

自噬活性调节胶质瘤起始细胞辐射敏感性的体内实验研究

赵江虎 庄文卓 龙林梅 李峰 梁中琴

(苏州大学医学部药理学系 苏州 215123)

摘要 为探讨自噬调节对胶质瘤起始细胞移植瘤辐射敏感性的影响,建立裸小鼠皮下移植瘤模型,测量肿瘤体积大小,比较抑瘤率检测雷帕霉素对移植瘤的辐射增敏作用;建立裸小鼠颅内移植瘤模型,观察裸小鼠生存期,HE染色观察移植瘤的生长。取两种模型中各组肿瘤组织做 Western blot,分析自噬相关蛋白 LC3 表达。结果显示,裸小鼠皮下移植瘤模型中,联合治疗组的肿瘤体积明显小于阴性对照组和单纯辐照组 ($P>0.05$),抑瘤率明显增加 ($P>0.05$);在裸小鼠颅内原位移植瘤模型中,联合治疗组的裸小鼠生存期较阴性对照组和单纯辐照组明显延长,HE染色中可见联合治疗组肿瘤生长局限,与周围正常脑组织界限清楚。Western blot 结果显示,两种模型中,联合治疗组中的比值 LC3II/LC3I 显著增加。研究表明,自噬激动剂雷帕霉素通过激活胶质瘤起始细胞的自噬活性,增加胶质瘤的辐射敏感性。

关键词 胶质瘤起始细胞,自噬,辐射增敏,雷帕霉素,体内实验

中图分类号 R730.264

放射治疗是胶质瘤术后有效的辅助治疗手段^[1]。然而,在放射治疗中,胶质瘤对放疗的抗性不断增加,相当一部分患者经过放射治疗后,肿瘤出现复发。Bao 等^[2]报告,CD133 胶质瘤起始细胞 (Glioma-initiating cells, GICs) 或者称为胶质瘤干细胞 (Glioma stem cells, GSCs) 具有一定的放射耐受性,推测可能与放射损伤后早期启动 DNA 修复机制有关,虽然确切的分子机制尚不十分清楚,但为恶性胶质瘤耐受辐射机制的研究提供了新的切入点。本工作已经通过体外实验证明胶质瘤起始细胞的基础自噬活性很低,经自噬激动剂雷帕霉素^[3]处理后,再经 X 射线照射,胶质瘤起始细胞的辐射敏感性明显增加。

本文是在体外实验的基础上,建立裸小鼠皮下移植瘤模型和裸小鼠颅内原位移植瘤模型,观察自噬激动剂雷帕霉素对胶质瘤起始细胞移植瘤的辐射增敏作用。

1 实验材料与方法

1.1 细胞培养

胶质瘤起始细胞系 SU-2 来自 1 例间变性星形细胞、室管膜细胞混合瘤患者的手术标本。采取文献

[4]的方法,分离 CD133⁺细胞,置于含 Bfgf (Bovine basic fibroblast growth factor) (终浓度 20 ng/mL)、EGF (Epidermal growth factor) (终浓度 20 ng/mL) 和 N2 添加剂 (N-2 Supplement) 的 DMEM/F12(1:1) 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。LC3 抗体: Cat: PD014, PD015, MBL。β-actin 抗体: clone EP1123Y, Abcam。雷帕霉素: Cat: R0395, 为 Sigma 试剂。

1.2 实验动物

NC 裸小鼠由 SPF 动物房提供[合格证号为 SYXK(苏)2007-0035]。裸鼠, BALB/C nu/nu, 鼠龄在 5 周至 7 周,体重 18–20 g,雌雄兼用。接种肿瘤的裸小鼠继续饲养于 NASA1000 级生物净化室内,按 SPF 级管理。

1.3 照射方法

6 MeV X 射线直线加速器,源皮距 100 cm,剂量率为 2 Gy/min。只照射裸鼠皮下肿瘤区域或裸鼠右脑,其他部位挡铅。照射前将裸鼠以 10%水合氯醛麻醉,照射时将裸鼠置于自制装置内,与外界空气隔绝。

国家自然科学基金 (30873052、81072656)、江苏省自然科学基金 (BK2010226)、江苏省普通高校研究生科研创新计划 (CX10B_057Z)、苏州大学优秀博士论文选题立项 (23320935)、国家级大学生创新性实验计划 (SG315866) 资助
第一作者: 赵江虎,男,1986年4月出生,目前在读医学硕士研究生,研究方向为肿瘤与神经药理学
通讯作者: 梁中琴, Email: liangzhongqin@suda.edu.cn
收稿日期: 初稿 2011-06-10, 修回 2011-10-11

1.4 裸小鼠皮下移植瘤模型的建立和实验治疗

以胶质瘤起始细胞 SU-2 (1×10^7) 接种于裸小鼠右腋皮下, 致瘤后以组织块移植传代, 4 代后生物学特征稳定(致瘤率 100%, 生长速度差异很小)。将皮下移植瘤以无菌技术取出剪切后按 2 mm^3 /鼠接种于裸鼠右腋皮下。待肿瘤生长至体积约 100 mm^3 时, 将荷瘤鼠随机分为 3 组: 每组 7 只。(1) 生理盐水阴性对照组 (Control): $150 \mu\text{L}$ 生理盐水; (2) 单纯照射组 (IR): 6 MeV X 射线 5 Gy ; (3) 联合治疗组 (IR+RPM): RPM, 50 mg/kg , $150 \mu\text{L}$ 和 6 MeV X 射线 5 Gy 。RPM 用生理盐水混悬至体积 $150 \mu\text{L}$, 经皮多点穿刺缓慢注入肿瘤间质内。每 3 d 照射一次, 照射前 12 h 给药。每 3 d 测量肿瘤质量、肿瘤短径 a 和长径 b , 根据下列公式计算肿瘤体积 $W=a^2 \times b/2$ 。27 d 为 1 个治疗周期, 末次测量后处死小鼠, 取出肿瘤组织称量质量。计算肿瘤抑制率 (%), 评价疗效。肿瘤抑制率=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.5 裸小鼠颅内原位移植瘤模型的建立和实验治疗

取裸鼠以 10% 水合氯醛 200 mg/kg 腹腔注射, 麻醉后用安尔碘 II 消毒头部皮肤; 然后于小鼠头顶正中纵向切开 0.5 cm 长皮肤, 显露颅骨, 用双氧水涂擦颅骨、显露前囟、矢状缝、冠状缝等结构; 接着于前囟前 1.0 mm , 中线右侧 2.5 mm 处, 用直径 1.0 mm 的颅钻钻颅至硬膜, 将细胞浓度为 1×10^5 个/ $15 \mu\text{L}$ 的悬液置于微量注射器内, 在立体定向仪辅助下, 经钻好的颅骨孔注入裸小鼠右脑尾状核。缓慢拔针, 骨孔用骨腊封闭, 以 0#丝线缝合头皮后待其自然苏醒。接种一周后, 将荷瘤鼠随机分为 3 组: 每组 14 只。(1) 生理盐水阴性对照组 (Control): $15 \mu\text{L}$ 生理盐水原位注射; (2) 单纯照射组 (IR): 6 MeV X 射线 5 Gy ; (3) 联合治疗组 (IR+RPM): 原位注射 RPM 3 nmol 和 6 MeV X 射线 5 Gy 。移植 7 d 后照射, 每 3 d 照射一次, 照射前 12 h 给药。观察裸小鼠的活动、饮食及体貌等状态。瘤龄 4 周时各组处死 2 只, 其中一只取荷瘤鼠全脑组织进行石蜡包埋切片后行 HE 染色, 另一只做 Western Blot 分析; 其余荷瘤鼠观察生存期, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.6 Western Blot

取裸小鼠皮下移植瘤模型和裸小鼠颅内原位移植瘤模型中各组中的肿瘤组织, 放在 1.5 mL EP 管

中, 加入组织裂解液冰浴 10–15 min, 用超声波破碎仪在冰浴中短暂多次超声细胞, 直至裂解液不粘稠。 4°C 、 12000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 在 -70°C 条件下保存备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定以上所提取蛋白的浓度, 在样品中加入 $\times 5$ 上样缓冲液中, 95°C 煮沸 5 min 使蛋白质变性。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后, 用 50 g/L 的脱脂奶粉封闭, 加入兔抗人 LC3 抗体 (1: 1 000) 孵育过夜, 加入耦联辣根过氧化物酶 (HRP) 的第二抗体 (1: 5 000) 孵育 1 h。洗膜后, 用 ECL 显色。

1.7 统计学分析

用 SPSS13.0 软件对肿瘤的体积和荷瘤鼠体质量进行方差分析、Kaplan-Meier 生存分析及 Log rank 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 联合治疗对皮下接种肿瘤的抑瘤效应

荷瘤鼠治疗前体重为 $(19.20 \pm 0.95) \text{ g}$, 治疗结束后重量阴性对照组为 $(25.66 \pm 0.78) \text{ g}$, 单纯照射组为 $(25.98 \pm 1.03) \text{ g}$, 联合治疗组 $(25.08 \pm 1.56) \text{ g}$ 。各组治疗开始与结束后体重变化与同龄饲养鼠无明显差异, 未见体重减轻等不良反应。各组间裸小鼠体质量无明显的统计学差异 ($P > 0.05$)。治疗期间各实验组肿瘤体积变化显示, 处理 1 周后阴性对照组和单纯照射组肿瘤生长明显快于联合治疗组, 并持续呈指数倍增长。治疗 18 d 内各组肿瘤生长速度维持于较低水平, 18 d 后阴性对照组和单纯照射组肿瘤生长明显加速, 持续快速增大, 高于联合治疗组 ($P < 0.05$)。治疗 27 d 结束。结果显示, 联合治疗组对皮下移植瘤的抑制率为 58.4%, 明显高于阴性对照组和单纯照射组 ($P < 0.05$) (见图 1 和表 1)。

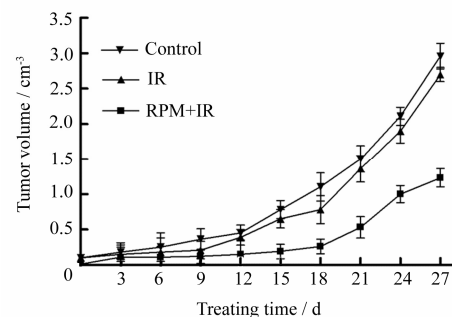


Fig.1 The subcutaneous tumor growth in the groups treated using combination with rapamycin and IR inhibits. The tumor volume was measured after treatments

Table 1 Treatment with RPM and IR inhibits tumorigenicity of glioma-initiating cells

	Control	IR	RPM+IR
Tumor mass / g	2.96±0.18	2.70±0.10	1.23±0.13
Tumor inhibition rate / %	0	8.8%	58.4%

2.2 联合治疗对颅内原位移植瘤的抑瘤效应

裸小鼠早期生存状态良好, 无偏瘫等神经系统体征, 饮食正常。阴性对照组和单纯照射组的荷瘤鼠在 GICs 接种后 4 周出现反应迟缓、纳食减少、体形消瘦、精神萎靡、对侧肢体偏瘫等, 逐渐呈恶病质状态, 中位生存期分别为 81 d 和 86.5 d。联合治疗组比阴性对照组和单纯辐照组的病理状态出现时间延后。log rank 检验: 阴性对照组和单纯辐照组之间生存期差异无统计学意义 ($P>0.05$); 阴性对照组和联合治疗组之间生存期差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2)。

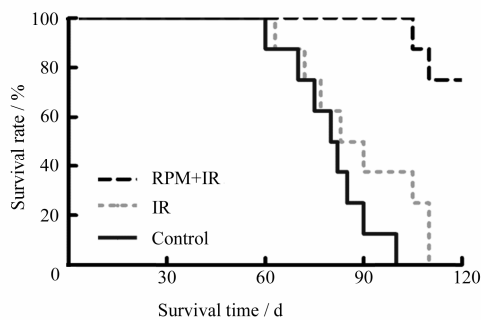


Fig.2 Animal survival was evaluated using a log-rank analysis from a Kaplan-Meier survival curve. Kaplan-Meier curves demonstrate that combination treatment with rapamycin and IR increased the survival of mice bearing SU-2 intracranial xenografts

HE 染色在体视显微镜下观察各组肿瘤生长情况, 阴性对照组和单纯辐照组可见肿瘤侵袭性生长, 同周围脑组织无明显分界, 脑室等结构受压移位; 在光镜下观察可见肿瘤细胞呈圆、椭圆和星形; 胞核大而圆, 核深染, 异形, 分裂相多见, 偶见双核; 瘤内可见坏死组织; 肿瘤区染色较周围正常脑组织深, 肿瘤广泛向周围脑组织浸润生长, 与正常脑组织无明显分界, 呈鸡爪样, 或与正常脑组织呈“犬牙”交织; 浸润的肿瘤细胞成束向脑组织伸展。而联合治疗组, 肿瘤生长局限, 与周围脑组织有明显分界 (图 3)。

2.3 Western blot 检测 LC3 的表达情况

LC3 是自噬泡形成过程中的关键蛋白, 其中

LC3 II 存在于自噬双层膜上。细胞内新合成的 LC3 经过加工, 成为胞浆可溶形式的 LC3 I, 后者经泛素化加工修饰, 与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合, 成为膜结合形式的 LC3 II。LC3 II 定位于前自噬体和自噬体, 是自噬体的标志分子。LC3 I 的表观分子量是 18 kDa, LC3 II 的表观分子量是 16kDa。LC3 II 的含量或 LC3 II/LC3 I 的比值与自噬泡的比例成正相关。LC3 II/LC3 I 在某种程度上反映了细胞的自噬活性, 比值越大代表自噬活性越高^[5, 6]。

Western Blot 结果表明, 裸小鼠皮下移植瘤模型中, 单纯辐照组 LC3 II/LC3 I 与阴性对照组的相比没有统计学意义 ($P>0.05$); 联合治疗组的 LC3 II/LC3 I 比阴性对照组和单纯辐照组的大且有统计学意义 ($P<0.05$)。裸小鼠颅内原位移植瘤模型中的 LC3 II/LC3 I 分析中得到与裸小鼠皮下移植瘤模型相同的结果 (图 4)。这些结果提示我们, 在裸小鼠皮下移植瘤模型和裸小鼠颅内原位移植瘤模型中, 联合治疗组, 也就是在辐照前预先给予雷帕霉素处理时, 自噬相关蛋白 LC3 的表达上调, 自噬被激活。

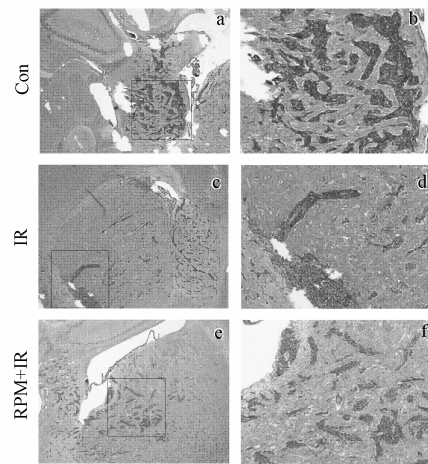


Fig. 3 H&E stained section five weeks after tumor implantation revealed antitumor efficacy of rapamycin in combination with IR. Tumors in untreated control mice and IR-treated mice contain pleiomorphic, neoplastic and malignant, infiltrating cells and have invaded the ventricular system (a-d). Co-treated animals generated very small noninvasive tumors (e, f). Magnification was in 4× a, c, e and 10× in b, d, f

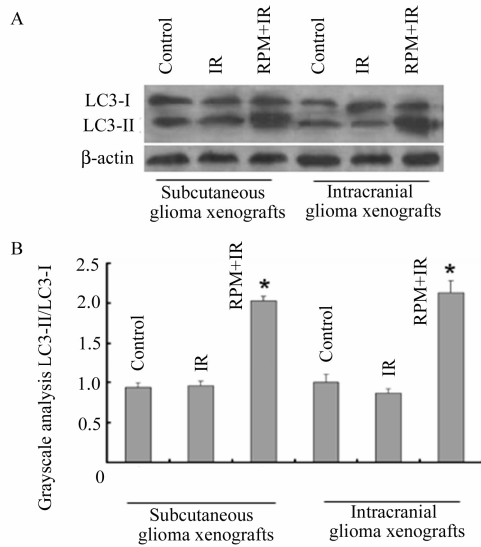


Fig.4 Autophagy detection in GICs after treatments. (A) Tumors were harvested in the indicated time for western analyses of LC3-II. (B) The data are expressed by ratio LC3-II/LC3-I. * $P < 0.05$ vs. Control. Points, mean of triplicate experiments; bars, SD

3 讨论

越来越多的研究表明^[7-13], 胶质瘤组织中存在少数具有自我更新、多向分化、较强增殖潜能的细胞, 即胶质瘤起始细胞, GICs 是胶质瘤的种子和源泉。众多事例证明胶质瘤起始细胞对放射的抵抗是胶质瘤放射治疗失败的主要原因, 但这部分细胞的生物学特征以及耐辐射机制至今仍不清楚。

自噬 (Autophagy) 是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 是真核细胞特有的生命现象。自噬是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制, 与包括肿瘤在内的多种人类疾病有关^[14-16]。Ito 等^[17]发现在放射线作用于胶质瘤细胞后, 自噬被激活, 当自噬被抑制后, 可提高胶质瘤对辐射的敏感性。而 Daido 等^[18]的研究却显示出相反的结果, 当用 DNA-PK (DNA 依赖蛋白激酶) 抑制剂激活胶质瘤细胞自噬的同时, 却提高了胶质瘤细胞的放射敏感性。以上研究提示, 自噬在胶质瘤耐放射治疗中起着重要作用, 但到目前为止, 关于自噬调节在 GICs 耐辐射中的作用还未见报道。

在以前的体外实验研究中发现, 胶质瘤起始细胞的基础自噬活性很低, 经自噬激动剂雷帕霉素处理后, 再经 X 射线辐照, 胶质瘤起始细胞的辐射敏感性明显增加。本研究利用裸小鼠皮下移植瘤模型和裸小鼠原位移植瘤模型, 证明了自噬激动剂雷帕霉素对胶质瘤起始细胞移植瘤的辐射增敏作用。在裸小鼠皮下移植瘤模型中, 联合治疗组 (预先给予

雷帕霉素再辐照处理组) 的肿瘤明显小于阴性对照组和单纯辐照组, 联合治疗组的抑瘤率明显高于阴性对照组和单纯照射组 ($P < 0.05$), 达到了 58.4%, 而单纯辐照组的抑瘤率为 8.8%。在裸小鼠颅内原位移植瘤模型中, 联合治疗组比阴性对照组和单纯辐照组出现体形消瘦, 精神萎靡等病理状态的时间延后, 中位生存期延长, 联合治疗组的裸小鼠在 120 d 内死亡两只, 而阴性对照组和单纯辐照组的中位生存期分别为 81 d 和 86.5 d ($P < 0.05$)。并且 HE 染色的病理切片中, 可以看到, 联合治疗组的肿瘤生长局限, 与周围正常脑组织界限清楚。而阴性对照组和单纯辐照组肿瘤广泛向周围脑组织浸润生长, 与正常脑组织无明显分界。Western Blot 结果表明在联合治疗组, 自噬激动剂雷帕霉素激活了裸小鼠皮下移植瘤和颅内原位移植瘤中 GICs 的自噬活性。以上这些数据提示, 联合治疗对移植瘤的辐射增敏作用, 可能由于通过预先给予雷帕霉素激活了 GICs 自噬活性引起的。

本研究表明, 在体内, 适量的自噬激动剂雷帕霉素, 可以通过激活 GICs 自噬活性增加胶质瘤的辐射敏感性。自噬可能成为胶质瘤辐射增敏的作用靶点。自噬可能在调节胶质瘤起始细胞在辐射抗性中起着重要的作用。但是自噬调控 GICs 的辐射敏感性的机制仍不清楚, 对其开展深入研究有可能为脑胶质瘤辐射抗性找到新的作用靶点。

参考文献

- 1 Walker M D, Jr Alexander E, Hunt W E, *et al.* Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery*, 1978, **49**: 333-343
- 2 Bao S, Wu Q, McLendon R E, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, **444**: 756-760
- 3 Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008, **4**: 151-75
- 4 Huang Q, Zhang Q B, Dong J, *et al.* Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term in vitro. *BMC cancer*, 2008, **8**: 304
- 5 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 2000, **19**: 5720-5728

- 6 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2004, **36**: 2503-2518
- 7 方加胜, 邓永文, 李茗初, 等. 神经上皮来源脑肿瘤干细胞的分离培养与鉴定[J]. *中华医学杂志*, 2007, **87**(5): 298-303
FANG Jiasheng, DENG Yongwen, LI Mingchu, *et al.* Isolation and identification of brain tumor stem cells from human brain neuroepithelial tumors[J]. *Nail Med J China*, 2007, **87**(5): 298-303
- 8 Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 2006, **9**: 391-403
- 9 Rich J N. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. *Front Biosci*, 2003, **8**: 245-260
- 10 Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger M S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 2005, **353**: 811-822
- 11 Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, 2003, **63**: 5821-5828
- 12 Stiles C D, Rowitch D H. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*, 2008, **58**: 832-846
- 13 Vescovi A L, Galli R, Reynolds B A. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews*, 2006, **6**: 425-436
- 14 Hippert M M, O'Toole P S, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both?. *Cancer research*, 2006, **66**: 9349-9351
- 15 Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, *et al.* The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews*, 2005, **5**: 726-734
- 16 Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews*, 2005, **5**: 886-897
- 17 Ito H, Daido S, Kanzawa T, *et al.* Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *International Journal of Oncology*, 2005, **26**: 1401-1410
- 18 Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, *et al.* Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Research*, 2005, **65**: 4368-4375

The enhancement of radio-sensitivity via autophagy induced by rapamycin with glioma-initiating cells in vivo

ZHAO Jianghu ZHUANG Wenzhuo LONG Linmei LI Feng LIANG Zhongqin

(Department of Pharmacology, Medical College, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the effect of rapamycin (RPM) on radio-sensitivity of glioma - initiating cells (GICs) in vivo, GICs were inoculated subcutaneously into the NC nude mice. And an intracranial orthotropic model was utilized for evaluation of radio-sensitivity by use of orthotropic injection. Protein levels of LC3 were analyzed with immunoblotting. It was found that tumor inhibition ratio of RPM+IR group was higher than that in control group and IR group. Combination treatment of nude mice bearing intracranial GICs glioma xenografts with rapamycin and IR made a significant increment of animal survival compared with control or IR alone group. Western blot assay showed that the rate of LC3-II /LC3-I increased obviously in combination treatment group among two models. As a conclusion, Rapamycin can enhance the radio-sensitivity of glioma-initiating cells by inducing autophagy in vivo.

KEYWORDS Glioma-initiating cells, Autophagy, Radio-sensitivity, Rapamycin, In vivo test

CLC R730.264