

• 基础论著 •

沉默 MEF2C 基因对髓母细胞瘤 Daoy 细胞形态结构的影响

付鹏 赵立军 孙鹏 刘广丽 刘兴田

【摘要】 目的 探讨抑制人 MEF2C 基因后对髓母细胞瘤 Daoy 细胞形态结构的影响作用。方法 实验分为两组:对照组和干扰组。对照组 Daoy 细胞培养感染阴性慢病毒液,干扰组 Daoy 细胞培养感染 MEF2C-RNAi 慢病毒液。光镜下观察培养细胞的大体形态,然后利用透射电镜观察细胞的超微结构变化情况。同时将两组细胞分别接种至裸鼠背部皮下,观察裸鼠成瘤情况以及肿瘤组织的光镜下结构和电镜下超微结构变化情况。结果 干扰组 Daoy 细胞生长较对照组细胞生长缓慢,种植裸鼠后成瘤重量较对照组轻;光镜下显示对照组瘤组织细胞较干扰组瘤组织细胞排列密集;电镜下显示干扰组瘤组织细胞排列疏松,核固缩,凋亡小体形成。结论 沉默 MEF2C 基因可以引起异染色质减少、凋亡小体形成,影响细胞的形态结构,抑制肿瘤细胞生长,为其肿瘤生物治疗提供了实验依据。

【关键词】 髓母细胞瘤; MEF2C; RNAi; Daoy 细胞; 形态结构

Influence of silencing MEF2C genes on morphological structure of medulloblastoma Daoy cell FU Peng, ZHAO Li-jun, SUN Peng, LIU Guang-li, LIU Xing-tian. Department of Neurosurgery, Taian City Central Hospital, Taian 271000, China

Corresponding author: LIU Xing-tian, Email: xingtianliu@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of silencing MEF2C gene on the morphological structure of medulloblastoma Daoy cell. **Methods** The experiment was divided into two groups: control group and interference group. Daoy cells of control group were infected with negative LV liquid, and Daoy cells of interference group were infected with MEF2C-RNAi-LV liquid. Light-microscopy (LM) was used to observe general form of cells, and transmission electron microscopy (TEM) was used to observe ultrastructure changes of cells. Meanwhile, the two groups of cells were subcutaneously inoculated to the dorsum of nude mice to form transplantation tumors, respectively, and the morphological structures of tumor tissues were observed by LM and TEM. **Results** Daoy cells of interference group grew slower than cells of control group, the weights of transplantation tumors in interference group were lighter than those in control one. The tumor tissue cells of control group had more intensive array than those of the interference group; Tumor tissue cells of interference group showed array loose, nucleus pycnosis, apoptosis body formation under TEM. **Conclusions** Silencing MEF2C gene could cause heterochromatin reduce, apoptosis body formation, and influence cell morphology, inhibit tumor cell growth. This provides experimental basis for tumor biological therapy.

【Key words】 Medull oblastoma; MEF2C; RNA interference; Daoy cell; Morphological structure

髓母细胞瘤是一种源于胚胎残留组织的恶性程度极高的肿瘤,被定为4级肿瘤(WHO),好发于儿童,仅次于星形胶质细胞瘤而占第2位,其发生率占儿童颅内肿瘤的25%,是对人类尤其是儿童健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。髓母细胞瘤高度恶性,生长快,病程较短,为其治疗带来严峻的挑战。尽管目前手术

辅以放疗、化疗的治疗方案延长了患者生存时间,但其转移和高复发率仍然是一大难题。因此,探讨髓母细胞瘤发生机制以进一步提高治疗效果具有重要临床意义。本实验运用RNA干扰技术沉默髓母细胞瘤 Daoy 细胞中肌细胞增强因子2C(MEF2C)基因的表达后,利用光镜和透射电镜对沉默 MEF2C 的细胞形态结构进行观察,以探寻干扰 MEF2C 对髓母细胞瘤细胞生长影响的机制,为生物治疗髓母细胞瘤提供实验基础。

材料与amp;方法

1. 材料:人髓母细胞瘤细胞株 Daoy 购自北京协和

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.03.048

基金项目:山东省自然科学基金资助(ZR2009CM132)

作者单位:271000 山东省,泰安市中心医院神经外科(付鹏),病理科(孙鹏),检验科(刘广丽,刘兴田);泰安军区后勤部(赵立军)

通讯作者:刘兴田,Email:xingtianliu@yahoo.com.cn

细胞资源中心,慢病毒载体系统 LV3-MEF2C 来源于上海吉玛制药公司。DMEM 购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,PBS 溶液本室自配。SPF 级裸鼠 BALB/cASlac-nu 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。EM-1200EX 透射电镜观察为日本光电公司制造。Olympus 光学显微镜和倒置显微镜均为日本制造。

2. 细胞培养:Daoy 细胞接种于 6 孔板,每孔 6×10^5 个细胞,在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37 °C、5% CO₂、95% 空气条件的培养箱。实验分为对照组和干扰组。培养过夜后,对照组加入阴性慢病毒液,干扰组加入 MEF2C-RNAi-慢病毒液,24 h 后更换为完全培养液继续培养。

3. 标本制备:将上述处理后的两组细胞培养 3 d,倒置显微镜观察细胞形态,用胰酶消化,离心洗涤,分别做成体积大小约为 1 mm³ 的小块,采用固定液 4% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,进行常规电镜制样,JEM-1200EX 透射电镜观察。

4. 动物实验:将上述步骤处理的细胞培养 2 d 后分组接种至裸鼠背部皮下,每只 5×10^6 个细胞/0.1 ml 生理盐水,每组 6 只。于接种后 30 d 时手术摘取肿瘤组织,称取瘤组织重量,分别取材制样,以透射电镜和光镜观察肿瘤组织结构情况。

5. 统计学分析:应用 SPSS 19.0 统计软件的 *t* 检验处理相关数据, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

结 果

一、培养细胞观察

1. 光镜观察:相同数量的细胞接种于相同底面积的培养板中,培养液体积也相同。培养 3 d 后,对照组肿瘤细胞生长旺盛,细胞由于分裂增殖,细胞间隙变小,细胞拥挤,细胞所占平面面积减小。干扰组肿瘤细胞生长缓慢,细胞间隙较大,细胞所占平面面积较大(图 1)。

2. 电镜观察:对照组肿瘤细胞多边形,细胞内可见大液泡。膜相结构界限清楚,厚薄均匀。线粒体圆形或椭圆形,外膜不完整,基质丰富。细胞核圆形或分叶,常染色质多,核仁清楚,异染色质边集明显(图 2, 3)。干扰组肿瘤细胞,多数细胞肿胀,细胞膜不完整,界限不清楚,线粒体肿胀,嵴不清晰。部分细胞异染色质边集,部分细胞核固缩,凋亡小体形成,可见早期、中期、晚期凋亡(图 4 ~ 6)。部分细胞转化良好,核膜边界清楚,线粒体较完整。

二、裸鼠成瘤组织观察

1. 移植瘤重量比较:两组裸鼠背部皮下种植 Daoy 细胞后 15 d 内皮下肿瘤组织大小未见明显差异。30 d

时脱臼处死裸鼠,剥离瘤组织,电子天平称量瘤组织重量。结果发现对照组裸鼠瘤组织平均重量(0.23 ± 0.05)g,干扰组裸鼠瘤组织平均重量(0.11 ± 0.04)g,两者间差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

2. 光镜观察:HE 染色显示对照组细胞密集,细胞核大小不等,核不规则,核分叶,胞质丰富,核分裂象多见,也可见片状坏死组织。干扰组细胞排列相对疏松,细胞体积相对偏大,核圆形、椭圆形以及不规则形,可见核碎裂、核固缩等(图 7, 8)。

3. 电镜观察:对照组细胞多边形,核大,核不规则,核分叶,异染色质丰富、边集明显,线粒体丰富,胞质内多出有黑色物质(图 9, 10)。干扰组细胞圆形或椭圆形,细胞体积变小,核分叶少,异染色质边集变轻,部分细胞可见核碎裂、核固缩以及凋亡小体形成等现象,线粒体结构正常(图 11 ~ 13)。

讨 论

MEF2C 又名 MADS 盒转录增强因子 2 多肽 C (C5DELq14.3; DEL5q14.3; 肌细胞特异的增强因子 2C),是一种由 MEF2C 基因编码的蛋白质,是 MEF2 家族中一个成员。MEF2C 主要与 MAPK7、EP300、Sp1 转录因子、TEAD1、SOK18、HDAC4/7/9 相互作用,在心肌、神经嵴、软骨细胞分化发育过程中发挥重要作用^[1]。该基因的突变可导致人类精神运动性迟滞、周期性震颤、上肢镜像运动、肌张力低下、脑电图异常、癫痫、失语、自闭症、磨牙、轻微畸形等。近来的研究发现,MEF2C 与某些肿瘤如肝细胞癌、T 细胞淋巴瘤、白血病^[2-4]等有关。

本研究采用 RNA 干扰技术沉默该基因后,光镜下观测到在相同面积的培养板内接种相同数量的细胞一定时间后,对照组细胞间的间隙变小,单个细胞所占面积变小说明细胞分裂增殖快,细胞数量大,细胞生长旺盛。干扰组单个细胞所占面积较大,细胞间的间隙大,细胞数量少,说明细胞分裂慢,生长缓慢。裸鼠成瘤组织的重量显示,干扰组瘤组织重量明显轻于对照组瘤组织重量,说明沉默 MEF2C 基因可抑制裸鼠移植瘤的生长。裸鼠成瘤组织的光镜显示,对照组细胞排列紧密,形态不规则,细胞核大、多叶,胞质多少不一;干扰组细胞圆形或椭圆形,排列疏松,胞质丰富。电镜下显示,对照组细胞体积较大,核大、不规则,核分叶,异染色质较丰富,边集明显,核仁多个,核膜不完整,线粒体外嵴不完整;沉默组细胞规则,细胞核分叶较少,核膜完整,异染色质较少,边集变轻,可见凋亡小体,线粒体结构正常。说明在肿瘤细胞中,MEF2C 可能通过促进细胞的分裂增殖,表现为细胞核体积大、染色质、异染

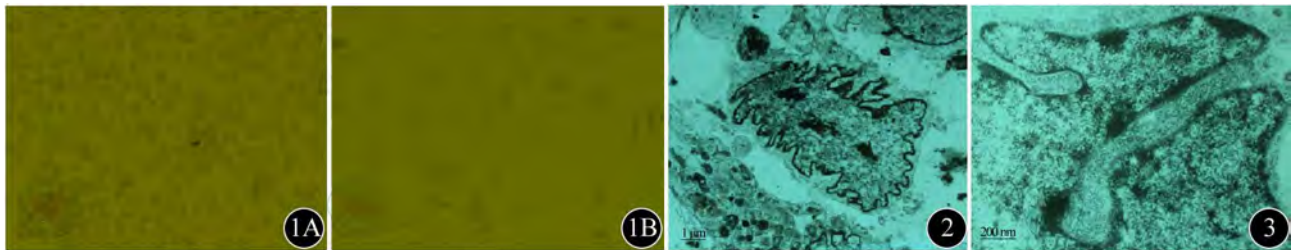


图1 感染慢病毒3 d后细胞生长情况(×100) 图2 肿瘤细胞核不规则 图3 核膜不完整, 异染色质边集明显

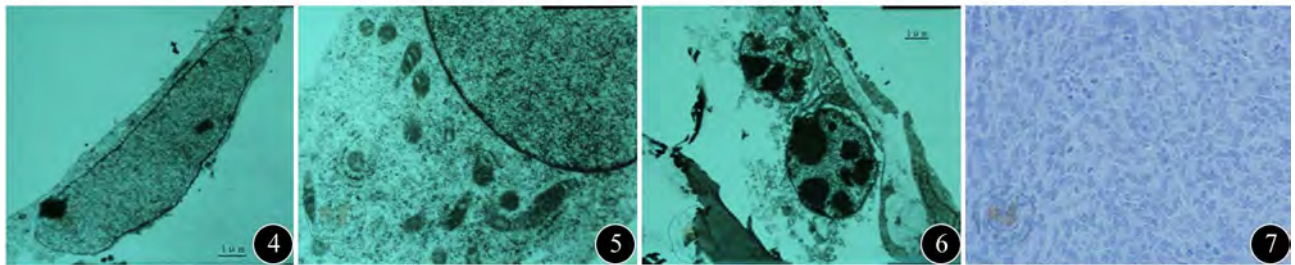


图4 肿瘤细胞核染色质均匀 图5 线粒体完整, 异染色质边集变轻 图6 凋亡小体 图7 对照组瘤组织(HE ×200)

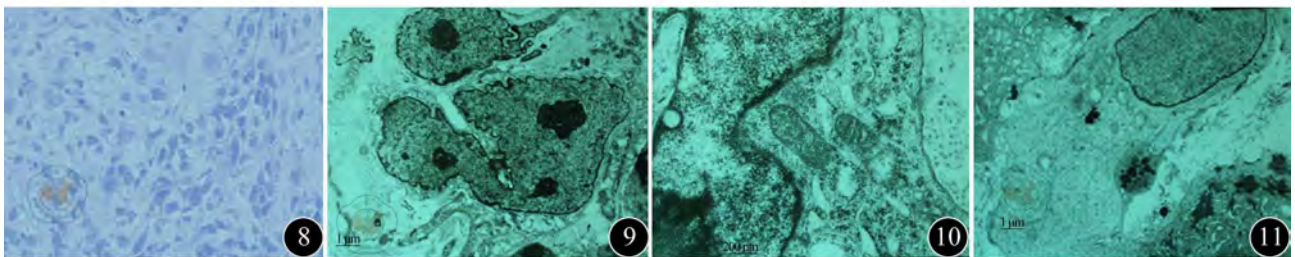


图8 干扰组瘤组织(HE ×200) 图9 细胞核分叶, 核仁明显 图10 细胞异染色质边集明显, 核膜不完整 图11 肿瘤细胞核染色质均匀

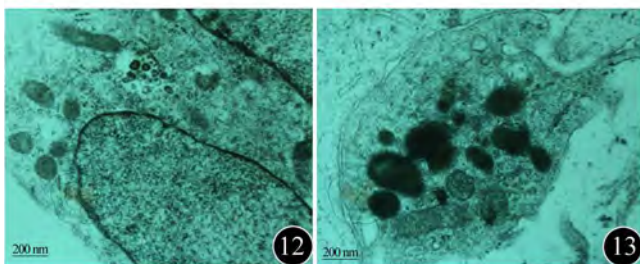


图12 线粒体完整, 异染色质边集变轻
图13 凋亡小体

色质丰富,多核、分叶核,线粒体肿胀、外嵴不完整;沉默 MEF2C 可影响细胞内某些环节的物质代谢,启动或诱导了某些凋亡基因的活化,进而诱导细胞的凋亡,抑制了细胞生长,从而使肿瘤细胞表现为一些形态学上的改变。

染色质是存在于原核和真核生物中的遗传物质,生物的遗传性状与染色质的组成、结构及基因表达的模式密切相关。染色质基因表达不仅具有种属特异性,也具有组织细胞特异性和发育阶段特异性。细胞分裂间期的染色质可分为常染色质和异染色质两种:常染色质着色浅而均匀,螺旋化程度低,转录活跃,复制较早,多位于细胞核中央;异染色质着色深而不均匀,螺旋化程度高,无转录,复制较晚,多位于细胞核边缘,含高比例 C、T 碱基和高度重复 DNA 序列。异染色

质区的这些串联的短序列重复(如 CpG),容易配对和广泛甲基化,促使异染色质结构域形成。这种高度甲基化的异染色质结构域对相邻常染色质顺式作用元件具有很强的沉默效应,并可传递至子代细胞。常染色质和异染色质在 DNA 修复和损害敏感性分别发挥作用,异染色质中染色质的压缩能够帮助 DNA 免受损害,然而,一旦 DNA 受到损害,这种压缩会影响到 DNA 的修复。鉴于异染色质对维持基因组稳定性的重要作用,细胞必须在允许修复因素接近受损区域以及这些区域保持组织结构以阻止 DNA 损害的增加和染色质突变间保持极其精细的平衡^[5]。细胞正常分裂时异染色质的浓缩可抑制多种基因的活化,有助于细胞的分化。有研究表明,抑癌基因 BRCA1 通过组蛋白 H2A 泛素化维持异染色质的结构,介导相关基因沉默,抑癌基

因 BRCA1 的突变导致乳腺癌或卵巢癌的发生^[6]。异染色质的损害在癌症中导致染色体的不稳定,有助于肿瘤的发生^[7]。异染色质的不稳定可以导致基因的过表达,与肿瘤的发生密切相关^[8]。这些研究表明了异染色质在细胞中的重要作用。本实验电镜显示,沉默 MEF2C 基因后 Daoy 细胞异染色质从丰富状态转化为正常状态,细胞恶性特征减少,部分细胞出现凋亡,证明 MEF2C 在 Daoy 细胞中的癌基因作用,证明了异染色质变化在 Daoy 细胞中重要作用。

综上所述,本实验结果表明,沉默 Daoy 细胞的 MEF2C 后,抑制细胞核分裂,抑制细胞生长,促进细胞凋亡,为以 MEF2C 为靶点的肿瘤生物治疗提供了实验依据和理论基础。究其详细机制有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 2007, 134:4131-4140.

[2] Bai XL, Wu LH, Lian TB, et al. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134:83-91.

[3] Nagel S, Meyer C, Quentmeier H, et al. MEF2C is activated by multiple mechanisms in a subset of T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia*, 2008, 22:600-607.

[4] Faber J, Krivosov AV, Stubbs MC, et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood*, 2009, 113:2375-2385.

[5] Cann KL, Dellaire G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89:45-60.

[6] Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, et al. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature*, 2011, 477:179-184.

[7] Slee RB, Steiner CM, Herbert BS, et al. Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene*. 2012, 31:3244-3253.

[8] Carone DM, Lawrence JB. Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Semin Cancer Biol*, 2012.

(收稿日期:2012-11-16)

(本文编辑:郝锐)

付鹏,赵立军,孙鹏,等.沉默 MEF2C 基因对髓母细胞瘤 Daoy 细胞形态结构的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(3):1125-1128.

