

小剂量阿糖胞苷诱导神经母细胞瘤细胞分化的研究

罗福永,刘颖,朱星华,刘颖,孙艳丽,成晓君,黄康,曲梅
(中国医科大学附属第四医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要: [目的] 通过人神经母细胞瘤(NB)SMS-KCNR 细胞的体外实验,观察小剂量阿糖胞苷(Ara-C)对 NB 细胞的诱导分化作用。[方法] MTS 法检测小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞增殖的影响;观察小剂量 Ara-C 处理后 SMS-KCNR 细胞的形态变化;流式细胞仪检测小剂量 Ara-C 处理后 SMS-KCNR 细胞的细胞周期分布;Western blot 检测 TrkA、N-myc 蛋白的表达,RT-PCR 检测 TrkA 及 MYCN mRNA 水平的变化。[结果] 小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞的增殖具有抑制作用,诱导 SMS-KCNR 细胞周期停滞于 S 期, G_2/M 期细胞比例下降 ($P<0.05$)。经小剂量 Ara-C 处理后 SMS-KCNR 细胞形态与正常神经节细胞类似,并使 TrkA 的表达上调 ($P<0.05$),MYCN 的表达下调 ($P<0.05$)。[结论] 小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞具有诱导分化作用,该作用可能与 TrkA 表达上调,MYCN 表达下调有关。

关键词: 神经母细胞瘤;SMS-KCNR 细胞;小剂量阿糖胞苷;诱导分化

中图分类号: R739.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)11-0904-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.11.A014

Study of Differentiation of Neuroblastoma SMS-KCNR cell by Low-dose Cytosine Arabinside

LUO Yong-fu, LIU Ying, ZHU Xin-hua, et al.

(The Forth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China)

Abstract: [Purpose] Through a series of experiments of SMS-KCNR cells of neuroblastoma (NB) by low-dose cytosine arabinoside (Ara-C) in vitro. To explore the differentiation of SMS-KCNR cells by low-dose Ara-C. [Methods] The proliferation of SMS-KCNR cells treated with low-dose Ara-C was detected by MTS. The morphological changes of SMS-KCNR cells was observed by microscope. The distribution of cell cycles was analyzed by Flow cytometry. Further, the protein expression of TrkA and N-myc was measured by Western blot and the mRNA change of the TrkA and MYCN was quantified by the real time-PCR. [Results] The proliferation of SMS-KCNR cells were inhibited by low-dose Ara-C. Low-dose Ara-C induced the stagnation of the cell cycle in S phase. The content of SMS-KCNR cells in G_2/M phase decreased ($P<0.05$). SMS-KCNR cells' morphology was similar to normal ganglion cells after treated by low-dose Ara-C. The expression of TrkA increased by low-dose Ara-C, but decreased the expression of MYCN. [Conclusion] The low-dose Ara-C could induce the differentiation of SMS-KCNR cells might be through increased the expression of TrkA.

Key words: neuroblastoma; SMS-KCNR cell; low-dose Cytosine arabinoside; induce differentiation

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童最常见的恶性颅外实体肿瘤,发病率占儿童恶性肿瘤的8%~10%,但病死率却达15%^[1]。其预后与患者的年龄、分期、分型及 NB 细胞的分化程度密切相关^[2]。研究表明 50%以上的高危及晚期 NB 患儿出现化疗耐

药并复发,使 NB 成为婴幼儿期放弃治疗率最高的肿瘤^[3]。然而 NB 细胞具有自行分化成熟、逆转和消退的独特生物学特性,这为 NB 的诱导分化治疗提供了可靠的理论依据。研究发现大剂量阿糖胞苷(Ara-C)对肿瘤细胞主要起细胞毒作用,而小剂量 Ara-C 则以诱导细胞分化为主^[4,5]。因此,本研究用小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞进行处理,探讨小剂量 Ara-C 对 NB 细胞的诱导分化作用,为 NB 的治

收稿日期:2016-06-18;修回日期:2016-08-18

基金项目:沈阳市科学技术计划项目(F13-221-9-43)

通讯作者:刘颖, E-mail: cmu4h-ly@126.com

疗寻求新途径。

1 材料与方法

1.1 SMS-KCNR 细胞培养

人 NB SMS-KCNR 细胞株由美国国立卫生研究所 Carol.J.Thiele 博士惠赠。37℃水浴复苏 SMS-KCNR 细胞并接种于培养瓶中,培养液为 RPMI 1640 (含 10% 优质胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 IU/ml 链霉素),置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2 MTS 法检测 SMS-KCNR 细胞增殖,筛选诱导 SMS-KCNR 细胞分化的 Ara-C 浓度

将对数生长期 SMS-KCNR 细胞分成 10 组,每组设 6 个复孔,接种于 96 孔板(每孔 2×10^4 个细胞、100 μ l 培养液)。各组细胞培养 24h 后,对照组换以新鲜培养液(100 μ l),处理组分别加入 Ara-C,使其终浓度为 0、5 ng/ml、10 ng/ml、15 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、50 ng/ml、75 ng/ml、100 ng/ml。培养 72h 后加 MTS 混匀,避光反应 2h,酶标仪(波长 495 nm)测 OD 值。

1.3 SMS-KCNR 细胞形态的观察

取对数生长期 SMS-KCNR 细胞接种于 6 孔板(每孔细胞为 5×10^4 个),培养 24h 后加药处理。将 SMS-KCNR 细胞分为 4 组:实验组(Ara-C 20 ng/ml、Ara-C 30 ng/ml)、对照组(以新鲜培养液替代)、阳性对照组(全反式维甲酸-ATRA 1 μ mol/L)。隔天换液,每日于显微镜下观察 SMS-KCNR 细胞的增殖情况及形态变化。

1.4 流式细胞仪检测 SMS-KCNR 细胞周期分布

将 SMS-KCNR 细胞分为 4 组,培养 24h 后进行加药处理。6d 后分别收集实验组(Ara-C 20 ng/ml、Ara-C 30 ng/ml)、阳性对照组(ATRA 1 μ mol/L)、对照组(以新鲜培养液替代)共 4 组细胞进行以下操作:1000 r/min,离心 5 min,弃上清 → 加 2 ml PBS 混匀,调整细胞至 1×10^6 个,再次离心,重复 2 次 → 加 100 μ l PBS 混匀细胞 → 加 2 ml 预冷的 70% 乙醇,4℃固定 1h → 1000 r/min,离心 5 min,弃上清 → 加 2 ml PBS 混匀,离心,重复 2 次 → 加 100 μ l RNase 和 PI,摇匀,避光反应 30 min → 应用流式细胞仪检测细胞周期分布,实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测 TrkA、N-myc 蛋白表达

收集加药处理 6d 的 SMS-KCNR 细胞进行以下操作:蛋白裂解液提取细胞总蛋白 → 测蛋白 OD 值,计算浓度 → 蛋白电泳 3h(上样蛋白量相等) → 转膜:TrkA (140 kD) 湿转过夜、N-myc (62 kD) 半干转 40 min → 5% 脱脂奶封闭 1h (摇床上) → TBST 洗膜 10 min × 3 次(摇床上) → 一抗孵育:4℃过夜(摇床上) → TBST 洗膜 10 min × 3 次(摇床上) → 二抗孵育:室温 2h(摇床上) → TBST 洗膜 10 min × 3 次(摇床上) → 发光仪发光 → 测各组蛋白条带灰度值 → 统计、分析。

1.6 RT-PCR 检测 TrkA、MYCN 基因的表达

提取总 RNA:收集经培养处理 6d 的 SMS-KCNR 细胞,用 Trizol 提取细胞总 RNA,测定 RNA 的 OD₂₆₀ 值和 OD₂₈₀ 值,计算提取 RNA 的纯度及浓度。逆转录合成 cDNA:根据逆转录试剂盒操作步骤合成 cDNA。PCR 扩增:引物序列:TrkA 上游引物 5' GCCACACGCAACTGTCTAGT3',下游引物 5' GCCTCCACACGGTAATAGT3';MYCN 上游引物 5' GCA-GAAACCACAACATCCTG3',下游引物 5' GCGGCCTTCTCATTCTTTAC3';GAPDH 上游引物 5' AGA-AGGCTGGGGCTCATTTG3',下游引物 5' AGG-GGC-CATCCACAGTCTTC3'。反应体系为 20 μ l;反应条件:预变性(95℃ 30s),PCR 反应(95℃ 5s,60℃ 34s),融解反应(95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s,60℃ 15s)。

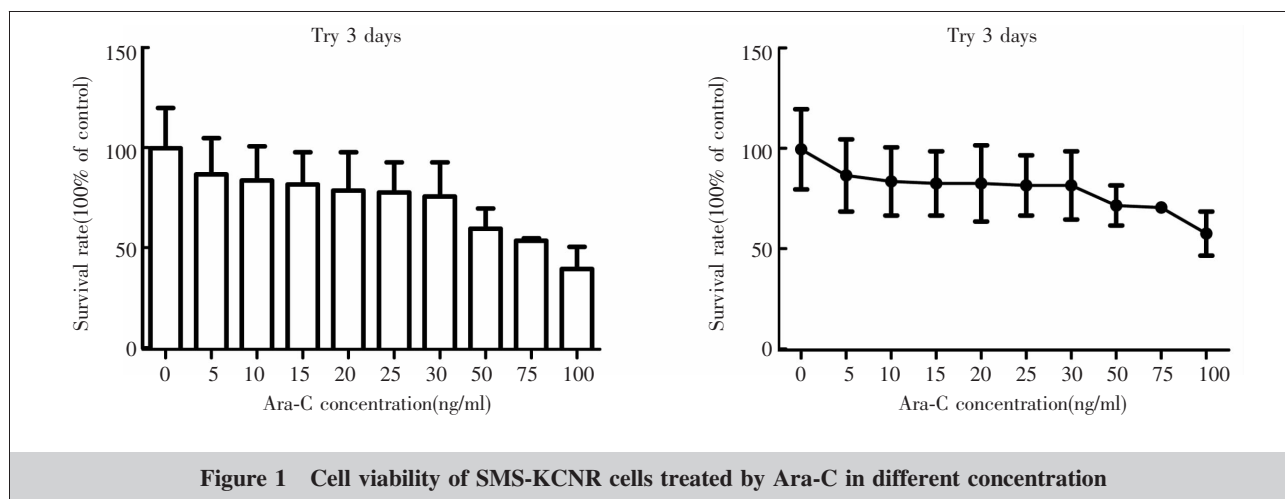
1.7 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件对所有实验数据核对后进行分析,将所得变量作单因素方差分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞增殖的影响

经处理 72h 后,对照组 SMS-KCNR 细胞基本长满。处理组中 Ara-C 5 ng/ml、Ara-C 10 ng/ml、Ara-C 15 ng/ml 可抑制 SMS-KCNR 细胞增殖,但无明显杀伤作用,细胞形态无改变;Ara-C 20 ng/ml、Ara-C 25 ng/ml、Ara-C 30 ng/ml 抑制细胞生长,同时细胞还表现出树突、轴突增多的形态学变化,未见细胞杀伤作用;Ara-C 50 ng/ml、Ara-C 75 ng/ml、Ara-C 100 ng/ml 则表现为明显的细胞毒作用(见 Figure 1)。提示 Ara-C 浓度在 20 ng/ml 至 30 ng/ml 时有明确的诱导



分化作用。

2.2 小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞形态的影响

光镜下,对照组 SMS-KC-NR 细胞为形态不规则,呈小梭形、类圆形或不规则多边形,胞体大,树突及轴突相对较少、且短,瘤细胞基本长满。而分别经小剂量 Ara-C (20ng/ml、30ng/ml)、ATRA (1 μ mol/l)处理后 3d 的实验组和阳性对照组相似,观察到细胞形态发生变化,细胞开始逐渐变小、变圆,细胞边缘不断有树突、轴突的出现。第 6d 时细胞形态改变更加明显,与对照组相比细胞胞体相对更小、更圆,树突及轴突增多、增长、变细,延伸明显,部分轴突长度超过胞体直径两倍以上,甚至交织成网状,部分肿瘤细胞变得细长,与周围树突、轴突融合成神经节,而细胞增殖明显抑制(见 Figure 2)。

2.3 小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞周期的影响

如 Figure 3 所示,经小剂量 Ara-C (20ng/ml、30ng/ml)处理 6d 后即实验组主要作用于 SMS-KC-NR 细胞的 DNA 复制期(S 期)。经 ATRA (1 μ mol/l)处理后 6d 即阳性对照组主要作用于 DNA 复制前期(G₀/G₁ 期)。实验组和阳性对照组的 G₂/M 期细胞

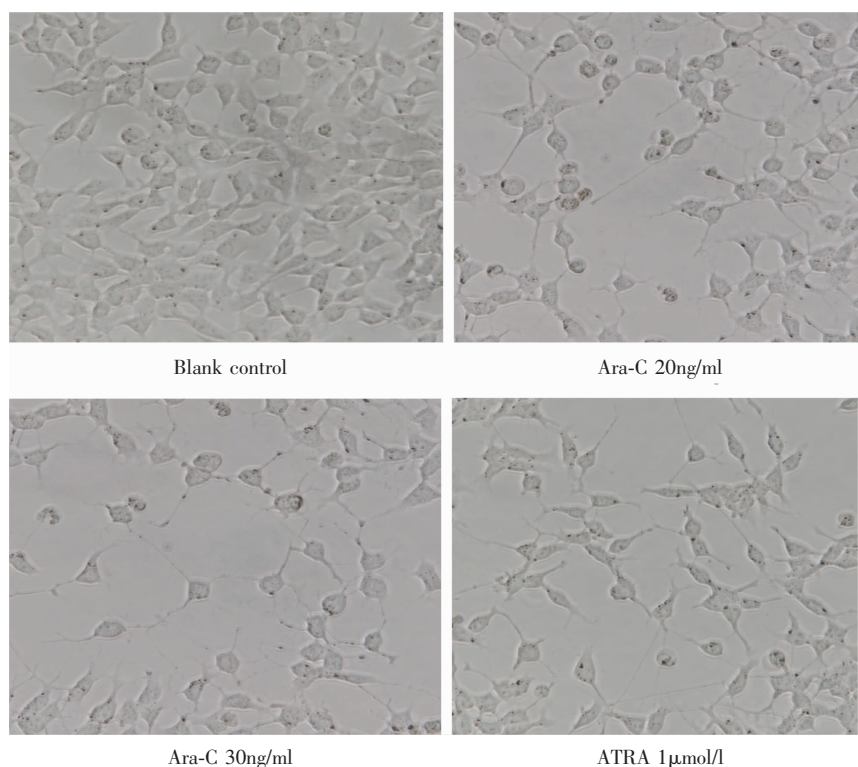


Figure 2 The morphology of SMS-KCNR cells treated with low dose Ara-C or ATRA for 6 days($\times 200$)

均较对照组减少($P < 0.05$, 见 Table 1)。说明小剂量 Ara-C 和 ATRA 均可阻滞 SMS-KCNR 细胞的有丝分裂,使其有机会分化成熟。

2.4 小剂量 Ara-C 对 TrkA、N-myc 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,用小剂量 Ara-C (20ng/ml、30ng/ml)、ATRA (1 μ mol/L)处理 SMS-KCNR 细胞

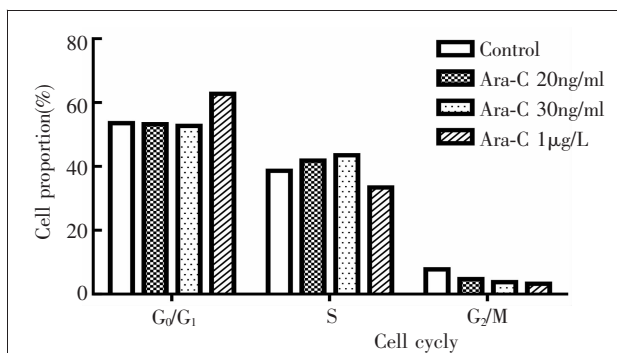


Figure 3 Cell cycle of SMS-KCNR cells in different groups

Table 1 The content of SMS-KCNR cells in G₂/M phase each groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	G ₂ /M
Control	7.18±0.76
Ara-C 20ng/ml	4.71±1.28*
Ara-C 30ng/ml	3.79±0.69*
ATRA 1μmol/L	3.25±0.56*

Note: Compared with control group, *: $P < 0.05$

6d,将实验组和阳性对照组分别与对照组比较,TrkA 蛋白表达增强 ($P < 0.05$),N-myc 蛋白表达下降 ($P < 0.05$),实验组与阳性对照组的实验结果一致(见 Figure 4)。

2.5 小剂量 Ara-C 对 TrkA、MYCN 基因表达的影响

RT-PCR 结果显示,实验组(小剂量 Ara-C)和阳性对照组(ATRA)TrkA 的相对表达量均高于对照组 ($P < 0.05$),提示实验组和阳性对照组 SMS-KCNR 细胞内 TrkA 的表达均明显上调。MYCN 的相对表达量则相反,均低于对照组 ($P < 0.05$),说明实验组和阳性对照组使 SMS-KCNR 细胞内 MYCN 的表达均下调(见 Figure 5)。

3 讨论

NB 在恶性肿瘤中存在最高比例的自然退化率,即在没有任何干预的情况下,NB 可自行缩小甚至消失。因此,许多学者认为 NB 可作为恶性肿瘤细胞诱导分化治疗的理想模型。本研究用不同浓度的 Ara-C 处理 SMS-KCNR 细胞,发现 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞增殖的影响随其浓度的不同而出现相应的变化。Ara-C 浓度为 5ng/ml、10ng/ml、15ng/ml 时可以抑制 SMS-KCNR 细胞增殖,但无杀伤作用,细胞形态无改变。Ara-C 浓度在 20ng/ml、25ng/ml、30ng/ml 时可抑制细胞生长,同时细胞形态发生了变化,但无明显细胞杀伤作用。Ara-C 浓度达 50ng/ml、75ng/ml、

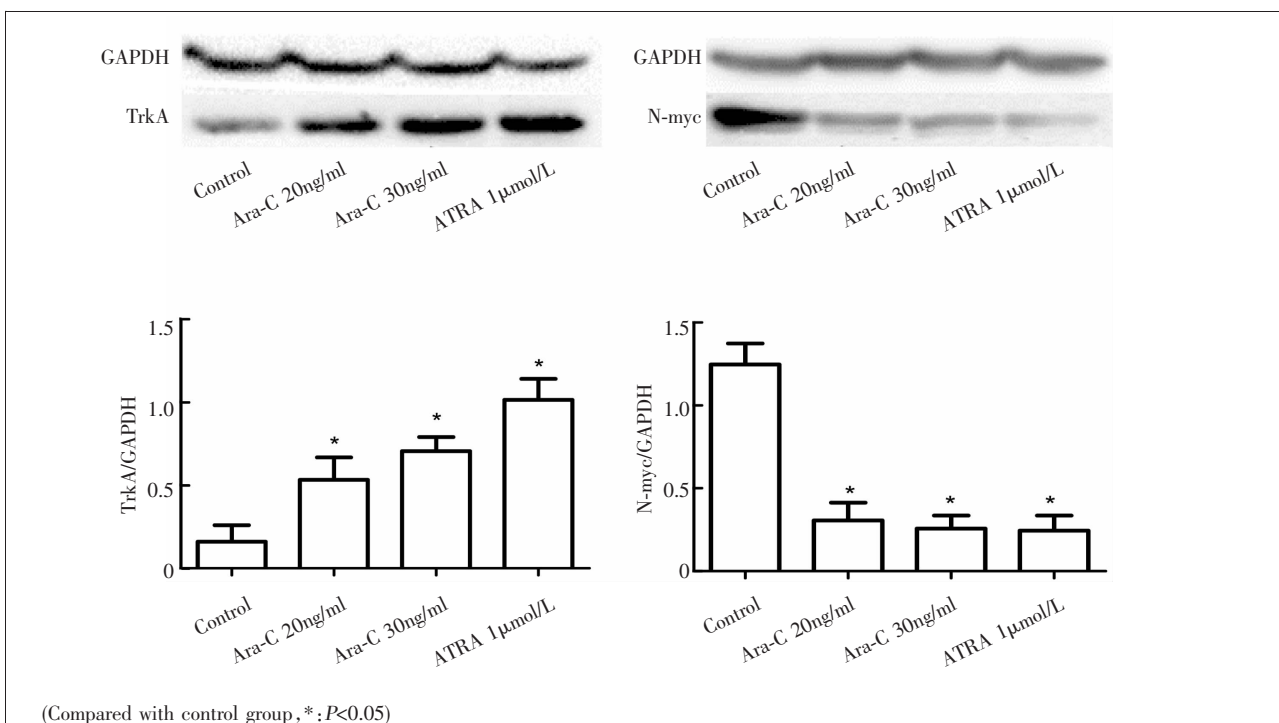
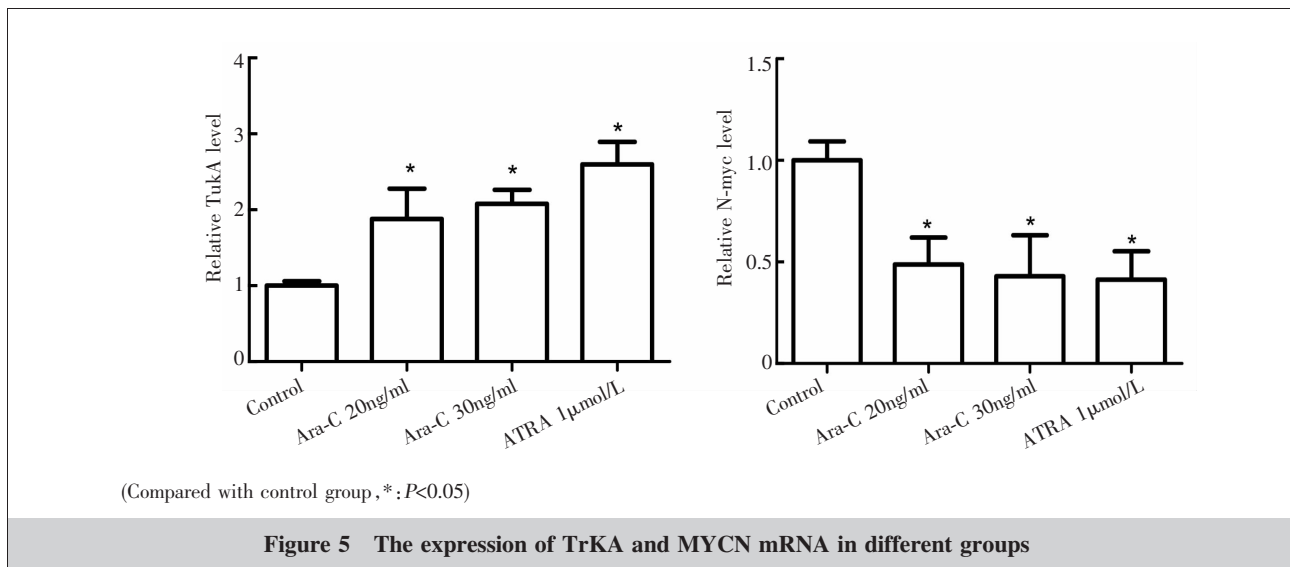


Figure 4 The expression of TrkA and N-myc protein in SMS-KCNR cells



100ng/ml 则表现为明显细胞毒作用。理想的诱导分化剂是在不杀伤肿瘤细胞的基础上,能够最大限度地抑制细胞增殖,诱导其分化成熟。因此,本实验中选取了 20ng/ml 和 30ng/ml 的小剂量 Ara-C 进行诱导分化研究。

恶性肿瘤细胞的特点在于其 DNA 复制迅速, G₂/M 期细胞数量增加明显,出现无限增殖的情况,肿瘤细胞没有机会分化成熟,呈现不分化或低分化的恶性状态。因此,考察药物对肿瘤细胞增殖活动的抑制和细胞周期分布的影响是判定其诱导分化作用的重要指标。本实验发现小剂量 Ara-C 主要作用于 SMS-KCNR 细胞的 S 期,阻滞 DNA 的复制与转录,使 G₂/M 期的细胞明显减少,其结果与 ATRA 作用一致。说明小剂量 Ara-C 抑制 SMS-KCNR 细胞的生长和增殖,阻止细胞周期进程,使诱导细胞分化成为可能。

细胞的形态与其分化程度密不可分,良性、恶性细胞在形态上的差异很明显。恶性细胞多表现为胞体大而不规则、多核、核仁明显等低分化形态,细胞恶性程度越高,其形态与正常细胞的差异越明显。神经源性细胞中因其有轴突、树突等与细胞分化相关且易于观察的形态学特点。因此,细胞形态的观察是鉴定 NB 细胞诱导分化的重要参考指标。本实验中 SMS-KCNR 细胞经小剂量 Ara-C 处理后,第 3d 即可观察到细胞形态发生改变,第 6d 时同组细胞间形态差异缩小,胞体变得更规则、更小、更圆,呈极性,周围伸出多个轴突、树突状突起,部分轴突长度超过

胞体直径两倍以上,交织成网状,细胞变得细长,与周围树突、轴突融合在一起形成类似神经节样结构,表现为成熟神经节细胞的形态。而对照组仍呈现胞体大而不规则,细胞间差异明显,轴突、树突相对少而短的低分化形态。因此,本实验结果表明小剂量 Ara-C 具有促 SMS-KCNR 细胞分化成熟的能力。

小剂量 Ara-C 发挥诱导分化作用的机制可能是通过使分化相关基因得以表达,干扰增殖相关基因的转录,而不影响分化相关基因的转录^[6]。TrkA 是酪氨酸激酶受体家族(还包括 TrkB、TrkC)的成员之一,是神经生长因子的高亲和性功能受体。神经生长因子对神经、血管和肿瘤有多种病理生理功能^[7]。TrkA 基因的表达上调可介导神经元的分化,降低 NB 的恶性程度和/或促进 NB 的自然消退率^[8,9]。而 MYCN 属于 MYC 基因家族,是恶性肿瘤细胞所固有,对细胞增殖、分化意义重大,是实体恶性肿瘤中第一个被发现具有扩增现象的原癌基因^[10]。研究证实 NB 最严重的亚型是由 MYCN 基因过度表达引起的^[11]。MYCN 基因的高扩增及过度表达与 NB 细胞的无限增殖、低分化及 NB 预后不良密切相关。本实验结果显示小剂量 Ara-C 能够上调 TrkA 的表达 ($P < 0.05$),并下调 MYCN 的表达 ($P < 0.05$),与阳性对照组的的结果相一致。提示小剂量 Ara-C 对 SMS-KCNR 细胞的诱导分化作用可能与 TrkA 表达上调, MYCN 的表达下调有关。

综上所述,小剂量 Ara-C 能够调控 SMS-KCNR 细胞的 DNA 复制,改变细胞的周期分布,抑制细胞

无限增殖,使细胞向着良性、成熟的神经节细胞分化。此结果为 Ara-C 用于 NB 诱导分化治疗提供了依据。

参考文献:

- [1] Waldeck K, Cullinane C, Ardley K, et al. Long term, continuous exposure to panobinostat induces terminal differentiation and long term survival in the TH-MYCN neuroblastoma mouse model [J]. Int J Cancer, 2016, 139 (1): 194-204.
- [2] Shao JB, Lu ZH, Huang WY, et al. A single center clinical analysis of children with neuroblastoma [J]. Oncol Lett, 2015, 10(4): 2311-2318.
- [3] Modak S, Cheung NK. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma [J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36 (4): 307-317.
- [4] Sung KW, Choi HS, Yoo ES, et al. Clinical trial of low dose cytosine-arabioside in the treatment of acute promyelocytic leukemia [J]. J Korean Med Sci, 1997, 12(4): 298-304.
- [5] Ossenkoppele CJ, Wijermans PW, de Waal FC, et al. Low dose cytosine-arabioside has only minimal differentiation inducing capacity in HL60 cells [J]. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989, 25(11): 1561-1569.
- [6] Vereeeque R, Saudemont A, Quesnel B. Cytosine arabioside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells [J]. Leukemia, 2004, 18 (7): 1223-1230.
- [7] Aloe L, Chaldakov GN. The multiple life of nerve growth factor: Tribute to rita levi-montalcini [J]. Balkan Med, 2013, 30(1): 4-7.
- [8] Eggert A, Ikegaki N, Liu XG, et al. Brodeur GM. Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma [J]. Klin Padiatr, 2000, 212(4): 200-205.
- [9] Pajtlter KW, Rebmann V, Lindemann M, et al. Expression of NTRK1/TrkA affects immunogenicity of neuroblastoma cells [J]. Int J Cancer, 2013, 133(4): 908-919.
- [10] Kang JH, Rychahou PG, Ishola TA, et al. MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 192-197.
- [11] Atmadibrata B, Liu PY, Sokolowski N, et al. The novel long noncoding RNA linc00467 promotes cell survival but is down-regulated by N-Myc [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88112.

《中国肿瘤》编辑部关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。

使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,本刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿。

《中国肿瘤》网址: <http://www.chinaoncology.cn>

如有任何问题,请与编辑部联系! 联系电话:0571-88122280。