

. 实验研究 .

过表达 TBX2 对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响

刘小江 管 诚 李 军 管义祥

【摘要】目的 探讨 TBX2 表达对胶质瘤细胞增殖、侵袭的影响。方法 采用 RT-qPCR 和免疫印迹法检测 53 例胶质瘤组织和瘤旁组织 TBX2mRNA 和蛋白表达水平。体外培养胶质瘤细胞(U251、U87 和 SHG-44)和正常星型胶质细胞(HA1800),采用 RT-qPCR 和免疫印迹法检测细胞 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平。构建 TBX2 过表达或低表达 U251 细胞株,分别采用 WST-1 法检测胶质瘤细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力。结果 胶质瘤组织 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平明显高于瘤旁组织($P<0.05$),而且,高级别胶质瘤 TBX2 表达水平显著高于低级别胶质瘤($P<0.05$)。相比于人正常星型胶质细胞系 HA1800,胶质瘤细胞系 U251、U87、SHG-44 细胞 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平平均明显增高($P<0.05$);而且,U251 细胞 TBX2 表达水平显著高于 U87 和 SHG-44 细胞($P<0.05$),因此使用 U251 细胞进行后续实验。过表达 TBX2 显著增加 U251 细胞增殖和侵袭能力($P<0.05$),低表达 TBX2 显著抑制 U251 细胞增殖和侵袭能力($P<0.05$)。结论 胶质瘤 TBX2 呈高表达,与胶质瘤增殖、侵袭能力有关。

【关键词】胶质瘤;TBX2;U251 细胞;细胞增殖;细胞侵袭;基因表达

【文章编号】1009-153X(2022)04-0283-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effect of over-expression of TBX2 on proliferation and invasion of glioma cells

LIU Xiao-jiang, GUAN Cheng, LI Jun, GUAN Yi-xiang. Department of Neurosurgery, Hai'an People's Hospital, Hai'an 226600, China

【Abstract】Objective To explore the effect of TBX2 over-expression on the proliferation and invasion of glioma cells. Methods The expression levels of TBX2 mRNA and protein in glioma tissues and paratumoral tissues of 53 glioma patients were determined by RT-qPCR and immunoblotting, respectively. Glioma cells (U251, U87 and SHG-44) and normal astroglial cells (HA1800) were cultured in vitro, and the expression levels of TBX2 mRNA and protein were determined by RT-qPCR and immunoblotting, respectively. TBX2 overexpressed or hypoxpressed U251 cell lines were constructed to detect the abilities of invasion and proliferation of glioma cell by the WST-1 assay and Transwell assay, respectively. Results The expression levels of TBX2 mRNA and protein were significantly higher in glioma tissues than those in the paratumoral tissues ($P<0.05$), and the expression level of TBX2 was significantly higher in high-grade glioma tissues than those in low-grade glioma tissues ($P<0.05$). Compared with human normal astroglial cell line HA1800, the expression levels of TBX2 mRNA and protein significantly increased in glioma cell lines U251, U87 and SHG-44 cells ($P<0.05$). TBX2 expression in U251 cells was significantly higher than those in U87 and SHG-44 cells ($P<0.05$), so U251 cells were used for subsequent experiments. Overexpression of TBX2 significantly increased the proliferation and invasion of U251 cells ($P<0.05$), and low-overexpression of TBX2 significantly inhibited the proliferation and invasion of U251 cells ($P<0.05$). Conclusions High expression of TBX2 in glioma tissues is related to the proliferation and invasion abilities of glioma.

【Key words】Glioma; TBX2; Cell proliferation; Cell invasion; Gene expression

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,病死率呈逐年增加趋势^[1,2]。尽管在过去的几十年中,胶质瘤的诊治取得了重大进展,但其临床结局仍然不理想,中位生存期约为 14 个月^[3]。目前,胶质瘤的标准治疗方法是手术辅助替莫唑胺治疗和放疗

^[4],但是 5 年总生存率不超过 35%^[5]。因此,研究者开始逐步开发分子靶向疗法、免疫疗法、基因疗法和新型药物递送技术。相比于其他肿瘤,目前仍缺乏对胶质瘤诊疗的有效分子靶标^[6,7]。因此,探讨胶质瘤肿瘤诊断和治疗的分子靶标和其分子机制具有重要意义。

TBX2 是保守化转录因子 T-box 家族的成员之一^[8,9]。研究发现 TBX2 在多种恶性肿瘤中呈高表达,在肿瘤演变的过程中发挥作用^[10-13]。本文探讨 TBX2 在胶质瘤中的表达,及其过表达对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响,从而为胶质瘤的诊治、预后评估等提供参考。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.04.012
基金项目:江苏省卫生健康委科研立项(Z2019033);南通市卫生和计划委员会科研立项(WKZD2018003);江苏省南通市市级科技计划(YYZ17006);江苏省南通市市级科技计划(GJZ17040)
作者单位:226600 江苏,海安市人民医院神经外科(刘小江、管 诚、李 军、管义祥)

1 材料与方法

1.1 组织标本来源 收集 2017 年 7 月~2019 年 6 月手术切除并经术后病理证实的胶质瘤样本以及对应的瘤旁组织(术前静脉注射荧光素钠,术中使用荧光显微镜观察肿瘤的颜色跟质地以判断肿瘤的边界,距肿瘤组织 1 cm 以上认为是瘤旁组织)各 53 例,其中男 30 例,女 23 例;年龄 35~71 岁。WHO 分 1~2 级 24 例,3~4 级 29 例。所有病人术前均未行放疗或化疗。本研究已经我院伦理委员会审核通过。

1.2 细胞培养 胶质瘤细胞 U251、U87、SHG-44(中国科学院细胞库)使用含 10% 胎牛血清(美国 Invitrogen 公司)的 DMEM(美国 Invitrogen 公司)培养,人正常星型胶质细胞(HA1800;中国科学院细胞库)使用 RPMI 1640(美国 Invitrogen 公司)培养,待细胞融合达到 80%~90%时,进行传代以备后续实验使用。

1.3 细胞转染 构建过表达 TBX2(TBX2-OE)及干扰 TBX2(TBX2-sh)质粒,分别用空载体(negative control, NC)-OE 和 NC-sh 作为对照。取对数生长期 U251 细胞,用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)进行转染,48 h 后检测转染效率。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 使用 Trizol 试剂(上海通蔚生物有限公司)提取组织以及细胞总 mRNA,严格按照逆转录试剂盒说明书(上海双赢生物科技有限公司)将 mRNA 逆转录成 cDNA。使用 SYBR Green 荧光试剂盒(上海双赢生物科技有限公司)扩增目的基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法量化,以 GAPDH 为内参。引物序列:TBX2 正义链 5'-CACTCGCTTGACCGAACCC-3',反义链 5'-CGCACTGTCTGTCTGCACCA-3'; GAPDH 正义链 5'-CTGCCAGAACATCATCCCT-3',反义链 5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'。

1.5 免疫印迹法检测蛋白表达 使用预冷磷酸盐缓冲液洗涤组织及细胞 3 次,用 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)冰上裂解 30 min,4 ℃、12 000 g 离心 20 min 留取上层蛋白清液。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离后,转移至 PVDF 膜。使用封闭液室温封闭 1 h。4 ℃条件下与一抗(上海碧云天生物技术有限公司)孵育过夜,用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,加入对应二抗(上海碧云天生物技术有限公司)在室温下孵育 1 h。使用 ECL 发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)显像。 β -actin 用作内参,用 Image J 测定蛋白条带灰度。

1.6 细胞增殖的测定及细胞生长曲线的绘制 将稳

定转染的 U251 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,根据试剂盒说明,0、24、48、72、96 和 120 h 进行 WST-1 分析(上海碧云天生物技术有限公司)。弃除培养基后使用 PBS 冲洗细胞 3 次,向各孔中加入含 10 μ l WST-1 及 90 μ l 正常培养基溶液的混合培养液,37 ℃孵育 30 min,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度,并绘制细胞生长曲线。

1.7 细胞侵袭的测定 将稳定转染的 U251 细胞以 1×10^5 个/孔接种于涂有基质胶的 Transwell 聚碳酸酯滤膜上,加入 200 μ l 无血清的培养基;下层小室加入含 10% 胎牛血清的正常培养基,将细胞放回培养箱继续培养 48 h。在室温下,依次用 3.7% 甲醛固定细胞 15 min,用含有 0.1% 结晶紫 10% 乙醇溶液染色 30 min。除去多余染液,在光学显微镜下观察,400 倍视野下计数侵袭细胞数。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织 TBX2 表达变化 相比于瘤旁组织,胶质瘤组织 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平均明显增加($P < 0.05$);并且,高级别胶质瘤组织 TBX2 mRNA 和蛋白水平均显著高于低级别胶质瘤($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 胶质瘤细胞系 TBX2 的表达变化 相比于人正常星型胶质细胞系 HA1800,胶质瘤细胞系 U251、U87、SHG-44 细胞 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平均明显增高($P < 0.05$)。此外,U251 细胞 TBX2 表达水平显著高于 U87 和 SHG-44 细胞($P < 0.05$),因此使用 U251 细胞进行后续实验。

2.3 细胞转染质粒的有效性验证 相比于 NC-OE 组,TBX2-OE 组 U251 细胞 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加($P < 0.05$)。与 NC-sh 组比较,TBX2-sh 组 U251 细胞 TBX2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。

2.4 TBX2 表达水平与胶质瘤 U251 细胞增殖及侵袭的关系 过表达 TBX2 显著增加 U251 细胞增殖和侵袭能力($P < 0.05$);低表达 TBX2 显著抑制 U251 细胞增殖和侵袭能力($P < 0.05$)。见图 3

3 讨论

本文结果显示胶质瘤组织 TBX2 的表达水平显著增加,尤其是高级别胶质瘤。这提示 TBX2 可能与

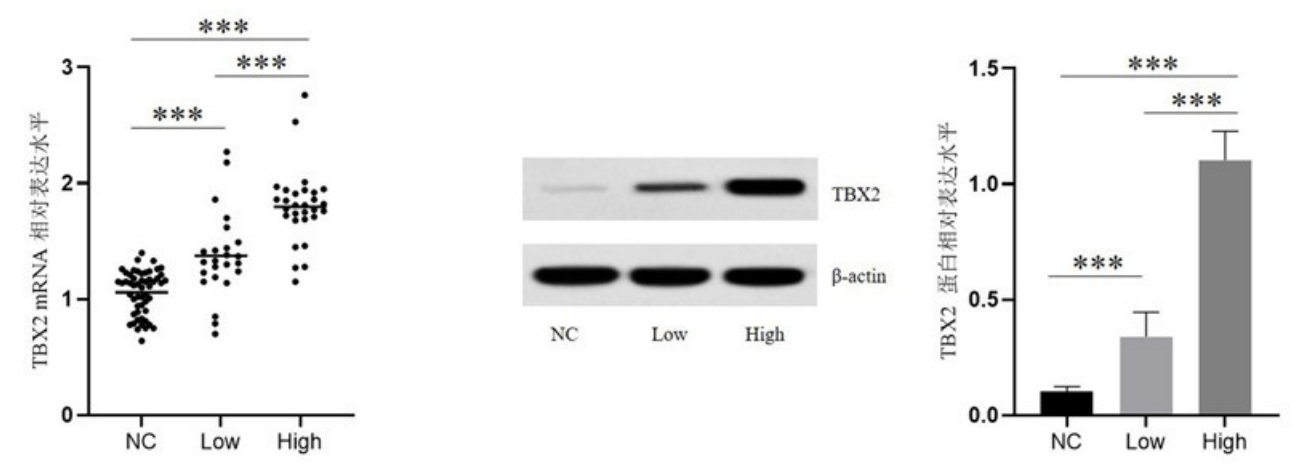


图1 胶质瘤组织TBX2 mRNA和蛋白表达水平
*** $P<0.001$; NC. 瘤旁组织; Low. 低级别胶质瘤; High. 高级别胶质瘤

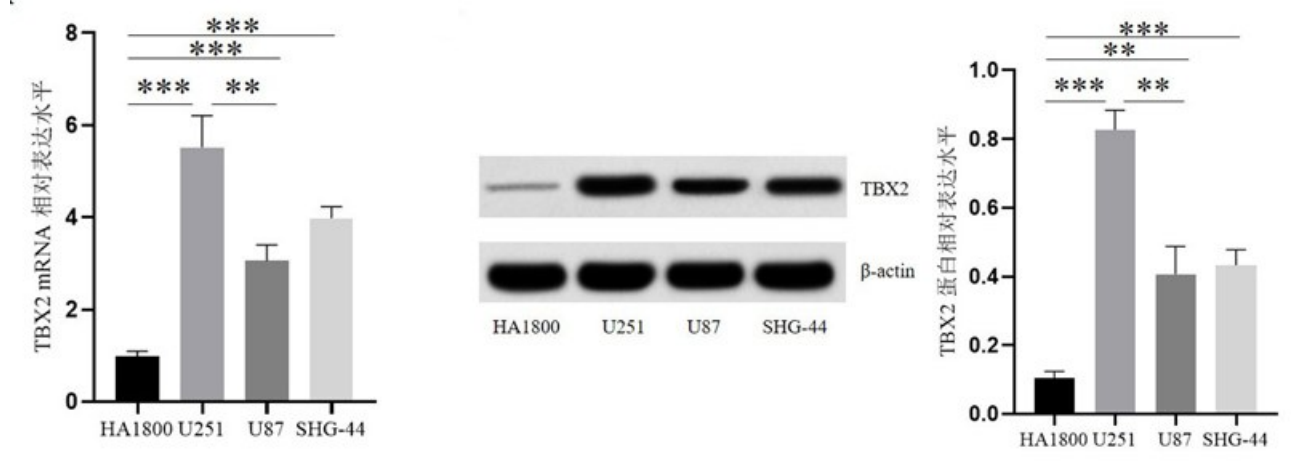


图2 胶质瘤细胞系TBX2 mRNA和蛋白表达水平
** $P<0.01$; *** $P<0.001$

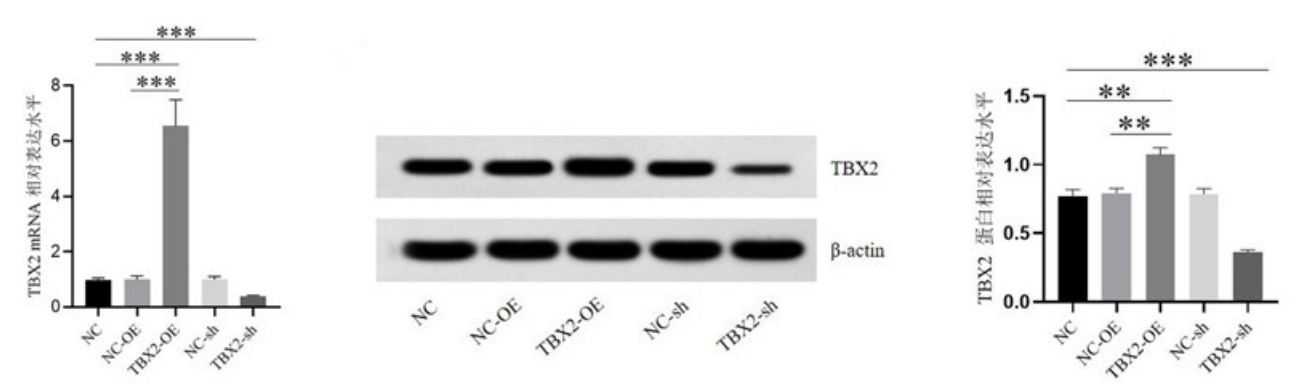


图3 细胞转染质粒的有效性验证

** $P<0.01$; *** $P<0.001$; TBX2-OE. TBX2 过表达质粒; TBX2-sh. TBX2 低表达质粒; TBX2-OE. TBX2 过表达质粒空载体; NC-sh. TBX2 低表达质粒空载体

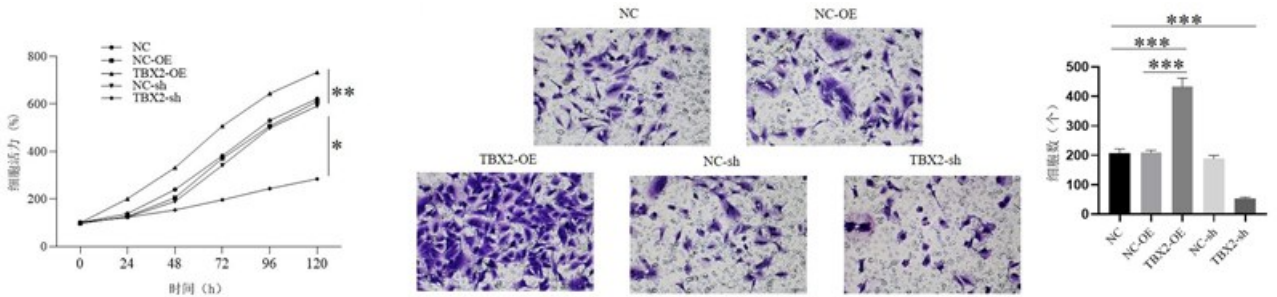


图4 TBX2表达与胶质瘤U251细胞增殖和侵袭的关系

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; TBX2-OE. TBX2 过表达质粒; TBX2-sh. TBX2 低表达质粒; TBX2-OE. TBX2 过表达质粒空载体; NC-sh. TBX2 低表达质粒空载体

胶质瘤的发生发展相关。Pan 等^[14]发现胶质母细胞瘤 TBX2 表达上调,明显降低 E-钙粘蛋白的表达、增加波形蛋白的表达,增强细胞侵袭能力。本文结果显示 TBX2 过表达明显促进胶质瘤细胞增殖及侵袭。目前, TBX2 发挥促肿瘤作用的信号通路尚不清楚。Liu 等^[15]发现 TBX2 可通过 ERK 信号通路增强胃癌细胞的上皮间充质转化和侵袭能力。另外, TGF- β 1 信号通路可能与 TBX2 促进肿瘤细胞增殖和迁移有关^[16]。

总之,胶质瘤 TBX2 表达上调,过表达 TBX2 可显著增强胶质瘤细胞的增殖、侵袭能力。

【参考文献】

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[3] Ho VKY, Reijneveld JC, Enting RH, *et al.* Changing incidence and improved survival of gliomas [J]. Eur J Cancer, 2014, 50(13): 2309-2318.

[4] Wen PY, Reardon DA. Neuro-oncology in 2015: progress in glioma diagnosis, classification and treatment [J]. Nature Rev Neurol, 2016, 12(2): 69-70.

[5] Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults [J]. Lancet, 2018, 392(10145): 432-446.

[6] Zang L, Kondengaden SM, Che F, *et al.* Potential epigenetic-based therapeutic targets for glioma [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 408.

[7] Shih JC. Monoamine oxidase isoenzymes: genes, functions and targets for behavior and cancer therapy [J]. J Neural Transm, 2018, 125(11): 1553-1566.

[8] Papaioannou VE. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer [J]. Development, 2014, 141(20): 3819-3833.

[9] Papaioannou VE. T-box genes in development: from hydra to humans [J]. Int Rev Cytol, 2001, 207: 1-70.

[10] Abrahams A, Parker MI, Prince S. The T-box transcription factor Tbx2: its role in development and possible implication in cancer [J]. IUBMB life, 2010, 62(2): 92-102.

[11] Wansleben S, Peres J, Hare S, *et al.* T-box transcription factors in cancer biology [J]. Biochim biophys Acta, 2014, 1846(2): 380-391.

[12] Crawford NT, McIntyre AJ, McCormick A, *et al.* TBX2 interacts with heterochromatin protein 1 to recruit a novel repression complex to EGR1-targeted promoters to drive the proliferation of breast cancer cells [J]. Oncogene, 2019, 38(31): 5971-5986.

[13] Yi F, Du J, Ni W, *et al.* Tbx2 confers poor prognosis in glioblastoma and promotes temozolomide resistance with change of mitochondrial dynamics [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1059-1069.

[14] Pan CM, Chan KH, Chen CH, *et al.* MicroRNA-7 targets T-Box 2 to inhibit epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in glioblastoma multiforme [J]. Cancer Lett, 2020, 493: 133-142.

[15] Liu X, Miao Z, Wang Z, *et al.* TBX2 overexpression promotes proliferation and invasion through epithelial-mesenchymal transition and ERK signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 723-729.

[16] Li J, Ballim D, Rodriguez M, *et al.* The anti-proliferative function of the TGF- β 1 signaling pathway involves the repression of the oncogenic TBX2 by its homologue TBX3 [J]. J Biol Chem, 2014, 289(51): 35633-35643.

(2021-01-10 收稿, 2022-03-21 修回)