DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.017
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0661-03

论著

视黄酸对横纹肌肉瘤细胞分化及生肌调节因子表达的影响

叶 鑫[1],王东林[1],邢 茂[2] (第三军医大学附属新桥医院:[1]全军肿瘤中心;[2]药局;重庆 400037)

提 要:目的 观察视黄酸对人横纹肌肉瘤细胞的诱导分化作用及对生肌调节因子(MRF)表达的影响。方法 以10^{-6} mol/L全反式维甲酸(ATRA)处理人横纹肌肉瘤细胞RD和A673,用免疫细胞化学检测横纹肌肌球蛋白重链和肌动蛋白α-actin表达,用原位杂交检测生肌调节因子MRF4、MyoD mRNA表达,并观察细胞生长曲线变化。结果 ATRA作用后,RD、A673细胞肌球蛋白重链和α-actin表达增强,MRF4和MyoD mRNA表达上调,细胞生长受抑。结论 ATRA具有促进横纹肌肉瘤细胞分化的作用,其作用可能与MRF表达上调有关。

关键词:视黄酸;横纹肌肉瘤;诱导分化;生肌调节因子
中图法分类号:R329.28;R346.2;R738.7 文献标识码:A

Effects of retinoic acid on the differentiation of human rhabdomyosarcoma cells and expression of myogenic regulatory factor

YE Xin, WANG Dong-lin, XING Mao (Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effects of retinoic acid on the differentiation of human rhabdomyosarcoma cells and on the expression of myogenic regulatory factor (MRF). Methods Human rhabdomyosarcoma cell line RD and A673 were treated with 10^{-6} mol/L all-tans retinoic acid (ATRA). The expressions of myosin heavy chain (MHC) and α-action in the cells were determined with immunocytochemical method and the expression of myogenic regulatory factors MRF4 and MyoD mRNA were studied with in situ hybridization. The cell growth curve was observed at the same time. Results The expression of MHC and α-action were increased in RD and A673 cells after treated with ATRA, while the expressions of MRF4 and MyoD mRNA were up-regulated and cell growth was suppressed. Conclusion ATRA can induce the differentiation of RD and A673 cells and inhibit the cell growth *in vitro*, which might be associated with the up-regulated expression of MRF.

Key words: retinoic acid; rhabdomyosarcoma cell; differentiation; myogenic regulation factor

横纹肌肉瘤是一种好发于儿童和青少年的肌源性恶性肿瘤,遗传学分析提示其具有特异的染色体异常,是由于多种重要的细胞生长调节基因功能失调的结果[1,2]。生肌调节因子(Myogenic regulatory factors, MRF)是一类具有共同生物学特性的肌肉基因专一转录调节因子,其表达对成肌细胞向肌细胞定向分化起重要作用,被认为是肌发生过程中决定向肌细胞定向分化的主导基因。视黄酸为维生素A衍生物,是一种细胞分化诱导剂。研究证实,视黄酸除了可诱导白血病细胞分化外,也具有诱导实体瘤细胞分化的作用。本实验通过视黄酸诱导横纹肌肉瘤细胞分化,观察其对生肌调节因子表达的影响,初步探讨视黄酸促进横纹肌肉瘤细胞分化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 cDNA探针制备

含MRF4 cDNA的表达质粒为美国Ludwig癌症研究所Cavenee教授惠赠,探针全长为1.2 kb;含MyoD cDNA的表达质粒为加拿大McMaster大学Rudnicki教授惠赠,探针全长为1.785 kb。按常规方法进行质粒的提取及纯化,根据cDNA在质粒的克隆位点酶切、电泳、洗脱、回收片断后,地高辛(DIG)标记探针。DIG标记、检测试剂盒购自博士德公司,按说明使用。

1.2 抗体

抗横纹肌肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)单抗和抗横纹肌肌动蛋白α-actin单抗为肌丝A带蛋白专一抗体(购自Sigma公司)。

1.3 细胞培养和ATRA处理

人横纹肌肉瘤细胞株RD、A673(购于上海细胞所细胞库)用含15%小牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素RPMI 1640(Hyclone产品)培养基,置于37 ℃,5% CO_2的孵育箱中培养。细胞接种24 h后,加入ATRA(Sigma产品)连续处理1周,终浓度为10^{-6} mol/L,3 d换液,4~5 d传代。

1.4 免疫细胞化学

采用常规ABC法。收集培养皿盖片培养经ATRA处理1周后细胞,用丙酮固定20 min,正常血清封闭20 min后,与一抗反应,一抗工作浓度1∶200。阴性对照以PBS代替一抗。

1.5 细胞原位杂交

cDNA探针杂交常规方法[3]。收集细胞,用4%多聚甲醛固定30 min后进行杂交。阴性对照设:①不加探针;②先用未标

基金项目:全军"九五"青年科研基金资助课题(96Q068)
作者简介:叶 鑫(1967—),男,四川省资中市人,硕士,医师,主要从事肿瘤分化调控方面的研究。电话:(023)68755424
收稿日期:2000-03-21;修回日期:2000-09-15

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

记探针杂交，再用标记探针杂交；③先用 RNA 酶破坏细胞 RNA 再进行杂交。

1.6 细胞生长曲线

用 24 孔板每孔以同样密度（1×10^5/ml）接种 0.2 ml，每日取 3 孔计数取平均值，绘制生长曲线。

1.7 结果判断

在排除非特异染色的情况下，原位杂交以胞浆内出现淡蓝色颗粒为阳性。免疫细胞化学以细胞浆呈现蓝紫色为阳性，计数高倍视野 40 个细胞作半定量图像分析。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用统计分析软件包 STAT 5.0 进行 t 检验。

2 结果

2.1 ATRA 对人横纹肌肉瘤细胞生长的影响

ATRA 可抑制人横纹肌肉瘤细胞 RD、A673 生长，见图 1，处理后细胞生长曲线变平，在第 3 天 ATRA 抑制细胞生长作用最明显。

倒置显微镜活细胞观察发现，经过 ATRA 处理后细胞排列出现较为一致的趋向性，部分细胞呈现向多核肌管样融合发展。

2.2 细胞分化表型的表达

RD、A673 经过 ATRA 处理后，免疫组化显示其表达分化标志蛋白肌球蛋白重链（MHC）和肌动蛋白 α-actin，细胞胞浆染色呈蓝色。而未经 ATRA 处理的 RD 细胞几乎不表达 MHC 和 α-actin；A673 细胞也未见明显的 MHC 和 α-actin 两种蛋白的表达，细胞胞浆不染色，经统计学分析差异有显著性，见图 2、表 1。

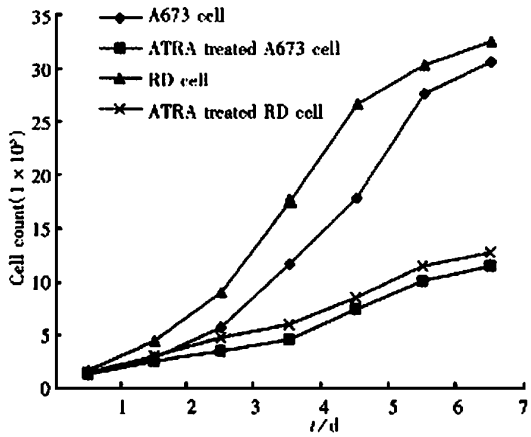


图 1 细胞生长曲线图

Fig 1 Growth curves of the cell line

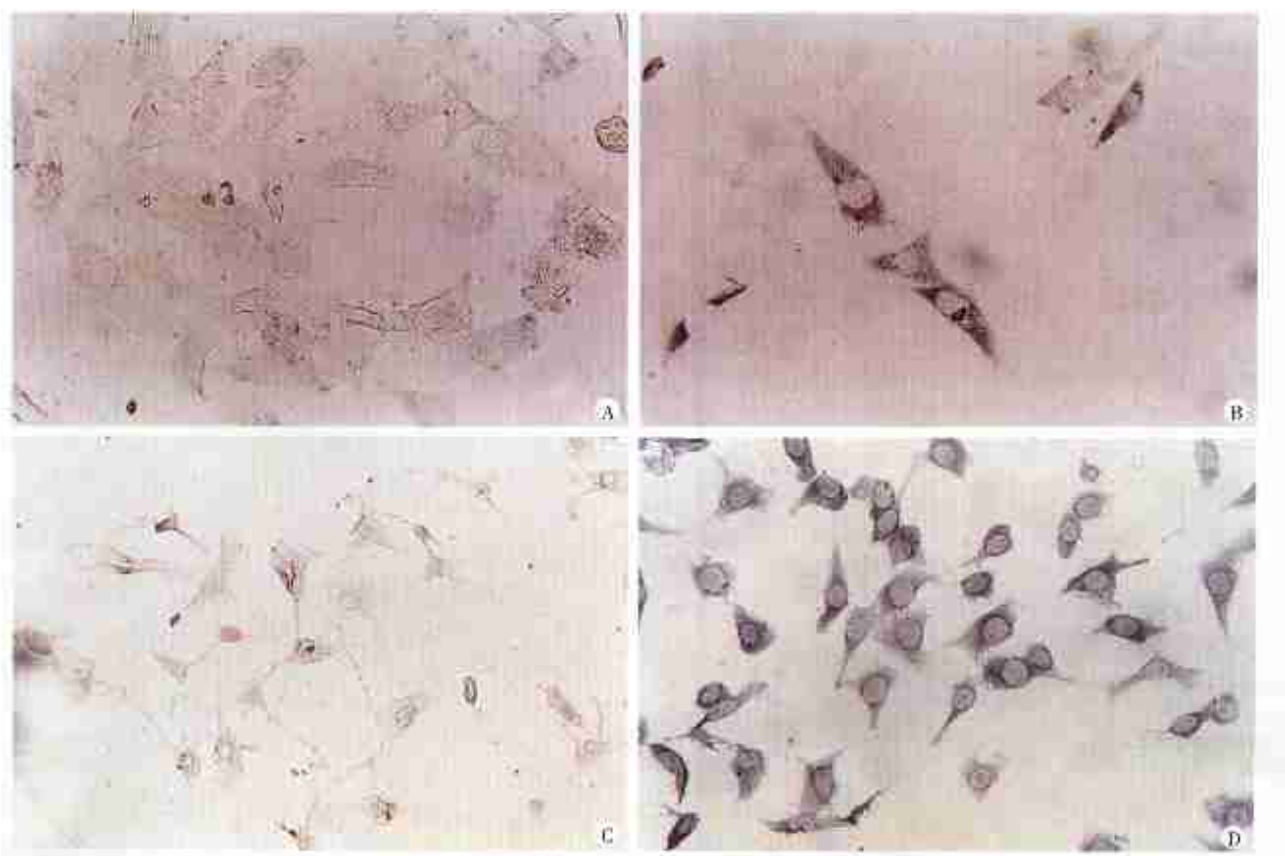


图 2 2A：正常 RD 细胞 MHC 阴性表达；2B：ATRA 处理后 RD 细胞 MHC 阳性表达；2C：正常 A673 细胞 MHC 阴性表达；2D：ATRA 处理后 A673 细胞 MHC 阳性表达 （ABC× 100）

Fig 2 2A: Negative expression of MHC in normal RD cell; 2B: Positive expression of MHC in RD cell treated with ATRA; 2C: Negative expression of MHC in normal A673 cell; 2D: Positive expression of MHC in A673 cell treated with ATRA （ABC× 100）

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

表 1　细胞胞浆染色平均积分光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of cytoplasm optical density in cells with immunohistochemical stain ($\bar{x}\pm s$)

		MHC	α-actin
RD	Control	18.25±2.37	19.31±4.89
	Treated	49.17±6.12 *	57.23±7.17 *
A673	Control	17.16±1.97	16.82±1.78
	Treated	46.24±5.16 *	55.36±6.83 *

*: $P<0.01$ *vs* control

2.3　ATRA 对 MRF4 及 MyoD 表达的影响

RD、A673 经过 ATRA 作用后, MRF4 和 MyoD mRNA 表达上调。原位杂交显示, 未经过 ATRA 处理的 A673 细胞未见明显的 MRF4 及 MyoD mRNA 信号表达, RD 细胞仅弱表达 MyoD 而未见明显的 MRF4 mRNA 表达。经过 ATRA 处理的细胞有较强的 MRF4 和 MyoD mRNA 信号表达, 胞浆多量紫蓝色颗粒沉着, 越靠近核膜处杂交信号越强, 见图 3。

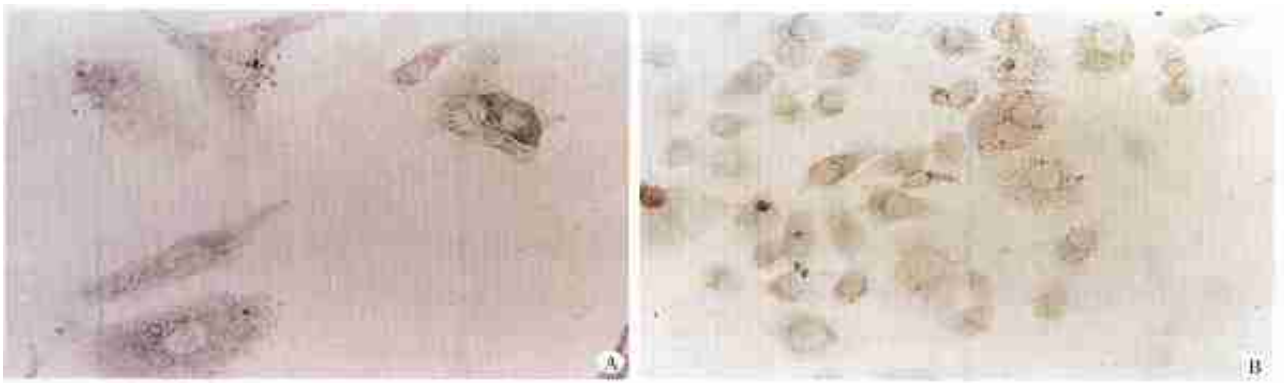


图 3　3A: ATRA 处理后 RD 细胞 MRF4 mRNA 阳性表达; 3B: ATRA 处理后 A673 细胞 MRF4 mRNA 阳性表达　(原位杂交× 200)

Fig 3　3A: Positive expression of MRF4 mRNA in RD cell treated with ATRA; 3B: Positive expression of MRF4 mRNA in A673 cell treated with ATRA　(*in situ* hybridization× 200)

3　讨论

细胞分化的主要标志是合成细胞特异性的功能蛋白, 并出现相应形态和功能及生物学行为改变。横纹肌肉瘤在向肌细胞分化过程中可表达功能蛋白肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)和肌动蛋白 α-actin[4], 是横纹肌肉瘤细胞分化的重要标志。过去研究发现视黄酸诱导分化主要通过受体机制、酶学机制、免疫增强机制起诱导分化作用[5,6]。本实验结果提示视黄酸可诱导横纹肌肉瘤细胞分化, 使其表达特异功能蛋白 MHC 和 α-actin, 抑制细胞生长, 并可上调 MRF4 及 MyoD mRNA 表达。

生肌调节因子是肌肉基因特异转录调节因子, 在发育过程中可决定肌细胞定向分化, 被认为是决定肌细胞分化的主导调控基因, 它的表达可使包括成纤维细胞在内的许多细胞向成肌细胞转化[7,8]。本实验采用 cDNA 探针与生肌调节因子 mRNA 进行杂交, 结果证实在 ATRA 诱导横纹肌肉瘤细胞向正常肌细胞分化过程中可上调生肌调节因子 MyoD、MRF4 表达。Wasserman 等[9] 报道, 双丁酰环腺苷酸作用 RD 细胞可诱导细胞分化, 但对 MRF4 及 MyoD 表达影响不明显, 提示 ATRA 诱导横纹肌肉瘤细胞分化的调节途径可能有别于双丁酰环腺苷酸的作用途径, 这进一步证实细胞分化调节是多因素、多途径的。生肌调节因子在横纹肌肉瘤细胞的不表达或弱表达, 从而不能激活肌肉基因的表达、细胞分化受阻, 可能与 MRF 的功能受抑或其下游基因启动失活有关[10]。细胞分化伴随细胞从细胞周期退出、细胞 G_0 期阻滞、以及特异基因的表达, 在整个过程中细胞可受到细胞周期调节蛋白、信号转导等多种因素的调节。本实验结果显示视黄酸在诱导横纹肌肉瘤细胞分化时 MRF 表达上调, 提示视黄酸对横纹肌肉瘤细胞的诱导分化作用与 MRF 的表达上调可能有关, 其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Pappo A S, Shapiro D N, Crist W M, *et al*. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma[J]. J Clin Oncol, 1995, 13(8): 2 123—2 139.

[2] Prowse O A, Reddy P R, Barrieras D, *et al*. Pediatric genitourinary tumors[J]. Curr Opin Oncol, 1998, 10(3): 253—260.

[3] 蔡文琴, 王伯彝云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.401—427.

[4] 韩　锐 主编. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997.342—346.

[5] 刘　卫, 房殿春. 维甲类化合物诱导肿瘤细胞分化研究进展[J]. 国外医学: 内科学分册, 1996, 23(4): 160—163.

[6] 糜漫天, 张乾勇, 朱俊东. 视黄酸诱导细胞分化分子机制的研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1998, 20(1): 17—22.

[7] Filvaroff E H, Derynck R. Induction of myogenesis in mesenchymal cells by MyoD depends on their degree of differentiation[J]. Dev Biol, 1996, 178(2): 459—471.

[8] 王东林, 毛宝龄. 生肌调节因子及其作用机理[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1995, 17(4): 157—160.

[9] Wasserman LM, Newsham I, Su Huang H J, *et al*. cAMP effects on myogenic gene expression in rhabdomyosarcoma cells[J]. Exp cell Res, 1996, 227(1): 56—62.

[10] Tapscott S J, Thayer M J, Weintraub H. Deficiency in rhabdomyosarcoma of a factor reqired for MyoD activity and myogenesis[J]. Science, 1993, 259(5 100): 1 450—1 453.

(编辑　薛国文)

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