

GSK3对人脑胶质瘤增殖的影响及基因表达谱富集分析

岑学程¹, 高力扬^{2*}, 陈兵¹, 杨帆¹, 龙霄翱¹, 顾雪锋¹, 李锦宏¹ (广东医科大学附属医院 1. 神经外科; 2. 干细胞研发与转化中心, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 研究GSK3(glycogenkinase3)对胶质瘤分化增殖的影响, 并对其基因表达相关通路富集分析。
方法 利用Wnt/ β -catenin信号通路激活剂AZD2858, 通过抑制GSK3活性的方式激活 β -catenin介导的转录。利用GO (gene ontology)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对GSK3抑制前后表达差异显著的基因进行功能类别和通路分析。
结果 抑制GSK3活性可以引起P53、Wnt等多条信号通路的协同作用, 并且通过正向调控细胞死亡相关功能基因Caspase 3、FAS、p21, 负向调控细胞周期和细胞分裂相关功能基因Cyclin A、Cyclin B、VEGF、Survivin, 最终抑制人脑恶性胶质瘤U87的增殖。
结论 利用小分子化合物AZD2858抑制GSK3活性可激活人脑恶性胶质瘤中的Wnt/ β -catenin信号通路, 对胶质瘤细胞增殖起到抑制作用。

关键词: 人脑恶性胶质瘤; 糖原合成酶3; Wnt/ β -catenin信号通路; 基因表达谱

中图分类号: R 602

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)01-0036-04

Effect of the GSK3 on the proliferation of human glioma and the enrichment of its gene expression profile

CEN Xue-cheng¹, GAO Li-yang^{2*}, CHEN Bing¹, YANG Fan², LONG Xiao-ao¹, GU Xue-feng¹, LI Jin-hong¹
(1. Department of Neurosurgery, 2 Stem Cell Research and Transformation Center, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To study the effect of glycogenkinase3 (GSK3) on the proliferation of human glioma and analyze the enrichment of its gene expression profile. Methods AZD2858, the activator of Wnt/ β -catenin signaling pathway, was used to activate the β -catenin-mediated transcription by inhibiting the activity of GSK3. The GO (gene ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database were used to analyze the functional category and pathways on the genes with significant difference in the expression before and after the inhibition of GSK3. Results The inhibition of the activity of GSK3 may cause the synergistic effect of multiple signaling pathways including P53 and Wnt. The proliferation of human brain glioma U87 was finally inhibited through positive regulation of the functional genes related to cell death including Caspase 3, FAS and p21, and negative regulation of the functional genes related to cell cycle and cell division including Cyclin A, Cyclin B, VEGF and Survivin. Conclusion Using the small molecule compound AZD2858 to inhibit the activity of GSK3 can activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway of human brain glioma and inhibit the proliferation of glioma cells.

Key words: human brain glioma; glycogenkinase3; Wnt/beta-catenin signaling pathway; gene expression profile

Wnt/ β -catenin信号通路目前已被发现与多种肿瘤的发生、增殖密切相关^[1]。作为Wnt/ β -catenin通路重要组成的 β 连环蛋白(β -catenin)和糖原合成酶3(glycogenkinase3, GSK3)蛋白在胶质瘤细胞分化、

增殖、转移中发挥着重要的作用^[2]。目前有关Wnt信号通路与胶质瘤关系的研究相对较少, 且具体影响尚不明确。调控Wnt/ β -catenin信号通路是肿瘤治疗的一个研究方向^[3]。与 β -catenin在其他癌中的高表达不同, 胶质瘤中 β -catenin表达水平并无显著增高。如APC基因突变及GTNNB1基因表达异常增高可以导致结肠癌的发生^[4], 但胶质瘤中APC基因突变和GTNNB1基因表达异常并不显著^[5]。研究发现GSK3可以与APC、Axin、CK 1等一起组成 β -catenin降解复合体, 抑制降解复合体活性, 增加游离的 β -catenin

基金项目: 广东省自然科学基金(No.2016A030313680),
广东省卫生厅项目(No.A2015483)

收稿日期: 2017-09-03; 修订日期: 2017-12-18

作者简介: 岑学程(1991-), 男, 在读硕士研究生。

通信作者: 高力扬(1981-), 女, 助理研究员, 博士,
E-mail: pandarun@aliyun.com。

浓度,并激活Wnt/ β -catenin信号通路^[6]。本研究利用小分子化合物抑制GSK3活性,从而激活胶质瘤中Wnt/ β -catenin信号,进而从基因表达层面研究Wnt信号通路抑制胶质瘤增殖的作用机制,旨在探讨小分子化合物治疗胶质瘤的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

人脑恶性胶质瘤细胞系U87,逆转录试剂盒(TAKARA, Japan),实时荧光定量PCR试剂盒(TAKARA, Japan),Affymetrix HUG133 plus 2.0芯片。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 本实验采用人脑恶性胶质瘤细胞系U87,培养基采用DMEM高糖培养基(Hyclone, China)加15%胎牛血清(Gibco, USA)和1%青霉素-链霉素配制。取对数生长期U87细胞分为对照组和AZD2858处理组。对照组不干预,AZD2858处理组使用2 μ mol/L Wnt/ β -catenin信号通路激活剂AZD2858干预48 h。

1.2.2 mRNA提取及检测 使用总mRNA提取试剂盒(Omega, USA)提取人脑恶性胶质瘤细胞系U87mRNA,并通过琼脂糖凝胶电泳检测mRNA纯度,利用微量紫外分光光度仪NanoDrop检测mRNA浓度。使用Affymetrix HUG133 plus 2.0芯片对样本进行转录本检测,使用GeneChip Scanner 3000 7G扫描仪记录结果,并利用KEGG基因组信息数据库进行基因功能分析。利用mRNA使用逆转录试剂盒(TAKARA, Japan)将mRNA逆转录为cDNA。使用实时荧光定量PCR试剂盒(TAKARA, Japan)对目标基因相对表达量进行验证。荧光定量PCR仪为ROCHE LightCycler 480II。

1.2.3 数据分析 使用Gene Ontology(GO)seq和topGO分析靶基因对应的GO-term的富集情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS17.0统计软件进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制胶质瘤中GSK3活性通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制胶质瘤增殖

Wnt/ β -catenin信号通路相关转录因子复合体TCF/LEF、Wnt受体Frizzled及Wnt/ β -catenin信号通路靶基因MMP7表达均显著升高($P < 0.01$),见图1。

通过CCK8细胞活性实验发现抑制GSK3活性2 d可以抑制胶质瘤细胞U87的增殖($P < 0.05$),而抑制GSK3活性4 d可以显著抑制胶质瘤细胞U87增殖($P < 0.01$),详见图2。PT-PCR结果发现AZD2858处理后的细胞中细胞凋亡相关因子Caspase 3、FAS、p21 基因表达显著增高($P < 0.01$)(图3A),而细胞周期蛋白Cyclin A、Cyclin B、血管内皮生长因子(VEGF)、凋亡抑制蛋白Survivin基因表达显著降低($P < 0.01$)(图3B)。

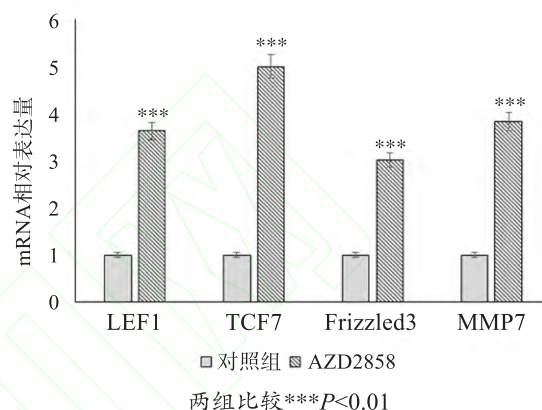


图1 AZD2858对Wnt/ β -catenin靶基因表达的影响

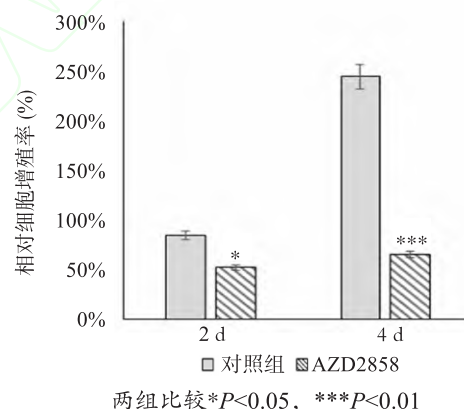
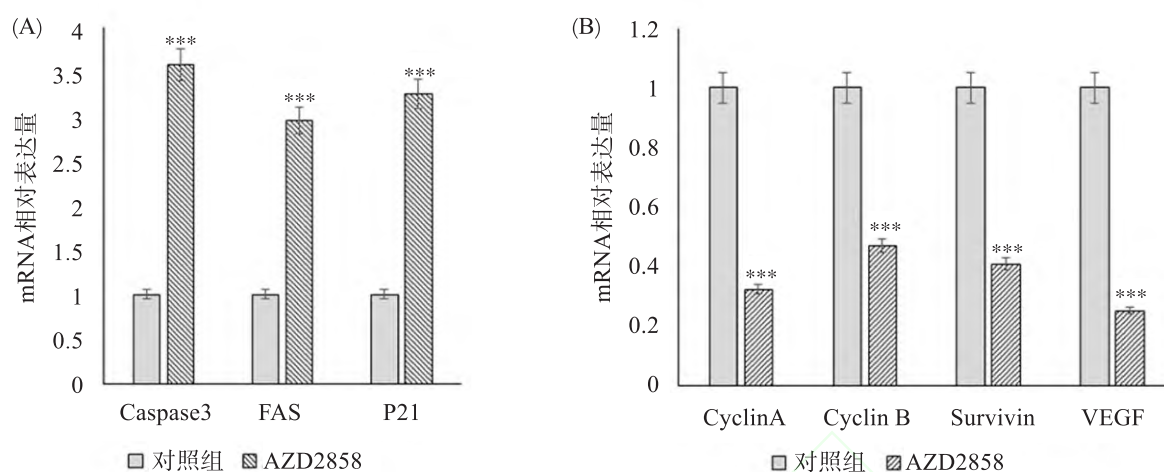


图2 AZD2858对胶质瘤细胞增殖的影响

2.2 芯片结果中差异表达基因的功能预测和分析

AZD2858处理组与对照组比较,信号强度比值大于2倍。芯片结果共检测到478个差异表达显著基因,其中表达显著上调基因179个,表达显著下调基因399个。利用GO对转录组数据进行功能注释分析,发现表达显著上调基因涉及生物学过程,主要有单有机体过程、对化学物质的应答、非生物刺激的反应、对外部刺激的反应、细胞通讯、信号、细胞死亡的正向调节等(图4A)。表达下调基因涉及的生物学过程大部分与细胞周期有关,如有丝分裂细胞周期、有丝分裂、细胞周期过程、核分裂、细胞分裂、细胞成分合成等(图4B)。

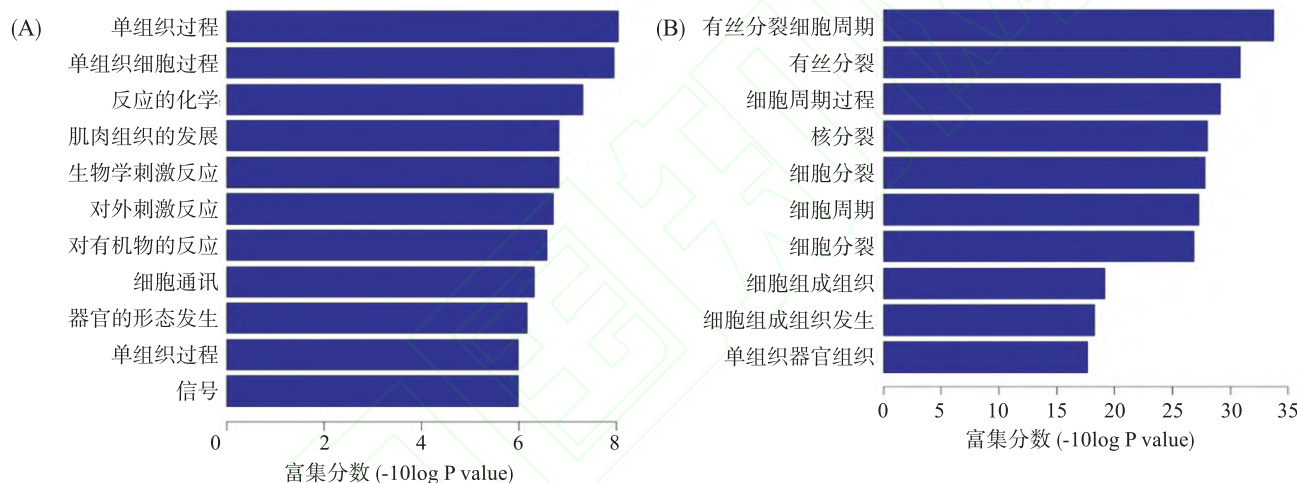
2.3 GSK3抑制剂通过相关信号通路协同作用影响



(A): 细胞凋亡相关因子表达分析; (B): 细胞周期、生长相关蛋白表达分析

两组比较*** $P < 0.01$

图3 AZD2858对细胞生长、周期、凋亡相关基因的影响



(A): 表达上调基因涉及的细胞生物过程; (B): 表达下调基因涉及的细胞生物学过程

图4 利用GO分析表达变化显著的基因参与的细胞生物过程

胶质瘤细胞增殖

利用京都基因与基因组百科全书KEGG通路数据库对转录组数据进行分析,发现抑制胶质瘤中GSK3活性后会引起相关通路上调和下调。上调的信号通路有细胞因子-受体相互作用通路、P53信号通路、Hippo信号通路以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路;下调的信号通路有TGF- β 信号通路、细胞周期、黏合斑、细胞外基质受体相互作用、癌症发生相关通路等。详见表1。

3 讨论

调控Wnt/ β -catenin信号通路是肿瘤治疗的一个研究方向^[3]。与 β -catenin在其他癌中的高表达不同,胶质瘤中 β -catenin表达水平并无显著增高。如APC基因突变及GTNNB1(β -catenin)基因表达异常增高可

以导致结肠癌的发生^[4]。但胶质瘤中APC基因突变和GTNNB1基因表达异常并不显著^[5]。GSK3可以与APC、Axin、CK 1等一起组成 β -catenin降解复合体,抑制降解复合体活性可以增加游离的 β -catenin浓度,并激活Wnt/ β -catenin信号通路^[6]。

本研究发现抑制GSK3活性可以激活胶质瘤中Wnt/ β -catenin信号通路,并提高通路靶基因的表达。处理后胶质瘤细胞中Caspase 3、FAS、P21表达增高;Cyclin A、Cyclin B、VEGF、Survivin表达明显降低。FAS是重要的凋亡促进因子,已发现能促进多种肿瘤凋亡^[7];凋亡因子Caspase 3表达升高被证实可以促进胶质瘤细胞的凋亡^[8-9]。P21属细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族,是细胞周期的负调控因子,可通过与P53共同作用抑制胶质瘤增殖^[10]。

我们在基因表达谱分析中发现:细胞周期负调

表1 抑制胶质瘤中GSK3活性后显著变化的信号通路

显著性通路	KEGG功能分类	基因数	错误发现率
上调			
细胞因子-受体相互作用通路	信号分子间相互作用相关通路	19	0.003
P53信号通路	细胞信号转导	9	0.003
Hippo信号通路	细胞信号转导	13	0.005
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	氨基酸代谢	5	0.037
蛋白多糖与癌症	肿瘤	14	0.037
下调			
TGF-β信号通路	细胞信号转导	10	0.000
细胞周期	细胞生长和凋亡	12	0.000
补体和凝血级联反应	免疫系统	9	0.000
黏合斑	细胞通讯	13	0.001
细胞外基质受体相互作用	信号分子间相互作用相关通路	8	0.003
癌症发生相关通路	肿瘤	14	0.024
PI3K-AKT信号通路	细胞信号转导	14	0.037

控蛋白P21显著增高可能通过与P53共同作用抑制细胞周期G1期，从而抑制胶质瘤增殖；细胞凋亡促进因子FAS和凋亡因子Caspase 3在AZD2858处理后基因表达显著升高，凋亡抑制蛋白Survivin基因表达显著降低，说明激活Wnt/β-catenin信号通路可能促进胶质瘤细胞U87凋亡；细胞周期蛋白Cyclin A、Cyclin B明显被抑制，提示激活Wnt/β-catenin信号通路可能通过调控细胞周期和阻碍细胞有丝分裂的方式抑制胶质瘤细胞的增殖；血管内皮生长因子VEGF显著降低，提示肿瘤血管生长可能被抑制。AZD2858可以通过激活胶质瘤中Wnt/β-catenin信号通路，抑制胶质瘤增殖^[7-9]。

另一方面，我们对细胞信号通路分析发现：除了Wnt/β-catenin信号通路之外，多条通路如P53通路、Hippo通路、PI3K-AKT信号通路网络共同在抑制胶质瘤增殖中发挥交互作用。

综上所述，抑制GSK3活性可以通过激活Wnt/β-catenin影响多条信号转导通路，调控多种信号分子相互作用和细胞周期、分裂、凋亡、侵袭，从而协同抑制胶质瘤细胞增殖。

参考文献：

[1] Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003,

129(4): 199-221.
[2] Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, et al. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas[J]. Cancer Cell, 2010, 17(5): 497-509.
[3] Herbst A, Kolligs F T. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer[J]. Methods Mol Biol, 2007, 361(2): 63-91.
[4] Polakis P. Wnt Signaling in Cancer. Cold Spring Harb[J]. Perspect Biol, 2012, 4(5): a008052.
[5] Paraf F, Jothy S, Van Meir E G. Brain tumor-polypoid syndrome: two genetic diseases?[J]. J Clin Oncol, 1997, 15 (7): 2744-2758.
[6] Valvezan A J, Klein P S. GSK-3 and Wnt signaling in neurogenesis and bipolar disorder[J]. Front Mol Neurosci, 2012(5): 1.
[7] Iozzo R V, Sanderson R D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(5): 1013-1031.
[8] Xie Y, Li Q, Yang Q, et al. Overexpression of DCF1 inhibits glioma through destruction of mitochondria and activation of apoptosis pathway[J]. Sci Rep, 2014, 4: 3702.
[9] Qiu B, Sun X, Zhang D, et al. TRAIL and paclitaxel synergize to kill U87 cells and U87-derived stem-like cells in vitro[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 9142-9156.
[10] Yan K, Wu Q, Yan D H, et al. Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy[J]. Genes Dev, 2014, 28(10): 1085-1100.