

· 基础研究 ·

livin β 对胶质瘤细胞增殖和凋亡能力的影响*石全红¹, 崔荣周¹, 王佳^{2△}, 陈敏若¹, 王文¹, 李海涛¹, 詹傲¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科 400016; 2. 重庆医科大学附属大学城医院妇产科 401331)

摘要:目的 探讨 livin β 基因阻断对胶质瘤细胞增殖和凋亡能力的影响。方法 脂质体法转染重组质粒于人星形胶质瘤细胞(U251), MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡值, RT-PCR、Western blot 分别检测细胞中 caspase-3 基因及蛋白的表达。结果 MTT 法检测转染组细胞增殖明显低于对照组和空载体组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); PI 单染流式细胞术检测转染组细胞凋亡值明显低于对照组和空载体组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 转染组 caspase-3 基因及蛋白表达均明显高于对照组和空载体组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 阻断人星形胶质瘤细胞(U251)中 livin β 基因表达, caspase-3 基因及蛋白表达均明显增加, 激活细胞凋亡蛋白酶级联反应, 导致凋亡增加, 细胞增殖减少, 进一步证实了 livin β 基因在胶质瘤的发生、发展中起着重要作用。

关键词: livin β ; 胶质瘤; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 细胞凋亡; 细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3506-03

Effects of livin β gene disruption on apoptosis and proliferation of glioma cells*Shi Quanhong¹, Cui Rongzhou¹, Wang Jia^{2△}, Chen Minruo¹, Wang Wen¹, Li Haitao¹, Zan Ao¹

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Objective To investigate whether silencing livin β gene by siRNA leads to apoptosis, arrest of cell cycle and inhibition of proliferation. **Methods** The recombinant plasmid was transfected into U251 glioma cells by liposome mediated transfection. Then PI flow cytometric analysis was performed for cell cycle and apoptosis, MTT assay for cell proliferation, RT-PCR and Western blotting for caspase-3 expression. **Results** Silencing livin β gene by siRNA could inhibit cell proliferation remarkably ($P < 0.05$), could arrest cell cycle significantly and induce cell apoptosis ($P < 0.05$), could upregulate caspase-3 obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing livin β gene in glioma cells could activate caspase-3 and increased poly(ADP-ribose) polymerase cleavage, therefore induce apoptosis and inhibit proliferation. So the livin β may play key role in pathogenesis of glioma.

Key words: livin β ; glioma; caspase 3; apoptosis; cell proliferation

livin 是凋亡抑制蛋白, livin 基因包括 livin α 、livin β 两种亚型^[1-4], 有研究发现, 胶质细胞瘤中 livin β mRNA 表达高于正常对照组。本研究采用脂质体法转染重组质粒于人星形胶质瘤细胞(U251), 阻断 U251 中 livin β 基因表达, 通过对 caspase-3 基因及蛋白表达的测定, 进一步证实 livin β 基因在胶质瘤的发生、发展中起着重要作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 MTT 溶液购自美国 Amresco 公司, DM-SO、70% 冰乙醇、兔抗人 caspase-3 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司, 预染蛋白质 Marker 购自上海 Promega 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔购自美国 Santa Cruz 公司。caspase-3 基因引物序列, 上游: 5'-CTG GTA CAG ATG TCG ATG CAG-3', 下游: 5'-ATA CAA GAA GTC GGC CTC CAC T-3', 扩增产物 392 bp; 内参 β -actin 引物序列, 上游: 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', 下游: 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3', 扩增产物 250 bp, 均由上海生工生物技术公司合成。

1.1.2 主要仪器 96 孔板为德国 Greiner, CO₂ 孵箱为三洋 SANYO, 显微镜为 OLYMPUS, 酶标 WESTINGAREA 为西域科技, 流式细胞仪(FACScab Licbur)为美国 BD。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验方法 接种 U251 细胞: 用 0.25% 胰酶消化单层培养细胞, 用完全培养液配成单层培养细胞悬液, 以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L。转染目的基因分 3 组, 转染组、空载体组、对照组。将目的载体 BIR71+72、HK 转入 U251 细胞, 载体质量与转染试剂的体积比为 1:5。培养细胞: 37 $^{\circ}$ C CO₂ 箱培养不同时间段 1、2、3、4、5 d。呈色: 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L (5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔中培养液上清, 震荡 10 min, 使产物充分溶解。比色: 490 nm 波长, 在酶标仪上测定吸光值。以时间为横轴, 以吸光值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.2 流式细胞检测方法 转染载体 livin β 1+livin β 2, 取转染后细胞样品 livin β 1+livin β 2, HK, NC 每个样品 5×10^5 个, 900 r/min 离心 5 min, 弃去培养液各管加入 5 μ L, 洗细胞 1 次 900 r/min 离心 5 min 去 PBS, 加入预冷的 70% 的无水乙醇 4

℃ 固定 4 h, 900 r/min 离心 5 min 去固定液, 3 mL PBS 重悬细胞 5 min。400 目筛网过滤 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS, 染液重悬细胞, 4 ℃ 避光 30 min 流式细胞仪检测; PI 用氩离子激发荧光, 激发光波为 488 nm, 发射光波长大于 630 nm, 产生红色荧光。

1.2.3 RT-PCR 检测细胞中 caspase-3 基因的表达 应用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度定量, 具体按说明书进行操作。反应条件: 95 ℃ 5 min 1 个循环; 95 ℃ 20 s; 60 ℃ 20 s; 72 ℃ 10 s; 共 35 个循环, 72 ℃ 延长 3 min 后结束扩增。按 5 : 1 比例, 取 5 μL PCR 产物与 1 μL 上缓冲液混合进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 100 V 35 min, 电泳结束后, 凝胶成像扫描仪分析, 采用 Quantity One 软件分析系统, 对 caspase-3 的 PCR 产物及内参 GAPDH 的 PCR 产物进行光密度值分析。

1.2.4 Western blot 检测细胞中 caspase-3 蛋白表达 蛋白提取: 每 10⁶ 个细胞加入 1 mL RIPA 蛋白提取液, 收集裂解的细胞, 转移至 EP 管离心, 取上清 5 μL 于紫外分光光度计测浓度。转膜: 据泳道预染 marker 的位置, 以及 caspase-3 蛋白和 GAPDH 的分子量切胶分别切取大小与每块凝胶接近的滤纸 6 张及 PVDF 膜 1 张, 与凝胶一起浸泡于电转缓冲液中转膜。封闭: 用封闭液 (5% 脱脂牛奶-TBST) 封闭 PVDF 膜, Anti-human livin (1 : 200), 内参 Rabbit anti-GAPDH (1 : 10 000), 按 0.2 mL/cm² 分别加入一抗, 用 Western 洗涤液洗 PVDF 膜 3 次, 稀释二抗羊抗兔 IgG/HRP, 稀释比例均为 1 : 2 500, 按 0.2 mL/cm² 分别加入二抗, 室温缓慢摇动孵育 1 h 用 Western 洗涤液洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min 将化学发光试剂 A 液和 B 液等量混合后均匀铺于 PVDF 膜上 1~2 min, 曝光成像, 用 Quantity One 软件分析蛋白区带, 将 caspase-3 蛋白光密度值与内参 GAPDH 光密度值相比, 为 caspase-3 蛋白相对光密度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件, 所有计量资料均采用方差分析, 不同组间酶标仪检测结果采用随机区组方差分析显示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 实验结果 转染组、空载体组及对照组细胞通过酶标仪检测吸光值见表 1, 分别取各组平均值绘制 MTT 细胞生长曲线, 见图 1。采用随机区组方差分析显示, 3 组之间表达差异有统计学意义 ($F = 22.88, P < 0.05$), 进一步比较显示转染组和空载体组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染组和对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而空载体组和对照组差异无统计学意义 ($P = 0.382, P > 0.05$), 认为转染组细胞增殖明显低于空载体组和对照组。另外统计结果也显示, 从第 3 天开始, 各组之间 MTT 表达开始出现明显差异。

2.2 流式细胞检测实验结果 流式细胞仪分别检测对照组、空载体组及转染组细胞凋亡情况, 转染组、空载体组、对照组细胞凋亡值为 6.93%、2.50%、0.44%。采用随机区组方差分析显示, 3 组之间表达差异有统计学意义 ($F = 2 950.66, P < 0.05$), 且转染组分别与空载体组、对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。认为转染组细胞凋亡明显多于空载体组和对照组。

2.3 细胞中 caspase-3 基因的表达 RT-PCR 检测重组质粒转染人星形胶质瘤细胞 U251 后, 细胞中 caspase-3 mRNA 的表达。采用随机区组方差分析显示, 3 组之间表达差异有统计

学意义 ($F = 2 398.8, P < 0.05$), 且转染组分别与空载体组、对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而空载体组、对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 3 组酶标仪检测吸光值

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
转染组	0.036	0.056	0.102	0.210	0.417	0.534
	0.036	0.052	0.101	0.208	0.403	0.515
	0.036	0.055	0.106	0.216	0.410	0.521
空载体组	0.036	0.068	0.153	0.327	0.678	0.846
	0.036	0.068	0.157	0.330	0.700	0.856
	0.036	0.071	0.155	0.324	0.664	0.855
对照组	0.036	0.097	0.185	0.364	0.834	0.933
	0.036	0.092	0.182	0.357	0.836	0.940
	0.036	0.099	0.181	0.346	0.827	0.901

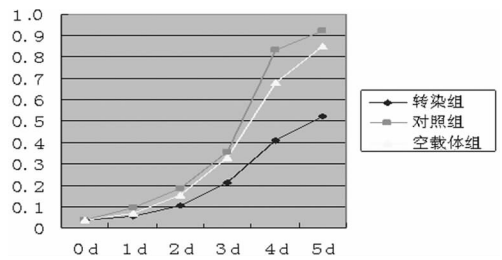


图 1 3 组细胞生长曲线

2.4 细胞中 caspase-3 蛋白的表达 Western blot 检测重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 后, 细胞中 caspase-3 蛋白的表达, 见图 2。采用随机区组方差分析显示, 3 组比较表达差异有统计学意义 ($F = 316.1, P < 0.05$), 且转染组分别与空载体组、对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而空载体组、对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

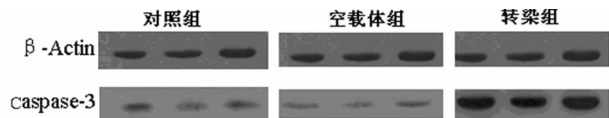


图 2 细胞中 caspase-3 蛋白的表达

3 讨 论

已有研究发现 livin 基因在胶质瘤中高表达^[5-6], 而 livin 基因又有两个不同的亚型^[1-4], 本研究已经发现星形胶质瘤细胞 U251 中 livin β mRNA 表达明显高于 livin α mRNA。由于 livin α 和 livin β 两种亚型结构上的差异, 推测它们在胶质瘤中表现出不同的抗凋亡活性。细胞周期出现 G₁/G₀ 期阻滞, 细胞增殖周期进展受阻, 细胞增殖能力下降, 从而促进细胞凋亡进程^[7]。本实验采用 siRNA 阻断星形胶质瘤细胞 U251 中 livin β 基因表达, MTT 检测也表明转染后星形胶质瘤细胞 U251 增殖明显受到抑制。而细胞周期调控异常是恶性肿瘤细胞凋亡和增殖异常的重要原因^[8]。更进一步表明 livin β 在胶质瘤的发生、发展中起着重要作用。

本实验同时发现星形胶质瘤细胞 U251 中 livin β 基因被阻断后, caspase-3 基因及蛋白表达均明显增加。caspase-3 是凋亡通路下游的效应分子, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的末端效应器, 也是凋亡的关键酶和执行者。也是线粒体和死亡受体两

条凋亡信号途径的共同通道,凋亡通路一旦激活则引起 caspase-3 级联反应并使其活化引起细胞凋亡。Crnkovic-Mertens 等^[8]应用 siRNA 抑制 HeLa 细胞中 livin 基因的表达,激活 caspase-3,促进 HeLa 细胞凋亡,同样增加了 HeLa 细胞对化疗药物(如:阿霉素)及紫外线照射的敏感性,并发现该效应只作用于 livin 基因表达阳性的 HeLa 细胞,对无 livin 基因表达的 H1299 细胞不起作用。Wang 等^[9]沉默恶性黑色素瘤 LiBr 细胞中 livin 基因表达,发现 procaspase 表达增加, caspase-3 活化,诱导凋亡的发生。因此,可以认为胶质瘤中高表达的 livin β 通过下调凋亡效应蛋白酶 caspase-3 表达,而达到抑制凋亡的作用。但也有学者发现 livin 通过非 caspase 途径抑制细胞凋亡,主要是通过激活核因子- κ B 及丝裂原激活蛋白激酶之一的 c-Jun 氨基末端激酶 1(c-jun-NH2-kinase 1, JNK1)来抑制细胞凋亡^[10]。因此, livin 抑制凋亡的机制与其他 IAPs 既有相同点也有不同点, livin 可能通过多种途径来抑制细胞凋亡。

本研究初步证实了采用 RNAi 技术靶向胶质瘤细胞中 livin β ,可解除对凋亡效应蛋白酶 caspase-3 的抑制作用,激活细胞凋亡蛋白酶级联反应,可诱导细胞凋亡、引起细胞周期阻滞和抑制细胞增殖。阻断胶质瘤细胞中 livin β 基因表达,可解除对凋亡效应蛋白酶 caspase-3 的抑制作用,激活细胞凋亡蛋白酶级联反应,凋亡增加,细胞增殖减少。进一步表明 livin β 有拮抗凋亡的作用,在胶质瘤的发生、发展中起着重要作用。

参考文献:

- [1] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. FEBS Lett, 2007, 495(1/2): 56-60.
- [2] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 279(3): 820-831.
- [3] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression

and prognostic significance of livin, sueivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85-90.

- [4] Crnkovic-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, et al. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells [J]. J Mol Med, 2006, 84(3): 232-240.
- [5] 向心, 黄正松, 石忠松, 等. 脑星形细胞瘤 Livin 基因表达与细胞增殖的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(9): 1141.
- [6] Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR, et al. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein(IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome [J]. Pediatr Dev Pathol, 2005, 8(6): 621-629.
- [7] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling; Cell cycle arrest versus apoptosis [J]. Toxicology, 2002, 27(181/182): 475-481.
- [8] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene [J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.
- [9] Wang H, Tan SS, Wang XY, et al. Silencing livin gene by siRNA leads to apoptosis induction, cell cycle arrest, and proliferation inhibition in malignant melanoma LiBr cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(12): 1968-7194.
- [10] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: The TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1754-1766.

(收稿日期:2012-03-29 修回日期:2012-06-25)

(上接第 3505 页)

- correlates with colon-rectal tumorigenesis [J]. Oncology, 2003, 65(1): 37-45.
- [3] Nair A, Venkat raman M, Maliekal TT, et al. NF- κ B is constitutively activated in high grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix [J]. Oncogene, 2003, 22(1): 50-58.
 - [4] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.
 - [5] Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(2): 121-132.
 - [6] Ghosh G, Wang VY, Huang DB, et al. NF- κ B regulation: lessons from structures [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 36-58.
 - [7] Egan LJ, Toruner M. NF- κ B signaling pros and cons of altering NF- κ B as a therapeutic approach [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1072: 114-122.

- [8] Tang X, Liu D, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions [J]. Cancer, 2006, 107(11): 2637-2646.
- [9] Arkan MC, Greten FR. IKK- and NF- κ B-mediated functions in carcinogenesis [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 349: 159-169.
- [10] Carbone C, Melisi D. NF- κ B as a target for pancreatic cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16 Suppl 2: S1-10.
- [11] Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(2): 125-140.
- [12] Wang Z, Rao DD, Senzer N, et al. RNA interference and cancer therapy [J]. Pharm Res, 2011, 28(12): 2983-2995.

(收稿日期:2012-03-08 修回日期:2012-09-27)