

槲皮素对胶质瘤干/祖细胞的 辐射致敏作用及其机制的初步探讨

陈列松¹ 季文君² 庄文卓² 梁中琴²

(苏州大学附属第二医院放疗科 苏州 215004)

(苏州大学医学部药理学系 苏州 215123)

摘要 本研究旨在探讨槲皮素对胶质瘤干/祖细胞辐射敏感性的影响及其机制。用槲皮素(Quercetin, Que)作用于已经建立的胶质瘤干/祖细胞系 SU-2, 用 Western Blot 和免疫荧光法检测自噬相关蛋白 LC3 的变化, 以检测 SU-2 的自噬活性的改变。采用四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)比色法和克隆形成实验比较各处理组对 SU-2 的增殖抑制作用; 应用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同因素处理 SU-2 后细胞凋亡情况的改变。实验结果表明: 用槲皮素预先处理胶质瘤干/祖细胞系 SU-2 再辐照组较单纯辐照组的细胞增殖率降低($p < 0.05$), 克隆形成率明显降低($p < 0.05$), 细胞凋亡率显著增加($p < 0.05$)。这些结果提示, 胶质瘤干/祖细胞的基础自噬活性很低, 经槲皮素处理后, 再经 X 线照射, 胶质瘤干/祖细胞的自噬活性提高, 辐射敏感性明显增加。

关键词 胶质瘤干/祖细胞, 自噬, 辐射致敏, 槲皮素

中图分类号 R730.264, R966, R739

恶性胶质瘤复发率居高不下, 患者平均生存期小于 1 年。放射治疗是胶质瘤患者手术后的主要治疗手段之一^[1]。手术后放射治疗可显著延长恶性胶质瘤患者的生存期。然而, 由于大部分脑胶质瘤患者对放射治疗产生耐受性而难以达到有效治疗目的。近来有研究表明^[2], 胶质瘤干细胞/祖细胞(Glioma stem progenitor cells, GSPCs)或者称为胶质瘤起始细胞(Glioma-initiating cells, GICs)不仅是肿瘤发生、发展、浸润和复发的种子细胞, 而且还极有可能是肿瘤细胞耐受放射治疗的靶细胞, 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。本研究旨在建立人脑 GSPCs 系的基础上, 探讨槲皮素在调节 GSPCs 自噬活性进而影响其辐射敏感性中的关键作用。

1 实验材料和方法

1.1 细胞培养

胶质瘤干/祖细胞系 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[3]的方法, 分离 CD133⁺细胞, 置于含碱性成纤维生长因子(bFGF)(终浓度 20 ng/mL)、EGF(终浓度 20 ng/mL)和 N2 添加剂的 DMEM/F12 (1: 1)培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。DMEM/F12 培养基、bFGF、N2 添加剂为 GIBCO 公司产品; 表皮生长因子(EGF)为 Invitrogen 公司产品; 3-甲基腺嘌呤(3-MA)和 MTT 为 Sigma 产品。LC3 抗体: Cat: PD014、PD015、MBL。β-actin 抗体: clone EP1123Y。caspase-3 抗体: Cell Signaling。槲皮素由美国 Sigma 公司生产, DMSO 配制, 分装后于 -20℃ 温度下保存, 临用前用 RPMI 1640 完全培养基稀释。

1.2 照射条件

收集干细胞培养条件下生长至对数生长期的胶质瘤干/祖细胞, 以浓度为 2.5 mg/mL 胰蛋白酶消化后计数, 调整细胞悬液至 1×10^5 / mL 接种于 6 孔培养板中, 平行样品 3 份。短期培养后, 采用 SIEMENS-Primus 直线加速器对培养的细胞进行照

国家自然科学基金(30873052、81072656、81102466)、江苏省自然科学基金(BK2010226)、苏州市应用基础研究计划项目(SYS201105)资助

第一作者: 陈列松, 男, 1969 年 12 月出生, 2006 年毕业于苏州大学附属第二医院放疗科, 放疗技术专业, 中级

通讯作者: 梁中琴, Email: liangzhongqin@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-12-02, 修回 2012-03-01

射,照射条件为 6 MV X 线垂直照射,剂量率为 2Gy/min,机架旋转 180°,照射时于培养板底部加入 1.5 cm 组织等效填充物,源皮距(SSD)100 cm。

1.3 MTT 法检测细胞活力

实验分组:阴性对照组(Control)、单纯辐照组(IR)、联合治疗组(Que+IR)和三联治疗组(3-MA+Que+IR)。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 8×10^4 /mL 后接种于 96 孔培养板中,联合治疗组给予槲皮素 200 μ mol/L, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养,次日辐照处理。为探讨槲皮素对胶质瘤干/祖细胞的辐射增敏作用是否因为槲皮素激活了 GSPCs 的自噬活性,在三联治疗组中,先给予自噬抑制剂 3-MA 10 mmol/L, 10 min 后,再给予槲皮素 200 nmol/L, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养,次日辐照处理。照射剂量均为 6 Gy。每组均设 3 个复孔,分别培养 24 h, 48 h, 72 h。培养终止前 4 h 加入 MTT (5 mg·mL⁻¹, PBS 配制,过滤除菌), 10 μ L 每孔, 37℃继续培养 4 h 后每孔加入酸化的 10% SDS 100 μ L 终止反应,放置过夜,于酶标仪检测波长为 570 nm 时的吸光度 *A* 值,重复 3 次。

1.4 克隆形成实验观察放射后细胞存活率

实验分组同 1.3。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 2.5×10^2 /mL 于 6 孔板中,各组处理方法同上,2 mL/孔,每组均设 3 复孔,37℃、5% CO₂ 条件下培养过夜,次日辐照处理。分别给与 2、4、6 Gy 剂量照射。在含 37℃、5% CO₂ 条件下静置 14 d,弃去培养基,用结晶紫染色后镜下计数含 50 个细胞以上的集落,并摄影。以 0 Gy 组计算种植率,并计算存活分数, SF=照射后细胞形成的克隆数/(接种细胞数×细胞种植率),根据单击多靶模型拟合曲线计算得到 SF3 (3 Gy 照射后细胞的存活分数),重复 3 次。

1.5 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

实验分组同 1.3。各组取处理后 72 h 的细胞, PBS 洗涤,制成单细胞悬液,细胞数约 1×10^6 /mL, Annexin V/PI 染色后进行流式细胞仪分析。具体步骤按 Annexin-V/PI 试剂盒(Vybrant® Apoptosis Assay Kit #2, BD)说明书进行。

1.6 Western Blot

收集细胞,放在 1.5 mL EP 管中,加入组织裂解液冰浴处理 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℃、12000 r/min 离心 10 min,吸取上清,–70℃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×5 上样缓冲液中,95℃煮沸 5 min 使蛋白质变性。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后,50 g/L 脱脂奶粉封闭,加入兔抗人 LC3 抗体(1:1000)孵育过夜,加入耦联辣根过氧化物酶(HRP)的第二抗体(1:5000)孵育 1 h。洗膜后,用 ECL 显色。

1.7 免疫荧光法检测 LC3 表达的改变。

实验分组同 1.3。各组取处理后 72 h 的细胞, PBS 洗涤 2 次;吸取 10 μ L,滴于已做过预处理的载玻片上,用血涂片的方法将其均匀涂开;涂片快干时,用–20℃预冷的甲醇固定 10 min;将载玻片置于 PBS 中洗涤 4 次,室温吹干;滴加 1% BSA 封闭液封闭细胞,4℃,1 h;将载玻片置于 PBS 中洗涤 4 次,室温吹干;滴加 LC3(1:1000 稀释)一抗孵育,4℃过夜;将载玻片置于 PBS 中洗涤 4 次,室温吹干;滴加 FITC-DAR 二抗避光孵育,4℃,1 h;将载玻片置于 PBS 中洗涤 4 次,暗处晾干;滴加荧光封裱液封片;共聚焦显微镜下观察,摄片。

1.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 4 软件作图分析。采用单因素方差分析处理,组间采用 Dunnett—*t* 检验。

2 结果

2.1 联合治疗对 GSPCs 的增殖抑制作用

如图 1 所示,联合治疗组的细胞增殖明显受到抑制,与阴性对照组、单纯辐照组和三联治疗组相比有显著性差异($p < 0.05$)。MTT 结果表明,用槲皮素 200 nmol/L 预先处理细胞,24 h 后再进行辐照对细胞生长有明显抑制作用,且此作用呈明显的时间依赖性。而在三联治疗组,先给予自噬抑制剂 3-MA,再给予槲皮素处理细胞时,GSPCs 的增殖抑制作用大大降低。

2.2 联合治疗对 GSPCs 克隆形成的抑制作用

联合治疗组(SF3=0.34±0.2)的细胞克隆形成与未处理组、单纯辐照组(SF3=0.73±0.2)和三联治疗组(SF3=0.68±0.1)相比,明显减低($p < 0.05$) (图 2)。实验结果显示,预先用槲皮素 200 nmol/L 处理细胞后再辐照能明显降低细胞的克隆形成能力,且此作用可明显被自噬抑制剂 3-MA 阻止。

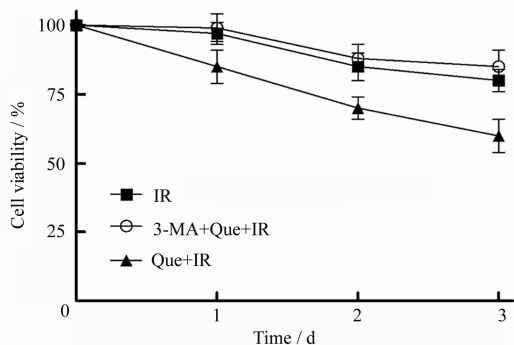


Fig.1 Cell viability after the treatments. The number of viable cells was calculated by a trypan blue dye exclusion assay. The viability of untreated cells was regarded as 100%. Points, mean of triplicate experiments; bars, SD

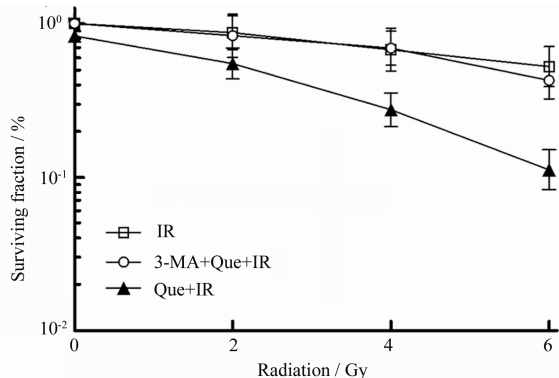


Fig.2 Clonogenic survival curves. Clonogenic survival curves for irradiation alone or irradiation plus quercetin in cells. Points, mean of triplicate experiments; bars, SD

2.3 检测细胞凋亡结果

为了检测联合治疗组对 GSPCs 的辐射增敏作用的机制是否和细胞凋亡有关,我们做了凋亡相关检测。首先,流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡(图 3 A、B)。细胞经 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测,在双参数散点图上,左下象限为 Annexin V 和 PI 双阴性,代表正常细胞;右下象限为 Annexin V 阳性和 PI 阴性,代表早期凋亡细胞;右上象限为 Annexin V 和 PI 双阳性,代表凋亡晚期或坏死细胞。联合治疗组的细胞凋亡率为(67.8±3.1)%,与单纯辐照组(13.2±3.0)%和三联治疗组(14.6±2.5)%相比,差异有显著性意义(均 $p < 0.05$)。

Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应中的关键酶,活化的 Caspase-3 能直接催化核内的脱氧核糖核酸酶(DNase)的抑制蛋白 ICAD 的降解,而激活核酸内切酶 CAD (Caspase-activated DNase),导致细胞凋亡。我们检测了各组取处理后 72 h 的细胞 Caspase-3 的蛋白水平的变化。Western Blot 结果显示(图 3 C),联合治疗组的 Caspase-3 的活性剪切片段(17 kDa/19 kDa)较对照组相比,表达明显增加,而单纯辐照组和三联治疗组未见 Caspase-3 的活性片段增加。

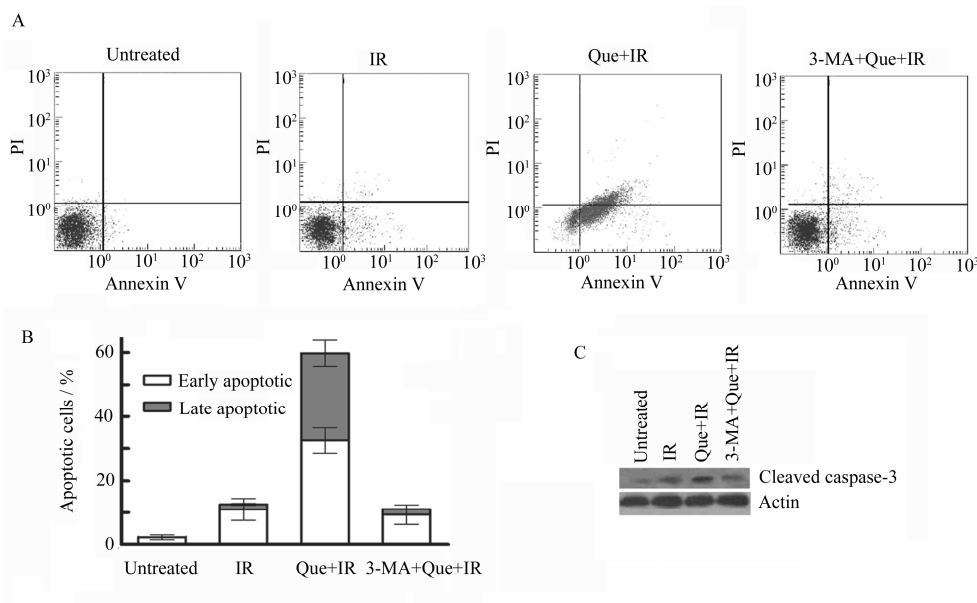


Fig.3 Effect of combination of quercetin and IR on SU-2 apoptosis. (A) Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometric determination of apoptosis in cells. Cells treated with quercetin and IR demonstrated a dramatically increased percentage of apoptotic cells compared to untreated control, IR alone group and triple therapy (quercetin + IR + 3-MA) group. (B) Means $\pm$ SD results from B. ($n=3$; * $p < 0.05$ vs. untreated group; ** $p < 0.001$ vs. untreated group). (C) Whole cell lysates in each treatment groups were collected, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with an antibody specific for cleaved caspase-3 Equal loading was confirmed by actin immunoblot

2.4 自噬相关蛋白 LC3 表达的情况

LC3 (微管相关蛋白轻链 3, microtubule-associated protein light chain-3) 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 LC3I, 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 16 kDa。LC3 II 的含量或 LC3 II/LC3I 的比值与自噬泡的比例成正比相关。LC3 II/LC3I 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^[4,5]。

免疫荧光的实验结果显示, 联合处理组的细胞 LC3 表达上调。在一部分细胞中 LC3 表达呈现颗粒状, LC3 绿色荧光呈点状散在分布于细胞膜附近, 说明带有 LC3-II 的自噬体的形成。而阴性对照组、单纯辐照组和三联治疗组只有很弱的荧光 (见图 4A、B)。

Western Blot 结果表明, 单纯辐照组和三联治疗组的 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 ($p<0.05$)。 (图 4 C、D)。这些结果提示联合治疗组, 即在辐照前预先给予槲皮素处理时, 自噬相关蛋白 LC3 的表达上调, 自噬被激活。

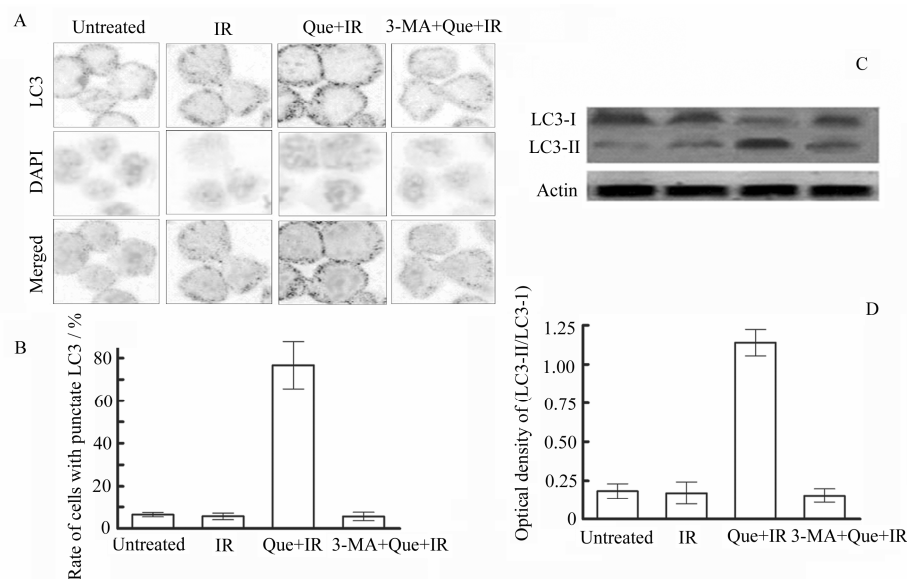


Fig.4 Autophagy detection in SU-2 treated with rapamycin and radiation. (A) Changes in the localization of LC3 in cells after the indicated treatments assessed by immunocytochemistry. After specific treatment, the cells were subjected to immunofluorescence with anti-LC3-II antibody. (B) Quantification of cells with LC3 dots in cells treated by indicated treatments. The percentage of cells with punctate LC3 fluorescence was calculated relative to all GFP-positive cells. (C) Cells were harvested in the indicated time for western analyses for LC3-II. (D) Densities of protein bands were analyzed with an image analyzer (Sigma Scan Pro 5) and normalized to the loading control (β -actin)

3 讨论

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。越来越多的研究表明^[6-12], 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, 即胶质瘤干/祖细胞, 该学说认为 GSPCs 是胶质瘤的种子和源泉。众多事例证明胶质瘤干/祖细胞对放疗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^[13-15]。Ito 等^[16]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^[17]的研究却显示出相反地结果, 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 GSPCs 耐辐射中的作用还未见报道。

槲皮素具有广泛的生理及药理活性, 因其扩张冠脉、调血脂、降低血管通透性被作为心血管药物而在临床广泛应用^[18]。槲皮素在体外实验中可抑制乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、胃癌、白血病等多种恶性肿瘤的生长^[19]。在本研究中, 已经成功建立了 GSPCs 系的基础上, 发现胶质瘤干/祖细胞的基础自噬活性很低。而用适量的槲皮素可以激活其自噬活性, 在 GSPCs 的自噬活性激活后其辐射敏感性显著增加。表现为 GSPCs 用槲皮素处理后再接受辐照时, 细胞增殖受到抑制, 克隆形成能力降低, DNA 损伤的修复能力大大减弱。如果先给予自噬抑制剂 3-MA, 再给予槲皮素处理细胞时, GSPCs 的增殖抑制作用大大降低。这些结果表明, 槲皮素的辐射增敏作用是通过增加 GSPCs 自噬活性完成的。进一步的 Annexin V/PI 双染色流式细胞术分析和 Western Blot Caspase-3 分析表明此时细胞是以细胞凋亡的方式死亡的。以上的实验数据说明适量的槲皮素可以通过激活 GSPCs 自噬活性增加 GSPCs 的辐射敏感性。

本研究表明, 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干/祖细胞在辐射抗性中起着重要的作用。但是, 由于自噬分子机制的复杂性以及自噬和凋亡调控的多因素性, 许多相关调控因子在两者机制通路中的作用仍有待于更深入细致的研究来阐明。槲皮素是如何调控 GSPCs 的辐射敏感性的仍不清楚, 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

- 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
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, **444**: 756-760
- 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
- 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
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology*, 2004, **36**: 2503-2518
- Fang J S, Deng Y W, Li M C, *et al.* [Isolation and identification of brain tumor stem cells from human brain neuroepithelial tumors]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 2007, **87**: 298-303
- 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
- Rich J N. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. *Front Biosci*, 2003, **8**: e245-260
- 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
- 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
- Stiles C D, Rowitch D H. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*, 2008, **58**: 832-846
- Vescovi A L, Galli R, Reynolds B A. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews*, 2006, **6**: 425-436
- Hippert M M, O'Toole P S, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer research*, 2006, **66**: 9349-9351
- 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
- Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews*, 2005, **5**: 886-897
- 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
- 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
- Hollman P C, Kata M B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*, 1999, **37**(9-10): 937-942
- LUO L, WU K L. Study improvements On cancer chemop

reventive effects of quercetin. Chin Trad it Herb Drugs,

2001, 32(4): 378-379

Autophagy plays a role in promoting radiosensitivity of glioma stem/progenitor cells by quercetin

CHEN Liesong¹ JI Wenjun² ZHUANG Wenzhuo² LIANG Zhongqin²

¹(Department of radiotherapy, 2nd Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

²(Department of Pharmacology, Medical College, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the effect of quercetin on glioma stem/progenitor cells (GSPCs) sensitivity to radiation, GSPCs were exposed to quercetin and IR. The changes in protein levels of LC3 in GSPCs with various treatments were confirmed by the immunoblotting analysis and immunofluorescence analysis. Growth inhibition of GSPCs was assessed with methylthiazolyl tetrazolium (MTT) and cell viability assay. Annexin V-FITC/PI staining was used to study the treatment effects on apoptosis. The results show that cells previously treated with quercetin and IR generated a decreased number of colonies as compared to untreated cells, and apoptosis level in GSPCs was significantly increased by the combined treatment with quercetin and IR. These suggest that activating autophagy may abrogate the resistance of GSPCs to radiation and could lead to the development of novel therapeutic approaches for the treatment of glioblastomas.

KEYWORDS Glioma stem/progenitor cells, Autophagy, Radio-sensitization, Quercetin

CLC R730.264, R966, R739