

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.08.007

· 基础研究 ·

过表达程序性细胞死亡基因5提高脑神经胶质瘤细胞对替莫唑胺的化疗敏感性

王雷¹, 沈维高², 刘艳波³, 许海洋⁴(1. 北华大学附属医院 神经外科, 吉林 吉林 132000; 2. 吉林医药学院附属医院 神经外科, 吉林 吉林 132081; 3. 北华大学 医学院病理生理学教研室, 吉林 吉林 132000; 4. 吉林大学第一附属医院 神经外科, 吉林 长春 130031)

[摘要] **目的:** 探讨抑癌基因程序性细胞死亡基因5(programmed cell death 5 gene, PDCD5)对脑神经胶质瘤细胞增殖及替莫唑胺(temozolomide, TMZ)化疗敏感性的影响。**方法:** 收集吉林大学第一临床医院神经外科2009年1月至2014年12月间收治的脑神经胶质瘤患者116例。分别利用qPCR、WB及免疫组化方法检测神经胶质瘤细胞系U87、U251、稳定克隆U87-PDCD5细胞、转染si-PDCD5后的脑神经胶质瘤细胞以及原发性神经胶质瘤组织中PDCD5 mRNA及蛋白质的表达情况。MTT法检测过表达或敲降PDCD5对胶质瘤细胞生长及TMZ化疗敏感性的影响。建立脑神经胶质瘤细胞系U87裸鼠皮下荷瘤模型, 随机分为对照组、TMZ组、PDCD5组和TMZ+外源性PDCD5重组表达载体联合组, 治疗20 d后断颈处死动物, 切取瘤组织, 测量瘤体积并称瘤质量。采用qPCR、WB法检测移植瘤组织中PDCD5的表达水平, 分析PDCD5联合TMZ治疗对脑神经胶质瘤生长的影响。**结果:** PDCD5 mRNA和蛋白在U87细胞中的相对表达量明显低于在U251细胞中的相对表达量(均 $P < 0.05$); 在高级别脑神经胶质瘤组织中, PDCD5 mRNA和蛋白的表达明显低于低级别组织(均 $P < 0.05$); U87-PDCD5和U251细胞对TMZ的敏感性均高于U87细胞(均 $P < 0.05$), U87-PDCD5-siRNA、U251-siRNA组细胞对TMZ的敏感性均明显低于对照组(均 $P < 0.05$)。比较裸鼠移植瘤的瘤体积和质量, 对照组>TMZ组>PDCD5组>联合组(均 $P < 0.05$); 各组移植瘤组织内PDCD5 mRNA及蛋白的表达水平趋势与之相反(均 $P < 0.05$)。**结论:** PDCD5过表达可增强脑神经胶质瘤细胞对TMZ的化疗敏感性, 而沉默PDCD5表达作用则相反, PDCD5与TMZ联合应用可更好地抑制脑神经胶质瘤裸鼠移植瘤的生长。

[关键词] 程序性死亡基因5; 脑神经胶质瘤; U87细胞; U251细胞; 替莫唑胺; 化疗敏感性

[中图分类号] R739.41; R730.59; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)08-0868-08

Over-expression of programmed cell death 5 gene enhances chemosensitivity of brain glioma cells to temozolomide

WANG Lei¹, SHEN Weigao², LIU Yanbo³, XU Haiyang⁴(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132000, Jilin, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin 132081, Jilin, China; 3. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Beihua University, Jilin 132000, Jilin, China; 4. Department of Neurosurgery, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130031, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of tumor suppressor gene programmed cell death 5 gene (PDCD5) in the growth and temozolomide (TMZ) sensitivity of brain glioma cells. **Methods:** A total of 116 patients with cerebral glioma admitted to the Department of Neurosurgery, First Clinical Hospital of Jilin University from January 2009 to December 2014 were enrolled in this study. QPCR, WB and immunohistochemistry method were used to detect the mRNA and protein expressions of PDCD5 in glioma cell lines (U87, U251), U87 cell line with stable PDCD5 expression (U87-PDCD5), glioma cells with si-PDCD5 transfection and primary cerebral glioma tissues, respectively. MTT assay was used to detect the effect of over-expression or knockdown of PDCD5 on the growth and TMZ-sensitivity of glioma cells. The subcutaneous tumor-bearing model of glioma cell line U87 was established in nude mice, and then the experimental mice were randomly divided into control group, TMZ group, PDCD5 group and TMZ+exogenous PDCD5 recombinant expres-

[基金项目] 吉林省教育厅“十三五计划”科学技术项目资助(No. JJKH20180332KJ)。Project supported by the "13th Five-Year" Science and Technology Project of Education Department of Jilin Province (No. JJKH20180332KJ)

[作者简介] 王雷(1978-), 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事胶质瘤的基础和临床研究, E-mail: 2311241601@qq.com

[通信作者] 刘艳波(LIU Yanbo, corresponding author), 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事恶性实体肿瘤发病机制的基础研究, E-mail: liuy-anbobeihua@163.com

sion vector group. After 20 days, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the tumor tissue was excised to measure the tumor volume and weigh. The expression of PDCD5 in tumor tissues was detected by qPCR and WB methods, and the effects of PDCD5 combined with TMZ on the growth of gliomas were also analyzed. **Results:** The relative mRNA and protein expressions of PDCD5 in U87 cells were significantly lower than those in U251 cells (both $P<0.05$), and the mRNA and protein expressions of PDCD5 in high level glioma tissues were significantly lower than those in low level tissues (all $P<0.05$). The sensitivity of U87-PDCD5 cells and U251 cells to TMZ was higher than that of U87 cells (all $P<0.05$). The sensitivity of cells to TMZ in U87-PDCD5-siRNA group and U251-siRNA group was significantly lower than that of the control group (both $P<0.05$). The tumor volume and weight of nude mice xenografts were compared, and the results showed control group>TMZ group>PDCD5 group>combined group (all $P<0.05$); however, the mRNA and protein expressions of PDCD5 in the transplanted tumor tissues of each group showed the opposite trend (all $P<0.05$). **Conclusion:** PDCD5 over-expression can enhance the chemosensitivity of brain glioma to the chemotherapy drug TMZ, while silencing of PDCD5 expression exerts the opposite effect. The combination of PDCD5 and TMZ can better inhibit the growth of xenografts in nude mice.

[Key words] programmed cell death 5 gene (PDCD5); cerebral glioma; U87 cell; U251 cell; temozolomide (TMZ); chemosensitivity [Chin J Cancer Biother, 2019, 26(8): 868-875. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.08.007]

脑神经胶质瘤是一种常见的中枢神经系统恶性肿瘤,起源于神经上皮,其发病率居所有神经系统肿瘤首位,约占35%~60%,其中位生存期只有14~18个月^[1]。目前临床上尚无治愈脑胶质瘤的方案,多采用以手术治疗为主、结合术后放化疗的个体化综合治疗。脑神经胶质瘤术后化疗是其综合治疗中的一个关键环节,目前常用于治疗胶质瘤的化疗药物有替莫唑胺 (temozolomide, TMZ)、顺铂 (cisplatin, DDP)、甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 等。其中 TMZ 是近年来研究较多的一种口服烷化剂,其主要通过转化为活性化合物甲基三氮烯咪唑酰胺进而水解为5-氨基-咪唑-4-酰胺和甲基胍,作用于肿瘤细胞各个分裂周期,使肿瘤细胞DNA烷基化,进而发生凋亡^[2]。STUPP等^[3]研究发现, TMZ 化疗联合放疗可明显提高脑神经胶质瘤的临床疗效,或使肿瘤细胞停留在G2-M期,该时期是细胞对放疗最敏感的阶段,从而增强其细胞毒性作用和放疗敏感性。

程序性细胞死亡基因5 (programmed cell death gene 5, PDCD5) 基因是一种新发现的抑癌基因,原名TFAR19 (TF-1 cell apoptosis related gene-19), 定位于染色体19q13.11, 蛋白相对分子质量为14 000^[4]。PDCD5具有诱导某些恶性肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长的功能。而WANG等^[5]研究表明, PDCD5本身无诱导细胞凋亡的作用,当化疗药物处理及射线照射等其他诱导凋亡因素存在时, PDCD5可明显加强细胞凋亡,说明其具有凋亡促进剂作用。研究^[6-7]发现, PDCD5联合化疗药物对肿瘤细胞的抑制作用优于单独使用该化疗药物,故认为PDCD5有望作为化疗药物增敏剂,延长肿瘤患者生存期及提高生存质量。然而关于脑神经胶质瘤细胞中PDCD5表达及其与TMZ敏感性关系的研究尚少有报道。本研究探讨抑癌基因PDCD5在脑神经胶质瘤细胞生长及TMZ化疗敏感性中的作用,为临床应用PDCD5联合

化疗药物TMZ治疗脑神经胶质瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床标本采集

收集吉林大学第一临床医院神经外科2009年1月至2014年12月间收治的脑神经胶质瘤患者116例,其中男64例、女52例;其中2013年1月至2014年12月收集接受手术治疗的脑神经胶质瘤患者的新鲜组织标本30例、癌旁新鲜组织标本1例,另外85例标本为石蜡包埋组织标本。按照WHO病理分级将30例新鲜组织标本分成高、低级别胶质瘤。患者入组标准:(1)均经临床、手术及病理学检查确诊,且均为原发性脑神经胶质瘤;(2)年龄18~80岁;(3)术前未接受过放疗、化疗。排除标准:(1)患者信息不完整;(2)曾患其他肿瘤;(3)同时使用其他药物。本研究方案获得吉林大学第一临床医院伦理委员会批准,所有患者签署了知情同意书。

1.2 主要实验材料和试剂

人脑胶质瘤细胞株U87和U251购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。siRNA oligo由Ambion公司设计合成。TMZ购于江苏天士力帝益药业有限公司(每粒50 mg,批号:20160620)。SPF级裸鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物合格证号:SYXK(沪)2017-0005]。细胞转染试剂Lipofectamine™ 3000购自美国ThermoFisher公司;MTT试剂购于Sigma公司。小鼠抗人PDCD5单克隆抗体购自Cell Signal公司,小鼠抗人β-actin单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔IgG和羊抗鼠IgG均购自美国Santa Cruz公司,Taq酶和dNTP (deoxy-ribonucleoside triphosphate)购自TaKaRa公司,RT-PCR试剂盒、TRIzol裂解液、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水购自北京天根生化科技有限公司,免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,WB试剂盒购自碧云天生物科技

有限公司。荧光定量PCR仪购自BIO-RAD公司。

1.3 细胞培养及转染

将U87和U251细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养基中,置于5%CO₂、37℃、95%饱和湿度培养箱中传代培养。经过3次传代后,取对数生长期细胞进行实验。U87和U251细胞系接种于6孔板中,待细胞汇

合率达30%~40%时用Lipofectamine™ 3000转染siRNA-PDCD5及阴性对照;细胞汇合率达70%~80%时转染PDCD5重组表达载体(pDsRed2-N1-PDCD5)及空白载体染入U87细胞中。在37℃、5%CO₂环境中培养6 h,换为正常培养基继续培养,根据实验要求在相应时间点收集细胞进行检测。

表1 siRNA序列
Tab.1 Sequence of siRNA

Name	Sequence
siPDCD5-siRNA-1 sense	5'-GAGAAUUACCUUAUACAGTT-3'
siPDCD5-siRNA-1 antisense	5'-UCUGUAAGGUAUUUCUCTA-3'
siPDCD5-siRNA-2 sense	5'-GAACAAGGUUUAAUAGAAATT-3'
siPDCD5-siRNA-2 antisense	5'-UUUCUAUUAAACCUUGUUCTG-3'
NC-siRNA sense	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
NC-siRNA antisense	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.4 qPCR检测脑胶质瘤细胞和组织中PDCD5的表达

细胞转染24 h后,收集各组细胞,采用TRIzol法提取细胞总RNA。取手术中切下并冻入液氮中的癌或癌旁组织50 mg,加入1 ml TRIzol,在匀浆机中充分混匀,根据说明书抽提组织总RNA。取4 μg RNA,1 μl OligodT,运行RT-PCR程序70℃、5 min,冰上放置1 min,加入反应混合物(5×缓冲液5 μl,dNTP 3 μl,M-mlv逆转录酶1 μl),42℃、60 min,85℃、6~7 min合成cDNA,产物-20℃保存。利用BIO-RAD荧光定量PCR仪检测细胞PDCD5 mRNA表达水平,PDCD5的上游引物为:5'-CCATGGCGGACGAGGAGCTTG-3',下游引物为:5'-TCAATAATCGTCATCTTCATC-3',β-actin的上游引物为5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3',下游引物为:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。按照以下体系进行qPCR扩增:cDNA 1 μl,2×Taq PCR Master Mix 12.5 μl,10 μmol/L上下游引物各1 μl,ddH₂O 9.5 μl,反应总体积为25 μl。反应条件为:94℃预变性5 min,94℃、30 s,57℃、30 s,72℃、30 s扩增30个循环,72℃延伸5 min,4℃、5 min。进行琼脂糖凝胶电泳观察结果,并进行条带灰度分析,计算相对表达量。

1.5 WB法检测脑胶质瘤细胞中PDCD5蛋白的表达

收集转染48 h的细胞,使用RIPA裂解液进行细胞裂解抽提总蛋白;手术中切取冻入液氮中的组织50 mg,抽提总蛋白,BCA法进行蛋白定量,每组样本取30 μg蛋白样品行8%SDS-PAGE,然后将蛋白转膜至甲醇预处理的PVDF膜,以5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h,加入1:1 000稀释的一抗,4℃孵育过夜,次日PBST漂洗3次后,加入1:5 000稀释的HRP标记的二抗,室温孵育2 h,加入ECL试剂于暗室内曝光,

冲洗胶片,采用佳能CanoScanLiDe 90扫描仪扫描,采集图像,ImageJ软件测定蛋白条带灰度值并计算蛋白相对表达量。

1.6 免疫组化法检测人脑神经胶质瘤组织中PDCD5的表达水平

将癌及癌旁组织标本用10%中性甲醛溶液固定24 h,进行常规石蜡包埋、切片。切片经脱蜡,柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复,滴入50 μl的3%H₂O₂,室温孵育10 min。PBS冲洗3次,滴入山羊血清封闭液,室温孵育20 min。加入50 μl一抗,4℃过夜。PBS冲洗3次,加入50 μl二抗,37℃孵育60 min。PBS冲洗3次,滴入100 μl DAB溶液显色,用纯净水终止显色。将切片浸泡在苏木精溶液中35 min,进行碱性核染色。酸酒精分色,自来水蓝化。乙醇梯度脱水,透明、甩干。中性树脂胶封片,显微镜观片,照相。

PDCD5阳性表达于细胞质或胞核内,呈棕黄色颗粒。随机选择5个高倍镜视野,每个视野计数200个细胞,采用半定量计分方法^[72]。按染色强度评分:0分,无着色;1分,着色弱;2分,着色适中;3分,着色深。按阳性细胞比例评分:0分,着色的阳性细胞数百分比≤5%;1分,>5%~25%;2分,>25%~50%;3分,>50%。将着色强度得分与阳性细胞数百分比得分相乘得到阳性系数:0、1分判定为(-),2、3分判定为(+),4~6分判定为(++),9分则判定为(+++)。

1.7 MTT法检测PDCD5表达对U87、U251细胞TMZ化疗敏感性的影响

取对数生长期细胞消化后调整细胞密度至6×10⁴/ml,接入96孔板,每孔100 μl,37℃ 5%CO₂环境中

孵育 16~24 h 后吸取上清, 分别加入 0、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ, 每个浓度设 3 个复孔。设置未加药孔为对照组。加药 24 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h。弃尽板中的培养液, 每孔加入 50 μl DMSO, 置于摇床上低速震荡 10 min 使结晶物充分溶解, 在酶标仪 570 nm 处读取各孔光密度 (D) 值。细胞生存率 = $(D_{\text{测定}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。以不同药物浓度的对数值为横坐标, 细胞生存率为纵坐标绘制生长曲线。

1.8 U87 细胞裸鼠皮下胶质瘤模型的构建及观察

制备对数生长期 U87 细胞悬液, 用 PBS 将细胞密度调整为 1×10^{10} 个/L, 取 1 ml 细胞悬液注射入裸鼠腋区皮下, 饲养 3~4 周建立荷瘤模型。裸鼠的皮下可触及肿瘤结节则提示成功建立移植瘤模型。将 20 只荷瘤裸鼠模型随机分为 4 组, 分别注射生理盐水 100 μl (对照组, $n=5$), TMZ 10 mg/kg (TMZ 组, $n=5$), 外源性 PDCD5 重组表达载体 20 μg (PDCD5 组, $n=5$), TMZ+外源性 PDCD5 重组表达载体 (联合组, $n=5$, 给药剂量与单药组相同), 均为每 4 d 给药 1 次, 共 3 次。治疗 20 d 后断颈处死所有裸鼠, 切取肿瘤组织并测量组织体积、称重, 取部分新鲜组织抽提组织 RNA 和

蛋白。用三维卡尺测量肿瘤直径并计算肿瘤体积, $V = (\pi/6) LW^2$ (W 为短径、 L 为长径、单位为 cm^3)。利用 qPCR、WB 方法检测新鲜移植瘤组织中各组 PDCD5 的 mRNA 和蛋白表达情况。

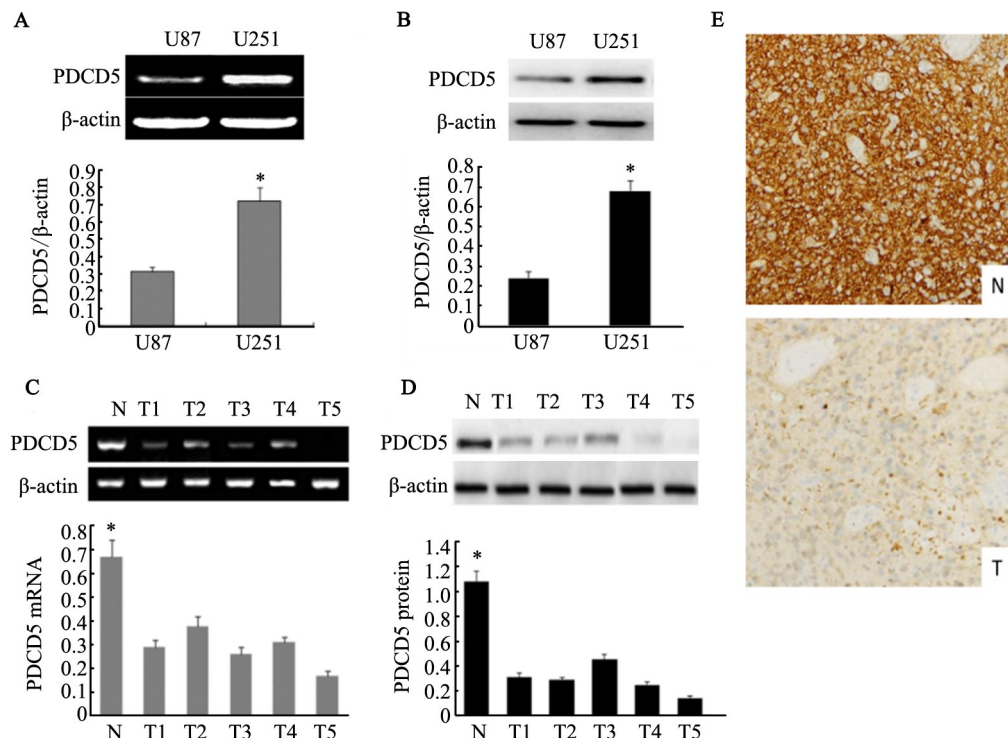
1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验或方差分析, 计数资料以率或百分比表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PDCD5 mRNA 和蛋白在脑神经胶质瘤细胞及组织中的表达

qPCR 检测结果显示, PDCD5 mRNA 在 U87 和 U251 细胞均有不同程度的表达, PDCD5 mRNA 在 U87 细胞中的相对表达量明显低于 U251 细胞 ($P < 0.05$, 图 1A); 与癌旁组织 (N) 比较, PDCD5 mRNA 在原发性脑神经胶质瘤组织中的表达出现不同程度的下调 (T1-T4), 甚至缺失 (T5), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1C)。



A: PDCD5 mRNA expression in U87 and U251 cells ($P < 0.05$ vs U87 cell); B: PDCD5 protein expression in U87 and U251 cells ($P < 0.05$ vs U87 cell); C: PDCD5 mRNA expression in primary cerebral glioma tissues (N: Para-carcinoma tissue, T1-T5: Tumor tissue, $P < 0.05$ vs T1-T5 group); D: PDCD5 protein expression in primary cerebral glioma ($P < 0.05$ vs T1-T5 group); E: PDCD5 protein expression in primary cerebral glioma and para-carcinoma tissue by immunohistochemistry ($\times 200$)

(N: Para-carcinoma tissue, T: Tumor tissue)

图1 PDCD5 mRNA 和蛋白在脑神经胶质瘤细胞和组织中的表达

Fig. 1 mRNA and protein expressions of PDCD5 in brain glioma cells and tissues

WB 检测结果与 qPCR 检测结果一致, PDCD5 蛋白在 U87 中的表达水平明显低于在 U251 中的表达 ($P < 0.05$, 图 1B); 癌旁组织(N)PDCD5 蛋白的表达水平明显高于原发性胶质瘤组织(T1-T4, $P < 0.05$, 图 1D), T5 瘤组织中甚至缺失。

免疫组化检测结果(图 1E)显示, 在癌旁组织中 PDCD5 阳性表达主要位于胶质细胞核及细胞质内, 呈棕黄色及棕褐色颗粒, 其分布表现为明显异质性; 而在脑神经胶质瘤组织中, PDCD5 染色较弱, 甚至呈阴性表达。

2.2 脑神经胶质瘤组织中 PDCD5 的表达与病理参数的关系

按照 WHO 病理分级将 2013 年 1 月至 2014 年 12 月收集的 30 例标本分成高、低级别胶质瘤, qPCR 结果显示, PDCD5 mRNA 相对表达量在高级别脑神经胶质瘤组织中的表达显著低于低级别瘤组织 (0.317 ± 0.025 vs 0.549 ± 0.046 , $P < 0.05$)。免疫组化检测结果显示, 脑神经胶质瘤组织中 PDCD5 蛋白的表达随病理分级升高而降低 ($P < 0.05$), 而与年龄、性别、组织分型无关 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 PDCD5 蛋白在脑神经胶质瘤组织中的表达与临床病理参数间的关系

Tab.2 Relationship between PDCD5 protein expression and clinico- pathological parameters in primary cerebral glioma

Pathological feature	N	PDCD5 expression (n)				U	P
		-	+	++	+++		
Age (t/a)							
<50	69	29	16	19	5	0.71	0.48
≥50	47	16	13	14	4		
Gender							
Male	64	25	19	16	4	0.73	0.46
Female	52	20	10	17	5		
Organizational classification							
Astrocytoma	57	24	15	14	4	1.24	0.74
Glioblastoma multiforme	42	15	12	12	3		
Others	17	6	2	7	2		
Pathological grading							
I-II	71	14	20	29	8	5.38	0.00
III-IV	45	31	9	4	1		
Position							
Frontal lobe	41	17	10	11	3	0.33	0.99
Temporal lobe	30	12	7	9	2		
Occipital lobe	26	10	6	8	2		
Parietal lobe	19	6	6	5	2		

2.3 PDCD5 表达与胶质瘤细胞生长及化疗敏感性的关系

MTT 检测结果(图 2)显示, 当 TMZ 浓度在 0~110 $\mu\text{mol/L}$ 范围时, 随着 TMZ 浓度的升高, U87 和 U251 细胞的相对生存率均随之下降, 且 U251 细胞生存率下降的更为明显, 与 U87 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 当 TMZ 浓度大于 110 $\mu\text{mol/L}$ 时, 两种细胞的生存率变化不大。

2.4 PDCD5 过表达提高 U87 细胞 TMZ 的敏感性

qPCR (图 3A)、WB (图 3B) 检测结果显示, PDCD5 mRNA 和蛋白在转染 pDsRed2-N1-PDCD5 的

细胞 U87-PDCD5 中相对表达量显著高于未转染的 U87 细胞 (均 $P < 0.05$), 说明成功构建高表达 PDCD5 的细胞系 U87-PDCD5。

MTT 法检测结果(图 3C)显示, 当 TMZ 浓度在 0~110 $\mu\text{mol/L}$ 范围时, 随着 TMZ 浓度的升高, U87 和 U87-PDCD5 细胞的相对生存率均随之下降, 且 U87-PDCD5 细胞生存率下降的更为明显, 与 U87 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明其对 TMZ 的敏感性高于 U87。当 TMZ 浓度大于 110 $\mu\text{mol/L}$ 时, 两种细胞的生存率变化不大。

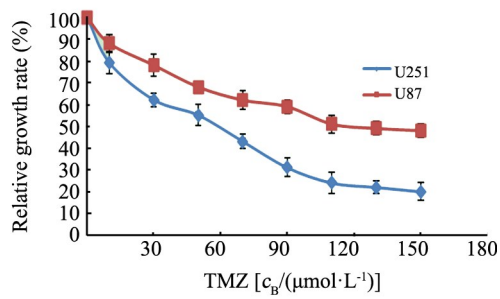
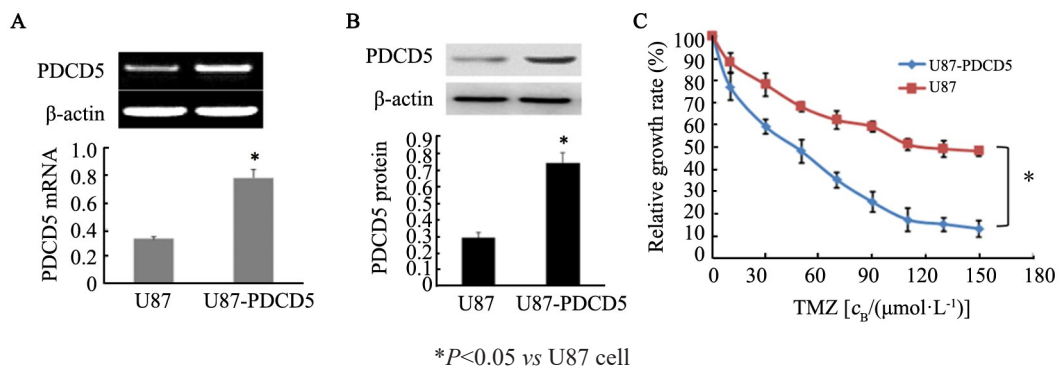


图2 U87、U251细胞在不同浓度TMZ作用下生长曲线
Fig.2 Growth curve of U87 and U251 cells treated by different doses of TMZ

2.5 敲低PDCD5表达降低脑神经胶质瘤细胞对TMZ的敏感性

qPCR(图4A)和WB(图4B)检测结果显示,与对照组比较,转染PDCD5 siRNA后U251和U87-PDCD5细胞内PDCD5 mRNA和蛋白的表达均明显下降(均 $P<0.05$)。

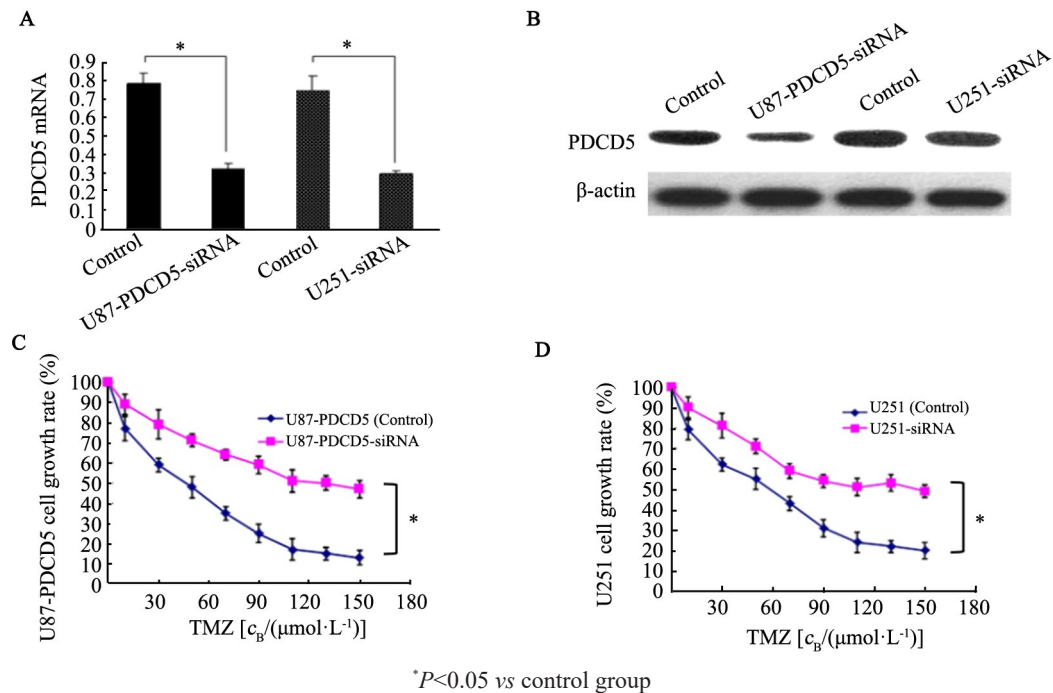
MTT检测结果(图4C、D)显示,随着TMZ浓度的升高,U87-PDCD5-siRNA和U251-siRNA细胞的相对生存率均随之下降,而U87-PDCD5-siRNA、U251-siRNA组细胞的生存率均明显高于对照组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。



A: PDCD5 mRNA expression in U87 cells after PDCD5 siRNA transfection; B: PDCD5 protein expression in U87 cells after PDCD5 siRNA transfection; C: Growth curve of U87 and U87-PDCD5 cells treated by different doses of TMZ

图3 U87-PDCD5细胞对TMZ的敏感性高于U87细胞

Fig.3 U87-PDCD5 cells were more sensitive to TMZ than U87 cells



A: PDCD5 mRNA expression in U87 and U87-PDCD5 cells after transfected with siRNA; B: PDCD5 protein expression in U87 and U87-PDCD5 cells after transfected with siRNA; C: Growth curve of U87-PDCD5 under different doses of TMZ after transfected with siRNA; D: Growth curve of U251 under different doses of TMZ after transfected with siRNA

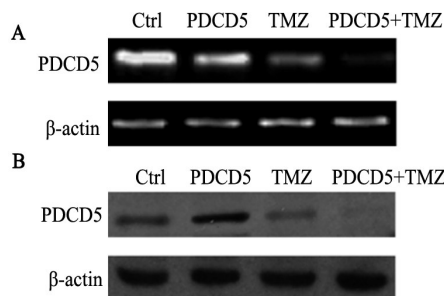
图4 沉默PDCD5促进U251和U87-PDCD5细胞增殖并降低其TMZ敏感性

Fig.4 Silencing PDCD5 promoted proliferation of U251 and U87-PDCD5 cells and reduced their TMZ sensitivity

2.6 过表达PDCD5联合TMZ对脑神经胶质瘤生长的影响

RT-PCR、WB方法检测移植瘤组织PDCD5的表达,结果显示,含PDCD5载体的联合组和PDCD5组PDCD5 mRNA及蛋白的表达高于对照组和TMZ组,表明PDCD5在荷瘤模型体内成功表达(图5)。

动物实验结果显示,联合组肿瘤体积和重量分别为(1.78±0.07) mm³、(0.21±0.03) g,均明显低于对照组的(3.46±0.06) mm³、(0.58±0.04) g, TMZ组的(2.73±0.13)mm³、(0.37±0.06)g和PDCD5组的(2.34±0.11) mm³、(0.34±0.05) g,差异均有统计学意义(均P<0.05)。经两两比较,各组肿瘤体积和重量依次为对照组> TMZ组、PDCD5组>联合组,其中TMZ组、PDCD5组间比较,差异无统计学意义(P>0.05,表3)。



A: PDCD5 mRNA expression detected by RT-PCR;

B: PDCD5 protein expression detected by WB

图5 移植瘤组织中PDCD5 mRNA及蛋白的表达
Fig.5 mRNA and protein expressions of PDCD5 in transplanted tumor tissues

表3 过表达PDCD5和TMZ单独或联合应用对移植瘤生长的影响(̄x±s)

Tab. 3 Effect of PDCD5 over-expression or/and TMZ on the growth of transplanted tumors (̄x±s)

Group	n	Tumor volume (V/mm ³)	Tumor mass (m/g)
Control	5	3.46±0.06	0.58±0.04
TMZ	5	2.73±0.13*	0.37±0.06*
PDCD5	5	2.34±0.11*	0.34±0.05*
TMZ+PDCD5	5	1.78±0.07* ^{△△}	0.21±0.03* ^{△△}

*P<0.05 vs Control group; [△]P<0.05 vs TMZ group; ^{△△}P<0.05 vs PDCD5 group

3 讨论

脑胶质瘤是最常见且恶性程度最高的原发性中枢神经系统肿瘤,其5年的病死率在全身肿瘤中位列第3位,仅次于胰腺癌和肺癌^[8]。术后化疗仍然是目

前主要的辅助手段之一,但化疗药物的毒性及耐药性不仅一定程度上限制其应用,也削弱了其临床疗效^[9]。新型烷化剂TMZ以其毒副作用小、用药耐受性好等优势已成为治疗脑神经胶质瘤的一线药物之一,但仍有部分患者因长时间使用而出现耐药性。有研究^[10]认为,患者肿瘤细胞内分子特性的差异性决定了患者对化疗表现出反应性或耐受性差异性。如何增加化疗药物的敏感性、提高化学药物疗效、降低其对正常组织细胞的毒性,已成为当下肿瘤学研究的热点领域。

随着肿瘤分子生物学的深入,对于高表达耐药基因与肿瘤耐药之间的相关性已基本达成共识。目前,学者尝试根据基因表达水平选择最有效的药物来肿瘤治疗。早期对PDCD5的研究均集中于其在促凋亡中的作用,随着研究的不断深入,其对肿瘤发生、发展过程的更多样的影响引起了国内外学者的关注。有研究^[11]表明与正常子宫内膜组织相比,子宫内膜癌组织内PDCD5蛋白表达明显下调,且其蛋白水平与子宫内膜癌的分化密切相关。QIAO等^[12]发现,胃癌细胞中PDCD5的过表达会引起凋亡,而干扰其表达可抑制凋亡。在白血病细胞中,PDCD5同样发挥抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞凋亡的功能^[13]。由此推测,PDCD5基因在肿瘤组织中的表达情况可以作为反映肿瘤细胞生长状态与肿瘤抗原活性的一个指标。SHI等^[14]进行的体内外实验发现,与单独应用去甲氧柔红霉素(IDR)比较,rhPDCD5蛋白联合IDR可更有效地抑制肿瘤的生长。ZHANG等^[15-16]研究认为,PDCD5的表达在神经胶质瘤的发生、发展过程中起到了重要的作用,且PDCD5的外源性过表达可有效增强顺铂诱导的细胞凋亡,提示PDCD5基因联合化疗治疗胶质瘤的可能性。TMZ是治疗脑神经胶质瘤具有代表性的药物之一^[17]。本研究发现,PDCD5在脑神经胶质瘤中呈低表达或无表达,而转染PDCD5表达载体的U87细胞对TMZ的敏感性增强,且PDCD5过表达能够明显促进TMZ诱导的细胞凋亡。过表达PDCD5的U87细胞对TMZ的敏感性升高,而敲低PDCD5表达后,对TMZ的敏感性降低。在裸鼠皮下脑神经胶质瘤模型中发现,PDCD5、TMZ、PDCD5+TMZ均能不同程度抑制胶质瘤细胞生长,但PDCD5+TMZ抑制胶质瘤生长效果最好,进一步在动物模型体内证明过表达PDCD5能够促进U87移植瘤对TMZ的敏感性。

脑神经胶质瘤的发生、发展是多种癌基因和抑癌基因共同作用的结果,且与机体的免疫状态密切相关,但PDCD5在神经胶质瘤发病机制中的具体作用以及基因治疗的可行性与临床疗效尚无明确结

论。PDCD5可能作为治疗剂提高化疗药物的抗癌的敏感性,但其本身的基因治疗效果尚不明晰,本研究发现,PDCD5在脑神经胶质瘤中呈低表达,过表达PDCD5使U87细胞对TMZ的敏感性升高,证明PDCD5有可能成为脑神经胶质瘤基因治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] WELLER M, VAN DEN BENT M, HOPKINS K, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(9): e395-e403 [2019-05-10]. [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(14\)70011-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(14)70011-7/fulltext). DOI:10.1016/S1470-2045(14)70011-7.
- [2] GULER O C, YILDIRIM B A, ÖNAL C, et al. Retrospective comparison of standard and escalated doses of radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide[J]. *Indian J Cancer*, 2019, 56(1): 59-64. DOI: 10.4103/ijc.IJC_128_18.
- [3] STUPP R, MASON W P, VAN DEN BENT M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996. DOI: 10.1056 / NEJMoa043330.
- [4] ZHAO H, PENG C, LU X, et al. PDCD5 inhibits osteosarcoma cell metastasis via targeting TGF- β 1/Smad signaling pathway and is associated with good prognosis [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 1116-1128.
- [5] CHOI H, CHOI Y, PARK E S, et al. Programmed cell death 5 mediates HDAC3 decay to promote genotoxic stress response[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7390[2019-05-10]. <https://www.nature.com/articles/ncomms8390>. DOI:10.1038/ncomms8390.
- [6] LI H Y, ZHANG X, SONG X G, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9): 822-830. DOI: 10.4161/cbt.20565.
- [7] XU H Y, CHEN Z W, PAN Y M, et al. Transfection of PDCD5 effect on the biological behavior of tumor cells and sensitized gastric cancer cells to cisplatin-induced apoptosis[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(7): 1847-1856. DOI:10.1007/s10620-012-2090-y.
- [8] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, FULOP J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012[J/OL]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(Suppl 4): iv1-iv62[2019-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623240/>. DOI:10.1093/neuonc/nov189.
- [9] PANG L, ZHU Y, QIN J, et al. Primary M1 macrophages as multifunctional carrier combined with PLGA nanoparticle delivering anticancer drug for efficient glioma therapy[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1922-1931. DOI:10.1080/10717544.2018.1502839.
- [10] ZHU D H, TU M, ZENG B, et al. Up-regulation of miR-497 confers resistance to temozolomide in human glioma cells by targeting mTOR/Bcl-2[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(2): 452-462. DOI: 10.1002/cam4.987.
- [11] GAO M, GAO W, WANG Z Y, et al. The reduced PDCD5 protein is correlated with the degree of tumor differentiation in endometrioid endometrial carcinoma[J/OL]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 988[2019-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4937001/>. DOI:10.1186/s40064-016-2698-z.
- [12] QIAO F C, GONG P H, SONG Y W, et al. Downregulated PITX1 modulated by MiR-19a-3p promotes cell malignancy and predicts a poor prognosis of gastric cancer by affecting transcriptionally activated PDCD5[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2215-2231. DOI:10.1159/000489590.
- [13] LI P H, FEI H X, WANG L H, et al. PDCD5 regulates cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 1177-1183. DOI:10.3892/ol.2017.7401.
- [14] SHI L, SONG Q S, ZHANG Y M, et al. Potent antitumor activities of recombinant human PDCD5 protein in combination with chemotherapy drugs in K562 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 224-230. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.04.068.
- [15] ZHANG X, WANG X Y, SONG X G, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 353-358. DOI:10.3892/or.2010.1103.
- [16] LI H Y, ZHANG X, SONG X G, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9): 822-830. DOI: 10.4161/cbt.20565.
- [17] GUNTUKU L, NAIDU V G, YERRA V G. Mitochondrial dysfunction in gliomas: pharmacotherapeutic potential of natural compounds[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(6): 567-583.

[收稿日期] 2019-05-05

[修回日期] 2019-07-25

[本文编辑] 黄静怡