

文章编号: 1000-5862(2017)02-0150-05

# 钾通道阻断剂对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响

李卫玲 李超英 茹 琴\*

(江汉大学武汉生物医学研究院 湖北 武汉 430056)

**摘要:** 为了检测电压门控钾通道阻断剂 4-氨基吡啶(4-AP)、四乙胺(TEA)和 ATP 敏感钾通道阻断剂格列本脲(Glibenclamide, Gli)对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响, 选用人胶质瘤细胞系 U87 和 U251, 其中钾通道阻断剂 4-AP、TEA 及 Gli 处理作为实验组, 未处理的作为对照组。采用划痕实验和 Transwell 小室法检测钾通道阻断剂对 U87 和 U251 细胞迁移和侵袭能力的影响; Western blot 检测药物处理后细胞高迁移率蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)表达水平。结果表明: 5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 4-AP、40 mmol · L<sup>-1</sup> 的 TEA 及 400 μmol · L<sup>-1</sup> 的 Gli 可以显著抑制胶质瘤细胞的迁移、侵袭, 并降低 HMGB1 表达水平。电压门控钾通道和 ATP 敏感钾通道对胶质瘤细胞迁移和侵袭具有重要调控作用, 3 种钾通道阻断剂对胶质瘤细胞迁移和侵袭有不同程度的抑制作用, 可能通过调控 HMGB1 相关通路实现。

**关键词:** 钾通道; 神经胶质瘤; 迁移; 侵袭; 阻断剂

**中图分类号:** Q 25; R 739.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.02.08

## 0 引言

神经胶质瘤是来源于神经上皮的恶性肿瘤, 占颅内肿瘤的 40% ~ 50%, 具有高发病率、高复发率、高死亡率和低治愈率的特点<sup>[1]</sup>, 由于胶质瘤细胞呈浸润性生长, 目前的手术方式无法完全切除肿瘤, 手术后仍需要辅助化疗<sup>[2-3]</sup>。由于血脑屏障、肿瘤组织内及水肿脑组织间隙静水压较高等因素导致肿瘤内化疗药物的有效浓度较低, 残余病灶的复发率达到 100%<sup>[4]</sup>。因此, 寻求新的治疗方法仍是胶质瘤治疗过程中亟待解决的难题。

钾通道是种类最多、分布最广的离子通道之一, 在许多疾病的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。近年来研究发现, 神经系统、消化系统等多种肿瘤细胞较相同组织来源的正常细胞过度表达不同类型的钾通道, 或存在钾通道的异常开放, 对肿瘤细胞增殖或凋亡的调控起重要作用<sup>[6]</sup>, 已有学者将恶性肿瘤划归到“钾通道病”的范畴, 并将其列为恶性肿瘤非常有前景的诊疗靶点<sup>[7]</sup>。目前发现在胶质瘤中表达量显著上调的钾通道主要有电压敏感型钾通道(Kv)、Ca<sup>2+</sup> 激活型钾通道(KCa)和 ATP 敏感型钾通道(KATP), 且与胶质瘤的恶性程度高度相关, 钾通道阻断剂如 Kv 通道阻断剂 4-氨基吡啶(4-Aminopyridine, 4-AP)、KATP 通道阻断剂 tolbutamide 等可显

著抑制胶质瘤生长<sup>[8-11]</sup>。由此可见, 钾通道在胶质瘤的发生发展过程中发挥着重要作用。

钾离子通道蛋白作为一种细胞膜蛋白, 广泛存在于各种肿瘤细胞膜表面, 参与细胞外信号向细胞内传导, 一些钾通道如 Kv1.3、Kca1.1/3.1 及 Kir4.2 与胶质瘤迁移和侵袭相关<sup>[12-16]</sup>。钾离子通道与细胞迁移的机制目前尚未明确, 目前认为钾通道开放间接引起细胞内钙离子浓度增加从而促进细胞运动相关的蛋白的活性, 增加细胞迁移。另外一种解释认为, 钾通道介导钾离子的外流, 能增加细胞外的局部钾离子浓度, 而激活局部细胞膜的各种通道, 促进细胞局部体积的变化, 从而引起细胞的迁移。

此前本课题组对钾通道在胶质瘤细胞 U87 增殖、细胞周期和细胞凋亡的作用进行了研究<sup>[17]</sup>, 而钾通道对胶质瘤细胞迁移和侵袭鲜见文献报道。本文通过电压门控钾通道阻断剂 4-AP、四乙胺(Tetraethylammonium, TEA)及 ATP 敏感钾通道阻断剂格列本脲(Glibenclamide, Gli)处理胶质瘤细胞 U87 和 U251, 研究钾通道对胶质瘤细胞的迁移、侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及试剂

人胶质瘤细胞 U87 和 U251 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; 4-氨基吡啶、四乙胺和

收稿日期: 2016-11-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81302203)资助项目。

通信作者: 茹 琴(1984-), 女, 河南三门峡人, 副研究员, 博士, 主要从事恶性肿瘤发病机制及小分子靶向抗肿瘤药物的研发。E-mail: ruq.whibs@aliyun.com

格列苯脲购自 Sigma 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; Transwell 小室购自 Corning 公司; RIPA 裂解液、cocktail、PMSF、BCA 蛋白定量试剂盒购自博士德; anti-HMGB1 抗体购自 Abcam 公司; 山羊抗小鼠 IgG、anti- $\beta$ -actin 购自 Cell Signaling 公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和加药 人恶性胶质瘤 U251 和 U87 细胞系培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(完全培养基)中,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>、70% 湿度。将生长状态良好的细胞接种到 6 孔板中,培养至细胞融合度为 90% 左右,实验分空白对照组、加药组,其中加药组分别是 4-氨基吡啶(2.5、5.0 mmol·L<sup>-1</sup>)、四乙胺(20、40 mmol·L<sup>-1</sup>)和格列苯脲(200、400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),空白对照组只加入完全培养基。

1.2.2 细胞划痕实验 加药处理 48 h 的细胞用 200  $\mu$ L 枪头顶端垂直于 6 孔板底部划痕。用 PBS 洗 3 次去除划下的细胞后换无血清培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub>、70% 湿度温箱中培养。随机取 10 个固定点分别在划痕后 0 和 24 h 时于倒置光学显微镜下拍照(放大 100 倍)记录。利用 Image J 软件测量划痕区域宽度,并计算细胞迁移能力  $R$ ,即 0 和 24 h 划痕两侧边缘之间的距离差。

1.2.3 Transwell 细胞迁移和侵袭实验 1) 取加药处理 48 h 的胶质瘤细胞用于迁移实验,每组设 3 个复孔,上室每孔加入 100  $\mu$ L 无血清细胞悬液,总计约  $1 \times 10^5$  个细胞;下室每孔中加入 600  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,取出小室,移去上室中的培养液,以棉签擦去膜上层未穿过的细胞,4% 甲醛溶液固定 15 min,0.1% 结晶紫染色,PBS 冲洗后在倒置显微镜下观察迁移到膜下的细胞,并以 30% 醋酸洗脱小室,酶标仪检测 590 nm 吸光度。2) 取加药处理 48 h 的胶质瘤细胞用于侵袭实验,Matrigel 胶在 4℃ 冰箱内融化后,用无血清按 1:5 进行稀释,取 100  $\mu$ L 均匀平铺于预冷的 24 孔 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上,37℃ 预置 30 min 聚合成凝胶备用。每组设 3 个复孔,上室每孔加入 150  $\mu$ L 无血清细胞悬液,总计约  $2 \times 10^5$  个细胞;下室每孔中加入 600  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的培养基,培养 24 h,结晶紫染色后照相并洗脱测吸光度。

1.2.4 总蛋白的提取 加药处理 48 h,用预冷的  $1 \times$  PBS(pH 值为 7.4)洗涤 1 次,悬浮收获至离心管中,加入 200  $\mu$ L 细胞裂解液冰浴裂解 30 min,4℃,

12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃沉淀,收上清即细胞裂解液。用 BCA 法进行蛋白定量,加入 5  $\times$  SDS 上样缓冲液混合后,100℃ 煮沸 5 min,缓慢冷却后分装并在 -20℃ 冰箱中保存。

1.2.5 Western blot 检测胶质瘤细胞 HMGB1 蛋白的表达 取 30  $\mu$ g 细胞总蛋白上样,12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,半干转至 PVDF 膜。用 0.05 g·mL<sup>-1</sup> 脱脂奶粉封闭 2 h,加入小鼠抗人 HMGB1 蛋白一抗(1:500)4℃ 过夜,加入山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:5 000)孵育 1 h。采用 Gensys 成像分析系统扫描。用样本的 HMGB1 条带灰度值与该样本  $\beta$ -actin 的条带灰度值相比,求出其比值作为样本中 HMGB1 蛋白的表达水平。

## 1.3 统计学方法

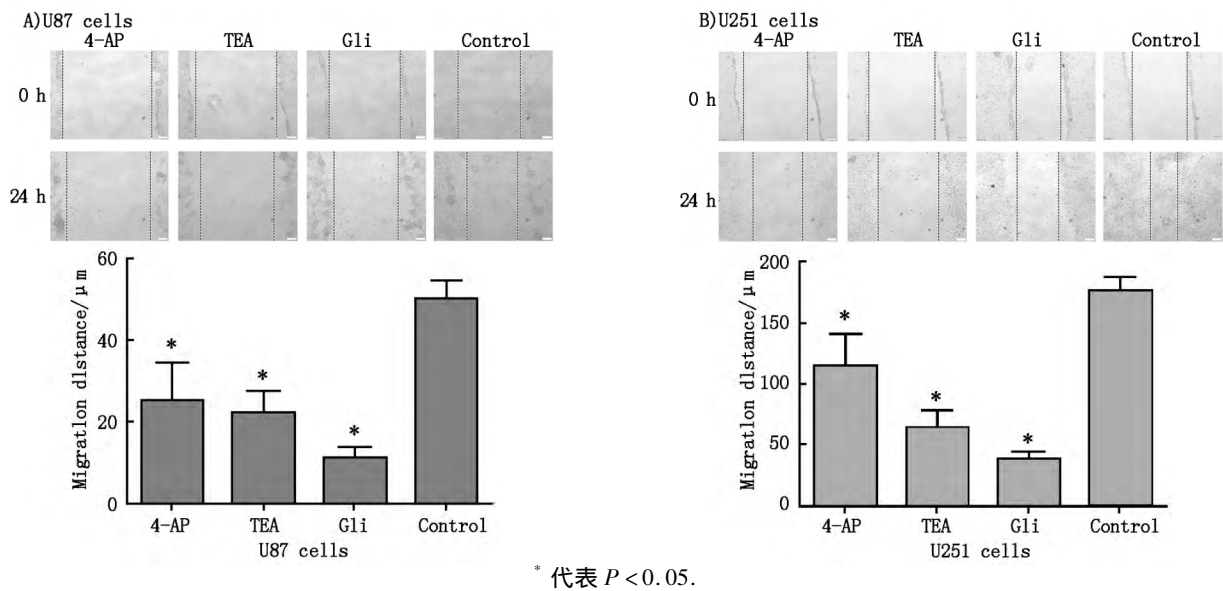
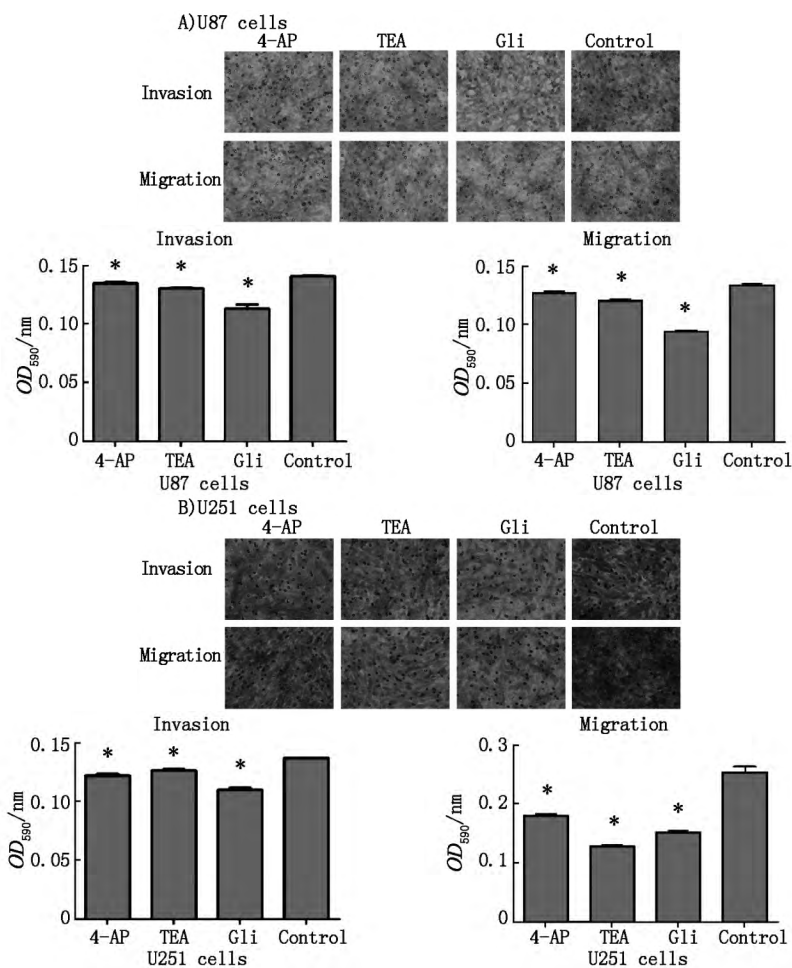
采用 SPSS 软件进行数据分析。计量资料采用均数  $\pm$  标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同组别细胞迁移、侵袭能力的比较

划痕实验后分别于 0 和 24 h 时在倒置光学显微镜下观察划痕宽度,结果如图 1 所示。U87 细胞加药的 4-AP 5 mmol·L<sup>-1</sup> 组、TEA 40 mmol·L<sup>-1</sup> 组和 Gli 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 组在 24 h 内迁移距离分别为 24.0、21.5 和 10.5  $\mu$ m,与正常组 48.0  $\mu$ m 相比差异有显著性( $F = 6.983$ ;  $P < 0.05$ ); U251 细胞加药组 4-AP、TEA 和 Gli 在 24 h 内迁移距离分别为 94.0、61.5 和 38.5  $\mu$ m,与正常组 159.0  $\mu$ m 相比差异有显著性( $F = 25.236$ ;  $P < 0.05$ )。另外 4-AP 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 组、TEA 20 mmol·L<sup>-1</sup> 组及 Gli 200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 组划痕结果与正常组相比差异无统计学意义。

采用 Transwell 小室法检测钾通道阻断剂对 U87 和 U251 细胞侵袭和迁移能力的影响,结果如图 2 所示,U87 加药的 4-AP 5 mmol·L<sup>-1</sup> 组、TEA 40 mmol·L<sup>-1</sup> 组和 Gli 400  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 组侵袭至 Transwell 小室经 30% 乙酸处理后吸光度与正常组相比差异有显著性( $F = 33$ ;  $P < 0.05$ ); 迁移结果与正常组相比也有显著性差异( $F = 141.614$ ;  $P < 0.05$ )。U251 加药组 4-AP、TEA 和 Gli 侵袭和迁移结果与正常组比差异显著( $F = 34.838$ ;  $F = 203.759$ ;  $P < 0.05$ )。由此可知,钾通道阻断剂在合适浓度下能显著抑制 U87 和 U251 细胞的侵袭和迁移。

图1 划痕实验检测阻断剂对 U87 和 U251 细胞迁移的影响( $\times 100$ )图2 Transwell 小室法检测钾通道阻断剂对 U87 和 U251 细胞侵袭和迁移的影响( $\times 200$ )

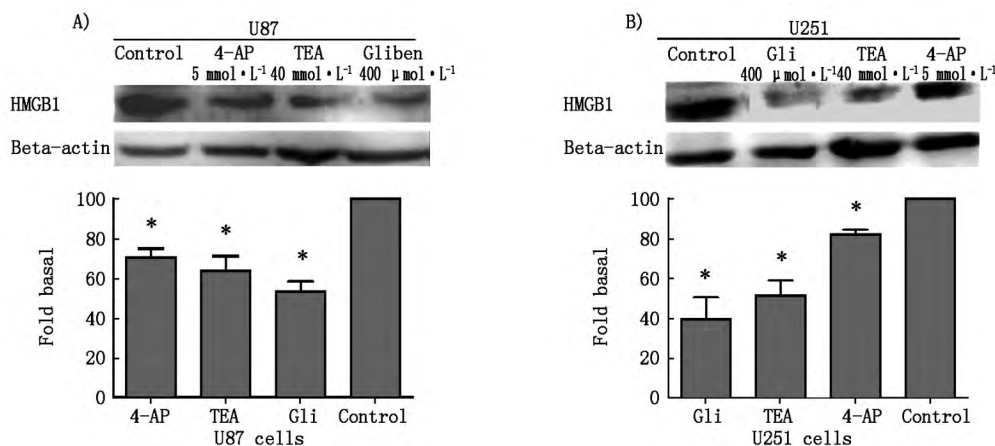
## 2.2 Western blot 结果

蛋白质印迹法结果显示,在 U87 和 U251 细胞中, HMGB1 蛋白表达量较高,而钾通道阻断剂各处

理组 HMGB1 表达量降低,根据条带灰度值归一化法,与正常组 U87 细胞相比,加药的 4-AP  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、TEA  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  组和 Gli  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组 HMGB1 表达量分别是 82%、51% 和 39%, 经过统计学分析有显著差异 ( $F = 17.160$ ;  $P < 0.05$ ). 与正常组 U251 细胞相比, 加药组 4-AP、TEA 和 Gli 的

HMGB1 表达量分别是 70%、64% 和 53%, 钾通道阻断剂组显著抑制 HMGB1 表达 ( $F = 14.811$ ;  $P < 0.05$ ).



\* 代表  $P < 0.05$ .

图3 Western blot 检测钾通道阻断剂对 U87 和 U251 细胞 HMGB1 蛋白的影响

### 3 讨论

离子通道作为药物治疗靶点已广泛应用于临床. 如钾通道阻断剂多非利特是 III 类抗心律失常药物、优降糖(格列本脲)是口服降糖药; 钙通道阻断剂尼莫地平是降血压药物等. 近年来文献报道, 钾通道参与肿瘤细胞的增殖、分化及肿瘤发生等过程, 钾通道作为潜在化疗药物靶点越来越受到重视.

本实验通过划痕法检测了钾通道阻断剂 4-AP、TEA 和 Gli 对胶质瘤细胞迁移的影响, Transwell 法检测其对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响. 相关分析显示钾通道阻断剂有显著的抑制作用. E. Lastraioli 等<sup>[18]</sup>发现, 电压门控钾通道 HERG1 在多种结肠癌细胞系中有表达, 并且与结肠癌的侵袭能力相关. Zhou Qing 等<sup>[19]</sup>电压门控钾通道抑制剂 4-AP 可以抑制肝癌细胞的增殖及黏附. 以上结果均说明钾通道在肿瘤细胞迁移和侵袭中起重要作用.

肿瘤细胞高度侵袭是胶质瘤高死亡率的主要原因. 肿瘤的侵袭转移是多基因、多步骤相互作用的过程. 细胞迁移的动态过程持续存在于肿瘤侵袭转移的始终. HMGB1 是一种非组蛋白染色体结合蛋白, 广泛分布于心、肝、肺、淋巴、脾、肾和脑等组织. 有文献报道, HMGB1 在胶质瘤组织中恶性程度升高而表达增强, 并在胶质瘤的恶化及浸润生长过程中起着重要作用<sup>[20]</sup>. HMGB1 也可与其受体 RAGE 结合, 引起表达上调. 细胞外基质的降解, 肿瘤发生浸润和转移, 导致肿瘤的发展<sup>[21]</sup>. 通过 Western blot 结果可知, 钾通道阻断剂能显著下调 HMGB1 水平, 钾通道

可能通过调控 HMGB1 表达参与细胞迁移.

目前, 对胶质瘤的迁移研究中主要有电压门控钾通道和  $Ca^{2+}$  激活钾通道, 而 ATP 敏感钾通道鲜见文献报道. 本研究发现电压门控钾通道阻断剂 4-AP、TEA 及 ATP 敏感钾通道阻断剂 Gli 能显著抑制胶质瘤细胞的体外迁移和侵袭现象, 可能通过下调 HMGB1 蛋白水平实现. 进一步说明钾通道在胶质瘤迁移和侵袭中起重要作用, 为钾通道阻断剂药物在胶质瘤转移防治中应用提供基础.

### 4 参考文献

- [1] Holland E C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models [J]. Nat Rev Genet 2001 2: 120-129.
- [2] Maher E A, Furnari F B, Bachoo R M, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter [J]. Genes Dev 2001 15: 1311-1333.
- [3] Ru Qing, Shang Boyang, Miao Qinfang, et al. A cell penetrating peptide-integrated and enediynes-energized fusion protein shows potent antitumor activity [J]. Eur J Pharm Sci 2012 47: 781-789.
- [4] Van Meir E G, Hadjipanayis C G, Norden A D, et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma [J]. CA Cancer J Clin 2010 60: 166-193.
- [5] Zhorov B S. Interactions of drugs and toxins with permeant ions in potassium, sodium, and calcium channels [J]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 2011 97: 661-677.
- [6] Becchetti A. Ion channels and transporters in cancer [J]. Am J Physiol Cell Physiol 2011 301: C255-C265.

- [7] Stuhmer W ,Alves F ,Hartung F ,et al. Potassium channels as tumour markers [J]. *FEBS Lett* ,2006 ,580: 2850–2852.
- [8] Asanuma M ,Abdullaev I F ,Rudkouskaya A ,et al. Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation [J]. *Plos One* 2010 5: e12304.
- [9] Huang Liang ,Li Boxing ,Li Wenjun ,et al. ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity [J]. *Carcinogenesis* ,2009 ,30: 737-744.
- [10] Masi A ,Becchetti A ,Restano-Cassulini R ,et al. hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines [J]. *Br J Cancer* 2005 93: 781-792.
- [11] Weaver A K ,Bomben V C ,Sontheimer H. Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells [J]. *Glia* 2006 54: 223-233.
- [12] Cherubini A ,Hofmann G ,Pillozzi S ,et al. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling [J]. *Mol Biol Cell* 2005 16( 6) : 2972-2983.
- [13] Kraft R ,Krause P ,Jung S ,et al. BK channel openers inhibit migration of human glioma cells [J]. *Pflugers Arch* , 2003 446( 2) : 248-255.
- [14] Catacuzzeno L ,Aiello F ,Fioretti B ,et al. Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration [J]. *J Cell Physiol* 2011 226( 7) : 1926-1933.
- [15] D'Alessandro G ,Catalano M ,Sciaccaluga M ,et al. KCa3. 1 channels are involved in the infiltrative behavior of glioblastoma in vivo [J]. *Cell Death Dis* 2013 4: e773.
- [16] Veeravalli K K ,Ponnala S ,Chetty C ,et al. Integrin  $\alpha 9 \beta 1$ -mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4. 2 potassium channel pathway [J]. *Cell Signal* , 2012 24( 1) : 272-281.
- [17] Ru Qin ,Tian Xiang ,Wu Yuxiang ,et al. Voltage-gated and ATP-sensitive  $K^+$  channels are associated with cell proliferation and tumorigenesis of human glioma [J]. *Oncol Rep* 2014 31( 2) : 842-848.
- [18] Lastraioli E ,Guasti L ,Crociani O ,et al. hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells [J]. *Cancer Research* 2004 64( 2) : 606-611.
- [19] Zhou Qing ,Kwan H Y ,Chan H C ,et al. Blockage of voltage-gated  $K^+$  channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells [J]. *Int J Mol Med* ,2003 ,11( 2) : 261-266.
- [20] Kostova N ,Zlateva S ,Ugrinova I ,et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors [J]. *Mol Cell Biochem* ,2010 ,337( 1/2) : 251-258.
- [21] Rauvala H ,Rouhiainen A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptor [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2010 ,1799( 1/2) : 164-170.

## Effect of Potassium Channel Blockers on Migration and Invasion of Human Glioma Cells

LI Weiling ,LI Chaoying ,RU Qin\*

( Wuhan Institutes of Biomedical Science ,Jiangnan University ,Wuhan Hubei 430056 ,China)

**Abstract:** To explore the effect of potassium channel blocker on glioma migration and invasion ,voltage-gated potassium channel blocker 4-aminopyridine ,tetraethylammonium and ATP sensitive potassium channel blocker glibenclamide were investigated. Human glioma cell lines U87 and U251 were selected to use. Wound-healing assay and Transwell assays were performed to determine the migration and invasion of glioma cells. The expression level of HMGB1 protein was detected by western blot. Cell abilities of migration and invasion were significantly reduced with 4-AP(  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) ,TEA(  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) or glibenclamide(  $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) compared with that of the control. The expression level of HMGB1 was significantly down-regulated in the blockers groups. Potassium channels play important roles in the migration and invasion of human glioma. The selective blockers of voltage-gated potassium channels or ATP-sensitive potassium channels significantly inhibited the migration and invasion of U87 and U251 cells and down-regulation of HMGB1 gene expressions might be its possible mechanism.

**Key words:** potassium channels; glioma; cell migration; invasion; blockers

( 责任编辑: 刘显亮)