

TRIM22通过PI3K/AKT信号通路调控胶质母细胞瘤增殖、侵袭和迁移的研究

冯爽,陈正新,仇文进,蔡小敏,陆嘉诚,刘宁,王慧博*

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:探讨基因TRIM22在人脑胶质母细胞瘤中的表达及对增殖、侵袭和迁移等生物能力的影响。方法:通过TCGA数据库分析胶质母细胞瘤组织和正常脑组织中TRIM22表达水平,采用实时定量PCR(qRT-PCR)和Western blot两种方法分别检测胶质母细胞瘤细胞系U87和U251中TRIM22 mRNA和蛋白表达水平。应用Lipofectamine 3000将2种TRIM22-siRNA分别转染至U87及U251细胞中,再分别通过qRT-PCR和Western blot检测胶质母细胞瘤细胞中TRIM22敲低效率。应用CCK-8法、细胞平板克隆形成实验来评估TRIM22敲低后对于细胞增殖能力的影响;应用细胞划痕实验和Transwell实验检测TRIM22敲低后细胞侵袭和迁移能力的变化。应用Western blot检测TRIM22敲低对PI3K/AKT信号通路蛋白和上皮间质化标记蛋白(N-cadherin、Vimentin、E-cadherin)表达的影响。结果:在U87及U251细胞中敲低TRIM22后,细胞增殖、侵袭和迁移都明显减弱,p-AKT(S473)、N-cadherin、Vimentin表达水平则明显降低,E-cadherin表达水平明显升高。结论:TRIM22可能通过调节PI3K/AKT信号通路调控胶质母细胞瘤增殖、侵袭和迁移能力。

[关键词] 胶质母细胞瘤;TRIM22;增殖;侵袭;迁移

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-728-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180603

TRIM22 promotes proliferation, invasion and migration of glioblastoma by regulating PI3K/AKT signaling

Feng Shuang, Chen Zhengxin, Qiu Wenjin, Cai Xiaomin, Lu Jiacheng, Liu Ning, Wang Huibo*

Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of TRIM22 on proliferation, invasion and migration in glioblastoma. **Methods:** The expression levels of TRIM22 were analyzed in TCGA database and were examined in two glioblastoma cell lines (U87 and U251 cells) using qRT-PCR and Western blot. Two independent TRIM22 siRNAs were transfected into U87 and U251 cells, and the effect of TRIM22 depletion was confirmed. CCK8 assay and colony formation assay were carried out to assess the effect of TRIM22 depletion on glioblastoma cell proliferation. Transwell assay and wound healing assay were also performed to investigate the role of TRIM22 depletion on glioblastoma cell invasion and migration. The expression of p-AKT and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated proteins including N-cadherin, Vimentin, E-cadherin were examined using Western blot after TRIM22 depletion. **Results:** Inhibition of TRIM22 expression markedly reduced the proliferation, invasion and migration of glioblastoma cells. Correspondingly, the expression of p-AKT (S473), N-cadherin and Vimentin were decreased, whereas the expression of E-cadherin was increased after TRIM22 depletion. **Conclusion:** TRIM22 is a crucial factor for regulating the proliferation, invasion and migration of glioblastoma cells through PI3K/AKT signaling.

[Key words] glioblastoma; TRIM22; proliferation; invasion; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 728-733]

[基金项目] 国家自然科学基金(81772681);江苏省科技厅基础研究计划(BK20160098)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hbwang@njmu.edu.cn

胶质母细胞瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤^[1-2]。尽管随着手术技术的迅速发展、放疗以及替莫唑胺等新型化疗药物的广泛应用,胶质母细

瘤患者的预后依然不容乐观。据统计,胶质母细胞瘤患者的中位总生存期仅为12~15个月,5年生存率在4.7%左右,复发率及致死率极高^[3]。因此,深入探索胶质母细胞瘤发生和发展的分子机制,研究新型治疗靶点,对提高胶质母细胞瘤的治疗效果,改善患者预后十分必要。

TRIM家族是一类具有RING结构域、B盒和回旋卷曲区等结构的特征性蛋白^[4-5],TRIM22作为TRIM家族的重要成员,在人体内多种生理活动中扮演着重要角色^[6]。近些年研究发现,TRIM22在肿瘤发生发展中发挥着重要作用^[7]。但在胶质母细胞瘤中,TRIM22的表达、功能及临床意义还没有相应的研究。本研究通过分析TRIM22在胶质母细胞瘤中的表达情况,并通过在胶质母细胞瘤细胞系U87和U251中下调TRIM22的表达,探讨TRIM22对胶质母细胞瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响以及和PI3K/AKT信号通路、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

正常星型胶质细胞(美国ATCC细胞库);人脑胶质母细胞瘤细胞系:U87细胞、U251细胞(中国科学院细胞库);DMEM高糖培养基、新生胎牛血清(Hyclone公司,美国);转染用培养基Opti-MEM(Gibco公司,美国);RNA抽提试剂TRIzol、转染试剂Lipofectamine 3000转染试剂盒(Invitrogen公司,美国);总蛋白提取试剂盒(南京凯基公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、TRIM22引物、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物(TaKaRa公司,日本);TRIM22小干扰序列(TRIM22-siRNA)及无意义序列(GE healthcare公司,美国);Western blot凝胶配置试剂盒、CCK-8试剂盒(上海碧云天公司);Transwell小室(Corning公司,美国);Matrigel(BD公司,美国)。下列一抗:TRIM22(ab224059)、N-cadherin(ab18203)、E-cadherin(ab1416)、Vimentin(ab8978)、 β -actin(ab8227)(Abcam公司,美国);下列二抗:AKT(#4685)、p-AKT(S473)(#4060)(CST公司,美国);辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

胶质母细胞瘤细胞系U87和U251接种于含10%胎牛血清和1%青链霉素双抗的高糖DMEM培

养基中,放置于37℃、5%CO₂恒温恒湿的密闭培养箱中培养。细胞贴壁生长,2d换1次液,传代培养。按照GE healthcare公司和Invitrogen公司说明书的方法在胶质母细胞瘤细胞系U87和U251中进行TRIM22小干扰序列和无意义序列的转染。

1.2.2 实时定量PCR(qRT-PCR)检测TRIM22的干扰效率

使用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA,取RNA于紫外分光光度计下测 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$,比值处于1.8~2.1之间则符合纯度要求。按miRNA逆转录试剂盒说明配制逆转录试剂,逆转录合成cDNA,按照qRT-PCR说明书方法进行qRT-PCR反应,反应条件为:50℃ 2 min,95℃ 2 min,95℃退火15 s,60℃延伸1 min,40个循环,最后72℃延伸5 min。利用ABI 7300 System SDS Software软件进行分析,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算TRIM22的相对表达量,每个样品均重复实验3次。TRIM22上游引物:5'-GCACGCTCATCTCAGATCTCC-3', TRIM22下游引物:5'-TTTTGGCTTCTTCAATGTCCAG-3'; GAPDH上游引物5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', GAPDH下游引物5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。

1.2.3 CCK-8法检测细胞活力

将U87和U251细胞以每孔1000个的数量接种至96孔板中,于培养箱中培养48 h后取出,每孔分别加入10 μ L CCK-8试剂,充分混匀后放入培养箱中继续培养,通过在不同时间点测量450 nm波长下每孔的吸光度值来比较观察各组的细胞活力变化情况。

1.2.4 平板克隆形成实验

将对照组或转染后的胶质母细胞瘤细胞重悬并计数,以每孔100个的数量接种于6孔板中,轻轻吹打,确保细胞均匀分布于板底。在培养箱中连续培养10 d后取出,用移液器去除培养液,用PBS仔细洗涤3次后使用4%甲醛覆盖孔底用以固定20 min,去除甲醛,PBS仔细清洗3次后用结晶紫染色液染色2 h,回收染色液后用PBS清洗干净,晾干后拍照。

1.2.5 侵袭实验

提前1 d,基质胶于4℃冰箱过夜解冻,稀释后均匀铺入Transwell小室上室,将小室放入24孔板后,每孔上室加入混有 2×10^4 个细胞的200 μ L无血清DMEM培养基,另在每孔下室中加入500 μ L DMEM培养基,其中混有10%胎牛血清用以诱导细胞侵袭。在培养箱中恒温恒湿的条件下培养24 h

后,将Transwell小室从24孔板中取出,用PBS仔细清洗小室底层3次,后用棉签擦除上室未侵袭的胶质母细胞瘤细胞,清洗完毕后用4%甲醇固定20 min, PBS仔细清洗3次后用结晶紫染色液染色2 h,染色完成后清洗干净,在显微镜下随机选取3个独立视野计数并拍照,重复3次计算平均值。

1.2.6 细胞划痕实验

将对照组或转染后的U87和U251细胞接种至6孔板,取 3×10^5 个细胞均匀铺入6孔板中,于6孔板中心区域人工划一条笔直的、约5 mm的划痕伤口,通过显微镜分别在划痕后0、24 h两个时间点进行拍照。重复3次实验。

1.2.7 Western blot 实验

按照总蛋白提取试剂盒说明书提取U87和U251细胞的总蛋白,通过BCA法测定调整蛋白浓度后加入上样缓冲液并煮沸10 min。配制10% SDS-PAGE凝胶,每个孔统一上样蛋白量15 μ g,80 V电泳分离蛋白,恒流280 mA、120 min湿转至PVDF膜,室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h,孵育相应的一抗在4 $^{\circ}$ C过夜,常温孵育二抗2 h,最后曝光显影。以 β -actin作为内参。

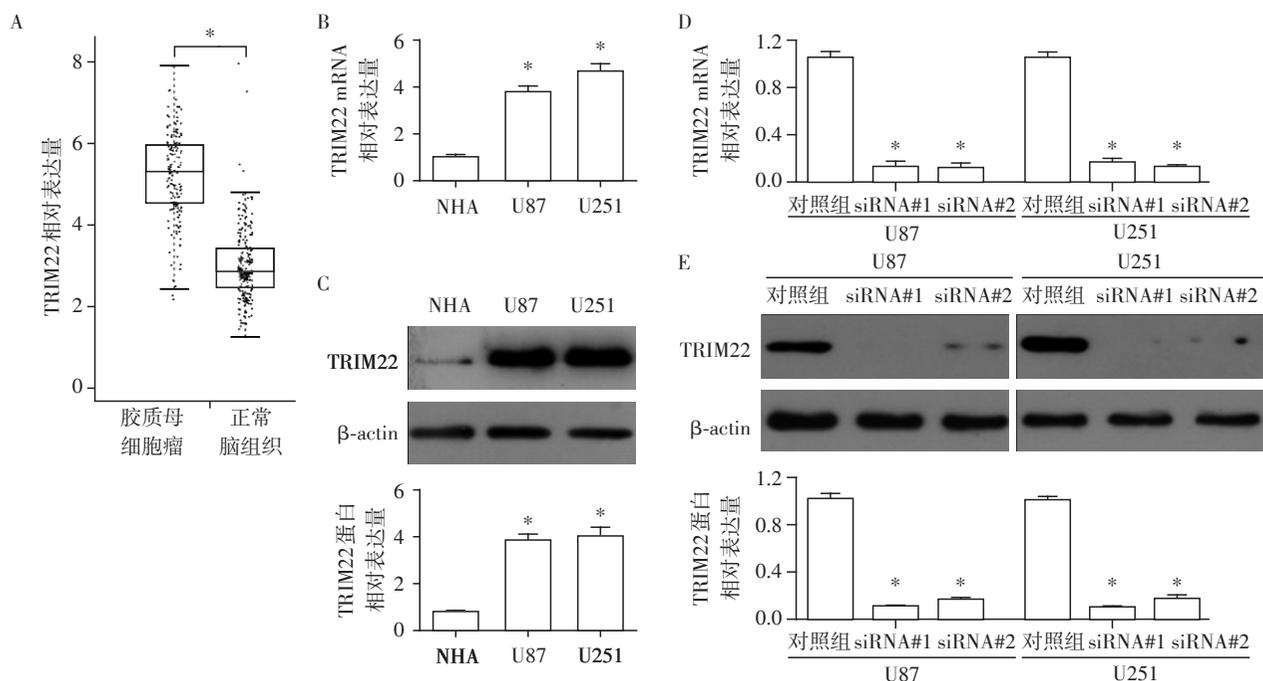
1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行数据统计分析,各实验计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,实验均独立重复3次。

2 结果

2.1 TRIM22在胶质母细胞瘤细胞系中表达情况及TRIM22-siRNA转染效率

通过TCGA数据库(gepia.cancer-pku.cn)分析发现,胶质细胞瘤的TRIM22表达水平明显高于正常脑组织($P < 0.05$,图1A)。在胶质母细胞瘤细胞系U87、U251及正常星型胶质细胞(NHA)中分别检测TRIM22的mRNA和蛋白表达水平,结果发现与NHA相比,U87和U251中TRIM22的mRNA和蛋白表达显著提高($P < 0.001$,图1B、C)。在胶质母细胞瘤U87和U251细胞系中转染两种TRIM22-siRNA,并以无意义序列作为对照组,应用qRT-PCR和Western blot证实转染TRIM22-siRNA后,TRIM22的mRNA和蛋白表达水平与对照组相比均显著降低(图1D、E)。



A: TCGA数据库中分析TRIM22在胶质母细胞瘤和正常脑组织表达水平,两组比较, $^*P < 0.05$;B: qRT-PCR检测TRIM22在U87和U251中mRNA表达水平,与NHA比较, $^*P < 0.001$ ($n=3$);C: Western blot检测TRIM22在U87和U251中蛋白表达水平,与NHA比较, $^*P < 0.001$ ($n=3$);D: qRT-PCR检测两种TRIM22-siRNA在U87和U251细胞中的敲低效率,与对照组比较, $^*P < 0.001$ ($n=3$);E: Western blot检测2种TRIM22-siRNA在U87和U251细胞中的敲低效率,与对照组比较, $^*P < 0.001$ ($n=3$)。

图1 TRIM22在胶质母细胞瘤以及细胞系中表达情况及两种TRIM22-siRNA的转染效率

Figure 1 The expression of TRIM22 in glioblastoma and examination of the transfection efficacy of two TRIM22-siRNA

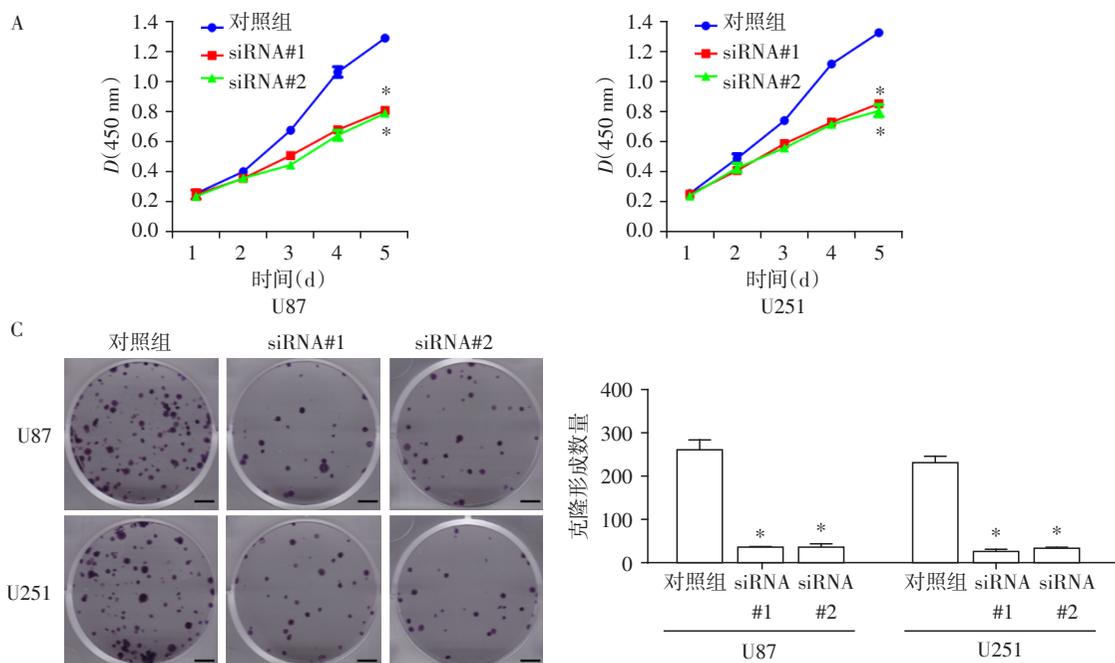
2.2 下调TRIM22明显抑制胶质母细胞瘤细胞增殖能力

在胶质母细胞瘤U87和U251细胞系中转染两种TRIM22-siRNA后,通过CCK8实验来评估下调TRIM22对于细胞活力的影响。与对照组相比,两种TRIM22-siRNA转染后的胶质母细胞瘤细胞系在第5天的活力有明显下降($P < 0.001$,图2A、B)。细

胞平板克隆实验进一步表明,在U87和U251细胞系中敲低TRIM22后,细胞克隆形成数明显下降($P < 0.001$,图2C)。上述实验证明了TRIM22与胶质母细胞瘤细胞增殖能力密切相关。

2.3 下调TRIM22明显抑制胶质母细胞瘤细胞侵袭和迁移能力

进一步研究TRIM22对胶质母细胞瘤侵袭和迁



A、B: CCK8实验检测下调TRIM22后胶质母细胞瘤细胞系U87(A)和U251(B)活力的变化,与对照组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$); C: 细胞平板克隆实验检测下调TRIM22后胶质母细胞瘤细胞系增殖能力的变化,与对照组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 敲低TRIM22抑制胶质母细胞瘤细胞系的增殖能力

Figure 2 TRIM22 depletion inhibited the proliferation in U87 and U251 cells

移能力的影响,应用Transwell实验评估了U87和U251细胞系在转染两种TRIM22-siRNA前后穿透基质胶能力的变化,结果表明下调TRIM22后,U87和U251穿透基质胶的细胞数量明显减少,提示细胞的侵袭能力显著下降($P < 0.001$,图3A)。此外,划痕实验结果亦表明,转染TRIM22-siRNA后能够显著抑制胶质母细胞瘤细胞U87和U251的迁移能力($P < 0.001$,图3B)。

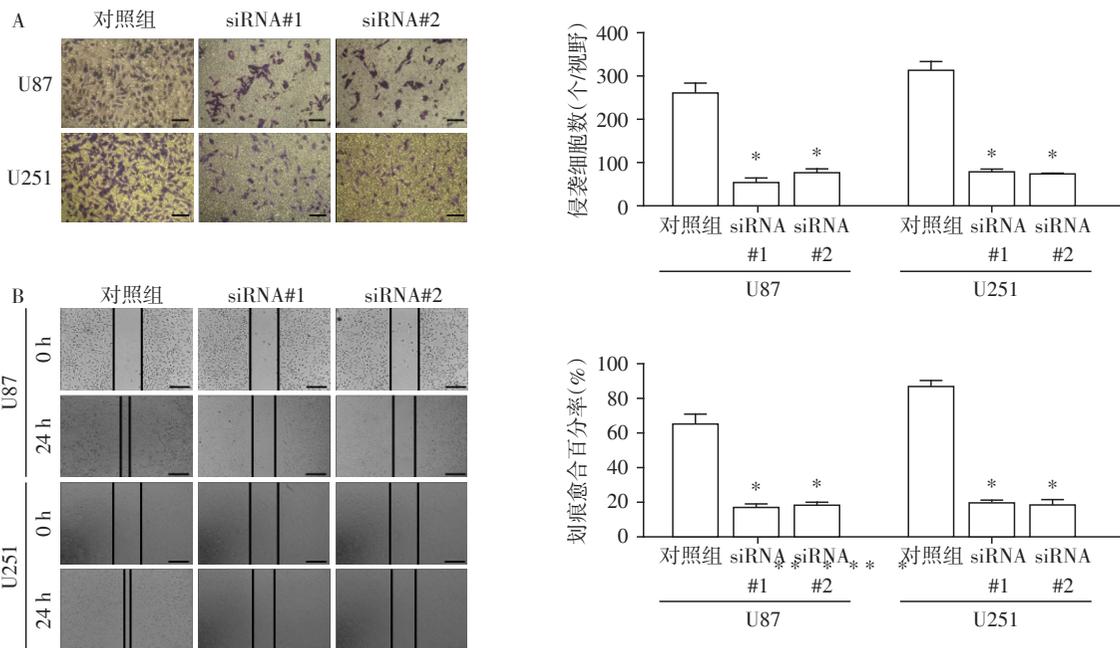
2.4 TRIM22影响PI3K/AKT及EMT相关信号通路蛋白

此外,应用Western blot检测了敲低TRIM22对PI3K/AKT及EMT相关信号通路蛋白(N-cadherin、Vimentin、E-cadherin)的影响。结果显示,敲低TRIM22后,AKT总蛋白表达水平不变,但AKT的S473位点的磷酸化水平显著低于对照组($P < 0.001$,图4A)。间质标志蛋白N-cadherin和Vimen-

tin亦下降明显($P < 0.001$,图4B),而上皮标志蛋白E-cadherin表达明显上升($P < 0.001$,图4B),上述实验说明下调TRIM22能够抑制PI3K/AKT信号通路以及EMT相关信号通路蛋白。

3 讨论

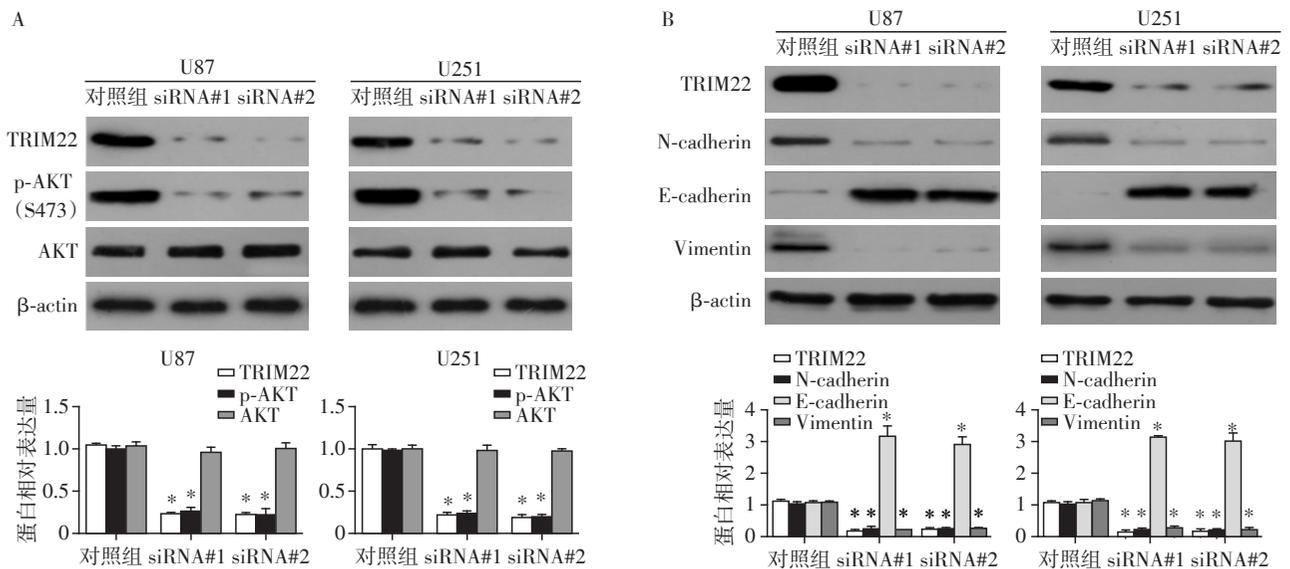
TRIM22作为TRIM家族的重要一员,具有典型的RING结构域,作为一种转录因子和核蛋白受体在人体内稳定发挥其作用,调节细胞内其他蛋白的表达和功能。先前研究发现TRIM22在乳腺癌中的表达量比正常乳腺组织中明显降低,表明TRIM22可能扮演着抑癌基因的作用^[8]。但是在非小细胞肺癌中,TRIM22则明显高表达,并促进肺癌的发展和进展^[9-10],这些结果表明TRIM22在不同组织的表达状况和具体功能有所差异。本研究发现,与正常脑组织相比,胶质母细胞瘤细胞系中TRIM22表达明



A: Transwell 实验检测下调 TRIM22 后胶质母细胞瘤细胞系侵袭能力的变化,与对照组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$); B: 划痕实验检测下调 TRIM22 后胶质母细胞瘤细胞系迁移能力的变化,与对照组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 敲低 TRIM22 抑制胶质母细胞瘤细胞系的侵袭和迁移能力

Figure 3 TRIM22 depletion suppressed the invasion and migration in U87 and U251 cells



A: 敲低 TRIM22 后检测 AKT 磷酸化水平变化,与对照组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$); B: 敲低 TRIM22 后检测 EMT 相关蛋白的变化,与对照组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图4 敲低 TRIM22 后检测 AKT 磷酸化水平以及 EMT 相关蛋白的表达变化

Figure 4 The expression of p-AKT(S473) and EMT-associated proteins after TRIM22 depletion in U87 and U251 cells

显升高。敲低 TRIM22 后,胶质母细胞瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等生物学行为明显受到抑制,以上结果表明 TRIM22 在促进胶质母细胞瘤发生和发展中具有重要意义。

PI3K/AKT 作为一经典的信号转导通路,已被广泛报道,在人体多种肿瘤中具有调节肿瘤细胞增

殖、分化和凋亡的能力^[11],在胶质母细胞瘤中,PI3K/AKT 也具有促进肿瘤增殖等功能^[12-15]。EMT 是胚胎发育和恶性肿瘤侵袭迁移中的重要过程^[16],其过程的主要特征除了细胞在形态上会向间质细胞转变外,细胞中的 EMT 标志蛋白也会发生相应变化,如 E-cadherin 等黏附分子开始减少并逐渐转变为以 Vi-

mentin 等为主要细胞骨架的间充质细胞^[17]。E-cadherin 是一种经典的上皮黏附分子,对肿瘤侵袭和迁移具有抑制作用,先前的研究表明,E-cadherin 蛋白的表达缺失与肺癌^[18]、胃癌^[19]、前列腺癌^[20]、乳腺癌^[21]等肿瘤的发生和发展以及不良预后有着密切联系。而在胶质母细胞瘤中,E-cadherin 的异常低表达也会导致细胞间黏附力下降和细胞运动能力增强,从而导致细胞侵袭力增加,这也是胶质母细胞瘤预后情况不佳的原因之一。

此外,本实验表明,敲低 TRIM22 后,AKT 磷酸化水平及 N-cadherin、Vimentin 表达水平较对照组均明显下降,而 E-cadherin 的表达则明显升高。这些结果进一步证实了 TRIM22 通过影响 PI3K/AKT 以及 EMT 相关信号通路蛋白,参与胶质母细胞瘤的增殖、侵袭和迁移。但是 TRIM22 具体通过何种方式影响 PI3K/AKT 和 EMT 信号通路尚不清楚,TRIM22 本身作为转录因子,能否直接结合这些蛋白启动子调节其表达有待进一步研究。此外,TRIM22 是否能够影响 EMT 过程中的相关蛋白,如 Snail1、ZEB1 和 Twist1 等,也是将来研究的方向。

综上所述,TRIM22 可作为胶质母细胞瘤治疗的新靶点,本研究为胶质母细胞瘤的靶向治疗提供一条新的思路和方向。

[参考文献]

[1] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5): 492-507

[2] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2683-2710

[3] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996

[4] Cammas F, Khetchooumian K, Chambon P, et al. TRIM involvement in transcriptional regulation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 770(1): 59-76

[5] Cambiaghi V, Giuliani V, Lombardi S, et al. TRIM proteins in cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 770(1): 77-91

[6] Duan Z, Gao B, Xu W, et al. Identification of TRIM22 as a RING finger E3 ubiquitin ligase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(3): 502-506

[7] Saito-Kanatani M, Urano T, Hiroi H, et al. Identification of TRIM22 as a progesterone-responsive gene in Ishikawa endometrial cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 154: 217-225

[8] Sun Y, Ho GH, Koong HN, et al. Down-regulation of tripartite-motif containing 22 expression in breast cancer is

associated with a lack of p53-mediated induction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(3): 600-606

[9] Zhan W, Han T, Zhang C, et al. TRIM59 Promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells by upregulating cell cycle related proteins [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142596

[10] Liu L, Zhou XM, Yang FF, et al. TRIM22 confers poor prognosis and promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of AKT/GSK3beta/beta-catenin signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 62069-62080

[11] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193-204

[12] Jiang H, Shang X, Wu H, et al. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2009, 8(1): 25-33

[13] Han L, Yang Y, Yue X, et al. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of beta-catenin-mediated transcription [J]. *Brain Res*, 2010, 1366(1): 9-17

[14] Wei Y, Jiang Y, Zou F, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(17): 6829-6834

[15] Wu YL, Maachani UB, Schweitzer M, et al. Dual inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways induces synergistic antitumor effects in diffuse intrinsic pontine glioma cells [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(2): 221-228

[16] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454

[17] Yu JM, Sun W, Hua F, et al. BCL6 induces EMT by promoting the ZEB1-mediated transcription repression of E-cadherin in breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 190-200

[18] Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, et al. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2010, 70(2): 136-145

[19] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7061-7070

[20] Kong D, Sethi S, Li Y, et al. Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes [J]. *Prostate*, 2015, 75(2): 161-174

[21] Ye X, Brabletz T, Kang Y, et al. Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): E1-E3