

. 实验研究 .

CREPT对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响及机制

张 刚 董新亚 史航宇

【摘要】目的 探讨肿瘤高表达细胞周期相关蛋白(CREPT)对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响及可能机制。方法 体外培养人胶质瘤细胞株U373、U251、A172、U87-MG、SHG44,并构建过表达或沉默CREPT的U251细胞;免疫印迹法检测蛋白表达水平;CCK-8法检测细胞增殖能力;Transwell实验检测细胞侵袭能力;细胞划痕实验检测细胞迁移能力。结果 U251细胞CREPT蛋白表达水平最高,SHG44细胞最低。沉默CREPT后,U251细胞增殖、侵袭和迁移能力明显下降($P<0.05$),p-Wnt和p- β -catenin蛋白表达水平下降($P<0.05$)。过表达CREPT后,U251细胞增殖、侵袭和迁移能力明显增强($P<0.05$),p-Wnt和p- β -catenin蛋白水平明显升高($P<0.05$)。Wnt/ β -catenin通路抑制剂KYA1797K可逆转过表达CREPT对细胞增殖、侵袭和迁移的影响($P<0.05$)。结论 CREPT可能通过激活Wnt/ β -catenin通路促进胶质瘤U251细胞的增殖、侵袭和迁移。

【关键词】胶质瘤;U251细胞;肿瘤高表达细胞周期相关蛋白;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移

【文章编号】1009-153X(2020)11-0763-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effect of CREPT on proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells

ZHANG Gang, DONG Xin-ya, SHI Hang-yu. Department of Neurosurgery, Children's Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710003, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of tumor overexpression of cell cycle associated protein (CREPT) on the proliferation, invasion and migration of glioma U25 cells and its mechanism. Methods Human glioma cell lines U373, U251, A172, U87-MG, and SHG44 were cultured in vitro. U251 cells with overexpressing or silencing CREPT were constructed. Western blotting was used to detect the protein expression levels of CREPT, p-Wnt and p- β -catenin. CCK-8 method was used to detect the cell proliferation. Transwell cell migration assay was used to detect the cell invasion ability. Cell scratch test was used to detect the cell migration ability. Results The CREPT protein expression level was highest in U251 cells, and lowest in SHG44 cells. After silencing CREPT, the proliferation, invasion and migration abilities of U251 cells decreased significantly ($P<0.05$), and the expression levels of p-Wnt and p- β -catenin protein decreased significantly ($P<0.05$). After overexpression of CREPT, the proliferation, invasion and migration capabilities of U251 cells were enhanced significantly ($P<0.05$), and the protein levels of p-Wnt and p- β -catenin increased significantly ($P<0.05$). Wnt/ β -catenin pathway inhibitor KYA1797K could reverse the effect of overexpression of CREPT on the proliferation, invasion and migration of U251 cells ($P<0.05$). Conclusion CREPT may promote the proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells by activating the Wnt/ β -catenin pathway.

【Key words】 Glioma; U251 cell; Cell cycle-related and expression elevated protein in tumor; Proliferation; Invasion; Migration

胶质瘤是颅内最常见恶性肿瘤,具有进展迅速、病死率高和术后易复发等特点。有研究显示,WHO 分级 I ~ II 级胶质瘤 5 年存活率在 30%~70%,IV 级胶质瘤存活期仅 9~12 个月^[1]。近年来,研究发现多种肿瘤高表达细胞周期相关蛋白(cell cycle-related and expression elevated protein in tumor, CREPT),例如非小细胞肺癌^[2]、结直肠癌^[3]、肾癌^[4]和宫颈癌^[5]等。

而 Wnt/ β -catenin 信号通路在胶质瘤进展中起到重要作用^[6]。本研究探讨 CREPT 在胶质细胞瘤增殖、侵袭和迁移中的作用及其对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人胶质瘤细胞株 U373、U251、A172、U87-MG 和 SHG44 均购于中科院上海细胞库。DMEM 培养基和胎牛血清购于上海蓝季科技发展有限公司;pUM-T-CREPT 质粒和 CREPT-siRNA 质粒由上海吉凯基因科技有限公司设计并提供,lipofectamineTM 2000、SDS-PAGE 凝胶快速制备试

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.11.010
作者单位:710003 西安,西安交通大学附属儿童医院神经外科(张刚、董新亚、史航宇)
通讯作者:史航宇,E-mail:sichuan_yang123@163.com

剂盒和 CCK-8 检测试剂盒均购于日本 Takara 公司; CREPT、Wnt、p-Wnt、 β -catenin、p- β -catenin 和 β -actin 一抗均购于美国 Sigma 公司, Wnt/ β -catenin 抑制剂 KYA1797K 购于美国 Selleck 公司。

1.2 细胞培养 将细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 链霉素的 DMEM 培养基中培养。当细胞融合度达 80% 时进行传代,取 5~15 代、对数生长期、生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.3 沉默和过表达 CREPT 的 U251 细胞株的构建

1.3.1 沉默 CREPT 的 U251 细胞 随机将细胞分为空白对照组 (CON 组)、阴性对照组 (NC-siRNA 组) 和沉默组 (CREPT-siRNA 组),设置 4 个复孔。当细胞融合度达 80% 时,用 Lipofectamine®2000 转染。转染步骤:A 液为 4 μ l 转染试剂+125 μ l 不含胎牛血清培养基;B 液为 5 μ l siRNA+125 μ l 不含胎牛血清培养基,混合 A 和 B,加入转染细胞中,48 h 后提取总 RNA,72 h 后提取蛋白质。

1.3.2 过表达 CREPT 的 U251 细胞 随机将细胞分为空白对照组 (CON 组)、空载体组 (pUM-T 组)、过表达组 (pUM-T-CREPT 组),设置 4 个复孔。当细胞融合度达 80% 时,用 Lipofectamine®2000 转染。转染时 A 液为 4 μ l 转染试剂+2.5 μ g 质粒+125 μ l 不含胎牛血清培养基;B 液为 4 μ l 转染试剂+125 μ l 不含胎牛血清培养基,其余步骤同上。

1.4 KYA1797K 对过表达 CREPT 的 U251 细胞生物学行为的影响 将转染 pUM-T 载体或 pUM-T-CREPT 质粒的 U251 细胞在含有 10 μ mol/L KYA1797K 或等量二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂中培养 24 h。根据干预条件,将细胞分为 Vector+DMSO 组、Vector+KYA1797K 组、CREPT+DMSO 组、CREPT+KYA1797K 组。

1.5 免疫印迹法检测蛋白表达 用 RAPI 裂解液提取总蛋白,10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 [CREPT (1:500)、Wnt (1:1 000)、p-Wnt (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000)、p- β -catenin (1:1 000) 和 β -actin (1:3 000)] 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第二日除去一抗,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后加入二抗 (羊抗兔,1:500) 封闭 1 h。用 ECL 发光仪对蛋白成像,用 Image J 软件分析灰度值。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 取对数生长期细胞,以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ l。待细胞贴壁后,培养 12、24、48、72、96 h,加入 10 μ l CCK-8 溶液培养 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 光密度

值 (optical density, OD)。

1.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期细胞,以 5×10^4 个/孔密度接种于 6 孔板中,当细胞融合度达 90% 时用无菌枪头进行划痕处理。首先吸去原培养基,然后用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,置于无血清培养基中继续培养。培养 0、12、24 h 时用显微镜拍照,细胞迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 培养后划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 用无血清培养液细胞浓度调整至 2×10^5 个/ml,取 0.2 ml 到 Transwell 小室,加入 10% 胎牛血清 0.5 ml 到室下,待贴壁后更换上室培养液,置于细胞培养箱中 24 h 后取出,用无菌棉签拭去小室滤膜上的细胞,PBS 洗涤后用甲醛固定 15 min,HE 染色,光镜下统计膜背面侵袭的细胞数。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 LSD-*t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CREPT 在胶质瘤细胞系中的表达 CREPT 蛋白在 U251 细胞中表达水平最高,在 SHG44 细胞中表达最低,见图 1。

2.2 沉默 CREPT 基因对 U251 细胞生物学行为的影响 CON 组和 NC-siRNA 组 CREPT 蛋白表达水平以及细胞增殖、侵袭和迁移能力均无统计学差异 ($P > 0.05$)。与 NC-siRNA 组比较,CREPT-siRNA 组 CREPT 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$),细胞增殖、侵袭、迁移能力均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 过表达 CREPT 基因对 U251 细胞生物学行为的影响 CON 组和 pUM-T 组 CREPT 蛋白表达水平以及

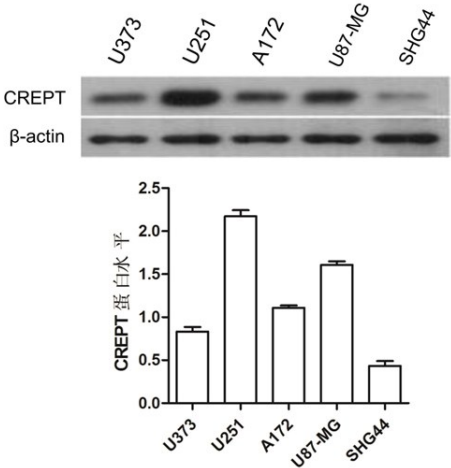


图 1 CREPT 蛋白在胶质瘤细胞系中的表达

细胞增殖、侵袭和迁移能力均无统计学差异($P>0.05$)。与 pUM-T 组比较, pUM-T-CREPT 组组 CREPT 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$), 细胞增殖、侵袭、迁移能力均明显增高($P<0.05$)。见图 3。

2.4 沉默或过表达 CREPT 基因对 U251 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响 与 CREPT-siRNA 组比较, CON 组和 NC-siRNA 组 p-Wnt 和 p- β -catenin 蛋白水平明显增高($P<0.05$)。与 pUM-T-CREPT 组比较, CON 组和 pUM-T 组 p-Wnt 和 p- β -catenin 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图 4。

2.5 KYA1797K 对过表达 CREPT 的 U251 细胞生物学行为的影响 与 CREPT+ DMSO 组比较, CREPT+ KYA1797K 组细胞增殖、侵袭、迁移能力均明显降低($P<0.05$), 见图 5。

3 讨论

CREPT 基因位于人第 20 号染色体长臂 1 区 1 带, 包含 7 个外显子, 可能作为原癌基因在肿瘤发生

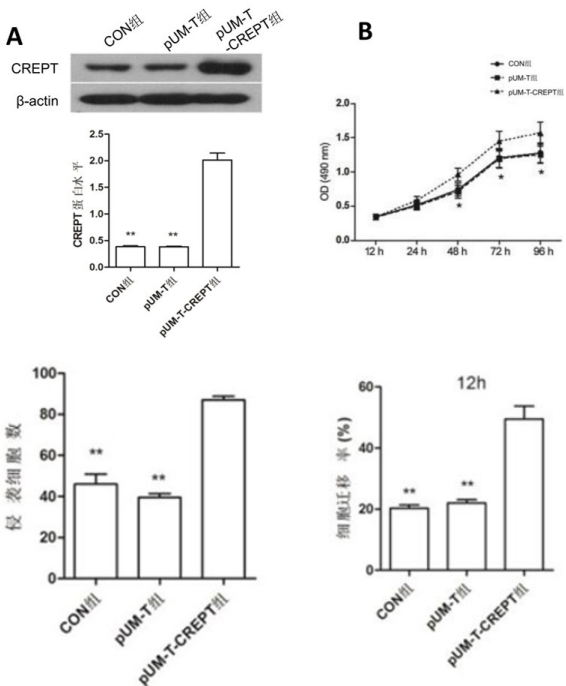


图 3 过表达 CREPT 基因对 U251 细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响

A. 免疫印迹法检测 CREPT 蛋白表达; B. CCK-8 法检测细胞增殖; C. Transwell 实验检测细胞侵袭能力; D. 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; 与 CREPT-siRNA 组比较, ** $P<0.01$

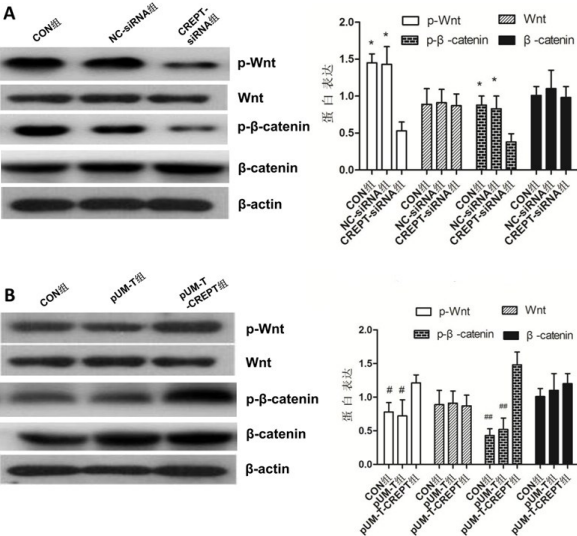
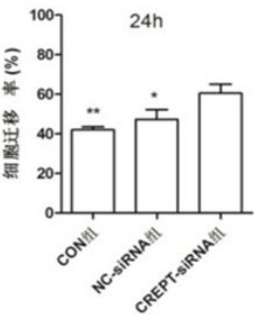


图 4 沉默或过表达 CREPT 基因对 U251 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响

A. 沉默 CREPT 基因对蛋白表达的影响; B. 过表达 CREPT 基因对蛋白表达的影响; 与 CREPT-siRNA 组比较, * $P<0.05$; 与 pUM-T-CREPT 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

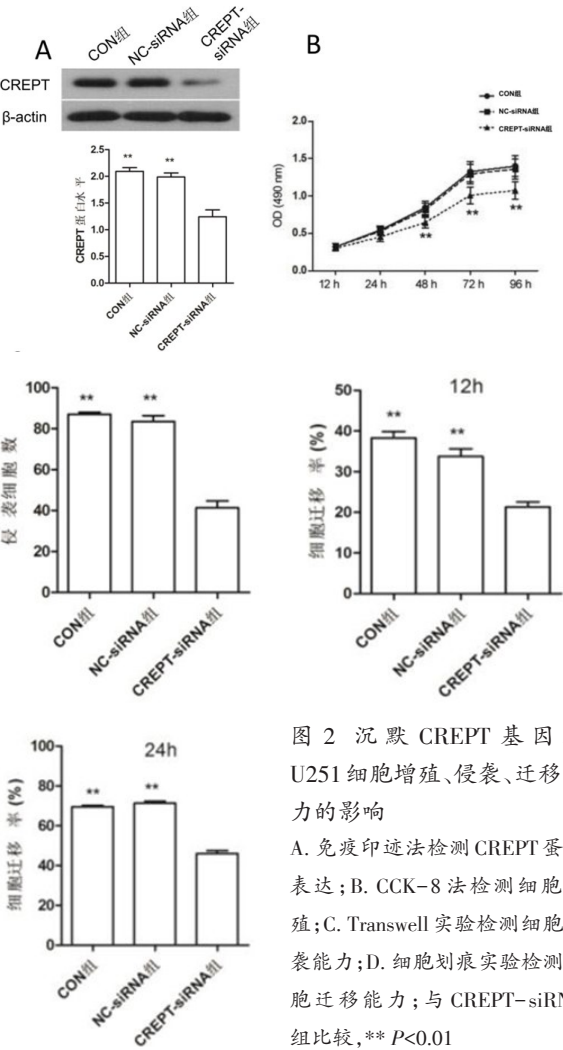


图 2 沉默 CREPT 基因对 U251 细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响

A. 免疫印迹法检测 CREPT 蛋白表达; B. CCK-8 法检测细胞增殖; C. Transwell 实验检测细胞侵袭能力; D. 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; 与 CREPT-siRNA 组比较, ** $P<0.01$

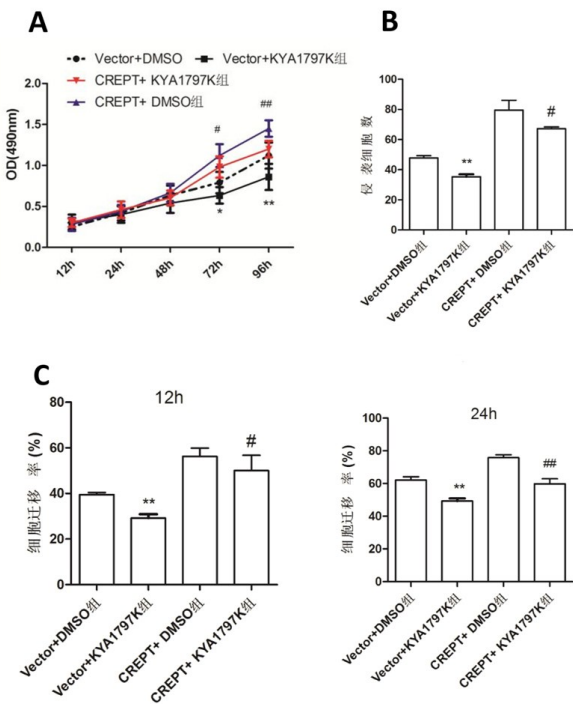


图 5 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 KYA1797K 对过表达 CREPT 的 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响
A. CCK-8 法检测细胞增殖;B. Transwell 实验检测细胞侵袭能力;
C. 细胞划痕实验检测细胞迁移能力;与 Vector+DMSO 组比较,*
 $P<0.05$,** $P<0.01$;与 CREPT+DMSO 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

和发展中起到重要作用^[7]。本研究发现,CREPT 蛋白在 U251 细胞中表达水平最高,在 SHG44 细胞中表达最低;过表达 CREPT 基因可以促进 U251 细胞的增殖、侵袭和迁移,反之,沉默 CREPT 基因可抑制 U251 细胞的增殖、侵袭和迁移。CREPT 基因在肿瘤中的作用机制:参与机体免疫调节^[8];促进细胞周期 G1/S 转换加速;和细胞周期蛋白 D1 的启动子结合,促进其转录^[7];调控 ROS/p53 通路^[9]、RhoA 基因^[10]和 miRNA 等^[11]促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等。

Wnt/ β -catenin 信号通路在发育、细胞转运和细胞凋亡等生理过程中起到重要作用,其异常活化与肿瘤的发生和发展有关^[12]。既往研究证实,Wnt/ β -catenin 信号通路参与胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等^[13],并且与胶质瘤的治疗效果有关^[14]。Wnt/ β -catenin 信号通路是 CREPT 的下游通路^[15,16]。本研究发现,过表达 CREPT 基因可提高 p-Wnt 和 p- β -catenin 蛋白表达水平,沉默 CREPT 基因可下调二者表达;而且,Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 KYA1797K 可逆转过表达 CREPT 对胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

综上所述,CREPT 促进胶质瘤 U251 细胞的增

殖、侵袭和迁移,机制可能是激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

【参考文献】

[1] Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 51: 50-58.

[2] 夏靖华,张志培,文苗苗,等. CREPT 和 CDK4 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(4): 340-345.

[3] Zhang Y, Wang S, Kang W, et al. CREPT facilitates colorectal cancer growth through inducing Wnt/ β -catenin pathway by enhancing p300-mediated β -catenin acetylation [J]. Oncogene, 2018, 37(26): 3485-3500.

[4] Yin H, Cao Q, Zhao H, et al. Expression of CREPT is associated with poor prognosis of patients with renal cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 4789-4797.

[5] Wen N, Bian L, Gong J, et al. Overexpression of cell-cycle related and expression-elevated protein in tumor (CREPT) in malignant cervical cancer [J]. J Int Med Res, 2020, 48(1): 300060519895089.

[6] Cao Y, Shi L, Wang M, et al. ATDC contributes to sustaining the growth and invasion of glioma cells through regulating Wnt/ β -catenin signaling [J]. Chem Biol Interact, 2019, 305: 148-155.

[7] 李晶晶,应杰儿. CREPT 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(9): 1436-1439.

[8] Lu D, Wu Y, Wang Y, et al. CREPT accelerates tumorigenesis by regulating the transcription of cell-cycle-related genes [J]. Cancer Cell, 2012, 21(1): 92-104.

[9] Sun M, Si G, Sun HS, et al. Inhibition of CREPT restrains gastric cancer growth by regulation of cycle arrest, migration and apoptosis via ROS-regulated p53 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(4): 1183-1190.

[10] Liu H, Seynhaeve ALB, Brouwer RWW, et al. CREPT promotes melanoma progression through accelerated proliferation and enhanced migration by RhoA-mediated actin filaments and focal adhesion formation [J]. Cancers (Basel), 2019, 12(1): 1-9.

[11] Liang Z, Feng Q, Xu L, et al. CREPT regulated by miR-138 promotes breast cancer progression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 263-269.

(下转第 770 页)