,每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸去孔内培养上清液,每孔加 150 μl DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分融解。比色:选择 492 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光密度值[$D(490)$]。

1.2.5 Hochest 核染色检测 U251 细胞的凋亡 3 组细胞分别消化后每孔种入 1×10^5 细胞,培养 3 d。细胞固定:吸尽培养液,加入 0.5 ml 固定液固定 10 min,弃去固定液,PBS 洗涤 2 遍,每次晃动 3 min,吸尽液体。Hoechst 染色:加入 0.5 ml Hoechst 染色液,染色 5 min。弃去染色液,PBS 洗 2 遍,每次3 min,吸尽液体。观察:荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。正常细胞核较大,发出弥散均匀荧光;凋亡细胞核皱缩呈致密浓染或碎裂成块状。计数:3 组细胞每组选取 5 个高倍镜视野,计数细胞核个数和核固缩、核碎裂个数。凋亡率 = 凋亡细胞个数/细胞总个数。

1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 pEGFP-C2/ING4 重组质粒的鉴定

使用引物进行 RT-PCR,pEGFP-C2/ING4 重组质粒经过双酶切后,电泳显示在 10 000、1 000 bp 附近各有 1 条条带;10 000 bp 上方条带与 pEGFP-C2 质粒大小相符,1 000 bp 附近条带与目的基因 ING4 的开放读码框(open reading frame,ORF)大小相符。pEGFP-C2/ING4 重组质粒测序结果比对显示所插入的片段的测序结果和 ING4 的 ORF 比对相似性 100%,没有碱基突变。见图 1。

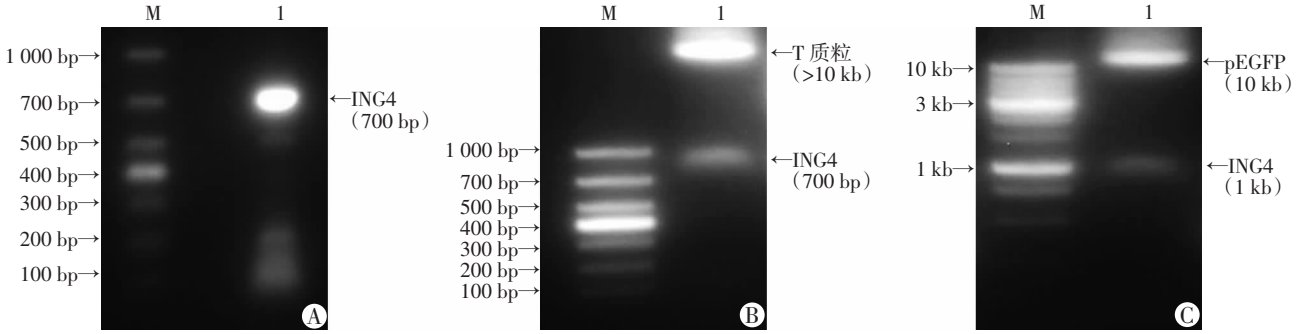
2.2 G418 和流式筛选阳性克隆结果

pEGFP-C2 质粒和 pEGFP-C2/ING4 质粒转染 U251 细胞,使用 G418(800 μg/ml)筛选后,可获得较多的 GFP 阳性细胞。再使用流式细胞分选系统分选,可获得 GFP 阳性克隆,2 组 U251 GFP 阳性率 >90%。见图 2。

2.3 ING4 蛋白在转染 U251 细胞中的表达

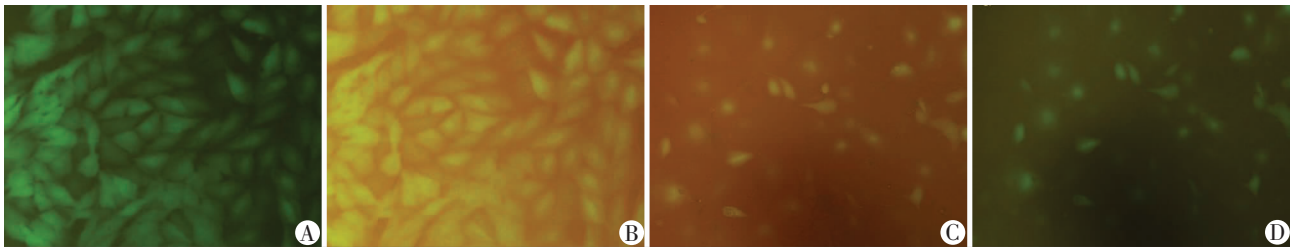
2.3.1 U251 细胞抗 ING4 免疫组化染色 抗 ING4 抗体免疫组化染色显示 pEGFP-C2/ING4 转染组细胞有阳性着色,细胞核深染并能见到凋亡小体;pEGFP-C2 转染组和未转染组细胞没有阳性着色。见图 3。

2.3.2 Western blot 检测 ING4 蛋白的表达 pEGFP-C2/ING4 转染组在 30×10^3 附近有 1 条条带,与 ING4 相对分子质量相一致;在同一区域,其他 2 组未见条带。3 组细胞在 40×10^3 附近均有 1 条条带,与内参 β-actin 相对分子质量大小相一致。Western blot 结果表明,稳定高表达 ING4 蛋白的细胞株已建成。见图 4。



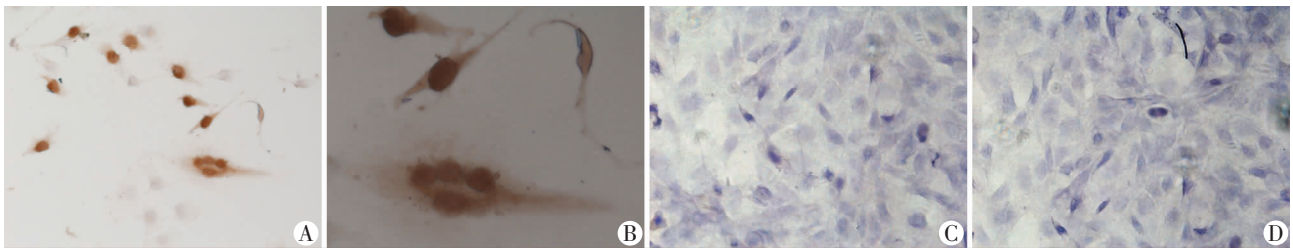
A:ING4 的 PCR 产物电泳结果 M:标准(DL 1000);1:PCR 产物;B:TA 克隆双酶切产物电泳结果 M:标准(DL 1000);1:双酶切产物;C:pEGFP-ING4 双酶切产物电泳结果 M:标准 1 kb;1:双酶切产物

图 1 pEGFP-C2/ING4 重组质粒的鉴定结果



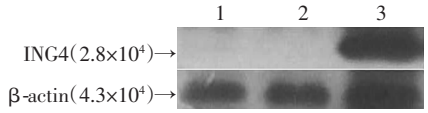
A:pEGFP-C2 转染组筛选后培养荧光显微镜观察;B、C:分别为 pEGFP-C2 转染组、pEGFP-C2/ING4 转染组同一视野普通光和荧光显微镜观察的合图;D:pEGFP-C2/ING4 转染组筛选后培养荧光显微镜观察

图 2 G418 联合流式细胞分选系统筛选阳性克隆结果 (×200)



A:pEGFP-C2/ING4 转染组(×100);B:pEGFP-C2/ING4 转染组(×400);C:pEGFP-C2 转染组(×100);D:空白对照组(×100)

图 3 U251 细胞抗 ING4 免疫组化染色观察 (SABC)



1:空白对照组;2:pEGFP-C2;3:pEGFP-C2/ING4

图 4 Western blot 检测 pEGFP-C2 和 pEGFP-C2/ING4 细胞株中 ING4 蛋白表达

2.4 MTT 检测 U251 细胞的增殖

细胞转染第 1、3、5 天行 MTT 检测,pEGFP-C2/ING4 转染组的 $D(490)$ 呈下降趋势,而 pEGFP-C2 转染组和空白对照组则呈上升趋势。接种第 1 天 pEGFP-C2/ING4 转染组、pEGFP-C2 转染组和空白对照组的 $D(490)$ 分别为(0.379 5 ± 0.019 3)%、(0.380 2 ± 0.001 1)%和(0.381 2 ± 0.002 4)%,3 组间的差异无统计学意义($P>0.05$);接种第 3 天这 3 组的 $D(490)$ 分别为(0.260 7 ± 0.046 4)%、(0.582 2 ± 0.004 6)%和(0.594 7 ± 0.007 2)%,pEGFP-C2/ING4 转染组与 pEGFP-C2 转染组和空白对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),pEGFP-C2 转染组与空白对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);接种第 5 天 3 组的 $D(490)$ 分别为(0.192 0 ± 0.010 5)%、(1.392 6 ± 0.070 5)%和(1.402 0 ± 0.001 5)%,pEGFP-C2/ING4 转染组与 pEGFP-C2 转染组和空白对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.01$),pEGFP-C2 组与空白对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明 ING4 蛋白高表达能明显抑制 U251 细胞的增殖。

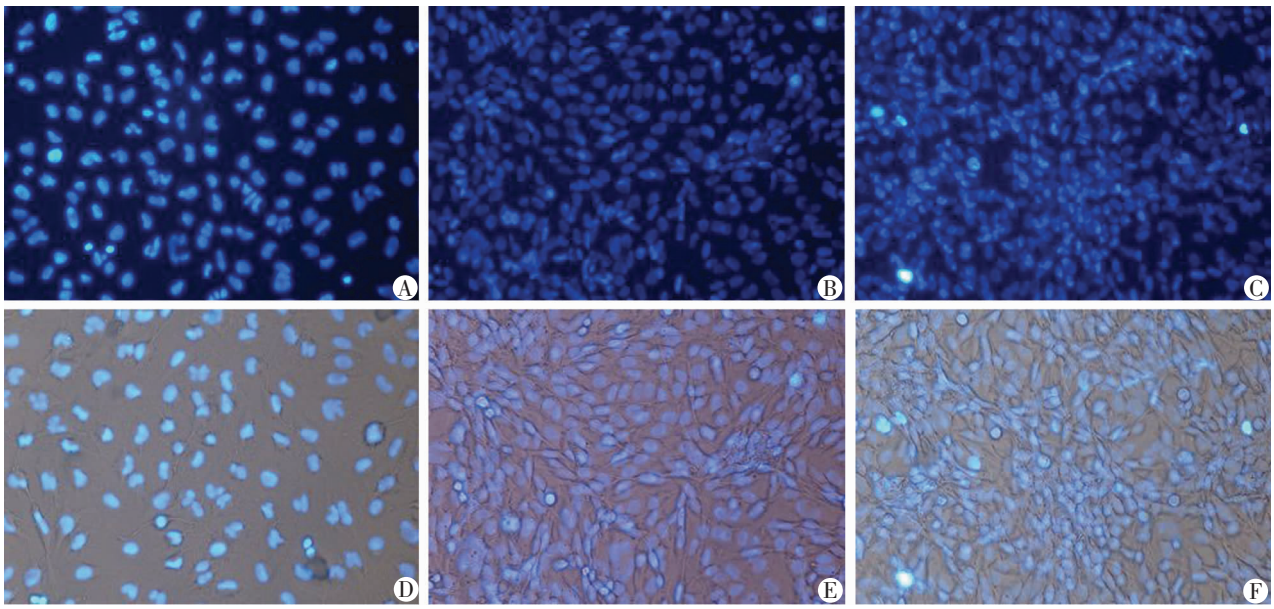
2.5 Hochest 核染色检测 U251 细胞的凋亡

细胞培养第 3 天,pEGFP-C2/ING4 转染组即可见到较多的核固缩、核碎裂等凋亡现象。pEGFP-C2/ING4 转染组、pEGFP-C2 转染组和空白对照组的凋亡率分别为(29.0 ± 1.2)%、(13.7 ± 0.8)%和(14.1 ± 0.5)%,pEGFP-C2/ING4 转染组高于其他 2 组($P<0.05$),pEGFP-C2 转染组和空白对照组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明,ING4 蛋白高表达能明显诱导 U251 细胞的凋亡。见图 5。

3 讨论

神经胶质瘤是颅内最常见的肿瘤,约占颅内肿瘤 40% ~60%,具有高度间变和侵袭性生长特点,目前预后仍然很差,经手术、放疗、化疗等综合治疗后 WHO 分级中Ⅲ级和Ⅳ级患者中的复发率和致死率仍然很高,中位生存时间少于 18 个月,1 年生存率约为 30%,5 年生存率不足 5%,寻找更加有效的治疗方法对改善胶质瘤的治疗效果至关重要[5-6]。ING4 基因是近年发现的一种候选肿瘤抑制基因,目前研究已证实 ING4 蛋白在胶质瘤组织中表达明显下调,且 ING4 蛋白表达与胶质瘤的分级有密切关系,其表达水平与神经胶质瘤的恶性程度呈负相关[7-9]。Garkavtsev 等[10]于 2004 年研究通过实时定量 PCR 发现,ING4 蛋白在低度恶性胶质瘤中的表达水平比正常细胞低 2 ~3 倍,在高度恶性胶质瘤中的表达水平则比正常细胞低 6 倍,ING4 蛋白高表达能明显抑制胶质瘤 U87 细胞生长及组织血管生成;Li 等[7]不仅证实 ING4 蛋白表达水平在恶性胶质瘤中明显较正常脑组织中低,胶质瘤级别越高表达水平越低,而且发现 ING4 蛋白高表达能明显抑制胶质瘤 U87 细胞增殖和诱导细胞凋亡;赵耀东等[11]研究亦证实腺病毒介导的 ING4 蛋白过表达能抑制鼠胶质瘤 C6 细胞增殖,诱导细胞的凋亡。

至于 ING4 蛋白高表达对人胶质瘤 U251 细胞生长的影响,尚少见研究报道。在本实验中,我们将 pEGFP-C2/ING4 质粒通过 PEI 转染入人胶质瘤 U251 细胞中,并通过 G418 的筛选,单克隆扩大化培养后建立



A:pEGFP-C2/ING4 组培养第3天;B:pEGFP-C2 组培养第3天;C:空白对照组培养第3天;D、E、F:分别为 pEGFP-C2/ING4、pEGFP-C2、空白对照组同一视野普通光和荧光显微镜观察的合图

图5 Hochest 染色检测 U251 细胞的凋亡 (荧光显微镜×100)

了 ING4 蛋白稳定高表达的 U251 细胞株;我们在通过对细胞增殖和凋亡的研究中发现,ING4 蛋白的高表达具有明显抑制 U251 细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用。

另外,本实验选用 pEGFP-C2 质粒作为载体,避免了病毒载体过强的免疫原性、毒性和致瘤性,而且 pEGFP 载体携带有 GFP 报告基因和 $Kana^k$/neo^k 基因,对转染后筛选阳性克隆细胞有着重要的作用,当其被转染进肿瘤细胞并被成功表达后可在绿色显微镜下观察到绿色,可直观检测到目的基因是否被转染进肿瘤细胞内及是否被成功的表达;采用可生物降解的新一代转染试剂阳离子聚合物 PEI 转染,可同时获得高的转染效率和低的细胞毒性。

综上所述,人 ING4 蛋白表达水平与胶质瘤恶性度存在明显相关性,ING4 蛋白的高表达能明显抑制 U251 细胞增殖和诱导细胞凋亡。深入研究 ING4 蛋白在胶质瘤中的作用及机制有望使 ING4 蛋白成为胶质瘤新的相关特异性标志物和基因治疗的新靶点,为胶质瘤的临床基因治疗研究提供新途径。

参考文献:

[1] 陈斌, 邓跃飞. ING4 基因抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2008, 13(3): 141-144.

[2] Li X, Zhang Q, Cai L, *et al*. Inhibitor of growth 4 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549 via Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(6): 829-835.

[3] Zhang X, Zhu W, Zhang J, *et al*. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(2): 275-280.

[4] 雷炳喜, 赵义营, 牛江涛, 等. pEGFP-ING4 真核表达载体的构建及在人脐静脉内皮细胞中的表达[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2011, 16(1): 38-41.

[5] Deorah S, Lynch C F, Sibenaller Z A, *et al*. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001[J]. Neurosurg Focus, 2006, 20(4): E1.

[6] 姚声涛, 陈佳琳, 黄轶, 等. 腺病毒介导 GRIM19 对恶性胶质瘤 CHG-5 细胞增殖及分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 548-551.

[7] Li X, Cai L, Chen H, *et al*. Inhibitor of growth 4 induces growth suppression and apoptosis in glioma U87MG[J]. Pathobiology, 2009, 76(4): 181-192.

[8] 赵树鹏, 牛光明, 陶胜忠, 等. ING4 和 HIF-1α 在人脑不同级别星形细胞瘤中表达的研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(4): 3-5.

[9] 王涤, 程慧, 李晓梅. ING4 及 SKP2 在不同级别脑胶质瘤组织中的表达[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(9): 825-828.

[10] Garkavtsev I, Kozin S V, Chernova O, *et al*. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis[J]. Nature, 2004, 428(6980): 328-332.

[11] 赵耀东, 缪竞诚, 张海峰, 等. 腺病毒介导的人 ING4 基因诱导 C6 鼠胶质瘤细胞凋亡[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 33-39.

(**收稿**:2011-06-03;**修回**:2011-08-10)

(编辑 王小寒)