基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.004

多药耐药基因 MGMT 在脑胶质瘤干细胞中表达的实验研究

徐忠烨[1]，陈　松[1]，程　远[1]，王志刚[2]
（1. 重庆医科大学附属第二医院神经外科；2. 重庆医科大学超声影像学研究所，重庆　400010）

【摘　要】目的：探讨甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（Methylguanine-dna methyltransferase，MGMT）在脑胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞（Brain glioma stem cells，BGSC）中的表达情况。方法：由手术切除的多形性胶质母细胞瘤中分离培养胶质瘤细胞和 BGSC；应用免疫细胞化学染色和流式细胞术（Flow cytometry，FCW）鉴定 BGSC；应用 RT-PCR 法测定 MGMT mRNA 在胶质瘤细胞、BGSC 和正常脑组织中的表达。结果：本研究中获得的 BGSC 具有典型的 BGSCs 细胞生物学特征和免疫学标记；RT-PCR 检测结果表明 MGMT mRNA 在 BGSC 中的相对表达量明显高于胶质瘤细胞（0.562 ± 0.021 vs 0.112 ± 0.023，$P<0.01$），而胶质瘤细胞MGMT mRNA 的相对表达量明显高于正常脑组织（0.112 ± 0.023 vs 0.005 ± 0.001，$P<0.01$）。结论：多药耐药基因 MGMT 主要在 BGSC 而非胶质瘤细胞中表达，其可能是 BGSC 产生多药耐药性的主要分子机制之一。

【关键词】胶质瘤干细胞；胶质瘤细胞；甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
【中国图书分类法分类号】R739.41　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2010-03-04

Study on the expression of MGMT gene in glioma stem cells derived from GBM

XU Zhong-ye[1], CHEN Song[1], CHENG Yuan[1], WANG Zhi-gang[2]
(1. Department of Neurosurgery; 2. Institute of Ultrasound Imaging, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression of MGMT gene in glioma stem cells and glioma cells derived from glioblastoma. *Methods*: BGSC was isolated from glioblastoma and cultured in vitro, and was identified by immunocytochemical stain and flow cytometry. Relative expression of MGMT gene in BGSC and in glioma cells by RT-PCR was analyzed. *Results*: BGSC from glioblastoma could express Nestin and CD133 antigen, self-renew and differentiate into astrocyte and neuron in vitro. RT-PCR results demonstrated the relative expression of MGMT gene in BGSC was markedly higher than in glioma cells (0.562 ± 0.021 vs 0.112 ± 0.023, $P<0.01$), and the relative expression of MGMT gene in glioma cells was markedly higher than in normal brain tissue (0.112 ± 0.023 vs 0.005 ± 0.001, $P<0.01$). *Conclusion*: The expression of MGMT gene in BGSC is markedly higher than in glioma cells. MGMT may be the key molecular biology mechanism that leads to drug resistance in BGSC.

【Key words】brain glioma stem cells; glioma cells; methylguanine-dna methyltransferase

作者介绍：徐忠烨（1977-），讲师，博士，
研究方向：恶性胶质瘤的临床与基础研究。

基金项目：国家重点基础研究发展计划（973 计划）（编号：2011CB707900）。

ods Enzymol, 1981, 77(5): 413-415.

[7] Wang L Q, Falany C N, James M O. Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions[J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(10): 1162-1169.

[8] Chen X, Yang Y S, Zheng Y, et al. Tyrosine-ester sulfotransferase from rat liver: bacterial expression and identification[J]. Protein Expr Purif, 1992, 3(5): 421-426.

[9] Sheng J, Sharma V, Duffel M W. Current Protocols in Toxicology[M] (Chapter 4, unit 4.5). 1st Edition. New York: John Wiley & Sons, 2001. 1-9.

[10] Liu Y G, Smart J T, Song Y, et al. Structure-activity relationships for hydroxylated polychlorinated biphenyls as substrates and inhibitors of rat sulfotransferases and modification of these relationships by changes in thiol status[J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(5): 1065-1072.

[11] Jocelyn P C. Spectrophotometric assay of thiols[J]. Methods Enzymol, 1987, 143(1): 44-67.

[12] Marshall A D, McPhie P, Jakoby W B. Redox control of aryl sulfotransferase specificity[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 382(1): 95-104.

[13] Nowell S, Ambrosone C B, Ozawa S, et al. Relationship of phenol sulfotransferase activity (SULT1A1) genotype to sulfotransferase phenotype in platelet cytosol[J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(9): 789-797.

[14] Liu Y G, Apak T I, Lehmler H J, et al. Hydroxylated polychlorinated biphenyls are substrates and inhibitors of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2A1[J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19(11): 1420-1425.

[15] Liu Y G, lehmler H J, Robertson L W, et al. Physicochemical properties of hydroxylated chlorinted biphenyls aid in predicting their interactions with rat sulfotransferase 1A1 (rSULT1A1) [J]. Chemico-Biol Interact, 2011, 189(3): 153-160.

（责任编辑：张学颖）

最新的理论认为，脑胶质瘤干细胞（Brain glioma stem cells，BGSC）是胶质瘤抵抗化疗的关键。胶质瘤内 BGSC 比例越高，胶质瘤抵抗化疗的能力就越强[1]。因此深入研究BGSC产生耐药的分子机制，对逆转胶质瘤的多药耐药性具有重要意义。甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（Methylguanine-dna methyltransferase，MGMT）是胶质瘤表达的一种多药耐药基因，临床研究证明 MGMT 表达水平的高低是判定胶质瘤是否耐药的重要指标[2]。故本研究拟通过体外细胞培养实验探讨 BGSC 表达 MGMT 的情况，为进一步研究和逆转 BGSC 的多药耐药性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

胶质瘤标本来自我科室的新鲜手术标本（多形性胶质母细胞瘤，WHO Ⅳ级），正常脑组织来源于经手术的脑挫裂伤患者。细胞培养用 DMEM/F12、B27、bFGF、EGF、LIF 购于 Sigma 公司，胰酶购于 GIBCO 公司，胎牛血清购于天津灏洋公司，Nestin一抗、GFAP一抗、NSE一抗、FITC标记的 CD133 抗体购于 Santa Cruz 公司，TRITC、FITC 二抗购于北京中杉公司，RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。引物设计及合成：MGMT（428 bp）的正义链 5'-CACCGTTTGCGACTTGGT-3'；反义链 5'-TTGCTCCTCCCACTGCTC-3'。内参 GAPDH（311 bp）的正义链 5'-CACATCGCTCAGACACCA-3'；反义链 5'-GGACTCCACGACGTACTCA-3'，均由 TaKaRa 公司合成。

1.2 胶质瘤细胞和 GSCs 的体外分离、培养

将剪碎后的新鲜胶质瘤标本在含有 0.125%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 的消化液中消化 20 min，血清终止消化，机械吹打成单细胞悬液，离心，细胞沉淀以 1×10^8 个/L 的浓度，分别接种于胶质瘤细胞培养基（含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12）和胶质瘤干细胞（Glioma stem cells，GSCs）培养基（含有 bFGF、EGF 各 20 μg/L，LIF 10 μg/L 和 2%B27 的 DMEM/F12）中，于 37℃、5%CO_2 的条件下培养。每 3~4 d 换液 1 次，每 7 d 机械分离传代 1 次。

1.3 GSCs 的鉴定

1.3.1 免疫组化鉴定 将原代培养中悬浮生长的细胞集落行 Nestin 免疫荧光细胞化学染色，Nestin 一抗的使用浓度为 1:1 000。应用含 5%胎牛血清的培养基诱导细胞集落分化 12 d 后，分别行神经系统化酶（Nervous system enzyme，NSE）、胶质纤维酸性蛋白（GFAP）免疫荧光细胞化学染色，NSE 一抗、GFAP 一抗的使用浓度分别为 1:250、1:500。

1.3.2 流式细胞术分析（Flow cytometry，FCW） 将原代培养中悬浮生长的细胞集落分离成单细胞悬液，经 FITC 标记的兔抗鼠CD133 抗体标记后送 FACS 检测。

1.4 耐药基因 MGMT mRNA 在 GSCs 中的表达分析

由 GSCs、胶质瘤细胞和正常脑组织中提取总 RNA，按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒提供的方法进行 RT-PCR 反应，反应结束后取 5 μl 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳，经凝胶电泳成像仪显影后应用 Qauntity One 软件分析结果。根据目的基因（MGMT）和内参基因（GAPDH）电泳条带的密度值，计算目的基因的相对表达量。

1.5 统计学分析

所有数据以 SPSS12.0 统计软件建立数据库，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组间比较使用 ANOVA 分析和 *Newman-Keuls* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BGSC 的体外培养及鉴定

原代培养 2~3 d 后，在培养液中出现大量悬浮生长的“胶质瘤干细胞球”，多由几个细胞集合而成，7 d 后出现一些由数十个细胞组成的“胶质瘤干细胞球”（图 1）。免疫细胞化学染色证明“胶质瘤干细胞球”内的细胞主要为 Nestin 阳性细胞（图 2），在血清诱导下细胞发生分化（图 3），分化的细胞可表达 GFAP 阳性（图 4）和 NSE 阳性（图 5），FCW 检测证明“胶质瘤干细胞球” 内的细胞几乎全部为 CD133 阳性细胞（99.79%）（图 6）。



图 1 悬浮生长的“胶质瘤干细胞球”（×40 倍）



图 2 血清诱导分化的胶质瘤干细胞（×200 倍）

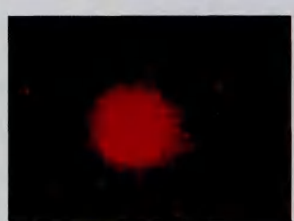


图 3 细胞集落内的细胞及迁移出来的细胞绝大多数为表达红色荧光的 Nestin 阳性细胞（×100 倍）

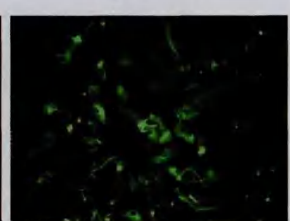


图 4 发生分化的 BGSC 呈 GFAP 阳性细胞（×200 倍）



图 5 发生分化的 BGSC 呈 NSE 阳性（×100 倍）

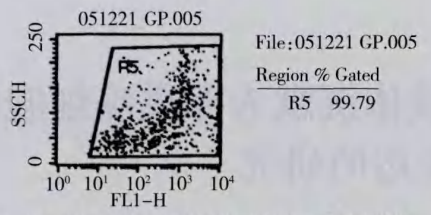
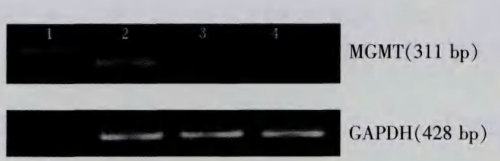


图 6 流式细胞仪检测表明“胶质瘤干细胞球”中的细胞 99.79%为 $CD133^+$ 细胞

2.2 MGMT mRNA 在 BGSC 中表达的 RT-PCR 分析

RT-PCR 检测结果表明 MGMT mRNA 在 BGSC 中的相对表达量明显高于胶质瘤细胞（0.562±0.021 vs 0.112±0.023，$P<0.01$），而胶质瘤细胞 MGMTmRNA 的相对表达量明显高于正常脑组织（0.112±0.023 vs 0.005±0.001，$P<0.01$）（图 7）。



1. Marker（100 bp）；2. 胶质瘤干细胞；3. 胶质瘤细胞；4. 正常脑组织细胞

图 7 在各种细胞中 MGMT mRNA 的表达

3 讨 论

脑胶质瘤严重威胁人类健康和生命，由于其呈浸润性生长，与周围正常脑组织无明显边界，现有的手术与放射治疗仅限于局部治疗，不能做到彻底全切，术后肿瘤极易复发。而化疗作为一种作用范围更广的治疗对进一步消灭残留肿瘤细胞起到至关重要作用。以替莫唑胺、尼莫司汀为代表的烷化剂因具有高脂溶性和易于通过血脑屏障的特点，被认为是治疗胶质瘤最有临床应用前景的化疗药物。但临床研究表明，胶质瘤的耐药性限制了上述药物的临床效果。最新的理论认为，胶质瘤内的细胞并非均质性，一部分具有干细胞特性的细胞是胶质瘤抵抗化疗的关键[3]。这些细胞具有自我更新、长期增殖和多向分化潜能的特性，表达神经干细胞的抗原标志如 CD133、Nestin 等，是胶质瘤的“种子”细胞。在本研究中 GSCs 来源于手术切除的多形性胶质母细胞瘤，经体外分离、培养收集，并通过观察 BGSC 的生物学行为，免疫细胞化学染色和流式细胞术验证。结果表明，所分离培养的细胞均有 Nestin 和 CD133 阳性表达，具有自我更新和多分化潜能，符合 BGSC 的基本特征[4]。

如何克服耐药，提高临床疗效，是胶质瘤治疗中亟待解决的问题。近年来的研究证明，胶质瘤可以表达多种耐药基因，在这些基因中 DNA 修复蛋白 O^6-MGMT 被认为是导致肿瘤细胞发生耐药的主要分子基础。MGMT 表达水平的高低可用于判断胶质瘤对烷化剂类化疗药物的敏感性，有助于在无法行体外药敏实验情况下的化疗药物选择[5]。由 MGMT 介导的耐药机制主要是：烷化剂类药物在体内分解后释放出的烷化基团可以造成 DNA 上鸟嘌呤第 6 位氧原子烷基化，而烷基化产物又可以与胸腺嘧啶共价结合，进而形成具有高度细胞毒性的 DNA 链间交联，影响 DNA 的复制和转录，杀伤肿瘤细胞。而 MGMT 能特异性地转移并接受 DNA 上鸟嘌呤第6位氧原子上的烷化基团，修复损伤的 DNA，从而导致肿瘤细胞对烷化剂类药物的耐药[6]。

研究证明胶质母细胞瘤内 MGMT 启动子是否甲基化对患者的预后具有重要意义。MGMT 启动子发生甲基化意味着患者对替莫唑胺等化疗药物更加敏感，在接受同样放疗和烷化剂化疗药物的治疗下，其生存时间明显长于 MGMT 未发生甲基化的患者[7]。尽管目前尚无研究明确地证明 MGMT 主导了 BGSC 的多药耐药性，但是我们实验结果初步证明在BGSC 中 MGMT 基因的表达明显高于胶质瘤细胞，而在正常脑组织细胞中几乎检测不到 MGMT 基因的表达。这些结果提示我们，在胶质瘤中 BGSC 是表达 MGMT 的主要细胞，这很可能就是 BGSC 抵抗多种烷化剂类化疗药物的主要分子机制。

胶质瘤干细胞的发现使我们对胶质瘤的认识进入了一个新的阶段，以胶质瘤干细胞为靶点的各种治疗是胶质瘤治疗领域的热点。在本研究中我们初步证实了 MGMT 基因主要在 BGSC 中而非在胶质瘤细胞中表达，这将为逆转胶质瘤耐药提供新的治疗靶点，为胶质瘤的治疗寻找新的有效解决途径。

参 考 文 献

[1] Lamszus K, Gunther H. Glioma stem cells as a target for treatment [J]. Target Oncol, 2010, 5(3): 211-215.

[2] Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, et al. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2009, 6(4): 219-227.

[3] Angelastro J, Lamé M. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(8): 1105-1115.

[4] Prestegarden L, Enger P. Cancer stem cells in the central nervous system-A critical review[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8255-8258.

[5] 许洪升，张俊英，岳伟英，等. 脑胶质瘤 MGMT 表达与体外药敏相关性及其临床表达意义[J]. 中国临床神经外科杂志，2007，12(5)：263-266.

[6] Yoshino A, Ogino A, Yachi K, et al. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas[J]. Int J Oncol, 2010, 36(6): 1367-1377.

[7] Rivera A, Pelloski C, Gilbert M, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(2): 116-121.

（责任编辑：冉明会）