

. 实验研究 .

白藜芦醇通过下调 CD44 表达抑制胶质瘤 U251 细胞增殖和侵袭

张 亮 王凤鹿 李小强 王林林 陈 鹏 蒋小兵 赵海康

【摘要】目的 探讨白藜芦醇对脑胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响及可能的分子调控机制。方法 体外培养胶质瘤 U251 细胞，分别用浓度为 0 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L 白藜芦醇继续培养 48 h，参考 Lipofectamine2000TM 说明书将 pcDNA3.1/CD44(CD44 过表达)、pcDNA3.1(过表达对照)等质粒转染胶质瘤 U251 细胞并培养 24 h 进行后续实验。利用 CCK-8 法检测细胞增殖，利用 Transwell 实验检测细胞侵袭；RT-PCR 和免疫印迹法检测细胞 CD44、CyclinD1、CDK4、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 和蛋白表达。结果 白藜芦醇明显抑制 U251 细胞的增殖和侵袭能力( $P<0.05$ )，而且呈浓度依赖性( $P<0.05$ )；所以，用 150 μmol/L 白藜芦醇进行 CD44 干预实验。白藜芦醇明显抑制 U251 细胞 CD44、CyclinD1、CDK4、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 和蛋白表达( $P<0.05$ )，而且呈浓度依赖性( $P<0.05$ )。CD44 过表达明显抑制白藜芦醇对胶质瘤 U251 细胞增殖和侵袭的抑制作用( $P<0.05$ )。结论 白藜芦醇抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭，其机制与下调 CD44 的表达有关。

【关键词】胶质瘤；白藜芦醇；U251 细胞；细胞增殖；细胞侵袭；CD44

【文章编号】1009-153X(2022)08-0667-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Resveratrol inhibits the proliferation and invasion of glioma U251 cells through down-regulation of CD44

ZHANG Liang, WANG Feng-lu, LI Xiao-qiang, WANG Lin-lin, CHEN Peng, JIANG Xiao-bing, ZHAO Hai-kang. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, China

【Abstract】Objective To investigate the effect and possible molecular mechanism of resveratrol on the proliferation and invasion of glioma cells. Methods Glioma U251 cells were cultured in vitro, and were further cultured with resveratrol at concentrations of 0 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L, and 150 μmol/L for 48 h. The plasmids of pcDNA3.1/CD44 (CD44 overexpression) and pcDNA3.1 (overexpression control) were transfected into glioma U251 cells under culture with resveratrol at concentration of 150 μmol/L. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and cell invasion was detected by Transwell assay. The expressions of mRNA and protein of CD44, CyclinD1, CDK4, MMP2 and MMP9 were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Results Resveratrol significantly inhibited the proliferation and invasion of U251 cells in a concentration-dependent manner ( $P<0.05$ ). Resveratrol significantly inhibited the mRNA and protein expressions of CD44, CyclinD1, CDK4, MMP2 and MMP9 in U251 cells in a concentration-dependent manner ( $P<0.05$ ). Overexpression of CD44 significantly inhibited the inhibitory effect of resveratrol on the proliferation and invasion of glioma U251 cells ( $P<0.05$ ). Conclusions Resveratrol inhibits the proliferation and invasion of glioma cells, which is related to the down-regulation of CD44 expression.

【Key words】Glioma; Resveratrol; U251 cell; Cell Proliferation; Cell invasion; CD44

胶质瘤是发病率非常高的原发性脑肿瘤，恶性胶质瘤占一半以上<sup>[1]</sup>，预后非常差，即使选择手术进行最大限度切除及联合放化疗治疗，仍难以提高恶性胶质瘤的预后<sup>[2]</sup>，中位生存期只有 15 个月左右<sup>[3]</sup>。白藜芦醇是一种天然多酚，对肿瘤细胞的发生、发展具有显著的抑制作用<sup>[4]</sup>。CD44 是一种跨膜蛋白，定位于细胞膜，参与细胞迁移、细胞粘附以及细胞间相

互作用等，其表达异常与肿瘤恶化具有密切联系<sup>[5]</sup>。本文探讨白藜芦醇对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响及 CD44 在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料 U251 细胞购自上海一研生物科技有限公司；胎牛血清和 RPMI1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司；白藜芦醇购自上海源叶生物科技有限公司；Lipofectamine2000TM 脂质体购自美国 Invitrogen 公司；RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司；广州锐博生物科技有限公司合成引物；Transwell 小室购自美国 Coming-Costar 公司；细胞计

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.08.013  
作者单位：710038 西安，西安医学院第二附属医院神经外科（张亮、王凤鹿、李小强、王林林、陈 鹏、蒋小兵、赵海康）  
通讯作者：赵海康，E-mail: zby0910@163.com

数试剂盒(CCK-8)购自日本Dojindo公司,CD44、Cyclin D1、CDK4、MMP2、MMP9、GAPDH抗体购自英国Abcam公司,二抗购自美国ThermoFisher Scientific公司;引物和siCD44(GGACCUCUUUCAUGACAATT)购自生工(上海)生物公司。

1.2 细胞培养 将U251细胞置于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中培养48 h,待细胞生长密度接近90%时,利用胰蛋白酶消化细胞,制备单细胞悬液。收集细胞待用。

1.3 白藜芦醇干预 将单细胞悬液接种96孔板,每孔100  $\mu$ l,加入白藜芦醇,浓度分别为0  $\mu$ mol/L(空白对照组)、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L、150  $\mu$ mol/L,培养48 h进行细胞增殖和侵袭检测,根据结果选择最佳浓度进行CD44干预实验。

1.4 细胞转染 将U251细胞悬液接种6孔板,密度 $5\times 10^4$ 个/孔。参考Lipofectamine2000TM说明书,将pcDNA3.1/CD44(CD44过表达)、pcDNA3.1(过表达对照)等质粒转染胶质瘤U251细胞,培养24 h进行后续实验。

1.5 细胞增殖实验 将U251细胞接种96孔板,按照操作说明书,每孔加入10  $\mu$ l CCK-8溶液继续孵育2 h,然后用酶标仪检测490 nm吸光值。

1.6 细胞侵袭实验 将基质胶涂布于侵袭小室上室,U251细胞接种于下室,正常培养24 h,去除上室中的培养液,擦除未发生侵袭的胶质瘤细胞,利用0.1%浓度的结晶紫染色试剂进行处理,显微镜下拍照记录实验结果,记录视野下发生侵袭的细胞数量。

1.7 实时定量PCR检测mRNA表达 收集培养的U251细胞,利用Trizol试剂盒根据说明书提取细胞总RNA,利用反转录试剂盒根据说明书合成cDNA,

利用RT-PCR试剂盒根据说明书检测mRNA。PCR条件:96  $^{\circ}$ C、4 min,95  $^{\circ}$ C、20 s,56  $^{\circ}$ C、10 s,72  $^{\circ}$ C、15 s,35个循环。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对表达量。引物序列见表1。

1.8 免疫印迹法检测蛋白表达 收集待检测胶质瘤细胞,利用细胞裂解液将细胞完全裂解,12 000转/min、4  $^{\circ}$ C条件下离心15 min,收集上清液,利用BCA方法测定蛋白液浓度。利用SDS-PAGE电泳分离目的蛋白并转膜,脱脂奶粉4  $^{\circ}$ C封闭过夜。加入一抗(1:1 000)常温孵育1 h,再加入辣根过氧化酶标记的山羊抗兔IgG二抗常温孵育1 h(1:10 000),ECL试剂盒显影定影,拍照并记录。内参蛋白为GAPDH。

1.9 统计学分析 利用SPSS 20.0软件处理;定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 $t$ 检验; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对U251细胞增殖及侵袭的影响 与空白对照组相比,白藜芦醇明显抑制U251细胞的增殖和侵袭能力( $P<0.05$ ;图1、2),而且呈浓度依赖性( $P<0.05$ ;图1、2)。所以,用150  $\mu$ mol/L白藜芦醇进行CD44干预实验。

2.2 白藜芦醇对U251细胞CD44表达的影响 与空白对照组相比,白藜芦醇明显抑制U251细胞CD44 mRNA和蛋白表达( $P<0.05$ ;图3),而且呈浓度依赖性( $P<0.05$ ;图3)。

2.3 白藜芦醇对U251细胞增殖和侵袭相关信号通路蛋白表达的影响 与空白对照组相比,白藜芦醇明显抑制U251细胞增殖相关信号通路(Cyclin D1、

表1 PCR检测引物序列

基因	引物序列
CD44	F:CTGCCGCTTTGCAGGTGTA
	R:CATTGTGGCAAGGTGCTATT
Cyclin D1	F:AGGAACAGAAGTGCAGGAGG
	R:GGATGGAGTTGTCGGTGTAGATG
CDK4	F:GCCCTCAAGAGTGTGAGAGTC
	R:CACGAAGTGTGCTGATGGGA
MMP2	F:GCTGATGTCCAGCGAGTG
	R:TGCAGCCTAGCCAGTCG
MMP9	F:GAGTCCACCCTTGTGCTCTTC
	R:AGCCACCCGAGTTGTAACCAT
GAPDH	F:CGCTCTCTGCTCCTCTGTTTC
	R:ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC

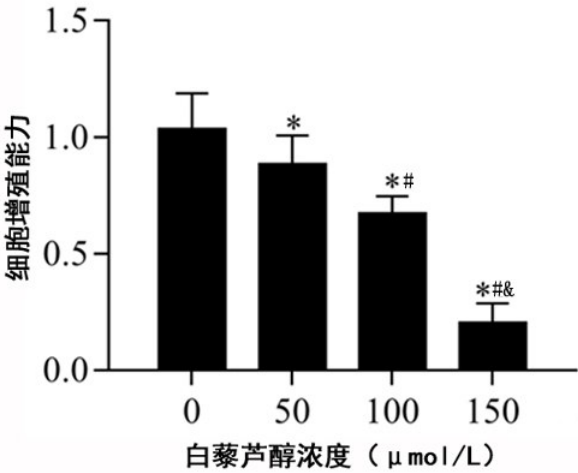


图1 白藜芦醇对U251细胞增殖能力的影响  
与0  $\mu$ mol/L组相应值比,\*  $P<0.05$ ;与50  $\mu$ mol/L组相应值比,#  $P<0.05$ ;与100  $\mu$ mol/L组相应值比,&  $P<0.05$

CDK4)以及细胞侵袭相关信号通路(MMP2、MMP9) mRNA 和蛋白表达( $P<0.01$ ;图 4),而且呈浓度依赖性( $P<0.05$ ;图 4)。

2.4 CD44 过表达对白藜芦醇作用的影响 CD44 过表达明显抑制白藜芦醇对胶质瘤 U251 细胞增殖和侵袭的抑制作用( $P<0.05$ ;图 5)。

3 讨论

白藜芦醇是一种植物抗毒素,在浆果、花生及葡萄等植物中广泛存在<sup>[6]</sup>。白藜芦醇对人体的心脑血管具有保护作用,同时具有神经保护、抗炎和抗氧化等作用<sup>[7]</sup>。Sun 等<sup>[8]</sup>研究显示,白藜芦醇显著增强皮肤鳞状细胞癌的治疗效果,参与调控皮肤鳞状细胞癌的发生发展过程。Subedi 等<sup>[9]</sup>报道显示,白藜芦醇调控 MAPK/PI3K 信号通路,抑制乳腺癌细胞增殖,同时明显促进细胞凋亡。Khusbu 等<sup>[10]</sup>研究显示,白藜芦醇显著抑制 TRAF6 的表达,从而抑制前列腺癌

细胞的增殖、侵袭和迁移。Yang 等<sup>[11]</sup>研究显示,白藜芦醇抑制 T98G 和 U138 胶质瘤细胞 Wnt2 和  $\beta$ -catenin 的表达,从而抑制 Wnt 信号途径的活性,抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭。本研究发现,白藜芦醇显著下调 CD44 表达,明显抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖和侵袭。CD44 在细胞中具有两种作用,分别为淋巴细胞归巢受体和透明质酸受体,参与炎症、血管再生、细胞粘附以及肿瘤发生发展等<sup>[12]</sup>。Vanje 等<sup>[13]</sup>研究显示,釉母细胞瘤 CD44 异常高表达,参与调控肿瘤细胞的发展过程。Guo 等<sup>[14]</sup>报道显示,非小细胞肺癌 CD44 表达异常升高,促进肿瘤细胞的增殖和迁移。本研究发现 CD44 过表达可逆转白藜芦醇对脑胶质瘤细胞增殖和侵袭的抑制作用,表明 CD44 高表达对胶质瘤具有促进作用。Hu 等<sup>[15]</sup>研究显示,CD44 在乳腺癌细胞中高表达,参与调控肿瘤细胞的迁移和侵袭。Wang 等<sup>[16]</sup>研究显示,脑胶质瘤细胞 CD44

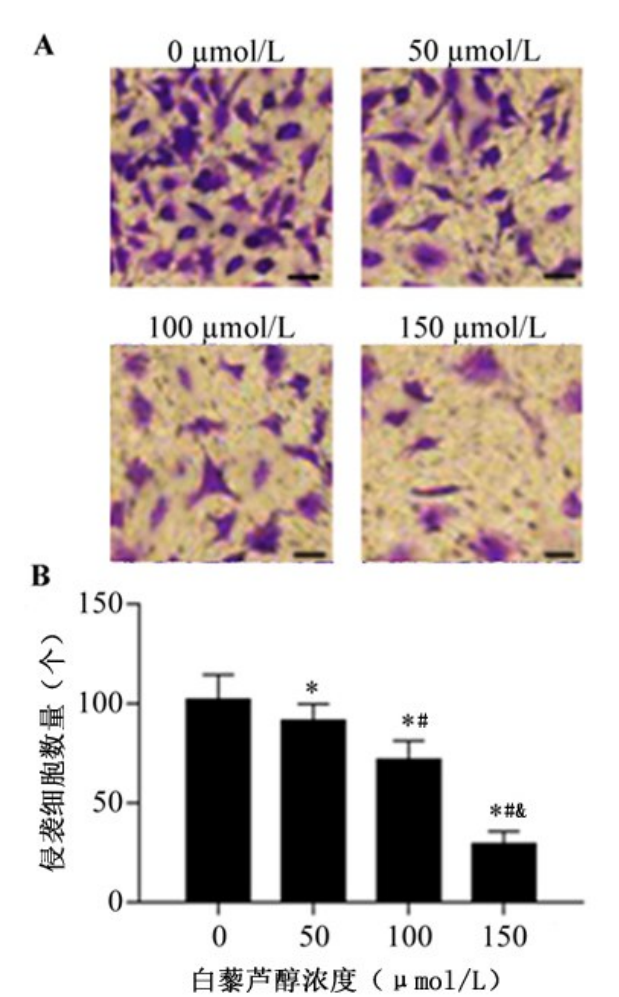


图2 白藜芦醇对U251细胞侵袭能力的影响  
与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, \*  $P<0.05$ ; 与 50  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, #  $P<0.05$ ; 与 100  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, &  $P<0.05$

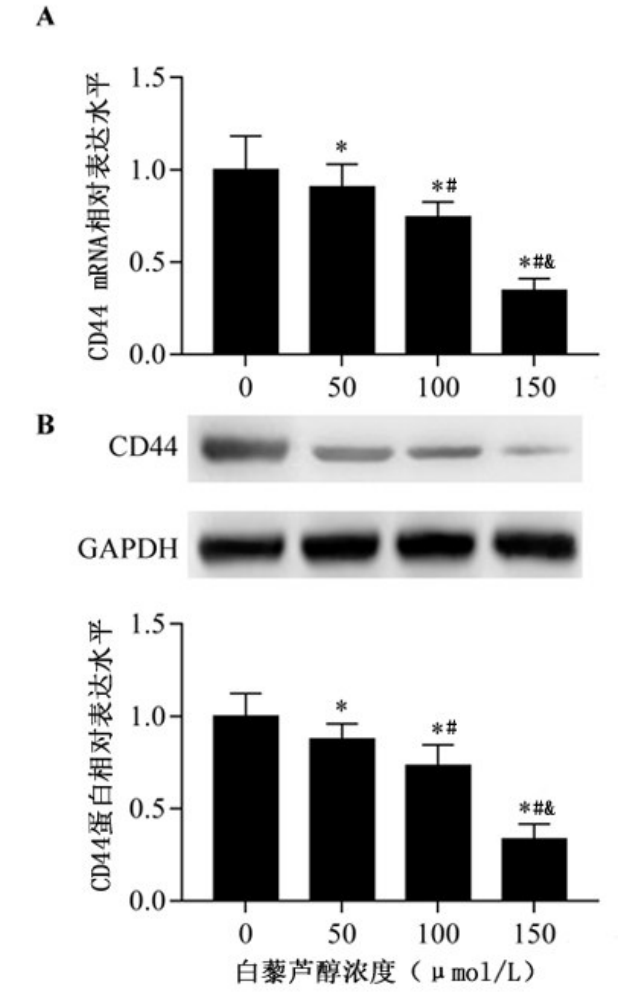


图3 白藜芦醇对U251细胞CD44表达的影响  
与 0  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, \*  $P<0.05$ ; 与 50  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, #  $P<0.05$ ; 与 100  $\mu\text{mol/L}$  组相应值比, &  $P<0.05$



表达异常上调,并且CD44过表达促进脑胶质瘤细胞的增殖、侵袭及细胞干性发展。

此外,本研究结果显示白藜芦醇明显抑制胶质瘤U251细胞CyclinD1、CDK4、MMP2、MMP9等表达。Zhang等<sup>[17]</sup>研究显示,当细胞周期相关蛋白CyclinD1、CDK4的表达降低时,细胞增殖受抑制。这提示白藜芦醇抑制胶质瘤U251细胞增殖,可能与下调CyclinD1、CDK4的表达有关。Li等<sup>[18]</sup>研究显示,胶质瘤细胞MMP2的表达水平下降时,细胞的增殖和侵袭能力也受显著影响。Dai等<sup>[19]</sup>研究显示,脑胶质瘤细胞MMP9的表达水平下调时,细胞的增殖和侵袭能力显著下降,并且脑胶质瘤细胞的凋亡水平显著上升。另有研究表明,在人急性髓系白血病细胞中,CD44活性下调时,细胞CyclinD1、CDK4的表达水平下调,影响细胞的增殖<sup>[20]</sup>。此外,肾癌细胞

CD44表达上调,通过促进MMP2和MMP9调控肿瘤细胞的侵袭转移<sup>[21]</sup>。

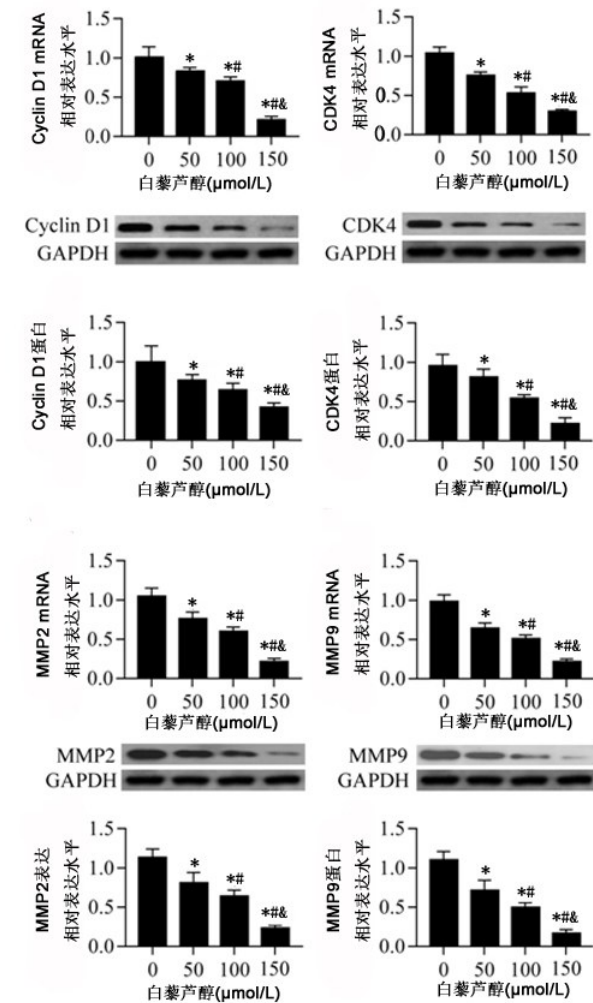


图4 白藜芦醇对U251细胞增殖和侵袭相关信号通路蛋白表达的影响  
与0 μmol/L组相应值比,\* $P<0.05$ ;与50 μmol/L组相应值比,# $P<0.05$ ;与100 μmol/L组相应值比,& $P<0.05$

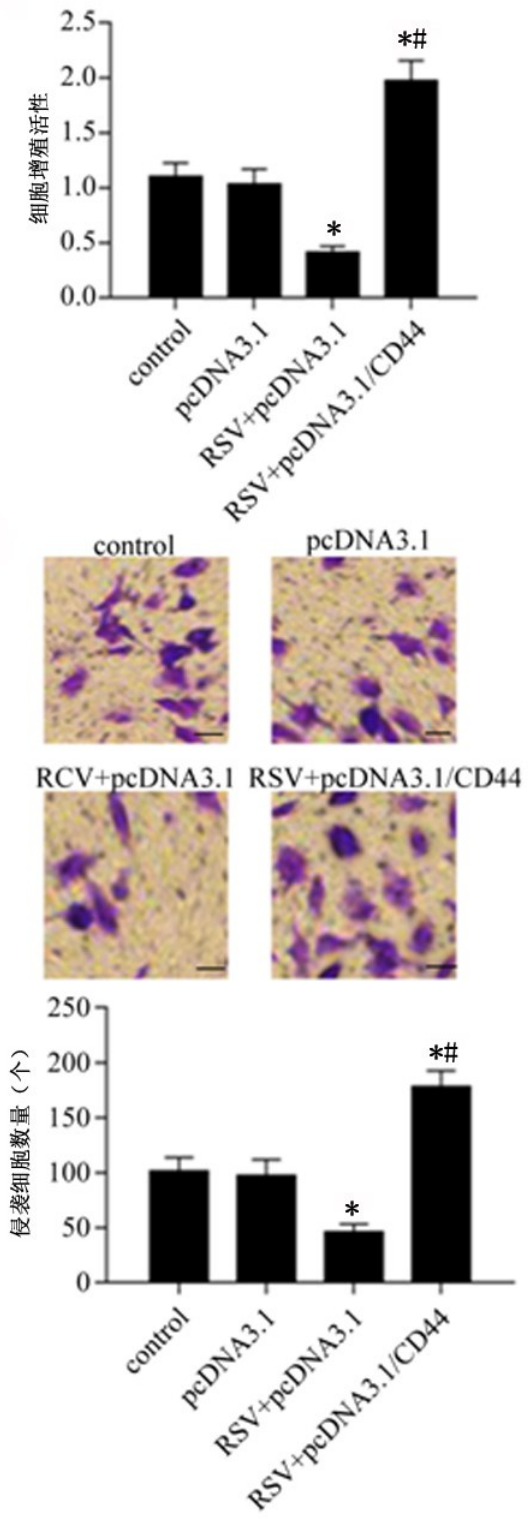


图5 CD44过表达对白藜芦醇作用的影响  
与control和pcDNA3.1组相应值比,\* $P<0.05$ ;与RSV+pcDNA3.1组相应值比,# $P<0.05$ ;pcDNA3.1/CD44. CD44过表达质粒;pcDNA3.1. 过表达对照质粒;RSV. 白藜芦醇

综上所述,白藜芦醇明显抑制脑胶质瘤细胞的增殖和侵袭,其机制可能与下调 CD44 的表达,进而抑制 CyclinD1、CDK4、MMP2、MMP9 的表达有关。

【参考文献】

[1] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, *et al.* Epidemiology and molecular pathology of glioma [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(9): 494–503; quiz 1 p following 516.

[2] Mutter N, Stupp R. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(8): 1187–1204.

[3] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC–NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459–466.

[4] Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, *et al.* Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad [J]? *Mutat Res*, 2008, 658(1–2): 68–94.

[5] Erb U, Megaptche A, Gu X, *et al.* CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 29.

[6] Han G, Xia J, Gao J, *et al.* Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol [J]. *Drug Discov Ther*, 2015, 9(1): 1–12.

[7] Sato D, Shimizu N, Shimizu Y, *et al.* Synthesis of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol, and their anti-oxidant, anti-allergic, and neuroprotective activities [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(7): 1123–1128.

[8] Sun Y, Li A, Liu X, *et al.* A panel of biomarkers for skin squamous cell carcinoma: various functional entities and differential responses to resveratrol [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(4): 1363–1377.

[9] Subedi L, Teli MK, Lee JH, *et al.* A stilbenoid isorhapon-tigenin as a potential anti-cancer agent against breast cancer through inhibiting sphingosine kinases/tubulin stabilization [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1947.

[10] Khusbu FY, Zhou X, Roy M, *et al.* Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 118: 105644–105655.

[11] Yang HC, Wang JY, Bu XY, *et al.* Resveratrol restores sensitivity of glioma cells to temozolamide through inhibiting the activation of Wnt signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6783–6800.

[12] Jang BI, Li Y, Graham DY, *et al.* The role of CD44 in the pathogenesis, diagnosis, and therapy of gastric cancer [J]. *Gut Liver*, 2011, 5(4): 397–405.

[13] Vanje MM, Tanveer S, Ahmed SA, *et al.* Immunoexpression of cancer stem cell marker (CD44) in ameloblastoma [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2019, 23(3): 400–406.

[14] Guo JY, Chiu CH, Wang MJ, *et al.* Proteoglycan serglycin promotes non-small cell lung cancer cell migration through the interaction of its glycosaminoglycans with CD44 [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 2.

[15] Hu S, Cao M, He Y, *et al.* CD44v6 targeted by miR-193b-5p in the coding region modulates the migration and invasion of breast cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(1): 260–271.

[16] Wang J, Li X, Wu H, *et al.* EMP1 regulates cell proliferation, migration, and stemness in gliomas through PI3K-AKT signaling and CD44 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17142–17150.

[17] Zhang X, Yu J, Zhao C, *et al.* MiR-181b-5p modulates chemosensitivity of glioma cells to temozolomide by targeting Bcl-2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2192–2202.

[18] Li L, Du Y, Xiang D, *et al.* Prediction of the anti-glioma therapeutic effects of temozolomide through in vivo molecular imaging of MMP expression [J]. *Biomed Opt Express*, 2018, 9(7): 3193–3207.

[19] Dai C, Zhang B, Liu X, *et al.* Pyrimethamine sensitizes pituitary adenomas cells to temozolomide through cathepsin B-dependent and caspase-dependent apoptotic pathways [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(8): 1982–1993.

[20] Sharma M, Mittapelly N, Banala VT, *et al.* Amalgamated microneedle array bearing ribociclib-loaded transfersomes eradicates breast cancer via CD44 targeting [J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(3): 661–675.

[21] Lee YM, Kim JM, Lee HJ, *et al.* Immunohistochemical expression of CD44, matrix metalloproteinase2 and matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinomas [J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(10): 742–748.

(2022-02-22 收稿, 2022-06-23 修回)