

NR2E1 促神经母细胞瘤细胞分裂增殖的效应研究

朱海霞¹, 马楠², 焦春红², 薛蔚雯², 曾赵军²

(中南大学 1. 湘雅三医院神经内科, 长沙 410013; 2. 生物科学与技术学院分子生物学研究中心, 长沙 410078)

[摘要] **目的:** 探讨核蛋白样转录因子核受体亚家族 2 组 E 成员 1 (nuclear receptor subfamily 2 group E member 1, NR2E1) 对儿童神经母细胞瘤细胞株 IMR-32 生长、分裂、增殖的影响。**方法:** 应用 LipofectamineTM2000 将构建的针对核蛋白样转录因子 NR2E1 的 shiRNA 质粒载体转染神经母细胞瘤细胞株 IMR32, 并通过细胞计数法观察细胞生长抑制效应, 采用细胞免疫荧光染色检测神经母细胞瘤细胞株 IMR32 细胞分裂蛋白的表达。**结果:** 核蛋白样转录因子 NR2E1 的 shiRNA 质粒转染神经母细胞瘤细胞株 IMR32 48 h 后, 该细胞株生长缓慢; 相关细胞核分裂蛋白表达受到明显的抑制。**结论:** 核蛋白样转录因子 NR2E1 的 shiRNA 干扰质粒转染神经母细胞瘤细胞株 IMR32 后, 抑制了神经母细胞瘤细胞 IMR32 的分裂和增殖。

[关键词] 神经母细胞瘤; 核蛋白样转录因子 NR2E1; 细胞分裂

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.06.002

Effect of NR2E1 on the division and proliferation of neuroblastoma cells

ZHU Haixia¹, MA Nan², JIAO Chunhong², XUE Weiwen², ZENG Zhaojun²

(1. Department of Neurology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013; 2. Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT

Objective: To explore the effects of nuclear protein-like transcription factor nuclear receptor subfamily 2 group E member 1 (NR2E1) on the growth, division, and proliferation of neuroblastoma cell line IMR32.

Methods: A NR2E1 shiRNA plasmid vector was constructed and transfected into neuroblastoma cell line IMR32 using lipofedamineTM2000. Subsequent cell growth was measured by cell counting and the protein expression of somatic nuclear division was examined by immunofluorescent staining.

Results: At 48 h after the neuroblastoma cells IMR32 were transfected with NR2E1-shiRNA vector, the related nuclear division protein and the proliferation of the transfected cells IMR32 were remarkably depressed.

Conclusion: Cells division and proliferation of neuroblastoma cell line IMR32 is inhibited through transfection with the NR2E1-shiRNA plasmid vector.

KEY WORDS

neuroblastoma; nuclear receptor subfamily 2 group E member 1; cell division

收稿日期 (Date of reception): 2011-10-03

作者简介 (Biography): 朱海霞, 博士研究生, 主要从事神经系统疾病分子机制的研究。

通信作者 (Corresponding author): 曾赵军, Email: zengzj71@sina.com

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (81172154); 湖南省自然科学基金 (2011JJ5014)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81172154) and the Natural Science Foundation of Hunan Province, P.R. China (2011JJ5014)。

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童较常见的恶性肿瘤, 与其他的儿童期常见恶性肿瘤相比, 化疗效果差, 恶性程度高, 严重威胁儿童的生命安全。因此, 寻找其肿瘤发病的新关键分子和发病机制成为人们十分关切的问题。近年来, 研究发现核蛋白样转录因子核受体亚家族 2 组 E 成员 1(nuclear receptor subfamily 2 group E member 1, NR2E1) 是一种核蛋白样转录因子, 在胚胎形成过程中主要表达于脊椎动物前脑、外侧端脑中^[1-2]。NR2E1 核受体基因是维持成体干细胞增殖和成神经分化的关键基因^[3-4], 在神经系统发育过程中具有重要意义。然而, 目前 NR2E1 在神经母细胞瘤细胞中的功能及调控机制尚不清楚。

使用 RNA 干扰对核受体表达进行沉默, 是阐明特异性受体在细胞功能中的作用的有效手段之一, 本实验通过选择针对 NR2E1 核受体的 shiRNA 质粒对人神经母细胞瘤细胞株 IMR32 进行转染, 并进一步观察其能否影响 IMR32 的核分裂蛋白(centromere protein J, CENPJ) 的表达, 以及是否可以抑制神经母细胞瘤的生长, 初步探索 NR2E1 在神经母细胞瘤细胞中的调控作用, 以期为进一步研究其在神经肿瘤细胞中的致病机制及临床应用提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与传代

IMR32 细胞用含 5% 的小牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃, 5% CO₂ 培养箱内培养细胞, 每 2~3 天换液一次。待细胞长至 80% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 加含血清的培养基终止反应。轻柔吹打使其成为单细胞悬液, 按 1:3 的体积比分瓶传代。

1.2 稳定转染 NR2E1-shiRNA 的细胞系的建立

转染前 24 h, 接种对数生长期细胞(约 1.0×10^5 /mL) 至 6 孔板中的 3 孔, 加 2 mL 含 10% 灭活胎牛血清不含双抗的培养液, 并置于 37℃, 体积分数 95% O₂ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。至转染时细胞密度为 60% ~ 70%。转染前, 把 0.8 μg NR2E1-shiRNA 质粒和 2 μL LipofectamineTM2000 分别用体积分数 2% 新生胎牛血清 -DMEM 稀释至 50 μL, 静置 5 min 后把两者混合并再静置 20 min, 然后把该混合物加入培养板每孔细胞中, 于 37℃, 体积分数 95% O₂ 和 5% CO₂ 的培养箱内培养 6 h, 然后弃去转染液, 换用 DMEM 继续培养。对照组仅加入等体积的 LipofectamineTM2000。转染后 48 h, 加 215 μg/mL 新霉素筛选, 14 d 后筛选出稳定 NR2E1-shiRNA 质粒细胞克隆, 用含新霉素为 215 μg/mL 完全培养基常规传代培养。分别命名转染了阴性对照 shiRNA

空载体质粒的 IMR32 细胞克隆为 IMR32 Vector 1(IMR32+Vector 1)、IMR32 Vector 2(IMR32+Vector 2), 分别命名转染了 NR2E1-shiRNA 质粒的 IMR32 细胞克隆为 NR2E1 shiRNA I(1~4)IMR32。

1.3 细胞生长抑制效应的测定

取处于对数生长期的 IMR32 细胞及转染了各载体的 IMR32 细胞克隆培养后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 1000 r/min, 离心 5 min, PBS 洗 2 次, 以 1×10^4 个/mL 接种在 12 孔细胞培养板中, 待细胞长至 50% ~ 60% 融合时, 进行转染, 每个样品 4 个复孔, 每一浓度均设立溶剂对照, 同时设立空白对照组。分别培养 1, 3, 5, 7 d 后用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 胎盘蓝染色, 计数器计数细胞并进行统计学分析。

1.4 细胞免疫荧光鉴定

IMR32 细胞爬片后, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 2% Triton-X 100 破膜 3 min, 3% 过氧化氢封闭 10 min, 正常羊血清封闭 30 min, 一抗为兔抗 NR2E1 或鼠抗 CENPJ (1:500 稀释) 4℃ 过夜孵育(阴性对照以 PBS 代替一抗), TRITC 标记的二抗(1:1000 稀释) 孵育 30 min, DAPI (1:1000 稀释) 染核, 自发荧光淬灭, 抗荧光衰减, 封片。荧光倒置显微镜下观察各组样品, 随机选取 5 个视野进行细胞荧光计数, 每个视野细胞数大于或等于 50 个。

1.5 Western 印迹检测

收集前述细胞, 应用蛋白变性裂解液提取蛋白, BCA (bicinchoninic acid, BCA) 方法检测蛋白浓度, 各取 80 μg 蛋白质变性, SDS-PAGE 后电转移到 PVDF(polyvinylidene difluoride) 膜上, 用含 3% 脱脂奶粉的 TBST(Tris buffered saline with tween) 溶液 4℃ 封闭 16 h, 一抗为兔抗 NR2E1 或鼠抗 CENPJ 或鼠抗 β-actin(1:2000 稀释) 4℃ 封闭 16 h, TBST 洗膜, 二抗(1:4000 稀释) 室温孵育 50 min, 用 ECL 发光试剂盒对 PVDF 膜蛋白信号曝光显色, Image Quant350 化学发光系统照相保存, 检测 NR2E1 等蛋白的表达差异。

1.6 统计学处理

实验均重复 3 次以上。各实验组与对照组差异的显著性采用 *t* 检验, 应用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析, 数据结果用均数 ± 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 经 NR2E1-shiRNA 质粒转染的 IMR32 细胞生长形态

NR2E1-shiRNA 质粒转染神经肿瘤细胞 IMR32 形成克隆并培养后, 细胞形态与对照组比较, 细胞胞体变小, 多为梭形, 而对照组均呈扁平多角形(图 1)。

2.2 NR2E1-shiRNA 质粒转染 IMR32 对细胞增殖的影响

转染后 2 d, 加 215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素筛选, 14 d 后筛选出稳定克隆, 用含新霉素为 215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 完全培养基常规传代培养于 12 孔培养板中。NR2E1-shiRNA 质粒载体转染 IMR32 细胞培养 2 d 后, 对照组 IMR32 和转染了阴性对照 shiRNA 空载体质粒的 IMR32 细胞克隆 IMR32 Vector 1(IMR32+Vector 1)、IMR32 Vector 2(IMR32+Vector 2) 细胞数明显多于转染了 NR2E1-shiRNA 质粒的 IMR32 细胞克隆 NR2E1-shiRNA I(1~4)IMR32 的细胞, 且生长增

殖旺盛; 转染 4 d, 对照组细胞已呈饱和, 而转染 NR2E1-shiRNA 质粒的 IMR32 细胞克隆组细胞生长明显慢于对照组。经 1, 3, 5, 7 d 分别于每个孔随机选取 5 个视野进行细胞计数, 发现转染了阴性对照 shiRNA 空载体质粒的 IMR32 和野生型对照组 IMR32 细胞计数明显多于 NR2E1-shiRNA IMR32 转染的各组 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 NR2E1-shiRNA 质粒转染 IMR32 细胞后 CENPJ 的表达

使用细胞免疫荧光染色法对经 NR2E1-shiRNA 质粒转染的 IMR32 细胞 CENPJ 表达量的变化进行分析发现: CENPJ 在人神经母细胞瘤 IMR32 细胞的表达主要集中在细胞分裂期, 以细胞分裂中、后、末期中心体最为常见, 经 NR2E1-shiRNA 质粒转染后 2 d, IMR32 的 CENPJ 的表达均下降; 转染 4 d 后, CENPJ 表达进一步下降, NR2E1 维持低水平表达(图 3, 4)。阴性对照质粒转染 IMR32 后与 IMR32 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

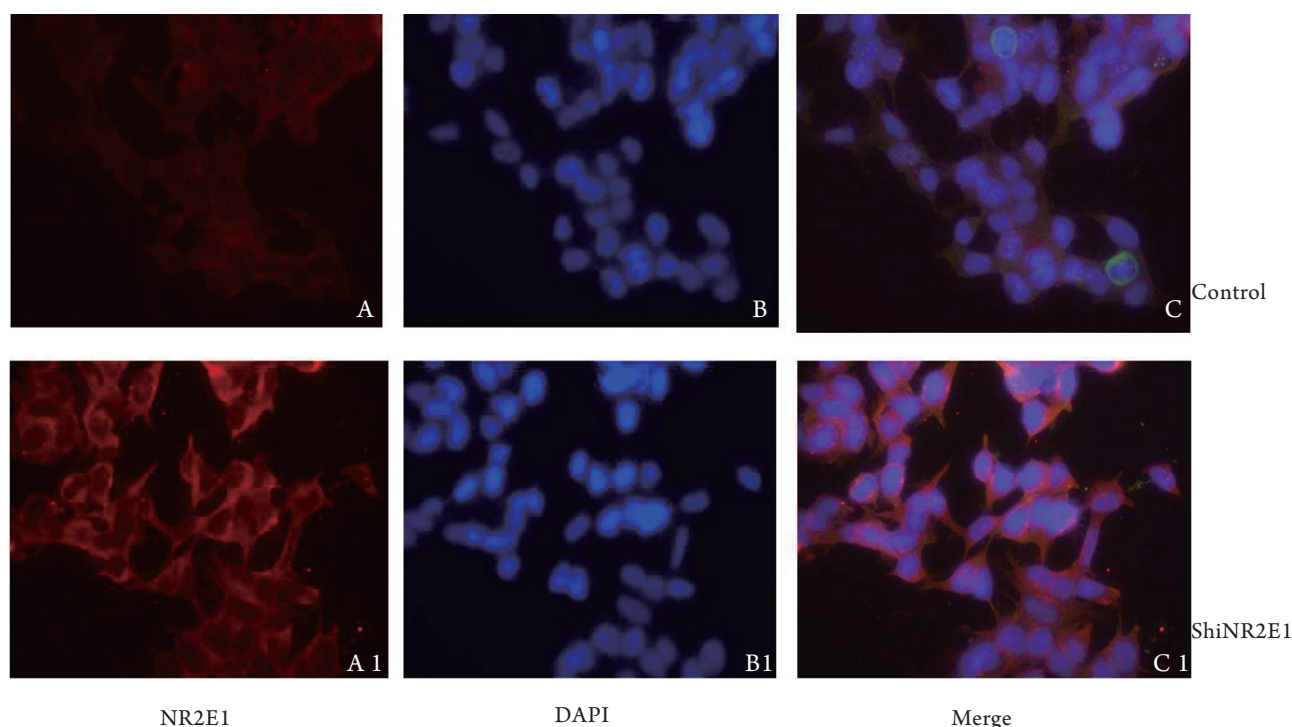


图 1 NR2E1-shiRNA 质粒及空载体分别转染 IMR32 细胞后 IMR32 细胞形态及 NR2E1 表达的免疫荧光染色 ($\times 100$)。A, A1: IMR32 细胞转染后, NR2E1 染色呈阳性 (红色); B, B1: DAPI 染色细胞核呈阳性 (蓝色); C, C1: 重叠两组照片为 Merge。Control: 转染空载体的 IMR32 细胞; ShiNR2E1: 转染 NR2E1-shiRNA 质粒的 IMR32 细胞。

Figure 1 Morphological alteration and expression of NR2E1 immune fluorescence staining in the IMR32 cells with transfection of NR2E1 shiRNA plasmid vector or control vector ($\times 100$). A, A1: IMR32 cells were transfected with the vectors, and NR2E1 immune fluorescence staining are positive (red); B, B1: the nuclear counterstaining with DAPI was blue; C, C1: Merge photo shows overlapping staining in the two groups. Control: IMR32 cells transfected with control vector of NR2E1; ShiNR2E1: IMR32 cells transfected with NR2E1-shiRNA plasmid vector.

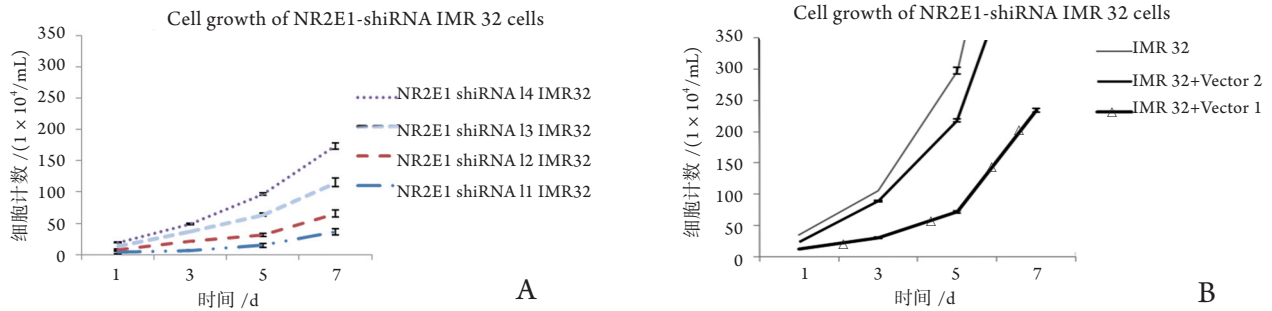


图2 NR2E1 基因沉默后对各细胞克隆细胞生长的影响。A: 细胞计数检测 ShiNR2E1 IMR32 细胞生长曲线; NR2E1-siRNA I(1~4) IMR32 分别为转染了 NR2E1-siRNA (1~4) 质粒的 IMR32 细胞克隆; B: 细胞计数检测转染 ShiNR2E1 空载体的 IMR32 细胞和 IMR32 细胞的生长曲线。IMR32 Vector 1(IMR32+Vector 1)、IMR32 Vector 2(IMR32+Vector 2) 分别为转染了 siRNA 空载体质粒的 IMR32 细胞克隆。IMR32 为野生型细胞。

Figure 2 Effects of NR2E1 silencing on cell growth. A: Cell growth curve of SiNR2E1 IMR32 by cell counting assay; NR2E1-siRNA I(1-4) IMR32 was respectively transfected with NR2E1-siRNA (1-4) plasmid vector IMR32 cell clone(1-4); B: Cell growth curve of control vector of ShiNR2E1 IMR32 and wildtype IMR32 by cell counting assay; IMR32 Vector 1(IMR32+Vector 1), IMR32 Vector 2(IMR32+Vector 2) was respectively transfected with negative control shiRNA plasmid vector IMR32 cell clone. IMR32 was wildtype IMR32 cell.

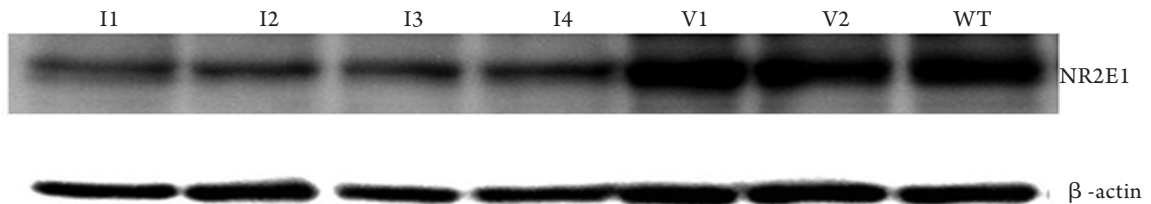


图3 Western 印迹检测 SiNR2E1 IMR32 细胞与对照 IMR32 细胞 NR2E1 表达。I1, I2, I3, I4: 分别为 SiNR2E1 IMR32 细胞克隆 1, 2, 3, 4; V1, V2: 分别为 SiNR2E1 空载体 IMR32 细胞克隆 1, 2; WT: 野生型 IMR32 细胞。

Figure 3 Expression of NR2E1 in the SiNR2E1 IMR32 cells and IMR32 control cells by Western blot. I1,I2,I3,I4: SiNR2E1 IMR32 cell clone 1,2,3,4; V1,V2: SiNR2E1 control vector 1,2 of IMR32; WT: Wildtype IMR32 cells.

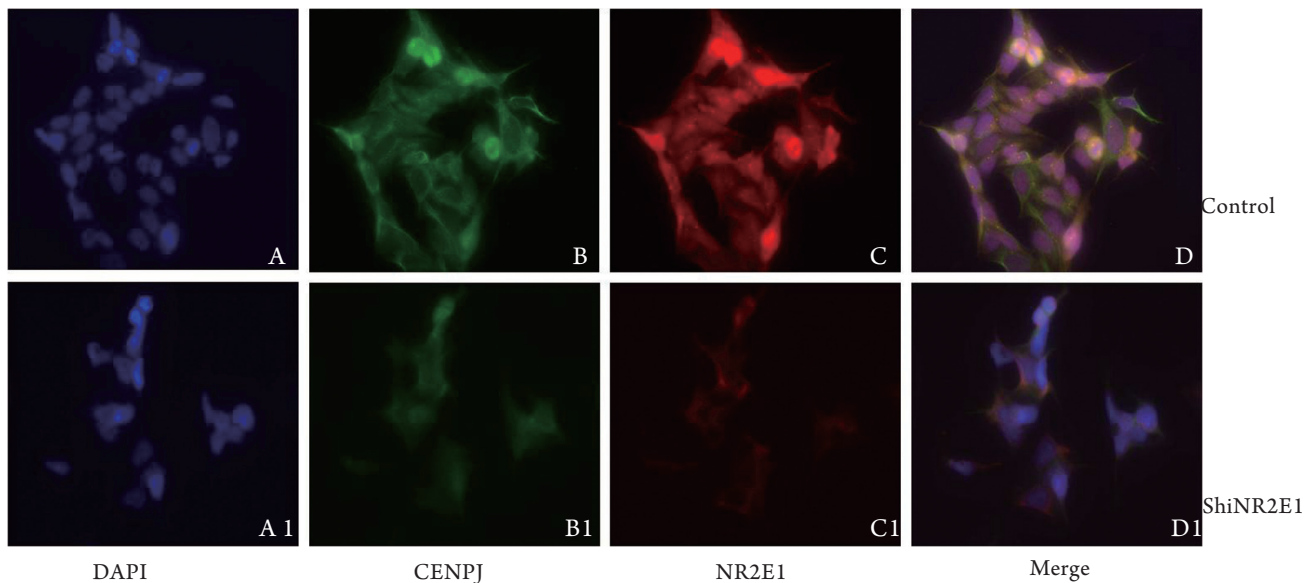


图4 NR2E1-siRNA 质粒转染 IMR32 细胞后 SiNR2E1 IMR32 与转染对照空载体 IMR32 细胞形态及 NR2E1、CENPJ 表达的免疫荧光染色 ($\times 100$)。A, A1: IMR32 细胞转染后, DAPI 染色显示细胞核阳性(蓝色); B, B1: CENPJ 染色显示阳性(绿色); C, C1: NR2E1 染色显示阳性(红色); D, D1: 重叠三组染色照片为 Merge。Control: 转染对照空载体的 IMR32 细胞; ShiNR2E1: 转染 NR2E1-siRNA 质粒的 IMR32 细胞。

Figure 4 Morphological alteration and expression of NR2E1 or CENPJ immune fluorescence staining in the IMR32 cells with transfection of NR2E1 shiRNA plasmid vector or control vector ($\times 100$). A, A1: Nuclear counterstaining with DAPI was positive(blue); B, B1: IMR32 cells were transfected with the vectors, and CENPJ immune fluorescence staining are positive (green); C, C1: NR2E1 immune fluorescence staining was positive (red); D, D1: Merge photo shows overlapping staining in the three groups. Control: IMR32 cells transfected with control vector of NR2E1; ShiNR2E1: IMR32 cells transfected with NR2E1-siRNA plasmid vector.

3 讨论

NR2E1 是一种核蛋白样转录因子, 在胚胎形成过程中主要表达于脊椎动物前脑、外侧端脑中^[1-2]。NR2E1 最初是作为一个“孤儿”核受体发现的, 没有已知的功能, 但现在研究人员却发现它对干细胞功能可能有潜在的贡献。从成年大脑中分离出来的、表达 NR2E1 的细胞, 能够繁殖、自我更新并分化成所有类型的神经细胞。因此, NR2E1 核受体基因是维持成体干细胞增殖和成神经分化的关键基因^[3-5], 在神经系统发育过程中具有重要意义。

IMR32 细胞来源于人神经母细胞瘤, 其细胞形态与正常神经元相似, 生理和生化功能也与正常神经元相似, 已广泛用于神经生物学(如神经元的迁移、增殖、凋亡等)的研究^[6-7]。因此, 可以选择该细胞作为模拟人神经元的细胞模型进行 NR2E1 基因功能的研究。首先, 通过 Western 印迹和细胞免疫荧光组织化学明确了 NR2E1 在 IMR32 细胞中的表达情况。实验结果显示: 无论在 mRNA 还是蛋白质水平, NR2E1 在 IMR32 细胞中均有表达; 在此基础上, 进一步分析 NR2E1 在 IMR32 细胞中的定位表达模式, 免疫荧光结果显示: NR2E1 主要在 IMR32 细胞胞浆及细胞核中表达。NR2E1 在 IMR32 细胞中的表达情况表明: 可以选择 IMR32 为模型, 并用小 RNA 干扰技术来分析 NR2E1 基因表达下调后对 IMR32 细胞增殖的影响。因此, 可以首先建立 NR2E1 在 IMR32 细胞中的基因表达下调模型, 并观察 NR2E1 基因表达下调后对 IMR32 细胞增殖和分裂的影响, 初步探讨 NR2E1 基因在神经母细胞瘤发病机制中的可能作用。作者通过脂质体转染的方法将 NR2E1-shiRNA 质粒导入了 IMR32 细胞, 经筛选可获得稳定表达 NR2E1-shiRNA 的 IMR32 的细胞系。应用 RT-PCR、免疫荧光和 Western 印迹对干扰效率进行鉴定, 结果显示相对于 IMR32 细胞而言, 在 mRNA 水平, NR2E1-shiRNA 细胞中 NR2E1 的表达显著下调(下调率接近 80%); 在蛋白水平上, NR2E1-shiRNA 细胞中 NR2E1 的表达也呈现出与 mRNA 类似的模式。这些结果表明, 作者成功地构建了 NR2E1 基因沉默的 IMR32 细胞模型。利用该模型可检测 NR2E1 基因沉默对 IMR32 细胞增殖的影响。细胞计数结果显示: NR2E1 基因沉默后, IMR32 细胞增殖明显减慢, 经过统计学分析, 沉默细胞组和对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。显然, NR2E1 基因沉默可导致 IMR32 细胞的增殖减慢, 影响 IMR32 细胞的增殖。结合既往研究, 证实 NR2E1 具有促进多种细胞增殖的

作用^[8], 故认为 NR2E1 在神经母细胞瘤肿瘤的增殖中也起着重要的作用。

已有研究^[8-10]表明: NR2E1 表达水平的增高可促进神经干细胞、脑部肿瘤细胞的发育而发挥保护作用。而在相关的研究中, 还发现 NR2E1 基因沉默后能诱导 IMR32 细胞凋亡, 导致大脑发育过程中神经细胞数量进一步减少。这也说明 NR2E1 基因沉默可从影响细胞的增殖和分裂两方面来影响神经细胞的数量。综上所述, NR2E1-shiRNA 的 IMR32 细胞可以作为研究人类 NR2E1 基因沉默的神经元细胞模型, 并且在一定程度上可以反映脑组织中 NR2E1 的表达模式。结合 NR2E1 基因沉默能够抑制 IMR32 细胞增殖和影响细胞分裂相关蛋白 CENPJ 表达的实验, 可以初步推测在儿童神经母细胞瘤大脑特定区域中, 神经元数目明显减少^[11]的重要原因之一可能就是 NR2E1 在脑组织中的特异性表达下调, 抑制了神经细胞的进一步发育、增殖与分裂。本研究结果也证实了作者最初的推测, 即 NR2E1 表达下调可能进一步抑制神经元的增殖和细胞分裂, 但 NR2E1 表达异常与神经母细胞瘤脑病变发生之间的确切关系尚有待于进一步的研究。

志 谢

感谢瑞典歌德堡大学 Keiko Funa 教授在课题研究中提供的技术指导与咨询。

参考文献

1. Li W, Sun G, Yang S, et al. Nuclear receptor TLX regulates cell cycle progression in neural stem cells of the developing brain[J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(1):56-64.
2. Stenman JM, Wang B, Campbell K. Tlx controls proliferation and patterning of lateral telencephalic progenitor domains[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(33):10568-10576.
3. Qu Q, Sun G, Li W, et al. Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1):31-40.
4. Liu HK, Wang Y, Belz T, et al. The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(7): 683-695.
5. Sun G, Yu RT, Evans RM, et al. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39):15282-15287.
6. Sun LC, Mackey LV, Luo J, et al. Targeted chemotherapy using

- a cytotoxic somatostatin conjugate to inhibit tumor growth and metastasis in nude mice[J]. *Clin Med Oncol*, 2008, 2(8):491-499.
7. Kim Y. The effects of nutrient depleted microenvironments and delta-like 1 homologue (DLK1) on apoptosis in neuroblastoma[J]. *Nutr Res Pract*, 2010,4(6):455-461.
8. Niu W, Zou Y, Shen C, et al. Activation of postnatal neural stem cells requires nuclear receptor TLX[J]. *J Neurosci*, 2011,31(39):13816-13828.
9. Liu HK, Belz T, Bock D, et al. The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(18):2473-2478.
10. Belz T, Liu HK, Bock D, et al. Inactivation of the gene for the nuclear receptor tailless in the brain preserving its function in the eye[J]. *Eur J Neurosci*, 2007,26(8):2222-2227.
11. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model[J]. *Cancer Lett*, 2004, 204(2):213-224.

(本文编辑 傅希文)

《国际病理科学与临床杂志》2012年征订启事

《国际病理科学与临床杂志》(原名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》)创刊于1981年,为教育部主管、中南大学主办的国家级医学学术期刊,为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录,被评为“第2届中国高校特色科技期刊”,“第3届中国高校优秀科技期刊”,已成为病理科学与临床医学领域中颇具影响力的期刊。

本刊为双月刊,逢双月末出版,16开,国内外公开发行。定价15元/期,全年定价90元,国内统一刊号:CN 43-1458/R,国际标准刊号:ISSN 1673-2588;国内邮发代号:42-35,国外邮发代号:BM6564;各地邮局(所)均可订阅,漏订者也可直接汇款至湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院50号信箱《国际病理科学与临床杂志》编辑部,邮政编码:410078,订阅者请在汇款单附言注明所订刊物的年度、期号和册数。

编辑部电话:0731-84805495, 84805496; 传真:0731-84804351

Email: gwyxxy@126.com; gwyxxy@vip.163.com

[Http://www.gjbl.net](http://www.gjbl.net)

《国际病理科学与临床杂志》编辑部