

干扰 $ClC-2$ 基因表达对胶质瘤 BT-325 细胞生长的影响杨翔云^{1a}, 赖小刚², 张勇^{1b}, 裴建明^{1a}, 杨安钢^{1b}, 周士胜³

[摘要] 目的 观察抑制容积调控氯通道 $ClC-2$ 基因的表达对胶质瘤 BT-325 细胞生长的影响。方法 设计和构建两个针对 $ClC-2$ 基因的小干扰 RNA (siRNA) 重组表达载体, 用脂质体 LipofectamineTM2000 介导转染, 将空载体质粒和两个重组质粒分别转入 BT-325 细胞 (依次为对照组、PPI 组和 PP2 组); 通过 RT-PCR 检测 $ClC-2$ 基因 mRNA 表达变化; MTT 分析检测细胞活性; 流式细胞仪检测细胞周期。结果 与对照组相比较, 干扰组 $ClC-2$ 基因的 mRNA 水平明显降低, 细胞生长速度明显减慢, 细胞周期进程被阻滞在 G1 期。结论 干扰胶质瘤细胞系 BT-325 细胞的 $ClC-2$ 基因表达可以抑制细胞的生长, 提示 $ClC-2$ 基因可能成为控制胶质瘤恶性生长的新靶点。

[关键词] $ClC-2$ 基因; 胶质瘤; RNA 干扰 (RNAi); BT-325 细胞

Knockdown of $ClC-2$ Gene Expression Inhibits the Growth of BT-325 Human Glioma Cells YANG Xiang-Yun, LAI Xiao-Gang, ZHANG Yong, et al. Department of Physiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

[Abstract] Objective To observe the growth of BT-325 human glioma cells after interfering volume-regulated chloride channel $ClC-2$ gene. Methods Two expression recombinant vectors of $ClC-2$ gene were designed and constructed. The primary plasmid, pSUPER.puro-shRNA, and the two recombinant plasmids, pSUPER.puro-shRNA- $ClC-21$ and pSUPER.puro-shRNA- $ClC-22$, were transfected into BT-325 cells by LipofectamineTM2000 (Groups: control, PPI and PP2, respectively). The mRNA expression of $ClC-2$ gene was detected with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the cellular survival was determined with MTT assay, and the cell cycle was measured with flow cytometry (FCM). Results $ClC-2$ mRNA expression and the growth of the cells in PPI and PP2 groups were significantly lower than that of control group. The cell cycle progression was blocked in G1 phase (PPI and PP2 vs control, $P < 0.01$). Conclusion The growth of BT-325 human glioma cells is prevented by knockdown of $ClC-2$ gene expression, which may be one of the novel targets to inhibit growth of human malignant glioma cells.

[Key words] $ClC-2$ gene; glioma; RNA interference (RNAi); BT-325 cells

中图分类号: Q78; R739.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)05-0378-03

[本文著录格式] 杨翔云, 赖小刚, 张勇, 等. 干扰 $ClC-2$ 基因表达对胶质瘤 BT-325 细胞生长的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(5): 378-380.

$ClC-2$ 通道蛋白在体内广泛表达, 其中在脑、肾、小肠等部位表达较多。它主要分布于细胞膜上, 能被超极化、细胞膨胀和细胞外酸化激活, 能被 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 阻断^[1]。研究发现, 在胶质瘤细胞, $ClC-2$ mRNA 和蛋白质的表达水平上调^[2]。脑胶质细胞瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 其发病率极高, 占全部脑肿瘤的 40%~60%, 手术切除是其主要的治疗方法, 但切除后极易复发, 这可能与瘤细胞在体内的恶性增殖和高侵袭性密切相关^[3]。近年来, 随着对肿瘤分子生物学行为研究的不断深入, 肿瘤基因治疗给人们带来了新的希望^[4-5]。本研究通过干扰 $ClC-2$ 基因使 $ClC-2$ 基因表达降低, 观察其对胶质瘤细胞系 BT-325 细胞生长的影响, 为探讨胶质瘤的基因治疗寻找新靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 pSUPER.puro 载体和增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP):

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270602)。

作者单位: 1. 第四军医大学, a. 生理学教研室; b. 免疫学教研室, 陕西西安市 710032; 2. 解放军第 202 医院, 辽宁沈阳市 110003; 3. 大连大学医学院生理学教研室, 辽宁大连市 116622。作者简介: 杨翔云 (1979-), 女, 河南汝南县人, 硕士研究生, 主要研究方向: 生理学。通讯作者: 杨安钢、周士胜。

第四军医大学生物化学与分子生物学教研室提供; DME M (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、新生牛血清、LipofectamineTM2000、RT-PCR 试剂盒、TrizolTM 试剂及反转录酶: Invitrogen 公司; DL-2000 DNA marker: TaKaRa 公司; MTT 试剂: Amresco 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组表达载体的构建与鉴定 根据 $ClC-2$ 基因的 cDNA 序列 (序列号: NM004366), 设计两个干扰靶序列, 并合成两对脱氧寡核苷酸序列:

$ClC21$ (sense): 5'-GATCCCCGTTGGAATCC TGTGAGAAGTTCAAGAGACTTCTCACAGGAT TCCAAC TTTTGGAAA-3';

$ClC21$ (antisense): 5'-AGCTTTTCCAAAAAGT TGGAAATCCTGTGAGAAGTCTCTTGAAC TCTC ACAGGATTCCAACGGG-3'。

$ClC22$ (sense): 5'-GATCCCCCATGCTTAT GTCACCAGTTTCAAGAGAACTGGTGACATAA GCATGG TTTTGGAAA-3';

$ClC22$ (antisense): 5'-AGCTTTTCCAAAAAC CATGCTTATGTCACCAGTTCTCTTGAACTGG TGACATAAGCATGGGGG-3'。

经 Pub Med BLAST 分析显示, 选取的序列具有良

好的特异性。将化学合成的互补寡核苷酸序列退火后连接于 pSUPER.puro 载体,转化、扩增、挑选单克隆,经酶切鉴定及 DNA 测序鉴定重组表达载体。

1.3 细胞培养和脂质体转染

1.3.1 细胞培养 BT-325 细胞株为本教研室培养维持,用 DMEM 高糖培养基、10 % 新生牛血清、1 % 青链霉素 (penicillin streptomycin, PS) 培养,置 37 °C、5 % CO₂ 孵箱中。0.25 % 胰蛋白酶消化细胞,常规计数、冻存,数码荧光倒置显微镜 Olympus IX71 用于细胞形态观察并摄像。

1.3.2 空载体质粒和干扰重组质粒的脂质体转染

将对数生长期的 BT-325 细胞用胰蛋白酶消化后,接种于含 10 % 新生牛血清 DMEM 培养基的 6 孔板中,置 37 °C、5 % CO₂ 孵箱中培养。次日待汇合率达 90 % 时,采用脂质体 Lipofectamine™2000 将空载体质粒和两个干扰重组质粒分别按照 Invitrogen 公司提供的方案转染入 BT-325 细胞,三组细胞分别为对照组、PPI 组和 PP2 组,根据需要于转染后预定的时间点进行检测。

1.4 瞬时转染效率的测定 用 EGFP 确定转染效率。6 孔板上培养 BT-325 细胞,如同 1.3.2 转染的方法,将 EGFP 质粒转染入 BT-325 细胞中,在倒置显微镜下观察细胞,48 h 随机计数同一视野下所有细胞数及含有绿色荧光的细胞数,共取 3 个培养孔 6 个视野,根据公式:

转染效率 = (含有绿色荧光的细胞数 / 该视野下所有细胞数) × 100 %,

计算 BT-325 细胞的瞬时转染效率。

1.5 半定量 RT-PCR 检测 取转染 48 h 的三组细胞,依据 Trizol 说明书操作,抽提细胞总 RNA,在 260 nm、280 nm 下行紫外分光光度测定。各取 5 μg RNA 样品,加 0.5 μg/μl Oligo (dT) 16 1 μl、10 mmol/L dNTP 1 μl,DEPC 水补充至 10 μl,65 °C 水浴变性 5 min;冰上骤冷后加入 10 × RT Buffer 2 μl、25 mmol/L MgCl₂ 4 μl、0.1 mol/L DTT 2 μl、40 U/μl RNase out 1 μl,42 °C 水浴 2 min;加入 200 U/μl SuperScript™ II 1 μl,混匀,42 °C 水浴 50 min,70 °C 水浴 15 min,冰上骤冷。各取逆转录产物 2 μl 进行 PCR 扩增。25 μl 反应体系包括:模板 2 μl,0.4 μmol/L 上、下引物各 0.5 μl,2 × Master Mix 12.5 μl,加水至 25 μl。反应条件:94 °C 预变性 5 min,再 94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,22 个循环(未达到反应的平台期),72 °C 加强延伸 10 min,冷却至 4 °C。扩增产物大小为 464 bp,正向引物为 5'-CTCAGTGGTCTCCGTGTCA-3',反向引物为 5'-CAGAGTCGGCAGGCATCGC-3';以 β-actin 作为 RT-PCR 内参照,其产物大小为 221 bp,正向引物序列为 5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAAT-3',反向引物为 5'-CCGTCACCGGAGTCCATCA-3'。产

物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech 公司) 拍照后采用 Bandscan 软件测定分析条带的吸光度值。

1.6 MTT 分析 取对数生长期 BT-325 细胞,经 0.25 % 胰蛋白酶消化,用含 10 % 新生牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,加入培养液 200 μl/孔,37 °C 5 % CO₂ 培养箱中培养。次日瞬时转染三种质粒,分别于转染后 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 进行检测,检测前 4 h 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl,继续培养,到达检测点时弃去培养液,每孔加入 150 μl DMSO 溶解蓝紫色结晶,轻轻振动 10 min 后,用酶标仪(波长为 490 nm)测定各孔的吸光度值,取 3 个孔的均值。

1.7 流式细胞仪检测 取转染 48 h 的三组细胞,用 0.25 % 的胰蛋白酶消化后,置于 5 ml 离心管中,室温用 PBS 冲洗 2 次,1000 r/min 离心 5 min;每管加入 PBS 1 ml 制成单个细胞悬液,再加入预冷的无水乙醇 2 ml 固定,碘化丙啶染色,流式细胞仪进行细胞周期定量分析。

1.8 统计学方法 实验均重复 3 次,数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两样本均数 *t* 检验,α = 0.05。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建与鉴定 成功构建了编码 CIC-2 基因的短发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 重组表达载体,酶切图谱分析结果与预期片段大小一致,DNA 测序结果表明,shRNA 编码序列以正确的读码框插入到表达载体中,其转录产物为 shRNA,将它们分别命名为 pSUPER.puro-shRNA-CIC-21 和 pSUPER.puro-shRNA-CIC-22(待发表)。

2.2 转染效率测定 转染效率的高低不仅取决于 Lipofectamine™2000 和 DNA 量的多少,更决定于两者合适的比例。在 BT-325 细胞中,当 DNA/Lipofectamine™2000 = 1 : 2.5 时,EGFP 瞬时转染效率最高。结果表明,转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察绿色 BT-325 阳性细胞占总计数细胞的比例约为 78 % ~ 81 %,平均值为 79.5 %。

2.3 CIC-2 基因的 mRNA 表达 RT-PCR 半定量的结果表明,对照组有较强 CIC-2 mRNA 表达,而 PPI 组和 PP2 组 CIC-2 的 mRNA 表达水平明显降低。电泳图谱结合电泳条带的密度扫描分析,以 β-actin 为内参对照,两个干扰组 CIC-2 mRNA 表达的相对水平与对照组 CIC-2 mRNA 表达的相对水平比较有显著差异 (*P* < 0.01)。见图 1。

2.4 细胞生长曲线的测定 将三组细胞接种于 96 孔板中,从转染后 12 h 开始检测,每 12 h 检测 1 次,共 6 次。将所测结果进行统计学分析并绘制成细胞生长曲线(图 2)。结果显示:PPI 组、PP2 组较对照组细胞的活性明显下降,细胞的生长速度明显减慢。

2.5 流式细胞仪检测细胞周期 收集一定数量三组细胞,固定后测定细胞周期。由测定结果可见,对照组细胞周期类型比例结果。PP1 组和 PP2 组细胞的 G1 期比例分别为:

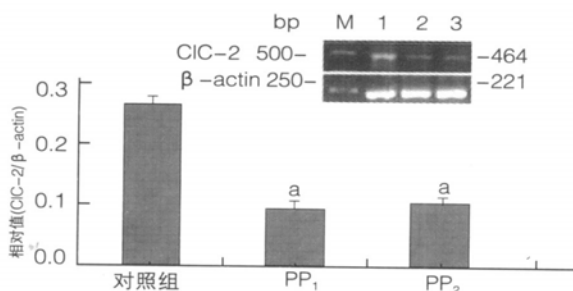


图 1 各组 CIC-2 mRNA 表达水平

注:a:与对照组比较, $P<0.01$

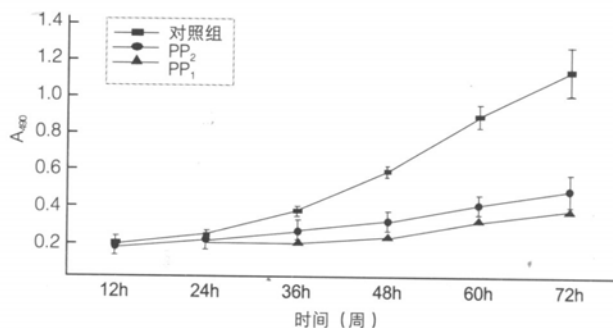
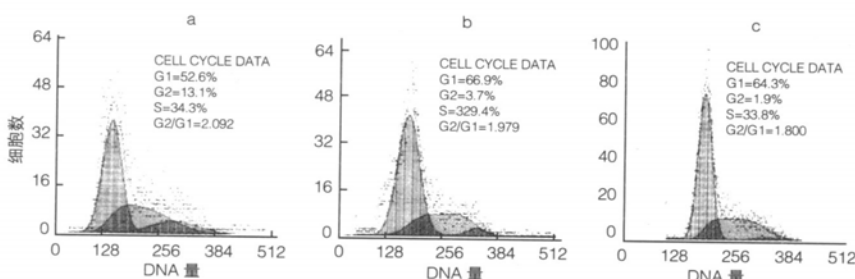


图 2 各组细胞活力的生长曲线图



a: 对照组;b:PP1 组;c:PP2 组。

3 讨论

细胞周期失控是许多肿瘤发生发展的重要原因。细胞周期包括有丝分裂期和分裂间期,分裂间期为细胞分裂做准备,又分为三期:合成前期(G1)、合成期(S)、合成后期(G2)。G1 期是细胞质复制的主要阶段,蛋白质、RNA 及多聚核蛋白体都在此期合成。细胞周期能否启动进入细胞增生,主要在于能否通过 G1/S 检测点;细胞一旦通过该检测点,即使在缺乏生长因子刺激条件下,也能在周期素(cyclins)和周期素依赖的蛋白激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)的驱动下完成该细胞周期^[6-7]。

人 CIC-2 基因位于 3q27,它是编码 898 个氨基酸的 Cl⁻通道蛋白^[8]。研究表明,CIC-2 通道的活动在细胞周期进程中不断变化,在特定 M 期周期素依赖的蛋白激酶 p34^{cdc2}/cyclin B 的作用下,CIC-2 通道直接磷酸化并发挥功能调节^[9-10]。但 CIC-2 对人胶质瘤细胞生物学的影响尚无研究。为此我们构建干扰真核表达载体,脂质体法瞬时转染人胶质瘤 BT-325 细胞,检测其生物学特性。RT-PCR 结果表明,CIC-2 基因的 mRNA 表达水平显著降低;流式细胞仪检测细胞周期的结果表明,细胞被阻滞在 G1 期,提示 CIC-2 氯通道可能与胶质瘤的发生有关。细胞生长曲线结果再次表明,干扰 CIC-2 将抑制细胞周期运行。

综上所述,干扰 CIC-2 基因可抑制人胶质瘤 BT-

325 细胞的生长。但是,在人神经胶质瘤细胞上高表达的 CIC-2 通道蛋白是通过何种机制影响细胞的增殖能力,还不清楚,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 503 - 568.
- [2] Olsen ML, Schade S, Lyons SA, et al. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells[J]. J Neurosci, 2003, 23(13): 5572 - 5582.
- [3] 卢旺盛. 胶质瘤基因治疗研究现状[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2003, 30(2): 169 - 173.
- [4] Kang CS, Pu PY, Li YH, et al. An in vitro study on the suppressive effect of glioma cell growth induced by plasmid-based small interference RNA (siRNA) targeting human epidermal growth factor receptor[J]. J Neurooncol, 2005, 74(3): 267 - 273.
- [5] Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference[J]. N Engl J Med, 2004, 351(17): 1772 - 1777.
- [6] Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(36): 9408 - 9421.
- [7] Loyer P, Trembley JH, Katona R, et al. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing[J]. Cell Signal, 2005, 17(9): 1033 - 1051.
- [8] Sik A, Smith RL, Freund TF. Distribution of chloride channel-2-immunoreactive neuronal and astrocytic processes in the hippocampus[J]. Neuroscience, 2000, 101(1): 51 - 65.
- [9] Zheng YJ, Furukawa T, Ogura T, et al. M phase-specific expression and phosphorylation-dependent ubiquitination of the CIC-2 channel[J]. J Biol Chem, 2002, 277(35): 32268 - 32273.
- [10] Furukawa T, Ogura T, Zheng YJ, et al. Phosphorylation and functional regulation of CIC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase[J]. J Physiol, 2002, 540(Pt 3): 883 - 893.

(收稿日期:2006-03-20)