

抗失巢凋亡对胶质瘤细胞增殖和生存的影响

高力扬¹, 杨帆², 李锦宏², 龙霄翱², 陈兵^{2*}

1. 广东医科大学附属医院干细胞研发与转化中心, 广东 湛江 524001

2. 广东医科大学附属医院神经外科, 广东 湛江 524001

摘要:目的 抗失巢凋亡与肿瘤侵袭扩散密切相关, 本研究主要揭示抗失巢凋亡对 U87 胶质瘤细胞增殖、生存能力的影响及机制, 对了解脑胶质瘤转移有一定意义。方法 本研究构建了稳定表达 EGFP(增强绿色荧光蛋白)的人脑胶质瘤 U87 细胞, 并利用 EGFP 表达监控悬浮培养条件下细胞聚集情况。通过 CCK-8 细胞增殖检测、平板克隆形成检测、流式细胞周期检验及荧光定量 PCR 技术, 研究抗失巢凋亡对 U87 细胞的增殖、生存的影响及其机制。结果 抗失巢凋亡细胞的增殖能力显著增加, 单克隆形成能力增强, G1 期细胞所占百分比显著减少, 而 S 期细胞百分比显著增加, 并且抗失巢凋亡 U87 细胞中 OCT4、SOX1、CCND 等基因表达上调($P < 0.05$)。结论 失巢凋亡的胶质瘤细胞对生存环境依赖性较弱, 具有更强的增殖和自我更新能力。

关键词:失巢凋亡; 脑胶质瘤细胞; 悬浮培养

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.05.002

Effects of anoikis resistance on glioma cell proliferation and survival

GAO Li-Yang¹, YANG Fan², LI Jin-Hong², LONG Xiao-Ao², CHEN Bing^{2*}. 1 Stem cell research center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001; 2 Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001

Abstract: Objective Anoikis resistance is closely associated with tumor invasion and metastasis. This study aimed at determining the effects of anoikis resistance on the proliferation and survival of U87 glioma cells and revealing their mechanisms in order to contribute to the understanding of glioma metastasis. **Methods** The enhanced green fluorescent protein-expressing human glioma cell line U87 was established to monitor the formation of cell aggregates in suspension culture. CCK-8 proliferation assay, colony formation assay, flow cytometry analysis of cell cycle, and real-time PCR were used to determine the effects of anoikis resistance on the proliferation and survival of U87 cells. **Results** The anoikis-resistant U87 cells had significantly increased cell proliferation, enhanced colony formation ability, significantly reduced percentage of cells in G1 phase, and significantly increased percentage of cells in S phase. Moreover, the stem cell-related genes OCT4 and SOX1 and proto-oncogene CCND1 were up-regulated in anoikis-resistant U87 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Anoikis-resistant glioma cells are less dependent on survival environment with more robust proliferation and self-renewal capacity.

Key words: Anoikis; Glioma; Suspension culture

细胞增殖、分化及动态平衡由邻近细胞或周围环境所影响^[1], 而失巢凋亡(Anoikis)是一种特殊条件下的细胞程序性死亡, 由细胞脱离细胞外基质或脱离其他细胞而诱发^[2]。而在病理情况下, 癌细

胞可以逃逸失巢凋亡^[3]。脑胶质瘤的抗失巢凋亡能力会促进胶质瘤细胞入侵邻近的脑实质(brain parenchyma), 进而导致胶质瘤侵袭复发。人脑胶质瘤 U87 细胞被广泛用于胶质瘤研究, 部分研究发

基金项目: 广东省卫生厅项目 A2015483

收稿日期: 2016-08-21; 修回日期: 2016-10-12

作者简介: 高力扬(1981-), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 干细胞、神经肿瘤细胞。

通讯作者: 陈兵(1970-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 神经肿瘤。

现从 U87 细胞系中可以分离培养出胶质瘤干细胞,说明 U87 细胞中可能含有胶质瘤干细胞亚群。而肿瘤干细胞具备抗失巢凋亡的能力,并且与肿瘤侵袭和复发密切相关,因此,本研究拟选取 U87 细胞系探讨失巢条件下胶质瘤的生物学特征变化,以期对胶质瘤的临床治疗提供一定线索。

1 材料与方法

1.1 试剂

OCT4 抗体、poly-hema 购自 Sigma 公司;CD133, Nanog 抗体购自义翘神州公司;FITC 荧光二抗购于中杉金桥公司;慢病毒、Polybrene 购自吉玛基因公司;嘌呤霉素购自 Hyclone 公司;胰酶、胎牛血清、高糖培养液购自 Gibco 公司;总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;逆转录试剂盒购自 Takara 公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司。

1.2 U87 胶质瘤细胞株的构建

接种 5×10^5 个 U87 胶质瘤细胞于 60 mm 皿中,加培养基 4 ml,当细胞融合率为 40% ~ 60% 时用携带 EGFP 质粒的慢病毒进行感染。将 $100 \mu\text{l}$ 的 1×10^8 TU/ml 的病毒加入细胞培养基,感染时添加 $5 \mu\text{g/ml}$ 的 Polybrene 以提高感染效率。细胞孵育 24 h 后换液继续培养,并于 72 小时后观察荧光表达情况,加入 $1 \mu\text{M}$ 嘌呤霉素筛选细胞,并扩大培养。

1.3 失巢凋亡耐受胶质瘤细胞 U87 细胞筛选

贴壁培养 U87 细胞,取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化后,弃去上清液,重悬浮细胞于 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中。收集 1×10^6 个细胞悬浮于 30 mg/ml 浓度的 poly-hema 包被的 60 mm 细胞培养皿中。收集悬浮培养 10 天的细胞团,用胰酶消化后,重新贴壁培养。

1.4 平板细胞克隆形成试验

取悬浮培养筛选后的 U87 胶质瘤细胞和未处理的 U87 胶质瘤细胞,贴壁培养两天后收集细胞,利用 0.25% 胰蛋白酶消化后吹打成单个细胞,离心后弃去上清液并重悬细胞于 10% FBS 的高糖 DMEM 中。分别进行细胞计数,最终接种 500 个细胞于 60 mm 培养皿中,接种一周后加入甲醛固定并用结晶紫染液染色。将平皿叠加于网格上,统计克隆数并计算克隆形成率。

1.5 mRNA 的提取及荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

取对数生长期细胞培养,待细胞 90% 融合后

消化收集细胞。利用总 RNA 提取试剂盒提取 mRNA,电泳法检测 mRNA 质量。利用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA,然后根据检测试剂盒操作说明建立反应体系,进行实时荧光定量 PCR 检测,并用 ROCHE LightCycler480 II 荧光定量 PCR 仪检测。基因表达分析采用相对定量,通过管家基因 RNA 对目的基因表达水平的校准来衡量目的基因的 RNA 的表达水平。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

将对数期细胞接种后培养,利用无血清培养液同步化细胞 2 h 后,消化收集细胞,冷磷酸盐缓冲液 (PBS, GIBCO) 润洗后加入 70% 预冷的乙醇,4℃ 固定 24 h 后重新收集细胞,使用细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒处理细胞,使用 BD FACSCantoII 流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测红色荧光,同时检测光散射情况。

1.7 统计学处理

数据统计学处理采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较采用 T 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 U87 胶质瘤细胞的特征鉴定

流式细胞仪分析显示,脑胶质瘤 U87 细胞中三种干细胞相关标记物 CD133 表达约 79%,NANOG 表达约 99%,而胚胎干细胞多能性相关转录因子 OCT4 的表达达到 100% (图 1)。

2.2 U87 抗失巢凋亡细胞的筛选及特性

为了筛选抗失巢凋亡的 U87 细胞,本实验采取了悬浮培养法。U87 细胞收集后悬浮于低吸附培养皿中。结果发现,部分细胞聚集成团状,并且连续培养 10 天后消化细胞,细胞可以继续贴壁生长。为了直观检测细胞团中细胞的存活情况,本实验构建了表达 EGFP 的 U87 细胞株。利用携带 EGFP 质粒的慢病毒感染 U87 细胞并筛选后,发现 U87 细胞有明显的 EGFP 表达 (图 2A)。将稳定表达 EGFP 的 U87 细胞悬浮培养 2 天后,发现细胞可以聚集成大小不一的球形细胞团,随着培养时间的增加,部分细胞团连接成形状不规则的大细胞团 (图 2)。

连续培养细胞团 10 天后消化为单个细胞,并贴壁培养。CCK-8 细胞增殖实验发现,悬浮聚集筛选后的抗失巢凋亡 U87 细胞增值率明显高于对照组 (图 3A),且平板克隆形成率显著增加 (图 3B,3C)。

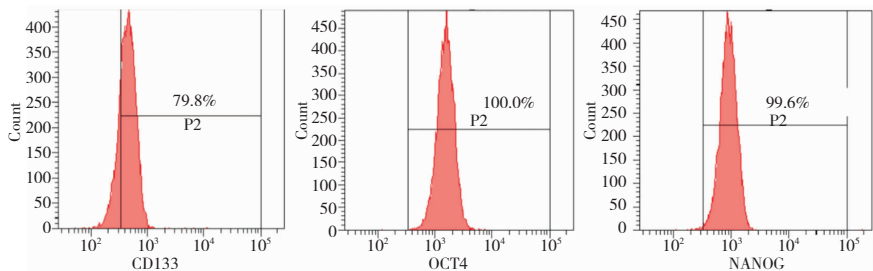


图 1 部分干细胞特异性标记物在 U87 细胞中的表达。

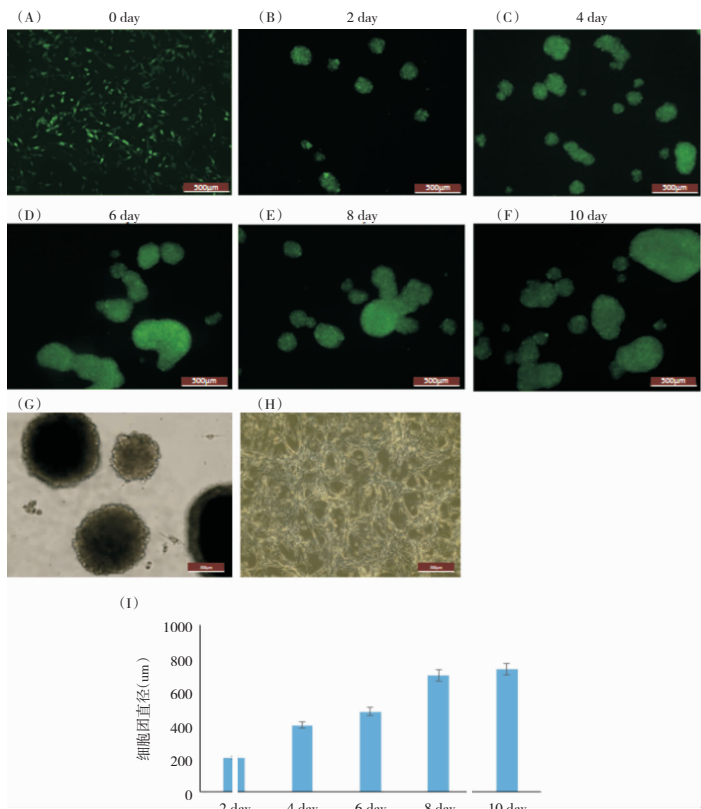


图 2 悬浮培养法筛选抗失巢凋亡 U87 细胞。(A) U87-EGFP 细胞贴壁培养形态。(B-F) 悬浮培养 U87-EGFP 2 天至 10 天过程中细胞团 EGFP 表达情况及细胞团形态的改变。(G) 白光下第 10 天 U87 细胞团形态。(H) 悬浮培养 10 天后, 细胞团消化后重新贴壁培养的细胞形态(I) U87-EGFP 细胞团直径变化。

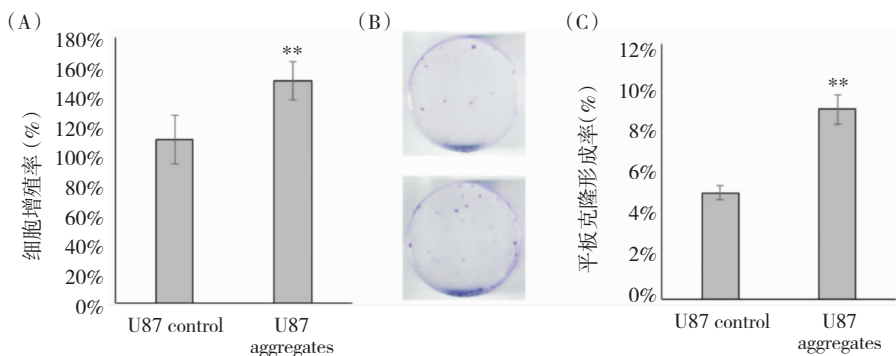


图 3 抗失巢凋亡细胞增殖及克隆形成能力变化。(A) 培养 48h 后 Cck-8 检测细胞增殖率变化。(B) 平板克隆实验。(C) 抗失巢凋亡 U87 细胞克隆形成率变化。* * 0.001 < P < 0.05。

流式结果发现,经过悬浮聚集筛选后的抗失巢凋亡 U87 细胞,处于 DNA 合成前期 (G1 期) 的细胞数显著降低,而处于 DNA 合成期 (S 期) 的细胞

百分比增加,而 DNA 合成后期 (G2) 期细胞无显著变化 (图 4)。

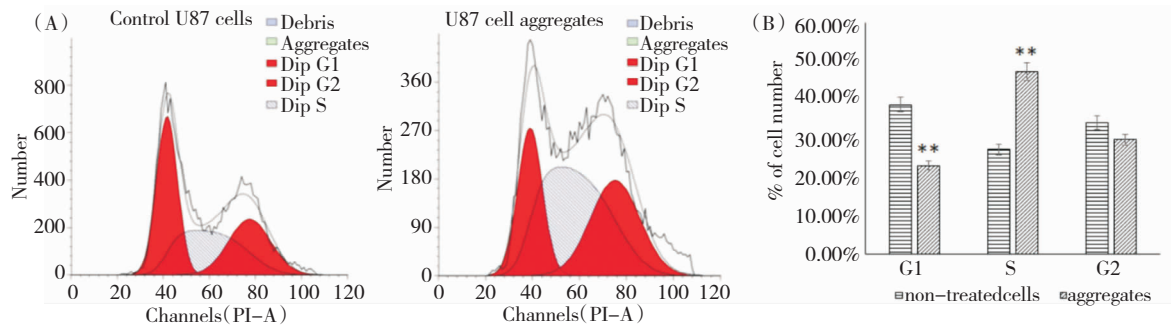


图 4 抗失巢凋亡细胞周期变化。(A) FACS 结果。(B) 不同细胞期细胞比例变化。* * 0.001 < P < 0.05。

mRNA 表达的检测发现,与对照组相比,抗失巢凋亡组中 CCND1, SOX1, OCT4 显著增加,而 c-Myc, MMP7, MMP14, PAX6, NESTIN, TUJ1, GFAP, SOX2, NANOG 表达差异不显著 (图 5)。

3 讨论

以往研究发现 U87 细胞系中可以分离出具有自我更新和分化能力的胶质瘤干细胞亚群^[4,5]。本研究发现 U87 细胞中有较强的 OCT4, CD133 及 NANOG 等干性相关细胞因子的表达。说明本研究使用的 U87 脑胶质瘤细胞具有部分胶质瘤干细胞的特征。利用超低粘附培养皿阻止细胞贴壁的悬浮培养法是在肿瘤研究中构建失巢凋亡模型的常用方法^[6],本研究采用 poly-HEMA 包被的方式阻碍脑 U87 细胞的贴壁生长,迫使细胞悬浮生长,从而减弱细胞与环境及细胞与细胞之间的接触,最终达到诱导细胞失巢凋亡的目的。实验结果发现悬浮培养的 U87 细胞并没有发生大规模失巢凋亡的现象,而是聚集形成的大小不一的细胞团,这些细胞团消化后可重新贴壁生长。为了直观的检测细胞团中细胞是否存活,本研究构建了可以表达绿色荧光蛋白的 U87-EGFP 细胞株。通过观察 U87-EGFP 细胞团,发现大多数失去粘附条件的 U87-EGFP 细胞通过形成细胞聚集的方式抵抗失巢凋亡。以上结果提示脑胶质瘤 U87 细胞是具有抗失巢凋亡能力的细胞系。

经过悬浮聚集培养筛选后的 U87 胶质瘤细胞增殖速率显著提高而且单个细胞成克隆能力显著增强。说明细胞对群体依赖性减弱而对生存环境的适应性增强。细胞周期是细胞增殖的最终调控途径,实验发现,抗失巢凋亡的胶质瘤细胞中 G0/G1 期细胞占总细胞比例下降,而 S 期细胞所占比例上升,G2 期细胞数量变化不显著。这些结果表明抗失巢凋亡细胞的分裂和 DNA 合成比对照组细

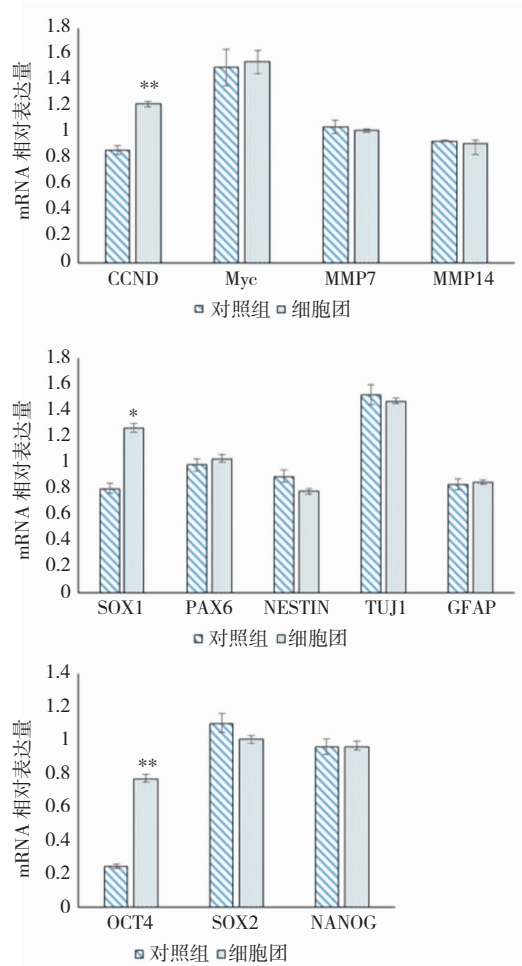


图 5 RT-qPCR 分析基因相对表达情况。

胞加快,加速其由 G0/G1 期向 S 期转换,从而导致胶质瘤细胞增殖加快、细胞活性增强。为了探讨细胞周期改变的原因,我们分析了部分细胞周期相关基因。CCND1 是编码细胞周期蛋白 D1 (Cycling D1) 的基因,细胞周期调控中起到重要作用,细胞周期蛋白 D1 参与调控转录因子 E2F 的表达,而 E2F 是驱动细胞由 G1 期进入 S 期、促进细胞增殖的因素^[7,8]。以往研究发现过表达细胞信号蛋白 D1 会引起细胞 G1/S 期调控异常,从而使细胞发生不可以异常增殖^[9]。本研究发现 CCND1 的表达显著上调,可能是抗失巢抑制胶质瘤细胞周期发生改变的原因之一。而与细胞生长调控、分化相关基因 c-Myc,与细胞降解细胞外基质能力相关基因 MMP7、MMP14 则没有显著变化,说明悬浮聚集培养 U87 细胞不会促进侵袭、转移相关基因的表达。

基因分析进一步发现,神经分化相关的神经干细胞特异性标志物巢蛋白基因 NESTIN、神经元特异性分化蛋白基因 TuJ1、神经系统星形胶质细胞活化标志物神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 基因表达无明显变化。说明悬浮聚集培养对 U87 细胞分化相关基因表达无明显影响。SOX1 主要表达于神经外胚层细胞,在胚胎神经发育早期发挥决定细胞分化和命运,并且在整个中枢神经系统发育中发挥调控作用^[10]。实验结果显示抗失巢凋亡 U87 细胞中 SOX1 基因表达增加,可能与保持胶质瘤细胞未分化状态有关。进而对三种重要的干细胞干性相关转录因子 OCT4、NANOG、SOX2 的基因表达研究发现,OCT4 编码基因 POU5F1 表达显著增加。近年来,OCT4 被发现与胶质瘤恶性程度正性相关^[11],OCT4 基因表达的增加可能有助于维持抗失巢凋亡 U87 细胞的未分化状态,使其肿瘤干细胞特征更为显著。而且 OCT4 表达量的增加是促进 CCND1 基因表达的因素之一^[12]。综上所述,SOX1 和 OCT4 等干细胞相关基因表达的增加,可能是促进抗失巢凋亡细胞自我更新的内在原因,直接导致抗失巢凋亡细胞具有更强的生存和自我扩增能力。

4 结论

1 研究发现 U87 胶质瘤细胞具有部分干细胞特征,U87 细胞在失巢情况下没有发生大规模失巢凋亡,而是聚集成团生长,这些抗失巢凋亡细胞的增殖速率和生存能力显著增强。其中细胞周期调

控的改变和细胞周期调控基因的表达上调,可能是促进增殖的内在原因。而细胞中 SOX1、OCT4 基因表达的上调,可能是细胞生存、扩张能力增强的条件。本研究证明抗失巢凋亡的胶质瘤细胞对生存环境依赖性较弱,具有更强的增殖和自我更新能力,这些细胞可能是胶质瘤在颅内侵袭复发的重要因素。

参 考 文 献

- [1] Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22 (1): 287-309.
- [2] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, 124 (4): 619-626.
- [3] Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 1994, 10 (10): 9-22.
- [4] 苑召虎,胡子有,张兰兰,等. 槲皮素对胶质瘤 U87 细胞侵袭、迁移、增殖及其细胞周期的影响. *南方医科大学学报*, 2013, 33 (2): 29-33.
- [5] 刘于海,牛朝诗,李冬雪. 血清剥夺法分离 u87 细胞系中的胶质瘤干细胞. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14 (1): 6-10.
- [6] Bao W, Qiu H, Yang T, et al. Upregulation of TrkB Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Anoikis Resistance in Endometrial Carcinoma. AgoulNIK IU, editor. *PLoS One*, Public Library of Science, 2013, 8 (7): 670-692.
- [7] Zhou J, Li Lu, Fang LI, et al. Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells. *Oncol Lett*, 2016, 12 (1): 516-522.
- [8] Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (11): 785-797.
- [9] Noel EE, Yeste-Velasco M, Mao X, et al. The association of CCND1 overexpression and cisplatin resistance in testicular germ Cell tumors and other cancers. *Am J Pathol*, 2010, 176 (6): 2607-2615.
- [10] Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, et al. A role for SOX1 in neural determination. *Development*, 1998, 125 (10): 1967-1978.
- [11] Bo W, Huang TJ, Zheng YY. The expression and significance of Sox2 and Oct4 in human glioma tissue. *China Mod Medicine*, 2015, 22 (9): 18-21.