

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0457-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240219

通用转录因子2I在胶质母细胞瘤替莫唑胺化疗抵抗中的作用

周建国¹, 姜红建¹, 朱其辉², 张耿强², 邓琪琳², 齐玲², 李凯舒², 于洪泉¹

(1. 吉林大学第一医院神经肿瘤外科, 吉林 长春 130021; 2. 广州医科大学附属清远医院神经外科, 广东 清远 511518)

[摘要] **目的:** 探讨通用转录因子2I (GTF2I) 在胶质母细胞瘤 (GBM) 替莫唑胺化疗抵抗中的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 基于转录因子预测网站 (PROMO网站), 生物信息学分析GBM组织中甲基转移酶1 (DNMT1)、损伤特异性DNA结合蛋白1 (DDB1)、染色盒同源物5 (CBX5) 和着色性干皮病基因组C (XPC) 的共同转录因子, 并基于癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库进行DDB1、CBX5、XPC和DNMT1与GTF2I和甲基鸟嘌呤甲基转移酶 (MGMT) 的相关性分析及生存分析。分别用小干扰序列 (siRNA) 转染并沉默人脑多形性成胶质细胞瘤 T98 细胞和人脑胶质瘤 LN229 细胞中MGMT及GTF2I的基因表达, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测上述基因的mRNA表达水平。沉默GTF2I基因后, 平板克隆形成实验检测肿瘤细胞的集落形成能力, CCK-8法检测细胞对替莫唑胺的敏感性。**结果:** 生物信息学分析, GBM组织中DDB1、CBX5、XPC和DNMT1表达水平与GTF2I表达水平呈显著正相关关系 ($P < 0.05$), 与MGMT表达水平呈负相关关系 ($P < 0.05$); GTF2I表达水平与MGMT表达水平呈显著负相关关系 ($P < 0.05$)。剔除未接受替莫唑胺治疗的GBM患者的生存分析, GTF2I高表达的患者总体生存时间降低。沉默MGMT基因后, 人脑胶质瘤 T98 细胞中GTF2I、DDB1、CBX5和XPC mRNA表达水平升高 ($P < 0.001$); 沉默GTF2I基因后, 人脑胶质瘤 LN229 细胞中MGMT mRNA表达水平升高 ($P < 0.05$), 而DDB1、CBX5、XPC和DNMT1 mRNA表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。平板克隆形成实验, 沉默GTF2I基因前后, 细胞集落形成能力比较差异无统计学意义 ($P = 0.138$); CCK-8法检测, 与对照组比较, 观察组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 转录因子GTF2I可以调控MGMT、DDB1、CBX5和XPC等关键DNA损伤修复蛋白的mRNA表达, 参与GBM细胞替莫唑胺化疗抵抗, 可能是GBM潜在的治疗新靶点。

[关键词] 胶质母细胞瘤; 替莫唑胺抵抗; 通用转录因子2I; 甲基鸟嘌呤甲基转移酶; 关键DNA损伤修复基因

[中图分类号] R739.41 **[文献标志码]** A

Effect of general transcription factor 2I on temozolomide chemotherapy resistance of glioblastoma

ZHOU Jianguo¹, JIANG Hongjian¹, ZHU Qihui², ZHANG Gengqiang², DENG Qilin², QI Ling², LI Kaishu², YU Hongquan¹

[收稿日期] 2023-04-14

[基金项目] 吉林省卫健委卫生健康科技能力提升项目 (2021LC007); 广东省卫健委医学科学技术研究基金资助项目 (A2022125, A2023486); 广东省科技厅自然科学基金面上项目 (2021A1515010716)

[作者简介] 周建国 (1998—), 男, 内蒙古自治区呼伦贝尔市人, 在读硕士研究生, 主要从事神经外科学基础和临床方面的研究。

[通信作者] 于洪泉, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: qiling1718@gzhmu.edu.cn); 李凯舒, 主治医师 (E-mail: kaishu_li@126.com)

- (1. Department of Oncological Neurosurgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;
2. Department of Neurosurgery, Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University,
Qingyuan 511518, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of general transcription factor 2I (GTF2I) on the chemotherapeutic resistance to temozolomide in the glioblastoma multiforme (GBM), and to clarify its mechanism. **Methods:** Bioinformatics analysis was used to identify the common transcription factors for DNA methyltransferase 1 (DNMT1), damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1), chromobox protein homolog 5 (CBX5), and xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC) in GBM tissue using the transcription factor prediction website (PROMO website); correlation analysis and survival analysis for DDB1, CBX5, XPC, and DNMT1 with GTF2I and methylguanine methyltransferase (MGMT) were conducted based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) Database; small interfering RNAs (siRNAs) were used to transfect and silence the gene expression of MGMT and GTF2I in the human T98 GBM cells and LN229 glioma cells; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of the gene mRNA. After silencing the GTF2I gene, plate clone formation assay was used to detect the clone forming ability of the tumor cells, and CCK-8 assay was used to detect the sensitivity of the cells to temozolomide. **Results:** The bioinformatics analysis results showed that the expression levels of DDB1, CBX5, XPC, and DNMT1 were significantly positively correlated with the expression level of GTF2I in GBM tissue ($P < 0.05$), and were negatively correlated with the expression level of MGMT ($P < 0.05$). The expression level of GTF2I was significantly negatively correlated with the expression level of MGMT ($P < 0.05$). Excluding the GBM patients who did not receive temozolomide treatment, the survival analysis results indicated that the patients with high expression of GTF2I had a decreased overall survival time. After silencing the MGMT gene, the expression levels of GTF2I, DDB1, CBX5, and XPC mRNA in the human brain glioma T98 cells were increased ($P < 0.001$); after silencing the GTF2I gene, the expression level of MGMT mRNA in the human brain glioma LN229 cells was increased ($P < 0.05$), while the expression levels of DDB1, CBX5, XPC, and DNMT1 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). The plate clone formation assay results showed that there was no significant difference in the clone formation ability of the cells before and after silencing the GTF2I gene ($P = 0.138$). The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the viability of the cells in observation group was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The transcription factor GTF2I regulates the expressions of key DNA damage repair protein mRNA, including MGMT, DDB1, CBX5, and XPC, and is involved in the chemotherapeutic resistance of the GBM cells to temozolomide; GTF2I may represent a potential new therapeutic target for the GBM.

KEYWORDS Glioblastoma multiforme; Temozolomide resistance; Universal transcription factor 2I; Methylguanine methyltransferase; Key DNA damage repair genes

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是成人最常见、恶性程度最高的中枢神经系统原发性肿瘤,临床上仍以手术切除联合放射治疗及替莫唑胺化学治疗(简称化疗)的治疗方案为主,患者的中位生存期仅有12.1~14.6个月^[1-3]。目前认为,GBM细胞通过各种DNA损伤修复产生替莫唑胺化疗抵抗是患者预后不良的重要原因^[4]。甲基鸟嘌呤甲基转移酶(methylguanine methyltransferase, MGMT)蛋白是替莫唑胺抵抗最相关的DNA损伤修复蛋

白^[5-6]。DNA甲基转移酶1(DNA-methyltransferase 1, DNMT1)是甲基转移酶家族的重要成员,参与调节MGMT蛋白表达^[7-9]。本课题组前期研究^[10]结果显示:MGMT表达阴性的GBM患者可产生替莫唑胺化疗抵抗,这一过程中MGMT表达并未发生改变,而染色质结合盒蛋白5(chromobox protein homolog 5, CBX5)、损伤特异性DNA结合蛋白1(damage-specific DNA binding protein 1, DDB1)、黑色素瘤易感性C亚型

(xeroderma pigmentosum complementation group C, XPC) 和动力蛋白重链域2 (dynein heavy chain domain 2, DHC2) 等DNA损伤修复蛋白表达水平升高, 并取代MGMT蛋白入核发挥DNA损伤修复功能。通用转录因子2I (general transcription factor 2I, GTF2I) 是一种与DNA损伤修复等功能相关的转录因子^[11-15]。目前, GTF2I调控MGMT蛋白与其他DNA损伤修复蛋白表达的机制国内外未见相关报道。因此, 本研究探讨GTF2I在GBM替莫唑胺化疗抵抗中的作用, 阐明其抵抗作用机制, 为GBM替莫唑胺化疗抵抗的治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析 使用转录因子预测PROMO网站 (https://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 分析DDB1、CBX5、XPC和DNMT1基因的共同转录因子, 参考MESSEGUER等^[16]和FARRÉ等^[17]报道的方法, 根据基因的启动子序列, 使用PROMO网站对相关基因的转录因子进行预测分析。癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库的官方数据下载地址: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>, 下载胶质瘤的转录数据和临床数据。使用R3.5.1软件, 以基因表达中位值作为低风险组和高风险组的分组依据, 采用“survival”包 (下载地址: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/>) 对TCGA中患者的生存时间数据进行生存时间分析 (说明书下载地址: <https://www.rdocumentation.org/packages/survival/versions/3.5-5>), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 采用“ggcorrplot”R包 (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggcorrplot/index.html>) 对GTF2I、MGMT、DDB1、CBX5和XPC表达水平与DNMT1 mRNA表达的相关性进行表达相关性分析 (说明书下载地址: <https://www.rdocumentation.org/packages/ggcorrplot/versions/0.1.4>), 使用person法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 GBM细胞包括人脑多形性成胶质细胞瘤T98细胞、人脑胶质瘤LN229和U87细胞, 均购自中国科学院上海细胞库; 10 cm培养皿和高糖DMEM培养基购自美国Corning公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered

saline, PBS) 购自中国武汉塞维尔公司, 0.25%胰蛋白酶购自美国Hyclone公司, 4%多聚甲醛购自中国Biosharp公司。1% BSA购自中国Vetec公司, GTF2I-siRNA、MGMT-siRNA以及阴性对照siRNA购自中国吉玛公司, TRIzol购自中国Ambion公司, 逆转录试剂盒购自中国GeneCopoeia公司, Annexin V-APC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒和CCK-8试剂盒购自中国凯基公司, Lipofectamine™ 3000购自美国Invitrogen公司, 替莫唑胺购自中国Selleck公司, 胎牛血清购自新西兰Vivacell公司, 高糖DMEM细胞培养基购自美国Gibco公司; 培养箱 (型号: 3WJ) 购自美国Thermo公司, 倒置显微镜 (型号: DMi1) 购自德国徕卡公司, 离心机 (型号: Sigma 3-30k) 购自德国Sigma公司, 荧光定量PCR仪 (型号: 伯乐CFX-CONNEC) 购自美国伯乐公司。

1.3 细胞培养和实验分组 T98细胞、LN229细胞和U87细胞使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基并置于培养箱进行培养^[18], 培养箱条件为5% CO₂、37 °C。基因沉默实验中将细胞分为转染siRNA的阴性对照 (negative control, NC) 组和转染靶基因MGMT siRNA组或GTF2I siRNA组。siRNA序列见表1。替莫唑胺溶解于二甲基亚砜, 储存液浓度约为200 mmol·L⁻¹。替莫唑胺药物处理组作为观察组, 添加替莫唑胺储存液等体积的二甲基亚砜处理细胞作为对照组。

1.4 细胞转染 用6孔细胞培养板进行siRNA细胞沉默实验, 分别将5 μL siRNA和5 μL Lipofectamine™ 3000与250 μL无血清培养基混匀,

表1 靶基因siRNA序列
Tab. 1 SiRNA sequences of target genes

Primer		Sequence (5'-3')
GTF2I-1	Forward	GGCCAAGUCCAAAGCCGAATT
	Reverse	UUCGGCUUUGGACUUGGCCTT
GTF2I-2	Forward	GGUGGUCGUGUGAUGGUAATT
	Reverse	UUACCAUCACACGACCACCTT
GTF2I-3	Forward	CCACAGAAGAUUCUGGCAUTT
	Reverse	AUGCCAGAAUCUUCUGUGGTI
MGMT-1	Forward	GCAGGGUCUGCACGAAAUAATT
	Reverse	UAUUUCGUGCAGACCCUGCTT
MGMT-2	Forward	GCAAUGAGAGGCAAUCCUGTT
	Reverse	CAGGAUUGCCUCUCAUUGCTT
MGMT-3	Forward	GCUGCUGAAGGUUGUGAAATT
	Reverse	UUUCACAACCUUCAGCAGCTT

孵育 5 min; 后再将二者混匀, 孵育 20 min。PBS 缓冲液漂洗 2 或 3 次, 加入 1.5 mL 无血清培养基或优化培养基。将 siRNA 和 Lipofectamine™ 3000 混合液加入培养基中, 转染 6~8 h, 更换为完全培养基。转染前后 24 h 内, 细胞培养基不可添加抗生素。转染完毕后采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法验证细胞中基因沉默效率。

1.5 RT-qPCR 法检测 T98 细胞和 LN229 细胞中 GTF2I、MGMT、CBX5、DDB1、XPC 及 DNMT1 的 mRNA 表达水平 分别设计 GTF2I、MGMT、CBX5、DDB1、XPC 和 DNMT1 基因引物 (表 2)。从培养箱中取出 6 孔细胞培养板, PBS 缓冲液漂洗 2 次, 每次 5 min, 每孔分别加入 1 mL TRIzol RNA 提取试剂, 用常规酚/氯仿法提取细胞总 RNA, 测定其浓度, 按照逆转录试剂盒说明书进行。上样量为 1 μg , 最后逆转录为 cDNA。cDNA 以 GAPDH 为内参, 进行 qPCR 反应, 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 循环数为 1; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 退火 58 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 循环数为 40。采用循环数阈值 (cycle threshold value, CT) 比较法计算目的基因的相对拷贝数和表达水平。

表 2 靶基因引物序列

Tab. 2 Primers sequences of primers target genes

Primer		Sequence (5'-3')
GTF2I	Forward	GCATGTAGGTGGTCGTGTGA
	Reverse	CAGTTTCAGAAGGGCCTTGA
MGMT	Forward	GAAGCTGGAGCTGTCTGGTT
	Reverse	CGGGGAACTCTTCGATAGCC
CBX5	Forward	TAGACAGGCGCGTGGTTAAG
	Reverse	AGCCCCGAGCGATATCATTG
DDB1	Forward	CAAAGCACGATTGTGTGCCA
	Reverse	TGAGCTTCACAAGCTGGGAG
XPC	Forward	TGCCTATTGGCTGTGTCCAG
	Reverse	AGACCTTTGGCCAGCAACTT
DNMT1	Forward	AGGAGGGCTACCTGGCTAAA
	Reverse	GCTTAGCCTCTCCATCGGAC

1.6 平板克隆形成实验检测各组细胞的细胞克隆数 药物或 siRNA 处理完毕后, 将细胞用胰酶消化处理, 使用细胞计数并采用梯度稀释法稀释至每毫升约 50 个细胞, 并移植于 6 孔细胞培养板中。连续培养 2 周后, 吸去培养基, PBS 缓冲液漂洗 2 次, 使用多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 缓冲液漂洗

2 次, 加入 0.2% 结晶紫进行细胞染色 10~15 min 后吸去结晶紫, 使用 PBS 缓冲液洗去多余的结晶紫后晾干拍照, 计算细胞克隆数 (超过 50 个细胞), 细胞克隆数越多代表细胞的增殖能力越高。

1.7 CCK-8 法检测细胞对替莫唑胺的敏感性 细胞接种于 96 孔细胞培养板内, 密度为每孔约 1000 个细胞。细胞贴壁后吸尽原培养基, 然后每孔添加 100 μL 含 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 替莫唑胺培养基。替莫唑胺培养基配置方法: 将 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储存液按照 1:500 的比例溶于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基。检测时将 CCK-8 原液与无血清培养基按 10:100 的比例稀释, 每孔添加 100 μL 稀释液, 培养箱孵育 120 min, 使用酶标仪在 450 nm 波长处检测细胞的吸光度 (A) 值, 其原理为活细胞中的脱氢酶将 CCK-8 试剂中的水溶性四唑盐还原为黄色甲瓩产物, 通过检测该产物在 450 nm 的 A 值, 可评估细胞活力, 进而反映细胞对替莫唑胺的敏感性。

1.8 统计学分析 采用 Graph Pad Prism 5.0 统计软件进行统计学分析。T98 细胞和 LN229 细胞中 GTF2I、MGMT、CBX5、DDB1、XPC 和 DNMT1 表达水平及细胞克隆数符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。MGMT 和 GTF2I 的 siRNA 干扰效率比较采用双因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

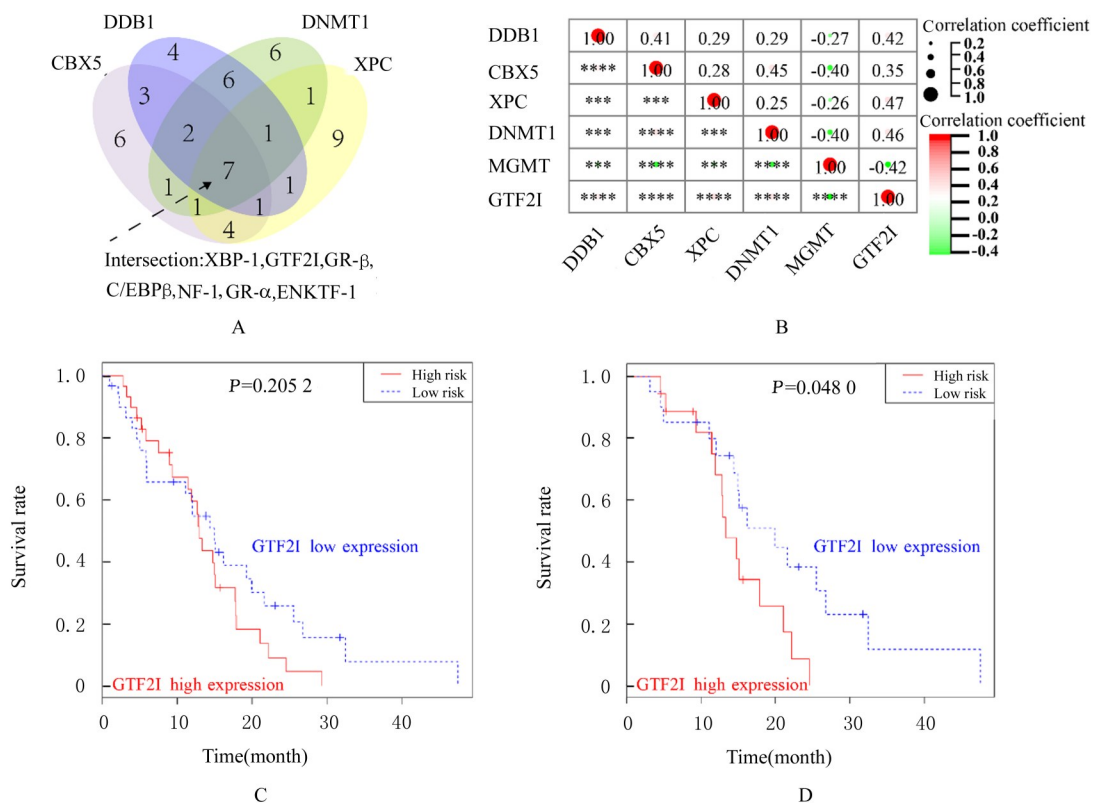
2.1 利用 PROMO 网址和 TCGA 数据库分析转录因子及表达相关性 利用 PROMO 网站预测 DNA 损伤修复基因 (DDB1、CBX5 和 XPC) 和 DNMT1 基因的共同转录因子, 取每个基因对应的前 25 个预测转录因子进行交集, 结果显示有 7 个共同转录因子, 包括: GTF2I、X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP-1)、糖皮质激素受体 α (glucocorticoid receptor alpha, GR-alpha)、糖皮质激素受体 β (glucocorticoid receptor beta, GR-beta)、CCAAT 增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer binding protein beta, C/EBPbeta)、神经纤维瘤素 1 (neurofibromin 1, NF-1) 和 ETS 相关转录因子 Elf-11 (ETS-related transcription factor Elf-1, ENKTF-1) (图 1A)。进一步通过 TCGA 数据库中 GBM 基因表达数据进行 Person 相关性分析, 结果显示: DDB1、CBX5、XPC 和 DNMT1

表达水平与GTF2I表达水平均呈显著正相关关系[相关系数(r)依次为0.42、0.35、0.47和0.46, $P < 0.05$], 与MGMT表达水平均呈显著负相关关系(r 依次为-0.27、-0.40、-0.26和-0.40, $P < 0.05$); GTF2I表达水平与MGMT表达水平呈显著负相关关系($r = -0.42$, $P < 0.05$), 见图1B。根据GTF2I mRNA表达水平(mRNA表达水平中位值为2 431)对TCGA数据库中GBM患者进行生存分析, 结果显示: 与低表达患者比较, GTF2I高表达的患者生存时间偏低, 但差异无统计学意义($P = 0.205$, 图1C); 剔除未接受替莫唑胺化学治疗的GBM患者后再进行分析, 提示GTF2I高表达的患者预后不良($P = 0.048$), 见图1D。

2.2 分别沉默T98和LN229细胞的MGMT基因及GTF2I基因后验证细胞DDB1、CBX5、XPC和DNMT1基因表达水平 采用文献^[10]报道的MGMT阳性表达的T98细胞和阴性表达的LN229细胞进行验证, 分别构建MGMT和GTF2I基因的

siRNA细胞转染序列, 分别转染T98和LN229细胞。细胞转染siRNA后使用RT-qPCR验证siRNA对应靶基因的mRNA的表达水平。其中MGMT-siRNA2序列和GTF2I-siRNA1序列对靶基因mRNA表达的敲降效率最高(图2A)。与NC-siRNA组比较, MGMT-siRNA2沉默T98细胞中MGMT基因表达后, 使用RT-qPCR法验证结果显示: GTF2I、DDB1、CBX5和XPC mRNA表达水平升高($P < 0.05$), 而DNMT1 mRNA表达水平差异无统计学意义($P = 0.334$), 见图2B。与NC-siRNA组比较, 使用GTF2I-siRNA1沉默LN229细胞GTF2I基因表达后, MGMT mRNA表达水平升高($P < 0.05$), 而DDB1、CBX5、XPC和DNMT1 mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$), 见图2C。

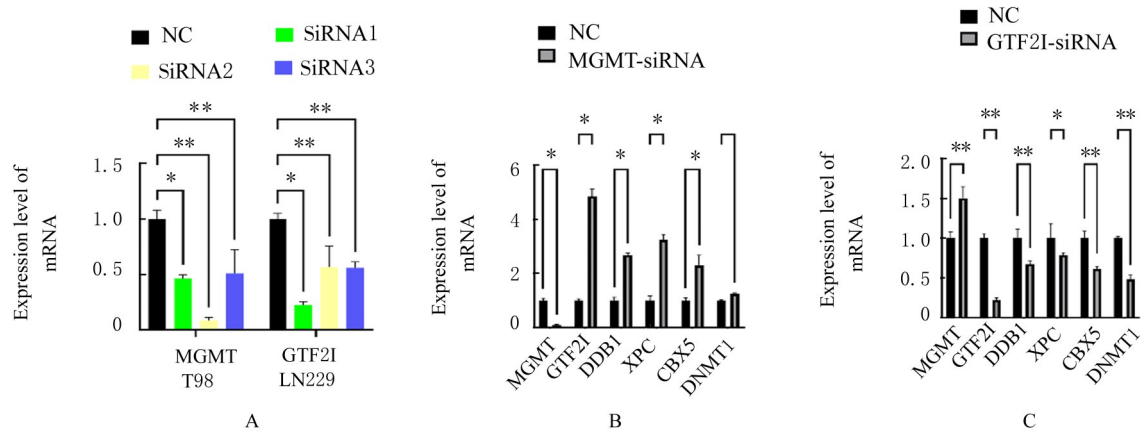
2.3 沉默GTF2I基因后观察细胞集落形成能力 平板克隆实验检测结果显示: 沉默LN229细胞中GTF2I基因表达后观察细胞集落形成能力;



A: Transcription factors of DDB1, CBX5, XPC and DNMT1 predicted in PROMO Database, and intersection analysis; B: Correlation analysis on DDB1, CBX5, XPC, DNMT1, MGMT, and GTF2I performed in TCGA Database; C: Clinical survival data of GBM patients in TCGA Database; D: Clinical survival data of patients treated with temozolomide in TCGA Database.

图1 DNA损伤修复基因转录因子筛选和GTF2I生存分析

Fig. 1 Screening for DNA damage repair gene transcription factors and GTF2I survival analysis

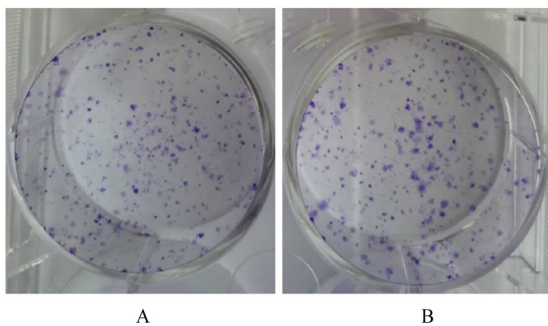


A: Silencing efficiency (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs NC-siRNA group); B: Expression levels of MGMT, GTF2I, DDB1, CBX5, XPC, CBX5, and DNMT1 in T98 cells (* $P < 0.01$ vs NC-siRNA group); C: Expression levels of MGMT, GTF2I, DDB1, CBX5, and DNMT1 in LN229 cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs NC-siRNA group).

图2 2种细胞中MGMT、DDB1、CBX5、XPC和DNMT1 mRNA表达水平

Fig. 2 Expression levels of MGMT, DDB1, CBX5, XPC, and DNMT1 mRNA in two kinds of cells

与NC组比较, GTF2I-siRNA I组细胞集落形成能力无显著改变, 差异无统计学意义 ($P = 0.138$)。见图3和4。



A: NC group; B: GTF2I-siRNA I.

图3 平板克隆形成实验检测细胞集落形成情况

Fig. 3 Colon formation of cells detected by plate clone formation assay

2.4 沉默GTF2I基因后细胞对替莫唑胺的敏感性 分别沉默T98、LN229和U87 3种细胞的GTF2I基因表达后, 使用 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 替莫唑胺处理细胞, 并将NC-siRNA作为对照组, 将GTF2I沉默组作为观察组, 使用CCK-8法检测细胞经替莫唑胺处理后细胞活力的改变, 进而评估细胞对药物的敏感性。CCK-8法检测结果显示: 与对照组比较, 沉默GTF2I基因表达后3种细胞经替莫唑胺处理后的细胞活力明显降低 ($P < 0.05$)。见图5。

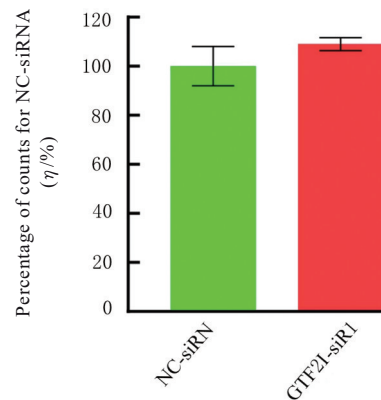


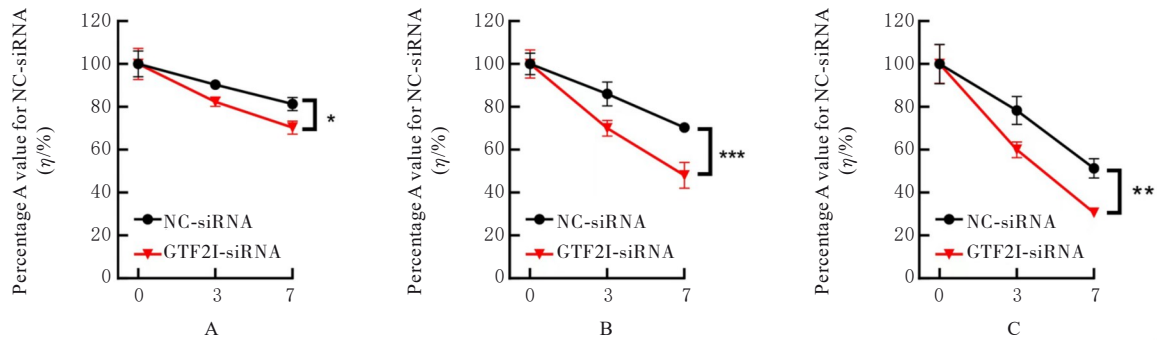
图4 2组细胞集落形成能力

Fig. 4 Colon formation abilities of cells in two groups

3 讨论

目前, 替莫唑胺是GBM患者一线治疗方案, 而替莫唑胺耐药也成为GBM预后不良的重要原因^[19]。DDB1、CBX5和XPC蛋白与MGMT蛋白具有一定的互斥现象, 导致MGMT阴性的GBM也可产生继发性的替莫唑胺耐药现象, 导致这一现象的调控机制值得深入探讨^[10]。

转录因子是调控RNA转录的重要因子, 可动态调控各类RNA和蛋白的表达使细胞适应外部环境^[20-21]。为此, 本课题组通过PROMO网站分析并预测了7个可能调控DDB1、CBX5和XPC以及DNMT1表达的转录因子, 并结合TCGA大数据分析确认GTF2I可能与DDB1、CBX5和XPC及甲基转移酶DNMT1等表达密切相关。本研究结果提示



A: T98 cells; B: LN229 cells; C: U87 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC-siRNA group.

图5 CCK-8法评估沉默GTF2I基因后细胞对替莫唑胺的敏感性

Fig. 5 Sensitivities of cells to temozolomide after silencing GTF2I gene detected by CCK-8 assay

GTF2I可能在调控GBM细胞DNA损伤修复蛋白/基因表达中发挥重要作用。目前研究^[12, 22]证实在DNA双链断裂的过程中GTF2I参与了细胞DNA损伤修复过程,但其在替莫唑胺抵抗及对MGMT和DDB1等基因的调控作用仍不清楚。本研究基于数据库分析结果显示:在替莫唑胺治疗的GBM患者中GTF2I高表达与较差的生存结局相关。上述结果提示GTF2I参与GBM患者替莫唑胺化疗抵抗的发生。进一步分析GTF2I可能直接启动DDB1、CBX5和XPC的mRNA转录过程,而既往研究证实DNMT1可抑制MGMT基因的表达^[23]。本研究的相关结果既补充GTF2I参与DNA损伤修复的生物学过程,也提出了GTF2I调控MGMT阴性GBM细胞产生替莫唑胺的化疗抵抗的一个新的机制。

为了初步探讨GTF2I调控GBM细胞替莫唑胺化疗抵抗的相关机制,本研究通过沉默GBM细胞MGMT和GTF2I基因的表达,结果表明当MGMT基因被沉默后,GTF2I和DDB1基因的表达上调,表明GBM细胞可防止因MGMT基因低表达而导致的DNA损伤修复失效,部分解释了目前MGMT靶向疗法无效的原因。沉默GTF2I基因的表达后,MGMT表达水平升高,而DDB1等DNA损伤修复蛋白和甲基转移酶DNMT1的mRNA表达水平则相应降低。该结果进一步提示GTF2I对DDB1等DNA损伤修复蛋白的mRNA转录具有直接的调控作用;而GTF2I则通过DNMT1发挥了对MGMT的间接调控作用。上述结果表明:GTF2I在GBM细胞中MGMT和DDB1等基因的表达调控机制中扮演重要角色。CCK-8法检测结果显示:敲低GTF2I基因后,多个GBM细胞对

替莫唑胺的敏感性升高。GTF2I低表达状态下,MGMT基因的表达可部分恢复,并替代其DNA损伤修复蛋白的作用。其原因可能是MGMT基因表达的部分恢复并不足以完全抵消其DNA损伤修复蛋白表达下降对GBM细胞所产生的影响。

综上所述,GTF2I可通过调控GBM细胞中MGMT、DDB1、CBX5和XPC等多个DNA损伤修复蛋白的mRNA表达,进而在GBM细胞替莫唑胺化疗抵抗的过程中发挥重要作用,GTF2I是GBM潜在的治疗靶点,值得进一步深入研究。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

周建国、姜红建和朱其辉负责论文选题、实验设计、数据分析和论文撰写,张耿强、邓琪琳和齐玲负责实验操作和数据收集,李凯舒和于洪泉负责统计学分析和论文审校。

[参考文献]

- [1] LOUIS D N, PERRY A, WESSELING P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. Neuro-oncology, 2021, 23(8): 1231-1251.
- [2] DE SILVA M I, STRINGER B W, BARDY C. Neuronal and tumorigenic boundaries of glioblastoma plasticity[J]. Trends Cancer, 2023, 9(3): 223-236.
- [3] HORBINSKI C, BERGER T, PACKER R J, et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours[J]. Nat Rev Neurol, 2022, 18(9): 515-529.
- [4] ZHANG X N, YANG K D, CHEN C, et al. Pericytes augment glioblastoma cell resistance to temozolomide

- through CCL5-CCR5 paracrine signaling[J]. *Cell Res*, 2021, 31(10): 1072-1087.
- [5] TOMAR M S, KUMAR A, SRIVASTAVA C, et al. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188616.
- [6] CHEN X Y, ZHANG M J, GAN H Y, et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2949.
- [7] CHRISTMANN M, KAINA B. Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2019, 780: 15-28.
- [8] WU S F, LI X L, GAO F, et al. PARP-mediated PARYlation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(6): 920-931.
- [9] OMURO A, BRANDES A A, CARPENTIER A F, et al. Radiotherapy combined with nivolumab or temozolomide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter: an international randomized phase III trial[J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(1): 123-134.
- [10] YI G Z, HUANG G L, GUO M L, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2[J]. *Brain*, 2019, 142(8): 2352-2366.
- [11] XIE J L, LIU J, LIAN Z Y, et al. Association of GTF2IRD1-GTF2I polymorphisms with neuromyelitis optica spectrum disorders in Han Chinese patients [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 346-353.
- [12] KOPP N D, NYGAARD K R, LIU Y T, et al. Functions of Gtf2i and Gtf2ird1 in the developing brain: transcription, DNA binding and long-term behavioral consequences[J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(9): 1498-1519.
- [13] DEURLOO M H S, TURLOVA E, CHEN W L, et al. Transcription factor 2I regulates neuronal development via TRPC3 in 7q11.23 disorder models [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(5): 3313-3325.
- [14] FAN A X, PAPAPOPOULOS G L, HOSSAIN M A, et al. Genomic and proteomic analysis of transcription factor TF II-I reveals insight into the response to cellular stress[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(12): 7625-7641.
- [15] ROY A L. Role of the multifunctional transcription factor TF II-I in DNA damage repair[J]. *DNA Repair*, 2021, 106: 103175.
- [16] MESSEGUER X, ESCUDERO R, FARRÉ D, et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(2): 333-334.
- [17] FARRÉ D, ROSET R, HUERTA M, et al. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3651-3653.
- [18] LI K S, HUANG G L, WANG Z Y, et al. IKBIP, a novel glioblastoma biomarker, maintains abnormal proliferation of tumor cells by inhibiting the ubiquitination and degradation of CDK4 [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(1): 166571.
- [19] LIU D Z, CHENG Y, QIAO S, et al. Nano-codelivery of temozolomide and siPD-L1 to reprogram the drug-resistant and immunosuppressive microenvironment in orthotopic glioblastoma [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(5): 7409-7427.
- [20] HAJHEIDARI M, HUANG S S C. Elucidating the biology of transcription factor-DNA interaction for accurate identification of cis-regulatory elements [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2022, 68: 102232.
- [21] VIEIRA M S, SANTOS A K, VASCONCELLOS R, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: mechanisms of regulation and biotechnological applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(7): 1946-1970.
- [22] TANIKAWA M, WADA-HIRAIKE O, YOSHIZAWA-SUGATA N, et al. Role of multifunctional transcription factor TF II-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(12): 3042-3048.
- [23] WONG K K. DNMT1: a key drug target in triple-negative breast cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 198-213.