

## CREB1在胶质瘤中的表达及其对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响

钱进<sup>1\*</sup>,徐英纳<sup>1</sup>,陶振玉<sup>1</sup>,史岩<sup>2</sup>,栾文康<sup>3</sup>,颜伟<sup>3</sup>

<sup>1</sup>宣城市人民医院神经外科,安徽宣城 242000;<sup>2</sup>南京医科大学附属南京医院神经外科,江苏南京 210006;<sup>3</sup>南京医科大学第一附属医院神经外科,江苏南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨CREB1在胶质瘤中的表达及其对人脑胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响。方法:采用中国脑胶质瘤基因组计划(CGGA)数据库中CREB1在不同级别胶质瘤组织中的表达数据,分析CREB1的表达水平与胶质瘤患者临床预后的相关性。采用CREB1小干扰RNA(si-CREB1)转染胶质瘤U251及U87细胞,通过CCK8试验及Transwell试验观察下调CREB1表达后胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的变化。结果:CREB1在人脑高级别胶质瘤组织中的表达高于低级别组,胶质瘤患者中高表达CREB1提示预后不良。下调CREB1表达可以抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力。结论:CREB1与胶质瘤的病理级别和临床预后相关,si-CREB1可以抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力。

**[关键词]** 胶质瘤;临床预后;CREB1;增殖;侵袭

**[中图分类号]** R739.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)01-0007-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180102

### Expression of CREB1 in glioma and its effect on the proliferation and invasion of glioma cells

Qian Jin<sup>1\*</sup>, Xu Yingna<sup>1</sup>, Tao Zhenyu<sup>1</sup>, Shi Yan<sup>2</sup>, Luan Wenkang<sup>3</sup>, Yan Wei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Xuancheng People's Hospital, Xuancheng 242000; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Nanjing Hospital, NMU, Nanjing 210006; <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, the First Affiliate Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the expression of CREB1 in glioma and its effect on the proliferation and invasion of human glioma cells. **Methods:** The expressions of CREB1 in different grades of glioma tissues were analyzed within the Chinese Glioma Genome Atlas expression Dataset (CGGA). The correlation between CREB1 expression and clinical prognosis in glioma patients was analyzed by using CGGA Dataset. The small interfering RNA of CREB1 (si-CREB1) were transfected into U251 and U87 glioma cells, the effect of down-regulation of CREB1 on cell proliferation and invasion were tested by CCK8 assay and Transwell assay. **Results:** The expression of CREB1 in higher grade glioma tissues was higher than that in lower grade tissues. High-expression of CREB1 associated with unfavourable prognosis in glioma patients. Down-regulation of CREB1 suppressed proliferation and invasion in glioma cells. **Conclusion:** The expression level of CREB1 relates with tumor pathological grade and clinical prognosis in glioma. si-CREB1 inhibits proliferation and invasion in glioma cells.

**[Key words]** glioma; clinical prognosis; CREB1; proliferation; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0007-0010, 39]

胶质瘤是中枢神经系统中最常见的一种原发性肿瘤,病理恶性特点主要表现为肿瘤组织过度增殖并向周围脑组织侵袭,呈浸润性生长,目前认为

其发病机制是多基因异常调控所致。环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(cAMP-responsive element binding protein1, CREB1)是真核细胞转录因子,分子量为43 kDa,属于ATF/CREB家族,主要通过cAMP依赖的细胞信号转导途径调控基因的表达,其转录活性的激活由自身磷酸化所决定,在生命过程中发挥

**[基金项目]** 国家青年自然科学基金项目(81502168)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qj791109@163.com

重要作用<sup>[1]</sup>。对于CREB1基因的研究一方面集中于神经系统高级生理活动过程中,如抑郁症<sup>[2]</sup>、帕金森病<sup>[3]</sup>、神经元缺氧损伤修复<sup>[4]</sup>等。另一方面,CREB1在人体恶性肿瘤中作为一种重要的原癌基因愈发受到重视,已有证据表明CREB1在人类肺癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>、白血病<sup>[7]</sup>等多种肿瘤组织中高表达。本研究检测分析CREB1在脑胶质瘤中的表达情况及与临床预后的关系,并探讨其对胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胶质瘤细胞系U87、U251细胞均购自中科院上海细胞库。Opti-MEM1、DMEM培养基和新生胎牛血清均购自美国GIBCO公司。Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司。CREB1小干扰RNA购自上海吉玛公司,序列:5'-GUCUCCACAAGUCCA AACATT - 3', 5' - GGCCUGCAAACAUAACCATT - 3'。CCK8试剂盒购自上海碧云天公司。Matrigel基质胶购自美国BD Biosciences公司。CREB1抗体(1:400)购自美国Santa Cruz公司,GAPDH抗体(1:5 000)购自美国Bioworld公司,二抗(1:2 000)购于美国Santa Cruz公司。Pierce ECL发光液购自美国Pierce公司。

CREB1基因芯片表达谱数据和临床随访数据均下载自中国脑胶质瘤基因组计划(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)官方网站 <http://www.cgga.org.cn/portal.php>。325例不同级别胶质瘤样本表达数据(其中低级别WHO II级109例;高级别WHO III级72例+ WHO IV级144例);310例胶质瘤临床预后数据,其中CREB1高表达组102例,低表达组208例。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、分组和细胞转染

U87及U251细胞培养于10%新生牛血清的DMEM培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,取对数生长期细胞实验。将细胞分为2组:阴性对照组(转染无义序列NC)和si-CREB1组(转染si-CREB1)。按照Lipofectamine 2000说明书将si-CREB1和Lipofectamine 2000混合于Opti-MEM1中,得到转染混合液,静置20 min后将转染混合液加入细胞中,放入37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,8 h之后更换为完全培养基。

#### 1.2.2 Western blot 实验

转染96 h后,NC组、si-CREB1组各1×10<sup>6</sup>个细

胞用RIPA裂解液裂解,收获蛋白并行BCA定量,30 μg蛋白上样于12% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,湿转至PVDF膜并用5%脱脂奶粉于37℃条件下封闭1 h,一抗(CREB1 1:400稀释)4℃孵育过夜,HRP标记的二抗孵育90 min,以GAPDH作为内参,将超敏发光液加在PVDF膜上,曝光显影,验证si-CREB1的转染效果。

#### 1.2.3 细胞增殖试验

各组细胞消化后重悬于培养液中,每孔1×10<sup>4</sup>个细胞接种于96孔培养板中,按转染试剂说明书进行细胞转染。各组于转染后24、48、72和96 h检测。检测前4 h每孔加入5 μL CCK8溶液,到达检测点时弃去培养液,用酶标仪测定各孔的吸光度值,波长为450 nm,每组3个复孔。

#### 1.2.4 细胞侵袭试验

应用24孔预铺Matrigel的Transwell膜行细胞体外侵袭试验。将各组细胞种植于Transwell小室内,每组3个复孔,每孔上室含3×10<sup>4</sup>个细胞和无血清DMEM培养基200 μL,下室为含20%胎牛血清的DMEM培养基500 μL。培养48 h后,将上室未侵袭细胞用湿棉签擦去,以95%酒精固定,以0.1%结晶紫染色,拍照(×200),计数。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 11.5软件进行统计学分析,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,生存随访数据运用Kaplan-Meier生存分析和log-rank检验进行分析,其他数据运用单因素方差分析,各组实验均独立重复3次, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

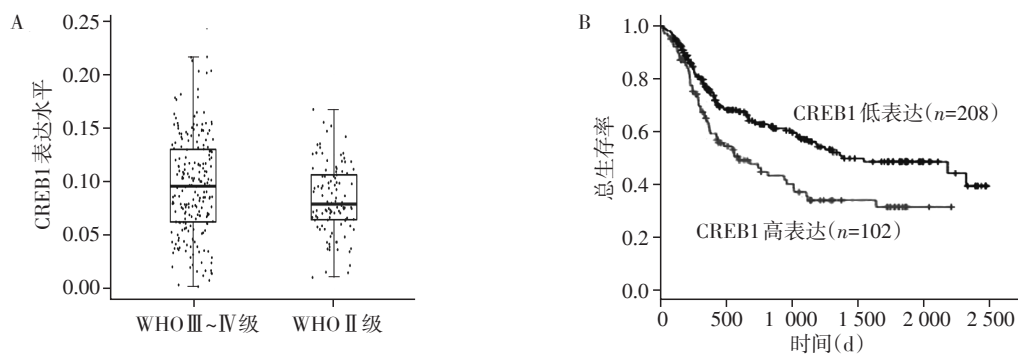
## 2 结果

### 2.1 CREB1在不同级别人脑胶质瘤组织中的表达

CREB1在325例不同级别胶质瘤中的表达数据(CGGA)分析显示:高级别胶质瘤(WHO III~IV级)组织中CREB1的表达水平明显高于低级别胶质瘤(WHO II级)组织(图1A,  $P < 0.01$ )。CGGA中310例胶质瘤患者临床随访数据分析显示:CREB1高表达组胶质瘤患者预后较低表达患者差,log-rank检验 $P=0.003$ ,提示在胶质瘤中CREB1高表达可作为一个独立的预后不良因素(图1B)。

### 2.2 si-CREB1可抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力

由于CREB1在胶质瘤中高表达,文献亦报道其作为原癌基因在多种肿瘤中有重要调控作用,我们运用CREB1小干扰RNA(si-CREB1)敲低CREB1的表达来观测其癌基因作用是否得到抑制。Western



A:单因素方差分析CREB1在不同级别胶质瘤中的表达数据( $P < 0.01$ );B:Kaplan-Meier生存分析胶质瘤临床预后数据( $P=0.003$ )。

图1 CREB1在不同级别胶质瘤组织中的表达及其与临床预后的关系

Figure 1 The expression of CREB1 in different grades of glioma tissues and its correlation to prognosis

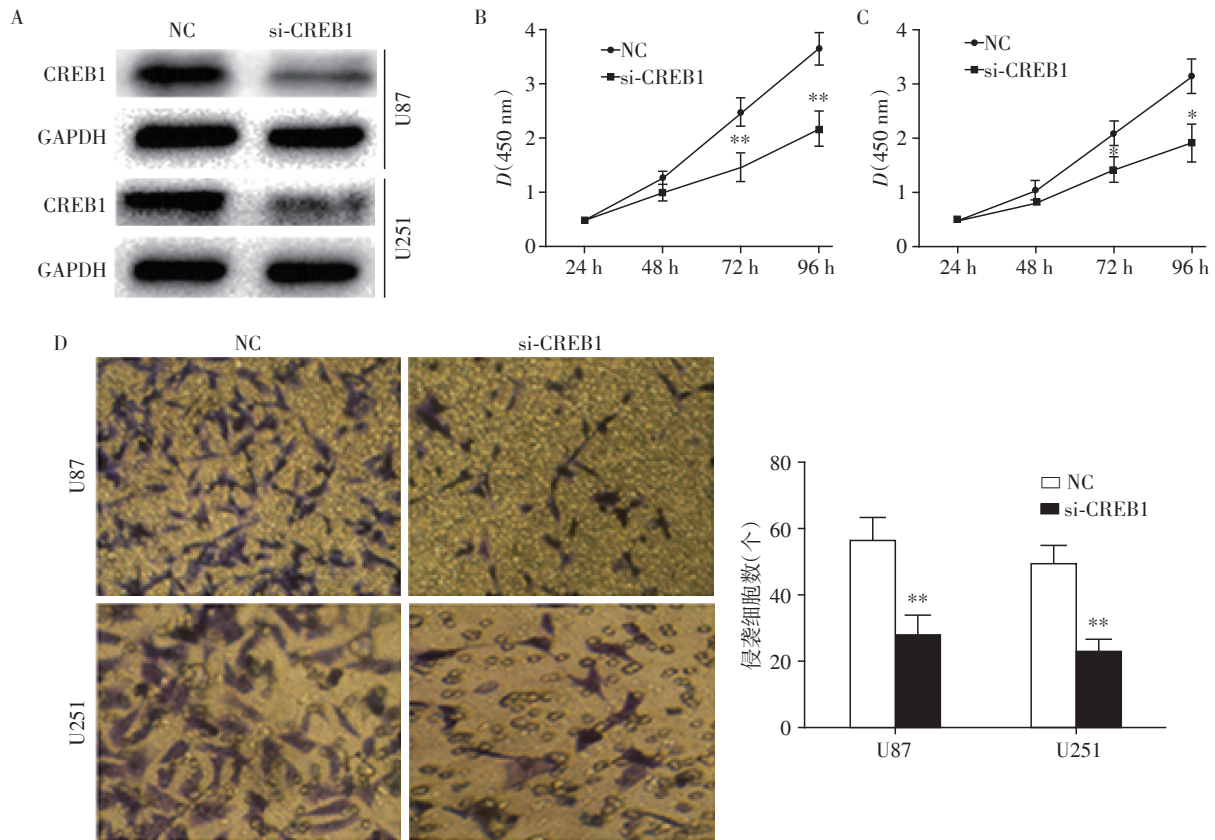
blot 验证转染 si-CREB1 后 U251 及 U87 两组细胞的 CREB1 表达降低(图 2A)。CCK8 细胞增殖实验结果表明 U87 细胞在转染 si-CREB1 后,和阴性对照(NC)组相比,si-CREB1 组在 72 h 和 96 h 处细胞增殖显著下降,且差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。在 U251 细胞中,转染 si-CREB1 产生的抑癌效果与 U87 细胞相似,在 72 h 和 96 h 处 si-CREB1 组细胞增殖较 NC 组显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2B)。体外 Transwell 实验检测其对胶质瘤细胞侵袭能力的影响,结果发现 si-CREB1 组 U87 细胞穿过人工基底膜数为( $28.3 \pm 4.5$ )个,而 NC 组为( $57.6 \pm 5.0$ )个,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。U251 细胞转染 si-CREB1 后,si-CREB1 组及 NC 组穿过的细胞数分别为( $22.0 \pm 2.6$ )个和( $46.0 \pm 4.4$ )个,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 2C)。该结果显示敲低 CREB1 表达能够有效抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力。

### 3 讨论

CREB1 基因组位于人类染色体 2q34,是转录因子中的激活转录因子(ATF)/CREB 家族中的一员,是调节转录的核蛋白因子,主要通过 cAMP 依赖的细胞信号转导途径调节基因的表达。在静息期细胞中,CREB1 以去磷酸化状态存在,无转录活性,当细胞内 cAMP 或  $Ca^{2+}$  水平升高时,CREB1 的 133 位丝氨酸被蛋白激酶 A 磷酸化后被激活,活化的 CREB1 识别保守的 cAMP 反应元件,从而调节其下游靶基因的表达<sup>[8]</sup>。CREB1 调控的靶基因涵盖了从神经传导、生长因子和激素、细胞结构、细胞生存、离子通道、细胞代谢、信号通路到基因转录调节等诸多方面,在众多细胞生理活动中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。目前 CREB1 与肿瘤发生发展的关系日益受到重视,成为近年来研究热点。Dimitrova 等<sup>[11]</sup>运用全新的生

物基因信息网络分析软件 inflo 寻找有效的生物基因标记物和靶点时发现 cAMP-CREB1 线轴通路在卵巢癌中发挥着重要的分子调控作用。Chhabra 等<sup>[12]</sup>研究发现 CREB1 在乳腺癌中高表达,恶性较高的浸润性导管癌中表达显著升高,乳腺癌患者生存期亦和 CREB1 的表达相关,高表达的 CREB1 与预后负相关。Li 等<sup>[13]</sup>研究发现 CREB1 在肾癌组织和细胞系中高表达,下调 CREB1 表达可以影响细胞的增殖、迁移、凋亡等功能从而抑制肾癌肿瘤发生,在肾癌中 CREB1 还可以被 miR-10b-5p 和 miR-363-3p 靶向调控影响肿瘤发生。

在胶质瘤的分子生物研究当中,CREB1 多被报道为重要的转录因子参与 miRNA 的调控网络当中,并形成多条反馈环行通路<sup>[14]</sup>。Peng 等<sup>[15]</sup>发现 miR-200b 可以靶向 CREB1 抑制胶质瘤的生长。Tan 等<sup>[16]</sup>发现在胶质瘤细胞中 CREB1 可以通过靶向 miR-23a 的表达进而调控 PTEN 来促进胶质瘤的生长,提出 CREB1-miR-23a-PTEN 的非编码 RNA 介导多基因路在胶质瘤中的调控方式。Hutter 等<sup>[17]</sup>在研究分子磷酸化在胶质母细胞瘤组织的调控作用时,挑选了 12 条最重要的磷酸化通路,在 60 例组织标本中运用反相蛋白质阵列(RPPA)技术结合随访资料发现 pCREB1/CREB1、NOTCH - ICD/NOTCH1、pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ 磷酸化在肿瘤患者中发挥重要作用并与预后生存相关。本研究首次运用 CGGA 大数据分析 CREB1 在不同级别胶质瘤中的表达情况及与临床预后的关系,与 CREB1 在其他肿瘤中表达情况相似,在胶质瘤中亦作为癌基因高表达且与级别相关,高级别胶质瘤中的表达高于低级别胶质瘤。患者生存数据随访也证实 CREB1 的表达水平和患者生存期相关,高表达的 CREB1 提示预后不良。我们进一步探讨了 CREB1 在细胞水平如何影响胶质瘤



A: 转染 si-CREB1 后, 在 U251 和 U87 细胞中, Western blot 检测均提示 CREB1 的表达降低; B、C: U87(B) 和 U251(C) 胶质瘤细胞转染 si-CREB1 后与对照组相比, 其增殖能力被抑制; D: 转染 si-CREB1 组较对照组相比, 胶质瘤细胞侵袭能力明显抑制( $\times 200$ ), 穿过人工基底膜细胞计数明显降低; 与 NC 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图2 si-CREB1对胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响

Figure 2 The effect of si-CREB1 on proliferation and invasion in glioma cells

的恶性生物学功能, 体外试验中用 si-CREB1 下调 CERB1 的表达, 运用 CCK8 试验和 Transwell 试验对胶质瘤的增殖及侵袭能力进行检测, 结果发现 si-CREB1 转染后能明显抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力。

这些结果表明, CREB1 与胶质瘤的级别和临床预后相关, 具有一定的临床分子标记评估价值, CREB1 对胶质瘤细胞的增殖和侵袭具有调控作用, 在胶质瘤的恶性进展过程中具有重要意义。下一步我们将着力于 CREB1 与其他重要信号通路和胶质瘤临床重要分子标志物的相关性研究, 为胶质瘤疾病的发病机制和基因治疗策略提供更多的实验依据。

[参考文献]

[1] Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene[J]. Nature, 1987, 328(6126): 175-178  
 [2] Zhou WJ, Xu N, Kong L, et al. The antidepressant roles of

Wnt2 and Wnt3 in stress-induced depression-like behaviors[J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(9): e892  
 [3] Huang QY, Du XX, He X, et al. JNK-mediated activation of ATF2 contributes to dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2016, 277: 296-304  
 [4] Lin WY, Chang YC, Lee HT, et al. CREB activation in the rapid, intermediate, and delayed ischemic preconditioning against hypoxic-ischemia in neonatal rat [J]. J Neurochem, 2009, 108(4): 847-859  
 [5] Park SA, Lee JW, Herbst RS, et al. GSK-3 $\alpha$  is a novel target of CREB and CREB-GSK-3 $\alpha$  signaling participates in cell viability in lung cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153075  
 [6] Zhang J, Ma Y, Wang S, et al. C/EBP $\alpha$  inhibits proliferation of breast cancer cells via a novel pathway of miR-134/CREB[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14472-14478  
 [7] Tregnago C, Manara E, Zampini M, et al. CREB engages

(下转第39页)

- 灌注损伤后内皮祖细胞归巢动力学的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2013,29(3):199-203
- [5] 薄成佳,陈 波,贾瑞鹏,等. 晚期缺血预适应对肾脏缺血再灌注损伤大鼠内皮祖细胞归巢的影响[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(8):1634
- [6] Berezin AE, Kremzer AA. Circulating endothelial progenitor cells as markers for severity of ischemic chronic heart failure[J]. *J Card Fail*, 2014, 20(6):438-447
- [7] Wang L, Wang X, Wang L, et al. Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(6):1555-1563
- [8] Chatauret N, Badet L, Barrou B, et al. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury [J]. *Prog Urol*, 2014, 24(Suppl 1):S4-S12
- [9] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(532):964-967
- [10] Xu S, Zhu J, Yu L, et al. Endothelial progenitor cells: current development of their paracrine factors in cardiovascular therapy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(4):387-396
- [11] Thomas AL, Morgan B, Dreves J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK 222584 [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30(3 Suppl 6):32-38
- [12] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(3):337-346
- [13] Wang S, Chen Z, Tang X, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor 165 transfected endothelial progenitor cells for the treatment of limb ischemia [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4):4967-4974
- [收稿日期] 2016-11-02

(上接第10页)

- C/EBP $\delta$  to initiate leukemogenesis [J]. *Leukemia*, 2016, 30(9):1887-1896
- [8] Haus-Seuffert P, Meisterernst M. Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 212(1/2):5-9
- [9] Montminy M, Brindle P, Arias J, et al. Regulation of somatostatin gene transcription by cyclic adenosine monophosphate [J]. *Metabolism*, 1996, 45(8 Suppl 1):4-7
- [10] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. *Neuron*, 2002, 35(4):605-623
- [11] Dimitrova N, Nagaraj AB, Razi A, et al. InFlo: a novel systems biology framework identifies cAMP-CREB1 axis as a key modulator of platinum resistance in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(17):2472-2482
- [12] Chhabra A, Fernando H, Watkins G, et al. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(4):953-958
- [13] Li Y, Chen D, Li Y, et al. Oncogenic cAMP responsive element binding protein 1 is overexpressed upon loss of tumor suppressive miR-10b-5p and miR-363-3p in renal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4):1967-1978
- [14] Wang YW, Chen X, Ma R, et al. Understanding the CREB1-miRNA feedback loop in human malignancies [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7):8487-8502
- [15] Peng B, Hu S, Jun Q, et al. MicroRNA - 200b targets CREB1 and suppresses cell growth in human malignant glioma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1/2):51-58
- [16] Tan X, Wang S, Zhu L, et al. cAMP response element-binding protein promotes gliomagenesis by modulating the expression of oncogenic microRNA - 23a [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39):15805-15810
- [17] Hutter G, Sailer M, Azad TD, et al. Reverse phase protein arrays enable glioblastoma molecular subtyping [J]. *J Neurooncol*, 2017, 131(3):437-448
- [收稿日期] 2017-09-14