

去泛素化酶USP7 抑制剂P5091 对脑胶质瘤抑制作用分析

王 英 张 弛 孙兴元*

佳木斯大学 黑龙江 佳木斯 154000

【摘 要】：目的：分析去泛素化酶USP7 抑制剂P5091 对脑胶质瘤的抑制作用。方法：此次实验对象为SD大鼠，研究时间均在 2020.04 月至 2020.04 月，入选例数共 30 例，采用去泛素化酶USP7 抑制剂P5091 处理脑胶质瘤细胞设为研究组，采用DMSO 处理脑胶质瘤细胞设为对照组，两组均开展细胞培养、MTT实验、蛋白印迹、免疫荧光及克隆形成等检查，对比分析两组的检查结果。结果：在肿瘤细胞增殖能力上，研究组低于对照组（ $P<0.05$ ）。在细胞侵袭数减少与细胞迁移数减少上，研究组低于对照组（ $P<0.05$ ）。在细胞凋亡率增加幅度上，研究组高于对照组（ $P<0.05$ ）。结论：去泛素化酶USP7 抑制剂P5091 通过促进细胞凋亡，抑制脑胶质瘤细胞的增殖和转移，为临床治疗脑胶质瘤提供靶点，临床可进一步推广应用。

【关键词】：去泛素化酶USP7；P5091；脑胶质瘤；细胞凋亡

Analysis of the Inhibitory Effect of Deubiquitinase USP7 Inhibitor P5091 on Glioma

Ying Wang Chi Zhang Xingyuan Sun*

Jiamusi University Heilongjiang Jiamusi 154000

Abstract: Objective: To analyze the inhibitory effect of P5091, a USP7 inhibitor, on glioma. Methods: This experiment was conducted on SD rats from April 2020.04 to April 2020.04. A total of 30 patients were enrolled. The glioma cells were treated with P5091, an inhibitor of ubiquitination enzyme USP7, as the study group, and the glioma cells were treated with DMSO as the control group. Cell culture, MTT test, protein blotting, immunofluorescence and cloning were performed in both groups. The results of the two groups were compared and analyzed. Results: The proliferation ability of tumor cells in the study group was lower than that in the control group ($P<0.05$). The number of cell invasion and migration in the study group was lower than that in the control group ($P<0.05$). The increase of apoptosis rate in the study group was higher than that in the control group ($P<0.05$). Conclusion: The inhibitor P5091 of USP7 can promote cell apoptosis, inhibit the proliferation and metastasis of glioma cells, and provide a target for clinical treatment of glioma, which can be further promoted in clinical application.

Keywords: Deubiquitinase USP7; P5091; Glioma; Apoptosis

脑胶质瘤在临床较为常见，是指神经上皮角质细胞与神经元细胞出现异常增殖而生成肿瘤，又被称为神经上皮组织肿瘤，具有较高的发病率。据流行病学统计，在颅内肿瘤中，脑胶质瘤的占比约为 40.00%~50.00%。近些年来，随着脑胶质瘤患病人数的不断增加，如何治疗脑胶质瘤成为临床关注的重点，且对于该疾病的治疗仍是医学难题，现阶段主要通过手术、术后放化疗来治疗该疾病，但其治疗效果不理想^[1]。P5091 作为去泛素化酶USP7 的噻吩类抑制剂，对于去泛素化酶USP7 的活性具有极强的抑制作用，且临床试验已经证实其用于多发性骨髓瘤治疗后的效果显著，但关于其对脑胶质瘤抑制作用的文献报道较少^[2]。鉴于此，本文就去泛素化酶USP7 抑制剂P5091 对脑胶质瘤的抑制作用进行分析，详细报告如下：

1 对象和方法

1.1 对象

此次实验开展时间在 2020.04~2022.04，实验对象为 30 例SD大鼠，按照抑制剂的不同分为对照组与实验组，每组各

15 例。

1.2 方法

两组均开展细胞培养、MTT实验、蛋白印迹、免疫荧光、克隆形成等检查，详细方法如下：

(1) 细胞培养：提前准备好实验操作所需器材，比如无菌枪头、胰蛋白酶、培养皿等，打开 37℃水浴锅，随后打开液氮罐，快速寻找出KYSE450、KYSE30 细胞，并将其放入水浴锅内，快速摇晃冻存管，促使其融化。操作者穿好无菌衣物、佩戴好口罩帽子后进入细胞间进行细胞复苏，将细胞放入细胞培养皿中进行培养。利用负压吸引器吸出细胞培养箱中的旧培养基，利用PBS清洗残留的培养基，清洗结束后加入胰蛋白酶，并将其放入 37℃的培养箱中进行消化，在显微镜下仔细观察细胞的状态，等到细胞脱壁后加入细胞培养基，对细胞进行传代培养。当细胞组织的状态良好时，收取和冻存细胞组织，在冻存前可在显微镜下观察细胞组织的状态和密度。抽出旧的培养基，加入 8ml的PBS后进行清洗，连续清洗两篇后去掉PBS，加入 1ml胰蛋白酶并轻轻摇

胰蛋白酶,促使胰蛋白酶能够完全接触整个皿底,之后放入细胞培养箱,放入时间控制在3min~5min。等到细胞消化好后加入培养基中终止消化,利用移液枪吹散细胞团块,随后抽取细胞悬液置入离心管中进行离心分离,离心速度为每分钟1000r,离心时间为5min~8min。完成离心处理后,获取血清,并加入冻存液,吹打均匀,将细胞悬液装入标记好的冻存管,利用棉花团紧紧包裹冻存管后放入-80℃的冰箱中备用,2天~3天后取出冻存管,拆掉棉花团后将细胞放入液氮罐内保存。

(2) MTT实验:在细胞消化后,将2500个细胞稀释到200μL培养基中,种植在96板孔中,等到细胞完全贴壁后将对照组中的DMSO与研究组中的去泛素化酶USP7抑制剂P5091加入培养基中,混合均匀后轻轻吸掉旧培养基,每隔24h换一次加药的培养基。选择酶标仪上570nm、630nm波长检测每个板孔的OD值,统计结果。

(3) 蛋白印迹:常规培养细胞且细胞到一定密度后,从培养箱中取出细胞,并放在冰上,吸去细胞培养皿中的培养基,利用PBS清洗两边细胞,加入RIPA缓冲液后放在摇床上裂解0.5h,将裂解后的细胞放入1.5ml的离心管中进行离心分离,之后检测蛋白质的浓度,制作蛋白样品。根据蛋白大小配置相对应浓度的SDS凝胶,通过SDS-PAGE分离制作好的蛋白样品,随后转膜1.5h,保证蛋白转移到硝酸纤维素膜。将丽春红染色剂滴入硝酸纤维素膜,按照maker的大小剪裁硝酸纤维素膜,随后利用4%脱脂牛奶在室温下封闭1h硝酸纤维素膜,封闭完成后利用PBS清洗硝酸纤维素膜,清洗结束后在4℃孵育过夜,并利用PBST清洗三次,最后利用双红外扫描仪检测免疫印迹。

(4) 免疫荧光:在细胞消化后,将其种植到已经灭菌的载玻片上,仔细处理细胞后进行室温孵育,利用PBS清洗三次,将已经加入DAPI的封片剂滴注在载玻片上,将细胞以玻璃片朝下紧紧与封片剂贴合,注意不能有气泡,避光保存,最后,利用荧光显微镜采集图片,分析实验结果。

(5) 克隆形成:将1500个细胞种植在细胞培养皿(长度约为3.5cm),随后将其放入37℃的培养箱中进行培养,等到细胞克隆到一定大小后,加入含有DMSO与去泛素化酶USP7抑制剂P5091,一星期后去掉培养基,利用PBS清洗两次,加入甲醇固定10min后再次使用PBS清洗两次,加入结晶染色15min,回收结晶紫,采用蒸馏水清洗结晶紫,在室温下晾干后采集图片。

1.3 观察指标

- (1) 对比两组肿瘤细胞的增殖能力。
- (2) 统计两组肿瘤细胞的迁移、侵袭及凋亡情况。

1.4 统计学分析

统计相关指标数据,使用SPSS23.0软件分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用百分比(%)表示,分别进行t检验法、卡方(χ^2)检验法,当所计算出的 $P < 0.05$ 时则提示对比的对象之间存在显著差异。

2 结果

2.1 对比两组肿瘤细胞的增殖能力

研究组为(0.27 ± 0.03),对照组为(0.27 ± 0.02),对比差异不大($t = 0.000$, $P = 1.000$, $P > 0.05$)。检测24h、检测48h、检测72h,研究组分别为(0.43 ± 0.04)、(0.58 ± 0.06)、(0.72 ± 0.08),均低于对照组(0.65 ± 0.06)、(1.12 ± 0.08)、(1.89 ± 0.14),对比差异较大($t_1 = 11.816$, $t_2 = 20.914$, $t_3 = 28.102$; $P_1 = 0.000$, $P_2 = 0.000$, $P_3 = 0.000$, $P < 0.05$)。

2.2 评价分析两组肿瘤细胞的侵袭和迁移情况

研究组细胞侵袭数减少(18.22 ± 3.16)个,显著低于对照组(33.58 ± 2.47)个,对比存在差异($t = 14.832$, $P = 0.000$, $P < 0.05$)。研究组细胞迁移数减少(30.56 ± 3.89)个,低于对照组(76.43 ± 4.18)个,对比差异较大($t = 31.113$, $P = 0.000$, $P < 0.05$)。

2.3 对比两组肿瘤细胞的凋亡情况

处理肿瘤细胞24h后,研究组的细胞凋亡率增加(25.18 ± 2.03)%,明显高于对照组(6.14 ± 1.52)%,对比差异显著($t = 29.078$, $P = 0.000$, $P < 0.05$)。

3 讨论

脑胶质瘤属于临床常见的原发性颅内恶性肿瘤疾病,具有较高的发病率和死亡率,给患者的生命安全构成极大的威胁。根据肿瘤恶性程度,临床将脑胶质瘤划分为低度恶性神经胶质瘤、间变的神经胶质瘤及多形性恶性胶质瘤;根据细胞形态,可将脑胶质瘤划分为星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、少枝胶质细胞瘤及室管膜瘤。目前临床尚未明确脑胶质瘤的发病机制,但已证实遗传因素、物理因素、化学因素及病毒因素是该疾病发生的危险因素,且外伤因素与免疫因素也会诱发脑胶质瘤,临床上表现为头痛、恶心呕吐、癫痫发作等症状^[3]。脑胶质瘤患者若未及时得到治疗,容易引起失明、颅内出血、脑疝等并发症,病情严重者可危及生命安全,导致其死亡。因此,临床加强对脑胶质瘤的治疗是十分必要的。目前临床对脑胶质瘤主要采取手术、放疗化疗治疗等,但预后效果较差,复发率较高。如何提高疗效、改善预后是目前此领域研究的热门课题,已引起临床的广泛关注。

随着医疗水平的提升、分子学理论的发展成熟,分子靶向药物是临床治疗脑胶质瘤的新方向,也是降低病死率的有效方法。泛素-蛋白酶体系统是细胞内复杂生理活动中关键的

蛋白调节剂,其主要作用是降解蛋白,与肿瘤细胞的发生、发展息息相关^[4]。蛋白质去泛素化是一种负向调节过程,是指从去泛素化酶介导的蛋白质实现泛素化,泛素与去泛素化调节的动态平衡,将直接影响或者调节细胞组织的生长、增殖、信号转导等生理病理过程。临床研究表明,去泛素化酶的作用底物范围极为广泛,部分癌基因和抑癌基因均在其调控范围内,能够降解或者稳定与细胞组织增殖、凋亡相关的蛋白,故在肿瘤疾病的发生发展过程中,通常存在去泛素化酶结构改变、功能失调或表达异常现象^[5]。由此看出,将去泛素化酶作为分子干预靶标,通过药物来改变蛋白酶的活性达到抑制肿瘤细胞生长和繁殖的目的,已成为临床研究新型抗肿瘤药物的重要方向^[6]。去泛素化酶USP7的底物范围非常广,并且与肿瘤抑制、病毒感染、免疫应答、DNA损伤修复等关系密切,当去泛素化酶USP7的过度表达时,可促进肿瘤细胞的增殖,促使肿瘤疾病向恶性发展,故临床将抑制去

泛素化酶USP7作为治疗肿瘤疾病的方向之一^[7]。自2003年5月批准硼替米(商品名为万科)用于临床后,针对USP7系统的抑制剂将成为临床治疗肿瘤疾病的新型靶向药物^[8]。P5091属于去泛素化酶USP7的抑制剂,有利于抑制USP7酶的活性,阻断细胞的增殖和转移,为临床诱导细胞凋亡提供新的途径^[9]。此次研究结果显示,研究组的肿瘤细胞增殖能力、细胞侵袭数减少及细胞迁移数减少低于对照组,细胞凋亡率增加幅度高于对照组($P<0.05$)。由此看出,去泛素化酶USP7抑制剂P5091对脑胶质瘤细胞的增殖与转移具有抑制作用,有利于促进肿瘤细胞凋亡,可作为一个潜在的抗肿瘤试剂用于抑制脑胶质瘤的生长和转移,为临床治疗脑胶质瘤提供新思路和新方向^[10]。

综上所述,去泛素化酶USP7抑制剂P5091通过促进细胞凋亡,抑制脑胶质瘤细胞的增殖和转移,为临床治疗脑胶质瘤提供靶点,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] 张金霞,梁素娟,霍浩然,等.罗哌卡因对脑胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移及 RhoA/ROCK1 信号通路的影响[J].中国医院用药评价与分析,2022,22(4):453-456.
- [2] 张良龙,安宏伟,赵立智,等.LncRNA?LINC00152 过表达在替莫唑胺诱导?脑胶质瘤干细胞周期阻滞中的作用机制探讨[J].中国癌症杂志,2020,30(5):328-334.
- [3] 许斐钰,龙胜文,魏晨曦,等.过表达 TNFAIP1 促进替莫唑胺对人脑胶质瘤细胞 U251 迁移和侵袭的抑制作用[J].激光生物学报,2021,30(2):178-184.
- [4] 李逢佳,张守庆,宋纯玉,等.微小 RNA-148a-3p 调控 Cullin-5 表达对脑胶质瘤细胞生物学功能的作用[J].中华实验外科杂志,2020,37(5):881-883.
- [5] 罗刚,喻坚柏,李春辉,等.异柠檬酸脱氢酶 1 基因突变对替莫唑胺干预下脑胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(8):1492-1496.
- [6] 刘湘宁,杜佳泯,钱美佳,等.去泛素化酶小分子抑制剂抗肿瘤作用研究:新进展和新思路[J].药学报,2022,57(3):547-556.
- [7] 曾瑜,李成龙,刘渊渊,等.应用胶质母细胞瘤类器官探究化疗及缺氧诱导因子 2 α 抑制剂对肿瘤细胞的抑制作用[J].中华神经外科杂志,2022,38(04):394-400.
- [8] 胡森,王君毅,李念宣,等.白藜芦醇调控 Wnt 信号通路增强替莫唑胺抗脑胶质瘤作用的体内研究[J].中华神经医学杂志,2020,19(2):146-153.
- [9] 矫永庆,王迅,吴文霄,等.P-选择素、促血小板生成素与脑胶质瘤患者病情严重程度的相关性研究[J].中国医师进修杂志,2021,44(9):778-782.
- [10] 黄华,王宽宇,王志亮,等.基于转录组学数据探讨岩藻糖基转移酶VII在脑胶质瘤中的表达及意义[J].中华神经外科杂志,2020,36(7):726-731.