

YAP 靶向抑制剂维替泊芬联合放疗抑制脑胶质瘤生长的作用与机制研究

杨新月¹, 徐静¹, 白雪¹, 陈金灿¹, 张宇^{2,3}, 赵敏^{2,3}, 王岩^{2,3}, 周秀萍^{2,3*}

(1. 徐州医科大学公共卫生学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学神经系统疾病研究所, 江苏 徐州 221002; 3. 徐州医科大学附属医院神经外科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究 Yes 相关蛋白(YAP)靶向抑制剂维替泊芬(VP)联合放疗对脑胶质瘤细胞增殖与迁移行为的影响及机制。方法 对脑胶质瘤细胞分别用放疗、VP、VP 联合放疗 3 种不同的方法进行处理,应用集落形成实验、CCK-8 实验检测细胞增殖情况;应用免疫印迹实验探究 VP 联合放疗增强放疗效果的机制;应用划痕实验检测细胞迁移情况。结果 放疗或 VP 处理均能抑制细胞增殖,放疗联合 VP 处理的细胞增殖速度受到的抑制效果更为显著;VP 联合放疗之后,细胞周期蛋白激酶 4(CDK4)和磷酸化 Rb(p-Rb)的蛋白表达水平显著低于对照组,细胞周期阻滞,增殖减慢;放疗或 VP 处理均抑制细胞迁移,放疗联合 VP 处理后,细胞的迁移能力下降更为显著。结论 VP 能够明显提高脑胶质瘤的放疗效果;VP 联合放疗通过阻断 Yes 相关蛋白-转录增强结合域(YAP-TEAD)的结合,阻滞细胞周期,从而抑制细胞的增殖。

关键词:脑胶质瘤; Yes 相关蛋白; 维替泊芬; 放疗; 增殖

中图分类号:R739.41 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-3882(2020)09-0635-05

DOI:10.3969/j.issn.2096-3882.2020.09.003

Effect and mechanism of YAP targeted inhibitor verteporfin combined with radiotherapy on glioma growth

YANG Xinyue¹, XU Jing¹, BAI Xue¹, CHEN Jincan¹, ZHANG Yu^{2,3}, ZHAO Min^{2,3},
WANG Yan^{2,3}, ZHOU Xiuping^{2,3*}

(1. School of Public Health, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Institute of Nervous System Diseases, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002; 3. Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of verteporfin (VP), a Yes-associated protein (YAP) targeted inhibitor, combined with radiotherapy on the proliferation and migration behavior of gliomas. **Methods** After having been treated with radiotherapy, VP or VP combined with radiotherapy, glioma cell proliferation was detected by colony formation assay and CCK-8 assay. The molecular mechanism of VP combined with radiotherapy was explored using Western blotting. The cell migration was detected by wound healing assay. **Results** Cell proliferation decreased after radiotherapy or VP treatment alone. The inhibition effect of radiotherapy combined with VP treatment on cell proliferation was more significantly. After VP combined with radiotherapy treatment, the protein expression of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and phospho-Rb (p-Rb) significantly decreased. Radiotherapy or VP treatment alone inhibited cell migration. The cell migration capacity decreased more significantly after radiotherapy combined with VP treatment. **Conclusions** VP can significantly improve the anti-tumor effect of radiotherapy on glioma. VP combined with radiotherapy can block cell cycle and cell proliferation by interfering the interaction of YAP-transcriptional enhanced associate domains (YAP-TEAD).

Key words: glioma; Yes-associated protein; verteporfin; radiotherapy; cell proliferation

胶质母细胞瘤 (GBM) 是颅内最常见的恶性肿瘤, 尽管采取了手术结合术后放化疗的综合治疗方

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划省级指导项目(201810313055X);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYCX19_2225);国家自然科学基金面上项目(81872053;81902526)

* 通信作者, E-mail: xpzhou@xzhmu.edu.cn

案,初诊 GBM 患者的平均中位生存期仅为 12 ~ 15 个月^[1]。由于肿瘤细胞呈浸润性生长,与周围脑组织边界不清,往往导致手术无法完全切除而复发。放疗是 GBM 患者术后主要的辅助治疗手段,但由于某些促癌分子的存在,促使 DNA 损伤修复加快,导致放疗抵抗^[2]。因此,找到影响放疗抵抗的关键分子,将分子靶向治疗与放疗结合,提高放疗敏感性可以提高患者的生存时间。Hippo/Yes 相关蛋白(YAP)通路是近年发现的、进化上保守的蛋白激酶信号通路,通过协调细胞的增殖与凋亡,调控器官大小和组织稳态。Hippo 信号失活时,不被磷酸化的 YAP 进入细胞核,与转录因子转录增强结合域(TEAD)结合,启动靶基因的转录,促进细胞增殖、抑制凋亡^[3]。富含半胱氨酸 61(Cyr61)是 YAP 的下游靶基因,在脑胶质瘤中高度表达,并且 Cyr61 可能通过整合素连接蛋白激酶介导 β -连接蛋白-T 细胞因子/淋巴增强因子和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 信号通路加强细胞增殖相关基因的表达,促凋亡蛋白 Bad 活性降低,促进细胞生长和迁移进而有利于脑胶质瘤的生长增殖^[4]。YAP 靶向抑制剂维替泊芬(VP)是一种光敏剂,在临床上主要用来治疗黄斑中心凹下脉络膜新生血管引起的疾病。近期,人们发现 VP 作为非光敏剂具有显著的抗癌作用,其机制是通过抑制 YAP-TEAD 复合物,下调原癌基因 c-myc, Axl 以及细胞迁移和血管生成因子如结缔组织生长因子(CTGF)、Cyr61、血管内皮生长因子 A(VEGF-A)等表达所致^[5]。有报道指出 VP 可通过抑制 YAP-TEAD 结合而抑制脑胶质瘤细胞的增殖^[6]。因此,我们采用 VP 联合放疗,观察对高表达 YAP 的脑胶质瘤细胞的增殖与迁移能力的影响,并探索其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 脑胶质瘤 U251 细胞系购自中国科学院上海分院细胞库,U87 细胞系购自美国 ATCC。

1.2 主要试剂 鼠抗 β -actin 购自美国 Millipore 公司;兔抗 YAP 购自美国 Abcam 公司;兔抗 p-Rb、兔抗 CDK4 均购自美国 Cell Signaling 公司。其他常规试剂均为国产分析纯或进口分装。

1.3 方法

1.3.1 免疫印迹法检测蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂的预冷的细胞裂解液抽提蛋白,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法检测蛋白浓度。取等量的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),充

分分离蛋白后,用湿转法转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。依次经过常温 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,一抗工作液 4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗工作液室温孵育,再用增强化学发光法(ECL)进行凝胶成像系统曝光显影。Image J 软件分析目的条带与各自内参的灰度值比值,判断目的蛋白的表达水平^[7]。

1.3.2 平板集落形成实验 将 U251 细胞以每孔 500 个的密度接种到 6 孔板中,待次日细胞贴壁后进行放疗(0、2、4、6 Gy),放疗后部分细胞进行 5 mg/L VP 加药处理。培养 3 周后予以 4% 多聚甲醛固定,20% 甲醇渗透,结晶紫染色,在显微镜下计数形成的克隆数目(直径 > 1 mm 的克隆或者大于 50 个细胞的克隆),对数据进行统计学分析,分析 VP 与放疗联合对细胞增殖的影响。

1.3.3 CCK-8 增殖实验 将实验分为空白对照组(即 VP 浓度为 0 mg/L),紫外线对照组(UV 组),VP1 组(VP 浓度为 1.875 mg/L);紫外线 + VP1 组(UV + VP1 组),VP2 组(VP 浓度为 5.000 mg/L),紫外线 + VP2 组(UV + VP2 组)。将单细胞悬液按每孔 5 000 个细胞密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后每孔加入 100 μ l 已稀释的各浓度药物(每组设置 3 个平行孔),空白对照组的孔中加入正常培养基,需要进行紫外线照射的 96 孔板在加药前进行紫外线照射 20 s。培养 24 h 后吸出培养基,加入 100 μ l 10% CCK-8 溶液,设置空白对照并继续培养 2 h;然后选取光密度比较适宜的时间点,酶标仪检测各孔在 450 nm 的光密度值(D 值)。记录结果,绘制细胞生长曲线。

1.3.4 细胞划痕实验 将实验分为溶剂对照组(Veh 组)、VP 对照组(VP 组)、紫外线对照组(UV 组)、紫外线 + VP 组(UV + VP 组),VP 浓度为 2.5 mg/L。在 6 孔板每个孔的底部划 3 ~ 5 条互相平行的划线,将对数期生长的细胞铺至 6 孔板中培养,并控制在次日达到 100% 密度为宜。实验时用 Tip 尖端垂直于 6 孔板进行划痕,划痕与之前的划线垂直相交,动作轻柔。随后用预温的磷酸盐缓冲液(PBS)洗去漂浮的细胞,加入无血清培养基,37℃ 孵育 3 ~ 5 min 后,在显微镜下以划痕与划线的交叉点为标记进行拍照,记为 0 h;于 48 h 后再分别拍照。取相同部位不同时间段的图片进行对比分析,统计划痕中间的细胞数,以此作为评价细胞迁移能力的标准。

1.4 统计学处理 所有实验均独立重复 3 次以上。

使用 Image J 图像分析软件分析图像。实验结果采用 SPSS 16.0 进行统计学处理。两样本均数比较采用两样本 *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析,然后再进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

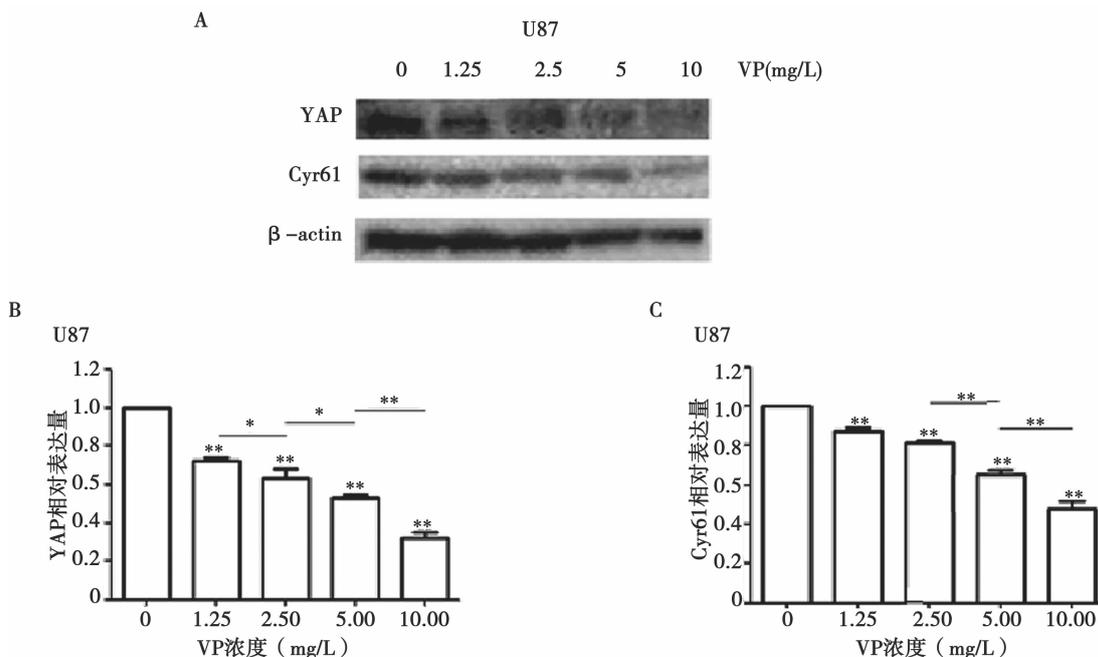
2.1 VP 浓度为 5 mg/L 时抑制 YAP - TEAD 作用明显 为了探求 VP 的适宜浓度范围,应用蛋白免疫印迹试验检测了加入不同药物浓度后细胞中 YAP 及其靶基因 Cyr61 含量的变化,以反映 VP 的效果。结果表明,不同浓度的 VP 处理均能下调 YAP 及其下游靶基因 Cyr61 的含量,在 5 mg/L 时 YAP 及其下游靶基因 Cyr61 的表达水平显著减少 ($P < 0.01$,图 1)。

2.2 VP 联合放疗抑制脑胶质瘤细胞的增殖 为了了解 VP 对脑胶质瘤细胞放疗效果的影响,我们用集落形成实验检测药物浓度为 5 mg/L 的 VP 对 U87 细胞放疗后增殖的影响。结果发现,分别在 0、2、4、6 Gy 的照射剂量之下,VP 组的细胞形成集落的数量显著少于 Veh 对照组 ($P < 0.05$,图 2 A、2B)。临床上的放射治疗主要是用 X 射线照射,也可以用 γ 射线照射,但本质上都是造成 DNA 受损,而紫外线

也能达到这个目的。为了实验操作方便,减少干扰因素,我们采用紫外线照射细胞后进一步用 CCK - 8 实验进行检测。结果显示,紫外线照射后,加入不同浓度 VP 的 U87 细胞增殖速度均显著低于对照组细胞,并且在一定范围内,随着药物剂量的加大,这种趋势越来越明显 ($P < 0.05$,图 2C)。上述结果表明,VP 联合放疗可以增强脑胶质瘤细胞的放疗效果。

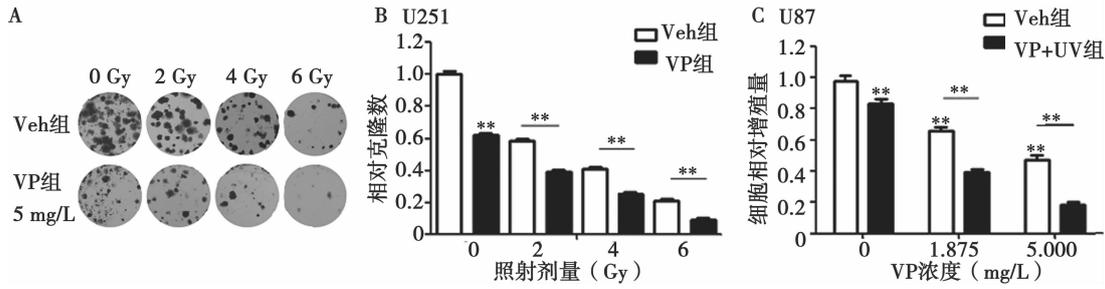
2.3 VP 抑制放疗后细胞周期的进程 我们进一步发现,VP 单独处理可以降低 U251 细胞 $G_1 - S$ 期转换的标志物 CDK4 水平,p - Rb 的水平也呈现相应的变化。而且,VP 联合放疗后,CDK4 和 p - Rb 降低更为显著 ($P < 0.05$,图 3A)。此外,U87 细胞中两个剂量的 VP 联合放疗组在 10 Gy 放疗 12 h 后,CDK4 和 p - Rb 的水平也均显著低于对照组,且剂量越大,降低越明显 ($P < 0.05$,图 3B)。以上结果提示,VP 联合放疗使细胞较晚进入细胞周期而增殖,从而达到抑制细胞增殖、增强放疗的效果。

2.4 VP 联合放疗抑制细胞的迁移 划痕实验结果显示,紫外线照射后,经过 VP 处理的 U251 细胞迁移到划痕中间的数量显著少于对照组 ($P < 0.05$,图 4A、4B)。以上结果表明,VP 能够通过抑制细胞的迁移从而进一步增强放疗效果。



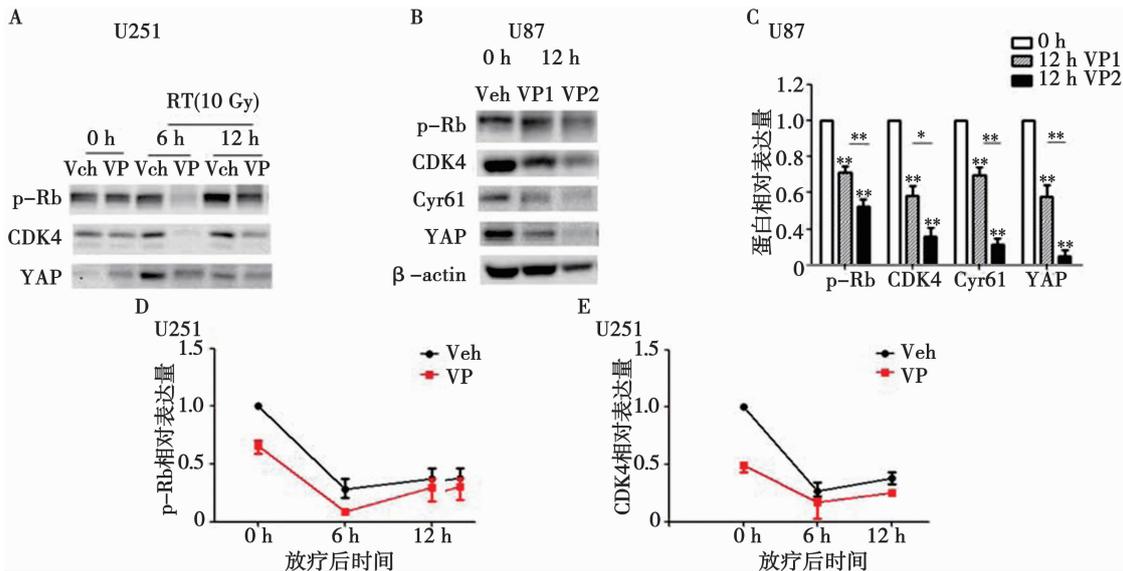
A. 蛋白免疫印迹检测不同浓度的 VP 对 YAP 下游靶基因 Cyr61 含量的影响;B、C. YAP 和 Cyr61 蛋白的相对表达量分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 不同 VP 浓度对 YAP - TEAD 的抑制作用



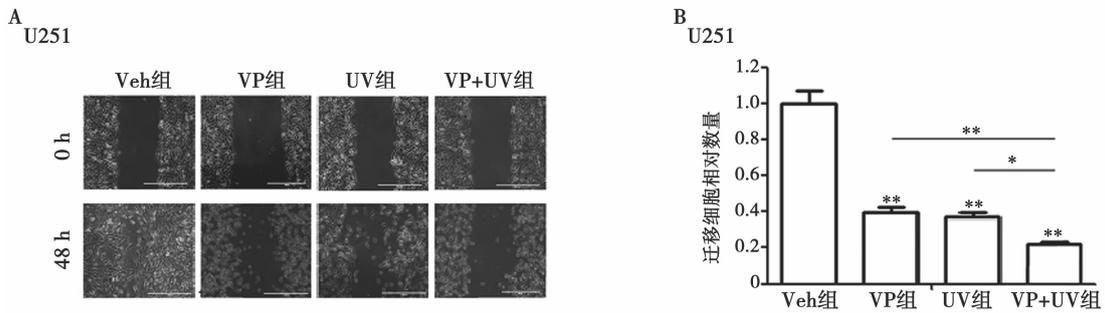
A. 集落形成实验检测 VP 联合不同照射剂量(2、4、6 Gy)对脑胶质瘤细胞集落形成能力的影响;B. 细胞克隆的统计;C. CCK - 8 实验检测 VP 联合紫外线照射对 U87 细胞增殖的影响; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 VP 联合放疗抑制细胞的增殖



A. 蛋白免疫印迹实验检测放疗不同时间后,U251 细胞周期转换标志蛋白水平;VP:5.0 mg/L;RT. 放疗。B. 蛋白免疫印迹实验检测放疗不同时间后,U87 细胞周期转换标志蛋白水平。C. U87 细胞 VP 联合放疗后各蛋白的相对表达量;VP1:2.5 mg/L,VP2:5.0 mg/L。D、E. U251 细胞 p - Rb 和 CDK4 蛋白的相对表达量

图3 VP 抑制放疗后细胞周期的进程



A. 划痕实验检测 VP 联合紫外线照射对细胞迁移能力的影响;B: 迁移细胞的相对数量; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 VP 联合放疗抑制细胞的迁移

3 讨论

由于肿瘤细胞呈高度浸润性生长,胶质母细胞

瘤与周围脑组织边界不清,导致手术无法完全切除而复发。此外,由于血脑屏障的存在,大部分药物不能进入脑内。而且,由于 DNA 损伤修复导致 GBM

存在较强的放疗抵抗,因此,GBM 患者的预后仍不理想。近年来随着分子生物学技术的发展,开展了针对细胞受体、关键基因和调控分子为靶点的靶向治疗不断进行。寻找有潜力的分子治疗靶点,再将分子靶向治疗与放疗结合,提高 GBM 的放疗敏感性,实行个体化综合治疗是提高 GBM 疗效的关键。

本研究发现 YAP-TEAD 靶向药 VP 可以抑制脑胶质瘤细胞的增殖与迁移能力。我们的研究同目前的部分报道相一致。陈敏等^[8]发现 VP 能抑制人类白血病 NB4 细胞的增殖,诱导细胞凋亡;刘国钦等^[9]报道 VP 能诱导肾癌细胞 769-P 细胞凋亡并抑制细胞增殖作用呈浓度及时间依赖性;陈蔚等^[10]发现 VP 能抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖,促进细胞凋亡,导致细胞周期阻滞,抑制细胞迁移和侵袭。相较于之前的报道,本研究首次探讨了 VP 联合放疗对脑胶质瘤细胞的影响,结果显示,VP 联合放疗能更显著地抑制细胞的增殖与迁移能力,表明 VP 促进了放疗效果。

放射治疗是临床治疗脑胶质瘤的主要手段之一,DNA 是放射性损伤的决定性靶点。放疗时,DNA 单链或双链断裂,从而阻止 DNA 复制,诱导细胞凋亡。但受射线损伤的细胞会在细胞周期检测点的参与下,停滞于细胞周期的某个或某些时相,进行受损 DNA 的修复^[2]。待细胞修复或排除故障后,细胞周期恢复运转,从而保证细胞生存并发挥功能。在本实验中我们不仅检测了 VP 联合放疗对细胞增殖的影响,更进一步探究了其作用机制。我们发现,VP 单独处理可以降低脑胶质瘤细胞 G₁-S 期转换的标志物 CDK4 和 p-Rb 的表达水平;在 VP 联合放疗后,CDK4 和 p-Rb 表达水平的降低更为显著。另外,两个剂量的 VP 联合放疗组在放疗 12 h 后,G₁-S 期转换的标志物 CDK4 和 p-Rb 的蛋白水平也均显著低于对照组,且剂量越大,降低越明显。以上结果提示,VP 可以使细胞停止在 G₁期,从而较晚进入细胞周期,达到增强放疗的效果。值得注意的是,相较于前人的报道,我们的研究结果还显示 VP 能使 YAP 及其下游靶基因 Cyt61 的表达水平显著降低,提示 YAP 可能促进自身的转录,从而表明 VP 可能通过降低 YAP 自身表达并且阻断 YAP-TEAD 的结合,抑制 YAP 下游靶基因的转录与细胞的增殖。

综上所述,我们发现 VP 靶向 YAP 的分子治疗可抑制脑胶质瘤细胞增殖与迁移,联合放疗作用更

为显著。其作用机制主要通过抑制 YAP-TEAD 以及下游靶基因的转录阻滞细胞周期的 G₁-S 期转换来实现。我们的研究为靶向 YAP 的分子治疗联合放疗治疗 YAP 高表达的脑胶质瘤患者提供了理论与实验依据。

参考文献:

- [1] Camacho CV, Todorova PK, Hardebeck MC, et al. DNA double-strand breaks cooperate with loss of Ink4 and Arf tumor suppressors to generate glioblastomas with frequent Met amplification [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (8): 1064 - 1072. DOI: 10.1038/onc.2014.29.
- [2] Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers [J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 230 - 234. DOI: 10.1038/nature10155.
- [3] Hansen CG, Moroishi T, Guan KL. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25 (9): 499 - 513. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.05.002.
- [4] Xie D, Yin D, Tong XJ, et al. Cyt61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(6): 1987 - 1996. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-0666.
- [5] Brodowska K, Al-Moujahed A, Marmalidou A, et al. The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth invitro without light activation [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 124: 67 - 73. DOI: 10.1016/j.exer.2014.04.011.
- [6] Al-Moujahed A, Brodowska K, Stryjewski TP, et al. Verteporfin inhibits growth of human glioma *in vitro* without light activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7602. DOI: 10.1038/s41598-017-07632-8.
- [7] Liu YP, Dong FX, Chai X, et al. Role of autophagy in capsaicin-induced apoptosis in U251 glioma cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(5): 737 - 743. DOI: 10.1007/s10571-015-0254-y.
- [8] 陈敏,刘北忠,姚仕菲,等. 维替泊芬通过抑制 YAP 诱导白血病 NB4 细胞凋亡 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37 (5): 2175 - 2181. DOI: 10.13417/j.gab.037.002175.
- [9] 刘国钦,胡国强,冼玉荣,等. 维替泊芬抑制肾癌细胞 769-P 增殖及其机制 [J]. *分子影像学杂志*, 2018, 41(4): 509 - 513. DOI:10.12122/j.issn.1674-4500.2018.04.20.
- [10] 陈蔚,余铃,陈敬腾,等. 维替泊芬影响骨肉瘤 MG63 细胞增殖和迁移侵袭的作用机制 [J]. *安徽医药*, 2019, 23(12): 2337 - 2341. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.002.

收稿日期:2020-03-09 修回日期:2020-08-08

本文编辑:吴进