

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.013

· 基础研究 ·

高表达 GRIM-19 诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡

王桂华, 罗学来, 孙黎, 邓豫, 王坤, 李兆明, 李小兰, 陶德定, 胡俊波, 龚建平(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胃肠外科中心, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 研究干扰素/维甲酸诱导死亡基因(retinoid-interferon-induced mortality, GRIM-19)对结肠癌 SW480 细胞凋亡的影响。方法: 构建 GRIM-19 真核表达载体(pCMV-Flag-GRIM-19), 转染入 SW480 细胞中, Western blotting 检测 GRIM-19 及凋亡相关蛋白 Bcl-xl 的表达, 采用 Annexin-V/PI 和线粒体膜电位 JC-1 染色检测 SW480 细胞的凋亡。结果: 成功构建 pCMV-Flag-GRIM-19 真核表达载体。pCMV-Flag-GRIM-19 质粒转染 SW480 细胞后, GRIM-19 的表达上调, 凋亡抑制蛋白 Bcl-xl 的表达则下调。转染空质粒 pCMV-Flag 组 SW480 细胞凋亡率为(7.7 ± 1.39)%, 转染 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒后 SW480 细胞凋亡率为(15.0 ± 2.52)% ($P < 0.05$)。线粒体膜电位检测显示转染空质粒 pCMV-Flag 组 SW480 细胞膜电位降低细胞为(7.5 ± 2.09)%, 而转染 pCMV-Flag-GRIM-19 后细胞线粒体膜电位降低细胞为(17.5 ± 3.07)% ($P < 0.05$)。结论: GRIM-19 体外转染可有效诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡。

[关键词] 结肠肿瘤; GRIM-19; 凋亡; Annexin-V/PI; 线粒体膜电位

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0067-04

Grim-19 overexpression induces apoptosis of colon cancer SW480 cells

WANG Gui-hua, LUO Xue-lai, SUN Li, DENG Yu, WANG Shen, LI Zhao-ming, LI Xiao-lan, TAO De-ding, HU Jun-bo, GONG Jian-ping (Department of Gastrointestinal Surgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of retinoid-interferon-induced mortality (GRIM-19) gene on the apoptosis of colon cancer. **Methods:** A GRIM-19 eukaryotic expression vector (pCMV-Flag-GRIM-19) was constructed and transfected into SW480 cells. Expressions of GRIM-19 and apoptosis-related proteins were detected by Western blotting analysis. Apoptosis of SW480 cells was measured by Annexin-V/PI assay and mitochondrial membrane potential JC-1 staining. **Results:** The GRIM-19 eukaryotic expression vector pCMV-Flag-GRIM-19 was successfully constructed. Expression of GRIM-19 in SW480 cells was up-regulated and that of apoptosis-related protein Bcl-xl was down-regulated after transfection with pCMV-Flag-GRIM-19. Apoptosis rate was (7.7 ± 1.39)% in SW480 cells transfected with pCMV-Flag empty vector and (15.0 ± 2.52)% in pCMV-Flag-GRIM-19 transfected cells ($P < 0.05$). Mitochondrial membrane potential was decreased in (7.5 ± 2.09)% of pCMV-Flag transfected cells and (17.5 ± 3.07)% of pCMV-Flag-GRIM-19 transfected cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** *In vitro* GRIM-19 transfection can effectively induce apoptosis of colon cancer SW480 cells.

[Key words] colon cancer; GRIM-19; apoptosis; Annexin-V/PI; mitochondrial membrane potential

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 67-70]

结肠癌是西方国家癌症发病率和病死率居第 2 位的恶性肿瘤, 结肠癌流行病学显示我国的发病率亦呈逐年上升的趋势。结肠癌主要采用以手术治疗为主的综合治疗, 但许多患者仍有较高的复发率, 寻找结肠癌治疗的新方法或提高现有治疗方法的疗效成为目前结肠癌治疗研究的热点。研究^[1-4]表明, 干扰素- β (interferon- β , IFN- β) 和全反式维甲酸 (retinoic acid, RA) 通过调节干扰素/维甲酸诱导死

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30471673, 30872472, 30800569); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2009CB521802)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471673, 30872472, 30800569), and the Major State Basic Research Development Program (973) of China (No. 2009CB521802)

[作者简介] 王桂华(1981 -), 男, 安徽省阜阳县人, 博士研究生, 主要从事胃肠肿瘤分子生物学研究

[通信作者] 胡俊波 (HU Jun-bo, corresponding author), E-mail: jibhu@tjh.tjmu.edu.cn

亡(retinoid-interferon-induced mortality, GRIM-19)基因的表达式来发挥作用。GRIM-19 是 GRIM 基因家族的一种, 编码相对分子质量 16 000 的蛋白, 可以与 STAT3(signal transduction and activators of transcription 3)结合, 调节 STAT3 下游基因的表达式, 诱导细胞凋亡^[5-6]。有研究显示, 在乳腺癌细胞系 MCF-7 中过表达 GRIM-19 可以有效地诱导细胞凋亡^[4], 本研究将 GRIM-19 基因导入结肠癌细胞系中, 观察其对结肠癌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和器材

含目的基因 GRIM-19 的 pCXN2-myc-GRIM-19 质粒、空质粒 pCMV-Flag、抗鼠 GRIM-19 多克隆抗体由美国马里兰大学 Greenebaum 肿瘤中心 Kalvakolanu 教授惠赠。脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, BamH I、Hind III 酶和 T4 连接酶购自 NEB 公司, 质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。FITC 荧光标记的二抗购自丹麦 Dako 公司, Annexin-V/PI 试剂盒和线粒体膜电位 JC-1 检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。结肠癌 SW480 细胞株为本室传代培养。FACS 流式细胞仪为美国 Becton Dickson 公司产品。

1.2 pCMV-Flag-GRIM-19 载体的构建

从 Genebank 检索出 GRIM-19 序列, 设计引物。上游引物 5'-CCAAGCTTATGCGGCGTCAAAGGTGA-3', 下游引物 5'-CGGGATCCTACGTGTACCA-CATGAAGCCG-3'(下划线处分别为 Hind III 和 BamH I 的酶切位点)。以质粒 pCXN2-myc-GRIM-19 为模板, PCR 反应体积为 50 μ l, 其中含 10 mmol/L dNTP 2 μ l, 5'和 3'引物各 50 pmol/L, Pfu DNA 聚合酶 0.25 U, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 40 s、94 $^{\circ}$ C 30 s、63 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环。反应结束后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 Qiagen 胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。将纯化的 PCR 产物与酶切后的 pCMV-Flag 载体连接, 连接产物命名为 pCMV-Flag-GRIM-19, 常规转化感受态细菌, 氨苄青霉素抗性的 LB/X-gal 平板筛选阳性克隆, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑选白色菌落扩增, 使用 Promega 公司小提质粒试剂盒提取质粒。BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳。酶切鉴定的阳性克隆送至上海 Invitrogen 公司测序。

1.3 脂质体介导质粒转染 SW480 细胞

结肠癌 SW480 细胞在含 10% 小牛血清和抗生

素的 DMEM/F-12 培养基中常规培养, 取对数生长期细胞转入 6 孔板, 加入含 10% 小牛血清而无抗生素的培养基继续培养, 待细胞长至融汇度为 40% 左右时, 用无血清、无抗生素的 DMEM 培养基进行转染。转染步骤按说明书进行, 先将 3 μ g 的质粒 DNA 稀释于 250 μ l 培养基中, 再将 8 μ l 的 Lipofectamine 2000 稀释于 250 μ l 培养基中, 4~5 min 后将二者混合, 混匀后室温放置 20 min。更换待转染细胞的培养基为无血清、无抗生素的培养基, 加入 DNA 和 Lipofectamine 2000 的混合物, 培养 5 h 后更换培养基为含 10% 小牛血清而无抗生素的培养基, 继续培养至 120 h, 收集细胞做后续检测。

1.4 Western blotting 检测转染后 SW480 细胞中 GRIM-19 的表达式

用 0.25% 胰蛋白酶消化转染后 SW480 细胞, 收集 0.5×10^7 细胞, 用冷 PBS 洗 2 次, 加入 100 μ l RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, $12\,000 \times g$, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, 加入 100 μ l 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存待检。待测蛋白在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶封闭非特异性抗体, 然后加入 1:1 000 抗鼠 GRIM-19 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日用 TEST 洗 3 次后再分别加入 1:5 000 的 HRP 标记的抗鼠和抗兔二抗, 室温孵育 2 h, TEST 洗 3 次后 ECL 显色。

1.5 Annexin-V/PI 和线粒体膜电位 JC-1 染色检测细胞凋亡

0.25% 胰蛋白酶消化(不含 EDTA)收集转染 120 h 后 SW480 细胞, PBS 洗 1 次, 进行 Annexin-V/PI 和线粒体膜电位 JC-1 染色后, 流式细胞仪分析 SW480 细胞凋亡及线粒体膜电位变化, 具体染色步骤按 Annexin-V/PI 试剂盒和线粒体膜电位 JC-1 染色试剂盒说明进行。

1.6 统计学处理

各实验均重复 3 次, 取其平均值, 数据以 $\bar{x} \pm s$, 采用 SPSS 13.0 软件分析实验数据, 比较组间差异。

2 结果

2.1 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒的构建和鉴定

图 1 为构建的 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒经核酸内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切、PCR 扩增后目的片段的电泳图, 双酶切后能看到约 452 bp 的目的基因条带。提取的质粒 pCMV-Flag-Grim19 做 PCR 扩增鉴定, 可以看出目的基因被正确构建在质粒中; 阳性质粒送 Invitrogen 公司测序, 结果显示插入序列与目的基因的核苷酸序列一致(结果未列出)。

2.2 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒转染对 SW480 细胞中 GRIM-19 和 Bcl-xl 蛋白表达的影响

转染空质粒 pCMV-Flag 和 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒后 60 h 收集 SW480 细胞,提取细胞蛋白后 Western blotting 分析细胞中 GRIM-19 及凋亡相关蛋白表达情况。结果(图 2)显示,转染 pCMV-Flag-GRIM-19 组细胞中 GRIM-19 表达增高,同时可以检测到其中 Flag 的表达,且转染 pCMV-Flag-GRIM-19 的 SW480 细胞中凋亡抑制蛋白 Bcl-xl 的表达降低。

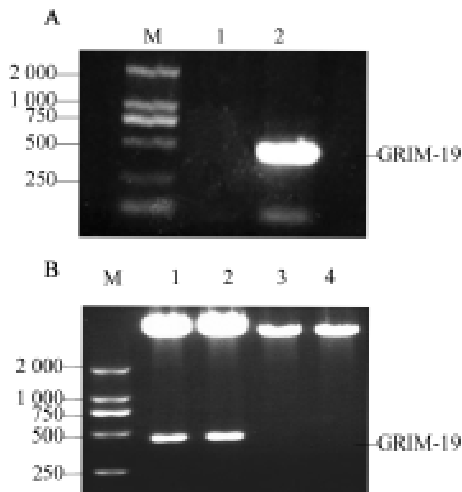


图 1 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒的 PCR(A)和酶切(B)鉴定
Fig. 1 Identification of pCMV-Flag-GRIM-19 plasmid by PCR and restriction endonuclease digestion

A, M: Marker; 1: pCMV-Flag; 2: pCMV-Flag-GRIM-19
B, M: Marker; 1: pCMV-Flag-GRIM-19; 2: pCMV-Flag-GRIM-19
3: pCMV-Flag; 4: pCMV-Flag

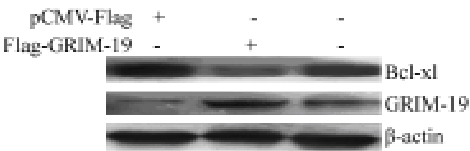


图 2 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒转染后 SW480 细胞中 GRIM-19 和 Bcl-xl 的表达情况
Fig. 2 Expression of GRIM-19 and Bcl-xl in SW480 cells after transfection with pCMV-Flag-GRIM-19 plasmid

2.3 pCMV-Flag-GRIM-19 转染促进 SW480 细胞凋亡

转染 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒 60 h 后收集 SW480 细胞,活细胞以 Annexin-V/PI 法和线粒体膜电位 JC-1 染色,染色后流式细胞仪分析细胞凋亡及线粒体膜电位变化情况。结果(图 3A)显示,转染 pCMV-Flag 组细胞凋亡率为(7.7 ± 1.39)%,而转染 pCMV-Flag-Grim-19 后 SW480

细胞凋亡率为(15 ± 2.52)%。线粒体膜电位 JC-1 检测结果(图 3B)显示,转染空质粒 pCMV-Flag 组细胞膜电位阴性细胞率为(7.5 ± 2.09)%,而转染 pCMV-Flag-Grim19 后 SW480 细胞线粒体膜电位阴性细胞率为(17.5 ± 3.07)%。因此,与空质粒 pCMV-Flag 转染组相比,转染 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒后 SW480 细胞凋亡明显增多,线粒体膜电位降低。

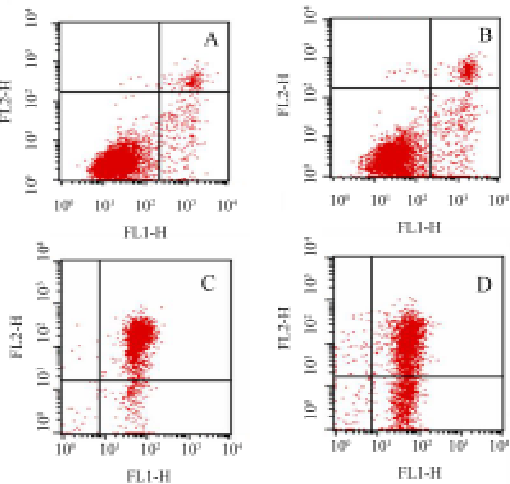


图 3 pCMV-Flag-GRIM-19 质粒转染诱导 SW480 细胞凋亡
Fig. 3 pCMV-Flag-GRIM-19 plasmid transfection induced apoptosis of SW480 cells

A: pCMV-Flag, Annexin-V/PI; B: pCMV-Flag-GRIM-19 Annexin-V/PI; C: pCMV-Flag, JC-1 staining; D: pCMV-Flag-GRIM-19, JC-1 staining

3 讨论

信号转导与激活因子 3(signal transduction and activators of transcription 3, STAT3)是近年来发现的癌基因,作为 STAT 家族的重要成员,在生长因子和细胞因子等刺激下被酪氨酸酶激活后迅速转入核内,结合于特定靶基因的启动子上,启动相应靶基因的转录^[7-9]。在正常组织细胞中,STAT3 的激活表现为严密调控的瞬时激活模式,以防止过度激活;而在恶性肿瘤细胞中 STAT3 的激活模式发生了显著改变,具体表现为 STAT3 异常表达和/或 STAT3 信号转导通路持续激活^[10-12]。STAT3 通路调控异常与肿瘤发生、发展密切相关。已有研究^[13-15]表明持续激活的 STAT3 可调节某些与细胞增殖、分化及凋亡密切相关的靶基因(如凋亡抑制基因 *Bcl-xl*, 细胞周期调节基因 *Cyclin-D1/D2*, *c-myc*, *CDC-2* 等)的表

达而促进肿瘤细胞的增殖、抑制细胞凋亡等过程。正是由于 STAT3 的上述重要调控作用, 其已作为研发肿瘤治疗药物的新的分子靶点^[8,16]。GRIM-19 是 STAT3 的抑制蛋白, 与 STAT3 特异性结合, 抑制 STAT3 相关的靶基因转录及表达^[17]。研究^[18-20]显示牛 GRIM-19 是牛线粒体复合物 I 的亚单位, GRIM-19 同线粒体膜电位的稳定性密切相关, 这些重要发现提示 GRIM-19 参与了线粒体诱导的细胞凋亡途径, 并在细胞凋亡机制中起着重要的作用。

本研究通过在结肠癌 SW480 细胞表达外源性 GRIM-19, 检测 GRIM-19 对结肠癌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响, 结果提示, GRIM-19 能够有效地诱导细胞凋亡, 对凋亡相关蛋白的表达有显著影响。通过进一步线粒体膜电位检测提示, GRIM-19 能够明显地降低线粒体膜电位, 结果提示 GRIM-19 参与了线粒体诱导的细胞凋亡途径。GRIM-19 作为一种特异性 STAT3 抑制蛋白, 可通过抑制 STAT3 的活性而影响下游蛋白的表达, 诱导细胞凋亡, 但具体作用机制尚待进一步阐明。本研究证实过表达 GRIM-19 抑制 STAT3 的功能将是一种有效的干预肿瘤生长的手段, 为以 STAT3 为靶点的肿瘤基因治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Lufei C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT, *et al.* GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses STAT3 activity via functional interaction [J]. *EMBO J*, 2003, 22 (6): 1325-1335.
- [2] Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, *et al.* GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19): 8447-8456.
- [3] Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33416-33426.
- [4] Chidambaram NV, Angell JE, Ling W, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Chromosomal localization of human GRIM-19, a novel IFN-beta and retinoic acid-activated regulator of cell death [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(7): 661-665.
- [5] Kalakonda S, Nallar SC, Lindner DJ, Hu J, Reddy SP, Kalvakolanu DV. 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.
- [6] Sun P, Nallar SC, Kalakonda S, Lindner DJ, Martin SS, Kalvakolanu DV. GRIM-19 inhibits v-Src-induced cell motility by interfering with cytoskeletal restructuring [J]. *Oncogene*, 2009, 28 (10): 1339-1347.
- [7] Levy DE, Danell JE. STATs: transcriptional control and biological impact [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 651-662.
- [8] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 798-809.
- [9] Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship [J]? *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1171: 59-76.
- [10] Chen Z, Han ZC. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis [J]. *Med Res Rev*, 2008, 28(2): 185-200.
- [11] 马向涛, 王 杉, 叶颖江, 杜如昱, 崔志荣. STAT3 及其靶基因产物与结直肠癌恶性程度关系的研究 [J]. *癌症*, 2003, 22 (11): 1135-1139.
- [12] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, *et al.* Targeted inhibition of STAT3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 4138-4143.
- [13] Turkon J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery [J]. *Oncogene*, 2000, 19(56): 6613-6626.
- [14] Devarajan E, Huang S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases [J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(5): 626-633.
- [15] Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1653-1655.
- [16] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention [J]. *Clinical Cancer Res*, 2002, 8(4): 945-954.
- [17] Zhang J, Yang J, Roy SK, Tininini S, Hu J, Bromberg JF, *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.
- [18] Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE, Hirst J. GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial nadh: ubiquinone oxidoreductase (complex i) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38345-38348.
- [19] Lu H, Cao X. GRIM-19 is essential for maintenance of mitochondrial membrane potential [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 1893-1902.
- [20] Máximo V, Lima J, Soares P, Silva A, Bento I, Sobrinho-Simões M. GRIM-19 in health and disease [J]. *Adv Anat Pathol*, 2008, 15(1): 46-53.

[收稿日期] 2009 - 10 - 25

[修回日期] 2009 - 12 - 21

[本文编辑] 徐红梅