

. 实验研究 .

替莫唑胺通过TFRC抑制U87胶质瘤细胞增殖和侵袭

赵海康 潘 力 张 亮 冯小云 刘建荣 蒋小兵 高文文 马廉亭

【摘要】目的 探讨转铁蛋白受体(TFRC)在替莫唑胺抑制U87胶质瘤细胞增殖和侵袭中的作用。方法 体外培养U87胶质瘤细胞,加入50 μmol/L、100 μmol/L和200 μmol/L替莫唑胺作用;构建control siRNA、siTFRC转染U87细胞沉默TFRC表达,构建pcDNA3.1空载体、pcDNA3.1/TFRC转染U87细胞过表达TFRC;利用CCK-8方法检测U87细胞增殖;利用Transwell小室实验检测U87细胞侵袭能力;实时荧光定量PCR和免疫印迹法检查U87细胞TFRC mRNA和蛋白表达。结果 与空白组相比,替莫唑胺处理后,U87细胞的增殖和侵袭能力显著下降($P<0.05$),TFRC mRNA和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),当替莫唑胺浓度为200 μmol/L时,对U87细胞的抑制能力最强($P<0.05$)。当利用pcDNA3.1/TFRC过表达U87细胞TFRC处理后,替莫唑胺对U87细胞增殖和侵袭的抑制能力显著下降($P<0.05$);而当利用siTFRC沉默U87细胞TFRC表达后,替莫唑胺对U87细胞增殖和侵袭的抑制能力显著增强($P<0.05$)。结论 替莫唑胺可能通过抑制TFRC的表达而抑制U87胶质瘤细胞的增殖和侵袭。

【关键词】胶质瘤;替莫唑胺;U87细胞;增殖;侵袭;转铁蛋白受体

【文章编号】1009-153X(2019)11-0685-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Temozolomide inhibits proliferation and invasion of glioma U87 cells by down-regulation of TFRC

ZHAO Hai-kang^{1,2}, PAN Li¹, ZHANG Liang³, FENG Xiao-yun², LIU Jian-rong², JIANG Xiao-bing², GAO Wen-wen², MA Lian-ting¹. 1. Department of Neurosurgery, General Hospital, Central Theater, PLA, Wuhan 430070, China; 2. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an 710038, China; 3. Department of Neurosurgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】Objective To investigate the role of transferrin receptor (TFRC) in the inhibition of proliferation and invasion of U87 glioma cells by temozolomide. Methods U87 glioma cells were cultured in vitro, and treated with 50 μmol/L, 100 μmol/L and 200 μmol/L temozolomide. Control siRNA and siTFRC transfected into U87 cells were used to silence TFRC expression, and pcDNA3.1 empty vector and pcDNA3.1 transfected into U87 cells were used to over-express TFRC expression. U87 cell proliferation was detected by CCK-8 method. U87 cell invasion ability was detected by Transwell chamber assay. TFRC mRNA and protein expression in U87 cells were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and immunoblotting, respectively. Results Compared with the blank group (without treatment of temozolomide), the proliferation and invasion ability of U87 cells reduced significantly ($P<0.05$) and the expression of TFRC mRNA and protein decreased significantly ($P<0.05$) after temozolomide treatment, in a concentration-dependent manner. When the concentration of temozolomide was 200 μmol/L, the inhibition ability of temozolomide to U87 cells was the strongest ($P<0.05$). Compared with the U87 cells treated with pcDNA3.1 empty vector, the expression level of TFRC significantly increased in the U87 cells treated with pcDNA3.1/TFRC ($P<0.05$). The inhibitory effect of temozolomide on cell proliferation and invasion was significantly reduced in U87 cells treated with pcDNA3.1/TFRC compared to those treated with pcDNA3.1 empty vector ($P<0.05$). Compared with the U87 cells treated with control siRNA, the expression level of TFRC significantly decreased in the U87 cells treated with siTFRC ($P<0.05$). The inhibitory effect of temozolomide on cell proliferation and invasion was significantly increased in U87 cells treated with siTFRC compared to those treated with control siRNA ($P<0.05$). Conclusion Temozolomide may inhibit the proliferation and invasion of U87 glioma cells by inhibiting the expression of TFRC.

【Key words】Glioma; Temozolomide; U87 cell; proliferation; invasion; TFRC

胶质瘤颅内最常见的恶性肿瘤,呈浸润性生长,手术很难完全切除,复发率高,预后差^[1-4]。替莫唑胺

是脑胶质瘤非常重要的化疗药物,可明显改善高级别胶质瘤的预后,然而对低级别胶质瘤的效果并不明显^[5]。转铁蛋白受体(transferrin receptor, TFRC)在多种肿瘤中发挥促癌作用^[6]。本文探讨TFRC在替莫唑胺抑制U87胶质瘤细胞增殖和侵袭中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 利用含10%胎牛血清的1640培养基

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.11.015
作者单位:430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院神经外科(赵海康、潘 力、马廉亭);710038 西安,西安医学院第二附属医院神经外科(赵海康、冯小云、刘建荣、蒋小兵、高文文);300052 天津,天津医科大学总医院神经外科(张 亮)
通讯作者:马廉亭,E-mail:mlt1937@163.com

(美国 Gibco 公司)培养 U87 细胞(上海汉博生物科技有限公司)。细胞融合度达到 80% 时,利用胰蛋白酶消化并传代培养,利用对数生长期细胞进行后续实验。分别加入 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺(江苏天士力帝益药业有限公司)作用 48 h 后,进行检测 U87 细胞增殖、侵袭能力以及 TFRC 表达水平,以最佳浓度进行后续实验。

1.2 细胞转染 将对数生长期 U87 细胞接种至 6 孔板中,浓度为 5×10^4 个/ml。利用 LipofectamineTM2000 (北京宜科思源科技有限公司,11668-027)进行转染,根据说明书进行操作。转染 pcDNA3.1/TFRC 质粒(生工(上海)生物公司合成)上调 TFRC 表达,以 pcDNA3.1 空载体(生工(上海)生物公司合成)为对照。转染 siTFRC(生工(上海)生物公司合成)沉默 TFRC 表达,以 control siRNA(生工(上海)生物公司合成)为对照。设置空白对照组、空载体组、替莫唑胺+空载体组、替莫唑胺+转染质粒组。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 TFRC mRNA 表达水平 收集 U87 细胞,利用 Trizol 试剂盒(日本 Takara 公司)提取总 RNA。利用逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)合成 cDNA,再利用荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)检测 TFRC mRNA 表达水平。均按照试剂盒说明书进行操作

1.4 免疫印迹法检测 TFRC 蛋白表达水平 收集细胞,加入 RIPA 细胞裂解液使细胞充分裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 转/min 离心 10 min,收集上清液,利用 BCA 法检测蛋白浓度,利用上样缓冲液与蛋白液按照 1:1 比例混合并变性处理,利用 SDS 法电泳分离蛋白。将含有目的蛋白区域转移至 PVDF 膜上,并用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h。加入一抗(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后利用 TBST 缓冲液洗涤三次,加入二抗(1:1 000)常温孵育 1 h,最后利用 ECL 发光液(美国 Millipore 公司,WBKLS00100)进行显影处理,拍照并记录实验数据。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参。

1.5 U87 细胞增殖检测 利用胰蛋白酶消化成细胞悬液,并将细胞浓度调整至 5×10^3 个/ml,接种至 96 孔板,每孔加入 0.2 ml 细胞悬液,每组设置 6 个复孔。培养 48 h 后,加入 10 μl CCK-8 溶液(北京百奥莱博科技有限公司,100T)继续孵育 2 h,然后利用酶标仪检测 490 nm 处吸光值。

1.6 U87 细胞侵袭能力检测 在侵袭小室中均匀铺布稀释 8 倍的 Matrigel 胶(美国 BD 公司,5 ml),预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 并维持;在侵袭小室的下室中加入含 10% 的胎牛血清细胞培养液。将待检测细胞悬液加入到侵袭

小室的上室中,每种细胞接种数目为 1×10^5 个,在培养箱中侵袭培养 24 h,移除上室培养液并擦除未发生穿膜的细胞,将细胞固定后利用浓度为 0.1% 的结晶紫溶液染色,置于显微镜下,观察记录侵袭细胞数目并拍照。

1.7 统计学分析 利用 SPSS 20.0 软件进行分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法和 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 替莫唑胺对 U87 胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响 与空白对照组相比,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理后,U87 细胞增殖能力和侵袭能力都显著下降($P < 0.05$),并且当替莫唑胺浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖能力和侵袭能力最低($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 替莫唑胺对 U87 细胞 TFRC 表达水平的影响 与空白对照组相比,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理后,U87 胶质瘤细胞 TFRC mRNA 和蛋白表达水平都显著下降($P < 0.05$)。当利用 200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处

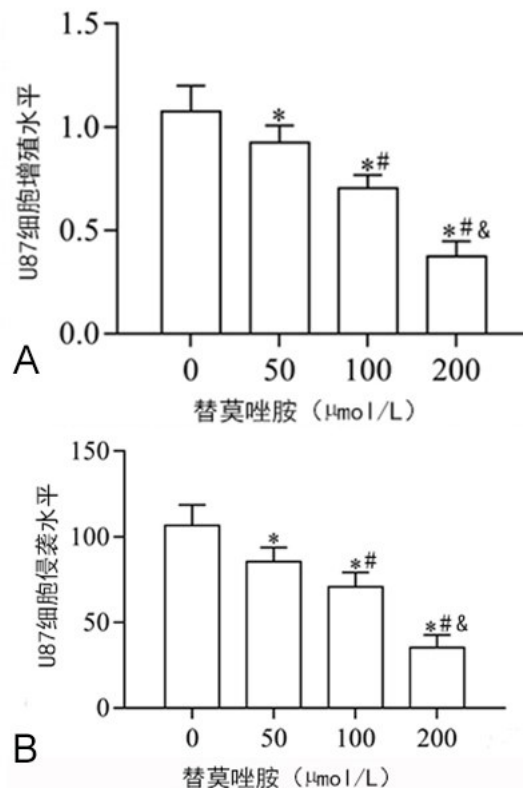


图1 替莫唑胺对U87胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺组相应值比,* $P < 0.05$;与 50 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺组相应值比,# $P < 0.05$;100 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺组相应值比,& $P < 0.05$

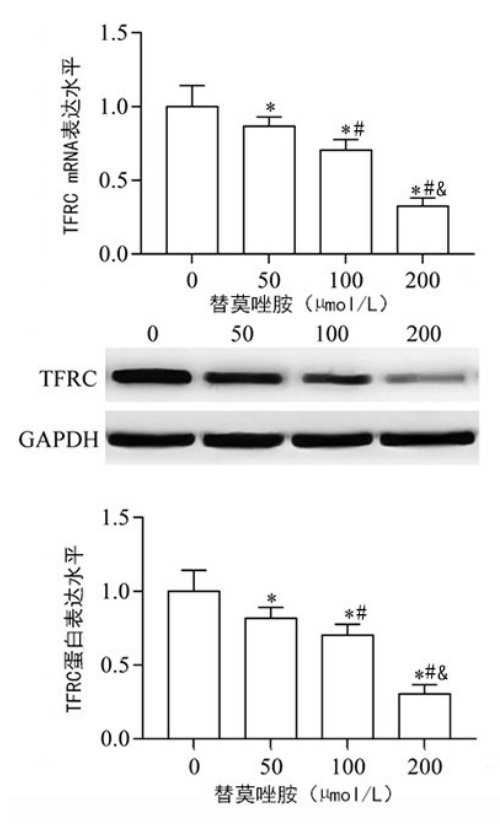


图2 替莫唑胺对U87胶质瘤细胞TFRC表达的影响

与0 μmol/L 替莫唑胺组相应值比, * $P<0.05$; 与50 μmol/L 替莫唑胺组相应值比, # $P<0.05$; 100 μmol/L 替莫唑胺组相应值比, & $P<0.05$; TFRC. 转铁蛋白受体

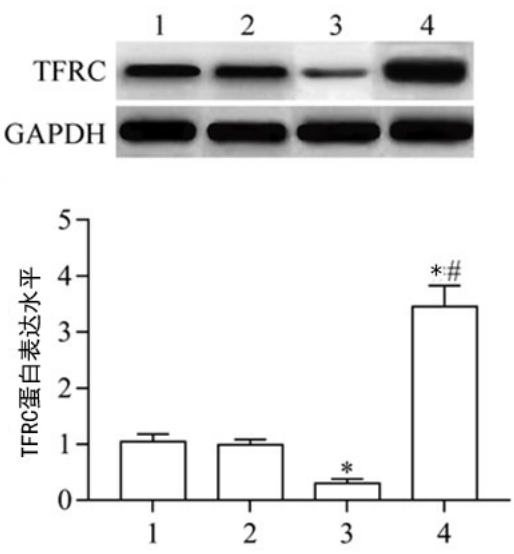


图4 转染pcDNA3.1/TFRC后替莫唑胺对U87胶质瘤细胞TFRC表达的影响

与1、2组相应值比, * $P<0.05$; 与3组相应值比, # $P<0.05$; 1. 空白对照; 2. pcDNA3.1 空载体组; 3. 替莫唑胺+pcDNA3.1 空载体组; 4. 替莫唑胺+pcDNA3.1/TFRC 组; TFRC. 转铁蛋白受体

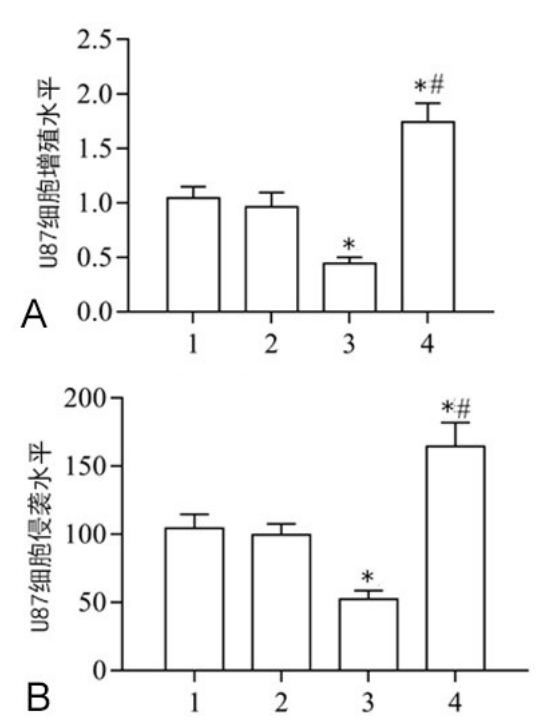


图5 转染siTFRC后替莫唑胺对U87胶质瘤细胞TFRC表达的影响

与1、2组相应值比, * $P<0.05$; 与3组相应值比, # $P<0.05$; 1. 空白对照; 2. pcDNA3.1 空载体组; 3. 替莫唑胺+pcDNA3.1 空载体组; 4. 替莫唑胺+pcDNA3.1/TFRC 组; TFRC. 转铁蛋白受体

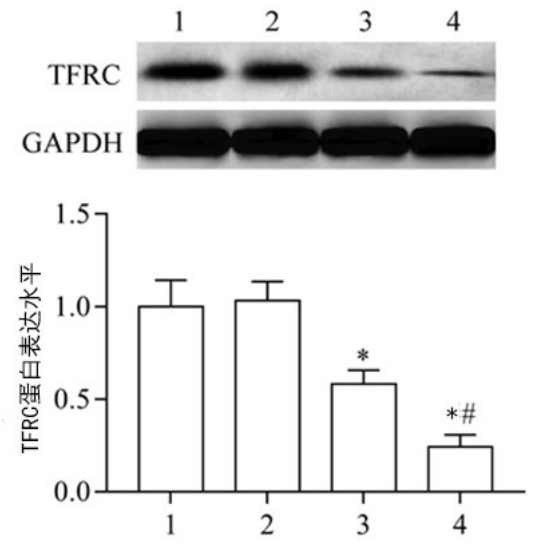


图5 转染siTFRC后替莫唑胺对U87胶质瘤细胞TFRC表达的影响

与1、2组相应值比, * $P<0.05$; 与3组相应值比, # $P<0.05$; 1. 空白对照; 2. pcDNA3.1 空载体组; 3. 替莫唑胺+pcDNA3.1 空载体组; 4. 替莫唑胺+pcDNA3.1/TFRC 组; TFRC. 转铁蛋白受体

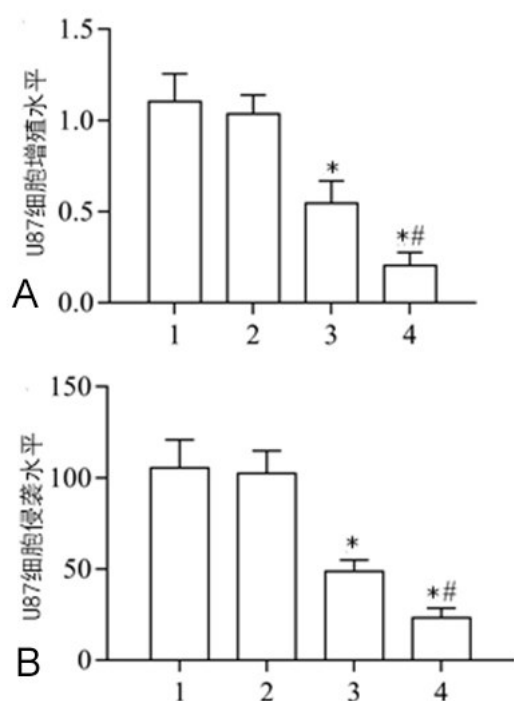


图6 转染 siTFRC 后替莫唑胺对 U87 胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响
与 1、2 组相应值比,* $P<0.05$;与 3 组相应值比,# $P<0.05$;1. 空白对照;2. pcDNA3.1 空载体组;3. 替莫唑胺+pcDNA3.1 空载体组;4. 替莫唑胺+pcDNA3.1/TFRC 组;TFRC. 转铁蛋白受体

理胶质瘤细胞时,细胞 TFRC mRNA 和蛋白的表达水平最低($P<0.05$)。见图 2。

2.3 TFRC 过表达条件下替莫唑胺对 U87 细胞增殖和侵袭能力的影响 与 pcDNA3.1 空载组相比,pcDNA3.1/TFRC 转染组 TFRC 表达水平显著上升($P<0.05$,图 3)。当利用 200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理后,与 pcDNA3.1 空载组相比,pcDNA3.1/TFRC 转染组 U87 细胞增殖和侵袭能力都显著上升($P<0.05$,图 4)。

2.4 沉默 TFRC 表达后替莫唑胺对 U87 细胞增殖和侵袭的影响 与 control siRNA 组相比,siTFRC 转染组 TFRC 的表达水平显著下降($P<0.05$,图 5)。当利用 200 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理后,与 control siRNA 转染组相比,siTFRC 转染组 U87 细胞增殖和侵袭能力显著下降($P<0.05$,图 6)。

3 讨论

在胶质瘤的生长、发展过程中,侵袭能力及浸润生长能力非常强,尤其是高级别胶质瘤,术后复发率高,预后差。替莫唑胺最早应用于治疗黑色素瘤,因其可以穿透血脑屏障,因此替莫唑胺对胶质瘤具有

一定的抑制作用^[7,8]。本研究发现替莫唑胺处理后,U87 胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力显著下降,并且替莫唑胺浓度在 200 $\mu\text{mol/L}$ 以内时,随着替莫唑胺浓度的增加,细胞的增殖和侵袭能力都显著下降。研究发现,TFRC 在宫颈癌、胰腺癌等肿瘤细胞中发挥非常重要的调控作用。Xu 等^[9]研究表明宫颈癌组织 TFRC 的表达水平显著上调,并且 TFRC 高表达显著促进肿瘤的生长,同时促进宫颈癌细胞发淋巴结转移。Laube 等^[10]研究表明,TFRC 在黑素瘤细胞中表达水平也显著上调,高表达 TFRC 显著促进黑素瘤细胞的增殖,而当其表达水平下调时可明显影响肿瘤细胞的增殖。另外,本研究发现替莫唑胺处理 U87 胶质瘤细胞后可显著抑制 U87 细胞 TFRC 的表达;而且,过表达 TFRC,明显拮抗替莫唑胺的肿瘤抑制效应;而沉默 TFRC 表达,促进替莫唑胺的肿瘤抑制效应。

总之,替莫唑胺可明显抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖和侵袭,其机制可能与抑制 TFRC 有关。

【参考文献】

- [1] 许蓓,李爱群,江高峰. 胶质瘤的细胞来源研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2018,34 (3): 566-571.
- [2] Woodward DE, Cook J, Tracqui P, *et al.* A mathematical model of glioma growth: the effect of extent of surgical resection [J]. Cell Proliferation, 2010, 29 (6): 269-288.
- [3] 蒲波,高晋健. 替莫唑胺联合放疗对胶质瘤患者 VEGF、IL-8 表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2016,35(12):3285-3291.
- [4] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16 (3): 203-222.
- [5] Gong D, Che HP, Xie W, *et al.* Cystathionine γ -Lyase(CSE)/Hydrogen sulfide system is regulated by miR-216a and influences cholesterol efflux in macrophages via the PI3K/AKT/ABCA1 pathway [J]. Bioch Biophys Res Commun, 2016, 470 (1): 107-116.
- [6] 陈媛媛,王斌俏,兰霄霄,等. 转铁蛋白受体在子宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. 温州医科大学学报,2017, 47 (4):254-257.
- [7] Degrate L, Bernasconi DP, Meroni P, *et al.* Mild acute biliary pancreatitis: the timing of cholecystectomy should not exceed index admission [J]. Minerva Chirurgica, 2017, 72 (5): 383.