文章编号:1000-5404(2014)24-2427-05

论著

神经降压素及其受体1对胶质瘤细胞侵袭的影响

欧阳庆,周 济,易 良,徐伦山,许民辉 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科)

[摘要] **目的** 探讨神经降压素(neurotensin, NTS)及其受体1(neurotensin receptor 1, NTSR1)对恶性胶质瘤细胞迁移和侵袭能力的影响。**方法** 体外实验分为空白对照组,NTS刺激组,NTS + sc-shRNA组和NTS + shNTSR1组,采用慢病毒介导的RNA干扰技术沉默人胶质瘤细胞系U87中NTSR1的表达后采用细胞划痕实验和Transwell侵袭实验检测NTS/NTSR1对胶质瘤细胞迁移和侵袭能力的影响;Western blot检测NTS/NTSR1对N-钙粘素(N-cadhein)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达水平的影响。在体实验分为实验组shNTSR1-U87和对照组sc-shRNA-U87,建立裸鼠颅内移植瘤模型。利用小动物磁共振技术(MRI)监测裸鼠颅内胶质瘤的生长,评估瘤细胞对瘤周组织的侵袭情况以及NTS/NTSR1对荷瘤鼠生存期的影响。**结果** NTS/NTSR1促进恶性胶质瘤细胞株U87的体外迁移和侵袭能力,划痕结果显示,NTS刺激组细胞迁移率[(38.02 ± 6.87)%高于空白对照组(13.46 ± 4.49)%,$P < 0.05$]。NTS + shNTSR1组细胞迁移率(9.48 ± 3.08)%低于NTS + sc-shRNA组[(35.48 ± 12.89)%,$P < 0.05$]。Transwell结果也证实,NTS刺激组穿膜细胞光密度值(0.25 ± 0.02)高于空白对照组[(0.16 ± 0.02),$P < 0.05$]。NTS + shNTSR1组光密度值(0.15 ± 0.03)低于NTS + sc-shRNA组光密度值[(0.24 ± 0.04),$P < 0.05$]。NTS/NTSR1上调U87细胞MMP-9的表达并抑制N-钙粘素的表达($P < 0.05$)。在体实验结果显示,沉默NTSR1抑制荷瘤小鼠颅内胶质瘤的生长和侵袭,延长荷瘤鼠生存期($P < 0.05$)。**结论** 抑制NTSR1的表达能降低瘤细胞体内外侵袭能力,延长小鼠的生存期。

[关键词] 胶质瘤;神经降压素;神经降压素受体1;侵袭
[中图法分类号] R341.6;R73-37;R730.264 [文献标志码] A

Effect of neurotensin and neurotensin receptor 1 on migration and invasion of human glioma cells

Ouyang Qing, Zhou Ji, Yi Liang, Xu Lunshan, Xu Minhui (Department of Neurosurgery, Daping Hospital, Institute of Surgery Research; Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of neurotensin (NTS) and neurotensin receptor 1 (NTSR1) on the migration and invasion of human glioma U87 cells. **Methods** An NTSR1-targeting shRNA vector and a non-homologous scramble sequence were constructed to transfect human glioma U87 cells, and the positive clones were screened with puromycin and then named as shNTSR1 and sc-shRNA. The expression levels of NTSR1, N-cadherin and MMP-9 were detected by Western blotting. The cell migration and invasion ability was determined by wound scratch assay and Transwell invasion assay. After the intracranial transplantation tumor model was established, magnetic resonance imaging (MRI) was used to measure the tumor volume, and the protein levels of MMP-9 and N-cadherin in the orthotopic tumor tissue were evaluated by Western blotting. **Results** The protein level of NTSR1 was significantly decreased after NTSR1 knockdown, and the cell migration and invasion ability was markedly reduced ($P < 0.05$). The wound scratch assay results showed that the cell migration rate (38.02 ± 6.87)% of the NTS stimulation group was higher than that (13.46 ± 4.49)% of the blank control group ($P < 0.05$), and the cell migration rate (9.48 ± 3.08) of the NTS + shNTSR1 group was lower than that (35.48 ± 12.89) of the NTS + sc-shRNA group ($P < 0.05$). The Transwell invasion assay results also showed that the OD value (0.25 ± 0.02) of the NTS stimulation group was

[基金项目] 国家自然科学基金青年-面上连续资助项目(81270039);中国博士后科学基金面上一等资助项目(2013M530388);重庆市博士后科研项目特别资助项目(Xm201341)

[通信作者] 许民辉,E-mail: dr_minhuixu@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1106.001.html(2014-11-06)

higher than that (0.16 ± 0.02) of the blank control group ($P < 0.05$), and the OD value (0.15 ± 0.03) of the NTS + shNTSR1 group was lower than that (0.24 ± 0.04) of the NTS + sc-shRNA group ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that MMP-9 expression was increased, however, the level of N-cadherin was decreased by NTS stimulation. Conversely, the expression of N-cadherin was increased, however, the level of MMP-9 was decreased after NTSR1 knockdown. More importantly, the *in vivo* results showed that NTSR1 down-regulation could impair U87 cell invasion ability and prolong the survival period of tumor bearing mice. **Conclusion** Suppressing NTSR1 expression decreases the migration and invasion ability of glioma cells and then improves the survival of mice.

[**Key words**] glioma; neurotensin; neurotensin receptor 1; invasion

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars and then General Program of China (81270039), the General First Grade Project of China Postdoctoral Science Foundation (2013M530388) and the Special Project of Chongqing Municipal Postdoctoral Science Foundation (Xm201341).
Corresponding author: Xu Minhui, E-mail: dr_minhuixu@126.com

恶性胶质瘤致死率高,预后差。尽管恶性胶质瘤的综合治疗已取得了较大的进展,但患者的中位生存期仍然只有14.6个月[1-2]。肿瘤细胞对周围脑组织的广泛侵袭是恶性胶质瘤难以手术清除和术后复发的根源。手术切除的彻底与否仍是影响患者预后的重要因素。因此,深入探讨恶性胶质瘤侵袭的分子机制,能够为提高恶性胶质瘤的诊治水平,改善患者预后提供新的线索和实验室依据。NTS是13个氨基酸组成的直链多肽,广泛分布在神经系统和消化系统,其高亲和力受体NTSR1介导了NTS的各种重要功能。已有研究表明NTS/NTSR1在肺癌、乳腺癌及消化系统肿瘤恶性进展中扮演着重要作用。我们前期研究发现NTS及其NTSR1在胶质瘤中高表达,而且表达水平与胶质瘤病理级别和患者预后相关,提示NTS/NTSR1可能与胶质瘤的恶性进展密切相关,但NTS/NTSR1在恶性胶质瘤中的确切作用及机制尚不清楚。本研究旨在探讨NTS/NTSR1对恶性胶质瘤细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清购自Gibco公司;Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司;DMEM购自Hyclone公司;BCA蛋白含量检测试剂盒、Tubulin抗体购自碧云天生物工程有限公司;N-Cadherin抗体购自Santa Cruz、基质金属蛋白酶(MMP-9)抗体购自Enogene公司;Transwell细胞培养滤膜购自Coring Costar公司;shRNA购自锐博生物科技有限公司;人脑胶质瘤细胞株U87源自中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒包装构建及稳定细胞系 293FT包装细胞常规培养,质粒和脂质体混合并加入293FT细胞中。转染8 h后换常规培养基。继续培养72 h后收取上清液中病毒颗粒。将sc-shRNA和shNTSR1慢病毒颗粒分别转染U87细胞系,嘌呤霉素筛选稳定细胞系。

1.2.2 细胞培养 实验分为空白对照组、NTS刺激组、NTS + sc-shRNA组和NTS + shNTSR1组。1×10^5 U87细胞接种于6孔板中,以含10%胎牛血清的DMEM培养液,置于37 ℃、5% CO_2的饱和湿度培养箱中培养。

1.2.3 划痕实验 将上述4组细胞分别接种于6孔板中,待其生长密度达80% ~90%后使用200 μL枪头垂直于6孔板底部做划痕,PBS洗去划落的细胞,加DMEM培养基并用倒置相差显微镜记录此时和24 h后细胞迁移情况。每组实验重复3次。

1.2.4 Transwell侵袭实验 实验分组同上。Transwell小室上表面加入DMEM稀释的Matrigel(DMEM∶Matrigel = 2∶1) 70 μL,37 ℃孵育30 min。下室加入含有10%胎牛血清完全培养基500 μL,上室加入含1×10^5个细胞的无血清培养基200 μL,培养24 h后擦去上表面的基质胶及未穿越的细胞,4%多聚甲醛固定,结晶紫染色。用33%的冰醋酸脱色,洗脱结晶紫,酶标仪检测波长560 nm处洗脱液的光密度值[$D(560)$],间接反映穿膜细胞数。

1.2.5 免疫印迹法检测蛋白表达 SDS上样缓冲液变性蛋白后BCA法定量。80 μg样品上样后电泳分离蛋白质,冰浴中250 mA × 2 h电转膜。室温封闭膜3 h后一抗孵育4 ℃过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温2 h,化学发光液孵育后曝光。Quantity one(Bio-Rad)软件对目的条带进行灰度检测。

1.2.6 裸鼠颅内原位移植瘤模型建立 分为实验组(shNTSR1-U87)和对照组(sc-shRNA-U87)。体质量15 ~20 g的无胸腺裸鼠,SPF饲养。麻醉,头部固定于立体定向仪,消毒铺巾。10 μL的PBS重悬对数生长期细胞5×10^6个。注射于裸鼠右侧尾状核。注射毕,停留5 min,缓慢拔针。Sc-shRNA-U87组(8只),shNTSR1-U87组(8只)。利用小动物7.0T MRI,分别于第5、10、15、20天监测颅内肿瘤大小。肿瘤体积(Tumor Volume,TV)计算公式:$TV = (a \times b^2)/2$,其中a、b分别代表肿瘤测量的长和宽。

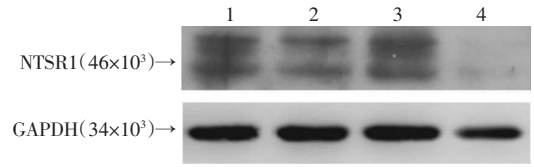
1.3 统计学方法

数据以$\bar{x} \pm s$表示。应用SPSS 13.0统计软件进行方差分析和t检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线、对数秩检验(Log-rank test)进行生存曲线比较。

2 结果

2.1 shNTSR1 抑制 U87 细胞中 NTSR1 蛋白的表达

慢病毒介导的 shNTSR1 和 sc-shRNA 感染 U87 细胞 72 h 后，Western blot 检测结果显示，NTS + shNTSR1 组中 NTSR1 蛋白表达水平(0.28 ± 0.23)明显低于 NTS + sc-shRNA 组(1.06 ± 0.23)(P = 0.009)，提示 shNTSR1 特异性的沉默 U87 细胞中 NTSR1 蛋白的表达(图 1)。而空白对照组(1.00 ± 0.00)、NTS 处理组(0.94 ± 0.20)和 NTS + sc-shRNA 组中 NTSR1 蛋白表达水平无明显差异(P = 0.971)。



1：空白对照组；2：NTS 刺激组；3：NTS + sc-shRNA 组；4：NTS + shNTSR1 组

图 1 Western blot 检测 U87 细胞中 NTSR1 蛋白的表达

2.2 NTS/NTSR1 促进 U87 细胞的迁移和侵袭

划痕 24 h 后，NTS 刺激组划痕愈合率为(38.02 ± 6.87)%，显著高于空白对照组[(13.46 ± 4.49)%，P = 0.01]，提示 NTS 能够促进 U87 细胞运动迁移(图 2)。而 NTS + shNTSR1 组的划痕愈率为(9.48 ± 3.08)%，显著低于 NTS + sc-shRNA 组[(35.48 ± 12.89)%，P = 0.027，图 2]。Transwell 侵袭实验结果表明，NTS 刺激组 D(560)值为(0.25 ± 0.02)，明显高于空白对照组[(0.16 ± 0.02)，P = 0.011，图 3]。NTS + shNTSR1 组 D(560)值为(0.15 ± 0.03)，显著低于 NTS + sc-shRNA 组[(0.24 ± 0.04)，P = 0.036，图 3]。该结果初步证实，NTS 可能通过与 NTSR1 作用促进胶质瘤细胞的侵袭。

2.3 NTS/NTSR1 对 N-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达的影响

上述 4 组细胞处理 72 h 后提取总蛋白，Western blot 检测不同处理组中 N-cadherin 和 MMP-9 蛋白的表达情况。结果显示，空白对照组 N-cadherin 的表达量(1.00 ± 0.00)高于 NTS 刺激组(0.77 ± 0.10)(P = 0.001，图 4A)，而空白对照组 MMP-9 蛋白表达量(1.00 ± 0.00)低于 NTS 刺激组(2.83 ± 0.62)(P = 0.037，图 4B)。NTS + shNTSR1 组中 N-cadherin 蛋白水平(1.01 ± 0.05)高于 NTS + sc-shRNA 组(0.80 ± 0.05)(P = 0.008，图 4A)，NTS + shNTSR1 组 MMP-9 的表达量(0.91 ± 0.24)则低于 NTS + sc-shRNA 组(2.41 ± 0.44)(P = 0.007，图 4B)，提示 NTSR1 参与了 NTS 对 N-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达的调节。

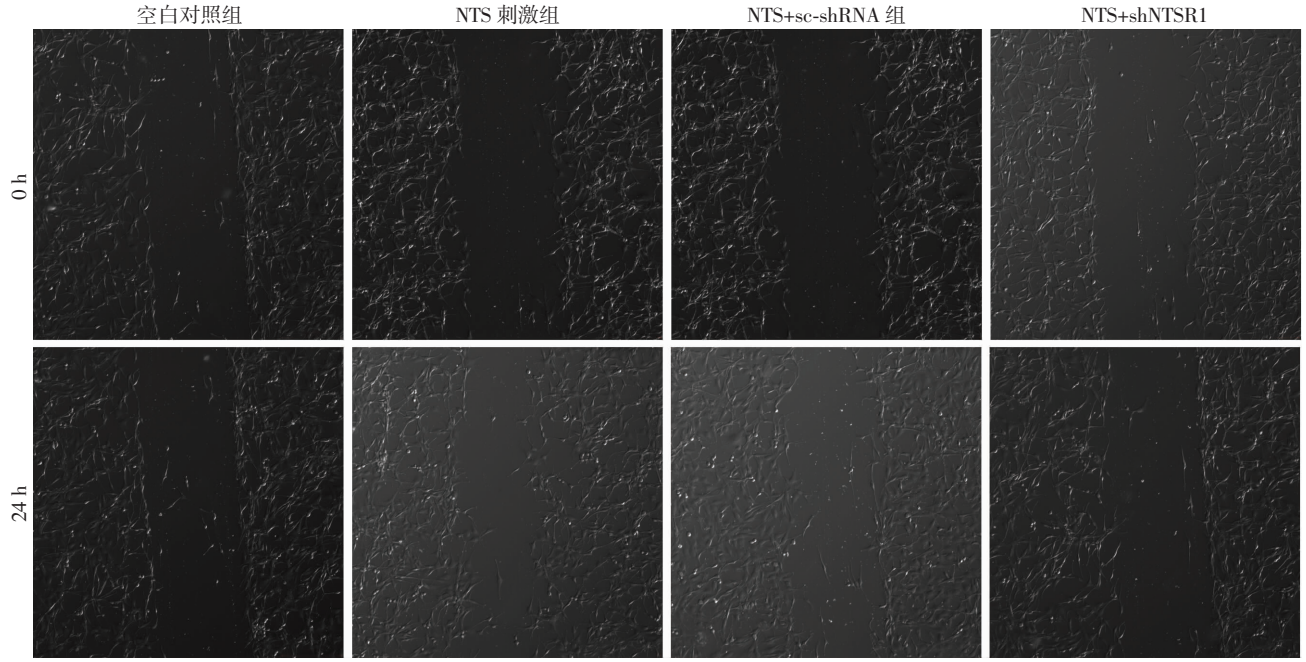
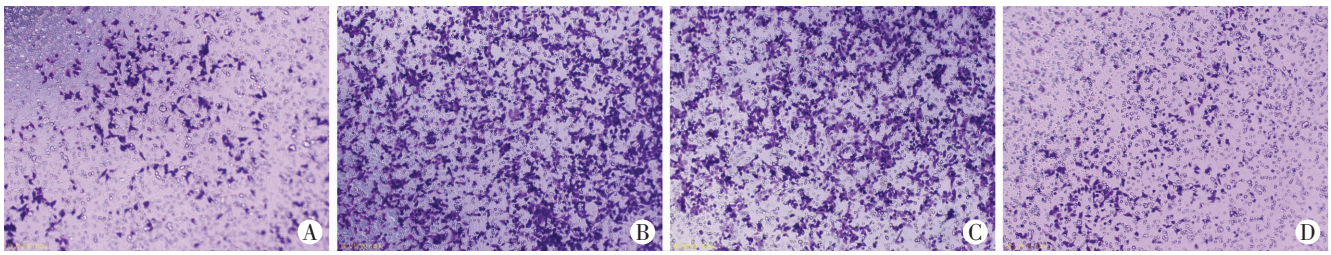
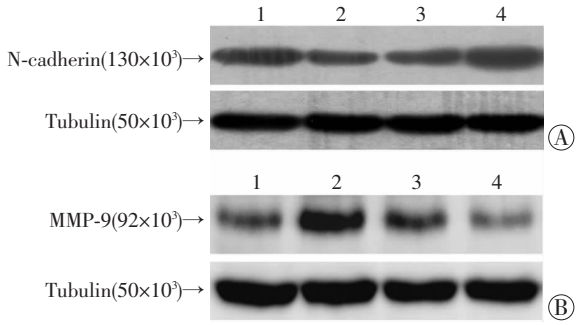


图 2 细胞划痕实验检测细胞侵袭能力 (×200)



A：空白对照组，B：NTS 刺激组，C：NTS + sc-shRNA 组，D：NTS + shNTSR1 组

图 3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 (×200)



1:空白对照组;2:NTS 刺激组;3:NTS + sc-shRNA 组;4:NTS + shNTSR1 组; A:N-cadherin,B :MMP-9

图4 Western blot 检测不同处理组中 N-cadherin 和 MMP-9 蛋白的表达

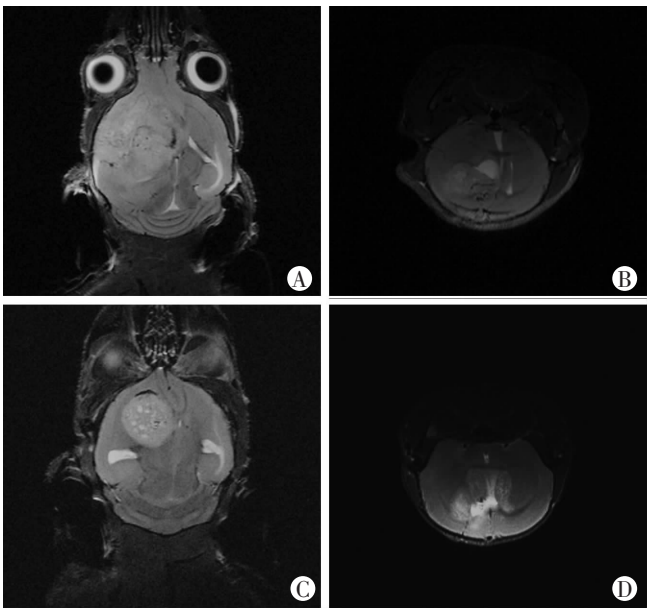
2.4 NTS/NTSR1 对裸鼠颅内原位移植瘤侵袭的影响

体内实验分为两组:实验组(shNTSR1-U87 组)和对照组(sc-shRNA-U87 组)。采用 MRI 分别于肿瘤细胞接种后第 5、10、15、20 天监测颅内肿瘤的大小及生长速度。结果显示,两组裸鼠在肿瘤细胞接种后 10 d 左右均可见颅内肿瘤形成,shNTSR1-U87 和 sc-shRNA-U87 两组的成瘤率分别为 50% 和 62.5%。值得注意的是,在接种 15 d 后,sc-shRNA-U87 细胞组颅内肿瘤和瘤周组织无明显边界,部分肿瘤组织侵袭到颅骨和头皮,解剖分离时发现肿瘤和颅骨粘连严重(图 5、6)。而 shNTSR1-U87 细胞接种组生长较缓慢,肿瘤体积较对照组小($P=0.014$),肿瘤边界较清晰,未见明显的侵袭现象,解剖分离肿瘤时见肿瘤表面较光滑,与颅骨无明显粘连(图 5、6)。MRI 定期监测肿瘤大小发现 shNTSR1-U87 实验组肿瘤体积明显小于对照组($P=0.014$,图 7)。同时,shNTSR1-U87 细胞接种组荷瘤鼠生存期为(28.5 ± 5.68)d,明显高于对照 sc-shRNA-U87 组[(20.6 ± 2.88) d,$P=0.029$,图 8]。利用 Westernblot 检测胶质瘤组织中 MMP-9 和 N-cadherin 的蛋白表达水平,结果显示:shNTSR1-U87 组 N-cadherin 表达水平高于 sc-shRNA-U87 组(图 9),而 MMP-9 蛋白表达水平则明显低于 sc-shRNA-U87 组。



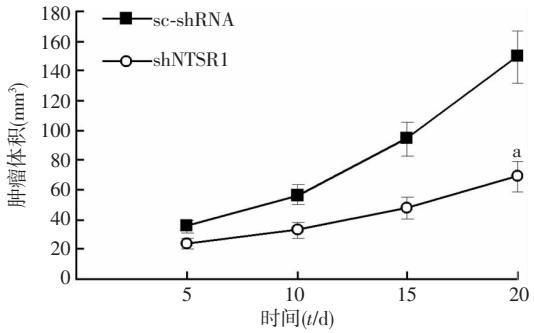
A:sc-shRNA-U87 细胞接种组,B:shNTSR1-U87 细胞接种组

图5 荷瘤鼠脑组织大体观察



A、B:sc-shRNA-U87 细胞接种组,B、D:shNTSR1-U87 细胞接种组

图6 荷瘤鼠脑 MRI 表现



a:$P<0.05$, 与 sc-shRNA-U87 组比较

图7 sc-shRNA 接种组和 shNTSR1 接种组颅内肿瘤体积比较

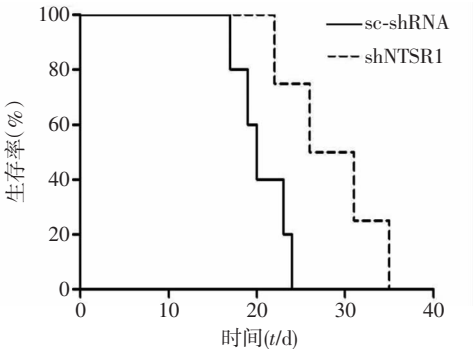
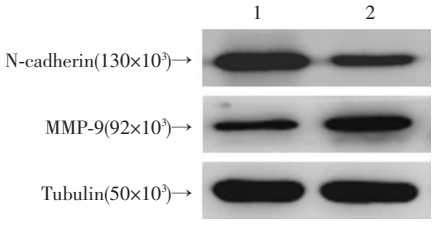


图8 荷瘤小鼠生存曲线分析



1:shNTSR1-U87,2:sc-shRNA-U87

图9 Western blot 检测肿瘤组织中 N-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达

3 讨论

侵袭性生长是恶性胶质瘤最显著的生物学行为特点,也是患者预后差及术后复发的主要原因之一。因此,探讨恶性胶质瘤侵袭性生长的机制能够为胶质瘤的治疗提供新的靶点。已有研究表明 NTS/NTSR1 在多种恶性肿瘤中高表达,并能促进肿瘤的恶性进展[3]。我们的前期研究也发现 NTS/NTSR1 在恶性胶质瘤中呈高表达。但是,NTS/NTSR1 在恶性胶质瘤迁移及侵袭的作用中的作用及机制,目前仍不清楚。

本研究利用划痕愈合以及 Transwell 侵袭实验发现 NTS 能够促进恶性胶质瘤细胞的迁移和侵袭。而采用慢病毒干涉技术沉默 NTSR1 后,U87 细胞的迁移和侵袭能力被显著抑制,提示 NTSR1 参与了 NTS 对胶质母细胞瘤的侵袭的促进作用。恶性胶质瘤呈侵袭性生长在影像学上通常表现为:与邻近正常脑组织分界不清。我们对裸鼠颅内原位移植瘤采用 MRI 进行连续性监测发现,sc-shRNA-U87 接种组,肿瘤边界不清,肿瘤组织内见坏死灶,部分肿瘤组织侵袭至颅骨和头皮。而 shNTSR1-U87 接种组,MRI 影像显示肿瘤边界清晰,未见明显的瘤周组织浸润,肿瘤坏死灶也较对照组少见。这些结果表明在 NTSR1 沉默后,恶性胶质瘤细胞的侵袭能力被明显削弱,提示 NTS/NTSR1 信号通路在恶性胶质瘤的侵袭中扮演着较为重要的作用。

金属基质蛋白酶(MMP)具有降解细胞外基质和促进肿瘤侵袭及转移的作用。已有的研究发现 MMP-9 在胶质母细胞瘤侵袭的过程中扮演重要的角色[4-5]。此外,Souaze 等[6]的研究发现 NTS/NTSR1 可以通过金属基质蛋白酶 MMP-9 促进乳腺癌细胞侵袭。本研究也发现在 NTS 刺激后,MMP-9 蛋白的表达上调,而沉默 NTSR1 后,能拮抗 NTS 对 MMP-9 表达的上调,提示 NTS/NTSR1 能够调节 MMP-9 的表达。然而 NTS/NTSR1 对 U87 细胞 MMP-9 表达的调节机制仍然未明,文献[7]报道 MAPK 信号是调节 MMP-9 表达的重要信号通路。而 MAPK 同时也是 NTS/NTSR1 重要的下游信号通路之一,提示 NTS/NTSR1 可能通过 MAPK 通路调节 MMP-9 的表达[8]。

此外,本研究也发现 NTS 能够调节 N-cadherin 蛋白表达。N-cadherin 是参与同源细胞间连接的一种跨膜糖蛋白,N-cadhering 的表达随着恶性胶质瘤的进展逐渐下降[9-10]。低表达水平的 N-cadherin 在高级别胶质瘤中较为常见并且和肿瘤细胞侵袭能力相关[11-13]。在低表达 N-cadherin 的 C6 胶质瘤细胞中上调 N-cadherin 的表达,可以减弱 C6 胶质瘤细胞在体内和体外的侵袭能力[9]。在 NTS 刺激后,我们发现 N-cadherin 蛋白表达水平下调,而沉默 NTSR1 后,NTS 抑制 N-cadherin 蛋白表达的作用将被削弱。体内和体外实验结果均提示 NTS/NTSR1 可能是通过抑制 N-cadherin 的表达和同时上调 MMP-9 的表达,进而为恶性胶质瘤细胞的迁移和侵袭开辟道路。

本研究发现 NTS/NTSR1 在恶性胶质瘤侵袭过程中具有重要的作用,提示靶向阻断 NTSR1 可以成为削弱胶质瘤侵袭能力的重要途径。我们将进一步对恶性胶质瘤细胞 NTS/NTSR1 过度活化的机制以及其对恶性胶质瘤侵袭性调节的确切分子机制进行深入的研究,以了解 NTS/NTSR1 在胶质瘤侵袭中的调控中作用。

参考文献:

[1] Dolecek T A, Propp J M, Stroup N E, *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.

[2] Komotar R J, Otten M L, Moise G, *et al*. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma-a critical review[J]. Clin Med Oncol, 2008, 2: 421-422.

[3] Ehlers R A, Kim S H, Zhang Y, *et al*. Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers [J]. Ann Surg, 2000, 231(6): 838-848.

[4] Zhao W J, Zhang W, Li G L, *et al*. Differential expression of MMP-9 and AQP4 in human glioma samples[J]. Folia Neuropathol, 2012, 50(2): 176-186.

[5] Sun C, Wang Q, Zhou H, *et al*. Antisense MMP-9 RNA inhibits malignant glioma cell growth *in vitro* and in vivo[J]. Neurosci Bull, 2013, 29(1): 83-93.

[6] Souaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, *et al*. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6243-6249.

[7] Kim J, Lee J W, Kim S I, *et al*. Thrombin-induced Migration and Matrix Metalloproteinase-9 Expression Are Regulated by MAPK and PI3K Pathways in C6 Glioma Cells [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2011, 15(4): 211-216.

[8] Dupouy S, Mourra N, Doan V K, *et al*. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers [J]. Biochimie, 2011, 93(9): 1369-1378.

[9] Asano K, Duntsch C D, Zhou Q, *et al*. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion[J]. J Neurooncol, 2004, 70(1): 3-15.

[10] Maret D, Gruzglin E, Sadr M S, *et al*. Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion[J]. Neoplasia, 2010, 12(12): 1066-1080.

[11] Camand E, Peglion F, Osmani N, *et al*. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 4): 844-857.

[12] Peglion F, Etienne-Manneville S. N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors[J]. Cell Adh Migr, 2012, 6(4): 327-332.

[13] Wu W, Tian Y, Wan H, *et al*. Expression of beta-catenin and E- and N-cadherin in human brainstem gliomas and clinicopathological correlations [J]. Int J Neurosci, 2013, 123(5): 318-323.

(**收稿**:2014-08-26;**修回**:2014-09-29)

(编辑 汪勤俭)