doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.12.009

热休克蛋白90靶向抑制剂多肽P7联合替莫唑胺协同抗胶质母细胞瘤的作用*

薛瞳瞳,黄 薇,杨 楠,刘雁勇△

(中国医学科学院基础医学研究所·北京协和医学院基础学院药理学系,北京 100005)

摘要:目的 探讨双功能小分子多肽P7(序列LPLTPLP)联合替莫唑胺(TMZ)对人胶质母细胞瘤细胞系U87MG的影响。**方法** 以TMZ与P7单用或联用处理U87MG细胞,采用CCK－8法检测细胞活性,流式细胞术检测U87MG细胞凋亡水平,蛋白质免疫印迹法检测U87MG细胞凋亡相关蛋白水平。以溶剂作对照。**结果** TMZ和P7均能抑制U87MG细胞的生长,当P7与TMZ浓度比为1∶1时,协同作用最明显;与对照组比较,联合给药组的U87MG细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),cleaved caspase－9和cleaved caspase－3表达水平显著升高($P<0.05$)。**结论** P7联合TMZ能协同抑制U87MG细胞活力,并促进其凋亡,其机制可能与显著上调促凋亡蛋白cleaved caspase－9和cleaved caspase－3水平有关。

关键词:胶质母细胞瘤;U87MG细胞;热休克蛋白90;靶向抑制剂;多肽P7;细胞凋亡;协同作用;机制

中图分类号:R965;R979.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)12－0030－04

Synergistic Antitumor Effect of Heat Shock Protein 90 Targeting Inhibitor Polypeptide P7 Combined with Temozolomide on Glioblastoma

XUE Tongtong, HUANG Wei, YANG Nan, LIU Yanyong

(*Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS · School of Basic Medicine PUMC, Beijing, China 100005*)

Abstract: Objective To investigate the effect of bifunctional polypeptide P7(LPLTPLP) combined with temozolomide(TMZ) on the human glioblastoma cell line U87MG *in vitro*. **Methods** U87MG cells were treated with TMZ and P7 alone or in combination, and the cell viability was detected by CCK－8 assay. The apoptosis level of U87MG cells was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis－related proteins was detected by western blot. The solvent was used as the control group. **Results** Both TMZ and P7 could inhibit the growth of U87MG cells. When the concentration ratio of P7 to TMZ was 1∶1, the synergistic effect was the most obvious. Compared with those in the control group, the apoptosis rate in the combined group was significantly increased($P<0.01$), and the expression levels of cleaved caspase－9 and cleaved caspase－3 in the combined group were significantly increased($P<0.05$). **Conclusion** P7 combined with TMZ can synergistically inhibit the survival of U87MG cells and promote their apoptosis, which may be related to the up－regulation of pro－apoptotic protein(cleaved caspase－9 and cleaved caspase－3) levels.

Key words: glioblastoma; U87MG cells; heat shock protein 90; targeted inhibitors; polypeptide P7; cell apoptosis; synergistic effect; mechanism

胶质母细胞瘤(GBM)是常见的中枢神经系统恶性原发性肿瘤[1],其中位生存期仅5个月,5年生存率仅5%。在世界卫生组织对脑胶质瘤的分级中,GBM被评为Ⅳ级,恶性程度最高,复发率极高,预后极差。替莫唑胺(TMZ)为烷基化药物,是目前治疗GBM的首选药物[2],作用机制为通过释放活性烷基化物质造成DNA甲基化,从而杀伤肿瘤细胞,疗效显著,但复发性耐药是限制其中长期疗效的一大阻碍[3]。热休克蛋白90(Hsp90)是重要的原癌信号交汇点[4],在肿瘤组织中表达水平较正常组织高2~10倍。Hsp90参与维持400多种客户蛋白的正常折叠和构象稳定,可促进肿瘤细胞生长和抑制细胞凋亡[5]。多项研究显示,Hsp90抑制剂与抗肿瘤药物联用能发挥协同抗肿瘤作用[6-7]。课题组前期通过噬菌体展示技术成功筛选出一种具备完全自主知识产权的多肽P7(序列LPLTPLP),P7能特异性地识别并结合肿瘤细胞表面及细胞内的Hsp90,并促进Hsp90的降解[8]。为此,本研究中探讨了P7与TMZ联合给药提高GBM治疗敏感性的效果及相关机制,为靶向化学药联用治疗GBM提供了新的研究思路。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

仪器:F50型酶标仪(上海三科仪器有限公司);Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司);DYY－7C型电泳仪(北京市六一仪器厂);Tanon 5800型化学发光成像仪(上海天能公司)。

试药:TMZ(上海陶素生化科技有限公司,规格为

*基金项目:国家自然科学基金[81972688];国家科技重大专项[2019ZX09301170];北京市自然科学基金[7192128,7172134]。

第一作者:薛瞳瞳,女,硕士研究生,研究方向为肿瘤药理学,(电子信箱)291807090@qq.com。

△通信作者:刘雁勇,男,教授,研究方向为神经肿瘤药理学,(电子信箱)yanyongliu@ibms.pumc.edu.cn。

25 mg，纯度为 99.00%，CAS 号为 85622－93－1）；多肽 P7（上海吉尔生化公司）；凋亡检测试剂盒（上海东仁化学科技有限公司）；cleaved caspase－3 抗体、cleaved caspase－9 抗体（Cell Signaling Technology 公司）。人脑星形胶质母细胞瘤细胞系 U87MG（中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心）。MEM－EBSS 培养基（迈晨科技有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

U87MG 在 5% CO_2、温度 37 ℃条件下，置含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸和 1% 青链霉素双抗的 MEM－EBSS 培养基中培养。

1.2.2 细胞活性检测

采用 CCK－8 法检测细胞活性。以每孔 3 000 个的密度接种 U87MG 细胞于 96 孔板中，过夜贴壁后分组给药。TMZ 组：0～1 mmol/L 共设 8 个浓度梯度；P7 组：0～500 μmol/L 共设 8 个浓度梯度；联合给药组：10，50，100 μmol/L 的 P7 分别与 7 个不同浓度梯度的 TMZ（0～1 mmol/L）以固定浓度比例（1∶1，1∶2，2∶1）联用。加药处理培养 72 h 后，加入 CCK－8 试剂，37 ℃避光孵育 1.5 h，以酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度，并计算存活率。

1.2.3 细胞凋亡检测

以流式细胞检测仪检测 U87MG 细胞凋亡情况。以每孔 10^6 个的密度接种 U87MG 细胞于 10 cm 培养皿中，过夜贴壁后分组给药。对照组：仅予溶剂；P7 组：100 μmol/L；TMZ 组：400 μmol/L；联合给药组：P7 100 μmol/L＋TMZ 400 μmol/L。继续培养 48 h，收集细胞，采用凋亡检测试剂盒进行 Annexin Ⅴ和 PI 染色，样品处理完毕后，1 h 内用流式细胞仪检测，并计算凋亡率。

1.2.4 蛋白定量分析

采用蛋白质免疫印迹法检测凋亡标志物 cleaved caspase－3 和 cleaved caspase－9 的表达水平。细胞接种及分组给药同 1.2.3 项，收集细胞进行细胞裂解和蛋白提取，采用 western blot 法检测对 U87MG 细胞凋亡相关蛋白的影响，使用 Gel－Pro 分析软件对蛋白条带定量分析，目的条带和内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

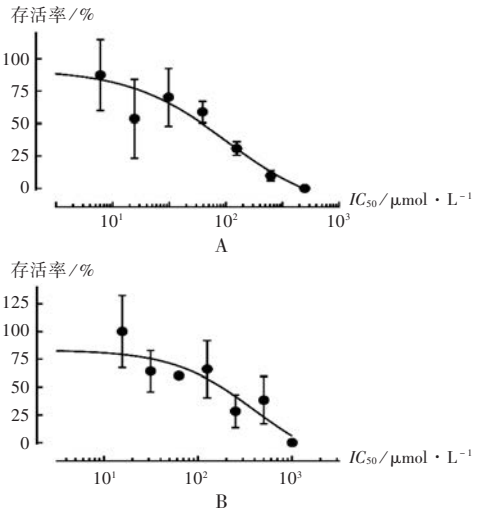
1.3 统计学处理

采用 Graghpad Prism 8.3 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单用对 U87MG 细胞存活率的影响

结果见图 1。P7 和 TMZ 均能抑制 U87MG 细胞的生长，IC_{50} 值分别为（397.12 ± 21.93）μmol/L 和（102.82 ± 11.72）μmol/L。

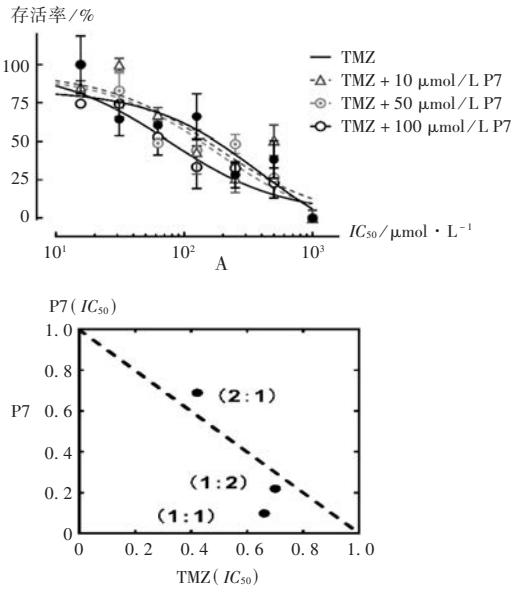


A. P7　B. TMZ

图 1　P7 与 TMZ 单用对 U87MG 细胞存活率的影响

A. P7　B. TMZ

Fig. 1　Effect of P7 or TMZ alone on the survival rate of U87MG cells



A. 生存曲线　B. TMZ 等效图

图 2　P7 和 TMZ 联用对 U87MG 细胞存活率的影响

A. Survival profile　B. TMZ equivalent diagram

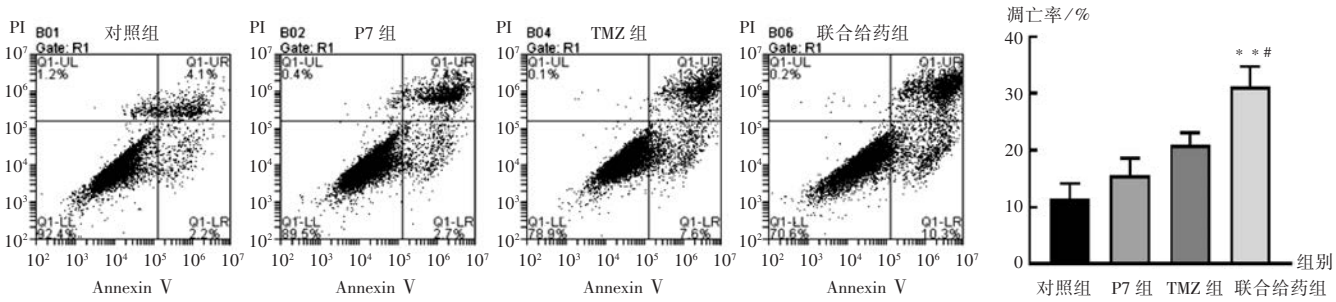
Fig. 2　Effect of P7 combined with TMZ on the survival rate of U87MG cells

2.2 联合用药对 U87MG 细胞存活率的影响

结果见图 2。联用 P7 后，原 TMZ 生存曲线出现明显左移，即 IC_{50} 值明显降低（图 2 A）。当 P7 与 TMZ 浓度比为 1∶1 和 1∶2 时，位于等效线下方，表明具有协同作用，且浓度比为 1∶1 时的协同作用最明显（图 2 B）。

2.3 联合用药对 U87MG 细胞凋亡率的影响

结果见图 3。P7 与 TMZ 单独给药后，U87MG 细胞凋亡比例略有上升，总凋亡率分别为 15.74% 和 21.01%，但与对照组相比无显著差异（$P > 0.05$）。



A. 流式细胞凋亡图 B. 数据统计

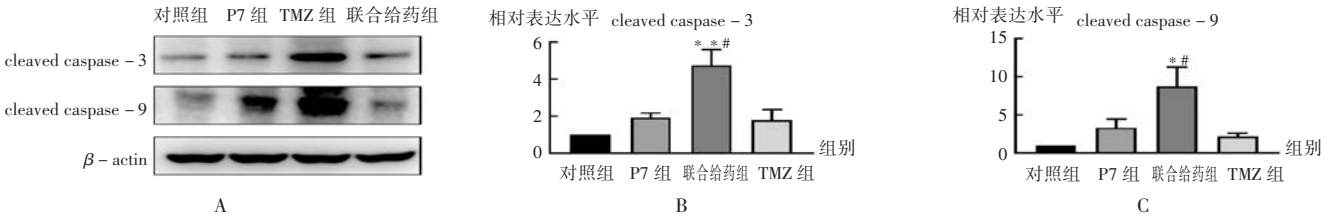
图3 P7与TMZ联用对U87MG细胞凋亡率的影响

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与P7组比较，$^{\#}P<0.05$。图4同。

A. Flow cytometry B. Data statistics

Note: Compared with those in the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with those in the P7 group, $^{\#}P<0.05$; as well as Fig. 4.

Fig. 3 Effect of P7 combined with TMZ on apoptosis rate of U87MG cells



A. 蛋白条带 B，C. 数据统计

图4 P7和TMZ联用U87MG细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

A. Protein band B, C. Data statistics

Fig. 3 Effect of P7 combined with TMZ on the expression of apoptosis－related proteins in U87MG cells

联合给药组的细胞总凋亡率与对照组相比显著升高（$P=0.005\ 6<0.05$）。表明联合给药组诱导细胞凋亡更显著。

2.4 联合用药对U87MG细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较，单药组cleaved caspase－3和cleaved caspase－9相对表达水平均略升高，联合给药组均显著升高（$P=0.004\ 5$，0.020），且均显著高于P7单药组（$P=0.021$，$P=0.045$）。详见图4。

3 讨论

目前，GBM的临床治疗“金标准”是手术切除后放射治疗联合替莫唑胺治疗[9－10]。与第1代抗GBM药物（如卡莫司汀）相比，尽管TMZ能显著改善肺纤维化和骨髓抑制等问题，但O6－甲基鸟嘌呤－DNA甲基转移酶（MGMT）阳性的GBM患者对TMZ响应极差[3]，长期服用易产生耐药，影响药效[11]。近年来，分子靶向治疗成为研究热点，但针对GBM的靶向治疗药物厄洛替尼和吉非替尼的临床获益却十分有限，其临床失败的原因是部分GBM存在表皮生长因子受体（EGFR）的突变和PTEN基因缺失[12]。Hsp90是一种重要的肿瘤治疗标志物，抑制Hsp90会造成多种肿瘤相关的Hsp90客户蛋白失活[4]，从而对多条肿瘤相关信号通路产生抑制作用[13]。与其他单靶点药物相比，Hsp90抑制剂在一定程度上避免了信号通路代偿问题，可降低复发率[14]。TACAEI等[15]研究发现，17－AAG，17－DMAG，AUY922等Hsp90抑制剂对多种肿瘤细胞具有明显抑制效果，与化疗药物联用能显著提高化疗药物的敏感性，并降低其副作用[13]。

当凋亡信号产生后，pro－caspase 9与Apaf－1结合，并促进pro－caspase 9被剪切生成cleaved caspase－9；活化的caspase－9进而促进生成cleaved caspase－3，启动caspase级联激活[16]。本研究中发现，P7与TMZ联用对U87MG细胞具有协同抑制作用并能显著上调cleaved caspase－9和cleaved caspase－3的表达水平，显著升高凋亡率，说明多肽P7和TMZ的协同抑制作用与促进细胞凋亡有关。

综上所述，多肽P7和化疗药物TMZ联用有协同增效作用，能抑制U87MG细胞存活，这与激活caspase级联凋亡通路，诱导细胞发生凋亡有关。本研究为改善TMZ对GBM的治疗效果提供了新的研究思路。

参考文献

[1] CAMPOS B, OLSEN LR, URUP T, et al. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma[J]. Oncogene, 2016, 35(45): 5819－5825.

[2] KARACHI A, DASTMALCHI F, MITCHELL DA, et al. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2018, 20(12): 1566－1572.