

文章编号 1006-8147(2015)04-0277-05

论 著

新烷化剂替莫唑胺酯对胶质瘤细胞生长的影响

郭珊珊¹, 朱仲玲¹, 徐 辉¹, 丁凤霞¹, 王国成², 赵 敏², 阎 昭¹

(1. 天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 国家药物临床试验机构, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060; 2. 天津天士力集团研究院, 天津 300410)

摘要 目的: 以替莫唑胺(TMZ)为阳性对照, 研究新烷化剂替莫唑胺酯(TMZ-HE)在体外抑制脑胶质瘤 LN-18 细胞生长并诱导其凋亡的作用。方法: MTT 比色法比较相同浓度梯度的 TMZ 和 TMZ-HE 作用后对 LN-18 细胞增殖的影响; 二维克隆法观察 TMZ、TMZ-HE 长期作用的效果; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; Hoechst33342/PI 荧光染色观察细胞核形态改变及细胞坏死情况; Western blot 检测 TMZ 和 TMZ-HE 对 LN-18 细胞内耐药蛋白 MGMT 的影响。结果: TMZ-HE 较 TMZ 明显抑制 LN-18 细胞的生长和增殖, 呈浓度及时间依赖性反应; TMZ-HE 的长期作用效果同样优于 TMZ; TMZ-HE 诱导 LN-18 细胞发生凋亡率高于 TMZ; TMZ-HE 能够更早消耗耐药蛋白 MGMT。结论: TMZ-HE 较 TMZ 更早更多地消耗耐药蛋白, 增加对胶质瘤 LN-18 细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用。

关键词 替莫唑胺酯; 多形性脑胶质瘤; 细胞凋亡; O⁶-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶

中图分类号 R739.4

文献标志码 A

Effects of new alkylating agent temozolomide ester on the proliferation of glioma cells

GUO Shan-shan¹, ZHU Zhong-ling¹, XU Hui¹, DING Feng-xia¹, WANG Guo-cheng², ZHAO Min², YAN Zhao¹

(1. Department of Clinical Pharmacology, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. China Tasly R&D Institute, Tianjin Tasly Group Co., Tianjin 300402, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of temozolomide ester (TMZ-HE) on the proliferation and apoptosis of glioma LN-18 cells *in vitro* compared with temozolomide (TMZ). **Methods:** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to measure the effects on the proliferation of LN-18 cells cultured with graded concentrations of TMZ and TMZ-HE for 24, 48, 72 and 96 h. The long term effect was measured by colony formation assay. Hoechst 33342 and PI fluorescence staining were used to observe the cellular morphological changes and cell necrosis. The AnnexinV-fluoresce in isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) assay by flow cytometer were applied to detect the apoptosis induced by TMZ and TMZ-HE. Expression of resistant protein MGMT in LN-18 after treatment with TMZ and TMZ-HE was detected by Western blot. **Results:** The proliferation of LN-18 cells was significantly suppressed by TMZ-HE in a concentration- and time-dependent manner compared with TMZ. More cellular apoptosis of the LN-18 cells was induced in a concentration-dependent manner. TMZ-HE could block the expressing of MGMT in LN-18 earlier than TMZ. **Conclusion:** TMZ-HE could inhibit proliferation and induce apoptosis by blocked resistant protein MGMT in LN-18 cells. These effects are much stronger than TMZ.

Key words temozolomide ester; glioma; apoptosis; O⁶-methylguanine methyltransferase

多形性脑胶质瘤(GBM)是恶性程度最高的原发性脑肿瘤^[1]。目前,术后替莫唑胺(TMZ)联合放疗是治疗 GBM 的标准方案。尽管如此,恶性脑胶质瘤患者的平均存活时间仅为 15 个月^[2]。TMZ 耐药是造成胶质瘤患者治疗效果不佳的主要原因。TMZ 主要攻击细胞 DNA,造成 DNA 烷基化损伤,进而形成 DNA 交联,导致细胞死亡^[3]。在众多 DNA 烷基化损伤中,以 O⁶-甲基鸟嘌呤(O⁶-mG)的损伤威胁最大,是引起细胞致死的重要原因^[4]。机体对 O⁶-mG 的修

复主要依赖 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT),此酶将甲基从 DNA 的 O⁶ 位转移到自身半胱氨酸残基上,使 DNA 链上的鸟嘌呤损伤修复,同时 MGMT 不可逆地失活,是一种“自杀式”、可消耗酶^[5-6]。临床研究一些 MGMT 抑制剂作为 TMZ 辅助化疗药物,如 O⁶-BG,但是,临床试验发现,O⁶-BG 具有神经毒性^[7]。所以,设计既有 TMZ 活性作用,又能够消耗 MGMT 蛋白的药物具有重要的临床意义。TMZ-HE 是在 TMZ 结构基础上改造而来,保留原有药物的作用基团,其目的为在保留原有药物的作用结构基础上,增加药物的脂溶性,使药物进入肿瘤内部的浓度增加。起初,TMZ-HE 作为治疗皮肤癌而设计的前体药,能够抑制裸鼠异种移植的黑色素

基金项目 十二五“重大新药创制”科技重大专项课题基金资助(2013ZX09303001)

作者简介 郭珊珊(1988-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤临床药理学;通信作者:阎昭,E-mail: yanzhaopaper@163.com。

瘤的生长^[8]。胶质瘤细胞 LN-18 由于自身 MGMT 表达属于原发性耐药细胞系^[9-10],本研究选取 LN-18 细胞系,旨在探索 TMZ-HE 体外对脑胶质瘤细胞的增殖抑制及诱导凋亡的作用,同时对 MGMT 蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 TMZ、TMZ-HE 由天津天士力公司提供,纯度>99%。二甲基亚砜(DMSO)溶解配成 100 mmol/L 贮存液,置-20℃冻存。胶质瘤 LN-18 细胞购于 ATCC,由本实验室冻存。改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)胰蛋白酶购自 Gibco 公司,胎牛血清购自天津灏洋生物制品公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst33342 荧光试剂盒、细胞凋亡试剂盒均为 Sigma 公司产品, MGMT 抗体为 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LN-18 细胞用 DMEM(含 10%胎牛血清,1%双抗)培养液培养,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 MTT 比色法 取对数生长期 LN-18 细胞,以 0.25%胰蛋白酶消化,计数,稀释成 1×10^4 mL 的单细胞悬液,接种至 96 孔板,过夜贴壁后,加入含 TMZ、TMZ-HE 终浓度为 62.5、125、250、500、1 000 μ mol/L 的培养液作为处理组及浓度为 0 μ mol/L 的等量 DMSO 对照组,每种浓度设 4 个重复孔,并以空白孔调零。药物作用 24、48、72 和 96 h 后,每孔加入 20 μ L 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,吸去上清,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10 min。490 nm 波长处酶标仪检测吸收值(OD),结果以各组 OD 均值 \pm 标准差表示(实验重复 3 次)。

1.2.3 二维克隆法 取对数生长期 LN-18 细胞,调整细胞密度为 200 个/mL,以每孔 1 mL 接种于 12 孔板,待细胞贴壁后,各实验组加入含药培养液(25~200 μ mol/L),阴性对照组分别加入等量的不含药培养液,每组设 2 个复孔。每隔 3 d 换液,2 周后取出培养板,甲醇-20℃固定 10 min,加入结晶紫染色液染色 30 min。显微镜下观察克隆大小及数量,>50 个细胞为克隆,计数。

1.2.4 Hoechst33342/PI 荧光染色 取对数生长期 LN-18 细胞,调整细胞密度为 1×10^6 mL,以每孔 1 mL 接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,加入含 TMZ、TMZ-HE(50~400 mol/L)培养液,作用 96 h 后,弃上清, PBS 洗 2 遍,各孔均加入 Hoechst 染料(10 g/mL)、PI 染料(1 μ g/mL)500 μ L,37℃避光孵育 10 min,弃去染料,加入培养液,荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率 TMZ、TMZ-HE(50~400 mol/L)作用 LN-18 细胞 96 h,收集细胞,调整细胞浓度至 1×10^5 mL,各取 100 μ L;加入预冷的结合缓冲液 100 μ L 重悬

细胞;加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 PI 染液于细胞悬液中,轻轻混匀,避光染色 10 min;补加 200 μ L 结合缓冲液,流式细胞仪检测凋亡的百分比。

1.2.6 Western blot 法检测 MGMT 蛋白的表达 收取蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,将等量蛋白(约 50 μ g)在 15% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电转移至 PVDF 膜后封闭,4℃孵育 MGMT 兔抗人单克隆抗体过夜,TBST 洗膜 3 次,兔抗荧光二抗孵育,TBST 洗膜 3 次,荧光扫描仪扫描。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,组间分析比较用 *t* 检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMZ-HE 对 LN-18 细胞活力的影响 MTT 结果显示,相同浓度梯度的 TMZ、TMZ-HE 作用胶质瘤 LN-18 细胞 24~96 h 后,两种药物均具有增殖抑制作用,且具有浓度和时间依赖性(图 1)。TMZ 在 24、48、72、96 h 处的 IC₅₀ 值分别为 (2 448 \pm 0.17)、(2 063 \pm 0.16)、(1 298 \pm 0.08)、(1 020 \pm 0.095) μ mol/L, TMZ-HE 的 IC₅₀ 值分别为 (318.2 \pm 0.03)、(215.9 \pm 0.04)、(204.3 \pm 0.04)、(178.3 \pm 0.05) μ mol/L,作用 96 h TMZ 和 TMZ-HE 的 IC₅₀ 值相差约 5.72 倍,具有显著统计学差异($P < 0.001$)。以上结果表明,TMZ-HE 对胶质瘤细胞 LN-18 的增殖抑制效果明显优于 TMZ。

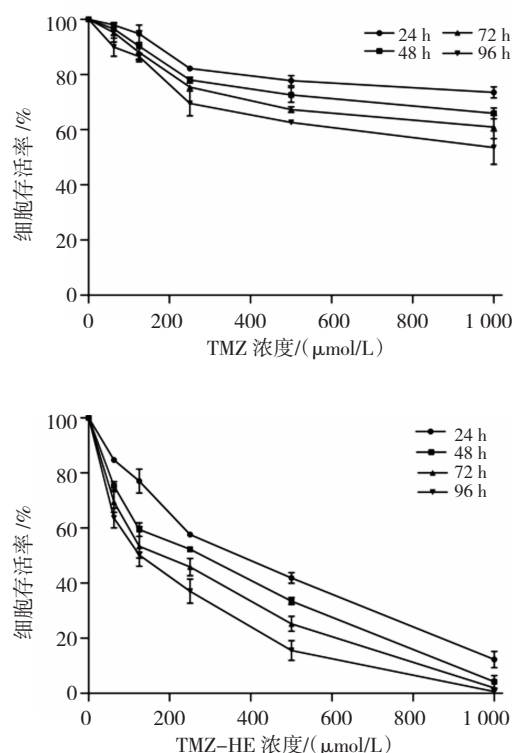
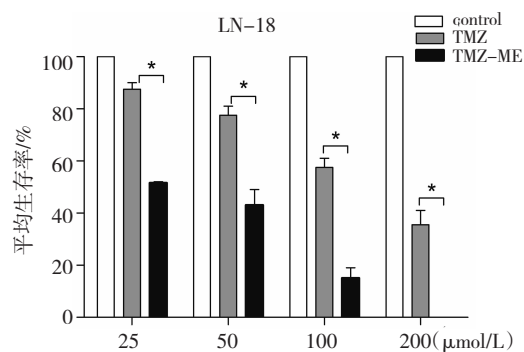


图1 TMZ、TMZ-HE 作用 LN-18 细胞 24、48、72、96 h 后细胞存活率

Fig 1 Survival rates of the LN-18 glioma cells treated by different concentrations of TMZ and TMZ-HE for 24, 48, 72 and 96 h

2.2 TMZ-HE 对 LN-18 细胞克隆形成的影响 克隆结果显示, TMZ、TMZ-HE 对 LN-18 克隆形成均有抑制作用, 随着药物浓度增加, 克隆形成数量也随着减少, 但 TMZ-HE 的克隆抑制效果强于 TMZ。如图 2 所示, TMZ-HE 作用 LN-18 细胞后, 克隆数量明显少于 TMZ 组, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ-HE 作用下, 能够完全抑制克隆形成, 而 TMZ 仅能抑制 40%。

2.3 TMZ-HE 诱导 LN-18 细胞发生凋亡情况 TMZ-HE 作用 LN-18 细胞 96 h 后, 细胞凋亡率(包括早期凋亡和晚期凋亡)分别为 8.4%、13.5%、14.9%、36.9%, 死亡率为 2.4%、5.4%、3.1%、6.5%, 而 TMZ 诱导 LN-18 的凋亡率为 7.1%、8.8%、11.5%、28.7%, 死亡率为 3.3%、2.8%、4.3%、7.3%。其结果表明, TMZ-HE 诱导胶质瘤 LN-18 细胞发生的凋亡高于 TMZ, 具有浓度依赖性。但是, TMZ 和 TMZ-HE

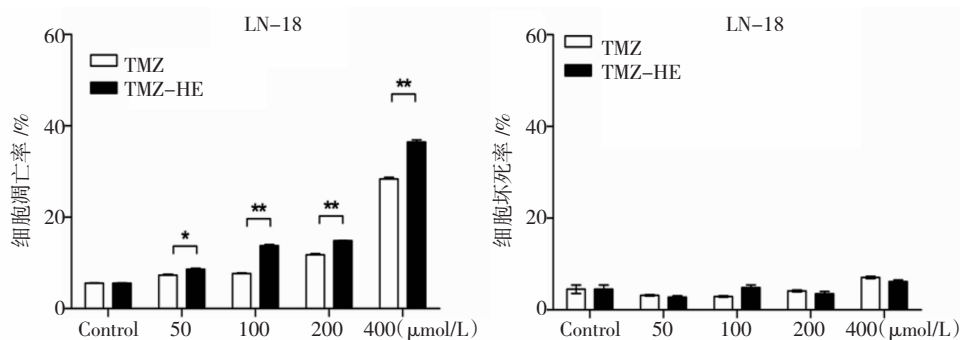
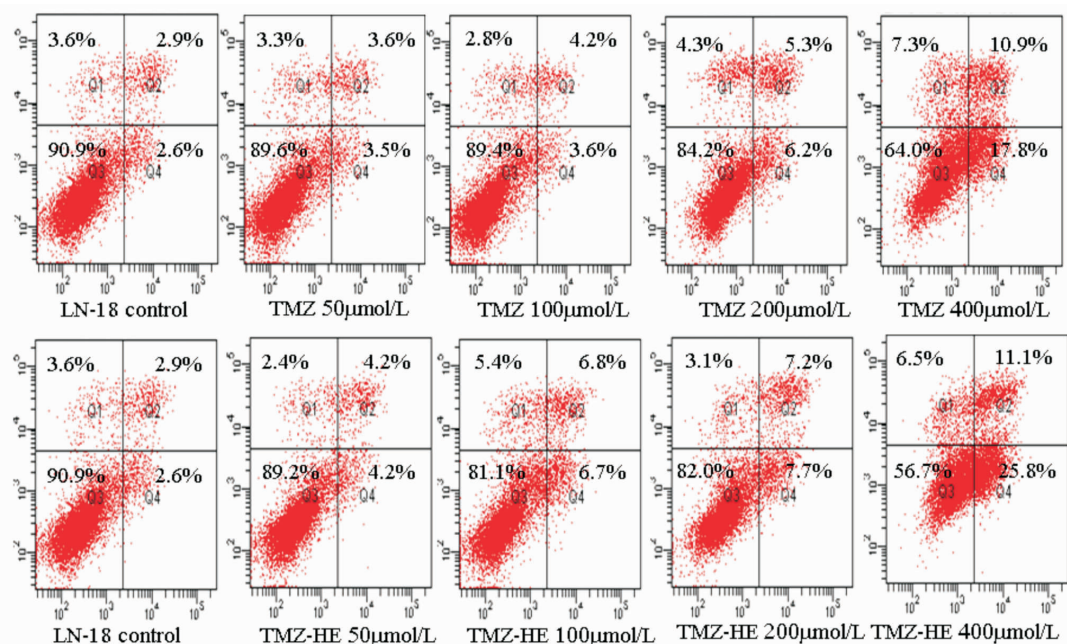


与 TMZ 组比较 * $P < 0.05$

图 2 不同浓度 TMZ, TMZ-HE 作用 LN-18 后克隆形成数量百分比

Fig 2 Effects of graded TMZ and TMZ-HE on LN-18 colony formation

引起细胞的死亡数量较少, 且没有明显的浓度依赖性, 见图 3。



与 TMZ 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 TMZ, TMZ-HE 作用 LN-18 细胞 96 h 后流式细胞仪检测细胞凋亡率和死亡率

Fig 3 Apoptosis and necrosis of LN-18 cells by flow cytometry after treated with TMZ and TMZ-HE for 96 h

2.4 Hoechst33342/PI 荧光染色观察细胞核形态变化和细胞坏死情况 如图 4A 所示, TMZ、TMZ-HE 作用 LN-18 细胞 96 h 后, 荧光显微镜下观察可见细胞核荧光信号增强, 同时, 随着浓度增加, 细胞核数量不断减少, 但是相同浓度下的 TMZ-HE 组细胞核数量减少的更多。相同作用条件下, PI 染色观察

可见, 随着两种药物浓度增加, 坏死细胞没有明显增加, 且荧光信号较少, 几乎没有坏死, 见图 4B。这与笔者流式检测的结果相符, 说明 TMZ-HE 更多的诱导 LN-18 细胞发生凋亡, 且诱导细胞的凋亡率高于 TMZ, 其结果具有统计学意义。

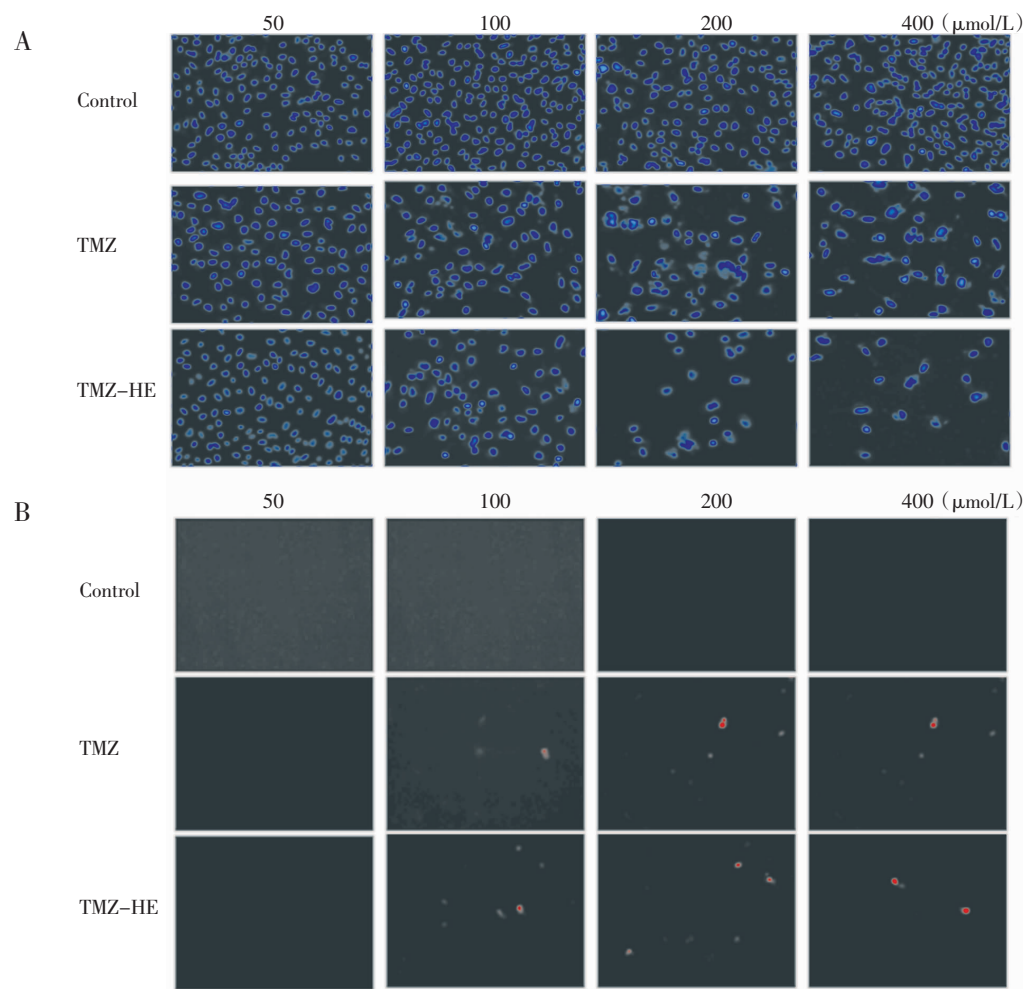


图 4 Hoechst33342 (A)/PI (B)染色观察 TMZ、TMZ-HE 对 LN-18 细胞核的影响及坏死情况(×10)
Fig 4 Hoechst33342 (A)/PI (B) staining was observed in TMZ, TMZ-HE effect on LN-18 cell nuclei and necrosis (×10)

2.5 TMZ-HE 对 LN-18 细胞耐药蛋白 MGMT 的影响 Western blot 结果显示, 两种药物能够使 MGMT 表达量降低, 其具有浓度依赖性。但是, TMZ-HE 能够较 TMZ 更早更多的消耗 MGMT 蛋白, 100 μmol/L 的 TMZ-HE 能够完全消耗细胞中 MGMT 蛋白, 而 TMZ 则需要更高浓度, 见图 5。

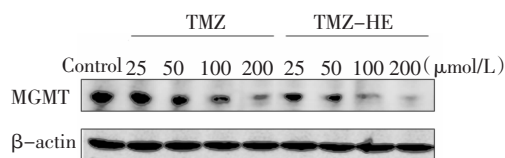


图 5 TMZ、TMZ-HE 对 LN-18 细胞中耐药蛋白 MGMT 的影响
Fig 5 The effect of TMZ, TMZ-HE on the resistant proterin MGMT in LN-18 cells

3 讨论

GBM 是Ⅳ级脑肿瘤, 年发病率为 5~8/10 万, 具有生长迅速、侵袭性强等特性, 使得手术彻底切除困难, 极易复发^[11]。目前对 GBM 的治疗采用手术和放化疗的综合治疗方式^[12]。TMZ 是临床治疗恶性脑胶质细胞瘤的标准一线化疗药物。临床研究表明, TMZ 对人恶性脑胶质瘤的有效率在 45%左右, GBM 对 TMZ 的耐药性是化疗失败的主要原因^[7, 13]。其中, DNA 修复酶 MGMT 是耐药的主要原因之一^[14-15]。有研究表明, 白藜芦醇能够抑制 MGMT 蛋白的表达, 与 TMZ 联合使用能够增加 TMZ 的敏感性^[16]。TMZ 治疗胶质瘤的作用效果与 MGMT 蛋白的消耗和合成的速率有关^[5]。本研究通过检测 TMZ-HE 对 LN-18 的

作用效果,可以初步探索 TMZ-HE 是否能够克服TMZ 耐药。研究表明,新型烷化剂 TMZ-HE 能够较 TMZ 更早更多地降低胶质瘤 LN-18 细胞中 MGMT 蛋白的表达含量,相应可以增加 DNA 损伤,导致更多的细胞死亡。通过凋亡等相应功能性实验结果表明 TMZ-HE 的作用效果明显优于 TMZ,具有统计学意义,说明 TMZ-HE 能够通过降低 MGMT 的表达增强对 LN-18 的作用效果。TMZ-HE 是在 TMZ 结构基础上改造而来,保留了原有的作用基团,所以,通过凋亡检测和荧光染色结果可以发现 TMZ 和 TMZ-HE 都主要诱导 LN-18 细胞发生凋亡,而细胞死亡几乎没有检测到。这与 Roos 等^[17]研究的 TMZ 能够诱导胶质瘤细胞发生凋亡的结果一致。但是,细胞发生凋亡的途径有很多,会受到各种因素的影响,如 p53 在胶质瘤细胞中的状态不同,会诱导细胞发生不同途径的凋亡^[18]。所以, TMZ-HE 诱导胶质瘤细胞发生凋亡的途径是否与 TMZ 完全相同,其增加的酯结构是否仅影响药物的渗透能力还有待进一步研究。

本实验通过 MTT 法、二维克隆法证明了 TMZ-HE 对胶质瘤细胞的短期和长期作用效果都优于 TMZ,但两者有一个共同点,即长期的作用效果更加明显,200 $\mu\text{mol/L}$ TMZ 能够抑制 60%的克隆形成, TMZ-HE 甚至完全抑制 LN-18 克隆的形成。TMZ 诱导细胞凋亡发生的时间为 96 h,这是因为 TMZ 首先导致胶质瘤细胞发生自噬,研究发现,通过药物抑制自噬能够增加 TMZ 诱导的凋亡^[19-20]。TMZ-HE 在 96 h 处诱导 LN-18 细胞发生更多的凋亡,这是由于 TMZ-HE 本身能够抑制自噬导致凋亡增多,还是和 TMZ 相同,先发生自噬,然后诱导更多的凋亡,这是笔者值得探讨的问题。

综上所述,本研究证明了 TMZ-HE 能够通过下调 MGMT 蛋白抑制胶质瘤细胞 LN-18 的增殖并诱导其凋亡, TMZ-HE 较 TMZ 作用效果更好, 对治疗胶质瘤有很好的应用前景。因此, TMZ-HE 是否能够克服 TMZ 耐药以及诱导凋亡的机制是进一步研究的主要内容。这些研究大多数还是建立在体外实验上,由于体内外环境差别较大,要想更好地了解 TMZ-HE 在胶质瘤中的作用,还有待进一步开展 TMZ-HE 在体内的相关研究。

参考文献:

- [1] Wen P Y, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5):492
- [2] Helseth R, Helseth E, Johannesen T B, et al. Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme[J]. *Acta Neurol Scand*, 2010, 122(3):159
- [3] Zhang J, Stevens M F, Bradshaw T D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5(1):102
- [4] Roos W P, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2):237
- [5] Silber J R, Bobola M S, Blank A, et al. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1):71
- [6] Spiegl-Kreinecker S, Pirker C, Filipits M, et al. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients[J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(1):28
- [7] Inno A, Fanetti G, Di Bartolomeo M, et al. Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer[J]. *World J Clin Cases*, 2014, 2(12): 835
- [8] Suppasansatorn P, Wang G, Conway B R, et al. Skin delivery potency and antitumor activities of temozolomide ester prodrugs[J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(1):42
- [9] Hapold C, Roth P, Wick W, et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells[J]. *J Neurochem*, 2012, 122(2):444
- [10] Fan C H, Liu W L, Cao H, et al. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e876
- [11] Dolecek T A, Propp J M, Stroup N E, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(Suppl 5):1
- [12] Stupp R, Hegi M E, van den Bent M J, et al. Changing paradigms—an update on the multidisciplinary management of malignant glioma[J]. *Oncologist*, 2006, 11(2):165
- [13] Cavaliere R, Wen P Y, Schiff D. Novel therapies for malignant gliomas[J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(4):1141
- [14] Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, et al. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(6):1391
- [15] Ramirez Y P, Weatherbee J L, Wheelhouse R T, et al. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6(12):1475
- [16] Huang H, Lin H, Zhang X, et al. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6):2050
- [17] Roos W P, Batista L F, Naumann S C, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O⁶-methylguanine[J]. *Oncogene*, 2007, 26(2):186
- [18] Goldstein M, Roos W P, Kaina B. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 229(1):20
- [19] Zou Y, Wang Q, Li B, et al. Temozolomide induces autophagy via ATM AMPK ULK1 pathways in glioma[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1):411
- [20] Zanutto-Filho A, Braganhol E, Klafke K, et al. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas[J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(2):220

(2015-03-25 收稿)