

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.04.010

## *PDCD4* 基因在胶质瘤细胞系的稳定表达及其对肿瘤细胞生长的影响

张霞, 王晓燕, 高琦, 高飞, 张利宁\* (山东大学医学院免疫研究所, 山东济南 250012)

**[摘要]** 目的: 建立稳定表达程序性死亡4基因(*programmed cell death 4*, *PDCD4*)的人神经胶质瘤 U251 细胞系, 观察 *PDCD4* 基因对人神经胶质瘤细胞增殖及细胞周期的影响。方法: 将构建好的携带 *PDCD4* 重组真核表达载体 pEGFP-*PDCD4* 转染 U251 细胞, 经过 G418 筛选获得稳定细胞系; 用 RT-PCR 及 Western blotting 检测 *PDCD4* mRNA 和蛋白的表达情况, 通过锥虫蓝染色活细胞计数法及克隆形成实验检测外源 *PDCD4* 转染对细胞增殖和克隆形成能力的影响, 以流式细胞术检测细胞周期。结果: 成功建立稳定表达 *PDCD4* 的胶质瘤细胞 U251-*PDCD4*。未转染的 U251 及空载体转染的 U251 细胞均不表达 *PDCD4*, 而 pEGFP-*PDCD4* 转染的 U251-*PDCD4* 细胞表达高水平的 *PDCD4* mRNA 和蛋白质; 转染 *PDCD4* 基因的细胞生长速度明显减慢 ( $P < 0.01$ ), 克隆形成率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 细胞周期检测显示, 转染 *PDCD4* 的细胞较其他两对照组细胞 S 期升高、G<sub>2</sub>/M 期明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论: *PDCD4* 通过干扰细胞周期明显抑制胶质瘤 U251 细胞的细胞增殖及克隆形成能力。

**[关键词]** 程序性死亡4基因; 神经胶质瘤; 转染; 细胞周期; 细胞增殖

**[中图分类号]** R739.41; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2008)04-0347-04

## Stable expression of programmed cell death 4 gene in glioma cell line and its influence on proliferation of tumor cells

ZHANG Xia, WANG Xiao-yan, GAO Qi, GAO Fei, ZHANG Li-ning\* (Institute of Immunology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a glioma cell line U251 stably expressing programmed cell death 4 (*PDCD4*) gene, and to observe the influence of exogenous *PDCD4* gene on the proliferation and cell cycle of U251 cells. **Methods:** Recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-*PDCD4* was transfected into human glioma cell line U251 by Lipofectamine 2000, and the U251 cells stably expressing *PDCD4* were established by G418 selection. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were employed to detect the expression of *PDCD4* mRNA and protein. Furthermore, cell proliferation and colony forming ability were determined by cell counting and colony formation assay; the cell cycle was detected by FACS. **Results:** High expression of *PDCD4* mRNA and protein was observed in U251 cells transfected with pEGFP-*PDCD4*, whereas no *PDCD4* mRNA and protein expression was detected in the non-transfected and vector-transfected cells. Further, cells transfected with pEGFP-*PDCD4* grew more slowly and had lower colony formation rate than cells of the other two control groups ( $P < 0.01$ ). Moreover, transfection of *PDCD4* significantly reduced the number of cells at the G<sub>2</sub>/M phase and increased the cells at the S phase ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tumor suppressor gene *PDCD4* can effectively inhibit cell proliferation and colony formation by altering their cell cycle.

**[Key words]** programmed cell death 4 gene (*PDCD4*); glioma; transfection; cell cycle; cell proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 347-350]

程序性死亡4基因(*programmed cell death 4*, *PDCD4*)是近年来新发现的抑癌基因, 可通过抑制蛋白转录和翻译过程而抑制肿瘤细胞的生长。近来, 在肺癌<sup>[1]</sup>、结肠癌<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>等恶性肿瘤中检测到 *PDCD4* 表达的下调甚至缺失, 并且来自肺癌<sup>[1]</sup>、结肠癌<sup>[2]</sup>的研究还显示 *PDCD4* 表达的下调甚至缺失与肿瘤的进展和患者的预后密切相关。

此前, 本课题组发现 *PDCD4* 在人胶质瘤细胞系 U251 和近 80% 的人神经胶质瘤组织标本中表达缺失<sup>[4]</sup>, 提示 *PDCD4* 在神经胶质瘤中可能发挥重要

作用。本研究拟将 *PDCD4* 基因转染 U251 细胞系, 建立稳定表达 *PDCD4* 的神经胶质瘤细胞模型, 观察

**[基金项目]** 山东省中青年科学家科研奖励基金 (No. 2006BS03064); 中国博士后科学基金 (No. 2006BS03064)。Supported by the Scientific Research Foundation for Outstanding Young Scientists of Shandong Province (No. 2006BS03064); Chinese Postdoctoral Science Foundation (No. 20070411096)。

**[作者简介]** 张霞 (1983-), 女, 山东省烟台市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: zhangxiahui1983@yahoo.com.cn

\* Corresponding author. E-mail: zhang\_lining@hotmail.com

*PDCD4* 对神经胶质瘤细胞生长的影响及探讨其潜在的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

质粒抽提试剂盒(Qiagen Plasmid Midi)由 Qiagen 公司生产, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, PCR 试剂盒购自 TIANGEN 公司, DL2000 购自 TAKARA 公司, Lipofectamine™2000 及 Trizol 购自 Invitrogen 公司。兔抗人 *PDCD4* 多克隆抗体(Cat No. 3975)购自 ProSci Incorporated, Poway(USA)公司, 羊抗兔 IgG(Cat No. 73954)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DAB 试剂盒购自迈新试剂公司。引物使用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由上海博亚公司合成。其余生化试剂均为国产分析纯。

### 1.2 人神经胶质瘤细胞的培养及质粒转染

人神经胶质瘤 U251 细胞由本实验室保存。pEGFP-*PDCD4* 重组表达载体由纽约大学 Afonja O 教授惠赠。U251 细胞贴壁生长于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。转染前一天将细胞用胰酶消化后按  $1.8 \times 10^5$ /ml、每孔 500  $\mu$ l 接种于 24 孔板。次日细胞铺板约 90% 时转染, 转染时改用不含抗生素和血清的 MEM 培养液, 按照脂质体法说明书进行操作, 将 pEGFP-*PDCD4* 质粒转染入 U251 细胞, 并设空载体阴性对照组及空白对照组, 采用 G418(500  $\mu$ g/ml)抗性筛选 20 d, 经有限稀释法, 得到稳定表达 *PDCD4* 的细胞系 U251-PDCD4。

### 1.3 RT-PCR 检测转染后细胞中 *PDCD4* mRNA 的表达

收集空白对照细胞(U251)、稳定转染空载体的细胞(U251-MOCK)、稳定转染 *PDCD4* 的细胞(U251-PDCD4)各约  $1 \times 10^6$  个, 参照 Trizol 试剂说明书的操作抽提 RNA, 用分光光度计测定浓度之后, 用逆转录试剂盒得到 cDNA, 以  $\beta$ -actin 作为内参照, 进行 PCR 扩增。*PDCD4* 上游引物为 5'-CCAAA-GAAAGGTGGTGCA-3', 下游引物为 5'-TGA GG-TACTTCCAGTTCC-3'; PCR 扩增条件为 94 °C 2 min, 94 °C 90 s, 66 °C 90 s, 72 °C 90 s, 72 °C 5 min, 35 个循环。扩增长度为 673 bp。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, UVP 扫描并分析结果。

### 1.4 Western blotting 检测转染后细胞中 *PDCD4* 蛋白的表达

收集 U251、U251-MOCK、U251-PDCD4 各约  $1 \times 10^6$  个细胞, 用细胞裂解液破碎细胞后收集总蛋白, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳完毕后转膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 加入兔抗人 *PDCD4* 多克隆抗体(1:2 000 稀释)及兔抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体

(1:2 000 稀释), 4 °C 过夜, TBST 洗涤 10 min  $\times$  3 次, 加入羊抗兔的二抗(1:2 000)稀释, TBST 洗涤 10 min  $\times$  3 次, DAB 显色 5 min。

### 1.5 锥虫蓝染色活细胞计数法检测细胞增殖

将细胞 U251、U251-MOCK、U251-PDCD4 胰酶消化后, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$ /ml, 500  $\mu$ l/孔接种到 24 孔板, 每种细胞接种 24 个孔, 于 2、3、4、5、6 d 每天消化每种细胞 4 个孔, 锥虫蓝染色进行活细胞计数, 绘制细胞生长曲线。

### 1.6 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

将细胞 U251、U251-MOCK、U251-PDCD4 每孔 5 000 个接种到 6 孔板中, 每 2 d 换 1 次液, 2 周, 弃掉培养液, PBS 洗涤后 10% 甲醛固定, 结晶紫染色 15 min, 弃染色液, PBS 充分洗涤。镜下观察每孔的克隆生长状况, 并计数。

### 1.7 流式细胞术检测 U251 细胞周期

收集 U251、U251-MOCK、U251-PDCD4 细胞各约  $1 \times 10^6$  个, 800  $\times$  g 离心 5 min, 弃上清。用 3 ml PBS 平衡液洗涤 1 次后, 离心弃掉上清。加入多聚甲醛固定 20 min, 800  $\times$  g 离心 5 min, 弃上清。用 3 ml PBS 平衡液洗涤 1 次, 400 目铜网过滤细胞悬液, 800  $\times$  g 离心 5 min 去上清。加入 500  $\mu$ l PI 染液, 4 °C 避光保存 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期变化。

### 1.8 统计学处理

采用 Prism 4.03 统计软件进行统计分析, 用单因素方差分析(ANOVA), 两两比较行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 外源性 *PDCD4* 在胶质瘤 U251 细胞系的稳定表达

将 pEGFP-N1、pEGFP-*PDCD4* 分别转染 U251 细胞系, 同时 U251 细胞作为对照, 48 h 后在荧光显微镜下观察, U251 细胞没有任何荧光, 而在 U251-MOCK 和 U251-PDCD4 细胞中均可以看到绿色荧光(图 1), 由此说明转染成功。

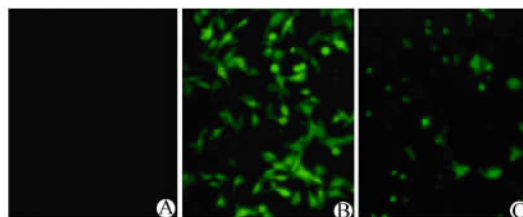


图 1 转染细胞绿色荧光蛋白的表达( $\times 200$ )

Fig. 1 Expression of GFP in transfected cells( $\times 200$ )

A: U251 cells; B: U251-MOCK cells; C: U251-PDCD4 cells

采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞转染

后 RNA 和蛋白质水平 *PDCD4* 的表达。如图 2、图 3 所示, U251 和 U251-MOCK 中没有检测到 *PDCD4* mRNA 和蛋白质的表达, 而 U251-PDCD4 中检测到高水平 *PDCD4* mRNA 和蛋白质的表达, 说明外源性 *PDCD4* 在胶质瘤细胞系中得到了稳定表达。

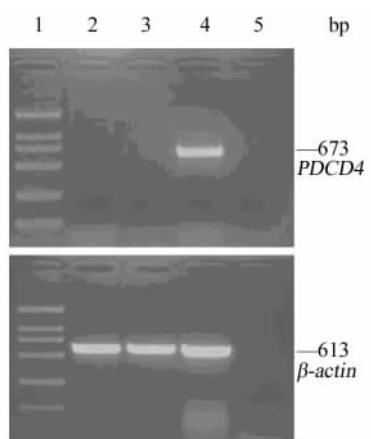


图 2 RT-PCR 检测转染后 U251 细胞 *PDCD4* mRNA 表达

Fig. 2 Expression of *PDCD4* mRNA in U251 cells after transfection by RT-PCR

1: Marker DL2000; 2: U251 cells; 3: U251-MOCK cells; 4: U251-PDCD4 cells; 5: H<sub>2</sub>O (control)

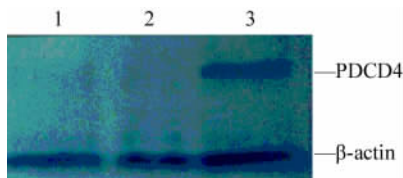


图 3 Western blotting 检测转染后 U251 细胞 *PDCD4* 蛋白表达

Fig. 3 Expression of *PDCD4* protein in U251 cells after transfection by Western blotting

1: U251 cells; 2: U251-MOCK cells; 3: U251-PDCD4 cells

## 2.2 外源性 *PDCD4* 对 U251 细胞增殖的抑制

以锥虫蓝活细胞计数法检测 *PDCD4* 转染对 U251 细胞增殖的影响, 结果发现, *PDCD4* 基因转染组细胞生长明显受到抑制, 且随着培养时间的延长, *PDCD4* 对 U251 细胞的增殖抑制效果逐渐明显; 从第 3 天开始, U251-PDCD4 细胞数目明显少于其余两对照组 ( $P < 0.01$ , 图 4)。

## 2.3 *PDCD4* 对 U251 细胞克隆形成能力的抑制

实验分别将 5 000 个 U251、U251-MOCK 及 U251-PDCD4 细胞接种到 6 孔板中, 培养 2 周后显微镜下观察细胞的克隆形成能力。计数发现, U251-PDCD4 的克隆形成率明显低于空载体转染组

[ (40.63 ± 0.53)% vs (63.49 ± 1.14)% ,  $P < 0.01$  ], 提示 *PDCD4* 表达不仅可以抑制肿瘤的生长, 而且可降低其恶性行为。

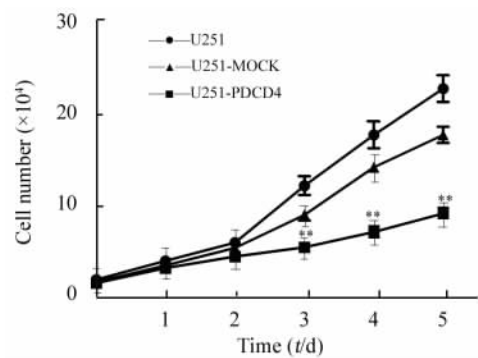


图 4 *PDCD4* 转染对 U251 细胞增殖的抑制作用  
Fig. 4 Inhibitory effect of *PDCD4* transfection on proliferation of U251 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs U251 cells or U251-Mock cells

## 2.4 *PDCD4* 对 U251 细胞周期的影响

以流式细胞术分析 *PDCD4* 表达对细胞周期的影响, 结果显示 U251-PDCD4 细胞 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例为 (4.95 ± 1.11)% , 较空载体组的 (8.71 ± 1.65)% 或未转染组的 (10.40 ± 1.91)% 明显减少 ( $P < 0.05$ ); 而 *PDCD4* 转染组 S 期细胞为 (27.67 ± 2.06)% , 较空载体组的 (21.93 ± 2.66)% 或未转染组的 (19.43 ± 1.25)% 均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 *PDCD4* 的转染使 U251 细胞周期出现 S 期阻滞 (图 5)。

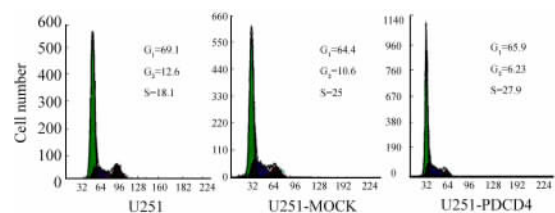


图 5 *PDCD4* 转染后对 U251 细胞周期的影响  
Fig. 5 Effect of *PDCD4* transfection on cell cycle of U251 cells

## 3 讨论

程序性细胞死亡-4 (*PDCD4*) 基因是 1995 年 Shibahara 等在小鼠体内发现的与细胞凋亡有关的基因, 在细胞发生程序性死亡时诱导产生<sup>[5]</sup>。1999 年 Soejima 等<sup>[6-7]</sup>从人胶质瘤细胞的 cDNA 文库中分离出人的 *PDCD4* 基因, 其定位于 10q24, 全长约 3.5 kb, 其中编码区约 1.4 kb。 *PDCD4* 编码蛋白约含

469 个氨基酸,在 *PDCD4* 的氨基侧有两个重要的  $\alpha$  螺旋结构区-MA3,*PDCD4* 通过该功能域与真核细胞翻译起始因子 eIF4A 发生结合,从而抑制核糖体复合物的形成和蛋白质的合成。Cmarik 等<sup>[8]</sup>证实在小鼠表皮细胞 JB6 模型中 *PDCD4* 的表达上调可抑制肿瘤启动子( TPA )诱导的恶性转化;Jansen 等<sup>[9]</sup>在 *PDCD4* 转基因小鼠模型中发现,*PDCD4* 的表达不仅抑制了表皮乳头状瘤的形成,而且降低了表皮乳头状瘤向皮肤癌的恶性转化和皮肤癌的发生率;Hilliard 等<sup>[10]</sup>进一步发现敲除 *PDCD4* 基因后,84% 小鼠产生恶性 B 细胞淋巴瘤。

已经有研究发现在某些人类肿瘤细胞系(如肺癌、肝癌)中,*PDCD4* 可通过诱导肿瘤细胞周期的阻滞,或诱导肿瘤细胞的凋亡,或下调促进血管生成因子的表达抑制肿瘤血管生成等不同机制抑制肿瘤细胞的生长。Brigitte 等<sup>[11]</sup>研究发现 *PDCD4* 发挥作用可能具有细胞特异性。

本课题组在前期研究<sup>[4]</sup>中已经发现 *PDCD4* 在神经胶质瘤组织标本中高频缺失( mRNA 缺失 47%,蛋白缺失 82%),在胶质瘤细胞系 U251 中表达也缺失,提示 *PDCD4* 在神经胶质瘤中可能发挥重要作用。本研究在前期研究的基础上,向神经胶质瘤细胞系 U251 中转染 *PDCD4* 并使其稳定表达,建立了稳定表达 *PDCD4* 的细胞系,为研究 *PDCD4* 的功能建立了很好的细胞模型。研究发现,*PDCD4* 转染不仅可以抑制 U251 的细胞增殖及克隆形成能力,而且会影响 U251 的细胞周期,流式细胞术检测细胞周期发现 S 期升高, G<sub>2</sub>/M 期下降,说明细胞阻滞在 S 期。Goke 等<sup>[12]</sup>实验显示 *PDCD4* 通过上调 p21 的表达抑制有丝分裂启动因子细胞周期蛋白依赖性激酶 1/cdc2 ( CDK1/cdc2 ),从而抑制了肿瘤的恶性转化。这就提示了 *PDCD4* 很有可能通过调控 U251 的细胞周期进而抑制细胞增殖,但确切的机制还有待于进一步研究。

综上所述,本课题成功地将重组 *PDCD4* 基因转染至 U251 细胞,并筛选得到稳定表达 *PDCD4* 的细胞株。细胞表达 *PDCD4* 后,其细胞增殖明显受到抑制,细胞周期 S 期升高, G<sub>2</sub>/M 期下降。实验表明, *PDCD4* 不仅在肿瘤的发生发展中起作用,更有可能成为肿瘤治疗的新靶点,因此进一步研究 *PDCD4* 的确切作用及其作用机制将有非常重要的意义。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, *et al.* Loss of *PDCD4* expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis[ J ]. *J Pathol*, 2003, 200( 5 ): 640-646.
- [ 2 ] Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, *et al.* Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer[ J ]. *Cancer*, 2007, 110( 8 ): 1697-1707.
- [ 3 ] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, *et al.* Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma[ J ]. *Oncogene*, 2006, 25 ( 45 ): 6101-6112.
- [ 4 ] Gao F, Zhang P, Zhou C, *et al.* Frequent loss of *PDCD4* expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma [ J ]. *Oncol Rep*, 2007, 17( 1 ): 123-128.
- [ 5 ] Soejima H, Miyoshi O, Yoshinaga H, *et al.* Assignment of the programmed cell death 4 gene ( *PDCD4* ) to human chromosome band 10q24 by *in situ* hybridization[ J ]. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 87( 1-2 ): 113-114.
- [ 6 ] Yang HS, Jansen AP, Komar AA, *et al.* The transformation suppressor *Pdc4* is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation[ J ]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23( 1 ): 26-37.
- [ 7 ] Waters LC, Veverka V, Bohm M, *et al.* Structure of the C-terminal MA-3 domain of the tumour suppressor protein *Pdc4* and characterization of its interaction with eIF4A[ J ]. *Oncogene*, 2007, 26 ( 34 ): 4941-4950.
- [ 8 ] Cmarik JL, Min H, Hegamyer G, *et al.* Differentially expressed protein *PDCD4* inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96( 24 ): 14037-14042.
- [ 9 ] Jansen AP, Camalier CE, Colburn NH. Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis[ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 14 ): 6034-6041.
- [ 10 ] Hilliard A, Hilliard B, Zheng SJ, *et al.* Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4[ J ]. *J Immunol*, 2006, 177( 11 ): 8095-8102.
- [ 11 ] Lankat-Buttgereit B, Lenschen B, Schmidt H, *et al.* The action of *Pdc4* may be cell type specific: evidence that reduction of dUTPase levels might contribute to its tumor suppressor activity in Bon-1 cells[ J ]. *Apoptosis*, 2008, 13( 1 ): 157-164.
- [ 12 ] Goke R, Barth P, Schmidt A, *et al.* Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21 ( *Waf1/Cip1* ) [ J ]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287( 6 ): C1541-C1546.

[ 收稿日期 ] 2008 - 04 - 20

[ 修回日期 ] 2008 - 07 - 05

[ 本文编辑 ] 王莹