

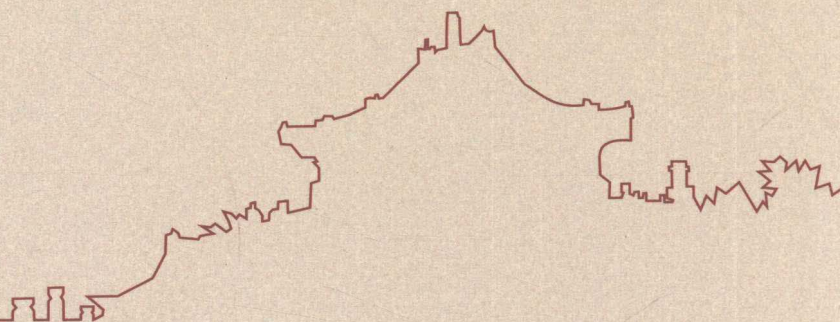
武汉大学优秀博士学位论文文库



RND3在人脑胶质母细胞瘤中的作用及机制研究

The Effect of RND3 in Human Glioblastoma and Mechanism

刘宝辉 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

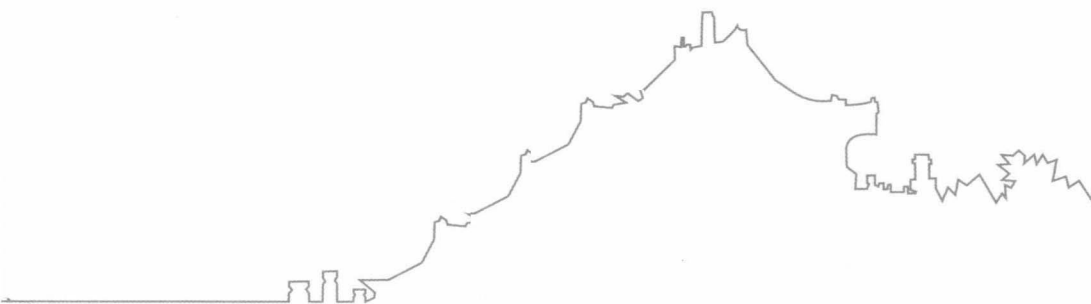
武汉大学优秀博士学位论文文库



RND3在人脑胶质母细胞瘤中的作用及机制研究

The Effect of RND3 in Human Glioblastoma and Mechanism

刘宝辉 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

RND3 在人脑胶质母细胞瘤中的作用及机制研究/刘宝辉著. —武汉: 武汉大学出版社, 2016. 4

武汉大学优秀博士学位论文文库

ISBN 978-7-307-17404-7

I. R… II. 刘… III. 蛋白质—应用—神经胶质瘤—研究 IV. R730.264

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 302879 号

责任编辑: 黄汉平 责任校对: 汪欣怡 版式设计: 马 佳

出版发行: 武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)
(电子邮件: cbs22@whu.edu.cn 网址: www.wdp.com.cn)

印刷: 武汉市洪林印务有限公司

开本: 720 × 1000 1/16 印张: 7.5 字数: 106 千字 插页: 2

版次: 2016 年 4 月第 1 版 2016 年 4 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-17404-7 定价: 25.00 元

版权所有, 不得翻印; 凡购我社的图书, 如有质量问题, 请与当地图书销售部门联系调换。

武汉大学
优秀博士学位论文文库
编委会

主 任 李晓红

副主任 韩 进 舒红兵 李 斐

委 员 (按姓氏笔画为序)

马费成	邓大松	边 专	刘正猷	刘耀林
杜青钢	李义天	李建成	何光存	陈 化
陈传夫	陈柏超	冻国栋	易 帆	罗以澄
周 翔	周叶中	周创兵	顾海良	徐礼华
郭齐勇	郭德银	黄从新	龚健雅	谢丹阳

总 序

创新是一个民族进步的灵魂，也是中国未来发展的核心驱动力。研究生教育作为教育的最高层次，在培养创新人才中具有决定意义，是国家核心竞争力的重要支撑，是提升国家软实力的重要依托，也是国家综合国力和科学文化水平的重要标志。

武汉大学是一所崇尚学术、自由探索、追求卓越的大学。美丽的珞珈山水不仅可以诗意栖居，更可以陶冶性情、激发灵感。更为重要的是，这里名师荟萃、英才云集，一批又一批优秀学人在这块沃土上砥砺前行、传播真理、探索新知。一流的教育资源，先进的教育制度，为优秀博士学位论文的产生提供了肥沃的土壤和适宜的气候条件。

致力于建设高水平的研究型大学，武汉大学素来重视研究生培养，是我国首批成立有研究生院的大学之一，不仅为国家培育了一大批高层次拔尖创新人才，而且产出了一大批高水平科研成果。近年来，学校明确将“质量是生命线”和“创新是主旋律”作为指导研究生教育工作的基本方针，在稳定研究生教育规模的同时，不断推进和深化研究生教育教学改革，使学校的研究生教育质量和知名度不断提升。

博士研究生教育位于研究生教育的最顶端，博士研究生也是学校科学研究的重要力量。一大批优秀博士研究生，在他们学术创作最激情的时期，来到珞珈山下、东湖之滨。珞珈山的浑厚，奠定了他们学术研究的坚实基础；东湖水的灵动，激发了他们学术创新的无限灵感。在每一篇优秀博士学位论文的背后，都有博士研究生们刻苦钻研的身影，更有他们的导师的辛勤汗水。年轻的学者们，犹如在海边拾贝，面对知识与真理的浩瀚海洋，他们在导师的循循善

诱下，细心找寻着、收集着一片片靓丽的贝壳，最终把它们连成一串串闪闪夺目的项链。阳光下的汗水，是他们砥砺创新的注脚；面向太阳的远方，是他们奔跑的方向；导师们的悉心指点，则是他们最值得依赖的臂膀！

博士学位论文是博士生学习活动和研究工作的主要成果，也是学校研究生教育质量的凝结，具有很强的学术性、创造性、规范性和专业性。博士学位论文是一个学者特别是年轻学者踏进学术之门的标志，很多博士学位论文开辟了学术领域的新思想、新观念、新视阈和新境界。

据统计，近几年我校博士研究生所发表的高质量论文占全校高水平论文的一半以上。至今，武汉大学已经培育出 18 篇“全国百篇优秀博士学位论文”，还有数十篇论文获“全国百篇优秀博士学位论文提名奖”，数百篇论文被评为“湖北省优秀博士学位论文”。优秀博士结出的累累硕果，无疑应该为我们好好珍藏，装入思想的宝库，供后学者慢慢汲取其养分，吸收其精华。编辑出版优秀博士学位论文文库，即是这一工作的具体表现。这项工作既是一种文化积累，又能助推这批青年学者更快地成长，更可以为后来者提供一种可资借鉴的范式抑或努力的方向，以鼓励他们勤于学习，善于思考，勇于创新，争取产生数量更多、创新性更强的博士学位论文。

武汉大学即将迎来双甲华诞，学校编辑出版该文库，不仅仅是为百廿武大增光添彩，更重要的是，当岁月无声地滑过 120 个春秋，当我们正大踏步地迈向前方时，我们有必要回首来时路，我们有必要清晰地审视我们走过的每一个脚印。因为，铭记过去，才能开拓未来。武汉大学深厚的历史底蕴，不仅在于珞珈山的一草一木，也不仅仅在于屋檐上那一片片琉璃瓦，更在于珞珈山下的每一位学者和学生。而本文库收录的每一篇优秀博士学位论文，无疑又给珞珈山注入了新鲜的活力。不知不觉地，你看那珞珈山上的树木，仿佛又茂盛了许多！

李晓红

2013 年 10 月于武昌珞珈山

摘 要

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是成人中枢神经系统最常见最致命的原发性恶性肿瘤,常用治疗方法为手术治疗、放疗和化疗。但即使是联合应用手术治疗与放化疗,患者的预后仍然较差,确诊后的中位生存时间只有14个月。如何提高GBM治疗效果是神经外科临床和基础研究迫切需要解决的难题。目前的观点认为,GBM治疗效果的提高,依赖于对其发生发展过程中分子机制的进一步了解。

GBM的异常增殖是GBM的一个重要特征,抑制GBM细胞增殖可以提高患者的生存率,但目前还不清楚GBM细胞异常增殖的分子机制。本书前期通过基因芯片方法检测了大量基因在人脑GBM组织与正常脑组织中的表达量,发现G蛋白RND3基因表达水平在人脑GBM组织中远远低于其在正常脑组织中,体外细胞水平实验研究表明稳定高表达外源性RND3可以明显抑制GBM细胞的增殖。在此基础上进行的小鼠脑内种植GBM细胞的实验结果进一步显示高表达RND3可以明显抑制GBM肿瘤的生长。这些实验结果均提示:RND3通过抑制GBM细胞的增殖从而抑制肿瘤生长。

RND3作为小G蛋白GTP水解酶(small GTPase)家族中的一员,可以调节部分肿瘤细胞的增殖,但具体机制尚不清楚。前期实验结果提示RND3基因的表达水平与Notch1信号的强弱紧密相关,敲除小鼠颅内RND3基因可以激活Notch1信号通路。GBM细胞系U251细胞中RND3可以通过结合Notch1受体的活性形式—Notch1受体的膜内段—NICD,影响并降低细胞核内的NICD的表达水平。这些结果提示RND3可能通过调节细胞核内NICD

的表达水平来调节 Notch1 信号, Notch1 信号通路是调节 GBM 细胞增殖的关键信号通路, 但到目前为止, Notch1 信号调控细胞增殖的分子机制仍不清晰。如何准确、有效而又合理地控制 Notch1 信号仍然是 GBM 临床治疗中的巨大挑战。基于这些困难, 本书在前期研究的基础上提出了 RND3 通过调节 Notch1 信号通路进而调节 GBM 细胞增殖的假说。为了验证这一假说, 本书分为四部分进行研究: ①RND3 在 GBM 内的表达及与患者术后生存时间的关系; ②RND3 在 GBM 细胞增殖中的作用; ③RND3 调节 GBM 细胞增殖的机制; ④RND3 调节 Notch1 信号通路的分子机制。

2.1 RND3 在 GBM 内的表达及与患者术后生存时间的关系

目的:

检测 RND3 在胶质母细胞瘤内的表达量, 揭示 RND3 与患者术后生存时间的关系。

方法:

检测小鼠各个器官内特别是中枢神经系统中 RND3 的表达水平, 为研究 RND3 在 GBM 细胞增殖中的作用提供生理依据; 收集人脑 GBM 与正常脑组织, 采用荧光双染检测 RND3 在胶质细胞、神经细胞及 GBM 细胞内的表达位置; 采用免疫印迹技术与荧光定量 PCR 检测 RND3 蛋白在正常脑组织和 GBM 组织中的表达水平, 应用 student t test 检验 RND3 蛋白水平在 GBM 与脑组织内的差别是否有统计学意义, 应用 mann-Whitney's test 检验 RND3 mRNA 的表达水平在 GBM 与脑组织内的差别是否有统计学意义; 采用免疫组织化学染色方法用于回顾性分析 49 例 GBM 患者 RND3 表达水平, 定量后从小到大排列, 前 25 例为 RND3 低表达组, 后 24 例为 RND3 高表达组, 患者术后存活时间为患者手术之后存活的月数, 应用 mann-Whitney's test 和 Kaplan-Meier test 检验 RND3 低表达组和高表达组术后生存时间差异有无统计学意义, 本文选取 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

结果:

(1)RND3 在中枢系统高表达: Laz staing 结果显示, RND3 在中枢神经系统高表达; 荧光定量 PCR 结果显示, RND3 在脑组织内高表达。

(2)RND3 在胶质细胞和神经元内高表达: 免疫荧光双染结果显示, RND3 在胶质细胞和神经元内高表达, 且主要表达于细胞核内。

(3)RND3 在 GBM 内主要表达于细胞核: 免疫组织化学染色及免疫荧光结果显示, RND3 在 GBM 细胞内主要表达于细胞核内。

(4)人脑 GBM 组织中的 RND3 表达水平低于正常脑组织: 免疫组织化学染色结果显示, 与正常脑组织相比, RND3 在人脑 GBM 组织内低表达, RND3 表达量从正常脑组织到 GBM 组织, 逐渐降低。免疫印迹结果显示, 在 4 例人脑 GBM 组织及配对脑组织中, RND3 在 GBM 内蛋白表达量都低于其配对脑组织; 荧光定量 PCR 结果显示, 在 4 例人脑 GBM 组织及配对脑组织中, RND3 在 GBM 内 mRNA 表达量都低于其配对脑组织 ($P<0.05$)。免疫印迹结果显示, RND3 在 15 例 GBM 内蛋白平均表达量低于在 15 例正常脑组织的蛋白平均表达量 ($P<0.001$); 荧光定量 PCR 结果显示, RND3 在 13 例 GBM 内 mRNA 平均表达量低于在 13 例正常脑组织 mRNA 的平均表达量 ($P=0.001<0.05$)。

(5)RND3 低表达患者的生存时间短于 RND3 高表达的患者: RND3 低表达组患者生存时间明显短于 RND3 高表达组患者, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。

结论: RND3 在 GBM 组织内低表达, 可能在 GBM 发生发展中有重要作用。

关键词: RND3 GBM 生存时间

2.2 RND3 在 GBM 细胞增殖中的作用

目的:

本研究发现 RND3 在 GBM 内低表达并与患者的预后密切相关,

提示 RND3 可能是 GBM 发生发展中的一个关键作用因子,因而需要进一步探讨 RND3 在 GBM 细胞中的作用。

方法:

构建 RND3 基因敲除小鼠,观察其是否能自发形成 GBM,并观察小鼠中枢神经系统相关变化;采用免疫组织化学染色方法回顾性分析 20 例人脑 GBM 患者肿瘤中 RND3 表达量,定量后按照从小到大排列,较小的 10 例定义为 RND3 低表达组,较大的 10 例定义为 RND3 高表达组,采用 mann-Whitney's test 分析两组肿瘤大小(肿瘤大小为手术时切除的肿瘤大小)之间的差异有无统计学意义;免疫印迹技术定量检测后,使用 Pearson's t test 分析 15 例 GBM 组织和相应正常脑组织中的 RND3 表达量与 Histone H3 磷酸化水平之间的相关性;检测 U87 及 U251 细胞内 RND3 表达量,选出本研究所需的主要细胞;构建稳定高表达和低表达 RND3 的四个 GBM 细胞系: GFP、GFP-RND3、siCtrl 和 siRND3,应用细胞计数法绘制 1~4 天细胞生长曲线,应用 student t test 检验高表达、低表达 RND3 组与其各自对照组之间的差异有无统计学意义;BrdU 法检测细胞增殖,并进行定量分析,计算各组阳性细胞百分比,应用 student t test 检验高表达、低表达 RND3 组与其各自对照组之间的差异有无统计学意义;免疫印迹技术检测细胞内 Histone H3 磷酸化水平;通过立体定向法将 RND3 高表达和正常表达的 GBM 细胞分别注射到裸鼠右脑尾状核,15 周后取鼠脑观察肿瘤大小并进行定量分析。

结果:

(1)成功构建 RND3 基因敲除小鼠: RND3 基因敲除小鼠构建成功,无自发性 GBM 形成。较对照组小鼠而言, RND3 基因敲除小鼠生长发育缓慢,但脑部发育先于对照组小鼠。

(2)人脑 GBM 组织中 RND3 表达水平与肿瘤大小和 HistoneH3 磷酸化水平均呈负相关: RND3 高表达组患者肿瘤组织的体积小于 RND3 低表达组患者($P=0.015<0.05$);肿瘤组织中 RND3 表达水平与 Histone H3 磷酸化水平呈负相关($R=-0.4598$, $P=0.0053<0.05$)。

(3)选择 U251 细胞作为研究 GBM 的主要细胞: U251 和 U87

都有 RND3 表达, 但 RND3 在 U251 中表达相对较低, 而 Histone H3 的磷酸化水平相对较高。因为本书重点研究高表达 RND3 对 GBM 的作用, U251 细胞中 RND3 表达降低, 转染 RND3 质粒后, 更易得到与野生型 U251 细胞对比明显的 RND3 表达量, 从而引起细胞表型和相关信号通路的改变; 且 U251 中的 RND3 也可以检测到, 足以用于 RND3 敲除实验, 因此, 选用 U251 作为本实验的主要细胞, 同时使用 U87 细胞进行验证。

(4) 成功构建 RND3 高表达和 RND3 低表达的稳定细胞系: 在波长 488nm 的激发光线刺激下细胞发出均一的绿色荧光, 免疫印迹结果显示, 高表达 RND3 的细胞 RND3 蛋白表达量明显升高, 低表达 RND3 的细胞 RND3 蛋白表达量明显降低; 荧光定量 PCR 结果显示, 高表达 RND3 的细胞, RND3 的 mRNA 明显升高 ($P < 0.0001$); 低表达 RND3 的细胞, RND3 的 mRNA 明显降低 ($P < 0.0001$)。

(5) RND3 可以在体外负性调节 GBM 细胞增殖: 细胞增殖曲线显示, 在第一天和第二天, 高表达 RND3 (GFP-RND3 组) 细胞数量明显减少 ($P < 0.05$), 低表达 RND3 (siRND3 组) 细胞数量明显增多 ($P < 0.05$); 在第三天和第四天, 差异进一步扩大, 高表达 RND3 组 (GFP-RND3 组) 细胞数量明显减少 ($P < 0.05$), 低表达 RND3 (siRND3 组) 细胞数量明显增多 ($P < 0.05$)。BrdU 结果显示, 高表达 RND3 细胞 BrdU 阳性细胞比例变小 ($P = 0.003 < 0.05$), 低表达 RND3 细胞 BrdU 阳性细胞比例变大 ($P = 0.003 < 0.05$)。免疫印迹结果显示, 高表达 RND3, Histone H3 磷酸化表达水平降低; 低表达 RND3, Histone H3 磷酸化水平升高。

(6) RND3 在体内可以抑制 GBM 肿瘤生长: 9 只 GFP 组裸鼠都有肉眼可见肿瘤, 而 9 只 GFP-RND3 组裸鼠只有一只具有很小的肉眼可见肿瘤, 定量后发现, 高表达 RND3 组 (GFP-RND3) 肿瘤的体积明显小于对照组 (GFP) ($P < 0.001$)。

结论:

(RND3 可以抑制 GBM 细胞增殖和 GBM 肿瘤生长。)

关键词 RND3 GBM 细胞增殖

2.3 RND3 调节 GBM 细胞增殖的机制

目的:

RND3 可以调节 GBM 细胞的增殖,但机制尚不清楚。应用基因芯片技术检测 RND3 基因敲除小鼠脑组织内基因表达后发现多个 Notch1 信号通路靶基因表达升高,提示 RND3 可能调节 Notch1 信号通路。拟研究 RND3 对 Notch1 信号通路的作用及 Notch1 信号通路在 RND3 调节 GBM 细胞增殖中的作用。

方法:

采用基因芯片技术检测 RND3 基因敲除小鼠脑组织中基因表达的变化,并采用荧光定量 PCR 和免疫印迹技术检测 RND3 基因敲除小鼠和正常小鼠脑组织中 Notch1 信号通路靶基因 HES1 的蛋白和 mRNA 表达量,应用 student t test 检验差异有无统计学意义;应用荧光定量 PCR 检测在上调或下调 RND3 表达后的 GBM 细胞中 Notch1 信号通路靶基因表达的变化,荧光素酶法检测 Notch1 信号通路活性变化,免疫印迹技术检测 Notch1 信号调节的蛋白表达变化,应用 student t test 检验差异有无统计学意义;采用免疫组织化学染色、免疫印迹技术和荧光定量 PCR 等方法检测人脑 GBM 组织与正常脑组织中 Notch1 及 Notch1 信号通路靶基因 HES5 的表达水平,采用 Pearson t test 检验 RND3 与 HES5 表达水平的相关性。应用细胞计数法和 BrdU 法检测活化 Notch1 信号通路(转染 Flag-NICD)或抑制 Notch1 信号通路(Compound E 和 siNotch1)后各组细胞数量和 BrdU 阳性细胞数量,并绘制生长曲线和计算 BrdU 阳性细胞百分比,应用 student t test 检验差异有无统计学意义。转染 Flag-NICD 到稳定高表达 RND3 的细胞中,BrdU 法和细胞计数法检测 GFP、GFP-RND3 和 GFP-RND3+Flag-NICD 组的细胞数和 BrdU 阳性细胞数,计算 BrdU 阳性细胞百分比,应用 one way anova 检验三组之间差异有无统计学意义。将 GBM 细胞分为两组,给予 DMSO 和 Compound E 处理,分别转染 siCtrl 和 siRND3 后分为两个亚组;在第 1、2、3、4 天,使用细胞计数分别得到各个亚组细胞

数,应用 one way anova 检验各组之间差异有无统计学意义;将 GBM 细胞分为两组,给予 siCtrl 和 siNotch1 处理,分别转染 siCtrl 和 siRND3 后分为两个亚组;在第 1、2、3、4 天,使用细胞计数分别得到各个亚组细胞数,应用 one way anova 检验各组之间差异有无统计学意义。

结果:

(1)RND3 在中枢神经系统中可以调节 Notch1 信号通路:基因芯片结果显示,RND3 基因敲除小鼠脑组织中 Notch1 信号通路中的多个靶基因表达增加;免疫印迹及荧光定量 PCR 结果显示 RND3 基因敲除小鼠的脑组织内的 HES1 蛋白和 mRNA 表达水平均明显增高($P<0.05$)。

(2)RND3 在 GBM 内可以负性调节 Notch1 信号通路:在 U251 细胞中,荧光定量 PCR 结果显示,高表达 RND3U251 细胞中 HES1 的 mRNA 表达降低($P=0.0077<0.05$),低表达 RND3 U251 细胞中 HES1 的 mRNA 表达增加($P=0.0016<0.05$);免疫印迹技术结果显示,高表达 RND3 细胞中 HES1 蛋白表达降低,低表达 RND3 细胞中 HES1 的蛋白表达增高;荧光素酶结果显示,细胞中 RND3 高表达时荧光素酶活性降低($P=0.0001<0.05$),反之荧光素酶活性升高($P=0.0002<0.05$);在 U87 细胞和 293T 细胞中得到的结果与 U251 细胞一致;在正常人脑组织和 GBM 组织中,RND3mRNA 表达量与 HES5mRNA 表达量呈负相关($R=-0.8430$, $P=0.0002<0.05$)。

(3)Notch1 信号通路可以调节 GBM 细胞增殖:免疫组织化学染色及免疫印迹结果显示,GBM 组织内 Notch1 及 Notch1 靶基因 HES5 的表达高于正常脑组织。Flag-NICD 激活 Notch1 信号通路后,细胞中 HistoneH3 磷酸化水平升高,细胞数明显增多($P<0.05$),BrdU 阳性细胞百分比增大($P<0.05$);Compound E 或 siNotch1 抑制 Notch1 信号通路后,细胞内 HistoneH3 磷酸化水平明显降低,细胞数明显减少($P<0.05$),BrdU 阳性细胞百分比明显减小($P<0.05$)。

(4)RND3 通过调节 Notch1 信号通路调节 GBM 细胞增殖:在体外培养环境下,高表达 RND3(GFP-RND3 组)U251 细胞比正常

表达 RND3(GFP 组)U251 细胞的细胞数明显减少, BrdU 阳性细胞百分比减小;然而,与 GFP 组相比,高表达 RND3 和 NICD(GFP-RND3+Flag-NICD 组)U251 细胞的细胞数与 BrdU 阳性细胞数没有明显改变,差异无统计学意义($P=0.292>0.05$)。在 U251 细胞中,敲低 RND3,细胞数增多($P<0.05$),然而,在阻断 Notch1 信号通路的 U251 细胞中,敲低 RND3,细胞数量无明显改变,与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:

(GBM 中 RND3 可以负性调节 Notch1 信号通路, Notch1 信号通路是 RND3 调节 GBM 细胞增殖的关键信号通路。)

关键词: RND3 Notch1 信号通路 细胞增殖

2.4 RND3 调节 Notch1 信号通路的机制

目的:

RND3 在 GBM 内通过调控 Notch1 信号通路调节细胞增殖,但具体机制尚不明确。在 Notch1 信号通路中, Notch1 经剪切生成 NICD,进入细胞核,在 MAML 1 的参与下与 CSL 结合形成 NICD-CSL-MAML 1 集团,绑定到 Notch1 信号通路靶基因启动子上,进而调节靶基因的表达;前述研究发现, RND3 主要表达于细胞核中,因此其可能在细胞核内发挥主要作用,而在 Notch1 信号通路中,处于细胞核且发挥关键作用的是 NICD-CSL-MAML 1 集团,因此,本文主要研究 RND3 是否通过调节 NICD-CSL-MAML 1 集团进而调节 Notch1 信号通路。

方法:

采用免疫荧光检测 RND3、Notch1、CSL 和 MAML 1 在 GBM 细胞 U251 内的表达;采用免疫印迹技术检测高表达 RND3 后 Notch1、CSL 和 MAML 1 的表达量及细胞核内 NICD 的表达量;采用荧光定量 PCR 检测高表达 RND3 后 Notch1、CSL 和 MAML 1 的 mRNA 表达量;采用免疫共沉淀检测 RND3 是否与 Notch1、CSL 和 MAML 1 结合;采用 Chip 检测高表达 RND3 后 NICD 与 HES1 启动子的结合数

量,应用 one way anova 检验各组之间差异有无统计学意义;转染 Flag-NICD 到稳定高表达 RND3 的 U251 细胞,采用荧光定量 PCR 检测 GFP、GFP-RND3 和 GFP-RND3 + Flag-NICD 组细胞中 HES1 的 mRNA 表达量,应用 one way anova 检验三组之间差异有无统计学意义;将 GBM 细胞分为两组,给予 siCtrl 和 siNotch1 处理,分别转染 siCtrl 和 siRND3 后分为两个亚组,应用荧光定量 PCR 检测各个组 HES1 的 mRNA 表达量,应用 one way anova 检验各个组之间差异有无统计学意义;采用免疫印迹技术检测 RND3 和 Notch1 在 15 例正常人脑组织和 15 例 GBM 组织中的表达量,定量并采用 Pearson t test 检验 RND3 与 Notch1 蛋白表达量的相关性;采用免疫印迹技术检测高表达 RND3 在阻断泛素化途径的情况下对 NICD 的作用。

结果:

(1)RND3 与 Notch1 都主要表达于细胞核:免疫荧光双染结果显示,GBM 细胞系 U251 细胞、GBM 组织中的 RND3 和 Notch1 主要表达于细胞核内,而且具有相同的表达位点。

(2)RND3 与 NICD 结合:免疫共沉淀结果显示,在 Myc-RND3 沉淀的蛋白中,可以检测到 Flag-NICD;在 Flag-NICD 沉淀的蛋白中,可以检测到 Myc-RND3。

(3)RND3 可以降低 NICD 蛋白表达量,但 mRNA 表达量无明显改变:免疫印迹结果显示,高表达 RND3 可以降低 NICD 的表达量,尤其是细胞核内 NICD 的表达量;荧光定量 PCR 结果显示,高表达 RND3(GFP-RND3 组)时,Notch1 的 mRNA 表达量无明显改变($P>0.05$)。

(4)RND3 与 CSL 表达位置相同:免疫荧光双染结果显示,RND3 与 CSL 在 GBM 中主要表达于细胞核,且表达位点相同。

(5)RND3 可以与 CSL 结合:免疫共沉淀结果显示,在 GFP-RND3 沉淀的蛋白中,可以检测到 Myc-CSL;在 Myc-CSL 沉淀的蛋白中,可以检测到 GFP-RND3。

(6)高表达 RND3 可以降低 CSL 蛋白表达量,但 CSL mRNA 无明显改变:免疫印迹结果显示,高表达 RND3,CSL 蛋白表达量明显降低;荧光定量 PCR 结果显示,高表达 RND3 时,CSL 的 mRNA

表达量无明显改变($P>0.05$)。

(7)RND3 与 MAML 1 表达位置相同:免疫荧光双染结果显示,RND3 与 MAML 1 在 GBM 中主要表达于细胞核,且表达位点相同。

(8)RND3 可以与 MAML 1 结合:免疫共沉淀结果显示,在 GFP-RND3 沉淀蛋白中,可以检测到 Flag-MAML 1;在 Flag-MAML 1 沉淀的蛋白中,可以检测到 GFP-RND3。

(9)高表达 RND3 可以降低 MAML 1 蛋白表达量,但 MAML 1 的 mRNA 表达量无明显改变:免疫印迹结果显示,高表达 RND3, MAML 1 蛋白表达量明显降低;荧光定量 PCR 结果显示,高表达 RND3 时, MAML 1 的 mRNA 表达量无明显改变($P>0.05$)。

(10)RND3 调节 NICD 表达量是 RND3 调节 Notch1 信号通路的关键:CHIP 结果显示,高表达 RND3 后, NICD 与 HES1 启动子结合减少($P<0.001$)。在 U251 细胞中,高表达 RND3 (GFP-RND3 组), HES1 的 mRNA 表达明显降低($P<0.001$),同时高表达 RND3 与 Flag-NICD (GFP-RND3+Flag-NICD 组), HES1 的 mRNA 表达量与对照组(GFP 组)相比,差异无统计学意义($P=0.3121>0.05$)。在 U251 细胞中,敲低 RND3 (siRND3), HES1 的 mRNA 表达量明显升高($P=0.02529<0.05$),然而,在阻断 NICD 表达 (siNotch1) 的 U251 细胞中,敲低 RND3 (siRND3), HES1 的 mRNA 表达量无明显改变,与对照组相比,差异无统计学意义($P=0.2118>0.05$)。在 GBM 组织和正常脑组织中, RND3 与 Notch1 蛋白表达量负相关($R=-0.6003$),具有统计学意义($P=0.0002<0.05$)。

(11)RND3 通过调节 NICD 稳定性调节 NICD 表达量:免疫印迹结果显示, NICD 表达量随 RND3 表达量增加而减少,但当我们使用 MG-132 阻断细胞的泛素化时, NICD 表达量随着 RND3 表达量增加无明显改变。

结论:

RND3 通过降低 NICD-CSL-MAML 1 集团的表达量抑制 Notch1 信号通路,这一过程的关键是 RND3 对 NICD 表达量的调节。

关键词: RND3 NICD CSL MAML 1 HES1

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) was the most common and lethal primary brain tumor in adults. The current gold standard of therapy for GBM consisted of surgical resection when feasible followed by chemo and radiotherapy. Despite combined with them, GBM remained a uniformly lethal disease with a dismal prognosis. Median patient survival continued to be 14 months post-diagnosis. Thus the field was in great need for new and novel tumor-specific therapies.

Uncontrolled proliferation was one of the most important characters of glioblastoma, inhibition of glioblastoma proliferation can improve the outcome of patients. However, the mechanism of uncontrolled proliferation was still unknown. We detected the expression level of genes in human glioblastoma and human normal brain by using Gene Chip Technology and found that RND3 gene was down regulated significantly in glioblastoma compared to normal brain tissues. The proliferation of glioblastoma was inhibited when RND3 was over expressed in U251 cells which was one of the most popular glioblastoma cells in glioblastoma research. Glioblastoma cells which stable over expressed RND3 and its control were injected into nude mice brain and data showed that the tumors were smaller when RND3 was over expressed. These data indicated that RND3 inhibited glioblastoma cells proliferation and glioblastoma growth both in vitro and in vivo.

RND3 is a member of the Rnd subfamily with unusual properties in that it lacks any detectable GTPase activity and it does not bind GDP. Therefore, RND3 does not behave like a conventional molecular