

# 自分泌运动因子AMF对人胶质母细胞瘤U251细胞 迁移、侵袭的影响及相关机制研究

李 阳<sup>1</sup> 汤 宁<sup>2</sup> 刘哲宇<sup>3</sup> 孙 铮<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>大连医科大学附属第一医院神经外科, 大连 116001; <sup>2</sup>大连医科大学药学院, 大连 116044;

<sup>3</sup>大连医科大学中西医结合基础研究所, 大连 116044)

**摘要** 为了探讨自分泌运动因子(autocrine motility factor, AMF)对人胶质母细胞瘤U251细胞迁移、侵袭影响及其相关分子机制, 该实验采用了RT-PCR及免疫印迹法检测RNA干扰AMF后U251细胞中AMF的表达变化; 细胞划痕实验、Transwell实验分别观察了AMF干扰前后U251细胞迁移、侵袭能力的变化; 免疫印记检测AMF干扰前后细胞中总Akt、p-Akt、Sox2、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloprotein-2, MMP-2)及MMP-9蛋白水平的变化。研究结果表明, AMF成功干扰后U251细胞的迁移和侵袭能力受到抑制, p-Akt、Sox2、MMP-2和MMP-9蛋白表达水平降低。该研究表明, AMF敲低可以通过下调PI3K/Akt信号通路活性及Sox2、MMP-2和MMP-9蛋白水平, 抑制人胶质母细胞瘤U251细胞迁移和侵袭。

**关键词** 胶质母细胞瘤; AMF; 迁移; 侵袭

## Effects of Autocrine Motility Factor (AMF) on the Migration and Invasion of Glioblastoma U251 Cells and Their Mechanism

Li Yang<sup>1</sup>, Tang Ning<sup>2</sup>, Liu Zheyu<sup>3</sup>, Sun Zheng<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Neurosurgery Department, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116001, China;

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

<sup>3</sup>Institute of Integrative Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**Abstract** To explore the effects of autocrine motility factor (AMF) on migration and invasion of U251 cells and their related mechanisms, the expression of AMF was interfered by siRNA. The expression of AMF in U251 cells was detected by RT-PCR and Western blot. Wound healing assay and transwell invasion were used to detect the migration and invasion ability of U251 cells. Western blot was used to detect the protein levels of total Akt, p-Akt, Sox2, MMP-2 and MMP-9 before and after down regulation of AMF. Our results showed that the migration and invasion ability of U251 cells, which AMF was down-regulated successfully, has been significantly inhibited. Protein levels of phosphorylation Akt, Sox2, MMP-2 and MMP-9 were decreased significantly compared with the control group. These results indicated that AMF has played an important role in inhibiting the migration and invasion of U251 cells, through down-regulation the expression of PI3K/Akt pathway, Sox2, MMP-2 and MMP-9 proteins.

**Keywords** glioblastoma; AMF; migration; invasion

收稿日期: 2015-07-13 接受日期: 2016-02-24

中国博士后科学基金面上项目(批准号: 2013M541232)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0411-86110192, E-mail: sunclank@163.com

Received: July 13, 2015 Accepted: February 24, 2016

This work was supported by the Grants of China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2013M541232)

\*Corresponding author. Tel: +86-411-86110192, E-mail: sunclank@163.com

网络出版时间: 2016-04-14 15:40:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160414.1540.002.html>

多形性胶质母细胞瘤简称为胶质母细胞瘤(glioblastoma mutiforme, GBM), 是星形细胞瘤中恶性程度最高的胶质瘤, 属WHO IV级。“多形”顾名思义, 是指细胞在病理、转录和基因组水平具有显著的肿瘤异质性。临床诊断中, GBM具有增殖失控、弥漫性浸润、倾向于坏死和强大的血管生成、抗凋亡及基因组不稳定等特点<sup>[1]</sup>。尽管目前手术切除以及放化疗技术都取得了长足的进步, 但在过去的十年里, GBM的中位患者生存期一直仅维持在1年左右。因此, 研究GBM浸润及转移的机制, 对GBM患者的治疗及预后尤为重要。

自分泌运动因子(autocrine motility factor, AMF)是肿瘤自身产生和分泌的细胞因子, 它能通过与细胞膜糖蛋白即自分泌运动因子受体(autocrine motility factor receptor, AMFR)结合刺激肿瘤细胞定向运动<sup>[2]</sup>。AMF与恶性肿瘤转移密切相关, 且AMF表达水平标志着肿瘤的病理分期、分级及肿瘤渗透到周围组织的程度<sup>[3]</sup>, 因此, AMF在恶性肿瘤中是一个重要的临床预后指标。有研究发现, AMF家族成员ATX(autotaxin)在不同级别胶质瘤中均有表达, 在GBM中表达尤为显著<sup>[4]</sup>。还有研究发现, 侵袭性胶质瘤细胞可分泌ATX, 其旁分泌作用可引起少突神经胶质细胞黏附, 促发胶质瘤细胞侵袭<sup>[5]</sup>。但AMF在胶质母细胞瘤侵袭迁移中的作用及相关分子机制仍有待进一步研究。

本实验以胶质母细胞瘤U251细胞为研究对象, 观察siRNA干扰AMF表达后, U251细胞迁移、侵袭能力变化, 探讨具体调节机制, 为寻找胶质母细胞瘤治疗靶点或抑制因子奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

人胶质母细胞瘤U251细胞系购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清、HEPES缓冲液、胰蛋白酶、L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素均购自Gibco公司。山羊抗人AMF抗体、驴抗山羊IgG抗体购自Santa Cruz公司。小鼠抗人 $\beta$ -actin抗体、山羊抗小鼠IgG抗体购自ZSGB-BIO公司。小鼠抗人MMP-2、MMP-9单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司。兔抗人Akt、phospho-Akt抗体购自

Cell Signaling Technology公司。小鼠抗人Sox2单克隆抗体购自Sigma-Aldrich公司。基质胶购自上海浩然生物技术有限公司。

### 1.3 细胞培养

胶质母细胞瘤U251细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液于37 °C、5% CO<sub>2</sub>温育箱中培养。待其贴壁生长至70%~80%的汇合率时, 用0.25%的胰蛋白酶进行消化、传代。

### 1.4 RNA干扰

靶向干扰AMF序列由文献[2]获得, 序列为: 5'-UGG UAC CGC GAG CAC CGC UTT-3', 5'端由FAM(carboxyfluorescein)绿色荧光修饰。空白对照组siRNA序列为: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。siRNA序列由上海GenePharma公司合成。转染前24 h, 取适当数量的细胞接种至细胞培养板中, 控制转染时细胞密度达为30%~50%, 最好使用无抗生素的培养基。将Lipofectamine 2000试剂摇匀后取适量, 用不含血清的优化培养基Opti-MEM I Reduced Serum Medium稀释, 混合后于室温条件下孵育5 min。应用Opti-MEM I Reduced Serum Medium稀释siRNA, 并轻轻混合。Lipofectamine 2000经过5 min的孵育后, 与稀释好的siRNA混合, 在含有细胞以及培养液的细胞培养板中, 加入上述混合物, 使最终转染浓度为50 nmol/L。将转染细胞放入CO<sub>2</sub>培养箱中, 培养4~6 h后, 将培养板中不含血清的培养基倒掉, 加入新鲜的完全培养基。继续培养48 h后进行mRNA及蛋白质水平的检测。

### 1.5 划痕实验

AMF转染72 h后, 细胞接种于24孔板中, 汇合度为95%时开始实验。应用培养基轻轻冲洗单层细胞3遍, 200  $\mu$ L移液器头垂直于培养板在单层细胞上直线划痕, 每孔于正中间留下一条细胞划痕。划痕后的细胞放入培养箱继续培养, 于0 h、8 h记录细胞情况。相对迁移距离计算: 相对迁移距离(%)=100×(A-B)/A, 其中A为细胞在培养前的划痕距离, B为培养后的细胞划痕距离, 结果用mean±S.D.表示, 实验重复3次。

### 1.6 侵袭实验

体外侵袭实验应用Transwell小室系统(Corning Costar No.3422)于siRNA转染72 h后进行。Transwell小室系统中预先铺好10  $\mu$ L基质胶(5 mg/mL, 50  $\mu$ g/室), 加入0.1% FBS的DMEM培养基中重新悬浮细胞, 上

室细胞数控制在 $1 \times 10^5$ 。下室加入含有10% FBS的DMEM培养基。培养18 h后,用棉签擦除上室没有透膜的细胞。HE染色后,镜下观察透膜细胞数。应用放大倍数为400,观察10个随机视野。实验重复3次。

### 1.7 RT-PCR

PCR引物序列: 5'-AAT GCA GAG ACG GCG AAG GAG-3'(AMF上游引物); 5'-ACG AGA AGA GAA AGG GGA GTC-3'(AMF下游引物)。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min。取PCR产物20  $\mu$ L与上样缓冲液4  $\mu$ L混匀后,上样于1%的琼脂糖凝胶中,80 V电压电泳1 h。凝胶成像仪成像,成像结果用Quantity One软件进行分析,以目的基因条带的灰度值/内参条带灰度值表示目的基因mRNA相对表达量。

### 1.8 Western blot

裂解细胞提取细胞总蛋白,BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取25  $\mu$ g蛋白质进行10% SDS-PAGE凝胶变性电泳,然后将蛋白转至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭2 h,滴加一抗,于4 °C孵育过夜,0.1% TBST洗膜10 min $\times$ 3次。常温下二抗孵育1 h,

TBST洗膜10 min $\times$ 3次。用ECL化学发光法显影,凝胶成像仪成像,成像结果用Quantity One软件进行分析,以目的基因条带的灰度值/内参条带灰度值表示目的蛋白相对表达量。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计分析。计量资料运用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学显著性以单因素方差分析(ANOVA)进行比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

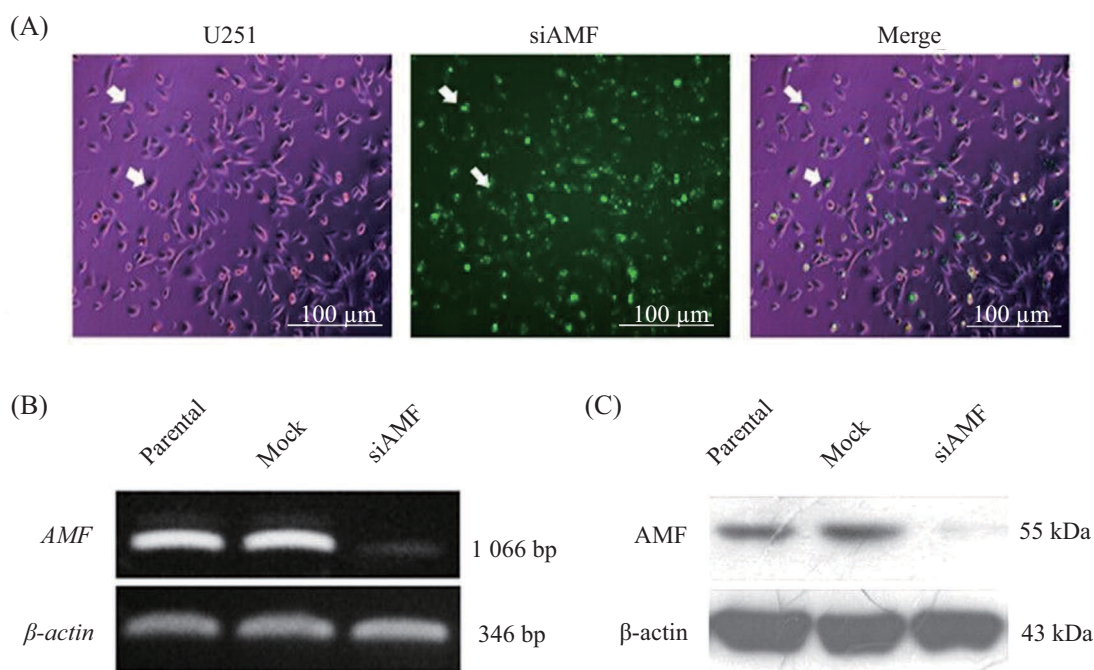
## 2 结果

### 2.1 RT-PCR、Western blot检测干扰后AMF的表达

荧光标记合成的siRNA成功转染U251细胞后(图1A),RT-PCR结果显示,AMF mRNA水平较对照组和空白组表达明显下调( $>50\%$ ,  $P < 0.01$ ,图1B);Western blot结果显示,siAMF组AMF蛋白较其他组相比下调水平大于70%( $P < 0.001$ ,图1C)。

### 2.2 AMF干扰对U251细胞体外迁移影响

划痕实验检测细胞迁移能力,对比siAMF组与对照组(parental和mock组)的细胞划痕愈合情况,siAMF组相对迁移距离小于对照组( $P < 0.01$ ,图2A和



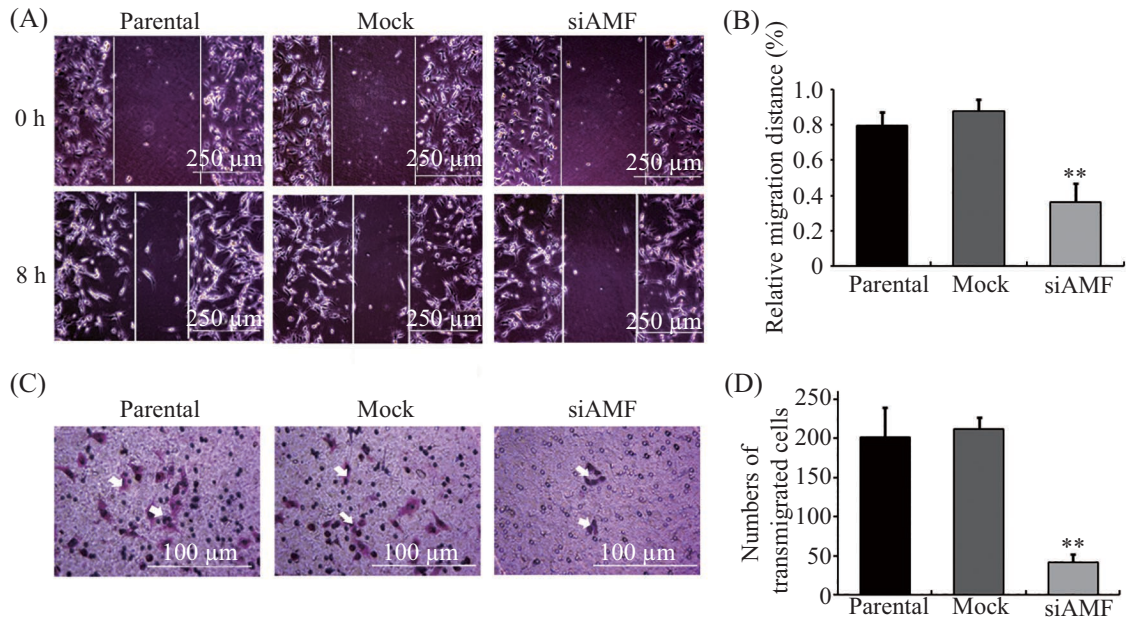
A: 免疫荧光分析, siAMF组于5'端加入AMF修饰,转染入U251细胞中可观察到绿色荧光; B: RT-PCR检测U251细胞中AMF mRNA表达; C: Western blot检测U251细胞AMF蛋白表达。白色箭头为突出显示siAMF成功干扰的U251细胞。

A: siAMF was interfered into U251 cells; B: the mRNA expressions of AMF detected by RT-PCR in each group; C: the protein expressions of AMF detected by Western blot in each group. White arrows mean outstanding U251 cells, which were successfully interfered with siAMF.

图1 RT-PCR和Western blot检测各组细胞中AMF mRNA和蛋白表达变化

Fig.1 The mRNA and protein expressions of AMF detected by RT-PCR and Western blot in each group



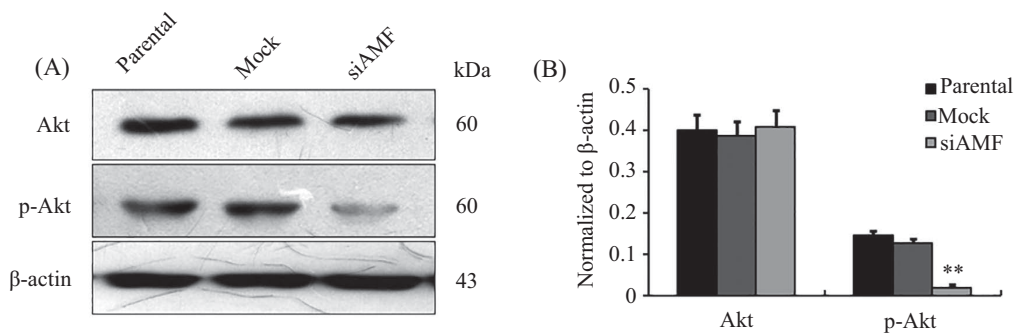


A: AMF表达下调对U251细胞迁移能力影响; B: 细胞迁移实验相对定量结果,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比; C: AMF表达下调对U251细胞侵袭能力影响; D: Transwell细胞侵袭实验相对定量结果,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: the migration of U251 cells affected by down-regulation of AMF; B: cell migration assays were scanned and quantified,  $**P < 0.01$  compared with control group; C: the invasion of U251 cells affected by down-regulation of AMF; D: the invasion assays were scanned and quantified,  $**P < 0.01$  compared with control group.

图2 siAMF对U251细胞迁移、侵袭能力影响

Fig.2 The cell migration and invasion of U251 cells affected by AMF interference



A: Western blot检测U251细胞中Akt和p-Akt蛋白表达水平; B: Western blot分析实验的相对定量结果, 纵坐标表示Akt和p-Akt与β-actin灰度分析的比值,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: expressions of Akt and p-Akt were determined by Western blot in U251 cells; B: Western blot was scanned and quantified. Data presented densitometric analyses of Akt and p-Akt relative to β-actin.  $**P < 0.01$  compared with control group.

图3 AMF干扰后Akt和磷酸化Akt水平的变化

Fig.3 Expressions of Akt and p-Akt proteins after AMF interference in U251 cells

图2B)。

### 2.3 AMF干扰对U251细胞体外侵袭能力影响

Transwell检测细胞侵袭能力, 结果显示, siAMF组迁移到对侧的细胞数较parental和mock组相比显著减少( $P < 0.01$ )(图2C和图2D)。

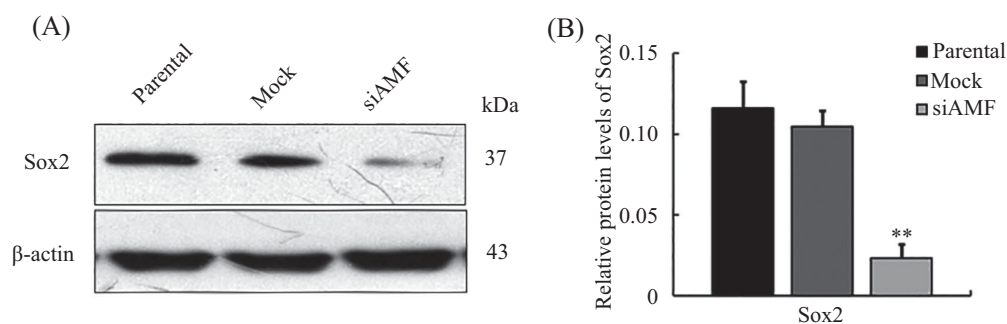
### 2.4 Akt蛋白在siAMF U251细胞中的表达情况

Western blot检测结果显示, 三组细胞中Akt总

蛋白表达基本一致, 但siAMF组Akt磷酸化水平明显低于对照组(parental和mock组)表达水平( $P < 0.01$ , 图3A和图3B)。

### 2.5 Sox2蛋白在siAMF U251细胞中的表达情况

Western blot结果显示, siAMF组中Sox2蛋白表达水平明显低于对照组(parental和mock组)表达水平( $P < 0.01$ , 图4A和图4B)。

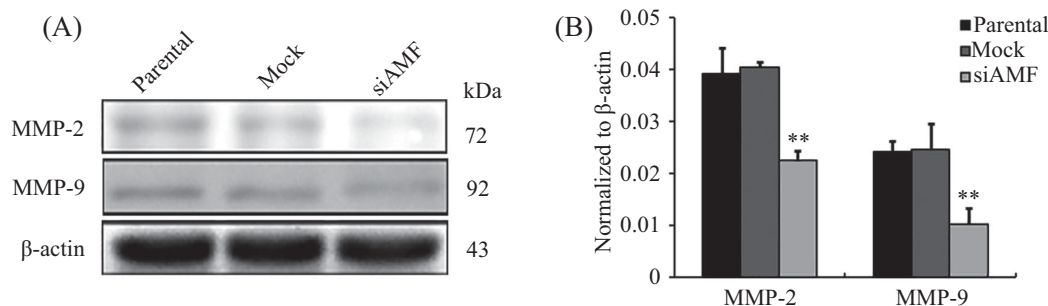


A: Western blot检测U251细胞中Sox2蛋白表达水平; B: Western blot分析实验的相对定量结果, 纵坐标表示Sox2与 $\beta$ -actin灰度分析的比值,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: expressions of Sox2 were determined by Western blot in U251 cells; B: Western blot was scanned and quantified. Data presented densitometric analyses of Sox2 relative to  $\beta$ -actin.  $**P < 0.01$  compared with control group.

图4 AMF干扰后Sox2水平的变化

Fig.4 Expressions of Sox2 proteins after AMF interference in U251 cells



A: Western blot检测U251细胞中Sox2蛋白表达水平; B: Western blot分析实验的相对定量结果, 纵坐标表示MMP-2、MMP-9与 $\beta$ -actin灰度分析的比值,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比。

A: expressions of MMP-2 and MMP-9 were determined by Western blot in U251 cells; B: Western blot was scanned and quantified. Data presented densitometric analyses of MMP-2 and MMP-9 relative to  $\beta$ -actin.  $**P < 0.01$  compared with control group.

图5 AMF干扰后MMP-2、MMP-9水平的变化

Fig.5 Expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins after AMF interference in U251 cells

## 2.6 MMP-2和MMP-9蛋白在siAMF U251细胞中的表达情况

Western blot结果显示, siAMF组MMP-2、MMP-9的表达水平明显低于对照组(parental和mock组)表达水平( $P < 0.01$ , 图5A和图5B)。

## 3 讨论

胶质母细胞瘤居恶性肿瘤发病率前十位, 是造成成年人死亡的主要实体肿瘤。该肿瘤发病率和死亡率近年来逐渐升高, 对人类健康和生命产生极大的危害。目前, 尽管外科手术和放疗等治疗措施取得了进展, 但是治愈率仍然较低。经手术及放疗治疗以后, 患者一般也只能存活12~15个月, 最后死于肿瘤复发。因此, 如何有效治疗胶质母细胞瘤, 搞清其侵袭、转移机制尤为重要, 这也是医学界所

面临的一大难题, 值得大家深入探究。

AMF最初是由人黑色素瘤细胞株A2058血清培养基中分离、纯化出的一种由肿瘤细胞产生和分泌的细胞因子。有研究发现, AMF调控肿瘤细胞的生长、侵袭和转移<sup>[6-7]</sup>。如在骨髓瘤细胞中, 转染拮抗AMF基因G390位点的锤头型核酶序列, AMF分泌减少, 细胞增殖、迁移和侵袭能力减弱<sup>[8]</sup>。类似的结果还在NIH3T3纤维母细胞瘤中被证实, AMF转染后NIH3T3细胞增殖能力明显增强, 裸鼠体内肿瘤形成。而AMF基因被敲低后, 肿瘤细胞增殖速度减慢<sup>[9]</sup>。我们前期研究发现, AMF在胶质母细胞瘤U251细胞中有表达, 那么AMF在胶质母细胞瘤中通过何种机制发挥怎样作用? 值得我们进一步深入研究。

为了研究AMF在胶质母细胞瘤侵袭、转移中的作用, 我们首先进行了细胞划痕和Transwell实验,

研究结果发现, 干扰U251细胞AMF表达后, 细胞的侵袭和迁移能力与对照组相比明显降低, 提示AMF与肿瘤细胞侵袭、迁移密切相关。Nicholson等<sup>[10]</sup>研究发现, AMF的异常表达会诱导PI3K/Akt信号通路激活, Akt的活化引发肿瘤的发生、侵袭和抗凋亡。同时, PI3K/Akt信号通路还正向调控Sox2蛋白<sup>[11]</sup>。Sox2为促癌基因, 控制肿瘤细胞的生物学行为。在胶质母细胞瘤中, 沉默Sox2导致细胞侵袭转移能力显著下降, 而本不表达Sox2的胶质瘤细胞株细胞转染Sox2后则发现侵袭转移率显著升高<sup>[12]</sup>。我们在研究中发现, U251细胞AMF被干扰后, 细胞侵袭、转移能力降低的同时, Akt磷酸化蛋白及Sox2的表达明显低于对照组。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是阻止肿瘤转移的重要屏障, 肿瘤细胞降解基质蛋白是局部侵袭和转移的另一个维度。与ECM相关的众多肿瘤转移因素中, 有关基质金属蛋白酶(MMP)降解ECM和细胞之间的黏着蛋白的研究最多。MMP-2和MMP-9属于MMP家族中的明胶酶, 主要降解IV型、V型、层黏连蛋白等基膜的主要成分, 使肿瘤细胞沿着基底膜缺损和基质空隙侵入周围组织。本研究中, siRNA干扰U251细胞48 h后, MMP-2、MMP-9蛋白质水平较对照组出现显著性降低, 表明AMF参与了对MMP-2、MMP-9的表达调控。

本文结果提示, AMF敲低可通过以下三个方面抑制胶质母细胞瘤细胞的迁移和侵袭: (1)抑制U251细胞PI3K/Akt信号通路活化; (2)下调Sox2表达, 调控U251细胞生物学行为; (3)抑制U251细胞表达MMP-2和MMP-9, 降低ECM降解。其中, 有关PI3K/Akt、Sox2和MMPs三者之间联系、具体调控机制有待于我们深入探讨。综上所述, AMF与胶质母细胞瘤发展密切相关, 以上结论对阐明胶质母细胞瘤易发生转移的分子机制提供新的思路, 并为最终找到抑制脑肿瘤转移方法奠定分子生物学基础。

## 参考文献 (References)

- 1 Ening G, Osterheld F, Capper D, Schmieder K, Brenke C. Risk factors for glioblastoma therapy associated complications. *Clin Neurol Neurosurg* 2015; 134: 55-9.
- 2 Han T, Kang D, Ji D, Wang X, Zhan W, Fu M, *et al.* How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? *Cell Adh Migr* 2013; 7(5): 395-403.
- 3 Funasaka T, Raz A. The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(3/4): 725-35.
- 4 Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, Woyke T, Berens TJ, McDonough WS, *et al.* Gene expression profile of glioblastoma multiform invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 2005; 7(1): 7-16.
- 5 Hoelzinger DB, Nakada M, Demuth T, Rosensteel T, Reavie LB, Berens ME, *et al.* Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *J Neurooncol* 2008; 86(3): 297-309.
- 6 Furuta E, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(2): 141-52.
- 7 Chiu CG, St-Pierre P, Nabi IR, Wiseman SM. Autocrine motility factor receptor: A clinical review. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(2): 207-17.
- 8 Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, Oda M, Haga A, Hosoki M, *et al.* Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9483-93.
- 9 Onishi Y, Tsukada K, Yokota J, Raz A. Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20(1): 51-8.
- 10 Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14(5): 381-95.
- 11 Dogan I, Kawabata S, Bergbower E, Gills JJ, Ekmekci A, Wilson W 3rd, *et al.* Sox2 expression is an early event in a murine model of EGFR mutant lung cancer and promotes proliferation of a subset of EGFR mutant lung adenocarcinoma cell lines. *Lung Cancer* 2014; 85(1): 1-6.
- 12 Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, *et al.* Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* 2011; 6(11): e26740.