

. 实验研究 .

敲低 WTAP 表达抑制脑胶质瘤干细胞的增殖、迁移和侵袭

刘 楨 赵海洋 吴环立 李琳坤

【摘要】目的 探讨敲低 Wilms 肿瘤抑制因子(WTAP)表达对脑胶质瘤干细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及机制。方法 从手术切除胶质瘤标本中提取胶质瘤干细胞(GSC),应用 lipofectamine2000 转染 WTAP shRNA 质粒敲低 WTAP 表达,以 shRNA 为阴性对照;PCR 检测 WTAP mRNA 水平分析敲低效率;MTT 法检测细胞增殖能力,Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力,免疫印迹法检测细胞 AKT 磷酸化水平。结果 从胶质瘤标本中成功提取 GSC,其 SOX2 表达显著降低($P<0.001$),而 α -SMA 和 PDGFRb 的表达上调($P<0.001$)。与阴性对照组相比,WTAP 敲低组 GSC 细胞 WTAP mRNA 水平明显降低($P<0.05$),细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著下降($P<0.05$),细胞 AKT 的磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。结论 敲低 WTAP 表达可抑制 GSC 的增殖、迁移和侵袭能力,其机制可能与抑制 AKT 磷酸化有关。

【关键词】胶质瘤;胶质瘤干细胞;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移;Wilms 肿瘤抑制因子(WTAP)

【文章编号】1009-153X(2023)04-0263-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Knockdown of WTAP expression inhibites proliferation, migration, and invasion of glioma stem cells

LIU Zhen, ZHAO Hai-yang, WU Huan-li, LI Lin-kun. Department of Neurosurgery, Nanyang Second General Hospital, Nanyang 473000, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of knockdown of Wilms tumor suppressor factor (WTAP) on proliferation, migration, and invasion of glioma stem cells and its mechanism. Methods Glioma stem cells (GSCs) were extracted from glioma specimens. WTAP shRNA plasmids were transfected into GSCs to knockdown the WTAP expression using lipofectamine2000 transfection kit. WTAP mRNA level was detected by PCR assay to analyze the efficiency of knockdown. GSCs proliferation was detected by MTT assay, migration and invasion abilities of GSCs were detected by Transwell assay, and AKT phosphorylation levels in GSCs were detected by western blotting. Results Tumor cells extracted from glioma specimens were cultured in GSC medium and showed high expression of the stem cell marker SOX2. When EGF and FGF2 were replaced with TGF β in the medium, the expression of stem cell marker SOX2 was significantly decreased ($P<0.001$), while the expression of peritascular cell markers α -SMA and PDGFRb were significantly up-regulated ($P<0.001$). Compared with negative control group, proliferation, migration, and invasion were significantly inhibited ($P<0.05$), and the phosphorylation level of AKT was significantly decreased ($P<0.05$) in GSCs with knockdown of WTAP expression. Conclusions Knockdown of WTAP expression can inhibit the proliferation, migration, and invasion of GSCs, which may be related to the inhibition of AKT phosphorylation.

【Key words】Glioma; Glioma stem cells; Wilms tumor suppressor factor (WTAP); Proliferation; Migration; Invasion

胶质瘤是颅内最为常见的原发性恶性肿瘤,大约占中枢神经系统恶性肿瘤的 80%。在胶质瘤中,一半以上为恶性程度最高的胶质母细胞瘤,以快速侵袭生长和反复复发为特点,临床预后极差^[1]。同其他恶性肿瘤一样,胶质母细胞瘤存在异质性,其中胶质瘤干细胞(glioma stem cell, GSC)是胶质瘤起始和

复发的来源,也是胶质瘤侵袭生长和对放化疗抵抗的重要原因^[2]。研究显示, GSC 是胶质瘤治疗的关键,只有针对 GSC 的治疗方法才能有效遏制胶质瘤的生长^[3]。Wilms 肿瘤抑制因子(Wilms tumor suppressor factor, WTAP)是一种在人体内广泛表达的核蛋白。有研究显示 WTAP 在胶质瘤中高表达且能通过调控 AKT 通路来影响胶质瘤细胞的生长、侵袭^[4]。本文探讨敲低 WTAP 表达对 GSC 增殖、迁移和侵袭的作用。

1 材料与方法

1.1 GSC 分离及鉴定 术中获得胶质瘤标本后,将标

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.03.011
基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20200897);南阳市科技攻关计划项目(KJGG142)
作者单位:473000 河南,南阳市第二人民医院神经外科(刘 楨、赵海洋、吴环立、李琳坤)

本组织尽可能剪碎至形成悬浊液,然后 300 g 离心 5 min,取沉淀并用 5 ml 已活化的木瓜蛋白酶溶液(生工生物工程有限公司)重悬,混匀后 37 ℃培养箱中消化 30 min,每 10 min 取出重悬混匀 1 次,消化完毕后过 40 μ m 滤膜,取过滤液 300 g 离心 5 min,GSC 培养基重悬沉淀后置于培养箱中培养。GCS 培养基为无血清培养基,由 DMEM/F12(美国 Gibco 公司)中加入 1% N2(美国 Gibco 公司)、2% B27(美国 Gibco 公司)、0.04% EGF(美国 Invitrogen 公司)、0.02% FGF2(美国 Invitrogen 公司)配置,GSC 贴壁培养时需预先应用 laminin(美国 Sigma 公司)包被培养皿。应用定量 PCR 检测干细胞标记物 SOX2 的表达量,通过加入 TGF- β 促进分化后检测其 SOX2、血管周细胞标记物 α -SMA 和 PDGFRb 的表达检测其分化能力。HUVEC 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,并使用该公司提供培养基培养。

1.2 转染实验 应用 lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)将 WTAP shRNA 和阴性对照 shRNA(由武汉金开瑞生物有限公司提供)转染 GSC。将 GSC 接种 24 孔板(5×10^4 个/孔),培养箱孵育过夜,应用 50 μ l 无血清培养基分别稀释 0.5 μ g 的质粒和 1 μ l 的 lipofectamine2000 转染试剂,将两者充分混匀后分散滴加到细胞中,qRT-PCR 检测转染效率。

1.3 qRT-PCR 检测 mRNA 表达量 应用 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取细胞总 RNA,应用 M-MLV 逆转录酶体系(日本 Takara 公司)逆转录为 cDNA,应用 SYBR Green I 嵌合荧光法(美国 Bio-rad 公司)进行荧光定量分析,以 β -actin 为内参,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的相对表达量。引物序列:内参 β -actin 正义链 5'-CTCTTCCAGCCTTCC TTCCT-3',5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3';WTAP 正义链 5'-GCCAACTGCTGGCGTGTCT-3',反义链 5'-ATGGCGAAGTGTCGAATGCT-3';SOX2 正义链 5'-CACAACTCGGAGATCAGCAA-3',反义链 5'-CGGGGCCGGTATTTATAATC-3'; α -SMA 正义链 5'-CAATGAGCTTTCGTGTTGCCC-3',反义链 5'-GCAAGGCATAGCCCTCATAGA-3';PDGFRb 正义链 5'-GCTGTTACCCACTCTGGGAC-3',反义链 5'-TG-GTGCCTTGCTGCTGATG-3'。

1.4 细胞增殖实验 应用 MTT 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)检测细胞增殖能力。将 GSC 接种 96 孔板,每孔 1 000 个细胞,培养基 100 μ l 每孔,培养至预定时间后加入 5 μ l MTT(5 mg/ml)培养 4 h,加入 100 μ l 裂解液、37 ℃裂解 4 h,测定 570 nm 波长处吸

光度。

1.5 细胞侵袭、迁移实验 应用 Transwell 小室(美国 Corning 公司,8 μ m 膜)检测细胞迁移及侵袭能力,小室下层提前铺入 HUVEC 细胞以诱导 GSC 迁移,迁移实验直接进行实验,侵袭实验上下两层小室之间铺基质胶(美国 Corning 公司),培养至预定时间后对发生转移的底部细胞进行 DAPI 染色计数。迁移实验时间为 24 h,侵袭实验为 3 d。

1.6 免疫印迹实验 收取待测定细胞六孔板,吸出培养基并用 PBS 洗涤后每孔加入 200 μ l RIPA 裂解液(北京 Biosharp 公司)裂解,超声裂解细胞后 10 000 转/min 离心 10 min,离心温度 4 ℃,取上清液应用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度,加入上样缓冲液配置为蛋白样本,100 ℃煮 10 min,行 SDS-PAGE 电泳(恒压电泳 80 V、30 min,之后 120 V),电泳分离满意后 200 mA 恒流转膜,蛋白转移到 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭液封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 2~4 h 后显影分析。应用 Image J 软件进行灰度值分析。内参 GAPDH 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(1:100 000),AKT 抗体(1:1 000)及 pAKT 抗体(1:2 000)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司(1:5 000)。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 GSC 的鉴定 GSC 高表达于性标记物并具备一定条件下分化的能力。GSC 完全培养基和用 TGF β 替换 EGF 和 FGF 的培养基分别培养 GSC,两种培养条

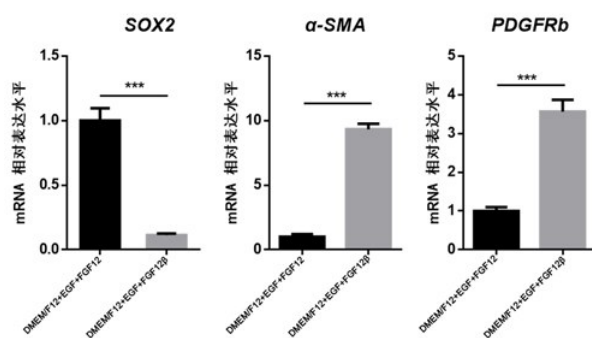


图1 GSC 完全培养基(DMEM/F12+EGF+FGF2)和用 TGF β 替换 EGF 和 FGF 的培养基(DMEM/F12+TGF β)培养进行鉴定 GSC

*** $P < 0.001$

件下 GSC 的 SOX2、 α -SMA 和 PDGFRb mRNA 表达量均有显著差异($P<0.001$)。胶质瘤手术标本中提取的肿瘤细胞在 GSC 培养基中培养,其高表达干细胞标记物 SOX2,证实这些细胞具备 GSC 的“干性”。将培养基中 EGF、FGF2 替换为 TGF β ,发现其干细胞标记物 SOX2 的表达量明显下降,而血管周细胞标记物

α -SMA 和 PDGFRb 的表达量显著上调(图 1),证实这些细胞具有分化为其他细胞的潜能。以上结果说明这些胶质瘤细胞具备 GSC 的特征,可满足 GSC 的实验要求。

2.2 WTAP 敲低效率的检测 与阴性对照 shRNA 相比,转染 WTAP shRNA 质粒的 GSC 中 WTAP mRNA 表达量显著下降($P<0.05$;图 2)。

2.3 敲低 WTAP 表达对 GSC 增殖的影响 与阴性对照 shRNA 相比,转染 WTAP shRNA 质粒后,GSC 的增殖、侵袭、迁移能力均显著下降($P<0.05$;图 3、4)。

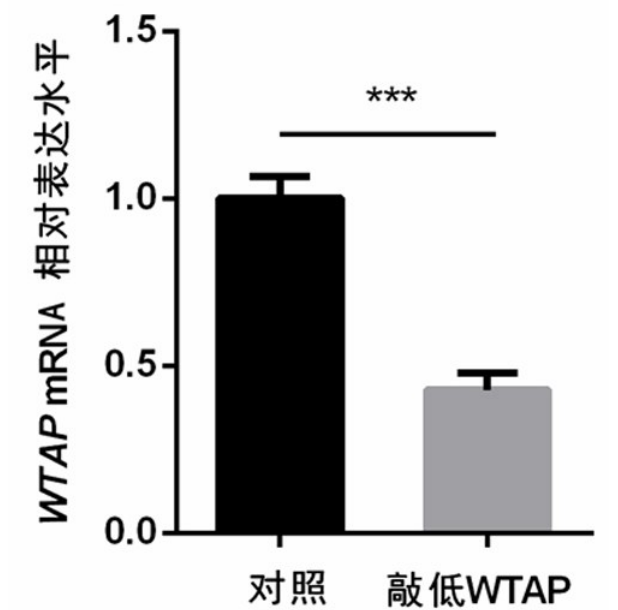


图 2 GSC 中 WTAP 敲低效率检测结果
GSC. 胶质瘤干细胞;WTAP. Wilms 肿瘤抑制因子;***, $P<0.001$

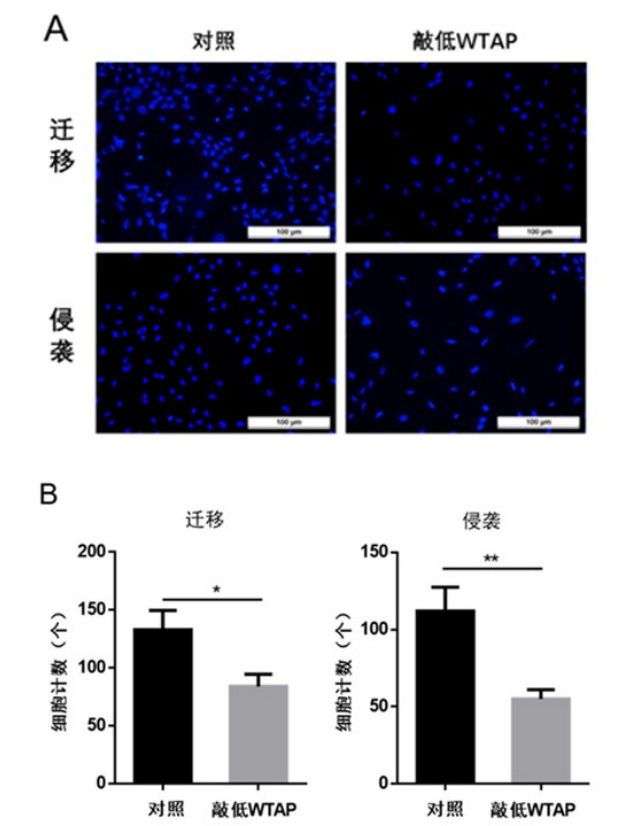


图 4 敲低 WTAP 显著抑制 GSC 的迁移和侵袭
A. 培养至预定时间后进行 DAPI 染色,标尺为 100 μ m;B. 显微镜下观察细胞数;GSC. 胶质瘤干细胞;WTAP. Wilms 肿瘤抑制因子;* $P<0.05$,** $P<0.01$

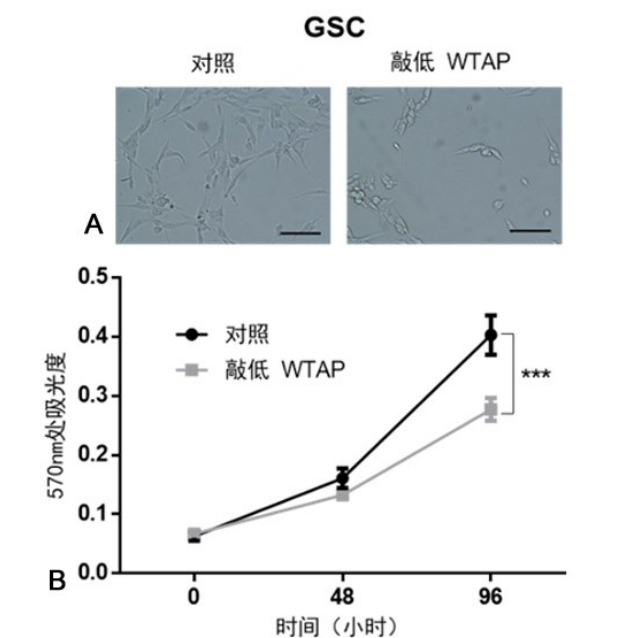


图 3 敲低 WTAP 表达显著抑制 GSC 的增殖
A. 培养 96 h 后在显微镜下观察,标尺为 50 μ m;B. 0 h、48 h、96 h 应用 MTT 法检测细胞的增殖能力并绘制生长曲线;GSC. 胶质瘤干细胞;WTAP. Wilms 肿瘤抑制因子;*** $P<0.001$

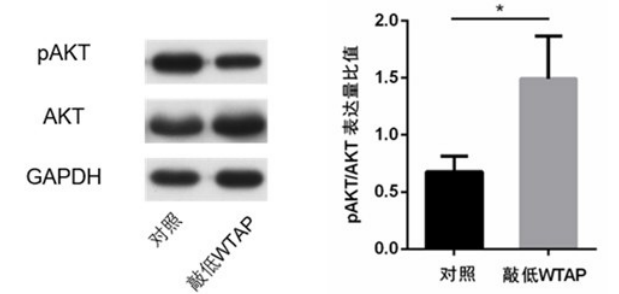


图 5 敲低 WTAP 抑制 GSC 中 AKT 磷酸化的水平
GSC. 胶质瘤干细胞;WTAP. Wilms 肿瘤抑制因子* $P<0.05$

2.4 敲低WTAP表达对GSC中AKT磷酸化水平的影响 与阴性对照shRNA相比,转染WTAP shRNA质粒后,pAKT/AKT比值显著下降($P<0.05$;图5)。

3 讨论

胶质瘤是成人中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,高级别胶质瘤以生长迅速、侵袭性强和反复发作为临床特点,临床预后极差,是临床上亟待解决的难题。GSC被认为是胶质瘤治疗的关键,其主要特征是能够高表达干细胞生物标记物,可以自我更新并具备分化能力。有研究显示WTAP在多种肿瘤的发生发展中具有重要作用,可以调节Wnt信号通路促进直肠癌的发生发展;通过结合CDK2转录本促进肾细胞癌细胞增殖;促进弥漫大B淋巴瘤细胞的增殖并降低其化疗效果^[5,6]。有研究对WTAP在胶质瘤普通细胞系增殖和迁移中的作用进行探究,结果显示敲低WTAP抑制胶质瘤细胞系的增殖和迁移,值得注意的是,在10%胎牛血清的培养条件下敲低WTAP可以抑制U87细胞增殖,但对胶质瘤原代细胞的增殖无影响,在1%胎牛血清的条件下敲低WTAP,明显抑制U87细胞和原代胶质瘤细胞的增殖^[4]。本研究GSC是在无血清调节下培养的,敲低WTAP表达后增殖受到明显抑制。由于无血清培养是维持GSC干性的必要条件,无法验证培养基胎牛血清浓度与WTAP对GSC增殖影响之间的关系,另一方面,这种差异也可能是由于该项研究中提取的原代细胞的异质性导致。

有研究显示WTAP可能通过调控AKT通路抑制卵巢癌细胞和胶质瘤普通细胞系的增殖和迁移^[4,7]。AKT信号通路是影响肿瘤增殖和迁移的经典通路,在GSC的自我更新、迁移和成瘤能力等多方面发挥重要调控作用^[8,9]。本研究观察到敲低WTAP表达后GSC的AKT磷酸化水平明显降低。

总之,WTAP在胶质瘤中高表达,敲低WTAP表达显著抑制GSC的增殖、迁移和侵袭,其作用机制可

能与调控AKT磷酸化水平有关。

【参考文献】

[1] Louis DN, PerryA, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251.

[2] 袁凡恩,陈谦学. 胶质瘤干细胞的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(8): 508-511.

[3] Cheng L, Bao SD, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5): 654-665.

[4] Jin DI, Lee SW, Han ME, *et al.* Expression and roles of Wilms' tumor 1- associating protein in glioblastoma [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12): 2102-2109.

[5] Kuai Y, Gong X, Ding L, *et al.* Wilms' tumor 1-associating protein plays an aggressive role in diffuse large B- cell lymphoma and forms a complex with BCL6 via Hsp90 [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 50.

[6] Tang J, Wang F, Cheng G, *et al.* Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating CDK2 mRNA stability [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 40.

[7] Yu HL, Ma XD, Tong JF, *et al.* WTAP is a prognostic marker of high-grade serous ovarian cancer and regulates the progression of ovarian cancer cells [J]. *Onco Targets Therapy*, 2019, 12: 6191-6201.

[8] Wei Y, Jiang Y, Zou F, *et al.* Activation of PI3K/Akt pathway by CD133- p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): 6829-6834.

[9] 张 国,易 伟. 针对脑胶质瘤相关通路治疗的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(3): 215-219.

(2022-03-08收稿,2023-02-22修回)