

丙戊酸钠对胶质瘤细胞系U251中Nanog及GFAP表达的影响

安玉胜*(临沂市肿瘤医院头颈外科, 山东临沂 276001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2329-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.10

摘要 目的:研究丙戊酸钠对胶质瘤细胞系U251中转录因子Nanog及角质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。方法:取对数生长期的U251细胞,采用MTT法检测0、0.5、1.0、2.0 mmol/L丙戊酸钠对U251细胞增殖的影响($n=7$);免疫细胞化学技术和逆转录聚合酶链式反应检测试验组(1.0 mmol/L丙戊酸钠)和对照组(完全培养基)细胞内GFAP、Nanog蛋白的表达和Nanog mRNA的表达。结果:0、0.5、1.0、2.0 mmol/L丙戊酸钠诱导U251细胞后的活细胞吸光度分别为(0.7571 ± 0.0086)、(0.7034 ± 0.0098)、(0.6277 ± 0.0199)、(0.6033 ± 0.0101),表明丙戊酸钠能明显抑制U251细胞的增殖($P<0.01$),且具有浓度依赖性;与对照组比较,试验组细胞内GFAP蛋白[阳性细胞率:(39.23 ± 0.71)% vs. (78.09 ± 0.44)%]表达明显增强($P<0.01$),Nanog mRNA[灰度值:(0.6516 ± 0.0444) vs. (0.3331 ± 0.0540)]及其蛋白[阳性细胞率:(85.23 ± 0.59)% vs. (52.23 ± 0.61)%]表达明显降低($P<0.01$)。结论:丙戊酸钠能明显抑制U251细胞的增殖,可能与降低细胞中Nanog的表达、增强GFAP蛋白表达有关。

关键词 胶质瘤细胞系U251;丙戊酸钠;角质纤维酸性蛋白;Nanog

Influence of Sodium Valproate on the Expression of Nanog and GFAP in U251 Gliomas Cell Line

AN Yu-sheng(Dept. of Head and Neck Surgery, Linyi Tumor Hospital, Shandong Linyi 276001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the influence of sodium valproate on Nanog and GFAP in U251 glioma cell line. METHODS: Taking human gliomas U251 cells at logarithmic growth phase as example, The effect of 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mmol/L sodium valproate on them were determined by MTT assay ($n=7$). The immunohistochemistry test and RT-PCR were used to detect the protein expression of GFAP and Nanog and the level of Nanog mRNA in trial group (1.0 mmol/L sodium valproate) and control group (complete medium). RESULTS: After treated with 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mmol/L sodium valproate, the absorbance of U251 cells were (0.7571 ± 0.0086), (0.7034 ± 0.0098), (0.6277 ± 0.0199) and (0.6033 ± 0.0101), showing sodium valproate could inhibit the proliferation of U251 gliomas cells in concentration-dependant manner ($P<0.01$). Compared with control group, the protein expression of GFAP [(39.23 ± 0.71)%, (78.09 ± 0.44)%] increased significantly, while the expression of Nanog mRNA [grey level of (0.6516 ± 0.0444), (0.3331 ± 0.0540)] and protein [(85.23 ± 0.59)%, (52.23 ± 0.61)%] in trial group decreased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Sodium valproate can significantly inhibit the proliferation of U251 gliomas cells, which may be associated with the down-regulation of Nanog expression and up-regulation of GFAP protein expression.

KEY WORDS U251 gliomas cell line; Sodium valproate; GFAP; Nanog

丙戊酸钠是临床上常用的抗癫痫药物。相对于其他的抗癫痫药物而言,其具有耐受性好、用药安全性高、不容易产生抵抗等优点。近年来,诱导分化治疗概念的提出,为胶质瘤的治疗提供了一条崭新的领域。诱导分化治疗是应用分化诱导剂,使恶性肿瘤细胞向正常细胞方向分化演变,甚至完全转变为正常细胞。国内外学者已开始探索该疗法在神经胶质瘤治疗中的潜在用途。脑胶质瘤是颅内肿瘤中较为常见的恶性肿瘤,其发病率较高,术后易复发,各种单一的治疗方案难以取得令人满意的效果。因此,探索新的治疗手段显得尤为重

要。肿瘤干细胞理论^[1]的提出,以及诱导分化治疗在临床的应用都为肿瘤的治疗提供了新的思路。丙戊酸钠除了抗癫痫作用以外,其通过诱导胶质瘤细胞分化对脑胶质瘤也有一定的抗肿瘤作用。丙戊酸钠诱导肿瘤细胞分化及抗肿瘤作用^[2-3]已开始受到国内外学者的重视。许多研究^[4-8]发现,胚胎肝细胞基因转录因子Nanog与肿瘤的恶性程度以及耐药、复发和转移有一定关系,是细胞未分化状态的标志。角质纤维酸性蛋白(GFAP)是神经细胞分化的标志,可以用来检测胶质瘤的分化高低。本文以胶质瘤细胞系U251为对象,研究丙戊酸钠对

- [5] 高明亮,刘莹,高明月.HPLC法测定去甲斑蝥素的含量[J].中国药师,2009,12(8):1081.
- [6] 陈晓艳,刘扬,张玮,等.去甲基斑蝥素纳米粒肠道吸收的体内外相关性研究[J].中草药,2009,40(12):1930.
- [7] 李国锋,王春霞,晏媛,等.体外扩散池法评价瑞巴派特经大鼠肠黏膜的透过特性[J].药学学报,2008,43(3):314.

- [8] 李国锋,孙亚彬,杨凌,等.Labrasol对p-糖蛋白底物紫杉醇经肠黏膜透过性的影响[J].中国医院药学杂志,2009,29(8):617.
- [9] 李玉华,张默,王坚成,等.吸收促进剂对蚓激酶肠道吸收的影响[J].药学学报,2006,41(10):939.
- [10] 张玮,张学农.壳聚糖纳米粒制备技术研究进展[J].抗感染药学,2008,5(2):65.

*副主任医师。研究方向:脑肿瘤。电话:0539-8121817。E-mail: theankang@163.com

(收稿日期:2013-01-20 修回日期:2013-02-22)

U251细胞中Nanog及GFAP表达的影响。

1 材料

1.1 仪器

CO₂细胞孵化箱(美国Thermo公司)。

1.2 药品与试剂

胎牛血清(美国Hyclone公司);胰蛋白酶(北京索莱宝公司);丙戊酸钠(湖南省湘中制药有限公司,批号:H20067474,纯度:99.96%);RNA提取试剂Trizol及MTT检测试剂盒(美国Invitrogen公司);逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];兔抗人Nanog及GFAP多克隆抗体及二抗、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 细胞

胶质瘤细胞系U251购自上海中科院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

取U251细胞用含10%胎牛血清的达尔伯克改良伊格勒(DMEM)培养基于37℃、5%CO₂培养箱中培养,隔天换液,5d传代1次,传代时用0.25%的胰酶消化剥离细胞。

2.2 丙戊酸钠溶液的配制

丙戊酸钠用DMEM培养基分别配成0.5、1、2 mmol/L,调节pH至7.2,经0.22 μm微孔滤膜滤过,4℃贮存备用。

2.3 MTT法检测丙戊酸钠对U251细胞增殖的影响

取对数生长期细胞,制成细胞悬液,将其分成4组,依次加入0(对照组)、0.5、1、2 mmol/L丙戊酸钠,另外设1组为调零组(只加正常培养基)。每组设7个复孔,分别培养3d,然后加入MTT试剂,继续培养30 min,震荡15 min,采用分光光度仪在470 nm波长处检测各组的吸光度值。试验重复3~5次,取平均值。吸光度值越大,活细胞越多。

2.4 免疫细胞化学技术检测U251细胞内GFAP、Nanog蛋白的表达

取生长旺盛的细胞用胰酶消化后,制成细胞悬液,备用。然后于6孔板的底部滴加1滴培养液,将经过处理的盖玻片放于6孔板内;而后于每个孔内加垂悬好的细胞悬液2 ml,置于5%CO₂培养箱内培养,12 h后细胞爬满盖玻片。取细胞,用含1 mmol/L丙戊酸钠、10%胎牛血清的DMEM培养基培养作为试验组,用完全培养基培养作为对照组,培养3d,隔日换液1次。第3天时取出细胞,弃去培养基,经过磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,10%甲醛固定,用30%双氧水1份+纯甲醇50份、0.3%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)及5%胎牛血清等处理后,加兔抗人Nanog及GFAP多克隆抗体,4℃过夜;PBS洗涤,加二抗,37℃孵育30 min,DAB显色,复染,封片。PBS代替一抗作为空白对照,正常培养的U251细胞作为阴性对照。光镜下观察,GFAP和Nanog基因蛋白产物阳性反应为棕黄色均匀细颗粒。低倍和高倍镜下观察,并随机选择5~10个高倍(×400)视野,计数1 000个细胞中阳性染色细胞,计算阳性细胞率=(阳性染色细胞/1 000)×100%。

2.5 RT-PCR法检测U251细胞内Nanog mRNA的表达

取“2.4”项下对照组和试验组的细胞,提取总RNA,取5 mg总RNA,按照RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA。PCR扩增目的基因时反应体系为:25 μl,94℃,5 min;94℃,

30 s;54.5℃,30 s;72℃,30 s;共30个循环;最后72℃,10 min;4℃保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,Gel-pro Analyzer软件进行半定量分析,以油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,分别计算2组细胞内Nanog mRNA表达的相对灰度值。特异性引物序列分别为GAPDH-F:5'-CCACCCATG-GCAAATCCCCATGGCA-3',GAPDH-R:5'-TCTAGACGGC-AGGTCAGGTCCACC-3',产物长度为596 bp;Nanog-F:5'-TCAGGGCTGTCTGAATAAGC-3',Nanog-R:5'-CCGACTG-TAAAGAATCTTCACCTATG-3',产物长度为196 bp。

2.6 统计学方法

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0统计软件分析,2组独立样本进行*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

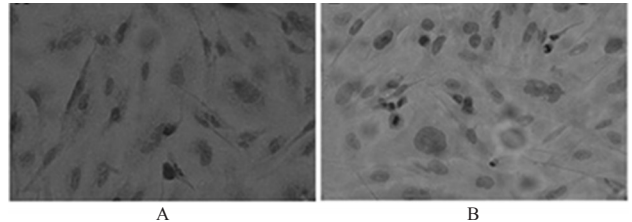
3.1 丙戊酸钠对U251细胞增殖的影响

与对照组[吸光度:(0.757 1 ± 0.008 6)]比较,0.5、1、2 mmol/L丙戊酸钠[吸光度:(0.703 4 ± 0.009 8)、(0.627 7 ± 0.019 9)、(0.603 3 ± 0.010 1)]能明显抑制细胞的增殖($P < 0.01$),且呈浓度依赖性($P < 0.01$)。

3.2 U251细胞内GFAP、Nanog蛋白的表达情况

对照组、试验组细胞内Nanog蛋白的阳性细胞率分别为(85.23 ± 0.59)%和(52.23 ± 0.61)%,提示丙戊酸钠能明显降低细胞内Nanog蛋白的表达($P < 0.01$);GFAP蛋白的阳性细胞率分别为(39.23 ± 0.71)%和(78.09 ± 0.44)%,提示丙戊酸钠能明显增强细胞内GFAP蛋白的表达($P < 0.01$)。此外,棕黄色细颗粒主要位于细胞核,同时也出现在细胞浆,这说明丙戊酸钠可以促进U251细胞的分化,使细胞恶性程度降低。2组细胞内Nanog和GFAP蛋白表达的显微镜图见图1。

Nanog:



GFAP:

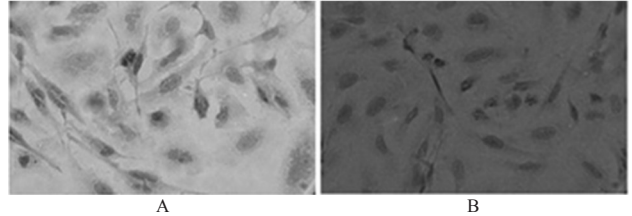


图1 2组细胞内Nanog和GFAP蛋白表达的显微镜图(×400)

A.对照组;B.试验组

Fig 1 Microscopic images of the expression of Nanog and GFAP protein of 2 groups(×400)

A. control group; B. trial group

3.3 U251细胞内Nanog mRNA的表达情况

对照组、试验组细胞内Nanog mRNA的灰度值分别为(0.651 6 ± 0.044 4)和(0.333 1 ± 0.054 0)。与对照组比较,试验组细胞内Nanog mRNA表达明显降低($P < 0.01$)。说明丙戊酸钠不仅可以诱导U251中Nanog蛋白表达降低,而且可以诱

导 Nanog mRNA 表达降低。2 组细胞内 Nanog mRNA 表达的电泳图见图 2。

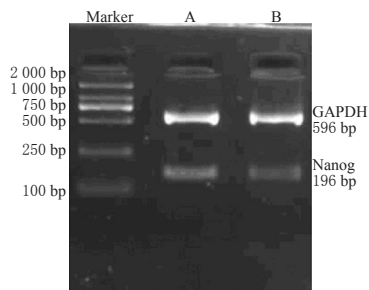


图 2 2 组细胞内 Nanog mRNA 表达的电泳图
A. 对照组; B. 试验组

Fig 2 Electrophoretogram of the expression of Nanog mRNA of 2 groups

A. control group; B. trial group

4 讨论

GFAP 是 1971 年由英国人首先发现的一种中间纤维丝蛋白^[9],其分子质量约为 50 kD,是构成神经胶质细胞骨架的重要成分之一^[10],一般出现在细胞核的周围和细胞浆中。GFAP 作为胶质纤维的特异标志物,可用于颅内肿瘤中胶质起源肿瘤的确定。随着对 GFAP 研究的不断深入,发现随着胶质瘤恶性程度的提高,GFAP 合成有呈进行性丧失的趋势^[11-13]。如上调 GFAP 基因的表达可以促进胶质瘤的分化,诱导瘤细胞凋亡^[14]。本研究应用丙戊酸钠诱导 U251 细胞后发现 GFAP 蛋白的表达明显增强,说明丙戊酸钠可以诱导 U251 细胞的分化成熟。

Nanog 作为重要的胚胎干细胞转录因子^[15],是细胞全能性或多能性及未分化的标志物^[16]。U251 细胞中 Nanog 的存在说明细胞具有较强的增殖能力。另外,Nanog 的表达同肿瘤的恶性程度高低、术后复发、耐药以及转移有一定的联系。在本研究中丙戊酸钠可以诱导 U251 细胞内 Nanog 表达明显降低,这也说明丙戊酸钠能够诱导 U251 细胞的分化成熟,使其恶性程度降低。

综上所述,丙戊酸钠能明显抑制 U251 细胞的增殖,可能与降低细胞中 Nanog 的表达、增强 GFAP 蛋白表达有关。但是丙戊酸钠通过什么机制来调节这 2 种因子表达以抑制 U251 增殖的,还有待进一步的探讨。

参考文献

[1] Huntly BJ, Gilliland DG. Cancer biology: summing up cancer stem cells[J]. *Nature*, 2005, 435 (7 046): 1 169.
[2] Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells[J]. *EMBO J*, 2001, 20 (24): 6 969.
[3] Kieslich M, Schwabe D, Cinatl J Jr, et al. Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2003, 20 (1): 15.

[4] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. *Nat Genet*, 2008, 40 (5): 499.
[5] 牛朝诗,倪永丰,陈建民.胶质母细胞瘤肿瘤干细胞的分离培养与生物学特性研究[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2009, 14 (1): 25.
[6] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432 (7 015): 396.
[7] 魏宇佳,赵洪洋,姜晓兵,等.免疫磁珠法分离、培养人脑胶质瘤干细胞[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2008, 7 (5): 426.
[8] Santngata S, Ligon KL, Honick JL. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors[J]. *Am J Surg Pathol*, 2007, 31 (6): 836.
[9] Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, et al. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review[J]. *J Neurosurg*, 1997, 87 (3): 420.
[10] Chen MH, Yang WK, Whang-Peng J, et al. Differential inducibilities of GFAP expression, cytostasis and apoptosis in primary cultures of human astrocytic tumours[J]. *Apoptosis*, 1998, 3 (3): 171.
[11] Peraud A, Mondal S, Hawkins C, et al. Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2003, 20 (2): 53.
[12] Zamecnik J, Vargova L, Homola A, et al. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004, 30 (4): 338.
[13] Fiks T, Jesionek-Kupnicka D, Zakrzewski K, et al. Clinicopathological analysis of pilocytic astrocytomas and gangliogliomas[J]. *Pol J Pathol*, 2001, 52 (1/2): 47.
[14] Pekny M, Eliasson C, Chien CL, et al. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 239 (2): 332.
[15] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003, 113 (5): 643.
[16] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. *Cell*, 2003, 113 (5): 631.

(收稿日期:2012-12-24 修回日期:2013-01-12)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅