

. 实验研究 .

STIP1 对胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

娄志刚 袁 波 谭占国

【摘要】目的 探讨下调磷酸化应激诱导蛋白 1(STIP1)表达对胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,及其对 JAK2/STAT3 信号通路的调控作用。方法 免疫印迹法检测体外培养的正常胶质细胞(SVG)和人胶质瘤细胞(U251、U87 和 U37)STIP1 蛋白表达水平。NC-siRNA 或 STIP1-siRNA 质粒转染 U251 细胞,CCK-8 法检测 U251 细胞增殖;Transwell 实验检测 U251 细胞侵袭能力;流式细胞术检测 U251 细胞凋亡率;免疫印迹法检测 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达水平。结果 与正常胶质细胞 SVG 比较,胶质瘤细胞 U251、U87 和 U373 的 STIP1 蛋白表达水平均明显增高( $P<0.05$ )。与 NC-siRNA 组比较,STIP1-siRNA 组 STIP1 蛋白表达水平、细胞增殖活力和细胞侵袭力明显降低( $P<0.05$ ),细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ ),而且,p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。结论 STIP1 在胶质瘤细胞中呈高表达,抑制 STIP1 表达可以抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭、促进凋亡,机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

【关键词】胶质瘤;U251 细胞;磷酸化应激诱导蛋白 1;JAK2/STAT3 信号通路;细胞增殖;细胞侵袭;细胞凋亡;基因沉默  
【文章编号】1009-153X(2020)12-0847-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effects of STIP1 on proliferation, invasion and apoptosis of glioma U251 cells

LOU Zhi-gang, YUAN Bo, TAN Zhan-guo. Department of Neurosurgery, Luohe Central Hospital, Luohe 462000, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of stress-induced phosphoprotein 1 (STIP1) on the proliferation, invasion and apoptosis of glioma U251 cells. Methods Western-blot test was used to detect the expression level of STIP1 protein in normal glioma cells (SVG) and human glioma cell lines U251, U87 and U37. The NC-siRNA STIP1-siRNA plasmids were transfected into U251 cells, respectively. CCK-8 method was used to detect cell proliferation. Transwell test was used to detect cell invasion. Annexin-V-FITC/PI flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western-blot test was used to detect the protein expression levels of STIP1, JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3. Results Compared with normal glioma SVG, the expression levels of STIP1 protein in glioma cell lines U251, U87 and U373 significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the NC-siRNA group, the expression levels of STIP1, p-JAK2 and p-STAT3, and the abilities of cell proliferation activity, cell invasiveness significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the cell apoptosis rate significantly increased ( $P<0.05$ ). Conclusion STIP1 is highly expressed in glioma cells. Inhibiting STIP1 expression can inhibit the proliferation and invasion of glioma cells, promote cell apoptosis, which may be related to inhibit the JAK2 / STAT3 signaling pathway.

【Key words】Glioma; U251 cells; Stress-induced phosphoprotein 1; Cell proliferation; Cell invasion; Cell apoptosis

胶质瘤是颅内常见肿瘤,预后较差,总体生存时间约 14.6 个月,术后 5 年生存率仅 9.8%<sup>[1]</sup>。寻找胶质瘤的新型分子生物学标志物是临床研究重点之一。磷酸化应激诱导蛋白 1(stress-induced phosphoprotein 1, STIP1)是一种真核细胞蛋白质,与细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡等密切相关<sup>[2-4]</sup>。研究发现 JAK2/STAT3 信号通路在胶质瘤的发生和发展中具有重要作用<sup>[5,6]</sup>。本文通过 RNA 干扰技术抑制胶质瘤细胞 STIP1 的表达,观察细胞增殖、侵袭和凋亡的变化,并研究对 JAK2/STAT3 信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及转染 正常胶质细胞 SVG、人胶质瘤细胞 U251、U87 和 U373(中科院上海细胞库)接种于含 10%胎牛血清、1%链霉素的 DMEM 培养基(北京迈瑞达科技有限公司)中培养。待细胞融合度达 80%时进行传代,取 5~15 代、对数生长期且生长状态良好的细胞进行后续实验。

随机将 U251 细胞分为阴性对照组(NC-siRNA 组)和沉默组(STIP1-siRNA 组),设置 4 个复孔。当细胞融合度达 80%时,用 Lipofecta mine 2000[生工生物工程(上海)股份有限公司]转染 NC-siRNA 或 STIP1-siRNA。质粒由上海吉凯基因科技有限公司设计并提供。NC-siRNA 序列 5'-GGAGACTACC

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.12.010  
作者单位:462000 河南,漯河市中心医院神经外科(娄志刚、袁 波、谭占国)

AGAAGGCTTAT- 3'; STIP1- siRNA 序列 5'- GCT ACTCCGAAGCTATTAAGC-3'。以 $2\times 10^5$ 个细胞/孔密度将U251细胞接种于6孔板中。转染前用PBS洗涤细胞2次,加入1.8 ml无血清培养基。分别用100  $\mu$ l无血清培养基稀释10  $\mu$ l转染液和10 ml STIP1-siRNA(或者NC-siRNA),静置5 min后将二者混匀,随后将混合物加入6孔培养板中。转染48 h后提取总蛋白。

1.2 免疫印迹法检测STIP1、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平 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STIP1(1:500)、JAK2(1:1 000)、p-JAK2(1:1 000)、STAT3(1:1 000)、p-STAT3(1:1 000)和 $\beta$ -actin(1:3 000)一抗(武汉艾美捷科技有限公司),4  $^{\circ}$ C过夜孵育;用TBST缓冲液洗涤3次后加入二抗(羊抗兔,1:500)封闭1 h。最后用ECL法显色,FP-UVCI-2100型凝胶成像仪(美国Major Science公司)拍照,用Image J软件分析灰度值。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖 取转染48 h后对数生长期细胞,以 $1\times 10^4$ 个/孔密度接种于96孔板中,每孔100  $\mu$ l。待细胞贴壁后,培养24、48、72、96 h时加入10  $\mu$ l CCK-8溶液[生工生物工程(上海)股份有限公司],培养2 h后用美国Bio-Rad公司生产的680型酶标仪(波长设置为450 nm)检测光密度值(optical density, OD)。设置4个复孔。

1.4 Transwell实验检测细胞侵袭能力 首先在Transwell迁移板[生工生物工程(上海)股份有限公司]上室铺基质胶,随后将两组对数生长期细胞接种于Transwell小室24孔板,以 $2\times 10^5$ 个/ml密度将细胞加入上室(每孔100  $\mu$ l),下室中加入含胎牛血清的培养基(250  $\mu$ l/孔)。待细胞贴壁后更换上室培养液,培养24 h。用无菌棉签拭去小室滤膜上的细胞,甲醛固定15 min,HE染色,光镜(100倍)下统计膜背面侵袭的细胞数。设置4个复孔。

1.5 Annexin-V-FITC/PI流式细胞术检测细胞凋亡 试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。取转染48 h后对数生长期细胞,用500  $\mu$ l预冷1 $\times$ 结合缓冲液将细胞制成 $1\times 10^6$ 个/ml的悬液。随后加入5  $\mu$ l FITC,混匀后孵育10 min。加入2.5  $\mu$ l PI,孵育5 min。最后用FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司)检测细胞凋亡率。设置4个复孔。

1.6 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,用单因素方差分析或 $t$ 检验; $P<0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 STIP1在胶质瘤细胞中的表达 与正常胶质细胞SVG比较,胶质瘤细胞U251、U87和U373的STIP1蛋白表达水平均明显增高( $P<0.05$ ;图1)。

2.2 下调STIP1对U251细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 与NC-siRNA组比较,STIP1-siRNA组STIP1蛋白表达水平、细胞增殖活力和细胞侵袭力均明显降低( $P<0.05$ ),而细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ )。见图2~5。

2.3 下调STIP1对JAK2/STAT3信号通路的影响 与NC-siRNA组比较,STIP1-siRNA组p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ),两组JAK2和STAT3总蛋白表达水平无统计学差异( $P>0.05$ )。见图6。

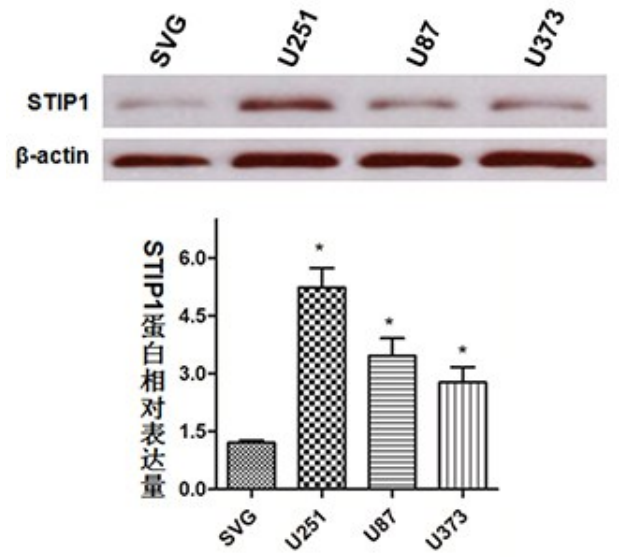


图1 正常胶质细胞和人胶质瘤细胞STIP1蛋白表达水平比较  
与SVG组相比,\* $P<0.05$ ;SVG. 正常胶质细胞;U251、U87、U373. 胶质瘤细胞系

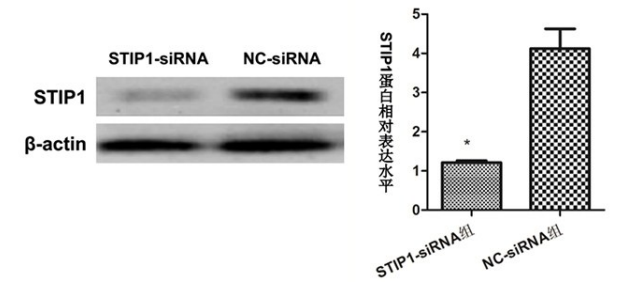


图2 转染siRNA对U251细胞STIP1蛋白表达的影响  
与NC-siRNA组比较,\* $P<0.05$

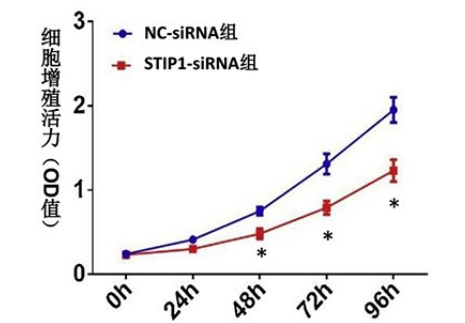


图3 下调STIP1对U251细胞增殖活力的影响与NC-siRNA组比较,\**P*<0.05

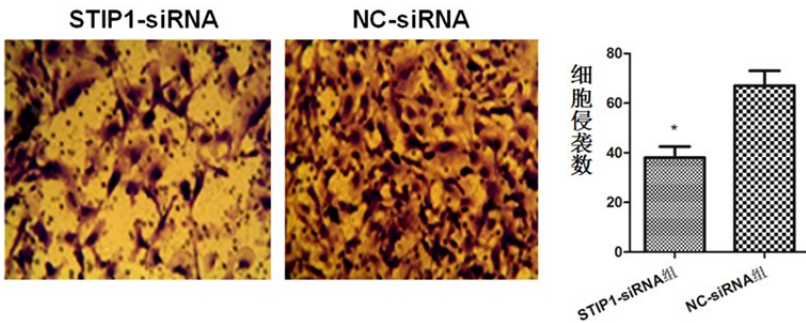


图4 下调STIP1对U251细胞侵袭力的影响与NC-siRNA组比较,\**P*<0.05

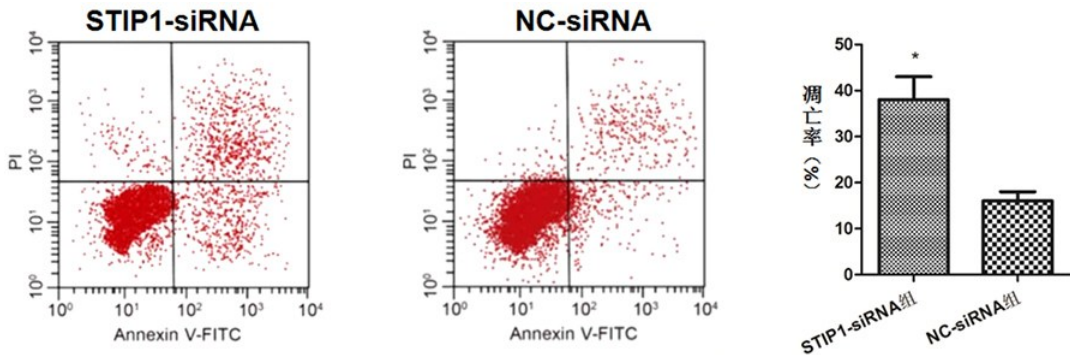


图5 下调STIP1对U251细胞凋亡率的影响与NC-siRNA组比较,\**P*<0.05

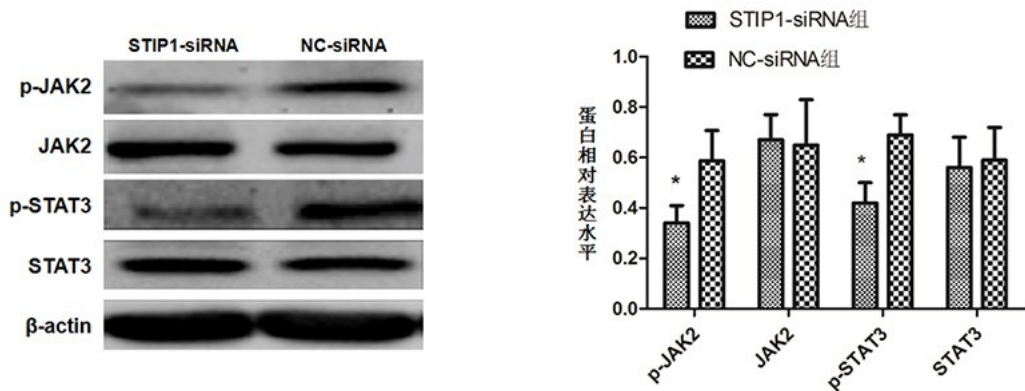


图6 下调STIP1对U251细胞JAK2/STAT3信号通路的影响与NC-siRNA组比较,\**P*<0.05

3 讨论

STIP1 也被称为 HPS70/HSP90 组织蛋白,可以与热休克蛋白家族成员相互作用,参与 RNA 剪接、转录和蛋白折叠<sup>[7]</sup>。STIP1 也是细胞朊病毒蛋白的细胞膜配体,二者集合后在细胞生长和分化中起到重要作用<sup>[7]</sup>。研究证实,STIP1 与肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[2-4]</sup>。本研究发现,与正常胶质细胞 SVG 比较,胶质瘤细胞 U251、U87 和 U373 的 STIP1 蛋白表

达水平明显增高,提示 STIP1 可能参与胶质瘤的发生。由于 U251 细胞 STIP1 蛋白表达水平最高,因此我们选择该细胞进行后续研究;结果显示,沉默 STIP1 基因表达,U251 细胞增殖活力和侵袭力明显降低,而细胞凋亡率明显增高,说明 STIP1 与胶质瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡密切相关,而这些细胞生物学行为又与胶质瘤进展相关,因此 STIP1 可能参与了胶质瘤进展。

STIP1 在肿瘤发生、发展中的作用机制既往少有



报道。有研究发现 STIP1 能通过激活 FAK/AKT/MMP 信号通路促进胰腺癌细胞的侵袭和迁移<sup>[8]</sup>；通过激活 TRAP1/AKT 信号通路促进胶质瘤细胞的增殖,抑制凋亡<sup>[9]</sup>。JAK2/STAT3 是由细胞因子刺激的信号转导通路,参与胶质瘤细胞的增殖、分化、凋亡和免疫调节等多种重要的生物学过程<sup>[5]</sup>。抑制 JAK2/STAT3 信号通路可以诱导胶质瘤细胞自噬并促进凋亡<sup>[10]</sup>。本研究发现,抑制 STIP1 表达,p-JAK2 和 p-STAT3 水平明显降低,说明 STIP1 可能通过 JAK2/STAT3 信号通路影响胶质瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡。与 Guo 等<sup>[4]</sup>报道一致。另外,应激诱导的 STIP1 高表达可以通过 JAK2/STAT3 信号通路促进黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[8]</sup>。

综上所述,STIP1 在胶质瘤细胞中呈高表达,抑制 STIP1 表达可以抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭、促进凋亡,机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

【参考文献】

[1] Fatehi M, Hunt C, Ma R, *et al.* Persistent disparities in survival for patients with glioblastoma [J]. *World Neurosurg.* 2018, 120: e511–e516.

[2] Chao A, Lai CH, Tsai CL, *et al.* Tumor stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) as a prognostic biomarker in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): 1–9.

[3] Krafft U, Tschirdewahn S, Hess J, *et al.* STIP1 tissue expression is associated with survival in chemotherapy-treated

[8] Schiavone S, Neri M, Trabace L, *et al.* The NADPH oxidase NOX2 mediates loss of parvalbumin interneurons in traumatic brain injury: human autaptic immunohistochemical evidence [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8752.

[9] Devyatov AA, Fedorova TN, Stvolinskii SL, *et al.* Assessment of oxidative status of the brain and blood plasma in rats with modeled focal cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 163(2): 195–198.

[10] Swardfager W, Yu D, Scola G, *et al.* Peripheral lipid oxidative stress markers are related to vascular risk factors and subcortical small vessel disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2017,

bladder cancer patients [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 1243–1249.

[4] Guo X, Yan Z, Zhang G, *et al.* STIP1 Regulates proliferation and migration of lung adenocarcinoma through JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10061–10072.

[5] Tang J, Xu J, Zhi Z, *et al.* MiR-876-3p targets KIF20A to block JAK2/STAT3 pathway in glioma [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4957–4966.

[6] Zhong C, Tao B, Chen Y, *et al.* B7- H3 regulates glioma growth and cell invasion through a JAK2/STAT3/sluc-dependent signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2215–2224.

[7] Kituyi SN, Edkins AL. Hop/STIP1 depletion alters nuclear structure via depletion of nuclear structural protein emerlin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1–4): 503–509.

[8] Jing Y, Liang W, Liu J, *et al.* Stress-induced phosphoprotein 1 promotes pancreatic cancer progression through activation of the FAK/AKT/MMP signaling axis [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(11): 152564.

[9] Yin H, Deng Z, Li X, *et al.* Down-regulation of STIP1 regulate apoptosis and invasion of glioma cells via TRAP1/AKT signaling pathway [J]. *Cancer Genet*, 2019, 237: 1–9.

[10] Mukthavaram R, Ouyang X, Saklecha R, *et al.* Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 269–276.

(2020-06-01 收稿, 2020-10-08 修回)

(上接第 846 页)

59: 91–97.

[11] 袁丽伟, 张 晶, 冯宏娟, 等. 维生素 C 和维生素 D3 水平对女性抗氧化能力影响[J]. *中国公共卫生*, 2019, 35(4): 451–454.

[12] 张泽慧, 张 晶, 马 莹, 等. 维生素 C 联合低剂量维生素 D3 对溃疡性结肠炎豚鼠氧化应激的影响[J]. *营养学报*, 2019, 41(1): 53–57.

[13] 师 豪, 黄世龙, 张孟柯, 等. 原花青素联合维生素 E 对动脉粥样硬化大鼠血脂及抗氧化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(4): 889–893.

(2019-05-23 收稿, 2020-02-18 修回)