神经病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001020

LPL在U251细胞中的表达及核质穿梭对其增殖、生长的影响

宫惠琳[1]，陈文楠[2]，杨 柳[3]，董炜疆[2]

（1. 西安交通大学第一附属医院病理科，西安 710061；2. 西安交通大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系，西安 710061；3. 西安交通大学医学部公共卫生学院，西安 710061）

【摘 要】目的：观察脂蛋白脂肪酶（lipoprotein lipas，LPL）在人胶质瘤U251细胞系中的表达及在leptomycin B（LMB）作用下对其增殖、生长的影响。**方法**：将经体外培养的U251细胞加入染色体区域稳定蛋白1（CRM1）抑制剂LMB后，分别于12 h和24 h观察细胞核与细胞质LPL表达情况，并利用MTT和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡。**结果**：加入5、10 nmol/L的LMB孵育12 h和24 h后，细胞核内LPL的表达明显增加，且呈剂量依赖性变化，其中10 nmol/L的LMB孵育24 h，细胞核内LPL增高最明显；MTT显示，对照组和各实验组A值分别为（0.82±0.08）、（0.71±0.03）、（0.70±0.04）、（0.69±0.07）和（0.68±0.09），各实验组和对照组之间差异有统计学差异（$P<0.05$）；流式细胞术检测显示各实验组与对照组U251细胞的凋亡率分别为2.81±0.33、4.17±0.24、5.25±0.31和6.80±0.42，各实验组与对照组间差异有统计学差异（$P<0.05$）。**结论**：LPL在U251细胞中的核质穿梭是依赖CRM1的，且LMB可以显著增加LPL在细胞核内的表达。随着LMB的浓度增加和孵育时间的延长，U251细胞的增殖和凋亡也受到显著的影响，提示核质穿梭可能对肿瘤的生长有一定的影响。

【关键词】U251细胞；LeptomycinB；胶质瘤；核质穿梭

【中图分类号】R329.24 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-2-22

Expression of LPL in U251 cells and effect of nucleocytoplasmic shuttling on their proliferation and growth

Gong Huilin[1], Chen Wennan[2], Yang Liu[3], Dong Weijiang[2]

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University; 2. Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, School of Basic Sciences, Xi'an Jiaotong University; 3. School of Public Health, Xi'an Jiaotong University Health Science Center)

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of lipoprotein lipas (LPL) in human glioma cell lines U251 and the effects of nucleocytoplasmic shuttling on their proliferation and growth. ***Methods***: After being incubated with leptomycin B (LMB) for 12 and 24 hours, the cytoplasmic and nuclear proteins of human glioma cells were islolated and analyzed by Western blot; MTT and flow cytometry were used to investigate the cell proliferation and necrosis. ***Results***: After 5 nmol/L and 10 nmol/L of LMB being added, the cells were incubated for 12 and 24 hours; the expression of LPL in the nucleus was significantly increased in a dose dependent manner. The nucleus LPL dramatically increased when LMB incubating for 24 hours at concentration of 10 nmol/L. MTT showed that with the increase of LMB concentration and the extension of the incubation time, the cells proliferation was obviously inhibited [the A value were (0.82±0.08), (0.71±0.03), (0.70±0.04), (0.69±0.07), (0.68±0.09), respectively]. U251 cell apoptosis rate was also significantly increased [(2.81±0.33), (4.17±0.24), (5.25±0.31), (6.80±0.42), respetcively] based on results of flow cytometry. ***Conclusion***: LPL in human glioma U251 cells in nucleocytoplasmic shuttle is CRM1 dependent and CRM1 inhibitor LMB can significantly increase the expression of LMB in the nucleus. With increasing of LMB concentrations and incubation time, the proliferation and apoptosis of U251 cells are also significantly influenced, revealing that nucleocytoplasmic shuttling may have certain effect on the tumor development.

【Key words】U251; leptomycin B; glimoa; nucleocytoplasmic shuttling

作者介绍：宫惠琳，Email：gonghuilin1214@126.com，研究方向：肿瘤病理学。

通信作者：董炜疆，Email：dongwj@mail.xjtu.edu.cn。

基金项目：陕西省国际科技合作与交流计划资助项目（编号：2015KW-037、2014KW21-01）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160706.1713.024.html（2016-07-06）

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase,LPL)是甘油三酯分解代谢的关键酶,广泛分布于全身多个组织,其生物作用非常复杂[1-2]。LPL 参与调节脂肪酸的新陈代谢,水解三脂酰甘油;参与磷脂和载脂蛋白(低密度脂质蛋白、极低密度脂蛋白、乳糜蛋白)及不同高密度脂蛋白之间相互转换;促进细胞摄取脂蛋白、脂质和脂溶性维生素;调节体重及能量平衡,并在认知功能中发挥作用。研究发现,胶质瘤病人脑组织脂质代谢活性极高,约为正常脑组织的 6 倍,致使胶质瘤患者脑内脂质含量明显减少[3]。LPL 还可以依赖其分子桥功能促使胆固醇的转运顺利通过血脑屏障[4],提示 LPL 与脑内脂质代谢平衡有关。

细胞核-质蛋白的转运过程通常需要一些蛋白的辅助来完成,染色体区域稳定蛋白-1(chromosome region maintenance 1,CRM-1)可以识别亮氨酸富集的核输出信号序列(nuclear export signal,NES)的出核信号,将带有 NES 的蛋白质从细胞核输出到细胞质。研究表明 LPL 的出核转运是由 CRM-1 介导的,出核因子抑制剂 leptomycin B(LMB)可以竞争性与 CRM1 结合,从而阻止 CRM1 与 NES 的相互作用,抑制目标蛋白出核过程。本实验通过培养胶质瘤 U251 细胞,检测不同浓度的 LMB 处理 U251 细胞后,细胞核和细胞质 LPL 的蛋白表达变化情况,并利用 MTT 和流式细胞学检测 U251 细胞的增殖与凋亡情况,为进一步明确 LPL 在胶质瘤细胞系中的核质穿梭机制以及对胶质瘤的发病原因和治疗打下重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人神经胶质瘤 U251 细胞(购自中国科学院细胞库);GFAP 一抗(ab68428)购自 Abcam 公司;LPL 单克隆抗体(美国华盛顿大学 Dr. John Brunzell 馈赠),兔抗人 β-actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司);Leptomycin B(美国 Sigma 公司),NE-PER 核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒(美国 PIERCE 公司)DMEM/F-12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、D-Hanks 液、购自 Gibco 公司,HRP 标记兔抗小鼠二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液、Western 封闭液、免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液、DAPI 染色液、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Western 凝胶试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,PBS、PBST、4%血清封闭液为实验室配制。

1.2 方法

1.2.1 人脑胶质瘤细胞株 U251 细胞的培养和鉴定 将冻存的 U251 细胞 37℃复苏至培养瓶中,用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养液,置 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养。取上述培养的 U251 细胞,4%多聚甲醛固定(20 min),PBS 洗 3 次(每次 5 min),4%血清 37 ℃封闭 60 min,加 GFAP 一抗(1:100)4 ℃过夜,PBS 洗 3 次(每次 5 min),FITC 标记的二抗(1:50)37 ℃孵育 90 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min),PBS 清洗 3 次(每次 5 min),50%甘油封片后在荧光显微镜下观察。

1.2.2 LMB 对 U251 细胞的作用 选择处在对数生长期的细胞,分为正常 U251 细胞组、正常细胞+LMB 组,加入 5、10 nmol/L 的 LMB,于 5% CO_2 的培养箱中 37 ℃培养。用倒置显微镜和荧光显微镜分别观察 LMB 加入前以及加入 12 h 和 24 h 后细胞的生长情况。

1.2.3 Western blot 法检测 U251 细胞中 LPL 的表达 细胞培养 24 h 后,PBS 洗涤 2 次,按照说明书用 NE-PER 核蛋白-细胞质蛋白抽提试剂盒分别提取细胞质和细胞核蛋白,加入蛋白酶抑制剂,-80 ℃保存备用。Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,调整样本蛋白质浓度,保证上样量一致。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,Bio-Rad 转膜装置将蛋白转移至 PVDF 膜上,Western blot 封闭液 37 ℃封闭 90 min,加入相应 LPL 一抗 4 ℃孵育过夜,PBST 洗涤 3 次(每次 5 min),辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃孵育 90 min,PBST 洗涤 3 次(每次 5 min)。DAB 显色后,扫描各免疫印迹条带并以 actin 为内参用Quantity One-4.6.2 软件进行结果分析。

1.2.4 MTT 法检测 LMB 对 U251 细胞增殖的影响 加入 LMB 前 24 h 在 100 μl 无抗生素培养基中以每孔(0.5~1.0)×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,使实验时细胞融合度在 30%~50%,同时加入不同浓度的 LMB(5、10、20 nmol/L)共同培养,每组设 10 个平行孔。继续培养 72 h 后,吸去培养基,每孔滴加以配好的 MTT 液 20 μl,37 ℃恒温培养箱孵育 4 h。吸净 MTT 液,再于每孔加入 DMSO 150 μl,摇床上摇动约 10 min 使结晶溶解。以酶标仪于 570 nm 处读取各孔吸光度(absorbance,A)值。细胞生长抑制率 IR(%)=($A_{对照组}$-$A_{实验组}$)/$A_{对照组}$×100%。

1.2.5 流式细胞仪检测 LMB 对 U251 细胞凋亡的影响 加入 LMB 前 24 h 在 2 ml 的无抗生素培养基中以每孔 0.5×10^5~1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,同时加入不同浓度的LMB(5、10、20 nmol/L)共同培养,加液量均为 1.5 ml,每组设 6 个平行孔,24 h 后收集细胞进行检测。离心、漂洗细胞,100 μl 4 倍稀释的结合缓冲液悬浮细胞,立即加入 5 μl 的Annexin V 和 10 μl 的 PI,震荡混匀,避光室温保存 15 min。上述细胞悬液转移至 5 ml 流式反应管中,加入 400 μl 的PBS,上机检测。

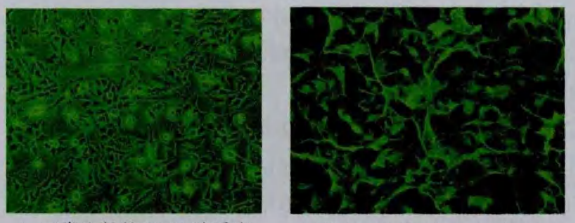
1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计包进行统计处理，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 GFAP 在人胶质瘤 U251 细胞株中的表达

常规培养人胶质瘤 U251 细胞株，计数传代后，显微镜下观察星形胶质细胞呈扁平、多角形、突起短而粗大、境界明显。GFAP 免疫荧光鉴定阳性，GFAP 阳性细胞为星形胶质细胞，在激发光下成绿色，说明所培养的细胞为星形胶质细胞，且纯度很高。见图 1。



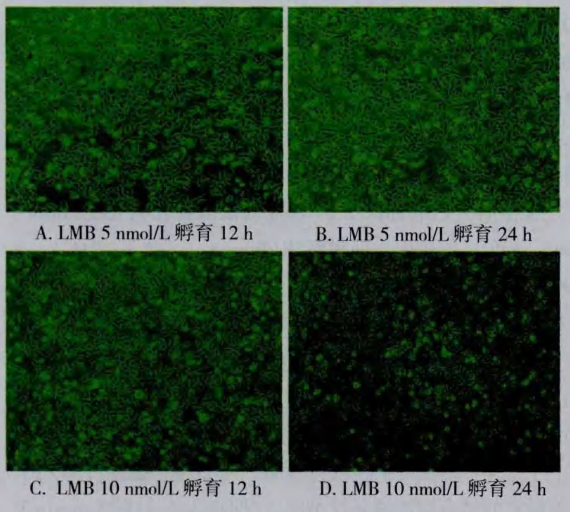
A. 正常生长的 U251 胶质瘤细胞株（100×）　B. 荧光显微镜下 GFAP 在 U251 细胞中的表达（200×）

图 1 GFAP 在人胶质瘤 U251 细胞株中的表达

Fig.1 Expression of GFAP in human glioma U251 cell line

2.2 不同浓度 LMB 对 U251 细胞的影响

加入浓度为 5、10 nmol/L 的 LMB 于培养基中，12 h 和 24 h 后，细胞形态无较大变化，外形完整、境界清晰，无明显细胞脱壁、死亡。10 nmol/L 的 LMB 培养 12 h 后，可见少部分细胞外形不完整、并有少许坏死细胞。24 h 后，坏死细胞略有增加。见图 2。



A. LMB 5 nmol/L 孵育 12 h　B. LMB 5 nmol/L 孵育 24 h

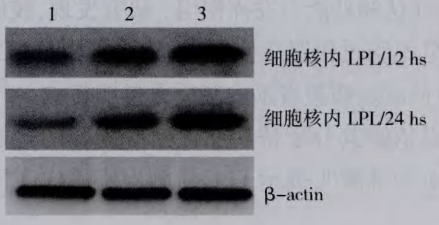
C. LMB 10 nmol/L 孵育 12 h　D. LMB 10 nmol/L 孵育 24 h

图 2 显微镜观察 5、10 nmol/L 的 LMB 孵育 U251 细胞 12 和 24 h 后细胞的生长

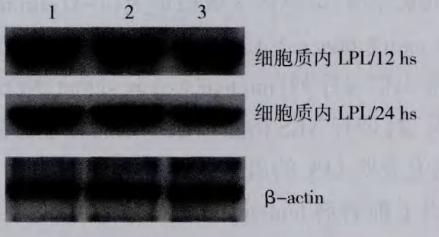
Fig.2 Growth of U251 at 5 nmol/L and 10 nmol/L of LMB after 12 and 24 hours incubation

2.3 Western blot 法检测 U251 细胞核质中 LPL 的表达

分别提取 U251 细胞的核、质蛋白，蛋白电泳观察 LPL的表达情况，浓度为 5、10 nmol/L 的 LMB 加入培养基后，分别孵育 12 和 24 h 后，随着浓度的增加和孵育时间的延长，细胞核内的 LPL 表达明显增加，特别在 10 nmol/L 的 LMB 孵育12 和 24 h 后，LPL 表达量最高。5、10 nmol/L 的 LMB 培养 12 h 后，细胞质内的 LPL 表达变化不明显，培养 24 h 后，10 nmol/L 的 LMB 减少了细胞质 LPL 的表达量。见图 3。



A. 细胞核中 LPL 的表达



1为对照组；2 为 5 nmol/L LMB；3 为 10 nmol/L LMB

B. 细胞质中 LPL 的表达

图 3 LMB 对 U251 细胞核、细胞质中 LPL 表达的影响

Fig.3 Effects of LMB on cytoplasmic and nuclear LPL expressions in U251 cells

2.4 MTT 法检测 LMB 对 U251 细胞增值的影响

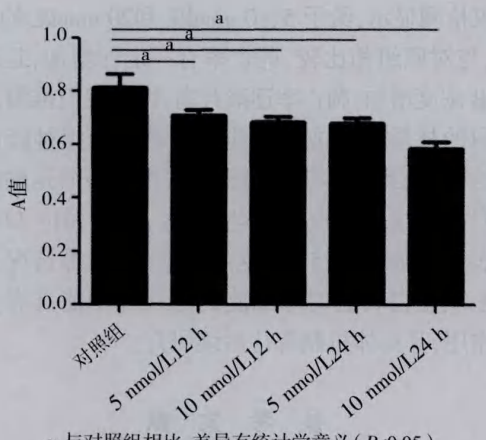
不同浓度 LMB 作用细胞 12 h 和 24 h 后，随着 LMB 浓度的增加和时间的延长，各组 U251 细胞的吸光度值略有下降趋势。其中 10 nmol/L 培养 24 h，细胞的吸光度值最低，为（0.68 ± 0.09），提示 LMB 对细胞的增殖有一定的影响，各实验组与对照组相比，有显著性差异（F=36.025，P<0.01）。以上结果均由 3 次独立性实验获得。见表 1、图 4。

表 1 MTT 法检测经 LMB 处理后各组 U251 细胞的 A 值（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.1 A value of LMB treated U251 cells by MTT（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	A值
对照组	0.82 ± 0.08
5 nmol/L LMB 组（12 h）[a]	0.71 ± 0.03
5 nmol/L LMB 组（24 h）[a]	0.70 ± 0.04
5 nmol/L LMB 组（12 h）[a]	0.69 ± 0.07
5 nmol/L LMB 组（24 h）[a]	0.68 ± 0.09

注：a，各处理组与对照组相比，P < 0.01



a：与对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）

图 4　对照组和 LMB 实验组 A 值的比较（$\bar{x}\pm s$）

Fig.4　Comparison of the A value between control and LMB treated cells（$\bar{x}\pm s$）

2.5　流式细胞术检测 LMB 对 U251 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测显示，加入不同浓度的 LPL（5、10、20 nmol/L）培养 24 h 后，细胞凋亡率有明显增加，对照组和实验组间凋亡率差异有统计学意义（F=85 522.750，$P<0.01$）（表2，图 5、6）。说明 LMB 对细胞的凋亡有一定影响。以上结果均由 3 次独立性实验获得。

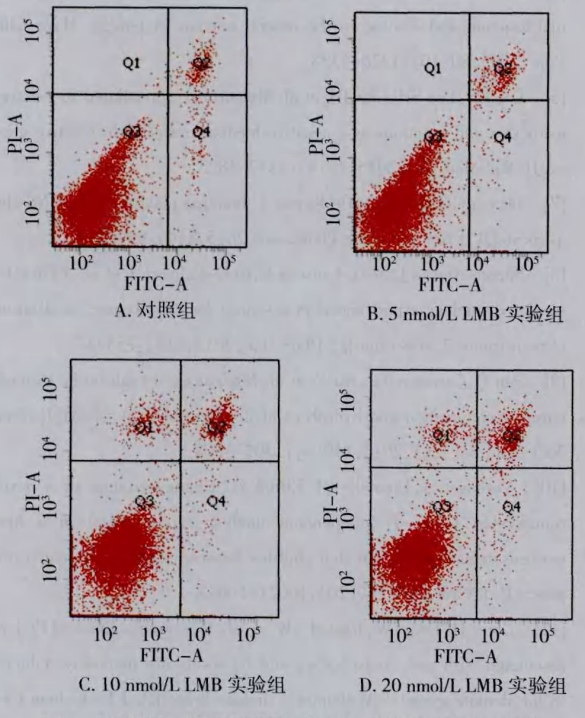


图 5　流式细胞术检测不同浓度 LMB 作用下 U251 细胞的凋亡情况

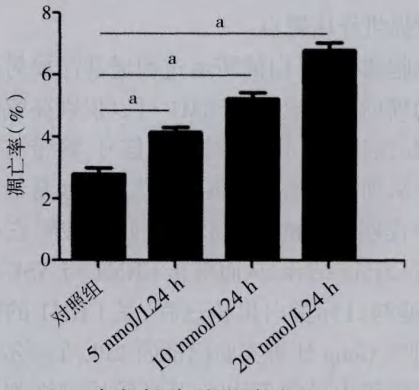
Fig.5　Apoptosis of U251 cells detected by flow cytometry at different concentrations of LMB

表 2　FCM 检测 LMB 对 U251 细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Tab.2　Effect of LMB on the apoptosis of U251 cells detected by FCM（$\bar{x}\pm s$，n=4）

组别	经过 LMB 处理后的凋亡率
对照组	2.81 ± 0.33
5 nmol/L LMB 组（12 h）[a]	4.17 ± 0.24
10 nmol/L LMB 组（24 h）[a]	5.25 ± 0.31
20 nmol/L LMB 组（12 h）[a]	6.80 ± 0.42

注：a，各处理组与对照组相比，$P<0.01$



a：各实验组与对照组相比，$P<0.05$

图 6　LMB 对 U251 细胞凋亡的影响

Fig.6　Effect of LMB on apoptosis of U251

3　讨　论

中枢神经系统肿瘤以神经胶质瘤最为常见，尽管目前针对于胶质瘤的基础与临床研究已经有所进展，但由于其致死率极高且手术易复发难以达到满意的治疗效果。研究表明，LPL 在胶质瘤患者脑组织内和脑脊液中异常表达，且已证实 LPL 的表达情况与胶质瘤患者的年龄、性别以及组织学分型无关，仅与胶质瘤的恶性程度正相关，提示 LPL 在胶质瘤的发生发展中有至关重要的作用。

U251 细胞系是来源于人类的星形胶质细胞瘤[5-6]，星形胶质细胞不仅能够维持神经元结构并为其提供营养、影响神经系统的发育和神经组织的修复与再生，而且作为免疫效应细胞，还参与神经系统的免疫和血脑屏障的建立和维持[7]，因此 U251 细胞是研究人类胶质肿瘤的理想工具。研究发现，肿瘤的发生和细胞外信号通过相应受体及细胞内信号转导有密切关系，它可以引起细胞核发生反应，在

细胞增殖、分化、发育、凋亡及与细胞反应有关的物质合成调控中起重要作用。在指数增殖期的细胞，每分钟约有数以百计的蛋白质通过细胞核进行转运，其中由细胞质向核内转运的物质主要是蛋白质（包括细胞质内信号分子及其活化产物），这一过程称之为细胞核转入。真核细胞中，细胞核与细胞质是由核膜分开的，因此蛋白质入核机制的研究对阐明细胞的核反应机制及其调节具有重要的意义，而核转录因子入核是对信号转导途径进行调节的一个重要环节，对这一环节机制的探讨将为相关疾病的治疗提供作用靶点。

细胞核-质蛋白的转运过程通常需要另外一些蛋白的辅助来完成，而 CRM1 可以识别亮氨酸富集的核输出信号序列 NES 的出核信号，将带有 NES的蛋白质从细胞核输出到细胞质[8]。LMB 是最初从链霉菌中提取出来的不饱和支链脂肪酸[9]，它可以竞争性与 CRM1 结合，从而阻止 CRM1 与 NSE 的相互作用，抑制目标蛋白出核过程，是 CRM1 的特异性抑制剂[10]。Gong H 等实验已证明 LPL 在阿尔茨海默病人脑组织中异常表达[11]，其在胶质瘤细胞中的表达情况鲜有报道。在本实验中，分别给予 5 nmol/L和 10 nmol/L 的 LMB 作用 12、24 h 后观察细胞形态，倒置显微镜下未见明显改变。然后进一步对不同浓度 LMB 处理不同时间前后 U251 细胞核、细胞质内 LPL 蛋白采用 Western blot 检测发现细胞核内LPL 蛋白在空白对照组的表达水平较低，在细胞质内的表达水平较高。5、10 nmol/L 的 LMB 可上调核内LPL 蛋白表达，对质内 LPL 蛋白无影响，且细胞核内 LPL 蛋白随着 LMB 剂量加大其表达也明显增强，而处理时间延长至 24 h 后发现核内 LPL 蛋白表达强度反而比 LMB 处理 12 h 后核内的 LPL 蛋白强度稍有下降，提示 LMB 对 LPL 蛋白的核-质转运具有剂量和时间依赖性，其最佳剂量和最佳影响时间有待进一步研究。迄今为止，关于 LPL 核质穿梭的分子机制和细胞内功能的研究未见报道。在本实验中，通过加入 LMB 后，显微镜观察细胞形态有所改变，部分细胞脱壁，边界稍有模糊，细胞内颗粒物增加。MTT 观察细胞的增殖情况显示随着 LMB 浓度的增加和孵育时间的延长，细胞的增殖明显降低，显示 LMB 形成的 LPL 核质蛋白的重新定位和核质比例变化对 U251 细胞的分裂、增殖有一定的影响。流式细胞仪检测显示，给予 5、10 nmol/L 和20 nmol/L 的LMB 后，与对照组相比较，凋亡率有一定的增加，且随着 LMB 浓度增加，凋亡率逐渐升高，因此我们推测，LPL 蛋白的核质转运或许可能成为靶向治疗神经胶质瘤的靶点，目前影响与肿瘤相关蛋白核质运输的机制研究已成为热点，在本实验中，细胞核内 LPL 蛋白表达增加后 U251 细胞的存活、凋亡等情况也提示核质蛋白转运对于细胞的分化和功能具有重要的作用，其具体机制有待后续研究。

参 考 文 献

[1] 顾 彬，赵迎春. 脂蛋白酯酶与动脉粥样硬化及脑梗死的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2012，39(6)：534-537.

[2] 张秀兰，杨新平，刘 芳，等. 脂蛋白脂肪酶和动脉粥样硬化[R]. 中国药物与临床，2012，12(10)：1309-1311.

[3] Wang X，Sun W，Xu E. The expression and activity of brain lipoprotein lipase is increased after acute cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Neuropathology，2010，30(2)：131-139.

[4] Zechner R. The tissue specific expression of lipoprotein lipase：implications for energy and lipoprotein metabolism[J]. Curr Opin Lipidol，1997，8(2)：77-88.

[5] Benarroch EE. Neuron-astrocyte ineractions：partnership for normal function and disease in the central nervous system[J]. Mayo Clin Proc，2005，80(10)：1326-1338.

[6] Lee HS，Lee SH，Cha JH，et al. Meteorin is upregulated in reactive astrocytes and functions as a negative feedback effector in reactive gliosis[J]. Mol Med Rep，2015，4(14)：1817-1823.

[7] Jensen CJ，Massie A，De Keyser J. Immune players in the CNS：the astrocyte[J]. J Neuroimmune Pharmacol，2013，8(4)：824-839.

[8] Simon-Areces J，Acaz-Fonseca E，Ruiz-Palmero I，et al. A CRM1-mediated nuclear export signal is essential for cytoplasmic localization of neurogenin 3 in neurons[J]. PLoS One，2013，8(1)：e55237.

[9] Sun Q，Carrasco YP，Hu Y，et al. Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2013，110(4)：1303-1308.

[10] Verhagen J，Donnelly M，Elliott G. Characterization of a novel transferable CRM-1-independent nuclear export signal in a herpesvirus tegument protein that shuttles between the nucleus and cytoplasm[J]. J Virol，2006，80(20)：10021-10035.

[11] Gong H，Dong W，Rostad SW，et al. Lipoprotein lipase(LPL) is associated with neurite pathology and its levels are markedly reduced in the dentate gyrus of Alzheimer's disease brains[J]. J Histochem Cytochem，2013，61(12)：857-868.

（责任编辑：张辉洁）