

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2015.01.006

• 基础研究 •

胶质瘤细胞中IL-1RAP的作用及其与STAT3的关系

郭智珍¹, 宫剑², 王建功³, 刘卫东⁴, 胡万宁³, 邢树山³

Role of IL-1RAP in Gliomas Cells and Its Relationship with STAT3

GUO Zhizhen¹, GONG Jian², WANG Jiangong³, LIU Weidong⁴, HU Wanning³, XING Shushan³

1. Department of Nephrology, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000, China; 2.

Department of Pediatric Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University,

Beijing 100050, China; 3. Department of Biotherapy, Tangshan People's Hospital, Hebei

United University, Tangshan 063000, China; 4. Department of Radiochemotherapy, Tangshan

People's Hospital, Hebei United University, Tangshan 063000, China

Corresponding Author: XING Shushan, E-mail: xingshushan1986@sina.com

Abstract: Objective To clarify the biological function of IL-1RAP in glioma cells and its relationship with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Methods** The glioma cell line U251 was transfected with IL-1RAP expression vector. Cell cycle and apoptosis of IL-1RAP-transfected U251 cells were analyzed by flow cytometry. STAT3 expression was analyzed by immunocytochemistry and co-immunoprecipitation. Colocalization of IL-1RAP and STAT3 was detected by immunofluorescence.

Results IL-1RAP protein was localized in the nucleus of glioma cells. Compared with control group transfected with empty plasmid, IL-1RAP transfection caused the apoptosis [(52.10±5.51)% vs. (7.57±0.54)%, $P < 0.05$] and cell cycle arrest of U251 cells [(68.22±1.96)% vs. (38.31±7.22)%, $P < 0.05$]. In addition, IL-1RAP and STAT3 were colocalized and may interacted to affect the prognosis of glioma cells.

Conclusion IL-1RAP could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of glioma cells, which may be related with its interaction with STAT3.

Key words: Interleukin 1 receptor accessory protein (IL-1RAP); Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); Gliomas; Cell cycle; Apoptosis

摘要: 目的 研究白介素1受体辅助蛋白 (IL-1RAP) 在胶质瘤中的作用及其与转录活化因子3 (STAT3) 的关系。**方法** 构建IL-1RAP表达载体, 转染胶质瘤细胞系U251, 利用流式±细胞仪检测转染IL-1RAP对U251细胞周期及凋亡影响。利用免疫共沉淀钩取STAT3, 检测转染IL-1RAP后STAT3的表达情况, 并利用免疫荧光方法检测IL-1RAP与STAT3的共定位情况。**结果** IL-1RAP蛋白定位于胶质瘤细胞核。与转染空质粒对照组相比, IL-1RAP有明显的促进肿瘤细胞凋亡[(52.10±5.51)% vs. (7.57±0.54)%, $P < 0.05$]和周期阻滞作用[(68.22±1.96)% vs. (38.31±7.22)%, $P < 0.05$]。通过免疫共沉淀和共定位证实IL-1RAP和STAT3可以相互作用。**结论** IL-1RAP有抑制胶质瘤细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。

IL-1RAP可能通过与STAT3相互作用进入细胞核发挥促进细胞凋亡和抑制细胞周期的作用。

关键词: 白介素1受体辅助蛋白; 转录活化因子3; 胶质瘤; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A

0 引言

胶质瘤亦称神经胶质细胞瘤, 是最常见的颅

内恶性肿瘤 (约占60%), 具有发病率、复发率、死亡率高和治愈率低等特点, 即使手术切除结合综合治疗, 平均带瘤生存时间超过5年的却不到50%^[1], 是威胁人类生存的神经系统主要疾病之一。目前对于影响胶质瘤预后的具体分子生物学机制尚不清楚。

近年来, 感染性炎症因子、细胞因子以及细胞因子间的网络调控在肿瘤的发生发展中越来越受到重视。白介素1受体辅助蛋白 (interleukin 1 receptor accessory protein, IL-1RAP) 是IL-1信号通路的一种

收稿日期: 2013-11-26; 修回日期: 2014-03-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81072074, 31271119)

作者单位: 1.063000 唐山, 开滦总医院肾内科; 2.100050 北京, 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科; 3.063000 唐山, 河北联合大学附属唐山市人民医院生物治疗科; 4.063000 唐山, 河北联合大学附属唐山市人民医院放射科

通信作者: 邢树山, E-mail: xingshushan1986@sina.com

作者简介: 郭智珍 (1988-), 女, 学士, 护师, 主要从事病理机制研究

辅助蛋白^[2], 本课题组既往研究发现IL-1RAP在胶质瘤中有明显抑癌作用^[3]。信号转导和转录活化因子3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 是一种转录因子, 在调节细胞多种生物学功能方面起重要作用。本研究将在既往研究的基础上进一步在胶质瘤细胞系U251中验证IL-1RAP的抑癌作用及其与STAT3的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人神经胶质细胞瘤U251细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心, IL-1RAP抗体、二抗购自英国Abcam公司, STAT3抗体购自美国CST公司。Protein A/G agarose、凋亡和周期试剂盒购自美国Invitrogen公司。RIPA试剂购自中国碧云天公司。DH5 α 感受态细胞、LB培养液、kana+抗生素、BHI琼脂平板培养液、BCA蛋白定量试剂盒均购自中国普利来公司。FITC和TRITC标记的二抗购自中国中杉金桥公司。TurboFect Transfection Reagent转染试剂购自加拿大Fermantas公司。细胞用血清和培养液购自美国Gibco公司。质粒提取并去除内毒素试剂盒 (EndoFree Plasmid Mini Kit) 购自美国Omega公司。

1.2 IL-1RAP质粒制备和转染

IL-1RAP质粒的构建与质检均由Origin公司完成, 并出具质检报告。质检方法为利用构建的质粒与空质粒分别转染HEK239细胞, 再利用PCR和Western blot检测IL-1RAP的RNA和蛋白表达情况。经检测转染构建质粒组IL-1RAP的RNA和蛋白均表达, 表明质粒制备及转染成功。

利用IL-1RAP质粒转化DH5 α 感受态细胞, 将转化的菌液按照1:100体积接种于kana+抗性LB培养液中, 37℃摇床培养10 h。取10 ml菌液, 按照质粒提取并去除内毒素试剂盒 (EndoFree Plasmid Mini Kit) 说明书操作。将洗脱下的DNA定量-20℃分装保存用于转染。并利用PCR对质粒进行鉴定, IL-1RAP引物序列: 上游: 5'-TATGCCTGCCTTTGGTAC-3'; 下游: 5'-CATTCCCTTGAATGTTCT-3'。

根据TurboFect Transfection Reagent试剂说明书, 将U251细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度均匀种植于6孔板中, 37℃培养12 h。按照每孔50 μ l无血清MEM培养液与5 μ l转染试剂和3 μ l质粒的混合物进行转染, 以空载体作为阴性对照, 以荧光显微镜观察GFP标签表达情况计算转染效率。转染质粒

37℃培养12 h进行下一步实验。将6孔板中转染IL-1RAP质粒的U251细胞在荧光显微镜高倍视野下 ($\times 400$) 观察, 于可见光下固定一个视野, 计数细胞总数, 转换荧光光源计数携带GFP绿色荧光的细胞数, 转染效率 = 有荧光表达的细胞数/细胞总数 $\times 100\%$, 每孔细胞随机选择5个观察视野, 重复3次^[4]。

1.3 流式细胞分析IL-1RAP对U251细胞周期的影响

将转染IL-1RAP质粒和空载体的U251, 用胰酶消化细胞, 清洗, 重悬细胞, 加入1 ml 70%乙醇中-20℃固定过夜。收集细胞并重悬。每管细胞样品中加入0.5 μ l碘化丙啶 (PI) 染色液, 37℃避光温浴30 min。冰浴避光存放。流式细胞仪分析时以未作处理的U251细胞圈门, 通过流式细胞仪分析对比转染IL-1RAP组和转染空质粒的对照组各设3个平行对照。

1.4 流式细胞分析IL-1RAP对U251细胞凋亡的影响

将转染IL-1RAP质粒和空载体的U251, 用胰酶消化细胞, 清洗, 重悬细胞, 取 1×10^5 的细胞, 加入195 μ l Annexin V-FITC结合液重悬。并加入5 μ l Annexin V-FITC, 加入10 μ l PI染色液, 轻轻混匀, 避光放置室温孵育30 min。流式细胞仪分析时以未作处理的U251细胞圈门, 通过流式细胞仪分析对比转染IL-1RAP组和转染空质粒的对照组各设3个平行对照。

1.5 免疫共沉淀分析IL-1RAP与STAT3的关系

RIPA裂解液在使用前数分钟内加入PMSF, 使PMSF的最终浓度为1 mM。去除转染过后U251细胞培养液, 用PBS液洗一遍, 按照6孔板每孔加入200 μ l裂解液的比例加入裂解液。蛋白样品应用BCA法进行定量。每1 ml总蛋白中加入100 μ l Protein A/G agarose, 4℃摇晃1 h, 以去除非特异性杂蛋白, 去除Protein A/G珠子。上清液加入IL-1RAP抗体和STAT3抗体各5 μ l并加入100 μ l Protein A/G agarose, 4℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜。收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 去上清液。用60 μ l 2 \times 上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起, 轻轻混匀, 将样品煮10 min。收集上清液, 将上清液电泳。

1.6 免疫荧光检测IL-1RAP与STAT3的共定位

将转染后的U251细胞用PBS洗3次。加入4%多聚甲醛200 μ l于4℃固定20 min。在固定好的细胞中加入200 μ l的0.5% Triton X-100于4℃通透15 min。用3% BSA于37℃封闭1h, 洗净封闭液。加入IL-1RAP抗体和STAT3一抗于4℃孵育过夜。加入FITC

和TRITC标记的二抗37℃避光孵育30 min,此步骤之后尽量避光操作。用甲醇稀释的DAPI洗一次,加入新的甲醇稀释的DAPI于37℃避光孵育10 min甲醇,用甲醇洗一次。稍晾干后用 50%甘油封片。激光共聚焦显微镜镜检。

1.7 统计学方法

用SPSS19.0 软件进行*t*检验,比较细胞周期和细胞凋亡数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

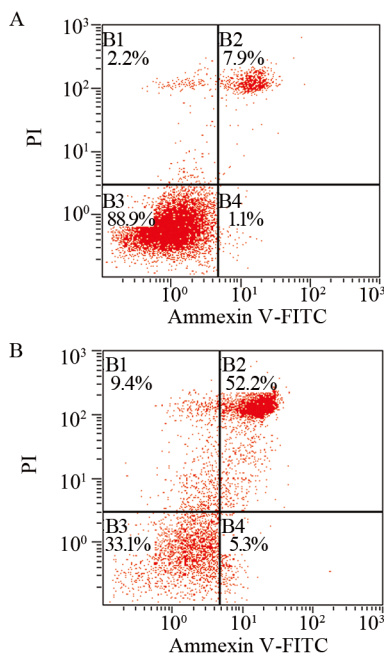
2 结果

2.1 IL-1RAP转染效率计算结果

根据流式细胞仪检测结果计算IL-1RAP质粒在U251细胞中的转染效率为(56.9±5.1)%。

2.2 流式细胞仪分析IL-1RAP对U251细胞形态学的影响情况

流式细胞仪分析发现转染IL-1RAP组细胞凋亡百分比为(52.10±5.51)%,而转染空质粒的对照组细胞凋亡百分比为(7.57±0.54)%。转染IL-1RAP组细胞凋亡百分比明显增加($P < 0.05$),见图1。

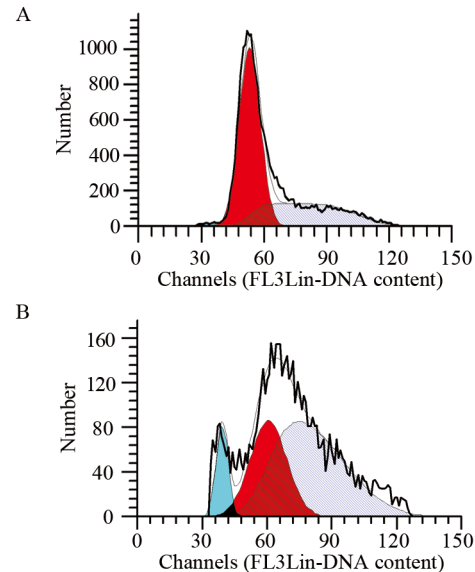


A: transfected with blank plasmid; B: transfected with IL-1RAP

图1 转染IL-1RAP对U251细胞凋亡的影响

Figure1 The impact of IL-1RAP transfection on U251 cell apoptosis

流式细胞仪分析发现,转染IL-1RAP组细胞S期细胞百分比为(68.22±1.96)%而转染空质粒的对照组细胞S期细胞百分比为(38.31±7.22)%。转染IL-1RAP组细胞S期百分比明显增加,转染IL-1RAP使细胞停留在S期抑制其进一步的细胞分裂($P < 0.05$),见图2。



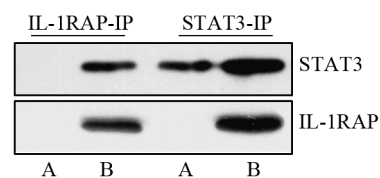
A: transfected with blank plasmid; B: transfected with IL-1RAP

图2 转染IL-1RAP对U251细胞周期的影响

Figure2 The impact of IL-1RAP transfection on U251 cells cycle

2.3 免疫共沉淀分析IL-1RAP与STAT3的关系

IL-1RAP抗体和STAT3抗体分别钩取转染IL-1RAP组和转染空白质粒组细胞总蛋白,IL-1RAP抗体在转染组钩取到STAT3和IL-1RAP,说明存在IL-1RAP的情况下STAT3可以和IL-1RAP结合。STAT3抗体在转染组钩取到STAT3和IL-1RAP说明存在STAT3的情况下IL-1RAP可以和STAT3结合,并且转染IL-1RAP后STAT3表达量有所提高。通过免疫共沉淀证实了IL-1RAP和STAT3之间在细胞内可以相互结合。在转染空白质粒组利用STAT3抗体钩取到STAT3蛋白说明STAT3在未转染IL-1RAP的胶质瘤细胞系U251中也有表达,而IL-1RAP几乎没有表达,见图3。



A: transfected with blank plasmid; B: transfected with IL-1RAP

图3 IL-1RAP和STAT3免疫共沉淀结果

Figure3 Co-immunoprecipitation of IL-1RAP and STAT3

2.4 免疫荧光法检测IL-1RAP与STAT3的共定位结果

在免疫荧光共定位实验中,利用激光共聚焦显微镜观察,IL-1RAP与FITC标记的二抗相结合,在波长495 nm的激光下观察产生绿色荧光;STAT3与TRITC标记的二抗相结合,在波长550 nm的激光下观察产生橘红色荧光;细胞核与DAPI

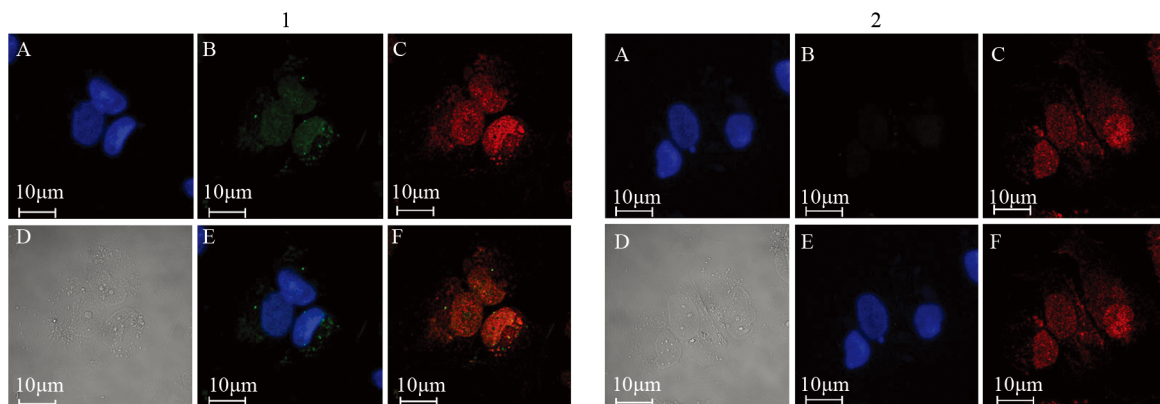
相结合,在波长340 nm的激光下观察产生蓝色荧光。通过激光共聚焦显微镜观察,在转染IL-1RAP组,代表STAT3表达水平的橘红色荧光与明场视野基本一致,说明STAT3为全细胞表达,代表IL-1RAP表达水平的绿色荧光与代表细胞核的蓝色荧光视野一致说明IL-1RAP为细胞核表达,绿色荧光与橘红色荧光较强的部位视野一致说明二者有共定位信号,见图4-1。在转染空白质粒的对照组可见橘红色荧光说明有STAT3表达;但是未见绿色荧光说明未见IL-1RAP表达,见图4-2。

3 讨论

IL-1RAP是IL-1信号通路的一种辅助蛋白。近年来,对IL-1RAP的研究主要集中于其在IL-1信号转导通路中的作用^[2],其抗肿瘤作用却报道不多。Kim等^[5]曾报道在肾癌IL-1RAP的表达水平镜像反映了Wilms'肿瘤抑制基因(WT1)的表达水平。Järås等^[6]研究发现利用单克隆抗体靶向IL-1RAP能够对慢性粒细胞白血病干细胞产生杀伤作用。有报道称IL-1RAP可以使免疫器官更加敏感从而提高免疫反应和免疫应答^[7]。本课题组既往研究证实IL-1RAP在儿童低级别胶质瘤中表达水平明显高于成人低级别胶质瘤,并发现IL-1RAP在胶质瘤中具有抑癌作用^[3]。本研究利用IL-1RAP转染U251细胞发现转染IL-1RAP组细胞凋亡百分比为(52.10±5.51)%,而转染空质粒的对照组细胞凋亡百分比为(7.57±0.54)%。说明转染IL-1RAP可以明显促进细胞凋亡($P < 0.05$)。转染IL-1RAP组细胞S期百分比为(68.22±1.96)%,而转染空质粒的对照组细胞S期百分比为(38.31±7.22)%。转染IL-1RAP组细胞S期百分比明显增加,转染IL-1RAP可

以使细胞停留在S期抑制其进一步的细胞分裂。转染IL-1RAP主要造成细胞的S期阻滞($P < 0.05$)。结合以上结果表明IL-1RAP的核定位后抑制了细胞的分裂,从而导致了U251细胞的凋亡。在进一步的研究中我们发现转染后IL-1RAP主要表达于U251细胞的细胞核,这与本课题组既往报道的IL-1RAP在胶质瘤组织中的表达定位一致^[3]。通常情况下IL-1RAP通过分泌到细胞外发挥其生物学功能^[8],然而无论是在胶质瘤组织中还是在胶质瘤细胞系U251细胞中IL-1RAP均为胞核表达。一般认为核定位信号(NLS)是核内功能蛋白进入细胞核的结构基础^[9]。由于常规核定位信号序列在构成特点上具有明显的规律性,因而通过生物信息学的手段容易预测^[10],而通过生物信息学的手段预测IL-1RAP蛋白没有细胞核定位信号。

STAT3是一种在调节发育、分化、增殖和细胞凋亡等生物学功能方面起重要作用的转录因子^[11]。Dasgupta等^[12]的研究发现在异常活化的STAT3不仅导致肿瘤发生,而且还通过抑制细胞免疫使肿瘤细胞免疫逃逸。另一方面STAT3作为细胞自我改造的一种代偿性、适应性的反应抑制细胞生长的功能,减缓肿瘤形成过程。STAT3在某些情况下还有促进细胞死亡的作用,从而揭示了STAT3有潜在的肿瘤抑制功能。当乳腺上皮细胞缺乏STAT3时细胞凋亡明显抑制^[13]。本研究中发现STAT3和IL-1RAP在U251细胞系中具有共定位信号,并且能够相互结合。研究证实STAT3能够促进神经干细胞分化为星形胶质细胞^[14]。在STAT3基因对胶质瘤影响的研究中发现,过量表达STAT3可以促使胶质母细胞瘤沿着星形胶质细胞方向分化。敲除STAT3的星形胶质细胞与STAT3



A: DAPI; B: IL-1RAP; C: STAT3; D: Bright field; E: DAPI+IL-1RAP; F: IL-1RAP+STAT3; 1: transfected with IL-1RAP; 2: transfected with blank plasmid

图4 免疫荧光检测STAT3与IL-1RAP共定位

Figure4 Colocalization of STAT3 and IL-1RAP detected by immunofluorescence

过表达的星形胶质细胞相比,其增殖和侵袭的能力都有明显的增强,表明STAT3有抑制星形胶质细胞的增殖和侵袭的作用^[14]。本研究中发现在未转染IL-1RAP的胶质瘤细胞中也有STAT3表达,但并未引起胶质瘤细胞的凋亡和细胞周期阻滞现象,而转染IL-1RAP后STAT3的表达水平亦有提高并且出现了胶质瘤细胞的凋亡和细胞S期阻滞。说明在胶质瘤细胞中STAT3与IL-1RAP结合发挥作用引起了胶质瘤细胞的凋亡和细胞周期阻滞,二者之间可能存在反馈调节机制。目前认为二聚化的STAT3可以进入细胞核,结合在基因启动子的特定序列上,通过与其他转录调控元件的相互作用来调控基因的表达^[15]。在没有信号分子刺激的情况下,STAT3分子主要分布在胞质中。受IL-6等细胞因子的刺激后,数分钟内发生磷酸化而聚集在细胞核内^[16],而IL-1RAP可以促进IL-6的产生^[17]。经典NLS包括一段单价的碱性氨基酸或双价的碱性氨基酸^[18]。STAT3的DNA结合域具有一段这样的序列。但是STAT3与IL-1RAP在低级别胶质瘤中的具体作用机制还有待我们进一步研究。

综上所述,本研究发现IL-1RAP有抑制胶质瘤细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。IL-1RAP可能通过与STAT3相互作用进入细胞核进一步发挥其生物学作用。由此推测 IL-1RAP 和STAT3在胶质瘤的发生、发展过程中发挥了重要作用,可为胶质瘤的治疗提供客观依据和可能的药物靶点。

参考文献:

- [1] Zhang J. Deep and comprehensive treatment of glioma[J]. *Zhonghua Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2003, 19(1): 1-2. [张纪. 深入开展胶质瘤综合治疗及其基础研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2003, 19(1): 1-2.]
- [2] Huang J, Gao X, Li S, *et al.* Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24): 12829-32.
- [3] Xing SS, Hu WN, Zhao XQ, *et al.* Interleukin 1 receptor accessory protein contributes to children and adult low grade gliomas[J]. *Shou Du Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, 34(2): 258-63. [邢树山, 胡万宁, 赵喜庆, 等. 白介素1受体辅助蛋白在儿童和成人低级别胶质瘤中的作用[J]. *首都医科大学学报*, 2013, 34(2): 258-63.]
- [4] Erfle H, Simpson JC, Bastiaens PI, *et al.* siRNA cell arrays for high-content screening microscopy[J]. *Biotechniques*, 2004, 37(3): 454-8, 460, 462.
- [5] Kim HS, Kim MS, Hancock AL, *et al.* Identification of novel Wilms' tumor suppressor gene target genes implicated in kidney development[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22):16278-87.
- [6] Järås M, Johnels P, Hansen N, *et al.* Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(37): 16280-5.
- [7] Yılmaz-Eliş AS, Aartsma-Rus A, 't Hoen PA, *et al.* Inhibition of IL-1 signaling by antisense oligonucleotide-mediated exon skipping of IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP)[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e66.
- [8] Jensen LE, Muzio M, Mantovani A, *et al.* IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein[J]. *J Immunol*, 2000, 164(10): 5277-86.
- [9] Lu Q, Lu Z, Liu Q, *et al.* Chromatin-bound NLS proteins recruit membrane vesicles and nucleoporins for nuclear envelope assembly via importin- α/β [J]. *Cell Res*, 2012, 22(11): 1562-75.
- [10] Zhou M, Li XL, Li GY. Molecular mechanism and progress of protein transport from cytoplasm to nucleus[J]. *Zhongguo Sheng Wu Hua Xue Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Bao*, 2006, 22(10):780-6. [周鸣, 李小玲, 李贵源. 蛋白质入核转运的机制和研究进展[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(10): 780-6.]
- [11] Stine RR, Matunis EL. JAK-STAT signaling in stem cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 786: 247-67.
- [12] Dasgupta A, Raychaudhuri B, Haqqi T, *et al.* Stat3 activation is required for the growth of U87 cell-derived tumours in mice[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(4): 677-84.
- [13] Casanova JL, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn errors of human JAKs and STATs[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 515-28.
- [14] de la Iglesia N, Konopka G, Puram SV, *et al.* Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(4): 449-62.
- [15] Darnell JE Jr. STATs and gene regulation[J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1630-5.
- [16] Nigg EA. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation[J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 779-87.
- [17] Sha Y, Markovic-Plese S. A role of IL-1R1 signaling in the differentiation of Th17 cells and the development of autoimmune diseases[J]. *Self Nonself*, 2011, 2(1): 35-42.
- [18] Fagerlund R, Mélen K, Kinnunen L, *et al.* Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin α 5[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(33): 30072-8.

[编辑: 杨卉; 校对: 刘红武]