

. 实验研究 .

Hax-1 对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的作用

陆 正 刘小江 管 诚 管义祥

【摘要】目的 探讨造血干细胞特异性相关结合蛋白-1(Hax-1)对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 选择2018年9月至2019年6月手术切除并得到术后病理证实的胶质瘤组织35例和颅脑损伤内减压术切除的正常脑组织35例,采用qRT-PCR检测Hax-1 mRNA水平;同时检测胶质瘤细胞系(U87、A172、T98及U343)和人星形胶质细胞(NHAs)Hax-1 mRNA水平。使用Lipofectamine 2000法将Hax-1 siRNAs和阴性对照siRNA转染U87细胞构建Hax-1低表达细胞株,将Hax-1高表达质粒和PCDNA3.1空载质粒转染U343细胞构建Hax-1过表达细胞株,使用蛋白印迹法验证转染效果,采用CCK-8法检测细胞增殖,采用Transwell小室实验检测细胞迁移和侵袭,免疫印迹法检测NF-κB信号通路相关蛋白表达水平(NF-κB、CCND1、C-myc、MMP-2、MMP-9)。结果 胶质瘤组织Hax-1 mRNA水平明显高于正常脑组织($P<0.05$);胶质瘤细胞系(U87、A172、T98及U343)Hax-1 mRNA水平明显高于人星形胶质细胞($P<0.05$),其中U87细胞Hax-1 mRNA水平最高,U343细胞最低。U343细胞转染Hax-1过表达质粒后,Hax-1蛋白水平显著增高($P<0.05$),细胞增殖、侵袭、迁移能力均明显增强($P<0.05$),NF-κB p65及IκBα蛋白磷酸化水平以及CCND1、C-Myc、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)。U87细胞转染Hax-1 siRNA后Hax-1蛋白水平显著降低($P<0.05$),细胞增殖、侵袭、迁移能力均明显降低($P<0.05$),NF-κB p65及IκBα蛋白磷酸化水平以及CCND1、C-Myc、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。结论 胶质瘤组织Hax-1呈高表达,明显促进肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移,其机制可能与激活NF-κB信号通路有关。

【关键词】胶质瘤;Hax-1;造血干细胞特异性相关结合蛋白-1;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

【文章编号】1009-153X(2021)02-0101-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effect of Hax-1 on proliferation, migration and invasion of glioma cells

LU Zheng, LIU Xiao-jiang, GUAN Cheng, GUAN Yi-xiang. Department of Neurosurgery, Hai'an Hospital Affiliated to Nantong University, Haian 226600, China

【Abstract】Objective To explore the effect of hematopoietic stem cell-specific binding protein-1 (Hax-1) on the proliferation, migration and invasion of glioma cells. Methods The mRNA levels of Hax-1 were detected by qRT-PCR in glioma tissues obtained from 35 patients with glioma who underwent surgery and in normal brain tissues obtained from 35 patients with traumatic brain injury who underwent decompression from September 2018 to June 2019, and in cultured cells including glioma cell lines (U87, A172, T98 and U343) and human astrocytes (NHAs). The cell line with low-expression of Hax-1 was constructed using Lipofectamine 2000 method to transfect Hax-1 siRNAs and negative control siRNA into U87 cells, and the cell line with high-expression of Hax-1 was constructed using Lipofectamine 2000 method to transfect Hax-1 high-expression plasmid and PCDNA3.1 empty plasmid into U343 cells, and Western blotting was used to verify the transfection efficiency, CCK-8 method was used to detect the cell proliferation, Transwell chamber experiment was used to detect the cell migration and invasion, and Western blotting was used to detect the expression levels of NF-κB signaling pathway related proteins (NF-κB, CCND1, C-myc, MMP-2, MMP-9). Results The level of Hax-1 mRNA in glioma tissue was significantly higher than that of normal brain tissue ($P<0.05$). The levels of Hax-1 mRNA in glioma cell lines (U87, A172, T98 and U343) were significantly higher than that of human astrocytes ($P<0.05$). Among glioma cell lines, the level of Hax-1 mRNA was the highest in U87 cells and the lowest in U343 cells. Up-regulation of Hax-1 expression in U343 cells significantly promoted cell proliferation, invasion, and migration ($P<0.05$), and increased the expression levels of phosphorylation of NF-κB p65 and IκBα, CCND1, C-Myc, MMP-2 and MMP-9 ($P<0.05$). Down-regulation of Hax-1 expression in U87 cells significantly inhibited cell proliferation, invasion, and migration ($P<0.05$), and decreased the expression levels of phosphorylation of NF-κB p65 and IκBα, CCND1, C-Myc, MMP-2 and MMP-9 ($P<0.05$). Conclusions Hax-1 is highly expressed in glioma tissues, which significantly promotes tumor cell proliferation, invasion and migration. The mechanism may be related to the activation of NF-κB signaling pathway.

【Key words】Glioma; Hax-1; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.02.012

基金项目:江苏省卫生健康委基金(Z2019033);南通市科技技术局项目(MSZ18171)

作者单位:226600 江苏海安,南通大学附属海安医院神经外科(陆正、刘小江、管 诚、管义祥)

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,即使采用手术、放疗和化疗等综合治疗,效果仍不理想^[1,2]。深入研究胶质瘤的发病机制,对于寻找新的治疗方式具有重要意义。造血干细胞特异性相关结合

蛋白-1 (hematopoietic cell-specific protein 1-associated protein X-1, Hax-1) 具有抗细胞凋亡作用^[3], 在食管癌^[4]、结直肠癌^[5]及乳腺癌^[6]中呈高表达, 在肿瘤的发生发展中起重要作用^[7,8]。本文探讨 Hax-1 对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 胶质瘤组织 Hax-1 RNA 水平检测 选择 2018 年 9 月至 2019 年 6 月手术切除并得到术后病理证实的胶质瘤组织 35 例和颅脑损伤内减压术切除的正常脑组织 35 例。-80℃超低温冰箱保存备用。采用实时荧光定量 PCR 检测 Hax-1 RNA 水平。本研究经我院伦理委员会批准, 病人知情并签署知情同意书。

1.2 胶质瘤细胞系 Hax-1 RNA 水平检测 人恶性胶质瘤细胞系(U87、A172、T98 及 U343; 美国 ATCC 公司)和人星形胶质细胞(NHAs, 美国 ATCC 公司)使用含 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)及 1% 双抗(美国 Gibco 公司)DMEM 培养基(美国 HyClone 公司)培养。采用实时荧光定量 PCR 检测 Hax-1 RNA 水平。

1.3 Hax-1 过表达与低表达胶质瘤细胞株构建 在 PCDNA3.1 表达载体中插入 Hax-1 序列构建过表达质粒(Hax-1 OE)。使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司), 将 Hax-1 siRNAs(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)和阴性对照 siRNA(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)转染 U87 细胞构建 Hax-1 低表达细胞株, 将 Hax-1 OE(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)和 PCDNA3.1 空载质粒(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)转染 U343 细胞构建 Hax-1 过表达细胞株, 使用蛋白印迹法验证转染效果。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖 将 1×10^4 个转染不同质粒的细胞柱接种于 96 孔板, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液(日本 Dojindo 公司)孵育 24、48、72 h, 多功能酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度。

1.5 Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭情况 使用 8 μ mol/L 孔径 Transwell 小室进行迁移及侵袭实验。在侵袭实验中, 将上室预先涂有基质凝胶(美国 Corning), 后将上室置于 24 孔板中, 下室加入含 10% 胎牛血清的 DMEM, 取 5×10^4 个细胞培养 24 h, 然后取出小室, 经甲醛固定、结晶紫染色, 显微镜计数下室侵入的细胞数。细胞迁移实验, 上室不涂基质胶, 其他处理同侵袭实验。

1.6 qRT-PCR 检测 Hax-1 mRNA 水平 使用 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取组织及细胞总 RNA。随后将 RNA 逆转录(日本 Takara 公

司)为 cDNA, 使用 SYBR Green 试剂盒(日本 Takara 公司)进行荧光定量分析(美国 Applied Biosystems 公司)。 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列: Hax-1 正义链为 5'-CAG-GAGGAGGGATACGTTTCC-3', 反义链为 5'-CCCATATCGCTGAAGATGCTATT-3'; β -actin 正义链为 5'-GATTCCTATGTGGGCGACGA-3', 反义链为 5'-AGGTCTCAAACATGATCTGGGT-3'。

1.7 免疫印迹法测定蛋白表达水平 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 强裂解液(碧云天生物技术有限公司)制备总细胞和组织蛋白裂解物, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。室温封闭 PVDF 膜 1 h, 使用一抗 Hax-1、CCND1、C-myc、MMP-2、MMP-9、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、p-I κ B α 、I κ B α 及 β -actin(均购自美国 Cell Signaling Technology 公司)在 4℃进行孵育过夜, 清洗 PVDF 膜, 对应二抗孵育后滴加 ECL 发光显液(碧云天生物技术有限公司)进行显影。

1.8 统计学分析 用 SPSS 18.0 软件分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织和胶质瘤细胞系 Hax-1 mRNA 表达水平 胶质瘤组织 Hax-1 mRNA 水平明显高于正常脑组织($P < 0.05$, 图 1A)。胶质瘤细胞系(U87、A172、T98 及 U343)Hax-1 mRNA 水平明显高于人星形胶质细胞($P < 0.05$, 图 1B); 其中 U87 细胞 Hax-1 mRNA 水平最高, U343 细胞最低。

2.2 转染效果 U343 细胞转染 Hax-1 过表达质粒后, Hax-1 蛋白水平显著增高($P < 0.05$; 图 2A)。U87 细胞转染 Hax-1 siRNA 后 Hax-1 蛋白水平显著降低($P < 0.05$; 图 2B)。这提示转染成功。

2.3 Hax-1 水平对胶质瘤细胞增殖的影响 U343 细胞过表达 Hax-1 后, 细胞增殖能力显著升高($P < 0.05$; 图 3A); U87 细胞低表达 Hax-1 后, 细胞增殖能力明显降低($P < 0.05$; 图 3B)。

2.4 Hax-1 水平对胶质瘤细胞迁移和侵袭的作用 U343 细胞过表达 Hax-1 后, 迁移和侵袭细胞数目显著增高($P < 0.05$; 图 4A、4B); U87 细胞低表达 Hax-1 后, 迁移和侵袭细胞数目显著降低($P < 0.05$; 图 4C、4D)。

2.5 Hax-1 水平对胶质瘤细胞 NF- κ B 信号通路的影响 U343 细胞过表达 Hax-1 后, NF- κ B p65 及 I κ B α 蛋白磷酸化水平以及 CCND1、C-Myc、MMP-2、

MMP-9 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$);U87 细胞低表达 Hax-1 后,结果与之相反($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

Hax-1 作为一种促生存蛋白^[9],可通过抑制线粒体和内质网应激相关凋亡途径的激活,在细胞保护中发挥关键作用^[10]。越来越多的研究表明 Hax-1 在多种恶性肿瘤中呈高表达,影响肿瘤细胞增殖、迁移和凋亡^[11-13]。Deng 等^[7]发现 Hax-1 在胶质瘤组织和细胞系中过表达,并与胶质瘤临床病理特征和预后相关;而且,促进胶质母细胞瘤细胞增殖,抑制肿瘤细胞凋亡^[8]。也有研究发现 Hax-1 促进肝癌细胞增殖、迁移、侵袭及上皮间质转化^[11, 12],通过抑制 Caspase-9 的活化抑制前列腺癌细胞凋亡^[13]。本研究发现,胶质瘤组织 Hax-1 表达水平明显增高;过表达 Hax-1 显著促进胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭。这提示 Hax-1 可能作为癌基因在胶质瘤中发挥生物

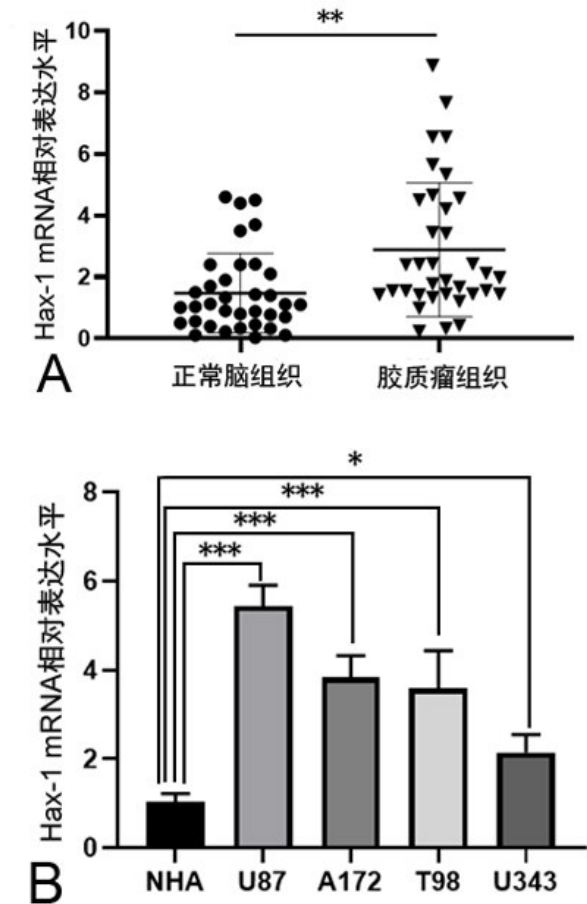


图1 胶质瘤组织和胶质瘤细胞系 Hax-1 mRNA 表达水平
* $P<0.05$, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; Hax-1. 造血干细胞特异性相关结合蛋白-1; NHA. 人星形胶质细胞; U87、A172、T98、U343. 胶质瘤细胞系

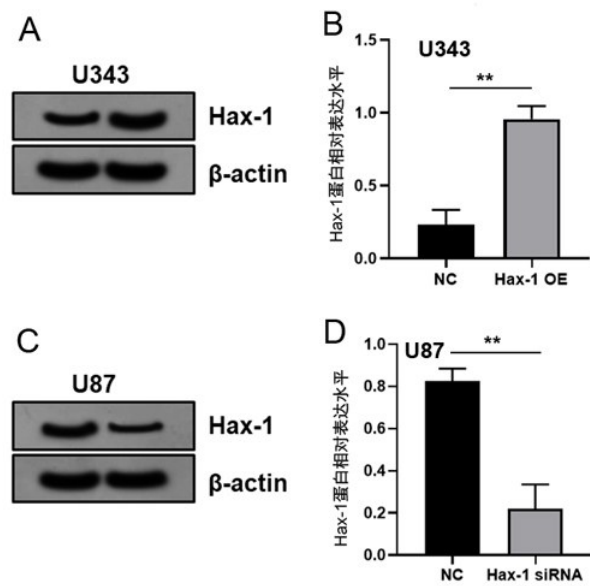


图2 免疫印迹法检测 Hax-1 转染效果
A、B. U343 细胞转染 Hax-1 过表达质粒(Hax-1 OE)与 PCDNA3.1 空载质粒(NC); C、D. U87 细胞转染 Hax-1 干扰 RNA(siRNA)和阴性对照 siRNA(NC); ** $P<0.01$; Hax-1. 造血干细胞特异性相关结合蛋白-1

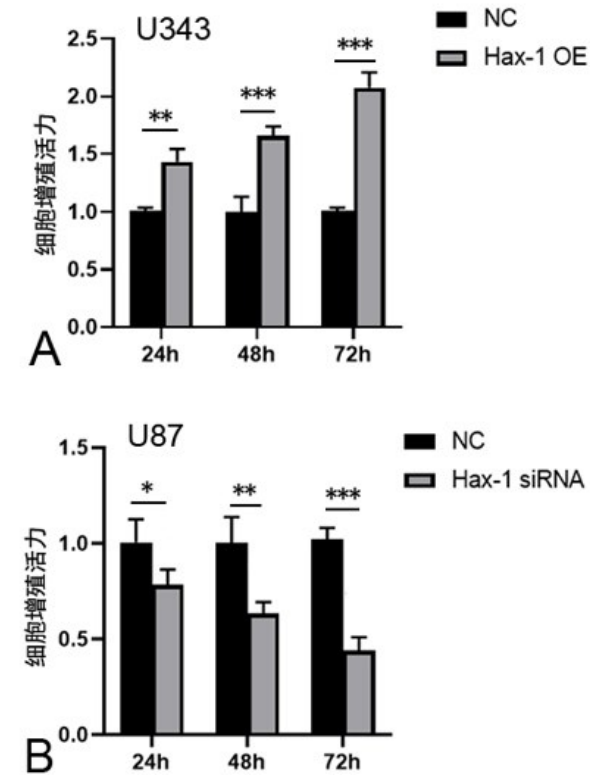


图3 Hax-1 对胶质瘤细胞增殖活力的影响
A. U343 细胞转染 Hax-1 过表达质粒(Hax-1 OE)与 PCDNA3.1 空载质粒(NC); B. U87 细胞转染 Hax-1 干扰 RNA(siRNA)和阴性对照 siRNA(NC); * $P<0.05$, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; Hax-1. 造血干细胞特异性相关结合蛋白-1

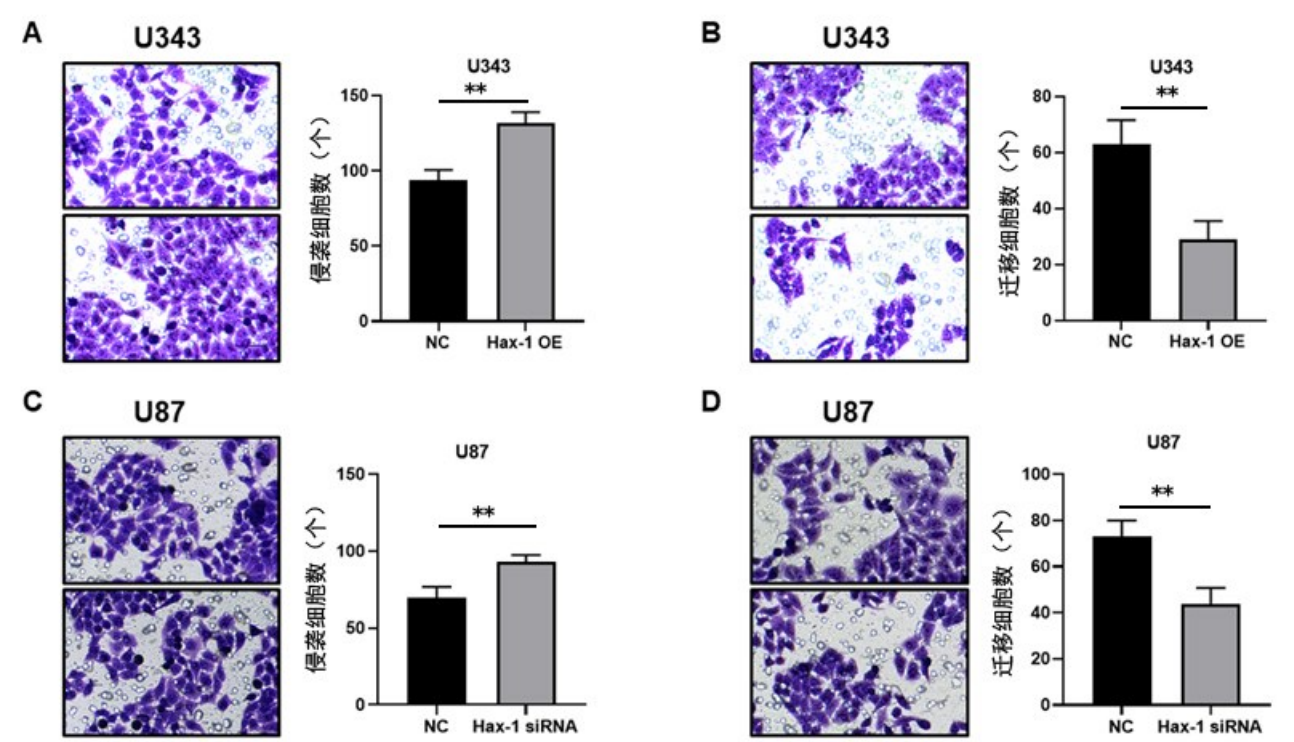


图4 Hax-1对胶质瘤细胞侵袭和迁移的影响
A、B. U343细胞转染Hax-1过表达质粒(Hax-1 OE)与PCDNA3.1空载质粒(NC);C、D. U87细胞转染Hax-1干扰RNA(siRNA)和阴性对照siRNA(NC);* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;Hax-1. 造血干细胞特异性相关结合蛋白-1

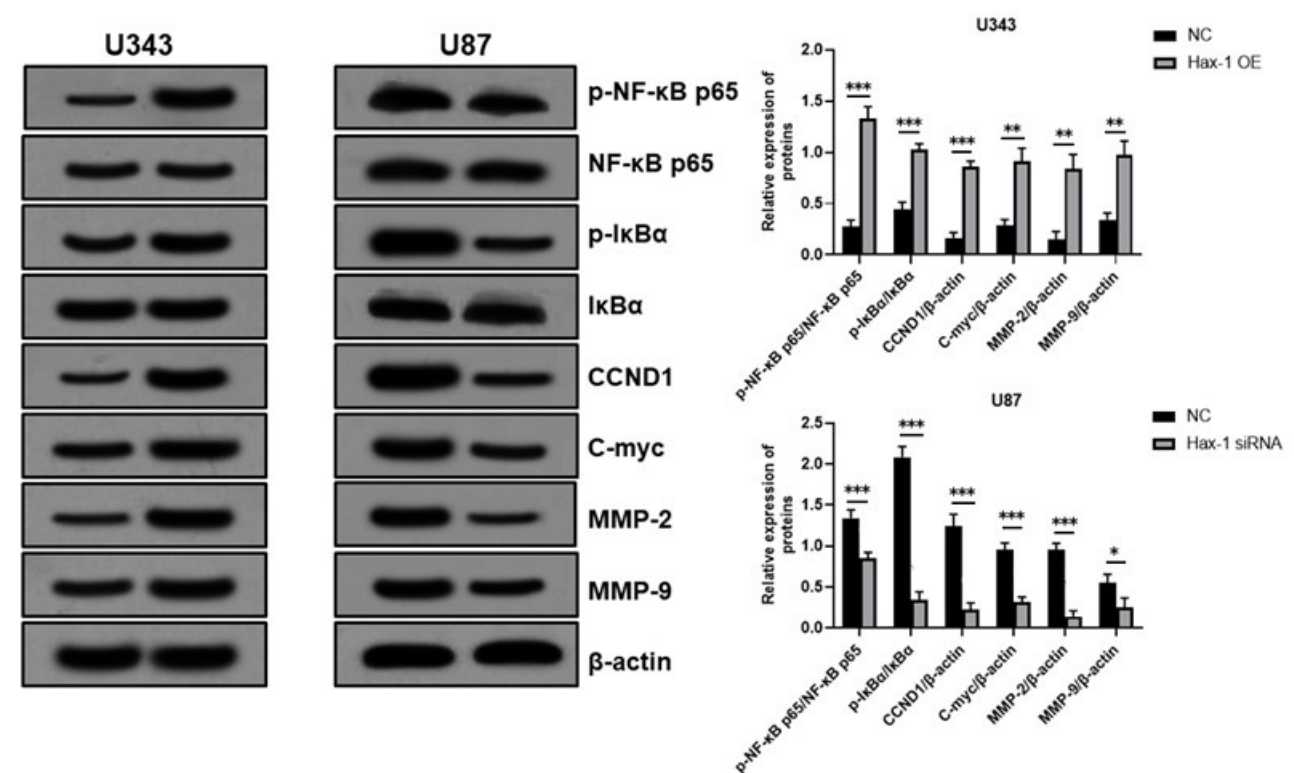


图5 Hax-1水平对胶质瘤细胞NF-κB信号通路的影响
U343细胞转染Hax-1过表达质粒(Hax-1 OE)与PCDNA3.1空载质粒(NC);U87细胞转染Hax-1干扰RNA(siRNA)和阴性对照siRNA(NC);* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;Hax-1. 造血干细胞特异性相关结合蛋白-1

学作用。

本研究发现 Hax-1 可通过激活 NF- κ B 信号通路促进胶质瘤细胞增殖、侵袭、迁移。NF- κ B 信号通路是肿瘤细胞发挥生物学功能的重要调控通路,与肿瘤细胞增殖、凋亡、转移等有关^[14]。细胞增殖相关基因 CCND1 和 C-myc 是 NF- κ B 的下游靶点^[15],迁移和侵袭相关基因 MMP-2 和 MMP-9 同样是 NF- κ B 的下游靶点^[16]。本研究发现 Hax-1 可通过激活 NF- κ B 信号通路,促进这些基因表达。

综上所述,胶质瘤 Hax-1 呈高表达,可能通过激活 NF- κ B 信号通路促进胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

【参考文献】

[1] Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012 [J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17 Suppl 4(Suppl 4): iv1–iv62.

[2] Wang X, Chen JX, Zhou Q, *et al.* Statistical report of central nervous system tumors histologically diagnosed in the Sichuan province of China from 2008 to 2013: a West China Glioma Center Report [J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23 (5 Supplement): 946–953.

[3] Yap SV, Koontz JM, Kontogianni–Konstantopoulos A. HAX-1: a family of apoptotic regulators in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11): 2752–2761.

[4] Li M, Tang Y, Zang W, *et al.* Analysis of HAX-1 gene expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 47.

[5] Trebinska A, Rembiszewska A, Ciosek K, *et al.* HAX-1 overexpression, splicing and cellular localization in tumors [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 76.

[6] Vafiadaki E, Sanoudou D, Arvanitis DA, *et al.* Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function [J]. *J Mol Biol*, 2007, 367(1): 65–79.

[7] Deng X, Song L, Wei Y, *et al.* Analysis of the expression of HAX-1 gene in human glioma [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 657: 189–193.

[8] Deng X, Song L, Zhao W, *et al.* HAX-1 Protects glioblastoma cells from apoptosis through the Akt1 pathway [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 420.

[9] Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, *et al.* HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease) [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(1): 86–92.

[10] Lam CK, Zhao W, Cai W, *et al.* Novel role of HAX-1 in ischemic injury protection involvement of heat shock protein 90 [J]. *Circ Res*, 2013, 112(1): 79–89.

[11] Wang Y, Huo X, Cao Z, *et al.* HAX-1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7): 8099–8106.

[12] Hu YL, Feng Y, Ma P, *et al.* HAX-1 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through the induction of epithelial–mesenchymal transition via the NF- κ B pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 381(1): 66–76.

[13] Yan J, Ma C, Cheng J, *et al.* HAX-1 inhibits apoptosis in prostate cancer through the suppression of caspase-9 activation [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5): 2776–2781.

[14] Verzella D, Pescatore A, Capece D, *et al.* Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 210.

[15] Gupta SC, Kim JH, Prasad S, *et al.* Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(3): 405–434.

[16] Li X, Bao C, Ma Z, *et al.* Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- κ B/MMP-2/-9 pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 294: 44–50.

(2020-12-28 收稿, 2021-01-18 修回)