

. 实验研究 .

CXCR4 表达上调对 U251 细胞增殖、侵袭、迁移的影响

李成林 丁 妍 于爱清 杨艳芳 李东升

【摘要】目的 探讨CXC趋化因子-4受体(CXCR4)表达上调对U251细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响及其作用机制。方法 构建携带CXCR4基因的质粒,采用电转染法将携带CXCR4基因的质粒整合到胶质瘤U251细胞的基因组中,然后将细胞分为空白对照组、阴性对照组和CXCR4上调组,分别从mRNA水平和蛋白水平检测CXCR4及其他相关基因的表达;MTT试验检测细胞增殖能力的改变;划痕试验检测细胞的迁移能力;Transwell侵袭试验检测细胞侵袭性的变化。结果 与空白对照组和阴性对照组相比,CXCR4上调组U251细胞CXCR4在mRNA和蛋白水平上表达都增强,细胞增殖、侵袭和迁移能力均显著增强;而空白对照组和阴性对照组之间并无明显变化。结论 CXCR4在胶质瘤的增殖、侵袭、迁移行为中发挥着重要的作用,可以被视为胶质瘤治疗的靶向基因。

【关键词】胶质瘤;U251细胞;CXC趋化因子受体4;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移

【文章编号】1009-153X(2016)02-0097-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 789

Effects of up-regulation of CXCR4 on proliferation, invasion and migration of U251 cells

LI Cheng-lin¹, DING Yan², YU Ai-qing¹, YANG Yan-fang², LI Dong-sheng¹. 1. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Taihe Hospital, Hubei Medicine College, Shiyan 442000, China

【Abstract】Objective To study the effects of CXC chemokine receptor-4 (CXCR4) expression up-regulation on U251 cells proliferation, invasion and migration abilities and its possible mechanism. Methods Plasmids carrying CXCR4 gene sequence were constructed and transfected into U251 cells by electroporation. The blank control group, negative control group and experimental group were designed. The expression of CXCR4 mRNA and protein and other related genes were detected in U251 cells. U251 cells proliferation ability was detected by MTT assay, their migration ability was detected by scratch assay and the changes in U251 cell invasion were detected by Transwell invasion assay. Results The levels of CXCR4 mRNA and protein and Nanog mRNA expression were significantly higher in the experimental group than those in the blank control group and the negative control group. The abilities of U251 cells proliferation, migration and invasion were significantly stronger in the experimental group than those in the other two groups ($P<0.05$). Conclusions It is suggested that CXCR4 plays an important role in the proliferation, migration and invasion of glioma cells, and it may be regarded as a target gene for the treatment of glioma.

【Key words】U251 cells; CXC chemokine receptor-4 (CXCR4); Expression; Up-regulation; proliferation; Migration; Invasion

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性恶性肿瘤,占颅内肿瘤的40%~50%,死亡率和复发率均很高^[1]。手术切除及术后辅助放疗是目前治疗脑胶质瘤主要方法,但预后很差^[2]。基因靶向治疗有可能是胶质瘤新的治疗方法^[3]。CXC趋化因子受体-4(CXC chemo- kine receptor-4, CXCR4)是G蛋白偶联受体家族中的一员^[4],与其配体基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)结合,可以引起

相应信号级联反应放大效果^[5]。研究表明CXCR4参与脑胶质瘤的肿瘤生物学恶性行为^[6,7]。本文探讨CXCR4表达上调对U251胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人脑胶质瘤U251细胞由湖北省胚胎干细胞重点实验室提供,DMEM培养液和Opti-MEM培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自四季青公司,电转杯购自美国BIO-RAD公司,总RNA提取试剂TRIzol试剂购自美国Life Technologies公司, FastQuant cDNA第一链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,TALEN试剂盒购自上海斯丹赛生物技术有限公司, CellTiter 96®Aqueous One

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.02.013
作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院神经外科(李成林、于爱清、李东升);442000 十堰,湖北医药学院附属太和医院神经外科(丁妍、杨艳芳)
通讯作者:李东升,E-mail:dsl1698@aliyun.com

Solution 购自美国 Promega 公司, RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司, 青霉素、链霉素、胰酶消化液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒及碱性磷酸酶标记抗兔抗体购自武汉碧云天生物技术有限公司, 兔抗人 CXCR4 抗体购自美国 GeneTex 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 U251 细胞以 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素)培养, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内培养, 0.25% 胰酶消化液消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 携带 CXCR4 基因质粒的构建 用 TRIzol 法提取人胚胎干细胞总 RNA, 并以其为模板进行 PCR 扩增合成 CXCR4 基因序列(正向引物为 5'-GAATTC GGATGGAGGGGATCAGTATATACACTTCAG-3'; 反向引物为 5'-CTCGAGCTTAGCTGGAGTGAAAAC TTGAAGACTCA-3')。用 EcoR I 酶和 Xho I 酶对合成 CXCR4 mRNA PCR 产物和 TALEN 骨架载体进行双酶切, 酶切后用 T4 连接酶将 CXCR4 链接到 TALEN 骨架载体上, 构建携带 CXCR4 基因的质粒。以 TALEN 空骨架为阴性质粒。

1.2.3 表达 CXCR4 的 U251 细胞株的制备及分组 100 μl Opti-MEN 培养基悬浮 1×10⁶ 个 U251 细胞, 携带 CXCR4 基因质粒(5 μg, CXCR4 上调组)和阴性质粒(5 μg, 阴性对照组)分别置于电转杯中, 转染电压为 130 V, 通过 NEPA21 高效基因电转系统进行质粒转染。将转染质粒后的 U251 细胞置于 6 孔板内, DEME 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素)、5% CO₂、37 °C 恒温培养。由于 TALEN 骨架质粒具有嘌呤霉素抗性, 待细胞贴壁后, 用 3 μg/ml 嘌呤霉素进行筛选, 野生型 U251 细胞作为空白对照组。野生型 U251 细胞完全死亡后, 所得细胞为 CXCR4 上调组细胞和阴性对照组细胞。细胞在稳定转染质粒后, 生长 10 代以内进行试验。

1.2.4 U251 细胞 CXCR4 mRNA 水平的检测 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)悬浮细胞, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml, 取 1 ml 接种于 6 孔板内。24 h 后, 按照 TRIzol 试剂说明的方法提取总 RNA, 按照反转录试剂盒的方法合成 cDNA。以 cDNA 作为模板, 按照 RT-PCR 检测试剂盒的说明方法进行 PCR 扩增。PCR 扩增的引物如下: CXCR4 上游引物为 5'-CAT CATCTTCTTAAGTGGCATTGTG-3', 下游引物为 5'-GCTGTAGAGGTTGACTGTGTAGA-3'; 内参 β-actin 上游引物为 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3', 下游引物为 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA-3'。

PCR 的反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。用 Image Lab 软件测量每个条带的积分光密度(integrated option density, IOD), mRNA 相对表达量=待查基因 IOD/β-actin IOD。

1.2.5 U251 细胞 CXCR4 蛋白表达的测定 DMEM 培养基(含 10% FBS)悬浮细胞, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml, 取 1 ml 接种于 6 孔板内, 次日收集蛋白。蛋白变性后, 以 20 μl/孔的上样量进行 10% SDS-PAGE 蛋白分离, 然后将电泳分离的蛋白电转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入 CXCR4 抗体(1:1 000 稀释)、β-actin 抗体(1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 碱性磷酸过氧化物酶标记的人抗兔二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 将 PVDF 膜显影并在凝胶成像系统上采相。

1.2.6 MTT 试验 分别取三组对数生长期 U251 细胞 3×10³ 个/孔接种于 96 孔板内, 培养 1、3、5、7 d 后每孔加入 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution, 继续培养 4 h 后 490 nm 的波长下读取吸光度值。重复 3 次。

1.2.7 划痕试验 重悬各组细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁵/ml, 2 ml 接种于 6 孔板内, 5% CO₂、37 °C 恒温孵育过夜。第 2 天用 PBS 洗涤 2 遍, 10 μl 的枪头划 3 条平行的直线, PBS 洗涤 3 遍后, 用无血清的 DMEM 培养基孵育, 分别于 0 h、24 h 显微镜(40×)下采相, 用 ImageJ 软件计算图片中两条直线的距离, 迁移率=(0 h 所测距离-24 h 所测距离)/0 h 所测距离×100%。实验重复 3 次, 并进行统计学分析。

1.2.8 Transwell 侵袭试验 用无血清的 DMEM 培养基悬浮三组细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10⁶/ml。无血清 DMEM 培养基 1:7 稀释 Matrigel 胶, 取 50 μl 铺于 Transwell 小室的上室内, 将 Transwell 小室放于 24 孔板内, 37 °C 孵育 2 h, Matrigel 胶凝固后, 取 100 μl 细胞悬液铺于 Transwell 小室的上室内, 并将上室内的无血清 DMEM 培养基增加至 200 μl, Transwell 小室的下室内加入 500 μl DMEM 培养基(含 10% FBS 以及 50 ng/ml SDF-1), 5% CO₂、37 °C 恒温孵育 48 h, 取出上室, 95% 酒精固定 30 min, 用棉签拭去上室内的细胞和 Matrigel 胶, PBS 清洗上室内残留的细胞及 Matrigel 胶, 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 洗涤 2 次。用显微镜(100×)观察实验结果, 随机取上、下、左、右、中 5 个视野进行细胞计数, 并进行统计学分析。

1.2.9 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和 *t* 检验, 以 *P* < 0.05

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 携带 CXCR4 基因质粒载体的构建 图 1A 为以人胚胎干细胞总 RNA 为模板合成 CXCR4 mRNA 的 PCR 产物,约为 1 060 bp。环形 TALEN 骨架载体(图 1B 中 3 号条带)用 EcoR I 酶和 Xho I 酶进行双酶切(图 1B 中 1、2 号条带)切割成线性。将合成的 CXCR4 mRNA 及 TALEN 骨架载体的双酶切产物进行连接后,合成的新的质粒转化感受态,生长出的菌落做菌落 PCR(图 1C)并测序,所得结果完全正确。图 1D 为 CXCR4 过表达质粒示意图。

2.2 U251 细胞 CXCR4 mRNA 及蛋白的表达 CXCR4 上调组 U251 细胞 CXCR4 mRNA 相对表达量(0.635±0.041)明显高于空白对照组(0.217±0.034; $P<0.05$)和阴性对照组(0.208±0.026; $P<0.05$),而空白对照组和阴性对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。相比空白对照组及阴性对照组, CXCR4 上调组 U251 细胞

CXCR4 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)。见图 2。

2.3 CXCR4 对 U251 细胞增殖的影响 CXCR4 上调组 U251 细胞在培养 24 h 后增殖能力明显强于空白对照组及阴性对照组($P<0.05$),而空白对照组与阴性对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。详见表 1。

2.4 CXCR4 对 U251 细胞迁移能力的影响 CXCR4 上调组 U251 细胞 24 h 迁移率[(35±4)%]明显高于空白对照组[(21±5)%; $P<0.05$]和阴性对照组[(22±3)%; $P<0.05$],而空白对照组与阴性对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。

2.5 CXCR4 对 U251 细胞侵袭性的影响 CXCR4 上调组 U251 细胞 48 h 穿过 Transwell 小室的细胞数量[(86.78±5.14)个]明显高于空白对照组[(34.58±3.27)个; $P<0.05$]和阴性对照组[(38.72±4.87)个; $P<0.05$],而空白对照组与阴性对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

脑胶质瘤的发生发展是一个多因素参与的复杂过程,基因的突变或异常表达在胶质瘤的恶性行为

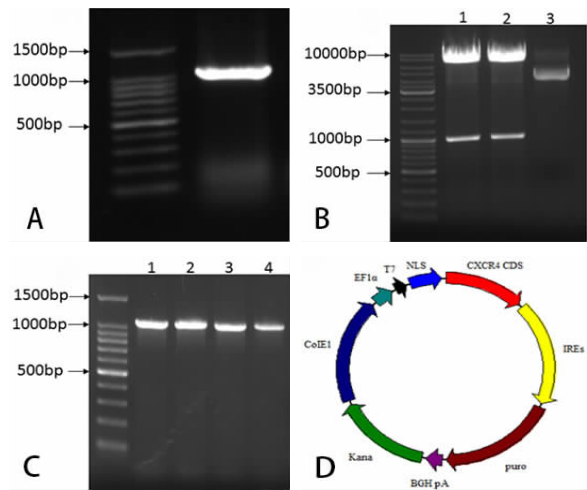


图 1 携带 CXCR4 基因质粒的构建

A. 人胚胎干细胞总 RNA 为模板合成 CXCR4 mRNA 的 PCR 产物;B. 3 号条带为环形 TALEN 骨架载体,1、2 号条带为环形 TALEN 骨架载体被 EcoR I 酶和 Xho I 酶切成线性;C. 携带 CXCR4 基因质粒转化感受态菌落 PCR;D. 携带 CXCR4 基因质粒示意图;CXCR4:CXC 趋化因子-4

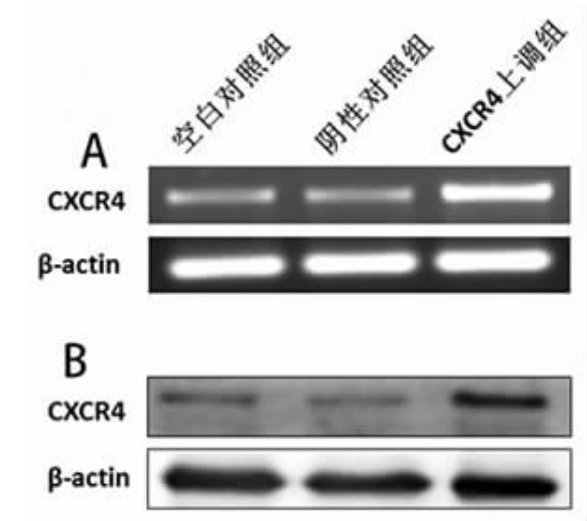


图 2 各组 U251 细胞 CXC 趋化因子-4 mRNA 和蛋白表达电泳图

A. mRNA 电泳图;B. 蛋白电泳图

表 1 MTT 试验检测各组细胞光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	检测时间(d)			
	1	3	5	7
CXCR4 上调组	1.075±0.054	1.653±0.057 [*]	1.981±0.048 [*]	2.252±0.063 [*]
阴性对照组	1.006±0.050	1.372±0.038	1.613±0.057	1.826±0.046
空白对照组	1.005±0.051	1.325±0.048	1.595±0.071	1.781±0.055

注:与阴性对照组和空白对照组相应值比,* $P<0.05$

中起到至关重要的作用^[8]。CXCR4 是恶性肿瘤中最为常见的趋化因子受体, SDF-1/CXCR4 信号轴是介导肿瘤恶性行为的基础^[9]。CXCR4 在很多恶性肿瘤中表达增强, 例如急性淋巴细胞白血病、肺癌、胃癌、乳腺癌等。研究发现 CXCR4 在正常脑组织中低表达, 在胶质瘤表达增强, 且 CXCR4 的表达量越高, 其恶性程度越高^[10]。

复发性高是脑胶质瘤难治性的重要方面。脑肿瘤干细胞是脑胶质瘤不断增殖和术后复发的来源^[11]。上调 U251 细胞 CXCR4 表达可以增强干细胞标志物 Nanog 的表达, 表明 U251 细胞 CXCR4 对肿瘤多能性因子的表达有增强作用^[12]。因此, 上调 CXCR4 的表达可能是脑胶质瘤高复发性的的重要因素。研究表明 SDF-1/CXCR4 可以诱导脑胶质瘤中上皮细胞向间质细胞的转变 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 激活磷酸化细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, PKB/Akt)、Twist 及 N-钙粘素蛋白的表达。在人脑胶质瘤中, SDF-1/CXCR4 信号轴通过激活 ERK 和 PI3K/Akt 信号通路, 加快 EMT 的发展过程^[13]。综上所述, 上调 CXCR4 不仅可以促进 U251 细胞 Nanog 表达, 也增强细胞的增殖、迁移和侵袭能力, CXCR4 可以作为脑胶质瘤的生物学标志物和治疗靶点, 为脑胶质瘤提供新的诊断和预后生物学依据^[14-16]。

【参考文献】

- [1] Kros JM, Mustafa DM, Dekker LJ, *et al.* Circulating glioma biomarkers [J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(3): 343-360.
- [2] Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, *et al.* Molecular biology of gliomas: present and future challenges [J]. *Transl Med UniSa*, 2014, 10: 29-37.
- [3] Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(12): 1575-1584.
- [4] Nomura W, Koseki T, Ohashi N, *et al.* Trivalent ligands for CXCR4 bearing polyproline linkers show specific recognition for cells with increased CXCR4 expression [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(32): 8734-8739.
- [5] Kim KH, Chung WS, Kim Y, *et al.* Transcriptomic analysis reveals wound healing of morus alba root extract by up-regulating keratin filament and CXCL12/CXCR4 signaling [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(8): 1251-1258.
- [6] Ehtesham M, Thompson RC. CXCR4-expressing glial precursor cells demonstrate enhanced migratory tropism for glioma [J]. *J Cancer Ther*, 2012, 3(6): 1086-1091.
- [7] Im KS, Graef AJ, Breen M, *et al.* Interactions between CXCR4 and CXCL12 promote cell migration and invasion of canine hemangiosarcoma [J]. *Vet Comp Oncol*, 2015. Epub ahead of print.
- [8] Panditharatna E, Yaeger K, Kilburn LB, *et al.* Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape [J]. *Cancer Genet*, 2015, 208(7-8): 367-373.
- [9] Nakano I, Garnier D, Minata M, *et al.* Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells--implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 17-26.
- [10] Bian XW, Yang SX, Chen JH, *et al.* Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival [J]. *Neurosurgery*, 2007, 61(3): 570-579.
- [11] Safa AR, Saadatzaheh MR, Cohen-Gadol AA, *et al.* Emerging targets for glioblastoma stem cell therapy [J]. *J Biomed Res*, 2015, 20: 30.
- [12] Jung MJ, Rho JK, Kim YM, *et al.* Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32(2): 209-221.
- [13] Yao C, Li P, Song H, *et al.* CXCL12/CXCR4 axis upregulates twist to induce EMT in human glioblastoma [J]. *Mol Neurobiol*, 2015. Epub ahead of print.
- [14] Gagliardi F, Narayanan A, Reni M, *et al.* The role of CXCR4 in highly malignant human gliomas biology: current knowledge and future directions [J]. *Glia*, 2014, 62(7): 1015-1023.
- [15] Terasaki M, Sugita Y, Arakawa F, *et al.* CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2011, 28(2): 89-97.
- [16] Trautmann F, Cojoc M, Kurth I, *et al.* CXCR4 as biomarker [J]. *Neurosci Biomed Res*, 2014, 90(8): 687-699.

(2015-09-19 收稿, 2015-12-27 修回)