

GRK5-Moesin 通路在胶质母细胞瘤中的分布特点及作用

杨 洋^{1,2} 钱中润^{1,2} 吴婧婧³

摘要 目的 研究 GRK5-Moesin 通路在胶质瘤中的分布特点及作用。方法 采用慢病毒转染法制备 GRK5 上调/下调的胶质瘤细胞系, Western blot 和 qRT-PCR 鉴定转染效果, Western blot 分析 GRK5 改变对 Moesin 表达的影响。免疫荧光分析 GRK5 与 Moesin 在胶质瘤组织中的亚细胞定位及分布特征。采用 CCK-8 法、细胞划痕法、Transwell 法和流式细胞术分别检测 U87 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡情况。结果

GRK5、Moesin 及 CD44 共定位于胶质母细胞瘤的细胞膜。GRK5-Moesin-CD44 在胶质瘤壁龛结构中富集表达。GRK5-Moesin 与胶质瘤血管关系密切, 但各血管中的 GRK5 和 Moesin 分布位置存在差异。靶向 GRK5-Moesin 可影响 U87 胶质瘤细胞生物学活性。结论 GRK5-Moesin 可促进胶质母细胞瘤的恶性进展, 并且与胶质瘤干细胞关系密切。

关键词 胶质瘤; G 蛋白偶联受体激酶 5; 膜突蛋白; 胶质瘤干细胞; 血管

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1016-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.002

胶质瘤是成人最常见的颅内原发性恶性肿瘤, 其中多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 恶性程度最高, 预后极差。尽管当今医疗技术不断发展精进, 胶质瘤的治疗还是以手术联合放化疗为主, GBM 患者的中位生存期仍只有 14 个月左右^[1-3]。GBM 中存在大量低分化的胶质瘤干细胞 (glioma stem cells, GSCs), 被认为是引起肿瘤耐

药性和肿瘤复发的“元凶”^[1-5]。G 蛋白偶联受体激酶 5 (G protein coupled receptor kinase-5, GRK5) 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 其功能涉及多种病理过程。前期研究^[6]表明 GRK5 的表达分布与胶质瘤干细胞有关。Moesin 属于 ERM 蛋白家族 (The Ezrin-Radixin-Moesin proteins)^[7], 可通过调节肌动蛋白改变细胞迁移活性。Moesin 与肿瘤的发生发展有关^[7-8]。前列腺癌研究^[9]中提示 Moesin 是 GRK5 的磷酸化底物。GRK5 通过磷酸化位点 T66 结合 Moesin 靶向调控 Moesin 亚细胞分布^[9]。而 GRK5-Moesin 在胶质瘤中的定位关系和分布特点尚不清楚。

该研究通过免疫组化和免疫荧光分析 GRK5 和 Moesin 在 GBMs 中的亚细胞定位和分布特点, 以及 GRK5-Moesin 与肿瘤血管及胶质瘤干细胞的位置关系, 进而研究上调/下调 GRK5 活性对 Moesin 的影响, 以及对 U87 细胞生物学活性的改变。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 U87 胶质瘤细胞系购自中国科学院细胞库; 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; GRK5 上调质粒 (GV358/GRK5) 和 GRK5 敲减质粒 (GV248/shRNA) 慢病毒液购自上海 GenePharma 公司; RNeasy Mini Kit 试剂盒购自美国 QIAGEN 公司; AceQ SYBR Green Master Mix 试剂盒购自南京诺唯赞生物技术股份有限公司; GAPDH 抗体购自美国 Sigma 公司; GRK5 抗体购自中国南京 Bioworld 公司; Moesin 抗体购自美国 Affbiotech 公司; CD44 抗体购自美国 CST 公司; 细胞培养板购自美国 Corning 公司; 荧光二抗均购自武汉塞维尔生物技术有限公司; 超敏 ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo Fish 公司; 相关引物设计自美国 Invitrogen 公司。细胞增殖检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本东仁化学科技有限公司; Annexin V-PE/7AAD 凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司; 细胞迁移侵袭实验使用的 Bio-Coat™ Invasion Chambers 小室和 Matrigel 胶购自美国 BD 公司; 实时定量 PCR 仪、生物安全柜和细胞培养箱等均购自美国 Thermo Scientific 公司; 荧光显微

2022-06-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81803041); 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085QH413、2208085QH255); 中央高校基本科研业务费专项资金 (编号: WK9110000129); 安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵育计划 (编号: 2019GQF12)

作者单位: ¹ 中国科学技术大学附属第一医院 (安徽省立医院) 神经外科, 中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230036

² 中国科学技术大学附属第一医院脑功能与脑疾病安徽省重点实验室, 合肥 230001

³ 安徽医科大学第二附属医院肿瘤科, 合肥 230601

作者简介: 杨 洋, 男, 主治医师, 博士;

吴婧婧, 女, 主治医师, 博士, 责任作者, E-mail: elainewjj0819@163.com

镜购自日本 Olympus 公司; 流式细胞仪来自美国 Beckman 公司; 蛋白与核酸电泳设备购自北京六一生物科技有限公司。本研究中涉及的胶质瘤样本均取自中国科学技术大学附属第一医院神经外科确诊并手术的胶质瘤患者。所有患者术前均未接受化疗或放疗。所有患者术前均获得知情同意。所有研究方法和程序均经中国科学技术大学附属第一医院伦理委员会批准(批号: 2019-X(H)-029)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和病毒包装细胞转染 U87 胶质母细胞瘤细胞系来自脑功能与脑疾病安徽省重点实验室。该细胞系经中国科学技术大学附属第一医院伦理委员会批准使用^[6,10-11]。细胞在 DMEM 培养基中添加 10% 胎牛血清, 置于 37 °C、5% CO₂ 的湿化培养箱中。用 GRK5 上调质粒(GV358/GRK5)和 GRK5 敲减质粒(GV248/shRNA)慢病毒液感染细胞。根据说明书加入 1 µg/ml 聚凝胺和 5 µg/ml 嘌呤霉素(美国 Sigma-Aldrich 公司)到培养基中, 将感染细胞传代至 10% 汇合。未处理的 U87 细胞定义为空白对照组; 表达 GV358/GRK5、GV248/shRNA、LV-3 阴性对照的细胞分别定义为 U87-UP、U87-KD、NC 组。采用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 检测 GRK5 的表达。

1.2.2 RNA 分离和 qRT-PCR 利用 Qiagen RNeasy Mini Kit 从胶质瘤细胞中提取总 RNA。然后, 用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将 2 mg RNA 逆转录为 cDNA。所有的程序都是按照制造商的说明进行的。采用 AceQ SYBR Green Master Mix 进行 qPCR 检测。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达的倍数变化^[6,11]。引物序列为: 人 GRK5, F: 5'-AGGAGCTGAACGTGTTTGA-3', R: 5'-TTGTTCTGATGCTGCCGCT-3'; 人 GAPDH, F: 5'-TCGGAGTCAACGGATTGCT-3', R: 5'-TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC-3'。

1.2.3 Western blot 实验 按照标准实验步骤进行实验^[6,10], GRK5 (1:500) 和 Moesin (1:500) 在 4 °C 下过夜。使用抗 GAPDH 的抗体(1:1000)在室温下 1 小时, 使用 ECL 检测系统通过化学发光观察免疫反应蛋白。采用 Image Pro Plus 6.0 软件测定蛋白条带强度。

1.2.4 细胞划痕试验 胶质瘤细胞在 12 孔板中培养。当细胞融合到 80-90% 时, 用标准的 200 µl 枪头尖在 12 孔板的单层细胞上制造出划痕。在 24 和 48 h 观察细胞向刮拭区迁移, 在固定观察点使用显微镜拍摄图像。通过测量细胞进入划痕区域的运动

来确定细胞迁移。使用 Image J 软件进行定量分析, 结果以百分比表示: 伤口闭合面积相对于最初伤口面积的平均值^[6,10]。

1.2.5 侵袭试验 采用 BioCoat™ Invasion Chambers 小室进行。用基质凝胶(Matrigel)包覆上室后将约 5 × 10⁴ 个细胞用 200 µl 无血清 DMEM 重悬并加入上腔, 在下室中加入 600 µl 含 10% 胎牛血清的 DMEM。37 °C 培养 18 h 后, 去除膜上侧细胞, 用 1% 多聚甲醛固定膜下表面受侵细胞, 用 0.1% 结晶紫染色。然后在 200 倍光学显微镜下, 每个小室选取 8 个随机视野计数细胞, 取平均数作为该小室的细胞计数^[6,10]。

1.2.6 细胞增殖实验 采用 CCK-8(日本 DOJINDO)检测细胞增殖。将 2 × 10⁴ 的胶质瘤细胞植入 96 孔培养皿中。培养 24、48、72、96 h 后, 用含 1:10 稀释 CCK-8 的培养基替换培养基。在 37 °C 下再孵育 2 h 后, 用设置在 450 nm 处的分光光度计测量吸光度^[6]。

1.2.7 免疫荧光三重染色分析 针对胶质瘤组织切片, 首先进行载玻片脱脂和抗原提取, 将涂胶载玻片放入 EDTA 缓冲液(pH 8.0, 塞维尔生物技术有限公司, 武汉)加热 8 min。用含 2.5% 山羊血清和 0.5% SDS 的缓冲液在室温下阻断 1 h。然后用兔抗人 GRK5(1:1000)、小鼠抗人 Moesin(1:3000)和小鼠抗人 CD44(1:2000)抗体在 0.01 M 磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline, PBS)、0.5% 牛血清白蛋白和 0.05% NaN₂ 中过夜。冲洗玻片, 用相应的二抗依次孵育: HRP 标记山羊抗兔荧光二抗(1:500), HRP 标记山羊抗小鼠荧光二抗(1:500), Cy5 标记山羊抗小鼠荧光二抗(1:400), 50 min/次。DAPI 染核, 盖玻片覆盖后荧光显微镜下观察。针对 U87 胶质瘤细胞进行染色, 首先将细胞重悬于含血清培养基, 滴加到多聚赖氨酸包被盖玻片上培养过夜。用 40 g/ml 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, 0.2% TritonX-100 通透 10 min。山羊血清封闭 30 min。再同时加上上述抗体过夜, 后续步骤同上。

1.2.8 免疫组化及 HE 染色 石蜡包埋切片、脱蜡、水化, GRK5 (1:500) 或 Moesin (1:500) 或 CD44 (1:500) 作为一抗, 严格按照试剂盒步骤操作。光镜下观察, 染色结果判定: 胞质或胞膜染成棕黄色为阳性。石蜡包埋的组织切片用 10% 多聚甲醛固定后行 HE 染色。

1.2.9 细胞凋亡检测 使用 Annexin V-PE/7-AAD

凋亡检测试剂盒分析胶质瘤细胞凋亡,同时用 Annexin V-PE 和活性染料 7-氨基-放线菌素 D (7-aminomycin D, 7AAD) 对肿瘤细胞进行染色。染色细胞立即用流式细胞仪进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRK5 和 Moesin 在胶质瘤中共表达情况及与胶质瘤干细胞关系 通过免疫荧光染色检测 U87 胶质母细胞瘤细胞及高级别胶质瘤组织中 GRK5 与 Moesin 的表达相关性。结果显示 GRK5 主要以在细胞质表达为主,在胞膜表达较少;Moesin 在胞质表达较弱,而在细胞膜中表达较多。GRK5 与 Moesin 的共表达部位在图中显示为黄色区域(图 1、2)。CD44 作为另一种胶质瘤干细胞标志物,被发现在 GBM 细胞膜存在阳性表达(呈粉色,见图 1、2);且在部分 GBM 细胞中可观察到 GRK5、Moesin 与 CD44 三者共同定位于细胞膜上同一位置的共表达,见图 1、2。而作为对照,正常脑组织中 GRK5、Moesin 和 CD44 的免疫组化和免疫荧光染色均为阴性。

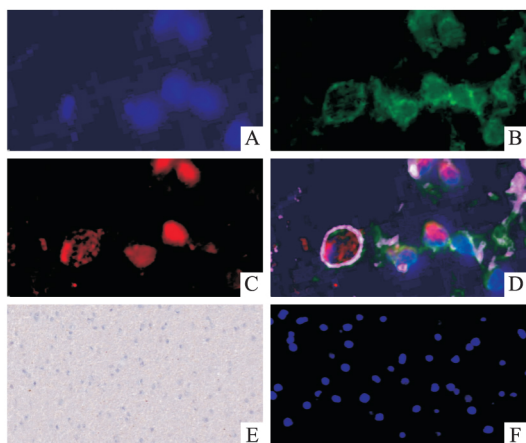


图 1 GRK5、Moesin 及 CD44 在 GBMs 中存在共定位

A: DAPI(蓝色)染核;B:绿色标记 Moesin;C:红色标记 GRK5;D:荧光三标:DAPI 染核,绿色标记 Moesin、红色标记 GRK5、粉色标记 CD44;E:正常脑组织免疫组化检测 GRK5 无阳性表达;F:正常脑组织免疫荧光三重染色检测 GRK5、Moesin 及 CD44 均无阳性表达;A-D: $\times 1\,000$;E、F: $\times 200$ 。

2.2 GRK5、Moesin 与胶质瘤“壁龛”样结构关系 光镜及荧光显微镜下观察,GBM 组织样本中存在许多类似“壁龛”样的结构,CD44 在此类结构中富集表

达。荧光显微镜下观察,壁龛结构中的肿瘤细胞内大多同时表达 GRK5 和 Moesin,且壁龛中部分细胞存在 GRK5-Moesin-CD44 三者的共定位,见图 2。

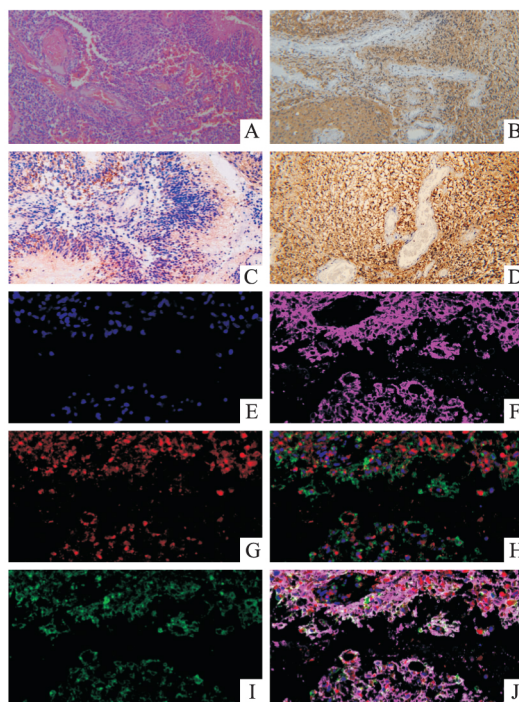


图 2 GRK5-Moesin-CD44 在胶质瘤细胞壁龛中富集

A: GBM 样本切片的 HE 染色;B:免疫组化检测 GBM 中 GRK5 表达;C:免疫组化检测 GBM 中 Moesin 表达;D:免疫组化检测 GBM 中 CD44 表达;E-J:荧光三重染色观察同一例 GBM 样本中 GRK5-Moesin-CD44 共表达情况;E:DAPI 染核(蓝色);F:GRK5 标记为红色;G:Moesin 标记为绿色;H:CD44 标记为粉色;I:为 EFG 三通道叠加,提示 GBM 样本中 GRK5-Moesin 存在共表达;J:为 EFGH 四通道叠加,显示 GBM 样本中 GRK5-Moesin-CD44 存在共表达。壁龛样结构中胶质瘤干细胞标志物 CD44(粉色)富集表达,共表达阳性的胶质瘤细胞参与构成了胶质瘤壁龛结构;A-J: $\times 400$ 。

2.3 GRK5 和 Moesin 在胶质瘤血管的分布 研究显示,GBM 样本中的血管附近细胞存在大量 GRK5 和 Moesin 阳性表达(图 3B、C)。另一方面,肿瘤中各个血管周围 GRK5 阳性和 Moesin 阳性细胞的分布却又存在明显差异(图 3D~G):图 3D 中的血管结构以 Moesin 阳性表达为主,GRK5 阳性表达较少。图 3E 中的 GRK5 阳性细胞均匀分布于整个血管,Moiesin 阳性细胞则局限于血管内膜。图 3F 中的血管结构以 GRK5 阳性细胞为主,Moiesin 阳性细胞较少。图 3G 中的血管则表现为 GRK5 和 Moiesin 共同分布,部分细胞中存在亚细胞共定位。

2.4 建立 GRK5 上调/下调的 U87 稳转细胞系 利用 GRK5 上调/敲减质粒的慢病毒液对 U87 细胞进行转染,建立稳转细胞系(空白对照组:U87;阴性

对照组: U87-NC; GRK5 上调组: U87-UP; GRK5 下调组: U87-KD)。鉴定结果显示,与对照组相比, U87-UP 组的 GRK5 的 mRNA ($F = 75.823$, $P < 0.01$) 和蛋白水平均提高 ($F = 99.707$, $P < 0.01$), 而 U87-KD 组的 GRK5 的 mRNA ($F = 27.780$, $P = 0.002$) 和蛋白水平 ($F = 9.900$, $P < 0.05$) 均降低, 差异有统计学意义, 见图 4。

2.5 GRK5-Moesin 表达改变对 U87 生物学活性的影响 利用 GRK5 上调/下调稳转细胞系, 分析 GRK5 活性改变对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。CCK-8 实验结果显示, 第 48、72、96 h, GRK5-UP 组细胞增殖能力较对照组及 GRK5-KD 组

增强, 而 GRK5-KD 组细胞增殖能力较对照组及 GRK5-KD 组减弱, 见图 4D。如图 5A、B 所示, 细胞划痕实验, GRK5 上调可提高 U87 细胞迁移能力, 促进“划痕”愈合 ($P < 0.01$, $F = 110.163$), 而 GRK5 下调的 U87 细胞“划痕”愈合明显减慢 ($P < 0.01$, $F = 109.606$)。Transwell 实验结果见图 5C、D, U87-UP 组细胞的侵袭能力较对照组提高 ($P < 0.01$, $F = 84.961$), 而 U87-KD 则降低 ($P < 0.01$, $F = 86.755$)。流式细胞术检测细胞凋亡发现, U87-UP 组的胶质瘤细胞的凋亡较 U87-NC 及 U87 组相对减少 ($P < 0.05$, $F = 11.244$), 而 U87-KD 组细胞凋亡比 U87-NC 及 U87 组增加 ($P < 0.01$, $F = 87.464$), 见图 5E、F。

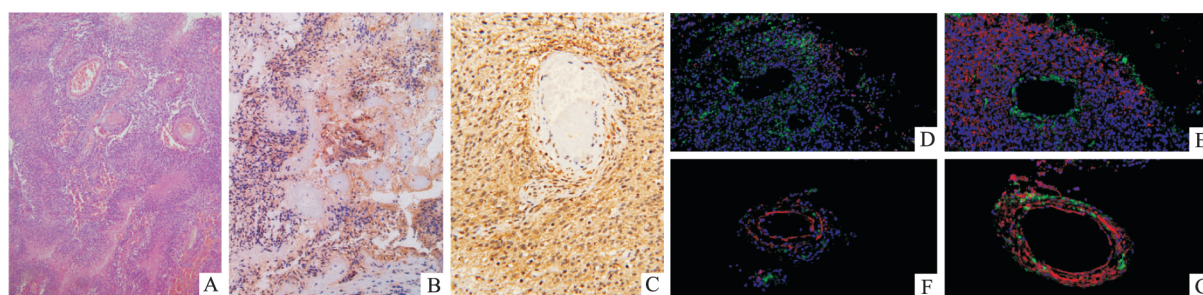


图3 GRK5 与 Moesin 在胶质瘤血管的表达和分布

A: GBM 样本切片的 HE 染色 $\times 200$; B: GRK5 在 GBM 血管周围显著高表达 $\times 200$; C: Moesin 亦在 GBM 血管周围高表达 $\times 400$; D ~ G 四支胶质瘤血管中 GRK5 和 Moesin 分布各异: D: 血管以 Moesin (绿色) 表达为主, GRK5 (红色) 表达较少, 血管腔内壁未见阳性表达; E: 血管中 GRK5 在整个血管均匀表达, Moesin 仅局限于血管内膜表达; F: 血管几乎只有 GRK5 表达, Moesin 表达极少; G: 血管中 GRK5 和 Moesin 均匀表达于整个血管结构, 并在部分细胞中共表达 (GRK5 为红色, Moesin 为绿色); D ~ G: $\times 400$

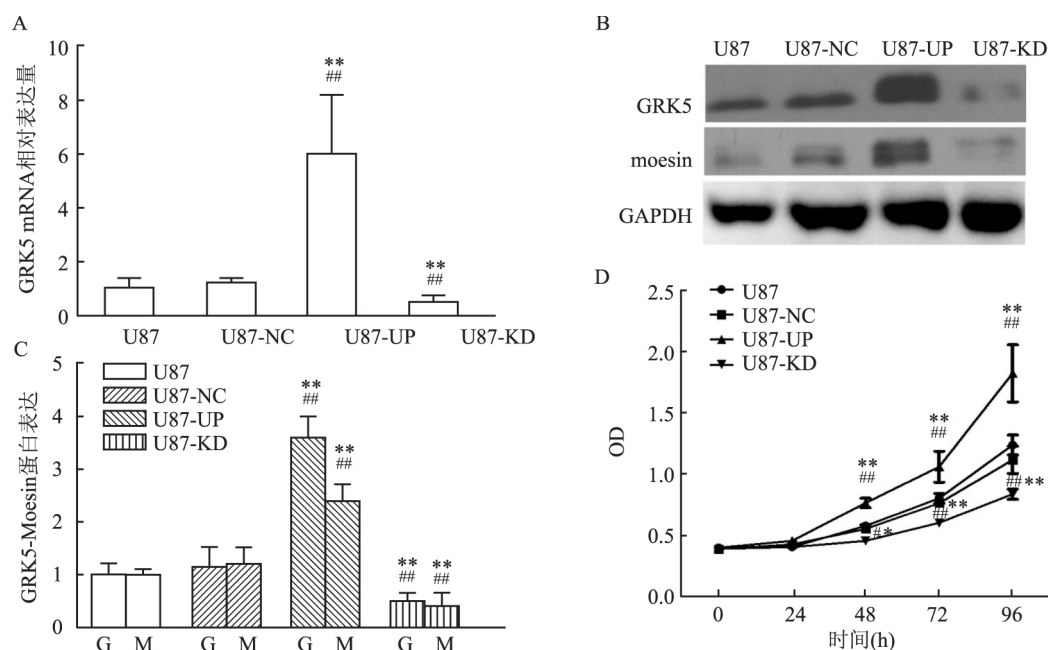


图4 GRK5 上调/下调可靶向调控 Moesin 表达

A: qRT-PCR 检测各组胶质瘤细胞中 GRK5 的 mRNA 水平, 与 U87-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 U87 组比较: ## $P < 0.01$; B: Western blot 检测各组细胞 GRK5 和 Moesin 的蛋白表达; C: 柱状图显示各组 GRK5 和 Moesin 的相对蛋白水平: 与 U87-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 U87 组比较: ## $P < 0.01$ (G: GRK5, M: Moesin); D: CCK-8 检测各组细胞增殖水平: 与 U87-NC 组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 U87 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

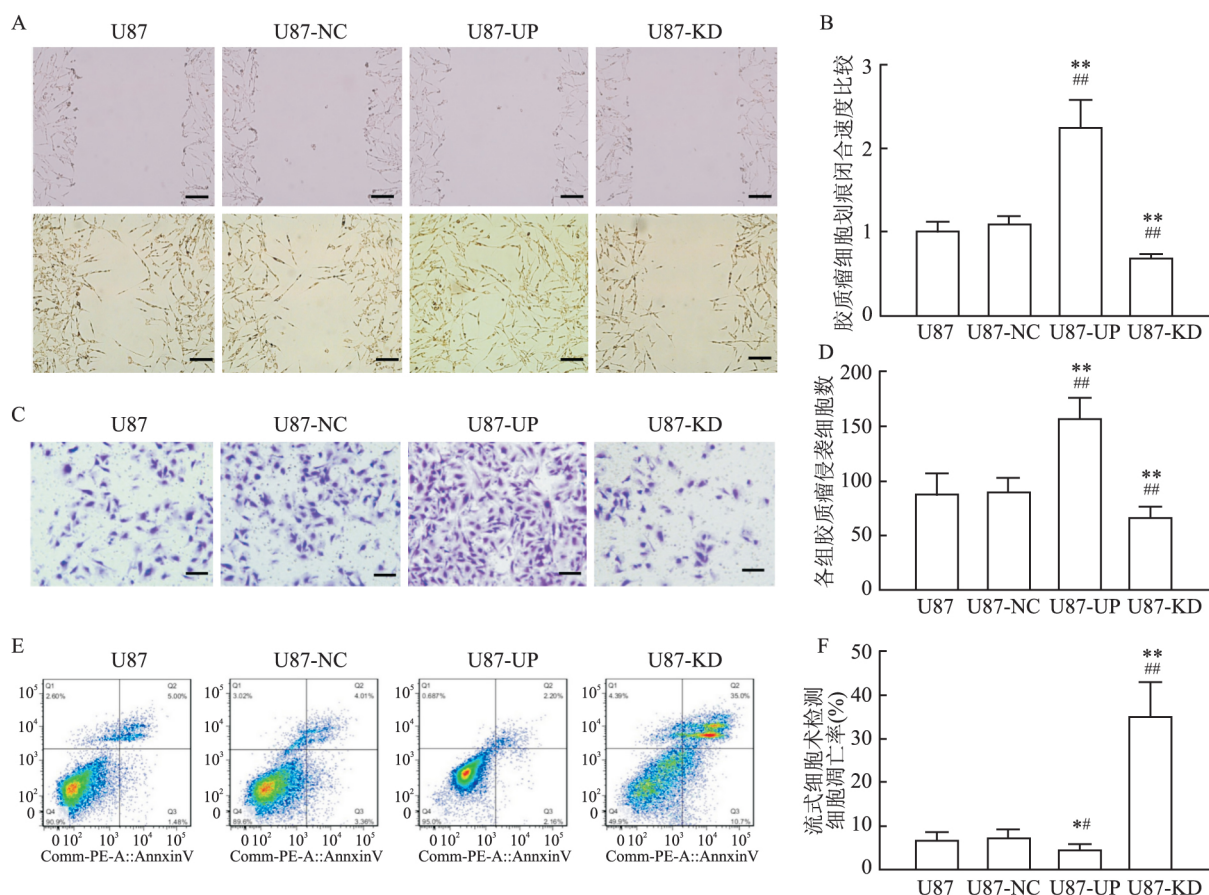


图5 GRK5对U87细胞生物学活性的影响

A: 划痕实验检测 GRK5 表达对各组细胞迁移能力的影响 $\times 200$; B: 直方图显示各组细胞迁移速度; C: Transwell 实验检测 GRK5 表达对各组细胞侵袭能力的影响 $\times 200$; D: 直方图显示各组穿膜的细胞数; E: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平; F: 直方图显示各组凋亡细胞百分比; 与 U87-NC 组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 U87 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论

尽管 GRK5 在心血管疾病发病机制中的作用已经被广泛研究,但直到近年来,它在肿瘤发生发展中的作用才逐渐被揭示。GRK5 被认为在调节肺癌、前列腺癌等肿瘤细胞的生长中发挥作用,而在胶质瘤中的研究还相对较少。近期的研究^[9]表明 GRK5 通过结合 T66 位点使 Moesin 磷酸化,从而对前列腺癌细胞中肌动蛋白的重塑、侵袭和转移产生影响。而在 GBM 细胞中, Moesin 是被磷酸化激活的主要 ERM 成员,在胶质瘤中的表达水平上调,并且与胶质瘤干细胞密切相关^[12]。

本研究表明 GRK5 和 Moesin 均在 GBM 中高表达,课题组不仅观察到 GRK5、Moesin 和 CD44 三者在 GBM 细胞膜上存在共表达,而且在肿瘤血管和胶质瘤壁龛结构大量富集分布,提示 GRK5 和 Moesin 可能参与构成胶质瘤的壁龛结构。GRK5-Moesin 可能是 GBMs 维系胶质瘤干细胞“干性”的重要调节

子。而调控 GRK5 可显著改变 Moesin 表达,进一步提示 GRK5-Moesin 在胶质瘤中存在相互作用, GRK5 作为上游基因,可靶向调控 Moesin 的表达活性。

GRK5 + 细胞和 Moesin + 细胞在胶质瘤各个血管周围富集,但呈现出差异化分布特点。近年来有报道^[13]提出, GBM 生长需要不同的微循环模式,尤其是 GBM 细胞来源的血管(GBM cell-derived vessels, GDVs)。分析胶质瘤患者术后病理样本发现,样本中 GDVs 较多的患者的中位生存期仅为 9.56 个月,而 GDVs 较少的患者的中位生存期为 13.60 个月。那么, GRK5-Moesin 与胶质瘤血管类型存在怎样的关系, GRK5-Moesin 差异化分布与胶质瘤内血管类型的关系有待进一步研究。

GRK5 活性改变可影响胶质瘤细胞生物学活性。GRK5 上调可促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭; GRK5 上调/下调导致胶质瘤细胞凋亡率随之减少/增加。目前已研制出针对 GRK5 的特异性靶向药物:舒尼替尼(Sunitinib)是已被 FDA 批准的针

对 GRK5 最有效的小分子抑制剂^[14],主要抑制血管内皮生长因子受体和血小板衍生生长因子受体,从而阻断肿瘤的血管生成^[15]。舒尼替尼能否通过靶向抑制 GRK5 使胶质瘤患者获益还需继续深入研究。

参考文献

- [1] Sminia P, van den Berg J, van Kootwijk A, et al. Experimental and clinical studies on radiation and curcumin in human glioma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(2): 403–9.
- [2] de Boeck A, Ahn B Y, D Mello C, et al. Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4997.
- [3] Kenmochi H, Yamasaki T, Koizumi S, et al. Nicotine does not affect stem cell properties requisite for suicide gene therapy against glioma [J]. *Neurol Res*, 2020, 42(10): 818–27.
- [4] 徐峰, 胡珊珊, 谢时帅, 等. 胶质瘤干细胞分泌的外泌体对缺氧/复氧损伤的血管内皮细胞的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(6): 837–42.
- [5] 刘彦廷, 孙拯, 王壮壮, 等. 胶质瘤细胞外泌体通过 miR-125b 对细胞增殖凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(9): 1361–6.
- [6] Yang Y, Wu J J, Cheng C D, et al. G-protein-coupled receptor kinase-5 promotes glioblastoma progression by targeting the nuclear factor kappa B pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3370–84.
- [7] Qin Y, Chen W, Liu B, et al. MiR-200c inhibits the tumor progression of glioma via targeting moesin [J]. *Theranostics*, 2017, 7(6): 1663–73.
- [8] Barros F B A, Assao A, Garcia N G, et al. Moesin expression by tumor cells is an unfavorable prognostic biomarker for oral cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 53.
- [9] Chakraborty P K, Zhang Y, Coomes A S, et al. G protein-coupled receptor kinase GRK5 phosphorylates moesin and regulates metastasis in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(13): 3489–500.
- [10] Niu C S, Yang Y, Cheng C D. MiR-434 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(5): 1533–40.
- [11] Yang Y, Niu C S, Cheng C D. Pin1-Nanog expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 560–6.
- [12] Zhu X, Morales F C, Agarwal N K, et al. Moesin is a glioma progression marker that induces proliferation and Wnt/beta-catenin pathway activation via interaction with CD44 [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1142–55.
- [13] Mei X, Chen Y S, Zhang Q P, et al. Association between glioblastoma cell-derived vessels and poor prognosis of the patients [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(5): 211–21.
- [14] Anastassiadis T, Deacon S W, Devarajan K, et al. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11): 1039–45.
- [15] Sommer A K, Falcenberg M, Ljepoja B, et al. Downregulation of GRK5 hampers the migration of breast cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15548.

Distribution characteristics and role of GRK5–Moesin pathway in glioblastoma

Yang Yang^{1,2}, Qian Zhongrun^{1,2}, Wu Jingjing³

(¹ Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of USTC, Hefei 230036;

² Anhui Province Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Hefei 230001;

³ Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the distribution characteristics and role of GRK5–Moesin pathway in glioma.

Methods Glioma cell lines with GRK5 up-regulated/ down-regulated were prepared by lentivirus transfection, which were identified by Western blot and qRT-PCR. Effect of GRK5 changes on Moesin expression was detected by Western blot. Immunofluorescence analyzed subcellular localization and distribution characteristics of GRK5 and Moesin in glioma tissues. Proliferation, migration, invasion and apoptosis of U87 cells were detected by CCK-8 assay, Cell scratch assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. **Results** GRK5, Moesin and CD44 were co-located in glioblastoma cell membrane. GRK5–Moesin were enriched in glioma niches and glioma blood vessels, but the distribution of GRK5 and Moesin in each blood vessel was different. Targeting GRK5–Moesin could affect the biological activity of U87 glioma cells. **Conclusion** GRK5–Moesin can promote the malignant progression of glioma and is closely related to glioma stem cells.

Key words glioma; GRK5; moesin; glioma stem cell; blood vessel