

GDNF 通过 AKT/ β -catenin 调节人胶质瘤细胞增殖的研究*李周儒¹,滕道辉²,董国凯¹,殷文江¹,蔡红星¹

(1. 徐州医学院法医学教研室,江苏徐州 221002;2. 江苏省徐州市铜山区公安局刑警大队 221000)

[摘要] **目的** 研究胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)促进人胶质瘤细胞增殖的机制。**方法** 将胶质瘤样本分为低级别胶质瘤组和高级别胶质瘤组,脑挫裂伤患者样本作为正常对照组,每组各 12 例;将胶质瘤细胞系 C6 细胞分为细胞对照组、牛血清蛋白(BSA)组和 GDNF 组。CCK-8 实验检测细胞增殖率,蛋白免疫印迹(Western blot)法检测各组 AKT、p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 的表达。**结果** 与正常对照组相比,胶质瘤组 AKT、p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 的蛋白水平显著增加($P < 0.05$),且高级别胶质瘤组的蛋白水平明显高于低级别胶质瘤组($P < 0.05$)。CCK-8 检测 C6 胶质瘤细胞实验中,与细胞对照组相比,GDNF 组细胞增殖率明显增高($P < 0.05$),Akt 表达水平没有明显变化,而 p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的蛋白表达均显著增加($P < 0.05$)。**结论** GDNF 可能通过上调胶质瘤细胞 p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 来促进胶质瘤细胞的增殖。

[关键词] 神经胶质瘤;胶质细胞源性神经营养因子;AKT; β -catenin**[中图分类号]** R739.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)22-3034-03GDNF regulates the proliferation of glioma cells through AKT/ β -catenin signaling pathway*Li Zhou¹, Teng Dao², Dong Guokai¹, Yin Wenjiang¹, Cai Hongxing¹

(1. Department of Forensic Medicine, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Criminal Police Brigade of Tongshan District, Public Security Bureau of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism that glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes human glioma cells proliferation. **Methods** We divided glioma samples into two groups, including low-grade glioma group and high-grade glioma group, while cerebral contusion patients were treated as the control group, 12 cases in each group. C6 glioma cell lines were divided into three groups, such as GDNF group, BSA (bovine serum albumin) group and control group. CCK-8 (cell counting kit-8) was used to detect the cell proliferation, while Western blot was used to detect the expression of AKT, p-AKT, β -catenin and p- β -catenin in each group. **Results** Comparing with the control group, the expression levels of AKT, p-AKT, β -catenin and p- β -catenin in glioma group had a significantly increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the high-grade gliomas group also had a significant increase in those more than low-grade gliomas group ($P < 0.05$). CCK-8 test showed that the cell proliferation in GDNF group was significantly higher than the control group ($P < 0.05$), and the expression levels of p-AKT, β -catenin and p- β -catenin proteins all had a significant increase ($P < 0.05$). However, the expression level of AKT had no obvious difference. **Conclusion** GDNF might promote the proliferation of glioma cells by up-regulating the expression of p-AKT, β -catenin and p- β -catenin.

[Key words] glioma; glial cell line-derived neurotrophic factor; AKT; β -catenin

胶质瘤是人中枢神经系统常见病、多发病,因发病机制未明,故临床尚无根治胶质瘤的有效办法。胶质瘤细胞内一系列信号转导的机制研究是近年来神经外科学研究的热点。普遍认为,胶质瘤细胞信号转导通路中信号传导因子引发胶质瘤一系列生物学效应。有文献报道胶质瘤细胞 AKT 与 β -catenin 表达水平上调,且两者之间存在着多种交叉联系,都能够促进细胞增殖,然而这两者相互作用的机制目前仍不甚清楚^[1-3]。同时有研究证实胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)能够促进 C6 胶质瘤细胞增殖,GDNF 下游通路因子对 AKT/ β -catenin 信号通路存在调节作用,其可能参与 GDNF 促 C6 胶质瘤细胞增殖的机制^[4-7]。本试验首先通过 GDNF 促进胶质瘤细胞增殖,然后通过蛋白免疫印迹(Western blot)方法、CCK-8 检测细胞增殖率等方法,观察在促进胶质瘤细胞增殖过程中 GDNF 是否通过调节 AKT/ β -catenin 信号通路来实现的这一生物学作用。

1 材料与与方法

1.1 材料

临床胶质瘤患者的术中所取胶质瘤样本,胶质瘤

细胞系 C6 细胞购自中科院细胞库。Akt(ab66138)、p-Akt(ab8805)、 β -catenin(ab32572)、p- β -catenin(ab24925)一抗购自 Abcam 公司。羊抗小鼠荧光二抗(#610632-002)购自 Rockland 公司。羊抗兔荧光二抗(#35568)购自 Thermo 公司。牛血清白蛋白(BSA,A2153)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织样本

胶质瘤组织样本 24 例,按照 WHO 诊断标准将胶质瘤样本分成低级别脑胶质瘤组、高级别脑胶质瘤组,每组 12 例。所有样本均取自徐州医学院附属医院神经外科手术切除并经过病理证实的人脑胶质瘤样本,其中男 15 例,女 9 例,年龄 10~82 岁。另取 12 例因脑挫裂伤行内减压术患者的非肿瘤脑组织设为正常对照组。Western blot 方法检测 3 组中 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 表达。

1.2.2 细胞培养

C6 胶质瘤细胞购自中科院上海细胞库,依照其培养说明书进行培养。每 3~4 天,细胞处于对数生长期,铺满培养瓶底约 70%时传代 1 次(主要保证细胞的活性)。按 1:3 或 1:4 的细胞比例传代。将传代所得细胞分为细胞对

照组,BSA 组和 GDNF 组。细胞对照组不进行任何处理,BSA 组加入 BSA (60 $\mu\text{g/L}$) 处理,GDNF 组加入 GDNF 药物 (60 $\mu\text{g/L}$),BSA 组和 GDNF 组处理时间均为 15 min。处理结束后细胞收集入 EP 管中,以备细胞提取。然后进行样品总蛋白的提取及蛋白含量的测定,分装并置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱待用。

1.2.3 CCK-8 试验检测 C6 神经胶质瘤细胞的增殖 取对数生长期的 C6 胶质瘤细胞接种于 96 孔培养板(每孔约 5×10^3 个细胞),24 h 后细胞生长达约 80% 融合时,以脂质体与 DNA 比例为 2.2 μL : 1.0 μg 转染细胞。将转染所得细胞分为细胞对照组,BSA 组和 GDNF 药物组。每组设 4 个复孔,在转染 46 h 后每孔加 CCK-8 试剂 10 μL ,继续孵育 2 h,终止培养,小心吸取孔内的液体,移入另外 1 个对应的 96 孔板内。在全波长酶标仪上测定波长为 450 nm 的吸光度值,试验重复 3 次,取均值。

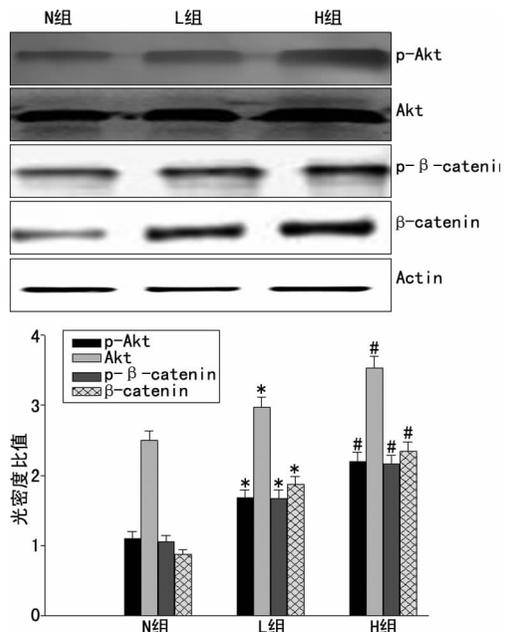
1.2.4 Western blot 检测 等量蛋白样品经 7.5% SDS 聚丙烯酰胺电泳分离后,以湿转法转移至聚偏氟乙烯膜上,3% BSA 封闭后加入一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。用洗涤液除去多余一抗,然后加入相应的二抗, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h,洗膜。用荧光扫描仪扫描图像,蛋白表达水平以目的蛋白/Actin 蛋白的比值来表示。

1.3 统计学处理 采用 Sigmaxt 3.5 进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较时采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织样本中 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的表达

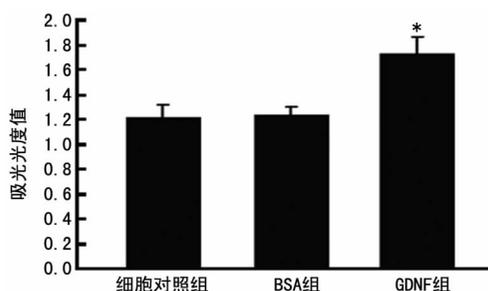
Western blot 检测正常对照组、低级别胶质瘤组和高级别胶质瘤组样品,结果显示与正常对照组相比,低级别胶质瘤组和高级别胶质瘤组中 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$),且高级别胶质瘤组 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的表达水平高于低级别胶质瘤组 ($P < 0.05$),见图 1。



N 组:正常对照组;L 组:低级别胶质瘤组;H 组:高级别胶质瘤组。光密度比值:样本光密度/Actin 光密度。*: $P < 0.05$,与 N 组比较;#: $P < 0.05$,与 L 组比较。

图 1 3 组胶质瘤组织 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白表达

2.2 GDNF 对 C6 胶质瘤细胞系增殖的影响 CCK-8 实验检测 GDNF 诱导 C6 胶质瘤细胞增殖,结果显示与细胞对照组细胞增殖率相比,GDNF 组细胞增殖率增大 ($P < 0.05$),而 BSA 组细胞增殖率与细胞对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

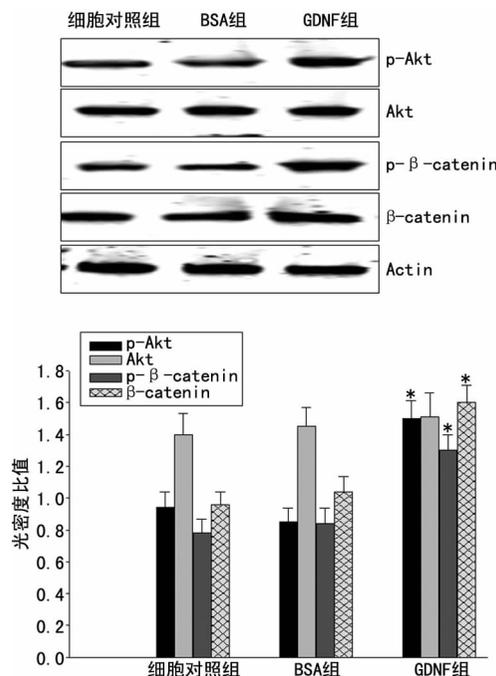


*: $P < 0.05$,与细胞对照组比较。

图 2 CCK-8 实验检测 GDNF 作用对 C6 细胞增殖的影响

2.3 GDNF 对 C6 胶质瘤细胞系 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 表达的影响

Western blot 检测结果显示与细胞对照组相比,GDNF 组中的 p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$),而 Akt 没有明显变化,BSA 组中的 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 的表达水平则无明显变化,见图 3。



*: $P < 0.05$,与细胞对照组比较。

图 3 GDNF 对 C6 胶质瘤细胞 Akt、p-Akt、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白表达的影响

3 讨论

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,占原发性中枢神经系统恶性肿瘤的 50%~60%[8]。目前对其治疗策略是在手术切除肿瘤主体的基础上,采用多种手段杀灭残存瘤细胞或抑制其增殖,但是手术加放疗的平均生存期仅为 8~11 个月。研究人员发现,脑胶质瘤中 GDNF 及其受体人胶质细胞系来源神经生长因子受体 $\alpha 1(\text{GFR}\alpha 1)$ 的表达量显著高于正常脑组织中的含量[9],其中 GDNF 的含量大约是正常成年脑组织中含量

的 5 倍。这种表达异常与肿瘤的哪些生物学活性有关,目前其具体的机制仍不明确。

GDNF 是糖基化二硫键结合的同源二聚体蛋白质,为转化生长因子(TGF)超家族的成员^[10]。它是一种神经营养因子,对多种神经元如多巴胺能神经元、运动神经元、交感神经元等有明显营养作用^[11-13]。有文献报道 GDNF 能够促使胶质瘤细胞增殖^[7]。有研究指出,GDNF 通过激活 AKT 来发挥其对肿瘤细胞的促增殖作用^[14]。AKT、JNK 信号通路与许多信号途径交叉,形成复杂的信号网络。AKT 信号通路在特定的条件下,可以被细胞因子、生长因子和应激等多种因素激活,参与细胞的增殖、分化、凋亡和恶变等多种生物学反应,与肿瘤、糖尿病等多种疾病的发生、发展密切相关。

本研究发现,胶质瘤组织中 AKT、p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 均表达增高,而 GDNF 细胞因子处理后胶质瘤细胞系 p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 蛋白表达增高,但 AKT 表达无变化。这些蛋白表达的变化可能潜在地促进胶质瘤细胞的增殖。因此推测 GDNF 很可能通过诱导 p-AKT、 β -catenin 和 p- β -catenin 的表达,促进 AKT 和 β -catenin 向其活化形式的转变,从而促进胶质瘤细胞的增殖。

有关 GDNF 表达与胶质瘤恶性程度之间关系研究报道较少,根据本试验结果认为 GDNF 作为重要的因子可能通过 AKT 磷酸化以及上调 β -catenin 和 p- β -catenin 来促进胶质瘤细胞增殖。如果能够阐明 GDNF 促进胶质瘤细胞增殖的机制,将为临床研发抑制胶质瘤的药物提供良好的理论基础。

参考文献

- [1] Zhou X, Ren Y, Han L, et al. Role of the AKT pathway in microRNA expression of human U251 glioblastoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(3): 665-672.
- [2] Kwiatkowska A, Kijewska M, Lipko M, et al. Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5): 655-667.
- [3] Zhang X, Chen T, Zhang J, et al. Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2): 181-190.
- [4] Zuo T, Qin JY, Chen J, et al. Involvement of N-cadherin in the protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopaminergic neuron damage [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(3): 561-568.
- [5] Tanwar PS, Kaneko-Tarui T, Zhang L, et al. Constitutive WNT/ β -catenin signaling in murine sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 422-432.
- [6] Li F, Wang M, Zhu S, et al. The potential neuroprotection mechanism of GDNF in the 6-OHDA-Induced cellular models of parkinson's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(7): 907-919.
- [7] Yu ZQ, Zhang BL, Ren QX, et al. Changes in transcriptional factor binding capacity resulting from promoter region methylation induce aberrantly high GDNF expression in human glioma [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 571-580.
- [8] Bian EB, Li J, Xie YS, et al. LncRNAs: new players in gliomas, with special emphasis on the interaction of lncRNAs with EZH2 [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(3): 496-503.
- [9] Wan GQ, Too HP. A specific isoform of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 regulates RhoA expression and glioma cell migration [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(3): 759-770.
- [10] Li XY, Liu YJ, Hou LL, et al. Regulatory effect of GDNF on the proliferation and differentiation of mammalian spermatogonial stem cells [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2011, 17(7): 628-633.
- [11] Hegarty SV, O'keeffe GW, Sullivan AM. Neurotrophic factors: from neurodevelopmental regulators to novel therapies for parkinson's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(19): 1708-1711.
- [12] Tovar-Y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, et al. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 61.
- [13] Miwa K, Lee JK, Takagishi Y, et al. Axon guidance of sympathetic neurons to cardiomyocytes by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e65202.
- [14] Sartelet H, Oligny LL, Vassal G. AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(5): 757-769.

(收稿日期: 2015-02-28 修回日期: 2015-07-09)

2015 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-63604477。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!