

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.003

· 基础研究 ·

FHL2 通过 MGMT 影响胶质母细胞瘤 U87 细胞对替莫唑胺的耐药性

陈丽莉^a, 代晶^b, 郑彦文^a, 李明^a (苏州大学附属第二医院 a. 实验中心; b. 药学部, 江苏 苏州 215000)

[摘要] **目的:** 探讨干扰四个半 LIM 结构域蛋白 2 (FHL2) 的表达对胶质母细胞瘤 U87 细胞中 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (MGMT) 表达的影响, 以及对 U87 细胞替莫唑胺 (TMZ) 耐药性的影响。 **方法:** 利用慢病毒感染技术分别将携带不同 FHL2 干扰序列的慢病毒 (shFHL2-1#, shFHL2-4#) 及其阴性对照 (shN) 感染 U87 细胞, 分别命名为 shFHL2-1#, shFHL2-4# 和 shN 组; 采用 siRNA 转染技术将 siMGMT-1#, siMGMT-4# 和 siN 转染至 U87 细胞, 为 siMGMT-1#, siMGMT-4# 和 siN 组, qPCR 和 WB 法验证 FHL2 或 MGMT 的敲低效果。用 TMZ 处理上述各组细胞 (以 DMSO 处理组为对照), 随后以 CCK-8 法和细胞克隆形成实验检测 TMZ 处理前后 FHL2 或 MGMT 敲低组细胞的增殖情况, FCM 检测 TMZ 处理前后 FHL2 敲低组细胞的凋亡情况, WB 法和免疫荧光法检测敲低 FHL2 对 U87 细胞中 MGMT 表达的影响, WB 法检测 TMZ 处理对各组细胞中 FHL2 和 MGMT 表达水平的影响。 **结果:** 成功构建敲低 FHL2 或 MGMT 表达的 U87 细胞。与 shN 组相比, shFHL2-1#, shFHL2-4# 组 U87 细胞的增殖能力减弱、凋亡水平升高 (均 $P < 0.01$), MGMT 表达水平明显降低 (均 $P < 0.01$)。经 TMZ 处理后, 与相应的 DMSO 处理组相比, shN 组细胞中 FHL2 和 MGMT 的表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$), 而细胞的增殖和凋亡均无显著变化 (均 $P > 0.05$); shFHL2-1#, shFHL2-4# 组细胞中 FHL2 和 MGMT 的表达水平无显著改变 (均 $P > 0.05$), 但细胞增殖能力进一步显著降低、凋亡水平进一步显著升高 (均 $P < 0.01$)。敲低 MGMT 使 U87 细胞增殖减慢 ($P < 0.01$), 而 siMGMT-1#, siMGMT-4# 组细胞经 TMZ 处理后增殖能力进一步降低 (均 $P < 0.01$)。 **结论:** 干扰 FHL2 表达使得 U87 细胞增殖减慢而凋亡加剧、MGMT 表达下调, 提示 FHL2 可能通过影响 MGMT 的表达调控 U87 细胞对 TMZ 的耐药性。

[关键词] 胶质母细胞瘤; U87 细胞; 四个半 LIM 结构域蛋白 2; 替莫唑胺; 耐药性; O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
[中图分类号] R739.41; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)01-0020-09

FHL2 affects the resistance of glioblastoma U87 cells against temozolomide via MGMT

CHEN Lili^a, DAI Jing^b, ZHENG Yanwen^a, LI Ming^a (a. Central Laboratory; b. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of interfering the expression of four and a half LIM-only protein 2 (FHL2) on the expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and temozolomide (TMZ) resistance of glioblastoma U87 cells. **Methods:** Lentiviruses carrying different sequences of FHL2 interference sequences (shFHL2-1#, shFHL2-4#) and negative control (shN) were infected into U87 cells, namely shFHL2-1# group, shFHL2-4# group, and shN group, respectively. siMGMT-1#, siMGMT-4#, and siN were transfected into U87 cells by siRNA transfection technology, namely siMGMT-1# group, siMGMT-4# group, and siN group, respectively. The FHL2 or MGMT knockdown efficiency was verified by qPCR and WB. The above groups of cells were treated with TMZ (the DMSO treatment group was used as the control), and then the proliferation of cells with FHL2 or MGMT knockdown before and after TMZ treatment was detected by CCK-8 method and cell clone formation assay, the apoptosis of cells in FHL2 knockdown group before and after TMZ treatment was detected by flow cytometry. WB method and immunofluorescence method was used to detect the effect of FHL2 knockdown on the expression of MGMT in U87 cells. WB method was used to detect the effect of TMZ treatment on the expression levels of FHL2 and MGMT in each group of cells. **Results:** Glioblastoma U87 cells with FHL2 or MGMT knockdown were successfully constructed. Compared with the shN group, the proliferation ability in cells of shFHL2-1# or shFHL2-4# group was significantly reduced while the apoptosis rate was significantly elevated (all $P < 0.01$), and the expression of MGMT were significantly reduced (all $P < 0.01$). After TMZ treatment, the expression levels of FHL2 and MGMT in the shN group were significantly increased (both $P < 0.05$), while the proliferation and apoptosis of the cells were not significantly changed (all $P > 0.05$)

[基金项目] 苏州市科技发展计划项目 (No. SKJY2021091)

[作者简介] 陈丽莉 (1991—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事胶质瘤耐药机制相关的基础研究, E-mail: lilichen0418@163.com

[通信作者] 李明, E-mail: m2liva@hotmail.com

compared with the corresponding DMSO treatment group. The expression levels of FHL2 and MGMT in the cells of shFHL2-1# and shFHL2-4# groups did not change significantly (all $P>0.05$), but the cell proliferation capacity was significantly reduced, and the apoptosis level was significantly increased (all $P<0.01$). Knockdown of MGMT slowed down the proliferation of U87 cells in shN group ($P<0.01$), while the proliferation capacity of cells of siMGMT-1# and siMGMT-4# groups was further reduced after TMZ treatment (all $P<0.01$). **Conclusion:** Interfering with FHL2 expression weakened the proliferation ability of U87 cells and increased the apoptosis rate, and downregulated the expression of MGMT, suggesting that FHL2 may regulate the resistance of U87 cells to TMZ by affecting the expression of MGMT.

[Key words] glioblastoma (GBM); U87 cell; four and a half LIM-only protein 2 (FHL2); temozolomide (TMZ); resistance; O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(1): 20-27. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.003]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的原发性中枢神经系统恶性肿瘤,约占所有颅内肿瘤的40%。目前,用于临床神经胶质瘤化学疗法的第一线药物是替莫唑胺(temozolomide, TMZ),其是一种口服烷基类化疗药物,可以有效地穿过血脑屏障到达病变部位。研究^[1]表明,用TMZ治疗人脑胶质瘤的有效率约为45%,易导致胶质瘤细胞产生耐药性且预后差,改善TMZ的耐药性对GBM的治疗至关重要。四个半LIM结构域蛋白2(four and a half LIM-only protein 2, FHL2)是FHL家族的重要成员,广泛参与多种肿瘤的发生发展过程。本课题组曾报道FHL2是一个新发现的胶质瘤致癌基因^[2]。O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)是一种DNA修复蛋白,能够移除DNA鸟嘌呤O⁶位点上具有细胞毒性的烷基加合物,保护细胞对抗TMZ等烷化剂的损害,减弱TMZ的抗肿瘤效应。作为与FHL2相关的一种蛋白,MGMT目前被认为是胶质瘤细胞对TMZ耐药的关键蛋白之一;MGMT表达阳性的肿瘤细胞比MGMT表达阴性者对TMZ耐药性更强^[3]。本研究以恶性程度最高的GBM细胞U87细胞系为研究对象,通过敲低FHL2的表达观察FHL2对U87细胞TMZ耐药性及MGMT表达的影响,探讨FHL2与GBM细胞TMZ耐药性之间的关系,为揭示FHL2在GBM治疗中的作用及其机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人GBM细胞U87购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自BI公司,BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液和Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)均购自碧云天生物技术有限公司,SDS-PAGE凝胶试剂购自上海雅酶公司,逆转录试剂和qPCR试剂购自南京诺唯赞公司,引物购自上海生工公司,鼠抗人FHL2单克隆抗体、鼠抗人MGMT单克隆抗体购自SantaCruz

公司,鼠抗人 β -actin单克隆抗体购自Proteintech公司,HRP标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG二抗均购自Abcam公司,CCK-8法实验、细胞凋亡检测试剂盒均购自江苏凯基公司,LipofectamineTM 3000购自Invitrogen公司,敲低FHL2所用病毒液、敲低MGMT所用siRNA均购自上海吉玛公司。shFHL2-1#序列:5'-GAGACTTTCTTCTAGTGCTTTC-3', shFHL2-4#序列:5'-CGAATCTCTCTTTGGCAAGAAC-3', shN序列:5'-CAAGCTGACCCTGAAGTTCAT-3', siMGMT-1#序列:5'-GGUUGUGAAAUUCGGAGATTUUCUCCGAAUUUCACAACCTT-3', siMGMT-4#序列:5'-AUGGCUUCUGGCCCAUGAATTUUCUUGGCCAGAAGCAUTT-3', siN序列:5'-UUCUCGGAACGUGUCACGUTTACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.2 细胞培养、感染和转染

U87细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。感染前一天按照 2×10^5 个/孔接种于6孔板,将shN/shFHL2-1#/shFHL2-4#组病毒液加入U87细胞中,感染细胞12h后换液继续培养48h,然后加入嘌呤霉素(5 μ g/mL)筛选感染后的细胞,将其分别命名为shN、shFHL2-1#、shFHL2-4#组。培养过程中加入嘌呤霉素(2 μ g/mL)维持感染细胞的基因稳定。

siMGMT转染:根据LipofectamineTM 3000转染试剂手册进行操作,已接种U87细胞的每孔加入用2 μ g siRNA和3 μ L LipofectamineTM 3000转染试剂,将其分为siMGMT-1#、siMGMT-4#和siN组。转染12h后换液,继续培养24h,收集细胞进行下一步实验。

1.3 qPCR法检测转染后细胞中FHL2和MGMT mRNA的表达

收集转染后各组细胞,用TRIzol裂解细胞,提取总RNA并逆转录为cDNA,然后进行qPCR实验。qPCR反应条件:95℃预变性5min;95℃变性10s,60℃退火和延伸30s,共40个循环。以 β -actin为内参照,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算各目的基因mRNA的相对表

定量。

1.4 WB法检测转染后细胞中FHL2和MGMT蛋白的表达

收集转染后各组细胞, PBS清洗后, 使用RIPA裂解液裂解细胞提取总蛋白, 并用BCA法测定总蛋白浓度。取30 μg 蛋白样品进行SDS-PAGE, 将蛋白质转移至PVDF膜上, 在5%牛血清白蛋白中封闭2 h; 然后加入鼠抗人FHL2抗体(1:500)、鼠抗人MGMT抗体(1:400)、鼠抗人 β -actin抗体(1:2 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; 次日, TBST洗涤3次(5 min/次), 加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:3 000), 室温反应1.5 h, TBST洗涤, 最后通过凝胶成像仪记录蛋白条带增强型化学发光(ECL)结果, 采用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 CCK-8法和细胞克隆形成实验检测细胞的增殖能力

将转染后各组细胞用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 然后按照 2×10^3 个/孔接种于96孔板中, 培养箱中培养2 h待其贴壁后, 加入DMSO或不同浓度的TMZ(10、100、200 $\mu\text{mol/L}$), 每24 h更换培养基(含DMSO或TMZ)。每组设5个复孔, 每孔100 μL 培养基, 分别在0、24、48 h时加入10 μL CCK-8试剂, 2 h后用酶标仪检测在450 nm波长处每孔的光密度(D)值, 以D值代表细胞增殖水平。

对于细胞克隆形成实验, 将各组细胞按照 1×10^3 个/孔接种于6孔板中, 加入DMSO或100 $\mu\text{mol/L}$ TMZ处理细胞, 每组设3个复孔。每3 d观察细胞状态并换液, 共培养14 d后, 用PBS清洗细胞, 4%多聚甲醛固定, 然后加入结晶紫染液染色30 min, 计数含有50个以上细胞的克隆。

1.6 FCM检测细胞的凋亡

将转染后各组细胞接种于6孔板中, 加入DMSO或TMZ(100 $\mu\text{mol/L}$)后继续培养48 h, 收集细胞, PBS清洗后, 利用PE Annexin V细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况: 用500 μL 结合缓冲液悬浮细胞, 加入5 μL PE和5 μL 7-AAD, 混匀, 室温下避光处理10 min, 1 h内上FCM检测, 其中PE⁺7-AAD⁻的细胞代表早期凋亡细胞群, PE⁺7-AAD⁺的细胞代表晚期凋亡细胞群。

1.7 免疫荧光法检测细胞中MGMT的表达

将转染后各组细胞接种于共聚焦小皿(20 mm)中, 培养24 h后, 用4%多聚甲醛固定20 min, 用0.2% Triton-X 100在4 $^{\circ}\text{C}$ 放置10 min, 然后用2% BSA封闭30 min, 加入鼠抗人MGMT抗体(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日加入Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗(1:1 000), 避光反应30 min, 然后加入DAPI染液(1:1 000)避光反应3 min。利用激光共聚焦显微镜(Zeiss公司, 型号:LSM800)采集图像。

1.8 统计学处理

所有实验均重复3次。采用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计分析, 正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建敲低FHL2表达的U87细胞

WB法和qPCR法检测结果(图1)显示, 与shN组相比, shFHL2-1#、shFHL2-4#组细胞中FHL2的蛋白和mRNA表达水平均显著下降(均 $P < 0.01$)。结果表明, 通过病毒感染特异性shRNA, 成功构建敲低FHL2表达的U87细胞, 可以进行后续实验。

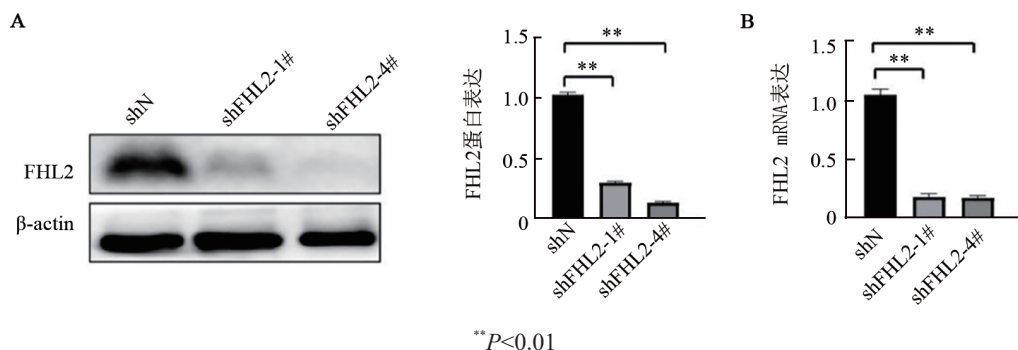


图1 慢病毒感染后各组U87细胞中FHL2的蛋白(A)和mRNA(B)表达水平

2.2 敲低FHL2表达降低U87细胞对TMZ的耐药性

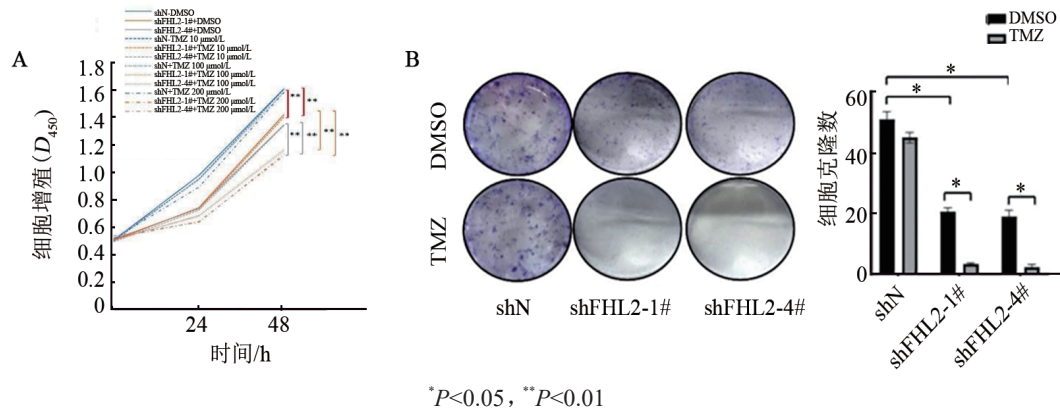
CCK-8实验结果(图2A)显示, shFHL2-1#、shFHL2-4#组细胞增殖能力显著低于shN组($P < 0.01$)。加入不同浓度的TMZ后, shN组细胞增殖能力并

没有明显变化($P > 0.05$), 但shFHL2-1#、shFHL2-4#组细胞的增殖能力随着TMZ浓度增加而逐渐降低。在加入10 $\mu\text{mol/L}$ TMZ处理后, 各组细胞的增殖与相应对照组相比无显著差异($P > 0.05$), 而100 $\mu\text{mol/L}$ 和

200 μmol/L TMZ 处理后 shFHL2-1#、shFHL2-4# 组细胞增殖显著减慢 (均 $P < 0.01$)。参考文献[4-5]数据, 选择 100 μmol/L TMZ 进行下一步的检测。

细胞克隆形成实验 (图 2B) 结果显示, 与 CCK-8 实验结果一致, shFHL2-1#、shFHL2-4# 组克隆数较对

照组显著减少 (均 $P < 0.05$); 加入 TMZ (100 μmol/L) 处理后, shN 组细胞克隆数没有发生显著改变 ($P > 0.05$), 而 shFHL2-1#、shFHL2-4# 组细胞克隆数较相应的 DMSO 处理组显著减少 (均 $P < 0.05$)。



A: 通过 CCK-8 法检测 10、100、200 μmol/L TMZ 处理前后 shN、shFHL2-1#、shFHL2-4# 组 U87 细胞的增殖情况;
B: 通过细胞克隆形成实验检测 TMZ 处理前后 shN、shFHL2-1#、shFHL2-4# 组 U87 细胞的克隆形成能力

图 2 敲减 FHL2 表达及 TMZ 处理对 U87 细胞增殖的影响

FCM 检测结果 (图 3) 显示, 敲低 FHL2 促进 U87 细胞的早期凋亡和晚期凋亡, 相较于 shN 组, shFHL2-1#、shFHL2-4# 组细胞早期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), shFHL2-1# 组细胞晚期凋亡率增加 ($P < 0.01$), shFHL2-4# 组细胞晚期凋亡没有明显变化 ($P > 0.05$); TMZ 处理对 shN 组细胞的早期和晚期凋亡均无显著

影响 (均 $P > 0.05$), 而经 TMZ 处理后, shFHL2-1#、shFHL2-4# 组细胞早期凋亡率增加 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), shFHL2-1# 组细胞的晚期凋亡没有显著变化 ($P > 0.05$), shFHL2-4# 组的晚期凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。

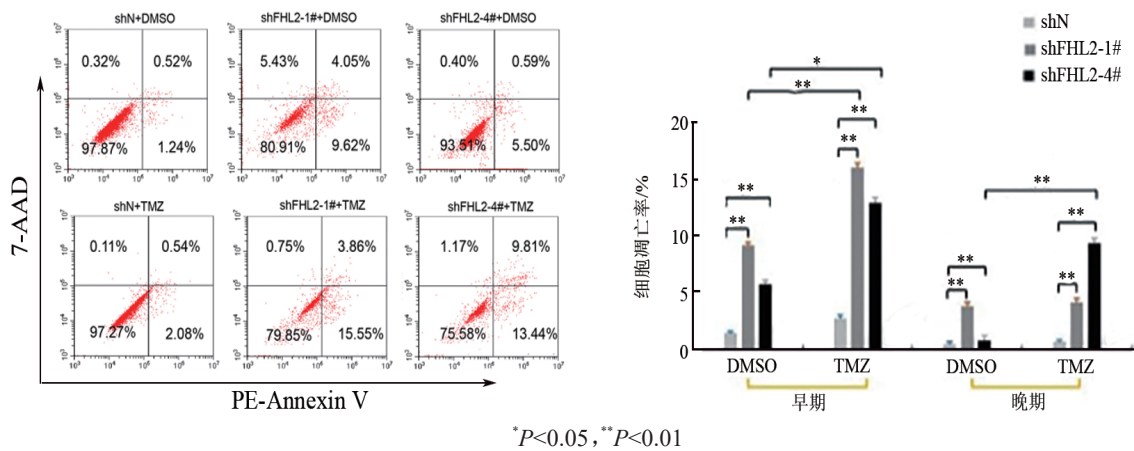


图 3 干扰 FHL2 表达对 U87 细胞凋亡的影响

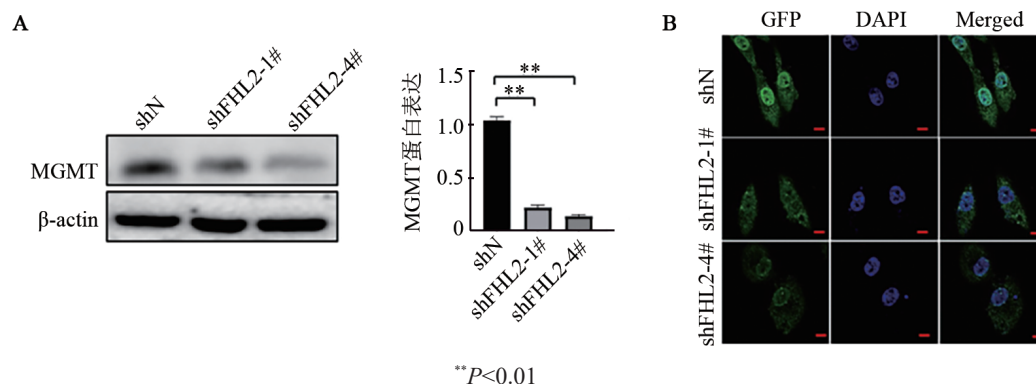
以上结果表明, 敲减 FHL2 的表达后, U87 细胞的增殖能力明显受到抑制; 而加入 TMZ 后, shN 组细胞呈现出对 TMZ 细胞毒作用的抵抗性, 表明 U87 细胞是一个耐药性细胞; 但敲减 FHL2 的 U87 细胞对 TMZ 耐药性急剧下降, 增殖能力明显减慢, 同时凋亡细胞率增加。因此推测, FHL2 参与调控 U87 细胞对 TMZ 的耐药性。

2.3 敲减 FHL2 抑制 MGMT 的表达

本研究通过分析 Rembrandt 数据库中相关资料发现, 在 356 例 GBM 患者的胶质瘤组织中 FHL2 与 MGMT 具有较好的正相关性 ($R = 0.342$), 其中 254 例接受化疗的患者肿瘤组织中 FHL2 与 MGMT 相关性更高 ($R = 0.355$)。因此, 本研究进一步检测敲降 FHL2 对 U87 细胞中 MGMT 表达的影响。

WB 实验结果(图 4A)显示,U87 细胞中 FHL2 敲低后 DNA 损伤修复蛋白 MGMT 的表达水平显著降低 ($P<0.01$);免疫荧光实验(图 4B)显示了同样的结果:

相较于 shN 组细胞,在 shFHL2-1#、shFHL2-4#组细胞中 MGMT 的荧光明显减弱。以上结果表明,在 U87 细胞中,FHL2 能够调控 MGMT 的表达。



A: WB 法检测 shN、shFHL2-1#和 shFHL2-4#组 U87 细胞中 MGMT 的蛋白表达水平;
B:免疫荧光法检测 shN、shFHL2-1#和 shFHL2-4#组 U87 细胞中 MGMT 的荧光强度($\times 400$,标尺=20 μm)

图 4 干扰 FHL2 表达下调 U87 细胞中 MGMT 蛋白的表达

进一步检测 TMZ 刺激条件下 FHL2 和 MGMT 的表达变化。WB 实验结果(图 5)显示,TMZ 刺激后,细胞中 FHL2 的表达水平上升 ($P<0.05$),同时 MGMT 的表达水平也升高 ($P<0.05$);敲低 FHL2 后,TMZ 刺激对 FHL2 和 MGMT 的表达没有显著的影响 ($P>0.05$)。

这些结果表明 TMZ 诱导 FHL2 和 MGMT 的表达上调,且 MGMT 的表达依赖于 FHL2。据此推测,降低 FHL2 表达抑制 TMZ 的耐药性可能与 MGMT 的表达有关。

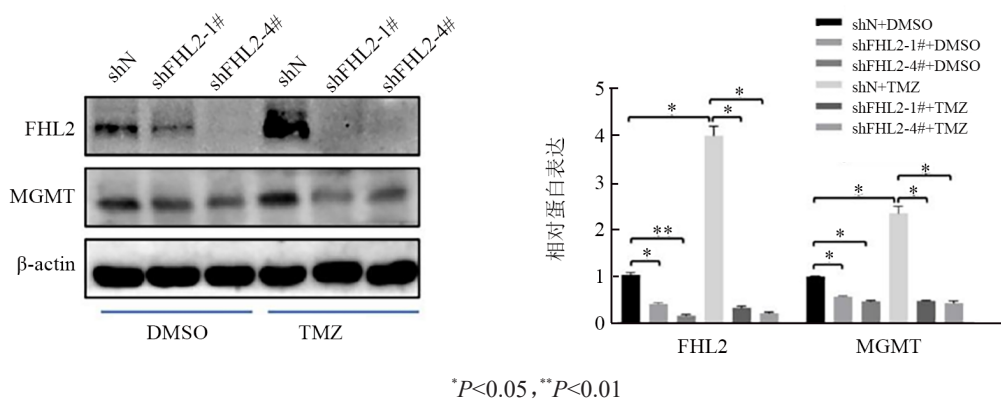


图 5 TMZ 刺激对 U87 细胞中 FHL2 与 MGMT 表达的影响

2.4 干扰 MGMT 的表达降低细胞对 TMZ 的耐药性

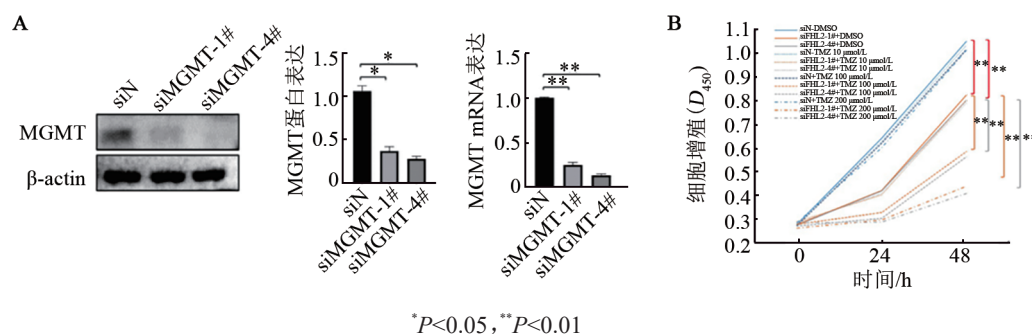
WB 法和 qPCR 法检测结果(图 6A)显示,转染 siMGMT-1#、siMGMT-4#敲低了 U87 细胞中 MGMT 的蛋白和 mRNA 水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。CCK-8 法检测结果(图 6B)显示,siMGMT-1#、siMGMT-4#组细胞增殖能力显著低于 siN 组(均 $P<0.01$);而加入不同浓度的 TMZ 后,siN 组细胞增殖并没有明显变化 ($P>0.05$),但 siMGMT-1#、siMGMT-4#组细胞的增殖随着 TMZ 浓度增加逐渐减慢 ($P<0.01$),这一结果表明降低 MGMT 的表达抑制 U87 细胞对 TMZ 的耐药性。

3 讨论

FHL2 是 FHL 家族中被研究得最为深入的成员,在人横纹肌肉瘤细胞中作为下调基因被首次发现^[6]。FHL2 在鳞状细胞癌、黑色素瘤、子宫颈癌、结肠癌、肺癌等多种癌细胞中均表达上调^[7-9]。近年来,越来越多的研究发现 FHL2 对不同肿瘤发挥了促进或抑制作用,但关于其与肿瘤耐药性的关系尚不清楚。基于 GBM 治疗中易产生耐药的困难,本课题组将注意力转向了 TMZ 耐药性的改善上。本研究发现,敲低 U87 细胞中 FHL2 的表达能够降低 GBM 细胞对

TMZ 耐药性, 这表明 FHL2 在 TMZ 的耐药性中起着至关重要的作用。本研究通过 CCK-8、WB 等实验发

现, 干扰 FHL2 抑制细胞对 TMZ 的耐药性, 可能与 MGMT 的表达有关。



A: WB法和qPCR法分别检测转染siN、siMGMT-1#和siMGMT-4#对U87细胞中MGMT的蛋白和mRNA表达的影响;

B: CCK-8法检测siN、siMGMT-1#和siMGMT-4#组细胞的增殖情况

图6 敲低MGMT表达对U87细胞增殖的影响

目前研究认为, TMZ 耐药是 MGMT、错配修复、碱基切除修复等 DNA 损伤修复系统及自噬、肿瘤干细胞等共同作用的结果^[10-11]。其中 MGMT 与 TMZ 耐药性引起了越来越多学者的关注, MGMT 的表达与高级别脑胶质瘤细胞 TMZ 耐药性密切相关^[12]。HEGI 等^[13]研究结果表明, 降低 MGMT 活性表达能够提高 TMZ 的抗肿瘤作用, 延长患者生存期; KATO 等^[14]发现, 在人 GBM 细胞中敲低 MGMT 会增加 TMZ 对于肿瘤细胞的杀伤作用。这些研究均表明, MGMT 的表达水平对胶质瘤中 TMZ 治疗至关重要。KATO 等^[15]发现, 在体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞中, 用高于 50 μg/mL 的 TMZ 处理后会诱导 MGMT mRNA 表达升高, 同时影响细胞耐药性。本研究在 U87 细胞中敲低了 MGMT 的表达, 发现细胞的增殖受到抑制; 而加入 TMZ 后, siMGMT 组细胞的耐药性显著减弱(图 6), 这与其他的 research 结果一致。TMZ 引起对照组细胞 MGMT 表达增强(图 5), 可能是细胞表现出对 TMZ 强烈耐药性的原因之一。

FHL2 影响 TMZ 耐药性的机制目前尚不清楚。FHL2 是细胞内信号转导途径的关键调节因子, 能与 50 多种蛋白相互作用, 参与转录因子的相互作用和调控。研究^[16]发现, FHL2 可与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 结合而介导 NF-κB 信号通路的激活。NF-κB 通路在 MGMT 和 TMZ 耐药性方面也起着重要的调控作用。研究发现, NF-κB 通路参与介导 MGMT 的转录, 进而调控胶质瘤细胞的 TMZ 耐药^[17-19]; NF-κB 激酶亚基 ε 抑制剂(inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon, IKBKE)是肿瘤中的主要致癌蛋白, 能够通过激活 AKT/NF-κB 信号通路上调 MGMT 的表达, 增强 GBM 细胞对 TMZ 的耐药性^[20]。此外, 人 MGMT 基因的启动子含有两个特定的激活

蛋白(activator protein, AP)位点, AP-1 参与了 MGMT 表达的调节。在小鼠胚胎癌细胞中, AP-1 与 MGMT 启动子的两个靶序列结合, 并与 c-fos 和 c-jun 共转染后会诱导 MGMT 启动基因的反式激活^[21], 而 FHL2 作为一种转录辅助因子, 可以与 AP-1 转录因子相互作用, 发挥转录共激活剂的功能^[22]。因此推测, FHL2 调控 MGMT 的表达可能与 NF-κB 信号通路或转录因子 AP-1 的激活有关。

另一方面, MGMT 启动子超甲基化是 GBM 患者 TMZ 治疗的唯一已知生物标志物。其中弥漫性中线胶质瘤对 TMZ 表现出耐药性, 主要是由于胶质瘤中的组蛋白基因突变引发表观遗传变化, MGMT 启动子甲基化的频繁缺失导致 MGMT 表达增加^[23]。基因的特异性高甲基化或低甲基化受 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的调控。DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)在 DNA 甲基化的“维持”中起着重要作用。在高级别星形细胞瘤中, DNMT1 过表达与 MGMT 蛋白表达降低相关^[24]; DNMT1 抑制 MGMT 介导的下咽鳞癌细胞生长和转移^[25]。在近年的研究中发现, 前列腺癌中 NF-κB RelA/p65 通过招募 DNMT1 与胶原蛋白反应介质蛋白 4 基因的启动子结合, 并影响甲基化状态而促进细胞的迁移和侵袭^[26]; 在胃癌发展中, 幽门螺杆菌的毒力因子细胞毒素相关蛋白 A (cytotoxin-associated gene A, CagA) 通过 AKT-NF-κB 通路上调 DNMT1 诱导抑癌基因发生高水平甲基化^[27]; 心血管疾病中也发现了 TLR4/NF-κB/DNMT1 参与调控 DNA 甲基化^[28-29]。以上研究均表明, NF-κB 通路在 DNMT1 介导的基因甲基化中至关重要。本研究从 Rembrandt 数据库中分析发现, 接受化疗的 GBM 组织中 FHL2 与 DNMT1 具有一定的负相关性($n=254, R=-0.223$)。综上, 推测 FHL2 可能通

过NF- κ B信号通路调控DNMT1,进而影响MGMT的甲基化和表达,这一推测有待于进一步验证。

本研究发现,敲低FHL2后,TMZ的处理并没有使FHL2和MGMT恢复甚至高表达,表明靶向作用于FHL2对于治疗胶质瘤耐药性有一定的可行性。TMZ作为GBM的一线治疗用药,对GBM患者的2年生存率有明显的改善效果,但耐药性使GBM的治疗遇到了瓶颈。更多的学者为了解决这一困难,专注于多种药物联合治疗,这使GBM的治疗得以进一步改善,但也给患者带来更多的不良反应。本研究旨在探索通过干扰FHL2,一方面抑制GBM细胞的生长,一方面减轻GBM细胞的TMZ耐药性,尽可能减少治疗中涉及多种药物或化疗手段,为GBM的治疗提供新的方向。当然,本研究仍需进一步的机制探索和体内实验验证。

综上所述,干扰FHL2表达降低细胞对TMZ的耐药性,使细胞增殖减慢、凋亡增强,这可能与FHL2调控MGMT的表达有关,本研究为TMZ在胶质瘤中的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] WANG Y, MENG X J, ZHOU S Z, *et al.* Apatinib plus temozolomide for recurrent glioblastoma: an uncontrolled, open-label study[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10579-10585. DOI: 10.2147/OTT.S226804.
- [2] LI M, WANG J D, NG S S M, *et al.* The four-and-a-half-LIM protein 2 (FHL2) is overexpressed in gliomas and associated with oncogenic activities[J]. *Glia*, 2008, 56(12): 1328-1338. DOI: 10.1002/glia.20701.
- [3] PAUKOVCEKOVA S, SKODA J, NERADIL J, *et al.* Novel thiosemicarbazones sensitize pediatric solid tumor cell-types to conventional chemotherapeutics through multiple molecular mechanisms[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3781[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33334021/>. DOI: 10.3390/cancers12123781.
- [4] CHEN L, LI Z K, HU S B, *et al.* Extracellular vesicles carry miR-27a-3p to promote drug resistance of glioblastoma to temozolomide by targeting BTG2[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2022, 89(2): 217-229. DOI: 10.1007/s00280-021-04392-1.
- [5] DRLJAČA J, POPOVIĆ A, BULAJIĆ D, *et al.* Diazepam diminishes temozolomide efficacy in the treatment of U87 glioblastoma cell line[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(9): 1447-1457. DOI: 10.1111/cns.13889.
- [6] GENINI M, SCHWALBE P, SCHOLL F A, *et al.* Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma[J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(4): 433-442. DOI: 10.1089/dna.1997.16.433.
- [7] ZHOU R Q, LI S, LIU J S, *et al.* Up-regulated FHL2 inhibits ovulation through interacting with androgen receptor and ERK1/2 in polycystic ovary syndrome[J/OL]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102635[2022-09-12]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102635>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102635.
- [8] ALGABER A, MADHI R, HAWEZ A, *et al.* Targeting FHL2-E-cadherin axis by miR-340-5p attenuates colon cancer cell migration and invasion[J/OL]. *Oncol Lett*, 2021, 22(2): 637[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34295384/>. DOI: 10.3892/ol.2021.12898.
- [9] HABIBE J J, CLEMENTE-OLIVO M P, DE VRIES C J. How (epi) genetic regulation of the LIM-domain protein FHL2 impacts multifactorial disease[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(10): 2611[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8534169/>. DOI: 10.3390/cells10102611.
- [10] KIRSTEIN A, SCHMID T E, COMBS S E. The role of miRNA for the treatment of MGMT unmethylated glioblastoma multiforme [J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1099[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32354046/>. DOI: 10.3390/cancers12051099.
- [11] HIGUCHI F, NAGASHIMA H, NING J F, *et al.* Restoration of temozolomide sensitivity by PARP inhibitors in mismatch repair deficient glioblastoma is independent of base excision repair[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(7): 1690-1699. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2000.
- [12] 段然, 颜成睿, 王磊. lncRNA POU3F3通过调节MGMT的表达影响高级别胶质瘤细胞对替莫唑胺耐药[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(3): 328-332. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.013.
- [13] HEGI M E, GENBRUGGE E, GORLIA T, *et al.* MGMT promoter methylation cutoff with safety margin for selecting glioblastoma patients into trials omitting temozolomide: a pooled analysis of four clinical trials[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1809-1816. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3181.
- [14] KATO T, NATSUME A, TODA H, *et al.* Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(11): 1363-1371. DOI: 10.1038/gt.2010.88.
- [15] KATO Y, OKOLLIE B, RAMAN V, *et al.* Contributing factors of temozolomide resistance in MCF-7 tumor xenograft models[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(6): 891-897. DOI: 10.4161/cbt.6.6.4096.
- [16] BAI S T, KITaura H, ZHAO H B, *et al.* FHL2 inhibits the activated osteoclast in a TRAF6-dependent manner[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2742-2751. DOI: 10.1172/JCI24921.
- [17] LI M, LIANG R F, WANG X, *et al.* BKM120 sensitizes C6 glioma cells to temozolomide via suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B/MGMT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6597-6603. DOI: 10.3892/ol.2017.7034.
- [18] HU Y H, JIAO B H, WANG C Y, *et al.* Regulation of temozolomide resistance in glioma cells via the RIP2/NF- κ B/MGMT pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(5): 552-563. DOI: 10.1111/cns.13591.
- [19] 黄惠勇, 林洪, 苏保义, 等. 白藜芦醇通过NF- κ B依赖途径下调MGMT增强胶质瘤细胞对替莫唑胺药物的敏感性[J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(2): 114-120. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2014.02.002.
- [20] GUO G, SUN Y, HONG R, *et al.* IKBKE enhances TMZ-chemoresistance through upregulation of MGMT expression in glioblastoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(8): 1252-1262. DOI: 10.1007/s12094-019-02251-3.
- [21] BOLDOGH I, RAMANA C V, CHEN Z, *et al.* Regulation of expression of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(17):

- 3950-3956.
- [22] MORLON A, SASSONE-CORSI P. The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3977-3982. DOI: 10.1073/pnas.0735923100.
- [23] ABE H, NATSUMEDA M, OKADA M, *et al.* MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 9: 1568[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6985080/>. DOI: 10.3389/fonc.2019.01568.
- [24] RAHMAN W F W A, RAHMAN K S A, NAFI S N M, *et al.* Overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in astrocytic tumour and its correlation with O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6095-6106.
- [25] TIAN R X, LV Y Y, YANG X, *et al.* DNA methyltransferase 1 inhibits O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-mediated cell growth and metastasis of hypopharyngeal squamous carcinoma[J/OL]. *Arch Oral Biol*, 2021, 128: 105160[2022-09-12]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105160>. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105160.
- [26] GAO X, MAO Y H, XIAO C T, *et al.* Calpain-2 triggers prostate cancer metastasis *via* enhancing CRMP4 promoter methylation through NF- κ B/DNMT1 signaling pathway[J]. *Prostate*, 2018, 78(9): 682-690. DOI: 10.1002/pros.23512.
- [27] ZHANG B G, HU L, ZANG M D, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA induces tumor suppressor gene hypermethylation by upregulating DNMT1 *via* AKT-NF κ B pathway in gastric cancer development[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 9788-9800. DOI: 10.18632/oncotarget.7125.
- [28] MA S C, HAO Y J, JIAO Y, *et al.* Homocysteine-induced oxidative stress through TLR4/NF- κ B/DNMT1-mediated LOX-1 DNA methylation in endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9181-9188. DOI: 10.3892/mmr.2017.7753. *Rep*, 2017, 16(6): 9181-9188. DOI: 10.3892/mmr.2017.7753.
- [29] XIE M R, TANG Q M, NIE J M, *et al.* BMAL1-downregulation aggravates *Porphyromonas gingivalis*-induced atherosclerosis by encouraging oxidative stress[J/OL]. *Circ Res*, 2020, 126(6): e15-e29 [2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32078488/>. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315502.

[收稿日期] 2022-09-12

[修回日期] 2023-01-16

[本文编辑] 黄静怡