·论　著·

免疫球蛋白 G 促进胶质瘤细胞系 U87MG 中 PCNA P-ERK 及 P-SRC 的表达

王　丽[1]，滕晓梅[1]，权翠侠[1]，霍美凤[1]，胡书群[2]（1. 江苏省徐州市第一人民医院检验科　221002；2. 南京医科大学基础学院　210029）

【摘要】 目的　了解在体外培养条件下人源性免疫球蛋白 G（IgG）刺激人胶质瘤细胞系 U87MG 后，对增殖细胞核抗原（PCNA）、激活的细胞外信号调节激酶（P-ERK）及激活的非受体酪氨酸激酶（P-SRC）表达的影响。**方法**　用不同浓度的 IgG（0.01、0.1、1 μg/mL）刺激 U87MG，24 h 后采用 Western blot 方法检测 PCNA、ERK 及 P-ERK、SRC 及 P-SRC 的表达变化情况。**结果**　IgG 直接作用于体外培养的胶质瘤 U87MG 后，相对于对照组而言 PCNA、P-ERK 及 P-SRC 表达有明显的升高，并且表达呈现出一定的剂量依赖性。**结论**　IgG 可能与神经系统癌症有关联。

【关键词】 胶质瘤细胞系 U87MG；　免疫球蛋白 G；　增殖细胞核抗原；　激活的非受体酪氨酸激酶；　激活的细胞外信号调节激酶

DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2013.08.011　**文献标志码：**A　**文章编号：**1672-9455(2013)08-0936-02

Immunoglobulin G promotes the expression of PCNA, P-ERK and P-SRC in Glioma cell line U87MG

WANG Li[1], *TENG Xiao-mei*[1], *QUAN Cui-xia*[1], *HUO Mei-feng*[1], *HU Shu-qun*[2] (1. *Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu* 221002, *China*; 2. *School of Foundation Studies, Nanjing Medical University, Nanjing*, 210029, *China*)

【Abstract】 Objective　To analyze the effect of immunoglobulin G (IgG) on PCNA, P-SRC and P-ERK expression in Glioma cell lines U87MG. **Methods**　By Western blot, we detected PCNA, P-SRC and P-ERK expression in Glioma cell lines U87MG at 24h after different concentration of IgG stimulation. **Results**　The result of western blot showed that after IgG stimulation for 24 hours, PCNA, P-SRC and P-ERK expression increased in U87MG. Meanwhile, the result also showed that PCNA, P-SRC and P-ERK expression increased dose-dependently in the IgG groups. **Conclusion**　IgG can increase PCNA, P-SRC and P-ERK expression in Glioma cell lines U87MG, which indicated IgG probably was relative to nerve system cancer.

【Key words】 glioma cell line U87MG;　immunoglobulin G;　PCNA;　P-SRC;　P-ERK

最近的一些研究显示在多种肿瘤的细胞胞质中发现有免疫球蛋白（Ig）的表达，如人乳腺癌、大肠癌、胃癌等[1-4]。外源性 IgG 也可以引起中枢神经系统的免疫反应，虽然有关 IgG 的报道较多，但 IgG 的功能尚不清楚[5-6]。为此，本研究拟观察人源性 IgG 刺激人胶质瘤细胞系 U87MG，检测其中增殖细胞核抗原（PCNA）、激活的非受体酪氨酸激酶（P-SRC）及激活的细胞外信号调节激酶（P-ERK）表达水平的变化，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　标本来源　以人源胶质瘤 U87MG 细胞系为研究对象。

1.2　培养过程　将 U87MG 细胞培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中（内含青霉素和链霉素各 10 U/L），置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，取对数生长期细胞进行实验。以 5×10^3 细胞/孔密度接种于 96 孔培养板中，培养 24 h，实验孔分别加入以下浓度的人源性 IgG 0.01、0.1、1 μg/ml，每孔设 3 个复孔，分别培养 24 h。磷酸盐缓冲液（PBS）作为阴性对照。

1.3　实验方法　使用 Western blot 方法，检测 PCNA、P-ERK 及 P-SRC 表达变化情况。外源性 IgG 刺激 24 h 后，收集 U87MG 细胞，加入适量 RAPI（含 PMSF）裂解液，碾碎匀浆，离心提取总蛋白，按照 BCA 法测定总蛋白浓度，上样量为每孔 50 μg 总蛋白。按 1∶4 加上样缓冲液后，95 ℃变性 10 min。100 V 恒压 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，湿转至聚偏二氟乙烯膜（PVDF）。5%BSA 封闭液室温封闭 1 h，一抗（anti-mouse PCNA、p-ERK、ERK、P-SRC、SRC、GAPDH、santa cruz）按 1∶1 000 稀释，4 ℃孵育过夜。0.05% TBST 洗 3 次，每次 5 min。二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，37 ℃ 孵育 1 h。TBST 0.05% 洗 3 次，每次 5 min。化学发光法检测条带，实验重复 3 次。

1.4　统计学处理　Western blot 条带灰度值用 Image J 软件进行分析，GAPDH 作为 PCNA 的内参对照，总的 SRC 作为 P-SRC 内参对照，总的 ERK 作为 P-ERK 的内参对照，采用 SPSS11.0 统计软件，数据差异统计学意义检验及采用方差齐性检验及单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　IgG 刺激 U87 MG 细胞 24 h 后，PCNA 蛋白表达水平的变化　PCNA 蛋白表达在 IgG 刺激后有显著性升高（图 1A）。在浓度为 0.01 μg/mL 时，PCNA 的表达没有明显变化；在 IgG 浓度为 0.1 μg/mL 时 PCNA 的表达水平明显升高，为对照组的 2.51 倍（$P<0.05$）；当浓度为 1 μg/mL 时，表达水平升高最为显著，为对照组的 3.56 倍（$P<0.05$，图 1B）。同时发现 PCNA 的升高与 IgG 浓度呈现剂量依赖性。

2.2　IgG 刺激 U87 MG 细胞 24 h 后，P-SRC 蛋白表达水平的变化　不同浓度的 IgG 都能增强 P-SRC 的表达（图 2A）。在浓度

为 0.01 μg/mL 时，P-SRC 的表达就明显升高，相对于对照组升高 2.12 倍（$P<0.05$）；在 IgG 浓度为 0.1 μg/mL 时 P-SRC 的表达水平为对照组的 3.15 倍（$P<0.05$）；当浓度为 1 μg/mL 时，表达水平升高最为显著，为对照组的 7.34 倍（$P<0.05$，图 2B）。发现 P-SRC 的表达水平与 IgG 浓度呈现剂量依赖性。

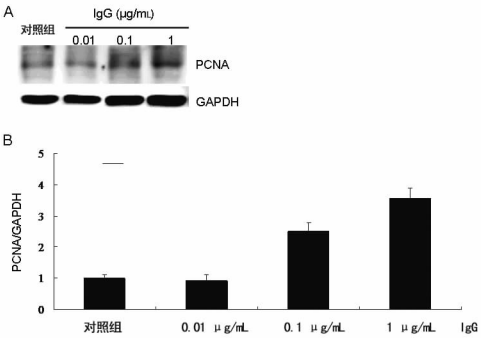

图 1　不同浓度 IgG 处理后 PCNA 的蛋白表达变化

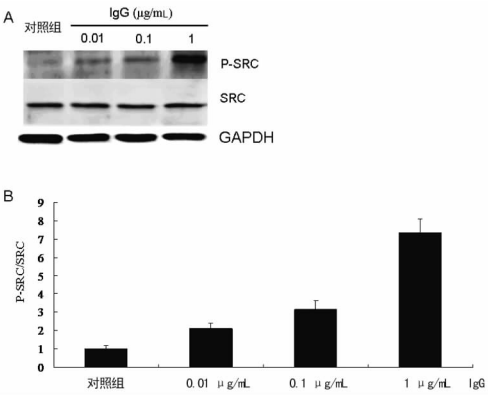

图 2　不同浓度 IgG 处理后 P-SRC 蛋白表达的变化

2.3　IgG 刺激 U87 MG 细胞 24 h 后，P-ERK 蛋白表达水平的变化　不同浓度的 IgG 都能显著地影响 P-ERK 的表达，随着浓度的升高，P-ERK 的表达水平逐渐上升（图 3A）。在浓度为 0.01 μg/mL 时，P-ERK 的表达水平就明显升高，相对于对照组升高 2.08 倍（$P<0.05$）；在 IgG 浓度为 0.1 μg/mL 时 P-ERK 的表达水平为对照组的 2.51 倍（$P<0.05$）；当浓度为 1 μg/mL 时，表达水平升高最为显著，为对照组的 5.87 倍（$P<0.05$，图 3B）。在浓度为 0.01 μg/mL 和 0.1 μg/mL 时 P-ERK 的表达水平并没有明显变化（$P>0.05$），P-ERK 的表达水平与 IgG 浓度呈现出一定的剂量依赖性。

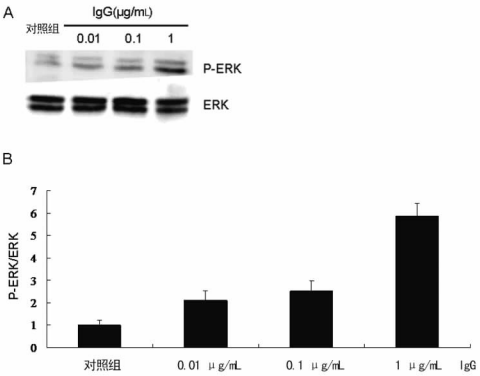

图 3　不同浓度 IgG 处理后 P-ERK 蛋白表达的变化

3　讨　论

IgG 一直以来被认为是 B 淋巴细胞的特征性产物[7]。然而，IgG 在非 B 细胞来源的上皮细胞表达已被多个实验室证实。Qiu 等[8]用原位杂交、免疫组化及 Western blot 等方法证实 IgG 在非 B 细胞来源的肿瘤细胞中表达，并提出癌细胞来源的 IgG 具有生长因子样活性。

MAPK/ERK 信号通路参与了细胞增长、发育、增殖、分化和细胞恶性转化等多种生理、病理过程。Src 激活后，能活化下游丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）途径[9]。PCNA 是一种重要的细胞周期蛋白，细胞的增殖离不开 PCNA 蛋白的作用，PCNA 蛋白的表达减少会降低细胞的增殖活性[10]。本研究结果显示，外源 IgG 刺激胶质瘤细胞系 U87 MG 后，PCNA、P-SRC 及 P-ERK 表达水平升高，提示外源性的 IgG 促进了胶质瘤细胞系的进一步增殖。这与癌细胞及部分正常的上皮细胞来源的 IgG 具有促进肿瘤细胞生长的研究结果一致[8]。

在神经系统中，有研究发现正常脑脊液中 IgG 表达量较低，当中枢神经系统发生病变时，脑脊液中免疫球蛋白水平将有所增高，原因可能有两种情况：（1）血脑屏障损伤后，IgG 渗透性增高；（2）内源性 IgG 表达增加，即有鞘内 IgG 合成[11]。对于外源 IgG 在神经系统的作用研究较少，有研究发现外源 IgG 刺激新生大鼠皮层的原代混合胶质细胞，小胶质细胞和星型胶质细胞表现出活化状态，提示了同种 IgG 在多种胶质细胞共存时仍主要引起小胶质细胞激活，并且星型胶质细胞也参与了对 IgG 的反应[12]。IgG 的抗体体外对膀胱肿瘤细胞的生长具有一定抑制作用，且具有促进肿瘤细胞凋亡的效应[13]。有研究发现在大鼠黑质注射帕金森病患者的血清 IgG，可导致多巴胺能神经元的损伤[5]。在大鼠隔区注射阿尔茨海默症患者血清 IgG，可导致胆碱能神经元的损伤、丢失[6]。这些实验研究暗示了异种外源性 IgG 直接注射到 CNS 可引起 CNS 免疫损伤。

为进一步明确外源性 IgG 在神经系统疾病中的作用，还需要更多的实验证据，期望外源性 IgG 能成为对中枢神经系统疾病诊断、治疗一个新策略。

参考文献

[1] Babbage G, Ottensmeier CH, Blaydes J, et al. Immunoglobulin heavy chain locus events and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast Cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 3996-4000.

[2] 邱晓彦，侯春梅，李秀森，等. 多种肿瘤传代细胞中 Ig 样物质存在与检测[J]. 癌症，1999，18(2)：180-181.

[3] 杨少波，王孟薇，尤纬缔. 胃癌细胞中免疫球蛋白轻链 Igκ 和 Igλ 的共同表达[J]. 中华肿瘤杂志，2002，24(5)：465-466.

[4] Chen Z, Gu J. Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines[J]. FASEB J, 2007, 21(11): 2931-2938.

[5] He Y, Le WD, Appel SH. Role of Fcgamma receptors in nigral cell injury induced by parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra[J]. Exp Neurol, 2002, 176(2): 322-327.

[6] Engelhardt JI, Le WD, Siklós L, et al. Stereotaxic injection of IgG from patients with Alzheimer disease initiates injury of cholinergic neurons of the basal （下转第 939 页）

表 1　443 例支原体药敏试验结果[n(%)]

抗生素	Uu(n=372)			Mh (n=42)			Uu+Mh (n=29)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
强力霉素	301(80.9)	29(7.8)	42(11.3)	35(83.3)	2(4.8)	5(11.9)	24(82.8)	0(0.0)	5(17.2)
交沙霉素	298(80.1)	26(7.0)	48(12.9)	29(69.0)	9(21.4)	4(9.5)	20(69.0)	4(13.8)	5(17.2)
氧氟沙星	47(12.6)	115(30.9)	210(56.5)	3(7.1)	6(14.3)	33(78.6)	4(13.8)	3(10.3)	22(75.9)
红霉素	156(41.9)	21(5.6)	195(52.4)	4(9.5)	0(0.0)	38(90.5)	6(20.7)	3(10.3)	20(69.0)
四环素	284(76.3)	53(14.2)	35(9.4)	16(38.1)	11(26.2)	15(35.7)	17(58.6)	3(10.3)	9(31.0)
环丙沙星	16(4.3)	31(8.3)	325(87.4)	2(4.8)	3(7.1)	37(88.1)	1(3.4)	2(6.9)	26(89.7)
阿奇霉素	194(52.1)	36(9.7)	142(38.2)	4(9.5)	2(4.8)	36(85.7)	3(10.3)	1(3.4)	25(86.2)
克拉霉素	319(85.8)	29(7.8)	24(6.4)	2(4.8)	3(7.1)	37(88.1)	8(27.6)	0(0.0)	21(72.4)
原始霉素	359(96.5)	6(1.6)	7(1.9)	38(90.5)	0(0.0)	4(9.5)	25(86.2)	0(0.0)	2(13.8)

3　讨　　论

引起人类疾病的支原体最为常见的是 Uu 和 Mh，女性泌尿生殖道更易受到支原体的感染[2]。本地区 814 例女性泌尿生殖道感染患者支原体培养结果显示，支原体培养阳性 443 例，总检出率 54.4%(443/814)，比熊敏等[3]报道的稍高。在支原体培养阳性结果中，Uu 阳性 372 例，阳性率 84.0%(372/443)，Mh 阳性 42 例，阳性率 6.5%(29/443)，Uu+Mh 29 例，阳性率 9.5%(42/443)。女性泌尿生殖道支原体感染 Uu 感染率明显高于 Mh 感染和 Uu+Mh 混合感染，差异有统计学意义(P<0.05)，与孔阳英等[4]报道一致。

由于支原体无细胞壁，对作用于细胞壁的抗生素(青霉素、头孢菌素等)天然耐药[5-6]。从本试验药敏结果分析显示，Uu、Mh、Uu+Mh 对 9 种抗生素均出现不同程度的耐药，耐药率为 1.9%～90.5%。原始霉素、克拉霉素、强力霉素、交沙霉素、四环素对单纯 Uu 感染耐药率较低；原始霉素、强力霉素、交沙霉素对单纯(Mh)感染和 Uu+Mh 混合感染耐药率均较低。

综上所述，支原体对抗生素的耐药性在不同地区及不同时期均存在差异，由于抗生素的滥用、治疗的不规范以及交叉感染等因素导致女性泌尿生殖道支原体感染的增多，支原体对抗生素的耐药率也不断上升[6-7]。对临床有泌尿生殖道感染症状的女性患者，应进行支原体培养及药敏试验，根据培养结果选择药物治疗，以提高疗效和降低耐药率。原始霉素、强力霉素、交沙霉素可作为本地区女性泌尿生殖道支原体感染治疗的首选药物[8-9]。

参考文献

[1] 叶俊琴，何月敬，黄慧萍. 泌尿生殖道支原体感染状况及药敏分析[J]. 检验医学与临床，2012，09(8)：924-925.

[2] 刘礼富，李焱平，胡高强，等. 426 例泌尿生殖道标本中解脲支原体和人形支原体的分离及耐药性分析[J]. 中国当代医药，2008，15(24)：47，74.

[3] 熊敏，谢建渝. 3 467 例患者支原体感染状况及药敏实验结果分析[J]. 检验医学与临床，2012，9(10)：1188-1190.

[4] 孔阳英. 泌尿生殖道支原体感染及耐药性分析[J]. 检验医学与临床，2011，8(10)：1201-1202.

[5] 刘春霞，刘斌，曹小秋. 某地区 2008～2010 年泌尿生殖道支原体感染状况及其耐药性演变[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(12)：1454-1455.

[6] 梁培松，王结珍. 某地区泌尿生殖道支原体培养及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(13)：1615-1617.

[7] 杨小琴，刘铸，廖以眉. 812 例泌尿生殖道支原体培养及药敏分析[J]. 检验医学与临床，2012，9(23)：2949-2950.

[8] 余一海，彭惠诗. 821 例男性泌尿生殖道支原体培养及药敏分析[J]. 检验医学与临床，2011，8(21)：2573-2574，2576.

[9] 冯明. 女性尿路感染病原菌分布及其耐药性分析[J]. 临床和实验医学杂志，2011，10(22)：1776-1777.

(收稿日期：2012-10-16　修回日期：2012-12-28)

(上接第 937 页)

forebrain[J]. Arch Neurol，2000，57(5)：681-686.

[7] 黎明，唐敏，邓锡云，等. 上皮来源的肿瘤细胞表达免疫球蛋白 A[J]. 中华肿瘤杂志，2001，23(6)：451-453.

[8] Qiu X，Zhu X，Zhang L，et al. Human epithelial cancers secrete immunoglobulin g with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells[J]. Cancer Res，2003，63(19)：6488-6495.

[9] Mccubrey JA，Steelman LS，Chappell WH，et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth，malignant transformation and drug resistance[J]. Biochim Biophys Acta，2007，1773(8)：1263-1284.

[10] Kawai T，Suzuki M，Kono S，et al. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in lung carcinoma，correlation with DNA flow cytometric analysis[J]. Cancer，1994，74(9)：2468-2475.

[11] 张颖. IgG 及 IgG 指数在中枢神经系统疾病中的诊断价值[J]. 检验医学与临床，2008，5(20)：1221-1222.

[12] 吴瑞，刘玲，彭正午，等. IgG 刺激诱发的小胶质细胞 Toll 样受体 4 表达及细胞因子分泌[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2009，25(3)：201-203.

[13] 李浩勇，梁培育，朱孝峰，等. 免疫球蛋白 G 在膀胱癌细胞中的表达及其抗体诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 中国病理生理杂志，2007，23(6)：1068-1073.

(收稿日期：2012-10-09　修回日期：2012-12-28)