

JDP2 在神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞分化中的作用

沈金花* 吴萌* 吴宁华 张业† 沈翊菲†

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005; Division of Hematology & Oncology, Department of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, USA. * 同等贡献.

† 联系人, E-mail: yfshen@ms.imicams.ac.cn, yfshen@pumc.edu.cn, yezhang@pumc.edu.cn

摘要 c-Jun二聚化蛋白(JDP2)是AP-1 家族成员, 参与基因的转录抑制. 为探讨JDP2 在神经母细胞瘤分化过程中的作用, 构建了稳定整合有JDP2 全长编码区的SH-SY5Y细胞株(SY5Y-JDP2). 实验结果显示, JDP2 能促进SH-SY5Y细胞的分化. 与对照细胞相比, SY5Y-JDP2 细胞在S期比例降低, 生长速率迟缓, 并且表现p21 高水平表达, 在分化过程中cyclin D1 降低. 由此可见, JDP2 对生长的抑制作用可能是SH-SY5Y细胞撤出细胞周期进入分化的主要原因.

关键词 JDP2 SH-SY5Y 细胞 全反式维甲酸(RA) 分化 p21

神经母细胞瘤是发生在儿童中的一种常见的恶性肿瘤. 神经母细胞瘤细胞衍生于肾上腺髓质或交感神经细胞的神经嵴细胞^[1]. SH-SY5Y细胞是人神经母细胞瘤细胞系SK-N-SH中的一个克隆, 具有交感神经节细胞的某些特性. 许多分化诱导剂, 包括维甲酸(RA)、佛波醇酯(TPA)等均能诱导SH-SY5Y细胞分化成神经元样细胞^[2-4]. 因此, SH-SY5Y细胞是研究RA诱导神经母细胞瘤分化机制的理想模型^[5,6].

c-Jun二聚化蛋白 2 (JDP2)是转录因子AP1 家族成员. JDP2 蛋白可以形成同源二聚体, 也可以与其他AP1 家族转录因子(如c-Jun, JunB, JunD, ATF-2 等)结合形成异源二聚体, 从而抑制这些转录因子的功能^[7]. 作为AP-1 家族的抑制因子, JDP2 首先被发现可以促进肌肉细胞的分化^[8], 而JDP2 对RA诱导的F9 细胞分化具有抑制作用^[9]. 因此, 本文主要探讨JDP2 蛋白对神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞神经分化的影响, 以进一步揭示JDP2 蛋白的生物学功能.

1 材料和方法

() 材料. 全反式维甲酸(ATRA), G418, MTT, 碘化丙啶及二甲基亚砷(DMSO)均为Sigma公司产品. RPMI-1640 培养基为Gibco-BRL公司产品. TRIzol, M-MLV逆转录酶、脂质体Lipofectamine²⁰⁰⁰和pcDNA6 为Invitrogen公司产品. 抗cyclinD1 和抗Actin多克隆抗体及抗p21 单克隆抗体均为Santa-Cruz公司产品. 抗Neuronal Class β -tubulin (TuJ1)单克隆抗体购自Covance公司. 辣根过氧化物酶标记的二抗购自中山

生物技术公司. Oligo(dT)₁₈和PCR引物由上海生工生物技术公司合成. pEGFP-N1 质粒为 ClonTech 生物技术公司产品.

() 细胞培养和 RA 处理. SH-SY5Y 细胞按参考文献^[10]中方法培养. RA处理时, 加入终浓度 10 μ mol/L RA, 未用 RA 处理的细胞中以 DMSO 代替 RA.

() 稳定整合细胞株的建立. JDP2 cDNA 编码区片段基本参照Sambrook等人^[11]的RT-PCR方法从SH-SY5Y 细胞中获得. 采用 TRIzol 法提取细胞总RNA, 取 10 μ g 总 RNA 进行逆转录. 逆转录反应体系含: 4 μ L 5 \times 逆转录缓冲液, 1 μ L dNTP (各 10 μ mol/L), 20 U RNasin, 2 μ L 50 μ mol/L Oligo(dT)₁₈, 2 μ L 0.1 mol/L DTT, 10 μ g 细胞总 RNA, 200 U M-MLV 逆转录酶, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 94 $^{\circ}$ C 加热 5 min. JDP2 cDNA 经两轮 PCR 扩增. 第一轮 PCR 反应体系 20 μ L 含: 7 μ L 逆转录产物, 2 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 1.2 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 上下游引物各 1 μ L (上游引物: 5'-GGATCC-ATGATGCCTGGGCAGATCC-3', 下画线处为 *Bam*H 酶切位点; 下游引物: 5'-GAATTCACCTTCTCTCGA-GCTGCT-3', 下画线处为 *Eco*R 酶切位点), 2 μ L 2.5 mmol/l dNTP, 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶. 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C , 1 min, 57 $^{\circ}$ C , 45 s, 72 $^{\circ}$ C , 45 s, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将稀释 100 倍的第一轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR 扩增, 退火温度变为 60 $^{\circ}$ C , 其他条件不变. 508 bp JDP2 cDNA 片段定向插入真核表达载体 pEGFP-N1 中(pEGFP-JDP2). 采用

脂质体Lipofectamine²⁰⁰⁰转染法将pEGFP-N1-JDP2质粒转染SH-SY5Y细胞,37℃培养24h后换用含150 μg/mL G418(致死浓度)的培养基继续培养3周,其间每隔两天换一次液,将能够存活下来的细胞采用流式细胞分选后即得到稳定整合的SH-SY5Y细胞株.荧光显微镜下稳定转染细胞呈现明显的绿色荧光.

() 细胞转染与 Western 印迹分析. 质粒 pcDNA6, pEGFP-N1 和 pEGFP-JDP2 以 Lipofectamine²⁰⁰⁰说明书中方法进行转染. Western印迹分析方法见参考文献[12].

() 半定量RT-PCR. 基本参照文献[13]进行,用来检测SH-SY5Y细胞中神经分化的标志基因中分子量神经纤维蛋白基因(middle molecular weight-neuro-filament protein, *nf-m*)和神经特异的烯醇酶基因(neuron-specific enolase, *nse*)的表达水平. 对照细胞和过表达JDP2的细胞在RA处理相应时间后提取总RNA,测定浓度后调整到同一浓度,取10 μg等量的RNA进行RT-PCR反应. 逆转录反应体系为: 4 μL 5×逆转录缓冲液, 1 μL 4×dNTP(各10 μmol/L), 20 U RNasin, 2 μL 50 μmol/L Oligo(dT)₁₈, 2 μL 0.1 mol/L DTT, 10 μg 细胞总RNA, 加DEPC水至19 μL. 将反应体系于65℃加热5 min后置冰上,然后加200 U M-MLV逆转录酶,37℃反应1 h,94℃加热5 min使M-MLV逆转录酶灭活. PCR扩增体系: 4 μL RT产物, 2 μL 10×PCR缓冲液, 1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂, 10 μmol/L 5'及3'引物各2 μL, 2 μL 2.5 mmol/L dNTP, 1 U *Taq* DNA聚合酶. *nse*基因的5'引物序列为: 5'-CTATCC-TGTGGTCTCCATTG-3', 3'引物序列为: 5'-CCTC-AATTCTCATGAGCTGG-3'; *nf-m*基因5'引物序列为: 5'-TGGGAAATGGCTCGTCATTT-3', 3'引物序列为: 5'-CTTCATGGAAGCGCCAATT-3'; *actin*基因5'引物序列为: 5'-TGACCCAGATCATGTTTGAG-3', 3'引物序列为: 5'-GAGGAG-CAATGATCTTGATC-3'. 扩增条件为: 94℃, 1 min, 55℃或58℃, 45 s(55℃为扩增*nse*, 58℃为扩增*nf-m*和*actin*), 72℃, 1 min, 35次(扩增*nse*和*nf-m*)和25次(扩增*actin*)循环; 72℃延伸10 min. 取相同体积的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分离分析.

() 流式细胞仪分析. 将1×10⁶ SH-SY5Y细胞用PBS洗两次,然后依次用0.25%胰酶及0.2 mmol/L EDTA室温消化30 s; 4℃, 1000 r/min离心5 min,收集细胞;再用PBS洗两遍后,加250 μL PBS重悬细

胞,再加750 μL无水乙醇,混匀后4℃放置至少16 h. 检测前,离心沉淀细胞,用PBS洗两遍,用500 μL PBS重悬,然后加入50 μg/mL碘化丙啶(PI)和终浓度为20 μg/mL的RNase A,37℃消化30 min后,用Coulter EPICS-XL流式细胞仪进行检测.

() MTT分析. 基本参照文献[14]进行. 在96孔板中接种4×10³个细胞/孔. 培养1 d后加入10 μmol/L RA处理相应天数. 向每孔加入MTT溶液至终浓度为0.5 g/L,37℃继续培养4 h,吸弃培养基,向每孔中加入150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解,然后在酶联免疫检测仪(Ceres 900 micro titer plate reader, Bio-Tek Instruments Inc.)上测定490 nm波长下各孔的光吸收值. 每组实验重复3次,每次做3个平行样品. 结果以与对照细胞之比的百分数表示. 数值和标准差来自3次独立实验.

2 结果与讨论

2.1 JDP2 诱导 SH-SY5Y 细胞分化

转染pcDNA6和pEGFP空载体的SH-SY5Y细胞与非未经转染的表现相似的形态,细胞呈现圆形或稍长. 而稳定转染JDP2的SH-SY5Y细胞(SY5Y-JDP2)呈现类似神经元的突触,提示SY5Y-JDP2细胞发生自发分化. 经RA诱导4 d后SY5Y-JDP2细胞长出更长的突触(图1). 这些结果提示,过表达JDP2能促进SH-SY5Y细胞向神经细胞方向分化.

为检测JDP2对神经母细胞瘤分化的作用,使用

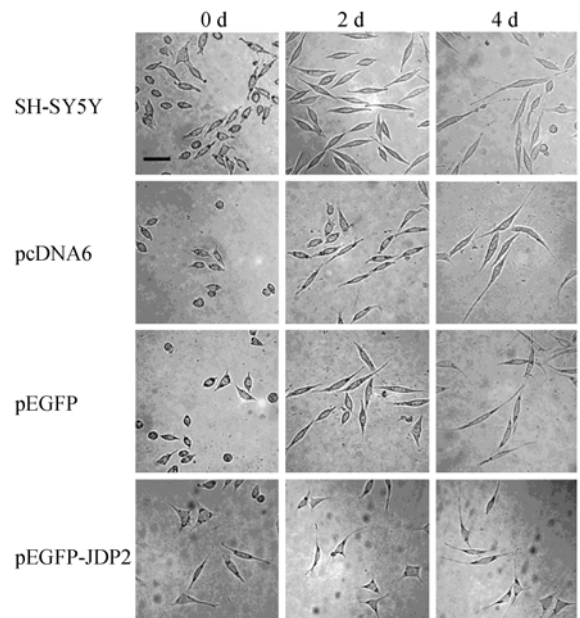


图1 转染JDP2引起SH-SY5Y细胞形态变化
10 μmol/L RA分别处理0, 2和4 d的细胞形态学观察. 标尺示30 μm

半定量RT-PCR的方法检测了神经分化标志基因*nse*和*nf-m*的RNA表达水平(图2)。结果发现, RA处理前,*nf-m*和*nse*在SY5Y-JDP2细胞中均有表达,而在SH-SY5Y细胞中只检测到微量的*nse*。当用10 μmol/L RA处理细胞4 d后,*nf-m*和*nse*基因在两组细胞中表达水平均升高,但在JDP2稳定整合细胞系中*nf-m*和*nse*的表达水平增加更明显。神经纤维蛋白属于中间纤维蛋白家成员。在神经细胞中有3种由主要神经纤维蛋白(NF-L, NF-M和NF-H)组成的异源多聚体。它们是神经突触最丰富的细胞骨架组分。NSE也是一种神经元标志蛋白,存在于人体的神经母细胞瘤、神经节神经母细胞瘤、神经节细胞瘤以及包括SH-SY5Y在内的培养神经母细胞瘤细胞中。神经母细胞瘤细胞在分化试剂的作用下诱导表达NSE和NF-M^[15,16]。在RA的诱导下70%神经母细胞瘤细胞可以分化成神经元样表型,并伴随着NSE和NF-M的表达增加^[3]。为显示SH-SY5Y细胞和SY5Y-JDP2细胞的差异,应用另一种特异的神经分化标志蛋白β-tubulin (TuJ1)进行免疫荧光分析。结果显示,SH-SY5Y细胞

中TuJ1表达水平非常低,而在SY5Y-JDP2细胞中TuJ1表达水平很高并能被清楚地观察到。SY5Y-JDP2细胞在形态上的变化以及神经特异标志基因的高表达提示JDP2在促进SH-SY5Y细胞分化上发挥作用。

2.2 SY5Y-JDP2细胞的增殖和细胞周期调控

已有研究报道,JDP2可能通过细胞周期阻滞来促进骨骼肌细胞分化^[8]。在神经母细胞瘤细胞分化过程中,撤出细胞周期也是一个关键的步骤。因此我们使用流式细胞仪和MTT方法检测了JDP2对细胞周期和增殖的影响(图3)。流式细胞仪检测结果表明,在RA处理前,处于S期的SY5Y-JDP2只占(19.3 ± 1.5)%,而在SH-SY5Y细胞以及转染EGFP的SH-SY5Y细胞中S期比例约为27% (图3(a)和(b))。RA处理过程中,3组细胞处于S期的比例都逐渐降低,其中SY5Y-JDP2细胞一直保持在最低的水平。MTT分析也显示,SY5Y-JDP2细胞增殖相对速率只有对照细胞的75%(图3(c), 0 d)。然而,RA诱导4 d后,SY5Y-JDP2细胞与对照细胞生长速率的增殖速率逐渐接近相同的水平(图3(c), 2和4 d)。

上述结果提示,在无RA的条件下或在RA处理的早期,JDP2对SH-SY5Y细胞的增殖有显著的影响。在无RA的条件下,JDP2使SY5Y细胞在形态学上出现神经细胞的某些特征,并伴随着神经标志基因的高表达。因此过表达JDP2可能诱导了SH-SY5Y细胞的神经分化。我们发现,在RA处理初始,SY5Y-JDP2细胞具有明显的分化特征,但在RA处理4 d后,SY5Y-JDP2细胞与对照组细胞越来越相似。这提示JDP2主要在SH-SY5Y细胞分化早期起作用。

流式细胞仪检测的结果显示,RA诱导前处于S期的SY5Y-JDP2细胞的比例(图3(b))与RA诱导后的处于S期的SY5Y-JDP2的比例相似,提示JDP2可能通过调控细胞周期促进细胞分化。作为AP-1的抑制因子,JDP2可能参与调控生长相关基因的表达从而减缓细胞周期的进程。

2.3 p21和cyclin D1对SY5Y-JDP2细胞的调控

已有报道显示,在骨骼肌成肌细胞诱导分化过程中,细胞周期激活因子的表达水平降低、抑制因子表达水平升高是分化的关键步骤之一^[17]。因此,我们进一步检测了两种主要的细胞周期调控蛋白——细胞周期素依赖的激酶抑制蛋白p21和细胞周期素

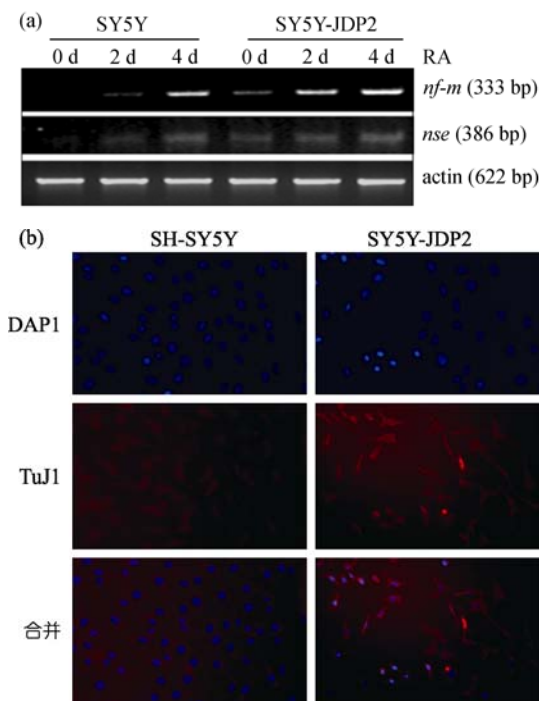


图2 JDP2对SH-SY5Y细胞中神经标志基因表达的影响 (a) 半定量RT-PCR分析SH-SY5Y细胞中*nf-m*和*nse*的表达水平。SY5Y示SH-SY5Y细胞;SY5Y-JDP2示SY5Y-JDP2细胞。两组细胞分别用10 μmol/L RA处理0, 2, 4 d。actin作为上样对照。(b) 免疫荧光染色检测SH-SY5Y细胞和SY5Y-JDP2细胞内神经特异β-tubulin (TuJ1, 红色)的表达

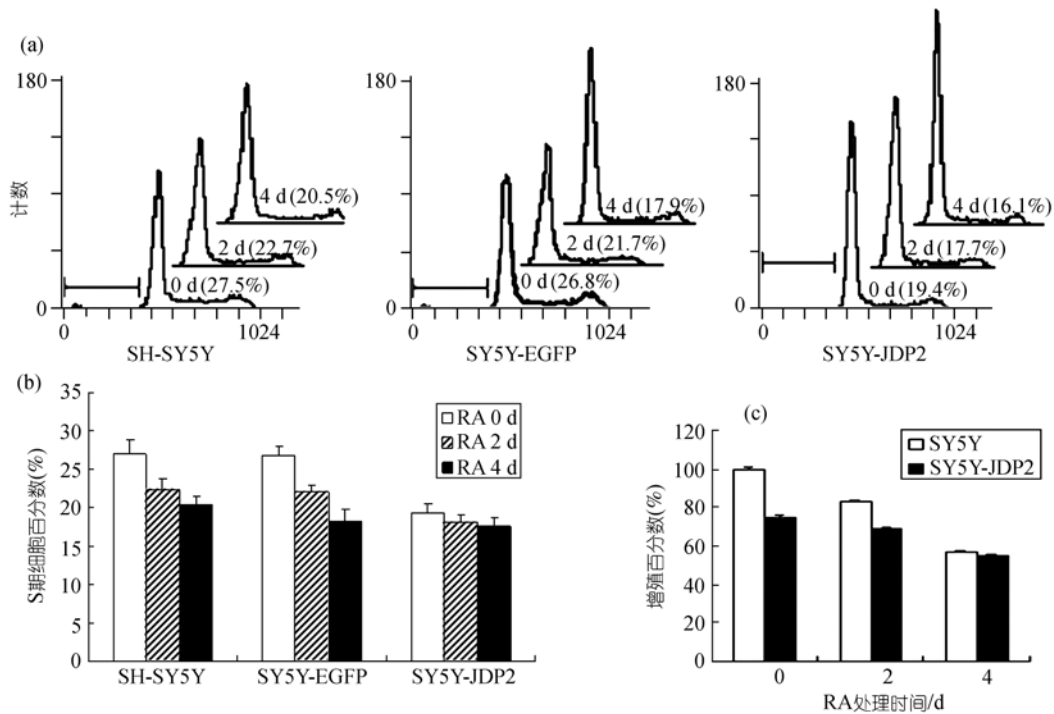


图 3 JDP2 对 SH-SY5Y 细胞增殖和细胞周期的影响

(a) 流式细胞术检测 RA 处理后细胞周期变化。数值显示 RA 处理过程中处于 S 期细胞所占细胞总数比例。SY5Y-EGFP, pEGFP-N1 瞬时转染的 SH-SY5Y 细胞; SY5Y-JDP2, pEGFP-JDP2 稳定转染的 SH-SY5Y 细胞。(b) 流式细胞术检测 RA 处理不同时间的 3 组细胞中 S 期所占比例, 数值为 3 次独立实验结果的平均值。(c) MTT 分析 SH-SY5Y 细胞和 SY5Y-JDP2 细胞 RA 处理过程中增殖变化。0 d 表示未加 RA 的对照细胞, 2 和 4 d 分别表示 10 μmol/L RA 处理 2 和 4 d 的细胞。未处理的 SH-SY5Y 细胞设为 100%

cyclin D1 在 SY5Y-JDP2 细胞中的表达水平。结果发现, 与未转染 JDP2 的 SH-SY5Y 细胞相比, SY5Y-JDP2 细胞表达高水平的 p21, 而 cyclin D1 表达水平在两组细胞中几乎相等(图 4, 0 d)。在 RA 诱导后, p21 在两组细胞中均增加, cyclin D1 均降低, 但是 SY5Y-JDP2 细胞中 p21 增加不明显, 而 cyclin D1 急剧降低(图 4, 4 d)。由于细胞周期阻滞是细胞分化的前提, 因此 JDP2 在分化早期的作用可能与调控细胞周期有关。

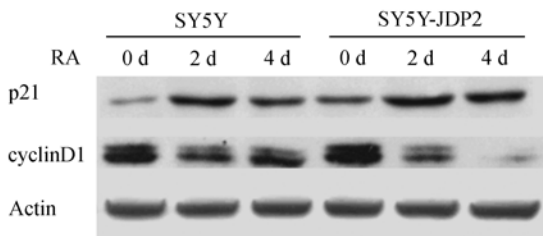


图 4 JDP2 对 SH-SY5Y 细胞中 p21 和 cyclinD1 表达的影响 Western 印记分析 RA 处理不同时间的 SH-SY5Y 细胞和 SY5Y-JDP2 细胞中 p21 和 cyclinD1 的表达。SH-SY5Y 和 SY5Y-JDP2 分别表示对照 SH-SY5Y 细胞和稳定转染 pEGFP-N1-JDP2 的 SH-SY5Y 细胞。两组细胞分别用 10 μmol/L RA 处理 0, 2 和 4 d。actin 作为上样对照

我们发现虽然 SY5Y-JDP2 细胞持续表达 JDP2, 但是 JDP2 只在分化早期发挥重要的作用, 在 RA 处理之后这种作用就逐渐不明显了。结果提示, 在 RA 诱导 SY5Y-JDP2 细胞分化过程中 JDP2 引发细胞分化的机制可能与 RA 诱导分化的机制不同, 在 SH-SY5Y 细胞终末分化过程中, 以 RA 的诱导作用为主。此外, JDP2 和 RA 在一定程度上具有叠加效应。与对照组细胞相比, RA 处理的 SY5Y-JDP2 细胞呈现最典型的神经细胞分化表型。例如, RA 处理 4 d 的 SY5Y-JDP2 细胞中 cyclin D1 下降到几乎检测不出的水平, 提示细胞周期阻滞处于最为显著的状态。

3 结论

总之, 为研究 JDP2 在神经母细胞瘤细胞分化中的作用, 我们首先建立了稳定转染 *jdp2* 全长编码序列的 SH-SY5Y 细胞系。JDP2 过表达引起细胞出现神经分化的形态变化, 并高表达神经分化标志基因 *nf-m*, *nse* 以及 *TuJ1*。SY5Y-JDP2 细胞发生细胞周期阻滞, 可能与 p21 表达升高有关, 而 cyclin D1 的降低需要 RA 进一步的处理。由于 JDP2 主要在 SH-SY5Y 细

胞分化早期发挥作用,提示 JDP2 与 RA 诱导 SH-SY5Y 细胞分化的机制有所不同.

参 考 文 献

- 1 Evans A E. Staging and treatment of neuroblastoma. *Cancer*, 1980, 45: 1799—1802
- 2 Pählman S, Ruusala A I, Abrahamsson L, et al. Kinetics and concentration effects of TPA-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells. *Cell Differ*, 1983, 12: 165—170[doi]
- 3 Rebhan M, Vacun G, Bayreuther K, et al. Altered ganglioside expression by SH-SY5Y cells upon retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neuroreport*, 1994, 5: 941—949[doi]
- 4 Perez-Juste G, Aranda A. Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of retinoic acid receptor beta gene expression. *Oncogene*, 1999, 18: 5393—5402[doi]
- 5 Brown A M, Riddoch F C, Robson A, et al. Mechanistic and functional changes in Ca^{2+} entry after retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Biochem J*, 2005, 388: 941—948[doi]
- 6 Pan J, Kao Y L, Joshi S, et al. Activation of *Rac1* by phosphatidylinositol 3-kinase *in vivo*: Role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, 2005, 93: 571—583[doi]
- 7 Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, et al. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 3094—3102
- 8 Ostrovsky O, Bengal E, Aronheim A. Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40043—40054[doi]
- 9 Jin C, Li H, Murata T, et al. JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 4815—4826[doi]
- 10 Shen J H, Zhang Y, Wu N H, et al. Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 2007, 414: 110—114[doi]
- 11 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 12 Xiao L, Lang W. A dominant role for the c-Jun NH₂-terminal kinase in oncogenic ras-induced morphologic transformation of human lung carcinoma cells. *Cancer Res*, 2000, 60: 400—408
- 13 Estève P O, Chicoine E, Robledo O, et al. Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J Biol Chem*, 2002, 277: 35150—35155[doi]
- 14 Ronca F, Chan S L, Yu V C. 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine induces apoptosis in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, through a p53-dependent pathway. *J Biol Chem*, 1997, 272: 4252—4260[doi]
- 15 Lariviere R C, Julien J P. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, 2004, 58: 131—148[doi]
- 16 Odelstad L, Pählman S, Nilsson K, et al. Neuron-specific enolase in relation to differentiation in human neuroblastoma. *Brain Res*, 1981, 224: 69—82[doi]
- 17 Kitzmann M, Fernandez A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 571—579[doi]

· 招 聘 ·

中国科学院生物物理研究所范祖森课题组 招聘副研究员及博士后

中国科学院生物物理研究所范祖森实验室主要从事肿瘤发生的分子基础、免疫活性细胞介导的肿瘤杀伤机制以及肿瘤与传染性疾病的免疫治疗等领域的研究,拥有一支全天候的创新研究队伍,正从事着学科前沿领域的研究探索(Fan Z, et al. *Cell*, 2003; *Nature Immunology*, 2003; *Blood*, 2006; Lu H, et al. *J Immunol*, 2006; Zhao T, et al. *Cell Death Differ & JBC*, 2007; Hua G, et al. *JBC*, 2007).

因工作需要,特招聘博士后和副研究员.受聘者应在结构生物学、生物化学、细胞生物学、免疫学及生物医学等相关领域获得博士学位,在一流实验室接受过博士或博士后训练,具有良好的研究论文写作和英语交流能力,并具有良好的组织协调能力.薪酬将根据应聘者个人能力面议.请应聘者将个人简历、陈述以及推荐信发送至 fanz@moon.ibp.ac.cn; Tel: 010-64888457.