

胶质母细胞瘤 *FGFR3-TACC3* 融合基因介导丙酮酸激酶 M2 入核促进 DNA 损伤修复基础研究

任修德 李涛 范吉康 王希森 贾晓丹 杨学军

【摘要】 **目的** 探讨胶质母细胞瘤 *FGFR3-TACC3* (*F3-T3*) 融合基因介导丙酮酸激酶 M2 (PKM2) 入核激活 DNA 损伤修复致替莫唑胺 (TMZ) 耐药的作用机制。**方法** 慢病毒转染构建稳定表达 *F3-T3* 融合基因和空载体的胶质母细胞瘤细胞系 U87MG 和 U251MG, 构建稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤裸鼠模型, 小动物活体成像系统观察荷瘤鼠肿瘤荧光信号强度; 采用生物信息学分析基因芯片转录组数据分析 *F3-T3* 融合基因的生物功能, 并分析肿瘤基因组学图谱计划 (TCGA) 数据库中胶质瘤患者生存期与 *PKM2* 基因表达的关系; 瞬时转染小干扰 RNA (siRNA) 敲低 *PKM2* 基因表达; CCK-8 细胞增殖实验观察经梯度浓度替莫唑胺处理后、转染 siRNA 后、替莫唑胺联合 *PKM2* 抑制剂 Compound 3k 处理后 U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性; 提取核质蛋白并观察经替莫唑胺处理后总蛋白提取物、胞质提取物和胞核提取物 *PKM2* 蛋白表达情况; Western blotting 法检测稳定表达 *F3-T3* 融合基因的 U87MG 和 U251MG 细胞 *PKM2* 蛋白相对表达量、磷酸化组蛋白 H2AX (p-H2AX) 相对表达量、siRNA 敲低 *PKM2* 基因 p-H2AX 相对表达量。**结果** (1) CCK-8 细胞增殖实验显示, 经替莫唑胺 640、320、160、80、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 *F3-T3* 转染组的 U87MG 细胞存活率均高于空载体转染组 ($P=0.000, 0.000, 0.000, 0.004, 0.010$), 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、5 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 *F3-T3* 转染组的 U251MG 细胞存活率亦均高于空载体转染组 ($P=0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.002, 0.001, 0.002$); 然而, 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、10、5 和 2.50 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 si-*PKM2*-1009 转染组的 U87MG 细胞存活率均低于 *F3-T3* 转染组 ($P=0.000, 0.000, 0.000, 0.012, 0.006, 0.030, 0.000, 0.007, 0.025$), 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、5 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 si-*PKM2*-1377 转染组 U251MG 细胞存活率亦低于 *F3-T3* 转染组 ($P=0.000, 0.000, 0.002, 0.000, 0.002, 0.048, 0.042$); 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理后 TMZ + Compound 3k 组 U87MG 细胞存活率低于 TMZ 组 ($P=0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.001, 0.002$), 经高浓度 (640、320、160、80、40 $\mu\text{mol/L}$) 替莫唑胺处理后 TMZ + Compound 3k 组 U251MG 细胞存活率亦低于 TMZ 组 ($P=0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.003$), 而经低浓度 (10、5、2.50 $\mu\text{mol/L}$) 替莫唑胺处理后 TMZ + Compound 3k 组 U251MG 细胞存活率高于 TMZ 组 ($P=0.000, 0.000, 0.006$)。 (2) 胶质母细胞瘤动物模型显示, 荷瘤鼠存在替莫唑胺耐药。 (3) 生物信息学分析, *F3-T3* 融合蛋白的生物功能显著富集于 DNA 修复通路 ($P=0.000$)。TCGA 数据库中胶质瘤患者 *PKM2* 基因高表达组生存率和总生存期均低于低表达组 ($P<0.05$)。 (4) Western blotting 法显示, 经替莫唑胺处理 48 h 再更换培养基后 24、36 和 48 h, *F3-T3* 转染组 U87MG ($P=0.000, 0.000, 0.004$) 和 U251MG ($P=0.000, 0.007, 0.005$) 细胞 p-H2AX 蛋白相对表达量均低于空载体转染组; 经替莫唑胺处理后 *F3-T3* 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞均可见明显的 *PKM2* 入核, 而空载体转染组细胞均未见这一现象; si-*PKM2*-1009 和 si-*PKM2*-1377 分别敲低 U87MG ($P=0.000, 0.001, 0.006$) 和 U251MG ($P=0.000, 0.000, 0.000$) 细胞 *PKM2* 基因表达的效果最显著。**结论** *F3-T3* 融合基因可促进 *PKM2* 入核, 激活 DNA 损伤修复相关通路, 进而介导胶质母细胞瘤对替莫唑胺耐药, 不同细胞株对替莫唑胺的耐药浓度不一致, *PKM2* 抑制剂可逆转这种耐药。

【关键词】 胶质母细胞瘤; 受体, 成纤维细胞生长因子, 3 型; 基因融合; 丙酮酸激酶; DNA

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2023.08.015

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (项目编号: 82102951)

作者单位: 300052 天津医科大学总医院神经外科 (任修德, 李涛, 范吉康, 王希森, 贾晓丹); 102218 北京清华长庚医院神经外科 (杨学军)

通讯作者: 杨学军, Email: yxja03728@bthc.edu.cn

修复; 替莫唑胺; 抗药性,肿瘤; 细胞增殖; 免疫印迹法; 肿瘤细胞,培养的; 疾病模型,动物

The study of *FGFR3-TACC3* fusion gene mediating pyruvate kinase M2 nuclear translocation to promote DNA damage repair in glioblastoma

REN Xiu-de¹, LI Tao¹, FAN Ji-kang¹, WANG Xi-sen¹, JIA Xiao-dan¹, YANG Xue-jun²

¹Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

²Department of Neurosurgery, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, Beijing 102218, China

Corresponding author: YANG Xue-jun (Email: yxja03728@btch.edu.cn)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of *FGFR3-TACC3* (*F3-T3*) fusion gene mediating DNA damage repair through promoting pyruvate kinase M2 (PKM2)'s nuclear translocation in glioblastoma. **Methods** The lentiviral transfection technology was used to constructed stable transitional cell lines U87MG cells and U251MG cells that stably expressing *F3-T3* and empty vector. In vivo glioblastoma model was constructed by intracranial in situ tumor implantation in athymic mice, and the tumorigenic ability of *F3-T3* transfected cells in athymic mice of each treatment group was observed by small-animal in vivo imaging system. Bioinformatics analysis was performed to analyze gene microarray data exploring the possible biological functions of *F3-T3* mediating chemoresistance and identify the relationship between survival expectations and PKM2 expression levels in glioblastoma patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Transient transfection of small interference RNA (siRNA) was used to knock down the expression of PKM2 in the *F3-T3* transfected cells. Proliferative activity of U87MG and U251MG cells treated with different concentrations of temozolomide (TMZ), transfected with siRNA, and TMZ in combination with Compound 3k, a PKM2 inhibitor, was observed in CCK-8 cell proliferation assays. Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted separately and PKM2 protein expression was observed in whole cell extract, cytoplasmic extract and cytosolic extract after TMZ treatment. Relative expression of PKM2, relative expression of cytosolic phosphorylated histone H2AX (p-H2AX) and relative expression of siRNA knockdown *PKM2* gene in U87MG and U251MG cells stably expressing the *F3-T3* fusion gene, detected by Western blotting. **Results** 1) CCK-8 cell proliferation assay showed that the survival rate of U87MG cells in the *F3-T3* transfected group was higher than that in the empty vector transfected group after treatment with TMZ 640, 320, 160, 80, 40 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.004, 0.010$), and the survival rate of U251MG cells in the *F3-T3* transfected group was also higher than that in the empty vector transfected group after TMZ 640, 320, 160, 80, 40, 20, 5 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.002, 0.001, 0.002$); the survival rate of U87MG cells in the si-PKM2-1009 transfected group was lower than that of *F3-T3* transfected group after TMZ 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.50 $\mu\text{mol/L}$, the survival rate of U251MG cells in the si-PKM2-1377 transfected group was also lower than that in *F3-T3* transfected group after TMZ 640, 320, 160, 80, 40, 20, 5 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.000, 0.000, 0.002, 0.000, 0.002, 0.048, 0.042$); and the survival rate of U87MG cells in TMZ + Compound 3k group was lower than TMZ group after TMZ 640, 320, 160, 80, 40, 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.001, 0.002$), and the survival rate of U251MG cells in TMZ + Compound 3k group after treatment with high concentrations of TMZ (640, 320, 160, 80 and 40 $\mu\text{mol/L}$) was also lower than TMZ group ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.003$), while the survival rate of U251MG cells in TMZ + Compound 3k group after treatment with low concentrations of TMZ (10, 5 and 2.50 $\mu\text{mol/L}$) was higher than that of TMZ group ($P = 0.000, 0.000, 0.006$). 2) An animal model of glioblastoma showed the presence of TMZ resistance in homozygous mice. 3) Bioinformatic analysis showed that the biological function of *F3-T3* was significantly enriched in the DNA repair pathway ($P = 0.000$). Survival and overall survival of glioblastoma patients in the TCGA database were lower in the *PKM2* high expression group than in the low expression group ($P < 0.05$). 4) Western blotting showed that the relative expression of p-H2AX in U87MG ($P = 0.000, 0.000, 0.004$) and U251MG ($P = 0.000, 0.007, 0.005$) cells in the *F3-T3* transfected group were lower than those in the empty vector transfected group after TMZ treatment for 48 h and then medium change for 24, 36 and 48 h. PKM2 protein incorporation into the nucleus was observed in both U87MG and U251MG cells in the *F3-T3* transfected group after TMZ treatment, whereas it was not observed in cells in the empty vector transfected group; si-PKM2-1009 and si-PKM2-1377 knocked down the relative expression of p-H2AX in U87MG ($P = 0.000, 0.001, 0.006$) and U251MG ($P = 0.000, 0.000, 0.000$) cells, respectively. **Conclusions** In the presence of TMZ, *F3-T3* promotes PKM2's nuclear translocation and activates DNA damage repair pathways, which in the eventually results resistance of glioblastoma cell to TMZ. PKM2 inhibitors can compromise the resistance glioblastoma cells stably expressing *F3-T3* fusion gene to TMZ.

【Key words】 Glioblastoma; Receptor, fibroblast growth factor, type 3; Gene fusion; Pyruvate kinase; DNA repair; Temozolomide; Drug resistance, neoplasm; Cell proliferation; Immunoblotting;

Tumor cells, cultured; Disease models, animal

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (No. 82102951).

Conflicts of interest: none declared

脑胶质瘤是临床最常见的中枢神经系统肿瘤,其中胶质母细胞瘤恶性程度最高,预后极差,中位生存期仅 14~17 个月^[1]。胶质母细胞瘤存在广泛的基因组学改变,其中基因融合是常见的染色体畸变,由染色体重排引发,导致致癌融合基因的产生。*FGFR3-TACC3(F3-T3)*融合基因由定位于染色体 4p16 的 *FGFR3* 基因 150×10^3 bp 长度范围内罕见染色体重排所形成,最早在胶质母细胞瘤中被检出^[2]。*F3-T3*融合蛋白由大部分纤维母细胞生长因子受体 3(*FGFR3*)结构域和小部分转录相关酸性卷曲蛋白 3(*TACC3*)结构域组成,既保留野生型 *FGFR3* 蛋白的重要磷酸化位点^[3],又具有组成性激活(constitutive activation)特点^[4]。替莫唑胺(TMZ)是胶质瘤治疗的一线烷化剂,但是由于肿瘤的异质性进展,其治疗抵抗和治疗后复发仍是亟待解决的问题。一方面,*F3-T3*融合基因阳性的胶质瘤患者经替莫唑胺治疗后易复发,且复发肿瘤仍携带 *F3-T3*融合基因^[5-6];另一方面,胶质瘤 *FGFR3* 基因表达变化显著影响烷化剂治疗敏感性^[3]。本研究拟体外构建胶质母细胞瘤模型,探究 *F3-T3*融合蛋白和 *F3-T3*融合基因引发胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药的作用机制以及对抗或逆转这种耐药性的方案,以为携带 *F3-T3*融合基因的胶质母细胞瘤患者提供更精准的治疗方案。

材料与方 法

一、实验材料

1. 细胞系来源 人胶质瘤细胞系 U87MG 和 U251MG 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。以含体积分数为 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基置于 37℃、含 5% 二氧化碳(CO₂)的恒温培养箱培养,每 2~3 天进行传代培养。

2. 动物来源 无特定病原体(SPF)级 BALB/c 裸鼠共 10 只,雄性和雌性各 5 只,6~12 周龄,体重为 17~21 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物于环境温度 24~27℃、12 h 昼-12 h 夜循环照明环境中饲养,自由摄食、饮水。本实验经天津

医科大学总医院实验动物福利伦理委员会审查通过(审批号:IRB2021-DWFL-076)。

3. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:胎牛血清和 DMEM 高糖培养基均购自美国 Gibco 公司;荧光素酶底物(规格:100 mg)购自美国 GoldBio 公司;替莫唑胺(规格:25 mg)购自美国 Cayman 公司;二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)干粉(规格:2 L)、BCA 蛋白定量检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;核质蛋白提取试剂盒(含胞质提取剂 I、II 和胞核提取剂)购自英国 Abcam 公司;冻干粉形式的小干扰 RNA(siRNA,规格:40 μg)购自上海和元生物技术股份有限公司;CCK-8 检测试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司;丙酮酸激酶 M2(PKM2)抑制剂 Compound 3k(规格:25 mg)购自美国 Selleck Chemicals 公司;I 抗工作液包括鼠源性抗磷酸化组蛋白 H2AX(p-H2AX)单克隆抗体(1:1000)购自美国 Millipore 公司,兔源性抗 PKM2 单克隆抗体(1:1000)、兔源性抗 LAMIN A/C 多克隆抗体(1:1000)为美国 Cell Signaling Technology 公司产品,鼠源性抗人 β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(1:3000)、鼠源性抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(1:1000)以及 II 抗工作液包括辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG II 抗(1:3000)和山羊抗兔 IgG II 抗(1:3000),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(2)设备与仪器:含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱和低温高速离心机购自德国 Heraeus 公司,IX73 倒置相差荧光显微镜(×600)购自日本 Olympus 株式会社,IVIS Spectrum 小动物活体成像系统(精密度:20 μm)购自美国 Xenogen 公司,Synergy 2 多功能酶标仪(精密度:0.001 OD)购自美国 BioTek 公司,PowerPac HC 电泳仪(电流 1 mA、电压 1 V、功率 1 W)为美国 Bio-Rad 公司产品,G:BOX Chemi XT4 化学发光/荧光/凝胶成像系统(分辨率:420 万像素)为英国 Syngene 公司产品。

二、实验方法

1. 慢病毒转染与细胞分组 *F3-T3*质粒载体构

建和慢病毒包装由上海吉凯基因医学科技股份有限公司完成,载体携带嘌呤霉素抗性基因、不携带 *GFP* 基因。将生长良好、处于对数生长期的细胞实验用 U87MG 和 U251MG 细胞分别接种于 2 个 6 孔板,每孔细胞数 100×10^3 个,分为 F3-T3 转染组、空载体转染组和空白对照组(每种细胞各 2 孔);恒温培养箱培养 24 h 后更换新鲜的 DMEM 完全培养基(2 ml/孔),向转染组(F3-T3 转染组和空载体转染组)加入配制好的含慢病毒和感染增强液的转染复合物,空白对照组不转染病毒;恒温培养箱培养 24 h 后再更换培养基,继续培养 24 h,各组同时加入嘌呤霉素 $2 \mu\text{g/ml}$,倒置相差荧光显微镜观察细胞存活情况,空白对照组细胞完全死亡且转染组细胞未见明显死亡提示转染成功,再将转染组细胞进一步扩大培养。动物实验用稳定表达 F3-T3 融合基因的 U251MG 细胞另转染荧光素酶慢病毒,F3-T3 质粒载体构建、慢病毒包装和转染流程同上述方法,无需设置转染组,转染后无需嘌呤霉素筛选细胞,小动物活体成像系统观察到细胞发出荧光信号提示转染成功,再进一步扩大培养。

2. 胶质母细胞瘤动物模型制备与分组 取处于对数生长期、转染荧光素酶慢病毒、稳定表达 F3-T3 融合基因的 U251MG 细胞,制备含细胞(细胞数为 0.50×10^6 个/ $5 \mu\text{l}$)的磷酸盐缓冲液。腹腔注射 5% 水合氯醛($0.10 \text{ ml}/10 \text{ g}$)麻醉裸鼠,切开头皮,于前囟前 1 mm、中线右 2 mm 处钻孔,注射制备的含 U251MG 细胞的磷酸盐缓冲液 $5 \mu\text{l}$,缝合头皮。细胞接种后第 7 和 14 天,于腹腔注射荧光素酶底物($50 \mu\text{l}/10 \text{ g}$)麻醉小鼠,以小动物活体成像系统观察荷瘤鼠颅内肿瘤生长情况,肿瘤发生荧光信号为模型制备成功。10 只裸鼠均建模成功,随机分为替莫唑胺组和对照组,替莫唑胺组将药物溶解于二甲基亚砜溶液,磷酸盐缓冲液稀释(稀释比 1:100),于注射第 15~19 和 22~26 天灌胃给药 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,对照组予以与替莫唑胺相同体积的二甲基亚砜溶液,均于细胞接种后第 21、28、35 和 42 天采用小动物活体成像系统观察荷瘤鼠肿瘤荧光信号强度。

3. 生物信息学分析 差异基因分析和基因富集分析(GSEA)所用 E-MTAB-6037 基因芯片数据从 ArrayExpress 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress>)中下载,该基因芯片数据共包括 4 组转录组数据,即 F3-T3 组(稳定表达 F3-T3 融合基因的人星形胶质细胞)、F3-T3 PD173074 组

(以 FGFR 抑制剂 PD173074 处理稳定表达 F3-T3 融合基因的人星形胶质细胞)、F3-T3 KD 组(稳定表达 F3-T3 融合基因的激酶失活形式人星形胶质细胞)和空载体组(稳定表达空载体的人星形胶质细胞)。采用 R 语言软件包 DESeq2 分析 F3-T3 组与空载体组的差异基因,软件包 org.Hs.eg.db、clusterProfiler、GSEABase 和 msigdb 对差异基因行通路富集分析,软件包 ggplot2 将分析结果可视化。肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)数据从其官网(<https://www.cancergenome.nih.gov/>)下载,包含 639 例胶质瘤患者的临床信息及其中 173 例患者的基因转录组测序数据,采用 R 语言软件包 survival 和 survminer 分析胶质瘤患者预后与 PKM2 基因表达变化的相关性,软件包 ggplot2 和 ggpubr 将分析结果可视化。

4. 核质蛋白分离提取 将 F3-T3 转染组和空载体转染组细胞(U87MG 和 U251MG)接种于培养皿(规格:100 mm),加入替莫唑胺 $100 \mu\text{mol/L}$,48 h 后提取核质蛋白。重悬细胞,细胞悬液收集至 1.50 ml EP 管中,离心半径为 13.50 cm、转速 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 $200 \mu\text{l}$ 冰冷胞质提取剂 I,冰浴 10 min 后,再加入 $11 \mu\text{l}$ 冰冷胞质提取剂 II,冰浴 1 min 后,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷下离心半径为 13.50 cm、转速 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,即为胞质提取物;再向沉淀中加入 $100 \mu\text{l}$ 冰冷胞核提取剂,冰浴 40 min,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷下离心 10 min,取上清液,即为胞核提取物。胞质和胞核提取物用于 Western blotting 检测。

5. 瞬时转染小干扰 RNA 敲低 PKM2 基因表达 敲低 PKM2 基因的 siRNA 冻干粉以超净水配制成 $10 \mu\text{mol/L}$ 溶液,上海和元生物技术股份有限公司合成 siRNA 序列,无义对照序列(si-PKM2-control 组): 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', PKM2 干扰序列分别为 si-PKM2-819 转染组: 5'-GCAAGAUCUACGUGGAUGAUGTT-3'、si-PKM2-1009 转染组: 5'-GGAUGUUGAUUGGUGUUUGCTT-3'、si-PKM2-1377 转染组: 5'-GCAUGAUGCUGUCUGGAGAAATT-3'。一 EP 管加入 $10 \mu\text{l}$ siRNA 和 $250 \mu\text{l}$ 高糖 DMEM 培养基,另一 EP 管加入 $5 \mu\text{l}$ Lipofectamine 2000 和 $250 \mu\text{l}$ 高糖 DMEM 培养基,两管混匀后于室温静置 25 min,配制转染复合物;将稳定表达 F3-T3 融合基因的 U87MG 和 U251MG 细胞以密度 50×10^3 个/ml 接种于 6 孔板,恒温培养箱培养 48 h,加入转染复合

物,转染 72~96 h,提取各 siRNA 转染组总蛋白,用于 Western blotting 检测。

6. CCK-8 法检测肿瘤细胞增殖活性 将 U87MG 和 U251MG 细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数 1500 个,分为替莫唑胺孔、对照孔和空白对照孔,替莫唑胺孔依次加入梯度浓度(640、320、160、80、40、20、10、5 和 2.50 $\mu\text{mol/L}$)替莫唑胺(每个浓度 5 个复孔),对照孔接种细胞但不加入替莫唑胺(5 个复孔),空白对照孔不接种细胞(3 个复孔)。96 孔板恒温培养箱培养 72 h,吸掉各孔培养基,每孔加入含 100 μl 完全培养基和 10 μl CCK-8 溶液的检测体系混合物,恒温培养箱培养 30 min、1 h、1.50 h 和 2 h 后,以酶标仪于 450 nm 处测定光密度(OD)值,并计算细胞存活率,公式为细胞存活率(%)=(替莫唑胺孔 OD_{450 nm} - 空白对照孔 OD_{450 nm})/(对照孔 OD_{450 nm} - 空白对照孔 OD_{450 nm}) \times 100%。采用 CCK-8 法分别检测稳定表达 F3-T3 融合基因和空载体(F3-T3 转染组和空载体转染组)、稳定表达 F3-T3 融合基因和转染 siRNA 的稳定表达 F3-T3 融合基因(F3-T3 转染组和 siRNA 转染组)、替莫唑胺和替莫唑胺联合 PKM2 抑制剂 Compound 3k(1 $\mu\text{mol/L}$)处理后(TMZ 组和 TMZ + Compound 3k 组)U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性。再采用 GraphPad Prism 8 软件绘制 U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性与替莫唑胺浓度的标准曲线,并计算替莫唑胺半数抑制浓度(IC₅₀)。

7. Western blotting 法检测目的蛋白表达量

(1)PKM2 蛋白的核质定位:将 F3-T3 转染组和空载体转染组细胞(U87MG 和 U251MG)各接种于 2 个培养皿(规格:100 mm),加入替莫唑胺 100 $\mu\text{mol/L}$,48 h 后一皿提取核质蛋白、另一皿提取总蛋白,BCA 法检测总蛋白提取物、胞质提取物、胞核提取物蛋白含量;并行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),聚偏二氟乙烯(PVDF)转膜,以质量分数为 5% 胎牛血清白蛋白 V 的封闭液封闭 2 h,加入 I 抗工作液包括兔源性抗 PKM2 单克隆抗体、兔源性抗 LAMIN A/C 多克隆抗体和鼠源性抗 GAPDH 单克隆抗体(均 1:1000),再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG II 抗和山羊抗兔 IgG II 抗(均 1:3000),凝胶成像系统采集目的条带,以 GAPDH 作为胞质提取物的内参照物、LAMIN A/C 作为胞核提取物的内参照物,观察总蛋白提取物、胞质提取物和胞核提取物 PKM2 蛋白表达情况。(2)转染 siRNA 后 PKM2 蛋白相对表达量:瞬时转染 siRNA 敲低

PKM2 基因表达后,行 SDS-PAGE、转膜、封闭,加入 I 抗工作液包括兔源性抗 PKM2 单克隆抗体(1:1000)和鼠源性抗人 β -actin 单克隆抗体(1:3000),再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG II 抗和山羊抗兔 IgG II 抗(均 1:3000),凝胶成像系统采集目的条带,采用 Image J 软件分析目的条带的灰度值,以 β -actin 作为内参照物,计算 PKM2 蛋白相对表达量并筛选出 PKM2 基因敲低效果最佳的 siRNA。(3)p-H2AX 蛋白相对表达量:将 F3-T3 转染组和空载体转染组细胞(U87MG 和 U251MG)接种于培养皿(规格:100 mm),加入替莫唑胺 100 $\mu\text{mol/L}$,48 h 后更换为不含替莫唑胺的新鲜 DMEM 完全培养基,于更换培养基后即刻、24、36 和 48 h 提取总蛋白,BCA 法检测总蛋白含量;并行 SDS-PAGE、PVDF 转膜、封闭,加入 I 抗工作液包括鼠源性抗 p-H2AX 单克隆抗体(1:1000)、鼠源性抗人 β -actin 单克隆抗体(1:3000),再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG II 抗(1:3000),凝胶成像系统采集目的条带,Image J 软件分析目的条带灰度值,以 β -actin 作为内参照物,计算 p-H2AX 蛋白相对表达量。(4)转染 siRNA 后 p-H2AX 蛋白相对表达量:将 F3-T3 转染组和空载体转染组细胞(U87MG 和 U251MG)接种于培养皿(规格:100 mm),实验组转染筛选出的敲低 PKM2 基因效果最佳的 siRNA、对照组不转染,24 h 后均加入替莫唑胺 100 $\mu\text{mol/L}$,48 h 后更换为不含替莫唑胺的新鲜 DMEM 完全培养基,分别于更换培养基后 24 和 48 h 提取总蛋白,BCA 法检测总蛋白含量;并行 SDS-PAGE、转膜、封闭,加入 I 抗工作液包括鼠源性抗 p-H2AX 单克隆抗体(1:1000)和鼠源性抗人 β -actin 单克隆抗体(1:3000),再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG II 抗和山羊抗兔 IgG II 抗(均 1:3000),凝胶成像系统采集目的条带,Image J 软件分析目的条带灰度值,以 β -actin 作为内参照物,计算 p-H2AX 蛋白相对表达量。

8. 统计分析方法 采用 GraphPad Prism8 软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

CCK-8 细胞增殖实验显示,经替莫唑胺 640、320、160、80、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 72 h 后,F3-T3 转染组

表 1 梯度浓度替莫唑胺处理后 F3-T3 转染组与空载体转染组 U87MG 和 U251MG 细胞存活率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)**Table 1.** Comparison of the survival rates of U87MG and U251MG cells between F3-T3 transfected group and empty vector transfected group under different concentrations of TMZ ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本数*	替莫唑胺 ($\mu\text{mol/L}$)									
		640	320	160	80	40	20	10	5	2.50	
U87MG											
空载体转染组	5	53.96 ± 4.52	65.96 ± 1.89	67.66 ± 2.57	70.67 ± 5.57	75.15 ± 3.06	79.48 ± 2.27	85.19 ± 3.02	89.83 ± 3.67	94.09 ± 3.39	
F3-T3 转染组	5	88.70 ± 4.40	90.46 ± 4.73	90.97 ± 4.56	84.22 ± 3.99	85.45 ± 5.26	83.78 ± 4.97	82.26 ± 5.73	85.24 ± 10.82	93.43 ± 6.02	
<i>t</i> 值		11.021	9.617	8.913	3.953	3.385	1.574	0.906	0.803	0.758	
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.004	0.010	0.154	0.391	0.445	0.476	
U251MG											
空载体转染组	5	42.09 ± 1.53	51.75 ± 1.03	54.71 ± 4.06	59.34 ± 2.20	73.95 ± 3.97	83.78 ± 2.21	88.28 ± 4.05	85.37 ± 3.78	91.52 ± 3.39	
F3-T3 转染组	5	89.66 ± 3.32	92.72 ± 2.51	96.68 ± 5.20	91.95 ± 5.52	97.05 ± 5.20	93.02 ± 3.23	92.95 ± 4.85	95.40 ± 2.24	96.70 ± 4.66	
<i>t</i> 值		34.440	16.961	10.863	13.351	4.526	4.723	1.479	4.572	0.410	
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001	0.177	0.002	0.693	

*1500 cells per well at inoculation, 接种细胞数为 1500 个/孔

U87MG 细胞存活率均高于空载体转染组 ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.004, 0.010$); 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 72 h 后, F3-T3 转染组 U251MG 细胞存活率亦高于空载体转染组 ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.002, 0.001, 0.002$; 表 1)。进一步计算两组细胞替莫唑胺半数抑制浓度, 空载体转染组 U87MG 细胞 IC_{50} 值 236.80 $\mu\text{mol/L}$ 、F3-T3 转染组为 2827 $\mu\text{mol/L}$ 、空载体转染组 U251MG 细胞 IC_{50} 值 259.20 $\mu\text{mol/L}$ 、F3-T3 转染组为 4207 $\mu\text{mol/L}$ 。

胶质母细胞瘤动物模型显示, 不同时间点替莫唑胺组与对照组荷瘤鼠肿瘤荧光信号强度变化趋势无显著差异, 两组荧光信号强度亦无显著差异, 表明替莫唑胺组荷瘤鼠的肿瘤生长未受明显抑制 (图 1)。

基因富集分析显示, F3-T3 融合蛋白的生物学功能显著富集于 DNA 修复等通路 ($P = 0.000$, 图 2)。基于 TCGA 数据库的生物信息学分析显示, 胶质瘤患者 *PKM2* 基因高表达组生存率和总生存期均低于 *PKM2* 基因低表达组 ($P < 0.05$, 图 3)。

Western blotting 法显示, 经替莫唑胺处理 48 h 再更换培养基后 24、36 和 48 h, F3-T3 转染组 U87MG ($P = 0.000, 0.000, 0.004$) 和 U251MG ($P = 0.000, 0.007, 0.005$) 细胞 p-H2AX 蛋白相对表达量低于空载体转染组, 表明稳定表达 F3-T3 融合基因的肿瘤细胞可修复替莫唑胺造成的 DNA 损伤 (图 4, 表 2)。

Western blotting 法显示, F3-T3 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞均可见明显的 *PKM2* 入核, 而空载体转染组细胞未见这一现象 (图 5)。各 siRNA 转染组 U87MG ($F = 26.182, P = 0.002$) 和 U251MG ($F = 176.623, P = 0.004$) 细胞 *PKM2* 蛋白相对表达量差异均有统计学意义 (表 3), 其中, si-*PKM2*-1009 转染组 U87MG 细胞 *PKM2* 蛋白相对表达量降低最显著 ($P = 0.000, 0.001, 0.006$; 表 4, 图 6a), si-*PKM2*-1377 转染组 U251MG 细胞 *PKM2* 蛋白相对表达量降低最显著 ($P = 0.000, 0.000, 0.000$; 表 4, 图 6b)。因此, 后续实验选用 si-*PKM2*-1009 敲低 U87MG 细胞 *PKM2* 基因表达、si-*PKM2*-1377 敲低 U251MG 细胞 *PKM2* 基因表达。

CCK-8 细胞增殖实验结果显示, 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、10、5 和 2.50 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, si-*PKM2*-1009 转染组 U87MG 细胞存活率均低于 F3-T3 转染组 ($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.012, 0.006, 0.030, 0.000, 0.007, 0.025$); 经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20、5 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, si-*PKM2*-1377 转染组 U251MG 细胞存活率亦低于 F3-T3 转染组 ($P = 0.000, 0.000, 0.002, 0.000, 0.002, 0.048, 0.042$; 表 5), 表明敲低 *PKM2* 基因表达可使稳定表达 F3-T3 融合基因的肿瘤细胞对替莫唑胺耐药性下降。进一步计算两组细胞替莫唑胺半数抑制浓度, F3-T3 转染组 U87MG 细胞 IC_{50} 值为 2938 $\mu\text{mol/L}$ 、si-*PKM2*-1009

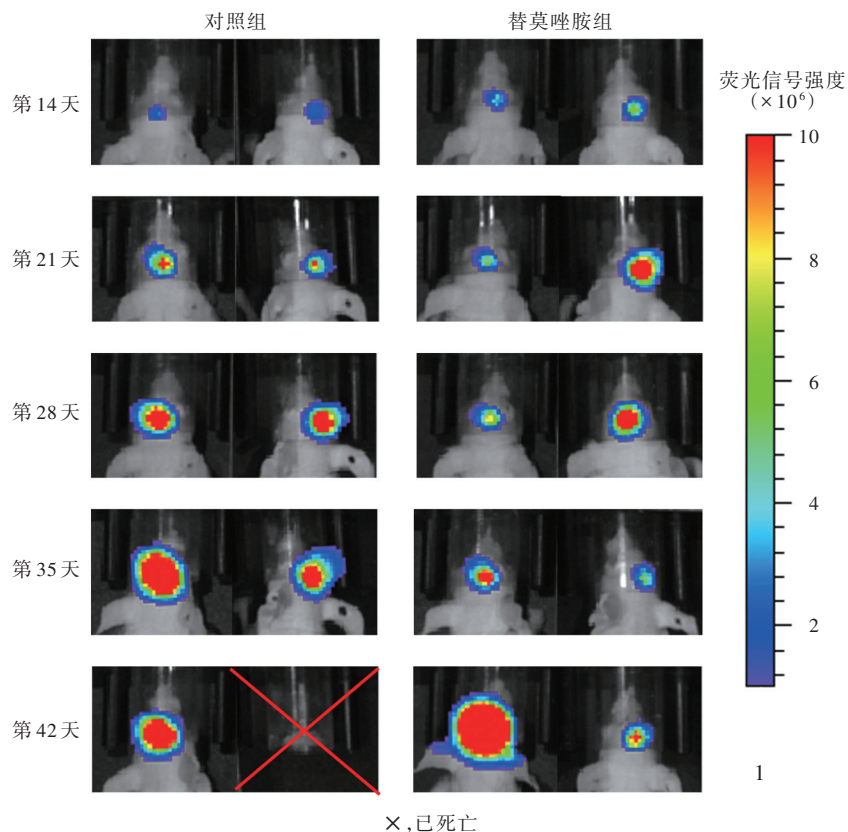


图1 小动物活体成像系统显示,细胞接种后第14、21、28、35和42天,替莫唑胺组与对照组荷瘤鼠肿瘤荧光信号强度变化趋势无明显差异,两组荧光信号强度亦无明显差异

Figure 1 Small animal in vivo imaging showed that there was no significant difference in the trend of tumor fluorescence signal intensity change between TMZ group and control group of homozygous mice on the 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd day after cell injection, and there was also no significant difference in the fluorescence signal intensity between the 2 groups.

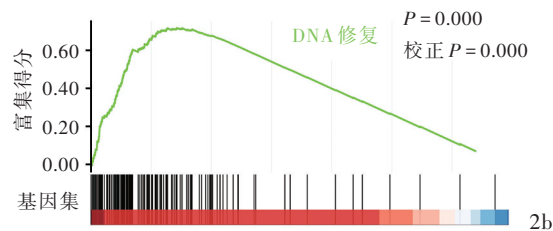
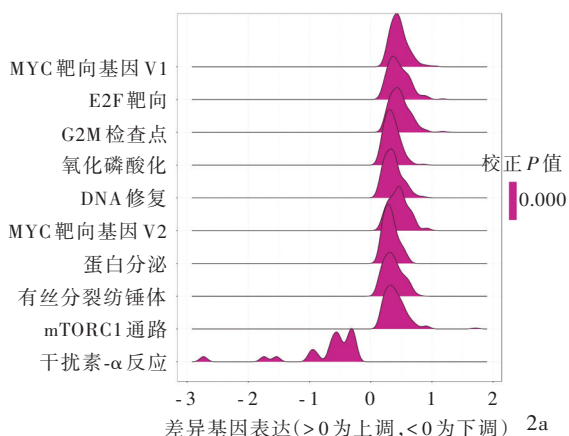


图2 基因富集分析所见 2a DNA修复通路差异基因表达显著上调($P = 0.000$) 2b 差异表达基因显著富集于DNA修复通路($P = 0.000$)

Figure 2 GSEA analysis showed that differently expressed genes DNA repair pathway significantly upregulated ($P = 0.000$, Panel 2a), and differently expressed genes significantly enriched in DNA repair pathway ($P = 0.000$, Panel 2b).

转染组为 272.30 $\mu\text{mol/L}$, F3-T3 转染组 U251MG 细胞 IC_{50} 值为 1252 $\mu\text{mol/L}$ 、si-PKM2-1377 转染组为 192.80 $\mu\text{mol/L}$ 。

Western blotting 法结果显示,经替莫唑胺处理后 siRNA 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞 DNA 损伤程度均明显高于 F3-T3 转染组(图 7)。经替莫唑胺

处理 48 h 并换液后 24 和 48 h, siRNA 转染组的 U87MG ($P = 0.000, 0.000$) 和 U251MG ($P = 0.000, 0.000$) 细胞 p-H2AX 蛋白相对表达量均高于 F3-T3 转染组(表 6)。

CCK-8 细胞增殖实验结果显示,经替莫唑胺 640、320、160、80、40、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 72 h 后, TMZ +

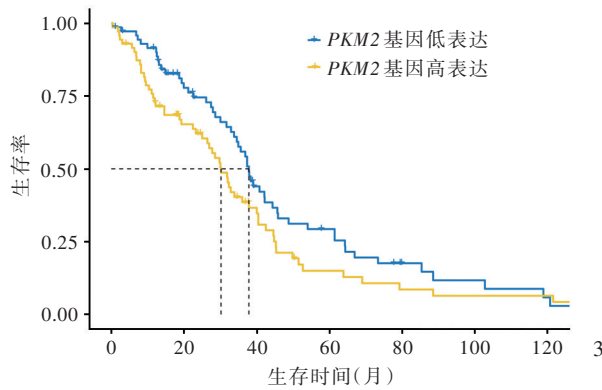


图3 基于TCGA数据库的生存分析显示,胶质瘤患者PKM2基因高表达组生存率和总生存期均低于PKM2基因低表达组($P < 0.05$)

Figure 3 Survival analysis curves based on the TCGA database showed that the survival rate and overall survival of glioma patients in the PKM2 gene high-expression group were lower than those in the PKM2 gene low-expression group ($P < 0.05$).

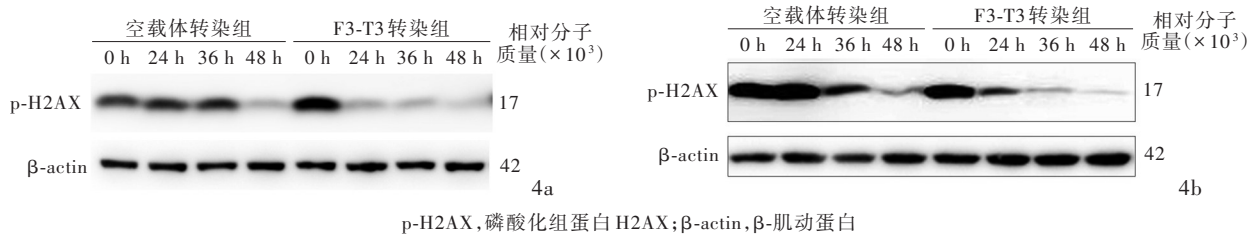


图4 Western blotting法所见 4a 替莫唑胺处理24、36和48 h时F3-T3转染组U87MG细胞p-H2AX蛋白相对表达量均低于空载体转染组 4b 替莫唑胺处理24、36和48 h时F3-T3转染组U251MG细胞p-H2AX蛋白相对表达量均低于空载体转染组

Figure 4 Western blotting showed significantly lower p-H2AX expression in U87MG cells (Panel 4a) and U251MG cells (Panel 4b) in F3-T3 transfected group than those in empty vector transfected group at 24, 36 and 48 h.

表2 替莫唑胺处理后不同时间点F3-T3转染组与空载体转染组U87MG和U251MG细胞p-H2AX蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

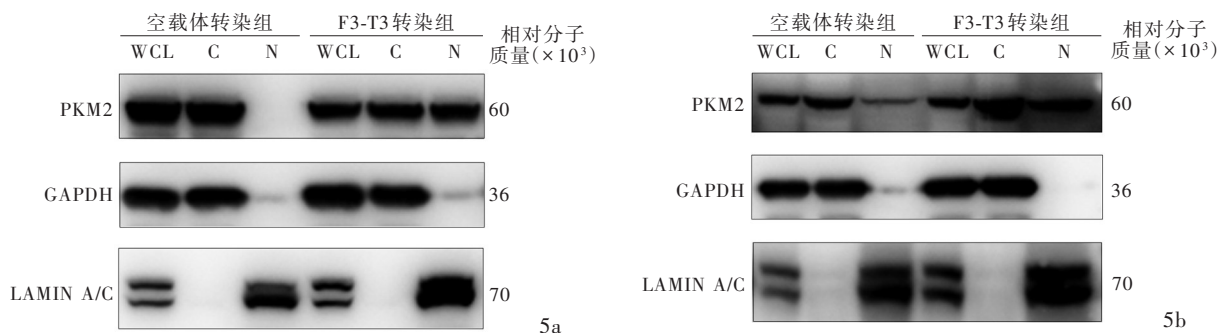
Table 2. Relative expression of p-H2AX in U87MG and U251MG cells between F3-T3 transfected group and empty vector transfected group at different time points after TMZ treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数*	0 h	24 h	36 h	48 h
U87MG					
空载体转染组	3	1.79 ± 0.17	1.85 ± 0.18	2.02 ± 0.11	0.28 ± 0.05
F3-T3转染组	3	1.72 ± 0.20	0.33 ± 0.11	0.23 ± 0.00	0.05 ± 0.02
<i>t</i> 值		0.357	10.261	22.570	5.848
<i>P</i> 值		0.739	0.000	0.000	0.004
组别	样本数*	0 h	24 h	36 h	48 h
U251MG					
空载体转染组	3	1.50 ± 0.14	1.64 ± 0.04	0.89 ± 0.18	0.33 ± 0.06
F3-T3转染组	3	1.20 ± 0.07	0.47 ± 0.08	0.21 ± 0.02	0.10 ± 0.01
<i>t</i> 值		2.679	20.020	5.077	5.560
<i>P</i> 值		0.055	0.000	0.007	0.005

* 1×10^6 cells per dish at inoculation, 细胞接种数为 1×10^6 个/皿

Compound 3k组U87MG细胞存活率低于TMZ组($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.001, 0.002$);且经高浓度(640、320、160、80和40 $\mu\text{mol/L}$)替莫唑胺处理72 h后,TMZ + Compound 3k组U251MG细胞存活率亦低于TMZ组($P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.003$),而经低浓度(10、5和2.50 $\mu\text{mol/L}$)替莫唑胺处理后,TMZ + Compound 3k组U251MG细胞存活率

高于TMZ组($P = 0.000, 0.000, 0.006$;表7),并认为这一现象与细胞生长活性的差异有关,而与药物作用无关。进一步计算两组细胞替莫唑胺半数抑制浓度,TMZ组U87MG细胞 IC_{50} 值为3684 $\mu\text{mol/L}$ 、TMZ + Compound 3k组为211.10 $\mu\text{mol/L}$ 、TMZ组U251MG细胞 IC_{50} 值为1039 $\mu\text{mol/L}$ 、TMZ + Compound 3k组为197.90 $\mu\text{mol/L}$ 。



WCL,总蛋白提取物;C,胞质提取物;N,胞核提取物;PKM2,丙酮酸激酶 M2;GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶
图 5 Western blotting法所见 5a F3-T3转染组U87MG细胞核部分发生明显PKM2蛋白富集 5b F3-T3转染组U251MG细胞核部分发生明显PKM2蛋白富集

Figure 5 Western blotting showed that significant enrichment of PKM2 in the nuclear fraction of U87MG cells (Panel 5a) and U251MG cells (Panel 5b) in *F3-T3* transfected group compared to empty vector transfected group.

表 3 不同 siRNA 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞 PKM2 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Comparison of relative expression of PKM2 of U87MG and U251MG cells in different siRNA transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

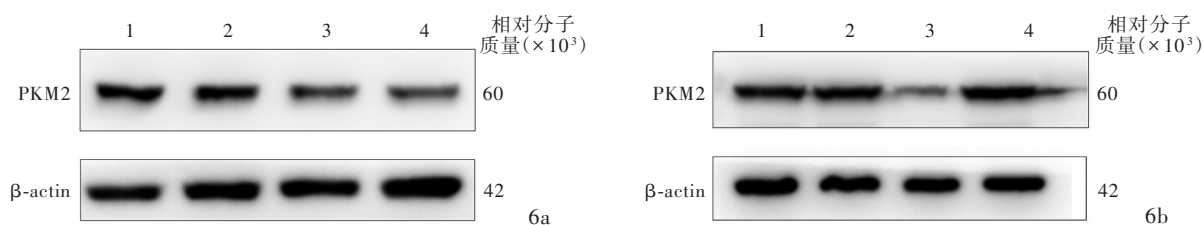
组别	样本数*	U87MG	U251MG
si-PKM2-control组(1)	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
si-PKM2-819转染组(2)	3	0.87 ± 0.13	1.19 ± 0.11
si-PKM2-1377转染组(3)	3	0.75 ± 0.16	0.39 ± 0.01
si-PKM2-1009转染组(4)	3	0.37 ± 0.06	1.49 ± 0.06
<i>F</i> 值		26.182	176.623
<i>P</i> 值		0.002	0.004

*50 × 10³ cells per well at inoculation,接种细胞数 50 × 10³ 个/孔

表 4 不同 siRNA 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞 PKM2 蛋白相对表达量的两两比较

Table 4. Pairwise comparison of relative expression of PKM2 of U87MG and U251MG cells in different siRNA transfection groups

组间两两比	U87MG		U251MG	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) : (2)	1.776	0.150	3.587	0.023
(1) : (3)	2.693	0.055	18.441	0.000
(1) : (4)	13.021	0.000	14.472	0.000
(2) : (3)	1.154	0.313	20.574	0.000
(2) : (4)	7.020	0.001	7.893	0.001
(3) : (4)	3.987	0.006	108.012	0.000



1, si-PKM2-control组;2, si-PKM2-819转染组;3, si-PKM2-1377转染组;4, si-PKM2-1009转染组
 PKM2,丙酮酸激酶 M2;β-actin,β-肌动蛋白

图 6 Western blotting法所见 6a si-PKM2-1009敲低F3-T3转染组U87MG细胞PKM2基因的效果最佳 6b si-PKM2-1377敲低F3-T3转染组U251MG细胞PKM2基因的效果最佳

Figure 6 Western blotting showed that si-PKM2-1009 had the best effect of knocking down *PKM2* gene in U87MG cells of *F3-T3* transfected group (Panel 6a) and si-PKM2-1377 had the best effect of knocking down *PKM2* gene in U251MG cells of *F3-T3* transfected group (Panel 6b).

讨 论

*F3-T3*是罕见的染色体重排形成的融合基因,最早见于胶质母细胞瘤,是其相对少见的基因组遗传性改变,*F3-T3*融合基因在胶质母细胞瘤中发生率为3.1%~12.0%^[2,5]。Di Stefano等^[7]认为,*F3-T3*融

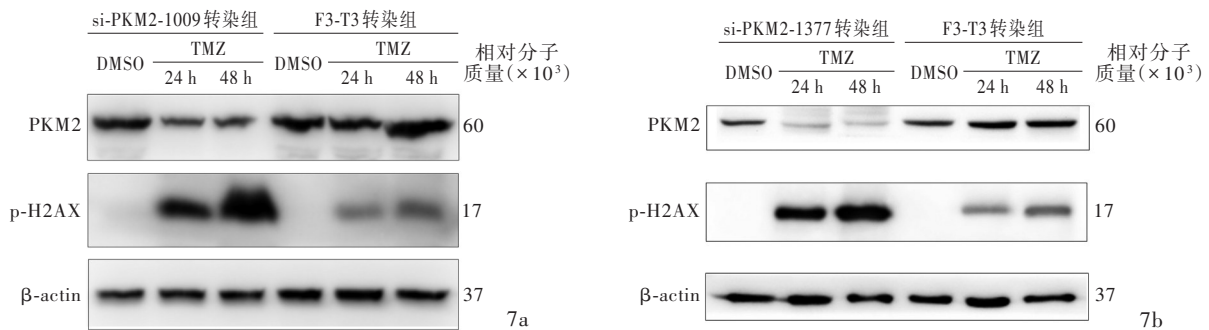
合基因仅表达于胶质母细胞瘤,IDH野生型(3.5%),而不表达于胶质母细胞瘤,IDH突变型。*F3-T3*融合基因与其他致癌性受体酪氨酸激酶(RTK)通路如表皮生长因子受体(EGFR)通路、血小板源性生长因子受体-α(PDGFR-α)通路和间质上皮细胞转化因子(MET)通路变异相互排斥,而且,*F3-T3*基因融

表 5 梯度浓度替莫唑胺处理后 F3-T3 转染组与 siRNA 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞存活率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 5. Comparison of the survival rates of U87MG and U251MG cells between F3-T3 transfected group and siRNA transfected group under different concentrations of TMZ ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本数*	替莫唑胺($\mu\text{mol/L}$)								
		640	320	160	80	40	20	10	5	2.50
U87MG										
F3-T3 转染组	5	84.80 ± 2.15	88.22 ± 5.97	82.19 ± 3.10	80.64 ± 5.44	85.56 ± 4.14	90.14 ± 3.05	95.63 ± 4.04	97.05 ± 3.51	95.91 ± 2.42
si-PKM2-1009 转染组	5	43.67 ± 5.38	64.60 ± 5.97	69.58 ± 4.43	68.39 ± 5.32	74.97 ± 3.93	78.78 ± 8.06	77.47 ± 4.05	82.47 ± 7.18	85.06 ± 7.51
<i>t</i> 值		14.581	8.922	7.705	3.917	3.709	2.636	6.348	3.648	2.751
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.012	0.006	0.030	0.000	0.007	0.025
U251MG										
F3-T3 转染组	5	81.91 ± 4.37	83.62 ± 7.20	80.19 ± 7.09	84.16 ± 5.14	91.03 ± 1.96	89.56 ± 8.70	100.74 ± 1.18	95.61 ± 6.11	92.07 ± 5.90
si-PKM2-1377 转染组	5	49.38 ± 4.91	56.03 ± 1.66	60.24 ± 4.88	61.04 ± 5.38	62.24 ± 2.70	79.05 ± 2.37	88.58 ± 5.11	83.65 ± 6.30	88.80 ± 4.75
<i>t</i> 值		0.896	7.463	4.636	6.217	4.699	2.331	1.978	2.727	0.864
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.002	0.000	0.002	0.048	0.083	0.042	0.413

*1500 cells per well at inoculation, 接种细胞数为 1500 个/孔



DMSO, 二甲基亚砜; TMZ, 替莫唑胺; PKM2, 丙酮酸激酶 M2; p-H2AX, 磷酸化组蛋白 H2AX; β -actin, β -肌动蛋白

图 7 Western blotting 法所见 7a 稳定表达 F3-T3 融合基因的 U87MG 细胞敲低 PKM2 基因后 DNA 损伤显著加重 7b 稳定表达 F3-T3 融合基因的 U251MG 细胞敲低 PKM2 基因后 DNA 损伤显著加重

Figure 7 Western blotting showed that U87MG (Panel 7a) and U251MG (Panel 7b) cells stably expressing F3-T3 had worsening DNA damage after PKM2 gene knockdown.

表 6 替莫唑胺处理后不同时间点 F3-T3 转染组与 siRNA 转染组 U87MG 和 U251MG 细胞 p-H2AX 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6. Comparison of relative expression of p-H2AX in U87MG and U251MG cells between F3-T3 transfected group and siRNA transfected group at different time points after TMZ treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数*	24 h	48 h	组别	样本数*	24 h	48 h
U87MG				U251MG			
F3-T3 转染组	3	0.49 ± 0.02	0.52 ± 0.05	F3-T3 转染组	3	0.35 ± 0.01	0.44 ± 0.02
si-PKM2-1009 转染组	3	1.09 ± 0.06	1.59 ± 0.04	si-PKM2-1377 转染组	3	0.86 ± 0.02	1.33 ± 0.03
<i>t</i> 值		12.711	24.052	<i>t</i> 值		40.820	36.840
<i>P</i> 值		0.000	0.000	<i>P</i> 值		0.000	0.000

* 1×10^6 cells per dish at inoculation, 接种时细胞数为 1×10^6 个/皿

合较少与 EGFR 基因扩增同时发生, 表达 F3-T3 融合基因的胶质母细胞瘤细胞也很少发生 TP53 基因变异。F3-T3 融合基因独特的分子特征使表达 F3-T3

融合基因的胶质母细胞瘤, IDH 野生型患者具有更长的生存预期, 靶向 F3-T3 融合基因可发挥出更理想的治疗效果^[8-11]。因此认为, 针对 F3-T3 融合基因

表 7 梯度浓度替莫唑胺处理后 TMZ 组与 TMZ + Compound 3k 组 U87MG 和 U251MG 细胞存活率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)Table 7. Comparison of the survival rates of U87MG and U251MG cells between TMZ group and TMZ + Compound 3k group under different concentrations of TMZ ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本数*	替莫唑胺($\mu\text{mol/L}$)								
		640	320	160	80	40	20	10	5	2.50
U87MG										
TMZ 组	5	88.20 \pm 2.12	99.07 \pm 6.67	100.58 \pm 11.19	97.16 \pm 4.74	97.86 \pm 6.46	98.70 \pm 6.60	99.01 \pm 7.67	101.92 \pm 6.24	102.40 \pm 7.45
TMZ + Compound 3k 组	5	31.55 \pm 6.21	48.61 \pm 3.05	61.91 \pm 2.98	71.01 \pm 5.47	74.99 \pm 5.54	83.24 \pm 6.67	95.49 \pm 4.50	98.54 \pm 7.60	101.06 \pm 8.39
t 值		27.271	13.772	6.677	7.224	5.371	4.148	2.140	0.688	0.818
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.065	0.511	0.237
U251MG										
TMZ 组	5	85.36 \pm 4.72	81.80 \pm 2.36	83.29 \pm 2.20	77.40 \pm 8.66	82.00 \pm 3.66	80.60 \pm 6.12	75.38 \pm 1.74	81.65 \pm 4.74	86.92 \pm 4.92
TMZ + Compound 3k 组	5	51.59 \pm 1.81	56.44 \pm 3.85	53.83 \pm 3.87	56.95 \pm 3.48	69.90 \pm 4.41	83.09 \pm 4.75	92.81 \pm 2.70	93.07 \pm 3.08	99.11 \pm 4.41
t 值		13.350	11.231	13.230	4.385	4.222	0.642	10.850	4.040	3.688
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.539	0.000	0.000	0.006

*1500 cells per well at inoculation, 细胞接种数为 1500 个/孔。TMZ, temozolomide, 替莫唑胺

的研究可能为携带该融合基因患者的个体化治疗和生存期改善提供良好前景。

F3-T3 融合蛋白由大部分 FGFR3 蛋白结构域和小部分 TACC3 蛋白结构域组成,这一特殊结构使其具有组成性激酶活性,最终导致 FGFR 信号转导通路持续激活。FGFR 信号转导通路通过基因组改变(如点突变、融合、扩增、异常剪接)实现自身异常激活,引起多个下游通路过度激活,进而促进肿瘤细胞增殖、存活、分化和迁移。对尿路上皮癌患者的血浆标本行第二代测序,发现 20% 发生 *FGFR2* 和 *FGFR3* 基因变异,其中 14% 的变异可引起 FGFR 信号转导通路异常激活^[12]。FGFR 信号转导通路异常激活被认为与胶质瘤基因毒性治疗(放射治疗和药物化疗)抵抗相关,例如,FGFR2 信号转导通路异常激活可诱导胶质瘤细胞对放射治疗产生抵抗,FGFR2 磷酸化激活其下游底物同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN),促进 DNA 损伤修复,最终介导放射治疗抵抗^[13]。本研究构建稳定表达 F3-T3 融合基因的胶质母细胞瘤细胞系(U87MG 和 U251MG),CCK-8 细胞增殖实验显示,经替莫唑胺(640、320、160、80、40 $\mu\text{mol/L}$)处理后 F3-T3 转染组 U87MG 细胞存活率均高于空载体转染组,经替莫唑胺(640、320、160、80、40、20、5 $\mu\text{mol/L}$)处理后 F3-T3 转染组 U251MG 细胞存活率亦高于空载体转染组,并且在替莫唑胺最大浓度(640 $\mu\text{mol/L}$)处理下,F3-T3 转染组

U87MG 细胞存活率达 88.70%、U251MG 细胞达 89.66%,表明 F3-T3 融合基因可以诱导胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺耐药;进一步构建胶质母细胞瘤裸鼠模型,发现荷瘤表达 F3-T3 融合基因的胶质母细胞瘤小鼠对替莫唑胺无明显效果,证实稳定表达 F3-T3 融合基因的荷瘤鼠对替莫唑胺耐药。

胶质瘤细胞基因组暴露于基因毒性因素时,基因组完整性破坏,肿瘤细胞可通过多种机制启动对基因毒性治疗的耐药,如 DNA 损伤修复、肿瘤干细胞激活、细胞凋亡逃逸和代谢重编程(metabolic reprogramming)等^[14],其中,DNA 损伤修复是肿瘤细胞维持基因组完整性的主要方式。替莫唑胺是胶质瘤临床治疗的一线烷化剂,可造成肿瘤细胞包括碱基错配、单链和双链断裂在内的多种基因组损伤,尤以双链断裂是最严重、最致命的损伤类型,也是基因毒性治疗发挥抗癌作用的主要作用机制^[15]。本研究采用基因芯片转录组数据进行基因富集分析,发现 F3-T3 融合蛋白的生物学功能显著富集于 DNA 损伤修复通路,而用于富集分析的基因芯片数据未经替莫唑胺处理^[16],故不排除 F3-T3 融合基因还可能通过其他机制如肿瘤细胞凋亡逃逸以实现替莫唑胺耐药。p-H2AX 是一种检测 DNA 损伤的敏感指标,DNA 损伤如双链断裂时 p-H2AX 可以被招募至 DNA 损伤部位^[17],本研究 Western blotting 结果显示,经替莫唑胺处理后 24、36 和 48 小时,稳定

表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤细胞(U87MG 和 U251MG)DNA 双链断裂标志物 p-H2AX 相对表达量均降低,提示稳定表达 *F3-T3* 融合基因的肿瘤细胞可修复替莫唑胺造成的 DNA 损伤。

F3-T3 融合蛋白是一种酪氨酸激酶受体,其信号传导需相应的下游底物承担。胰腺癌细胞中 PKM2 蛋白与肾上腺素受体(EphR)家族和 FGFR 家族(FGFR1、FGFR3、FGFR4)等受体酪氨酸激酶家族存在较强的结合能力^[18],此外,在 *F3-T3* 相互作用蛋白中^[16]仅 PKM2 蛋白与 DNA 修复过程相关^[19-21]。PKM2 蛋白是细胞糖酵解过程中关键酶丙酮酸激酶同工酶 M2 亚型,肿瘤细胞 PKM2 蛋白可促进有氧糖酵解,为肿瘤细胞获得生长优势^[22]。近年来,PKM2 蛋白在肿瘤发生发展过程中的非代谢功能亦受到关注,PKM2 蛋白可促进肿瘤细胞增殖,并进入胞核内发挥转录调控作用^[23];胰腺导管腺癌细胞中 PKM2 蛋白发生核易位,介导肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)诱导的细胞程序性死亡蛋白配体 1(PDL1)过表达和免疫抑制^[24]。本研究 Western blotting 法显示,经替莫唑胺处理后,稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤细胞(U87MG 和 U251MG)PKM2 蛋白发生明显的核内富集,而未表达 *F3-T3* 融合基因的细胞则无此现象;通过 siRNA 敲低 *PKM2* 基因表达,CCK-8 细胞增殖实验显示,稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤细胞(U87MG 和 U251MG)存活率明显降低,表明敲低 *PKM2* 基因表达可以减弱 *F3-T3* 融合基因介导的胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的耐药作用;再行 Western blotting 法显示,敲低 *PKM2* 基因表达后,p-H2AX 蛋白相对表达量明显升高,表明敲低 *PKM2* 基因表达阻碍稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤细胞的 DNA 损伤修复,上述研究结果均表明 *F3-T3* 融合基因通过促进 PKM2 入核介导 DNA 损伤修复,最终引发胶质母细胞瘤细胞的替莫唑胺耐药。

PKM2 蛋白是肿瘤治疗的理想靶点,靶向 PKM2 蛋白可减弱细胞代谢,进而抑制肿瘤生长,并抑制 PKM2 蛋白相关致癌机制。研究显示,联合应用 PKM2 抑制剂可增强卵巢癌细胞对化疗药物奥拉帕尼的敏感性,并能干扰 DNA 损伤修复过程^[25]。相较紫草素、二甲双胍和维生素 K 等传统 PKM2 抑制剂,Compound 3k 具有更强的 PKM2 抑制作用和更高的选择性^[26]。本研究 CCK-8 细胞增殖实验显示,联合应用 PKM2 抑制剂 Compound 3k 后,稳定表达 *F3-T3*

融合基因的胶质母细胞瘤细胞(U87MG 和 U251MG)存活率明显降低,表明 PKM2 抑制剂可阻碍 *F3-T3* 融合基因介导的替莫唑胺耐药,提示对于稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤,PKM2 蛋白可能成为治疗靶点。此外,近期一项关于选择性 FGFR1~3 抑制剂英菲替尼(Infigratinib/BGJ398)治疗携带 *FGFR* 基因变异的胶质瘤的多中心 II 期临床试验显示,4 例患者疾病控制持续时间超过 1 年,其中 1 例为 *F3-T3* 融合基因携带者^[27],提示靶向 *F3-T3* 融合基因有可能成为可供选择的治疗方案。

本研究初步探讨 *F3-T3* 融合基因及 *F3-T3* 融合蛋白引发胶质瘤替莫唑胺耐药的作用机制,确认 PKM2 蛋白是连接 *F3-T3* 融合蛋白与替莫唑胺耐药的重要节点蛋白,并发现 PKM2 抑制剂可在体外逆转稳定表达 *F3-T3* 融合基因的胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的耐药。然而,本研究亦存在不足之处,*F3-T3* 融合蛋白与 PKM2 蛋白之间的相互作用关系以及 PKM2 入核后参与 DNA 损伤修复的具体机制尚待进一步探索,替莫唑胺 + PKM2 抑制剂的联合用药方案仅进行体外研究,尚待动物实验进一步验证。后续将深入探究 *F3-T3* 融合蛋白与 PKM2 蛋白的相互作用关系,明确 PKM2 入核后的核内机制,同时建立动物模型以验证替莫唑胺联合 PKM2 抑制剂方案的可行性和有效性。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15:405-417.
- [2] Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, Liu EM, Reichel J, Porrati P, Pellegatta S, Qiu K, Gao Z, Ceccarelli M, Riccardi R, Brat DJ, Guha A, Aldape K, Golfinos JG, Zagzag D, Mikkelsen T, Finocchiaro G, Lasorella A, Rabadan R, Iavarone A. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma[J]. Science, 2012, 337: 1231-1235.
- [3] Li T, Mehraein-Ghomi F, Forbes ME, Namjoshi SV, Ballard EA, Song Q, Chou PC, Wang X, Parker Kerrigan BC, Lang FF, Lesser G, Debinski W, Yang X, Zhang W. HSP90 - CDC37 functions as a chaperone for the oncogenic FGFR3 - TACC3 fusion[J]. Mol Ther, 2022, 30:1610-1627.
- [4] Sarkar S, Ryan EL, Royle SJ. FGFR3 - TACC3 cancer gene fusions cause mitotic defects by removal of endogenous TACC3 from the mitotic spindle[J]. Open Biol, 2017, 7:170080.
- [5] Parker BC, Annala MJ, Cogdell DE, Granberg KJ, Sun Y, Ji P, Li X, Gumin J, Zheng H, Hu L, Yli-Harja O, Haapasalo H, Visakorpi T, Liu X, Liu CG, Sawaya R, Fuller GN, Chen K, Lang FF, Nykter M, Zhang W. The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma[J]. J Clin Invest, 2013, 123:855-865.

- [6] Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, Abate F, Liu Z, Elliott O, Shin YJ, Lee JK, Lee IH, Park WY, Eoli M, Blumberg AJ, Lasorella A, Nam DH, Finocchiaro G, Iavarone A, Rabadan R. Clonal evolution of glioblastoma under therapy[J]. *Nat Gene*, 2016, 48:768-776.
- [7] Di Stefano AL, Fucci A, Frattini V, Labussiere M, Mokhtari K, Zoppoli P, Marie Y, Bruno A, Boisselier B, Giry M, Savatovsky J, Touat M, Belaid H, Kamoun A, Idbaih A, Houillier C, Luo FR, Soria JC, Tabernerero J, Eoli M, Pattera R, Yip S, Petrecca K, Chan JA, Finocchiaro G, Lasorella A, Sanson M, Iavarone A. Detection, characterization, and inhibition of FGFR - TACC fusions in IDH wild-type glioma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 3307-3317.
- [8] Di Stefano AL, Picca A, Saragoussi E, Bielle F, Ducray F, Villa C, Eoli M, Pattera R, Bellu L, Mathon B, Capelle L, Bourg V, Gloaguen A, Philippe C, Frouin V, Schmitt Y, Lerond J, Leclerc J, Lasorella A, Iavarone A, Mokhtari K, Savatovsky J, Alentorn A, Sanson M; TARGET Study Group. Clinical, molecular, and radiomic profile of gliomas with FGFR3-TACC3 fusions[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22:1614-1624.
- [9] Mata DA, Benhamida JK, Lin AL, Vanderbilt CM, Yang SR, Villafania LB, Ferguson DC, Jonsson P, Miller AM, Tabar V, Brennan CW, Moss NS, Sill M, Benayed R, Mellinghoff IK, Rosenblum MK, Arcila ME, Ladanyi M, Bale TA. Genetic and epigenetic landscape of IDH-wildtype glioblastomas with FGFR3-TACC3 fusions[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8:186.
- [10] McDonald MF, Athukuri P, Anand A, Gopakumar S, Jalali A, Patel AJ, Rao G, Goodman JC, Lu HC, Mandel JJ. Varied histomorphology and clinical outcomes of FGFR3-TACC3 fusion gliomas[J]. *Neurosurg Focus*, 2022, 53:E16.
- [11] Wu Z, Lopes Abath Neto O, Bale TA, Benhamida J, Mata D, Turakulov R, Abdullaev Z, Marker D, Ketchum C, Chung HJ, Giannini C, Quezado M, Pratt D, Aldape K. DNA methylation analysis of glioblastomas harboring FGFR3 - TACC3 fusions identifies a methylation subclass with better patient survival[J]. *Acta Neuropathol*, 2022, 144:155-157.
- [12] Grivas P, Kiedrowski LA, Sonpavde GP, Gupta NJ, Vogelzang NJ. Spectrum of FGFR2/3 alterations in cell - free DNA of patients with advanced urothelial carcinoma [J]. *Bladder Cancer*, 2021, 7:1-6.
- [13] Ma J, Benitez JA, Li J, Miki S, Ponte de Albuquerque C, Galatro T, Orellana L, Zanca C, Reed R, Boyer A, Koga T, Varki NM, Fenton TR, Nagahashi Marie SK, Lindahl E, Gahman TC, Shiao AK, Zhou H, DeGroot J, Sulman EP, Cavenee WK, Kolodner RD, Chen CC, Furnari FB. Inhibition of nuclear PTEN tyrosine phosphorylation enhances glioma radiation sensitivity through attenuated DNA repair[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35:504-518.
- [14] Lang F, Liu Y, Chou FJ, Yang C. Genotoxic therapy and resistance mechanism in gliomas [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 228:107922.
- [15] Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876:188616.
- [16] Frattini V, Pagnotta SM, Tala, Fan JJ, Russo MV, Lee SB, Garofano L, Zhang J, Shi P, Lewis G, Sanson H, Frederick V, Castano AM, Cerulo L, Rolland DCM, Mall R, Mokhtari K, Elenitoba - Johnson KSJ, Sanson M, Huang X, Ceccarelli M, Lasorella A, Iavarone A. A metabolic function of FGFR3 - TACC3 gene fusions in cancer[J]. *Nature*, 2018, 553:222-227.
- [17] Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy[J]. *J Nucleic Acids*, 2010:920161.
- [18] Zhou Z, Li M, Zhang L, Zhao H, Şahin Ö, Chen J, Zhao JJ, Songyang Z, Yu D. Oncogenic kinase-induced PKM2 tyrosine 105 phosphorylation converts nononcogenic PKM2 to a tumor promoter and induces cancer stem-like cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78:2248-2261.
- [19] Sizemore ST, Zhang M, Cho JH, Sizemore GM, Hurwitz B, Kaur B, Lehman NL, Ostrowski MC, Robe PA, Miao W, Wang Y, Chakravarti A, Xia F. Pyruvate kinase M2 regulates homologous recombination-mediated DNA double-strand break repair [J]. *Cell Res*, 2018, 28:1090-1102.
- [20] Wu S, Cao R, Tao B, Wu P, Peng C, Gao H, Liang J, Yang W. Pyruvate facilitates FACT - mediated γ H2AX loading to chromatin and promotes the radiation resistance of glioblastoma [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9:e2104055.
- [21] Xia L, Wang XR, Wang XL, Liu SH, Ding XW, Chen GQ, Lu Y. A novel role for pyruvate kinase M2 as a corepressor for P53 during the DNA damage response in human tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291:26138-26150.
- [22] Zhu S, Guo Y, Zhang X, Liu H, Yin M, Chen X, Peng C. Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics [J]. *Cancer Lett*, 2021, 503:240-248.
- [23] Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase [J]. *Mol Cell*, 2012, 45:598-609.
- [24] Xia Q, Jia J, Hu C, Lu J, Li J, Xu H, Fang J, Feng D, Wang L, Chen Y. Tumor - associated macrophages promote PD - L1 expression in tumor cells by regulating PKM2 nuclear translocation in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2022, 41:865-877.
- [25] Zhou S, Li D, Xiao D, Wu T, Hu X, Zhang Y, Deng J, Long J, Xu S, Wu J, Li G, Peng M, Yang X. Inhibition of PKM2 enhances sensitivity of olaparib to ovarian cancer cells and induces DNA damage[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18:1555-1568.
- [26] Ning X, Qi H, Li R, Li Y, Jin Y, McNutt MA, Liu J, Yin Y. Discovery of novel naphthoquinone derivatives as inhibitors of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138:343-352.
- [27] Lassman AB, Sepúlveda - Sánchez JM, Cloughesy TF, Gil - Gil MJ, Pudukkavalli VK, Raizer JJ, De Vos FYF, Wen PY, Butowski NA, Clement PMJ, Groves MD, Belda-Iniesta C, Giglio P, Soifer HS, Rowsey S, Xu C, Avogadri F, Wei G, Moran S, Roth P. Infigratinib in patients with recurrent gliomas and FGFR alterations: a multicenter phase II study [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28:2270-2277.

(收稿日期:2023-04-21)

(本文编辑:彭一帆)