

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.009

· 基础研究 ·

Leptin 促进人脑胶质瘤 U87MG 细胞的迁移和侵袭

韩国胜, 刘建民, 岳志健, 胡小吾, 王来兴(第二军医大学附属长海医院 神经外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨瘦素(leptin)对人脑胶质瘤 U87MG 细胞迁移及侵袭能力的影响及其机制。**方法:**Leptin 处理 U87MG 细胞,采用细胞划痕实验检测 U87MG 细胞的迁移能力,Transwell 实验检测 U87MG 细胞的侵袭能力,RT-PCR 及 Western blotting 法检测 U87MG 细胞中 *MMP-2* 及 *MMP-9* mRNA 和蛋白的表达。**结果:**Leptin 明显促进 U87MG 细胞迁移能力[(152.42 ± 3.29) vs (83.24 ± 2.61) μm , $P < 0.05$]和侵袭能力[(31.78 ± 5.04) vs (17.03 ± 2.41) 个细胞, $P < 0.05$], leptin 能显著上调 U87MG 细胞中 *MMP-2*、*MMP-9* mRNA [(0.76 ± 0.04) vs (0.35 ± 0.02) , (0.84 ± 0.02) vs (0.41 ± 0.06) ; 均 $P < 0.05$]及蛋白 [(0.79 ± 0.03) vs (0.23 ± 0.01) , (0.81 ± 0.05) vs (0.39 ± 0.03) ; 均 $P < 0.05$]的表达。*MMP* 抑制剂 GM6001 ($10 \mu\text{mol/ml}$)可以逆转 leptin 对 U87MG 细胞迁移[(82.05 ± 2.98) vs (81.76 ± 3.25) μm , $P > 0.05$]和侵袭能力[(19.23 ± 2.46) vs (18.02 ± 1.98) 个细胞, $P > 0.05$]的影响。**结论:**Leptin 可以促进人脑胶质瘤 U87MG 细胞的侵袭及迁移,其机制可能与上调 *MMP-2*、*MMP-9* 的表达有关。

[关键词] 瘦素;人脑胶质瘤;U87MG 细胞;*MMP-2*;*MMP-9*;迁移;侵袭

[中图分类号] R739.4; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0154-04

Leptin promotes migration and invasion of human glioma U87MG cells

HAN Guo-sheng¹, LIU Jian-min¹, YUE Zhi-jian¹, HU Xiao-wu¹, WANG Lai-xing¹(Department of Neurosurgery, Chang-hai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of leptin on the migration and invasion of human glioma U87MG cells, and explore its molecule mechanism. **Methods:** U87MG cells were treated with leptin, the cell migration was analyzed by cell scratch assay, cell invasion was detected by Transwell, and mRNA and protein expressions of *MMP-2* and *MMP-9* in U87MG cells were observed by RT-PCR and Western blotting assay. **Results:** Leptin significantly promoted migration ($[152.42 \pm 3.29]$ vs $[83.24 \pm 2.61]$ μm , $P < 0.05$), and invasion ($[31.78 \pm 5.04]$ vs $[17.03 \pm 2.41]$ /field, $P < 0.05$) of U87MG cells; the mRNA and protein expressions of *MMP-2* and *MMP-9* were significantly upregulated by leptin in U87MG cells (mRNA: $[0.76 \pm 0.04]$ vs $[0.35 \pm 0.02]$, $[0.84 \pm 0.02]$ vs $[0.41 \pm 0.06]$, $P < 0.05$; protein: $[0.79 \pm 0.03]$ vs $[0.23 \pm 0.01]$, $[0.81 \pm 0.05]$ vs $[0.39 \pm 0.03]$, $P < 0.05$); *MMP* inhibitor GM6001 reversed U87MG cell migration ($[82.05 \pm 2.98]$ vs $[81.76 \pm 3.25]$ μm , $P > 0.05$) and invasion ($[19.23 \pm 2.46]$ vs $[18.02 \pm 1.98]$ /field, $P < 0.05$) induced by leptin. **Conclusion:** Leptin can promote the invasion and migration of human glioma U87MG cells, which might related with the upregulation of *MMP-2* and *MMP-9*.

[Key words] leptin; human glioma; U87MG cell; *MMP-2*; *MMP-9*; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 154-157]

脑胶质瘤细胞容易向周围正常脑组织侵袭生长,手术切除原发病灶后,残留病灶仍会发生远处侵袭,导致术后肿瘤复发,这是脑胶质瘤治疗的难点。瘦素(leptin)是由肥胖基因(obese gene, Ob)编码的146个氨基酸组成的多肽激素^[1]。Leptin 与其受体结合活化细胞内多条信号转导通路,不仅调控摄食和能量代谢,还能促进肿瘤细胞分化、增殖和侵袭,还参与调节血管形成和机体免疫等^[2-6]。本研究观

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101906);上海市科委基金资助项目(No. 8411953600)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101906), and the Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (No. 8411953600)

[作者简介] 韩国胜(1980-),男,山东省聊城市人,硕士,主要从事脑肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: hgs-xing72@sohu.com

[通信作者] 王来兴(WANG Lai-xing, corresponding author), E-mail: wlx920@163.com

察 leptin 对人脑胶质瘤 U87MG 细胞迁移及侵袭能力的影响,并探讨其中的机制,为脑胶质瘤的生物治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和材料

人脑胶质瘤 U87MG 细胞为本科室保存,leptin、GM6001(MMP 抑制剂)购自 Sigma 公司,引物均由上海 Sangon 公司合成,兔抗人 MMP-2、MMP-9 抗体购自美国 Cell Signaling 公司,二抗购于武汉博士德生物有限公司。

1.2 细胞划痕修复实验检测 leptin 对 U87MG 细胞的迁移性能

将处于对数生长期的 U87MG 细胞常规消化后,按 1×10^6 /孔种植到 6 孔板中,培养过夜,待细胞达到 70%~80% 融合时,用 100 μ l 微量移液头在 6 孔板内垂直划痕,PBS 洗 3 次,去除脱落细胞,换成常规培养基,实验组加 200 ng/ml leptin,作用 48 h 后,镜下观察 U87MG 细胞迁移变化。以迁移距离反映细胞迁移能力,并设对照组,实验均重复 3 次。

1.3 Transwell 细胞侵袭实验检测 leptin 对 U87MG 细胞侵袭能力的变化

将 60~80 μ l matrigel 均匀平铺于 24 孔 Transwell 小室的聚碳酸酯微膜上,37 $^{\circ}$ C 预置 2 h 聚合成凝胶备用。将 leptin 刺激 24 h 后的 U87MG 细胞以无血清培养基重悬。在 Transwell 上室每孔加入 2×10^4 个 U87MG 细胞,细胞悬液体积为 500 μ l;下室每孔中加入含 5% 小牛血清的 DMEM 培养基 500 μ l。实验设对照组,每组 3 个复孔。将装有 Transwell 小室的培养板置培养箱中培养 24 h。弃上室液体,取出小室,以湿棉签擦去聚碳酸酯微膜上未穿过膜的 U87MG 细胞,4% 甲醛固定后,进行结晶紫染色,冲洗后于倒置相差显微镜下观察穿过膜的 U87MG 细胞数目。分别于每张膜中央部分和周围部分随机选取 3 个视野($\times 200$),计数每一视野内穿过膜的细胞数目,以侵袭细胞数目来表示细胞的侵袭能力。

1.4 RT-PCR 检测 leptin 作用后 U87MG 细胞 MMP mRNA 表达变化

将处于对数生长期的 U87MG 细胞分为 2 组,实验组给予 200 ng/ml leptin 处理,培养 48 h 后,按试剂盒说明步骤抽提细胞总 RNA,经逆转录,获得 cDNA。以 cDNA 为模板,MMP-2: P1 为 5'-GCC-CCCCTGTGTCTTCCCTTCA-3', P2 为 5'-GCCCCA-CTTGCGGTCATCAT-3'; MMP-9: P3 为 5'-GTCCAC-

CCTTGTGCTCTTCCCT-3', P4 为 5'-TATCCAGCTCA-CCGGTCTCGGG-3'为引物进行 PCR 反应,并设 β -actin 作为内参。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 4 min、94 $^{\circ}$ C 50 s、58 $^{\circ}$ C 50 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。最后各取 10 μ l 产物与 DNA Marker 一起进行琼脂糖凝胶电泳,并用 Band Scan 软件进行分析。

1.5 Western blotting 检测 leptin 作用后 U87MG 细胞 MMP 蛋白表达变化

将处于对数生长期的 U87MG 细胞按上述方法进行处理,培养 48 h 后,以细胞裂解液充分裂解 U87MG 细胞,收集 U87MG 细胞总蛋白,检测其含量。煮沸 5~10 min 使蛋白质变性,冷却后上样,进行 SDS-PAGE 分离蛋白质;然后将凝胶蛋白转移到硝酸纤维素膜上,经 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;分别加入兔抗人 MMP-2 抗体(1:100),MMP-9 抗体(1:100),以及 β -actin 抗体(1:2 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 洗涤;再加山羊抗兔 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 洗涤后使用发光法显影,扫描分析。每组实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS12.0 统计软件,并进行 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Leptin 促进 U87MG 细胞的迁移和侵袭能力

细胞划痕修复实验结果(图 1)表明,在 leptin 作用 48 h 后,U87MG 细胞迁移距离为 $(152.42 \pm 3.29) \mu\text{m}$,对照组 U87MG 细胞迁移距离仅为 $(83.24 \pm 2.61) \mu\text{m}$,两组有明显的统计学意义($P < 0.05$)。在 Transwell 细胞侵袭实验中,对照组 U87MG 细胞穿过膜的细胞数为 (17.03 ± 2.41) 个/视野,而经 leptin 作用后,U87MG 细胞穿过膜的数目为 (31.78 ± 5.04) 个/视野($P < 0.05$,图 2)。由此可见,leptin 可以明显促进 U87MG 细胞的迁移和侵袭能力。

2.2 Leptin 上调 U87MG 细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达

RT-PCR 结果(图 3)表明,U87MG 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 相对表达量分别为 0.35 ± 0.02 、 0.41 ± 0.06 ,leptin 作用 48 h 后分别为 0.76 ± 0.04 、 0.84 ± 0.02 ,leptin 明显上调 U87MG 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达($P < 0.05$,图 3A);Western blotting 法检测结果(图 3B)表明,U87MG 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量分别为 $0.23 \pm$

0.01、 0.39 ± 0.03 , leptin 作用 48 h 后分别为 0.79 ± 0.03 、 0.81 ± 0.05 。结果说明, leptin 明显上调 U87MG 细胞中 *MMP-2*、*MMP-9* 在 mRNA 和蛋白水平的表达 ($P < 0.05$)。

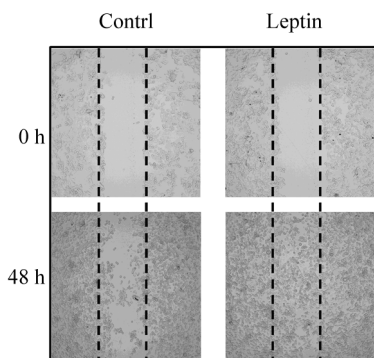


图 1 细胞划痕实验检测 leptin 对 U87MG 细胞迁移能力的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of leptin on U87MG cell migration detected by cell scratch assay (×200)

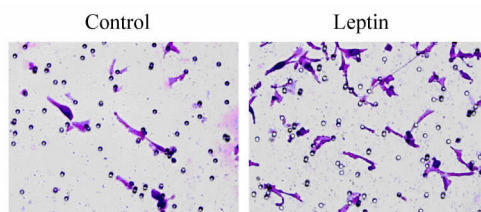


图 2 Transwell 实验检测 leptin 对 U87MG 细胞侵袭能力的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of leptin on U87MG cell invasion detected by Transwell assay (×200)

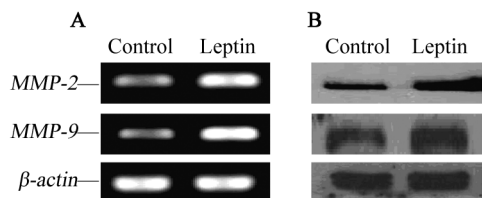


图 3 RT-PCR 和 Western blotting 法检测 U87MG 细胞中 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的表达

Fig. 3 Expressions of *MMP-2* and *MMP-9* in U87MG cells detected by RT-PCR and Western blotting

A: PT-PCR; B: Western blotting

2.3 MMP 抑制剂对 leptin 促进 U87MG 细胞迁移和侵袭能力的影响

加入 MMP 抑制剂 GM6001(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)

ml)后,细胞划痕修复实验结果(图 4A)表明,对照组 U87MG 细胞迁移距离为 $(81.76 \pm 3.25) \mu\text{m}$, leptin 组迁移距离为 $(82.05 \pm 2.98) \mu\text{m}$, 两组无明显差异 ($P > 0.05$),提示 GM6001 可逆转 leptin 对 U87 细胞迁移的促进作用。

Transwell 细胞侵袭实验结果(图 4B)显示,对照组细胞穿过膜的数目为 (18.02 ± 1.98) 个/视野, leptin 组细胞穿过膜的数目为 (19.23 ± 2.46) 个/视野,两组也无显著差异 ($P > 0.05$)。结果提示,抑制 MMP 的表达可以逆转 leptin 对 U87 细胞侵袭能力的促进作用。

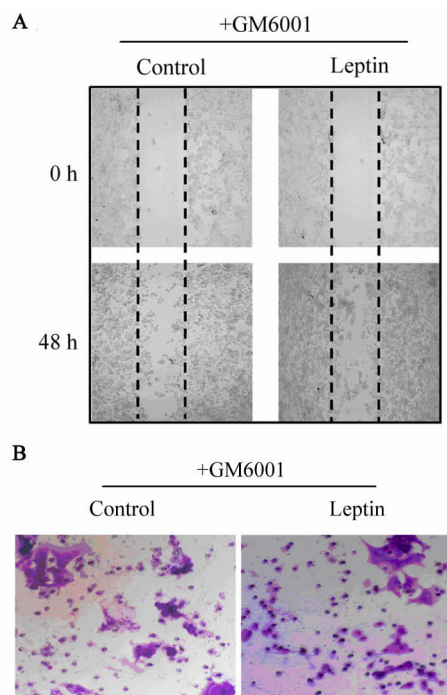


图 4 GM6001 对 U87MG 细胞迁移及侵袭能力的影响 (×200)

Fig. 4 Effects of GM6001 on migration and invasion of U87MG cells (×200)

A: Cell scratch assay; B: Transwell assay

3 讨论

Leptin 作为一种多肽激素,具有广泛的生物学功能,参与肿瘤的发生、发展及转移。Leptin 及其受体在众多肿瘤中高度表达,如胃癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌等^[7-9]。Leptin 可以激活多条信号转导通路,促进结肠癌细胞侵袭能力^[10]。软骨肉瘤及细胞系均高表达 leptin 受体, leptin 与受体结合后活化 Rho GTPase,促进细胞迁移能力^[11]。恶性程度越高的胶质瘤组织中,leptin/

leptin 受体表达越高^[12],leptin 可以激活肿瘤细胞中的 JAK-STAT3 信号通路,从而促进其增殖^[8]。

本研究结果显示,leptin 可以促进 U87MG 细胞侵袭及迁移能力。瘤细胞的侵袭能力,主要涉及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)系统。研究^[13-15]表明,脑胶质瘤的侵袭性与 MMP 密切相关。Castellucci 等^[16]发现,leptin 可以刺激滋养层细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌。Yeh 等^[17]研究表明,leptin 可以上调 C6 大鼠胶质瘤细胞中 MMP13 的表达,从而促进其侵袭及转移能力,但却不影响 MMP-2、MMP-9 的表达。本实验采用的 U87MG 细胞具有很强的侵袭能力,在胶质瘤侵袭研究中比较常用^[18]。将 leptin 作用于 U87MG 细胞后,发现细胞中 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 及蛋白表达均上调;当实验中加入 MMP 抑制剂后,U87MG 细胞迁移及穿过 matrigel 膜的细胞数明显减少。因此,leptin 促进 U87MG 细胞的侵袭及迁移可能通过提高 MMP-2、MMP-9 酶活性来实现。此结果与 Yeh 等^[18]报道的有所不同,可能是实验中采用的细胞系不同引起的。

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要生物学特性,成为胶质瘤临床治疗的难题。本实验揭示了 leptin 可能通过上调 U87 胶质瘤细胞中 MMP-2、MMP-9 酶活性来促进其侵袭及迁移,为胶质瘤的生物治疗提供了治疗靶点及其实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Isse N, Ogawa Y, Tamura N, et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (46): 27728-27733.
- [2] Catalano S, Marsico S, Giordano C, et al. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (31): 28668-28676.
- [3] Ogunwobi O, Mutungi G, Beales IL. Leptin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells by cyclooxygenase-2-dependent, prostaglandin-E2-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and c-Jun NH2-terminal kinase activation [J]. Endocrinology, 2006, 147 (9): 4505-4516.
- [4] Onuma M, Bub JD, Rummel TL, et al. Prostate cancer cell-adi-pocyt interaction: Leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (43): 42660-42667.
- [5] Ferla R, Bonomi M, Otvos L Js, et al. Glioblastoma-derived lep-tin induces tube formation and growth of endothelial cells: Comparison with VEGF effects [J]. BMC Cancer, 2011, 19 (11): 303.
- [6] Priya D, Xiaoti G, Rashidul H, et al. A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children [J]. J Clin Invest, 2011, 121 (3): 1191-1198.
- [7] Saxena, NK, Sharma D, Ding X, et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2007, 67 (6): 2497-2507.
- [8] Ray A, Cleary MP. Leptin as a potential therapeutic target for breast cancer prevention and treatment [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14 (4): 443-451.
- [9] López Fontana CM, Maselli ME, Pérez Elizalde RF, et al. Leptin increases prostate cancer aggressiveness [J]. J Physiol Biochem, 2011, 67 (4): 531-538.
- [10] Tamara J, Betty S. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways [J]. Int J Cancer, 2008, 123 (11): 2543-2556.
- [11] Shu NY, Hsien TC, His KT, et al. Leptin enhances cell migration in human chondrosarcoma cells through OBR1 leptin receptor [J]. Carcinogenesis, 2009, 30 (4): 566-574.
- [12] Mirko R, Rita F, Luis DV, et al. Leptin and its receptor are over-expression in brain tumors and correlate with the degree of malignancy [J]. Brain Pathol, 2010, 20 (2): 481-489.
- [13] Okada Y. Tumor cell-matrix interaction: Periecellular matrix degradation and metastasis [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2000, 84 (1): 33-42.
- [14] Yan W, Zhang W, Sun L, et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme [J]. Brain Res, 2011, 1411 (9): 108-115.
- [15] Badiga AV, Chetty C, Kesanakurti D, et al. MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells [J]. PloS One, 2011, 6 (6): e20614.
- [16] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, et al. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: Possible implications for trophoblast invasion [J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6 (10): 951-958.
- [17] Yeh WL, Lu DY, Lee MJ, et al. Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production [J]. Glia, 2009, 57 (4): 454-464.
- [18] Yoshida D, Watanabe K, Noha M, et al. Anti-invasive effect of an anti-matrix metalloproteinase agent in a murine brain slice model using the serial monitoring of green fluorescent protein-labeled glioma cells [J]. Neurosurgery, 2003, 52 (1): 187-196.

[收稿日期] 2011 - 12 - 10

[修回日期] 2012 - 01 - 25

[本文编辑] 韩丹