

· 论 著 ·

人恶性胶质瘤细胞 SHG-44 经诺帝诱导分化后形态学改变及差异表达蛋白的质谱分析

许建平¹, 卞修武^{1*}, 陈意生¹, 吴玉章², 蒋雪峰¹

(1. 第三军医大学西南医院病理学研究所, 重庆 400038; 2. 第三军医大学全军免疫学研究所)

[摘要] **目的:** 观察人恶性胶质瘤细胞 SHG-44 经去甲二氢愈创木酸类似物——诺帝诱导分化后形态学的改变, 并分析差异表达蛋白。**方法:** 分别用 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝诱导 SHG-44 细胞分化, 观察处理后 24、48、72 h 细胞形态学的改变, 并与未受刺激的空白对照组相比较; 提取 200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理后的 SHG-44 细胞以及空白对照组细胞总蛋白进行双向电泳, 用 PDquest 7.1 软件比较两者间的差异表达蛋白, 离子飞行时间质谱仪分析高丰度表达的差异蛋白。**结果:** 200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理后 SHG-44 细胞的形态学改变较 100 $\mu\text{mol/L}$ 更为明显; 处理 72 h 时细胞分化最为明显。与空白对照组 SHG-44 细胞相比, 经 200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝诱导后, 双向电泳发现了 23 个差异蛋白点, 其中 21 个蛋白点表达下调, 2 个蛋白点表达上调。质谱分析高丰度表达的差异蛋白分别为: 未知蛋白、增殖相关基因 A、解链蛋白 Up1、交替拼接因子 ASF-3、cofilin 1、真核转录启动因子 5A、 β 半乳糖苷酶结合凝集素、Pi 类谷光苷肽-S 转移酶。**结论:** 诺帝能诱导人恶性胶质瘤细胞 SHG-44 分化, 并呈一定的时-效及量-效依赖性, 分化后的差异蛋白涉及到细胞增殖、分化、凋亡及基因转录调控等多个方面。

[关键词] 去甲二氢愈创木酸; 神经胶质瘤; 细胞分化; 细胞学; 光谱分析, 质量

[中图分类号] R 730.264 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0378-04

Morphological changes and differential protein spectrum of human malignant glioma cell SHG-44 after treated with Nordy, an analog of Nordihydroguaiaretic acid

XU Jian-ping¹, BIAN Xiu-wu^{1*}, CHEN Yi-sheng¹, WU Yu-zhang², JIANG Xue-feng¹ (1. Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Institute of Immunology, Third Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the morphological changes and analyze the differential protein spectrum of human malignant glioma cells SHG-44 after treated with Nordy (Chinese patent number: ZL02133700.4), an analog of Nordihydroguaiaretic acid. **Methods:** The differentiation of SHG-44 cells was induced by 100 $\mu\text{mol/L}$ or 200 $\mu\text{mol/L}$ Nordy; the morphological changes of cells were observed 24, 48 and 72 h after Nordy treatment and the findings were compared with those of the control group (received no treatment). The total proteins were extracted from SHG-44 cells treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ Nordy for 72 h and cells in control group, then were subjected to two-dimensional gel electrophoresis. PDquest 7.1 software was employed to compare the protein expression differences. The highly expressed differential proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Results:** The morphological changes of SHG-44 cells treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ Nordy were more obvious than those treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Nordy, and the most obvious differentiation was found in the cells treated for 72 h. Compared with those of control group, 23 differential protein spots were identified by the two-dimensional electrophoresis, including 21 down-regulated ones and 2 up-regulated ones. MALDI-TOF-MS showed that the highly expressed proteins were: an unknown protein, proliferation-associated gene A, Up1, alternative splicing factor ASF-3, cofilin1(non-muscle), eukaryotic translation initiation factor 5A, beta galactoside binding lectin, and glutathione-S-transferase Pi. **Conclusion:** Nordy can induce differentiation of human malignant glioma cells SHG-44 in a time-effect and dose-effect dependent manner. The Nordy-induced differential proteins may function in multiple aspects such as cell proliferation, apoptosis and gene transcription.

[KEY WORDS] nordihydroguaiaretic acid; glioma; cell differentiation; cytology; spectrum analysis, mass

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 378-381]

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是一种天然成分,源自常青灌木。本研究室既往的研究^[1]表明,NDGA 对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 具有诱导分化的作用。但 NDGA 的来源受限。针对 NDGA 的化学结构,本研究室采用人工

[基金项目] 国家“863”计划引导项目(2002AA001010),重庆市科技攻关项目。Supported by Leading Item of National High-tech R&D Program(863 program)(2002AA001010) and Grants for Tackling Key Problems of Chongqing Municipality.

[作者简介] 许建平, 博士生, 讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: bianxiuwu@263.net

方法合成了纯度可达 99.9% 以上 NDGA 类似物——诺帝(合成专利号:ZL02133700.4)。本实验采用二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, two-DE)、基质辅助激光解析离子飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)等方法对诺帝诱导 SHG-44 细胞分化后的形态学改变及蛋白质组变化进行了研究,并对其中的部分高表达差异蛋白进行了质谱鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 诺帝由本研究室人工合成;IPG 胶条(pH3-10L, 13 cm)、载体两性电解质(pH3-10L)、胶条覆盖液购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;超纯脲素、过硫酸铵、四甲基乙二胺、二硫苏糖醇购自 Promega 公司;RPMI 1640 干粉培养基购自 Sigma 公司,优级小牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自 Biomol 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器及软件 主要仪器有 CO₂ 培养箱、低温超速离心机、IPGphor 等电聚焦仪、SE600 电泳仪、Bio-Rad 凝胶扫描仪、Autoflex 型 MALDI-TOF 质谱仪。主要软件有 Quantity One、PDQest 7.1、Mascot 等。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及实验分组 人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 引自苏州大学医学院第二附属医院脑肿瘤研究室,来源于人脑恶性胶质细胞瘤(WHO 分级:II~III 级)。取对数生长期的 SHG-44 细胞,按 3×10^4 /ml 的细胞密度接种在含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中。实验组细胞接种 12 h 后分别加入 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理,相应的空白对照组则用不含诺帝的溶剂处理。实验组及对照组细胞均设 24、48、72 h 共 3 组。

1.3.2 蛋白样品的制备 蛋白样品的制备按照 Berkelman 等^[2]的方法进行。分别收集 200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理 72 h 后的 SHG-44 细胞及其相应的空白对照组细胞,0.01 mol/L PBS 洗涤离心 3 次,在细胞沉淀中加入裂解液(8 mol/L 脲素,4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 60 mmol/L DTT),漩涡振荡 20~30 min,冰浴超声 1~2 min 使细胞完全裂解。12 000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,取上清,以标准牛血清白蛋白作参照, Folin-酚试剂法测定样品蛋白浓度。

1.3.3 二维凝胶电泳 参照 Berkelman 等^[2]及

Gorg 等^[3]的方法进行。从 200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理组及空白对照组各取 1 mg 总蛋白与胶条重胀液(8 mol/L 脲素,2% CHAPS, 60 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液 pH3~10)混合,总体积 250 μl ,将样品混合液加入到 IPG 胶槽中,与胶面充分混合,再加入 IPG 覆盖液覆盖胶条。按照设定的程序,胶条重胀和等电聚焦依次进行。终末聚焦电压 +8 000 V。等电聚焦之后的胶条进入平衡液中振荡平衡,然后在 12.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行第二向电泳。电泳电流为 25 mA/胶,当溴酚蓝作为指示剂移至胶底时结束电泳。诺帝处理组及空白对照组电泳均重复 3 次。凝胶染色参照文献^[4,5]的方法改进后进行。诺帝处理组及空白对照组胶条在同一染色液中染色,同一脱色液中脱色直至背景清晰。

1.3.4 图像采集和统计学处理 脱色后的凝胶在 Bio-Rad 凝胶成像系统中用 Quantity one 软件成像。图像文件用 PDquest 7.1 软件(Bio-Rad)进行数字化分析及统计学处理,以其中一张空白对照组的凝胶图像为参考,其余各胶与之进行灰度、等电点、相对分子质量的校正及蛋白点的匹配,具有 95% 统计学意义($P < 0.05$)的点作为差异点。

1.3.5 质谱分析 为确保质谱分析的准确性,对高丰度表达的差异蛋白点在凝胶上定位,然后切下差异蛋白点胶放入 EP 管中,用测序级胰酶进行胶内消化、洗脱后点样于 Autoflex 型 MALDI-TOF 质谱仪。质谱仪离子源加速电压 1 定为 20 kV,加速电压 2 定为 18.75 kV, N₂ 激光波长定为 337 nm,脉冲宽度定为 3 ns,离子延迟提取 500 ns,真空度定为 4×10^{-7} Torr。质谱信号单次累加 50 次。使用混合标准肽作为外标,胰蛋白酶自动降解峰 842.510 和 2211.105 作为内标校正质谱峰。获得的肽质量指纹图用 Mascot 软件在蛋白质数据库进行检索,获取相应的蛋白质。

2 结果

2.1 诺帝诱导分化后 SHG-44 细胞的形态学改变 诺帝诱导分化后,SHG-44 细胞呈现时-效与量-效依赖性。与相应的空白对照组(图 1A)比较,100 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理后 24 h,SHG-44 细胞增殖减慢,体积增大,突起变长,胞质增多;处理后 48 h 细胞变成长梭形,突起增多变长,核质比例进一步减少;处理后 72 h 细胞体积变小,核分裂像少见(图 1B);200 $\mu\text{mol/L}$ 诺帝处理后,SHG-44 细胞形态呈进一步分化状态,处理后 72 h 胶质瘤细胞分化明显,形似正常的星形胶质细胞(图 1C)。

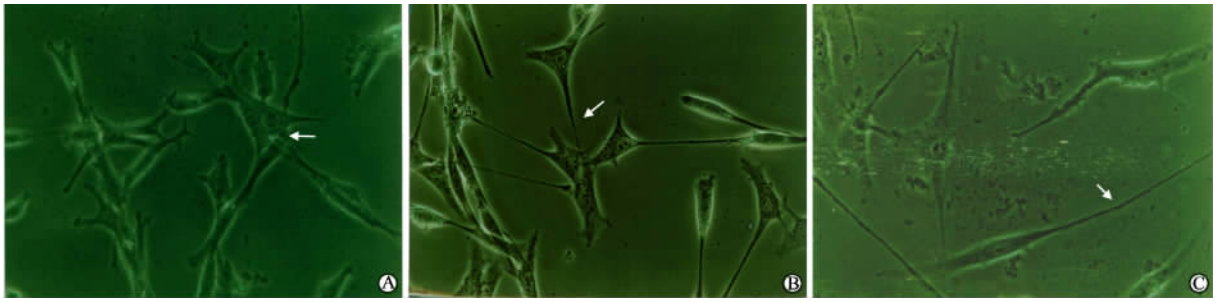


图1 空白对照组(A)、100 μmol/L(B)、200 μmol/L(C)诺帝处理72 h后SHG-44细胞形态学比较

Fig 1 Comparison of SHG-44 cell morphology between blank control group (A) and 72 h-Nurdy treated groups 100 μmol/L (B) and 200 μmol/L (C) (Converted microscope, ×200)

A: In control group, the volume and nucleus of SHG-44 cells were larger; karyokinesises were commonly seen (indicated by arrow); B: The volume of cells and the nucleus became smaller; the protuberance became longer in SHG-44 cells treated for 72 h by 100 μmol/L Nurdy (indicated by arrow); C: SHG-44 cells treated for 72 h by 200 μmol/L Nurdy had more and aceroser protuberance, similar to those of normal glial cells (indicated by arrow)

2.2 诺帝诱导分化后SHG-44细胞总蛋白双向电泳结果 200 μmol/L诺帝诱导分化72 h后,诺帝处理组及空白对照组SHG-44细胞总蛋白电泳图谱清

晰(图2)。PDquest 7.1软件分析后有23个差异蛋白点,其中21个蛋白点表达下调,2个蛋白点表达上调。

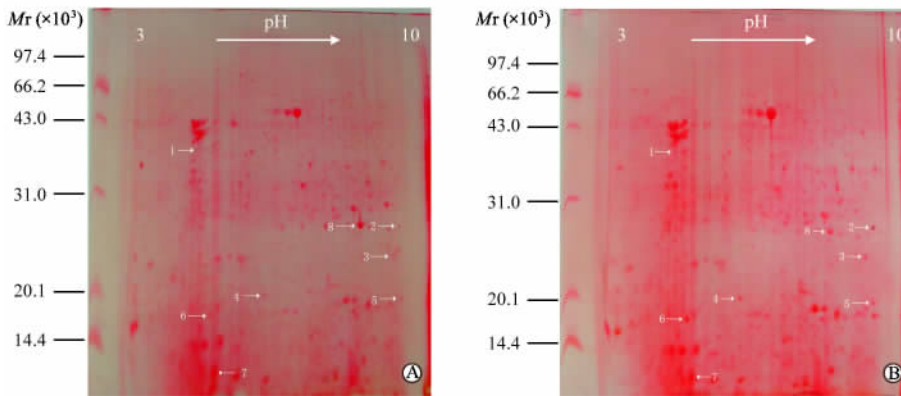


图2 SHG-44细胞的蛋白表达图谱

Fig 2 The protein expression maps of SHG-44 cells

A: Nurdy treated group; B: Blank control group. Arrows indicate the differential proteins subjected to mass spectrum analysis

2.3 高丰度差异表达蛋白质质谱分析结果 选取的高丰度表达差异蛋白点均获得良好肽指纹图,高丰度表达的差异蛋白分别为:未知蛋白(unknown protein)、增殖相关基因A (proliferation-associated gene A)、解链蛋白Up1 (unwinding protein 1, Up1)、交替拼接因子ASF-3 (alternative splicing factor ASF-3)、丝切蛋白1(cofilin 1)、真核转录启动因子5A(eukaryotic translation initiation factor 5A, eIF-5A)、β半乳糖苷酶结合凝集素(beta galactoside binding lectin)、Pi类谷光苷肽-S转移酶(glutathione-S-transfrease Pi, GSTPi)(表1)。

表1 高丰度表达差异蛋白点的质谱分析结果

Tab 1 Identification results of differential protein spots highly expressed with mass-spectrum

Spot No.	SWISS-PROT/NCBI ID	Description	Match score	Sequence coverage(%)
1	gi 16924319	Unknown protein	95	50
2	gi 4505591	Proliferation-associated gene A	236	87
3	gi 2554653	Up1	223	71
4	gi 105295	Alternative splicing factor(ASF-3)	127	52
5	gi 5031635	Cofilin 1(non-muscle)	126	58
6	gi 124229	Eukaryotic translation initiation factor 5A(eIF-5A)	77	35
7	gi 361563	Beta galactoside binding lectin	140	81
8	gi 32187525	Glutathione-S-transfrease Pi	132	70

3 讨论

SHG-44 是一种中度恶性的胶质瘤细胞(WHO 分级: II ~ III 级)。本实验证实, 诺帝作为人工合成的 NDGA 类化合物, 在对 SHG-44 的诱导分化中呈时-效和量-效依赖性, 与本研究室以往研究^[1]中 NDGA 类化合物的作用一致, 说明人工合成的诺帝具有类似 NDGA 类化合物的生物学作用。蛋白质既是细胞的组成成分, 又是细胞生物功能的执行者^[6], 因此, 分析诺帝诱导分化前后胶质瘤细胞 SHG-44 蛋白表达改变, 有助于了解诺帝诱导细胞分化的作用机制。

本实验所发现的诺帝诱导胶质瘤细胞 SHG-44 分化的差异蛋白中, 增殖相关基因 A 为抗氧化酶家族的成员, 研究表明该蛋白质能够促进肿瘤细胞的生长并抑制其凋亡, 与肿瘤细胞的发生、发展密切相关。由此可以推测该蛋白的表达下调与诺帝诱导分化后 SHG-44 细胞生长减慢及凋亡增加有关^[7,8]; 解链蛋白 1 包含有 2 个 RNA 识别结构 RRM1 和 RRM2, 能与 hnRNP A1 一起促进哺乳动物细胞端粒的延长^[9]。该蛋白的表达下调有可能与瘤细胞诱导分化后细胞增殖减慢有关。在肿瘤的发生中, 各种基因的交替拼接是一种普遍现象^[10]。交替拼接因子 ASF-3 在 SHG-44 细胞诱导分化后表达下调的意义目前还不十分清楚; 丝切蛋白 1 是一种肌动蛋白调节蛋白, 能促进肌动蛋白丝的解聚并参与细胞的有丝分裂及胞质内细胞动力学的调节^[11], 可以推测诺帝诱导分化后的 SHG-44 细胞增殖减慢、移动性下降等现象与此有关。真核转录启动因子 5A 能够启动蛋白第 1 链的合成, 促进 mRNA 的翻译, 从而控制细胞的生长和死亡^[12]。由此可以推测诺帝诱导胶质瘤细胞 SHG-44 分化后其表达下调可能是分化后的 SHG-44 细胞生长减慢的原因之一。 β 半乳糖苷酶结合凝集素具有多方面的功能, 与细胞的增殖、分化、凋亡等均有关^[13], 诺帝诱导后其表达下调到底在 SHG-44 的诱导分化中具有哪方面的作用尚不清楚。Pi 类谷光甘肽-S-转移酶是一种重要的异种生物代谢酶, 对于化疗药等亲电子类物质所引起的损伤具有保护作用, 因而与化疗药的抗药性有关^[14]。诺帝诱导胶质瘤细胞 SHG-44 分化后 Pi 类谷光甘肽-S-转移酶表达上调可能为一种损伤反应。本实验结果表明, 诺帝诱导胶质瘤细胞 SHG-

44 分化后的差异蛋白涉及细胞增殖、分化、转录、翻译及凋亡等各个方面, 进一步对这些差异蛋白进行功能研究, 可了解诺帝的作用机制。

[参考文献]

- [1] 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: 285-288.
- [2] Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods[M]. Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, 1998: 42-43.
- [3] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21: 1037-1053.
- [4] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 90-91.
- [5] 王 新, 时永全, 赵燕秋, 等. 胃癌细胞耐药相关蛋白质分子的差异展示[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23: 281-284.
- [6] Mullner S. The impact of proteomics on products and processes[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2003, 83: 1-25.
- [7] Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation[J]. Science, 2003, 300: 653-656.
- [8] Pak JH, Manevich Y, Kim HS, et al. An antisense oligonucleotide to 1-cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 49927-49934.
- [9] Fiset S, Chabot B. hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA *in vitro* [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29: 2268-2275.
- [10] Maeda T, Furukawa S. Transformation-associated changes in gene expression of alternative splicing regulatory factors in mouse fibroblast cells[J]. Oncol Rep, 2001, 8: 563-566.
- [11] Kaji N, Ohashi K, Shuin M, et al. Cell cycle-associated changes in slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 33450-33455.
- [12] Thompson JE, Hopkins MT, Taylor C, et al. Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 174-179.
- [13] Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, et al. Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8: 2570-2575.
- [14] Hara T, Ishii T, Fujishiro M, et al. Glutathione-S-transferase Pi has protective effects on cell viability against camptothecin [J]. Cancer Lett, 2004, 203: 199-207.

[收稿日期] 2005-11-29

[修回日期] 2006-03-20

[本文编辑] 贾泽军