

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.08.020

论著·实验研究

磷酸肌醇 4 磷酸对人脑胶质瘤 U87 细胞侵袭迁移的影响

金明卫 玄承敏 安琪 王磊

(徐州市儿童医院血液科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 了解磷酸肌醇 4 磷酸 (PI4P) 对人脑胶质瘤细胞侵袭迁移的影响, 探索 PI4P 在人脑胶质瘤发生过程中的作用机制。**方法** 包装慢病毒, 构建 U87-GFP (过表达 PI4P 细胞系对照组)、U87-GFP-PI4P (过表达 PI4P 细胞系实验组)、U87-Scramble (沉默 PI4P 细胞系对照组)、U87-shPI4P (沉默 PI4P 细胞系实验组) 细胞系。应用 Western blot 检测各组 PI4P 的表达水平, 应用细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力。**结果** 免疫印迹实验检测出 U87-GFP-PI4P 细胞系中外源性 PI4P 表达, 而 U87-shPI4P 细胞系中 PI4P 表达较对照组 U87-Scramble 细胞系减少。过表达 PI4P 的 U87-GFP-PI4P 细胞迁移能力较对照组 U87-GFP 细胞增强 ($P<0.01$); 沉默 PI4P 后迁移能力较对照组减弱 ($P<0.01$)。过表达 PI4P 的 U87 细胞侵袭能力强于对照组 ($P<0.05$), 沉默 PI4P 后侵袭能力减弱 ($P<0.05$)。**结论** PI4P 可促进脑胶质瘤细胞的侵袭迁移, 为脑胶质瘤的基础研究及临床治疗提供新的靶点。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 775-780]

[关键词] 脑胶质瘤; 侵袭; 迁移; U87; 磷酸肌醇 4 磷酸

Effect of phosphoinositide 4-phosphate on invasion and migration of human glioma U87 cells

JIN Ming-Wei, XUAN Cheng-Min, AN Qi, WANG Lei. Department of Hematology, Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (An Q, Email: anqi1974@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of phosphoinositide 4-phosphate (PI4P) on human glioma U87 cells and the mechanism of action of PI4P in the development of human glioma through the overexpression or silencing of PI4P in human glioma U87 cells, and to provide a new target for basic research and clinical treatment of glioma. **Methods** LV-Helper1, LV-Helper2, pWPXLd-PI4P, and pLL3.7-shPI4P were used to package pWPXLd-PI4P and pLL3.7-shPI4P lentiviruses. The U87-GFP (PI4P-overexpression control group), U87-GFP-PI4P (PI4P-overexpression experimental group), U87-Scramble (PI4P-silencing control group), and U87-shPI4P (PI4P-silencing experimental group) cell lines were established. Wound-healing assay and Transwell assay were used to evaluate cell migration and invasion, and Western blot was used to measure the expression of PI4P in each group. **Results** Western blot detected the expression of exogenous PI4P in the U87-GFP-PI4P cell line, and the U87-shPI4P cell line showed reduced expression of PI4P compared with the U87-Scramble cell line in the control group. The U87-GFP-PI4P cell line with PI4P overexpression had a significantly stronger ability of migration than the U87-GFP cell line in the control group ($P<0.01$); the U87-shPI4P cell line with PI4P silencing had a reduced ability of migration than the U87-Scramble cell line in the control group ($P<0.01$). The U87 cell line with PI4P overexpression had a significantly stronger invasion ability than the control group ($P<0.05$); after PI4P silencing, the experimental group showed a significant reduction in invasion ability compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusions** In human glioma U87 cells, PI4P can promote the invasion and migration of glioma cells and may become a new target in the basic research and clinical treatment of glioma. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(8): 775-780]

Key words: Glioma; Invasion; Migration; U87; Phosphoinositide 4-phosphate

[收稿日期] 2016-03-16; [接受日期] 2016-06-13

[作者简介] 金明卫, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 安琪, 女, 副主任医师。

脑胶质瘤亦称为神经胶质细胞瘤，它起源于神经上皮细胞，主要包括星形胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜细胞瘤、髓母细胞瘤等，占儿童颅内肿瘤的70%~86%^[1]。尽管磁共振成像对诊断脑胶质瘤有着革命性推动^[2]，但最近20年里儿童脑胶质瘤的治疗并未取得明显进展。儿童脑胶质瘤的临床治疗以手术切除为主，易复发，死亡率高。近年来，人们逐渐接受这样的观点：即肿瘤组织学特点有助于评估恶性肿瘤的侵袭性行为，故脑胶质瘤患儿术后是否放疗、化疗或生物治疗主要取决于其病理组织学诊断。随着分子生物学技术的发展，临床上对肿瘤的特点有了进一步认识，如何更加客观地综合评价小儿脑胶质瘤的恶性程度已经成为小儿神经外科医师关注的焦点。磷酸肌醇4磷酸(phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P)在高尔基体是含量相对丰富的磷脂酰肌醇。目前研究发现，PI4P和PI4P结合蛋白(GOLPH3)参与丙型肝炎病毒分泌过程^[3]，而GOLPH3在多种实体肿瘤中高表达^[4-7]，并对癌细胞迁移及侵袭具有促进作用^[8]。但PI4P是否影响脑胶质瘤细胞的侵袭迁移，尚未见报道。本实验旨在通过建立过表达或沉默PI4P细胞系，了解PI4P对人脑胶质瘤U87细胞侵袭迁移的影响，为脑胶质瘤的基础研究及临床治疗提供新的研究及治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑胶质瘤U87细胞及人胚肾细胞(HEK293T)均购自上海中科院细胞库；质粒：LV-Helper1、LV-Helper2、pWPXLd-puro、pWPXLd-PI4P、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P购自Addgene公司；DMEM培养基购自杭州吉诺生物医药技术有限公司；胎牛血清购自杭州四季青公司；PI4P一抗及兔二抗均购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养U87细胞及HEK293T。待细胞处于对数生长期铺满80%培养瓶底时传代一次，该两种细胞每周约传2~3代。

1.3 慢病毒包装

慢病毒包装系统包括有效序列载体质粒

pWPXLd-PI4P、包装质粒LV-Helper1和包膜质粒LV-Helper2。根据质粒抽提试剂盒说明书提取3种质粒的DNA，将DNA溶于灭菌后的去离子水中，以紫外光吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒的吸光度值在1.8~2.0之间。转染前24h用胰蛋白酶消化对数生长期的HEK293T细胞，加入到6孔板内，细胞密度为 $0.6 \times 10^6/L$ 。LV-Helper1、LV-Helper2及pWPXLd-PI4P质粒(质量比1:1:2)中加入opti 500 μL，然后加入PolyJet 10 μL立即混匀，室温静置30 min，将其转移至预先处理过的HEK293T细胞中，12 h后更换培养基，72 h后收集上清，即pWPXLd-PI4P慢病毒。pWPXLd-puro、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P慢病毒包装同上。

1.4 分组

用公司购买的过表达PI4P质粒及沉默PI4P质粒，包装pWPXLd-puro、pWPXLd-PI4P、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P慢病毒，构建过表达PI4P组及沉默PI4P组细胞系。过表达PI4P组，又分为过表达对照组(过表达pWPXLd-puro空载体)、过表达实验组(过表达pWPXLd-PI4P质粒)；沉默PI4P组分为沉默对照组(过表达pLL3.7-Scramble空载体)、沉默实验组(pLL3.7-shPI4P质粒)。

1.5 细胞系构建

取包装后的pWPXLd-puro、pWPXLd-PI4P、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P慢病毒各1 mL，加入到U87细胞(U87细胞胰酶消化后加入到6孔板内，密度为70%)中，然后加入polybrance 5 μg，24 h后换液，72 h后荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况，加入polypuro 5 μL(质粒含有puro标签，具有抗puro性)，构建成功的细胞呈绿色荧光，筛选后扩大培养。

1.6 细胞划痕实验

将U87-GFP、U87-GFP-PI4P、U87-Scramble、U87-shPI4P细胞铺于6孔板中，贴壁后PBS冲洗3次，加入无血清培养基，继续培养5 h，倒置显微镜观察。用10 μL微量移液头在6孔板内垂直划痕，PBS冲洗3次后加入无血清培养基，于0 h(细胞划痕即为0 h)、24 h(细胞划痕后24 h)随机选择5个视野(100×)，计算迁移到划痕空隙中的细胞。实验重复3次。

1.7 细胞体外侵袭试验

将无菌 Transwell 小室置于 24 孔板中, Transwell 小室内为上室, 24 孔板内为下室, 取稀释的 Matrigel 胶加入上室中, 50 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h。用 200 μL /孔的无血清培养基水化基质胶, 37 $^{\circ}\text{C}$, 培养 3 h。细胞计数, 用无血清培养基将细胞最终稀释为 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 。将上室水化的培养基洗净后加入 200 μL 细胞悬液, 下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清 (FCS) 的培养基 (注意: 操作过程中不能出现气泡), 将 24 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 40 h。取出 24 孔板, 将小室内细胞悬液洗净, 用棉签轻轻拭去上室的非侵袭细胞, 将 Transwell 小室倒置晾干, 用 4% 甲醛固定 30 min。取一废用 24 孔板, 每孔加入 500 μL 、0.1% 结晶紫染液, 将 Transwell 小室置于其中, 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, PBS 洗涤小室, 风干, 显微镜下观察拍照 (拍带孔的层面)。

1.8 Western blot 检测 PI4P 蛋白表达

用 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳, 恒流转膜, 加入 PI4P 一抗 (1:2000) 封闭、4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:6000), 室温 1 h, TBST/PBS 洗膜, 化学法曝光显影, 冲洗胶片。Image J 软件分析条带灰度值, 目的蛋白表达量以目的蛋白/ β -actin 的比值表示。

1.9 统计学分析

用 Image J、IP6.0、SPSS 13.0、Photoshop 软件进行统计分析并作图。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 包装慢病毒

用 pWPXLd-puro、pWPXLd-PI4P、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P 质粒及 LV-Helper1, LV-

Helper2 质粒转染 HEK293T 细胞, 包装 pWPXLd-puro 及 pWPXLd-PI4P、pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P 慢病毒, 荧光显微镜下观察暗场 (绿色荧光) 与明场下细胞比值达占 80% 以上, 提示转染成功 (图 1)。

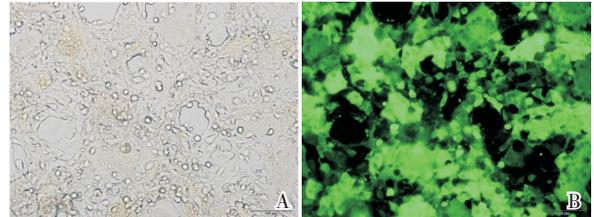


图 1 荧光显微镜观察转染情况 (100 \times) A: 荧光显微镜明场下观察 HEK293T 细胞; B: 暗场 (绿色荧光) 下观察 HEK293T 细胞绿色荧光蛋白表达, 提示病毒构建成功。

2.2 细胞系构建, 并检测细胞中 PI4P 蛋白表达

用包装好的慢病毒侵染 U87 细胞, 免疫荧光观察转染效率在 80% 以上, 构建 U87-GFP、U87-GFP-PI4P、U87-Scramble、U87-shPI4P 细胞系成功 (图 2A~B)。Western blot 检测出过表达 PI4P 的 U87-GFP-PI4P 细胞系中 PI4P 表达较对照组 U87-GFP 细胞系增高; 而沉默 PI4P 的 U87-shPI4P 细胞系中 PI4P 表达较对照组 U87-Scramble 细胞系减少 (图 2C~D)。

2.3 细胞迁移能力改变

过表达 PI4P 的 U87-GFP-PI4P 细胞系较对照组 U87-GFP 细胞系迁移能力增强, 差异有统计学意义 ($t=33.15$ 、 $P=0.001$), 见图 3A、3C; 沉默 PI4P 的 U87-shPI4P 细胞系较对照组 U87-Scramble 细胞系迁移能力减弱, 差异有统计学意义 ($t=18.34$ 、 $P=0.002$), 见图 3B、3D。

2.4 细胞侵袭能力的改变

过表达 PI4P 的 U87 细胞侵袭能力较对照组强, 差异有统计学意义 ($t=15.35$ 、 $P=0.01$), 见图 4A、4C; 沉默 PI4P 的 U87-shPI4P 细胞系较对照组 U87-Scramble 侵袭能力减弱, 差异有统计学意义 ($t=13.26$ 、 $P=0.01$), 见图 4B、4D。

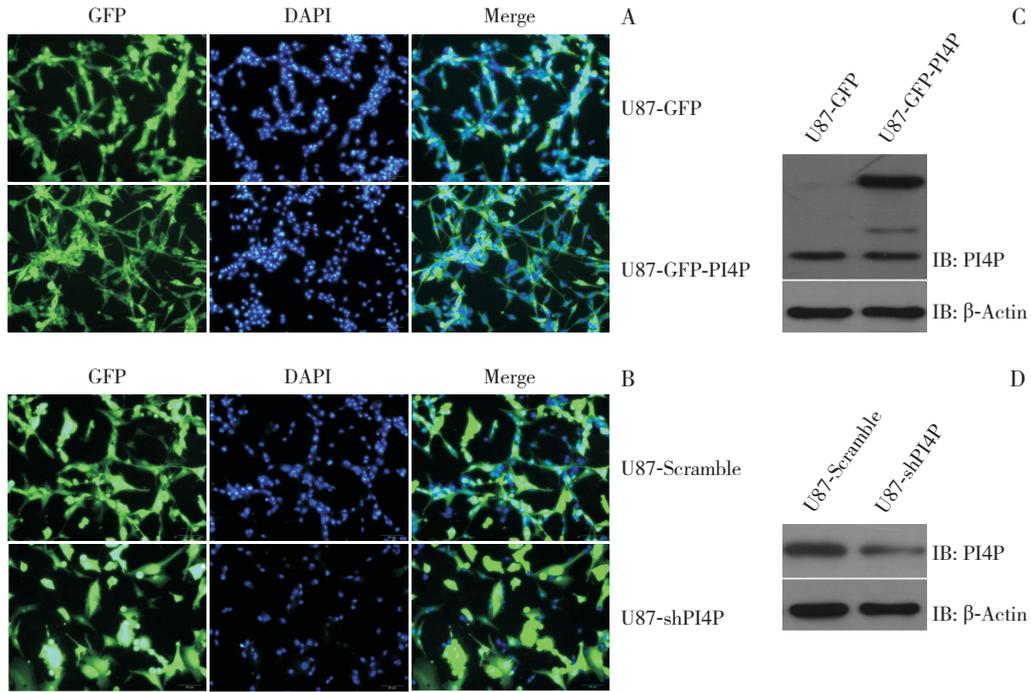


图 2 慢病毒侵染 U87 细胞，构建细胞系 A：用包装成功的 pWPLD-puro 及 pWPLD-PI4P 慢病毒侵染 U87 细胞，荧光显微镜（100×）暗场观察绿色荧光表达情况，GFP 即为表达目的蛋白 PI4P 的细胞，DAPI 为单个视野内所有细胞，Merge 后观察到总细胞中表达 PI4P 的细胞数目（≥ 80% 的细胞都有绿色荧光蛋白表达），提示细胞系构建成功；B：用包装成功的 pLL3.7-Scramble、pLL3.7-shPI4P 慢病毒侵染 U87 细胞，荧光显微镜（100×）暗场观察表达绿色荧光，提示细胞系构建成功；C-D：Western blot 检测过表达和沉默 PI4P 后的 PI4P 蛋白表达情况。

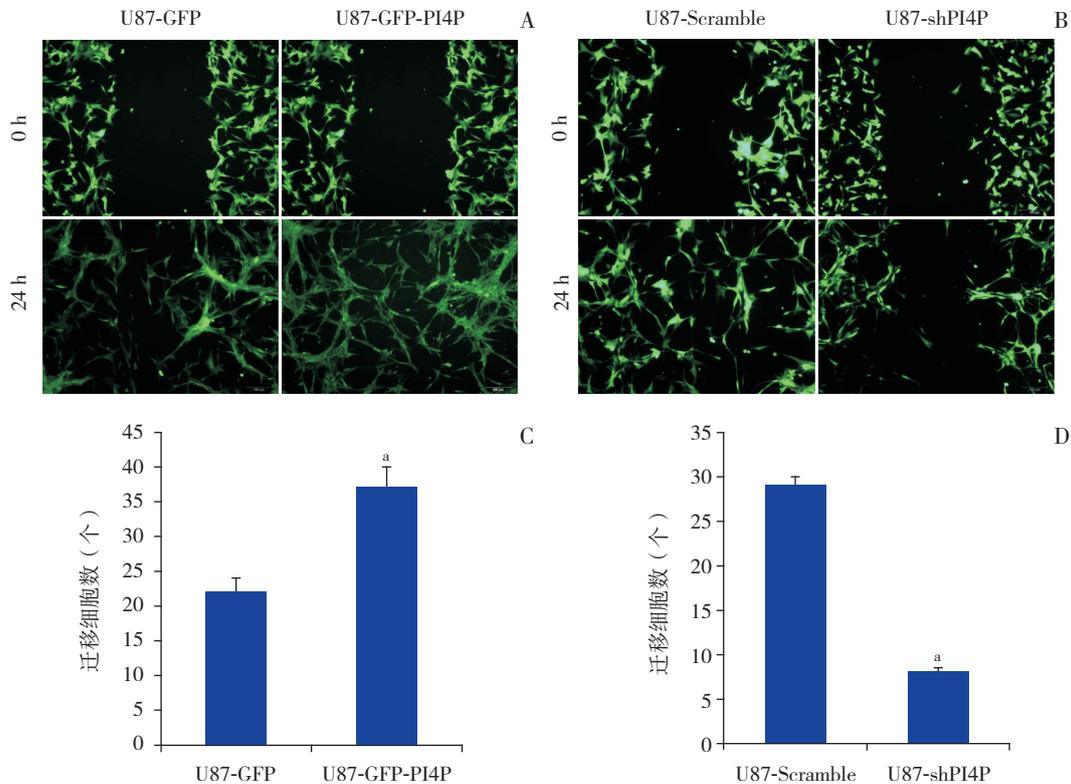


图 3 划痕实验检测 PI4P 对胶质瘤细胞迁移的影响 (n=6) A、C：荧光显微镜下（100×）观察过表达 PI4P 的 U87-GFP-PI4P 细胞系垂直划痕 24 h 后划痕愈合能力较对照组 U87-GFP 强；a 示与对照组 U87-GFP 细胞系比较， $P < 0.05$ 。B、D：荧光显微镜下（100×）观察沉默 PI4P 的细胞垂直划痕 24 h 后划痕愈合能力较对照组 U87-Scramble 细胞系差；a 示与对照组 U87-Scramble 细胞系比较， $P < 0.05$ 。

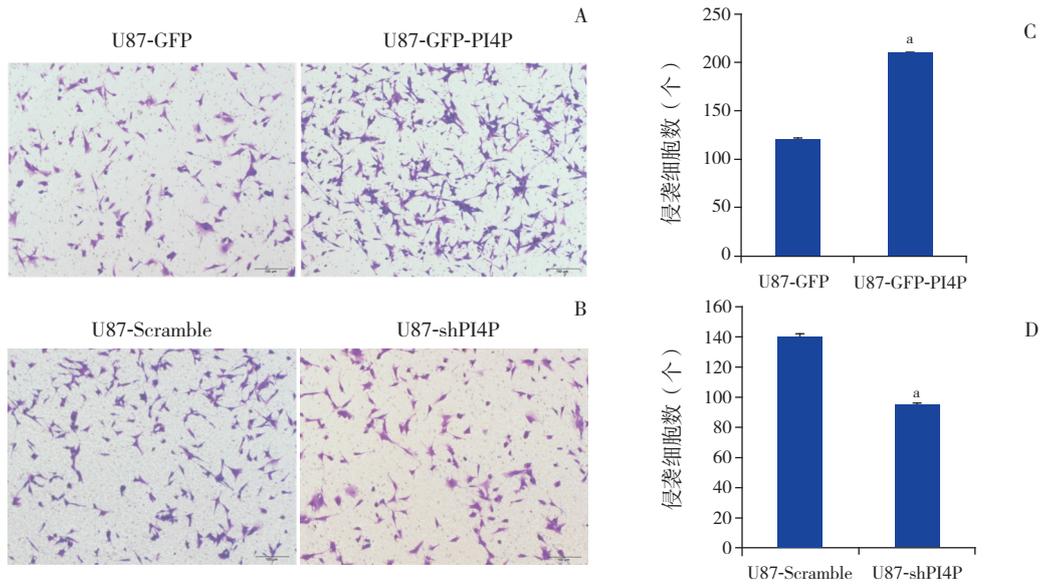


图4 Transwell 检测过表达和沉默 PI4P 后 U87 细胞的侵袭能力 ($n=3$) A、C: 显微镜下 ($100\times$) 过表达 PI4P 组的细胞侵袭能力强于对照组 U87-GFP 细胞系; a 示与对照组 U87-GFP 细胞系比较, $P<0.05$ 。B、D: 显微镜下 ($100\times$) 沉默 PI4P 的 U87-shPI4P 细胞系较对照组 U87-Scramble 细胞系侵袭能力减弱; a 示与对照组 U87-Scramble 细胞系比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

脑胶质瘤在颅内恶性肿瘤中占首位, 脑胶质瘤细胞具有增殖能力强, 凋亡率低, 高侵袭迁移能力等特点, 手术反而可能导致脑胶质瘤恶性程度提高、短期内再发, 因此其难以通过手术治愈, 死亡率极高^[9-10]。

肿瘤细胞的侵袭与迁移是决定肿瘤细胞转移能力的两个重要因素。局部侵袭性生长的特性往往是胶质瘤难以根治和复发的根本原因, 也是直接导致肿瘤难以全切、术后复发率高、预后差的主要原因。因此, 有关胶质瘤的抗侵袭迁移治疗具有重要的研究意义。PI4P 是广泛存在于细胞膜中带负电荷的一种磷脂, 虽然含量较低, 却是生物膜中重要的组成部分, 在膜的通透性、囊泡运输、膜的转移、细胞骨架调整及信号传导通路中均发挥着重要作用。PI4P 在高尔基体含量相对丰富。在肝炎中 PI4P 与 PI4P 结合蛋白 (GOLPH3) 相互作用^[3], 而 GOLPH3 在多种实体肿瘤中高表达, 并对癌细胞增殖、侵袭迁移具有促进作用^[8,11-14], 而 GOLPH3 在人脑胶质瘤中通过调节 RhoA 调节胶质瘤细胞的侵袭迁移^[15]。PI4P 下调可以诱导细胞凋亡^[16]; 另有报道指出, PI4P 能够调节乳腺癌细胞的粘附与迁移, 促进肿瘤的进展^[17]。而 PI4P 是

否可以调节胶质瘤细胞侵袭迁移尚未见相关报道。

基于以上研究, 我们通过慢病毒感染 U87 细胞, 建立了过表达和沉默 PI4P 的细胞系, 通过 Western blot 检测到各细胞系中 PI4P 表达, 提示细胞系构建成功, 我们分别通过细胞侵袭实验和划痕实验来了解 PI4P 对 U87 细胞的侵袭迁移能力的影响, 得知 PI4P 可以促进人脑胶质瘤 U87 细胞的侵袭迁移, 然而其相关机制尚需我们将进一步研究。

总之, 本研究发现 PI4P 可以促进人脑胶质瘤 U87 细胞的侵袭迁移, 为研究人类脑胶质瘤的发生机制提供了又一个基础平台, 为进一步治疗脑胶质瘤提供了新的治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Packer RJ. Brain tumors in children[J]. Arch Neurol, 1999, 56(4): 421-425.
- [2] Albright AL, Packer RJ, Zimmerman R, et al. Magnetic resonance scans should replace biopsies for the diagnosis of diffuse brain stem gliomas: a report from the Children's Cancer Group[J]. Neurosurgery, 1993, 33(6): 1026-1029.
- [3] Bishé B, Syed GH, Field SJ, et al. Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in hepatitis C virus secretion[J]. J Biol Chem, 2012, 287(33): 27637-27647.
- [4] Li H, Guo L, Chen SW, et al. GOLPH3 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients

- with clinically N0 oral tongue cancer[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 168.
- [5] Wang JH, Chen XT, Wen ZS, et al. High expression of GOLPH3 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45622.
- [6] Kunigou O, Nagao H, Kawabata N, et al. Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1337-1342.
- [7] Scott KL, Kabbarah O, Liang MC, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer[J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1085-1090.
- [8] Dai T, Zhang D, Cai M, et al. Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) promotes hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by activating the NF-kappaB pathway[J]. *J Pathol*, 2015, 235(3): 490-501.
- [9] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(Suppl 5): v1-v49.
- [10] Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 36-47.
- [11] Zhang Y, Ma M, Han B. GOLPH3 high expression predicts poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 10833-10839.
- [12] Peng J, Fang Y, Tao Y, et al. Mechanisms of GOLPH3 associated with the progression of gastric cancer: a preliminary study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e107362.
- [13] Ma Y, Ren Y, Zhang X, et al. High GOLPH3 expression is associated with a more aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma[J]. *Virchows Archiv*, 2014, 464(4): 443-452.
- [14] JianXin J, Cha Y, ZhiPeng L, et al. GOLP3 is a predictor of survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(4): E233-E242.
- [15] Zhou X, Zhan W, Bian W, et al. GOLPH3 regulates the migration and invasion of glioma cells through RhoA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(3): 338-344.
- [16] Chu KME, Minogue S, Hsuan JJ, et al. Differential effects of the phosphatidylinositol 4-kinases, PI4KIIalpha and PI4KIIIbeta, on Akt activation and apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1(12): e106.
- [17] Tokuda E, Itoh T, Hasegawa J, et al. Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and invasive cell migration in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 3054-3066.

(本文编辑: 俞燕)