

. 实验研究 .

抑制 SSRP1 对胶质瘤细胞增殖、化疗敏感性的影响

陶 祥 张文斐 冀保卫 张 戈 陈治标

【摘要】目的 探讨结构特异性识别蛋白 1(SSRP1)与胶质瘤预后的相关性,以及抑制 SSRP1 对胶质瘤细胞增殖及化疗敏感性的影响。**方法** 应用生信分析方法,检索中国胶质瘤数据库 CGGA 数据集,分析 SSRP1 表达与胶质瘤预后相关性。体外培养胶质瘤 U251、U87 细胞,应用 CBL0137 抑制 SSRP1,应用替莫唑胺(TMZ)检测化疗敏感性。应用 CCK8 法检测细胞增殖,利用免疫印迹法检测 MAPK 信号通路(p-38、ERK 及 JNK)表达。**结果** 生信分析结果显示,胶质瘤 SSRP1 呈高表达,随胶质瘤级别增加,SSRP1 表达明显上调($P<0.05$);SSRP1 高表达胶质瘤总生存期明显缩短($P<0.05$)。抑制 SSRP1,明显抑制体外培养 U251、U87 细胞增殖($P<0.05$),增加 U251、U87 细胞对 TMZ 化疗敏感性($P<0.05$),对 U251、U87 细胞 p-38、ERK 及 JNK 蛋白表达水平无明显影响,但明显降低 U251、U87 细胞 p-38、ERK 及 JNK 蛋白磷酸化水平($P<0.05$)。**结论** 胶质瘤 SSRP1 呈高表达,与病人不良预后有关;抑制 SSRP1,明显抑制胶质瘤细胞增殖,并增加其对 TMZ 的化疗敏感性,其机制可能与抑制 MAPK 信号通路有关。

【关键词】 胶质瘤;结构特异性识别蛋白 1(SSRP1);CBL0137;细胞增殖;U251 细胞;U87 细胞;化疗敏感性;预后

【文章编号】 1009-153X(2022)09-0760-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Effect of inhibition of SSRP1 on glioma cells proliferation and chemosensitivity to temozolomide

TAO Xiang, ZHANG Wen-fei, JI Bao-wei, ZHANG Ge, CHEN Zhi-biao. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between expression of structure specific recognition protein 1 (SSRP1) and prognoses of glioma patients, and the effect of inhibiting SSRP1 on glioma cells proliferation and chemotherapy sensitivity to temozolomide (TMZ). **Methods** The CGGA dataset of China Glioma Database was serched and the correlation between SSRP1 expression and prognosis of glioma patients was analyzed using bioinformatics analysis method. The U251 and U87 cells were cultured in vitro, CBL0137 was used to inhibit SSRP1, and TMZ was used to detect the sensitivity of chemotherapy. Cell proliferation was detected by CCK8 assay, and the expression of MAPK signaling pathway (p-38, ERK and JNK) was detected by Western blotting. **Results** The results of bioinformatics analysis showed that the expression of SSRP1 was high in glioma; the expression of SSRP1 was up-regulated with the increase of glioma grade ($P<0.05$); the overall survival time of glioma patients with high SSRP1 expression was significantly shorter than those with low SSRP1 expression ($P<0.05$). Inhibition of SSRP1 significantly inhibited the proliferation of U251 and U87 cells in vitro ($P<0.05$), increased the sensitivity of U251 and U87 cells to TMZ chemotherapy ($P<0.05$), and had no significant effect on the protein expression levels of p-38, ERK and JNK in U251 and U87 cells ($P>0.05$). However, the phosphorylation levels of p-38, ERK and JNK protein in U251 and U87 cells were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions** The high expression of SSRP1 in glioma is associated with poor prognosis. Inhibition of SSRP1 can significantly inhibit the proliferation of glioma cells and increase their sensitivity to TMZ chemotherapy, which may be related to the inhibition of MAPK signaling pathway.

【Key words】 Glioma; Structure specific recognition protein 1 (SSRP1); CBL0137; Cell proliferation; Chemotherapy; Prognosis

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤。近些年,随着神经外科显微技术、放化疗技术等进展,胶质瘤的治疗取得一定的进步,但其病死率仍居高不下。胶质瘤细胞恶性增殖、对放化疗的抵抗性、复发是导致病人最终死亡的重要原因。胶质瘤发生和进展的分子机制非常复杂,探索其分子机制对开发新

的治疗策略非常重要。结构特异性识别蛋白 1 (structure specific recognition protein 1, SSRP1) 是促进染色质转录复合体形成的亚基。研究表明 SSRP1 主要通过调控核小体的合成与降解,参与 DNA 损伤修复、转录调控、细胞凋亡和周期调控^[1,2]。SSRP1 表达上调与多种肿瘤的不良临床病理特征和恶性预后相关,如结直肠癌^[3,4]、膀胱癌^[5]、肝细胞癌^[6-8]、胃癌^[9]、恶性黑色素瘤^[10]。然而,SSRP1 在胶质瘤中的临床病理学意义和生物功能作用尚不清楚。丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen- activated protein kinase, MAPK) 信号通路在胶质瘤中常常为过度激活状态

[11],与胶质瘤不良预后有关[12]。本文探讨SSRP1与胶质瘤细胞增殖、化疗敏感性的关系,及MAPK信号在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 生信分析 胶质瘤临床资料下载自中国脑胶质瘤基因组计划CGGA(<http://cgga.org.cn/>),包括全外显子序列数据集WEsseq_286,mRNA数据集mRNAsseq_325、mRNAsseq_693和mRNA_array_301(以上原始数据均可在<http://cgga.org.cn/download.jsp>下载)。数据集中包含有性别、年龄、WHO级别及组织学分型、总体生存期(overall survival,OS)、是否放疗、是否化疗、IDH突变情况、1p/19q是否有联合缺失以及相应的基因表达数据。

1.2 细胞培养 人脑胶质瘤细胞系U251、U87细胞[中国科学院(上海)细胞库]培养于含10%胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)的DMEM培养基(美国Gibco公司)培养,每3天一次以含EDTA的0.25%胰酶消化,1:3传代。

1.3 细胞分组 将U251、U87细胞接种96孔板,每孔100 μl(含1×10⁵个细胞),分为SSRP1抑制剂组 and 对照组。SSRP1抑制剂组加入终浓度为600 nmol/L的CBL0137(上海东苍生物公司),对照组加入等体积PBS。检测化疗敏感性时,SSRP1抑制剂组在CBL0137作用基础上,加入替莫唑胺(temozolomide, TMZ;上海瀚香生物科技有限公司),浓度分别为30、60、90、120、150 μmol/L;对照组加入等体积PBS。

1.4 CCK8法检测细胞增殖 将对数生长期细胞接种于96孔板培养24、48、72 h,按CCK8试剂盒(日本Dojindo公司)说明书操作,用酶标仪检测450 nm处

吸光度。每组设3个复孔,重复3次。

1.5 免疫印迹法检测蛋白表达 使用添加蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液提取细胞总蛋白,BCA法测蛋白浓度。40 μg/孔上样后行常规变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。湿法转移蛋白到PVDF膜上,5%胎牛血清溶液室温封闭2 h,加入一抗(1:800)4℃孵育过夜,加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL发光液孵育后显影和定影。抗SSRP1抗体购自英国Cambridge公司,抗GAPDH、p-p-38、p-ERK、p-JNK、p-38、ERK、JNK抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司,抗鼠或抗兔HRP标记的二抗购自美国Promega Biotechnology公司。

1.6 统计学分析 使用SPSS 19.0软件分析;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 t 检验; $P<0.05$ 表示差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 生信分析结果 WEsseq_286分析结果显示,286例胶质瘤基因组外显子序列中,283例为野生型,3例为突变型(1%,3/286;图1A)。mRNAsseq_325和mRNA_array_301分析显示,WHO分级Ⅲ级、Ⅳ级胶质瘤SSRP1表达水平较WHO分级Ⅱ级胶质瘤明显上调($P<0.05$;图1B、1C)。

mRNAsseq_325、mRNAsseq_693分析显示1p/19q联合缺失型低级别胶质瘤(low grade glioma, LGG)的SSRP1表达明显下调,IDH野生型LGG的SSRP1表达明显下调;IDH野生型胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的SSRP1表达明显下调(图2A、2B);与原发性胶质瘤相比,复发性胶质瘤SSRP1表达显著上调(图2C、2D)。

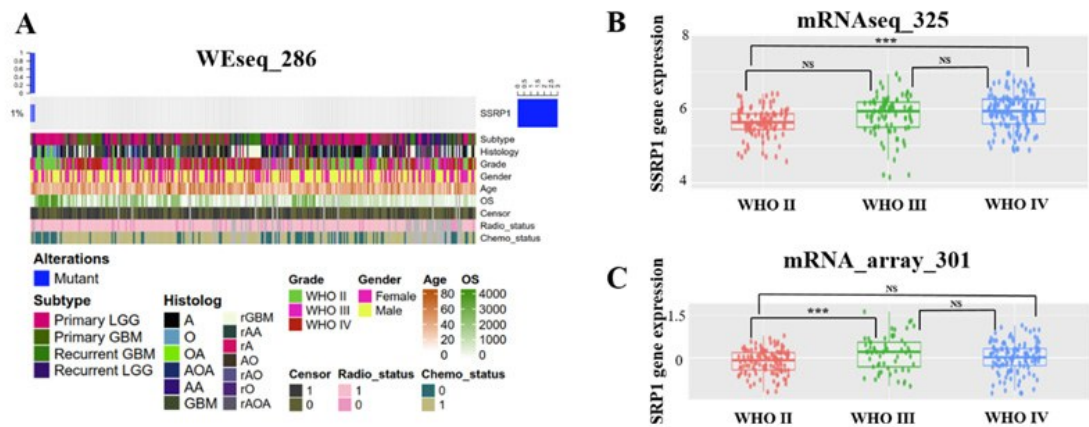


图 1 胶质瘤组织SSRP1表达

A. WEsseq_286分析显示SSRP1在286例胶质瘤基因组外显子序列中的分布;B. mRNAsseq_325分析胶质瘤SSRP1表达与胶质瘤WHO分级的关系;C. mRNA_array_301胶质瘤SSRP1表达与胶质瘤WHO分级的关系;*** $P<0.001$

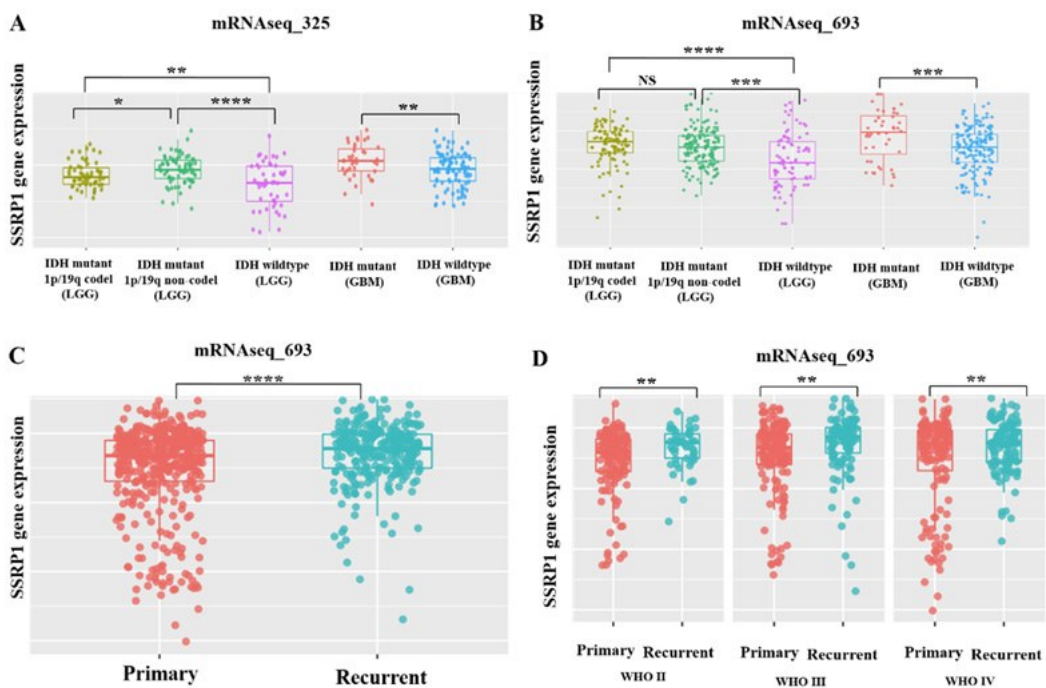


图2 胶质瘤SSRP1表达与IDH突变、1p/19q缺失以及肿瘤复发的关系

A. mRNAseq_325分析显示1p/19q联合缺失型胶质瘤SSRP1表达下调,IDH突变型胶质瘤SSRP1表达上调;B. mRNAseq_693分析显示IDH突变型胶质瘤SSRP1表达上调;C. mRNAseq_693分析显示复发性胶质瘤SSRP1表达上调;C. WHO分级Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ胶质瘤中,复发性胶质瘤SSRP1表达上调;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

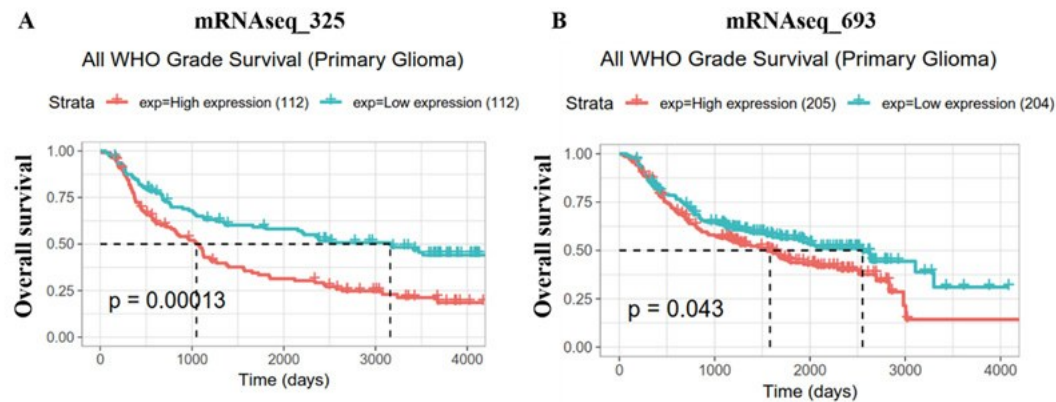


图3 胶质瘤SSRP1表达与病人预后的关系

A. mRNAseq_325分析显示SSRP1高表达组中位总生存期明显缩短;B. mRNAseq_693分析显示SSRP1高表达组中位总生存期明显缩短

Kaplan-Meier生存曲线分析显示,SSRP1低表达组病人OS明显优于高表达组(图3)。

2.2 抑制SSRP1抑制胶质瘤细胞系U251及U87细胞增殖 与对照组相比,SSRP1抑制剂组U251、U87细胞增殖受到显著抑制($P<0.05$;图4)。

2.3 抑制SSRP1增加U251及U87细胞对TMZ的化疗敏感性 随TMZ浓度增高,U251、U87细胞增殖能力明显降低($P<0.05$);与对照组相比,SSRP1抑制剂

组U251、U87细胞增殖能力明显降低($P<0.05$;图5)。

2.4 抑制SSRP1抑制U251、U87细胞MAPK信号通路 与对照组相比,SSRP1组MAPK信号通路p-38、ERK及JNK蛋白水平无明显改变($P>0.05$;图6),但磷酸化水平显著下降($P<0.05$;图6)。

3 讨论

我们的研究表明SSRP1与胶质瘤WHO级别、

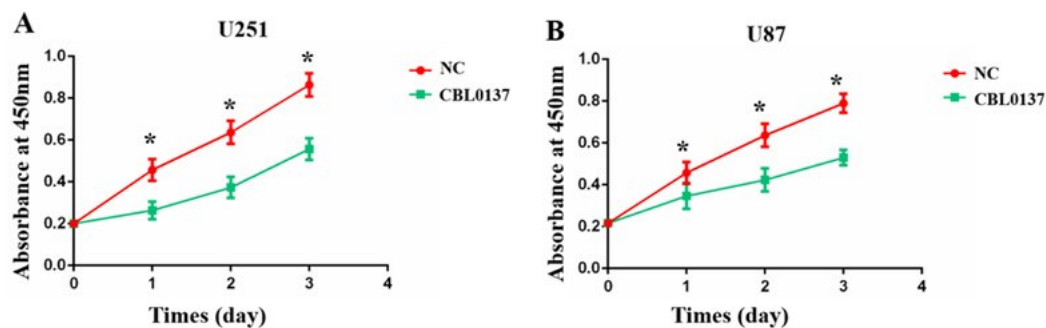


图4 抑制SSRP1抑制胶质瘤U251细胞、U87细胞增殖
CBL0137. SSRP1抑制剂;NC. 对照组;* $P<0.05$

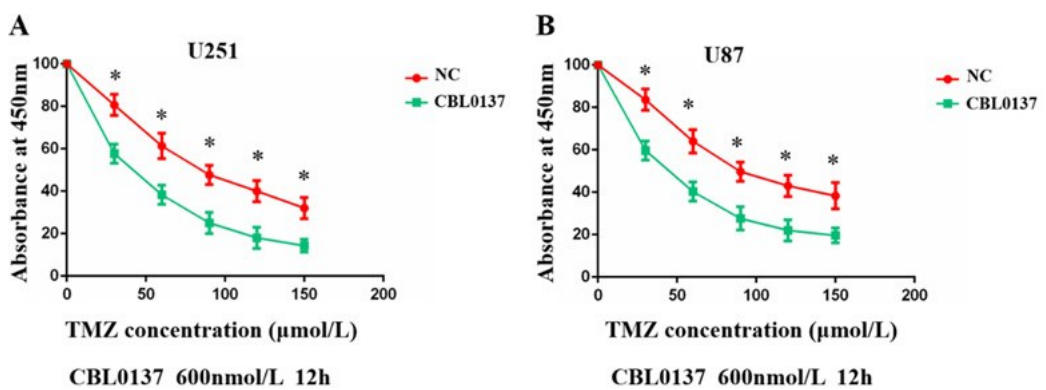


图5 抑制SSRP1增强胶质瘤U251细胞、U87细胞对TMZ的化疗敏感性
CBL0137. SSRP1抑制剂;TMZ. 替莫唑胺;NC. 对照组;* $P<0.05$

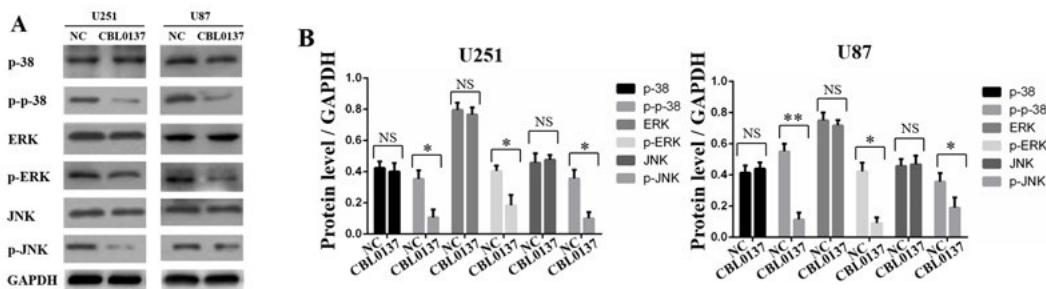


图6 抑制SSRP1抑制胶质瘤U251细胞、U87细胞MAPK信号通路
CBL0137. SSRP1抑制剂;NC. 对照组;* $P<0.05$, ** $P<0.01$; NS. $P>0.05$

IDH 突变、1p/19q 联合缺失、肿瘤复发和 OS 相关。显微手术切除联合放化疗仍是胶质瘤的重要治疗方法,如何克服肿瘤细胞的放化疗抗性是重要的研究方向。CBL0137 最初用于调控 P53 及 NF- κ B,尝试解决肿瘤细胞的化疗抵抗性,然而后来的研究发现 CBL0137 可特异性抑制 FACT,在多种恶性肿瘤中具有明显抗肿瘤作用,如肾细胞癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤和小细胞肺癌。据报道,CBL0137 可促进胶质瘤干细胞失活及凋亡^[13],还可通过激活 Notch1 抑制小细胞肺癌中干细胞样细胞与顺铂产生协同作用

^[14],增强肺癌化疗敏感性^[15]。我们的研究表明 CBL0137 可显著抑制胶质瘤细胞增殖,促进胶质瘤细胞对 TMZ 的化疗敏感性,其机制可能与抑制 SSRP1 进而抑制 MAPK 信号通路有关。MAPK 信号通路 与 胶质瘤 的 相关 研究 报道 较多。lncRNA MATN1-AS1 调控 MAPK 信号通路,抑制 GBM 细胞增殖和侵袭^[16]。环状 RNA MAPK4 调控 miR-125a-3p,抑制 MAPK 信号通路介导胶质瘤细胞凋亡^[17]。GBM 的 ZDHHC17 基因显著上调,激活 MAPK 信号通路的重要组成部分 p38/JNK,导致 GBM 恶性进展

[18]。lncRNA SNHG5 通过 p38 信号通路促进 GBM 细胞增殖^[19]。洋椿苦素可负调节 MAPK 信号通路,抑制耐 TMZ 胶质瘤细胞的生长、微血管生成及细胞周期紊乱,促进细胞凋亡^[20]。

总之,胶质瘤 SSRP1 呈高表达,与病人不良预后有关。抑制 SSRP1,可通过抑制 MAPK 信号通路,抑制胶质瘤细胞增殖,增加胶质瘤细胞对 TMZ 的化疗敏感性。

【参考文献】

[1] Liu Y, Zhou K, Zhang N, *et al.* FACT caught in the act of manipulating the nucleosome [J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 426-431.

[2] Marciano G, Da V S, Tria G, *et al.* Structure-specific recognition protein-1 (SSRP1) is an elongated homodimer that binds histones [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(26): 10071-10083.

[3] Wu W, He K, Guo Q, *et al.* SSRP1 promotes colorectal cancer progression and is negatively regulated by miR-28-5p [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3118-3129.

[4] Wang Q, Jia S, Jiao Y, *et al.* SSRP1 influences colorectal cancer cell growth and apoptosis via the AKT pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(12): 1573-1582.

[5] Song H, Zeng J, Lele S, *et al.* APE1 and SSRP1 is over-expressed in muscle invasive bladder cancer and associated with poor survival [J]. *Heliyon*, 2021, 7(4): e6756.

[6] Ding Q, He K, Luo T, *et al.* SSRP1 contributes to the malignancy of hepatocellular carcinoma and is negatively regulated by miR-497 [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(5): 903-914.

[7] Shen J, Chen M, Lee D, *et al.* Histone chaperone FACT complex mediates oxidative stress response to promote liver cancer progression [J]. *Gut*, 2020, 69(2): 329-342.

[8] Min J, Jin D, Zhang F, *et al.* DLG1-AS1 is activated by MYC and drives the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells through miR-497-5p/SSRP1 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 16.

[9] Jin G, Zhao R, Zhang J, *et al.* SSRP1 affects the growth and apoptosis of gastric cancer cells through AKT pathway [J]. *J Med Biochem*, 2022, 41(1): 100-107.

[10] Yu Y, Gao Y, Yu Y. SSRP1 worsens malignant melanoma progression by activating MAPKs pathway [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2021, 51(6): 783-789.

[11] Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK signaling in

cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1102.

[12] Perreault S, Larouche V, Tabori U, *et al.* A phase 2 study of trametinib for patients with pediatric glioma or plexiform neurofibroma with refractory tumor and activation of the MAPK/ERK pathway: TRAM-01 [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1250.

[13] Dermawan JK, Hitomi M, Silver DJ, *et al.* Pharmacological targeting of the histone chaperone complex FACT preferentially eliminates glioblastoma stem cells and prolongs survival in preclinical models [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2432-2442.

[14] De S, Lindner DJ, Coleman CJ, *et al.* The FACT inhibitor CBL0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing NOTCH1 expression and targeting tumor-initiating cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(9): 2396-2406.

[15] Jin MZ, Xia BR, Xu Y, *et al.* Curaxin CBL0137 exerts anti-cancer activity via diverse mechanisms [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 598.

[16] Han N, Yang L, Zhang X, *et al.* LncRNA MATN1-AS1 prevents glioblastoma cell from proliferation and invasion via RELA regulation and MAPK signaling pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(23): 784.

[17] He J, Huang Z, He M, *et al.* Circular RNA MAPK4 (circ-MAPK4) inhibits cell apoptosis via MAPK signaling pathway by sponging miR-125a-3p in gliomas [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 17.

[18] Chen X, Hao A, Li X, *et al.* Activation of JNK and p38 MAPK mediated by ZDHHC17 drives glioblastoma multi-forme development and malignant progression [J]. *Theranostics*, 2020, 10(3): 998-1015.

[19] Chen L, Gong X, Huang M. YY1-activated long noncoding RNA SNHG5 promotes glioblastoma cell proliferation through p38/MAPK signaling pathway [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(9): 589-596.

[20] Cao Y, Zhang L, Wang Y. Antitumor activity of cedrelone in temozolomide-resistant human glioma cells is accompanied by mitochondrial mediated apoptosis, inhibition of angiogenesis, cell cycle disruption and modulation of ERK/MAPK signalling pathway [J]. *J BUON*, 2019, 24(3): 1204-1209.