

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.20.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 20-0028-06

β 连环蛋白对脑胶质瘤辐射抗性的影响

高力扬¹, 李锦宏², 陈兵², 杨帆², 岑学程², 廖壮槟², 龙霄翔², 王思捷³

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 广东医科大学附属第一医院 神经外科, 广东 湛江 524001; 3. 广东医科大学附属第一医院 临床研究中心, 广东 湛江 524001)

摘要: 目的 探讨 β 连环蛋白 (β-catenin) 在 X 射线照射条件下对人脑胶质瘤 U87 细胞增殖、生存的影响。**方法** U87 细胞经采用 5 μmol/L IWR-1-endo 处理后, 用 X 射线照射, 采用 CCK-8 法平板克隆形成实验检验细胞增殖和存活能力, 免疫荧光染色检验细胞相关蛋白的表达, 电镜观察细胞内微结构的变化。**结果** 人脑胶质瘤 U87 细胞辐射后, 照射组 β-catenin 蛋白相对表达量比对照组低 ($P < 0.05$); 经 IWR-1-endo 处理的细胞增殖和平板克隆形成率有增加趋势 ($P < 0.05$)。**结论** 降低 β-catenin 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路, 虽然能降低胶质瘤细胞增殖能力, 但可能通过保护细胞线粒体的方式增加胶质瘤细胞对辐射治疗的抗性。

关键词: 人脑胶质瘤; β-catenin; 辐射抗性

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

Effect of β-catenin on radiation resistance of glioma

Li-yang Gao¹, Jin-hong Li², Bing Chen², Fan Yang², Xue-cheng Cen²,
Zhuang-bin Liao², Xiao-ao Long², Si-jie Wang³

(1. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. Department of Neurosurgery, 3. Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of β-catenin on proliferation and survive of U87 glioma cells after radiation. **Methods** To reduce the accumulation of β-catenin, U87 glioma cells were treated with 5 μmol/L IWR-1-endo. CCK-8 and single colony formation assay were used to examine the proliferation and survival of U87 cells after radiation. And immunocytochemistry (ICC) was used to monitor the expressions of related proteins in the cells. Moreover, electron microscopy was used to observe the changes of microstructures of the cells. **Results** The expression of β-catenin decreased dramatically in the U87 cells after radiation treatment compared to the control group ($P < 0.05$). After radiation, the proliferation of the IWR-1-endo-treated cells and the plate colony-forming efficiency increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Decreased accumulation of β-catenin might reduce the proliferation of glioma cells through inhibition of the Wnt/β-catenin signaling pathway, but it might cause radiation resistance of glioma cells by protecting the mitochondria of the cells.

Keywords: glioma; β-catenin; radiation resistance

胶质瘤占脑部恶性肿瘤的 60%, 世界卫生组织神经系统肿瘤分级将其分为低级别和高级别, 高级别胶质瘤中位生存时间只有 10 ~ 15 个月。胶质瘤主要的

治疗手段是最大安全范围内手术切除肿瘤^[1]。由于胶质瘤具有侵袭性的自然特性, 手术治疗后必须进行放疗。放射治疗致力于控制或者杀灭术后残留的肿瘤细

胞, 而化学药物治疗带来的损伤和肿瘤辐射抗性影响其疗效^[2]。目前研究发现一些细胞信号通路可能参与胶质瘤辐射抗性^[3-6]。因此研究胶质瘤辐射抗性产生的机制对当前临床治疗有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

细胞增殖检测试剂盒 (cell counting Kit-8, CCK-8) (上海碧云天生物技术研究所), IWR-1-endo 抑制剂 (美国 Selleck Chemicals 公司), 双抗含青霉素、链霉素购于美国 Hyclone 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、改良伊格格培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 购于美国 Gibco 公司, 巢蛋白 (Nestin)、 β 微管蛋白 III (β -tubulin III)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、CD133 及 Ki-67 抗体购于北京中杉金桥公司。德国 Leica 公司的 DMI3000B 荧光显微镜、日本电子株式会社的 JEM-1400+GATAN CCD832 投射电子显微镜由广东医科大学附属临床研究中心提供, 瑞典 Eleketa 公司的直线加速器由广东医科大学附属临床放疗科提供。

1.2 方 法

1.2.1 U87 细胞系的培养及诱导 人脑胶质瘤 U87 细胞株复苏后, 加入含有双抗 (青霉素 50 μ /ml, 链霉素 50 mg/ml) 和 10% FBS 的 DMEM 高糖型培养基悬浮细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 培养。待细胞进入对数培养期后, 取 1/3 细胞进行传代培养, 或者取 1×10^6 个细胞加入 1 ml 冻存液 (80% 完全培养基 + 100 μ l FBS+100 μ l 二甲基亚砷) 于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中短期冻存。用浓度为 5 μ mol/L 的 Wnt 信号通路抑制剂 IWR-1-endo 处理细胞 2 d, 收集细胞用于后续检测。

1.2.2 细胞增殖实验 采用 CCK-8 检测细胞增殖情况。消化收集对照组、照射组和 IWR-1-endo 联合照射组细胞, 调节细胞密度为 15 000 个/ml, 取 100 μ l 细胞培养于 96 孔板中。48 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK-8, 放置于细胞培养箱培养 2 ~ 4 h, 测定 450 nm 处吸光度值, 并利用细胞生长曲线计算各组贴壁细胞数。

1.2.3 平板克隆形成实验 0.25% 胰蛋白酶分别消化对照组、照射组和 IWR-1-endo 联合照射组, 将

3 组细胞分别计数, 按 500 个/皿的密度接种细胞于 60 mm 培养皿中, 静置培养 1 周。待培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 无水甲醛固定细胞 30 min, 除去固定液后加入结晶紫染色 10 min, 用流水温和洗脱染色液, 倒置干燥培养皿。肉眼计算细胞克隆数, 以克隆形成率表示细胞生长情况, 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 \times 100%。

1.2.4 细胞免疫荧光染色 将细胞接种于 24 孔板培养, IWR-1-endo 处理 2 d 后, 用磷酸盐缓冲溶液漂洗细胞, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 10% 聚乙二醇辛基苯基醚通透后加入 10% 羊血清的封闭液处理 30 min, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温下孵育 2 h 后加入 4,6-联脒 -2- 苯基吡啶核染, 于 DMI3000B 荧光显微镜下观察拍照。Nestin、GFAP、 β -tubulin III、CD133 及 Ki-67 抗体用于人胶质瘤 U87 细胞的鉴定。

1.2.5 细胞放疗抵抗实验 采用直线加速器 X 射线照射, 照射剂量率为 4 Gy/min。取对数生长期细胞, 于 100 mm 培养皿中培养 48 h 后进行放射实验。实验分为对照组和照射组, 照射组照射剂量为 4 Gy。照射后更换细胞培养液, 12 h 后收集细胞进行检测。

1.2.6 透射电镜 4% 异丙酮固定细胞后环氧树脂包埋切片, 甲苯胺蓝染色, 铜网法 JEM-1400+GATAN CCD832 投射电子显微镜观察细胞。

1.2.7 蛋白提取 取培养 48 h 后细胞, 添加 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的细胞裂解液裂解细胞, 并用细胞刮刀收集裂解液于 1.5 ml 离心管中。充分溶解后, 10 319 r/min 离心 5 min, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析, 组间比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人脑胶质瘤 U87 细胞的鉴定

为验证 U87 细胞具有神经干细胞、神经元及神经胶质细胞等多种特性, 而且有较强的增殖活性, 笔者选取神经上皮干细胞标志物 Nestin、神经胶质细胞标志物 GFAP、神经元标志物 β -tubulin III、干细胞和胶质瘤标志物 CD133 及增殖细胞相关核抗原 Ki-67 对人脑胶质瘤 U87 细胞进行鉴定 (见图 1)。

2.2 辐射处理后 U87 细胞中 β -catenin 的表达

分别提取照射组和对照组细胞中的蛋白,用 Western blot 检测细胞中 β -catenin 的表达,并使用 Image J 软件进行灰度分析。对照组 β -catenin 蛋白相对表达量为 (0.414 ± 0.012) ,照射组 β -catenin 蛋白的相对表达量为 (0.097 ± 0.003) ,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t=24.420, P=0.000$),照射组 β -catenin 蛋白相对表达量降低 (见图 2)。

2.3 抑制 β -catenin 对细胞辐射抵抗的影响

用 $5 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 IWR-1-endo 处理 U87 细胞进行辐射实验。CCK-8 细胞增殖实验结果显示,对照组细胞数为 $(195\ 200 \pm 5\ 100)$ 个, IWR-1-endo 联合照射组细胞数为 $(94\ 234 \pm 3\ 394)$ 个,两组比较,差异有统计学意义 ($t=16.790, P=0.000$), IWR-1-endo 联合照射组 U87 细胞增殖能力减弱 (见图 3A)。照射组、对照组及 IWR-1-endo 联合照射组细胞增殖个

数比较,差异有统计学意义 ($F=673.700, P=0.000$)。进一步组间两两比较,经 LSD- t 检验,对照组与照射组细胞数比较,差异有统计学意义 ($t=32.260, P=0.000$),对照组与 IWR-1-endo 联合照射组细胞数比较,差异有统计学意义 ($t=30.080, P=0.000$),照射组与 IWR-1-endo 联合照射组细胞数比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。照射组和 IWR-1-endo 联合照射组比对照组 U87 细胞增殖个数少。而照射组和 IWR-1-endo 联合照射组的比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$) (见图 3B)。

平板克隆实验显示, IWR-1-endo 联合照射组的细胞克隆形成率为 $(0.360 \pm 0.050)\%$,对照组细胞克隆形成率为 $(0.770 \pm 0.110)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t=5.513, P=0.005$), IWR-1-endo 联合照射组细胞克隆形成率降低 (见图 3C)。照射组、

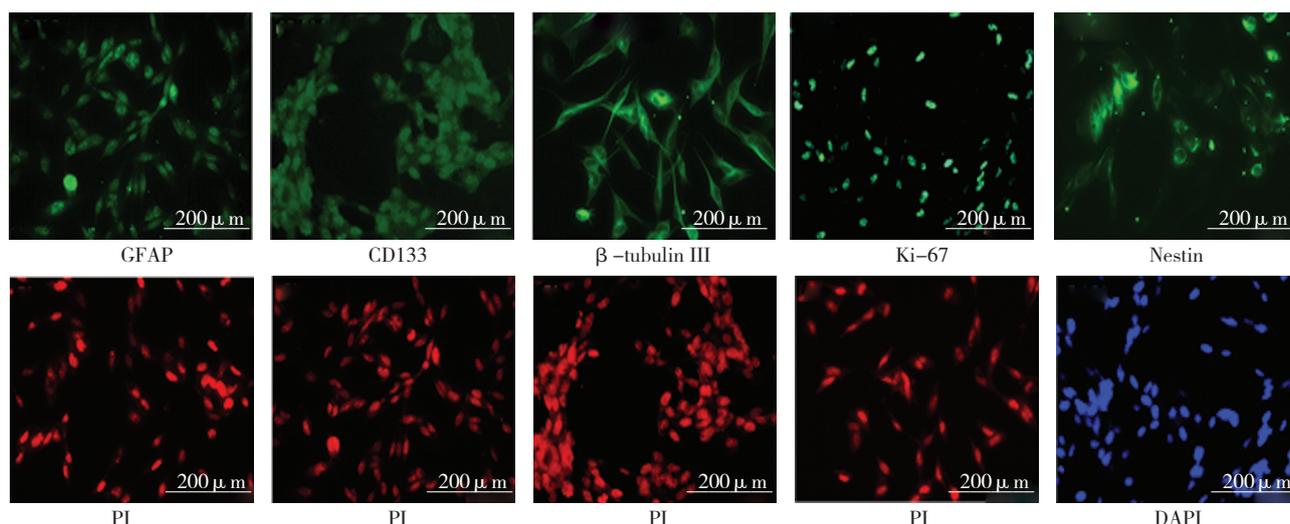
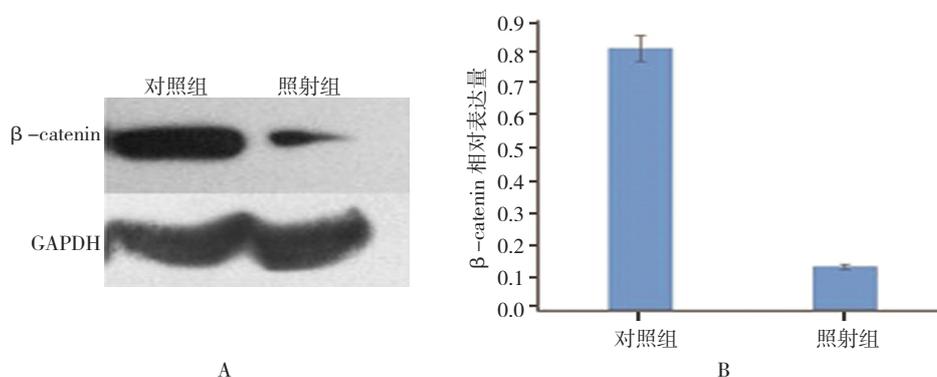


图 1 人脑胶质瘤 U87 细胞的鉴定

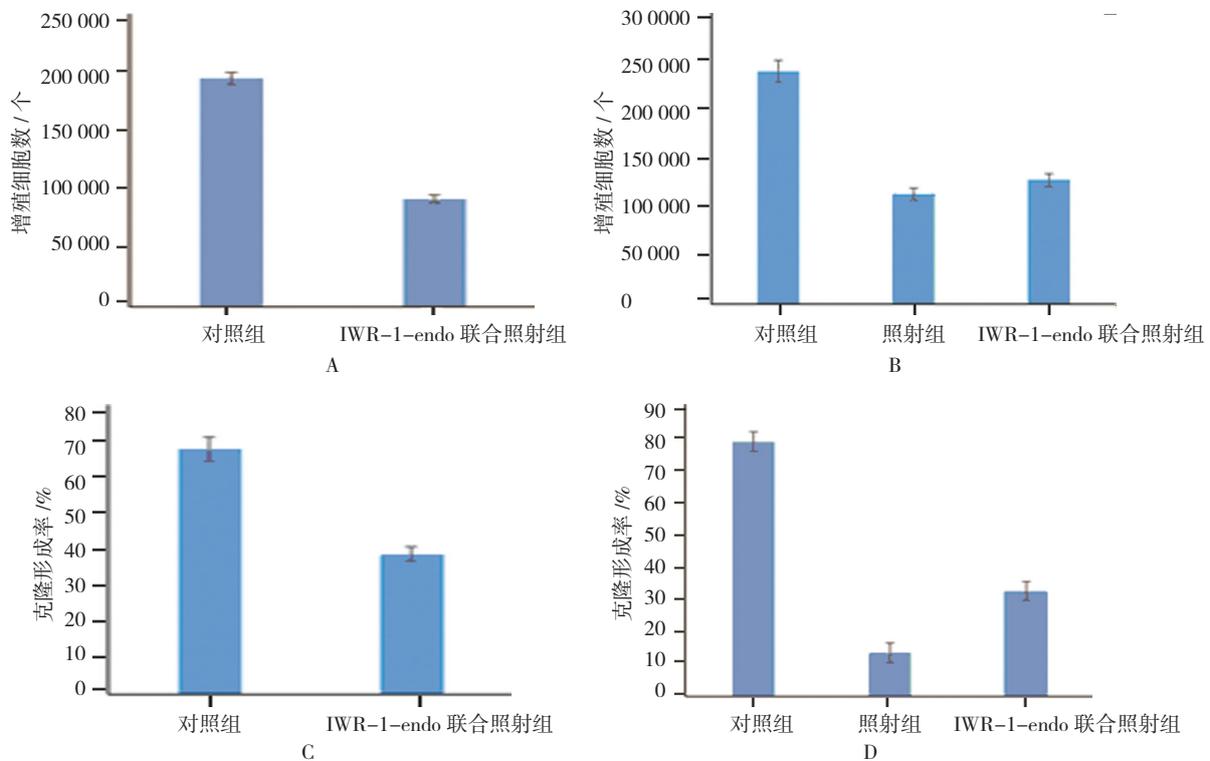


A: Western blot 检测; B: Image J 灰度分析定量

图 2 对照组和照射组细胞中 β -catenin 的表达

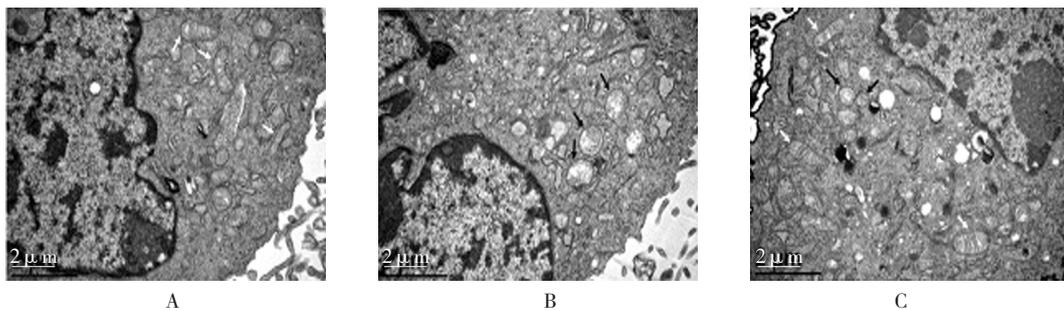
对照组及 IWR-1-endo 联合照射组细胞克隆形成率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=46.810, P=0.0002$)。进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, 对照组与照射组细胞克隆形成率比较, 差异有统计学意义 ($t=9.589, P=0.002$), 对照组与 IWR-1-endo 联合照射组细胞克隆形成率比较, 差异有统计学意义 ($t=5.915, P=0.010$), 照射组与 IWR-1-endo 联合照射组细胞克隆形成率比较, 差异有统计学意义 ($t=3.674, P=0.035$)。照射组和 IWR-1-endo 联合照射组比对照组的 U87 细胞克隆形成率低, 而 IWR-1-endo 联合照射组的细胞克隆形成率比照射组高 (见图 3D)。

电镜结果显示, 对照组线粒体成椭圆形, 双层膜及线粒体嵴较清晰 (见图 4A); 高剂量 X 射线照射后, U87 细胞线粒体肿胀, 形状接近圆形, 外膜较完整, 但中央为细粒状物质或大空泡 (见图 4B); 但 IWR-1-endo 联合照射组在经过 X 射线照射后, 部分线粒体形状较正常, 只有少量肿胀呈圆形, 中央为细粒状物质或大空泡 (见图 4C)。经 X 射线照射的细胞内线粒体肿胀严重, 嵴几乎完全消失 (见图 4B); 而经 X 射线照射的 IWR-1-endo 联合照射组中, 细胞内线粒体形状较为完好 (见图 4C)。提示 IWR-1-endo 可能通过抑制 β -catenin 的表达, 起到保护细胞线粒体的作用。



A、B: 各组增殖细胞数比较; C、D: 各组细胞克隆形成率比较

图 3 各组细胞增殖、克隆形成率比较 ($\bar{x} \pm s$)



A: 对照组; B: 照射组; C: IWR-1-endo 联合照射组。白色箭头示较正常线粒体, 黑色箭头示异常线粒体

图 4 3 组透射电镜图

3 讨论

射线对细胞的直接影响来源于辐射能量干扰细胞的氧化防御体系,细胞中活性氧增多,最终导致细胞 DNA 损伤^[7]。然而,细胞会通过改变基因表达、改变细胞因子表达量等方式对辐射产生抗性^[8-11]。在本研究中,受到高剂量 X 射线照射的 U87 细胞中 β -catenin 蛋白表达量降低,提示细胞中 β -catenin 的表达变化可能与辐射有一定关系。 β -catenin 是具有多种功能的蛋白,在细胞黏附和基因转录中发挥重要作用,并且在 β -catenin 在有丝分裂过程中参与促进中心体分离^[12]。细胞中 β -catenin 的累积受有糖原合成酶激酶 3 β 、Axin 蛋白参与的多种蛋白组成的破坏复合体的影响,被破坏复合体磷酸化 β -catenin 进一步被蛋白酶体水解^[13]。因此稳定破坏复合体或诱导其组成蛋白,可以促进 β -catenin 的磷酸化和降解,从而减少细胞中 β -catenin 的累积。为了验证此推论,笔者选取 IWR-1-endo 来抑制细胞中 β -catenin。IWR-1-endo 是一种 Axin 蛋白激活剂,可以降低细胞中 β -catenin 的表达量。随着 β -catenin 的降低,受辐射的细胞表现出辐射抵抗的现象,如细胞增殖和克隆形成率增高等。CCK-8 细胞增殖检测可以灵敏、快速检测活细胞数量变化;而细胞平板克隆实验可以反应细胞贴壁后的存活率及增殖活力,反应了细胞群体依赖性和增殖 2 个重要性状,用于评估辐射对细胞的亚致死性损伤情况。结果显示,在未经辐射照射前,IWR-1-endo 可以抑制细胞增殖和克隆形成率,说明此条件下 β -catenin 表达降低,对 U87 增殖和存活能力起到抑制作用。但经 IWR-1-endo 处理的细胞在接受辐射后,增殖细胞数和平板克隆形成率呈增加的趋势。以上结果显示, β -catenin 表达降低对细胞抵抗辐射伤害可能有保护作用。透射电镜结果发现, β -catenin 表达降低的细胞在接受辐射后,线粒体结构较对照组相对完整,线粒体形态较正常。提示 β -catenin 表达降低可能通过保护线粒体来抵抗辐射引起的细胞凋亡,从而起到保护作用。以往研究发现,电离辐射引起内源性自由基增多,其作用位点主要为线粒体膜、DNA 及蛋白质,对线粒体转膜功能、mtDNA 的断裂和碱基突变、ATP 合成等都有直接影响,因此线粒体是电离辐射诱导的凋亡的主要靶点^[14-15]。线粒体形态与细胞凋亡有密切联系,线粒体从管状向

点状表型的转换是细胞凋亡的表现,线粒体嵴重塑和开放与细胞色素 C 介导的细胞凋亡有关^[16]。综上所述, β -catenin 表达量的降低能维持辐射后细胞中线粒体形态,这个作用可能与细胞对辐射损伤的抵抗有关。

参考文献:

- [1] NIYAZI M, HARTER P N, HATTINGEN E, et al. Bevacizumab and radiotherapy for the treatment of glioblastoma: brothers in arms or unholy alliance[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2313-2328.
- [2] YANG Z, ZHANG Z, WANG X, et al. Intensity-modulated radiotherapy for gliomas: dosimetric effects of changes in gross tumor volume on organs at risk and healthy brain tissue[J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9(Issue1): 3545-3554.
- [3] ZHANG R, YAO Q, REN C, et al. Upregulation of long noncoding RNA small nucleolar RNA host gene 18 promotes radioresistance of glioma by repressing semaphorin 5A[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016, 98(4): 877-887.
- [4] MAACHANI U B, SHANKAVARAM U, KRAMP T, et al. FOXM1 and STAT3 interaction confers radioresistance in glioblastoma cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 77365-77377.
- [5] YE H, CHEN M, CAO F, et al. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16(1): 178.
- [6] YANG W, YU H, SHEN Y, et al. MiR-146b-5p overexpression attenuates stemness and radioresistance of glioma stem cells by targeting HuR/lincRNA-p21/beta-catenin pathway[J]. 2016, 7(27): 41505-41526.
- [7] TRIBIUS S, PIDEA A, CASPER D. ATM protein expression correlates with radioresistance in primary glioblastoma cells in culture[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50(2): 511-523.
- [8] SAFA A R. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells[J]. *Crit Rev Oncog*, 2016, 21(3): 203-219.
- [9] EL-JAWAHRI A R, LAUTENSCHLAEGER T, PATEL D, et al. Role of Galectin-3 in the activation of p-ERK and in resistance to radiotherapy in glioblastoma through the activation of p-ERK independent of Ras activity[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15_suppl): 11073.
- [10] STORCH K, DICKREUTER E, ARTATI A, et al. BEMER electromagnetic field therapy reduces cancer cell radioresistance by enhanced ROS formation and induced DNA damage[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0167931.
- [11] YAMAMOTO V N, THYLUR D S, SINHA U K, et al. Overcoming radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncology*, 2016, 63(0): 44-51.
- [12] BAHMANYAR S, KAPLAN D D, DELUCA J G, et al. β -Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation[J]. *Genes*

- Dev, 2008, 22(1): 91-105.
- [13] LUO W, PETERSON A, GARCIA B A, et al. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the β -catenin degradation complex[J]. EMBO J, 2007, 26(6): 1511-1521.
- [14] BARTOLETTISTELLA A, MARIANI E, KURELAC I, et al. Gamma rays induce a p53-independent mitochondrial biogenesis that is counter-regulated by HIF1 α [J]. Cell Death & Disease, 2013, 4(6): e663.
- [15] IVANOV V N, GHANDHI S A, ZHOU H, et al. Radiation response and regulation of apoptosis induced by a combination of TRAIL and CHX in cells lacking mitochondrial DNA: a role for NF-kappaB-STAT3-directed gene expression[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(11): 1548-1566.
- [16] ZHU X, PERRY G, SMITH M A, et al. Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of alzheimer's disease[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2012, 33(Suppl 1): 153-159.

(李科 编辑)