

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003015

shRNA-STAT3 增强胶质瘤干细胞放射敏感性的研究

李淑杰, 万 跃, 陶 丹, 周 伟, 谢 悦, 王 颖
(重庆大学附属肿瘤医院肿瘤放射治疗中心, 重庆 400030)

【摘要】目的:从人胶质瘤 U251 细胞系分离培养胶质瘤干细胞样细胞, 鉴定其放射敏感性, 并考察信号转导与转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 基因与胶质瘤干细胞放射敏感性的关系。**方法:**采用磁珠分选法分离 CD133⁺胶质瘤 U251 细胞, 并对 CD133⁺ U251 细胞进行成球能力及放射敏感性检测。分别构建 STAT3 基因的 shRNA 沉默表达质粒和慢病毒过表达质粒并鉴定, 再转染 CD133⁺ U251 细胞, 通过流式细胞术、Western blot 考察 STAT3 表达与胶质瘤细胞放射敏感性的关系。**结果:**经磁珠分选的 CD133⁺U251 细胞有较强成球生长能力。经 2、4、6、8 和 10 Gy 剂量射线照射后, CD133⁺组细胞抑制率明显低于 CD133⁻组和正常细胞组($P=0.000$), 且细胞凋亡比例更低。转染 STAT3 基因 shRNA 沉默表达质粒和慢病毒过表达质粒的 CD133⁺U251 细胞通过 Western blot 检测发现沉默组中 STAT3 蛋白表达降低。经 2、4、6、8 和 10 Gy 剂量射线照射后, STAT3 沉默组相较于 STAT3 过表达组有更高的细胞抑制率($P=0.000$), 且细胞周期抑制及凋亡增加。**结论:**磁珠分选的 CD133⁺胶质瘤细胞有放射性抵抗的干性特征, 下调 STAT3 表达可提高胶质瘤细胞的放射敏感性。

【关键词】胶质瘤; 干细胞; 信号转导与转录活化因子 3; 放射敏感性

【中图分类号】R739.41

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-05-19

Enhancement of radiosensitivity of glioma stem cells by shRNA-STAT3

Li Shujie, Wan Yue, Tao Dan, Zhou Wei, Xie Yue, Wang Ying
(Cancer Radiotherapy Center, Chongqing University Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To isolate and culture glioma stem cell-like cells from human glioma U251 cell line, identify the radiosensitivity, and investigate the relationship between signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) gene and radiosensitivity of glioma stem cells. **Methods:** The CD133⁺ glioma U251 cells were isolated by magnetic bead sorting method, and the spheroidizing ability and radiosensitivity of CD133⁺ U251 cells were detected. The shRNA silencing expression plasmid and lentiviral over expression plasmid of STAT3 gene were constructed and identified. The U251 cells were transfected with recombinant plasmid, and the relationship between STAT3 expression and radiosensitivity of glioma cells was investigated by flow cytometry and Western blot. **Results:** The CD133⁺ U251 cells sorted by magnetic beads had stronger spheroidizing ability. The inhibition rate of CD133⁺ cells was significantly lower than that of CD133⁻ cells and normal U251 cells after 2, 4, 6, 8 and 10 Gy doses of irradiation($P=0.000$), and the apoptosis proportion was lower. CD133⁺U251 cells transfected with shRNA silencing plasmid of STAT3 gene and lentivirus overexpression plasmid showed that STAT3 protein expression decreased in the silencing group by Western blot. After 2, 4, 6, 8 and 10 Gy doses of irradiation, the STAT3 silencing group had higher cell inhibition rate than the overexpression group($P=0.000$), and the cell cycle was inhibited and the apoptosis increased. **Conclusion:** The CD133⁺ glioma cells sorted by magnetic beads have the radiation resistance characteristic of stem cell. The glioma cell radiosensitivity can be improved by down regulating the STAT3 expression.

【Key words】glioma; stem cell; signal transducer and activator of transcription 3; radiosensitivity

脑胶质瘤是最常见的原发性颅内恶性肿瘤, 占颅内肿瘤的 40%~50%。手术加术后辅助放疗是恶

性胶质瘤的标准治疗模式, 但治疗后复发率较高, 且预后不佳, 平均生存期仅 8~11 个月。胶质瘤细胞对放疗的抵抗是治疗失败的重要原因^[1-2]。

根据干细胞理论, 恶性胶质瘤中存在的胶质瘤干细胞参与肿瘤的生长、复发及转移, 也是导致胶质瘤放疗抵抗的重要原因^[3-4]。有研究显示, 信号转导与转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是一种特殊的转录因子, 在包括脑胶质瘤在内的多种恶性肿瘤细胞中都观

作者介绍: 李淑杰, Email: 13274019536@163.com,

研究方向: 恶性肿瘤放射治疗。

通信作者: 王 颖, Email: 13996412826@163.com。

基金项目: 重庆市科学技术委员会院士牵头科技创新引导专项资助项目(编号: cstc2017jcyj-yszxX0014); 重庆市科学技术委员会技术创新与应用示范资助项目(编号: cstc2018jsscx-msybX0153); 重庆市卫计委面上资助项目(编号: 20142097)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220424.1551.005.html>
(2022-04-25)

察到 STAT3 的异常激活。STAT3 是激活多种生长因子或细胞因子信号通路上的关键点,其表达上调可促进肿瘤细胞增殖。已有研究表明,胶质瘤干细胞中存在 STAT3 通路激活,介导胶质瘤的放疗抵抗和复发^[5-6]。

鉴于此,本研究通过构建 STAT3 基因 shRNA 载体,下调胶质瘤干细胞中 STAT3 信号通路功能,并验证该 shRNA 载体转染胶质瘤干细胞后可提高肿瘤细胞放疗敏感性,为提高胶质瘤细胞放射治疗敏感性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

人脑胶质瘤细胞株 U251 购自上海中国科学院细胞库。细胞磁珠分选架和 CD133 磁珠分选试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司(德国)。兔抗人 STAT3 多克隆抗体购自 Abcam 公司(英国)。plvxshRNA-EGFP(2A)-puro 载体购自优宝生物公司。CCK-8 试剂盒购自碧云天公司(中国)。Bam H I 和 Eco R I 限制性内切酶为日本 Takara 公司产品。放疗设备为 X 射线直线加速器(美国 VARIAN IX)。

1.2 CD133⁺干细胞样人脑胶质瘤细胞 U251 的分离

将 U251 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中常规传代培养。收集重悬 U251 细胞,加入 20 μ L FcR 阻断剂和 20 μ L CD133 MicroBeads-Tumor Tissue,充分混匀,置 4℃ 孵育 15 min,磁性标记细胞。每 10^7 个细胞加入 2 mL 缓冲液,离心去除上清后 500 μ L 缓冲液重悬细胞待分选。将经过 CD133 抗体包被的 LS 分选柱安装入分选器中,分选柱不带磁性,但放入带磁场的分选器中时,可使分选器的磁场增强 1 000 倍,足以分选出目的细胞。分选柱中加入 3 mL 缓冲液,在重力作用下自然流尽以预处理分选柱。将上述磁性标记后的待分选的细胞加入 LS 分选柱中,收集未标记的细胞。用 3 mL 缓冲液清洗分选柱,收集未标记的细胞,重复 2 次。分选柱吸取 5 mL 缓冲液,冲洗出磁性标记的细胞,即为 CD133⁺胶质瘤 U251 细胞。按照上述方法利用负性 LD 分选柱进行 CD133⁺胶质瘤 U251 细胞的分选,即为 CD133⁺胶质瘤 U251 细胞。

1.3 流式细胞仪鉴定 CD133⁺U251 细胞

将磁珠分选后的 CD133⁺U251 细胞离心(300g, 10 min),去上清,保留 50 μ L 缓冲液。每个流式检测管中加入 10 μ L Labeling Check Reagent-PE,同时设置空白管。在各管中分别加入 50 μ L 细胞悬液,混匀后 4℃ 避光孵育 10 min。孵育完成后加入 2 mL 缓冲液,离心(300g, 10 min)去上清,重复洗涤过程 2 次。取 100 μ L 缓冲液重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.4 CD133⁺U251 细胞成球能力检测

目前比较公认的是 CD133⁺细胞具备成球能力的干性特征,而 CD133⁻细胞不具备成球能力,故实验只对 CD133⁺细胞成球能力进行检测。配置 CD133⁺细胞专用培养基:在 DMEM/F12 培养基中加入 2% B27 细胞培养添加剂、1% L-Glutamine,

EGF(20 ng/mL),bFGF(20 ng/mL),LIF(10 ng/mL),按 1% 体积加入青霉素-链霉素双抗贮存液,使青霉素和链霉素的终浓度分别为 100 U/mL 和 100 μ g/mL,4℃ 保存。取 CD133⁺细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化并轻轻吹打,使之成为单细胞,活细胞计数,培养液调整细胞密度至 3×10^3 个/mL。将细胞铺板于低黏附 6 孔板,每孔 2 mL,置于 37℃、5%CO₂ 孵箱培养。每 3 天添加 0.5 mL CD133⁺细胞培养基。每日细胞拍照记录。

1.5 CD133⁺细胞的放射敏感性检测

通过细胞克隆形成实验检测 CD133⁺与 CD133⁻U251 细胞的放射敏感性。实验分为 3 组:U251 细胞组、CD133⁺U251 细胞组和 CD133⁻U251 细胞组。取经不同处理的各组细胞,胰酶消化为单细胞后调整细胞密度至 1×10^4 个/mL,分装离心管,按 0、2、4、6、8、10 Gy 的分组剂量进行放射线照射处理[6 MV-X 射线,源皮距(source skin distance,SSD)100 cm,剂量率 400 MU/min,组织补偿 0.5 cm]。处理后的各组细胞铺 DMEM 培养基,置 37℃、5%CO₂ 孵箱培养 14~21 d 直至克隆形成。观察细胞克隆数,计算各组在不同辐射剂量(x Gy)下的细胞抑制率。公式:细胞抑制率=(0 Gy 细胞克隆数- x Gy 细胞克隆数)/0 Gy 细胞克隆数。完成上述实验后,将各组细胞经 8 Gy 剂量照射后继续孵育 48 h,上流式细胞仪行细胞周期及 Annexin V 法凋亡检测。

1.6 STAT3 基因 shRNA 质粒构建

1.6.1 引物设计合成 plvxshRNA-EGFP(2A)-puro 模板中的 loop 结构选用 CTCGAG。正义链模板 5' 端添加 GATCC,与 Bam H I 酶切后形成的黏端互补;反义链模板 5' 端添加 AATTC,与 Eco R I 酶切后形成的黏端互补。质粒构建的正义链、反义链根据 NCBI 中已经发表的序列进行合成。构建的干扰载体根据目的基因的序列选择靶序列进行设计。靶序列:shRNA-STAT3:CATCTGCCTAGATCGGCTA。正义链:5'-GATCCCATCTGCCTAGATCGGCTACTCGAGTAGCCGATCTAGGCAGATGTTTTTTG-3'。反义链:5'-AATTCAAAAAACATCTGCCTAGATCGGCTACTCGAGTAGCCGATCTAGGCAGATG-3'。

1.6.2 DNA oligo 模板退火 将 DNA oligo 分别用 TE(pH8.0)溶解,浓度为 100 μ mol/L。取相应的正义链和反义链 oligo 溶液行 PCR 退火处理。PCR 条件:95℃ 5 min,85℃ 5 min,75℃ 5 min,70℃ 5 min,4℃ 保存。退火处理后得到浓度为 10 μ mol/L 的 shRNA 模板。将所得模板溶液稀释至终浓度 200 nmol/L 用于连接反应。

1.6.3 plvxshRNA-EGFP(2A)-puro-STAT3 质粒的构建 先将 plvxshRNA-EGFP(2A)-puro 载体加入 Eco R I 和 Bam H I PCR 反应体系行双酶切反应。再加入 shDNA 模板,于 16℃ 连接 1 h。用热穿孔法将纯化的连接产物转化入感受态细菌。转化细菌富集后涂含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板,37℃ 培养 16 h。挑取 4 个单独、饱满的菌落加入上述 LB 培养液振荡培养 16 h 后提取质粒。

1.7 STAT3 慢病毒过表达质粒的构建

1.7.1 STAT3 基因序列合成 按 GeneBank 所查询的 STAT3 基因信息进行序列合成。其中,5' 端加入 Sma I 限制性内切酶位点 CCCGGG,3' 端加入 Mlu I 限制性内切酶位点 ACGCGT。

1.7.2 STAT3 基因的过表达质粒克隆 利用限制性内切酶 *Sma* I、*Mlu* I 双酶切 STAT3 基因和 Plvx-cmv-Zsgreen-puro 慢病毒载体;经 DNA 纯化试剂盒纯化酶切目的基因和载体基因片段,然后在 T4 DNA 连接酶作用下将双酶切目的基因插入 Plvx-cmv-Zsgreen-puro 载体。将连接产物转染感受态细菌,培养后行质粒酶切鉴定。

1.8 STAT3 沉默和过表达 U251 干细胞放射敏感性检测

实验分为 3 组:胶质瘤干细胞(CD133⁺细胞)组、胶质瘤干细胞+STAT3 shRNA 组和胶质瘤干细胞+STAT3 过表达组。将 STAT3 沉默组和 STAT3 过表达组细胞按 2、4、6、8、10 Gy 的分组剂量进行辐照处理(6 MV-X 射线,SSD 100 cm,剂量率 400 MU/min,组织补偿 0.5 cm)。处理后细胞接种于 96 孔板,培养箱内培养 48 h。每组设 3 个复孔,同时设置对照孔及空白孔。培养结束后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 4 h。酶标仪测定各孔 450 nm 处光密度(optical density,OD)值。计算细胞存活率及抑制率。细胞存活率(%)=(OD_{实验组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组}) $\times$ 100%;细胞抑制率(%)=1-细胞存活率(%)。完成上述实验后,将 STAT3 沉默和过表达组细胞经 8 Gy 剂量照射后继续孵育 48 h,上流式细胞仪行细胞周期及 Annexin V 法凋亡检测。

1.9 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达

在 STAT3 沉默组和 STAT3 过表达组胶质瘤干细胞接受 8 Gy 剂量放射性照射前后,分别按 Western blot 试剂盒方法检测 STAT3 表达。一抗为兔抗人 STAT3 多抗,二抗为羊抗兔

IgG。同时设未经照射的正常胶质瘤干细胞组为对照。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计分析软件处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料用率表示。Western blot 结果经 Image J 软件进行图像灰度计算,2 组间 STAT3 蛋白表达水平采用 *t* 检验,多组 STAT3 蛋白表达水平、细胞抑制率采用多因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 磁珠分选获得 CD133⁺U251 细胞

经培养 3 d 后可见细胞成球生长逐渐明显,提示分选得到的 U251 细胞有较好的成球生长能力(图 1)。

2.2 CD133⁺细胞流式细胞仪鉴定

KB 为未加 PE 标记抗体的空白对照,VIL 代表 CD133⁻细胞,VIR 代表 CD133⁺细胞。可见空白对照组大量洗脱细胞为 CD133⁻细胞(99.84%),CD133⁺细胞占比极少(0.16%);而实验组 CD133⁺细胞占比达 96.12%,提示经磁珠分选后 CD133⁺U251 细胞得到有效分选富集(图 2)。

2.3 CD133⁺U251 细胞成球能力检测

经 CD133⁺细胞培养基培养后,可以观察到随着培养时间延长,CD133⁺U251 细胞成球生长能力逐步增强,具备干性生长特征(图 3)。

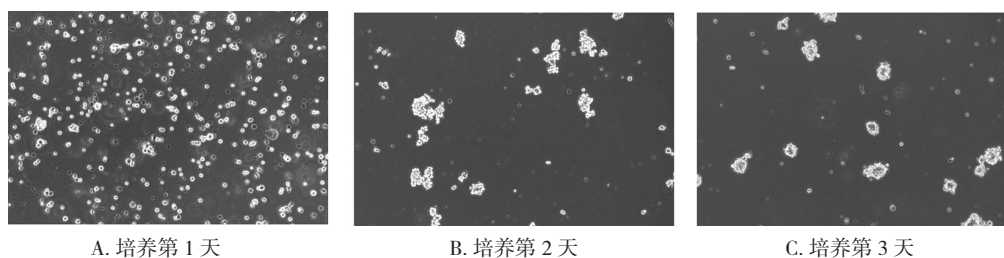


图 1 CD133⁺细胞成球能力检测(100 $\times$)

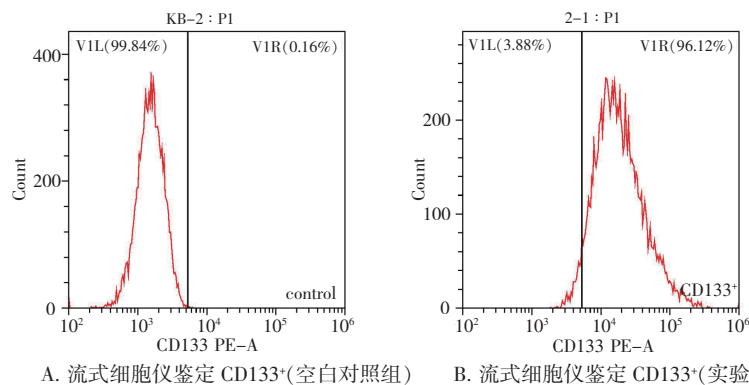


图 2 CD133⁺细胞流式细胞仪鉴定

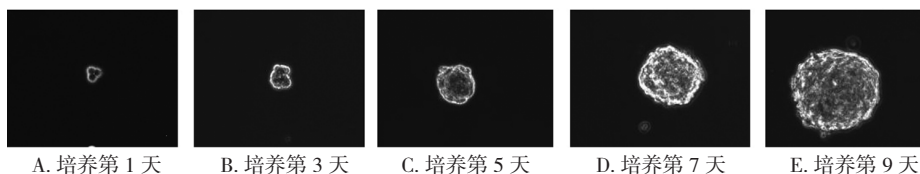


图 3 CD133⁺U251 细胞成球能力检测(200 $\times$)

2.4 CD133⁺细胞的放射敏感性检测

通过对正常 U251 细胞组、CD133⁺U251 细胞组和 CD133⁻U251 细胞组进行梯度剂量的放射线照射,计数细胞克隆数,计算抑制率。结果显示,2 Gy 照射剂量下,正常组、CD133⁺组和 CD133⁻组抑制率分别为 $(13.54 \pm 4.45)\%$ 、 $(7.99 \pm 0.14)\%$ 和 $(17.16 \pm 4.33)\%$;4 Gy 照射剂量下,上述 3 组抑制率分别为 $(28.81 \pm 5.34)\%$ 、 $(18.44 \pm 6.26)\%$ 和 $(33.37 \pm 3.61)\%$;6 Gy 照射剂量下,上述 3 组抑制率分别为 $(39.12 \pm 9.50)\%$ 、 $(24.36 \pm 10.26)\%$ 和 $(42.45 \pm 8.65)\%$;8 Gy 照射剂量下,上述 3 组抑制率分别为 $(64.13 \pm 3.57)\%$ 、 $(31.94 \pm 9.09)\%$ 和 $(65.29 \pm 3.48)\%$;10 Gy 照射剂量下,上述 3 组抑制率分别为 $(68.92 \pm 10.85)\%$ 、 $(45.15 \pm 7.19)\%$ 和 $(68.74 \pm 8.45)\%$ 。并且,CD133⁺细胞组抑制率均明显低于正常细胞组和 CD133⁻细胞组 ($F=3.193, P=0.000$),提示 CD133⁺细胞存在放射线抵抗现象。进一步通过流式细胞仪检测经 8 Gy 照射剂量后各组细胞的细胞周期及凋亡情况。结果显示,相较于 CD133⁻组,CD133⁺组有更高比例细胞处于 G₂ 和 S 期, DNA 合成受抑制程度更低 (图 4A), 且细胞凋亡比例更低 (图 4B), 提示分选得到的 CD133⁺细胞有更高的放射抵抗性。

2.5 STAT3 基因 shRNA 质粒和过表达质粒构建

STAT3 基因 shRNA 质粒构建参考目的基因 STAT3 序列设计 PCR 引物扩增相应的干扰序列。酶切载体后进行定向连接,将产物转化感受态细菌,培养后提取质粒。STAT3 基因慢病毒过表达质粒构建,利用全基因合成方法得到含特定黏性末端 STAT3 基因 ORF 序列;将目的载体 Plvx-cmv-ZsGreen-puro 进行酶切后与合成产物连接,将连接产物转化感受态细

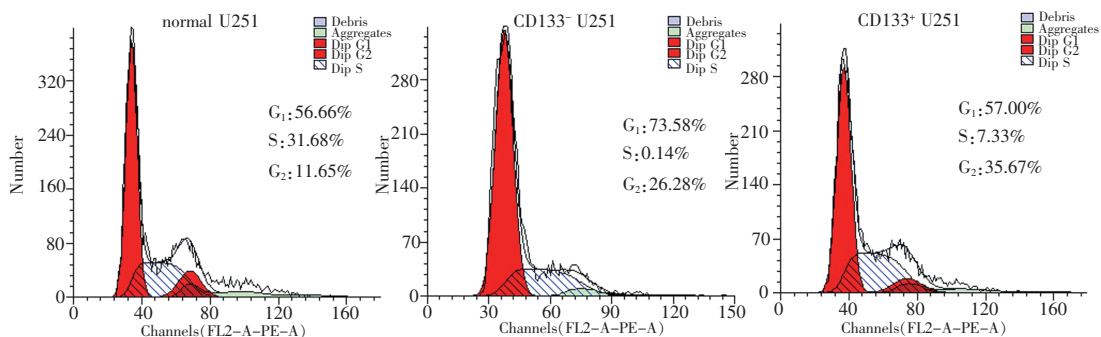
菌,培养后行质粒酶切鉴定。结果显示,在经 *Sma* I、*Mlu* I 双酶切 PCR 后的电泳图中,在 9 kb 附近可见目的条带 (图 5)。

2.6 STAT3 沉默和过表达 U251 干细胞放射敏感性检测

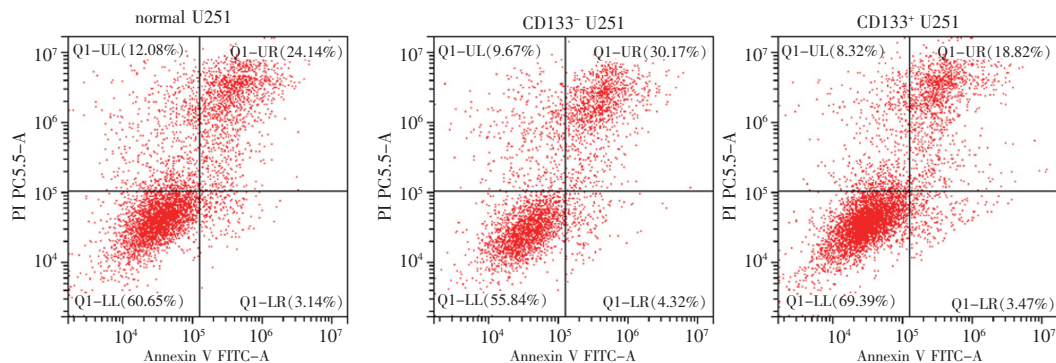
分别对 STAT3 沉默组和 STAT3 过表达组干细胞进行梯度剂量放射线照射并孵育,酶标仪测定 450 nm 处 OD 值,并按公式计算细胞抑制率。结果显示在不同照射剂量强度下,STAT3 沉默组相较于 STAT3 过表达组有更高的细胞抑制率 (2、4、6、8 和 10 Gy 剂量下,组间比较 $F=32.627, P=0.000$),结果见表 1。进一步流式细胞仪检测经 8 Gy 照射剂量后 STAT3 沉默组和 STAT3 过表达组细胞周期及凋亡情况。结果显示相较于 STAT3 过表达组,STAT3 沉默组有更高比例细胞周期受到抑制 (图 6A), 且细胞凋亡比例更高 (图 6B), 提示通过下调 STAT3 基因表达,可以提高胶质瘤干细胞对放射线的敏感性。

2.7 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达

各组均在 88 kD 处有条带显示,提示均有 STAT3 表达。各组行蛋白表达灰度分析,结果示正常干细胞组、shRNA-STAT3 组、STAT3 过表达组、shRNA-STAT3+8Gy 组及 STAT3 过表达+8Gy 组分别为 19.49 ± 0.40 、 10.71 ± 0.60 、 23.70 ± 1.88 、 15.18 ± 2.10 、 26.04 ± 2.40 。与正常干细胞组相比,STAT3 蛋白在 STAT3 沉默组表达降低 ($P=0.000$),在过表达组表达增加 ($P=0.000$),方差分析示 3 组 STAT3 蛋白表达水平的差异具有统计学意义 ($F=76.235, P=0.000$),提示成功对干细胞内 STAT3 表达进行了干预。经 8 Gy 放射线照射后,STAT3 沉默组的 STAT3 蛋白表达仍较过表达组明显降低 ($P=0.034$),见图 7。

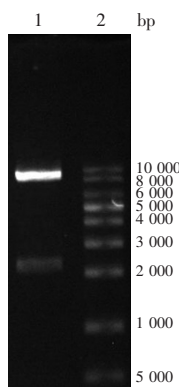


A. 3 组细胞经 8 Gy 照射后细胞周期变化



B. 3 组细胞经 8 Gy 照射后细胞凋亡改变

图 4 流式细胞仪测细胞周期及凋亡

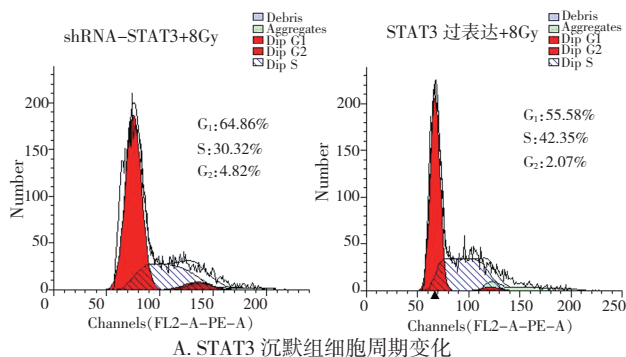


1. STAT3 过表达质粒; 2. DNA marker

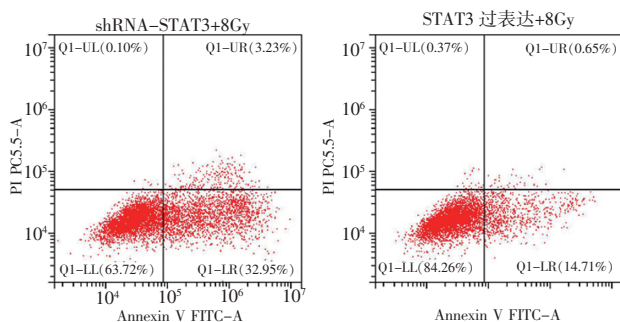
图 5 STAT3 过表达质粒酶切鉴定 PCR

表 1 检测梯度剂量射线照射后各组细胞抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD值	抑制率 /%
空白组	0.23	
正常干细胞对照组	1.51	0.00
STAT3沉默组	0 Gy	1.42 ± 0.02
	2 Gy	1.35 ± 0.04
	4 Gy	1.28 ± 0.03
	6 Gy	1.18 ± 0.05
	8 Gy	1.07 ± 0.02
	10 Gy	0.96 ± 0.03
STAT3过表达组	0 Gy	1.65 ± 0.04
	2 Gy	1.49 ± 0.03
	4 Gy	1.45 ± 0.04
	6 Gy	1.33 ± 0.04
	8 Gy	1.21 ± 0.08
	10 Gy	1.09 ± 0.03
F 值		32.627
P 值		0.000



A. STAT3 沉默组细胞周期变化



B. STAT3 沉默组细胞凋亡改变

图 6 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡

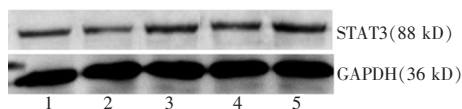
1. 正常干细胞组; 2. shRNA-STAT3 组; 3. STAT3 过表达组;
4. shRNA-STAT3+8Gy 组; 5. STAT3 过表达 +8Gy 组

图 7 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达

3 讨论

肿瘤放射生物学研究发现,肿瘤干细胞与非肿瘤干细胞的辐射敏感性存在较大差异。与一般的肿瘤细胞相比,肿瘤干细胞在放化疗中表现出更强的抗性^[7]。因此针对肿瘤干细胞放疗抵抗的逆转研究是提高放疗后局部控制率的重要突破口。所以在本研究中,首先对胶质瘤干细胞进行分离和鉴定。已有研究证实 CD133 是胶质瘤干细胞的表面标志物^[8],因此本研究以 CD133 为靶标,通过磁珠分选的方式分别获得了 CD133⁺和 CD133⁻ U251 胶质瘤细胞。对 CD133⁺细胞培养后发现细胞有较好的成球能力。进一步通过流式细胞仪鉴定,CD133⁺细胞的富集程度达 96.12%,保证了后续胶质瘤干细胞干性检测结果的可靠性。

成球生长能力是肿瘤干性细胞的重要特征,也是鉴定肿瘤干细胞干性的重要方法。通过对 CD133⁺胶质瘤细胞的成球能力检测,结果显示随着培养时间延长,单个细胞直径逐步增大,提示分离得到的 CD133⁺细胞具有较好的自我更新生长能力。

胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞特有的中间丝成分,是胶质瘤的干细胞分化标记物之一^[9-10]。微管相关蛋白 2 (microtubule associated protein-2, MAP2)属于结构性微管蛋白家族,在中枢神经系统神经元细胞体和树突中表达。研究发现,降低胶质瘤细胞中 MAP2 的表达,可降低胶质瘤细胞增殖活性和迁徙能力,并增加其凋亡^[11],由此推断 MAP2 在胶质瘤干性分化中具有一定作用。人脑髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)也被广泛研究认定与胶质瘤的增殖和抗凋亡作用相关。本研究通过免疫细胞化学法检测,发现经诱导分化培养后的 CD133⁺胶质瘤细胞中 GFAP、MAP2 和 MBP 的表达高于 CD133⁻细胞,且与正常胶质瘤细胞表达类似,提示筛选富集到的 CD133⁺胶质瘤细胞有较强的干性分化潜能。

在放射线抵抗性实验中发现经相同剂量放射线辐照后,CD133⁺U251 细胞比正常 U251 细胞和 CD133⁻U251 细胞有更高的细胞存活比例,提示 CD133⁺细胞有更强的放射线抵抗性,这进一步印证了筛选得到的 CD133⁺胶质瘤细胞的干性特征。

STAT3 是一种存在于细胞浆与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白。研究发现 STAT3 在胶质瘤细胞中高表达,而在正常脑组织中无表达^[9],并且可促进胶质瘤干细胞分化^[10]。已有研究发现 STAT3 的活化增加与多种肿瘤的化疗和放疗抵抗相关^[5-6],并且通过抑制 STAT3 通路可逆转肿瘤的放疗抵抗^[6-12]。You S 等^[13]研究发现放射性可导致肺癌细胞 STAT3 表达增加,提高肺癌的放疗抵抗能力,而在通过 STAT3 特异性抑制剂及 shRNA 下调 STAT3 表达后,肺癌细胞的放疗敏感性得到提高。Kim JS 等^[14]通过下调 STAT3 的表达,增加了放疗介导的乳腺癌细胞死亡。

本研究分别构建了沉默 STAT3 基因表达的 shRNA 质粒和上调 STAT3 基因表达的慢病毒质粒,并进行质粒 PCR 鉴定。通过对 STAT3 沉默 CD133⁺胶质瘤细胞和 STAT3 过表达 CD133⁺胶质瘤细胞进行梯度剂量放射线辐照。结果显示,下调 STAT3 表达后细胞的放射抵抗性降低,放射线对瘤细胞的抑制率更高,且细胞增殖受到抑制,凋亡增加。进一步通过 Western blot 检测 STAT3 表达情况,同样观察到其在沉默组有明显的表达降低,提示 STAT3 表达降低可能介导了胶质瘤干细胞放射敏感性的增强。

Manic G 等^[15]研究发现,CHK1/2 和 RAD51 参与 DNA 修复过程的激活,并证实对恶性肿瘤干细胞 DNA 完整性的维持至关重要。Park SY 等^[16]通过在 JAK2/STAT3/CCND2 信号通路中敲除 CCND2 和 STAT3 基因,观察到 CHK1/2 和 RAD51 转录下调,逆转了肿瘤干细胞的放疗抵抗,并且通过 MTT 法测定了 STAT3 抑制剂的 IC₅₀ 值,从而评估其在细胞毒性效应最小的情况下对放射抗性的功能效应。这为后续研究提供了思路。后续将对 STAT3 沉默 CD133⁺胶质瘤细胞、STAT3 过表达 CD133⁺胶质瘤细胞与普通胶质瘤细胞放疗敏感性进行对比,进一步探讨胶质瘤放疗抵抗的相关基因通路,并在动物模型上进一步论证通过降低放射抵抗基因表达,实现胶质瘤放疗增敏的可行性。

参 考 文 献

- [1] Yue X, Lan FM, Xia TY. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7[J]. Mol Ther, 2019, 27(11): 1939-1949.
- [2] Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma[J]. Nat Immunol, 2019, 20(9): 1100-1109.
- [3] Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm[J]. Science, 2009, 324(5935): 1670-1673.
- [4] Binello E, Germano IM. Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors[J]. Cancer Sci, 2011, 102(11): 1958-1966.
- [5] Singh N, Krishnakumar S, Kanwar RK, et al. Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers[J]. Drug Discov Today, 2015, 20(5): 578-587.
- [6] Spitzner M, Ebner R, Wolff HA, et al. STAT3: a novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy[J]. Cancers, 2014, 6(4): 1986-2011.
- [7] Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance[J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 8980-8984.
- [8] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396-401.
- [9] 周 任, 张龙洲, 王睿智, 等. STAT3 和 survivin 在人胶质瘤中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(2): 227-229.
- [10] Zhou R, Zhang LZ, Wang RZ, et al. Expression and its significance of STAT3 and survivin in human neurogliomas[J]. J Mod Oncol, 2009, 17(2): 227-229.
- [11] Li GH, Wei H, Lv SQ, et al. Knockdown of STAT3 expression by RNAi suppresses growth and induces apoptosis and differentiation in glioblastoma stem cells[J]. Int J Oncol, 2010, 37(1): 103-110.
- [12] Choe MH, Min JW, Jeon HB, et al. ERp57 modulates STAT3 activity in radioresistant laryngeal cancer cells and serves as a prognostic marker for laryngeal cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(5): 2654-2666.
- [13] Duru N, Fan M, Candas D, et al. HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(24): 6634-6647.
- [14] You S, Li R, Park D, et al. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(3): 606-616.
- [15] Kim JS, Kim HA, Seong MK, et al. STAT3-survivin signaling mediates a poor response to radiotherapy in HER2-positive breast cancers[J]. Oncotarget, 2016, 7(6): 7055-7065.
- [16] Manic G, Signore M, Sistigu A, et al. CHK1-targeted therapy to deplete DNA replication-stressed, p53-deficient, hyperdiploid colorectal cancer stem cells[J]. Gut, 2018, 67(5): 903-917.
- [17] Park SY, Lee CJ, Choi JH, et al. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 399.

(责任编辑:冉明会)