

干扰素- α/β 体外增敏替莫唑胺对 MGMT 阳性 胶质瘤干细胞作用

沈 冬, 仇志坤, 陈银生, 陈芙蓉, 陈忠平*

(1.中山大学肿瘤防治中心//华南肿瘤学国家重点实验室 神经外科/神经肿瘤科, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨干扰素是否能增加替莫唑胺(TMZ)对 O⁶ 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT)阳性胶质瘤干细胞的抗肿瘤作用及其可能机制。【方法】采用“悬浮克隆球形成法”对常规培养条件下 MGMT 阴性表达的胶质瘤细胞株 U251、SKMG-4 进行诱导,获得 MGMT 阳性的胶质瘤干细胞 U251G、SKMG-4G;应用 CCK-8 法检测干扰素- α 和干扰素- β 联合替莫唑胺对 MGMT 阳性胶质瘤干细胞的杀伤效应;分别应用逆转录 PCR (RT-PCR)、Western-blot 检测干扰素- α/β 作用后, MGMT 阳性胶质瘤干细胞 MGMT、NF- κ B 表达的变化。【结果】应用悬浮克隆球形成法,成功将 U251、SKMG-4 诱导为具有干细胞特征的胶质瘤干细胞 U251G、SKMG-4G, Western-blot 检测显示胶质瘤干细胞中 MGMT 蛋白表达明显增高。对 MGMT 阳性胶质瘤干细胞生长抑制实验显示, 干扰素- α/β 作用后提高了替莫唑胺的化疗敏感性, 杀伤效应显著增强;RT-PCR、Western-blot 检测结果表明, 干扰素- α/β 作用后, MGMT 阳性胶质瘤干细胞 NF- κ B、MGMT 在 mRNA 及蛋白水平表达均明显降低。【结论】对于 MGMT 阳性的胶质瘤干细胞, 干扰素- α/β 能够显著增加替莫唑胺的抗肿瘤效应, 其机制可能是干扰素- α/β 干预后, 下调 NF- κ B 的表达, 从而降低了 MGMT 的转录表达, 逆转替莫唑胺的化疗耐药。

关键词: MGMT; 胶质瘤干细胞; 替莫唑胺; 干扰素- α/β ; 化疗耐药

中图分类号: R73-36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)03-0368-05

Interferon- α/β Enhance Temozolomide Activity against MGMT-positive Glioma Stem Cells in Vitro

SHEN Dong^{1,2}, QIU Zhi-kun^{1,2}, CHEN Yin-sheng^{1,2}, CHEN Fu-rong^{1,2}, CHEN Zhong-ping^{1,2*}

(1.Department of Neurosurgery/Neuro-oncology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2.State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 O⁶ methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) is one of the main mechanisms of chemoresistance for alkylating agents in malignant glioma. Recent studies showed that glioma stem cells (GSC) was the main cause for tumor recurrence and chemoresistance. This study aimed to explore the effects of interferon- α/β against MGMT-positive glioma stem cells, and to investigate whether Interferon- α/β can enhance the efficiency of temozolomide and the possible mechanism. 【Methods】 Glioma cell line U251 and SKMG-4, MGMT-negative in conventional culture, were induced through serum-free clone culture to get MGMT-positive GSC U251G and SKMG-4G. CCK-8 assay was used to test the growth inhibition effect of temozolomide with interferon- α/β against the MGMT-positive GSC. RT-PCR and Western blot analysis were applied to detect the MGMT and NF- κ B expression in MGMT-positive GSC administered by interferon- α/β . 【Results】 GSC were successfully obtained from two parental glioma cell lines U251 and SKMG-4, and MGMT expression in GSC was significantly increased determined by Western blot analysis. The chemotherapy sensitivity of temozolomide was significantly enhanced by using interferon- α/β in vitro. The expression of NF- κ B and MGMT in MGMT-positive GSC decreased significantly in both mRNA and protein levels after using interferon- α/β through RT-PCR and Western-blot tests. 【Conclusion】 As to MGMT-positive GSC, interferon- α/β can enhance the sensitivity of temozolomide, and down-regulate NF- κ B expression, lower MGMT transcription expression and reverse the chemoresistance of temozolomide.

Key words: MGMT; glioma stem cells; temozolomide; interferon- α/β ; drug resistance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3):368-372]

收稿日期: 2011-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(30772551); 广东省自然科学基金(2011B031800178)

作者简介: 沈 冬, 博士研究生, 主治医师, 从事神经系统肿瘤的基础研究及化疗, E-mail: sdshendong@126.com; * 通信作者: 陈忠平, 教授, 博士生导师, E-mail: chenpz57@mail.sysu.edu.cn

恶性胶质瘤对于常规放疗及化疗有高度抵抗,即便术后行替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)同期放化疗,胶质母细胞瘤患者的中位生存期也仅由12.1个月提高到14.6个月^[1],5年生存率仅为9.8%^[2]。国内外临床和实验室的研究表明,胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSC)和O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(O⁶ methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)是导致恶性胶质瘤化疗耐药及肿瘤复发进展的重要原因。文献报道^[3-4]干扰素- α/β (Interferon, IFN)在恶性胶质瘤化疗中具有增敏替莫唑胺的作用,但研究多是基于体外胶质瘤细胞或临床试验,且干扰素增敏的机制尚未完全明确。本研究拟以MGMT表达阳性的GSC为模型,探讨干扰素- α/β 是否能提高替莫唑胺化疗敏感性及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞总RNA提取试剂盒购于北京Tiangen; RT-PCR二步法试剂盒购于日本TaKaRa。MGMT、NF- κ B、GAPDH引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。无胸腺小鼠(athymic nude mice Balb/c),4周龄,雄性,体质量18~20g,由中国科学院上海生命科学研究院上海斯莱克实验动物有限公司提供(SCXK,批准号:沪2002-0003),按SPF(specific pathogen free animals)的标准饲养。小鼠抗人MGMT单克隆抗体购买于美国Invitrogen。小鼠抗人NF- κ B单克隆抗体购买于美国Biovision。小鼠抗人 β -actin抗体和山羊抗鼠IgG抗体均购自于广州碧云天。重组人干扰素 β -1a、重组人干扰素 α -2b购自美国R&D公司。替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)购自于美国Sigma-Aldrich。CCK-8试剂盒购自于日本同仁化学研究所。

1.2 方法

1.2.1 GSC的诱导培养及鉴定 参照Singh等^[5]提出的“悬浮克隆球形成法”。选取人脑胶质瘤细胞U251、SKMG-4培养于已添加100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中,常规换液培养。选取融合率约70%、状态良好的细胞,加入干细胞培养基后培养,显微镜下观察胶质瘤干细胞球形成状况并收集干细胞进行分子标记鉴定和裸鼠移植成瘤试验。

1.2.2 Western-Blot检测胶质瘤细胞及GSC中

MGMT蛋白表达 分别收集胶质瘤细胞U251、SKMG-4及相应诱导得到的U251G、SKMG-4G,提取细胞总蛋白。应用Western-Blot方法检测细胞系及相应干细胞MGMT表达水平。一抗稀释度鼠抗人MGMT抗体4:125,鼠抗人 β -actin抗体1:1 000作为内参照,山羊抗鼠IgG为二抗(1:1 000)。

1.2.3 CCK-8法检测干扰素- α/β 对TMZ的化疗增敏作用 分别将U251G、SKMG-4G制备成单细胞悬液接种于96孔板中,接种密度为5 000个/孔,悬液体积为190 μ L。分为对照组、TMZ单药组、IFN单药组、TMZ+IFN组,每组设3个复孔。24 h后加IFN- α (100 U/mL)或IFN- β (100 U/mL);48 h后加TMZ(500 μ mol/L);96 h后每孔加CCK-8溶液20 μ L,孵育4 h,终止培养。在Multiskan MK3酶联免疫监测仪上选择490 nm波长测定各孔光吸收值,分析各组药物对GSC增殖的影响。

1.2.4 RT-PCR检测干扰素- α/β 作用后GSC中MGMT、NF- κ B mRNA表达水平 分别将U251G、SKMG-4G制备成单细胞悬液接种于6孔板,接种密度为 2×10^5 个/mL。分为对照组、TMZ单药组、IFN单药组、TMZ+IFN组,每组设3复孔。24 h后加IFN- α (100 U/mL)或IFN- β (100 U/mL);48 h后加TMZ(500 μ mol/L);96 h后分别提取各组细胞总RNA。应用逆转录试剂盒RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits(Fermentas)合成cDNA。各取等量cDNA进行PCR反应,凝胶成像系统扫描观察,QuantityOne软件分析结果。

1.2.5 Western-blot检测干扰素- α/β 作用后GSC中MGMT、NF- κ B蛋白表达水平 分别将U251G、SKMG-4G制备成单细胞悬液接种于6孔板,接种密度为 2×10^5 个/mL。分为对照组、TMZ单药组、IFN单药组、TMZ+IFN组,每组设3复孔。24 h后加IFN- α (100 U/mL)或IFN- β (100 U/mL);48 h后加TMZ(500 μ mol/L);96 h后分别提取各组细胞总蛋白。应用Western-blot法检测各组药物处理后GSC表达MGMT、NF- κ B情况。一抗稀释度鼠抗人MGMT抗体4:125,鼠抗人NF- κ B抗体1:50,鼠抗人 β -actin抗体1:1 000作为内参照,山羊抗鼠IgG为二抗(1:1 000)。

1.3 统计学分析

应用QuantityOne分析RT-PCR数据和CORELDRAWX4分析Western Blot数据。采用SPSS16.0统计干扰素- α/β 作用后TMZ对GSC杀

伤的增敏作用,所得数据用表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GSC 培养及鉴定

经过无血清“悬浮克隆球形成法”成功从胶质瘤细胞 U251、SKMG-4 培养得到胶质瘤干细胞 U251G、SKMG-4G,并已在形态学、表面分子标志鉴定及裸鼠成瘤实验中均得以证实^[6]。

2.2 GSC MGMT 蛋白表达水平分析

Western blot 结果显示胶质瘤干细胞 U251G、SKMG-4G MGMT 蛋白为阳性表达;而相应的胶质瘤细胞 U251、SKMG-4 蛋白均为阴性表达(图 1)。

2.3 干扰素- α/β 对 TMZ 的化疗增敏作用分析

在针对 MGMT 表达阳性的 U251G、SKMG-4G 体外杀伤实验中,CCK-8 法检测结果显示:替莫唑胺单药疗效不佳,其杀伤效应均 $< 20\%$;干扰素 α/β 单药显示出一定的抗肿瘤杀伤作用,约 10% 左右。而预先应用干扰素,然后再加入替莫唑胺化疗,其联合杀伤效应显著增强,均高达 60% 左右(见图 2),与 TMZ 单药组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 干扰素 α/β 作用后对 GSCs 中 MGMT、NF- κ B mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 结果显示:预先经过干扰素作用后,U251G、SKMG-4G 表达 NF- κ B mRNA、MGMT mRNA 均降低,联合 TMZ 后表达降低更明显;而 TMZ 单药组 MGMT mRNA 表达有所降低,但对 NF- κ B mRNA 表达影响不大(图 3)。

2.5 干扰素 α/β 作用后对 GSC 中 MGMT、NF- κ B 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明:预先加入干扰素 α/β ,U251G、SKMG-4G 中 MGMT、NF- κ B 蛋白表达均明显降低,联合替莫唑胺后,MGMT 蛋白表达更低,甚至检测不到;而替莫唑胺单药能够降低 MGMT 表达,但是对 NF- κ B 表达影响不明显(图 4)。

3 讨 论

MGMT 是一种 DNA 修复蛋白,能够移除 DNA 上鸟嘌呤 O⁶ 位点的致突变毒性和细胞毒性的烷基加合物,从而保护细胞对抗烷化基团的损害,同时

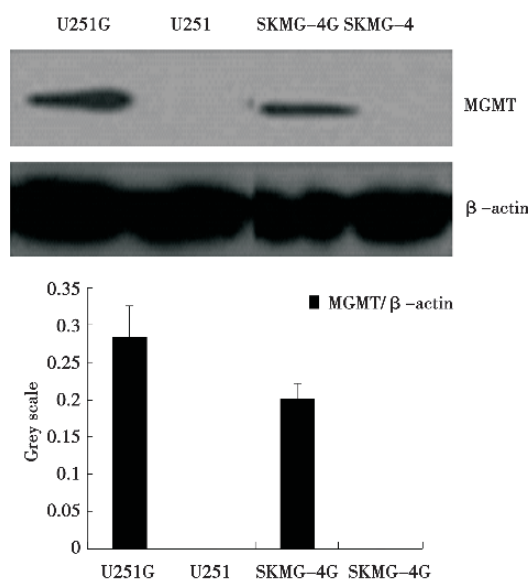


图 1 胶质瘤干细胞与胶质瘤细胞 MGMT 蛋白表达分析
Fig.1 Western blot analysis of MGMT in GSC and glioma cells

Data are the mean $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments

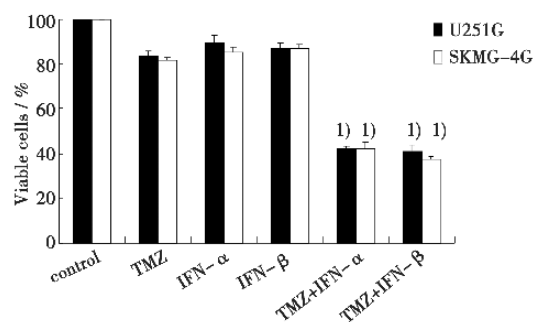


图 2 不同组别药物对 MGMT 阳性胶质瘤干细胞生长抑制作用

Fig.2 The growth inhibition effect of different group drugs against the MGMT-positive GSC

Each bar represents the $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. 1) $P < 0.05$, compared with TMZ alone.

也是肿瘤耐受 TMZ 等烷化剂药物的主要原因。GSC 是脑胶质瘤的起源细胞,也是脑胶质瘤对放化疗产生耐受的根源,在肿瘤的发生、发展过程中起决定性作用^[7]。已有证据表明 GSC 主要通过高表达多药耐药相关基因、上调 DNA 修复酶的表达以及上调抗凋亡蛋白从而对化疗药物耐药^[8]。因此,MGMT 和 GSC 是恶性胶质瘤烷化剂药物耐药的重要靶点。

我们在临床工作中往往碰到这样的病例,患者手术标本常规检测 MGMT 为阴性,临床上用 TMZ 化疗起初有效(甚至达到 CR 后),在随后的

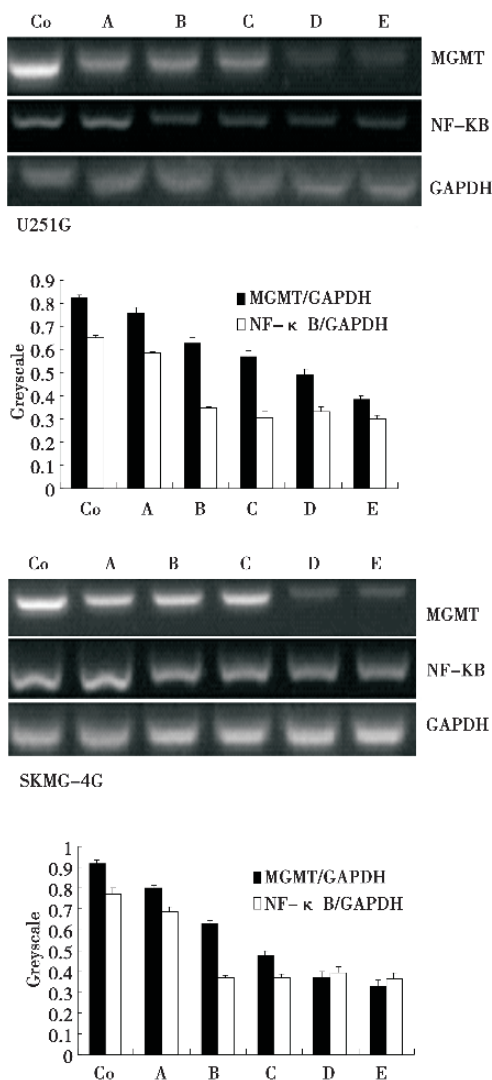


图3 干扰素作用后对胶质瘤干细胞NF- κ B、MGMT mRNA表达的影响

Fig.3 NF- κ B and MGMT mRNA expression in GSCs administered by interferon

The results are representative of three independent experiments. Co; control; A; TMI; B; IFN- α ; C; IFN- β ; D; TMZ+IFN- α ; E; TMZ+IFN- β

观察治疗过程中很快就会产生耐药甚至复发进展。我们设想这会不会是残存的GSC所致? GSC表达MGMT情况如何?假如GSC表达MGMT显著增高,那么我们用针对MGMT的药物能否清除GSC呢?研究结果显示MGMT表达阴性的U251、SKMG-4胶质瘤细胞株,经过干细胞培养后能够得到具有干细胞特征的胶质瘤干细胞U251G、SKMG-4G,且MGMT表达显著升高。这就提示我们,即使常规检查肿瘤MGMT表达呈阴性,其中的少数GSC很可能是MGMT阳性的,或还有其它耐

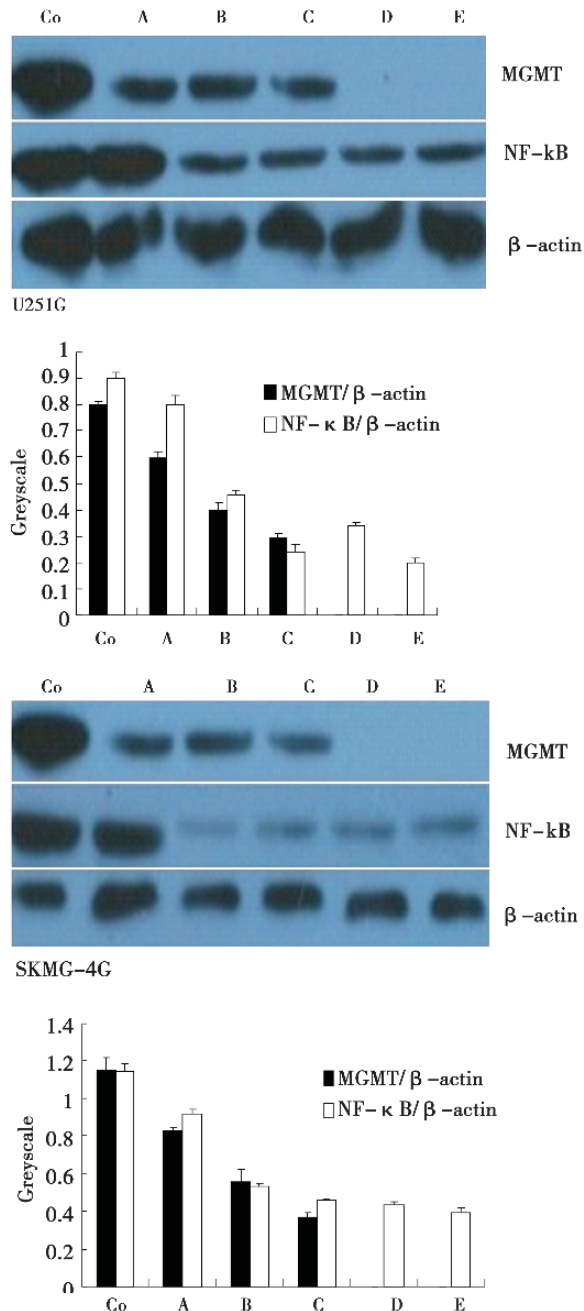


图4 干扰素作用后对胶质瘤干细胞NF- κ B、MGMT蛋白表达的影响

Fig.4 NF- κ B and MGMT protein expression in GSCs administered by Interferon

The results are representative of three independent experiments. Co; control; A; TMI; B; IFN- α ; C; IFN- β ; D; TMZ+IFN- α ; E; TMZ+IFN- β

药基因表达增加了。因此,如何清除这些残存的GSC是防止肿瘤复发的关键。

在针对GSC化疗的研究过程中,我们注意到了国内外研究的热点之一干扰素。干扰素是一类

重要的细胞因子,具有抗病毒、抑制肿瘤生长、抑制血管生成、调节免疫功能等多效生物学功能。Natsume 等^[10]发现 IFN- β 能通过激活 ISGF3 途径增加 P53 基因的转录及表达,从而 MGMT 的表达下调。随后他们用 IFN- β 联合 TMZ 治疗裸鼠移植瘤取得了显著的杀伤效应。Colman 等^[11]研究发现胶质母细胞瘤患者术后常规放疗后,使用 IFN- β 生存明显受益。Motomura 等^[12]的研究提示 MGMT 启动子甲基化和 TMZ+IFN- β 为胶质母细胞瘤的两个独立预测因素。

我们的研究以 MGMT 表达阳性的 GSC (U251G、SKMG-4G) 为模型,探讨干扰素能否对 GSC 起作用,特别是研究对 GSC 的 MGMT 表达有无影响,对替莫唑胺的化疗能否产生增敏效应。结果表明,预先给予干扰素后,GSC 表达 MGMT 明显降低,并能够显著增强替莫唑胺对 GSC 的杀伤效应。此外,我们发现,INF- α 与 IFN- β 作用相当,同样能够增加替莫唑胺的疗效。

在机制研究中,我们检测了核因子 kappa B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B) 和 MGMT。NF- κ B 与癌症的发生、发展及 GSC 的维持有密切的关系。同时还参与化疗损伤修复酶 MGMT 的调节。Lavon 等^[12]指出在人脑胶质瘤细胞株中,NF- κ B 可以诱导 MGMT 蛋白的表达,导致细胞株对烷化剂耐药。我们的研究发现预先加入干扰素作用后,含干扰素药物组 GSC 表达 NF- κ B、MGMT 在 mRNA 及蛋白水平均显著下降,这提示 NF- κ B 与 MGMT 表达呈相关性,与 Lavon 的研究一致,提示干扰素对替莫唑胺化疗增敏的机制可能是通过下调 NF- κ B 转录,从而降低 MGMT 的转录表达。

然而,我们的研究也发现,即便干扰素联合替莫唑胺作用后,GSC 中 MGMT 表达几乎测不到,其杀伤效应也仅 60%左右,提示 MGMT 阳性表达只是 GSC 耐药的重要原因之一,可能存在其他的耐药蛋白、耐药途径。此外,干扰素下调 NF- κ B 转录,调节 MGMT 表达的信号传导机制尚有待于进一步深入的研究。

参考文献:

[1] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
[2] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of

radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466.

- [3] Groves MD, Puduvalli VK, Gilbert MR, et al. Two phase II trials of temozolomide with interferon- α 2b (pegylated and non-pegylated) in patients with recurrent glioblastoma multiforme [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(4): 615-620.
[4] Park JA, Joe YA, Kim TG, et al. Potentiation of antiglioma effect with combined temozolomide and interferon- β [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(6): 1253-1260.
[5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
[6] 仇志坤,沈冬,赛克,等.胶质瘤干细胞样细胞中 MGMT 表达以及与替莫唑胺的耐药关系研究[J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2011, 11(02): 107-114.
[7] Huang Q, Dong J, Zhu YD, et al. Isolation and culture of tumor stem cells from human brain glioma tissues[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2006, 28(8): 331-333.
[8] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma[J]. *Mol Cancer*, 2006, 5(1): 67-69.
[9] Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, et al. IFN- β down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7573-7579.
[10] Colman H, Berkey BA, Maor MH, et al. Phase II Radiation Therapy Oncology Group trial of conventional radiation therapy followed by treatment with recombinant interferon- β for supratentorial glioblastoma: results of RTOG 9710[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(3): 818-824.
[11] Motomura K, Natsume A, Kishida Y, et al. Benefits of interferon- β and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: A multicenter study[J]. *Cancer*, 2011, 117(8): 1721-1730.
[12] Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, et al. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8952-8959.

(编辑 张恩健)