

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.12.1503

· 论 著 ·

CCND1 表达沉默促进胶质母细胞瘤细胞株对替莫唑胺的敏感性

赵 玮^{1,2Δ}, 张丹枫^{1Δ}, 王君玉^{1*}, 董 艳¹, 吴小军¹, 胡国汉¹, 骆 纯¹, 卢亦成¹

1. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海市神经外科研究所, 上海 200003

2. 火箭军总医院普外科, 北京 100088

[摘要] **目的** 利用已构建的 *CCND1* 表达沉默及过表达的人源性胶质母细胞瘤细胞株 SHG-44, 筛选能够与 *CCND1* 协同抑制胶质母细胞瘤细胞增殖的化学治疗药物。 **方法** 用蛋白质印迹法检测 *CCND1* 表达沉默及过表达的人源性胶质母细胞瘤细胞株 SHG-44 中多药耐药基因 *MDR1* 的表达产物 P-糖蛋白(P-gp)及凋亡因子 Bcl-2、Caspase-3 的表达。使用卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、替莫唑胺(TMZ) 3 种化学治疗药物分别处理 *CCND1* 过表达或表达沉默的 SHG-44 细胞, 筛选能够与 *CCND1* 表达沉默协同抑制肿瘤细胞生长的化学治疗药物, 并在人源性胶质母细胞瘤细胞株系 U251 中进一步验证。 **结果** 蛋白质印迹结果显示 *CCND1* 表达沉默能够下调 P-gp、Bcl-2 的表达, 上调 Caspase-3 的表达(P 均 <0.01)。BCNU (0.05、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、CCNU (20、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 *CCND1* 过表达或表达沉默的 SHG-44 细胞的第 2、3、4、5 天时, 细胞生长曲线的差异均无统计学意义; 而在药物处理后细胞培养的第 4、5 天, *CCND1* 表达沉默 SHG-44 细胞的生长受到 TMZ (9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的抑制作用较亲代 SHG-44 细胞强($P<0.05$)。U251 细胞实验证实 *CCND1* 表达沉默促进 TMZ 的化学治疗敏感性。 **结论** *CCND1* 表达沉默联合 TMZ 较两者单独作用能更有效地抑制人源性胶质母细胞瘤细胞株 SHG-44 的增殖, 提示 *CCND1* 可能参与 TMZ 化学治疗耐药机制。

[关键词] 细胞周期蛋白 D1 基因; 胶质母细胞瘤; 替莫唑胺; 多药耐药性**[中图分类号]** R 73⁻36; R 969.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)12-1503-05

CCND1 silencing promotes chemosensitivity of glioblastoma cell lines to temozolomide

ZHAO Wei^{1,2Δ}, ZHANG Dan-feng^{1Δ}, WANG Jun-yu^{1*}, DONG Yan¹, WU Xiao-jun¹, HU Guo-han¹, LUO Chun¹, LU Yi-cheng¹

1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Institute of Shanghai Neurosurgical Research, Shanghai 200003, China

2. Department of General Surgery, General Hospital of Rocket Force of PLA, Beijing 100088, China

[Abstract] **Objective** To screen chemotherapeutic drugs that can synergistically inhibit the proliferation of glioblastoma cells with *CCND1* by constructing *CCND1*-silenced and overexpressed human glioblastoma cell lines SHG-44. **Methods** SHG-44 cells with *CCND1* silenced or overexpressed were constructed, and the expression of P-glycoprotein (P-gp, expression product of multidrug resistance gene *MDR1*) and apoptotic factors (Bcl-2, Caspase-3) in the cells were detected by Western blotting. The SHG-44 cells with *CCND1* silenced or overexpressed were cultured with carmustine (BCNU), lomustine (CCNU) and temozolomide (TMZ), respectively; and then the available chemotherapeutic drugs were screened, which could synergistically inhibit the proliferation of tumor cells with *CCND1* silencing. Human glioblastoma cell lines U251 were used to verify the findings in SHG-44 cells. **Results** Western blotting analysis showed that *CCND1* silencing significantly down-regulated the expressions of *MDR1* and Bcl-2, and up-regulated the expression of Caspase-3 (all $P<0.01$). There were no significant differences in cell growth curves between the *CCND1*-silenced cells treating with BCNU (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CCNU (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2, 3, 4, and 5 days; However, the proliferation of *CCND1*-silenced SHG-44 cells was significantly inhibited by TMZ (9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared with parent SHG-44 cells on the 4th and 5th day after treatment ($P<0.05$). The findings that *CCND1* silencing promoted chemosensitivity of TMZ were confirmed by U251 cell experiments. **Conclusion** *CCND1* silencing combined with TMZ is more effective in inhibiting the proliferation of human glioblastoma cell lines SHG-44 than

[收稿日期] 2017-05-22 **[接受日期]** 2017-09-29**[作者简介]** 赵 玮, 硕士, 副主任医师. E-mail: 951287951@qq.com; 张丹枫, 博士生, 主任医师. E-mail: dfzhangsmmu@163.com

Δ共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885688, E-mail: jerome2008@163.com

CCND1 silencing or TMZ alone, suggesting that CCND1 may be involved in chemotherapeutic resistance of glioblastoma cells to TMZ.

[Key words] cyclin D1 gene; glioblastoma; temozolomide; multiple drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(12): 1503-1507]

脑胶质瘤是常见的中枢神经系统肿瘤,恶性程度高。近年来,关于胶质瘤发生、发展及治疗的研究较多,并取得了一定的成果。但其治疗临床上仍主要采用手术、放射治疗、化学治疗等综合治疗,复发率高。目前发现原发性和复发性胶质瘤均伴有原癌基因激活和抑癌基因突变或缺失,且相关基因的突变不仅参与了肿瘤的发生、发展,还可能参与了肿瘤化学治疗耐药性的发生。在脑胶质瘤的治疗过程中,化学治疗耐药现象较为普遍,但具体机制目前尚不清楚。

基因芯片技术是通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法。本课题组前期通过基因芯片技术在不同生存期的胶质母细胞瘤患者中筛选出表达差异的基因,应用生物信息学技术深入分析,发现了 29 个化学治疗敏感性相关基因,CCND1 基因即为其中之一^[1]。CCND1 基因的主要功能是调节细胞周期从 G₁ 期向 S 期过渡,其表达产物细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 水平异常会影响细胞周期,并与多种肿瘤的化学治疗耐药性相关^[2]。人胶质瘤细胞中存在 CCND1 基因表达异常,且其表达产物 Cyclin D1 水平与星形胶质细胞瘤的恶性程度密切相关^[3-4]。研究显示,Cyclin D1 过表达可以增加人纤维肉瘤 HT1080 细胞对甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 的耐药性^[5];而在人胰腺癌 BxPC3 细胞中其表达异常能够促进肿瘤细胞增殖、干扰化学治疗药物诱导的凋亡,最终导致肿瘤细胞对化学治疗药物耐受^[6]。另一方面,CCND1 表达沉默可以通过抑制耐药基因的表达、促进肿瘤细胞凋亡等增加肿瘤细胞对米托蒽醌、依托泊苷 (VP16)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 和顺铂等化学治疗药物的敏感性^[7-10]。可见 CCND1 基因表达水平异常与多种肿瘤化学治疗耐药相关,但 CCND1 基因表达异常与脑胶质瘤化学治疗敏感性之间的关系少有研究。本研究拟检测 CCND1 表达沉默对胶质母细胞瘤细胞株 SHG-44 和 U251 化学治疗敏感性的影响,筛选与 CCND1 表达沉默具有协同作用的化学治疗药物,为后期深入研究 CCND1 表达沉默

与化学治疗药物敏感性的关系提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂 自中国科学院上海细胞库购买人源性胶质母细胞瘤细胞株 SHG-44 及 U251,于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养液,5% CO₂、37 °C、饱和湿度的条件下培养。小鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体 (sc-130307)、兔抗 β-actin 多克隆抗体 (sc-130656)、小鼠抗 P-糖蛋白 (P-gp) 单克隆抗体 (sc-59593) 和羊抗 Caspase-3 多克隆抗体 (sc-1225) 均购自美国 Santa Cruz 公司。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]、卡莫司汀 (carmustine, BCNU)、洛莫司汀 (lomustine, CCNU) 和替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 均购自美国 Sigma 公司。

1.2 CCND1 表达沉默或过表达 根据本课题组前期 CCND1 表达沉默和过表达研究方法^[11-12],采用慢病毒载体系统 (LVTHM 载体,美国 Invitrogen 公司) 构建 Lenti-shRNA、Lenti-CCND1 和 Lenti-GFP 表达载体。

1.3 蛋白质印迹法 收集亲代 SHG-44 细胞、对照组 (Lenti-GFP)、CCND1 过表达组 (Lenti-CCND1) 和 CCND1 表达沉默组 (Lenti-shRNA) 对数生长期细胞,根据文献^[3]方法提取蛋白并定量、电泳、转膜、封闭、标记一抗和二抗、洗膜、显色、扫膜。一抗包括抗 Bcl-2 一抗 (1 : 1 000 稀释)、抗 β-actin 一抗 (1 : 1 000 稀释)、抗 P-gp 一抗 (1 : 1 000 稀释) 和抗 Caspase-3 一抗 (1 : 1 000 稀释)。

1.4 MTT 实验 采用 0.25% 胰酶消化生长良好的 SHG-44 细胞,配制单细胞悬液,调细胞密度为 2 × 10⁴ /mL,然后取 180 μL 细胞悬液接种至 96 孔板,每株细胞设 3 个实验孔。于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h,然后 3 孔分别加入 20 μL BCNU、CCNU、TMZ 继续培养。设置药物浓度为 BCNU 0.05、0.25 μg/mL,CCNU 20、80 μg/mL 及 TMZ 9.1 μg/mL。各组每个条件均设 3 个复孔。

细胞培养 48 h 后, 每天取 1 块 96 孔板行 MTT 实验: (1) 弃去培养液, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液和 180 μL 新鲜培养液, 混匀; (2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 4 h; (3) 弃去反应液, 每孔添加 150 μL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO); (4) 振荡 10 min 使反应液溶解混匀; (5) 使用酶标仪读取 570 nm 处的光密度 (D) 值, 连续检测 5 d, 绘制细胞生长曲线。

1.5 统计学处理 数据分析采用 SPSS 19.0 软件。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 CCND1 表达沉默及过表达对 P-gp、Bcl-2 和 Caspase-3 的影响 与亲代 SHG-44 细胞和对照组细胞相比, CCND1 过表达组细胞多药耐药 1 (multidrug resistance 1, MDR1) 基因表达产物 P-gp

和凋亡因子 Bcl-2 的表达水平均增高, Caspase-3 的表达水平降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而 CCND1 表达沉默组细胞 P-gp 和 Bcl-2 表达水平均降低, Caspase-3 表达升高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见图 1。

2.2 化学治疗药物对 CCND1 表达沉默的 SHG-44 细胞生长曲线的影响 由图 2 可见, 各浓度 BCNU、CCNU 处理 SHG-44 细胞的第 2、3、4、5 天, CCND1 表达沉默组、对照组细胞及亲代 SHG-44 细胞的生长曲线差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。而 9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TMZ 处理细胞的第 4、5 天, CCND1 表达沉默组 SHG-44 细胞的生长被抑制, 与对照组细胞和亲代 SHG-44 细胞相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结果表明 CCND1 表达沉默可能与 TMZ 对 SHG-44 细胞的生长有协同抑制作用, 而 BCNU、CCNU 则无此协同作用。

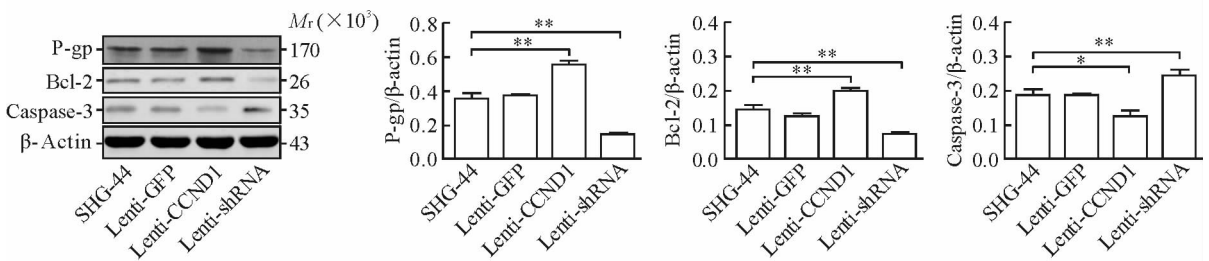


图 1 CCND1 表达沉默和过表达对 MDR1 基因表达产物 P-gp 和 Bcl-2、Caspase-3 蛋白质表达的影响

Fig 1 Effects of CCND1 silencing and overexpression on MDR1 gene expression product P-gp and Bcl-2, Caspase-3 protein expressions

MDR1: Multidrug resistance 1; P-gp: P-glycoprotein; Bcl-2: B-cell lymphoma-2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

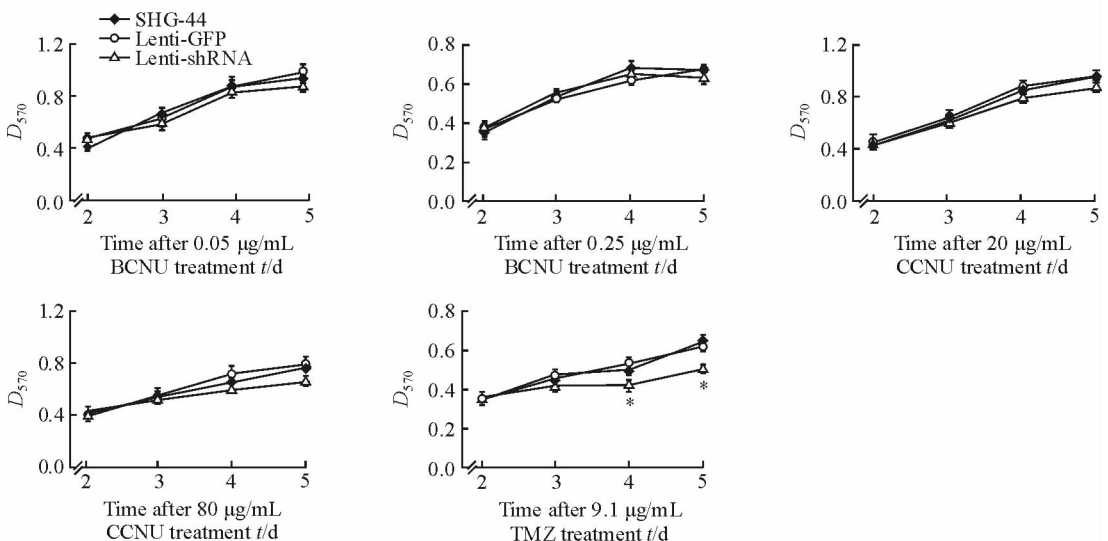


图 2 BCNU、CCNU 和 TMZ 对 CCND1 表达沉默的 SHG-44 细胞生长曲线的影响

Fig 2 Effects of BCNU, CCNU and TMZ on growth curves of CCND1-silenced SHG-44 cells

BCNU: Carmustine; CCNU: Lomustine; TMZ: Temozolomide. * $P < 0.05$ vs SHG-44 and Lenti-GFP groups at the same time point. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 *CCND1* 表达沉默促进 U251 细胞对 TMZ 的治疗敏感性 为进一步明确 *CCND1* 表达沉默在其他胶质母细胞瘤细胞株中能否促进 TMZ 的治疗敏感性,本研究以 U251 细胞 IC₅₀ 浓度(9.1 μg/mL)的 TMZ 处理 *CCND1* 表达沉默组、对照组和亲代人胶质母瘤细胞株 U251 细胞,并绘制细胞生长曲线。结果(图 3)显示, *CCND1* 表达沉默联合 TMZ 共同作用较 *CCND1* 表达沉默或 TMZ 单独作用能更有效地抑制 U251 细胞的增殖,差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。

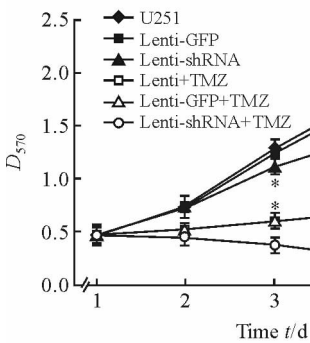


图 3 *CCND1* 表达沉默促进 U251 细胞对 TMZ 的治疗敏感性

Fig 3 *CCND1* silencing promotes chemosensitivity of U251 cell lines to TMZ

TMZ: Temozolomide. * $P<0.05$ vs U251 and Lenti-GFP groups at the same time point; $\Delta P<0.05$ vs Lenti-shRNA and TMZ groups at the same time point. $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

为深入研究 *CCND1* 表达水平异常与脑胶质瘤化学治疗敏感性之间的关系,本研究构建了 *CCND1* 表达沉默和过表达胶质母细胞瘤细胞株模型。蛋白质印迹法检测结果发现 *CCND1* 表达沉默可以下调 *MDR1* 表达产物 P-gp 的表达,而 *CCND1* 过表达则上调 P-gp 的表达。表明 *CCND1* 表达水平异常可能参与胶质母细胞瘤细胞株化学治疗耐药的相关机制。由于不同化学治疗药物作用的分子机制不同,本研究选用脑胶质瘤治疗中常用的 3 种化学治疗药物,筛选可与 *CCND1* 表达沉默协同促进肿瘤细胞化学治疗敏感性的药物。

通过 MTT 实验并绘制细胞生长曲线发现,在不同浓度 BCNU 和 CCNU 的作用下,SHG-44 亲代细胞株与 *CCND1* 沉默表达细胞株的生长无明显差别。而与上述 BCNU、CCNU 不同, TMZ 则能有效抑制 SHG-44 细胞的增殖。

为进一步研究在其他胶质母细胞瘤细胞株中, *CCND1* 表达沉默能否促进 TMZ 化学治疗的敏感性,本研究以 U251 细胞株 IC₅₀ 浓度的 TMZ 处理 *CCND1* 过表达或表达沉默的 U251 细胞,并绘制细胞生长曲线,结果表明 *CCND1* 表达沉默联合 TMZ 作用比 *CCND1* 表达沉默或者 TMZ 单独对 U251 细胞增殖的抑制作用更加明显。

综上所述, *CCND1* 表达沉默可以促进胶质母细胞瘤对 TMZ 的化学治疗敏感性。其可能机制: (1)通过调节 P-gp 的表达水平促进肿瘤细胞对 TMZ 的化学治疗敏感性。研究表明 TMZ 是 P-gp 的作用底物之一^[13]。 *CCND1* 表达沉默使 SHG-44 细胞中 P-gp 的表达下调,从而增加了细胞内 TMZ 的有效浓度,加强了 TMZ 对肿瘤细胞的杀伤作用。(2)通过调节凋亡因子的表达水平促进肿瘤细胞对 TMZ 的化学治疗敏感性。 *CCND1* 表达沉默通过下调 Bcl-2、上调 Caspase-3 表达水平促进肿瘤细胞凋亡。此外, TMZ 也能够通过调控 Bcl-2 和 Caspase-3 等的表达水平诱导肿瘤细胞凋亡^[14-16]。因此, *CCND1* 表达沉默可能通过改变 Bcl-2、Caspase-3 等的表达水平促进肿瘤细胞对 TMZ 的化学治疗敏感性。

[参考文献]

[1] ZHAO Z, LIU Y, HE H, CHEN X, CHEN J, LU Y C. Candidate genes influencing sensitivity and resistance of human glioblastoma to Semustine [J]. Brain Res Bull, 2011, 86(3/4): 189-194.

[2] MOTOKURA T, BLOOM T, KIM H G, JÜPPNER H, RUDERMAN J V, KRONENBERG H M, et al. A novel cyclin encoded by a *bc11*-linked candidate oncogene [J]. Nature, 1991, 350: 512-515.

[3] LIU X, WANG F, LIN T, WANG T, ZHANG W, LI B, et al. MicroRNA-520b affects the proliferation of human glioblastoma cells by directly targeting cyclin D1 [J]. Tumour Biol, 2016, 37: 7921-7928.

[4] ZHANG K, PANG B, XIN T, HOU X, JIA J, FENG B, et al. Increased signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and decreased cyclin D1 in recurrent astrocytic tumours compared with paired primary astrocytic tumours [J]. J Int Med Res, 2011, 39: 2103-2109.

[5] YOON D K, JEONG C H, JUN H O, CHUN K H,

- CHA J H, SEO J H, et al. AKAP12 induces apoptotic cell death in human fibrosarcoma cells by regulating CDKI-cyclin D1 and caspase-3 activity [J]. *Cancer Lett*, 2007, 254: 111-118.
- [6] DEHARVENGT S J, GUNN J R, PICKETT S B, KORC M. Intratumoral delivery of shRNA targeting cyclin D1 attenuates pancreatic cancer growth [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17: 325-333.
- [7] YUAN C, ZHU X, HAN Y, SONG C, LIU C, LU S, et al. Elevated HOXA1 expression correlates with accelerated tumor cell proliferation and poor prognosis in gastric cancer partly via cyclin D1 [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 15. doi: 10.1186/s13046-016-0294-2.
- [8] MENG Y, ZHANG C, ZHOU X. Association between the Cyclin D1 G870A polymorphism and the susceptibility to and prognosis of upper aerodigestive tract squamous cell carcinomas; an updated meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 367-376.
- [9] GUO L, LIU S, JAKULIN A, YILAMU D, WANG B, YAN J. Positive expression of cyclin D1 is an indicator for the evaluation of the prognosis of breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 18656-18664.
- [10] QIE S, DIEHL J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94: 1313-1326.
- [11] WANG J, WANG Q, CUI Y, LIU Z Y, ZHAO W, WANG C L, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells [J]. *J Neurooncol*, 2012, 106: 473-484.
- [12] 崔勇, 陈静, 王君玉, 王麒, 胡国汉, 骆纯, 等. AKT2 基因短发夹结构 RNA 慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11: 1413-1416.
- [13] ALBRECHT C, HOSINER S, TICHY B, ALDRIAN S, HAJDU S, NÜRNBERGER S. Comparison of lentiviral packaging mixes and producer cell lines for RNAi applications [J]. *Mol Biotechnol*, 2015, 57: 499-505.
- [14] SCHAICH M, KESTEL L, PFIRRMANN M, ROBEL K, ILLMER T, KRAMER M, et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20: 175-181.
- [15] OCHS K, KAINA B. Apoptosis induced by DNA damage *O*⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5815-5824.
- [16] ROOS W P, BATISTA L F, NAUMANN S C, WICK W, WELLER M, MENCK C F, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion *O*⁶-methylguanine [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 186-197.

[本文编辑] 杨亚红