

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.009

内源性谷氨酰胺合成酶对 C6 胶质瘤细胞体外增殖、迁移和侵袭能力的影响

刘春兴¹,殷莹²,张滨²,谢平²,邹健²

Effects of Endogenous Glutamine Synthetase on Proliferation, Migration and Invasion of C6 Glioma Cells *in vitro*

Liu Chunxing¹, Yin Ying², Zhang Bin², Xie Ping², Zou Jian²

1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Huadong Sanitarium, Wuxi 214065, China; 2. Department of Clinical Laboratory Science, The First Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing Medical University

Corresponding Author: Zou Jian, E-mail: zoujian@gmail.com

Abstract: Objective To study the effects of glutamine synthetase (GS) on proliferation, migration and invasion of C6 stable cell lines which transfected with GS expression vector or shRNA vector. **Methods** C6 stable cell lines were generated by introducing GS shRNA, GS-EGFP-N3 or EGFP-N3 vector and selected with G418 followed by cloning. GS expression was detected by Western blot. Cell proliferation was detected by MTS and colony-forming experiment. Adhesion assay, wound healing and transwell experiments was used to detect the cell adhesion, migration and invasion. **Results** Western blot showed that GS was over-expressed in GS stable cells and no signal was detected in GS knocking-down cells. GS over-expression suppressed cell growth, clone formation and invasion, increased cell adhesion; GS knocking-down increased cell invasion, decreased cell adhesion, and had no significant impact on cell growth and clone formation. **Conclusion** The level of GS affects cell growth, migration and invasion of C6 glioma cells.

Key words: Glutamine synthetase; C6 glioma cell line; Stable expression; Proliferation; Migration; Invasion

摘要:目的 建立稳定高表达和靶向干扰谷氨酰胺合成酶(GS)细胞株观察GS对C6胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法** 将已构建的GS-pEGFP-N3、GS-shRNA真核表达载体和空载体pEGFP-N3通过脂质体介导分别转染C6胶质瘤细胞株, G418持续筛选并用Western blot鉴定, MTS法和克隆形成实验观察GS对C6胶质瘤细胞增殖的影响, 用MTS黏附实验、划痕损伤实验和transwell侵袭实验检测GS对细胞黏附、迁移和侵袭能力的影响。**结果** Western blot证实过表达细胞株有超量GS蛋白表达, 而shRNA细胞株未检测到GS信号; GS过表达细胞增殖、克隆形成能力和侵袭性显著降低而黏附能力显著增强; shRNA细胞增殖和克隆形成能力无显著性变化, 黏附能力显著降低, 而侵袭性显著增强。**结论** 成功建立GS稳定高表达和靶向干扰C6胶质瘤细胞株, 并证实GS表达水平影响胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 谷氨酰胺合成酶; C6细胞株; 稳定表达; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)10-1197-05

0 引言

胶质瘤是脑内常见恶性肿瘤, 以神经胶质细胞(glia cells)为主要细胞来源^[1]。正常情况下, 胶质细胞发挥支持、滋养神经元的作用, 具有吸收和调节神经活性物质的功能。但在某些因素的作用下, 细胞生长调控机制发生异常, 出现恶性增生、迁移和侵袭能力增强, 从而导致胶质瘤的发生^[2-3]。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)表达于中枢神经

系统(central nervous system, CNS)的星形胶质细胞和少突胶质细胞, 参与谷氨酸-谷氨酰胺的代谢循环^[4-5]。GS常作为星形胶质细胞的标志物, 然而在尚未成熟的星形胶质细胞和CNS损伤后局部聚集的反应性胶质细胞中呈低水平表达, 故GS被认为与胶质细胞的增殖和分化相关^[6-7]。我们先前研究发现脊髓损伤后低水平的GS有利于星形胶质细胞的活化和迁移^[8]。因此, GS低表达可能与胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭有关。为证实这一假设, 在构建GS稳定高表达和靶向干扰C6胶质瘤细胞株的基础上, 本研究对GS表达水平是否影响胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠C6胶质瘤细胞为无锡市人民医院中心实

收稿日期: 2011-11-09; 修回日期: 2012-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81000527); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2010159); 上海市华东疗养院院级基金资助项目(201001)

作者单位: 1. 214065 江苏无锡, 上海市华东疗养院检验科; 2. 南京医科大学附属无锡市人民医院中心实验室

通信作者: 邹健, E-mail: zoujian@gmail.com

作者简介: 刘春兴(1979-), 男, 学士, 主管检验师, 主要从事神经系统肿瘤学方面的研究

实验室保存;DMEM、Opti-MEM、胎牛血清和 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司;G418、丝裂霉素 C 购自 Sigma 公司;细胞培养板、培养皿购自 Corning 公司;ECL 发光液购自 PIERCE 公司;Transwell 小室购自 Millipore 公司;GS 小鼠单克隆抗体和 Matrigel 购自 BD 公司;GAPDH 小鼠单克隆抗体购自上海康成;CellTiter 96® AQueous One Solution Cell(MTS)试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 C6 细胞转染和亚克隆细胞株的筛选

取对数生长期 C6 细胞按每孔 4×10^5 密度接种于 6 孔板,待细胞生长至 60%~70% 融合时进行转染。转染前培养液换为 1 ml 无血清 Opti-MEM。将本室已构建载体(空载体、野生型和 shRNA)^[8]按 Lipofectamine™2000 说明书进行转染,3 h 后换为含 15% 血清不含抗生素的 DMEM 培养液,24 h 后换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 48 h,更换为含 800 $\mu\text{g/L}$ G418 的培养液并按已报道的方法^[9]进行筛选。待 G418 连续加压 3 周后,将转染阳性细胞接种于 96 孔板,用连续稀释法挑选阳性单克隆细胞并扩增。将稳定表达空载体 GFP(green fluorescent protein)的阳性克隆命名为 GFP-C6,GS 过表达阳性克隆命名为 GS-C6,shRNA 干扰细胞株命名为 GSi-C6。

1.2.2 单克隆细胞株的 Western blot 鉴定

将上述 3 种细胞株以 1.5×10^6 细胞数接种于 3.5 cm 培养皿,24 h 后裂解细胞收集蛋白,BCA 法测定蛋白含量,蛋白变性后按每孔上样 25 μg ,经 12% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉-TBST 封闭 1 h,用鼠抗 GS 和 GAPDH 抗体 4℃ 摇床孵育过夜,其中 GAPDH 为内参蛋白,TBST 洗 3 次,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体室温摇床孵育 1 h,TBST 洗 4 次,化学发光法(ECL)检测蛋白印迹。

1.2.3 MTS 法检测 GS 对细胞生长的影响

细胞生长实验按之前报道的 MTS 法进行^[10]。取生长良好的各组细胞,按每孔 5 000 个细胞密度接种于 96 孔板,每孔细胞总数和培养液的量均保持一致,每组设 8 个复孔。分 4 个时间点进行检测:4 h、24 h、48 h 和 72 h,每个时间点单独一块 96 孔培养板。检测时按 MTS 试剂盒说明书每孔加入 20 μl MTS 试剂,直接于 570 nm 处测定 OD 值,以各细胞株培养 4 h 的 OD 值设为 1,绘制细胞生长曲线。

1.2.4 稳定转染的 C6 细胞系黏附能力的检测

参照王冰等^[11]报道的方法,各组细胞用无血清培养液按每孔 25 000 个细胞的密度接种 96 孔板(已经 Matrigel 处理),培养 1 h 后用无血清 DMEM 清洗

未黏附的细胞,每孔加入 100 μl DMEM 和 20 μl MTS,继续培养 4 h,于 570 nm 处测定 OD 值;为避免各细胞株接种细胞数的差异,另设接种总细胞数校正孔,即培养 1 h 后直接加 20 μl MTS,培养 4 h 后测定 OD 值。按黏附细胞 OD 值/总细胞 OD 值的比值计算黏附率,并把 GFP 细胞株黏附率设为 1。

1.2.5 Transwell 小室检测 GS 对 C6 细胞侵袭能力的影响

参照王冰等^[11]报道的方法,各组细胞用含 0.1% BSA 的 DMEM 配成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度,200 μl 细胞悬液接种于 Transwell 小室(已经 Matrigel 处理),下室加 500 μl 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,培养 24 h。取出小室弃除上室液体,用棉签擦尽上室未穿膜细胞,4% 多聚甲醛固定 20 min,常规 HE 染色,20 倍物镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞数,取其平均值,以穿膜细胞数表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组重复 6 次。

1.2.6 肿瘤细胞克隆形成实验

将上述三种细胞以 200 个细胞/平皿的密度接种于 6 孔培养板,连续培养 14 天后,4% 多聚甲醛室温固定 20 min,0.2% 结晶紫染色 20 min,倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆^[12]。每组重复 6 次。

1.2.7 划痕损伤实验

将上述 3 种细胞接种于 48 孔培养板,待融合度达到 100% 时,用 10 $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 处理 2 h^[13]后按本室报道的方法^[8]制作划痕损伤模型,损伤 0 h 和 24 h 后于倒置显微镜下拍照。划痕损伤面积大小采用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0)分析,以 0 h 时损伤面积为 100%,24 h 后的损伤面积与 0 h 损伤面积的百分比作为迁移指数^[8]。每组重复 6 次。

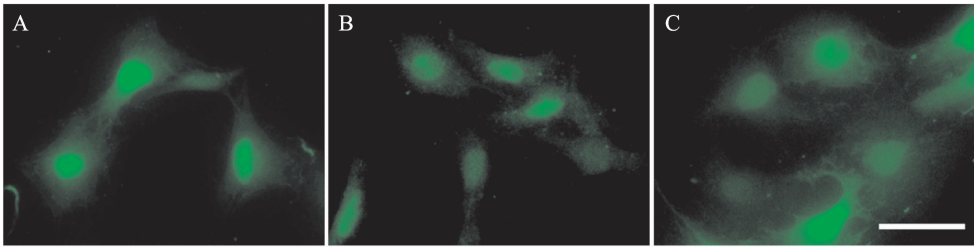
1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差表示,采用 *t* 检验及方差分析,运用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。最终统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GS 稳定过表达和干扰胶质瘤细胞株的建立及鉴定

经 G418 筛选并扩增获得稳定过表达 GS、干扰和空载的 C6 亚克隆细胞株 GS-C6、GSi-C6 和 GFP-C6。在荧光显微镜下观察,三组细胞均显示绿色荧光蛋白 GFP 的表达,见图 1,GS-C6 细胞在形态上显得扁平铺展,细胞间的接触相对更紧密。Western blot 结果显示 GS 和 GFP 细胞株均可见 43 kD 的 GS 蛋白条带,而 GSi 组未检测到 GS 蛋白阳性条带;GS-C6 细胞株在 75 kD 处还检测到另一蛋白条带,此即为 GS 与 GFP 融合蛋白的表达,见图 2。



A:GFP-C6 group;B:GSi-C6 group;C:GS-C6 group;GFP:green fluorescent protein;GSi:GS knockding-down C6 cells;GS:glutamine synthetase

图 1 荧光显微镜下显示 C6 细胞系 GFP 蛋白的表达及细胞形态(标尺,20 μm)

Figure 1 GFP expression and morphology of C6 cell lines by fluorescence microscope(bar, 20 μm)

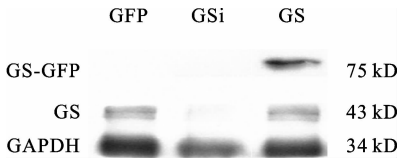
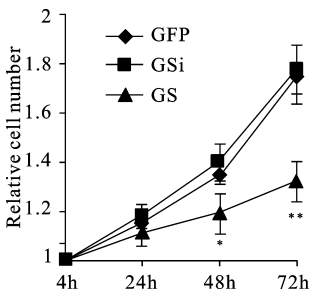


图 2 C6 细胞系目的基因 GS 的 Western blot 鉴定

Figure 2 Expression of GS in C6 glioma cell lines by Western blot

2.2 稳定转染细胞株的增殖能力

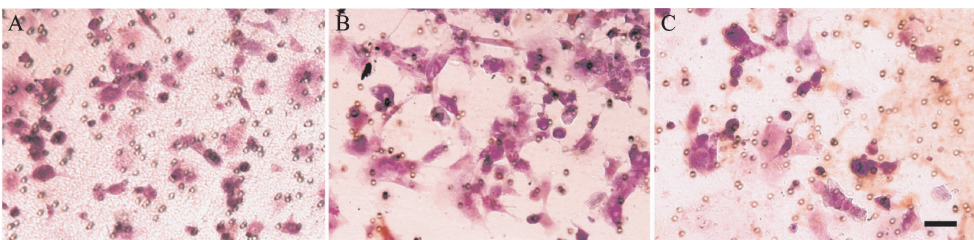
用 MTS 法检测细胞生长能力并绘制细胞生长曲线,取接种 4 h 各细胞株的 OD 值为 1。GFP-C6 细胞 24、48 和 72h 相对增殖率分别为(1.15 ± 0.04)、(1.35 ± 0.04)和(1.75 ± 0.11);GSi-C6 分别为(1.18 ± 0.05)、(1.40 ± 0.08)和(1.77 ± 0.10);GS-C6 分别为(1.11 ± 0.05)、(1.19 ± 0.08)和(1.32 ± 0.08)。统计结果显示,与 GFP-C6 组相比 GS-C6 在 48 h 和 72 h 时增殖能力显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

图 3 C6 细胞系生长曲线

Figure 3 Growth curves of C6 cell lines



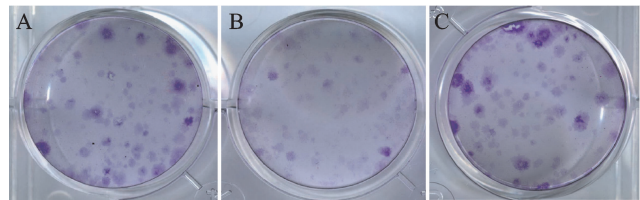
A:GFP;B:GSi;C:GS

图 5 C6 细胞系侵袭实验(标尺:20 μm)

Figure 5 Invasion of C6 cell lines in transwell assay(bar, 20 μm)

2.3 稳定转染细胞株克隆形成能力

经固定染色后的克隆形成示意图,见图 4。GFP-C6、GSi-C6 和 GS-C6 平板克隆数分别为(31.75 ± 2.50)、(32.75 ± 2.63)和(21.67 ± 2.04)。与 GFP-C6 组相比,GS-C6 细胞的克隆形成能力显著降低($P < 0.001$),而 GSi-C6 细胞与 GFP-C6 细胞间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:GFP;B:GS;C:GS;

图 4 C6 细胞系克隆形成实验

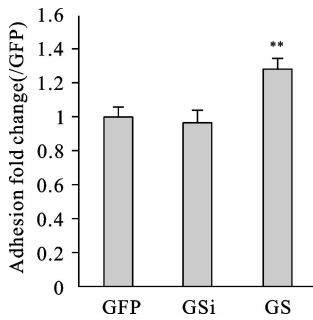
Figure 4 Clonogenic assays of C6 cells *in vitro*

2.4 稳定转染细胞株侵袭能力

侵袭实验结果显示,GFP-C6、GSi-C6 和 GS-C6 平均穿膜细胞数分别为(54.05 ± 4.21)、(73.47 ± 7.11)和(42.14 ± 6.62)。与 GFP-C6 组比较,GSi-C6 细胞穿膜能力显著升高($P = 0.0002$),而 GS-C6 细胞穿膜能力明显减弱($P = 0.004$),见图 5。

2.5 稳定转染细胞株的黏附能力

对各细胞株接种总数进行校正后,GSi-C6 和 GS-C6 的黏附率分别为(0.97 ± 0.034)和(1.28 ± 0.028),GSi-C6 的黏附率与 GFP-C6 相比差异无统计学意义,而 GS-C6 细胞黏附能力明显增强,见图 6。



** , compared with GFP, $P < 0.01$

图 6 C6 细胞系黏附实验

Figure 6 Quantification of cell adhesion

2.6 稳定转染细胞株划痕损伤后的迁移能力

图 7A 结果显示,划痕损伤早期损伤边缘整齐,24 h 后细胞突起明显增长并向损伤区域迁移,损伤面积逐渐减小。GFP-C6、GSi-C6 和 GS-C6 细胞 24 h 后损伤面积占损伤初期面积的百分比分别为 (27.04 ± 2.73) 、 (10.74 ± 2.56) 和 (59.46 ± 4.02) 。与 GFP-C6 组细胞相比,GSi-GS 细胞损伤后迁移能力显著增强,而 GS-C6 细胞迁移能力则显著降低,见图 7B。

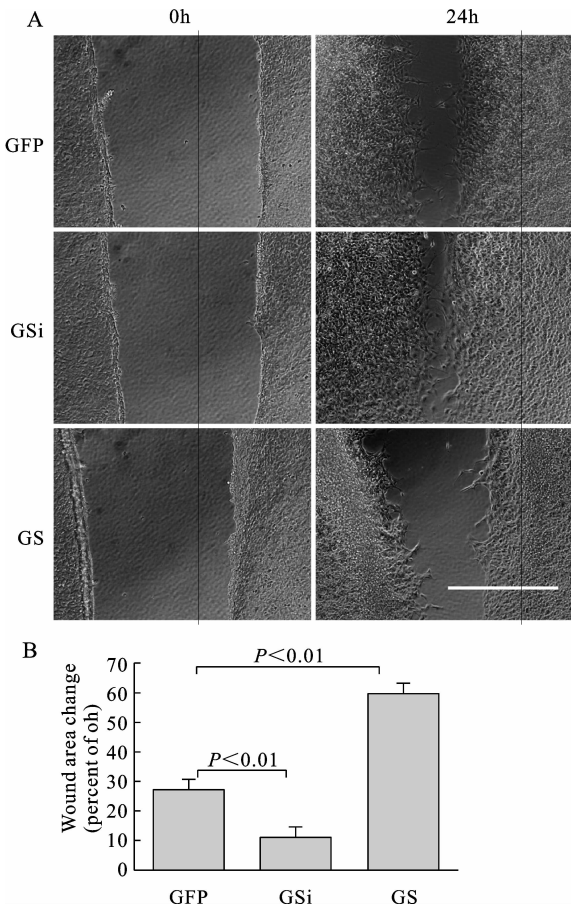


图 7 C6 细胞系划痕损伤实验(标尺:500 μm)

Figure 7 Migration of C6 cell lines after scratch wound

(bar: 500 μm)

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,目前尚无有效的治疗手段改善患者预后,这可能与胶质瘤细胞的生长特性密切相关。胶质瘤细胞与胶质细胞有许多共性,但在生长特性上又有别于成熟胶质细胞,表现出更强的增殖和侵袭力。脑内 GS 主要表达于星形胶质细胞和少突胶质细胞,脊髓损伤后 GS 表达下调有利于星形胶质细胞的活化和迁移。而星形胶质细胞在损伤后活化并形成胶质瘢痕的过程类似于体内胶质瘤的形成过程,即出现逆分化倾向,重新获得并强化增殖和迁移能力^[14-15]。

基于之前对星形胶质细胞中 GS 功能的研究,我们猜测胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭可能与 GS 表达水平较低有关。基于上述假设,在构建稳定 GS 过表达和 shRNA 靶向稳定干扰 C6 胶质瘤细胞株的基础上,本研究对 GS 表达水平是否影响胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭进行了初步研究。结果显示,过量表达 GS 可抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭力,促进与细胞外基质的黏附;而缺失表达 GS 可促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭。GS 是细胞内谷氨酸转化为谷氨酰胺的关键酶,谷氨酰胺可调控细胞外基质和细胞内肌动蛋白的表达^[16],因此过量表达 GS 抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭可能与此有关。GS 缺失表达促进星形胶质细胞迁移和抑制黏附与 Integrin $\beta 1$ 等细胞外基质受体的表达下调、金属基质蛋白酶的表达上调有关^[8]。虽然这些分子对肿瘤细胞迁移、侵袭甚至增殖都具有调控功能^[16-18],但 GS 是否同样通过调控上述分子的表达或功能影响胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭尚需进一步的实验去证实。另外,GS 过表达的细胞形态上呈现不同于胶质瘤细胞所具有的典型成纤维细胞形态,显得更扁平宽大,并且呈多细胞聚集接触状态,而作为考量细胞间相互作用对细胞迁移影响的划痕损伤实验表明这组细胞迁移能力明显受到抑制。这提示 GS 可能促进了胶质瘤细胞间的相互接触从而抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力,并可能通过增强细胞间接触抑制过度增殖。但 GS 影响胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭是否与细胞间的相互接触增强有关,尚无可靠证据。

综上所述,GS 能抑制胶质瘤细胞的增殖,并可能通过抑制细胞与细胞外基质及细胞与细胞间的黏附而降低细胞侵袭能力、抑制胶质瘤的转移。GS 可能在胶质瘤的发生发展过程中扮演着重要角色,但肿瘤的发生、发展与宿主的微环境是密不可分的,

与肿瘤细胞之间的相互作用也是相关联的,体内胶质瘤增殖、侵袭和转移过程中,GS 基因的作用及其机制,以及胶质瘤细胞中 GS 表达降低的机制都有待进一步研究来揭示,以便为胶质瘤的防治提供理论和实验依据。

参考文献:

- [1] Mamelak AN, Jacoby DB. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601) [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007, 4(2): 175-86.
- [2] Dufour C, Cadusseau J, Varlet P, et al. Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10): 2373-82.
- [3] Masui K, Suzuki SO, Torisu R, et al. Glial progenitors in the brainstem give rise to malignant gliomas by platelet-derived growth factor stimulation [J]. *Glia*, 2010, 58(9): 1050-65.
- [4] Shaked I, Ben-Dror I, Vardimon L. Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(3): 574-80.
- [5] Zou J, Wang YX, Dou FF, et al. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4): 577-84.
- [6] Hama H, Sakurai T, Kasuya Y, et al. Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ETB receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186(1): 355-62.
- [7] Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(9): 2143-55.
- [8] Zou J, Wang YX, Mu HJ, et al. Down-regulation of glutamine synthetase enhances migration of rat astrocytes after in vitro injury [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(3): 404-13.
- [9] Wang F, Wang LX, Wang RL, et al. Construction of specific silencing vector-based siRNA on stathmin gene [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2007, 34(8): 549-52. [王峰, 王留兴, 王瑞林, 等. 特异性沉默 Eca109 细胞系 stathmin 基因 siRNA 表达载体的构建 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(8): 549-52.]
- [10] Xiong JP, Tao QS, Zhang L, et al. The depressive effect of detected on the proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cell lines and celecoxib combined with cisplatin or X-ray [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2007, 34(1): 15-7. [熊建萍, 陶庆松, 张凌, 等. COX-2 抑制剂联合顺铂或 X 射线对 A549 肺腺癌细胞株的体外实验 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(1): 15-7.]
- [11] Wang B, Lin S, Wang L, et al. Influence of GPC3 gene on proliferation, adhesion and invasion of SK-Hep-1 hepatoma carcinoma cancer cells [J]. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2008, 25(9): 1143-5. [王冰, 林山, 王烈, 等. GPC3 基因对肝癌细胞 SK-Hep-1 体外迁移、侵袭能力的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(9): 1143-5.]
- [12] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells in vitro [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2315-9.
- [13] Okada S, Nakamura M, Katoh H, et al. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury [J]. *Nat Med*, 2006, 12(7): 829-34.
- [14] Yang H, Cheng XP, Li JW, et al. De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(4): 455-73.
- [15] Lang B, Liu HL, Liu R, et al. Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells [J]. *Neuroscience*, 2004, 128(4): 775-83.
- [16] Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, et al. Molecular mechanisms of glutamine action [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 204(2): 392-401.
- [17] Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting [J]. *FEBS J*, 2011, 278(1): 16-27.
- [18] Wojcik-Stanaszek L, Gregor A, Zalewska T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011, 71(1): 103-12.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]