

FoxO3在复发胶质母细胞瘤中的表达及其对替莫唑胺耐药性的影响

胡大玲¹, 张 寅^{2*}

(¹南京医科大学附属逸夫医院老年科, ²神经外科, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:研究抑癌基因FoxO3在复发胶质母细胞瘤中的表达及其在胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药中的潜在作用机制。方法:通过基因芯片分析、qPCR和Western blot检测FoxO3在原发和复发胶质母细胞瘤中的表达,并检测其在替莫唑胺耐药细胞株中的表达。通过FoxO3过表达芯片筛选其下游靶基因,并进一步探讨FoxO3在胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药中的作用机制。结果:FoxO3 mRNA及蛋白的表达在复发胶质母细胞瘤组织及耐替莫唑胺细胞系中明显减低。过表达FoxO3可通过抑制跨损伤修复蛋白REV3L的表达来增加胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的敏感性。结论:FoxO3在复发胶质母细胞瘤组织中表达减低。FoxO3表达减低与胶质母细胞瘤化疗耐药密切相关。FoxO3可能通过抑制REV3L基因表达增加胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的化疗敏感性。

[关键词] 胶质母细胞瘤; FoxO3; REV3L; 替莫唑胺; 耐药

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)11-1389-06

doi:10.7655/NYDXBNS20171103

Preliminary study on the expression of FoxO3 in recurrent glioblastoma and its resistance to chemotherapy

Hu Daling¹, Zhang Yin^{2*}

(¹Department of Gerontology, ²Department of Neurosurgery, Sir Run Run Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression level of tumor suppressor gene FoxO3 in the recurrent glioblastoma tissues and its potential function in temozolomide(TMZ) resistance. **Methods:** The expression level of FoxO3 mRNA and protein were detected and compared in primary and recurrent glioblastoma tissues via microarray, qPCT and Western blot. And then to explore the potential mechanism of FoxO3 mediated in TMZ resistance by screening its target using a microarray. **Results:** The expression level of FoxO3 mRNA and protein is decreased both in recurrent glioblastoma tissues and TMZ- resistance glioblastoma cell lines. Overexpression of FoxO3 could sensitize glioblastoma cells to TMZ via modulating the expression of REV3L. **Conclusion:** The expression level of FoxO3 is decreased in recurrent glioblastoma tissues, which might play a pivotal role in chemotherapy-resistance. Overexpression of FoxO3 could sensitize glioblastoma cells to TMZ via suppressing the expression of REV3L.

[Key words] glioblastoma; FoxO3; REV3L; temozolomide; chemoresistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(11):1389-1394]

胶质母细胞瘤是成人最常见的颅内原发性恶性肿瘤,具有较高的侵袭性和复发性^[1]。手术切除及术后辅以放疗是目前胶质母细胞瘤的标准治疗方案。然而,随着一线化疗药物替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的广泛应用,越来越多胶质母细胞瘤患者出现了 TMZ 耐药^[2],因此,深入研究 TMZ 的耐药机

制,对改善胶质母细胞瘤患者预后具有重要意义。

FoxO3 为叉头蛋白转录因子家族中的一员,在生物体的多种生命活动中起着重要作用^[3-4]。近来,越来越多的研究表明, FoxO3 表达失调与包括胶质瘤在内的多种肿瘤的发生密切相关^[5-7]。本研究发现, FoxO3 在复发胶质母细胞瘤中表达明显降低,过表达 FoxO3 可以逆转胶质母细胞瘤对 TMZ 的耐药,可能为改善胶质母细胞瘤对 TMZ 的耐药提供新思路,报告如下。

[基金项目] 国家自然科学基金(58201601)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zy1397@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

TMZ (Sigma 公司, 美国), DMEM 培养基和胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国), 无血清培养基 Opti-MEM (Gibco 公司, 美国), RNA 抽提试剂 TRIzol、转染试剂 Lipo2000 (Invitrogen 公司, 美国)。FoxO3 及 GAPDH 引物均由上海英俊公司合成。qPCR 检测试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本)。CCK8 试剂盒 (南京凯基生物公司)。

1.1.2 组织和细胞株

6 对原发和复发胶质母细胞瘤标本取自 2013 年 1 月—2015 年 12 月在本科就诊的患者, 均经病理证实, 标本取出后迅速放入液氮冷藏备用。所有标本均签署知情同意书, 并经伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR

分别取初发和复发胶质瘤组织用 TRIzol 法提取总 RNA。利用分光光度计检测 RNA 的浓度和质量 [$D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 为 1.7~2.0]。选取 3 对初发和复发患者的 mRNA 送广州锐博公司行微阵列芯片检测。同时 TaKaRa 试剂盒将余下 RNA 反转录成 cDNA。逆转录后分别加入 FoxO3 和 GAPDH 引物, FoxO3 引物序列为: 上游 5'-CGGACAAACGGCTCACTCT-3', 下游 5'-GGACCCGCATGAATCGACTAT-3'; GAPDH 引物序列为: 上游 5'-ACAACCTTGTATCGTGAAGG-3', 下游 5'-GCCATCACGCACAGTTTC-3'。置于 7300HTRT-PCR 仪进行扩增。反应条件按 TaKaRa 试剂盒条件设置。利用 ABI7300 系统 SDS Software 软件进行分析, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。实验均重复 3 次。

1.2.2 细胞培养及实验分组

胶质母细胞瘤 U87 及 U251 细胞由骆慧博士惠赠。用 TMZ 浓度递增的作用方式诱导胶质母细胞瘤耐药细胞株, 初始诱导剂量 25 $\mu\text{mol/L}$, 最高诱导剂量为 200 $\mu\text{mol/L}$, 以此获得稳定的对 TMZ 耐药的 U87、U251 细胞, 命名为 U87R、U251R。胶质瘤耐药细胞株 U87R、U251R 和非耐药 U87、U251 细胞均培养在含 10% FBS 的 DMEM 中, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中。隔日更换培养基。将 U87/U87R、U251/U251R 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 取对数生长期细胞做实验。实验分

为两组即对照组和实验组, 对照组为 U87/U251 空载组, 实验组为 U87/U251 耐药组或 FoxO3 质粒过表达组, 每组实验重复 3 次。恢复实验组共转染 FoxO3 及 REV3L 质粒 (由骆慧博士惠赠)。

1.2.3 细胞转染效率检测

按照 Lipo2000 试剂说明书将 FoxO3 质粒 (上海英俊生物技术有限公司) 及空白对照转入 U87R 和 U251R 细胞中, 6 h 后更换完全培养基。转染后 48 h, 通过 qRT-PCR 及 Western blot 实验检测 FoxO3 mRNA 和蛋白表达水平。

1.2.4 CCK8 试验

将转染后 U87R、U251R 细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔板中, 在指定时间加入 10 μL CCK8 试剂, 继续孵育 4 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度, 绘制生长曲线。

1.2.5 Western blot 检测

按 100 mg 组织或 2×10^7 个细胞加入 1 mL 细胞裂解缓冲液, 冰上裂解 30 min, 提取细胞总蛋白, 以 BCA 法进行蛋白浓度的定量测定。常规制胶、上样, 蛋白电泳后转膜, 封闭。用一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜: FoxO3 (1:1 000)、REV3L (1:400) 及 GAPDH (1:1 000)。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。将膜与辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体 (1:5 000) 室温下摇荡孵育 2 h, TBST 充分洗膜, 漂洗 3 次, 每次 10 min。采用 Bio-Rad 的化学发光仪检测, 并以 GAPDH 为内参照。采用 image J 软件进行 Western blot 条带定量分析。每组实验重复 3 次取均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。Graphpad prism 5 作图, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FoxO3 mRNA 和蛋白在原发和复发胶质母细胞瘤中的表达

mRNA 微阵列芯片分析提示在复发胶质母细胞瘤中众多基因表达降低, 其中 FoxO3 下调最为明显 (图 1A)。为进一步证明 mRNA 芯片结果, 通过 qPCR 和 Western blot 检测了 6 对原发和复发胶质母细胞瘤组织中 FoxO3 mRNA 和蛋白表达水平。与原发组相比, 复发肿瘤组织中 FoxO3 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, 结果与 mRNA 芯片一致 (图 1B~D)。

2.2 FoxO3 在 TMZ 耐药细胞株和非耐药细胞株中的表达

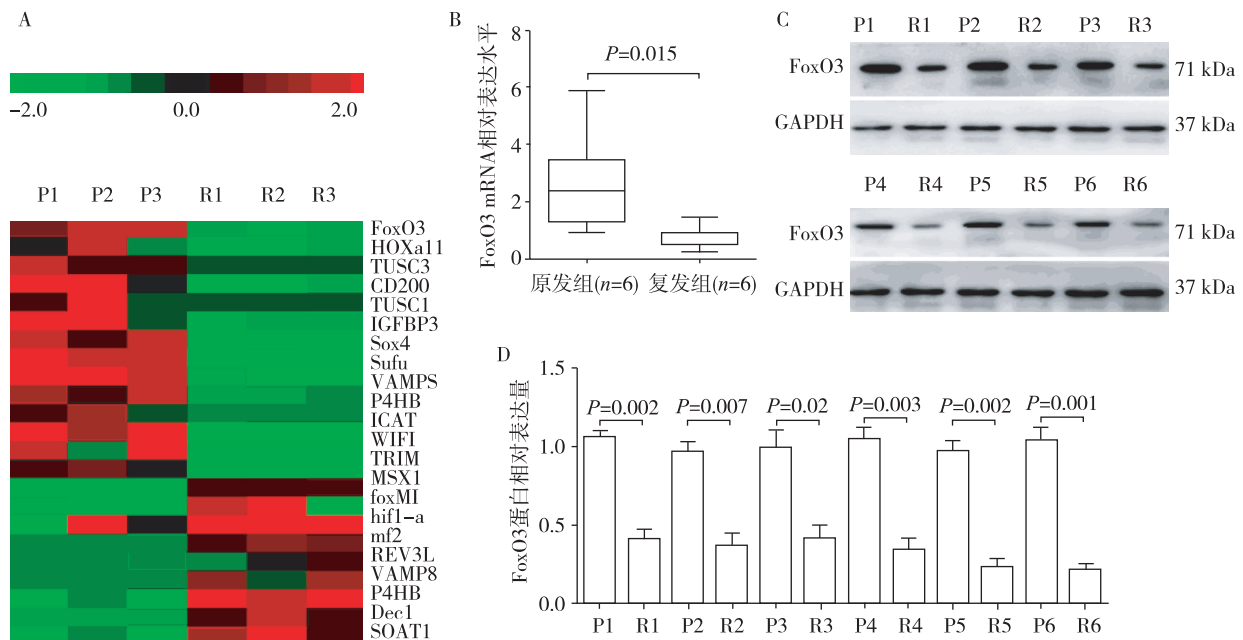
为明确 FoxO3 在 TMZ 耐药细胞株中的表达, 通过 CCK8 验证了耐药细胞株与非耐药细胞株在不同 TMZ 浓度下的细胞活性, 与非耐药细胞株相比, 耐药细胞株在相同 TMZ 浓度时活性明显高于非耐药细胞株(图 2A)。随后通过 qPCR 及 Western blot 检测发现, 与非耐药细胞相比, TMZ 耐药细胞株中 FoxO3 mRNA 及蛋白表达水平明显降低(图 2B~D)。

2.3 FoxO3 过表达增加耐药细胞株对 TMZ 的敏感性

CCK8 检测发现在 TMZ 耐药的胶质母细胞瘤细胞中, 过表达 FoxO3 可增加耐药细胞株对 TMZ 的敏感性(图 3)。

2.4 FoxO3 可抑制 REV3L 基因的表达

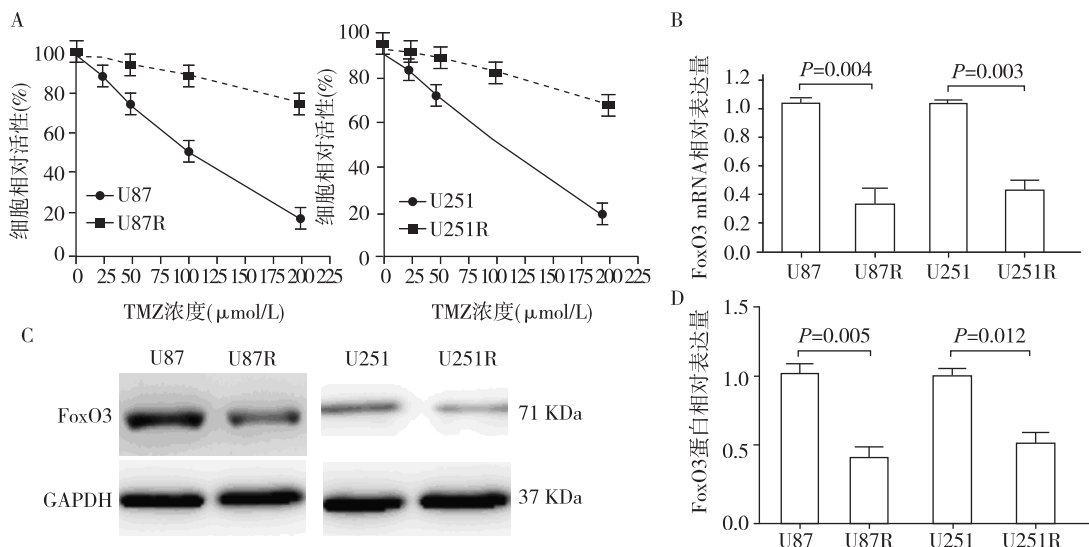
为了进一步研究 FoxO3 在胶质母细胞瘤耐药方面的潜在机制, 通过微阵列芯片对 FoxO3 过表达胶质母细胞瘤细胞进行相关分析, 发现 REV3L 表达与 FoxO3 呈负相关(图 4A)。通过 qPCR 和 Western



A: FoxO3 在 3 对原发和复发胶质母细胞瘤芯片中的表达; B: qPCR 检测 FoxO3 mRNA 在原发 (P1~P6) 和复发胶质母细胞瘤组织 (R1~R6) 中的表达; C、D: Western blot 检测 FoxO3 蛋白在原发 (P1~P6) 和复发胶质母细胞瘤组织 (R1~R6) 中的表达。

图 1 FoxO3 在原发和复发胶质母细胞瘤组织中的表达

Figure 1 The expression of FoxO3 mRNA and protein in the primary and recurrent glioblastoma tissues



A: TMZ 耐药和非耐药胶质母细胞瘤细胞的活性比较; B、C 和 D: FoxO3 mRNA 和蛋白在 TMZ 耐药和非耐药细胞株中的表达。

图 2 FoxO3 mRNA 和蛋白在 TMZ 耐药的胶质母细胞瘤细胞株中表达

Figure 2 The expression of FoxO3 mRNA and protein in TMZ-resistant glioblastoma cells

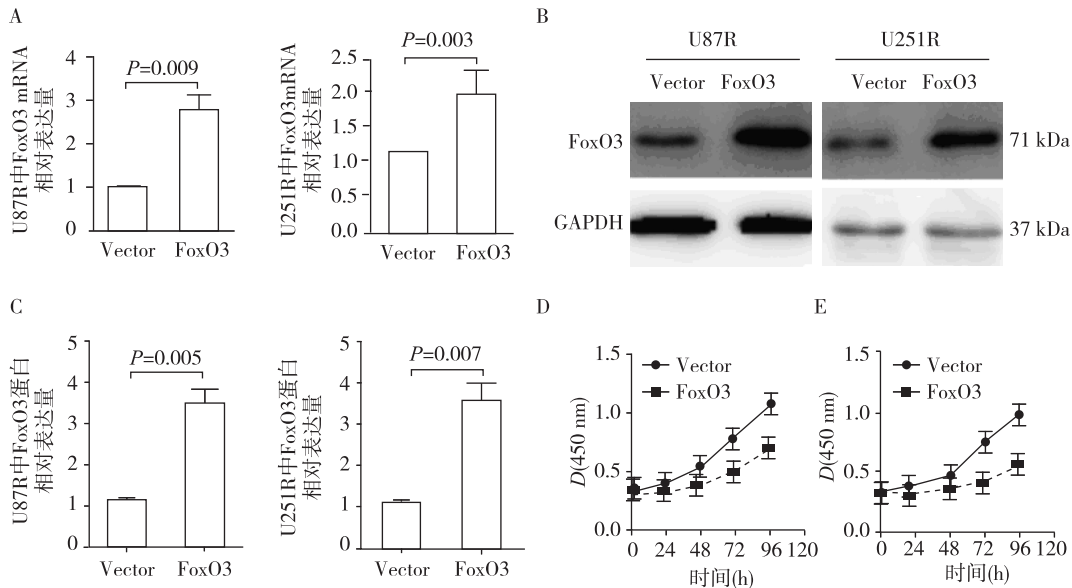
blot 检测,发现过表达 FoxO3 可抑制 REV3L 的 mRNA 和蛋白表达(图 4B 和 C)。

2.5 REV3L 可逆转 FoxO3 过表达对胶质母细胞瘤耐药性的影响

通过恢复实验发现,同时过表达 FoxO3 和 REV3L 可减弱 FoxO3 对耐药细胞株化疗敏感性的影响(图 5)。

3 讨论

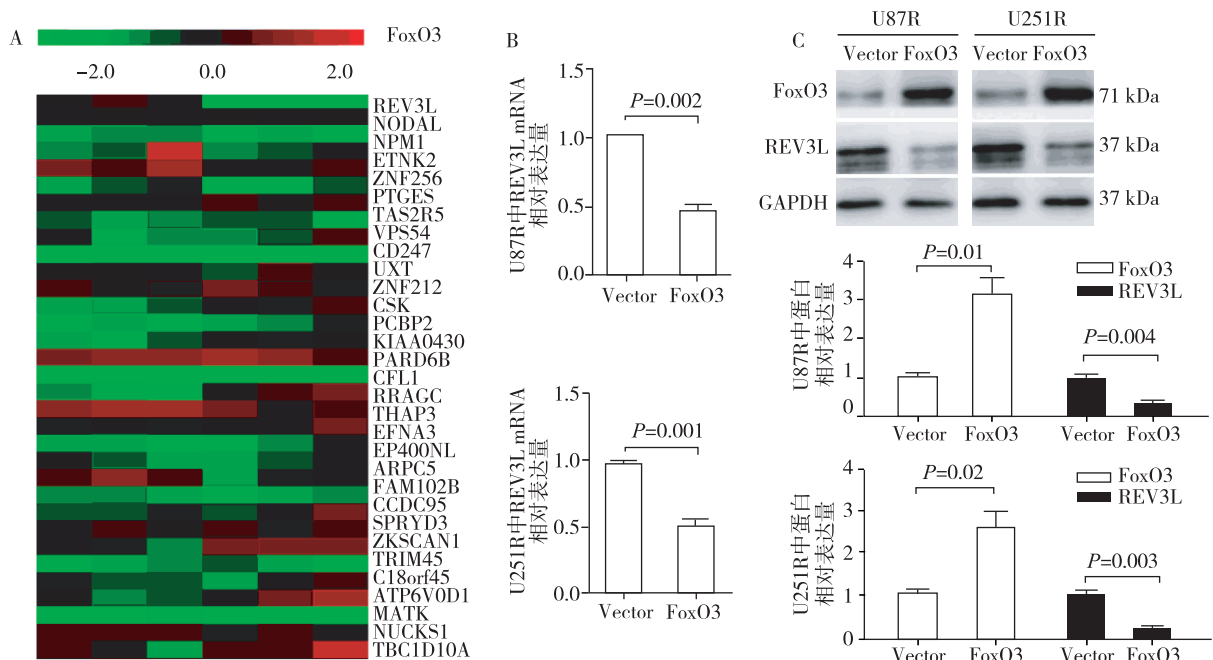
本研究发现 FoxO3 在复发胶质母细胞瘤组织中表达明显降低。这一结果提示 FoxO3 基因表达失调可能与胶质母细胞瘤复发密切相关。此外,由于本研究中的 10 例患者在初次手术后均接受了 TMZ 标准化化疗。因此猜想 FoxO3 表达失调可能参与了 TMZ



A,B,C:FoxO3 过表达胶质母细胞瘤细胞株中 FoxO3 mRNA 及蛋白的表达;D,E:FoxO3 过表达后胶质母细胞瘤细胞 U87R(D)和 U251R(E)对 TMZ 的敏感性。

图 3 FoxO3 对 TMZ 化疗耐药性的影响

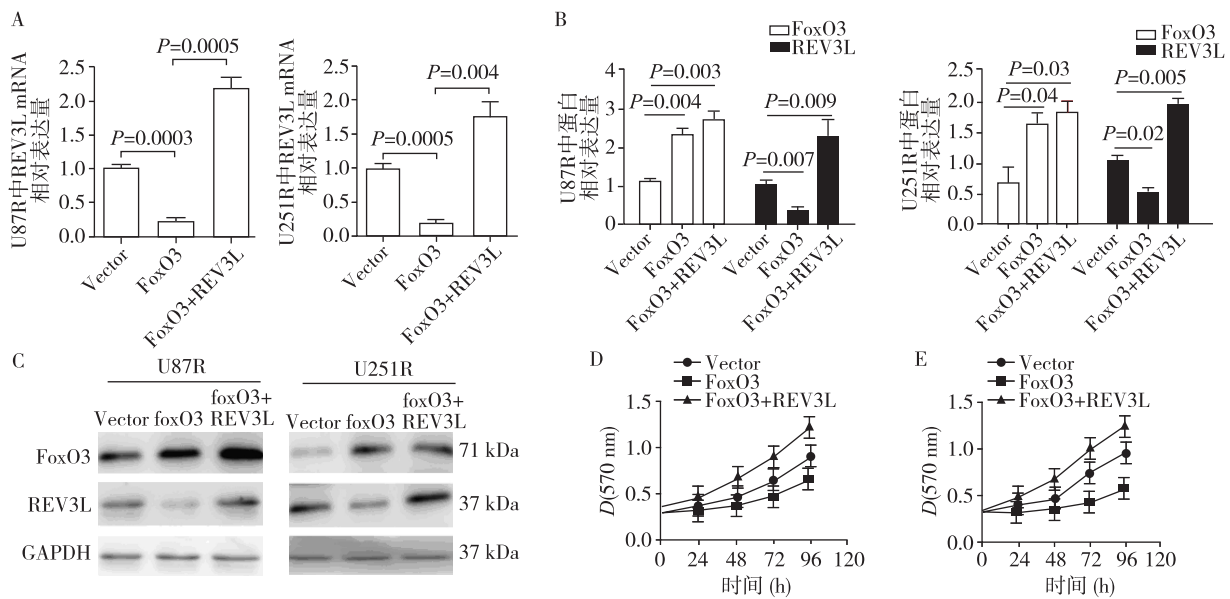
Figure 3 FoxO3 overexpression impaired TMZ resistance



A:胶质母细胞瘤组织中 FoxO3 表达相关基因;B,C:FoxO3 抑制 REV3L mRNA(B)及蛋白(C)表达。

图 4 FoxO3 抑制 REV3L 的表达

Figure 4 FoxO3 suppresses the expression of REV3L



A、B、C: FoxO3 及 REV3L 同时过表达的胶质母细胞瘤中 REV3L 的 mRNA(A) 及蛋白(B、C) 的表达量; D、E: REV3L 可逆转 FoxO3 过表达对胶质母细胞瘤 U87R(D) 和 U251R(E) 细胞的化疗增敏。

图 5 REV3L 可逆转 FoxO3 过表达对胶质母细胞瘤耐药性的影响

Figure 5 REV3L reverses the impact of FoxO3 overexpression on chemotherapy sensitivity

的化疗耐药。为此通过 qPCR 和 Western blot 进一步检测了 FoxO3 mRNA 和蛋白在耐 TMZ 胶质瘤细胞株中的表达, 结果显示: 与非耐药细胞株相比, 耐 TMZ 胶质瘤细胞株中 FoxO3 mRNA 及蛋白表达均明显降低。这一结果初步证实 FoxO3 表达失调与 TMZ 耐药相关。为进一步证实猜想, 在 TMZ 耐药细胞株中过表达 FoxO3, 结果发现过表达 FoxO3 后, 耐药细胞株对 TMZ 的敏感性明显增加。这些结果表明 FoxO3 表达失常是影响胶质母细胞瘤对 TMZ 耐药的机制之一。

胶质母细胞瘤对 TMZ 的耐药机制复杂, 目前较为明确的是 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)介导的 TMZ 耐药^[8]。此外, 还有研究表明 DNA 损伤修复也参与 TMZ 耐药^[9-10]。由于所选的 U87 和 U251 细胞株不表达 MGMT 蛋白^[11-13]。因此, FoxO3 对 TMZ 化疗敏感性的影响可能不依赖于 MGMT 蛋白的表达。为进一步研究 FoxO3 对 TMZ 化疗敏感性影响的潜在机制。对 3 对患者的芯片结果进行相关分析, 结果发现 REV3L 基因表达与 FoxO3 表达呈负相关, 且关系最为密切。REV3L 是 DNA 跨损伤修复的重要参与者。诸多研究表明 REV3L 在肿瘤化疗耐药方面发挥着重要作用。近来 Luo 等^[9]研究指出 REV3L 在胶质瘤 TMZ 耐药方面发挥着重要作用。本研究中过表达 FoxO3 可以抑制 REV3L mRNA 和蛋白水平的表达。此外, 通过恢复实验进一

步发现, 过表达 REV3L 可以逆转 FoxO3 过表达导致的胶质母细胞瘤细胞对 TMZ 敏感性的影响。这些结果表明 FoxO3 低表达可能是胶质母细胞瘤细胞对 TMZ 耐药的机制之一。

综上所述, FoxO3 在复发胶质母细胞瘤组织中表达减低。FoxO3 表达减低与胶质母细胞瘤化疗耐药密切相关。FoxO3 可通过抑制 REV3L 基因表达增加胶质母细胞瘤细胞对 TMZ 的化疗敏感性。

[参考文献]

- [1] Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(7): 717-726
- [2] Yang JK, Yang JP, Tong J, et al. Exosomal miR-221 targets DNMT3 to induce tumor progression and temozolomide resistance in glioma [J]. *J Neurooncol*, 2017, 131(2): 255-265
- [3] Bigarella CL, Li J, Rimmelé P, et al. FOXO3 transcription factor is essential for protecting hematopoietic stem and progenitor cells from oxidative DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(7): 3005-3015
- [4] Ikeda M, Toyoshima F. Dormant pluripotent cells emerge during neural differentiation of embryonic stem cells in a FoxO3-dependent manner [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(5): 416-417
- [5] Kumazoe M, Takai M, Bae J, et al. FOXO3 is essential for

- CD44 expression in pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(19): 2643–2654
- [6] Du WW, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2): 357–370
- [7] Cui QK, Liu WD, Zhu JX, et al. MicroRNA-184 promotes proliferation ability of glioma cells by regulating FOXO3 [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(10): 776–779
- [8] Brigladori G, Foca F, Dall'Agata M, et al. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2016, 128(2): 333–339
- [9] Luo H, Chen ZX, Wang S, et al. c-Myc-miR-29c-REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma[J]. *Brain*, 2015, 138(12): 3654–3672
- [10] Christmann M, Diesler K, Majhen D, et al. Integrin $\alpha V\beta 3$ silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 27754–27771
- [11] Van Nifterik KA, Van Den Berg J, Van Der Meide WF, et al. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(1): 29–35
- [12] Qiu ZK, Shen D, Cheng YS, et al. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells[J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(2): 115–122
- [13] Chahal M, Abdulkarim B, Xu Y, et al. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase is a novel negative effector of invasion in glioblastoma multiforme [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(11): 2440–2450

[收稿日期] 2016–12–27

(上接第 1388 页)

蓄积而达到杀死肿瘤细胞的作用。为了进一步了解 AP 对 A549/DDP 细胞内耐药基因和相关蛋白的影响,通过蛋白印迹和 RT-PCR 技术,检测肿瘤细胞内 P-gp 和 LRP 表达情况以及 MDR1 和 LRP mRNA 的转录情况。发现在 AP 作用下, A549/DDP 细胞内原先高水平转录的 MDR1 mRNA 出现下调,原先高表达的 P-gp 出现表达减少,而 LRP mRNA 和其产物蛋白 LRP 均无明显变化。AP 通过减少 A549/DDP 细胞内 P-gp 的表达,可以减少或降低细胞膜上 P-gp 转运蛋白的药物外排,增加细胞内化疗药物的蓄积,逆转了 A549/DDP 细胞的耐药。

综上所述, AP 对肺癌多药耐药细胞(A549/DDP)具有细胞毒作用,其细胞毒作用与 AP 的作用浓度有一定相关性;同时 AP 具有逆转 A549/DDP 细胞耐药功能,逆转机制与降低 MDR1 mRNA 转录水平和下调 P-gp 介导的药物外转运功能有关。

[参考文献]

- [1] 李占飞, 杨宏新, 张晶, 等. 芹菜素抑制乳腺癌细胞增殖及其机制研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(1): 258
- [2] 韩露, 陈子, 柏芳芳, 等. 芹菜素逆转白介素 6 诱导的中性粒细胞凋亡延迟[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(4): 399–402, 408
- [3] Seo HS, Choi HS, Kim SR, et al. Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53 and inhibiting STAT3 and NFkappaB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 366(1–2): 319–334
- [4] Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, et al. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(8): 150
- [5] Zhang X, Wang G, Gurley EC, et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107072
- [6] 药红梅, 贾永平, 薛铮, 等. 芹菜素可抑制脂多糖诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(4): 323–328
- [7] Cao HH, Chu JH, Kwan HY, et al. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21731
- [8] Shukla S, Shqankar E, Fu P, et al. Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by apigenin through IkappaBalpha and IKK pathway in TRAMP mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138710
- [9] Shukla S, Kanwal R, Shankar E, et al. Apigenin blocks IKKalpha activation and suppresses prostate cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31216–31232
- [10] Meng S, Zhu Y, Li JF, et al. Apigenin inhibits renal cell carcinoma cell proliferation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19834–19842

[收稿日期] 2017–06–07