

# 应用两种方法诱导 SH-SY5Y 细胞分化的研究

解洪荣<sup>1,2</sup> 常 明<sup>1</sup> 张玉花<sup>3</sup> 孙 丹<sup>4</sup> 王立峻<sup>2</sup> 杨 欢<sup>5</sup> 胡林森<sup>1,△</sup>

(1 吉林大学第一医院神经内科 吉林 长春 130021 2 大庆油田总医院神经内科 黑龙江 大庆 163001 ;

3 大庆油田总医院 CT 室 黑龙江 大庆 16 3001 4 大庆油田总医院老年病科 黑龙江 大庆 163001 ;

5 大庆油田总医院病案室 黑龙江 大庆 163001)

**摘要** 目的 观察全反式维甲酸(ATRA)处理和 ATRA 与十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)序贯处理(ATRA/TPA)对人类神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞增殖抑制和形态分化的影响。方法 应用  $10\mu\text{M}$  ATRA 处理 6 天和  $10\mu\text{M}$  ATRA 处理 3 天继以  $80\text{ nM}$  TPA 处理 3 天这两种方法使 SH-SY5Y 细胞分化,用倒置光学显微镜动态观察 SH-SY5Y 细胞形态学变化,并用 MTT 比色法比较两种分化方法对 SH-SY5Y 细胞的体外抗增殖作用。结果 ATRA 处理和 ATRA 与 TPA 序贯处理对 SH-SY5Y 细胞都有抗增值和诱导细胞分化作用,细胞形态发生明显的变化,分化成神经元表型,前者主要表现为两端带有长突起的纺锤体样细胞形态,而后者主要是由细胞体延伸出多个突起的多边形的细胞。ATRA 分化 6 天的细胞的存活率下降为  $78.7\%\pm 2.0\%$ 。当去除 ATRA 后,继续培养 1 天的细胞存活率上升为  $89\%\pm 0.2\%$ ,而继续培养 2 天的细胞存活率为  $86.3\%\pm 1.4\%$ ;ATRA 与 TPA 序贯分化 6 天细胞存活率下降为  $75.9\pm 0.4\%$ 。当去除 TPA 后,继续培养一天的细胞存活率为  $75.5\pm 0.7\%$ ,继续培养 2 天的细胞存活率为  $74.9\pm 1.0\%$ 。结论 维甲酸(ATRA)处理和 ATRA 与十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)序贯处理(ATRA/TPA)均能明显诱导 SH-SY5Y 细胞分化。这两种分化细胞为神经科学的研究提供了优良的体外培养模型细胞,尤其是 ATRA 与 TPA 序贯处理能获得分化完全而稳定的神经元样细胞。

**关键词** 全反式维甲酸(ATRA);十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA);诱导分化;增殖抑制;SH-SY5Y 细胞

中图分类号 R739.4 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)01-63-05

## The Study of Differentiation of SH-SY5Y Cells Induced by Two Methods

XIE Hong-rong<sup>1,2</sup>, CHANG Ming<sup>1</sup>, ZHANG Yu-hua<sup>3</sup>, SUN Dan<sup>4</sup>, WANG Li-ling<sup>2</sup>, YANG Huan<sup>5</sup>, HU Lin-sen<sup>1,△</sup>

(1 Department of Neurology, Daqing Oilfield General Hospital, Heilongjiang, Daqing 163001, Chiina; 2 Department of Neurology, The First Hospital, Jilin University, Jilin, Changchun 130021, China; 3 Department of CT, Daqing Oilfield General Hospital, Heilongjiang, Daqing 163001, China; 4 Department of Gerontology, Daqing Oilfield General Hospital, Heilongjiang, Daqing 163001, China; 5 Department of Record Room, Daqing Oilfield General Hospital, Heilongjiang, Daqing 163001, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of All trans-retinoic acid (ATRA) and ATRA followed by phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (ATRA/TPA) on growth and morphological differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. **Methods:** SH-SY5Y cells were differentiated with  $10\mu\text{M}$  ATRA for 6 days and  $10\mu\text{M}$  ATRA for 3 days followed by  $80\text{ nM}$  TPA for another 3 days (RA/TPA). Morphological differentiation was detected by using the inverse microscope. And MTT assay was used to detect the anti-proliferative effect of ATRA and ATRA/TPA on SH-SY5Y cells. **Results:** Both ATRA and ATRA/TPA could induce morphological differentiation and inhibit growth of SH-SY5Y cells. Differentiated cells underwent striking morphological changes and resulted in neuronal phenotype. ATRA-differentiated SH-SY5Y cells exhibited a spindle-shaped morphology with elongated processes extending from opposing ends. Whereas ATRA/TPA-differentiated SH-SY5Y cells showed polygon-shaped morphology with numerous elongated processes extending from cell body. The cell viability decreased to  $78.7\%\pm 2\%$  when exposed to ATRA at the concentration of  $10\mu\text{mol/L}$  for 6 days. After the removal of ATRA, cell viability increased to  $89\%\pm 0.2\%$  and  $86.3\%\pm 1.4\%$ , respectively, when cultured for another one day and two days. The cell viability decreased to  $75.9\pm 0.4\%$  when differentiated with  $10\mu\text{M}$  ATRA for 3 days followed by  $80\text{ nM}$  TPA for another 3 days. The cell viability was  $75.5\pm 0.7\%$  and  $74.9\pm 1\%$ , respectively, when SH-SY5Y cells were stoped treating with ATRA/TPA and cultured for another one day and two days. **Conclusion:** ATRA and ATRA/TPA induced SH-SY5Y cell differentiation. The two kind of differentiated SH-SY5Y cell provided excellent in vitro cell model for neurological studies, especially RA/TPA differentiated SH-SY5Y cells.

**Key words:** All trans-retinoic acid (ATRA); phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA); Differentiation; Growth inhibition; SH-SY5Y

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)01-63-05

作者简介 解洪荣(1973-)女,博士,主要研究方向:帕金森病细胞

模型的蛋白组学研究,电话:13304594591,

E-mail:xiehongrong99@yahoo.com.cn

△通信作者 胡林森 E-mail:hulinsen@hotmail.com

(收稿日期 2010-10-20 接受日期 2010-11-15)

## 前言

神经母细胞瘤是发生在儿童中的一种常见的恶性肿瘤。神经母细胞瘤细胞系衍生于肾上腺髓质或交感神经细胞的神经嵴细胞。SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 三次克隆后的亚系(SK-N-SH→SH-SY→SH-SY5→SH-SY5Y)<sup>[1,2]</sup>, 由于具有许多神经元的生化和功能特征, 在二十世纪八十年代早期就被广泛选做神经元模型, 应用于神经系统疾病发病机制和药物作用机制方面的研究。此外, SH-SY5Y 细胞来自于不成熟的肿瘤性神经嵴细胞, 表达干细胞的特征, 许多分化诱导剂, 包括全反式维甲酸(ATRA)<sup>[3]</sup>和十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)<sup>[4]</sup>等均能诱导 SH-SY5Y 细胞分化成具有功能的成熟神经元表现型, 同时分化使细胞停止增殖并在整个实验中提供稳定的细胞数, 从而可能为体外神经科学实验研究提供更好的细胞基础<sup>[5]</sup>。本实验旨在观察 ATRA 处理和 ATRA 与 TPA 序贯处理对 SH-SY5Y 细胞的生长的抑制作用及诱导分化作用, 进而为 SH-SY5Y 细胞在神经科学研究中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 SH-SY5Y 细胞来自美国典型培养物细胞库(American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)。

1.1.2 试剂 ATRA、TPA、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、青霉素、链霉素均为 Sigma 公司产品; 高糖 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)购自 Gibco 公司; 精密 pH 试纸购自 Merck 公司; 胎牛血清购自天津灏洋生物制品科技有限公司; 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )、氯化钾( $\text{KCl}$ )、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、盐酸( $\text{HCl}$ )、氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )、乙醇等均购自北京北化精细化学品有限责任公司。

1.1.3 主要仪器 石英自动双重水蒸馏器购自金坛医疗仪器厂; 荧光倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品;  $\text{CO}_2$  培养箱为美国 CellStar 公司产品; 超净工作台来自蚌埠净化设备厂; 低温高速离心机为德国 Heraeus Sepatech 公司产品; DK-8D 型电热恒温水槽和电热恒温干燥箱来自上海跃进医疗器械厂; pH 计为上海雷磁仪器厂产品; 电子分析天平购自北京赛多利斯公司; Model 550 酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人类多巴胺能神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞培养于含 5%胎牛血清、60  $\mu\text{g/ml}$  青霉素及 100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的高糖 DMEM 培养液中(pH7.2~7.4), 培养环境为 37℃、湿度饱和的 5%  $\text{CO}_2$  培养箱。培养液每隔 2 天更换一次, 待细胞生长至 90%接触时, 用 0.25%的胰蛋白酶消化使细胞从瓶壁上分离下来, 以 1:3~1:4 比例传代, 选取对数生长期细胞进行实验研究。

1.2.2 细胞分组和细胞分化 SH-SY5Y 细胞按参考文献<sup>[6]</sup>中方法进行分化。将用作生长及分化研究的 SH-SY5Y 细胞分成四组: A 组是未分化细胞, 细胞在正常培养基中培养 3 天后, 用新鲜配置的培养基继续培养 3 天, 然后换新鲜配制的培养基再培

养 2 天; B 组是 ATRA 分化的细胞, 细胞在含 10  $\mu\text{M}$  ATRA 的培养基中培养 3 天后, 换新鲜配制的 ATRA 培养基继续培养 3 天, 然后换用不含分化剂和 DMSO 的培养基再培养 2 天; C 组是 ATRA 与 TPA 序贯分化的细胞, 细胞在含 10  $\mu\text{M}$  ATRA 的培养基中培养 3 天后, 换含 80nM TPA 的培养基继续培养 3 天, 然后换用不含分化剂和 DMSO 的培养基再培养 2 天; D 组是试剂对照组, 细胞在含 0.1% DMSO 的培养基中培养 3 天后, 换新鲜配制的含 0.1% DMSO 培养基继续培养 3 天, 然后换用不含分化剂和 DMSO 的培养基再培养 2 天。

1.2.3 细胞形态学观察 用作分化研究的 SH-SY5Y 细胞以  $1 \times 10^3$  细胞/ml 的密度接种在 25ml 培养瓶中, A、B、C 组同时接种。处理后 1 天、3 天和 6 天在倒置显微镜下观察细胞形态学改变和分化情况并拍照记录。SH-SY5Y 细胞可有不长于胞体的短的轴突, 细胞分化标准根据 Sandquist 法, 细胞形态分化标准为有 1 个或 1 个以上的轴突长度延伸至胞体直径 2 倍以上。

1.2.4 MTT 比色法检测分化对 SH-SY5Y 细胞的生长抑制 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以  $1 \times 10^3$  细胞/ml 的密度接种至 96 孔培养板(Corning Costar, Corning, NY, USA)。各实验组和对照组均设 4 孔, 每一实验至少重复 3 次。各组细胞在培养整 6 天、7 天和 8 天时, 按文献方法进行 MTT 检测<sup>[7]</sup>, 每孔加 5mg/mL MTT 10  $\mu\text{L}$ , 37℃ 继续培养 4h, 然后离心(1000rpm, 10min), 吸弃培养基, 每孔加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 振荡 10min, 使结晶物充分溶解, 在酶标仪上测定 490nm 波长下各孔的吸光度(OD)值, 将 OD 值作为反映 SH-SY5Y 细胞活性和代谢状况的参数。求每组的平均值, 将对照细胞的数值定为 100%, 计算各处理组细胞的存活率。细胞存活率 = 试验组 OD 值去除本底 OD 值 / 对照组 OD 值去除本底 OD 值  $\times 100\%$ 。数值和标准差来自 3 次独立实验。

1.2.5 统计学处理 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 软件进行 one-way ANOVA 统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 分化对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测单纯应用 ATRA 分化与应用 ATRA 和 TPA 序贯分化对 SH-SY5Y 细胞生长的影响, 结果见表 1。这两种分化方法对 SH-SY5Y 细胞生长都有明显的抑制效应, 表现为 OD 值和细胞的存活率的降低, 但这两种分化方法对 SH-SY5Y 细胞的抑制程度略有不同, ATRA 和 TPA 序贯分化对 SH-SY5Y 细胞的抑制程度更高。ATRA 作用 6 天细胞的存活率为  $78.7\% \pm 2.0\%$ , 而 ATRA 和 TPA 序贯分化 6 天时细胞的存活率是  $75.9 \pm 0.4\%$ 。将这两种分化细胞 6 天时的存活率进行比较, ATRA 组大于 ATRA 和 TPA 序贯分化组, 但是统计学没有显著意义。此外, 去除 ATRA 后继续培养的 SH-SY5Y 细胞的生长抑制作用消失, 继续培养 1 天的细胞存活率上升为  $89\% \pm 0.2\%$ , 而继续培养 2 天的细胞存活率为  $86.3\% \pm 1.4\%$ 。ATRA 和 TPA 序贯分化的细胞则在撤销分化诱导剂时保持生长抑制状态, 去除 TPA 作用后继续培养一天的细胞存活率为  $75.5 \pm 0.7\%$ , 继续培养 2 天的细胞存活率为  $74.9 \pm 1.0\%$ 。从表 1 可以看出这样的趋势, ATRA/TPA 分化的 SH-SY5Y 细胞增殖抑制程度比单纯应用 ATRA 分化的细胞高, 并且前者在去除

分化诱导剂后 ,继续保持细胞的增殖抑制 ,而后者则在去除 A-TRA 的作用后 ,细胞的增殖抑制作用消失 ,存活率增加。实验结果表明试剂对照组和未分化组的细胞的 OD 值基本相同 ,实验中所应用的试剂对细胞的生长没有影响。

表 1 MTT 法测 ATRA 和 ATRA/TPA 分化以及去除分化剂对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响  
Table 1 Effect of ATRA and ATRA/TPA on growth proliferation of SH-SY5Y cells measured by MTT assay

time	SH-SY5Y differentiated by different agents	
	ATRA(%)	ATRA/TPA(%)
6 days with differentiation	78.7± 2.0	75.9± 0.4
1 day without differentiation	89.0± 0.2	75.5± 0.7
2 day without differentiation	86.3± 1.4	74.9± 1.0

表中数值均为细胞存活率的均数± 标准差  
Values are mean  $\bar{x} \pm$  s.d., representing cell viability

2.2 分化对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

在光学倒置显微镜下观察 SH-SY5Y 对照组细胞与未分化细胞 ,细胞形态具有人神经母细胞瘤典型的形态特征 ,细胞形态不规则 ,呈圆形、梭形、多边形等形态 ,有不长于胞体的短轴突 ,在 8 天的培养过程中无形态的改变也没有突起的延长 ,而且生长速度很快(见图 1a、1c、1e)。经 ATRA 处理 1 天后细胞形态发生变化 ,先是从细胞的两端伸出树突样突起 ,细胞呈极性状(见图 1b) ;3 天后分化形态更明显 ,胞体变小 ,细胞两端伸出的突起变成长而细的轴突样突起(见图 1d) ;达 6 天时突起长度加长并可见部分突起交织成网状(见图 1f)。ATRA 处理 3

天的 SH-SY5Y 细胞用 TPA 继续处理 3 天 ,则细胞进一步分化 ,不仅细胞两端的突起更加伸展 ,而且形成更多的突起在细胞间形成广泛联系 ,呈现成熟神经细胞的表型(见图 1g)。A-TRA 分化的与 ATRA 和 TPA 序贯分化的 SH-SY5Y 细胞在满 6 天时几乎所有的细胞都长出突起 ,分化成神经元表型 ,前者主要表现为两端带有长突起的纺锤体样细胞形态 ,而后者主要是由细胞体延伸出多个突起的多边形的细胞。两种分化细胞的生长速度都减慢 ,而 ATRA 和 TPA 序贯分化的 SH- SY5Y 细胞生长速度更慢。

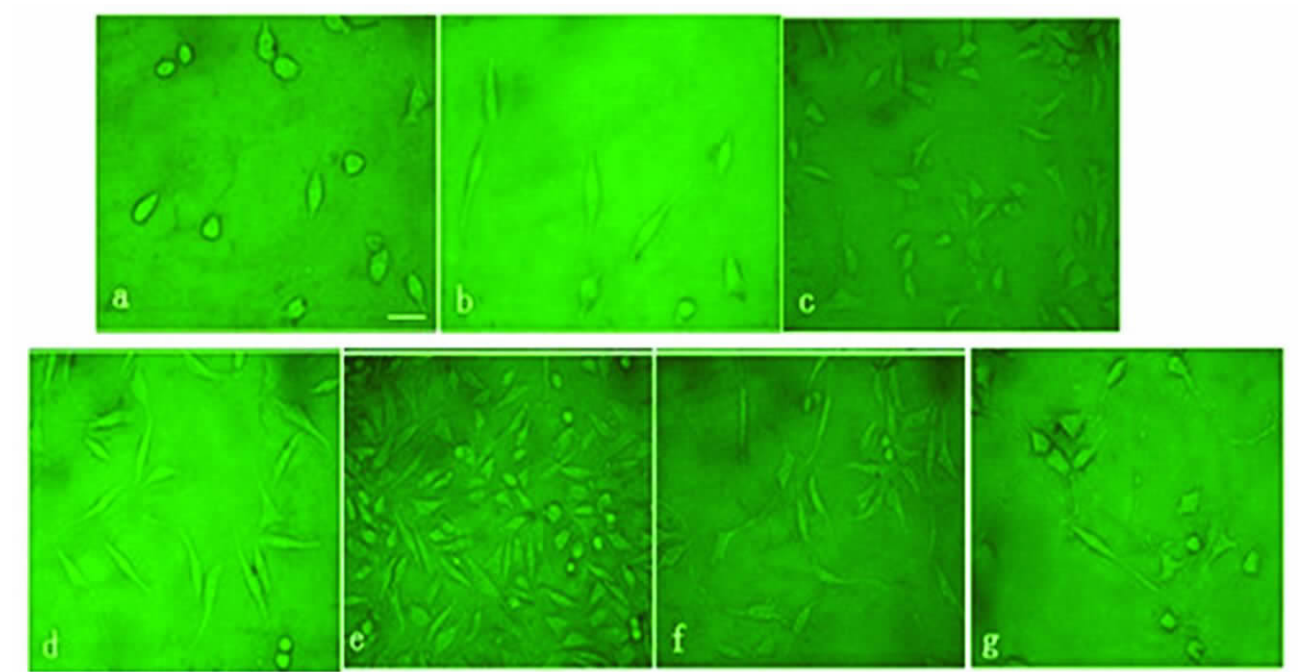


图 1 不同阶段的 SH-SY5Y 未分化细胞和分化细胞的形态:(a) 培养 1 天的未分化 SH-SY5Y 细胞 (b) 10μ M ATRA 处理 1 天的 SH-SY5Y 细胞 ; (c) 培养 3 天的未分化 SH-SY5Y 细胞 (d) 10μ M ATRA 处理 3 天的 SH-SY5Y 细胞 (e) 培养 6 天的未分化 SH-SY5Y 细胞 (f) 10μ M ATRA 处理 6 天的 SH-SY5Y 细胞 (g) 10μ M ATRA 处理 3 天继以 80nM TPA 处理 3 天的 SH-SY5Y 细胞。Scale bar: 25 μ m  
Fig. 1 The morphology of SH-SY5Y cells from undifferentiated stage to differentiated stage: (a) Undifferentiated SY5Y cells cultured for 1 day. (b) SH-SY5Y cells cultured with ATRA for 1 day. (c) Undifferentiated SY5Y cells cultured for 3 day. (d) SH-SY5Y cells differentiated with 10 μ M ATRA for 3 day. (e) Undifferentiated SY5Y cells cultured for 6 day. (f) SH-SY5Y cells cultured with ATRA for 6 days. (g) The cells treated sequentially with 10 μ M ATRA for 3 days followed by 80 nM TPA for another 3 days. Scale bar: 25 μ m



### 3 讨论

SH-SY5Y 细胞系是人类神经母细胞 SK-N-SH 细胞系三次克隆后的亚系(SK-N-SH→SH-SY→SH-SY5→SH-SY5Y)。由于 SH-SY5Y 细胞能够在体外长期培养而不被污染,因此经常被用作体外实验的模型细胞,同时由于具有许多神经元的生化和功能特征在二十世纪八十年代早期就被广泛选做神经元细胞模型<sup>[8]</sup>。但 SH-SY5Y 细胞系是未分化状态的细胞,与体内高度分化的神经细胞相比,无论形态学或细胞内物质代谢、基因表达都存在差异,必然影响实验结果。而且未分化的 SH-SY5Y 细胞是增殖的细胞系,在整个实验中细胞数不断增加使得神经保护和神经毒性因子对细胞增殖率或死亡率的影响难以真实体现而造成实验的不确定性<sup>[9]</sup>。SH-SY5Y 细胞来自不成熟的肿瘤性神经嵴细胞,表达干细胞特征,能够在不同分化因子的作用下分化成在生化、超微结构、形态学和电生理上都与神经元相似的终端分化细胞,同时使细胞停止增殖,在整个实验中提供稳定的细胞数。这些分化因子包括维甲酸(RA)<sup>[3]</sup>、佛波酯<sup>[4]</sup>、神经营养因子<sup>[10]</sup>、嘌呤<sup>[11]</sup>、双丁酰环磷腺苷酸(dBcAMP)<sup>[12]</sup>和星形孢菌素<sup>[13]</sup>等。因此 SH-SY5Y 细胞经常在实验前被诱导分化,使细胞形态接近成熟神经细胞,并在实验中提供稳定的细胞数,以便制备更理想的细胞模型用于实验性神经科学研究。

自从 1981<sup>[4]</sup>年生物活性的 TPA 成功诱导了 SH-SY5Y 细胞分化以来的二十几年间,出现了大量不同的分化方法。本实验采用 ATRA 以及 ATRA 和 TPA 序贯处理两种方法诱导 SH-SY5Y 细胞分化,并从形态学和细胞生长抑制两方面来比较这两种分化方法对 SH-SY5Y 细胞的分化效果。实验结果表明这两种分化方法均成功地诱导了 SH-SY5Y 细胞的神经元形态学分化和细胞生长抑制,但不同的分化方法诱导的神经元细胞分化形态和细胞生长抑制程度略有不同。

#### 3.1 分化对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

细胞形态学改变是细胞分化的表型特征,形态学上成熟程度是推断分化诱导成功与否的重要指标。这是因为细胞形态是细胞功能活动的基础,细胞形态的改变在一定程度上可反映细胞相关功能活动状态也发生了变化。本研究发现经 10 $\mu$  M ATRA 处理 6 天和 10 $\mu$  M ATRA 处理 3 天继以 80nM TPA 处理 3 天后,光镜下观察细胞的形态都发生了显著的变化,细胞丧失了未分化的肿瘤细胞样表型而呈极性状,细胞不仅胞体变小而且伸出轴突树突状突起,具有了类似神经元细胞样表型。这一结果与其他学者诱导 SH-SY5Y 细胞分化研究时观察到的形态变化结果相一致<sup>[10,14]</sup>。除了这些共性的改变以外,本实验还发现这两种不同分化方法诱导的细胞形态变化有些不同,单纯 ATRA 处理的 SH-SY5Y 细胞主要表现为两端带有长突起的纺锤体样细胞形态,而序贯应用 ATRA 和 TPA 处理的 SH-SY5Y 细胞主要是由细胞体延伸出多个突起的多边形的细胞。这一发现与 Presgraves 等学者的研究结果一致<sup>[6]</sup>。从形态学表现来看,单纯应用 ATRA 处理和序贯应用 ATRA 和 TPA 处理都能较好地诱导 SH-SY5Y 细胞分化成神经元表型。但是单纯 ATRA 处理的 SH-SY5Y 细胞似乎更象是双极神经元细胞,而序贯应用 ATRA 和 TPA 处理的 SH-SY5Y 细胞则与中枢神经系统的多极神经元具有更大的相似性。

#### 3.2 分化对 SH-SY5Y 细胞的增值抑制作用

肿瘤细胞与正常细胞的一个重要的生物学特征就是细胞分裂失控,细胞周期调控紊乱而表现为异常增殖,因此检测细胞的增殖抑制是确定细胞被诱导分化的一个基本指标。细胞还原 MTT 的能力在一定范围内取决于细胞数量的多少,因而测定分化诱导剂处理后的 SH-SY5Y 细胞对 MTT 的还原能力可以用来评价分化对细胞生长增殖状态的影响。本研究表明 10 $\mu$  M ATRA 处理 6 天和 10 $\mu$  M ATRA 处理 3 天继以 80nM TPA 处理 3 天这两种方法对 SH-SY5Y 细胞都有明显的增殖抑制作用。序贯应用 ATRA 和 TPA 分化的 SH-SY5Y 细胞增殖抑制程度比单纯应用 ATRA 分化的细胞高。同时还发现这两种分化的细胞对去除分化诱导剂的反应不同。ATRA 和 TPA 序贯分化的 SH-SY5Y 细胞是终端分化的细胞,在去除分化诱导剂后,继续保持细胞的增殖抑制,这种分化不依赖于分化诱导剂的持续存在。而单纯应用 ATRA 处理的细胞在去除 ATRA 的作用后,细胞的增殖抑制作用消失,存活率增加,这种分化细胞的保持依赖于 ATRA 的持续存在。然而,李林运用撤药动力学观察,发现 10 $\mu$  M ATRA 作用 HL-60 细胞 48 小时后,细胞就获得了效应记忆,在不依赖 ATRA 持续存在的情况下,继续分化并达到最大的分化效果<sup>[15]</sup>。因此 ATRA 分化的细胞应该是终端分化的细胞,它的分化诱导作用在 48 小时后是不可逆的,不依赖持续存在的 ATRA。那么如何解释在我们实验中去除了 ATRA 后细胞存活率增加的现象呢?这个现象可能有两方面的解释,一方面是 ATRA 处理后的 SH-SY5Y 细胞的表型并不是很成熟,导致在去除了 ATRA 后细胞的增殖抑制作用消失,细胞再次开始分裂、生长。另一方面的原因可能是尽管 SH-SY5Y 细胞来源于神经母细胞的亚克隆,但是含有一小部分的 S 型细胞,这部分细胞不能发生分化,而在细胞培养过程中不断增殖<sup>[16]</sup>。本实验结果中还有一个现象值得一提,那就是 ATRA 和 TPA 序贯分化的 SH-SY5Y 细胞在去除分化诱导剂的作用后两天,尽管统计学没有显著意义但细胞的存活率略有下降趋势,这可能进一步表明了这种分化细胞属于细胞不再分裂的终末分化的细胞,这种终末分化的细胞由于细胞周期的不可逆,在培养过程中最终引发细胞凋亡,使得存活率下降。ATRA 处理后的 SH-SY5Y 细胞在去除 ATRA 的作用后 48 小时细胞的存活率比 24 小时有所下降,这可能也与终末分化的细胞发生凋亡有关。有关这方面的研究还有待于进一步深入。

### 4 结论

10 $\mu$  M ATRA 处理 6 天和 10 $\mu$  M ATRA 处理 3 天继以 80nM TPA 处理 3 天这两种方法均能明显诱导 SH-SY5Y 细胞分化。这两种分化细胞为神经科学的研究提供了优良的体外细胞培养模型,尤其是序贯应用 ATRA 和 TPA 获得的分化完全成熟而稳定的神经元样细胞。

#### 参考文献(References)

- [1] Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture [J]. Cancer Res, 1973, 33(11):2643-52
- [2] Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest

- lineages [J]. Cancer Res, 1989, 49(1):219-25
- [3] Singh J, Kaur G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures [J]. Brain Res, 2007, 1154:8-21
- [4] Pahlman S, Odelstad L, Larsson E, et al. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate [J]. Int J Cancer, 1981, 28(5):583-9
- [5] Fagerström S, Pahlman S, Gestblom C, et al. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells [J]. Cell Growth Differ, 1996, 7(6): 775-85
- [6] Koch A, Lehmann HK, Dächsel JC, et al. Proteasomal inhibition reduces parkin mRNA in PC12 and SH-SY5Y cells [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2009, 15(3):220-5
- [7] Wang C, Sadovova N, Ali HK, et al. L-carnitine protects neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium -induced neuronal apoptosis in rat fore-brain culture [J]. Neuroscience, 2007, 144(1):46-55
- [8] Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages [J]. Cancer Res, 1989, 49(1):219-25
- [9] Datki Z, Juhász A, Gálfli M, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells [J]. Brain Res Bull, 2003, 62(3): 223-9
- [10] Cernaianu G, Brandmaier P, Scholz G, et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit [J]. J Pediatr Surg, 2008, 43(7): 1284-94
- [11] Guarnieri S, Pilla R, Morabito C, et al. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Int J Dev Neurosci, 2009, 27(2): 135-47
- [12] Kume T, Kawato Y, Osakada F, et al. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype [J]. Neurosci Lett, 2008, 443(3): 199-203
- [13] Mollereau C, Zajac JM, Roumy M. Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor- transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors [J]. Peptides, 2007, 28(5): 1125-8
- [14] Cheung YT, Lau WK, Yu MS, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research [J]. Neurotoxicology, 2009, 30(1): 127-35
- [15] 李林.全反式维甲酸诱导 HL-60 细胞分化的作用机理研究[D]. 中国博士学位论文全文数据库. 1992-7-1
- Li Lin. Studies on the All Trans Retinoic Acid-Induced Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60 and Its Mechanism of Action [D]. China Ph.D.Thesis full-text database, 1992-7-1
- [16] Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, et al. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation [J]. Cell Differ, 1984, 14(2): 135-44

## 封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展。①封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。②封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光闪现的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个“黑箱”问题,需要细心大胆的研究、推断,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!