

锌指基因1对脑胶质瘤细胞增殖及凋亡能力的影响

郑励力, 孙青芳

摘要 目的:研究过锌指基因1(JAZF1)对脑胶质瘤细胞增殖、凋亡能的影响及其信号通路。方法:体外培养脑胶质瘤细胞株,分为对照组、空载组和过表达组;分别于无血清的RPMI 1640培养基中,加入Adv-JAZF1-GFP或空载体Adv-GFP,对照组不予转染腺病毒。MTT法检测细胞活力,使用流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blot法检测糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)、腺瘤性结肠息肉病相关基因(APC)、Bax和Bcl-2蛋白表达量。结果:对照组和空载组细胞活力和凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$),过表达组细胞活力低于其他2组、细胞的凋亡率高于其他2组(均 $P<0.05$);对照组和空载组 β -actenin、GSK-3 β 、APC、Bax和Bcl-2蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),过表达组 β -actenin、GSK-3 β 、APC和Bax蛋白表达低于其他2组,Bcl-2蛋白表达高于其他2组($P<0.05$)。结论:过表达JAZF1可能可通过作用于Wnt/ β -catenin信号通路,调控 β -catenin、GSK-3 β 、Bax、APC、Bcl-2蛋白的表达,抑制脑胶质瘤细胞的增殖,促进脑胶质瘤细胞的凋亡。

关键词 脑胶质瘤细胞;增殖;凋亡;周期分布

中图分类号 R741;R741.02;R651.1 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20200188

本文引用格式:郑励力,孙青芳. 锌指基因1对脑胶质瘤细胞增殖及凋亡能力的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(10): 597-598.

作者单位
上海交通大学附属
瑞金医院神经外科
上海 200025
收稿日期
2020-02-18
通讯作者
孙青芳
rjns123@163.com

脑胶质瘤为临床常见神经系统肿瘤,恶性程度高,侵袭和迁移能力强。因此,治疗后复发率较高,预后不良^[1,2]。锌指基因1(juxtaposed with another zinc finger gene 1, JAZF1)在甲状腺乳头状癌、子宫内膜间质肿瘤等肿瘤中呈现异常高表达^[3,4],且与肿瘤的恶性、严重程度相关联。本文主要研究脑胶质瘤中JAZF1基因的表达特点及其对细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

人脑胶质瘤细胞株购于上海锐赛生物技术有限公司;绿色荧光蛋白标记的腺病毒载体Adv-GFP和Adv-JAZF1-GFP由元和上海公司构建;RPMI 1640培养基、胎牛血清、非必需氨基酸、丙酮酸钠、谷氨酰胺购于Gibco公司;全蛋白提取试剂盒购于索莱宝科技有限公司;PVDF膜购于Millipore公司;ECL化学发光检测试剂盒购于爱必信(上海)生物科技有限公司;MTT试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 脑胶质瘤细胞采用含10%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠的RPMI 1640培养基,置于37℃、5%CO₂孵箱中培养。取传至第5代且处于对数生长期的细胞,分为3组:对照组、空载组和过表达组;分别于无血清的RPMI 1640培养基中,加入Adv-JAZF1-GFP或空载体Adv-GFP,对照组不予转染腺病毒,24h常规培养后收集各组细胞进行后续检测。每组实验均重复3次。

1.2.2 MTT比色法检测细胞增殖 收集转染后的细胞以5×10³/mL的浓度接种于96孔板,200μL/孔,37℃、5%CO₂过夜培养,于1、3、5、7d进行MTT检测(参照说明书),采用酶标仪检测OD₄₉₀值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞凋亡检测 收集转染后的细胞,0.25%胰蛋白酶消化,离心并收集细胞,PI染色后,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 Western blot法检测Wnt信号通路各蛋白表达量 细胞以1×10⁵/孔接种于6孔板,转染细胞,融合达到50%~60%时提取总蛋白质,常规进行Western blot检测,孵育的一抗为糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase, GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)、腺瘤性结肠息肉病相关基因(adenomatous polyposis coli, APC)、Bax、Bcl-2, ECL显影。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用SNK-q检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力比较

对照组、空载组和过表达组的细胞活力分别为(88.42±6.72)%、(89.49±4.27)%和(51.48±9.26)%;对照组和空载组细胞的活力差异无统计学意义($P>0.05$),过表达组细胞的活力低于其他2组($P<0.05$)。

2.2 各组凋亡情况比较

对照组、空载组和过表达组的凋亡率分别为(8.63±2.01)%、(10.21±3.17)%和(26.37±5.15)%;对照组和空载组细胞的凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$),过表达组的细胞的凋亡率高于其他2组($P<0.05$)。

2.3 Wnt信号通路相关蛋白表达量比较

对照组和空载组β-actenin、GSK-3β、APC、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),过表达组β-actenin、GSK-3β、APC 和 Bax 蛋白表达低于其他2组,Bcl-2 蛋白表达高于其他2组($P<0.05$),见表1。

表1 Wnt信号通路相关蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	β-actenin	GSK-3β
对照组	3	1.24±0.27 ^①	1.32±0.21 ^①
空载组	3	1.32±0.31 ^①	1.51±0.27 ^①
过表达组	3	0.79±0.18	0.87±0.34

组别	APC	Bax	Bcl-2
对照组	1.23±0.14 ^①	1.51±0.37 ^①	0.85±0.15 ^①
空载组	1.42±0.29 ^①	1.67±0.34 ^①	0.71±0.12 ^①
过表达组	0.28±0.13	0.81±0.22	1.89±0.33

注:与过表达组比较,^① $P<0.05$

3 讨论

脑胶质瘤是由外胚叶组织衍化而来的神经间质细胞的肿瘤^[5]。其发病机制复杂,相关致病突变基因较多,临床常规治疗以手术联合化疗以及放射治疗为主^[6],但疗效并不理想。有研究显示,脑胶质瘤手术后加上精确的放疗,1年的存活率为79%,2年的存活率为55%,3年的存活率为46%^[7]。

JAZF1是核蛋白编码基因,由3个C2H2样锌指结构构成,有助于染色质稳定性维持^[1]。JAZF1是一个与2型糖尿病、子宫内膜间质肉瘤、甲状腺乳头状癌和前列腺癌相关联的基因^[8,9]。JAZF1水平在不同级别的脑胶质瘤患者中表达有差异,且级别越高差异越明显。推测JAZF1对脑胶质瘤的发生和发展具有一定的调控作用,且与脑胶质瘤的严重程度有关系。本研究结果显示,上调JAZF1后,体外培养的人脑胶质瘤活力降低、凋亡增加。

Wnt信号通路对细胞的增殖、凋亡可进行调控^[10-12]。Wnt信号通路的成分都非常保守,其由Wnt分泌蛋白、β-catenin、T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)、APC、GSK3β、轴蛋白等组成^[13,14]。β-catenin以3种方式存在于正常成熟细胞中,但少量游离β-catenin存在于细胞内,大部分则与E-cadherin结合,剩余的则形成复合体通过氨基端磷酸化被U3泛素连接酶β-转导素重复蛋白(β-TRCP)识别并被泛素化,最后被26S蛋白酶体降解。

JAZF1可能在脑胶质瘤的进程中发挥抑制作用。本研究结果显示:上调JAZF1可抑制细胞增殖、促进细胞凋亡。细胞的增

殖、凋亡是重要的生物学现象且受到多种基因的严格控制^[15]。Bcl-2蛋白家族通过控制线粒体通透性调节细胞凋亡,Bcl-2有三大亚家族:抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白和孔隙形成促凋亡蛋白,例如Bax蛋白^[16]。本研究中,Western blot结果证实了上调JAZF1,促进了β-actenin、GSK-3β、APC和Bax的表达,抑制了Bcl-2蛋白表达水平。当Wnt通路被激活时,一系列的分子事件会使β-catenin蛋白增多,β-catenin进入细胞核与其他因子相结合形成核内复合物^[17,18]。

综上所述,上调JAZF1可能通过作用于Wnt/β-catenin信号通路,调控β-catenin、GSK-3β、Bax、APC、Bcl-2蛋白的表达,抑制脑胶质瘤细胞的增殖,促进脑胶质瘤细胞的凋亡。

参考文献

[1] 欧海荣,梁仔,龙霄翱,等. JAZF1对胶质母细胞瘤侵袭和迁徙的影响及分子机制研究[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2019, 5: 168-172.

[2] 石圆梦,王宏伟. 复发脑胶质瘤的放射治疗进展[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2019, 24:471-473.

[3] 熊代刚,侯泽宇,蔡玉怀,等. 过表达JAZF1对甲状腺乳头状癌BCPAP细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29: 55-60.

[4] 常彬,卢立霞,涂小予,等. 子宫内膜间质肉瘤的病理形态学观察及JAZF1-SUZ12和YWHAE-FAM22融合基因检测[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45: 308-313.

[5] 刘臣,李根华,李想. 脑胶质瘤综合治疗的研究进展[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2019,24: 182-185.

[6] 王缤,赵刚. 脑胶质瘤免疫治疗的进展与展望[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2018, 23: 523-526.

[7] 黄仁华,徐欣,吴峥,等. 270例脑胶质瘤患者术后精确放疗的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24: 819-823.

[8] 柏乾明,常彬,涂小予,等. 荧光原位杂交法检测JAZF1基因易位在子宫内膜间质肿瘤中的诊断价值[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46: 769-774.

[9] Agaimy A, Moskalev EA, Weissner W, et al. Low-grade Endometrioid Stromal Sarcoma of the Paratestis A Novel Report With Molecular Confirmation of JAZF1/SUZ12 Translocation[J]. Am J Surg Pathol, 2018, 42: 695-700.

[10] 赵贤军,康璋,袁国强,等. Wnt/β-catenin信号通路抑制剂对脑胶质瘤细胞迁移的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37: 4474-4476.

[11] 高力扬,李锦宏,陈兵,等. β连环蛋白对脑胶质瘤辐射抗性的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28: 28-33.

[12] 程荆. TGF-β信号通路在胶质瘤中的作用及分子机制[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019,24: 245-247.

[13] 李巍,邢晓红,边志颖,等. Zeste基因增强子同源物2通过调控Wnt/β-catenin信号通路影响脑胶质瘤细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34: 1448-1454.

[14] 张惊宇,张力娜,郑永慧,等. Wnt信号通路抑制剂对脑胶质瘤细胞增殖的抑制作用及其作用机制研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24: 49-51, 52.

[15] 闫磊,董建将,胡江平,等. Rab23在脑胶质瘤细胞中的表达及其对细胞增殖的影响[J].中国临床药理学杂志, 2019, 35: 2709-2711.

[16] 卢迪,张钧栋,郭庚,等. 干扰素通路中的关键分子诱导脑胶质瘤细胞凋亡的机制[J]. 国际肿瘤学杂志, 2018, 45: 432-435.

[17] 尤宇,李小旭,王重韧,等. Galectin-3调控Wnt信号通路对脑胶质瘤细胞凋亡的影响[J].现代肿瘤医学, 2019, 27: 934-938.

[18] 江源铭,盛宝英. miR-141-3p对脑胶质瘤细胞生长和Wnt信号通路的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54: 1562-1565.

(本文编辑:唐颖馨)