

黏蛋白 16 在神经胶质瘤组织中表达及意义

杜顺利¹, 王衍刚¹, 吴家斌¹, 张俊杰¹, 闫东明²

1. 焦作市人民医院神经外科一区, 河南 焦作 454000

2. 郑州大学第一附属医院神经外科, 河南 郑州 450001

摘要:目的 检测黏蛋白 16 (MUC16) 在神经胶质瘤组织中的表达情况, 探讨下调 MUC16 基因表达对 U87 细胞增殖、迁移和侵袭力的影响。**方法** 选取 2013 年 5 月—2019 年 5 月在焦作市人民医院行手术治疗的神经胶质瘤患者 86 例及因颅脑外伤行手术治疗的正常脑组织患者 45 例。免疫组织化学法检测神经胶质瘤和正常脑组织中 MUC16 蛋白表达水平, 培养 U87 细胞并分为 MUC16 干扰组、阴性对照组和空白组, 分别利用实时荧光定量 PCR、MTT 法、划痕实验和 Transwell 法检测 U87 细胞中 MUC16 表达情况, 以及各组细胞增殖、迁移和侵袭能力。**结果** MUC16 蛋白在神经胶质瘤患者中阳性表达率 73.26%, 正常脑组织为 26.67%, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$); MUC16 蛋白在不同 WHO 分级阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MUC16 干扰组 MUC16 mRNA 相对表达量, 24、48、72 和 96 h 时吸光度 (A) 值, 24 和 48 h 时划痕愈合率、侵袭细胞数均低于阴性对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 神经胶质瘤组织中 MUC16 呈高表达, 且与 WHO 分级呈正相关, 下调 U87 细胞中 MUC16 基因表达可抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力。

关键词: 神经胶质瘤; 黏蛋白 16; 临床病理指标; 细胞迁移; 细胞侵袭

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.06.003

Expression and significance of mucin 16 in glioma

DU Shun-Li¹, WANG Yan-Gang¹, WU Jia-Bin¹, ZHANG Jun-Jie¹, YAN Dong-Ming². 1. Department of Neurosurgery, Jiaozuo People's Hospital, Henan Jiaozuo 454000, China; 2. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450001

Corresponding author: YAN Dong-Ming, Email: 2934670442@qq.com

Abstract: Objective To investigate the expression of mucin 16 (MUC16) in glioma tissues, and the effect of down-regulation of MUC16 gene expression on proliferation, migration and invasion of human glioma U87 cells. **Methods** A total of 86 cases of patients with glioma who underwent surgery treatment in our hospital were selected from May 2013 to May 2019. In the same period, 45 patients undergoing surgical treatment for craniocerebral trauma in our hospital were selected. The expressions of MUC16 proteins in glioma and normal brain tissues were detected by using immunohistochemistry. The U87 cells were cultured and divided into MUC16 interference group, negative control group and blank group. Real-time fluorescent quantitative PCR, MTT, scratch experiment and Transwell method were used to detect the expression of MUC16 in cells, and cell proliferation, migration and invasion ability. **Results** The positive expression rate of MUC16 protein in glioma patients was 73.26%, which was higher than 26.67% in the normal brain tissues, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 26.200$, $P < 0.001$). The difference of the positive expression rate of MUC16 protein between different WHO grades were statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression level of MUC16 mRNA in the cells, and the absorbance A values at 24, 48, 72 and 96 h, the scratchhealing rates at 24 and 48 h, the number of invasive cells in the MUC16 interference group were lower than those in the negative control group and the blank group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** MUC16 is highly expressed in glioma tissues and is positively correlated with WHO grade. Down-regulation of

基金项目: 河南省科技发展计划 (172102410015)

收稿日期: 2020-10-27; 修回日期: 2020-11-30

作者简介: 杜顺利 (1976-), 男, 副主任医师, 本科, 医学学士, 主要从事神经外科疾病的诊断和治疗。

通信作者: 闫东明, 男, 主任医师, Email: 2934670442@qq.com。

MUC16 gene expression in U87 cells can inhibit cell proliferation, migration and invasion ability.

Key words: glioma; mucin 16; clinicopathological indicators; cell migration; cell invasion

神经胶质瘤恶性程度高、侵袭力强,尽管现有的综合治疗策略不断改善,但治疗效果依然不尽人意,治疗后复发、转移或耐药发生风险高,总体预后仍较差^[1]。有研究指出^[2],细胞基底膜与细胞外基质降解减少细胞间黏附,在肿瘤侵袭转移中发挥关键性作用。黏蛋白(Mucin, MUC)作为一种糖蛋白,不仅在细胞间信号传递中发挥重要作用,而且与细胞间黏附及免疫反应密切相关^[3],近年来其在肿瘤中的作用越来越受到重视,不仅可通过减少肿瘤细胞间黏附力而加速细胞转移扩散^[4],而且可通过调控免疫系统而使肿瘤细胞逃避免疫杀灭^[5]。MUC16作为MUC家族成员,参与了胆囊癌^[6]、胃癌^[7]等多种恶性肿瘤发生进展,但其在神经胶质瘤中的作用鲜有报道。本研究分析了神经胶质瘤组织中MUC16蛋白表达,探讨其与临床病理指标及预后的相关性,并通过特异性沉默人胶质瘤细胞U87中MUC16基因的表达,观察其对该细胞增殖、迁移和侵袭力的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 选取2013年5月—2019年5月在焦作市人民医院行手术治疗且资料完整的神经胶质瘤患者86例,术前均未行放化疗,术后病理学检查证实为神经胶质瘤。男性48例,女性38例;年龄34~75岁,平均 (53.24 ± 9.62) 岁。同期,选取在我院因颅脑外伤行手术治疗的患者45例。男性27例,女性18例,年龄32~74岁,平均 (54.02 ± 10.13) 岁。两组性别构成比、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究通过医院医学伦理委员会批准(批准号:JZRMYY201303182263),所有患者均行知情同意。

1.1.2 主要试剂和设备 免疫组织化学(简称免疫组化)试剂盒及配套试剂购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗人MUC16多克隆抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,U87细胞购自南京康佰生物科技有限公司,DMEM培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司,MUC16干扰序列及阴性对照序列由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,MUC16和内参引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,总RNA提取试剂和

Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录和PCR扩增试剂盒购自北京诺博莱德科技有限公司,Transwell小室购自上海坤肯生物化工有限公司,Matrigel基质胶购自美国BD公司,实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法检测神经胶质瘤和正常脑组织中MUC16蛋白表达 取组织标本,多聚甲醛固定,脱水、石蜡包埋,4 μm厚切片、水化,置于枸橼酸钠缓冲液中加热行抗原修复,加入3%过氧化氢溶液中以灭活内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次。加入一抗兔抗人MUC16多克隆抗体(1:1200稀释),4℃下过夜孵育,PBS冲洗3次,加入生物素标记二抗,室温反应60 min,PBS冲洗3次,加入DAB,苏木素复染,脱水、透明、封片,镜下观察。以PBS替代一抗作为阴性对照。所有切片均由病理科具有副高级职称的医师双盲法完成阅片。以细胞膜或细胞质中出现淡黄色或黄褐色染色为阳性,随机取5个高倍视野,采用半定量法^[8]对结果进行评价:①染色强度:从无染色、淡黄、棕黄、黄褐色依次赋予0、1、2、3分;②阳性细胞比例:从<5%、5%~25%、>25%~50%、>50%~75%、>75%依次赋予0、1、2、3、4分;③将①和②相乘,0~3分为阴性(-),≥3分为阳性(+)

1.2.2 细胞培养和分组 在含5%二氧化碳CO₂的37℃的恒温培养箱中用含10%胎牛血清的DMEM培养液对U87细胞培养,待细胞密度达70%以上时,胰酶消化,传代。取对数生长期细胞,使用Lipofectamine™ 2000转染试剂进行分组转染。①MUC16干扰组,转染MUC16的干扰序列:正向5'-CACCGATGATGATGATGATGGGG-3',反向5'-AAACCCCCATCATCATCATCATC-3';②阴性对照组,转染阴性对照序列:正向5'-GAGGGCCTATTTC-CCATGATTCC-3',反向5'-GTTGGCGCGTCAGCCAG-GCGGGC-3';③空白组:不作任何处理。转染完成后继续培养48 h。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测细胞中MUC16表达 经酶处理48 h的细胞,离心取细胞沉淀,PBS冲洗3次,加入细胞裂解液,用总RNA提取试剂提取总RNA并检测其纯度。按逆转录试剂盒说明进

行逆转录获得模板链 cDNA,使用实时荧光定量 PCR 仪按照 PCR 扩增试剂盒说明书步骤对引物进行扩增,引物序列:MUC16,正向 5'-ACATCAACTC-CTGCCTTCCCAGAA-3',反向 5'-ACCAGTGGGCAT-TCCAGAAAGAGA-3'; β -actin,正向 5'-GTCCACCG-CAAATGCTTCTA-3',反向 5'-TGCTGTCACCTTCAC-CGTTT-3'。反应条件:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,74℃ 延伸 30 s,行 38 个循环。每个样品设 6 个平行复孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞中 MUC16 mRNA 相对表达量。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖力 取各组转染后细胞,胰酶消化,接种于 96 孔板,密度 5×10^3 /孔,每孔 3 板,将含 10% 胎牛血清的培养液 100 μ L 加入各孔,分别于 12、24、48、72 和 96 h 时停止培养,加入 MTT 液 20 μ L,孵育 4 h,弃上清,各孔加入 150 μ L 的 DMSO,振荡 5 min,用酶标仪检测各孔吸光度(A)值。

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移力 用 Marker 笔在无菌 6 孔板背面每间隔 1 cm 划横线,将经酶处理 48 h 的细胞接种于 6 孔板,继续培养至细胞融合度在 90% 以上,用 200 μ L 的移液管枪头在 6 孔板内垂直于横线划痕,PBS 冲洗 3 次,加入无血清培养液,继续培养。分别于 0、24 和 48 h 时测量划痕两边细胞间距离,计算划痕愈合率 = (0 h 划痕

宽度 - 24 或 48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 \times 100%。

1.2.6 Transwell 法检测细胞侵袭力 取 Transwell 小室,将 Matrigel 基质胶用无血清培养液稀释后平铺于小室上室,过夜风干备用。经酶处理 48 h 的细胞,离心取细胞沉淀,用无血清培养液重悬,密度调整为 2.5×10^5 /mL,将 200 μ L 的细胞悬液加入小室上室,下室则加入 600 μ L 含 20% 胎牛血清的培养液,培养箱中培养 48 h,多聚甲醛固定,结晶紫染色,并将散落细胞擦除。镜下观察,取 5 个视野计数穿膜细胞数,重复实验 3 次。

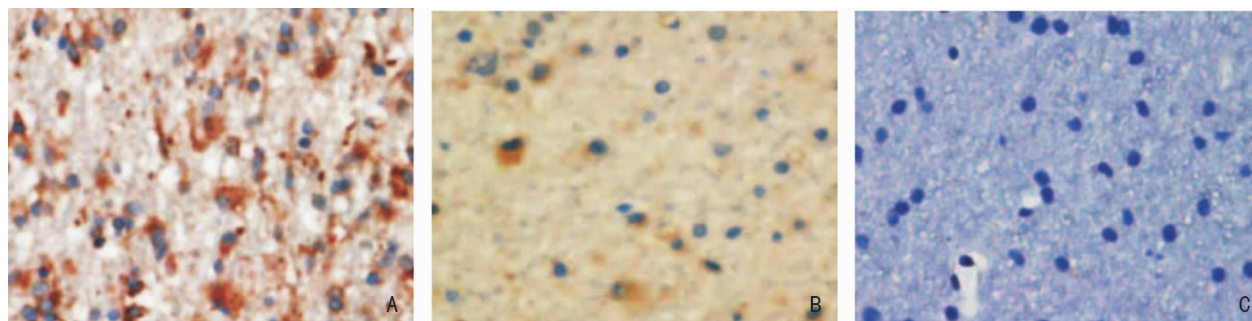
1.3 统计学方法

使用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验,计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经胶质瘤和正常脑组织中 MUC16 蛋白表达

MUC16 蛋白在神经胶质瘤患者中阳性表达率为 73.26% (63/86),正常脑组织中的为 26.67% (12/45),两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 26.200, P < 0.001$)。见图 1。



A: 高级别神经胶质瘤; B: 低级别神经胶质瘤; C: 正常脑组织

图 1 免疫组化法检测 MUC16 蛋白在神经胶质瘤和正常脑组织中表达 (SP, $\times 400$)

2.2 MUC16 蛋白在不同临床病理指标间表达差异性

MUC16 蛋白在不同年龄、性别、病理学类型、肿瘤部位和卡诺夫斯凯计分(KPS)间阳性表达率

比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而在不同 WHO 分级间阳性表达率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 MUC16 蛋白在不同临床病理指标间表达差异性 例(%)

指标	n	MUC16 蛋白		χ^2 值	P 值
		+	-		
年龄					
<53 岁	41	31(75.61)	10(24.39)	0.222	0.638
≥53 岁	45	32(71.11)	13(28.89)		
性别					
男性	48	37(77.08)	11(22.92)	0.812	0.367
女性	38	26(68.42)	12(31.58)		
病理学类型					
胶质母细胞瘤	37	28(75.68)	9(24.32)	0.523	0.770
少突胶质细胞瘤	31	23(74.19)	8(25.81)		
星形胶质细胞瘤	18	12(66.67)	6(33.33)		
肿瘤部位					
幕上	54	41(75.93)	13(24.07)	0.528	0.467
幕下	32	22(68.75)	10(31.25)		
WHO 分级					
I、II 级	34	20(58.82)	14(41.18)	5.978	0.014
III、IV 级	52	43(82.69)	9(17.31)		
KPS					
≥80 分	35	24(68.57)	11(31.43)	0.661	0.416
<80 分	51	39(76.47)	12(23.53)		

2.3 3 组细胞中 MUC16 mRNA 表达量

MUC16 干扰组、阴性对照组和空白组细胞中 MUC16 mRNA 相对表达量分别为(0.28±0.08)、(0.97±0.07)和(1.01±0.10),三组比较,差异有统计学意义($F=139.504, P=0.000$);阴性对照组和空白组细胞中 MUC16 mRNA 相对表达量比较,差异无统计学意义($P=0.407$),MUC16 干扰

组细胞中 MUC16 mRNA 相对表达量低于阴性对照组和空白组($P<0.05$)。

2.4 3 组细胞增殖活力

3 组细胞 A 值在 24、48、72 及 96 h 时比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。MUC16 干扰组细胞 24、48、72 和 96 h 时 A 值均低于阴性对照组和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 3 组细胞增殖活力比较 (A, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
MUC16 干扰组	0.16±0.04	0.24±0.10	0.34±0.08	0.41±0.04	0.56±0.08
阴性对照组	0.21±0.07	0.40±0.09*	0.53±0.10*	0.73±0.07*	0.81±0.17*
空白组	0.17±0.04	0.43±0.07*	0.54±0.05*	0.71±0.04*	0.85±0.06*
F 值	1.307	8.365	11.829	80.353	11.257
P 值	0.300	0.004	0.001	0.000	0.001

注: * 与 MUC16 干扰组比较, $P<0.05$

2.5 3 组细胞迁移力

3 组细胞在 24 和 48 h 的划痕愈合率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。MUC16 干扰组细胞 24 和 48 h 时划痕愈合率均低于阴性对照组和空白组($P<0.05$)。见表 3 和图 2。

2.6 3 组细胞侵袭力

MUC16 干扰组、阴性对照组和空白组侵袭细胞数分别为(82.00±8.90)、(119.67±7.99)和(122.67±12.80)个,三组比较,差异有统计学意义($F=30.119, P=0.000$);阴性对照组和空白

组侵袭细胞数差异无统计学意义($P=0.615$),MUC16 干扰组侵袭细胞数低于阴性对照组和空白组($P<0.05$)。见图 3。

表 3 3 组细胞 24 h 和 48 h 时划痕愈合率 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h
MUC16 干扰组	11.00±2.76	25.17±4.54
阴性对照组	35.17±7.70*	47.50±6.50*
空白组	37.33±6.28*	48.83±7.36*
F 值	36.140	27.189
P 值	0.000	0.000

注: * 与 MUC16 干扰组比较, $P<0.05$

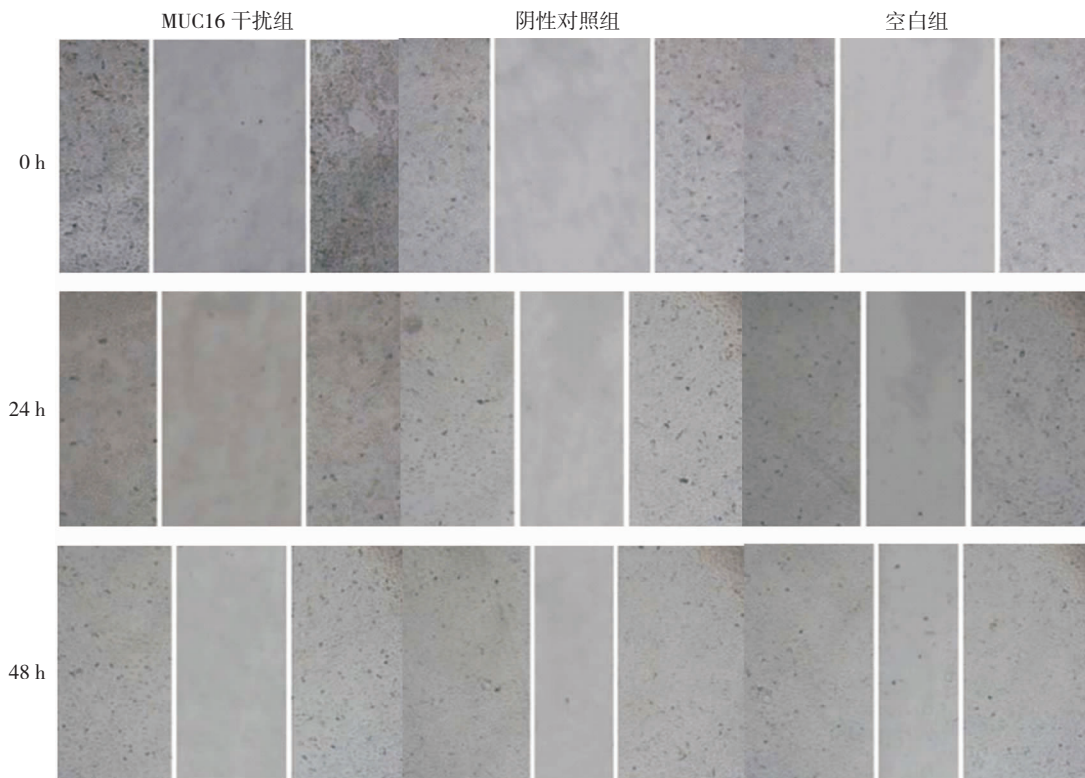
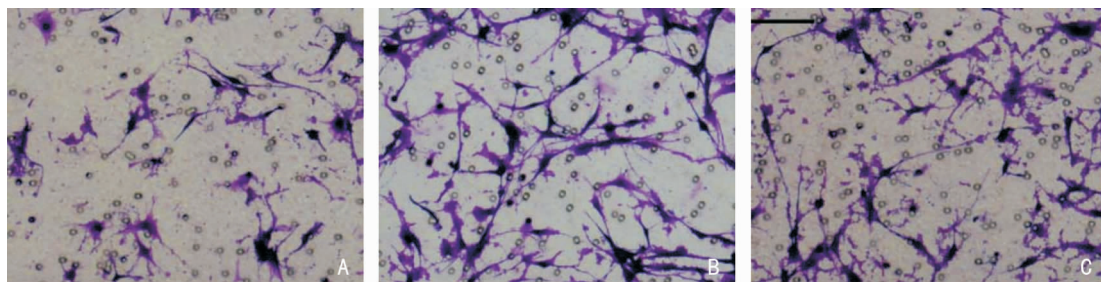


图 2 划痕实验检测细胞迁移情况 (×200)



A: MUC16 干扰组; B: 阴性对照组; C: 空白组

图 3 Transwell 法检测细胞侵袭能力 (结晶紫, ×200)

3 讨论

神经胶质瘤易脱离原发灶而转移至其他脑组织,手术根除的可能性微乎其微,导致患者总体生存时间短,死亡率高^[9],尽管临床上针对恶性肿瘤的综合治疗方案不断完善,但神经胶质瘤的易侵袭转移性致使这些治疗方案在改善患者预后方面疗效有限^[10]。随着分子靶向治疗技术在肿瘤治疗中的成功应用^[11],为神经胶质瘤的诊疗提供了新的方向,有望为神经胶质瘤诊疗打开突破口。MUC16 作为一种跨膜糖蛋白,定位于人染色体 19p13.2,在保护及修复上皮细胞中发挥重要作用^[12],研究发现^[13],MUC16 蛋白在受损或癌变上皮细胞中表

达异常。近年来研究发现^[14],其可能在促进肿瘤细胞浸润、转移、免疫逃逸中扮演重要角色。本研究表明,神经胶质瘤组织中 MUC16 蛋白呈高表达,提示 MUC16 可能参与了神经胶质瘤发病过程。本研究表明,MUC16 蛋白在 WHO 分级Ⅲ、Ⅳ级的神经胶质瘤组织中阳性表达率高于Ⅰ、Ⅱ级,说明其可能参与了神经胶质瘤病程进展,与其恶性程度有关。本研究对神经胶质瘤 U87 细胞中转染 MUC16 干扰序列,结果显示,MUC16 干扰组细胞中 MUC16 mRNA 相对表达量较阴性对照组和空白组降低,提示 U87 细胞中 MUC16 基因表达被抑制。本研究表明,MUC16 干扰组细胞

24、48、72 和 96 h 时吸光度值均低于阴性对照组和空白组,说明抑制 MUC16 基因表达可抑制细胞增殖活力,本研究结果显示,MUC16 干扰组细胞 24 和 48 h 时划痕愈合率及侵袭细胞数均低于阴性对照组和空白组,说明抑制 U87 细胞中 MUC16 基因表达可明显抑制细胞迁移力和侵袭力。

综上所述,神经胶质瘤组织中 MUC16 呈高表达,且与 WHO 分级呈正相关,下调 U87 细胞中 MUC16 基因表达可抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力,有望为神经胶质瘤机制研究及基因靶向治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Davis ME. Epidemiology and overview of gliomas[J]. Semin Oncol Nurs, 2018, 34(5): 420-429.
- [2] Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(6): 1147-1155.
- [3] Niv Y, Ho SB, Fass R, et al. Mucin expression in the esophageal malignant and pre-malignant states: a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Gastroenterol, 2018, 52(2): 91-96.
- [4] Jung YS, Wang WQ, Jun S, et al. Dereglulation of CRAD-controlled cytoskeleton initiates mucinous colorectal cancer via β -catenin[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(11): 1303-1314.
- [5] 曾替伦. 乳腺癌免疫治疗研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(1): 96-102.
- [6] 段海章, 陈进忠, 石岩, 等. MUC1 和 MUC16 在胆囊癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(18): 2892-2896.
- [7] Li XC, Pasche B, Zhang W, et al. Association of MUC16 mutation with tumor mutation load and outcomes in patients with gastric cancer[J]. JAMA Oncol, 2018, 4(12): 1691-1698.
- [8] 赵学英, 樊明德, 董文艳, 等. 三结构域蛋白 26 在胶质瘤组织中的表达及临床意义[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(3): 63-68.
- [9] Batash R, Asna N, Schaffer P, et al. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review[J]. Curr Med Chem, 2017, 24(27): 3002-3009.
- [10] Farazdaghi MK, Katowitz WR, Avery RA. Current treatment of optic nerve gliomas[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2019, 30(5): 356-363.
- [11] Guan LY, Lu Y. New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer[J]. Discov Med, 2018, 26(144): 219-229.
- [12] 刘畅, 张珉, 田兴. MUC16 对胆囊癌细胞生物学行为的调控作用及机制分析[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(5): 436-441.
- [13] 宋毓平, 张庆华, 龚丹妮, 等. MUC16 突变在皮肤恶性黑色素瘤患者预后中的作用分析[J]. 重庆医学, 2019, 48(19): 3333-3336.
- [14] Aithal A, Rauth S, Kshirsagar P, et al. MUC16 as a novel target for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(8): 675-686.