DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.012
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1153-03

论著

双向电泳分析比较维甲酸诱导HL60细胞分化的蛋白表达差异

牟芝蓉,吴玉章,李晋涛 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 以维甲酸诱导急性早幼粒白血病细胞HL60分化为模型,用双向电泳技术分析比较维甲酸诱导HL60细胞分化的蛋白表达差异。方法 用细胞生物学的方法分析分化细胞形态上的差异,NBT实验检测细胞NBT阳性率。用双向电泳技术分析分化肿瘤细胞蛋白表达差异。结果 分化后细胞形态发生明显变化,细胞表面出现突起,细胞核变小。分化后细胞NBT阳性率达90%以上,而未分化细胞NBT阳性率低于5%。双向电泳技术分析发现有7个蛋白点只未分化细胞检测到表达,而分化细胞未检测到;有14个蛋白点只在分化细胞检测到。结论 双向电泳技术可直接反映细胞蛋白表达变化。

关键词:双向电泳;维甲酸;诱导分化;HL60
中图法分类号:R345.1;R446.112;R733.71 文献标识码:A

Protein expression in retinoic acid treated HL60 cells with two-dimensional electrophoresis

MOU Zhi-rong, WU Yu-zhang, LI Jin-tao (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the protein expression in myeloid leukaemia cell line HL60 with retinoic acid treatment. Methods Cytobiological methods were used to observe the morphology of HL60 cells treated with retinoic acid. NBT positive cells were counted with NBT test. The differences of protein expressions in HL60 cells treated with 2×10^{-7} mol/L retinoic acid was analyzed through the results from two-dimensional electrophoresis. Results HL60 cells were induced to differentiate along the monocytic or granulocytic pathways with retinoic acid. The morphology of the treated cells was significantly different from control. This treatment resulted in 90% of NBT-positive cells, and the control is as lower as 5%. By two-dimensional electrophoresis, 7 protein spots were detected in control cells, while 14 protein spots in treated cells. Conclusion The expressions of some proteins are increased and some reduced in HL60 cells after retinoic acid treatment.

Key words: two-dimentional electrophoresis; retinoic acid; differentiation; HL60

自1978年Leo Sachs报告恶性肿瘤细胞可以转化为较成熟或较良性的细胞以来,有关诱导分化剂的研究及其应用已有大量报道。体外实验证明,许多药理活性物质能够诱导多种癌细胞分化,包括白血病和肺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤等实体瘤细胞。1986年,我国科学家首先应用全反式维甲酸(ATRA)治疗急性早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia, APL)取得很高的缓解率。研究表明,维甲酸(Retinoic acid, RA)可诱导某些肿瘤细胞终末分化,使其恶性程度降低,成为正常或接近正常的细胞。维甲酸诱导分化的肿瘤细胞中凋亡有关基因如Fas、Bcl-2及某些粘附分子和信号转导分析表达水平有变化[1~3]。我们希望通过双向电泳技术直接分析肿瘤细胞分化后蛋白质表达变化,筛选并鉴定一些分化有关的蛋白质,为进一步研究这些蛋白在肿瘤细胞分化中的作用奠定基础,也为阐明肿瘤细胞的恶性转化机制提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

全反式维甲酸和TPA购自Sigma公司;NBT为上海生工公司产品。尿素,SDS,甘氨酸,溴酚蓝,CHAPS,IPG干胶条(pH3-10L),丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,Tris,过硫酸铵,TEMED和低分子量蛋白Marker均购自Amersham Pharmacia公司。碘乙酰胺为Sigma公司产品。其余试剂为国产分析纯,所有溶液均用纯水配制。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和诱导分化 人急性早幼粒白血病细胞HL60由本校营养卫生教研室糜漫天教授惠赠。细胞传代后培养在含10%小牛血清的1640培养液中。分化细胞是用2×10^{-7} mol/L全反式维甲酸(ATRA)处理HL60 96 h后的细胞。

1.2.2 细胞核染色 细胞悬液滴在载玻片上,均匀涂成单层,将液体风干。加2~3滴瑞氏Giemsa染液,再加入等体积生理盐水,用洗耳球迅速吹匀染液,染色约1 min,蒸馏水冲洗,风干后显微镜观察。

1.2.3 NBT还原实验 参考文献[4],经维甲酸处理96 h的细胞HR96,细胞悬液与NBT反应液(1.25 mg/ml NBT、17 mg/ml BSA和2μg/ml TPA于生理盐水中)各0.5 ml混合于24孔板中,37 ℃培养2 h,倒置显微镜下计数200个细胞,求出NBT阳性细胞百分率。

1.2.4 双向电泳实验 样品处理参考文献[5,6],细胞经生理盐水洗涤3次后离心收集于1.5 ml EP管。细胞重悬于200 μl裂解液(8 mol/L尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,60 mmol/L DTT和0.8%IPG缓冲液),超声细胞破碎仪冰浴超声1 min。12 000× g离心10 min,4 ℃,取上清,BIO-RAD公司DC Protein Assay测定蛋白浓度。双向电泳主要按Gorg描述的方法,并按

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:牟芝蓉(1973-),女,重庆市万州区人,博士研究生,助教,主要从事肿瘤免疫方面的研究。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-08-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Sanches 等[7] 改进的胶内加样方法进行，参照 IPGphor 等电聚焦仪操作指南，1 mg 总蛋白与重水化液（8 mol/L 尿素，2% CHAPS，60 mmol/L DTT 和 0.5% IPG 缓冲液 pH 3～10）混合，总体积 250 μl 吸入 IPG 胶槽，IPG 干胶条（13 mm，pH 3～10）胶面朝下放入胶槽，覆盖一层矿物油。置于 IPGphor 等电聚焦仪（Amersham Pharmacia 公司）电极板上，重水化和等电聚焦在 20 ℃自动进行，总电压时间积 20～22 kVh。等电聚焦后于平衡液Ⅰ（10 mg/ml DTT，50 mmol/L Tris-HCl（pH 8.8），6 mol/L Urea，30%（v/v）甘油，2% SDS 和痕量溴酚蓝）平衡 15 min，再于平衡液Ⅱ（25 mg/ml 碘乙酰胺代替平衡液Ⅰ中的 DTT）平衡 15 min。胶条移置 1 mm 厚 12.5% SDS 均匀胶上端，0.5% 琼脂糖封胶。SDS-PAGE 在 SE600 电泳仪（Amersham Pharmacia）中进行 10 Ma/胶电泳 15 min 换用 25 mA/胶，直到溴酚蓝达到胶底线近 1 cm 处。为确定蛋白点的分子量，SDS-PAGE 时，加入低分子量 Marker。

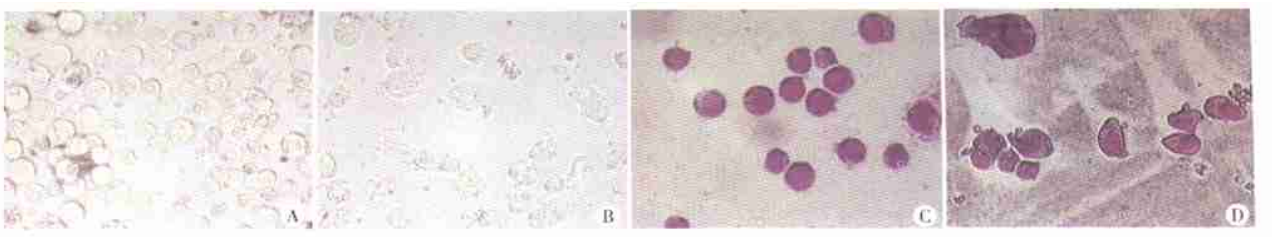
1.2.5 考马斯亮蓝染色 参照文献[8] 进行。

1.2.6 图像采集和分析 ImageMaster VDS-CL（Amersham Pharmacia）对双向电泳凝胶扫描，数字化图像文件运用 ImageMaster 2D Elite 软件（Amersham Pharmacia）分析。图像分析包括蛋白点的检测、背景扣除和点的匹配，以及等电点和分子量的校准。蛋白匹配以未分化细胞的凝胶图像作为参考胶。

2 结果

2.1 诱导分化前后细胞形态和细胞核的变化

未分化 HL60 细胞倒置显微镜下呈圆形，诱导分化后细胞表面伸出突起，细胞呈多形状。细胞经瑞氏 Giemsa 染色，未分化细胞核大，核/浆比大；诱导分化后细胞核相对缩小，核/浆比小，见图 1。



A: Untreated HL cells under an invert microscope; B: HL60 cells after 2×10^{-7} mol/L retinoic acid treatment for 96 h under an invert microscope; C: Giemsa-stained untreated HL cells, showing their nuclei; D: Giemsa-stained HL60 cells after retinoic acid treatment

图 1 分化肿瘤细胞的形态变化 （Giemsa×400）

Fig 1 Morphology of HL60 cells with or without retinoic acid treatment （Giemsa×400）

2.2 NBT 阳性率

正常中性粒细胞由于细胞内磷酸戊糖旁路活跃，在 TPA 的激发下，致使过氧化物产生增多，将可溶性的淡黄色 NBT 还原为不溶性蓝色颗粒，沉积于细胞浆内。而未分化肿瘤细胞则不具备这种氧化还原能力。在 HL60 细胞分化诱导实验中，NBT 还原反应是判断分化的常用标准。2×10^{-7} mol/L ATRA 诱导 HL60 96 h 后 NBT 阳性率（94±5.6）%，未分化肿瘤细胞 NBT 阳性率（4±1.0）%。

2.3 双向电泳结果

分化和未分化细胞蛋白质的双向电泳考马斯亮蓝染色图谱见图 2A、B，未分化细胞图谱图像分析后检测到 455 个蛋白点，分化细胞检测到 323 个。蛋白点等电点和分子量分布范围广，但在分子量 25～66×10^3 区域较丰富。对两张电泳图进行匹配比较，发现有 7 个蛋白点明显只未分化细胞检测到表达，而分化细胞未检测到；有 14 个蛋白点只在分化细胞检测到，差异蛋白点图 2（C，D）标出，所标数字为蛋白点编号。

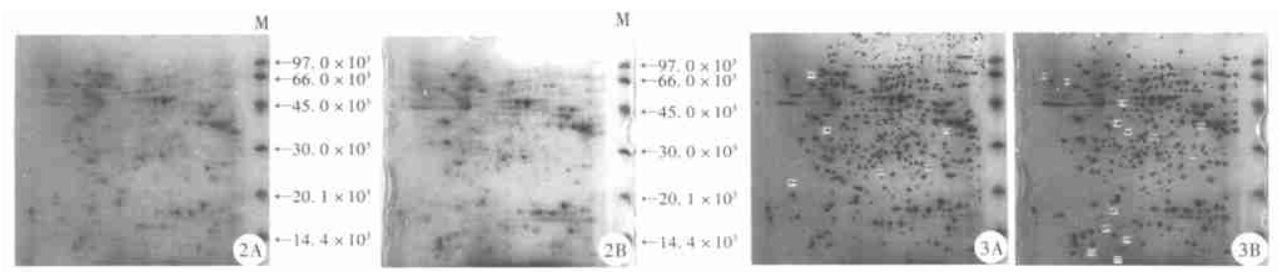


图 2 HL60 未分化（A）和分化（B）细胞总蛋白的双向凝胶电泳图谱（考马斯亮蓝染色）

Fig 2 Two-dimensional electrophoresis of total proteins from undifferentiated （A） and differentiated HL 60 cells （B）（Coomassie brilliant blue staining）

图 3 HL60 未分化（A）和分化（B）细胞蛋白质的差异表达谱，图中所标点为部分差异蛋白点，方框内数字为蛋白点编号

Fig 3 Differential expressions of total proteins from undifferentiated （A） and differentiated HL 60 cells （B） Spots of differential proteins are marked and numbered in the panes

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

用维甲酸体外诱导白血病细胞分化, Geary SM 和 Charbonnier A 等发现增强了体外刺激 CTL 的能力, 细胞表面分子 MHC Ⅱ、CD11、CD80 和 CD86 等表达增加[9,10]; 维甲酸通过 RAR/RXR 调节途径, 诱导下游多种基因的转录表达。研究维甲酸诱导分化后细胞蛋白表达变化, 以前的作者均是检测已知的某种或某几种基因转录或表达情况[1~3]。而高分辨率的双向电泳技术从整体水平分析细胞全蛋白的表达情况, 是近年蛋白质组研究的主要研究方法之一。本研究获得较好的双向电泳图谱, 并通过软件分析筛选了部分差异表达蛋白点, 为进一步鉴定这些蛋白奠定了基础。

参考文献:

[1] Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Change in susceptibility to Fas-mediated apoptosis during differentiation of HL-60 cells[J]. J Leukoc Biol, 2000, 67(3): 374—380.

[2] Sjogren F, Stendahl O, Ljunghusen O. The influence of retinoic acid and retinoic acid derivatives on beta2 integrins and L-selectin expression in HL-60 cells *in vitro*[J]. Inflammation, 2000, 24(1): 21—32.

[3] Xie P, Chan F S, Ip N Y, *et al*. IL-6 enhanced the retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells[J]. Cancer Lett, 2000, 148(2): 207—213.

[4] Kizaki M, Dawson M I, Heyman R, *et al*. Effects of novel retinoid X receptor-selective ligands myeloid leukiemia differentiation and proliferation *in vitro*[J]. Blood, 1996, 87(5): 1 977—1 984.

[5] Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients principles & methods[M]. Printed in the USA: Amersham Pharmacia Biotech Inc, 1998. 6—13.

[6] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1 037—1 053.

[7] Sanchez J C, Rouge V, Pisteur F, *et al*. Improved and simplified in—gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3—4): 324—327.

[8] 萨姆布鲁克, 弗里奇和曼尼阿蒂斯. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 885—886.

[9] Geary S M, Ashman L K. HL-60 myeloid leukaemia cells acquire immunostimulatory capability upon treatment with retinoic acid: analysis of the responding population and mechanism of cytotoxic lymphocyte activation[J]. Immunology, 1996, 88(3): 428—440.

[10] Charbonnier A, Gaugler B, Sainty D, *et al*. Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and against autologous leukemias[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(8): 2 567—2 578.

（编辑　王　红）

（上接 1152 页）

胸腔后张力低, 收缩无力, 同时纵隔胸膜关闭不足, 胸腔的负压作用又使胃扩张。

2.2.4　食管裂孔的位置偏左, 胃移入右胸后, 胃扩张可牵拉幽门, 引起幽门梗阻, 这也许是三切口术式 FDGE 的发生率高于经左胸术式的原因之一。

2.2.5　术中对胃壁过度牵拉, 搓捏, 使胃壁受损水肿, 影响胃的蠕动功能, 胸胃轴向扭转、营养不良, 原有胃下垂, 胃体过大、松弛等均影响术后胃的排空功能。

2.3　预防措施

食管癌术后 FDGE 是一种少见但较为严重的并发症, 重在预防, 我们的临床实践证实, 采取有效的预防措施能够避免 FDGE 的发生。

2.3.1　全部关闭纵隔胸膜, 将胃完全缩缝于食管床, 消除了胸腔负压对胃的影响, 去除了胃扩张的空间, 对胃体过大者, 适当拉回腹腔内。改良组 56 例绝大多数能够顺利进行全纵隔胸膜关闭, 仅有 2 例因肿瘤外侵, 切除部分纵隔胸膜, 无法直接缝合关闭, 而分别采用带蒂壁层胸膜和心包翻转缝合关闭。我们认为该法虽不能阻止出现 FDGE, 但去除了胃扩张的空间, 消除了胃极度扩张可导致的胃穿孔、吻合口瘘、呼吸衰竭等严重并发症, 是主要的预防手段。我院同期行非胸食管拔脱 35 例, 无 1 例 FDGE 发生。

2.3.2　常规行幽门成形或幽门肌层切开术, 解除术后短暂性幽门痉挛, 使胃内容物能顺利通过幽门部。

2.3.3　术中操作轻柔, 避免过多地挤压牵拉胃壁, 食管裂孔扩张至至少通过四指, 必要时剪开部分隔脚, 以免增加胃的排空阻力。

2.3.4　胸胃轴向勿扭转, 术后加强营养支持。

2.4　治疗

术后 3~5 d 肠功能恢复, 并不能说明胃功能已恢复, 若每天胃液量在 500 ml 以上, 不可贸然拔除胃管, 稳妥的办法是胃液量 300 ml/d 以下或口服亚甲蓝在尿液中排出, 说明胃功能完全恢复。本病属功能性病变, 一经确诊应及早进行积极非手术治疗, 主要有: 禁食水, 持续胃肠减压, 维持水电解质和酸碱平衡, 经十二指肠营养管滴注营养液, 耐心等待胃功能恢复。文献[5,6]报道一些胃肠动力药的应用对术后 FDGE 的治疗取得较好的效果, 如胃复安、吗丁啉、西沙比利、红霉素、新斯的明等。经积极内科治疗, FDGE 多在术后 3~4 周恢复, 其恢复常突然发生, 1~2 d 内引流液明显减少, 少于 300 ml/d 试行间歇夹管, 同时复查胸片或稀钡造影。只有经积极内科治疗无效, 在诊断上不能完全排除机械梗阻因素者, 才考虑再次手术探查。

关键词: 食管癌; 三切口术; 功能性胃排空障碍
中图法分类号: R735.105　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李国仁. 食管贲门癌切除术后并发症的手术处理[J]. 中华外科杂志, 1986, 24(10): 633—635.

[2] 答作为, 万国泰, 孙耀昌, 等. 食管癌术后功能性胃梗阻[J]. 第二军医大学学报, 1993, 14(1): 74—76.

[3] Livingston E H, Passaro E P. Postoperative ileus[J]. Dig Dis Sci, 1990, 35(1): 121—132.

[4] 潘瑞芹, 贾振庚, 刘德辉, 等. 手术后胃排空障碍[J]. 北京医学, 1989, 11(1): 15—17.

[5] 姚先弼. 消化道动力障碍和促动力药[J]. 中华消化杂志, 1992, 12(1): 63—64.

[6] 傅宝玉. 胃肠动力剂的药理及临床应用[J]. 辽宁医学杂志, 1998, 12(1): 16—17.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net