

本文引文格式:顾倩,周欣鸿,岑丽兰,等. eEF2K对胶质瘤细胞增殖及迁移能力的影响[J].

右江民族医学院学报, 2022, 44(5): 623-627.

【论著与临床报道】

eEF2K对胶质瘤细胞增殖及迁移能力的影响

顾倩^{1,2,3}, 周欣鸿^{1,2,3}, 岑丽兰^{1,2,3}, 陆海善^{1,2,3}, 黄永秩^{1,2,3}, 安苗苗^{1,2,3}, 杨茜^{1,2,4}

1. 右江民族医学院临床病理诊断与研究中心, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院病理科, 广西 百色 533000;
3. 广西分子病理学(肝胆疾病)重点实验室, 广西 百色 533000;
4. 右江民族医学院附属医院神经科学研究实验室, 广西 百色 533000]

摘要:目的 探讨 eEF2K 对胶质瘤细胞增殖及迁移能力的影响。方法 采用 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 检测 eEF2K 在胶质瘤细胞 U87 和正常星形胶质细胞 HA1800 中蛋白及 mRNA 的表达。在胶质瘤 U87 细胞上进行慢病毒转染, 以下调 eEF2K 的表达, 用 Western blot 法验证转染效率。实验分为两组: 转染阴性对照空病毒载体的为阴性对照组, 转染 eEF2K-shRNA 低表达载体的为实验组。稳转细胞株构建成功后, 采用 CCK-8 细胞增殖实验、细胞划痕实验检测胶质瘤 U87 细胞的增殖能力和迁移能力。结果 与正常星形胶质细胞相比, 胶质瘤细胞中 eEF2K 的蛋白表达量明显升高 ($P < 0.001$), mRNA 的表达水平有所升高 ($P < 0.01$)。与阴性对照组相比, 下调 eEF2K 的表达后可以抑制胶质瘤细胞的增殖能力 ($P < 0.001$) 和迁移能力 ($P < 0.01$)。结论 eEF2K 在胶质瘤细胞中呈高表达, 下调 eEF2K 的表达能够抑制胶质瘤 U87 细胞的增殖能力和迁移能力。

关键词: eEF2K; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R739.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2022)05-0623-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.05.002

Effect of eEF2K on proliferation and migration of glioma cells

Gu Qian^{1,2,3}, Zhou Xinhong^{1,2,3}, Cen Lilan^{1,2,3}, Lu Haishan^{1,2,3},
Huang Yongzhi^{1,2,3}, An Miaomiao^{1,2,3}, Yang Qian^{1,2,4}

1. Center for Clinicopathological Diagnosis and Research, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Guangxi Key Laboratory of Molecular Pathology (Hepatobiliary Diseases), Baise 533000, Guangxi, China;
4. Neuroscience Research Laboratory, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China]

Abstract: **Objective** To investigate the effect of eEF2K on the proliferation and migration of glioma cells. **Methods** The protein and mRNA expression of eEF2K in glioma cells U87 and normal astrocytes HA1800 were detected by Western blot and real-time PCR. With lentivirus transfection on glioma U87 cells, the expression of eEF2K was down-regulated and the transfection efficiency was verified by Western blot. The

基金项目: 广西科技计划项目(桂科 AD19245039); 百色市科学研究与技术开发计划项目(百科 20193220); 右江民族医学院 2022 年研究生创新计划项目(YXCXJH2022008)

第一作者简介: 顾倩(1991-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑肿瘤及其他神经系统疾病, E-mail: 920575130@qq.com

通讯作者简介: 杨茜(1975-), 女, 医学博士、博士后, 副教授, 研究方向: 神经系统疾病(癫痫、老年痴呆症以及创伤后应激综合征等)关于学习与记忆障碍的机制研究, E-mail: yangqian@ymun.edu.cn

experiment was divided into two groups; the negative control group was transfected by negative control virus, and the experiment group was transfected by eEF2K-shRNA low expression vector. After the stably transfected cell lines were successfully constructed, the proliferation and migration of glioma U87 cells were detected by CCK-8 cell proliferation test and cell scratch test. **Results** Compared with normal astrocytes, the protein expression of eEF2K in glioma cells significantly increased ($P < 0.001$), and the mRNA expression level increased ($P < 0.01$). Compared with the negative control group, the down-regulation of eEF2K could inhibit the proliferation ($P < 0.001$) and migration ($P < 0.01$) of glioma cells. **Conclusion** eEF2K is highly expressed in glioma cells. And down-regulation of the expression of eEF2K can inhibit the proliferation and migration ability of glioma U87 cells.

Key words: eEF2K; glioma; cell proliferation; cell migration

胶质瘤(glioblastoma, GBM)是中枢神经系统最常见的肿瘤之一,发病率约为 45%,占脑癌相关死亡的大部分^[1],具有发病率高、复发率高、死亡率高以及治愈率低的特点^[2]。由于胶质瘤和正常脑组织并无特别显著的界限,手术很难完全切除。临床上治疗胶质瘤以替莫唑胺作为基础的化疗药物,由于相较于其他癌种,胶质瘤对放疗、化疗不敏感,容易复发,现有的治疗方法只能适度延长患者的生存期^[3]。因此,探究脑胶质瘤发生及发展的分子机制、寻找新的生物治疗靶点,对于提高胶质瘤患者的生存率和改善预后具有十分重要的意义^[4]。真核延伸因子 2 激酶(eukaryotic elongation factor 2 kinase, eEF2K)是 α 激酶家族的非典型成员,它能够负向调节蛋白质合成的延伸步骤^[5]。在缺氧和代谢窘迫等压力条件下, eEF2K 能够减缓蛋白质合成,帮助细胞节省能量,从而促进细胞增殖导致肿瘤生长和进展^[6]。近年来国内外的许多学者在研究中发现 eEF2K 与肿瘤的发病机制关系密切,并且在多种实体瘤中高表达,包括胰腺癌、乳腺癌、食管癌、肺癌和脑肿瘤^[7-10],并且高水平的 eEF2K 表达与浸润性肿瘤和转移性肿瘤相关,同时 eEF2K 在肿瘤细胞的生存和迁移的进展中也发挥着重要的作用^[11],抑制 eEF2K 可诱导多种癌症类型的细胞死亡。此外,在癫痫患者中 eEF2K 还可以通过调节突触可触性来影响患者的学习和记忆能力,这种改变主要体现在突触可塑性的活性、形态及从头蛋白的合成^[12]。然而,当前 eEF2K 在胶质瘤细胞中的生物学作用研究尚少,本研究旨在探讨胶质瘤细胞中 eEF2K 的表达,观察分析下调 eEF2K 的表达对胶质瘤 U87 细胞增殖和迁移能力的影响,为癌症治疗提供一个新的靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂及抗体 胎牛血清购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司, MEM 培养基购自武汉博士德生物工程有限公司, 胶质细胞培养基购自上海盈湾生物科

技有限公司。eEF2K、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司, 10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司, PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 荧光定量 PCR 试剂盒购自上海普洛麦格生物产品有限公司, CCK-8 试剂盒购自美国 MCE 公司, 上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建 eEF2K 低表达慢病毒载体。

1.2 细胞培养 胶质瘤细胞 U87 细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 正常星形胶质细胞 HA1800 购自上海盈湾生物科技有限公司, 常规方法复苏细胞后用含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基和胶质细胞培养基分别重悬 U87 及 HA1800 细胞至培养瓶中, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁繁殖至 80%~90% 时用 0.25% 的胰酶进行消化传代。

1.3 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 eEF2K 蛋白的表达 收集对数生长期的 U87 及 HA1800 细胞, 用 PBS 清洗两次后加入裂解液, 并置于冰上进行裂解半小时。上样至 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 每个加样孔加入 30 μ g/30 μ L 的蛋白样品, 上样后上层胶电泳 80 v, 下层胶电泳 120 v, 使用恒压 100 v 进行转膜并依据蛋白分子量大小设置不同的转膜时间。转膜结束后将硝酸纤维素膜置于 5% 的脱脂牛奶中室温孵育 1 h, 一抗稀释比例: eEF2K (1 : 1000)、GAPDH (1 : 1000), 将封闭后的硝酸纤维素膜置于一抗中 4 °C 过夜孵育。配置二抗, 并在室温孵育 2 h。ECL 显影, A 液和 B 液按 1 : 1 的比例配置, 滴加至膜上进行曝光显影, 以 GAPDH 为内参。

1.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) Total RNA 试剂盒(上海普洛麦格生物产品有限公司)提取总 RNA, 反转录为 cDNA。并配置反应体系, 进行定量 PCR 反应。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析 eEF2K 的相对表达水平。引物序列, 见表 1。

表 1 引物序列

| 基因名称 | 上游引物 | 下游引物 |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| eEF2K | 'AGAGGTCATTGGGTCTGGTAAGGTC' | 'GAGGTTGTAGTGAGCCGAGATTGTG' |
| ACTIN | 'TCTCCAAGTCCACACAGG' | 'GGCACGAAGGCTCATCA' |

1.5 细胞转染 将 U87 细胞置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。实验分为两组:将阴性对照空病毒载体和 eEF2K-shRNA 低表达载体转染至 U87 细胞,作为阴性对照组和 eEF2K 低表达组。并将 U87 细胞悬液调整为 5×10⁴/mL 的浓度以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,待细胞融合至 40%~50%时,更换培养基,每孔 1 mL,并添加 50 μL 滴度为 5×10⁷ TU/mL 的病毒悬液进行转染,将两组细胞放入培养箱中继续培养,16 h 后更换新鲜培养基,24 h 镜下可见绿色荧光,72 h 荧光丰度最高。使用荧光显微镜观察慢病毒转染的效率,然后用嘌呤霉素进行稳转细胞株的筛选,以开展后续相关实验。

1.6 CCK-8 细胞增殖实验 收集对数生长期的阴性对照组和实验组细胞,以 10 000 个/孔接种于 96 孔板每孔 100 μL,设置 5 个复孔,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中分别培养 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,避免在孔中产生气泡,避光孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度值,并绘制 U87 细胞的生长曲线。

1.7 细胞划痕实验 收集对数生长期的阴性对照组和实验组细胞,使用无血清的 MEM 培养基调整细胞浓度为 1×10⁶/mL 的细胞悬液,每孔 2 mL 加入 6 孔板中,待细胞贴壁长满后使用 10 μL 枪头于 6 孔板底部垂直划痕,每次使用倒置显微镜观察及拍照前用无菌 PBS 清洗 2 次,以洗去不贴壁的细胞,然后更换新鲜的无血清培养基,将 6 孔板放入 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,然后在适当的时间点 0 h、48 h 测量划痕的宽度并拍照。

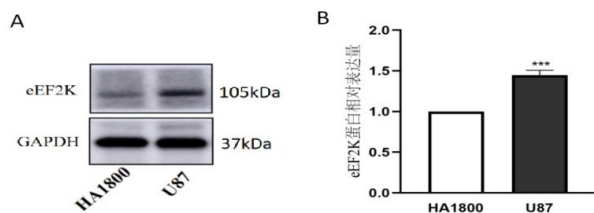
1.8 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析,图片制作采用 Graphpad 8.0 版本。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 eEF2K 在各细胞中蛋白相对表达情况 通过 Western blot 法在正常星形胶质细胞 HA1800 及胶质瘤细胞 U87 中检测 eEF2K 的表达水平,结果发现与 HA1800 相比,eEF2K 的表达量在 U87 中呈高表达,且差异具有统计学意义($P < 0.001$),如图 1 所示。

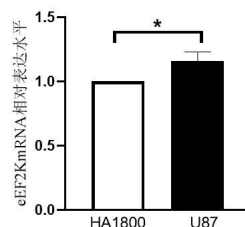
2.2 eEF2K 的 mRNA 表达结果 通过实时荧光定量 PCR 检测 eEF2K 的表达情况,与正常星形胶质细胞相比胶质瘤细胞中 eEF2K 的 mRNA 表达水平有所

升高($P < 0.01$),如图 2 所示。



注:与 HA1800 相比,*** $P < 0.001$ 。

图 1 Western blot 法检测 HA1800、U87 细胞中 eEF2K 蛋白的表达



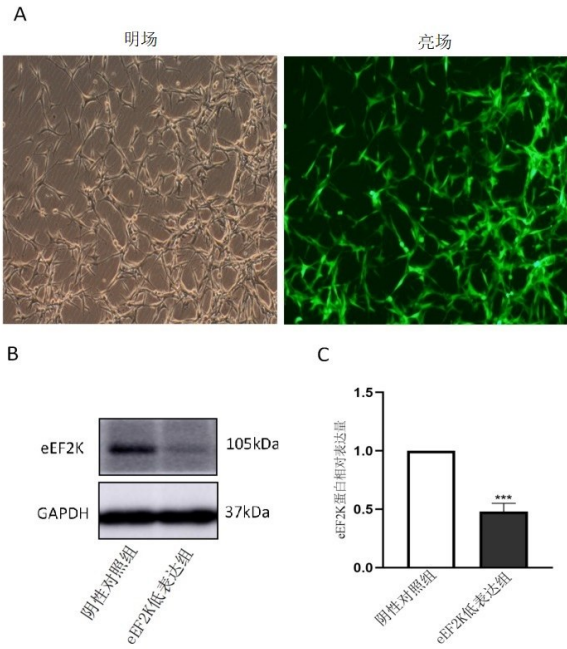
注:与 HA1800 相比,* $P < 0.01$ 。

图 2 RT-qPCR 检测 HA1800、U87 细胞中 eEF2K mRNA 相对表达水平

2.3 构建敲低 eEF2K 的胶质瘤 U87 稳转细胞株 待 U87 细胞融合至 40%~50%时,使用慢病毒进行转染,感染条件为 MOI=50,转染 24 h 后可见绿色荧光,培养至 72 h 时荧光强度达到最高。通过 Western blot 法检测慢病毒转染后各组 eEF2K 的表达情况,结果显示:与阴性对照组相比,eEF2K 低表达组中的 eEF2K 蛋白表达量下降,灰度分析显示具有统计学意义($P < 0.001$),表明 eEF2K-shRNA 低表达载体成功抑制胶质瘤细胞中 eEF2K 的蛋白表达水平,如图 3 所示。

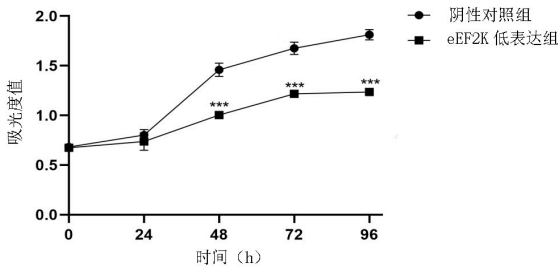
2.4 下调 eEF2K 的表达对胶质瘤细胞增殖能力的影响 CCK-8 细胞增殖实验结果显示与阴性对照组相比转染 eEF2K-shRNA 低表达载体的 eEF2K 低表达组从 48 h 之后胶质瘤 U87 细胞的增殖能力均显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.001$),提示敲低 eEF2K 可明显抑制胶质瘤细胞的增殖能力,如图 4 所示。

2.5 下调 eEF2K 的表达对胶质瘤细胞迁移能力的影响 通过划痕实验检测阴性对照组和 eEF2K 低表达组细胞的迁移能力。实验结果显示,48 h 后 eEF2K 低表达组的细胞迁移至空白处距离小于阴性对照组,差异显示统计学意义($P < 0.01$),如图 5A、5B 所示。



A: 胶质瘤 U87 细胞 (×100); B: Western blot 法检测转染后 eEF2K 的蛋白表达水平; C: 转染后 eEF2K 蛋白表达水平的统计分析, 与阴性对照组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 3 显微镜下慢病毒转染成功时的细胞形态及 eEF2K 的表达情况



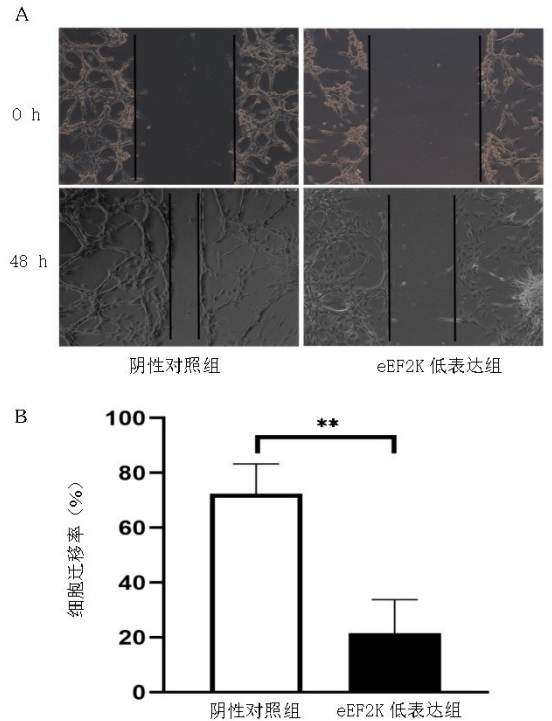
注: 与阴性对照组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 4 CCK-8 法检测干扰后胶质瘤 U87 细胞的增殖能力

3 讨论

胶质瘤是最恶性和最具侵袭性的脑肿瘤, 目前对胶质瘤的发生、发展的机制了解尚十分的有限, 因此, 寻找新的治疗靶点极其重要。eEF2K 是不同于传统蛋白激酶的非典型 α 激酶家族的新成员, 可以磷酸化和灭活 eEF2, 人类 eEF2K 含有 725 个氨基酸残基, 其催化结构域位于 N 端^[5]。eEF2K 在多种恶性肿瘤呈高表达, 并参与调节肿瘤细胞周期、增殖、自噬、凋亡、血管生成、侵袭和转移等过程^[13], 从而促进肿瘤发生发展的进程。

在前期的研究中发现 eEF2K 在胶质瘤细胞的表达明显高于正常星形胶质细胞, 因此, 本研究通过利用 shRNA 沉默胶质瘤细胞中 eEF2K 的表达, 以探究 eEF2K 与胶质瘤细胞增殖和迁移能力的关系。CCK-8



A: 胶质瘤 U87 细胞 48 h 划痕实验 (×100); B: 胶质瘤 U87 细胞 48 h 划痕结果统计学分析, 与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 低表达 eEF2K 对胶质瘤 U87 细胞迁移的影响

细胞实验结果显示从 48 h 开始抑制 eEF2K 后 U87 细胞的增殖能力明显下降; 细胞划痕实验的结果显示下调 eEF2K 的表达后和阴性对照组相比实验组细胞的迁移率明显降低, 以上实验结果均表明了沉默 eEF2K 能够抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移能力。以往的研究发现在结肠癌中的 eEF2K 的表达水平较低, 过表达 eEF2K 能够降低结肠癌细胞的活力, 并增强化疗药物奥沙利铂的抗肿瘤功效^[14]。一些学者的研究也发现穿心莲内酯 (andrographolide, AND) 通过 JAK2/STAT3 信号通路可以抑制胶质瘤细胞的生长、诱导细胞的凋亡, 也能起到一定的抗肿瘤效果^[15]。在肝癌中 eEF2K 通过 SP1/klf5 介导 VEGF 的表达, 能促进细胞中血管生长因子的合成和分泌, 并刺激 PI3K/Akt 和 STAT3 信号, 进而加速血管生成和肿瘤进展^[16], 下调 eEF2K 的表达可以抑制肿瘤细胞的增殖并促进细胞的凋亡。这些结果均和本实验结论一致, 说明了干扰 eEF2K 的表达, 能够对肿瘤细胞的恶性程度起到一定的抑制作用。此外, eEF2K 的活性也会随着肿瘤微环境的条件而改变, eEF2K 的高表达使肿瘤细胞在营养匮乏的情况下得以存活, 而 eEF2K 低表达的肿瘤细胞则被证明会死亡^[13]。eEF2K 的过表达也已被证明其能够促进多种类型肿瘤的血管生成、侵袭和转移^[9], 而 siRNA 介导的 eEF2K 敲低则能够减缓肿瘤的生

长。近年来有研究表明,eEF2K不但可以指导临床治疗而且还可作为癌症患者的预后指标^[17]。胶质瘤是一种高度异质性的肿瘤,难以治疗,现有的靶向和单一治疗方法未能对疾病进展和患者生存产生强有力的影响。尽管关于eEF2K在肿瘤的增殖及转移等方面取得了很大的进展,但eEF2K通过何种机制参与脑胶质瘤发生的过程并不清楚,这也是未来应当解决的重要问题,此外,将eEF2K作为靶点的临床研究也是未来重要的发展方向。

综上所述,本研究结果提示eEF2K在胶质瘤细胞中表达上调,抑制eEF2K的表达可以显著抑制胶质瘤细胞的增殖能力和迁移能力,为胶质瘤的治疗提供一个新的靶点。在未来,明确eEF2K对胶质瘤影响的机制还需要进行更深入的探索。

参考文献:

- [1] LUDWIG K,KORNBLUM H I. Molecular markers in glioma[J]. *J Neuro oncol*,2017,134(3):505-512.
- [2] XU S C,TANG L,LI X Z,et al. Immunotherapy for glioma:current management and future application[J]. *Cancer Let*,2020,476:1-12.
- [3] WAGLE N,NGUYEN M,CARRILLO J,et al. Characterization of molecular pathways for targeting therapy in glioblastoma[J]. *Chin Clin Oncol*,2020,9(6):77.
- [4] PENG Z X,LIU C H,WU M H. New insights into long noncoding RNAs and their roles in glioma[J]. *Mol Cancer*,2018,17(1):61.
- [5] WANG X M,XIE J L,Proud C G. Eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K) in cancer[J]. *Cancers*,2017,9(12):162.
- [6] KARAKAS D,OZPOLAT B. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K) signaling in tumor and microenvironment as a novel molecular target[J]. *J Mol Med*,2020,98(6):775-787.
- [7] COMERT ONDER F,DYRDAGI S,SAHIN K,et al. Design, synthesis, and molecular modeling studies of novel coumarin carboxamide derivatives as eEF-2K inhibitors[J]. *J Chem Inf Model*,2020,60(3):1766-1778.
- [8] WANG R X,XU X E,HUANG L,et al. eEF2 kinase mediated autophagy as a potential therapeutic target for paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer [J]. *Ann Transl Med*,2019,7(23):783.
- [9] ZHU H C,SONG H M,CHEN G Z,et al. eEF2K promotes progression and radioresistance of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Radiother Oncol*,2017,124(3):439-447.
- [10] BIRCAN H A,GURBUZ N,PATAER A,et al. Elongation factor-2 kinase (eEF-2K) expression is associated with poor patient survival and promotes proliferation, invasion and tumor growth of lung cancer[J]. *Lung Cancer*,2018,124:31-39.
- [11] XIE J L,SHEN K K,LENCHINE R V,et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase upregulates the expression of proteins implicated in cell migration and cancer cell metastasis[J]. *Int J Cancer*,2018,142(9):1865-1877.
- [12] 岑丽兰,杨茜. eEF2K在癫痫突触可塑性的研究进展[J]. *右江民族医学院学报*,2022,44(1):99-103.
- [13] ZHANG B,ZOU J M,ZHANG Q T,et al. Progress in the development of eukaryotic elongation factor 2 kinase (eef2k) natural product and synthetic small molecule inhibitors for cancer chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(5):2408.
- [14] ZHOU Y,LI Y,XU S,et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt and STAT3[J]. *Int J Cancer*,2020,146(5):1383-1395.
- [15] 黄桔,李晓文,蒋艳平,等. 穿心莲内酯对人胶质瘤细胞U87-MG的生长抑制及凋亡诱导作用的研究[J]. *右江民族医学院学报*,2020,42(6):685-689,697.
- [16] NG T H,SHAM K W Y,XIE C M,et al. Eukaryotic elongation factor-2 kinase expression is an independent prognostic factor in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*,2019,19(1):649.
- [17] JIANG M X,QI L,JIN K X,et al. eEF2K as a novel metastatic and prognostic biomarker in gastric cancer patients[J]. *Path Res Pract*,2021,225:153568.

收稿日期:2022-06-13;修回日期:2022-06-20