

## 视黄酸诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞 分化过程中核基质蛋白组成的变化

梁盈, 张秀艳, 李祺福\*, 石松林, 赵振利, 陈晋安  
(教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

**摘要** 在鉴定视黄酸(retinoic acid, RA)诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化的基础上,应用免疫细胞化学、选择性抽提和蛋白质组学分析技术,对 SK-N-SH 细胞诱导分化过程中核基质蛋白组成变化进行了系统研究.实验结果显示,经 1  $\mu\text{mol/L}$  RA 处理后 SK-N-SH 细胞呈极性状,伸出较长的轴突样突起,胞体逐渐变小变圆.免疫细胞化学结果显示,处理后神经细胞特异表达的蛋白 synaptophysin、NSE、MAP2 的表达量都较对照组有明显增强.双向凝胶电泳分析显示,在 RA 诱导 SK-N-SH 细胞分化前后存在 52 个差异表达的核基质蛋白,经质谱分析,鉴定了其中的 41 个蛋白.蛋白印迹杂交进一步确证了诱导分化差异表达核基质蛋白中 nucleophosmin 和 prohibitin 等的表达变化.研究表明,1  $\mu\text{mol/L}$  RA 对 SK-N-SH 细胞具有显著的诱导分化作用,在 SK-N-SH 细胞分化过程中,其核基质蛋白组成发生了明显变化.这些变化对于揭示人神经母细胞瘤细胞癌变与逆转机制和肿瘤细胞增殖与分化调控机理均有十分重要的意义,从而为研究神经系统正常发育过程及神经系统疾病的发病机理提供科学依据.

**关键词** 核基质蛋白; 诱导分化; 人神经母细胞瘤; 视黄酸

**中图分类号** Q24;Q27

### Differentiation of Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells and Alteration of Its Nuclear Matrix Proteins Induced by Retinoic Acid

LIANG Ying, ZHANG Xiu-Yan, LI Qi-Fu\*, SHI Song-Lin, ZHAO Zhen-Li, CHEN Jin-An

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,  
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

**Abstract** The alteration of the nuclear matrix proteins (NMPs) during differentiation of human neuroblastoma SK-N-SH cells after being induced by retinoic acid (RA) have been investigated by immunocytochemistry, selective extraction-whole mount optic and two-dimensional gel electrophoresis. It revealed that RA could induce neuroblastoma cells to extend neurite-like processes. The immunocytochemistry observation revealed that the expression of neuronal markers, including synaptophysin, NSE, MAP2 were up-regulated in SK-N-SH after RA treatment. And the 2-DE result displayed that 52 nuclear matrix proteins, 41 of which were identified by mass spectrometry, were differently expressed after being treated with RA. The changes of nucleophosmin, prohibitin and hnRNP A2/B1 differently expressed in nuclear matrix proteins during differentiation induced by RA, was further confirmed by Western blotting. It demonstrated that SK-N-SH cells had been undergone a restorational change similar to normal neural cells after RA treatment. And induced differentiation SK-N-SH

收稿日期:2008-01-25;接受日期:2008-05-14

国家自然科学基金(No. 30470877)资助项目

\*联系人 Tel: 0592-2185363; E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

Received: January 25, 2008; Accepted: May 14, 2008

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30470877)

\*Corresponding author Tel: 0592-2185363; E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

cells are accompanied with the expression alteration of NMPs. This alteration is important to reveal the relationship between nuclear matrix proteins and neuroblastoma cell carcinogenesis and reversion, and to elucidate the regulational principal of cell proliferation and differentiation.

**Key words** nuclear matrix proteins; differentiation; human neuroblastoma; retinoic acid

神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 是起源于胚胎期神经嵴细胞的小儿恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 有关神经母细胞瘤分化诱导及其机理的研究, 不仅对于神经母细胞瘤的防治具有重要意义, 同时对细胞增殖分化调控原理和神经生物学研究也具有重要意义. 近些年来, 国内外学者虽然在神经母细胞瘤的诱导分化方面开展了一些工作, 但尚未能从较为整体的水平上系统阐明神经母细胞瘤增殖与诱导分化调控机理问题<sup>[2-4]</sup>. 核基质 (nuclear matrix, NM) 是真核细胞核内以纤维蛋白为主的网络骨架, 在维持核形态、染色质的空间定位与组装方面起着重要作用, 并与 DNA 复制与转录、RNA 修饰等一系列重要的细胞生命活动密切相关<sup>[5,6]</sup>. 核基质蛋白参与细胞信号转导系统对基因表达进行调控, 高度动态的核基质及其蛋白组成与细胞的增殖分化密切相关<sup>[7]</sup>, 肿瘤细胞核基质与同组织来源的正常细胞在蛋白组成上具有显著差异<sup>[8-10]</sup>. 因此, 分析核基质蛋白的组成变化对于进一步探索细胞癌变与逆转机理具有重要意义. 而有关神经细胞蛋白质组的系统研究工作目前在国内外仍未开展. 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞是神经母细胞瘤研究中常用的细胞株<sup>[11,12]</sup>, 视黄酸 (retinoic acid, RA) 是肿瘤细胞诱导分化研究中常用的诱导分化物. 我们以人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞为对象, 在确定 RA 诱导 SK-N-SH 细胞分化效果的基础上, 分析 RA 诱导处理前后 SK-N-SH 细胞核基质蛋白组成的变化, 以寻找和鉴定神经肿瘤细胞增殖分化相关的特异核基质蛋白, 从而为研究神经系统正常发育过程及神经系统疾病的发病机理提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与诱导分化处理

人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 购自中科院上海细胞所. SK-N-SH 细胞生长于含 12% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、50 μg/ml 卡那霉素, pH 7.2 的 RPMI1640 培养液中, 置于 37℃ 培养. 视黄酸购自 Sigma 公司. 准确称量后溶于少量无水乙醇中, 再用培养液配成 200 μmol/L 的作用干液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4℃ 储存备用, 临用时稀释 200 倍. 取对数生长期细胞进行消化传代, 接种

24 h 后更换含 1 μmol/L RA 的培养液进行诱导处理. 每 48 h 更换新鲜加药培养液, 连续培养 7 d 后, 收集细胞备用. 对照组细胞相应扩增, 收集待用.

### 1.2 细胞生长曲线的测定

取对数生长期的 SK-N-SH 细胞以  $5 \times 10^4$  细胞/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, 诱导处理组换上 1 μmol/L RA 诱导处理液, 连续培养 7 d, 隔日取对照组细胞和处理组细胞各 3 瓶, 用苔盼蓝拒染法进行活细胞计数, 取平均值. 以上实验重复 3 次, 结果基本一致, 根据所测得的细胞生长数据进行统计学分析, 绘制细胞生长曲线.

### 1.3 细胞周期的测定

消化收集对数生长期的对照组和处理组细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 重悬洗涤 2~3 次, 细胞沉淀重悬于预冷 70% 乙醇中固定, 4℃ 过夜. 细胞上机检测前离心去乙醇, PBS 洗涤 2 次, 加入不含 DNase I 的 20 mg/ml RNase A (PBS 配制), 37℃ 温育 30 min 以消化 RNA, 然后加入 1 mg/ml 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 3 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 细胞形态光镜样品的制备与观察

将对照组和生长了 5 d 的处理组细胞, 分别以  $10 \times 10^4$  细胞/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, Bouin-Hollande 液固定过夜, 70% 乙醇洗涤, 常规苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照.

### 1.5 神经细胞分化标志物的免疫细胞化学检测

取分别长有对照组和处理组细胞的盖玻片, 于预温至 37℃ 的 PBS 中漂洗, 冷丙酮 4℃ 固定 20 min. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温避光孵育 10 min, 蒸馏水洗去 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 滴加适量的 2% BSA 室温孵育 25 min, 滤纸吸去多余液体, 滴加 synaptophysin、NSE、MAP2 一抗 (synaptophysin、NSE、MAP2 抗体购自武汉博士德生物工程公司) 37℃ 孵育 1.5 h 或 4℃ 过夜, PBS 漂

洗后,滴加生物素标记的二抗(IgG/Bio)37 孵育 20~30 min, PBS 洗去二抗,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 SABC,37 孵育 20~30 min, DAB 显色剂室温显色, 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(其他步骤相同)进行免疫细胞化学染色作为阴性对照.

### 1.6 细胞核基质蛋白的选择性抽提与纯化

参照 Michishita 等<sup>[13]</sup>方法,培养细胞经温 PBS (37 )漂洗 2 次,然后在 0 下先用含 0.5% Triton X-100 高离子强度细胞骨架提取液 CSK100(10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L PMSF, 100 mmol/L NaCl)抽提 10 min, 400 g 离心,去除上清,再经含 0.5% Triton X-100 的细胞骨架提取液 CSK50(10 mmol/L PIPES, pH 6.8, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L PMSF, 50 mmol/L NaCl)洗涤 2 次,离心,去除上清.

经高盐溶液抽提染色质、组蛋白后加入 CSK50 配制的 300 U/ml 的 DNase 消化 30 min,加入 1 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至终浓度 0.25 mol/L,室温抽提 15 min, 1 000 g 离心 5 min,去除上清液中的 DNA 和组蛋白,不溶性沉淀物的主要成分即为核基质蛋白,以 CSK50 漂洗 1 次, -75 保存备用.

### 1.7 双向电泳

等电聚焦参照夏其昌<sup>[14]</sup>方法进行,采用 13 cm ×0.2 cm 自制的管胶,抽提的核基质蛋白样品中加入裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 50 mmol/L DTT, 2% 两性电解质, pH 3~9.5),冰浴超声 2 min, 4 16 000 g 离心 30 min. Bradford 法测定蛋白质浓度,上样量 80 μg. 聚焦 11 000 V ·h,等电聚焦电泳结束后,胶条在平衡缓冲液(2% SDS, 50 mmol/L DTT, 10% 甘油, 0.65 mmol/L Tris, pH 6.8, 痕量溴酚蓝)中平衡 20 min 后,转移到 1 mm 厚 12.8% SDS-PAGE 胶上部,以 1% 琼脂糖封闭,40 mA 恒流下,电泳至溴酚蓝到达距凝胶底部 2 cm 处,下胶银染.凝胶图谱以 PD Quest v8.0 软件进行差异点分析.

### 1.8 MALDI-TOF-MS 及数据库检索

差异点胶内酶切后提取得到肽片段,加入 1~2 μl 0.1% TFA(三氟乙酸)溶解样品,与基质液 1:1 混合点样.用 ReFlex™ MALDI-TOF 质谱仪进行分析,反射模式,离子源加速电压 1 为 20 kV,加速电压 2 为 23 kV,正离子谱测定,获得肽指纹图谱.肽指纹图谱进行胰酶内标校准后,用 MASCOT 软件进入 NCBI & SWISSPROT 数据库检索.

### 1.9 Western 印迹分析

双向电泳蛋白样品以 SDS-PAGE 上样缓冲液稀释为 1 mg/ml, SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%,每上样孔加 15 μl 蛋白样品.电泳结束后以半干法转移到 PVDF 膜上(Millipore),具体方法参见 Millipore 公司的 Western blotting handbook. PVDF 膜以 2% BSA 室温封闭 1.5 h;分别加入质谱鉴定的差异表达蛋白 NPM、prohibitin 等蛋白的相应抗体作为一抗以相应适宜的稀释浓度与 PVDF 膜在室温孵育 1.5 h;TBST 漂洗(3 ×10 min)去除未结合的抗体后,以辣根过氧化物酶结合的相应免疫抗体作为二抗(1:1 000 稀释)与膜室温孵育 1.5 h,经 TBST 漂洗(3 ×10 min)后以 ECL 检测试剂盒显示蛋白条带.以 2% BSA 代替一抗作为阴性对照.

## 2 结果

### 2.1 RA 对 SK-N-SH 细胞的诱导分化作用

#### 2.1.1 RA 对 SK-N-SH 细胞增殖的抑制作用

细胞生长曲线测定结果显示,人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖速度较快,当接种细胞数为 5 ×10<sup>4</sup> 细胞/ml 时,连续计数至第 7 d,对照组细胞数为 29.33 ×10<sup>4</sup> 细胞/ml,为原来的 5.87 倍,群体平均倍增时间为 28.64 h,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(Fig. 1),在相同接种量的情况下,计数至第 7 d,细胞数仅增加为 12.34 ×10<sup>4</sup> 细胞/ml,为接种量的 2.468 倍,群体平均倍增时间 68.07 h,是对照组的 2.38 倍,增殖速度减慢,抑制率达到 57.93%.

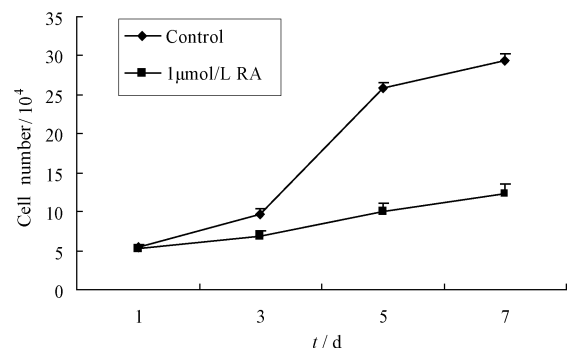


Fig. 1 Effect of RA on the proliferation of SK-N-SH cell. During the first seven days, untreated or treated cells were harvested from three flasks every two days, and the viable cells were counted by the trypan blue dye exclusion test to get average value. The growth inhibitory rate of SK-N-SH treated with RA was 57.93% on the seventh day ( $P < 0.05$ ).

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  $1 \mu\text{mol/L}$  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 (Fig. 2). 对照组 SK-N-SH 细胞  $G_0/G_1$  期细胞比例为 49.7%, S 期细胞占 21.4%, 而  $G_2/M$  期细胞占 27.7%. 经 RA 诱导处理之后, 细胞周期出现明显的  $G_0/G_1$  期阻滞,  $G_0/G_1$  期细胞比例高达 62.7%, 增加了 26.2%; S 期和  $G_2/M$  期细胞比例则均有所减少: 其中 S 期仅为 11.5%,  $G_2/M$  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.

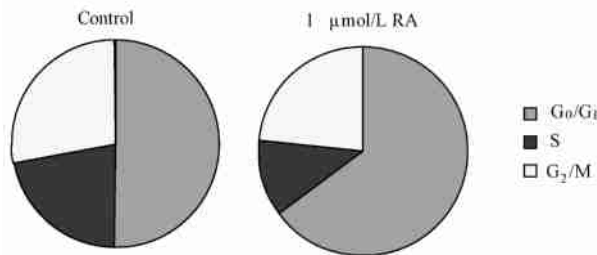


Fig. 2 Effects of RA on the cell cycle of SK-N-SH cells

Cell cycle of SK-N-SH cells was analyzed by flow cytometry. RA could arrest the SK-N-SH cells at  $G_0/G_1$  phase

### 2.1.2 RA 对 SK-N-SH 细胞形态与分化标志物的影响

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, 呈类纤维细胞样, 细胞形状不规则, 呈梭形、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 (Fig. 3 A). 经 RA 处理之后, 2 d 后开始出现形态分化, 胞体逐渐变小变圆, 细胞团缩, 呈极性状, 伸出较长的神经突起, 类似树突、轴突; 处理 7 d 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, 且其轴突长度不断增长并可见部分轴突交织成网状 (Fig. 3 B).

应用 SABC 免疫细胞化学方法, 研究 SK-N-SH 细胞在诱导分化前后正常神经细胞标志蛋白的表达变化. Synaptophysin 表达产物变化的实验结果显示, 对照组细胞 synaptophysin 基因表达免疫细胞化学反应呈弱阳性, 反应产物为浅棕色颗粒, 主要分布于细胞核周边的近核膜区域, 颗粒分布较不均一 (Fig. 3 C). 经过 RA 处理之后, 免疫反应显色强阳性, 反应产物为深棕色细小颗粒, 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 (Fig. 3 D). NSE 表达产物在 SK-N-SH 细胞诱导分化处理前染色呈弱阳

性, 免疫反应的产物为淡棕色的颗粒, 位于细胞核内和细胞质区域 (Fig. 3 E). RA 处理之后, 免疫反应显色较对照组明显增强, 反应产物为深棕色细小颗粒, 主要分布于细胞核内和细胞质, 核膜周围的细胞质区域分布较多 (Fig. 3 F). MAP2 的表达在诱导前后也发生了明显变化, 对照组免疫细胞化学染色的结果显示 MAP2 的表达较弱, 染色呈弱阳性, 反应的产物为浅棕色细小颗粒, 主要分布于细胞质与细胞核中, 且呈均匀分布 (Fig. 3 G). 经过 RA 处理后的 SK-N-SH 细胞显色呈强阳性, 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神经样突起的细胞质区域, 细胞核内也有一定分布, MAP2 的表达明显较对照组提高 (Fig. 3 H).

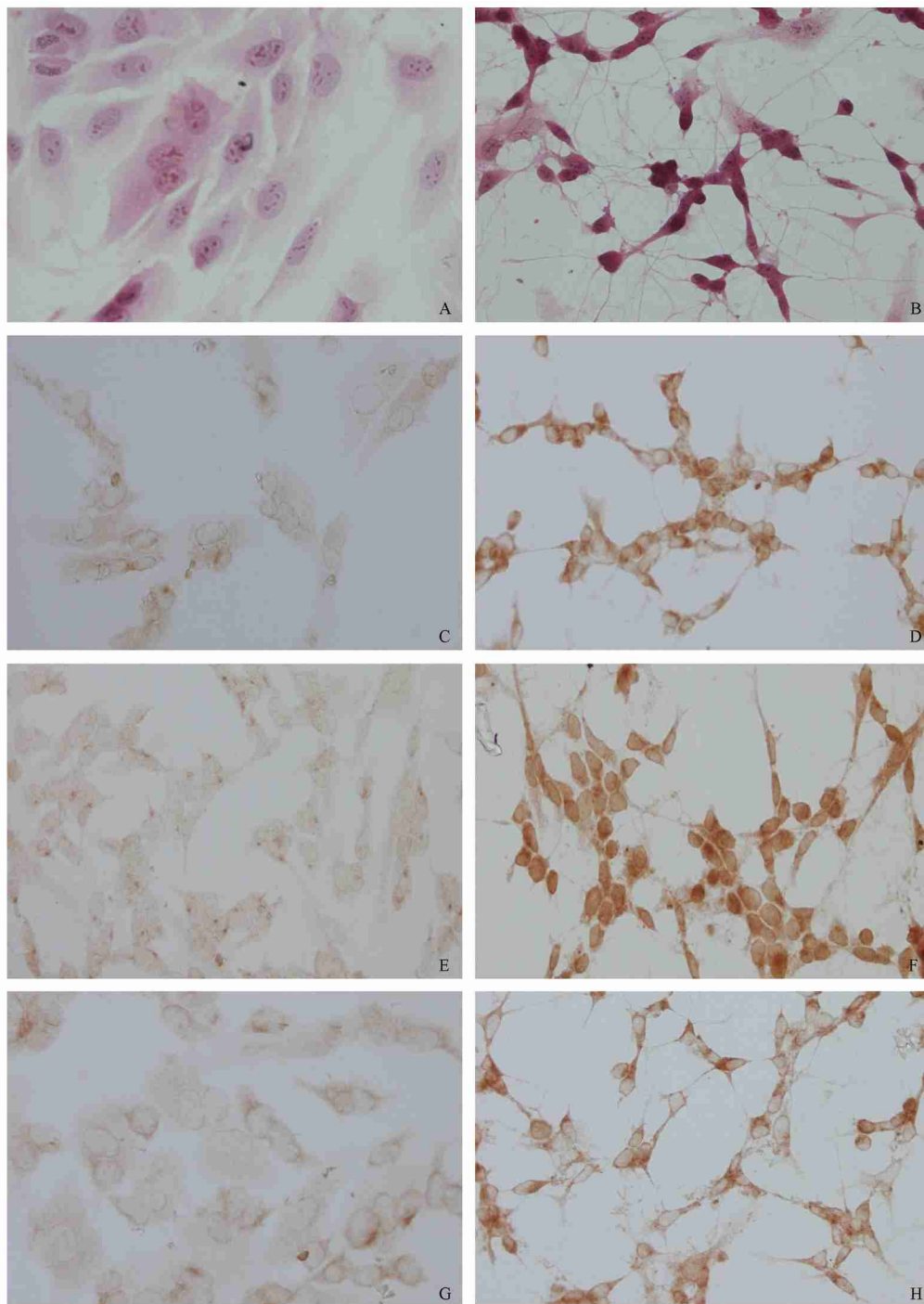
## 2.2 RA 对 SK-N-SH 细胞核基质蛋白表达变化的影响

### 2.2.1 双向凝胶电泳与图像分析

对照组 SK-N-SH 细胞与 RA 处理组细胞提取的核基质蛋白双向电泳均重复 3 次以上, 对 SK-N-SH 细胞核基质蛋白进行分析. 对照组 SK-N-SH 细胞核基质蛋白与处理组核基质蛋白在双向电泳图上的分布极为相似, 主要集中分布在等电点  $pI$  4~9、分子量 10~100 kD 之间, 其中以 20 kD 和 100 kD 之间蛋白含量最高. 如 Fig. 4 所示. 在等电点  $pI$  4~8、分子量 30~90 kD 之间存在大量等电点和分子量接近的蛋白质聚集, 彼此之间界限难以分清, 而在其他区域蛋白点则散在分布, 分子量 10~30 kD 之间蛋白点数量少而分散.

采用 Bio-Rad 公司的 PD Quest 8.0 版本凝胶图像分析软件对采集到的双向电泳图像进行定量分析. 分析结果显示, 对照组核基质蛋白双向电泳的 3 次重复胶中, 平均检测到的  $882 \pm 15$  个蛋白点, 平均匹配率为 90.8%; 处理组核基质蛋白双向电泳的 3 次重复胶中, 平均检测到的  $829 \pm 28$  个蛋白点, 平均匹配率为 89.5%. 这显示双向电泳结果重复性好, 结果可信度很高.

对 RA 组合处理前后表达水平较高的蛋白点进行定量分析, 发现有 52 个蛋白点在 SK-N-SH 细胞诱导分化前后发生明显改变 (表达量变化在 2 倍以上定义为差异表达点), 其中初步得到鉴定的 26 个表达下降的蛋白点依次命名为 L1~26, 10 个得到鉴定的表达上调的蛋白点命名为 H1~10, 3 个消失的点和 2 个新增加的点依次命名为 N1~5, 另有 11 个蛋白点由于丰度低或为新发现蛋白而数据库中无相关质谱数据, 因而没有得到鉴定, 图中没有标注.



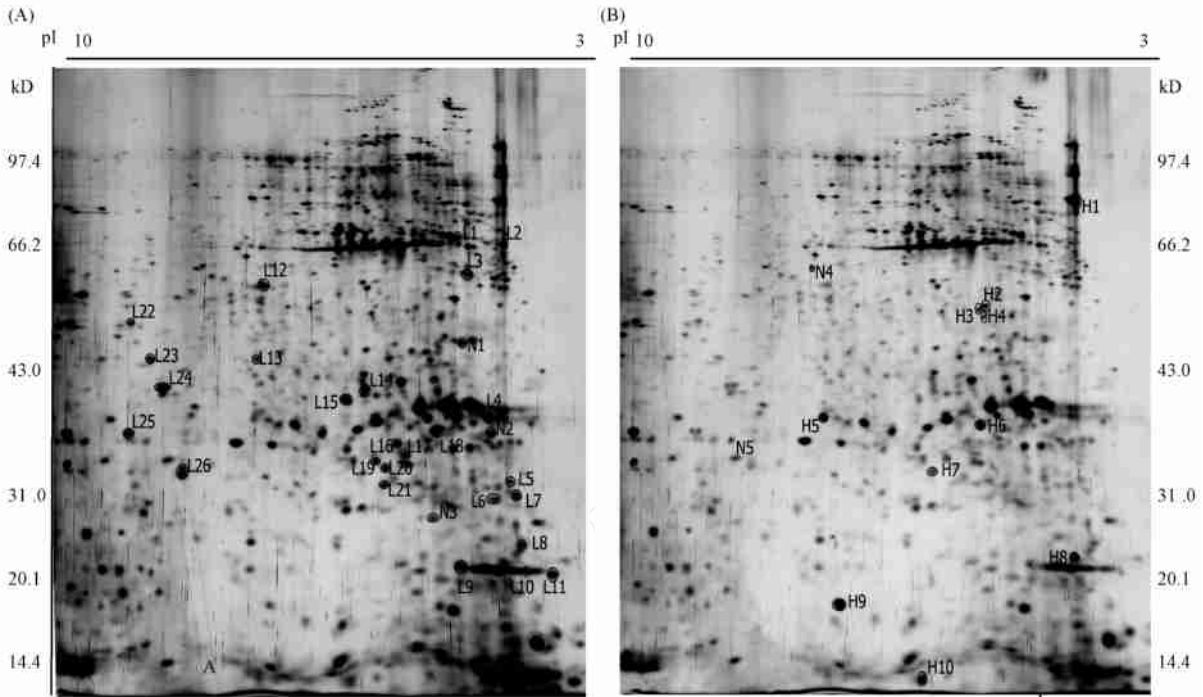
**Fig. 3 Light microscope (LM) observation of SK-N-SH cells** SK-N-SH cells and the treated cells were seeded in small culture flasks with cover slip strips for 36 hours, respectively. LM observation of SK-N-SH cells untreated (A) and treated with RA (B) (HE staining, 400  $\times$ ); Immunocytochemistry staining of synaptophysin in SK-N-SH cells untreated (C) and treated with RA (D) (400  $\times$ ); Immunocytochemistry staining of NSE in SK-N-SH cells untreated (E) and treated with RA (F) (400  $\times$ ); Immunocytochemistry staining of MAP2 in SK-N-SH cells untreated (G) and treated with RA (H) (400  $\times$ )

Fig. 4 为处理前后 SK-N-SH 细胞核基质蛋白双向电泳结果, L1 ~ L26 共 26 个蛋白点表达下调, H1 ~ H10 共 10 个蛋白点表达上调. Fig. 5 (A, B) 为 RA 处理前后表达发生差异变化的蛋白点的定量变化趋势, 定

量变化结果由 PD Quest 8.0 凝胶图像分析软件分析得出.

### 2.2.2 MALDI-TOF 质谱分析与数据库检索

在差异表达的 52 个蛋白点中, 部分蛋白点由于

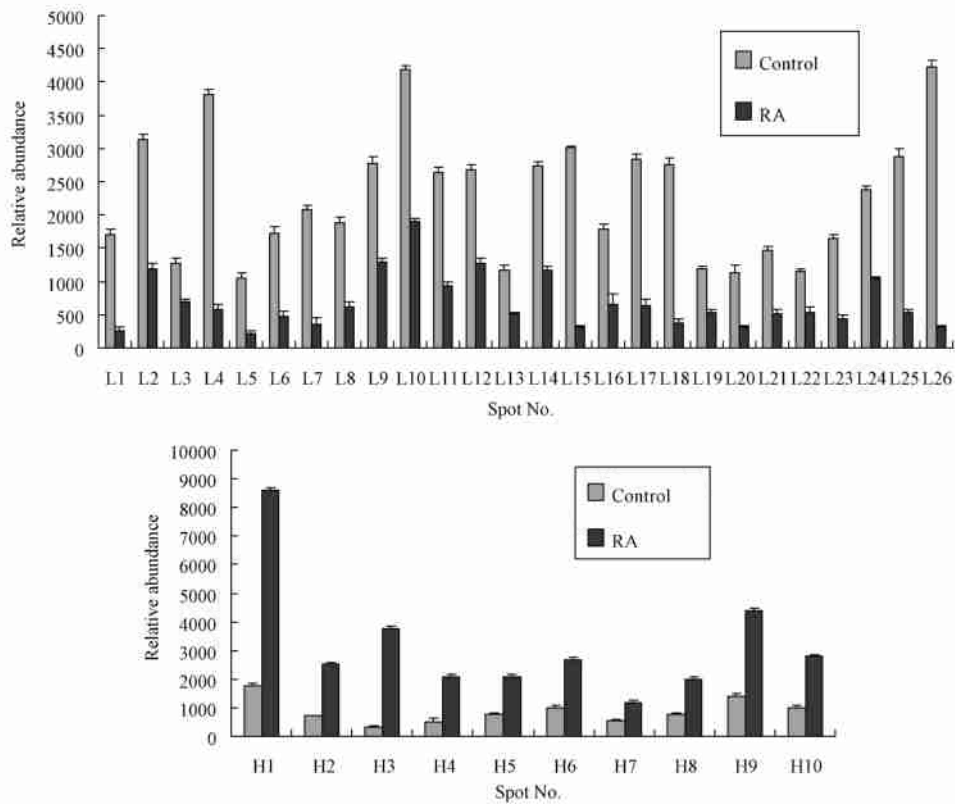


**Fig.4** 2-D PAGE gel of nuclear matrix proteins from SK-N-SH before (A) and after (B) treated with RA (silver staining) The protein excised from gels was digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed. Database searching using MASCOT software against NCBI & SWISSPROT database identified the proteins. L indicates down-regulated nuclear matrix proteins and H indicates up-regulated nuclear matrix proteins in SK-N-SH treated with RA

丰度太低,未能用 MALDI TOF 质谱得到较好的肽指纹图谱,没有得到鉴定;也有部分蛋白由于可能是未发现过的蛋白,数据库中没有相关的肽指纹数据进行匹配,因而未能得到鉴定.共有 11 个差异表达的蛋白点没有得到鉴定,有待进一步研究.在获得初步鉴定的 41 个蛋白点中,部分蛋白点鉴定为同一种蛋白,它们的共同特征是分子量相近,而 pI 有差异,说明它们是在细胞中因修饰而改变了等电点的蛋白质异构体 (isoform). 鉴定的结果见 Table 1.

在获得鉴定的 41 个蛋白点中,表达下调的蛋白为 DNA 复制准许因子 (DNA replication licensing factor)、线粒体内膜蛋白 (mitochondrial inner membrane protein, IMMT)、瞬时受体电位阳离子通道蛋白 2 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 2, TRPV2)、膜联蛋白 A5 (annexin A5)、核仁磷酸化蛋白 (nucleophosmin)、抑制素 (prohibitin)、Ras 相关蛋白 (Ras-related protein Rab-3D, RAB-3D)、谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase 1, GLDH1)、WNT1 诱导信号通路蛋白 3 前体 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 3 precursor, WISP3)、t-RNA 二氢尿苷合成酶 2 (tRNA-dihydrouridine synthase 2, tRNA-DUS2)、延胡索乙酰水

解酶 (fumarylacetoacetase, FAAA)、锌指蛋白 193 (zinc finger protein 193, ZFP193)、着丝粒蛋白 F (centromere protein F, mitosin)、中心粒周围蛋白 (pericentrin, PCNT)、ADP 核糖基化因子 5 (ADP-ribosylation factor 5, ARF5)、磷酸核糖焦磷酸激酶 (ribose-phosphate pyrophosphokinase, PRPP)、Ras 相关蛋白 (Ras-related protein Rab-23, RAB-23)、细胞分裂周期蛋白-7 相关蛋白激酶 (cell division cycle 7-related protein kinase, CDC7-related protein kinase)、3-甲基-2-氧代丁酸脱氢酶激酶 (3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide] kinase, BCKD)、核内不均一核糖蛋白 A2/B1 (hnRNP A2/B1)、细胞分裂蛋白激酶 2 (cell division protein kinase 2, CDK2);表达上调的蛋白点被鉴定为:肌管蛋白相关蛋白 2 (myotubularin-related protein 2, MTMR2)、波形蛋白 (vimentin)、突触相关蛋白 1 (synapse-associated protein 1, SYAP1)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、多配体聚糖结合蛋白 1 (syndecan-binding protein 1, syntenin-1)、星形胶质磷酸化蛋白 (astrocytic phosphoprotein PEA-15, PEA15)、mago nashi 同源蛋白 (protein mago nashi homolog)、小泛素相关修饰分子 3 前体 (small ubiquitin-related



**Fig. 5 Relative abundance of differential expression of nuclear matrix proteins in SK-N-SH untreated and treated with RA (  $P < 0.05$  )** (A) Relative abundance of down-regulated nuclear matrix proteins in SK-N-SH untreated and treated with RA ; (B) Relative abundance of up-regulated nuclear matrix proteins in SK-N-SH untreated and treated with RA

modifier 3 precursor ,SUMO-3) ;处理后消失的蛋白为 ATP 合成酶- (ATP synthase beta chain)、蛋白酶体亚单位 3 型 (proteasome subunit beta type 3 ,PSB3) ;处理后新出现的蛋白为富亮氨酸胶质瘤失活蛋白 1 前体 (leucine-rich glioma-inactivated protein 1 precursor ,LGI1)、联合会合体中心蛋白 1 (synaptonemal complex central element protein 1 ,SYCE1) .

### 2.2.3 RA 诱导 SK-N-SH 细胞分化过程中差异表达核基质蛋白的确认

我们选择其中 4 种差异表达核基质蛋白进行进一步确认,这 4 种蛋白经本实验室之前的研究确证为,不同诱导分化物诱导同种肿瘤细胞以及同种诱导分化物诱导不同肿瘤细胞分化前后的共同差异核基质蛋白.经 SDS-PAGE 分离与半干式转膜方式将蛋白转移到 PVDF 膜上进行 Western 印迹分析.以不含一抗的孵育液作为阴性对照,阴性对照未见蛋白条带;各标本与相应抗体反应后,也仅在与待测蛋白分子量附近有反应的条带,显示抗体特异性好,与其他成分无交叉反应 (Fig. 6) .

Nucleophosmin 的分子量为 38 kD ,Western 印迹结果显示,在这个分子量的位置出现了比较宽粗的蛋白条带.对照组的条带较粗而深,处理组相对较浅而细,这与双向电泳图像分析显示处理后 NPM 表达减弱的结果是符合的.

Prohibitin 的分子量为 32 kD ,Western 印迹结果显示的条带出现在了 32 kD 的位置上,表达强度与双向电泳结果一致,都是在处理后减弱了.

Vimentin 的分子量为 53 ~ 55 kD ,Western 印迹结果显示的条带出现在了 55 kD 的位置上,表达强度与双向电泳结果一致,其表达强度在处理后明显增强了.

hnRNP 有两个蛋白, hnRNP B1 比 hnRNP A2 在 N 末端多 12 个氨基酸,其分子量是 37 kD ,hnRNP A2 的分子量是 34 kD ,Western 印迹结果显示的主要是 hnRNP B1 的条带,其表达强度在诱导分化处理后减弱了.

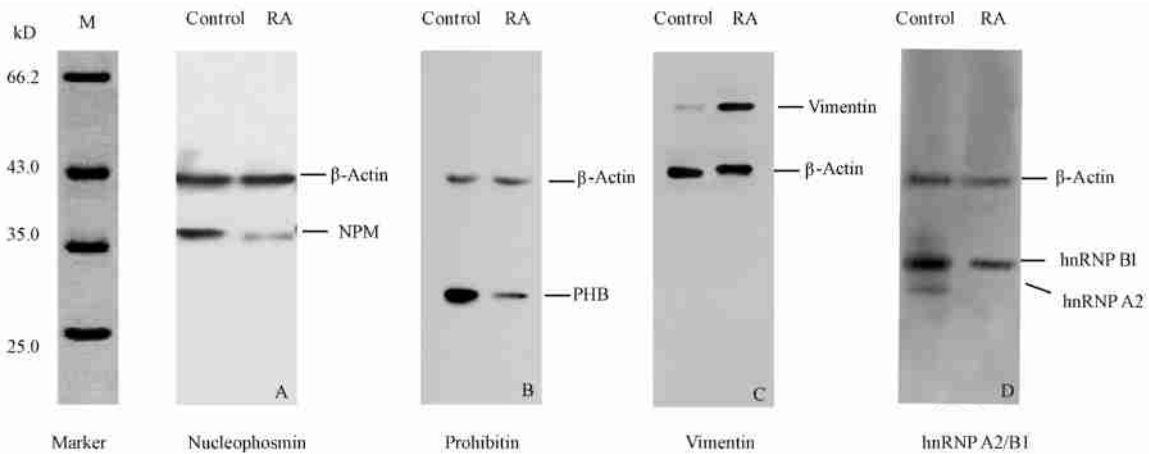
这些 Western 印迹结果,确证了我们经双向电泳和质谱初步鉴定的部分差异表达核基质蛋白及它们在视黄酸诱导分化前后的表达变化.



**Table 1** Proteins with altered expression in nuclear matrix and identification by MASCOT database (www.matrixscience.com)

Spot No.	Protein	Accession no.	$M_r$ (calc)	pI (calc)	Score/coverage	Matching peptides
Down-regulated proteins						
L1	DNA replication licensing factor	Q14566	93 801	5.29	55/13 %	9
L2	IMMT	Q9P0V2	84 025	6.08	66/11 %	5
L3	TRPV2	Q9Y5S1	86 838	5.56	60/10 %	8
L4	Annexin A5	P08758	35 971	4.94	128/32 %	10
L5	Nucleophosmin	Q96EA5	32 726	4.64	73/25 %	5
L6	Nucleophosmin	Q96EA5	32 726	4.64	73/25 %	5
L7	Nucleophosmin	Q96EA5	32 726	4.64	73/25 %	5
L8	Prohibitin	P35232	29 859	5.57	93/37 %	7
L9	Prohibitin	P35232	29 859	5.57	93/37 %	7
L10	Prohibitin	P35232	29 859	5.57	93/37 %	7
L11	RAB-3D	O95716	24 480	4.76	62/31 %	6
L12	GLDH1	P00367	61 701	7.66	106/25 %	11
L13	WISP3	O95389	41 329	8.87	77/29 %	5
L14	tRNA-DUS2	Q9NX74	55 814	6.73	131/26 %	9
L15	FAAA	P16930	46 743	6.46	61/28 %	7
L16	ZFP193	O15535	46 951	6.94	55/15 %	4
L17	Mitosin	P49454	36 736	5.03	54/6 %	14
L18	PCNT	O95613	38 064	5.39	55/11 %	5
L19	ARF5	P84085	20 631	6.30	71/35 %	6
L20	PRPP-1	P60891	35 325	6.51	58/21 %	7
L21	RAB-23	Q9ULC3	26 871	6.22	64/32 %	10
L22	Uncharacterized protein	Q9H943	71 463	9.34	60/13 %	5
L23	CDC7-related protein kinase	O00311	64 646	8.96	55/20 %	8
L24	BCKD	O14874	46 616	8.97	58/8 %	4
L25	hnRNP A2/B1	P22626	36 600	8.67	101/43 %	10
L26	CDK 2	P24941	34 079	8.80	78/26 %	5
Up-regulated proteins						
H1	MTMR2	Q13614	73 878	6.83	54/24 %	8
H2	Vimentin	P08670	53 545	5.06	96/18 %	11
H3	Vimentin	P08670	53 545	5.06	96/18 %	11
H4	Vimentin	P08670	53 545	5.06	96/18 %	11
H5	SYAP1	Q96A49	39 966	4.45	53/25 %	5
H6	GFAP	Q9UFDO	49 907	5.42	61/17 %	4
H7	Syntenin-1	O00560	32 595	7.05	58/20 %	4
H8	PEA-15	Q15121	15 088	4.93	55/27 %	4
H9	Protein mago nashi homolog	P61326	17 210	5.74	62/33 %	4
H10	SUMO3	P55854	11 687	5.32	65/25 %	5
Disappear/appear proteins						
N1	ATP synthase beta chain	P06576	59 012	5.26	78/17 %	6
N2	Uncharacterized protein C13 or f3	Q8IX90	46 843	4.99	56/16 %	5
N3	PSB 3	P49720	23 219	6.14	54/23 %	4
N4	LGII	O95970	64 519	8.50	59/14 %	4
N5	SYCE1	Q8NOS2	40 074	5.89	60/21 %	8





**Fig. 6 Western blotting of altered expression nuclear matrix proteins in SK-N-SH untreated and treated with RA**

Nuclear matrix proteins were obtained by extraction as described in 1.6. The immunoband of nucleophosmin, prohibitin and hnRNP A2/B1 are wider and thicker in control cell than that of RA-treated cell (A, B & D). The immunoband of vimentin is narrower and thinner in control cell than that of RA-treated cell (C). M: protein marker; Control: SK-N-SH cells; RA: RA-treated cells;  $\beta$ -Actin: loading control

### 3 讨论

#### 3.1 视黄酸对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化的诱导作用

肿瘤细胞区别于正常细胞的一个重要特征是,细胞增殖和分化失去控制,细胞周期调控发生紊乱,细胞呈恶性增殖.调控细胞周期将其阻滞在  $G_0/G_1$  期是鉴定诱导物诱导分化效果的重要指标<sup>[15]</sup>.本文细胞生长曲线测定结果显示,SK-N-SH 细胞增殖活跃,而 RA 处理组自第 2 d 起开始出现增殖抑制作用,到第 7 d,增殖抑制率达 57.93%,群体倍增时间也由 28.64 h 增加为 68.07 h.细胞周期测定结果显示,经 RA 诱导后,SK-N-SH 细胞周期发生明显的  $G_0/G_1$  期阻滞,由原来的 49.7% 增加为 62.7%,而 S 期和  $G_2/M$  期细胞比例则分别由 21.4% 和 27.7% 下降为 11.5% 和 22.6%.表明视黄酸能有效抑制 SK-N-SH 细胞的生长,并将细胞阻滞在  $G_0/G_1$  期.这不仅与前人用 RA、神经生长因子等处理神经母细胞瘤细胞后出现的细胞增殖抑制与  $G_0/G_1$  期阻滞的结果相一致<sup>[16,17]</sup>,也与本实验室在用视黄酸处理人成骨肉瘤 MG-63 细胞时所得细胞增殖抑制和发生  $G_0/G_1$  期阻滞的结果相似<sup>[18]</sup>.由此证明,1  $\mu\text{mol/L}$  视黄酸对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖具有显著的抑制作用.

细胞形态与标志物的变化,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与相应标志蛋白的改变是判断肿瘤细胞是否分化的一个重要指标<sup>[19]</sup>.SK-N-SH 细胞是从人神经母细胞瘤中亚克隆得到的神经元细胞的细胞系,在体外可被各种诱导分化剂不同程度地诱导分化<sup>[3]</sup>,从而向正常神经细胞形态变化,表达正常神经细胞特异表达的蛋白.本文光镜观察表明,SK-N-SH 细胞经 1  $\mu\text{mol/L}$  RA 处理后,细胞形态发生变化,胞体逐渐变小变圆,细胞团缩,呈极性,伸出较长的神经突起,类似树突、轴突;处理 7 d 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,且其轴突长度不断增长并可见部分轴突交织成网状,具有类似神经细胞样表型.这些形态变化同前人报道的神经母细胞瘤细胞诱导分化后形态改变描述一致<sup>[19,20]</sup>.分化的神经母细胞瘤细胞会表达神经细胞特异表达的标志物,包括 Syn、Ngn1、NSE、Tau 蛋白、MAP2、NeuroD 等<sup>[21]</sup>.突触体素 (synaptophysin, Syn) 是分布于突触前囊的突触囊泡蛋白,分布在神经终末和神经内分泌组织中.NSE 是神经元主要的烯醇化酶同工酶,来源于神经元和神经内分泌细胞.微管相关蛋白 2 (MAP2) 是微管结构性蛋白,主要分布于神经元的胞体及树突内<sup>[22]</sup>.本文实验结果表明,1  $\mu\text{mol/L}$  RA 能够使 SK-N-SH 细胞的 synaptophysin、NSE、MAP2 表达量明显升高.这与 Sarkanen 等<sup>[23]</sup>、Lombet 等<sup>[3]</sup>、Jain 等<sup>[21]</sup> 报导的分化后的神经母细胞瘤高表达 synaptophysin、NSE、MAP2 结果相一致.由此进一步证实,1  $\mu\text{mol/L}$  视黄酸在抑制 SK-N-SH 细胞增殖的同时,能诱导 SK-N-SH 细胞向

正常神经细胞方向分化.

### 3.2 视黄酸诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞分化过程中核基质蛋白的表达变化

细胞核基质异常与癌变具有密切关系<sup>[24,25]</sup>,核基质蛋白也与正常细胞的核基质组成存在明显差异<sup>[26,27]</sup>.本文在鉴定了 RA 诱导 SK-N-SH 细胞分化效果的基础上,进一步应用双向凝胶电泳技术分析鉴定其核基质蛋白变化.实验结果表明,在 RA 诱导 SK-N-SH 细胞分化过程中出现了 41 个差异表达的核基质蛋白.其中在分化的 SK-N-SH 细胞中表达上调的蛋白点为: SYAP1、GFAP、SUMO-3 等;表达下调的蛋白为 TRPV2、nucleophosmin、prohibitin 等;处理后消失的蛋白为 ATP synthase beta chain、PSB3;处理后新出现的蛋白为 LGII、SYCE1.本文对差异蛋白 nucleophosmin、prohibitin、vimentin、hnRNP A2/B1 的蛋白质印迹杂交实验结果,确证了 RA 处理 SK-N-SH 细胞核基质蛋白的表达变化.这些在 SK-N-SH 细胞分化过程中差异表达的核基质蛋白具有不同的功能,根据功能的不同,可以把这些蛋白分为以下几类:结构性蛋白如 TRPV2、ZN193、vimentin 和 IMMT;有丝分裂相关蛋白如 CDK2;DNA 修复及 RNA 代谢相关蛋白如 DNA replication licensing factor、ARF5、BCKD、LGII、FAAA 等;基因的表达调控因子如 nucleophosmin、SDCB1、SUMO3;抑癌基因表达产物如 prohibitin;神经细胞特异表达蛋白 SYAP1、GFAP 等.

这其中,WISP3、ARF5、GFAP、SYAP1 等都是我们新发现的核基质蛋白.需要特别指出的是,prohibitin 和 nucleophosmin,它们分别是近年来所发现的潜在的抑癌基因表达产物和涉及到 ARF-p53 肿瘤抑制途径的核仁磷酸蛋白,其在不同来源肿瘤细胞分化过程中所产生的相同表达变化,提示了它们与肿瘤增殖分化调节的密切关系.Nuclephosmin、prohibitin 和 hnRNP A2/B1 是近年来研究报道在细胞生长、增殖与癌变过程中起重要作用的功能蛋白.前人尚未有这 3 种蛋白与人神经母细胞瘤关系的报道,本文首次报导了 nuclephosmin、prohibitin 和 hnRNP A2/B1 在神经母细胞瘤细胞分化过程中的表达变化.本实验室在应用 HMBA 诱导人成骨肉瘤细胞、人肝癌和胃癌细胞分化中,均发现 nuclephosmin、prohibitin 和 hnRNP A2/B1 是核基质蛋白,并出现表达下调的变化.本文应用 RA 诱导人神经母细胞瘤细胞分化的实验结果,更进一步证实了 nuclephosmin、prohibitin、和 hnRNP A2/B1 存在于细胞核基质组织中,并且是同一种诱导分化物处理不同肿瘤细胞,和不同诱导

分化物处理同一种肿瘤细胞分化所出现的共同差异核基质蛋白.这为神经母细胞瘤等恶性肿瘤细胞诱导分化及其机理研究提供了明确的靶向性蛋白深入研究的新方向.

本文实验结果证实了,低浓度的视黄酸能有效抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖活动,诱导神经母细胞瘤细胞分化,并在分化过程中诱导核基质蛋白表达水平的变化.对这些差异核基质蛋白的功能及其在人神经母细胞瘤细胞诱导分化过程中的作用,以及这些蛋白与相关癌基因、抑癌基因和相关信号转导通路关系上的进一步研究,显然对于揭示人神经母细胞瘤细胞癌变与逆转机制和肿瘤细胞增殖与分化调控机理均有十分重要的意义.

### 参考文献 (References)

- [1] Redlinger R E Jr, Mailliard R B, Barksdale E M Jr. Neuroblastoma and dendritic cell function [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2004, **13**(1): 61-71
- [2] Kohler J A, Imeson J, Ellershaw C, *et al.* A randomized trial of 13-cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy [J]. *Br J Cancer*, 2000, **83**(9): 1124-1127
- [3] Lombet A, Zujovic V, Kandouz M, *et al.* Resistance to induced 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**(5): 1352-1362
- [4] 王希华,周晓健,岳孟源,等. 9-顺式维甲酸体外诱导神经母细胞瘤细胞分化的研究[J]. *中国临床医学* (Wang Xi-Hua, Zhou Xiao-Jian, Yue Meng-Yuan, *et al.* The study of differentiation in Human neuroblastoma cells with 9-cis retinoic acid *in vitro* [J]. *Clin Med J China*, 2002, **9**(4): 337-339
- [5] Wunderlich F, Herlan G. Reversibly contractile nuclear matrix. Its isolation, structure, and composition [J]. *J Cell Biol*, 1977, **73**(2): 271-278
- [6] Allen S L, Berezney R, Coffey D S. Phosphorylation of nuclear matrix proteins in isolated regenerating rat liver nuclei [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, **75**(1): 111-116
- [7] Marchisio M, Santavenero E, Paludi M, *et al.* Erythroid cell differentiation is characterized by nuclear matrix localization and phosphorylation of protein kinases C (PKC) [J]. *J Cell Physiol*, 2005, **205**(1): 32-36
- [8] Konety B R, Nangia A K, Nguyen T S, *et al.* Identification of nuclear matrix protein alterations associated with renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 1998, **159**(4): 1359-1363
- [9] Konety B R, Getzenberg R H. Nuclear structural proteins as biomarkers of cancer [J]. *J Cell Biochem Suppl*, 1999, **32/33**: 183-191
- [10] Brunagel G, Vietmeier B N, Bauer A J, *et al.* Identification of nuclear matrix protein alterations associated with human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(8): 2437-2442

- [11] Chang P A, Chen R, WU Y J. Reduction of neuropathy target esterase does not affect neuronal differentiation, but moderate expression induces neuronal differentiation in human neuroblastoma (SK-N-SH) cell line [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, **141** (1):30-38
- [12] Pizzi M, Boroni F, Bianchetti A, *et al.* Expression of functional NR1/NR2B-type NMDA receptors in neuronally differentiated SK-N-SH human cell line [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, **16**(12):2342-2350
- [13] Michishita E., Kurahashi T, Suzuki T, *et al.* Changes in nuclear matrix proteins during the senescence-like phenomenon induced by 5-chlorodeoxyuridine in HeLa cells [J]. *Exp Gerontol*, 2002, **37**(7):885-890
- [14] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展[M]. 北京:科学出版社 (Xia Qi-Chang. *Protein Chemistry Research Technology and Progress* [M]. Beijing: Science Press, 1997. 124-135)
- [15] 李祺福,李长友,欧阳高亮,等. 中国鲑素对人胃癌 BGC-823 细胞增殖的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版) (Li Qi-Fu, Li Chang-You, Ouyang Gao-Liang, *et al.* The inhibition effect of tachyplesin on the proliferation of human gastric carcinoma cell line BGC-823[J]. *J Xiamen Univ Nat Sci*, 2001, **40**(1):110-115)
- [16] 张浩川,陈肖鸣. 维甲酸对小儿实体瘤诱导分化研究进展 [J]. 医学综述 (Zhang Hao-Chuan, Chen Xiao-Ming. Research development in children solid tumor differentiation by retinoic acid [J]. *Med Recapit*, 2005, **11**(7):616-619)
- [17] Peterson S, Bogenmann E. The RET and TRKA pathways collaborate to regulate neuroblastoma differentiation [J]. *Oncogene*, 2004, **23** (1):213-225
- [18] 王国红,田玉玲,石贺欣,等.熊去氧胆酸和维甲酸对人骨肉瘤细胞 MG-63 细胞周期与分化的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版) (Wang Guo-Hong, Tian Yu-Ling, Shi He-Xin, *et al.* Effects of ursodeoxycholic acid and retinoic acid on the cell cycle and differentiation of human osteosarcoma MG-63 cell[J]. *J Xiamen Univ Nat Sci*, 2005, **44**(S):111-115)
- [19] Li Q F, Ouyang GL, Li C Y, *et al.* Effects of tachyplesin on the morphology and ultrastructure of human gastric carcinoma cell line BGC-823[J]. *World J Gastroenterol*, 2000, **6**(5):676-680
- [20] Shen J H, Zhang Y, Wu N H, *et al.* Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Neurosci Lett*, 2007, **414**(2):110-114
- [21] Jain P, Cerone M A, Leblanc A C, *et al.* Telomerase and neuronal marker status of differentiated NT2 and SK-N-SH human neuronal cells and primary human neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2007, **85**(1):83-89
- [22] Sanchez C, Arellano J I, Rodriguez S P, *et al.* Microtubule-associated protein 2 phosphorylation is decreased in the human epileptic temporal lobe cortex[J]. *Neuroscience*, 2001, **107**(1):25-33
- [23] Sarkanen J R, Nykky J, Siikanen J, *et al.* Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. *J Neurochem*, 2007, **102** (6):1941-1952
- [24] 陈兰英,唐剑,许东辉,等. 环六亚甲基双乙酰胺诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞分化过程中核基质-中间纤维系统的构型变化[J]. 电子显微学报 (Chen Lan-Ying, Tang Jian, Xu Dong-Hui, *et al.* Configurational changes of the nuclear matrix-intermediate filament (NM-IF) system during the differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells after being induced by hexamethylamine bisacetamide (HMBA) [J]). *J Chin Electr Microsc Soc*, 2007, **26**(3):212-216
- [25] Li QF. Effect of retinoic acid on the changes of nuclear matrix-intermediate filament system in gastric carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 1999, **5**(5):417-420
- [26] Nickerson J A. Nuclear dreams: the malignant alteration of nuclear architecture [J]. *J Cell Biochem*, 1998, **70**(2):172-180
- [27] Getzenberg R H, Konety B R, Oeler T A, *et al.* Bladder cancer-associated nuclear matrix proteins[J]. *Cancer Res*, 1996, **56**(7):1690-1694