DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.024
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
928 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0928-03

芳香化酶对胶质瘤细胞系SHG-44细胞生长及分化的作用

肖 岚,蔡文琴,孙 榆 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 在人胶质母细胞瘤细胞系SHG-44细胞中检测到芳香化酶细胞色素P450(AROM)表达的基础上探讨AROM对胶质瘤细胞生长增殖及分化的作用。方法 通过构建反义AROM真核表达载体,转染SHG-44细胞,利用流式细胞仪、MTT法、免疫荧光染色及激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)等技术观察封闭AROM基因表达后细胞生长曲线、细胞周期及中间丝蛋白GFAP和Vimentin表达的变化。结果 成功构建了反义AROM真核表达载体PCI/as-AROM并使AROM的表达封闭达50%以上。SHG-44细胞在转染了PCI/as-AROM和空载体PCI-neo后,生长曲线、细胞周期无明显变化,但GFAP免疫荧光强度减弱而Vimentin免疫荧光强度增强。结论 反义AROM可能对SHG-44细胞增殖无明显影响但对神经胶质瘤细胞的分化有一定的抑制作用。

关键词:芳香化酶;胶质瘤细胞;细胞增殖;分化
中图法分类号:R345.49;R394.2;R730.264 文献标识码:A

Effects of aromatase on proliferation and differentiation of malignant glioma cell line SHG-44

XIAO Lan, CAI Wen-qin, SUN Yu (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cytochrome P450 aromatase gene on the growth, proliferation and differentiation of malignant glioma cell line SHG-44. Methods Gene recombination technique and gene transfection were used to block the expression of aromatase gene. Changes of cell growth curve, cell cycle and expressions of glial fibrillary acid protein (GFAP) and Vimentin were detected by flow cytometry, MTT method, immunofluorescent staining and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Results Antisense aromatase mammalian expression vector PCI/as-AROM was constructed in success. The expression of aromatase was blocked in the cells (>50%) by gene transfection. No obvious difference was found between PCI/as-AROM and PCI-neo tranfected cells in growth velocity and proliferation cycle. The intensity of Vimentin immunofluorecence was increased, while the intensity of GFAP immunofluorescence was decreased. Conclusion Results suggest that antisense aromatase may be involved in inhibiting the differentiation of cell line SHG-44 but have no effect on cell proliferation.

Key words: aromatase; malignant glioma cells; proliferation; differentiation

芳香化酶细胞色素P450(Aromatase, AROM)又名雌激素合成酶,是细胞色素P450超家族中的一员。芳香化酶不仅存在于绝经后妇女的卵巢、胎盘及脂肪组织中,而且在中枢神经系统发育中有广泛表达[1]。现有的研究资料表明,AROM的表达与脑发育密切相关,而且可介入神经细胞的早期发育分化[2]。但在外周组织,AROM的表达常常与一些肿瘤如乳腺癌、肺腺癌的发生相关[3,4]。而AROM的表达与神经系统肿瘤是否相关?我们在以神经胶质母细胞瘤细胞系SHG-44为神经系统失分化状态的细胞模型研究中首次检测到AROM的基因表达(待发表),为了进一步探讨AROM对胶质瘤细胞的作用。本研究拟采用反义核酸技术,构建反义AROM真核表达载体,转染SHG-44细胞,观察封闭AROM基因表达后对细胞生长及分化的影响,进一步探讨AROM对神经肿瘤细胞发育分化的作用,丰富对脑AROM的认识。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870274);重庆市科委应用基础研究资助项目(2001)
作者简介:肖 岚(1967-),女,云南省昆明市人,博士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752229
收稿日期:2002-05-08;修回日期:2002-07-20

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 人恶性胶质母细胞瘤细胞株SHG-44 由本校附属西南医院病理研究所卞修武教授提供。

1.1.2 质粒与菌株 含有小鼠卵巢AROM开放阅读框860 bp的质粒PUC119,由日本Harada教授惠赠。真核表达载体选用PCI-neo,含Amp抗性及neo抗性基因。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建 按常规基因亚克隆技术操作。用*EcoR*Ⅰ从PUC119质粒中将860 bp的AROM片段切下并连接于真核表达载体PCI-neo中,用*xho*Ⅰ、*BamH*Ⅰ对重组质粒插入方向进行鉴定并筛选出反向重组子。

1.2.2 基因转染及抗性克隆筛选 在6孔培养板中,每孔接种2×10^{5}个细胞,37 ℃培养细胞至50%~80%融合时采用基因转染试剂FuGENETM 6 Transfection Reagent(BM公司)分别进行PCI/as-AROM表达质粒及空质粒PCI-neo转染(方法按说明书)。转染48 h后,按1∶8将细胞传代,待其贴壁后加入G418(600 μg/ml)的选择培养基培养4周(同时设立未转染细胞为对照),3~4 d换液1次,观察抗性克隆生长情况。待抗性克隆出现后挑取细胞克隆扩增。分别对PCI/as-AROM表达质粒及空质粒转染细胞进行以下检测。

1.2.3 转染细胞的AROM表达 收集对照细胞及转染细

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

胞, 用 75% 乙醇固定 30 min 后进行 AROM 免疫荧光染色, 一抗 AROM 抗血清(1∶100), 二抗 FITC 标记的兔抗鼠 IgG(1∶100)。细胞洗涤后进行 FCM 检测, 计数 1 万个细胞中 AROM 的平均荧光强度。每组样本量 2 瓶, 重复 2 次。结果进行双样本 χ^2 检验统计学处理。

1.2.4　细胞形态观察　　常规倒置显微镜和 HE 染色。

1.2.5　细胞生长曲线　　参照文献[5]进行, 以时间为横轴, 细胞吸光值为纵轴绘制细胞生长曲线。

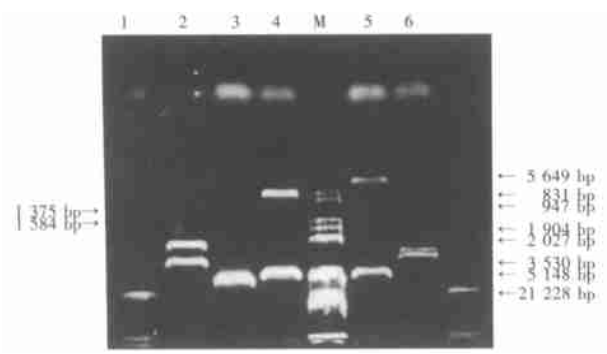
1.2.6　细胞周期　　收集培养细胞, 70% 冷酒精固定, 0.01% PBS 漂洗后以含 1% RNA 酶的碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色 30 min, 进行 FCM 检测。

1.2.7　免疫荧光染色　　采用间接免疫荧光法。抗 GFAP(1∶100), 抗 Vimentin(1∶100), 37 ℃孵育 1 h, FITC 标记二抗 37 ℃ 30 min, 各步骤间用 PBS(pH 7.2)充分漂洗, 磷酸甘油封片, 于 Leica TCS NT 激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察摄片并进行荧光强度半定量检测, 每组重复 3 次, 结果进行 χ^2 检验统计学处理。

2　结果

2.1　反义 AROM 真核表达载体的成功构建

可疑重组子经 *EcoR*Ⅰ酶切后能释放出 860 bp 的目的片段, 为阳性重组子。再进一步用 *xho*Ⅰ和 *BamH*Ⅰ分别酶切, 根据酶切图谱, 切下的不同的片段可鉴定出 AROM cDNA 的插入方向, 如图 1 所示, 正向重组子经 *xho*Ⅰ切成 700 bp 和 5.63 kb 两片段, 经 *BamH*Ⅰ切成 3.0 kb 和 3.3 kb 两片段。而反义重组子经 *Xho*Ⅰ切成 160 bp 和 6.18 kb 两片段; 经 *BamH*Ⅰ切成 3.9 kb 和 2.4 kb 两片段。将所获得的反义重组子命名为 PCI/as-AROM。



1: Recombinated plasmid; 2: Anti-sense recombinant digested with *BamH*Ⅰ; 3: Anti-sense recombinant digested with *Xho*Ⅰ; 4: Anti-sense recombinan digested with *EcoR*Ⅰ; M: Mark(digested with λDNA/*Hind*Ⅲ+ *EcoR*Ⅰ); 5: Sense recombinant digested with *Xho*Ⅰ; 6: Sense recombinant digested with *BamH*Ⅰ

图 1　重组质粒鉴定

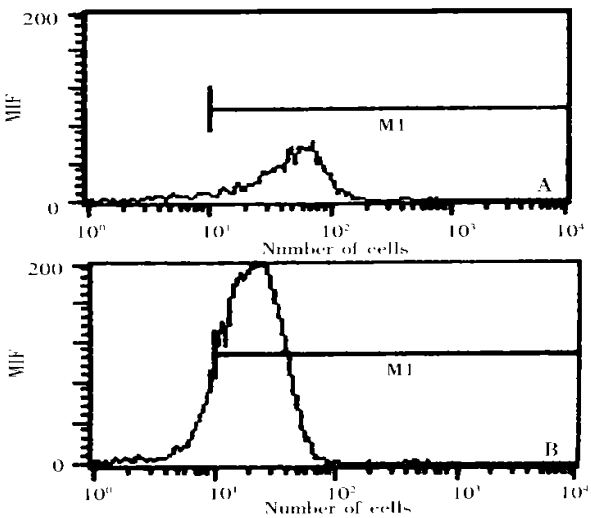
Fig 1　Identification of recombinant plasmids

2.2　基因转染后抗性克隆的筛选

通过 FuGENETM 6 Transfection Reagent 转染, 经 G418 选择培养基培养 7 d 后, 对照细胞全部死亡, 实验组有零星成活的细胞, 14 d 左右可见细胞克隆形成。继续选择培养 10 d 后, 挑取单个克隆扩增培养进行检测。

2.3　基因转染后 AROM 表达的检测结果

FCM 结果显示, 反义组和空载体组 AROM 的阳性细胞数都在 90% 左右, 无显著性差异。但平均荧光强度, 反义组为 23.5±3.8, 而空载体组为 54.1±6.3, 可见 AROM 的表达, 反义组明显低于空载体组 50% 以上($P<0.01$), 见图 2, 表明封闭有效。



A: Cells transfected with PCI-neo; B: Cells transfected with PCI/as-AROM; M1: Mark of positive reaction

图 2　基因转染后 SHG-44 细胞 AROM 的表达的 FCM 检测

Fig 2　Expressions of aromatase in SHG-44 cells with gene transfection(FCM)

2.4　基因转染对 SHG-44 细胞的影响

2.4.1　形态学观察　　倒置显微镜及 HE 染色下可见各组细胞呈长梭形, 可呈团生长, 两组转染细胞之间形态上未见明显变化。

2.4.2　生长曲线　　图 3 所示, 坐标横轴为时间(d), 纵轴为细胞吸光度值(*A*, 波长为 490 nm), 代表活细胞的数量。可见 SHG-44 细胞在转染了 PCI/as-AROM 和空载体 PCI-neo 后, 生长规律和速度无明显变化。

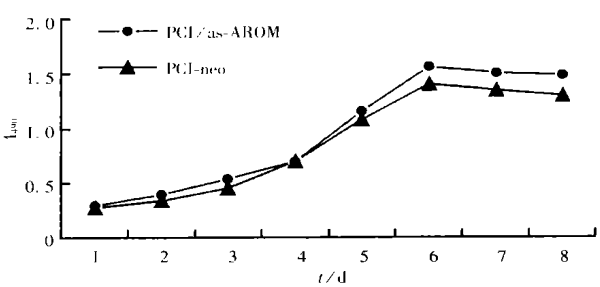


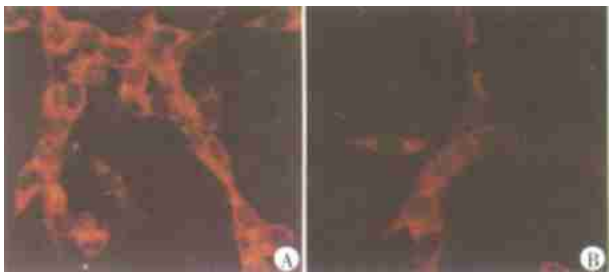
图 3　细胞生长曲线

Fig 3　Growth curve of cells　(wave length of 490 nm)

2.4.3　细胞周期　　FCM 检测结果显示, 转染了反义载体和空载体的 SHG-44 细胞的增殖指数[PI=(S+G_2M)/(G_0/G+S+G_2M)]为 31.3%, 而空载体组的 PI 为 31.1%, 二者无显著性差异($P<0.01$)。可见, 两组细胞的细胞周期无明显变化。

2.4.4　转染细胞的 GFAP 和 Vimentin 的免疫荧光观察和半定量。反义载体转染组和空载体转染组的 SHG-44 细胞中均可见绿色免疫荧光, 主要定位于胞质和细胞突起。但 GFAP 的免疫荧光强度较弱, 经 CLSM 半定量测定, 反义组荧光强度较空载体组减弱, 由 42.5±23.6 降为 35.8±20.3($P<0.05$), 见图 4A、B。而 Vimentin 免疫荧光呈强阳性, 经 CLSM 半定量测定, 反义组荧光强度较空载体组明显增强, 由 65.9±38.6 增加到 82.9±43.8($P<0.05$), 见图 5A、B。

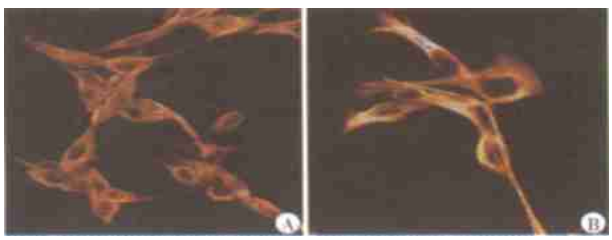
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Cells transfected with PCI-neo; B: Cells transfected with PCI/as-AROM

图 4 基因转染 **SHG-44** 细胞的 **GFAP** 免疫荧光染色 (CLSM× 500)

Fig 4 Immunofluorescence staining of GFAP in SHG-44 cells with gene transfection (CLSM× 500)



A: Cells transfected with PCI-neo; B: Cells transfected with PCI/as-AROM

图 5 基因转染 **SHG-44** 细胞的 **Vimentin** 免疫荧光染色 (CLSM× 500)

Fig 5 Immunofluorescence staining of Vimintin in SHG-44 cells with gene transfection (CLSM× 500)

3 讨论

SHG-44 细胞系源于人脑胶质母细胞瘤, 传至 100 代后仍能稳定生长。有研究表明 SHG-44 细胞存在 p24ras、c-erbB、EGF、BFGF 等细胞因子及 P16、P53 等肿瘤蛋白异常表达和细胞周期失控, 使其生长旺盛、增殖活跃, 具有很高的恶性表型[6]。关于芳香化雌激素与神经系统肿瘤细胞的相关性, 我们首次发现了 AROM 及 ER 在 SHG-44 中有表达, 并进一步证明多个 AROM 启动子的同时利用可能是导致 AROM 高表达的主要原因之一(待发表)。这一点和乳腺癌等肿瘤细胞类似, 它们是否同属一类肿瘤目前尚未见文献报道。为了探讨 AROM 的基因表达对 SHG-44 细胞生长增殖及分化的影响, 本实验采用反义核酸技术将重组的反义 AROM 真核表达质粒利用基因转染试剂 FuGENETM 6 将其导入 SHG-44 细胞, 获得能稳定表达 AROM asRNA 的细胞, FCM 检测结果显示反义质粒转染组细胞 AROM 的表达明显下降(> 50%), 说明反义封闭是有效的, 所获得的转染细胞为后续实验提供了良好的细胞模型。

研究表明, 在雌激素依赖性肿瘤中, 癌细胞局部表达的芳香化酶能促进癌细胞本身的生长。例如, 向稳定表达芳香化酶的乳腺癌 MCF-7 的工程细胞株的细胞培养液中加入 AROM 的催化底物雄激素, 可以促进这一工程细胞株的生长, 而这一促进作用可以被芳香化酶抑制剂所消除[7]。但关于 AROM 基因对正常或肿瘤细胞周期调控的研究目前尚未见文献报道。本实验采用稳定表达 AROM asRNA 的 SHG-44 细胞模型为研究对象, 同转染了空载体的细胞比较, 结果二者之间的细胞生长曲线及细胞周期均未见明显改变, 提示在神经系统肿瘤细胞中 AROM 的作用与外周肿瘤有所不同, 可能不是促癌细胞生长的主要因素, AROM 的表达与细胞周期调控蛋白之间可能也无明显的相关性。同时, 也进一步提示, 神经胶质母细胞瘤与乳腺癌等雌激素依赖性肿瘤可能不属于同一类。当然, 由于该实验采用的反义核酸技术并不能完全封闭 AROM 的表达, 故不能完全反映该基因的完整特性。而且 SHG-44 细胞仅是神经胶质肿瘤的一个细胞系, 也不能完全反映肿瘤本身的特性, 不过, 目前为止, 还尚未见 AROM 基因表达与神经系统肿瘤的发生、发展密切相关的文献。

就 SHG-44 细胞分化状态来看, 中间丝蛋白与其密切相关。研究表明, SHG-44 细胞中, GFAP 免疫反应弱阳性, 而 Vimentin 免疫反应强阳性, 它们在胞质、胞突中具有很高的共同表达率, 且二者的表达水平在星形细胞肿瘤分化和恶变过程中呈现相反的趋势。所以, GFAP 及 Vimentin 的表达可以作为判断 SHG-44 细胞分化的主要指标[6]。鉴于此, 本研究通过观察 AROM 基因封闭后, SHG-44 细胞中 GFAP 和 Vimentin 表达的变化来探讨 AROM 基因表达对 SHG-44 细胞分化的作用。结果显示, 转染了反义载体的细胞较转染了空载体的细胞 Vimentin 免疫荧光增强, 而 GFAP 免疫荧光减弱, 提示反义 AROM 在一定程度上可以抑制 SHG-44 细胞的分化。有研究表明雌激素(E_2)能诱导星形胶质细胞的分化, 使未成熟的胶质细胞表达 GFAP 和 MBP(髓磷脂碱性蛋白)[8]。因此作者推测 SHG-44 中 AROM 的作用可能类似于 E_2 对神经胶质细胞的促分化作用, 其确切的机制还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Naftolin F. Brain aromatization of androgens[J]. J Repord Med, 1994, 39(4): 257-261.

[2] 肖 岚, 李 巍, 蔡文琴 等. 芳香化酶在神经干细胞及其早期分化中的表达[J]. 解剖学报, 2000, 31(Suppl): 118-121.

[3] Lu Q, Naakmuraa J, Savinov A, *et al*. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers[J]. Endocrinology, 1996 137(7): 3 061-3 065.

[4] 周向东, 蔡文琴. 芳香化酶 P450 mRNA 在肺癌和胚胎肺组织中的表达及其意义[J]. 中国肺癌杂志, 2000, 13(4): 269-271.

[5] 司徒镇强 主编. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司北京分公司, 1996. 186-187.

[6] 卞修武, 陈自强, 郭德玉, 等. 人脑胶质母细胞瘤细胞系 SHG-44 中血管生成因子和细胞周期调控因子的表达[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 178-181.

[7] Brodie A, Lu Q, Long B. Aromatase and its inhibitors[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999, 69(1-6): 205-211.

[8] 郭畹华. 星形胶质细胞[A]. 见蔡文琴, 李海标 主编. 发育神经生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 149-150.

(编辑 郭建秀)

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