

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.005

· 临床研究(专题) ·

锌转运体 1 基因在脑胶质瘤组织中的表达及其对 U87 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

王维, 张路阳, 张东勇, 仇波, 王运杰, 包义君(中国医科大学附属第一医院 神经外科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] **目的:** 检测锌转运体 1(zinc transporter 1, *ZnT1*) 基因在胶质瘤组织中的表达, 初步探索 *ZnT1* 对 U87 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:** 收集 2015 年 10 月至 2017 年 1 月中国医科大学附属第一医院神经外科收治的术前未接受过放化疗的 II~III 期胶质瘤患者 20 例, 采用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测胶质瘤组织与瘤旁组织中 *ZnT1* mRNA 和蛋白的含量。向胶质瘤细胞系 U87 中分别转染 *ZnT1* 和 si-*ZnT1* 质粒, 构建 *ZnT1* 过表达和低表达细胞系, MTT 和 Transwell 实验分别检测 *ZnT1* 对 U87 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**结果:** *ZnT1* mRNA 和蛋白在胶质瘤组织中表达显著高于瘤旁组织(均 $P < 0.05$)。成功构建 *ZnT1* 过表达和低表达 U87 细胞系。与空白和空质粒对照组相比, 转染 12 h 后, *ZnT1* 过表达 U87 细胞的增殖(0.54 ± 0.01 vs 0.45 ± 0.04 、 0.43 ± 0.03 , $P < 0.01$)、侵袭和迁移能力(均 $P < 0.05$) 显著升高; 而转染 12 h 后 *ZnT1* 低表达 U87 细胞的增殖(0.37 ± 0.03 vs 0.45 ± 0.01 、 0.44 ± 0.03 , $P < 0.01$)、侵袭和迁移能力(均 $P < 0.05$) 显著降低。**结论:** *ZnT1* 在胶质瘤组织中呈高表达, *ZnT1* 可以促进胶质瘤 U87 细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 锌转运体 1 基因; 胶质瘤; U87 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R739.41; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0346-05

Expression of zinc transporter 1 gene in brain glioma tissues and its effects on proliferation, migration and invasion of glioma U87 cell line

WANG Wei, ZHANG Luyang, ZHANG Dongyong, QIU Bo, WANG Yunjie, BAO Yijun (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of zinc transporter 1 (*ZnT1*) gene in glioma tissue, and to explore its effect on the proliferation, migration and invasion of U87 cells. **Methods:** From October 2015 to January 2017, 20 patients with glioma, who received no chemoradiotherapy before operation, were collected from Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University. The protein and mRNA content of *ZnT1* in glioma tissues and adjacent tissues were detected by Western blotting and Real-time PCR, respectively. *ZnT1* and si-*ZnT1* plasmids were transfected into glioma U87 cell line respectively to construct *ZnT1* over-expression U87 cell line and *ZnT1* knockdown U87 cell line. The effects of *ZnT1* on proliferation, migration and invasion of U87 cells were detected by MTT and transwell assay. **Results:** Both mRNA and protein expressions of *ZnT1* in glioma tissues was significantly higher than those in adjacent tissues (all $P < 0.05$). U87 cell lines with *ZnT1* over-expression and knockdown were successfully constructed. Compared with the control group and empty plasmid control group, the proliferation (0.54 ± 0.01 vs 0.45 ± 0.04 , 0.43 ± 0.03 , $P < 0.01$), invasion and migration (all $P < 0.05$) of U87 cells with *ZnT1* over-expression were significantly increased at 12 h after transfection; however, the proliferation (0.37 ± 0.03 vs 0.45 ± 0.01 , 0.44 ± 0.03 , $P < 0.01$), invasion and migration (all $P < 0.05$) of U87 cells with *ZnT1* knockdown were decreased significantly. **Conclusion:** *ZnT1* was highly expressed in glioma tissues, and promoted the proliferation, migration and invasion of glioma U87 cells.

[Key words] zinc transporter 1 gene; glioma; U87 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 346-350. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.005]

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2013]1792号); 辽宁省自然科学基金面上项目资助(No.2015020460); 中国博士后科学基金第 59 批面上项目资助(No.2016M590240); 沈阳市科技计划项目资助(No.17-230-9-13); 中国医科大学附属第一医院科学研究基金资助(No.FSFH201722)。Project supported by the Overseas Returnees Research Foundation of Ministry of Education (No. [2013]1792); the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.2015020460); the Chinese Postdoctoral Science Foundation (No.2016M590240); the Science And Technology Project of Shenyang City (No.17-230-9-13); and the Scientific Research Foundation of the First Affiliated Hospital of China Medical University (No.FSFH201722)

[作者简介] 王维(1981-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事神经细胞缺血再灌注损伤的保护机制和胶质瘤增殖机制的研究, E-mail: neurogeoncmu-wangwei@hotmail.com

[通信作者] 包义君(BAO Yijun, corresponding author), 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事 Hippo 信号转导在胶质瘤增殖的机制及治疗研究, E-mail: neurobao3@hotmail.com

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,占原发性脑肿瘤的30%,目前的临床数据指出,手术切除和放化疗可以部分延长胶质瘤患者的生存期,但是预后不佳,恶性成胶质细胞瘤患者的平均生存期通常仅1年^[1-2]。探索胶质瘤中异常表达的蛋白质有利于寻找到治疗胶质瘤的潜在靶点。锌作为机体内一种必需的微量元素,是细胞生长、发育、分化的必须元素,其参与调控基因的表达、核酸的合成、DNA的复制和修复和蛋白质的合成等多种生理功能^[3-6]。锌与细胞的生长、迁移等密切相关,肿瘤中通常会出现锌离子表达异常的现象,这与锌转运体(zinc transporter, ZnT)密切相关。ZnT家族控制细胞内锌的供应,其成员的特点是包含6个膜覆盖的区域,一个大的组织内丰富的胞内循环,以及C末端的尾巴。ZnT1是细胞增殖和分化所需的必需因子,它在多种细胞功能中起着重要作用,包括作为多种酶和转录因子的辅助因子。ZnT1在胰腺癌、乳腺癌和膀胱癌中均被证明存在异常表达的现象,但是在胶质瘤中的作用目前尚无明确报道^[7]。本研究探讨探讨ZnT1如何调节胶质瘤的恶性生物学行为,为胶质瘤的治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人胶质瘤细胞系U87由本实验室冻存,在25 ml培养瓶中培养,并加入适量含10%胎牛血清的无抗生素的DMEM培养液于5%CO₂、37 °C的孵箱条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。DMEM培养基购自美国HyClone公司,胎牛血清购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司,ZnT1质粒、si-ZnT1均购自上海吉玛制药技术有限公司,ZnT1和GAPDH抗体均购自美国Santa Cruz公司,实时定量PCR试剂盒(SYBR Green qPCR Master Mix)购自美国Promega公司,Lipo2000购自上海碧云天生物技术有限公司。

收集2015年10月至2017年1月中国医科大学附属第一医院神经外科收治的术前未接受过放化疗的胶质瘤患者20例,其中男性12例,55~70岁,平均(62.17±6.98)岁;女性8例,56~82岁,平均(68.94±12.74)岁;TNM^[4]分期:II期7例,III期13例。取其肿瘤组织及瘤旁组织(手术过程中切除的半影区组织,距肿瘤组织约0.5 cm)。所有胶质瘤组织及正常组织均经病理学检查证实,采集前均经由中国医科大学附属第一医院伦理委员会批准。组织取下后置于液氮中备用。患者纳入标准:肿瘤部位局限于脑叶的低级别胶质瘤和原发性高级别胶质瘤,患者没有其他(糖尿病,高血压,心脏病等)基础性疾病,术前神经功能状态较好,术前未接受过放化疗等针对胶质

瘤的其他治疗。排除标准:胶质瘤组织优势半球弥漫浸润性生长,病灶侵袭及双侧半球,术前神经功能状态较差,脑内深部或脑干部位的恶性胶质瘤。

1.2 Western blotting检测转染ZnT1质粒或si-ZnT1对U87细胞中ZnT1蛋白表达的影响

对数生长期的U87细胞分别转染2 μg ZnT1质粒/si-ZnT1(空白对照组仅转染Lipo2000,载体组转染空载体)后,培养24 h收集细胞通过裂解得到蛋白。取30 μg蛋白煮沸,瞬时离心后进行SDS-PAGE,电泳后100 V转膜1 h,室温下5%脱脂牛奶封闭1 h,封闭后丽春红染色并切膜,加入一抗(ZnT1抗体1:1 000稀释,GAPDH抗体1:1 000)4 °C孵育过夜。TBST洗膜3次(10 min/次),加入二抗(HRP标记山羊抗兔抗体1:5 000稀释),室温杂交2 h。TBST洗膜3次(10 min/次),ECL发光仪检测,使用Image J软件分析,以ZnT1与GAPDH灰度值的比值表示ZnT1的相对表达量。实验重复3次。

1.3 Real-time PCR检测胶质瘤组织及转染ZnT1质粒或si-ZnT1的U87细胞中ZnT1 mRNA的表达

取1 cm³胶质瘤组织标本或对数生长期的U87细胞,向细胞内分别转染2 μg ZnT1质粒/si-ZnT1(空白对照组仅转染Lipo2000,载体组转染空载体)后,培养24 h后的细胞,加入1 ml TRIzol裂解液进行裂解。使用氯仿、异丙醇抽提。DEPC水溶解,反转录后将样品稀释10倍,作为Real-time PCR的模板。使用SYBR试剂盒进行反应,反应进行40个循环。ZnT1引物为F(5'-3'): TGATGGCTATTATGGACGAG, R(5'-3'): GGAGCGTTTCCCAAGC; GAPDH, F(5'-3'): CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC, R(5'-3'): GCGCCAATACGACCAAATC。

1.4 MTT实验检测ZnT1表达对U87细胞增殖的影响

以1×10⁴每孔的密度将U87细胞接种于96孔板中,12 h后分别使用Lipo2000进行转染,将培养基换成无血清培养基后,将混有Lipo2000和载体/2 μg ZnT1质粒/si-ZnT1的培养基加入,4 h后更换为含血清培养基,实验开始计时(空白对照组仅转染Lipo2000,载体组转染空载体)。转染后0、12、24、36和48 h加入MTT,孵育4 h,加入100 μl DMSO溶解MTT-甲臞结晶,15 min后,测量490 nm处各孔光密度(D)值。

1.5 Transwell实验检测ZnT1表达对U87细胞迁移和侵袭的影响

对数生长期的U87细胞分别转染2 μg ZnT1质粒/si-ZnT1(空白对照组仅转染Lipo2000,载体组转染空载体)后培养24 h,细胞以1×10⁵/孔的密度接种于Transwell小室中(侵袭实验在铺细胞前4 h先在

小室上铺 20 μ l 基质胶), 终体积 200 μ l, 下室加入 600 μ l 无血清培养基, 12 h 后更换培养基, 每组设 3 个复孔。转染 24 h 后, 棉签擦去上层细胞, 5% 乙醇固定 20 min, 0.4% 锥虫蓝染色 20 min。显微镜下观察, 计数穿膜细胞。

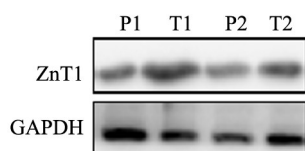
1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间差异比较使用非配对 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ZnT1 在胶质瘤组织中高表达

Western blotting 检测 20 例胶质瘤组织及瘤旁组织的 *ZnT1* 表达量, 结果(图 1)显示, 胶质瘤中 *ZnT1* 的表达量明显高于瘤旁组织 (0.95 ± 0.16 vs 0.42 ± 0.03 , $P < 0.05$)。Real-time PCR 检测结果显示, *ZnT1* mRNA 的表达量在胶质瘤组织中明显高于瘤旁组织 (0.73 ± 0.01 vs 0.48 ± 0.01 , $P < 0.05$)。

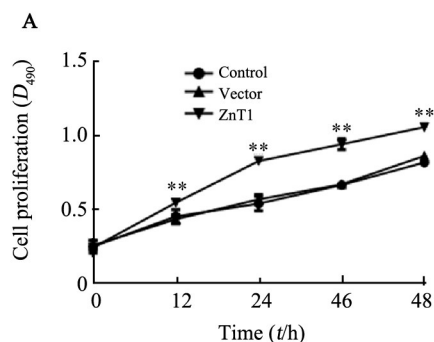


P: Paracancerous tissue; T: Tumor tissue

图 1 胶质瘤组织中 *ZnT1* 表达水平较高

Fig.1 The high expression of *ZnT1* in glioma

2.2 成功构建 *ZnT1* 过表达和低表达的 U87 细胞系



Western blotting 检测结果(图 2)显示, 与空白对照和空载体组相比, U87 细胞中转染 *ZnT1* 质粒后, *ZnT1* 表达显著上调 (0.56 ± 0.03 vs 0.37 ± 0.01 、 0.38 ± 0.01 , $P < 0.05$), 转染 si-*ZnT1* 后 *ZnT1* 表达受到抑制 (0.17 ± 0.01 vs 0.35 ± 0.04 、 0.32 ± 0.01 , $P < 0.05$)。Real-time PCR 实验结果显示, U87 细胞中转染 *ZnT1* 质粒后, *ZnT1* mRNA 表达上调 (0.76 ± 0.03 vs 0.45 ± 0.01 、 0.44 ± 0.03 , $P < 0.05$), 转染 si-*ZnT1* 后 *ZnT1* 表达受到抑制 (0.25 ± 0.04 vs 0.47 ± 0.02 、 0.46 ± 0.01 , $P < 0.05$)。

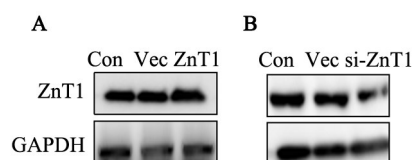
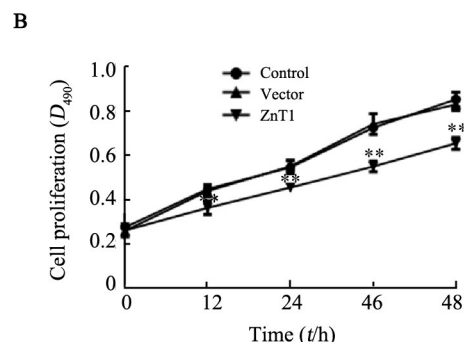


图 2 成功在 U87 细胞中过表达(A)或沉默(B)*ZnT1*
Fig.2 Over-expressed (A) or silenced (B) expression of *ZnT1* in U87 cells

2.3 *ZnT1* 过表达促进 U87 细胞的增殖

MTT 检测结果(图 3)显示, 转染 *ZnT1* 过表达载体 12 h 后, 实验组 *D* 值显著高于空白对照和空载体组 (0.54 ± 0.01 vs 0.45 ± 0.04 、 0.43 ± 0.03 , $P < 0.01$); 转染 si-*ZnT1* 12 h 后, 实验组 *D* 值显著低于空白对照和空载体组 (0.37 ± 0.03 vs 0.45 ± 0.01 、 0.44 ± 0.03 , $P < 0.01$)。



** $P < 0.01$ vs Control or Vector group

图 3 过表达(A)或沉默(B)*ZnT1* 对 U87 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of *ZnT1* overexpression (A) or silencing (B) on proliferation of U87 cells

2.4 *ZnT1* 过表达促进 U87 细胞的迁移和侵袭

Transwell 迁移和侵袭实验检测结果(图 4)显示, *ZnT1* 过表达实验组 U87 细胞的穿膜细胞数显著高于空白对照和空载体组 (均 $P < 0.05$), 反之, 当 *ZnT1* 表达下调后, U87 细胞的穿膜细胞数显著低于空白对照和空载体组 (均 $P < 0.05$)。

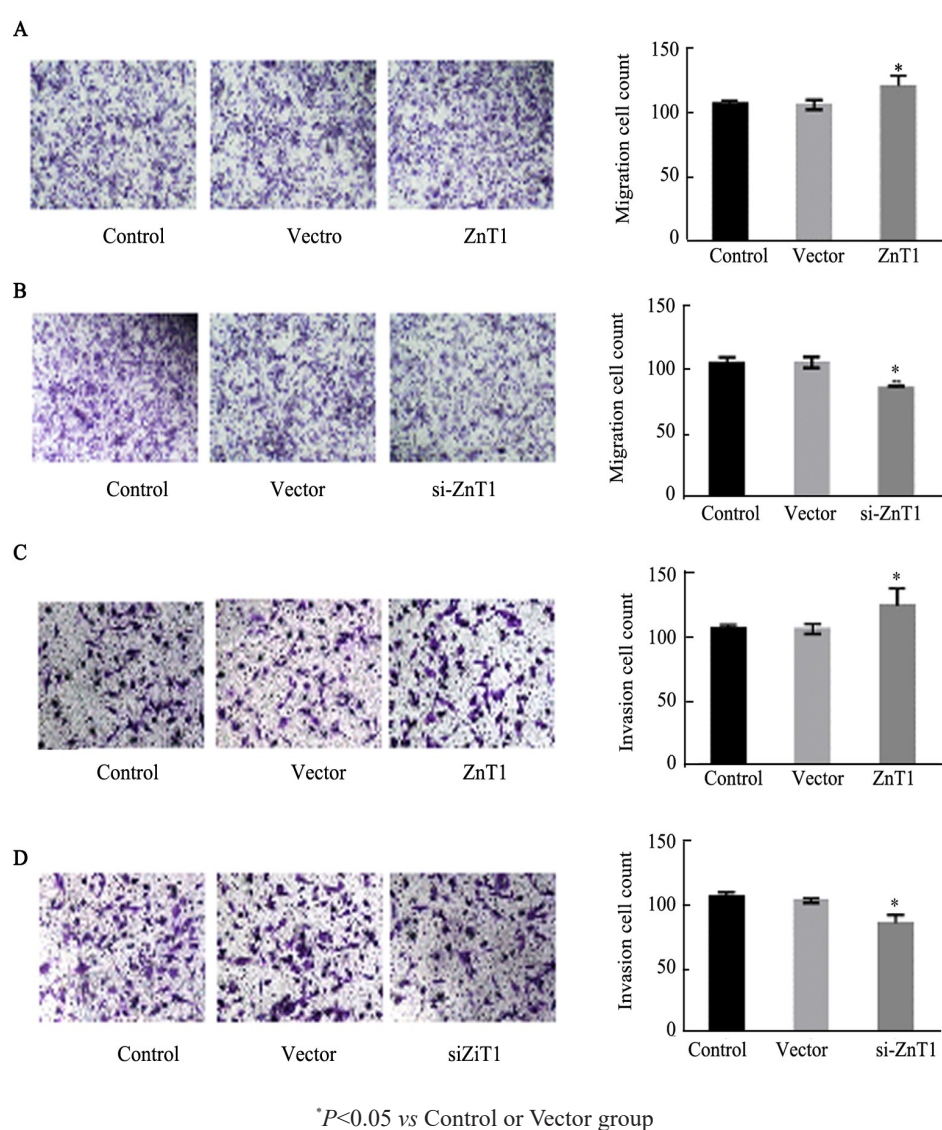
3 讨论

胶质瘤通常呈浸润性生长, 无明显界限, 具有发病率、复发率、病死率高, 治愈率低等特点, 手术很难完全切除, 放化疗也很难高度特异性地杀死胶质瘤细胞, 而且很容易产生中枢神经系统及全身不耐受的不良反应, 因此有必要寻找新型安全高效的治疗

手段^[8-9]。

锌是一种重要的微量元素,直接参与核酸和蛋白质的合成,细胞的分化、增殖和迁移等功能也与锌离子密切相关,锌离子在人体生长发育、生殖遗传、免疫分泌等重要的生理过程中起着必不可少的作用^[10]。在大脑中,锌离子的分布一般有两种方式,第一是形成膜结合蛋白参与代谢反应或者转化为细胞膜的构成成分;第二,在神经末梢突触小泡的囊泡或者细胞质内发挥神经信号传递作用。因此锌对于神经系统中细胞的生长发育有重要调节作用,母体缺锌可以导致婴儿中枢神经系统功能不全。锌转运体

家族在锌离子的跨膜转运过程中起重要作用,*ZnT1*与脑内锌离子代谢密切相关^[11]。*ZnT1*已经被证明^[12-14]在多种肿瘤中存在异常表达的现象,在乳腺癌中*ZnT1*过度表达,可以调节雌激素水平并且可以影响肿瘤细胞的增殖及侵袭能力,具体可以通过调节CDK2来影响G1/S期的转化,也可以通过影响基质金属蛋白酶来调节细胞的侵袭能力;在胰腺癌中,*ZnT1*也可以通过促进细胞的生长和细胞的迁移来促进胰腺癌的进程。但是目前*ZnT1*在胶质瘤中发挥的作用尚不明确。



* $P < 0.05$ vs Control or Vector group

图4 *ZnT1*对U87细胞迁移(A、B)和侵袭(C、D)的影响($\times 400$)

Fig.4 Effect of *ZnT1* on migration(A, B) and invasion (C, D) of U87 cells ($\times 400$)

本研究首先检测了20例胶质瘤患者肿瘤组织中*ZnT1*的表达情况,发现*ZnT1* mRNA和蛋白水平在胶质瘤中均有一定程度的上调,由此推断*ZnT1*可能在胶质瘤中发挥重要作用。胶质瘤的过度增殖可能会对周围组织产生压迫,侵袭转移又是胶质瘤威胁人

类生命健康的重要方式,因此本研究主要从这两个方面检测*ZnT1*对胶质瘤细胞生物学功能的影响。本课题组利用胶质瘤细胞系构建了*ZnT1*过表达和低表达细胞系,发现*ZnT1*可以促进U87细胞的增殖、迁移和侵袭。由此可见,抑制*ZnT1*在体内的表达可以对

胶质瘤的增殖及侵袭转移功能起到抑制作用,这一现象与其他肿瘤类似^[11-14]。

综上,*ZnTI*可以促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,这一发现为胶质瘤的治疗提供了新的方向。但*ZnTI*在胶质瘤中的生物学功还有必要进行深入的研究,其具体的作用机制,也需要通过体内实验对体外实验的结果进行印证。

[参考文献]

- [1] LV Q L, CHEN S H, ZHANG X, et al. Upregulation of long noncoding RNA zinc finger antisense 1 enhances epithelial-mesenchymal transition in vitro and predicts poor prognosis in glioma [J/OL]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317695022[2017-11-22]. http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1010428317695022?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed&. DOI: 10.1177/1010428317695022.
- [2] DI ANGELANTONIO S, MURANA E, COCCO S, et al. A role for intracellular zinc in glioma alteration of neuronal chloride equilibrium [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1501[2017-11-22]. <https://www.nature.com/articles/cddis2014437>. DOI: 10.1038/cddis.2014.437.
- [3] SINGH B P, DWIVEDI S, DHAKAD U, et al. Status and interrelationship of zinc, copper, iron, calcium and selenium in prostate cancer [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2016, 31(1): 50-56. DOI: 10.1007/s12291-015-0497-x.
- [4] TAYADE K, BONDHOPADHYAY B, KESHAV K, et al. A novel zinc(II) and hydrogen sulphate selective fluorescent "turn-on" chemosensor based on isonicotiamide: INHIBIT type's logic gate and application in cancer cell imaging[J]. *Analyst*, 2016, 141(5): 1814-1821. DOI: 10.1039/c5an02295a.
- [5] CHENG C C, GUAN S S, YANG H J, et al. Blocking heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin reduces tumor hypoxia-mediated VEGF release and inhibits tumor angiogenesis as a potential therapeutic agent against colorectal cancer[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 18[2017-11-22]. <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-016-0219-6>. DOI: 10.1186/s12929-016-0219-6.
- [6] ZHANG Z, WAN J, SUN L, et al. Zinc finger-inspired nanohydrogels with glutathione/pH triggered degradation based on coordination substitution for highly efficient delivery of anti-cancer drugs[J/OL]. *J Control Release*, 2016, 225: 96-108[2017-11-22]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168-3659\(16\)30032-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168-3659(16)30032-3). DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.035.
- [7] LEE M H, THOMAS J L, CHANG Y C, et al. Electrochemical sensing of nuclear matrix protein 22 in urine with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays for clinical studies of bladder cancer diagnosis[J/OL]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79: 789-795[2017-11-23]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316300045>. DOI: 10.1016/j.bios.2016.01.005.
- [8] XU D, CHEN X, CHEN K, et al. Tetra-sulfonate phthalocyanine zinc-bovine serum albumin conjugate-mediated photodynamic therapy of human glioma[J]. *J Biomater Appl*, 2014, 29(3): 378-385. DOI: 10.1177/0885328214529466.
- [9] CHUNG C H, DIGNAM J J, HAMMOND M E, et al. Glioma-associated oncogene family zinc finger 1 expression and metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with radiation therapy (RTOG 9003) [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(10): 1326-1334. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.3295.
- [10] CHANDLER P, KOCHUPURAKKAL B S, ALAM S, et al. Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 2 [2017-11-23]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0486-y>. DOI: 10.1186/s12943-015-0486-y.
- [11] CHANDRASEKARAN M, PANDURANGAN M. In vitro selective anti-proliferative effect of zinc oxide nanoparticles against co-cultured C2C12 myoblastoma cancer and 3T3-L1 normal cells[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 172(1): 148-154. DOI: 10.1007/s12011-015-0562-6.
- [12] LIU X S, LIU Z, GERARDUZZI C, et al. Somatic human ZBTB7A zinc finger mutations promote cancer progression[J]. *Oncogene*, 2016, 35(23): 3071-3078. DOI: 10.1038/onc.2015.371.
- [13] HOANG B X, HAN B, SHAW D G, et al. Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2016, 25(5): 457-461. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000194.
- [14] KUZYNIAK W, ERMILOV E A, ATILLA D, et al. Tetra-triethylenesulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy [J/OL]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, 13: 148-157[2017-11-23]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157210001530003X>. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.07.001.

[收稿日期] 2017-11-29

[修回日期] 2018-03-25

[本文编辑] 黄静怡