

. 实验研究 .

靶向沉默 Wip1 基因表达对胶质瘤细胞增殖及放疗敏感性的作用

尹 雷 王 鹏 侯崇显 李炎稳 周 东

【摘要】目的 探讨靶向沉默 Wip1 基因表达对脑胶质瘤细胞增殖及放疗敏感性的影响。**方法** 体外培养人胶质瘤细胞株 U251,用携带 Wip1 基因 RNA 干扰载体的慢病毒感染 U251 细胞沉默 Wip1 基因表达,然后对 U251 胶质瘤细胞进行放疗干预。根据对 U251 细胞处理方法分为 4 组:Wip1 基因沉默后放疗组(IR+Wip1 组)、单纯 Wip1 基因沉默组(Wip1 组)、单纯放疗组(IR 组)和 NC 组(空载体病毒感染 U251 细胞)。CCK-8 法检测细胞的增殖,实时定量 PCR 检测细胞 Chk1、Chk2 mRNA 表达,免疫印迹检测细胞 Chk1、Chk2 蛋白表达。**结果** U251 细胞慢病毒感染后 3~4 d,采用荧光显微镜观察,根据绿色荧光蛋白阳性表达判定感染效率,结果显示感染效率均 90% 以上。放疗后 24、48、72、96、120 h,IR 组和 Wip1 组增殖率均显著低于 NC 组($P<0.05$),而 IR+Wip1 组细胞增殖率明显低于 IR 组和 Wip1 组($P<0.05$)。放疗后 24 h,IR+Wip1 组 Chk1 mRNA 表达明显低于 Wip1 组($P<0.05$),明显高于 IR 组和 NC 组($P<0.05$);IR+Wip1 组 Chk2 mRNA 表达明显低于其他 3 组($P<0.05$)。IR+Wip1 组 Chk1 蛋白表达明显低于 IR 组和 NC 组($P<0.05$),Chk2 蛋白表达低于其他 3 组($P<0.05$)。**结论** 靶向沉默 Wip1 基因表达可抑制胶质瘤细胞的增殖,并可能通过抑制 Chk1、Chk2 的蛋白表达增加胶质瘤细胞对放疗的敏感性。

【关键词】 胶质瘤细胞;放疗;Wip1;p53;基因沉默;细胞增殖

【文章编号】 1009-153X(2018)05-0335-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 812

Effect of targeted silencing Wip1 gene on glioma cells proliferation and sensitivity to radiotherapy

YIN Lei^{1,2}, WANG Peng², HOU Chong-xian², LI Yan-wen², ZHOU Dong^{1,2}. 1. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Neurosurgery, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Science, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of targeted silencing of Wip1 gene on glioma cells proliferation and sensitivity to radiotherapy. **Methods** Glioma U251 cells which were cultured were transfected with Wip1 RNAi lentiviral vector. Then the U251 cells were treated with ionizing radiation (IR) and divided into negative control (NC) group, IR group, targeted silencing Wip1 gene (Wip1) group and IR+Wip1 group. The proliferation activities of U251 cells, Chk1 and Chk2 mRNA expressions and Chk1 and Chk2 protein expressions were detected respectively by CCK-8 kit, real time PCR and Western-blot in all the groups. **Results** The proliferation rates in the Wip1 and the IR groups were significantly lower than that in NC group 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the radiotherapy ($P<0.05$). The proliferation rate was significantly lower in the IR+Wip1 group than those in all the other groups 24, 72, 96 and 120 hours after the radiotherapy ($P<0.05$). The level of chk1 mRNA expression was significantly lower in IR+Wip1 group than that in Wip1 group and higher than those in IR and NC groups 24 hours after the radiotherapy ($P<0.05$). The level of chk2 mRNA expression was significantly lower in IR + Wip1 group than those in the other three groups ($P<0.05$).The level of Chk1 protein expression was significantly lower in IR+Wip1 group than those in IR and NC groups 24 hours after the radiotherapy ($P<0.05$). The level of Chk2 protein expression was significantly lower in the IR+Wip1 group than those in the other three groups ($P<0.05$). **Conclusions** It is suggested that targeted silencing Wip1 gene can inhibit the proliferation of glioma cells and may increase the sensitivity of glioma cells to radiotherapy by inhibiting the protein expressions of Chk1 and Chk2.

【Key words】 Glioma; U251 cells; Wip1 gene; Radiotherapy; Silencing; Proliferation; Chk1; Chk2; Expression

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.05.011
基金项目:国家自然科学基金(81201995);广东省医学科研基金(A2017183);广东省自然科学基金(2015A030313532);广东省科技计划项目(2014A020212678)
作者单位:510515 广州,南方医科大学第二临床医学院(尹 雷、周东);510080 广州,广东省人民医院、广东省医学科学院神经外科(尹雷、王 鹏、侯崇显、李炎稳、周 东)
通讯作者:周 东,E-mail:zhoudong5413@163.com

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,预后不佳。Wip1 是一种新型原癌基因,位于人染色体 17q23/q24 区域,是抑癌基因 p53 的负性调控因子,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶家族。研究显示高表达 Wip1 能够促使其作用的下游靶蛋白 Chk1/Chk2、p38MAPK-p53 去磷酸化失活,导致肿瘤的发生^[1]。目前发现,多种肿瘤 Wip1 呈高表达^[2,3]。研究

发现放疗主要是通过电离辐射(ionizing radiation, IR)损伤细胞 DNA,进而激活 p53 使其表达上调并增加稳定性,而 Wip1 表达依赖 p53 的表达上调^[3,4]。因此,我们推测 Wip1 可能对胶质瘤细胞增殖及放疗敏感性有调控作用,沉默 Wip1 基因可增强胶质瘤放疗效果。本文拟采用 RNA 干扰技术沉默 Wip1 基因表达,观察靶向沉默 Wip1 基因对脑胶质瘤细胞增殖作用及放疗敏感性的影响,为胶质细胞瘤的基因治疗提供理论基础和依据。

1 材料和方法

1.1 U251 细胞培养及慢病毒感染 人胶质瘤细胞株 U251 细胞(广州安邦公司)使用 DMEM 高糖培养基置于 37℃、5% CO₂混合气体培养箱中传代培养。慢病毒载体包装及滴度测定参照参考文献[5]。用慢病毒感染细胞使 Wip1 基因表达下降,用荧光显微镜观察感染效率,感染率大于 90%判断为感染成功。使用实时定量 PCR 及蛋白印迹法检测 Wip1 基因沉默效率。

1.2 实验分组 当细胞融合度处于 50%时,对细胞进行放疗,剂量为 8 Gy^[6],使用直线加速器 0°角照射,源皮距 100 cm,照射野 20 cm×20 cm。放疗后继续培养。根据对 U251 细胞处理方法分为 4 组:Wip1 基因沉默后放疗组(IR+Wip1 组)、单纯 Wip1 基因沉默组(Wip1 组)、单纯放疗组(IR 组)和 NC 组(空载体病毒感染 U251 细胞)。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将细胞接种于 96 孔板,

每孔 3×10³个,培养 24 h。放疗后继续培养,终止培养前 2 h 加入 10 μl CCK-8 试剂(日本 Dojindo 公司),2 h 后检测光密度(optical density, OD)值。

1.4 实时定量 PCR 检测 Chk1、Chk2 mRNA 表达 细胞融合度为 50%时,放疗 24 h 后提取 RNA 进行逆转录反应,制备细胞 cDNA。依据试剂盒(日本 Takara 公司)说明书配制反应体系并进行 PCR 反应。β-actin 作为参照基因,检测 Chk1、Chk2 mRNA 表达水平。

1.5 免疫印迹法检测 Chk1、Chk2 蛋白表达 细胞融合度为 50%时,放疗 24 h 后提取细胞总蛋白检测 Chk1、Chk2 蛋白表达,对所得条带进行灰度分析。β-actin 作为内参照。

2 结果

2.1 Wip1 基因沉默效率 U251 细胞慢病毒感染后 3~4 d,采用荧光显微镜观察,根据绿色荧光蛋白阳性表达判定感染效率,结果显示感染效率均 90%以上(图 1)。PCR 及免疫印迹法证实 Wip1 基因在 U251 细胞中被有效沉默^[7]。

2.2 各组 U251 细胞增殖率比较 放疗后 24、48、72、96、120 h,IR 组和 Wip1 组增殖率均显著低于 NC 组($P<0.05$),而 IR+Wip1 组显著低于 IR 组和 Wip1 组($P<0.05$)。见表 1。

2.3 各组 U251 细胞 Chk1、Chk2 mRNA 表达水平比较 Chk1 mRNA 的表达:Wip1 组明显高于 NC 组($P<0.05$),IR 组明显低于 NC 组($P<0.05$);IR+Wip1 组明

表 1 CCK-8 法检测 U251 细胞增殖能力

组别	光密度值					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
IR+Wip1	0.257±0.006	0.270±0.002 [#]	0.334±0.008 [#]	0.430±0.018 [#]	0.558±0.026 [#]	0.828±0.053 [#]
Wip1	0.258±0.004	0.306±0.015 [#]	0.350±0.029 [#]	0.568±0.018 [#]	0.927±0.047 [#]	1.774±0.071 [#]
IR	0.255±0.003	0.304±0.005 [#]	0.463±0.056 [#]	0.772±0.067 [#]	1.141±0.080 [#]	2.203±0.094 [#]
NC	0.260±0.004	0.343±0.020	0.542±0.038	1.017±0.128	1.896±0.087	3.414±0.124

注:与 IR+Wip1 组相应值比,* $P<0.05$;与 NC 组相应值比,# $P<0.05$;IR+Wip1 组. Wip1 基因沉默后放疗组; Wip1 组. 单纯 Wip1 基因沉默组;IR 组. 单纯放疗组;NC 组. 空载体病毒感染 U251 细胞

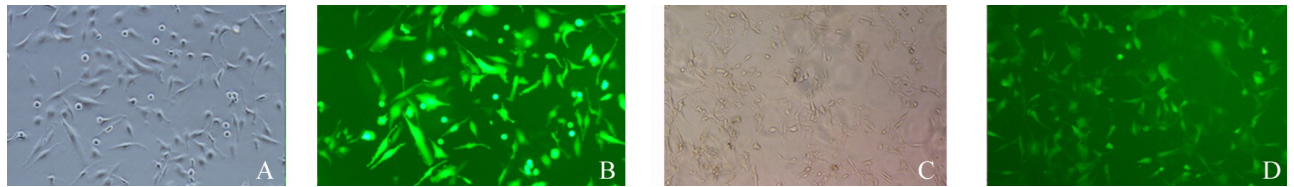


图 1 慢病毒载体感染 U251 细胞后显微镜下观察

A、B. 慢病毒感染的 U251 细胞; C、D. 空载体病毒感染的 U251 细胞; A、B 为同视野, C、D 为同视野; A、C. 为明场条件观察; B、D. 为荧光条件观察绿色荧光蛋白

显低于 Wip1 组($P<0.05$),但明显高于 NC 组和 IR 组($P<0.05$)。Chk2 mRNA 表达:IR 组、Wip1 组均显著低于 NC 组($P<0.05$),而 IR+Wip1 组显著低于 IR 组和 Wip1 组($P<0.05$)。见图 2。

2.4 各组 U251 细胞 Chk1、Chk2 蛋白表达水平比较
Chk1 蛋白表达:IR 组明显高于 NC 组($P<0.05$),而 Wip1 组、IR+Wip1 组均明显低于 NC 组($P<0.05$)。Chk2 蛋白表达:IR+Wip1 组、IR 组、Wip1 组、NC 组依次显著增高($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

Wip1 由 p53 诱导,在多种肿瘤中过表达^[2]。我们的前期研究也发现,Wip1 在胶质瘤细胞中存在过表达,对胶质瘤的恶性增殖具有重要的作用^[7,8]。本研

究发现 IR 和沉默 Wip1 基因表达均可显著降低 U251 细胞的增殖能力,而 IR+Wip1 组细胞的增殖能力又显著低于 IR 组和 Wip1 组,表明靶向沉默 Wip1 基因表达协同放疗可显著降低胶质瘤细胞的增殖能力,增强胶质瘤放疗敏感性。

Wip1 作为一种磷酸酶,可以通过多种途径调节细胞的损伤修复通路。Wip1 的表达不但可以对 p53 进行负反馈抑制,还可以去磷酸化 Chk1、Chk2 而使之失活^[9,10],影响 DNA 损伤后修复^[12,13],进而抑制细胞增殖^[11]。本文结果发现,IR+Wip1 组 Chk1 蛋白表达比 IR 组和 NC 组明显降低,Chk2 蛋白表达也显著降低,Chk1 mRNA 表达明显增高,Chk2 mRNA 表达明显降低。Chk1 mRNA 和蛋白表达不一致,可能和 Chk1 翻译后修饰或转录后调控有关。我们推测,在 U251 细胞,靶向沉默 Wip1 基因表达协同放疗,使 Chk1、Chk2 去磷酸化失活,进而抑制细胞增殖。

胶质瘤放疗抵抗是影响胶质瘤治疗效果的一个重要因素,本研究探索 Wip1 在胶质瘤细胞放疗敏感性及增殖方面的影响,为针对癌基因 Wip1 的靶向治疗胶质瘤提供理论依据。

【参考文献】

[1] Pecháčková S, Burdová K, Macurek L. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy [J]. J Mol Med, 2017, 95(6): 589–599.

[2] Lowe J, Cha H, Lee MO, *et al.* Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 1480–1498.

[3] Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV, *et al.* Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways [J]. Oncotarget, 2016, 7(21): 31563–31571.

[4] Mirzayans R, Andrais B, Scott A, *et al.* Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 22409–22435.

[5] 王 鹏,饶 竞,杨海峰,等.慢病毒介导的 RNA 干扰沉默 Wip1 基因对人脑胶质母细胞瘤细胞生长的影响[J].中华实验外科杂志,2010,27(4):481–483.

[6] Wang XW, Labussiere M, Valable S, *et al.* IDH1(R132H) mutation increases U87 glioma cell sensitivity to radiation therapy in hypoxia [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 198697.

[7] Wang P, Rao J, Yang H, *et al.* PPM1D silencing by lentiviral-mediated RNA interference inhibits proliferation and

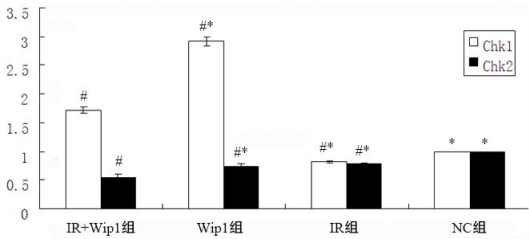


图 2 各组 U251 细胞 Chk1、Chk2 mRNA 表达水平比较与 IR+Wip1 组相应值比,* $P<0.05$;与 NC 组相应值比,# $P<0.05$;IR+Wip1 组. Wip1 基因沉默后放疗组;Wip1 组. 单纯 Wip1 基因沉默组;IR 组. 单纯放疗组;NC 组. 空载体病毒感染 U251 细胞

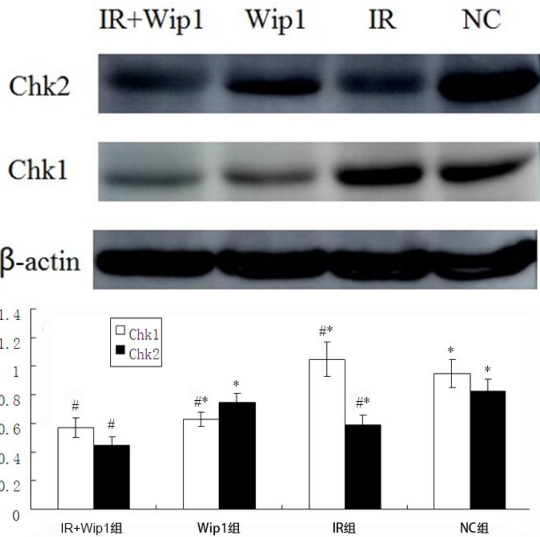


图 3 各组 U251 细胞 Chk1、Chk2 蛋白表达水平比较与 IR+Wip1 组相应值比,* $P<0.05$;与 NC 组相应值比,# $P<0.05$;IR+Wip1 组. Wip1 基因沉默后放疗组;Wip1 组. 单纯 Wip1 基因沉默组;IR 组. 单纯放疗组;NC 组. 空载体病毒感染 U251 细胞

invasion of human glioma cells [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(1): 94-99.

[8] Wang P, Rao J, Yang H, *et al.* Wip1 over-expression correlated with TP53/p14(ARF) pathway disruption in human astrocytomas [J]. J Surg Oncol, 2011, 104(6): 679-684.

[9] Rayter S, Elliott R, Travers J, *et al.* A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D [J]. Oncogene, 2008, 27(8): 1036-1044.

[10] Macurek L, Lindqvist A, Voets O, *et al.* Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gamma H2AX to promote checkpoint inhibition [J]. Oncogene, 2010, 29(15): 2281-2291.

[11] 凌 晖,文 玲,陈真伟,等. Chk1/2 基因沉默对人胃癌 MGC803 细胞增殖及周期的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(7): 481-484.

[12] Yoda A, Xu XZ, Onishi N, *et al.* Intrinsic kinase activity and SQ/TQ domain of Chk2 kinase as well as N-terminal domain of Wip1 phosphatase are required for regulation of Chk2 by Wip1 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24847-24862.

[13] Lu X, Nannenga B, Donehower LA. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints [J]. Genes Dev, 2005, 19(10): 1162-1174.

(2017-10-30 收稿, 2018-03-06 修回)

(上接第 324 页)

总之,左乙拉西坦联合盐酸舍曲林可显著改善癫痫伴抑郁患儿的抑郁症状、癫痫发作频率及认知功能,不影响患儿 BMI;学龄组疗效优于少年组。

【参考文献】

[1] 中国抗癫痫协会. 临床诊疗指南·癫痫病分册(2015 修订版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015.

[2] Fiest KM, Dykeman J, Patten SB, *et al.* Depression in epilepsy: a systematic review and meta-analysis [J]. Neurology, 2013, 80(6): 590-599.

[3] 蔡 伦,秦明芳. 癫痫相关性抑郁的炎症机制研究进展 [J]. 重庆医学, 2016, 45(33): 4716-4718.

[4] 梁艳玲,薛 峥,康慧聪,等. 56 例成年癫痫患者抑郁、焦虑的临床评估及危险因素分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9(1): 31-35.

[5] 杨理明,陈 波,宁泽淑. 常规治疗联合拉莫三嗪对儿童难治性癫痫生活质量的影响[J]. 医学临床研究, 2014, 31(2): 287-289.

[6] 李 峰,薄奇静,赵 燕,等. 重性抑郁障碍病人生活质量及其影响因素[J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(2): 186-191.

[7] 马小云,李 昭,王雪君,等. 左乙拉西坦添加治疗学龄期难治性癫痫患儿认知功能与生活质量的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2016, 42(11): 671-675.

[8] Mehndiratta P, Sajatovic M. Treatments for patients with comorbid epilepsy and depression: a systematic literature review [J]. Epilepsy Behav, 2013, 28(1): 36-40.

[9] Mula M, Sander JW. Suicide and epilepsy: do antiepileptic drugs increase the risk [J]? Expen Opin Drug Saf, 2015, 14(4): 553-558.

[10] Kwong KL, Lam D, Tsui S, *et al.* Anxiety and depression in adolescents with epilepsy [J]. J Child Neurol, 2016, 31(2): 203-210.

[11] 陈 葵,潘映辐. 慢性颞叶癫痫后抑郁的基础研究进展 [J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(16): 4788-4790.

[12] 柴贤亮. 不同发育阶段儿童癫痫的用药特点及不良反应分析[J]. 世界临床医学, 2017, 11(1): 158.

[13] DelBello MP, Goldman R, Phillips D, *et al.* Efficacy and safety of lurasidone in children and adolescents with bipolar depression: a double-blind, placebo-controlled study [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2017, 56(12): 1015-1025.

[14] Eddy CM, Rickards HE, Cavanna AE. The cognitive impact of antiepileptic drugs [J]. Ther Adv Neurol Disord, 2011, 4(6): 385-407.

[15] 王桂云. 舍曲林治疗癫痫伴发轻中度抑郁 50 例临床疗效观察[J]. 临床合理用药, 2012, 5(1B): 60.

[16] 徐 耀,任晓梅,张衍忠,等. 癫痫发作对成年女性患者体质质量及血清瘦素水平的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2012, 25(4): 254-256.

[17] Meier C, Kraenzlin ME. Antiepileptics and bone health [J]. Ther Adv Musculoskel Dis, 2011, 3(5): 235-243.

[18] Harden CL, Pennell PB. Neuroendocrine considerations in the treatment of men and women with epilepsy [J]. Lancet Neurol, 2013, 12(1): 72-83.

(2017-12-19 收稿, 2018-01-12 修回)