

· 基础研究 ·

维甲酸对 SK-N-SH 细胞增殖和相关基因表达的影响*

张秀艳 梁盈 李祺福[△] 宋建晔 荆光军

(厦门大学生命科学学院细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要 目的:研究维甲酸对 SK-N-SH 细胞的增殖和相关基因表达的影响。方法:通过台盼蓝排除法绘制细胞生长曲线、流式细胞技术测定细胞周期、HE 染色光镜观察细胞形态改变以及 SABC 免疫细胞化学染色法观察维甲酸对 SK-N-SH 相关癌基因、抑癌基因表达的影响。结果:1 μmol/L RA 处理后,SK-N-SH 细胞的增殖活动受到明显的抑制,处理第 7 天抑制率达 36.16%;周期测定显示处理后出现明显的 G0/G1 期阻滞,由对照组的 49.7%增加至 62.7%,增加了 26.2%;免疫细胞化学染色结果显示,处理后细胞癌基因 c-myc、c-fos 的表达较对照明显降低,而抑癌基因 p53、p27 的表达则有所加强。结论:维甲酸能有效抑制 SK-N-SH 细胞的增殖活动,其对细胞的增殖抑制作用与 RA 下调 c-myc、c-fos 等癌基因以及上调 p53、p27 等抑癌基因的表达有关。

关键词:神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞;维甲酸;细胞分化;基因表达

中图分类号:Q247, Q279, Q28 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2008)07-1201-04

The Effect of Retinoic Acid on Proliferation and Associated Gene Expression of SK-N-SH Cell*

ZHANG Xiu-yan, LIANG Ying, LI Qi-fu[△], SONG Jian-ye, JING Guang-jun

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of retinoic acid on proliferation and associated gene expression of SK-N-SH cell. **Methods:** Effects of retinoic acid on proliferation of SK-N-SH cells were determined with Taipan-blue dye exclusion test, effects on cell cycle were detected by flow cytometry, effects on morphology were detected by HE staining. And expression levels of oncogene and tumor suppressor gene were examined by immunocytochemistry. **Results:** The experiment results showed that after treated with 1 μmol/L RA, the proliferation rate of SK-N-SH cells was inhibited, the inhibition rate amounts to 36.16%, and the cell cycle was arrested at G0/G1 phase, it was increased from 49.7% to 62.7%. The immunocytochemistry assay also revealed that the expression level of oncogene including c-myc c-fos was downregulated, and the expression level of tumor suppressor gene including p53 and p27 was upregulated. **Conclusions:** The results showed that the RA could effectively inhibit the proliferation activity of the SK-N-SH cell, and the mechanism of RA was related to its downregulating the expression levels of c-myc c-fos and upregulating the expression levels of p53 and p27.

Key words: Neuroblastoma; Retinoic acid; Cell differentiation; Gene expression

Chinese Library Classification: Q247, Q279, Q28 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2008)07-1201-04

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是儿童较常见的神经源性恶性实体瘤,起源于神经外胚层细胞^[1]。SK-N-SH 细胞是一株国内外常用的神经母细胞瘤细胞系,它分化程度较低,能被多种分化诱导物分化,产生形态、生化、超微结构变化,并具备了神经元分化的指标^[2]。维甲酸(retinoic acid, RA)是体内维生素 A 的代谢中间产物,对多种肿瘤细胞具有显著诱导分化作用^[3]。为了更系统研究神经母细胞瘤的分化机理,我们应用维甲酸处理 SK-N-SH 细胞,通过鉴定维甲酸对 SK-N-SH 细胞分化的诱导效果以及对相关癌基因、抑癌基因表达的影响,从而为人神经母细胞瘤体外分化诱导模型的建立及其分化机理的进一步研究提供科学依据。

1 材料和方法

* 基金项目:国家自然科学基金(No.30470877)。

作者简介:张秀艳(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤细胞分子生物学

△通讯作者:李祺福,电话:0592-2185363, Email: chifulee@xmu.edu.cn

(收稿日期:2008-01-22 接受日期:2008-03-20)

1.1 细胞培养和诱导分化

人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 细胞(引自中科院上海细胞研究所)培养于 PRMI 1640 培养液中(内含 12%热灭活小牛血清、2 mmol/L 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、50 μg/mL 卡那霉素, pH 7.2),于 37°C 培养。维甲酸(购自 Sigma 公司)溶于少量无水乙醇中,然后用培养液配成 200 μmol/L 的作用干液,过滤除菌后 4°C 储存备用,临用时稀释成 1 μmol/L 作用液。实验取对数生长期的细胞进行消化传代,接种 24 h 后,对照组更换新鲜培养液,诱导处理组更换 RA 作用液。

1.2 生长曲线测定

取对数生长期细胞,以 5×10^4 cells/mL 浓度接种于一批 25

mL 培养瓶中,接种 24 h 后,对照组换上新鲜培养液,处理组换上 1 μmol/L RA 处理液,连续培养七天,隔日取对照组细胞和处理组细胞各 3 瓶,用苔盼蓝排除法进行活细胞计数,取平均值,绘制细胞生长曲线。以上实验重复三次,结果基本一致,以其中一次实验结果为准。

1.3 细胞周期测定

取对照组和处理组细胞分别用 PBS 清洗,消化收集细胞,并用 PBS 离心洗涤,细胞沉淀重悬于 70%乙醇(预冷)中固定,4℃暂存待测。上机检测前离心去乙醇,PBS 洗涤 2 次,加入 10 μL 不含 DNase I 的 20 mg/mL RNase A(PBS 配制),37℃温育 30 min,加入 25 μL 1 mg/mL 的碘化丙啶(PI)于 4℃避光染色 30 min,200 目筛绢过滤。用 Beckman 公司的 Coulter EPICS XL 型流式细胞仪进行细胞周期时相动力学检测,实验重复三次,根据所测得的 DNA 分布直方图进行细胞周期统计分析。

1.4 细胞形态光镜观察样品制备

将对照组和处理组生长了 5 天的细胞,分别以 1 × 10⁵ cells/mL 的浓度同时接种于放有盖玻片条的细胞培养瓶中,培养 48 h 后,取出长有细胞的盖玻片条,于预温至 37℃的 PBS 中漂洗 2-3 次,Bouin-Hollande 液固定过夜,70%乙醇洗涤,常规 HE 染色,Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。

1.5 相关癌基因、抑癌基因免疫细胞化学检测

取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片,温 PBS 中漂洗,冷丙酮 4℃固定 20 min,PBS 洗涤 3 次,3% H₂O₂ 室温避光孵育 10 min,蒸馏水洗 3 次,滴加适量的 2% BSA 室温孵育 25 min,甩去多余液体不洗,滴加 c-myc、c-fos、wtp53、p27 一抗(c-myc、c-fos、wtp53、p27 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司),37℃孵育 1.5 h 或 4℃过夜,PBS 漂洗 3 次,滴加生物素标记的二抗(IgG/Bio)37℃孵育 20-30 min,PBS 漂洗 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SABC,37℃孵育 20-30 min,PBS 漂洗 3 次,DAB 显色剂室温显色 5-20 min,自来水充分冲洗,蒸馏水洗 1-2 min,乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照,记录结果。实验过程中以 PBS 代替一抗(其它步骤相同)进行免疫细胞化学染色作为阴性对照。

2 结果

2.1 RA 对 SK-N-SH 细胞增殖的影响

细胞生长曲线测定结果显示,培养 7 天后,对照组细胞由 5 × 10⁴ cells/mL 增加至 19.33 × 10⁴ cells/mL,为原来的 3.87 倍,群体平均倍增时间为 43.46 小时,细胞增殖较快;而 1 μmol/L RA 处理组细胞的细胞生长速度明显减慢、倍增时间延长(表 1、图 1),在相同接种量的情况下,细胞数仅增加为 12.33 × 10⁴ cells/mL,为接种量的 2.47 倍,群体平均倍增时间 68.07 小时,是对照组的 1.57 倍,增殖速度减慢,抑制率达到 36.16%。

2.2 RA 对 SK-N-SH 细胞周期的影响

应用流式细胞仪检测 RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞周期分布的影响。检测结果显示,经 1 μmol/L RA 处理之后,SK-N-SH 细胞在细胞周期各个阶段的分布发生明显变化(表 2 和图 2)。对照组 SK-N-SH 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例为 49.7%,S 期细胞占 21.4%,而 G₂/M 期细胞占 27.7%。经 RA 诱导处理之

后,细胞周期出现明显的 G₀/G₁ 期阻滞,G₀/G₁ 期细胞比例高达 62.7%,增加了 26.2%;S 期和 G₂/M 期细胞比例则均有所减少:其中 S 期仅为 11.5%,G₂/M 期细胞比例也降到了 22.6%,降低幅度分别为 46.3%和 18.4%,以 S 期细胞比例下降幅度最大。

表 1 RA 对 SK-N-SH 细胞生长的抑制作用(× 10⁴ cells/mL)

Table 1 Growth inhibition of SK-N-SH cell treated with RA (× 10⁴ cells/mL)

Group	Day				inhibition rate
	1	3	5	7	
Control	5.47	9.66	15.90	19.33	-
1 μmol/L RA	5.31	6.94	10.09	12.34	36.16%

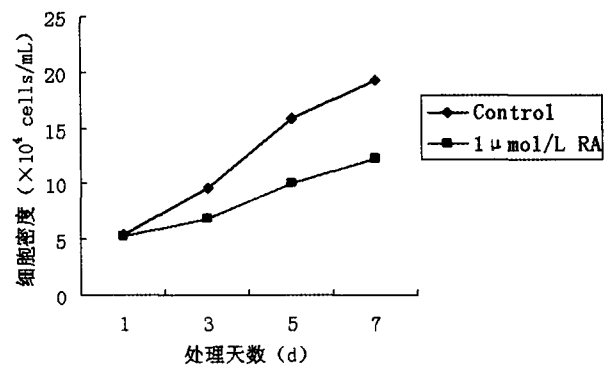


图 1 RA 对 SK-N-SH 细胞生长影响

Fig. 1 Effect of RA on the proliferation of SK-N-SH cell

表 2 RA 对 SK-N-SH 细胞周期的影响(%)

Table 2 The effect of RA on the cell cycle of SK-N-SH cells(%)

Group	Cell stage		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	49.7	21.4	27.7
RA	62.7	11.5	22.6

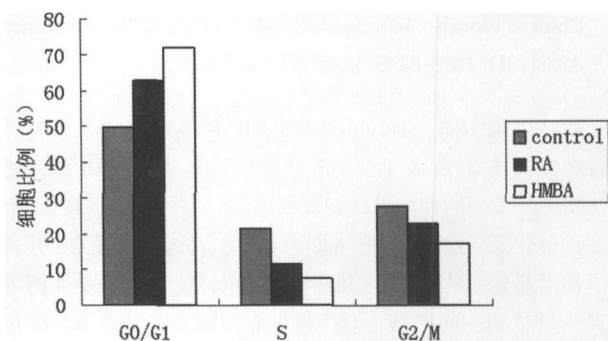


图 2 RA 对 SK-N-SH 细胞周期的影响

Fig.2 Effects of RA on the cell cycle of SK-N-SH cells

2.3 RA 对 SK-N-SH 细胞形态的影响

光镜下,对照组人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞具有人神经母细胞瘤典型的形态特征,细胞形状不规则,呈圆形、梭形、多边形等形态;细胞核大,核形不规则,常见畸形核,核内常见多个核仁,多达 2-4 个,大且深染;细胞质较少,HE 染色不均匀,着色深浅不一(图 3-1)。经 RA 处理之后,细胞形态发生变化,细胞核仁数目减少,核质比例减少,细胞呈极性,细胞伸出多个轴突树突状突起,胞体逐渐变小变圆,处理 7 天时,许多

变小变圆的胞体融合在一起形成类似神经节样结构,并且之间有细胞突起连接其中(图 3-2)。

2.4 RA 对 SK-N-SH 细胞相关癌基因、抑癌基因表达的影响

(1)c-myc 基因表达产物的变化:免疫细胞化学染色结果显示,对照组细胞 c-myc 基因表达免疫细胞化学反应呈强阳性,反应产物为深棕色颗粒,主要分布于细胞核内以及细胞核周边的细胞质区域,颗粒分布较不均一(图 3-3)。经过 RA 处理之后,免疫反应显色弱阳性,反应产物为浅棕色细小颗粒,主要分布于细胞核膜周围的细胞质区,细胞核内有少量分布,反应强度明显减弱(图 3-4)。

(2)c-fos 基因表达产物的变化:免疫细胞化学染色结果显示,对照组细胞 c-fos 基因表达免疫细胞化学反应呈阳性,免疫反应的产物为棕色的颗粒,位于细胞核内和细胞质区域,核周边的细胞质中分布较多(图 3-5)。RA 处理之后,免疫反应显色较对照组明显减弱,反应产物为浅棕色细小颗粒,主要分布于细胞核膜周围的细胞质区域,细胞核内有少量分布(图 3-6)。

(3)p53 基因表达产物的变化:免疫细胞化学染色结果显示,对照组 p53 的表达产物染色呈弱阳性,反应的产物为浅棕色细小颗粒,主要分布于细胞质中,且呈均匀分布,细胞核中几乎看不到(图 3-7)。经过 RA 处理后 p53 表达产物染色呈强阳性,较对照组相比,阳性程度明显增加,大量深棕色颗粒沉淀于细胞核外周的细胞质区域,细胞核内也有少量分布(图 3-8)。

(4)p27 基因表达产物的变化:免疫细胞化学结果显示,对照组细胞中 p27 表达极其微弱,免疫反应的产物为浅棕色细小颗粒,分布在细胞核内和核周围的细胞质区域(图 3-9)。经过 RA 处理之后,免疫染色呈阳性,可见棕色颗粒沉淀于细胞核膜周围的细胞质区域,细胞核内也有少量分布(图 3-10)。

3 讨论

3.1 RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖及其形态变化的影响

细胞分裂失控,细胞周期调控发生紊乱,细胞呈恶性增殖,是肿瘤细胞区别于正常细胞的重要生物学特征之一,因此,研究外源性物质对肿瘤细胞的增殖抑制作用以及对细胞周期的影响是鉴定外源性物质诱导肿瘤细胞分化效果的一个重要指标^[4]。本研究表明,经维甲酸诱导后 SK-N-SH 细胞的增殖受到抑制,细胞周期阻滞于 G₀/G₁,这一结果与前人用不同诱导物诱导人神经母细胞瘤细胞时出现的增殖抑制和细胞周期阻滞结果相一致^[5-7],而本实验室在用维甲酸处理人成骨肉瘤细胞 MG-63 时也得到相同的结果^[8]。由此表明,1 μmol/L RA 能明显抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖,将细胞周期阻滞在 G₀/G₁,从而促使细胞走向分化。

细胞形态是细胞功能活动的基础,所以细胞形态的改变在一定程度上可反映细胞相关功能活动状态也发生了变化,因此诱导分化处理前后肿瘤细胞形态改变是判断肿瘤细胞表型是否分化逆转的一个重要指标^[9]。本研究发现经 1 μmol/L RA 处理后,细胞形态发生变化,细胞丧失其恶性表型,细胞呈极性状,细胞伸出多个轴突树突突起,胞体逐渐变小变圆,处理 7 天后,可观察到许多变小变圆的胞体融合在一起形成类似神经节样结构,并且它们之间有细胞突起连接其中,具有类似神经

细胞样表型。这与人用不同分化诱导物处理神经母细胞瘤细胞系时观察到的形态变化结果相一致^[7,10-11],这一结果表明维甲酸能使 SK-N-SH 细胞形态发生变化,向正常神经细胞方向分化。

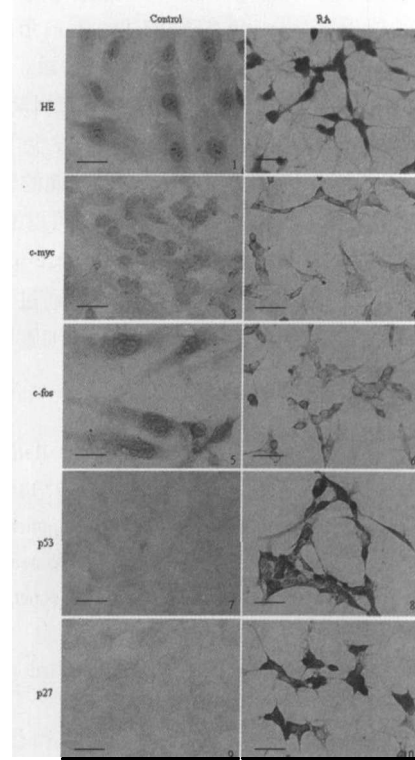


图 3 RA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞形态和相关癌基因、抑癌基因的影响 (Bar:40 μm)

1-2: HE 染色示 SK-N-SH 细胞与 RA 处理细胞形态变化; 3-4: 免疫细胞化学染色示 SK-N-SH 细胞与 RA 处理细胞 c-myc 表达变化; 5-6: 免疫细胞化学染色示 SK-N-SH 细胞与 RA 处理细胞 c-fos 表达变化; 7-8: 免疫细胞化学染色示 SK-N-SH 细胞与 RA 处理细胞 p53 表达变化; 9-10: 免疫细胞化学染色示 SK-N-SH 细胞(与 RA 处理细胞) p27 表达变化

Fig.3 Effects of retinoic acid on morphology and expression levels of oncogene and tumor suppressor gene of SK-N-SH cells (Bar:40 μm)

1-2: HE staining showing the morphology of SK-N-SH cells and RA treated cells; 3-4: Immunocytochemistry showing c-myc expression level of SK-N-SH cells and RA treated cells; 5-6: Immunocytochemistry showing c-fos expression level of SK-N-SH cells and RA treated cells; 7-8: Immunocytochemistry showing p53 expression level of SK-N-SH cells and RA treated cells; 9-10: Immunocytochemistry showing p27 expression level of SK-N-SH cells and RA treated cells

3.2 维甲酸诱导 SK-N-SH 细胞分化过程中相关癌基因、抑癌基因产物表达变化

细胞癌变过程中涉及多种癌基因的激活、抑癌基因的失活以及二者协同作用的复杂机制,外源性诱导分化物在诱导肿瘤细胞分化过程中,对相关基因的表达具有重要的调控作用,因此检测癌基因以及抑癌基因的表达水平是鉴定肿瘤细胞诱导分化效果的重要参考指标。神经母细胞瘤细胞在癌变过程中呈现到癌基因高表达、而抑癌基因表达水平较低的趋势^[12]。本文免疫细胞化学检测显示,SK-N-SH 细胞经 1 μmol/L RA 处理之后,癌基因 c-myc、c-fos 的表达较对照组明显降低,而抑癌基因 p53、p27 的表达则有所加强。这与人用维甲酸、NGF 等其他

诱导物处理不同神经母细胞瘤细胞所出现的上调抑癌基因表达、下调癌基因表达的作用结果相一致^[13]。c-Myc 癌蛋白是一种 DNA 序列特异性转录因子,诱导 CyclinD1 高表达,共同影响细胞周期,促进细胞 G₁/S 期转换^[14];c-fos 表达产物 Fos 蛋白与另一家族的原癌基因 c-jun 编码的 Jun 蛋白形成复合物 Fos-Jun/AP-1 与靶基因结合,激活靶基因的转录,影响细胞 G₁/G₁ 期的过渡;p53 蛋白通过能抑制细胞周期素依赖性激酶 CDK 的活性,诱导细胞周期 G₁ 期阻滞的发生^[6];p27 产物是一种分子量为 27KD 的 CKI,抑制细胞 G₁/S 期的转化,使细胞不能通过 G₁ 期,从而抑制细胞增殖^[15]。因此可以推测 RA 在 SK-N-SH 的分化过程中,通过下调癌基因 c-myc、c-fos 的表达,上调抑癌基因 p53、p27 表达,使细胞不能正常通过 G₁/S 周期调控点,导致细胞被阻滞于 G₁/G₁ 期,从而抑制细胞增殖,细胞启动终末分化过程。

参考文献(References)

- [1] Reynolds C. P., Matthay K. K., Villablanca J. G. et al. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma [J]. *Cancer Lett*, 2003,197,185-192
- [2] Lombet A, Zujovic C, et al. Resistance to induce apoptosis in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH in relation to neuronal differentiation role of Bcl-2 protein family [J]. *Eur J Biochem*, 2001,268: 1352-1362
- [3] Stewart Sell. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy [J]. *Oncology Hematology*, 2004,51:1-28
- [4] Errol C Friedberg. Reversible monoubiquitination of PCNA :a novel slant on regulating translesion DNA synthesis [J]. *Molecular Cell* , 2006,22 (2) :150 - 152
- [5] Joshi S, Guleria R, Pan J, et al.Singh US.Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Oncogene*, 2006,25(2):240-247
- [6] Laurora S, Tamagno E, Briatore F, et al. 4-Hydroxynonenal modulation of p53 family gene expression in the SK-N-BE neuroblastoma cell line [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005,38(2):215-225
- [7] Zhang S, He Q, Peng H, et al. MAT1-modulated cyclin-dependent kinase-activating kinase activity cross-regulates neuroblastoma cell G₁ arrest and neurite outgrowth [J].*Cancer Res*, 2004,64(9):2977-2983
- [8] Zhao Yan,Tang Jian, Zhao Chun-hong,et al. Observation of the Effects of Retinoic Acid on the Configurational Changes of the NM-IF System and the Alteration of Nuclear Matrix Proteins in Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 [J]. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2006,45(5):6-9(In Chinese)
- [9] Li QF, Ouyang GL, Li CY, Hong SG. Effects of tachyplesin on the morphology and ultrastructure of human gastric carcinoma cell line BGC-823 [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2000,6(5): 676-680
- [10] Oppenheimer O, Cheung NK, Gerald WL. The RET oncogene is a critical component of transcriptional programs associated with retinoic acid-induced differentiation in neuroblastoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007,6(4):1300-1309
- [11] Kravcka JM, Li L, Bielawski J, et al.Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003,419 (2): 110-119
- [12] Corvi R, Savellyeva L, Schwab M, Patterns of oncogene activation in human neuroblastoma cells [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 1997,31: 25-31
- [13] Chen J, Liu T, Ross AH, Down-regulation of c-myc oncogene during NGF-induced differentiation of neuroblastoma cell lines [J]. *Chin Med Sci J*, 1994,9(3):152-156
- [14] Glöckner S, Buurman H, Kleeberger W, et al.Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(10):1419-1426
- [15] Adriana Borriello, Valeria Cucciolla, Maria Criscuolo, et al. Retinoic Acid Induces p27Kip1 Nuclear Accumulation by Modulating Its Phosphorylation [J].*Cancer Reserch*, 2006, 66(8):4240-4248

(上接第 1210 页)

参考文献(References)

- [1] T Ne'stor H, Dritan A, Marina V, et al. Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells In Vitro and Expression of MMP-1 and Tie-2 [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006,17: 5163-5172
- [2] Karin L, Kristian R, Tommy A,er al. Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protern HuR in human breast epithelial cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006,1093(10):3988-3999
- [3] Gu G, Wells JM, Dombkowski D, et al. Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development [J]. *Development*, 2004, 131(1):165-179
- [4] Peter J, Jurgensen A, Kloppel G. Ontogeny. differentiation and growth of the endocrine pancreas [J]. *Virchows Arch*, 2000,436(6):527-538
- [5] Ni Xue-feng, Yuan Li, De Wei, et al. Expression and location of nestin in pancreas of E18.5, newborn and adult rats [J]. *J FourthM iLM ed Univ*), 2004, 25(3):193-196(In Chinese)
- [6] Teng Li-ping, Hu Jing-jing, Yuan Qin-xin, et al. Expression of Mesothelin during later rat pancreatic development[J]. *J FourthM iLM ed Univ*),2005,26(17):1570-1572(In Chinese)
- [7] Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, et al, Expression Patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and Misexpression in Transgenic Mice Suggesting a Role for Wnts in Pancreas and Foregut Pattern Formation [J]. *Development Dynamics*, 2002,225(30):260-270
- [8] Hyon J,ack R, Jose J, et al. Wnt5 signaling in vertebrate pancreas development [J]. *BMC Biol*, 2005,1186(10):1741-175
- [9] Giles RH, van Es JH, Clevers H, et al. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1653-1677