DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.008
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
264 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0264-04

人恶性胶质瘤细胞系CHG-5和SHG-44细胞骨架的比较研究

赵 雯,卞修武,史景泉,卢佳友,陈自强 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 比较人恶性胶质瘤细胞系CHG-5和SHG-44的细胞骨架系统成分,以进一步了解胶质瘤细胞骨架特征与其分化程度的关系。方法 利用免疫荧光细胞化学染色结合激光共聚焦显微镜观察两种细胞系微管、微丝、中间丝的含量及分布,并比较几种常用固定剂和缓冲液对各骨架成分检测的影响。结果 除微管和微丝均被染色外,所有细胞均表达Vimentin(波形蛋白),而只有部分细胞呈胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性。微管及中间丝在两种细胞胞质中的分布特征基本相似,但两种细胞微丝的定位、分布及荧光强度有一定差异。Vimentin型中间丝在SHG-44细胞中表达较强,而GFAP在CHG-5细胞中表达较强。丙酮、75%酒精和4%多聚甲醛对微管的固定效果较好;用醛类固定后中间丝(尤其是Vimentin)染色极弱。结论 CHG-5分化程度较SHG-44高,两种细胞系细胞骨架状态的差异可能是二者生物学特性差异的结构基础。

关键词:胶质瘤;细胞培养;细胞骨架;激光共聚焦显微术
中图法分类号:R329.24;R730.264 文献标识码:A

Comparative study on cytoskeleton of human glioma cell line CHG-5 and SHG-44 *in vitro*

ZHAO Wen, BIAN Xiu-wu, SHI Jing-quan, LU Jia-you, CHEN Zi-qang (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the cytoskeleton components between human glioma cell line CHG-5 and SHG-44. Methods The contents, distribution and fluorescent intensity of microtubules (MTs), microfilaments (MFs) and intermediate filaments (IFs) in the 2 cell lines were detected with immunofluorescence cytochemistry and confocal laser scanning microscopy. The effects of several common fixatives and buffers on every component of cytoskeleton were also studied. Results Besides MTs and MFs, vimentin was expressed in all CHG-5 and SHG-44 cells. Glial fibrillary acid protein (GFAP) positive was only found in a small proportion of the cells. The distributions of MTs and IFs in the cytoplasm were quite similar in both cell lines, but the locations, distributions and fluorescent intensities of MFs were different to some extent. The fluorescent intensity of vimentin was stronger in SHG-44 cells than in CHG-5 cells, and more GFAP-positive cells were found in CHG-5 cell line than in SHG-44. The fixatives, 75% ethanol, acetone and 4% paraformaldehyde (4%PFA) gave satisfactory results for MTs immunostaining, but the staining for IFs became weakened or negative after 4% PFA fixation. Conclusion The results suggest that human glioma cell line CHG-5 has a better differentiation than cell line SHG-44. Their differences in biological characteristics might base on their varied states of cytoskeleton.

Key words: glioma; cell culture; cytoskeleton; confocal laser scanning microscopy

转化细胞、肿瘤细胞的细胞骨架与正常细胞存在差异,并与肿瘤细胞的恶性行为如无限生长、侵袭和转移等相关[1]。其中Vimentin(波形蛋白)、胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acid protein, GFAP)两种中间丝蛋白,在星形细胞的不同发育和分化阶段以及星形细胞源性肿瘤中呈现不同的表达特征。我们既往研究发现,本室建立的人恶性胶质瘤细胞系CHG-5与国内常用的胶质瘤细胞系如SHG-44在某些生物学特性以及分化特征方面存在一定差别[2]。为进一步了解造成这种差异的物质基础,加深对胶质瘤细胞骨架状态与分化程度关系的认识,本研究对两种人恶性胶质瘤细胞系CHG-5和SHG-44的细胞骨架系统进行了比较观察。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
作者简介:赵 雯(1969—),女,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤发生机制及诱导分化治疗方面的研究,发表论文7篇。电话:(023) 68752246
通信作者:卞修武(Email:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2001-01-28;修回日期:2001-03-02

1 材料与方法

1.1 试剂

鼠抗微管蛋白(β-tubulin)多克隆抗体(Zymed,1∶50);异硫氰酸荧光素标记的鬼笔环肽(FITC-phalloidin, Sigma,1∶64);即用型兔抗GFAP多克隆抗体及鼠抗人GFAP单克隆抗体(Biogenex,1∶100);鼠抗Vimentin单克隆抗体(Biogenex,1∶100);异硫氰酸荧光素标记的抗鼠、兔IgG(FITC-IgG, Sigma,1∶50);荧光染料Cy3标记的抗兔IgG(Cy3-IgG, Sigma,1∶100)。

PHEM缓冲液:60 mmol/L哌嗪-N,N'-双乙磺酸(PIPES),25 mmol/L HEPES,10 mmol/L EGTA,2 mmol/L $MgCl_2$;PBS-Ca^{2+}:PBS加0.5~1.5 mmol/L $CaCl_2$;4%多聚甲醛固定液(4%PFA):40% PFA 10 ml加0.2 mol/L磷酸盐缓冲液50 ml,双蒸水40 ml,pH 7.2。

1.2 细胞培养

人脑星形细胞瘤细胞系CHG-5由本室建立[3],人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室[3],两种细胞均按本室常规方法,即用含10%小牛血清的RPMI-1640(Gibco)培养基,另添加适量HEPES、双抗(100 U/ml

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

青霉素及 100 μg/ml 链霉素)、3% 谷氨酰胺, 置 37 ℃、5% CO_2 混合气体孵箱中培养, 每 3~5 天传代 1 次。

1.3　标本制备

生长旺盛的细胞按 1×10^5 个/ml 密度接种于 35 mm 培养皿中的盖玻片上, 待细胞充分铺展后用于实验。

分别选用不同的方法进行标本处理: ①95% 乙醇, 4 ℃, 15~20 min。②丙酮, 4 ℃, 20 min。③4% PFA, 室温 20 min。④固定前分别用含 0.5% Triton X-100 的缓冲液(PHEM、PBS、PBS-Ca^{2+})处理 5 min。⑤另取用于中间丝染色的标本经 TritonX-100 处理后先进行免疫荧光染色, 染色完毕后再用 4% PFA 室温固定 10~20 min。

1.4　免疫荧光染色

采用直接(微丝染色, 因鬼笔环肽可特异性地与纤维状肌动蛋白结合, 故用荧光标记的鬼笔环肽可直接显示细胞内的微丝束, 即应力纤维)和间接免疫荧光法[4]。一抗孵育时间: 室温 2~4 h 或 37 ℃ 1 h; 二抗为 37 ℃ 30 min, 各步骤间均用 PBS(pH 7.2)充分漂洗, 缓冲甘油封片, 于 Leica TCS NT 激光共聚焦显微镜下观察并摄像。

1.5　中间丝双重标记免疫荧光染色

兔抗 GFAP 和鼠抗 Vimentin 抗体分别与同一细胞中的 GFAP、Vimentin 结合后, 用 Cy3-抗兔 IgG 及 FITC-抗鼠 IgG 先后显示。一、二抗孵育时间、漂洗步骤及观察方法同上。

2　结果

2.1　微管

固定前无论用含 TritonX-100 的缓冲液处理与否, CHG-5 和 SHG-44 两种细胞微管的定位、分布及荧光信号强度大致相同, 均在胞质内呈高密度、放射状由细胞中心向周边分布, 有的细胞内可见到微管组织中心, 见图 1。两种细胞经 PHEM-TritonX-100 处理后, 微管保存完整, 有时单根微管的轮廓亦清晰可辨; 而用 PBS-Triton 处理则微管受到一定程度的破坏, 数量明显减少、断片增多; 用 Ca^{2+} PBS-Triton 处理, 绝大部分微管被破坏, 仅在核周残留少量点状荧光。

2.2　微丝

在丙酮、4% PFA 固定的细胞内, 微丝束荧光亮度很高, 密度也较大, 镜下荧光多表现为融合状态, 不能清晰地辨出单个微丝束的形态; 用 75% 酒精固定的细胞内未见到阳性荧光或其亮度极为微弱。另外, 微丝的染色不受缓冲液成分与 Ca^{2+} 的影响。

CHG-5 与 SHG-44 细胞内微丝束的分布及荧光强度略有不同, 前者平均荧光强度较高, 较小的细胞内可见微丝束呈平行分布, 或走向呈一定角度形成交叉; 在较大的细胞内隐见不同方向微丝束相互交叉成网状或形成多个转折, 见图 2。而 SHG-44 细胞内微丝束数量较少, 平均荧光强度低, 阳性分布也多贴近于膜内侧区域, 一般不可见形成交叉或转折的网状分布。

2.3　中间丝

2.3.1　GFAP　　在用 75% 酒精、丙酮固定的标本中, CHG-5 细胞只有部分(约 10%)呈阳性表达, 而 SHG-44 阳性细胞的数目更少, 且两者在荧光强度上亦有明显差别。个别较大的 GFAP 阳性细胞内可见此种中间丝呈网格状分布, 排列无一定的方向性, 见图 3。不同来源的抗 GFAP 抗体对两种细胞的染色效果没有显著差别。

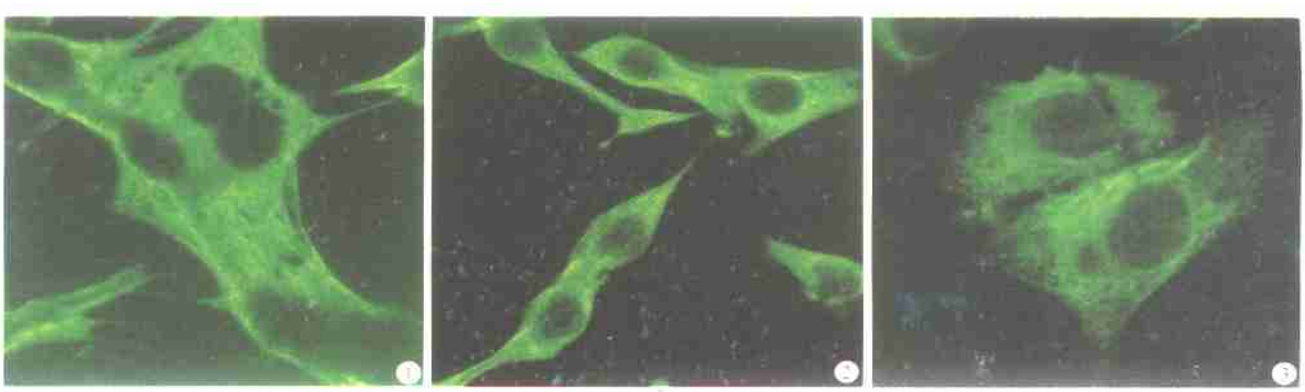


图 1　以抗β-tubulin 抗体染色显示微管在 CHG-5 细胞内的分布　(IFC× 400)

Fig 1　Distribution of microtubules in the cytoplasm of CHG-5 cells immunostained with anti β-tubulin antibody　(IFC× 400)

图 2　以 FITC-鬼笔环肽标记微丝, 在 CHG-5 细胞中呈平行或交叉分布　(DFC× 200)

Fig 2　Positive microfilaments immunostained by FITC-Phalloidin were distributed parallel to or cross each other in the cytoplasm of CHG-5 cells　(DFC× 200)

图 3　CHG-5 细胞用 75% 酒精固定, 鼠抗 GFAP 抗体染色显示 GFAP 网络状结构　(IFC× 400)

Fig 3　Expression of GFAP in network style in CHG-5 cells fixed with 75% alcohol, immunostained by anti-GFAP antibody　(IFC× 400)

2.3.2　Vimentin　　几乎所有 CHG-5 和 SHG-44 的细胞均为 Vimentin 阳性。Vimentin 阳性中间丝多位于细胞深部近核区域, 纵横交错排列, 呈较细密的网格状或筛孔状, 见图 4。与微管相比, 其密度较大且无明显方向性。两种细胞 Vimentin 的分布及形态未见显著不同, 但 SHG-44 细胞 Vimentin 型中间丝的密度更大, 荧光亮度也更强。4% PFA 固定后, 免疫荧光染色不能很好地显示两种细胞的 Vimentin 结构, 染色强度十分微弱; 而若将标本先行免疫荧光染色, 封片前再用 4% PFA 固定, 则 Vimentin

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

结构基本清晰，荧光强度与使用其他固定剂相比无明显差异。

固定前用含 TritonX-100 的缓冲液处理的细胞，其 Vimentin 结构显示更为清晰，荧光亮度强；其中 PHEM 缓冲液效果最佳，PBS 次之，而含 Ca^{2+} PBS-TritonX-100 缓冲液效果最差。

2.3.3 GFAP 与 Vimentin 双标免疫荧光染色结果 Cy3 标记的 GFAP 呈红色荧光，FITC 标记的 Vimentin 呈绿色荧光。SHG-44 和 CHG-5 细胞中均有部分呈 GFAP 和 Vimentin 双表达，表现为两种中间丝蛋白阳性荧光信号在同一细胞内重叠。其中，SHG-44 细胞以绿色荧光为主，即 Vimentin 表达较强；CHG-5 细胞以红色为主，即 GFAP 表达较强，见图 5、6。

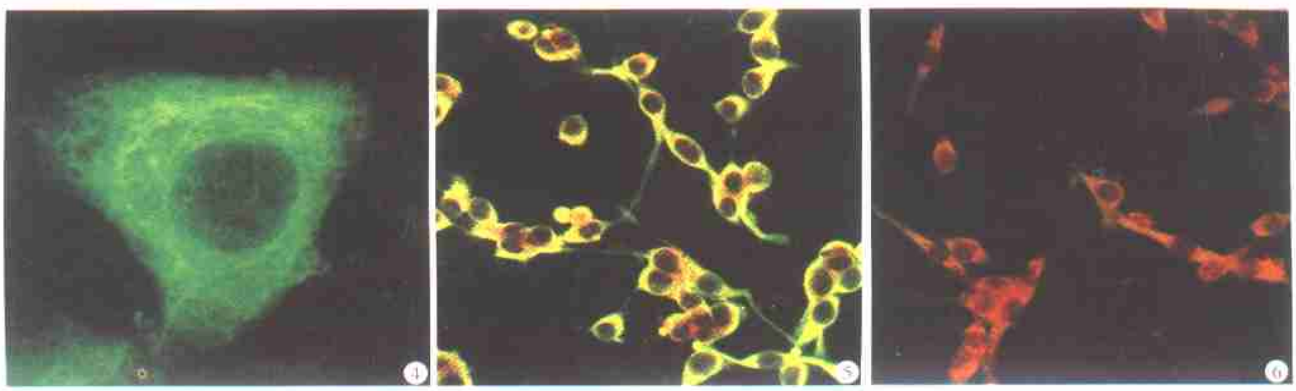


图 4 SHG-44 细胞以含 0.5% Triton X-100 的 PHEM 缓冲液处理，抗 Vimentin 抗体染色，显示 Vimentin 型中间丝交错形成网状，位于近核区域 (IFC× 400)

Fig 4 Network structure of positive vimentin near the nuclear in SHG-44 cells which were pretreated with PHEM buffer containing 0.5% Triton X-100 and immunostained with anti-vimentin antibody (IFC× 400)

图 5 SHG-44 细胞以抗 GFAP(红)、抗 Vimentin(绿)抗体进行双重染色，示绿色荧光表达较强 (IFC× 100)

Fig 5 Double immunofluorescent staining with anti-GFAP (red) and anti-vimentin (green) antibodies green fluorescence was stronger in SHG-44 cells (IFC× 100)

图 6 CHG-5 细胞中间丝双重染色，红色荧光表达较强，重叠后呈橙红色 (IFC× 100)

Fig 6 Double immunofluorescent staining of network, green fluorescence was stronger, became orange-red after superimposing (IFC× 100)

3 讨论

CHG-5 和 SHG-44 分别来自混合型间变性星形—少突胶质细胞瘤和胶质母细胞瘤患者，前者恶性程度低于后者。迄今为止，尚未见到对其细胞骨架系统进行比较研究的报道。本实验结果，两种细胞内微管的定位、分布及阳性表达强度基本相同，一般以胞核为中心向外呈放射状分布。微丝在 CHG-5 细胞内呈束状平行或交叉分布；在 SHG-44 细胞中多贴细胞膜内侧分布，数量较少，荧光强度也较弱。造成两种细胞微丝分布差异的原因目前尚不清楚。研究认为，细胞微丝的构筑和动态分布受胞浆内 Ca^{2+} 的直接调控，1 ~ 2 μmol/L 浓度的 Ca^{2+} 即可阻断微丝末端的延伸，5 μmol/L 浓度时可将其切成片段[5]，而本室研究发现 SHG-44 细胞胞浆内游离钙水平高于 CHG-5 细胞[2]，或可解释上述现象。细胞微管、微丝骨架与膜上的间隙连接成分在空间结构上直接相连，共同参与细胞运动、附着、信号传导以及细胞分裂、增殖的调控。微管聚合/解聚失衡、微丝束的破坏不仅可影响早期基因 c-fos、c-myc 等的转录活性及 mRNA 分布，与肿瘤发生和细胞增殖失控有关，而且与细胞的高活动性、转移性和侵袭性等恶性行为密切相关[1,6]。在既往实验中我们观察到 CHG-5 和 SHG-44 在细胞形态、增殖能力、体外粘附等方面存在一定差异，作者认为，两种细胞系细胞骨架系统的不同构成了这两种细胞生物学特性差异的结构基础，而 SHG-44 细胞内微丝相对不发达也正是其恶性程度相对更高的表型特征之一。

GFAP 是星形胶质细胞中间丝的结构蛋白和特异性分化标志物，广泛地应用于星形细胞源性胶质瘤的诊断及鉴别诊断中。Vimentin 是间充质来源的细胞内中间丝的结构蛋白，但也存在于其它类型细胞(如星形细胞、上皮细胞)的早期发育阶段。Vimentin 与 GFAP 均为酸性蛋白质，均可在酸性环境下构建成中间丝。它们在星形细胞瘤中的分布既相似又有各自的特点，也可共同表达于同一细胞内，在同一中间丝上以共聚体(Copolymers)的形式存在[7]。在星形细胞肿瘤，两者的表达随细胞分化程度的不同而变化，前者与分化程度呈负相关，后者与分化程度呈正相关[8,9]。本研究中我们观察到两种细胞系的几乎所有细胞均表达 Vimentin，其分布和形态结构相似，但 SHG-44 细胞 Vimentin 的荧光强度及密度更高；而无论 CHG-5 还是 SHG-44 细胞系，用不同来源之抗体检测均只有部分细

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

胞呈 GFAP 阳性, 其中 SHG-44 阳性表达的细胞数更少, 荧光强度亦很低; 双重荧光标记结果更能显示这两种中间丝的表达具有显著差异。上述结果提示 CHG-5 和 SHG-44 细胞在这两种中间丝蛋白表达上的差异可能反映了二者分化状态的不同, CHG-5 的分化程度较 SHG-44 高。另一方面, Vimentin 在两种胶质瘤细胞内的高水平表达表明 Vimentin 是该类胶质瘤细胞中间丝的主要成份, 而 GFAP 的空间构筑、表达水平及功能状态是细胞分化状态的更敏感、更可靠的指标。这些特性也为进一步研究恶性胶质瘤分化和药物诱导分化作用以及研究细胞骨架体系变化, 特别是中间丝构筑、共存、表达状况与细胞恶性逆转的关系提供了必要的形态学依据。

此外, 本研究中 4%PFA 对中间丝特别是 Vimentin 免疫染色结果具有较大影响的观察, 提示 4%PFA 固定可能会遮蔽或破坏中间丝上部分抗原结合位点, 因而在进行中间丝免疫组织化学染色时, 应尽量避免使用。

参考文献:

[1] Gerharz C D, Mou R, Meister P, *et al*. Cytoskeletal heterogeneity of an epithelioid sarcoma with expression of vimentin, cytokeratin, and neurofilaments[J]. Am J Surg Pathol, 1990, 14(3): 274—282.

[2] 陈自强, 卞修武, 辛　榕, 等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 880—883.

[3] 杜子威, 徐庚达, 王　尧, 等. 人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 的建立及其特征[J]. 中华肿瘤杂志, 1984, 6(4): 241—243.

[4] 谢锦玉. 现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1998. 102—151.

[5] Hill P B, Dora K A, Hughes A D. The involvement of intracellular Ca^{2+} in 5-HT(1B/1D) receptor-mediated contraction of the rabbit isolated renal artery[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(4): 835—842.

[6] Sabine H, Patricia C, Laila S, *et al*. IL-2-dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3 280—3 288.

[7] Alsza M S, Shaban F, Narayan R K, *et al*. Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross—reactivity[J]. Anticancer Res, 1998, 18(2B): 1 333—1 340.

[8] 卞修武. 胶质纤维酸性蛋白基因调控及其在胶质瘤诱导分化中的作用[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 1—2.

[9] 卞修武, 史景泉, 辛　榕, 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 生长和分化的影响[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(5): 285—288.

(编辑　王　红)

(上接 263 页)

血凝情况: 外置 T 形帽的封闭非常重要, T 形帽脱落易致血凝; 每次抽血后应用肝素冲洗导管, 才不易致血凝。

两种方法采血测定大鼠血浆的 TNF-α 浓度值并无明显差异, 但留置心导管术方法所得数值标准误较小, 见表 1。应用留置心导管术方法采血测定的 TNF-α 浓度值, 可见抗菌抗内毒素多肽对 LPS 攻击大鼠血液中 TNF-α 具有明显的降低作用。

表 1　两种实验方法的大鼠血浆 TNF-α 浓度比较(ρ_B/ ng·ml^{-1})

组别		0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
留置心导管	对照组	0.89±0.21	25.31±4.16	39.65±4.95	48.51±6.45	30.11±5.71	2.36±0.51	0.95±0.55	1.05±0.31
	治疗组	0.75±0.20	12.61±3.28	20.01±4.51	21.56±4.81	2.31±0.72	1.10±0.46	1.00±0.47	0.90±0.31
传统方法	对照组	0.86±0.36	24.35±7.31	35.41±18.96	46.61±18.97	28.61±17.96	2.16±1.84	1.75±0.94	1.05±0.41
	治疗组	0.87±0.38	13.46±5.47	19.25±12.01	20.03±8.15	0.16±1.04	0.18±0.79	1.06±1.01	1.00±0.72

3　讨论

在动物体内实验中存在给药次数、采血次数较多, 操作繁琐, 尤其是各时相点的采血既往一直是采用整组动物活杀, 存在动物及药品均大量消耗, 不仅工作量大并且各时相点间存在组间差及重复性不好的缺点, 这一直是动物体内实验中亟待解决的问题[2]。为解决这一问题, 本实验室开展了大鼠留置心导管术。初步结果表明大鼠留置心导管术克服了传统实验方法试剂、药品消耗大, 尤其是动物数量较多, 重复性也较差的缺点。在本研究中, 虽然需要采血 9 次, 由于开展了大鼠留置心导管术, 动物较传统方法(72 只)减少至 8 只, 而且通过导管采血, 极大减少了工作量, 缩短了操作时间, 证明留置心导管术操作简便, 重复性好。

我们的体会是严格无菌操作可有效避免留置导管的细菌感染, 外置 T 形帽的封闭可防止血液的凝固, 同时控制每次采血量对保证动物的一般情况非常重要。抗菌抗内毒素多肽对大鼠保护实验中 TNF-α 的检测结果表明大鼠留置心导管术可保证血液学检测指标结果的可靠性。

关键词: 大鼠留置心导管术; 内毒素; 抗菌抗内毒素多肽
中图法分类号: R645.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郑　江, 袁建成, 周　红, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白功能区结构模拟肽小鼠体内拮抗内毒素作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(6): 520—523.

[2] 周　红, 郑　江, 肖光夏. 猪源杀菌性/通透性增加蛋白对大鼠烧伤脓毒症模型的治疗作用[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(Suppl): 16—18.

(编辑　冷怀明)

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