论文

P4HA1调控EMT影响脑胶质瘤侵袭性研究

方胜, 张俊文, 董程远, 田毅夫, 王启俨, 刘福生, 金贵善*

首都医科大学, 北京市神经外科研究所, 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100070

* 联系人, E-mail: guishanjin7@163.com

收稿日期: 2020-01-11; 接受日期: 2020-03-09; 网络版发表日期: 2020-04-03

国家自然科学基金(批准号: 81772671, 81672478)资助

摘要 脯氨酰4-羟化酶亚基 $\alpha 1$ (prolyl 4-hydroxylase subunit $\alpha 1$, P4HA1)是脯氨酰4-羟化酶的限速亚基, 为合成各种类型胶原所必需. 有报道显示其在乳腺癌、前列腺癌等肿瘤中具有促进肿瘤细胞侵袭和转移的能力, 但机制尚不明. 本课题组在前期研究中发现, 低氧环境可诱导胶质瘤细胞中P4HA1表达上调, 敲低P4HA1可抑制胶质瘤干细胞的内皮细胞转分化, 从而破坏胶质瘤中血管形成. 本研究进一步探讨了P4HA1促进胶质瘤细胞侵袭性进展机制, 并发现P4HA1在胶质瘤细胞中与HIF1 α 的表达呈密切正相关, 其表达上调可促进上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 这一过程可能与其抑制E-钙黏蛋白、升高N-钙黏蛋白和波形蛋白表达密切相关, 而上述蛋白表达变化有可能是由于P4HA1上调了SNAI1和SNAI2的表达所导致. 同时, P4HA1还可促进人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMECs)的迁移和管腔形成, 推测P4HA1也有可能通过这一途径参与了胶质瘤的血管生成. 由此本文推论, P4HA1的表达有可能受HIF1 α 调控, 其表达升高有可能通过上调SNAI1和SNAI2诱导的EMT和通过诱导HBMECs的血管生成从而促进胶质瘤的侵袭性生长.

关键词 胶质瘤, 肿瘤侵袭, 上皮间质转化, P4HA1, HIF1 α

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 约占颅内肿瘤的45%, 其中70%为高级别胶质瘤(WHO病理分级III级和IV级), 生存期短, 中位生存期仅为12~15个月^[1]. 高度的异质性和侵袭性特征使其被称为“最富有挑战性的颅内肿瘤”, 探索其侵袭性进展机制具有重要意义.

脯氨酰4-羟化酶亚基 $\alpha 1$ (prolyl 4-hydroxylase subunit $\alpha 1$, P4HA1)是脯氨酰4-羟化酶(P4H)的限速亚基, 而P4H通过催化脯氨酸残基形成4-羟基脯氨酸, 对胶原蛋白的翻译后修饰至关重要^[2]. P4HA1可以调节成

纤维细胞中胶原合成分泌, 从而改变细胞外基质组成成分, 起到影响肿瘤黏附、迁移等生物学行为的作用^[3]. 目前, P4HA1在肿瘤中的研究较少, 主要涉及P4HA1与肿瘤的增殖、转移和血管生成. Gilkes等人^[4]发现, 在乳腺癌中, 敲低P4HA1减少了胶原沉积, 抑制了乳腺癌细胞的生长和转移. 也有学者发现, P4HA1过表达能通过P4HA1-MMP1信号通路促进前列腺癌的迁移和转移^[5]. 在胶质瘤中, 本课题组在前期研究中发现, P4HA1可促进胶质瘤干细胞向内皮细胞的跨分化以及保持血管基底膜结构完整性, 进而促进胶质瘤的

引用格式: 方胜, 张俊文, 董程远, 等. P4HA1调控EMT影响脑胶质瘤侵袭性研究. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 446–457

Fang S, Zhang J W, Dong C Y, et al. P4HA1 regulates EMT to affect glioma invasion (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 446–457, doi: 10.1360/SSV-2020-0067

血管生成^[6]. 这些研究表明, P4HA1在肿瘤发生发展过程中发挥了重要作用.

为了进一步揭示P4HA1在胶质瘤侵袭性进展中的作用, 本研究利用中国胶质瘤基因组图谱(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)数据库及人胶质瘤组织病理标本, 分析并探讨了P4HA1与胶质瘤组织病理分级和预后以及与HIF1 α 表达的关系; 通过P4HA1对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和EMT(epithelial-mesenchymal transition)相关标志物影响的研究, 揭示了P4HA1可能通过影响EMT相关蛋白的表达促进EMT发生从而在胶质瘤的侵袭性进展中发挥作用.

1 材料与方法

1.1 材料

U-251胶质瘤细胞株购自中国医学科学院, BT-01原代胶质瘤细胞是利用手术切除的病理组织通过原代培养获得的胶质瘤细胞^[7], 人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMECs)购自美国ScienCell公司. 过表达慢病毒载体Ubi-P4HA1-SV40-Cherry-IRES-puromycin及其对照、敲低P4HA1慢病毒载体U6-AGTGCTAGTTGG-CAACAAA-Ubiquitin-Cherry-IRES-puromycin及其对照、敲低HIF1 α 慢病毒载体U6-TGTGAGTTTCG-CATCTTGAT-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin及其对照均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成. DMEM培养基、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)、胰蛋白酶和嘌呤霉素购自美国Gibco公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 山羊抗人P4HA1抗体购自美国Novus公司, 兔抗人HIF1 α 抗体、兔抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、兔抗人N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体、兔抗人波形蛋白(vimentin)抗体和兔抗人 β -actin抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 鼠抗山羊辣根过氧化物酶和山羊抗兔辣根过氧化物酶购自美国Santa Cruz公司, NP40蛋白裂解液和TRNzol试剂购自美国Sigma公司, BCA蛋白定量试剂盒购自美国Invitrogen公司, ECL化学发光底物购自美国Life Technologies公司, CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司, Transwell-24孔板和基质胶购自美国Corning公司.

1.2 生物信息学分析

CGGA数据库用于分析胶质瘤中P4HA1的差异表达. 基于胶质瘤中P4HA1的表达, 本课题组利用该数据库研究了患者的预后以及相关基因, 使用癌症基因组图谱(Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库分析了胶质瘤中P4HA1与EMT激活转录因子(EMT-activating transcription factors, EMT-TFs)的相关性.

1.3 标本组织学检查

组织标本取自首都医科大学附属北京天坛医院神经外科9例接受手术治疗的患者, 术后病理确诊为胶质瘤, 其中3例为少突胶质细胞瘤(WHO II), 3例为间变性星形细胞瘤(WHO III), 3例为胶质母细胞瘤(WHO IV). 根据Cell Signaling Technology公司提供的实验说明对组织标本进行HE(hematoxylin-eosin)染色和免疫组织化学染色检测P4HA1和HIF1 α 的表达. 使用Image-Pro Plus 6.0软件分析染色结果.

1.4 细胞培养

U-251胶质瘤细胞和BT-01原代胶质瘤细胞在常氧条件下用含有10%胎牛血清的DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温培养箱中培养. 低氧处理时, U-251和BT-01细胞以含有10%胎牛血清的DMEM培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1% O₂和94% N₂的恒温培养箱中培养. HBMECs培养在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中. 细胞用含有0.05%的胰蛋白酶液进行消化和传代. 将慢病毒转染后的U-251细胞置于含1 μ g/mL嘌呤霉素的10% FBS培养基中培养.

1.5 慢病毒转染

将处于对数期的U-251细胞消化后, 以10⁴/孔接种于24孔板中, 第2天细胞汇合度达到约35%时, 分别按复感染指数(multiplicity of infection)MOI=10加入敲低HIF1 α 慢病毒载体、MOI=5加入P4HA1过表达慢病毒载体、MOI=10加入敲低P4HA1慢病毒载体, 然后放入培养箱内培养, 10 h后更换新鲜培养基, 48 h后在荧光显微镜下观察转染的细胞, 并加入含1 μ g/mL嘌呤霉素的新鲜培养基继续培养获得稳转株.

1.6 细胞增殖实验

分别将处于对数期稳定转染P4HA1的过表达组U-251细胞、稳定下调P4HA1的敲低组U-251细胞及各自对照组细胞正常消化后,按3000个/100 μ L接种于96孔板中,每组设置4个重复,共接种5块96孔板,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养1~5天。培养箱中孵育第1, 2, 3, 4和5天时,分别取出一块96孔板,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37℃培养箱内孵育70 min,酶标仪测定450 nm处的吸光度。

1.7 细胞划痕实验

将处于对数生长期的细胞分别接种于6孔板中,待细胞汇合度达到90%左右时,用10 μ L的移液枪头垂直于孔板制造细胞划痕,尽量保证各个划痕宽度一致,吸掉旧培养基,用PBS冲洗细胞3次,去除划下的细胞后,再加入无血清培养基,放入37℃、5% CO₂培养箱中培养,按0 h和12 h取样拍照。用以下公式计算胶质瘤细胞的迁移率(MR): $MR=(x-y)/x$,其中 x 是划痕在0 h的宽度, y 是12 h的宽度。

1.8 细胞迁移和侵袭实验

分别取对数期的细胞,常规消化后计数,用无血清DMEM培养基重悬,按 5×10^4 个/200 μ L接种于Transwell小室的上层,迁移实验时Transwell小室上层不作预处理,下层加入600 μ L胶质瘤细胞无血清上清液,侵袭实验时Transwell小室上层预先包被一层基质胶,下层加入600 μ L含15% FBS的DMEM培养基,每组设置3个重复,放入37℃、5% CO₂培养箱中培养。培养一段时间后终止实验(迁移实验培养16 h,侵袭实验培养24 h),用棉签擦去Transwell小室上层细胞,下层细胞不去除,用1%结晶紫染液染色,在显微镜下观察细胞染色情况,并随机取3个视野进行计数。

1.9 管腔形成实验

基质胶以每孔50 μ L铺在96孔板中,凝固30 min,备用。取对数期的HBMECs,常规消化后计数,用无血清DMEM培养基洗涤2次,加入胶质瘤细胞的无血清上清液重悬为 4×10^4 个/100 μ L,铺于96孔板中培养12 h后,在相差显微镜下观察毛细管状结构的形成,并使用Image J软件进行分析。每个实验重复3次。

1.10 免疫印迹分析

用NP40蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒定量蛋白,行SDS-PAGE电泳,冰浴下转膜100 min,室温下脱脂牛奶封闭1 h。加入一抗山羊抗人P4HA1抗体(1:500)、兔抗人HIF1 α 抗体(1:1000)、兔抗人E-cadherin抗体(1:1000)、兔抗人N-cadherin抗体(1:1000)、兔抗人vimentin抗体(1:1000)和兔抗人 β -actin抗体(1:2000),4℃孵育过夜后,室温复温60 min。鼠抗山羊辣根过氧化物酶和山羊抗兔辣根过氧化物酶二抗(1:2000)孵育1 h,ECL化学发光试剂显影。使用Image J软件分析其灰度值。

1.11 实时荧光定量PCR

用TRNzol法提取细胞总RNA,反转录为cDNA(complementary DNA),以 β -Actin作为内参基因,加入引物于荧光PCR仪上扩增,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达水平。本研究中所使用的引物均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物序列如下:SNAI1扩增引物,正向引物:5'-TGCCCTCAAGATGCACATCCGA-3',反向引物:5'-GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC-3';SNAI2扩增引物,正向引物:5'-ATCTGCGGAAGGCGTTTTCCA-3',反向引物:5'-GAGCCCTCAGATTGACCTGTC-3';TWIST1扩增引物,正向引物:5'-GCCAGGTACATC-GACTTCCTCT-3',反向引物:5'-TCCATCCTCCAGACC-GAGAAGG-3';ZEB1扩增引物,正向引物:5'-GGCATAACCTACTCAACTACGG-3',反向引物:5'-TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC-3'; β -actin扩增引物,正向引物:5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3',反向引物:5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'。

1.12 统计分析

采用SPSS 19.0进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,两组均数比较采用 t 检验。基因表达的相关性通过Spearman相关性分析进行评估。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤中P4HA1表达水平与病理分级、HIF1 α 表达水平呈正相关

利用CGGA数据库分析了P4HA1在人脑胶质瘤中

图 1 胶质瘤中P4HA1表达水平与病理分级、HIF1 α 表达水平呈正相关。A: 利用CGGA数据库分析了P4HA1在不同级别胶质瘤组织中的表达(****, $P<0.0001$); B: 胶质瘤中P4HA1高表达预示患者预后不良; C: 使用CGGA数据库分析发现, P4HA1与HIF1A表达水平呈正相关; D: P4HA1和HIF1 α 在U-251细胞和原代胶质瘤细胞BT-01中的表达; E: 免疫组织化学染色观察9例人脑胶质瘤样本中P4HA1和HIF1 α 的表达情况; F: P4HA1在高级别胶质瘤中存在过表达现象(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$); G: Spearman相关性分析显示, 在上述9例胶质瘤中, P4HA1表达水平与HIF1A水平呈正相关($n=9$, $r=0.819$, $P<0.01$)

Figure 1 P4HA1 expression is positively correlated with the degree of malignancy and HIF1 α expression in gliomas. A: Analysis of P4HA1 expression in different grade glioma tissues in the CGGA database(****, $P<0.0001$); B: high expression of P4HA1 in gliomas suggests poor prognosis; C: analysis in the CGGA database found that P4HA1 and HIF1A expression were positively correlated; D: expression of P4HA1 and HIF1 α in U-251 cells and primary glioma cells BT-01; E: immunohistochemical staining to evaluate the expression of P4HA1 and HIF1 α in 9 human glioma samples; F: P4HA1 was overexpressed in high-grade gliomas (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$); G: Spearman correlation analysis showed that P4HA1 expression levels were positively correlated with HIF1A levels in the above 9 glioma samples ($n=9$, $r=0.819$, $P<0.01$)

的表达情况. 结果表明, P4HA1在胶质瘤中的表达量随着病理分级升高而增加(图1A). 在所有级别胶质瘤中, 生存曲线分析显示P4HA1高表达组较P4HA1低表达组预后更差(图1B), 同时相关性分析显示P4HA1表达水平与HIF1 α 表达水平呈正相关(图1C). 紧接着, 本研究随机挑选9例不同病理级别的胶质瘤标本进行免疫组织化学分析(图1E). 结果显示, 胶质瘤标本病理级别越高, P4HA1表达量越高, 并与HIF1 α 表达量呈正相关(图1F和G). 同时, 本课题组观察了原代胶质瘤细胞BT-01和U-251细胞中P4HA1和HIF1 α 的表达水平, 结果表明, 与常氧培养条件下相比, BT-01和U-251细胞经过低氧处理后, P4HA1和HIF1 α 表达均上调(图1D).

2.2 HIF1 α 对胶质瘤细胞中P4HA1的表达有调节作用

为了探究P4HA1与HIF1 α 的关系, 我们将U-251胶质瘤细胞分别置于常氧和低氧条件下培养, 通过免疫印迹检测P4HA1和HIF1 α 的表达. 结果显示, U-251细胞中P4HA1和HIF1 α 随着低氧处理时间延长而表达上调, 低氧处理48 h后达到峰值, 与常氧培养的U-251细胞相比, 差异具有统计学意义($P<0.001$), 同时P4HA1增长趋势与HIF1 α 保持一致(图2A). 在低氧条件下, 使用慢病毒干扰了胶质瘤细胞中HIF1 α 的表达, 发现P4HA1的表达也随之下调(图2B). 以上结果表明, HIF1 α 对胶质瘤细胞中P4HA1的表达有调节作用.

图2 HIF1 α 对胶质瘤细胞中P4HA1的表达有调节作用. A: Western检测结果显示, 与常氧条件相比, 低氧条件下P4HA1和HIF1 α 蛋白发生显著上调, 在低氧培养48 h后, 上调效果最为显著, 同时P4HA1增长趋势与HIF1 α 保持一致(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: 用带有GFP标签的HIF1 α 敲低慢病毒转染U-251细胞并置于低氧条件下培养($\times 100$), Western检测转染后U-251细胞中蛋白表达, 与shNT组相比, shHIF1 α 组细胞中HIF1 α 和P4HA1蛋白显著下调(网络版彩图)

Figure 2 HIF1 α can regulate the expression of P4HA1 in glioma cells. A: Western Blot results showed that compared with normoxic conditions, P4HA1 and HIF1 α proteins in U-251 glioma cells were significantly up-regulated under hypoxic conditions. And P4HA1 expression increased with hypoxic treatment time and was consistent with HIF1 α expression (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: U-251 cells were infected with lentivirus labeled with GFP and cultured in hypoxia ($\times 100$), the expression of P4HA1 and HIF1 α proteins in shHIF1 α and shNT cells was assessed by immunoblot (color online)

2.3 构建P4HA1过表达/敲低的胶质瘤细胞株

为了探究P4HA1在胶质瘤进展过程中发挥的作用, 本课题组建立了P4HA1稳定过表达的胶质瘤细胞株来模拟胶质瘤组织内缺氧诱导P4HA1的表达, 同时通过敲低P4HA1慢病毒转染胶质瘤细胞下调P4HA1表达来研究P4HA1对胶质瘤细胞生物学功能的影响. 首先使用P4HA1过表达/敲低慢病毒及对照病毒分别感染U-251胶质瘤细胞, 然后加入嘌呤霉素筛选出稳转

株, 荧光显微镜下观察稳定表达Cherry蛋白的U-251细胞, 通过免疫印迹进一步验证了经P4HA1过表达/敲低慢病毒感染的实验组细胞较对照组中稳定上调/下调P4HA1蛋白的表达(图3A和B).

2.4 P4HA1表达对胶质瘤细胞增殖活性的影响

利用上述获得的稳转株, 通过CCK-8增殖实验测定了胶质瘤细胞中P4HA1表达水平对细胞增殖能力的影响. 结果表明, 与shNT对照组相比, P4HA1表达下调

图 3 建立及鉴定P4HA1过表达/敲低的胶质瘤细胞株. A: 荧光显微镜下观察P4HA1过表达的U-251细胞中Cherry蛋白的表达($\times 100$), Western检测转染后U-251细胞中P4HA1表达显著增高(***, $P < 0.001$); B: 镜下观察P4HA1敲低的U-251细胞状态($\times 100$), Western检测转染后U-251细胞中P4HA1表达明显降低(**, $P < 0.01$)(网络版彩图)

Figure 3 Establishment and identification of overexpression/knockdown of P4HA1 in glioma cells. A: Observation of Cherry protein expression in U-251 cells using a fluorescence microscope ($\times 100$), Western Blot analysis showed the overexpression efficiency of P4HA1 in U-251 cells (***, $P < 0.001$); B: observation of Cherry protein expression in U-251 cells using a fluorescence microscope ($\times 100$), Western Blot analysis showed the downregulation efficiency of P4HA1 (**, $P < 0.01$) (color online)

明显抑制了U-251细胞增殖活性(图4A), 而P4HA1过表达组较Ctrl对照组促进了U-251细胞增殖(图4B)。

2.5 P4HA1促进了胶质瘤细胞迁移、侵袭和EMT

胶质瘤细胞具有很强的侵袭性, 我们通过执行细胞划痕实验和Transwell侵袭实验评估了P4HA1对U-251细胞迁移和侵袭能力的影响。细胞划痕实验中, shP4HA1组细胞培养12 h后迁移能力比shNT组明显减弱, 而P4HA1过表达组细胞培养12 h后较Ctrl组迁移能力增强(图5A), 结果表明, 上调P4HA1可以有效促进胶质瘤细胞迁移。Transwell侵袭实验中, 与shNT组相比, shP4HA1组细胞在培养24 h后穿膜细胞数目减少, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 而P4HA1过表达组细胞在培养24 h后穿膜细胞数目比Ctrl组明显增多(图5B), 结果显示, P4HA1表达上调可以增强胶质瘤细胞侵袭能力。而EMT是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程, 本研究通过蛋白印迹检测了P4HA1过表达组、敲低组及其各自对照组U-251细胞中EMT相关蛋白的表达。与shNT组相比, shP4HA1组细胞E-cadherin表达水平升高, 而N-cadherin和vimentin表达水平降低, 而P4HA1过表达组细胞较Ctrl组E-cadherin表达升高, 而N-cadherin和vimentin表达下降, 结果表明, P4HA1参与了胶质瘤细胞EMT过程, 上调P4HA1可以促进EMT过程的发生(图5C)。

2.6 P4HA1上调了胶质瘤细胞中相关EMT-TFs的表达水平

EMT过程主要由一组核心的EMT激活转录因子

(EMT-TFs)介导。本研究通过qRT-PCR检测了P4HA1过表达组、敲低组及其各自对照组U-251细胞中相关EMT-TFs的mRNA表达水平。结果显示, P4HA1敲低后, SNAI1, SNAI2和TWIST1的mRNA相对表达量降低, P4HA1表达上调, SNAI1, SNAI2的mRNA相对表达水平升高, 其中SNAI1, SNAI2的表达水平变化明显, 而ZEB1的mRNA相对表达量变化不明显, 差异无统计学意义($P>0.05$)(图6A)。同时通过TCGA的胶质瘤数据库分析发现, P4HA1表达水平与SNAI1, SNAI2, TWIST1表达水平呈正相关, 且与SNAI1和SNAI2表达水平相关性比TWIST1更强, 而与ZEB1表达水平无相关性(图6B)。上述结果表明, P4HA1可以上调胶质瘤细胞中相关EMT-TFs的表达水平, 尤其是SNAI1, SNAI2的表达水平。

2.7 P4HA1促进了HBMECs迁移和管腔形成能力

为了评估P4HA1在胶质瘤血管生成中的作用, 我们研究了胶质瘤细胞中P4HA1对HBMECs迁移和管腔形成能力的影响。结果表明, P4HA1低表达抑制了HBMECs的迁移和管腔形成, 而P4HA1过表达促进了HBMECs的迁移和管腔形成(图7A和B)。

3 讨论

低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1 α)是一种细胞对缺氧的适应、血管生成、细胞代谢、细胞增殖等方面起重要调节作用的转录因子[8]。HIF1 α 在胶质瘤中存在过表达现象, 其表达与血管生

图4 细胞增殖实验检测P4HA1对胶质瘤细胞增殖活性的影响。A: 与空白对照组相比, P4HA1表达下调明显抑制了细胞增殖(**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: 相比于对照组, P4HA1过表达显著促进了细胞增殖(**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

Figure 4 Cell proliferation experiments were performed to detect the effect of P4HA1 on the proliferation of glioma cells. A: Downregulation of P4HA1 expression significantly inhibited glioma cell proliferation (**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: P4HA1 overexpression encouraged glioma cell proliferation (**, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

图 5 P4HA1促进了胶质瘤细胞迁移、侵袭和EMT。A: 划痕实验检测了U-251细胞的迁移能力, shP4HA1组较shNT组细胞迁移距离明显减少, P4HA1过表达组与对照组相比迁移距离明显增加($\times 100$; **, $P < 0.01$); B: Transwell侵袭实验检测了U-251细胞的侵袭能力, shP4HA1组较shNT组细胞侵袭的数目明显减少, P4HA1过表达组比Ctrl组细胞侵袭的数目明显增多($\times 200$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$); C: Western检测了EMT相关蛋白表达发现, 与各自对照组相比, shP4HA1组N-cadherin, vimentin相对表达量减少, E-cadherin表达水平升高, 而P4HA1组N-cadherin, vimentin相对表达水平升高, E-cadherin表达量降低(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)(网络版彩图)

Figure 5 P4HA1 expression promotes cell invasion, migration and EMT. A: The migration ability of glioma cells after P4HA1 knockdown/overexpression under normoxia ($\times 100$; **, $P < 0.01$); B: the invasion ability of glioma cells after P4HA1 knockdown/overexpression under normoxia ($\times 200$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$); C: immunoblot of E-cadherin, N-cadherin and vimentin in shNT and shP4HA1 glioma cells cultured under normoxia, and the expression of E-cadherin, N-cadherin and vimentin in P4HA1-overexpressing glioma cells under standard conditions was assessed by immunoblot (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) (color online)

成、肿瘤侵袭有关^[9]。本课题组在前期研究中发现, P4HA1在胶质瘤细胞缺氧时表达上调, 但与HIF1 α 关系不明确, 所以本研究进一步探究了胶质瘤中P4HA1与HIF1 α 的关系, 然后发现P4HA1在胶质瘤细胞中与HIF1 α 的表达呈密切正相关, 干扰HIF1 α 可抑制P4HA1

的表达, 由此我们推论, 在胶质瘤中P4HA1的表达可能受HIF1 α 调控。染色质免疫共沉淀分析揭示了P4HA1启动子上存在HIF1 α 结合位点^[10], 由此推测, HIF1 α 调节P4HA1表达是合理的。肿瘤细胞对缺氧的反应是一个复杂的过程, 为了更好地研究P4HA1在胶质瘤发生

图 6 胶质瘤中P4HA1与EMT-TFs的相关性分析. A: qRT-PCR检测了胶质瘤细胞中EMT-TFs的mRNA表达水平发现, 与各自对照组相比, shP4HA1组SNAI1, SNAI2和TWIST1的mRNA相对表达量降低, 而P4HA1过表达组SNAI1, SNAI2的mRNA相对表达水平升高(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: 使用TCGA数据库分析了胶质瘤中P4HA1与EMT-TFs的相关性

Figure 6 Correlation Analysis of P4HA1 and EMT-TFs in glioma cells. A: The results of qRT-PCR experiments showed that the expression of SNAI1, SNAI2 and TWIST1 decreased in glioma cells with down-regulated P4HA1 expression, while the expression of SNAI1 and SNAI2 increased in glioma cells with up-regulated P4HA1 expression (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$); B: the TCGA database was used to analyze the correlation between P4HA1 and EMT-TFs in gliomas

发展中发挥的作用, 本课题组建立了P4HA1过表达的胶质瘤细胞株, 用来模拟P4HA1在胶质瘤缺氧条件下

的表达, 通过细胞增殖实验、划痕实验和侵袭实验来评估P4HA1表达改变对胶质瘤细胞生物学功能的影

图 7 P4HA1促进了HBMECs迁移和管腔形成能力. A: 用Transwell迁移实验测定HBMECs在各组胶质瘤细胞无血清上清液中的迁移能力($\times 100$; **, $P < 0.01$); B: HBMECs经各组胶质瘤细胞无血清上清液重悬后在基质胶上的管腔形成情况($\times 100$; *, $P < 0.05$)(网络版彩图)

Figure 7 P4HA1 promoted migration and tube formation ability of HBMECs *in vitro*. A: Migration ability of HBMECs cultured in serum-free supernatant of each group of glioma cells, as measured by the transwell assay ($\times 100$; **, $P < 0.01$); B: tube formation ability of HBMECs treated with the serum-free supernatant of each group of glioma cells on matrigel ($\times 100$; *, $P < 0.05$) (color online)

响. 当P4HA1过表达时, 胶质瘤细胞的增殖活性、迁移和侵袭能力均增强. 反过来, 下调P4HA1抑制了胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭. 这些结果表明, P4HA1在胶质瘤细胞的增殖和侵袭过程中发挥了重要作用.

EMT是上皮细胞获得迁移性和侵袭性间充质表型的过程^[11]. 发生EMT时, 上皮标志物E-cadherin表达下调, 而间质标志物N-cadherin和vimentin表达上调^[12]. EMT激活转录因子EMT-TFs, 包括Snail(也称为SNAIL), Slug(也称为SNAI2), TWIST1和ZEB1, 参与了EMT的调控, 通过激活EMT诱导上皮细胞表现出间质细胞的表型^[13,14]. 胶质母细胞瘤是高度侵袭性肿瘤, 由于其向周围组织的侵袭性生长, 通常手术难以完全切除, 术后复发率高^[15]. 近年来有研究显示, 胶质母细胞瘤发生的间质性改变与其快速进展的临床表型有密切关系, 提示EMT过程可能与胶质母细胞瘤侵袭能力有紧密联系^[16]. Tso等人^[17]也发现, 在胶质母细胞瘤活检标本中有一系列与间质组织相关的基因过表达, 表明原发性胶质母细胞瘤具有间质性能和侵袭行为. 这些证据表明, EMT与胶质瘤的侵袭性生长确实存在紧密联系. Duan等人^[18]在卵巢癌研究中发现, miR-122可以通过下调卵巢癌细胞中的P4HA1抑制EMT过程. 本

课题组在胶质瘤中的研究也发现了P4HA1与EMT之间的联系. 当胶质瘤细胞中P4HA1过表达时, E-cadherin表达下调, N-cadherin和vimentin表达上调, 而胶质瘤细胞中P4HA1下调时, 结果反之. 这些证据表明, P4HA1可以调节EMT过程. 本课题组设想P4HA1与EMT之间是否通过EMT-TFs关联, 接下来检测了相关EMT-TFs的表达水平发现, P4HA1表达变化明显影响了SNAIL, SNAI2的表达, 同时TCGA胶质瘤数据库也暗示P4HA1与SNAIL, SNAI2存在相关性, 具有统计学意义. 因此, 有理由相信P4HA1上调了SNAIL, SNAI2的表达.

血管生成是胶质母细胞瘤的特征之一, 对其侵袭性生长至关重要^[19]. 胶质瘤的血管生成存在多种机制, 包括血管新生、血管共择、血管拟态和胶质瘤干细胞向内皮细胞转分化等^[20]. 本课题组在前期研究中已经发现, 敲低P4HA1可抑制胶质瘤干细胞向内皮细胞转分化, 从而破坏胶质瘤中血管形成. 本研究中课题组发现, 在胶质瘤细胞中, P4HA1过表达可诱导HBMECs的迁移和管腔形成, 干扰P4HA1表达可抑制HBMECs的迁移和管腔形成. 因此推测P4HA1可能通过多种机制影响了胶质瘤的血管生成, 进而促进胶质

瘤侵袭性生长。

本研究初步探索了P4HA1在胶质瘤侵袭性进展中的作用, P4HA1的表达有可能受HIF1 α 调控, 其表达升高有可能通过上调SNAI1和SNAI2诱导的EMT和通过

诱导HBMECs的血管生成从而促进胶质瘤的侵袭性生长。这些数据对更好理解P4HA1如何促进胶质瘤发生发展提供了实验基础。靶向抑制P4HA1可能是神经胶质瘤治疗的潜在策略。

参考文献

- 1 Wen P Y, Reardon D A. Progress in glioma diagnosis, classification and treatment. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12: 69–70
- 2 Chen L, Shen Y H, Wang X, et al. Human prolyl-4-hydroxylase α (I) transcription is mediated by upstream stimulatory factors. *J Biol Chem*, 2006, 281: 10849–10855
- 3 Gilkes D M, Bajpai S, Chaturvedi P, et al. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing *P4HA1*, *P4HA2*, and *PLOD2* expression in fibroblasts. *J Biol Chem*, 2013, 288: 10819–10829
- 4 Gilkes D M, Chaturvedi P, Bajpai S, et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2013, 73: 3285–3296
- 5 Chakravarthi B V S K, Pathi S S, Goswami M T, et al. The miR-124-prolyl hydroxylase P4HA1-MMP1 axis plays a critical role in prostate cancer progression. *Oncotarget*, 2014, 5: 6654–6669
- 6 Zhou Y, Jin G, Mi R, et al. Knockdown of P4HA1 inhibits neovascularization via targeting glioma stem cell-endothelial cell transdifferentiation and disrupting vascular basement membrane. *Oncotarget*, 2017, 8: 35877–35889
- 7 Zhang J W, Liu F S, Fang S, et al. A human glioma cell line and its establishment method and application (in Chinese). China patent ZL 2018 1 1535397.9. 2018 Aug 27 [张俊文, 刘福生, 方胜, 等. 一种人脑胶质瘤细胞系及其建立方法 and 应用. 中国, ZL 2018 1 1535397.9. 2018-8-27]
- 8 Nordgren I K, Tavassoli A. Targeting tumour angiogenesis with small molecule inhibitors of hypoxia inducible factor. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4307–4317
- 9 Zagzag D, Zhong H, Scalzitti J M, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: Association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, 2000, 88: 2606–2618
- 10 Bentovim L, Amarilio R, Zelzer E. HIF1 α is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. *Development*, 2012, 139: 4473–4483
- 11 Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139: 871–890
- 12 Nieto M A, Huang R Y J, Jackson R A, et al. EMT: 2016. *Cell*, 2016, 166: 21–45
- 13 Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 488–494
- 14 Stemmler M P, Eccles R L, Brabletz S, et al. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 102–112
- 15 Dunn G P, Rinne M L, Wykosky J, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*, 2012, 26: 756–784
- 16 Carro M S, Lim W K, Alvarez M J, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*, 2010, 463: 318–325
- 17 Tso C L, Shintaku P, Chen J, et al. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res*, 2006, 4: 607–619
- 18 Duan Y, Dong Y, Dang R, et al. MiR-122 inhibits epithelial mesenchymal transition by regulating P4HA1 in ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*, 2018, 42: 1564–1574
- 19 Furnari F B, Fenton T, Bachoo R M, et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 2007, 21: 2683–2710
- 20 Plate K H, Scholz A, Dumont D J. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol*, 2012, 124: 763–775

P4HA1 regulates EMT to affect glioma invasion

FANG Sheng, ZHANG JunWen, DONG ChengYuan, TIAN YiFu, WANG QiYan,
LIU FuSheng & JIN GuiShan

Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100070, China

Prolyl 4-hydroxylase subunit $\alpha 1$ (P4HA1) is the rate-limiting subunit of prolyl 4-hydroxylase, which is necessary for the synthesis of various types of collagen. There are reports that P4HA1 promotes tumor cell invasion and metastasis in breast cancer and prostate cancer, but the mechanism is unknown. In previous studies, we found that hypoxia can induce the expression of P4HA1 in glioma cells, and knockdown of P4HA1 can inhibit the differentiation of glioma stem cells into endothelial cells, thereby destroying the angiogenesis of gliomas. In this study, we further explored the mechanism by which P4HA1 promoted invasive progression of glioma cells. We found that P4HA1 was closely positively correlated with HIF1 α expression in glioma cells. Upregulation of P4HA1 expression promoted epithelial-mesenchymal transition (EMT) by inhibiting E-cadherin, increasing N-cadherin and vimentin, and the change in the expression of these proteins may be due to P4HA1 up-regulating SNAIL and SNAIL2. In addition, P4HA1 can also promote the migration and tube formation of human brain microvascular endothelial cells (HBMECs). It was speculated that P4HA1 may also participate in angiogenesis of gliomas through this pathway. Therefore, we reasoned that the expression of P4HA1 may be regulated by HIF1 α , and the high expression of P4HA1 may promote the aggressive growth of gliomas by up-regulating EMT activated by SNAIL and SNAIL2 and by inducing angiogenesis of HBMECs.

glioma, tumor invasion, epithelial-mesenchymal transition, P4HA1, HIF1 α

doi: [10.1360/SSV-2020-0067](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0067)