

. 实验研究 .

胶质瘤干细胞外泌体通过 PI3K/Akt 信号通路促进胶质瘤 U87 细胞侵袭、迁移

任光辉 李武雄 齐利豪

【摘要】目的 探讨胶质瘤干细胞(GSCs)外泌体(exo)对胶质瘤 U87 细胞侵袭、迁移的影响。**方法** 取对数生长期 U87 细胞,应用干细胞培养液分离、培养胶质瘤 U87 细胞中 GSCs 并提取、鉴定 GSCs-exo。取对数生长期 U87 细胞随机分为 4 组:对照组和高、中、低 GSCs-exo 浓度组(分别加入 20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 的 GSCs-exo)。Transwell 实验检测 U87 细胞侵袭能力,划痕实验检测 U87 细胞迁移能力,免疫印记法检测 U87 细胞磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)、L1CAM 的表达水平。**结果** 成功分离 GSCs 并获得 GSCs-exo。GSCs-exo 组 U87 侵袭细胞数、细胞迁移率明显高于对照组($P<0.05$),L1CAM、PI3K 及 p-Akt/Akt 表达水平明显高于对照组($P<0.05$),而且均呈浓度依赖性($P<0.05$)。**结论** GSCs-exo 可促进胶质瘤侵袭与转移,其机制可能与上调 L1CAM、PI3K 表达,促进 Akt 磷酸化有关。

【关键词】 胶质瘤;胶质瘤干细胞;U87 细胞;外泌体;细胞侵袭;细胞迁移;细胞磷脂酰肌醇-3 激酶;蛋白激酶 B

【文章编号】 1009-153X(2021)03-0176-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Glioma stem cell-derived exosomes promote glioma U87 cell invasion and migration through PI3K/Akt signaling pathway

REN Guang-hui¹, LI Wu-xiong², QI Li-hao². 1. Department of Neurosurgery, The Third Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China; 2. Department of Neurosurgery, Luoyang Oriental Hospital, Luoyang 471000, China

【Abstract】Objective To study the effect of glioma stem cell-derived exosomes (GSCs-exo) on the cell invasion and migration of cultured human glioma U87 cells. **Methods** GSCs were isolated from human glioma U87 cells and cultured using stem cell culture media. Then GSCs-exos were extracted and identified from the cell culture supernatant of the GSCs culture media. U87 cells were cultured and randomly divided into four groups, i.e.; control group, and high, medium and low GSCs-exo concentration groups (adding 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ GSCs-exo into the culture media, respectively). The invasion ability of U87 cells was detected by Transwell experiment, the migration ability of U87 cells was detected by the scratch experiment, and the expression levels of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and L1CAM in U87 cells were detected by the western blotting. **Results** GSCs and GSCs-exo were successfully separated and identified. The number of U87 invasion cells and cell migration rate in the GSCs-exo groups were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and the expression levels of L1CAM, PI3K and p-Akt/Akt were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and all the effects of GSCs-exo were concentration dependent ($P<0.05$). **Conclusions** GSCs-exo can promote the invasion and migration of glioma cells, and its mechanism may be related to the up-regulation of L1CAM and PI3K/Akt.

【Key words】 Glioma; Glioma stem cell; U87 cell; Exosomes; Phosphatidylinositol-3 kinase; Protein kinase B; Cell invasion; Cell migration

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,病死率、致残率高^[1,2]。外泌体(exosomes,exo)是细胞在生理、病理条件下释放到胞外的一种双层膜囊泡,能与靶细胞受体结合或水平转移内含物而发挥生物学功能^[3]。研究发现,肿瘤细胞来源的 exo 能通过不同机

制影响肿瘤的侵袭、转移、血管生成等^[4]。本研究探讨胶质瘤干细胞外泌体(glioma stem cells exosomes, GSCs-exo)对体外培养的胶质瘤 U87 细胞侵袭、迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 U87 胶质瘤细胞株(中国医学科学院基础医学研究所基础细胞中心提供)置于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养。**1.2 GSCs 分离、培养及鉴定** 取对数生长期 U87 细胞,消化重悬后,转移至干细胞培养液(上海索莱宝

科技有限公司)培养至第 3 代细胞,转移至防脱载玻片,贴壁后以多聚甲醛固定,清洗后依次加入 Nestin 抗体、CD133 一抗(1:200),4 ℃ 孵育过夜,清洗后加入 FITC 标记的二抗(1:400;德国默克公司),室温下孵育 1 h,避光处理,加入核衬染物 DAPI,室温孵育 10 min,荧光显微镜下观察。同时有多聚左旋赖氨酸涂层的载玻片上进行第 3 代 GSCs 诱导分化,常规培养 5 d 后,进行 GFAP 荧光染色,2 周后进行 Neun 染色,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.3 GSCs-exo 的提取与鉴定 超速离心法提取 exo。按照 QIAAGEN GSCs-exo 提取试剂盒(上海李记生物科技有限公司)说明书,收集 GSCs 上清细胞培养液,加入 XWP、XE 缓冲液分别离心洗涤、洗脱,获得 GSCs-exo 混合液固定,加入 3% 磷钨酸溶液负染,透射显微镜下观察 GSCs-exo 形态。RIPA 裂解液(上海索莱宝科技有限公司)提取 GSCs-exo 蛋白,10% SDS-PAGE 电泳分离转移至 PVDF 膜,室温封闭 2 h,加入 CD63 一抗(1:500),4 ℃ 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),孵育 2 h,ECL 曝光拍照。

1.4 干预与分组 取 50 μ l GSCs-exo,经 RIPA 裂解液处理,BCA 试剂盒(上海纪宁生物科研试剂盒公司)测量蛋白浓度,以 10% exo 血清培养液分别稀释至 20、40、80 μ g/ml。取对数生长期 U87 细胞接种于 6 孔板中,密度调整为 1×10^5 /孔,随机分为 4 组:对照组和高、中、低 GSCs-exo 浓度组(分别加入 20、40、80 μ g/ml 的 GSCs-exo),每组 5 个复孔。

1.5 Transwell 实验检测 U87 细胞侵袭能力 100 μ l 50 mg/L 的 Matrigel 基质胶 1:40 稀释液包被底部膜上室面。收集对数生长期细胞,按照 2×10^5 个/孔移入 Transwell 小室,下层加入 10% 胎牛血清的 1640 培养基 500 μ l,对照组、GSCs-exo 组小室上室分别加入无血清 1640 培养基 150 μ l 和重悬外泌体 150 μ l,37 ℃ 培养 24 h,甲醇室温固定 10 min。侵袭置滤膜下表面的细胞以结晶紫染色,正置显微镜下随机选取 5 个视野拍照,计算穿膜细胞数,取平均值。

1.6 划痕实验检测 U87 细胞迁移能力 对数生长期细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板常规培养,细胞贴壁生长时,弃培养基,以 50 μ l 无菌移液枪头在培养板中间划线,后加入完全培养基继续培养 24 h 后拍照,计算细胞迁移率。迁移率(%)=(初始划痕宽度-24 h 后划痕宽度)/初始划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.7 免疫印记法检测 U87 细胞磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、L1CAM 收集各组细胞,RI-

PA 裂解液处理,BCA 定量蛋白,SDS-PAGE 法分离,转移至 PVDF 膜,封闭液封闭,加入一抗(1:2 000),4 ℃ 封闭过夜,加入二抗(1:10 000;厦门慧嘉生物科技有限公司),室温孵育 2 h,ECL 显影,分析目的条带灰度值。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行处理;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSCs 的鉴定结果 肿瘤细胞球由多个细胞组合而成,即 GSCs(图 1)。荧光染色可见 CD133(图 2a)与 Nestin(图 2b)呈阳性表达。诱导分化 5 d 后 GSCs 分化成胶质细胞,GFAP 阳性表达(图 2c),2 周后 GSCs 分化为神经元细胞,Neun 阳性表达(图 2d)。

2.2 GSCs-exo 鉴定结果 GSCs-exo 为圆形或椭圆形囊泡结构,直径 30~100 nm,双层膜包被(图 3a)。提取的 GSCs-exo 总蛋白显示表达相关标志蛋白 CD63(图 3b)。

2.3 GSCs-exo 对 U87 细胞侵袭能力的影响 高浓度 GSCs-exo 组侵袭细胞数量[(135.32 \pm 13.47)个]明显高于中浓度 GSCs-exo 组[(108.36 \pm 11.35)个; $P < 0.05$],而中浓度 GSCs-exo 组明显高于低浓度 GSCs-exo 组[(88.45 \pm 8.23)个; $P < 0.05$],低浓度 GSCs-exo 组明显高于对照组[(65.32 \pm 6.35)个; $P < 0.05$]。

2.4 GSCs-exo 对 U87 细胞迁移能力的影响 高浓度 GSCs-exo 组细胞迁移率[(88.36 \pm 8.35)%]明显高于中浓度 GSCs-exo 组[(72.39 \pm 7.25)%; $P < 0.05$],而中浓度 GSCs-exo 组明显高于低浓度 GSCs-exo 组[(46.35 \pm 6.89)%; $P < 0.05$],低浓度 GSCs-exo 组明显高于对照组[(23.56 \pm 5.12)%; $P < 0.05$]。

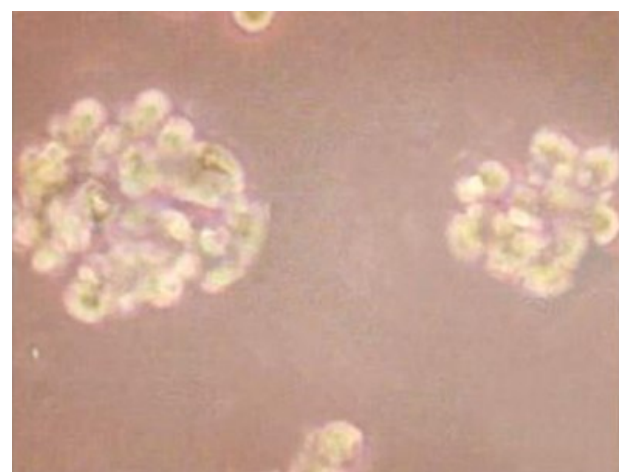


图 1 胶质瘤干细胞形态鉴定($\times 40$)

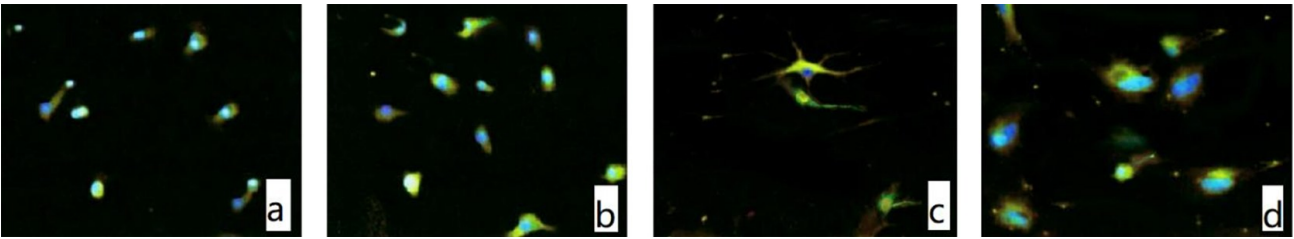


图2 胶质瘤干 CD133、Nestin、GFAP、Neun 免疫荧光染色鉴定(×40)
a. CD133 免疫荧光染色;b. Nestin 免疫荧光染色;c. GFAP 免疫荧光染色;d. Neun 免疫荧光染色;GFAP. 胶质纤维酸性蛋白;Neun. 神经元特异性核蛋白

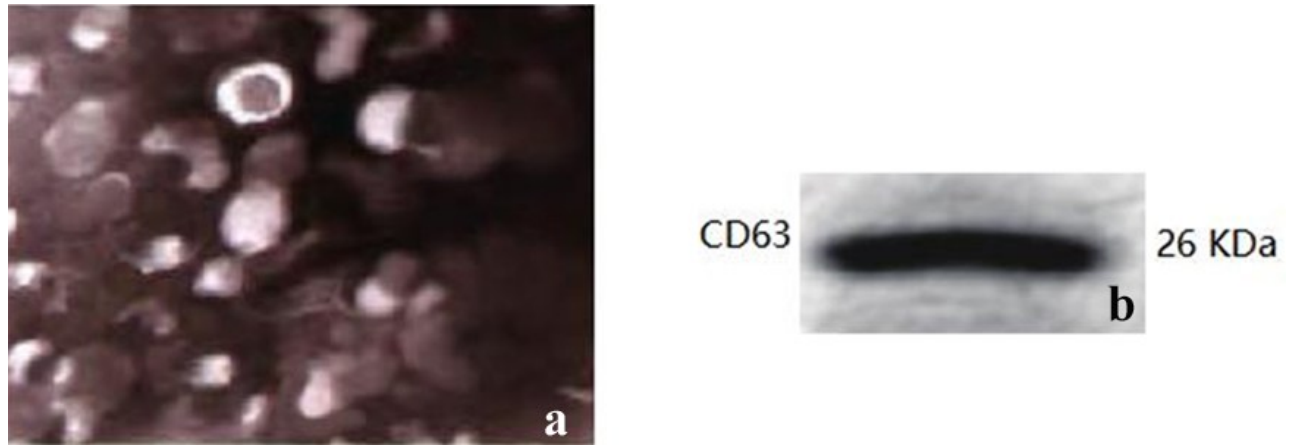


图3 胶质瘤干细胞外泌体鉴定
a. 透射电镜观察胶外泌体(×30 000);b. 免疫印迹法检测表面标志蛋白 CD63

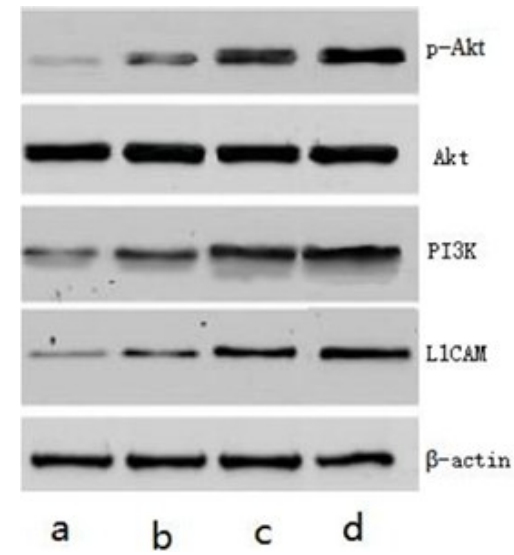


表 1 GSCs-exo 对 U87 细胞 L1CAM、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响

组别	L1CAM	PI3K	p-Akt/Akt
对照组	0.18±0.04	0.24±0.05	0.12±0.03
低浓度 GSCs-exo 组	0.40±0.06°	0.45±0.07°	0.20±0.04°
中浓度 GSCs-exo 组	0.65±0.09°#	0.82±0.11°#	0.41±0.06°#
高浓度 GSCs-exo 组	1.01±0.12°#△	1.21±0.15°#△	0.85±0.08°#△

注:与对照组相应值比,* $P<0.05$;与低浓度 GSCs-exo 组相应值比,# $P<0.05$;与中浓度 GSCs-exo 组相应值比,△ $P<0.05$;L1CAM. L1 细胞黏附分子;PI3K. 磷脂酰肌醇-3 激酶;Akt. 蛋白激酶 B;GSCs-exo. 胶质瘤干细胞外泌体

图4 免疫印迹法检测 GSCs-exo 对 U87 细胞 L1CAM、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响
a. 对照组;b. 低浓度 GSCs-exo 组;c. 中浓度 GSCs-exo 组;d. 高浓度 GSCs-exo 组;L1CAM. L1 细胞黏附分子;PI3K. 磷脂酰肌醇-3 激酶;Akt. 蛋白激酶 B;p-Akt. 磷酸化蛋白激酶 B;GSCs-exo. 胶质瘤干细胞外泌体

2.5 GSCs-exo 对 U87 细胞 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较,GSCs-exo 组 L1CAM、PI3K 蛋白表达量及 p-Akt/Akt 比值明显增高($P<0.05$),而且随 GSCs-exo 浓度增加明显增高($P<0.05$)。见表 1、图 4。

3 讨论

本研究结果显示,GSCs-exo 能促进胶质瘤 U87 细胞的侵袭和迁移,而且,GSCs-exo 组 L1CAM、PI3K 与 p-Akt/Akt 水平均明显升高;均呈浓度依赖性。这说明 GSCs-exo 可上调 L1CAM、PI3K 表达,促进 Akt 磷酸化,从而促进 U87 细胞侵袭和迁移。

GSCs 可自我更新、多向分化、无限增殖,对胶质瘤的生长、转移、浸润、复发及治疗敏感性有决定性作用^[4,5]。exo 在细胞间的物质和信息传递中有重要的转导作用,参与肿瘤生长、转移。肿瘤细胞来源的 exo,因携带 miRNA、DNA 片段、蛋白质、脂质等多种功能分子,能为肿瘤的侵袭和转移提供条件^[6]。邹敏等^[7]研究显示,缺氧环境下肝癌细胞分泌的 exo,可促进肝癌细胞的增殖、迁移与侵。Gong 等^[8]发现,GSCs-exo 能促进血管内皮细胞的增殖和迁移。

L1CAM 是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族的重要成员^[9]。张媛^[10]研究发现,L1CAM 能直传递双向信号,影响细胞的结构、基因表达、细胞增殖和细胞分化等生物学行为,促进肿瘤细胞的侵袭与转移。另外,L1CAM 还可调控血管的生成,参与肿瘤的发展,并提高肿瘤细胞耐药性^[11]。PI3K 是具有催化活性的胞内磷脂酰肌醇激酶,Akt 是 PI3K 下游的靶向调节分子,Akt 可在 PI3K 的磷酸产物激活后发生质-膜转移而被激活,通过磷酸化作用影响胞浆内的生物学信号传递,调控细胞的增殖、侵袭、转移等过程^[12,13]。

综上所述,GSCs-exo 可促进胶质瘤 U87 细胞的侵袭与迁移,可能与上调 L1CAM、PI3K 表达,促进 Akt 磷酸化有关。

【参考文献】

[1] Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, *et al.* Glioma subclassifications and their clinical significance [J]. Neurothera-

peutics, 2017, 14(2): 284-297.

[2] 方 园,樊欣鑫,张世荣,等. 姜黄素对人胶质瘤 SHG44 细胞侵袭、迁移的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018,23(6):416-418.

[3] Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, *et al.* Exosomes from glioma-associated mesenchymal stem cells increase the tumorigenicity of glioma stem-like cells via transfer of miR-1587 [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5808-5819.

[4] Murgoci AN, Cizkova D, Majerova P, *et al.* Brain-cortex microglia-derived exosomes: nanoparticles for glioma therapy [J]. Chemphyschem, 2018, 19(10):1205-1214.

[5] Jin X, Kim LJY, Wu Q, *et al.* Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition [J]. Nat Med, 2017, 23(11):1352-1361.

[6] Ruivo CF, Adem B, Silva M, *et al.* The Biology of cancer exosomes: insights and new perspectives [J]. Cancer Res, 2017, 77(23):6480-6488.

[7] 邹 敏,游 逾,何 松,等. 缺氧外泌体对肝癌 Huh7 细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(5):363-368.

[8] Gong M, Yu B, Wang J, *et al.* Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis [J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45200-45212.

[9] Angiolini F, Cavallaro U. The Pleiotropic Role of L1CAM in Tumor Vasculature [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 254-259.

[10] 张 媛. L1-CAM 在 I 型子宫内膜癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2018,24(11):1088-1091.

[11] Jo DH, Lee K, Kim JH, *et al.* L1 increases adhesion-mediated proliferation and chemoresistance of retinoblastoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15441-15452.

[12] 杜小颖,丁薇薇,陈 悦,等. IGF-1 通过 PI3K/AKT 信号通路促进骨髓细胞增殖及碱性磷酸酶活性的研究[J]. 口腔医学研究, 2017,33(5):538-541.

[13] 林祥博,石文静,杨志一,等. 间质表皮转化因子通过 PI3K/AKT/MMPs 信号通路促进肺腺癌细胞的侵袭转移 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(6): 648-654.

(2020-02-20 收稿,2020-04-20 修回)