

引用本文:罗刚,喻坚柏,陈涛,等.异柠檬酸脱氢酶1基因突变对替莫唑胺干预下脑胶质瘤U87细胞凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(8):1492-1496.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.003.

◇ 药学研究 ◇



异柠檬酸脱氢酶1基因突变对替莫唑胺干预下 脑胶质瘤U87细胞凋亡的影响

罗刚,喻坚柏,陈涛,唐宁,李春辉

作者单位:湖南中医药大学第一附属医院神经外科,湖南 长沙410007

通信作者:李春辉,男,副主任医师,研究方向为颅脑外伤,脑血管病,功能神经外科,Email:3389362441@qq.com

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ3404)

摘要: **目的** 研究异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)基因突变对替莫唑胺干预下脑胶质瘤U87细胞凋亡的影响,以期深入了解其生物学特性及其化疗敏感性。**方法** 通过DNA重组技术构建携带野生IDH1基因(wIDH1)或突变的IDH1基因(mIDH1)的真核表达载体;通过CCK-8检测三种稳定细胞系的增殖能力和细胞活力;利用流式细胞仪技术检测稳转细胞系细胞凋亡率及替莫唑胺干预后细胞凋亡率的变化;构建裸鼠移植瘤模型,替莫唑胺干预,ELISA技术和蛋白质免疫印迹检测细胞相关凋亡蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bax)和B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)]的表达情况;测量肿瘤大小为宽和长度,计算肿瘤大小;统计不同处理组肿瘤形成抑制率和总有效率。**结果** wIDH1组(100.37±10.24),对照组(102.45±13.57)和mIDH1组(100.63±12.42)之间细胞增殖差异无统计学意义($P>0.05$)。mIDH1组U87细胞在CCK-8测定中显示出对替莫唑胺的敏感性,mIDH1组(36.84±3.55)细胞增殖和细胞活力较wIDH1组(98.17±8.54)和对照组(73.26±5.37)低($P<0.05$);mIDH1组(62.18±3.47)%细胞的凋亡率高于对照组(33.16±6.54)%和wIDH1组(15.36±2.33)%;蛋白质免疫印迹和酶联免疫吸附测定(ELISA)结果显示,三组不同处理中,mIDH1组在Caspase-3、Caspase-9和Bax中的蛋白表达水平最高,Bcl-2的蛋白表达水平最低($P<0.05$),wIDH1的异位过表达诱导Bcl-2蛋白表达水平的上调及Caspase-3、Caspase-9和Bax蛋白水平的下调($P<0.05$);与其余两组相比,mIDH1组(220.17±12.15)mm³的肿瘤体积最小($P<0.05$)。wIDH1组(624.36±33.54)mm³与对照组(601.17±36.18)mm³差异无统计学意义($P>0.05$);在替莫唑胺治疗组中,mIDH1组的总有效率为(73.15±8.46)%,wIDH1组的总有效率为(22.16±3.96)%。对照组的结果为(42.25±3.17)%。**结论** mIDH1通过上调替莫唑胺后胶质瘤细胞Caspase-3、Caspase-9、Bax表达并下调Bcl-2表达提高胶质瘤细胞凋亡率,增强治疗敏感性。

关键词: 神经胶质瘤; 人异柠檬酸脱氢酶1; 替莫唑胺; 胶质瘤细胞; 凋亡率

Mechanisms of mIDH1 enhancing the therapeutic sensitivity of temozolomide by interfering with U87 cell apoptosis

LUO Gang, YU Jianbai, CHEN Tao, TANG Ning, LI Chunhui

Author Affiliation: Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Hu'nan University of Chinese Medicine, Changsha, Hu'nan 410007, China

Abstract: **Objective** To study the effect of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) gene mutation on the apoptosis of glioma U87 cells treated with temozolomide, in order to understand its biological characteristics and chemosensitivity. **Methods** The eukaryotic expression vector carrying the wild IDH1 gene (wIDH1) or the mutant IDH1 gene (mIDH1) was constructed by DNA recombination technology. The proliferation ability and cell viability of three stable cell lines were detected by CCK-8. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of stable cell lines and the change in cell apoptosis rate after the intervention of temozolomide. The nude mice xenograft model was constructed and temozolomide was adopted for intervention. ELISA and Western blotting were used to detect the expressions of cell-associated apoptosis proteins (Caspase-3, Caspase-9, Bax and Bcl-2). The tumor size was measured as width and length, and the tumor size was calculated. The tumor formation inhibition rate and the total effective rate of different treatment groups were figured out. **Results** There was no significant difference in cell proliferation among wIDH1 group (100.37±10.24), control group (102.45±13.57) and mIDH1 group (100.63±12.42) ($P>0.05$). U87 cells in mIDH1 group showed sensitivity to temozolomide in CCK-8 assay. Cell proliferation and cell viability in mIDH1 group (36.84±3.55) were lower than those in wIDH1 group (98.17±8.54) and control group (73.26±5.37) ($P<0.05$). The apoptotic rate of cells in mIDH1 group (62.18±3.47)% was higher than that in control group (33.16±6.54)% and wIDH1 group (15.36±2.33)%. The protein immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results showed that among the three different treatments, the protein expression levels of Caspase-3, Caspase-9 and Bax were the highest in mIDH1 group, while the

protein expression level of Bcl-2 was the lowest in mIDH1 group ($P<0.05$). The ectopic overexpression of wIDH1 induced the upregulation of Bcl-2 protein expression and the downregulation of Caspase-3, Caspase-9 and Bax protein expressions ($P<0.05$). Compared with the other two groups, the mIDH1 group (220.17 ± 12.15) mm^3 had the smallest tumor volume ($P<0.05$). There was no significant difference in tumor volume between wIDH1 group (624.36 ± 33.54) mm^3 and control group (601.17 ± 36.18) mm^3 ($P>0.05$). In temozolomide treatment group, the total effective rate of mIDH1 group was (73.15 ± 8.46) %, and the total effective rate of wIDH1 group was (22.16 ± 3.96) %. The result of the control group was (42.25 ± 3.17) %.

Conclusion mIDH1 can increase the apoptosis rate and the sensitivity of glioma cells by up-regulating the expressions of Caspase-3, Caspase-9 and Bax in glioma cells and down-regulating the expression of Bcl-2.

Key words: Glioma; Human isocitrate dehydrogenase 1; Temozolomide; Glioma cells; Apoptotic rate

胶质瘤年发病率约为0.06%^[1],目前用于神经胶质瘤的常规疗法包括手术、放射和化学疗法^[2]。胶质母细胞瘤病人的总生存期仅为12~15个月,与肿瘤复发和整体预后不良有关,老年病人的预后更差^[3]。替莫唑胺是一种烷化剂,可在多个位置引起DNA碱基甲基化,导致DNA损伤和细胞凋亡^[4]。由于其在血脑屏障通透性方面的表现及其治疗效果,替莫唑胺已成为胶质瘤治疗的首选化疗药物^[5]。然而,抗辐射和替莫唑胺化疗是治疗恶性神经胶质瘤的一个日益严重的问题,极大地影响了这些病人的预后^[6]。2008年,超过70%的原发性胶质瘤和继发性胶质母细胞瘤中发现了异柠檬酸脱氢酶1/2(IDH1/2)的突变。IDH突变的病人被认为比IDH野生型(IDH1-WT)肿瘤的病人预后更好^[7]。特别是, IDH1占IDH突变病例的最大比例, IDH1中超过90%的突变被归类为R132H突变^[8]。Arg132的其他IDH1突变发生在较低频率,包括R132S和R132L。功能上, IDH1催化异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸(α -KG),并在细胞质和过氧化物酶体中产生尼古丁腺嘌呤二磷酸核苷酸(NADPH)^[9]。IDH1参与了许多细胞功能,包括葡萄糖感应、脂肪生成和细胞氧化还原状态的调节^[10]。本研究自2019年1—5月探究IDH1基因突变对替莫唑胺干预下脑胶质瘤U87细胞凋亡的影响,以期深入了解其生物学特性及其化疗敏感性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60只成年雄性健康SD小鼠,体重质量范围为150~200 g,购自湖南中医药大学实验动物中心。饲养室温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%,自由进食和饮水,所有实验动物均在相同条件下饲养,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 裸鼠模型及实验分组 将60只小鼠采用随机数字表法分成3组:野生IDH1基因(wIDH1)组20只,在裸鼠背部皮下注射wIDH1胶质瘤细胞(5×10^6 个细胞);突变IDH1基因(mIDH1)组20只,在裸鼠背部皮下注射mIDH1胶质瘤细胞(5×10^6 个细胞);对照组20只,在裸鼠背部皮下注射对照胶质瘤细胞(5×10^6 个细胞)。

通过细胞注射处理雄性裸鼠并喂食14 d,根据

小鼠的表面区域通过胃管饲法用替莫唑胺(75 mg/d)处理5 d。随后的观察期持续21 d。根据函数 $V(\text{mm}^3)=\pi(a^2b)/6$ 计算肿瘤大小(a 为宽, b 为长度)。根据函数 $S(\text{m}^2)=0.06\times m(\text{kg})^{2/3}$ 计算表面积。计算肿瘤形成率和总化疗效率。皮下荷瘤小鼠见图1。



图1 皮下荷瘤小鼠

1.3 细胞系和细胞培养 人恶性胶质母细胞瘤细胞系,U87细胞和U251细胞购自上海生物化学与细胞生物研究所。将所有这些细胞系维持在高葡萄糖(Gibco, USA)的DMEM培养基中,补充有10%胎牛血清(Gibco, USA),2 mmol/L谷氨酰胺(Sigma, USA),抗生素(青霉素)100 U/mL和链霉素100 μg /mL,在37 $^{\circ}\text{C}$ 的5%二氧化碳中。通过胰蛋白酶方法收集细胞。

1.4 载体和稳定细胞系的构建 wIDH1或mIDH1的载体通过DNA重组技术构建。携带wIDH1、mIDH1或空p-EGFP-C1载体的U87细胞系基础上的稳定细胞系通过转染方法分别构建,并通过G418方法最终选择。稳转细胞系的建立经验证实验(应用WB检测wIDH1、mIDH1的表达)确定,筛选成功表达wIDH1或mIDH1蛋白的细胞系。

1.5 细胞增殖和活力测定 为了检测三种细胞系的增殖能力,使用胰蛋白酶消化和细胞计数方法。将相同数量的细胞在常规条件下培养48 h,然后通过胰蛋白酶方法收集并在细胞计数板上计数。通过最终细胞数与初始细胞数的比率计算增殖率。增殖抑制率的检测基于CCK-8方法。将细胞以 2×10^4 个细胞/毫升(100微克/孔)的密度接种在96孔板中,使其生长48 h,使零剂量细胞生长48 h,作为相应的对照组。在实验结束时,向培养基中加入10

μL CCK-8液体,将细胞培养4 h。在450 nm处测量吸光度。细胞的增殖抑制率通过 $(1-A_{\text{control}}/A_{\text{替莫唑胺}}) \times 100\%$ 来评估。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 流式细胞术用于评估细胞凋亡。用400 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理细胞72 h。将未经替莫唑胺处理的细胞作对照组。然后,收集细胞并用膜联蛋白V-FITC凋亡检测试剂盒(Keygen Biotech)处理。将细胞用PBS洗涤3次并重悬于400 μL 结合缓冲液中,然后在室温下在黑暗中与5 μL 膜联蛋白V-FITC和5 μL PI一起温育15 min。最后,使用流式细胞术(Gallios, Beckman-coulter, USA)在1 h内检测细胞凋亡。

1.7 Transwell细胞侵袭实验 实验步骤:①基质胶准备:将冻存于 -80°C 冰箱的BD matrigel 4°C 过夜,变成液态;②取300 μL 无血清培养基,加入60 μL 每室Matrigel,混匀, 4°C 操作;放入 37°C 培养箱中,孵育5 h。③消化细胞,无血清培养基洗3次,计数,配成细胞悬液;④用无血清培养基洗Matrigel洗1次;每孔加入100 μL 细胞悬液;⑤下腔室中加入500 μL 含有20%FBS条件培养基;⑥ 37°C 培养箱中,孵育24 h;⑦取出transwell用PBS洗2遍,5%戊二醛固定, 4°C ;⑧结晶紫(0.1%)染色,室温0.5 h,PBS洗2遍,用棉球擦去上表面细胞,显微镜下观察。

1.8 蛋白质印迹分析 将细胞在冰冷的RIPA裂解缓冲液中裂解。根据制造商的方案使用Bio-Rad蛋白质测定法估计蛋白质浓度。通过SDS-PAGE分离细胞裂解物并转移到PVDF膜上。将印迹在含有5%脱脂奶粉的TBS缓冲液中在室温下封闭1 h。将膜在 4°C 下与第一抗体一起温育过夜。洗涤膜并与辣根过氧化物酶缀合的第二抗体在室温下孵育1 h,洗涤。在每次用抗体处理后,用含有Tween20的tris缓冲盐水充分洗涤膜。根据制造商的说明,通过增强的化学发光进行抗体结合的检测。使用发光图像分析仪进行数据收集和处理。剥离相同的印迹并用抗 β -肌动蛋白或抗GAPDH重新探测以用作内部对照。

1.9 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞凋亡蛋白的表达 采用ELISA法将样本加入预冷的PBS(临用前加入蛋白酶抑制剂)匀浆,匀浆时置于冰上或冰浴中。吸取匀浆液到离心管, 4°C 、 $5\,000\times g$ 离心5~10 min,取上清, -20°C 或 -80°C 保存,避免反复冻融。按照说明书中操作步骤对三组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bax)表达水平进行测定。

1.10 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件处理数据;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单

因素方差分析,多组间两两比较采用LSD- t 检验;计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mIDH1显著增加对替莫唑胺的化学敏感性 在细胞集落形成测定中,wIDH1组、对照组和mIDH1组之间细胞增殖差异无统计学意义($P > 0.05$)。将wIDH1组、对照组和mIDH1组细胞暴露于替莫唑胺72 h,以评估其化学敏感性。结果显示,mIDH1组U87细胞在CCK-8测定中显示出对替莫唑胺的敏感性,mIDH1组细胞增殖和细胞活力较wIDH1组和对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 细胞活力测定/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	未干预	替莫唑胺干预
对照组	20	102.45 $\pm$ 13.57	73.26 $\pm$ 5.37
wIDH1组	20	100.37 $\pm$ 10.24	98.17 $\pm$ 8.54
mIDH1组	20	100.63 $\pm$ 12.42	36.84 $\pm$ 3.55
F值		15.134	16.473
P值		0.647	0.005

注:wIDH1为野生IDH1基因,mIDH1为突变的IDH1基因。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 流式细胞术检测400 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺处理后mIDH1组与其他组细胞凋亡的差异,结果表明mIDH1组细胞凋亡率(62.18 $\pm$ 3.47)%高于对照组(33.16 $\pm$ 6.54)%和wIDH1组(15.36 $\pm$ 2.33)%,表明IDH1 R132H突变增加对替莫唑胺的化学敏感性($F=11.147$, $P=0.003$)。

2.3 细胞侵袭实验 mIDH1组细胞侵袭能力低于对照组和wIDH1组,三组中wIDH1组细胞侵袭能力最强。表明IDH1 R132H突变增加对替莫唑胺的化学敏感性。见图2。

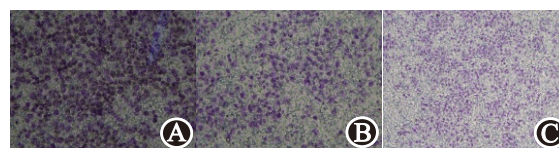
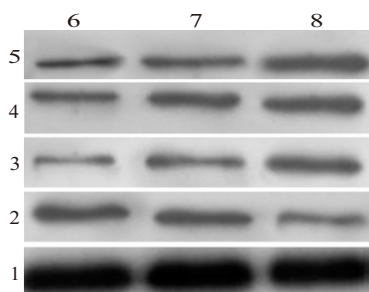


图2 细胞侵袭实验(HE $\times$ 100):A为野生IDH1基因(wIDH1)组;B为对照组;C为突变IDH1基因(mIDH1)组

2.4 细胞凋亡蛋白的表达变化 为了研究mIDH1,wIDH1和替莫唑胺诱导的细胞凋亡的潜在机制,应用蛋白质免疫印迹分析相关分子的蛋白质变化。结果显示,三组不同处理中,mIDH1组在Caspase-3,Caspase-9和Bax中的蛋白表达水平最高,Bcl-2的蛋白表达水平最低($P < 0.05$),wIDH1的异位过表达显示出化疗抗性特征或至少诱导Bcl-2蛋白表达水平的上调和Caspase-3,Caspase-9和Bax蛋白水平的下

调。表明 wIDH1 可能在化疗耐药中起辅助作用。mIDH1 通过下调 Bcl-2 水平和上调体内和体外 Caspase-3, Caspase-9 和 Bax 水平来增强对胶质瘤细胞的化疗敏感性,表明 mIDH1 可能作为化疗增强靶标起作用。见图3,表2。



注:1-β-肌动蛋白;2-B淋巴细胞瘤-2;3-B淋巴细胞瘤-2相关蛋白;4-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9;5-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;6-野生 IDH1 基因(wIDH1)组;7-对照组;8-突变 IDH1 基因(mIDH1)组。

图3 蛋白质免疫印迹

表2 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bax)和B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的蛋白表达水平 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Caspase-3	Caspase-9	Bax	Bcl-2
对照组	20	1.38±0.26	1.87±0.13	2.37±0.24	2.13±0.22
wIDH1 组	20	0.74±0.14	0.86±0.11	1.22±0.47	3.24±0.53
mIDH1 组	20	2.87±0.43	2.95±0.48	3.47±0.65	1.15±0.13
F 值		12.154	13.663	15.148	12.135
P 值		0.013	<0.001	0.002	0.008

注:wIDH1 为野生 IDH1 基因,mIDH1 为突变的 IDH1 基因。

2.5 ELISA 检测细胞凋亡蛋白的表达 mIDH1 组在三组中 Caspase-3, Caspase-9 和 Bax 中的表达水平最高,Bcl-2 的表达水平最低($P<0.05$),wIDH1 的异位过表达诱导 Caspase-3, Caspase-9 和 Bax 水平的下调以及 Bcl-2 表达水平的上调($P<0.05$)。见表3。

表3 酶联免疫吸附测定检测细胞凋亡蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Caspase-3	Caspase-9	Bax	Bcl-2
对照组	20	2.32±0.58	2.92±0.55	1.58±0.22	2.33±0.25
wIDH1 组	20	1.54±0.33	1.73±0.58	0.74±0.13	3.52±0.14
mIDH1 组	20	3.88±0.87	4.17±1.15	2.67±0.54	0.86±0.12
F 值		11.374	12.165	15.472	10.357
P 值		0.006	0.000	0.015	0.024

注:wIDH1 为野生 IDH1 基因,mIDH1 为突变的 IDH1 基因,Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3,Caspase-9 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9,Bax 为B淋巴细胞瘤-2相关蛋白,Bcl-2 为B淋巴细胞瘤-2。

2.6 mIDH1 增强体内替莫唑胺抗肿瘤功效 所有注射接受的小鼠最终形成胶质瘤模型,用替莫唑胺处理,每个神经胶质瘤肿块的大小在第21天结束时测量,发现增殖结果与体外相似。mIDH1 肿瘤生长

比 wIDH1 组和对照组慢得多。与其余两组相比,mIDH1 组的肿瘤体积(220.17 ± 12.15)mm³最小($P<0.05$)。wIDH1 组(624.36 ± 33.54)mm³与对照组(601.17 ± 36.18)mm³差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.7 mIDH1 提高替莫唑胺干预敏感性 体内研究显示,同时注射胶质瘤细胞和替莫唑胺胃管灌注处理裸鼠时,wIDH1 组肿瘤形成抑制率最低(41.37 ± 5.43)%,mIDH1 组肿瘤形成抑制率最高(82.14 ± 5.38)%,对照组为(52.16 ± 3.17)%。在替莫唑胺治疗组中,mIDH1 组总有效率为(73.15 ± 8.46)%,wIDH1 组总有效率为(22.16 ± 3.96)%。对照组为(42.25 ± 3.17)%。结果表明,wIDH1 的过表达可能在体内提供化疗耐药性,而 mIDH1 可能提高化疗敏感性。

3 讨论

恶性胶质瘤目前与预后不良相关,尽管采用多模式治疗策略,复发仍然几乎不可避免。胶质瘤在组织学上分级为 I~IV,70%~90%的 II~III 级胶质瘤和继发性 IV 级胶质母细胞瘤在一个 IDH1 等位基因中含有突变,其中 R132H 是最常见的^[11]。IDH1 存在于细胞质和过氧化物酶体中,在那里它将异柠檬酸转化为 α-KG。然而,突变酶将 α-KG 转化为代谢物 D-2-羟基戊二酸,其结构类似于 α-KG 和 α-KG 依赖性双加氧酶的竞争性抑制剂^[12]。治疗胶质瘤通常包括手术切除,放射治疗和使用 DNA 烷化剂替莫唑胺的化疗^[13]。替莫唑胺的细胞毒性作用主要通过产生 O-6-甲基鸟嘌呤(O6meG)病变来介导^[14]。如果甲基不被 O6meG-DNA 甲基转移酶(MGMT)除去,这是一种与替莫唑胺抗性相关的酶,O6meG 在 DNA 复制过程中与胸腺嘧啶错配,导致无效的错配修复和持续的 G2 检查点停滞,随后细胞凋亡或衰老^[15]。MGMT 启动子甲基化和因此低 MGMT 表达在 IDH1 突变体胶质瘤中是典型的,但不是唯一的,其通常对替莫唑胺的反应优于它们的 IDH1 野生型对应物^[16]。然而,MGMT 表达不是替莫唑胺敏感性的唯一决定因素,IDH1 突变体和野生型胶质瘤具有不同的分子个体发育,使得 IDH1 突变体和野生型胶质瘤之间的比较没有信息,哪些肿瘤特征可以直接归因于 IDH1 突变。缺乏 IDH1 突变的 II~III 级神经胶质瘤在遗传上与 IDH1 突变神经胶质瘤不同,并且与原发 IV 级胶质母细胞瘤更相似^[17]。虽然遗传改变如 EGFR 扩增和 CDKN2A 缺失在 IDH1 WT 胶质瘤中很常见,但它们很少发生在具有突变 IDH1 的胶质瘤中^[18]。尽管被认为化学反应性 IDH1 突变胶质瘤通常在手术切除和放射治疗和替莫唑胺治疗后仍然复发,但突出了对新治疗方案的需求。

本研究发现 mIDH1 在生物学行为和化疗敏感

性方面表现出不同。本研究证明 mIDH1 引起增殖抑制并上调化疗敏感性,其增强了替莫唑胺引起的细胞增殖和细胞凋亡的抑制作用。wIDH1 过表达不促进细胞增殖,但在替莫唑胺诱导的凋亡抑制中表现出化疗耐药特征。由于这些差异,胶质瘤可分为两种亚型,这两种亚型存在明显不同的预后。重要的是要了解这些差异并探索由 mIDH1 诱导的相对更好的预后的机制。笔者认为肿瘤病人的预后取决于肿瘤细胞本身以及对其进行治疗。前者涉及多因素事件,包括细胞周期、细胞凋亡等^[19]。细胞凋亡是程序性细胞死亡过程,其可由一些内源性或外源性因子诱导,即死亡信号诱导的死亡受体介导的途径和线粒体依赖性途径^[20]。细胞凋亡对于维持细胞数量的稳态非常重要。Caspase-cascade 在细胞凋亡中至关重要。Bax/Bcl-2 的比例通常决定细胞凋亡和激活的半胱天冬酶级联反应。mIDH1 和 wIDH1 过度表达在常规条件下不会引起细胞凋亡,wIDH1 过表达抑制替莫唑胺诱导的细胞凋亡,其是通过降低 Bax / Bcl-2 比率和 Caspase-3 活性。故而,mIDH1 异位表达通过增加 Bax / Bcl-2 比率和 Caspase-3 活性来增强细胞凋亡。笔者推测,其机制与 mIDH1 下调胶质瘤细胞 MMP-2、MMP-9 体内外表达水平,从而降低肿瘤细胞侵袭能力有关。

综上所述,mIDH1 引起胶质瘤细胞的生物学变化,这减少了细胞的恶性行为。mIDH1 还在体内和体外增强胶质瘤细胞的化疗敏感性,而 wIDH1 显示出化疗抗性特征。mIDH1 通过上调替莫唑胺后胶质瘤细胞 Caspase-3、Caspase-9、Bax 表达并下调 Bcl-2 表达提高胶质瘤细胞凋亡率,增强治疗敏感性。

参考文献

- [1] ZHU H, ZHANG Y, CHEN J, et al. IDH1 R132H mutation enhances cell migration by activating AKT-mTOR signaling pathway, but sensitizes cells to 5-FU treatment as NADPH and GSH are reduced [J/OL]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169038. DOI: 10.1371/journal.pone.0169038.
- [2] KONCAR RF, CHU Z, ROMICKROSENDALE LE, et al. PLK1 inhibition enhances temozolomide efficacy in IDH1 mutant gliomas[J]. Oncotarget, 2017, 8(9):15827-15837.
- [3] CHEN Y, GAO F, JIANG R, et al. Down-regulation of AQP4 Expression via p38 MAPK signaling in temozolomide-induced glioma cells growth inhibition and invasion impairment[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12):4905-4913.
- [4] WANG J, ZHOU F, LI Y, et al. Cdc20 overexpression is involved in temozolomide-resistant glioma cells with epithelial-mesenchymal transition[J]. Cell Cycle, 2017, 16(24):2355-2365.
- [5] LU Y, KWINTKIEWICZ J, LIU Y, et al. Chemosensitivity of IDH1-mutated gliomas due to an impairment in PARP1-mediated DNA repair[J]. Cancer Res, 2017, 77(7):1709-1718.
- [6] XU Q, AHMED AK, ZHU Y, et al. Oncogenic MicroRNA-20a is downregulated by the HIF-1 α /c-MYC pathway in IDH1 R132H-mutant glioma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(4):882-888.
- [7] CHITNENI SK, HAI Y, ZALUTSKY MR. Synthesis and evaluation of a 18F labeled triazinediamine analogue for imaging mutant IDH1 expression in gliomas by PET[J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2018, 9(7):606-611.
- [8] DI H, ZHANG X, GUO Y, et al. Silencing LDHA inhibits proliferation, induces apoptosis and increases chemosensitivity to temozolomide in glioma cells[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4):5131-5136.
- [9] ZHANG X, LIU X, ZHOU W, et al. Fasudil increases temozolomide sensitivity and suppresses temozolomide-resistant glioma growth via inhibiting ROCK2/ABCG2[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(2):190.
- [10] LI ZY, ZHANG C, CHEN L, et al. Radicol, a novel triterpenoid-type sesquiterpene, induces temozolomide-resistant glioma cell apoptosis via ER stress and Akt/mTOR pathway blockade [J]. Phytother Res, 2017, 31(5):729-739.
- [11] SANGHEZ V, CHEN M, LI S, et al. Efficacy of asparaginase erwinia chrysanthemi with and without temozolomide against glioma cells and intracranial mouse medulloblastoma[J]. Anticancer Research, 2018, 38(5):2627-2634.
- [12] TATEISHI K, HIGUCHI F, MILLER J, et al. The alkylating chemotherapeutic temozolomide induces metabolic stress in IDH1-mutant cancers and potentiates NAD⁺ depletion-mediated cytotoxicity[J]. Cancer Research, 2017, 77(15):4102-4115.
- [13] KHURSHED M, MOLENAAR RJ, LENTING K, et al. In silico gene expression analysis reveals glycolysis and acetate anaplerosis in IDH1 wild-type glioma and lactate and glutamate anaplerosis in IDH1-mutated glioma [J]. Oncotarget, 2017, 8(30):49165-49177.
- [14] PHILIP B, YU DX, SILVIS MR, et al. Mutant IDH1 promotes glioma formation in vivo[J]. Cell Rep, 2018, 23(5):1553-1564.
- [15] MILANI R, BROGNARA E, FABBRI E, et al. Corilagin induces high levels of apoptosis in the temozolomide-resistant T98G glioma cell line[J]. Oncol Res, 2018, 26(9):1307-1315.
- [16] ZHU D, TU M, ZENG B, et al. Up-regulation of miR-497 confers resistance to temozolomide in human glioma cells by targeting mTOR/Bcl-2[J]. Cancer Medicine, 2017, 6(2):452-462.
- [17] KUMARI S, AHSAN SM, KUMAR JM, et al. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433) [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):6602.
- [18] LAI SW, HUANG BR, LIU YS, et al. Differential characterization of temozolomide-resistant human glioma cells [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 19010127.DOI: 10.3390/ijms19010127.
- [19] MING J, SUN B, LI Z, et al. Aspirin inhibits the SHH/GLI1 signaling pathway and sensitizes malignant glioma cells to temozolomide therapy[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(4):1233-1247.
- [20] JIANG C, SHEN F, DU J, et al. Upregulation of CASC2 sensitized glioma to temozolomide cytotoxicity through autophagy inhibition by sponging miR-193a-5p and regulating mTOR expression [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:844-850.

(收稿日期:2019-07-22,修回日期:2019-09-25)