

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.12.004

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.12.004>

## ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和 beclin-1 在替莫唑胺治疗敏感与耐药的胶质母细胞瘤中的表达及意义

李小燕<sup>1</sup>, 赵建祥<sup>2</sup>, 任保刚<sup>3</sup>, 吴雪晶<sup>1</sup>, 吴丹<sup>1</sup>, 姚梅宏<sup>1</sup>, 陈晓雯<sup>1</sup>, 杨映红<sup>1</sup>

(1. 福建医科大学附属协和医院病理科, 福州 350001; 2. 福建省立医院重症医学三科, 福州 350001;  
3. 福建医科大学附属协和医院神经外科, 福州 350001)

**[摘要]** 目的: 探讨在替莫唑胺(temozolomide, TMZ)治疗敏感与耐药的胶质母细胞瘤中转录激活因子3(activating transcription factor 3, ATF3)、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1的表达水平变化及其与TMZ耐药产生的相关意义。方法: 采用RT-PCR及免疫组织化学法检测并比较同一患者TMZ治疗前及耐药时胶质母细胞瘤组织内ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因及蛋白质表达水平。取30  $\mu$ g/mL TMZ培养的U87细胞为实验组, 普通溶剂培养的U87细胞为对照组, 培养72 h, MTT及annexin V-别藻蓝素(allophycocyanin, APC)单染法分别检测并比较肿瘤细胞的生长抑制率、凋亡率, RT-PCR及蛋白质印迹检测并比较细胞内ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因及蛋白质表达水平。结果: TMZ耐药时胶质母细胞瘤组织中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1表达水平平均高于TMZ治疗前( $P<0.05$ ); TMZ敏感的U87细胞培养72 h肿瘤细胞生长抑制率和凋亡率均增加( $P<0.05$ ), 细胞内ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1表达水平平均低于对照组( $P<0.05$ ); 三者呈同向表达。结论: 在TMZ用药过程中, 胶质母细胞瘤内ATF3激活可能上调14-3-3 $\zeta$ 的表达, 进而启动并使自噬增强, 导致TMZ耐药产生。

**[关键词]** 胶质母细胞瘤; 替莫唑胺; 自噬; 转录激活因子3; 14-3-3 $\zeta$

## Expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 in the treatment of sensitive and drug-resistant glioblastomas with temozolomide and its significance

LI Xiaoyan<sup>1</sup>, ZHAO Jianxiang<sup>2</sup>, REN Baogang<sup>3</sup>, WU Xuejing<sup>1</sup>, WU Dan<sup>1</sup>, YAO Meihong<sup>1</sup>,  
CHEN Xiaowen<sup>1</sup>, YANG Yinghong<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001; 2. Department of Intensive Care Unit, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001; 3. Department of Neurosurgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the changes of the expression of activating transcription factor 3 (ATF3), 14-3-3 $\zeta$ , and

收稿日期 (Date of reception): 2020-12-04

通信作者 (Corresponding author): 杨映红, Email: [yyh1555@163.com](mailto:yyh1555@163.com)

基金项目 (Foundation item): 福建省科技创新联合资金项目 (2017Y9034); 福建省卫生健康科技计划青年项目 (2016-1-50); 福建医科大学启航基金项目 (2016QH021)。This work was supported by the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (2017Y9034), Youth Research Projects sponsored by Fujian Provincial Health Technology Project (2016-1-50), and Fujian Medical University Start-up Fund Project (2016QH021), China.

beclin-1 in the treatment of sensitive and drug-resistant glioblastomas with temozolomide (TMZ). And to investigate their correlation with TMZ resistance. **Methods:** Before TMZ treatment and after TMZ resistance, the gene and protein expression levels of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 in glioblastoma tissues of the same patient were detected and compared by RT-PCR and immunohistochemistry. U87 cells cultured with 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TMZ were taken as an experimental group, and U87 cells cultured with common solvent were taken as a control group. After 72 h of culture, the growth inhibition rate and apoptotic rate of tumor cells between the two groups were detected and compared by MTT and annexin V-allophycocyanin (APC) monochrome staining, respectively. After 72 h of culture, the gene and protein expression levels of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 between the two groups were detected and compared by RT-PCR and Western blotting. **Results:** The expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$  and beclin-1 in glioblastoma tissues with TMZ resistance was higher than that before TMZ treatment ( $P<0.05$ ). After 72 h of culture, the growth inhibition rate and apoptotic rate of TMZ-sensitive U87 cells were increased ( $P<0.05$ ); meanwhile, the expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$  and beclin-1 in TMZ-sensitive U87 cells was lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). All three have the same expression trend. **Conclusion:** During the TMZ treatment process, the activation of ATF3 in glioblastoma may upregulate the expression of 14-3-3 $\zeta$  which initiates and enhances the autophagy of tumor cells, leading to TMZ resistance in glioblastoma.

**Keywords** glioblastoma; temozolomide; autophagy; activating transcription factor 3; 14-3-3 $\zeta$

脑胶质瘤是中枢神经系统最好发也是治疗最棘手的肿瘤性疾病, 至今该疾病的致死率及预后状况仍令人担忧。目前, 临床治疗指南仍为最大限度的手术安全切除联合放射(以下简称放疗)及化学(以下简称化疗)治疗的综合方案<sup>[1]</sup>。尽管替莫唑胺(temozolomide, TMZ)是临床治疗恶性胶质瘤的标准一线化疗药<sup>[2]</sup>, 但是TMZ固有或继发耐药是妨碍临床疗效的重要因素, 其发生机制错综复杂。近年来, 化疗时肿瘤细胞内自噬活性的变化与TMZ耐药之间的关系, 究竟哪些关键因子对自噬发挥“开”与“关”的调节作用, 使得胶质瘤细胞可以随着化疗进程适时调整自噬活性, 以防御TMZ对肿瘤细胞的损害, 导致耐药的发生成为倍受科研人员关注的问题<sup>[3]</sup>。本研究检测并比较了TMZ耐药的胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)组织与TMZ敏感的U87细胞内转录激活因子3(activating transcription factor 3, ATF3)、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1表达水平, 初步探讨三者之间的相互关系, ATF3、14-3-3 $\zeta$ 对自噬活性的影响, 及其与TMZ耐药发生的可能关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 组织标本

经福建医科大学附属协和医院伦理委员会审核批准及患者知情同意后, 严格按纳入标准收

集2018年1月至6月福建医科大学附属协和医院收治的GBM患者7例(男5例, 女2例), 中位年龄39(13~59)岁; 所有标本于离体1 h内予10%中性缓冲福尔马林充分固定, 石蜡包埋。纳入标准: 患者年龄小于70岁; 首发灶位于大脑半球; 术前未行任何抗肿瘤治疗, 术后予Stupp方案[在放疗期间口服TMZ 75  $\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ , 连服42 d; 间隔4周, 进入辅助化疗阶段, 口服TMZ 150~200  $\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ , 连用5 d, 每28 d重复, 共用6个周期]服用TMZ期间出现肿瘤复发/进展; 首次及复发/进展的手术切除标本经病理诊断明确为GBM, WHO IV级。排除标准: 怀孕/哺乳女性;

#### 1.1.2 U87 细胞与 TMZ

人胶质瘤细胞U87购自中国医学科学院上海细胞库, 予含10%胎牛血清的DMEM培养液, 置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度的培养箱中培养, 每2 d更换1次培养液; 用含0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA的消化液消化细胞, 进行传代培养。TMZ纯品水溶性较差, 将其溶于10%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO; 5 mmol/L, 终浓度保持在0.1%以下)中保存, 使用时予DMEM稀释至所需浓度。

#### 1.1.3 试剂与仪器

TMZ购自MedChem Express公司(新泽西, 美国); 组织切片核酸提取试剂盒购自艾德生物医药科技有限公司(厦门, 中国); PCR所用ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1引物委托生工生物工程有限公司(上海, 中国)合成; Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit购自

Takara宝生物工程有限公司(大连, 中国); TriPure Isolation Reagent试剂盒购自Sigma-Aldrich贸易有限公司(上海, 中国); Genview MTT试剂盒购自鼎国昌盛生物技术有限责任公司(北京, 中国); annexin V-别藻蓝素(allophycocyanin, APC)凋亡试剂盒及binding buffer购自Thermo Fisher Scientific公司(马萨诸塞州, 美国); BCA蛋白浓度测定试剂盒、BeyoECL Plus发光液及PVDF膜均购自碧云天生物技术有限公司(上海, 中国); 蛋白质印迹、免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)所用ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1一抗鼠抗人单克隆抗体购自Cell Signaling Technology股份有限公司(马萨诸塞州, 美国); BioTek酶标仪购自Thermo Fisher Scientific公司(马萨诸塞州, 美国); 罗氏全自动免疫组织化学仪Benchmark XT(上海, 中国); 流式细胞仪购自Millipore公司(马萨诸塞州, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 免疫组织化学

采用罗氏全自动免疫组织化学仪将7例GBM患者化疗前及复发/进展时的石蜡切片进行ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1目的蛋白检测, 操作步骤依照仪器使用说明书进行。抗体浓度稀释如下: ATF3, 1:100; 14-3-3 $\zeta$ , 1:100; beclin-1, 1:100。用产品说明书推荐的阳性组织作阳性对照, 用PBS代替一抗作阴性对照。

### 1.2.2 RT-PCR

依照组织切片核酸提取试剂盒说明书提取GBM组织细胞核酸, 依照TriPure Isolation Reagent试剂盒说明书提取U87细胞总mRNA, 再反转录成cDNA, 依照Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit说明书进行基因水平检测。目的及内参基因引物序列如下: ATF3正向5'-AAGTGAGTGCTTCTGCCATCGTC-3', 反向5'-GTCGCTGACAGTGAATCCAG-3'; 14-3-3 $\zeta$ 正向5'-ACAGCAGATGGCTCGAGAATACAG-3', 反向5'-CATCACCAGCGGCAACCTCAG-3'; beclin-1正向5'-GGAGCTGCCGTTATACTGTTCTGG-3', 反向5'-TGCTCCTGTGTCTTCAATCTTGC-3'; GAPDH正向5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反向5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。组织标本以TMZ化疗前组织内目的基因中位Ct值为标准, U87细胞以普通溶剂组细胞内目的基因中位Ct值为标准, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 分别计算实验组ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因相对水平值。

### 1.2.3 U87 细胞 TMZ IC<sub>50</sub> 值

参照文献及预实验数据将TMZ诱导浓度梯度

设为0.3、3、10、30、100、300、900  $\mu\text{g/mL}$ , 连续培养U87细胞1周, MTT每日监测细胞增殖率的动态变化, 建立半对数回归方程, 求出半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为60.02  $\mu\text{g/mL}$ , 由此确定本研究TMZ对U87细胞的最高培养浓度为30  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 1.2.4 MTT

收集对数生长期U87细胞, 按每孔 $5 \times 10^3$ 个接种于96孔培养板。细胞达到80%融合时, 实验组加入TMZ, 对照组加入普通溶剂, 培养72 h进行MTT检测, 培养终止前4 h每孔加入20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL), 去掉上清, 每孔加入100  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡混匀后, 酶标仪490 nm测定光密度(optical density, OD)值。每组设3个复孔, 取均值作为实验结果。

### 1.2.5 Annexin V-APC 单染法

U87细胞接种于6孔板, 每组设3个复孔, 每孔加入细胞数 $\geq 5 \times 10^5$ ; 待细胞生长至覆盖率约70%时, 实验组加入TMZ, 对照组加入普通溶剂, 培养72 h将各组细胞用胰酶消化, 完全培养基重悬成细胞悬液, 与上清细胞一起收集于5 mL离心管中, 1 300 r/min离心5 min后弃上清, 再加入4  $^{\circ}\text{C}$ 预冷的D-Hanks(pH=7.2~7.4)洗涤细胞沉淀; 加入1 $\times$  binding buffer洗涤细胞沉淀1次, 1 300 r/min离心3 min, 收集细胞; 再加入1 $\times$  binding buffer 200  $\mu\text{L}$ 重悬细胞沉淀; 加入annexin V-APC 10  $\mu\text{L}$ 进行染色, 室温避光10~15 min后根据细胞量, 补加1 $\times$  binding buffer 400~800  $\mu\text{L}$ , 放置于流式细胞仪检测。

### 1.2.6 蛋白质印迹法

实验组与对照组U87细胞培养72 h, 加入蛋白质裂解液, 冰上裂解1 h; 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 应用BCA试剂盒测定蛋白质浓度, 取20  $\mu\text{g}$ 细胞蛋白质经10% SDS PAGE凝胶电泳分离后, 转入PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 按稀释浓度ATF3 1:500, 14-3-3 $\zeta$  1:100, beclin-1 1:500, GAPDH 1:2 000加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜3次; 加入1:2 000二抗室温孵育1 h, TBST洗膜3次; 加入ECL Plus发光液暗室中曝光, 将胶片置于Image Quant LSA4000超灵敏化学发光成像仪(GE公司, 美国)进行成像分析, 观察两组细胞ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白质条带与内参GAPDH的光密度比值。每项指标均重复检测3次。

## 1.3 统计学处理

应用SPSS 19.0软件进行数据分析。U87细胞生长抑制率及凋亡率采用非参数秩和检验; RT-PCR及蛋白质印迹结果为计量资料, 以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

GBM组织标本IHC结果显示: ATF3蛋白质阳性显色定位于细胞核, 14-3-3 $\zeta$ 、beclin-1蛋白质阳性显色定位于细胞质, 均呈棕褐色染色; ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白质在TMZ治疗前、复发/进展GBM组织中出现染色程度强弱不等: TMZ治疗

前肿瘤组织中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1染色程度较弱, 随着TMZ治疗至肿瘤出现复发/进展时, 组织中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1染色程度增强, ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1呈同向表达(图1A)。RT-PCR结果显示: GBM组织中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1的基因相对表达水平变化与IHC结果相同(图1B)。

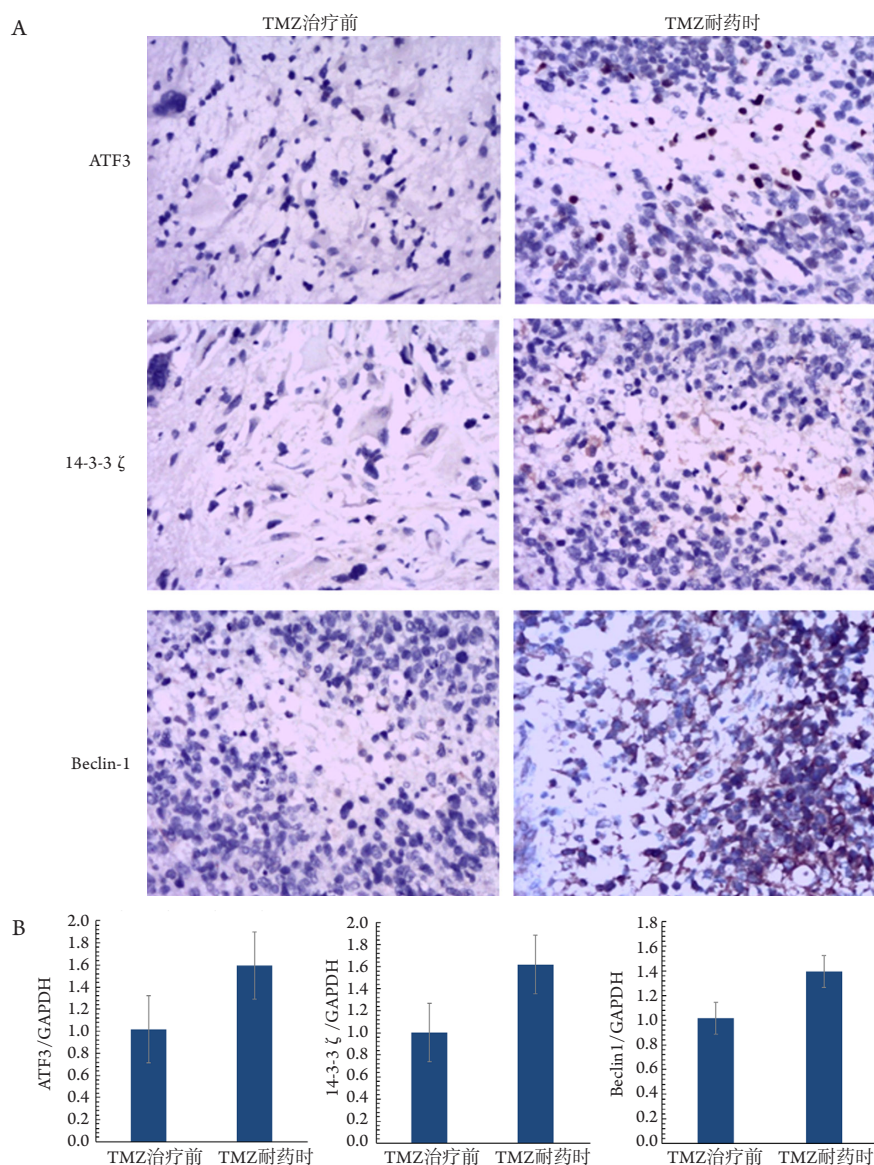


图1 GBM组织标本中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白与基因的表达情况

Figure 1 Protein and gene expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$  and beclin-1 in GBM tissues

(A) IHC结果显示: TMZ治疗前ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白质表达低于耐药时, TMZ治疗前目的蛋白相对表达量低( $\times 200$ ); (B) RT-PCR结果显示: TMZ治疗前ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因相对表达水平低于耐药时, 表达水平变化与IHC结果一致, 三者呈同向表达。

(A) IHC results show that the protein expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 before TMZ treatment is lower than that of drug resistance ( $\times 200$ ); (B) RT-PCR results show that the gene expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 before TMZ treatment is also lower than that of drug resistance. The results are consistent with those of IHC. All three have the same expression trend.

对TMZ敏感的U87细胞, 予30  $\mu\text{g/mL}$  TMZ培养72 h的实验组相比于普通溶剂培养的对照组, 肿瘤细胞生长抑制率(3.8% vs 0.0%,  $P<0.05$ ; 图2A)、凋亡率(8.9% vs 4.5%,  $P<0.05$ ; 图2B)均增加。蛋白质印迹法显示两组细胞内目的蛋白相对表达量存在差异, 实验组ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白量低于对照组( $0.120\pm0.018$  vs  $0.980\pm0.014$ ,  $t=65.32$ ,  $P<0.05$ ;  $0.530\pm0.043$  vs  $0.870\pm0.032$ ,  $t=10.99$ ,  $P<0.05$ ;

$0.430\pm0.035$  vs  $0.960\pm0.024$ ,  $t=21.63$ ,  $P<0.05$ ; 图2C)。RT-PCR显示两组细胞内目的基因相对表达量存在差异, 实验组ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因表达水平低于对照组( $0.770\pm0.047$  vs  $1.000\pm0.043$ ,  $t=6.25$ ,  $P<0.05$ ;  $0.680\pm0.045$  vs  $1.000\pm0.032$ ,  $t=10.04$ ,  $P<0.05$ ;  $0.730\pm0.021$  vs  $1.000\pm0.053$ ,  $t=8.20$ ,  $P<0.05$ ; 图2D); 细胞学体外实验与组织标本检测结果均显示ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1呈同向表达。

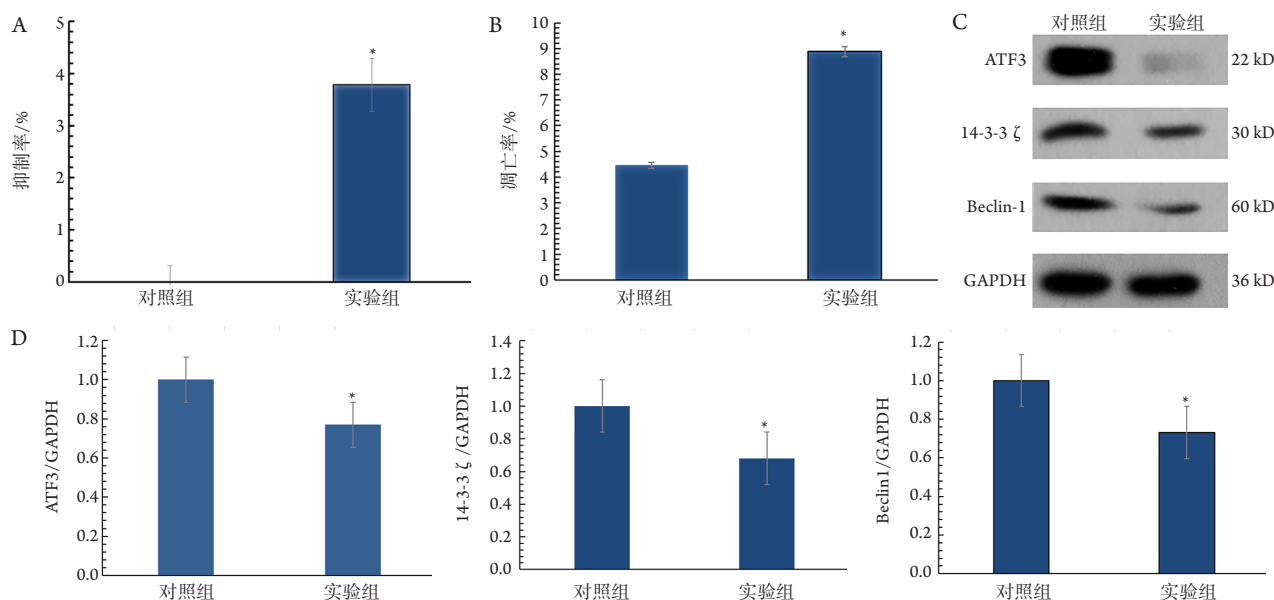


图2 U87细胞内ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白与基因的表达情况

Figure 2 Protein and gene expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 in U87 cells

(A) MTT检测结果显示: 30  $\mu\text{g/mL}$  TMZ培养72 h后, 与普通溶剂对照组相比, 药敏实验组U87细胞肿瘤细胞生长抑制率增加; (B)Annexin V-APC单染法结果显示: 肿瘤细胞凋亡率增加; (C)蛋白质印迹法结果显示: 实验组细胞ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1蛋白表达量低于对照组( $P<0.05$ ); (D)RT-PCR结果显示: 实验组细胞ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1基因表达水平低于对照组。与对照组相比, \* $P<0.05$ 。

(A) MTT results show that after culturing with 30  $\mu\text{g/mL}$  TMZ for 72 h, the growth inhibition rate of U87 cells in the experimental group is higher than that in the control group; (B) Annexin V-APC results show that the apoptotic rate of U87 cells in the experimental group is higher than that in the control group; (C) Western blotting results show that the protein expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$  and beclin-1 in the experimental group is lower than that in control group ( $P<0.05$ ); (D) RT-PCR results show that the gene expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$  and beclin-1 in the experimental group is lower than that in the control group. Compared with the control group, \* $P<0.05$ .

### 3 讨论

我国脑胶质瘤年发病率为5~8/10万, 5年病死率在全身肿瘤中仅次于胰腺癌和肺癌, 其中GBM患者中位生存期为14.4个月, 标准治疗后5年生存率为10%<sup>[1]</sup>。对于高级别胶质瘤临床治疗指南建议采用最大范围的安全切除瘤体联合放、化疗的综合方案, 对于成人GBM初治者推荐放疗联合TMZ同步化疗, 并随后辅以6个周期TMZ辅助化疗。

TMZ作为标准一线化疗药物<sup>[2]</sup>对进一步杀灭术后残留胶质瘤细胞, 有效减少肿瘤负荷发挥重要作用。然而, 胶质瘤细胞对TMZ产生耐药是影响临床疗效的重要原因之一<sup>[4]</sup>。长期以来, 科研人员就耐药发生机制一直在积极探索中<sup>[5]</sup>, TMZ发生耐药的复杂过程包括肿瘤细胞内的自噬活性<sup>[6]</sup>、肿瘤细胞对化疗药物的应激反应、各种DNA损伤修复途径、肿瘤干细胞及其微环境等, 其中自噬在TMZ耐药形成机制中的角色不容小觑。目前临床应用

的TMZ剂量能够引发胶质瘤细胞发生自噬,是由于TMZ可引起肿瘤细胞DNA上O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-MeG)发生甲基化,使DNA的复制受到干扰,此时细胞启动自噬活性参与DNA损伤修复过程<sup>[7]</sup>,使肿瘤细胞免受化疗药物损伤,这成为TMZ耐药发生过程中的重要环节<sup>[8]</sup>。进一步研究发现,控制自噬活性在适度范围内可以增强化疗药物的敏感性及其有效性<sup>[9]</sup>。本研究在GBM组织标本与U87细胞内均检测到自噬关键分子beclin-1, TMZ化疗过程中复发/进展的胶质瘤组织中beclin-1基因与蛋白质的表达量高于TMZ化疗前,而对TMZ敏感的U87细胞内beclin-1表达水平低于普通溶剂培养的细胞,说明TMZ给药过程中能够引发胶质瘤细胞自噬活性的改变,自噬活性增强且未得以适当控制可能引发TMZ耐药的产生。

14-3-3是一个高度保守的蛋白质家族,在人类脑内的含量较丰富<sup>[10]</sup>。已发现有7个14-3-3亚型蛋白质( $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\eta$ 、 $\sigma$ 、 $\tau/\theta$ 和 $\zeta$ ),14-3-3家族成员能够结合和调节细胞内关键分子参与各种生理过程,包括基因转录调控、信号转导、细胞增殖与周期、黏附与迁移<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>报道:14-3-3蛋白质亚型中14-3-3 $\zeta$ 的表达与抗肿瘤药物继发性耐药及肿瘤复发紧密相关;也有科研团队<sup>[13]</sup>发现:14-3-3 $\zeta$ 阳性的胶质母细胞较之14-3-3 $\zeta$ 阴性细胞具有更强的致瘤性、侵袭性和对TMZ的耐药性。与上述文献报道相同的是,本研究在复发/进展的GBM组织中检测到14-3-3 $\zeta$ 基因与蛋白质的表达量高于TMZ用药前,而对TMZ敏感的U87细胞内14-3-3 $\zeta$ 表达水平低于未予药物培养的细胞,证实14-3-3 $\zeta$ 高表达的肿瘤细胞确实具有更强的致瘤性和对TMZ的耐药性。不同的是,其他研究者<sup>[14]</sup>发现:14-3-3 $\zeta$ 通过哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路调节自噬早期的关键分子对自噬起负性调节作用,其蛋白质过表达会阻碍自噬进程,而在14-3-3 $\zeta$ 消耗殆尽时则会促进自噬发生;而本研究在GBM组织与U87细胞内检测到14-3-3 $\zeta$ 与beclin-1均呈同向表达,推测在错综复杂的肿瘤大环境中,不同信号通路的激活、不同的调控作用、分子之间不同的相互作用方式,都有可能影响自噬活性的强弱,并随着TMZ化疗的推进在GBM内呈现差异性的表达,最终引发TMZ耐药的产生。

ATF3是转录因子ATF/CERB家族成员之一,该基因定位于人类1号染色体3区2带,编码生成

的蛋白质由181个氨基酸组成,分子质量22 kD。ATF3含有多个的基因结合位点,在信号转导途径中处于枢纽位置<sup>[15]</sup>。许多病理性损伤因子可以诱导组织细胞表达ATF3,一旦被诱导激活,活化的ATF3通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、c-Myc及转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )/SMAD等信号通路<sup>[16]</sup>,将外源信号转导至细胞核内,再依ATF3二聚体构型、启动子和细胞状态对其靶基因的转录调控发挥激活或抑制作用,从而影响细胞增殖、凋亡、周期等<sup>[17]</sup>,在慢性疾病及肿瘤发生发展中扮演重要角色。研究<sup>[18]</sup>显示:在正常脑组织中ATF3呈低水平表达,而在I~IV级胶质瘤中,ATF3的表达逐级增强,且其表达水平与胶质瘤病理分级呈正相关,提示ATF3高表达与胶质瘤的演进及恶性程度密切相关。其作用机制可能是ATF3被诱导活化后表达上调,进而引发下游癌基因的激活和抑癌基因的失活等连锁反应,使胶质细胞无限增殖并恶性转化。与上述文献报道相似,本研究在复发/进展的GBM组织中检测到ATF3基因与蛋白质的表达量高于TMZ用药前,而对TMZ敏感的U87细胞内ATF3表达水平低于未予药物培养的细胞,证实ATF3的高表达推进了肿瘤细胞的恶性进展;此外,在GBM组织与U87细胞内检测到ATF3与14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1均呈同向表达,推测随着TMZ化疗的进行ATF3被诱导激活,表达水平上调,可能通过相关信号通路调控14-3-3 $\zeta$ 表达上调,进而启动自噬,使其活性增强导致TMZ耐药产生。

综上所述,本研究发现:在复发/进展的GBM组织中ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1表达水平较TMZ用药前有所升高;在对TMZ敏感的胶质瘤U87细胞内,予TMZ培养72 h肿瘤细胞生长受抑制、凋亡加速,此时细胞内ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1表达水平较之普通溶剂培养的细胞有所下降;GBM组织与U87细胞内检测到ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1水平变化趋势一致,三者呈同向表达。由此推测,在GBM患者术后TMZ化疗过程中,随着时间的推移与剂量的增加,胶质瘤细胞内ATF3被活化后作为核内转录激活因子,通过上调14-3-3 $\zeta$ 表达启动细胞自噬,随着其活性逐渐增强,在未得到适当控制时,自噬参与到细胞DNA损伤修复过程中<sup>[7]</sup>,使肿瘤细胞免受化疗药物损伤,导致胶质瘤细胞对TMZ耐药的产生。当然,这只是

揭秘GBM术后出现TMZ继发耐药的开始, 仅为该复杂机制中的一个相关因素, 后续我们将建立胶质瘤继发耐药细胞株, 应用染色质免疫共沉淀验证14-3-3 $\zeta$ 为ATF3的靶基因, 借助基因干预技术进一步证实ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和beclin-1的相互关系等, 以深入挖掘增强TMZ治疗效果潜在可行的药物靶点, 以期改善GBM患者的预后状态。

## 参考文献

1. 曾凡, 姚坤, 王宽宇, 等. FISH技术检测胶质瘤患者PTPRZ1-MET融合基因的表达及临床意义[J]. 中华神经外科杂志, 2017, 33(11): 1160-1163.  
ZENG Fan, YAO Kun, WANG Kuanyu, et al. Development and clinical significance of FISH technique for detecting PTPRZ1-MET fusion gene in glioma patients[J]. Chinese Journal of Neurosurgery, 2017, 33 (11): 1160-1163.
2. 李成婧, 吴晓明. 神经胶质瘤对替莫唑胺耐药机制的研究[J]. 当代医药论丛, 2019, 17(7): 51-52.  
LI Chengjing, WU Xiaoming. Mechanism of temozolomide resistance in glioma[J]. Contemporary Medical Symposium, 2019, 17 (7): 51-52.
3. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer[J]. Genes Dev, 2016, 30(17): 1913-1930.
4. 马健, 杨艳茹, 刘景景, 等. 地昔帕明逆转人脑胶质瘤耐药细胞U251/TR对替莫唑胺的耐药作用(英文)[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(6): 620-626.  
MA Jian, YANG Yanru, LIU Jingjing, et al. Reversal effects of desipramine on resistance of U251/TR cells to temozolomide[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2016, 30(6): 620-626.
5. 徐勇明, 王宏勤. MicroRNA调控胶质瘤替莫唑胺化疗耐药的研究进展[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2016, 2(4): 241-244.  
XU Yongming, WANG Hongqin. Advances in glioma temozolomide-resistance regulated by microRNA[J]. Chinese Journal of Neurotraumatic Surgery. Electronic Edition, 2016, 2(4): 241-244.
6. Nassour J, Radford R, Correia A, et al. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis[J]. Nature, 2019, 565(7741): 659-663.
7. 邹宇辉, 王伟民. KU-55933抑制替莫唑胺诱导的U87胶质瘤细胞自噬[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2015, 20(3): 130-133.  
ZOU Yuhui, WANG Weimin. KU-55933 depresses temozolomide-induced autophagy in U87 glioma cell[J]. Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery, 2015, 20(8): 130-133.
8. Yan Y, Xu Z, Dai S, et al. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35: 23.
9. 赵海杞, 赵世光, 石长滨, 等. 自噬在胶质母细胞瘤中的研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(16): 3212-3215.
10. 唐裕福, 张怡冰, 冯晓东, 等. 14-3-3蛋白在人类疾病中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(6): 509-520.  
TANG Yufu, ZHANG Yibing, FENG Xiaodong, et al. Role of 14-3-3 proteins in human diseases[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2017, 25(6): 509-520.
11. Killoran RC, Fan J, Yang D, et al. Structural analysis of the 14-3-3 $\zeta$ /chibby interaction involved in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123934.
12. 邱亚娟, 张明智. 14-3-3 $\zeta$ 蛋白诱导NK/T细胞淋巴瘤吉西他滨耐药的机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(11): 906-911.  
QIU Yajuan, ZHANG Mingzhi. Mechanism of 14-3-3 $\zeta$  protein mediating gemcitabine resistance in NK/T-cell lymphoma[J]. Chinese Journal of Hematology, 2019, 40(11): 906-911.
13. Luo Z, Yang X, Ma LT, et al. 14-3-3zeta positive cells show more tumorigenic characters in human glioblastoma[J]. Turk Neurosurg, 2016, 26(6): 813-817.
14. Pozuelo-Rubio M. 14-3-3 proteins are regulators of autophagy[J]. Cells, 2012, 1(4): 754-773.
15. Xiaoyan L, Shengbing Z, Yu Z, et al. Low expression of activating transcription factor 3 in human hepatocellular carcinoma and its clinicopathological significance[J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(8): 477-481.
16. Li X, Zang S, Cheng H, et al. Overexpression of activating transcription factor 3 exerts suppressive effects in HepG2 cells[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 869-876.
17. Sun MM, Wang YC, Li Y, et al. Effect of ATF3-deletion on apoptosis of cultured retinal ganglion cells[J]. Int J Ophthalmol, 2017, 10(5): 691-695.
18. Ma S, Pang C, Song L, et al. Activating transcription factor 3 is overexpressed in human glioma and its knockdown in glioblastoma cells causes growth inhibition both in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(6): 1561-1573.

本文引用: 李小燕, 赵建祥, 任保刚, 吴雪晶, 吴丹, 姚梅宏, 陈晓雯, 杨映红. ATF3、14-3-3 $\zeta$ 和Beclin-1在替莫唑胺治疗敏感与耐药的胶质母细胞瘤中的表达及意义[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(12): 2771-2777. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.12.004

Cite this article as: LI Xiaoyan, ZHAO Jianxiang, REN Baogang, WU Xuejing, WU Dan, YAO Meihong, CHEN Xiaowen, YANG Yinghong. Expression of ATF3, 14-3-3 $\zeta$ , and beclin-1 in the treatment of sensitive and drug-resistant glioblastomas with temozolomide and its significance[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021, 41(12): 2771-2777. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.12.004