

海细胞所。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。顺铂 (cisplatin) 购自美国 Sigma 公司。USP22 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司的产品。Lipofectamine 2000 试剂、CCK-8 试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 诱导顺铂耐药胶质瘤细胞株

参照文献 [8], 用顺铂剂量梯度爬升筛选方法将 U251 细胞体外培养 10 个月, 建立顺铂耐受细胞株 (U251/CP2)。采用 CCK-8 方法, 测定细胞的顺铂半数抑制浓度 (IC_{50}), 鉴定所诱导的 U251/CP2 细胞株的耐药性。

1.2.2 构建 USP22 沉默表达的细胞株

利用 Lipofectamine 2000 将 USP22-shRNA 表达质粒与病毒包装混合质粒共转染至 293T 细胞, 进行病毒包装。收集病毒液后分别感染 U251 和 U251/CP2 细胞, polybrene 筛选稳定干扰 USP22 表达的细胞克隆。RT-PCR 法检测细胞 USP22 mRNA 表达水平, 鉴定沉默效果。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

转染 24 h 后, 收集细胞。PBS 洗涤 2 次, 重悬于 500 μ L 的 Binding Buffer 溶液中, 细胞筛过筛, 加入 5 μ L Annexin V 和 5 μ L PI 染色液后混匀, 室温下孵育 15 min, 然后上样至流式细胞仪检测分析凋亡情况。

1.2.4 Western blotting 检测 USP22 蛋白水平

提取细胞总蛋白质, BCA 法检测蛋白浓度后取等量蛋白上样, 10% SDS-PAGE/E 恒压电泳分离蛋白, 然后恒电流转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, USP22 一抗和 GAPDH 内参 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗膜后, 二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 采用凝胶成像系统成像, 利用图像分析软件进行分析。

1.2.5 CCK-8 检测顺铂 IC_{50}

取对数生长期的细胞消化后制备成细胞悬液, 以 2×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 贴壁过夜。不同分组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 3 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 绘制曲线, 计算顺铂 IC_{50} 。

1.3 统计学方法

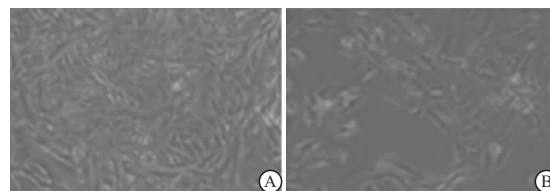
采用 t 检验、单因素方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 顺铂耐药细胞株 U251/CP2 的建立

经历持续 10 个月的诱导, 获得在顺铂 (2 μ g/mL) 中生长良好的耐药细胞 U251/CP2。与亲本细胞相比, U251/

CP2 形态略有变化, 表现为胞体较小, 轴突较短且未分叉 (见图 1)。CCK-8 法检测亲本细胞 U251 和耐药细胞 U251/CP2 对顺铂的敏感性差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 显示 U251/CP2 顺铂耐药; U251/CP2 细胞无药培养 2 周后, IC_{50} 为 (71.68 ± 0.49) μ g/mL, 耐药性未见降低 ($P > 0.05$), 说明 U251/CP2 对顺铂稳定耐药 (见表 1)。



A: U251; B: U251/CP2

图1 耐药细胞U251/CP2的形态变化

表1 耐药细胞 U251/CP2 的耐药性检测 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	顺铂 IC_{50} / (μ g/mL)
U251	1.20 ± 0.24
U251/CP2	$72.35 \pm 2.20^{**}$
U251/CP2 (不加顺铂)	$71.68 \pm 0.49^{**}$
F	2 308.51
P	<0.01
$MS_{组内}$	3 731.620

q 检验: 与对照组 U251 比较 * * $P < 0.01$

2.2 USP22 沉默细胞株 U251-shUSP22、U251/CP2-shUSP22 的建立

RT-PCR 检测 U251 组、U251/CP2 组、U251-shUSP22 组和 U251/CP2-shUSP22 组细胞中 USP22 mRNA 的相对表达量分别为 0.80 ± 0.10 、 0.29 ± 0.02 、 0.12 ± 0.05 、 0.18 ± 0.05 。与 U251 组相比, U251-shUSP22 组的 USP22 mRNA 表达水平明显降低 ($t = 10.49, P < 0.01$); 与 U251/CP2 组相比, U251/CP2-shUSP22 组的 USP22 mRNA 表达水平也明显降低 ($t = 3.44, P < 0.05$), 说明成功干扰 USP22 基因沉默表达 (见图 2)。

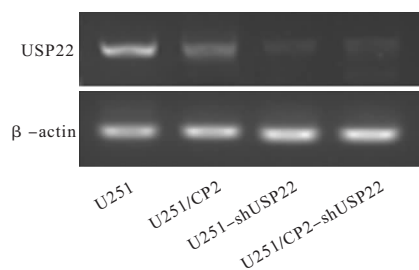


图2 RT-PCR 检测USP22基因沉默效果

2.3 抑制 USP22 表达促进胶质瘤细胞凋亡

流式细胞仪检测 U251 组、U251-shUSP22 组、U251/CP2 组和 U251/CP2-shUSP22 组的细胞凋亡率分别为

(4.13 ± 0.59)%、(23.64 ± 4.82)%、(7.65 ± 0.73)% 和 (19.36 ± 5.49)%; 与 U251 组相比, U251-shUSP22 组细胞凋亡率明显升高 ($t = 6.96, P < 0.01$); 与 U251/CP2 组相比, U251/CP2-shUSP22 组的细胞凋亡率同样也明显升高 ($t = 3.66, P < 0.05$); 提示抑制 USP22 的表达可以显著提高胶质瘤细胞的凋亡率 (见图 3)。

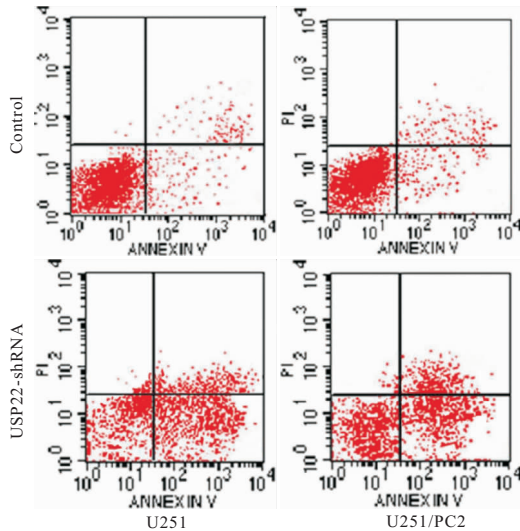


图3 流式细胞术检测抑制USP22表达对胶质瘤细胞凋亡的影响

2.4 顺铂促进胶质瘤细胞中 USP22 蛋白的表达

Western blotting 检测发现 $0 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $8 \mu\text{g/mL}$ 顺铂短暂处理 (24 h) 后 U251 细胞内 USP22 蛋白相对表达量分别为 0.21 ± 0.02 、 0.30 ± 0.01 、 0.64 ± 0.01 , U251/CP2 细胞 $2 \mu\text{g/mL}$ 顺铂短暂处理 (24 h) 后 USP22 蛋白相对表达量为 0.43 ± 0.02 (见图 4)。与对照 U251 ($0 \mu\text{g/mL}$) 组相比, USP22 蛋白表达水平在 U251 ($0.5 \mu\text{g/mL}$) 组、U251 ($8 \mu\text{g/mL}$) 组和 U251/CP2 ($2 \mu\text{g/mL}$) 组中均明显提高 ($t = 9.70, 40.35, 14.60, P < 0.01$)。提示顺铂用药可影响胶质瘤细胞中 USP22 的表达。

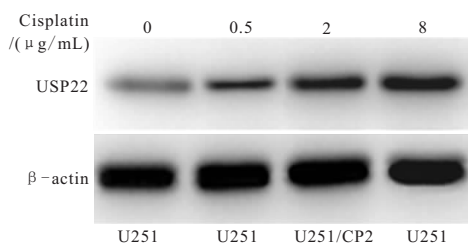


图4 Western blotting检测不同顺铂处理后细胞中USP22的表达

2.5 USP22 表达下调增强胶质瘤细胞对顺铂的敏感性

与对照细胞 U251 相比, U251-shUSP22 中 USP22 的蛋白表达水平明显下调 ($t = 6.83, P < 0.01$) (见图 5)。同时, U251-shUSP22 的顺铂 IC_{50}

为 (0.56 ± 0.07) $\mu\text{g/mL}$, 与 U251 的顺铂 IC_{50} (1.23 ± 0.13) $\mu\text{g/mL}$ 差异有统计学意义 ($t = 7.70, P < 0.01$)。提示下调 USP22 表达可增强胶质瘤细胞对顺铂的敏感性。

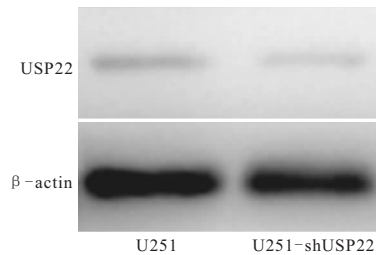


图5 Western blotting检测USP22基因沉默后USP22蛋白的表达

2.6 USP22 表达下调可部分逆转耐药细胞株对顺铂耐药

与对照细胞 U251/CP2 相比, U251/CP2-shUSP22 中 USP22 蛋白表达水平显著下调 ($t = 3.01, P < 0.05$) (见图 6)。U251/CP2 的顺铂 IC_{50} 为 (73.73 ± 2.74) $\mu\text{g/mL}$, 而 U251/CP2-shUSP22 的顺铂 IC_{50} 下降至 (51.25 ± 1.09) $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$) (见表 2), 提示 USP22 表达下调, 可逆转耐药细胞株 U251/CP2 对顺铂的耐药。U251 与 U251/CP2-shUSP22 的顺铂敏感性差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 USP22 表达下调可在一定程度上逆转 U251/CP2 对顺铂耐药, 但并非完全逆转。

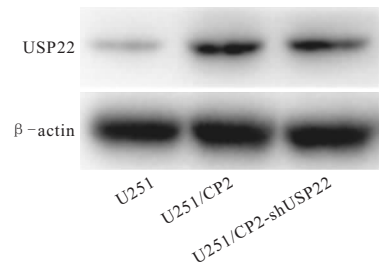


图6 Western blotting检测各组细胞USP22蛋白的表达情况

表2 CCK-8 检测各组细胞的顺铂 IC_{50} ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	顺铂 IC_{50} / ($\mu\text{g/mL}$)
U251	1.23 ± 0.13
U251/CP2	$73.73 \pm 2.74^{**}$
U251/CP2-shUSP22	$51.25 \pm 1.09^{**}$
<i>F</i>	3 626.38
<i>P</i>	<0.01
<i>MS</i> 组内	2 914.630

q 检验: 与对照组 U251 比较 * * $P < 0.01$

3 讨论

胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 恶性程度高, 侵袭性强, 易复发, 治疗相当困难。目

前临床常用的治疗胶质瘤推荐方案包括替莫唑胺 (TMZ) 剂量密度方案、联合治疗方案、抗血管生成治疗等。替莫唑胺为常用抗肿瘤药物,可通过阻断 DNA 合成,发挥抗肿瘤作用,控制病情进展。但是,并非所有病人都对替莫唑胺敏感,比如, O₆-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶高表达病人易对烷化剂类产生耐药性^[9]。有学者^[10]指出采用替莫唑胺与铂类药物联合治疗复发性恶性肿瘤效果更优,可有效改善病人临床症状,控制癌灶扩散,延长病人生存时间。

顺铂是临床上最常用的铂类药物,主要作用靶点就是 DNA,通过在细胞内形成铂-DNA 加合物抑制 DNA 的复制和转录,是临床治疗多种实体瘤的重要药物,也是对胶质瘤敏感性较高的药物之一^[11-12]。以抑制 DNA 合成的抗肿瘤药物,同时会使细胞启动防止其自身凋亡的多种修复机制来修复损伤的 DNA,比如激活各种 DNA 修复酶使受损伤的 DNA 尽量恢复其结构和功能,从而尽量维持其正常的结构和功能,从而降低了该药物的临床疗效,使得肿瘤对该药物产生耐药性^[13]。

胶质瘤的化疗耐药机制十分复杂,涉及到多方面因素,比如肿瘤细胞内药物的积聚减少、药物作用靶点减少、凋亡与抗凋亡机制失衡、DNA 修复机制及肿瘤干细胞等。TABATABAI 等^[14]从胶质瘤中分离出胶质瘤干细胞 (glioma stem cell, GSC) 并发现胶质瘤细胞和 GSC 均具有多药耐药现象,以 GSC 更为显著。无论在体内还是体外 GSC 基本处于休眠状态,停滞于细胞周期中的 G₀/G₁ 期并且高表达 ABCG2、MDR 等耐药基因。GSC 能特征性表达 ABC 转运体,能将多种化疗药物转运出细胞外,从而对化疗药物产生耐药性^[15]。另外,胶质瘤的耐药性还可能与高表达的 MGMT、抗凋亡蛋白和凋亡蛋白抑制因子有关。崔磊等^[16]利用芯片-基因组杂交技术筛选胶质瘤细胞中与顺铂耐药相关分子标志物,发现与胶质瘤顺铂耐药有关的基因包括 CFHR1、CFHR3 和 IL-7 等。但是,USP22 基因是否也参与了胶质瘤耐药尚未有研究报道。

USP22 基因位于人类 17 号染色体,编码蛋白产物约 66 000,是 hSAGA (human Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) 复合物的一个亚单位,是一类去泛素化酶,主要通过去泛素化修饰来调控肿瘤细胞的生长分化、影响细胞周期、转录激活和信号转导等。同时,USP22 作为一个肿瘤干细胞标记家族的成员,在细胞周期、DNA 转录、肿瘤发生发展进程中发挥重要作用,USP22 可能通过细胞周期 G₁/S 转换参与

肿瘤耐药^[17]。

李朝晖研究团队^[6,18]通过多项研究,明确了 USP22 在胶质瘤细胞中高表达,且验证了 USP22 通过调节细胞凋亡和细胞周期在胶质瘤细胞的增殖中发挥作用。吕磊等^[19]的研究指出沉默 USP22 可逆转膀胱癌细胞 T24 对丝裂霉素化疗药的耐药。王宛明等^[7]的研究则指出了抑制 USP22 可逆转胰腺癌细胞 SW1990 对吉西他滨化疗药的耐药。然而,关于 USP22 是否参与了胶质瘤细胞耐药目前尚无人研究。

本研究首次探讨 USP22 表达与胶质瘤细胞顺铂耐药的关系。首先,通过剂量梯度爬升诱导顺铂耐药胶质瘤细胞株 U251/CP2,相对于亲本细胞株 U251,U251/CP2 对顺铂的敏感性显著下降,显示出顺铂耐受。此后,Western blotting 检测其中 USP22 蛋白表达情况,发现在 U251/CP2 中 USP22 的表达显著高于 U251,提示 USP22 可能参与了胶质瘤顺铂获得性耐药。因此,本文又采用小干扰 RNA 沉默 U251、U251/CP2 细胞的 USP22 表达,证实抑制 USP22 表达可降低 U251 对顺铂的抗药性并可在一定程度上逆转耐药细胞株对顺铂的耐药。

综上所述,本研究发现 USP22 的表达与胶质瘤 U251 细胞对顺铂的耐药有相关性,提示 USP22 可能是胶质瘤顺铂耐药的分子机制之一,为进一步研究胶质瘤顺铂耐药机制提供了新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] LIU CA, CHANG CY, HSUEH KW, *et al.* Migration/invasion of malignant gliomas and implications for therapeutic treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1115.
- [2] GENNARO VJ, STANEK TJ, PECK AR, *et al.* Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(40): E9298.
- [3] LIU T, LIU J, CHEN Q, *et al.* Expression of USP22 and the chromosomal passenger complex is an indicator of malignant progression in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 2040.
- [4] MA Y, FU HL, WANG Z, *et al.* USP22 maintains gastric cancer stem cell stemness and promotes gastric cancer progression by stabilizing BMI1 protein [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33329.
- [5] LI Y, YANG Y, LI J, *et al.* USP22 drives colorectal cancer invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition by activating AP4 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32683.
- [6] 李朝晖, 王建, 付红, 等. siRNA 沉默 USP22 基因对胶质瘤细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015, 20(9): 419.
- [7] 王宛明, 董贾中, 管淑敏. 泛素特异性肽酶 22 诱导胰腺癌细胞对吉西他滨耐药的观察 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(4): 412.

(下转第 460 页)