

· 基础研究 ·

TRAF7在胶质母细胞瘤中的表达及其对肿瘤增殖和迁移的影响

蔡小敏,陈正新,仇文进,冯 爽,陆嘉诚,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:检测TRAF7在正常脑组织和胶质母细胞瘤中的表达情况,并且进一步分析TRAF7对胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移能力的影响。方法:在中国脑胶质母细胞瘤基因组计划(CGGA)数据库中分析正常脑组织及胶质母细胞瘤中TRAF7的表达情况与预后的关系,在U87和LN229细胞转入TRAF7的小干扰RNA(si-TRAF7)以敲低TRAF7的表达,通过CCK8试验、克隆形成试验及划痕试验观察胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移能力的改变。结果:胶质母细胞瘤中TRAF7的表达量明显高于正常脑组织,胶质母细胞瘤中TRAF7高表达组较低表达组预后差,下调TRAF7表达能够显著抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移能力。结论:TRAF7在胶质母细胞瘤中明显高表达并且其表达量与胶质母细胞瘤患者临床预后相关,TRAF7促进胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移。

[关键词] 胶质母细胞瘤;TRAF7;预后;增殖;迁移**[中图分类号]** R739.41**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)02-176-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190203

TRAF7 is highly expressed in glioblastoma and regulates glioblastoma cell proliferation and migration

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

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

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of TRAF7 in normal brain tissue and glioblastoma, and further analyze the effect of TRAF7 on proliferation and migration of glioblastoma cells. **Methods:** Expression of TRAF7 in normal brain tissue and glioblastomas were analyzed in the Chinese Glioblastoma Genome Project (CGGA) Database. The small interfering RNA of TRAF7 (si-TRAF7) was transfected into U87 and LN229 glioblastoma cells to downregulate the expression level of TRAF7. The CCK8 assay, colony formation assay and scratch assay were performed to observe the changes of proliferation and migration ability of glioblastoma cells. **Results:** The expression of TRAF7 in glioblastomas was significantly higher than that in normal brain tissue. Compare to low-expression group of TRAF7, poor prognosis was observed in high-expression group of TRAF7 in glioblastoma patients. Down-regulation of TRAF7 inhibit the proliferation and migration of glioblastoma cells. **Conclusion:** TRAF7 is highly expressed in glioblastomas, and its expression level is correlated with clinical prognosis in patients with glioblastomas. TRAF7 promotes proliferation and migration in glioblastoma cells.

[Key words] glioblastoma; TRAF7; prognosis; proliferation; migration

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02): 176-180]

胶质母细胞瘤是神经系统常见的原发性肿瘤,恶性程度很高^[1]。尽管治疗方法不断改进,胶质母

细胞瘤患者的生存期及预后仍然不容乐观^[2]。胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移能力极强导致手术治疗难以彻底清除肿瘤,复发率很高^[3]。肿瘤坏死因子受体相关因子蛋白7(tumor necrosis factor receptor associated factor protein7, TRAF7)是肿瘤坏死因子受体相关因子蛋白家族中的一员。分子量为75 kDa。有研究显示该家族蛋白主要在炎症反应、抗病毒免疫

[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

应答、凋亡调控等多个方面起重要作用^[4]。最近数据表明 TRAF7 参与信号转导途径,导致核因子(nuclear factor, NF)- κ B 转录因子的活化或阻遏^[5]。而且 TRAF7 突变在脑膜瘤的发生过程中也起着关键作用^[6]。此外,TRAF7 参与细胞应激途径激活的调节^[7],并在泛素化事件^[8]和肌肉组织的发生和分化过程中扮演着不可或缺的角色。本研究分析 TRAF7 在正常脑组织及胶质母细胞瘤中的表达差异以及 TRAF7 表达水平和胶质母细胞瘤患者预后的关系,除此之外还进一步分析 TRAF7 对胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人胶质母细胞瘤细胞系 U87、LN229 细胞均购自中科院上海细胞库。正常星型胶质细胞购自 ATCC 细胞库。Opti-MEMI (Gibco 公司,美国)。DMEM 培养基和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) (Hyclone 公司,美国)。转染试剂 Lipofectamine3000 (Invitrogen 公司,美国)。TRAF7 小干扰 RNA (si-TRAF7) 及无意义序列(上海吉玛公司)。TRAF7 小干扰序列:5'-CCUGUUC AAGAAC-CUGCUUTT-3', 5'-AAGCAGGUUCUUGAACAGGTT-3'。无意义序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。总蛋白提取试剂盒(南京凯基公司)。TRAF7 引物、GAPDH 引物(北京六合华大基因科技有限公司)。CCK8 试剂盒及 Western blot 凝胶配置试剂盒(上海碧云天公司)。TRAF7 抗体(1:1 000, Abcam 公司,美国), β -actin 抗体(1:3 000, 南京巴傲得生物科技有限公司),辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗(1:3 000, 北京中杉金桥公司)。超敏发光液(Thermo 公司,美国)。

TRAF7 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母细胞瘤基因组计划(Chinese Glioblastoma Genome Atlas, CGGA),官方网站 <http://www.cgga.org.cn/portal.php>。94 例样本表达数据(其中正常脑组织 5 例,胶质母细胞瘤 89 例);87 例胶质母细胞瘤临床预后数据,其中 TRAF7 高表达组 43 例,低表达组 44 例。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组和细胞转染

胶质母细胞瘤细胞系 U87 和 LN229 及正常星型胶质细胞(normal human astrocytes, NHAs)接种于含

10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养,放置于 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿密闭培养箱中培养。细胞贴壁生长,2~3 d 换 1 次液,传代培养。细胞分组:阴性对照组(转染无义序列 si-Ctrl)和小干扰敲低组(转染 si-TRAF7)。然后按照 Invitrogen 公司转染试剂说明书的方法在胶质母细胞瘤细胞系 U87 和 LN229 中进行转染。转染后将细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,6~8 h 更换为完全培养基。

1.2.2 稳定细胞系的建立

稳定表达 TRAF7 shRNA (shTRAF7) 或者对照 shRNA (shCtrl) 的 U87 和 LN229 细胞系使用慢病毒 shRNA 技术构建(上海吉凯公司)。用连续稀释的慢病毒上清液去感染 U87 和 LN229 细胞并使用嘌呤霉素(5 mg/mL)3~4 周筛选稳定转染的细胞株。人 TRAF7 shRNA 靶序列如下:5'-TGAGTCAGACCT-TGCAAGT-3'。

1.2.3 CCK8 细胞增殖实验

两组细胞消化后重悬于培养液中,每孔 1 000 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、96 h 检测。检测前每孔加入 10 μ L CCK8 溶液,到达检测点时弃去培养液,用酶标仪测定各孔吸光度值,波长为 450 nm,每组 3 个复孔。

1.2.4 平板克隆形成实验

将转染后的对照组 (shCtrl) 及实验组 (sh-TRAF7) 胶质母细胞瘤细胞重悬并计数,以每孔 500 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 8~12 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% 多聚甲醛覆盖孔底固定 20 min,去除甲醛,PBS 仔细清洗 3 次后用结晶紫染色液染色 20 min,回收染色液后用 PBS 清洗干净,晾干后拍照。

1.2.5 细胞划痕实验

将转染后的对照组及实验组 U87 和 LN229 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 孔板中心区域用直尺人工划 1 条笔直的约 2 mm 的划痕伤口,通过显微镜分别在划痕后 0、24 h 进行拍照。重复 3 次实验。

1.2.6 Western blot 实验

转染 48 h 后,si-Ctrl 组、si-TRAF7 组各 1×10^6 个细胞用蛋白裂解液进行裂解,收获蛋白并进行 BCA 定量,蛋白上样于 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,湿转至 PVDF 膜并用 5% 脱脂奶粉于室温条件下

封闭2 h,一抗TRAF7(1:1 000)4 ℃摇床过夜。次日,TBST洗脱3遍,二抗(1:3 000)孵育2 h,以 β -actin作为内参,将超敏发光液加在PVDF膜上,曝光显影。

1.2.7 实时定量PCR(qRT-PCR)实验

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1.8~2.1则符合纯度要求。按逆转录试剂盒合成cDNA,所得cDNA利用Step One Plus 实时荧光定量PCR仪(ABI公司,美国)进行qRT-PCR实验,检测TRAF7的表达情况。循环条件:95 ℃预变性20 min,随后40个循环,包括95 ℃变性5 s,60 ℃退火并延伸31 s。TRAF7上游引物:5'-TCCCCAAAGGG-ATGAGAAG-3',下游引物:5'-CACTTGGTGTTT-GCTACGA-3';GAPDH上游引物5'-GTCTTCACTAC-CATGGAGAAGG-3',下游引物5'-TCATGGAT-GACCTTGGCCAG-3'。实验独立重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,各实验计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用Kaplan-Meier生存分析和log-rank检验对生存随访数据进行分析,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数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。

2 结果

2.1 TRAF7在正常脑组织和胶质母细胞瘤中的表达水平及其与胶质母细胞瘤患者临床预后的关系

CGGA数据库分析显示,TRAF7在胶质母细胞瘤中的表达水平远高于正常脑组织($P < 0.001$,图1A)。CGGA中87例胶质母细胞瘤患者临床随访数据分析显示,胶质母细胞瘤患者中TRAF7高表达组较低表达组预后差,log-rank检验 $P=0.004$ (图1B),

该分析显示TRAF7可以作为评估胶质母细胞瘤患者预后的一个重要指标。应用qRT-PCR和Western blot检测NHAs、U87及LN229细胞中TRAF7的表达水平。结果显示胶质母细胞瘤细胞U87和LN229中TRAF7的表达水平明显高于NHAs($P < 0.01$,图1C、D)。

2.2 在胶质母细胞瘤细胞系中敲低TRAF7的表达能够明显抑制其增殖能力

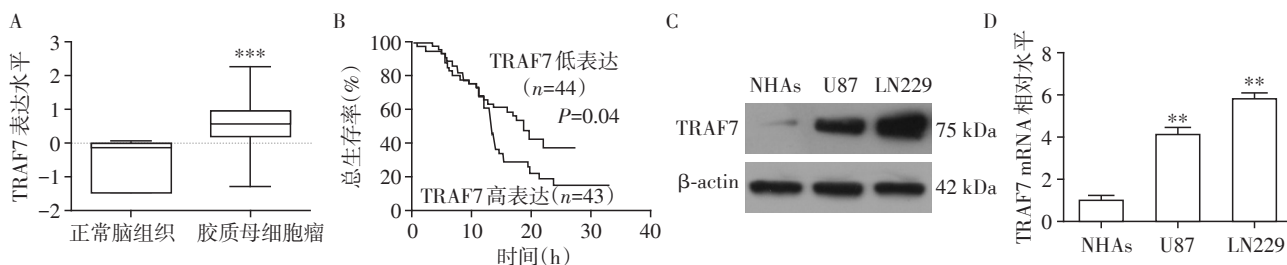
因为TRAF7在胶质母细胞瘤中表达水平很高,降低胶质母细胞瘤细胞系中TRAF7的表达后观察细胞增殖和侵袭能力的变化。Western blot显示转染TRAF7小干扰RNA后,U87和LN229两组细胞TRAF7表达水平都明显降低(图2A)。CCK8增殖实验结果显示,和si-Ctrl组相比较,转染了TRAF7小干扰RNA的U87和LN229细胞增殖在48、72、96 h明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$,图2B、C)。细胞平板克隆结果也表明,和对照组相比较,TRAF7稳定敲低组胶质母细胞瘤细胞的增殖受到明显抑制($P < 0.001$,图2D)。

2.3 敲低TRAF7抑制胶质母细胞瘤细胞的迁移

进一步研究TRAF7对于胶质母细胞瘤迁移能力的影响,应用划痕实验评估了U87和LN229细胞系在转染si-TRAF7后迁移能力的变化,结果表明下调TRAF7表达后,U87和LN229在24 h后的迁移距离较对照组明显缩短,差异有统计学意义($P < 0.01$,图3A、B)。该结果显示下调TRAF7的表达能够有效抑制胶质母细胞瘤细胞的迁移能力。

3 讨论

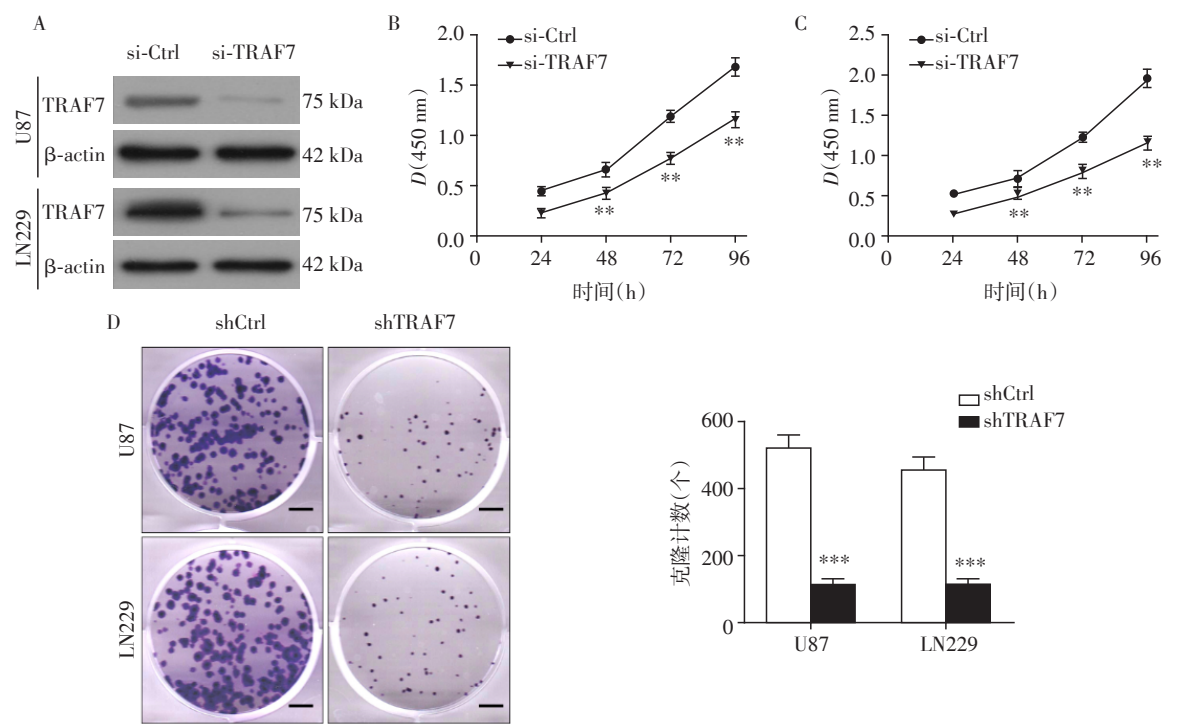
TRAF7基因位于人类染色体16P13.3,是肿瘤坏死因子受体相关因子家族(TRAFs)的重要成员。TRAF7最初是在针对围绕TNF- α /NF- κ B途径的已



A: 与正常脑组织比较TRAF7在胶质母细胞瘤中高表达,*** $P < 0.001$;B:Kaplan-Meier生存分析胶质母细胞瘤临床预后数据($P=0.04$);C: Western blot检测TRAF7蛋白在NHAs、U87和LN229中表达水平;D:qRT-PCR检测TRAF7 mRNA在NHAs、U87和LN229中表达水平,与NHAs组比较,** $P < 0.01$ 。

图1 TRAF7在正常脑组织和胶质母细胞瘤中的表达及其与胶质母细胞瘤预后的关系

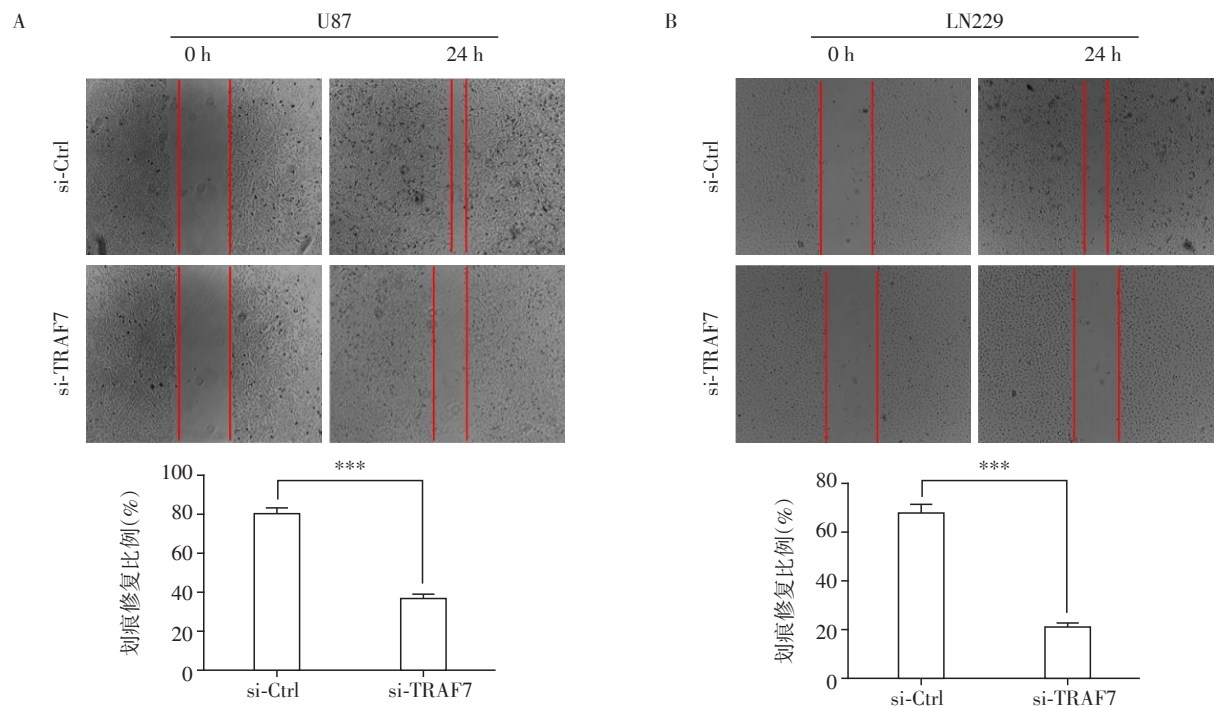
Figure 1 The expression of TRAF7 in normal brain tissue and glioblastoma and its relationship with prognosis



A: 在U87和LN229细胞中转入si-TRAF7后,TRAF7的蛋白表达量降低;B:CCK8试验中,在U87细胞中转入si-TRAF7,和对照组相比较,其增殖能力受到明显抑制,** $P < 0.01$ ($n=3$);C:CCK8试验中,在LN229细胞中转入si-TRAF7,和对照组相比较,其增殖能力受到明显抑制,** $P < 0.01$ ($n=3$);D:克隆形成试验中,在U87和LN229细胞中,TRAF7敲低组与对照组比较,其细胞增殖能力被明显抑制,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 TRAF7对胶质母细胞瘤细胞增殖能力的影响

Figure 2 The effect of TRAF7 on proliferation of glioblastoma cells



A: 在U87细胞中转入si-TRAF7后,细胞迁移能力减弱,*** $P < 0.001$ ($n=3$);B: 在LN229细胞中转入si-TRAF7后,细胞迁移能力减弱,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 TRAF7对胶质母细胞瘤细胞迁移能力的影响(×100)

Figure 3 The effect of TRAF7 on migration of glioblastoma cells(×100)

知和候选的蛋白质-蛋白质相互作用网络筛选中发现的。在 TRAF7 的氨基末端,包含一个环状结构域和一个相邻的锌指结构域。与其他家族成员结构所不同的是,TRAF7 的羧基末端并不包含特有的 TRAF 区域而是含有 7 个 WD40 重复序列。TRAF7 可以作为 MyoD1 的靶向基因,通过调节核因子 NF- κ B 的活性进而影响肌肉组织的发生和分化。TRAF7 在 TNF α 刺激后激活 JNK 中起着重要作用,并参与调节 c-FLIP 的转换并因此导致细胞死亡。

同样,TRAF7 也被多次报道在肿瘤的发生发展中起着很重要的作用^[9-10]。Wang 等^[11]曾报道 TRAF7 可以作为泛素-蛋白连接酶通过调节 P53 的降解从而在乳腺癌的发生发展中发挥关键作用。TRAF7 还可以作为 microRNA-126 的靶标,并且证明了 TRAF7 可以促进人脐静脉内皮细胞凋亡。本研究首次运用 CGGA 大数据分析了 TRAF 在正常脑组织及脑胶质母细胞瘤中的表达情况及与临床预后的关系,数据分析结果显示,在胶质母细胞瘤中 TRAF7 表达量远远高于正常脑组织,并且患者生存数据随访也证实 TRAF7 的表达水平和患者生存期明显相关,TRAF7 高表达患者生存期较 TRAF 低表达者明显缩短,差异具有统计学意义。在此基础上进一步探讨了 TRAF7 在细胞水平是否影响胶质母细胞瘤细胞的增殖及迁移能力,用 TRAF7 的小干扰 RNA 下调 TRAF7 的表达,运用 CCK8 实验和平板克隆实验对胶质母细胞瘤的增殖能力进行检测,结果发现敲低 TRAF7 后能明显抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖能力。其次采用划痕实验对胶质母细胞瘤细胞的迁移能力进行检测,结果再一次表明,TRAF7 的表达水平降低以后,胶质母细胞瘤细胞的迁移能力明显下降。TRAF7 在胶质母细胞瘤中的表达水平和临床预后有较强的相关性,具有一定的临床分子标志评估价值,TRAF7 对胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移具有很强的促进作用,这在胶质母细胞瘤的恶性进展过程中具有重要意义。下一步将进一步体内验证 TRAF7 对胶质母细胞瘤细胞恶性进展的影响。同时也会进行 TRAF7 相关通路的研究,争取为胶质母细胞瘤的治疗提供更多更直接的实验依据。

[参考文献]

- [1] 胡大玲,张寅. FoxO3 在复发胶质母细胞瘤中的表达及其对替莫唑胺耐药性的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(11):1389-1394
- [2] Luo H, Chen Z, Wang S, et al. c-Myc-miR-29c-REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma[J]. Brain, 2015, 138(Pt 12): 3654-3672
- [3] Peng C, Chen Z, Wang S, et al. The error-prone DNA polymerase kappa promotes temozolomide resistance in glioblastoma through rad17-dependent activation of ATR-Chk1 signaling[J]. Cancer Res, 2016, 76(8):2340-2353
- [4] Takatsuna H, Kato H, Gohda J, et al. Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(14):12144-12150
- [5] 林滢,祝先进,黄丽华,等. 抑制 NF- κ B 活性对 TNF- α 联合 IFN- γ 诱导肾小管上皮细胞表达趋化因子的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(6):721-725
- [6] Reuss DE, Piro RM, Jones DT, et al. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations[J]. Acta Neuropathol, 2013, 125(3):351-358
- [7] Yang J, Lin Y, Guo Z, et al. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation[J]. Nat Immunol, 2001, 2(7):620-624
- [8] Wang L, Wang L, Zhang S, et al. Downregulation of ubiquitin E3 ligase TNF receptor-associated factor 7 leads to stabilization of p53 in breast cancer [J]. Oncol Rep, 2013, 29(1):283-287
- [9] Klein CJ, Wu Y, Jentoft ME, et al. Genomic analysis reveals frequent TRAF7 mutations in intraneural perineuriomas[J]. Ann Neurol, 2017, 81(2):316-321
- [10] Yesiloz U, Kirches E, Hartmann C, et al. Frequent AKT1E17K mutations in skull base meningiomas are associated with mTOR and ERK1/2 activation and reduced time to tumor recurrence[J]. Neuro Oncol, 2017, 19(8):1088-1096
- [11] Wang Y, Wang F, Wu Y, et al. MicroRNA-126 attenuates palmitate-induced apoptosis by targeting TRAF7 in HUVECs[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(1-2):123-130

[收稿日期] 2018-06-19