

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.12.003

GRIM-19 的表达对人宫颈癌细胞移植瘤生长的影响

程 勇¹, 卫 莹², 李 敏², 周 颖², 冯定庆², 肖卫华³, 凌 斌²

Effects of GRIM-19 on Growth of Cervical Cancer Cell Xenograft Tumor

CHENG Yong¹, WEI Ying², LI Min², ZHOU Ying², FENG Ding-qing², XIAO Wei-hua³, LING Bin²

1. Department of Oncological Radiotherapy, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China, 2. Anhui Province Key Laboratory of Molecular Medicine, Molecular laboratory of Department of Obstetrics and Gynecology, 3. Institute of Immunology, University of Science & Technology of China

Corresponding Author: LING Bin, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

Abstract: Objective To explore the effects of GRIM-19 expression on the growth of cervical cancer *in vivo* and its mechanisms. **Methods** GRIM-19 gene expression was investigated at mRNA and protein levels by RT-PCR and Western blot. Tumor growth of the null mice was analyzed after injection HeLa/control, HeLa/GRIM-19 into the skin. The protein level of Ki-67 was inspected with immunohistochemistry methods. **Results** The growth of HeLa/GRIM-19 implanted tumor slowed down significantly ($P < 0.01$). The expression of GRIM-19 mRNA was up-regulated, while STAT3, cyclin B1, Bcl-L2 mRNA were decreased in tumors bearing HeLa/GRIM-19. The protein level of STAT3, p-STAT3, suvivin, ki-67 was reduced too; while the expression of GRIM-19 was increased by protein test. **Conclusion** The expression of GRIM-19 can slow down the proliferation of cervical cancer cells, suggesting that GRIM-19 may be a new target for the treatment of cervical cancer.

Key words: GRIM-19; Transfection; Cervical cancer

摘要:目的 探讨 GRIM-19 对宫颈癌细胞株 HeLa 增殖行为的影响及其机制。**方法** 采用 RT-PCR 和 Western blot 检测基因的 mRNA 和蛋白水平表达情况。将 HeLa/control、HeLa/GRIM-19 接种到裸鼠皮下检测荷瘤情况,利用免疫组织化学法检测 Ki-67 的表达。**结果** HeLa/GRIM-19 细胞接种肿瘤生长速度明显减慢 ($P < 0.01$)。移植瘤的 RT-PCR 结果:GRIM-19 表达升高,而其下游基因 STAT3、Cyclin B1、Bcl-L2 的表达降低;蛋白检测发现 STAT3、p-STAT3、suvivin、Ki-67 基因的表达均下降,GRIM-19 表达升高。**结论** GRIM-19 的表达可以抑制宫颈癌细胞的增殖,可能是宫颈癌治疗的新靶点。

关键词: GRIM-19; 转染; 宫颈癌

中图分类号:R737.33 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)12-1343-03

0 引言

GRIM-19 是 GRIMs (genes associated with retinoid-IFN-induced mortality, GRIM) 家族成员之一,定位于 19p13.2,该区的多种基因为前列腺癌的抑制基因^[1]。GRIM-19 在多种正常组织中表达,参

与 IFN/RA 诱导的肿瘤细胞凋亡,推测很可能是抑癌基因^[2]。本课题组的前期研究发现 GRIM-19 的表达可以抑制宫颈癌细胞株的体外增殖^[3],为探讨 GRIM-19 在妇科肿瘤发病机制中的作用,本课题组将稳定表达 GRIM-19 的宫颈癌细胞株接种到裸鼠皮下,体内试验探讨该基因的表达对宫颈癌细胞增殖行为的影响。

1 材料方法

1.1 主要试剂

Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;上、下游引物由上海生工合成。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司,DEPC 购自 Sigma 公司。GRIM-19 抗体(鼠抗

收稿日期:2009-07-07;修回日期:2010-02-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072127, 81001168);安徽省自然科学基金资助项目(090413117);安徽省高等学校省级自然科学基金资助项目(KJ2010B375)

作者单位:1. 230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院肿瘤放疗科,2. 妇产科分子实验室 安徽省分子医学重点实验室;3 中国科技大学免疫所

通信作者:凌斌, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

作者简介:程勇(1975-),男,主治医师,硕士在读,主要从事肿瘤放射治疗机制的研究

人单抗)、STAT3 均由美国马里兰大学肿瘤研究中心 Dhan V. Kalvakolanu 教授惠赠。p-STAT3、survivin 购自 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞株

HeLa/control、HeLa/GRIM-19 细胞株由本室构建^[3], 细胞培养液 DEME、新生小牛血清购自 GIBCOL 公司。培养液均含有 100mg/L 的氨苄青霉素和链霉素, 37°C 5%CO₂ 饱和湿度下培养。

1.3 实验动物

BALB/c 系雌性裸鼠(10 只, 4~6 周龄, 质量 16~18 g), 购自上海实验动物中心。

1.4 RT-PCR

提取细胞的总 RNA, 取定量好的 RNA 1 μg, 根据 Promega 反转录试剂盒的步骤合成 cDNA, 将以 cDNA 产物稀释 5 倍。取 5 μl 做模板, 以此做模板进行 PCR 反应, 扩增产物在 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。引物序列见表 1。

1.5 Western blot

细胞总蛋白(每组 20μg)经 12% SDS-PAGE 胶分离后, 电转至 PVDF 膜上。经封闭后室温培养一抗 2h, TBST 洗后加入相应的二抗培养 1h, 膜经 TBS-T 洗后与 ECL 发光检测剂结合, 经 X 线片压片曝光, 显示结果。

1.6 动物实验

将细胞 1×10⁷ 接种到 BALB/c 裸鼠背部皮下, 每只裸鼠接种细胞, 注射体积为 0.1ml, 各接种裸鼠 5 只。注射后每周观察肿瘤生长状况, 肿瘤分别在 10、20、30、40、50 天测量: 用游标卡尺测量肿瘤三个方向的直径, 分别记为 a、b、c, 按公式 $V = \pi abc/6$ 计算瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。

1.7 免疫组织化学

Ki-67 的检测采用兔抗人单克隆抗体、免疫组织化学两步法检测试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自中衫生物技术有限公司, 切片 4μm 厚, 采用免疫组织化学二步法, DAB 显色。

1.8 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计学软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异统计学意义采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 动物生长曲线

细胞接种后 10、20、30、40、50 天进行肿瘤体积测量, 发现接种 HeLa/GRIM-19 细胞实验组的瘤体积明显小于 HeLa/control 组, 见图 1。说明通过稳定转染 GRIM-19 基因后, 肿瘤的生长速度明显减慢 ($P < 0.01$)。

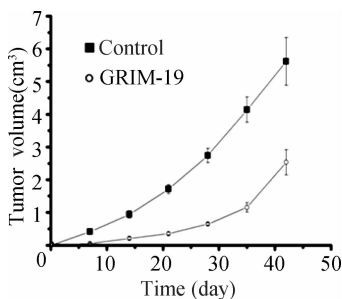


图 1 接种裸鼠肿瘤生长曲线
Figure 1 Tumor growth curves of the planted nude mice

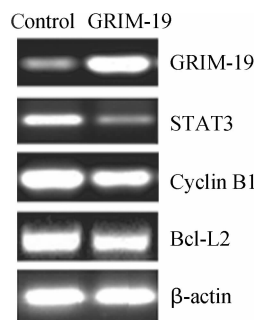


图 2 RT-PCR 检测 GRIM-19 及 STAT3 下游基因的表达
Figure 2 RT-PCR results of GRIM-19, STAT3 and the downregulated genes

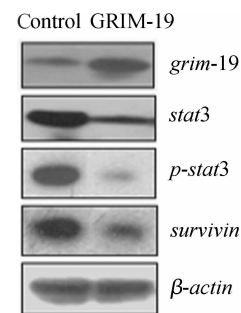


图 3 Western blot 检测 GRIM-19、stat3、p-stat3、survivin 的表达
Figure 3 Western blot of the expression of GRIM-19, stat3, p-stat3 and survivin

表 1 引物设计序列

Table 1 Sequences of designed primers

Transcript	Primer sequence	Product size(bp)
GRIM-19	Fwd: 5'- ACCGGAAGTGTGGGATACTG -3' Rev: 5'- GCAAGTCCGTTTGTAGTCG -3'	194
Beta-actin	Fwd: 5'-TGCTGGCAGCCCTTTC-3' Fwd: 5'-GCGCAGCCCTCCAAGAA-3'	500
STAT3	Fwd: 5'- TTGCCAGTTGTGGTGATC -3' Rev: 5'- AGAACCCAGAAGGAGAAGC -3'	317
Cyclin B1	Fwd: 5'-GGAACATCTGGATGTGCACCTGC-3' Fwd: 5'-GGATGGCTCTCATGTTCCAG-3'	223
BCL2-L1	Fwd: 5'-GCTGGTGGTTGACTTCTCTC-3' Fwd: 5'-CATCCAAACTGCTGCTGTG-3'	208

2.2 RT-PCR 检测接种肿瘤中 GRIM-19 及其下游基因的表达

将接种肿瘤剥离并提取 RNA, RT-PCR 检测发现, 与对照组相比, HeLa/GRIM-19 移植瘤中 GRIM-19 的表达显著升高, 而其下游基因 STAT3、Cyclin B1、Bcl-L2 的表达降低, 见图 2。

2.3 Western blot 检测接种肿瘤中 GRIM-19 及其下游基因的表达

将接种肿瘤剥离并提取蛋白检测发现, 与对照组相比, HeLa/GRIM-19 移植瘤中 GRIM-19 的表达显著升高, 而其下游基因 STAT3 的表达降低, p-STAT3 的表达也显著下降, STAT3 下游调控基因 survivin 也表达下调, 见图 3。

2.4 免疫组织化学检测 Ki-67 的表达

将接种肿瘤剥离经固定组织切片检测 Ki-67 的表达情况发现, 与对照组相比, HeLa/GRIM-19 移植瘤中 Ki-67 的表达显著降低, 见图 4。

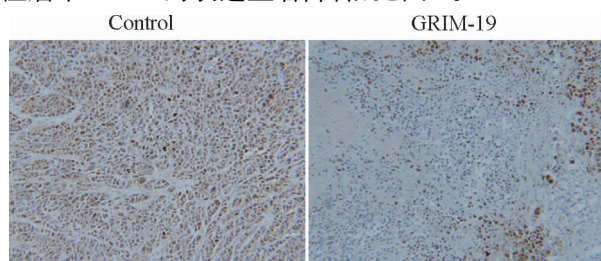


图 4 免疫组织化学检测组织切片中 Ki-67 的表达(DAB)
Figure 4 Immunohistochemistry detection of the expression of Ki-67 in tissue slides(DAB)

3 讨论

目前认为 GRIM-19 基因参与细胞增殖、凋亡的调控过程, 该基因表达的降低或者位点的突变可以导致细胞的异常增殖和恶性转化。GRIM-19 参与调控该家族的 STAT3 的活性, 而与 STAT1、STAT5 的活性无关^[4]。STAT3 在许多肿瘤中处于持续激活状态, 在肿瘤的抗凋亡机制中起着重要作用, 被认为是肿瘤治疗的新靶点。GRIM-19 则被认为是 STAT3 表达和激活的阴性调节子^[5-7]。肾癌、前列腺癌、结直肠癌组织中均发现 GRIM19 的表达降低, 对 STAT3 的抑制作用减弱, 使得 STAT3 下游抗凋亡基因大量表达^[8-9]。本课题组前期发现稳定表达 GRIM-19 的宫颈癌细胞株中 STAT3 的表达明显降低, 体外细胞的增殖行为也显著受抑制^[3]。

本研究结果也发现, 稳定表达 GRIM-19 的细胞株所形成的移植瘤生长速度明显小于对照组。许多研究发现, GRIM-19 表达的降低将显著增加机体患肿瘤的概率。本研究结果提示 GRIM-19 表达的升高将有助于改变宫颈癌的恶性生物学行为。

2007 年 Chen 等^[10]首次报道了 STAT3 在宫颈

癌和子宫内膜癌中持续性激活状态, STAT3 的持续性激活上调了其下游的抗凋亡基因 Bcl-xL、survivin、Mcl-1 等的表达, 抑制了肿瘤细胞的凋亡。而本研究结果也表明, 移植瘤中 STAT3、cyclin B1、Bcl-L2 的表达均受到抑制; 提取蛋白检测, 发现 p-STAT3、survivin 表达均下降, 提示 GRIM-19 表达的升高可能是通过抑制 STAT3 的表达、尤其是抑制 p-STAT3 的表达而抑制肿瘤的生长。

免疫组织化学的结果发现, GRIM-19 稳定表达的移植瘤组织切片中 Ki-67 的表达显著降低, 表明 GRIM-19 蛋白的表达具有抑制宫颈癌细胞增殖的功能。Ki-67 是主要表达于增殖期细胞中的核抗原, 是反映细胞群体增殖活性的可靠指标。研究还表明, Ki-67 的表达与肿瘤的恶性程度及预后有关、在恶性肿瘤侵袭、转移过程中起重要作用^[11]。因此, GRIM-19 的表达具有抑制细胞增殖的作用, 该基因功能的进一步探讨将可能为宫颈癌的治疗提供新的靶点和研究方向。

参考文献:

- [1] Kalvakolanu DV. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15 (2-3): 169-194.
- [2] Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, et al. 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.
- [3] 彭程, 周颖, 李敏, 等. 稳定表达 GRIM-19 的 HeLa 细胞株的建立及其对 STAT3 的抑制作用[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24 (10):1406-1409.
- [4] 周颖, 凌斌. GRIM-19 的功能及与肿瘤的相关性[J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(3):262-264.
- [5] Kalakonda S, Nallar SC, Lindner DJ, 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.
- [6] Lufe 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.
- [7] Zhang J, Yang J, Roy SK, 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.
- [8] Alchanati I, Nallar SC, Sun P, et al. A proteomic analysis reveals the loss of expression of the cell death regulatory gene GRIM-19 in human renal cell carcinomas[J]. Oncogene, 2006, 25(54):7138-7147.
- [9] Gong LB, Luo XL, Liu SY, et al. Correlations of GRIM-19 and its target gene product STAT3 to malignancy of human colorectal carcinoma[J]. Ai Zheng, 2007, 26(7):683-687.
- [10] Chen CL, Hsieh FC, Lieblein JC, et al. Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers[J]. Br J Cancer, 2007, 96 (4):591-599.
- [11] 李智, 段建敏. Ki-67 与恶性肿瘤预后的相关性[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(6): 312-313.

[编辑:安 凤;校对:周永红]