

文章编号 1006-8147(2020)05-0401-07

论 著

探索替莫唑胺联合 amlexanox 对胶质瘤细胞的作用效果及机制

熊金彪, 郭高超, 曹艺耀, 陈旨娟, 黄强, 杨卫东
(天津医科大学总医院神经外科, 天津 300052)

摘要 目的:探索替莫唑胺(TMZ)联合 amlexanox 对胶质瘤细胞的作用效果及机制。方法:本研究分为体外和体内实验,其中体外实验分为4组:对照(NC)组、amlexanox 组、TMZ 组和 TMZ+amlexanox 组,包括检测细胞增殖能力的 cell counting kit-8(CCK-8)实验、检测细胞侵袭和迁移的细胞划痕和 Transwell 实验及检测核因子 κ -B 激酶抑制剂(IKBKE)及蛋白激酶 B(Akt)通路蛋白质变化的 Western 印迹实验;体内实验分为3组:NC 组、TMZ 组和 TMZ+amlexanox 组,包括颅内成瘤实验和免疫组织化学染色(IHC)实验。结果:与 amlexanox 组、TMZ 组相比,TMZ 联合 amlexanox 组 U87 MG 和原代细胞增殖能力明显受抑制、划痕愈合面积显著降低($P < 0.01$)。Transwell 侵袭和迁移实验表明,TMZ+amlexanox 组穿入小室细胞数量显著降低($P < 0.01$)。Western 印迹实验结果显示,TMZ 联合 amlexanox 组 Akt 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)活性明显受抑制。动物实验表明,TMZ 联合 amlexanox 组裸鼠颅内肿瘤生长显著抑制($P < 0.01$),颅内肿瘤动物模型的生存时间延长(由 21 d 延长至 31 d);IHC 结果显示,TMZ 联合 amlexanox 组肿瘤标本中磷酸化 Akt(p-Akt)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)表达量明显下降。结论:TMZ 联合 amlexanox 能显著抑制 U87 MG 和原代细胞增殖、迁移和侵袭能力,而且二者联合能显著抑制裸鼠颅内肿瘤生长并延长裸鼠生存时间。该作用机制可能是 amlexanox 在一定程度上通过抑制 IKBKE 活性逆转 TMZ 诱导 Akt 激活,进而降低胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性。

关键词 amlexanox;替莫唑胺;胶质瘤;p-Akt;IKBKE;化学耐药性

中图分类号 R730.264

文献标志码 A

Effect and mechanism of temozolomide combined with amlexanox on human glioblastoma cells

XIONG Jin-biao, GUO Gao-chao, CAO Yi-yao, CHEN Zhi-juan, HAUNG Qiang, YANG Wei-dong

(Department of Neurosurgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the efficacy of combined therapy with temozolomide(TMZ) and amlexanox for human glioblastoma cells.**Methods:** This study was divided as experiments *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, all assays were divided into four groups: negative control (NC) group, amlexanox group, TMZ group and TMZ+amlexanox group, including cell counting kit-8(CCK-8) for determining glioblastoma cells viability, cell wound scratch and Transwell assays for assessing ability of glioblastoma cells on migration and invasion, Western-blot for detecting changes of inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (IKBKE) and relative proteins in protein kinase B (Akt) signal pathway. *In vivo*, all assays were divided into three groups: NC group, TMZ group and TMZ+amlexanox group, including establishment of intracranial tumor models and immunohistochemistry(IHC) assay. **Results:** The treatment combined with TMZ and amlexanox obviously inhibited the proliferation of U87MG and primary glioma cell compared with single agent treatment. Moreover, the treatment with TMZ and amlexanox significantly reduced the scratch healing area ($P < 0.01$). The results of transwell invasion and migration assays showed that TMZ combined amlexanox significantly reduced the number of cells penetrated out of the chamber($P < 0.01$). Western-blot showed that TMZ combined amlexanox could significantly inhibit the activity of Akt and mammalian rapamycin target protein(mTOR). Animal experiments showed that TMZ combined amlexanox significantly inhibited intracranial tumor growth ($P < 0.01$) and prolonged survival of animals with intracranial tumors (from 21 d to 31 d). IHC results showed that in the group treated with combined drugs, the expression of phosphorylation of Akt(p-Akt) and phosphorylation of mTOR(p-mTOR) were obviously decreased. **Conclusion:** Combined treatment with TMZ and amlexanox results in significant inhibition of cell viability, migration and invasion in primary glioma cells and in the human glioma cell line, U87 MG. Moreover, combined treatment significantly inhibits the growth of intracranial tumor and prolonged the survival time of mice with tumors. The mechanism by which amlexanox sensitized glioma cells to TMZ may be that amlexanox suppressed activity of IKBKE and partially reversed TMZ-induced Akt activation.

Key words amlexanox; temozolomide; glioblastoma; p-Akt; IKBKE; chemoresistance

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81572490)

作者简介 熊金彪(1991-),男,硕士在读,研究方向:肿瘤基础研究;通信作者:黄强,E-mail:huangqiang209@163.com;杨卫东,E-mail:yangweidong@sina.com。

多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 占所有胶质瘤的 60%~70%, 是成人恶性程度和死亡率最高的原发性脑肿瘤^[1]。过去几十年, 胶质瘤治疗技术飞速发展, 主要以脑肿瘤近全切, 辅以放疗和(或)化疗为主, 尽管如此, 胶质瘤患者平均生存中位数仅约 14.6 个月, 5 年生存率仅为 9.8%^[2-3]。因此临床上迫切需要一种针对 GBM 更有效的治疗方案。

替莫唑胺(TMZ)是一种新型口服甲基化药物, 具有多种抗肿瘤效果, 被广泛用于治疗 GBM^[4]。尽管 TMZ 被视为治疗 GBM 最具前景的化疗药物, 但由于耐药性, 大部分患者接受 TMZ 治疗 7 个月后会 出现 GBM 复发^[5]。越来越多证据表明, 蛋白激酶 B (Akt) 异常激活涉及多种类型肿瘤耐药性^[6]。并且 TMZ 能诱导 Akt 激活, 进而降低 TMZ 对肿瘤细胞的 毒性作用^[7]。此外, 最近有研究表明, 核因子 κ -B 激酶 抑制剂(IKBKE、IKK ϵ 或 IKKi)也能诱导激活 Akt^[8]。

Amlexanox 是一种选择性 IKBKE 抑制剂, 被批 准用于口腔溃疡和哮喘治疗^[9-10], 对肥胖和 2 型糖尿 病也有明确治疗效果^[11-12]。而且, 有研究证明 amlex- anox 能有效抑制 GBM 细胞生长^[13]。因此, 笔者假设 amlexanox 能通过抑制 IKBKE 而逆转 TMZ 诱导的 Akt 激活, 进而降低胶质瘤细胞耐药性, 增强 TMZ 细胞毒作用, 并通过一系列体内外实验对该假设进 行验证。

1 材料与方法

1.1 化学试剂 抗 IKBKE(#2690)、抗 p-Akt(phos- pho-Ser473, #9271) 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。抗 m-TOR(#36991)、抗 p-mTOR (phospho-Ser2448, #21214) 抗体购于美国 Signalway Antibody 公司。抗 Akt(#A18675) 抗体购于美国 AB- clonal 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、抗兔 IgG(#ZB-2307、#ZB-2301) 和 GAPDH(#TA505454) 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司。Am- lexanox (#S364805) 购于 Selleck.cn 中国分公司, TMZ(#IT1330) 购于中国索莱宝科技公司。Amlexanox 和 TMZ 分别溶于二甲基亚砜试剂(DMSO, #D2650, Sigma, 美国), 储存于-20℃, 储存浓度分别为 500 mmol/L(Amlexanox)和 100 mmol/L(TMZ)。

1.2 细胞培养

1.2.1 U87 MG 细胞系 该细胞系购于美国 ATCC 中心, 于含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基 中, 孵育在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱。为防止细胞污 染, 培养基中混有 100 U/mL 青霉素/链霉素双抗。

1.2.2 原代 GBM 细胞 术后病理证实为星形胶质 细胞瘤Ⅳ的新鲜肿瘤组织来源于天津医科大学总

医院手术患者。被分离新鲜组织在离体 1 h 内经磷 酸盐缓冲液(PBS)清洗, 去除血迹及正常脑组织, 然后经胰酶于 37℃环境中消化 1 h。消化后的组织经 离心后去掉上清液, 剩余沉淀培养于含有 10%FBS 的 F12 培养基(Gibco, 美国)中, 并加入 100 U/mL 青霉素/链霉素预防污染, 孵育于 37℃、5%CO₂ 恒温 细胞培养箱。

1.3 细胞增殖能力测定 细胞增殖能力由 CCK-8 实验测定。实验分为 4 组: 对照组、amlexanox 组、 TMZ 组、TMZ+amlexanox 组, 每组 3 个复孔。U87 MG 和原代 GBM 细胞经离心、重悬、计数后接种至 96 孔 板, 每孔约 4×10^3 细胞, 于 37℃、5%CO₂ 过夜贴壁。 次日, 更换含有设定浓度的单药(TMZ 或 amlexanox) 或联合药物(TMZ 和 amlexanox)的培养基。继续于恒 温细胞培养箱中孵育 24、48、72 h 后, 分别于每孔 中加入 10 μ L CCK-8 试剂, 轻柔晃动后, 置于恒温 细胞箱中培养 2 h。培养结束后, 用酶标仪检测每孔 于 450 nm 处吸光度值, 利用统计方法测定每组吸光 度值的平均值以反映细胞增殖能力。实验重复 3 次。

1.4 迁移能力测定 利用划痕和 Transwell 迁移实 验检测 U87 MG 和原代 GBM 细胞迁移能力。实验 分组同 CCK-8 实验。细胞划痕实验过程如下: U87 MG 和原代 GBM 细胞经设定浓度单药或联合药物 处理 72 h 后, 离心、重悬, 以每孔 2×10^5 细胞数接种 至 6 孔板, 于 37℃、5%CO₂ 恒温细胞培养箱中过夜 贴壁。至每孔单层细胞铺满底壁 80%~90%时, 用 200 μ L 移液枪头于每孔底壁做出十字划痕, 更换培 养基以清除游离细胞。再于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中 培养 0、12、24 h 后, 用相差倒置显微镜观察细胞迁 移情况, 每组取 5 个独立划痕视野拍照, 计算划痕 愈合面积进行统计学分析。Transwell 迁移实验参照 Liu 等^[13]研究。该实验独立重复 3 次。

1.5 侵袭能力测定 利用 Transwell 侵袭实验检测 U87 MG 和原代 GBM 细胞侵袭能力。实验分组同 CCK-8 实验。Transwell 侵袭实验过程如下: 处理 后的 U87 MG 和原代 GBM 细胞(4×10^3)重悬于 200 μ L 无血清培养基, 接种至被聚碳酸酯膜包被的 Tran- swell 小室的上室中, 然后将上室置于含有 700 μ L 10%FBS 培养基的下室(六孔板)中, 于 37℃恒温箱 中培养 24 h。培养结束后用棉棒擦除上室中未穿出 细胞, 经 4%甲醛于室温下固定, 再用 0.1%结晶紫 染色, 流水清洗后室温干燥, 最后在显微镜下观察, 每个小室于 10 \times 显微镜下取 3 个独立视野拍照, 计 数穿出细胞进行统计学分析。该实验独立重复 3 次。

1.6 Western 印迹实验 U87 MG 和原代 GBM 细

胞经设定浓度的单药和联合药物处理 72 h,用胰酶消化收集细胞,离心去除上清液,将沉淀于混有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解 1 h。总蛋白浓度依据 BCA 法测定。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测 IKBKE 及 Akt 通路蛋白变化,具体过程如下:取等量蛋白样品,于 6%、10%、12%的 SDS-PAGE 中电泳分离,然后将蛋白质转至 PVDF 膜(360 mA,60 min)。结束后,该膜经 PBS 洗涤 5 min×3 次,洗涤结束后将膜置于 5%脱脂牛奶中,于 37℃恒温箱中封闭 1 h。封闭完成后,去除封闭液,用特定一抗于 4℃环境中孵育过夜。次日于室温下复温 1 h,回收一抗后,用 PBS 将 PVDF 膜洗涤 5 min×3 次,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗于室温下再孵育 1 h。最后丢弃二抗,用 PBS 再次洗涤 PVDF 膜后,利用 ECL 法测定蛋白表达水平。其中以 GAPDH 为内参。

1.7 免疫组织化学染色(IHC) 裸鼠经颈椎脱臼法处死后,取出鼠脑标本固定于 4%福尔马林中,石蜡包埋后做成 5 μm 切片。将石蜡切片置于 60℃环境中烤片 1 h,然后经二甲苯和梯度乙醇水化脱蜡。结束后于 92~99℃柠檬酸钠溶液中抗原修复 15 min,室温中冷却,然后将切片用 PBS 洗涤 5 min×3 次,再经 3% H_2O_2 于室温下孵育 30 min 以清除内源性过氧化物酶活性。结束后经 PBS 洗涤 5 min×3 次,切片经 1%牛血清白蛋白(BSA)于 37℃恒温箱中封闭 30 min,最后经特定一抗于 4℃孵育过夜。次日室温下复温 1 h 后回收一抗,PBS 洗涤 5 min×3 次,再经二抗孵育 1 h,结束后经 DAB 染色、苏木素复染,然后分化、反蓝、水化、封片。显微镜下观察、拍照进行统计学分析。

1.8 动物实验 本实验利用裸鼠颅内模型进行药物体内实验。4 周龄雌性裸鼠(约 10 g/只)购买于中国医学科学院血液病研究所。颅内裸鼠模型构建及处理过程如下:将感染荧光病毒的原代 GBM 细胞用立体定向仪于裸鼠前后凶中点偏右 2 mm 处注射入裸鼠颅内。7 d 后,利用小动物活体成像系统测定裸鼠颅内肿瘤大小,记录数据。将裸鼠随机分配至 3 组,每组 15 只,分别为对照组、TMZ 组、TMZ+amlexanox 组。TMZ 组裸鼠接受 5 mg/(kg·d)TMZ 处理,联合药物组接受 5 mg/(kg·d)TMZ+100 mg/(kg·d)amlexanox 处理,对照组接受 DMSO 处理。3 组裸鼠接受药物处理 5 d 后休息 2 d,接着再处理 5 d,以此循环至实验结束。以后每周对裸鼠成像 1 次。4 周后,每组处死 3 只裸鼠,取出鼠脑后固定于福尔马林,用于苏木素伊红(HE)染色和 IHC 实验。每组剩

余裸鼠饲养至实验结束,用于动物生存分析。

1.9 统计学处理 用 $\bar{x} \pm s$ 表示所有实验数据。用 Graphpad Prism 6 软件进行统计学分析。One-way ANOVA 法用于分析多组数据是否具有统计学意义。采用 Kaplan-Meier 法检验各组生存率差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

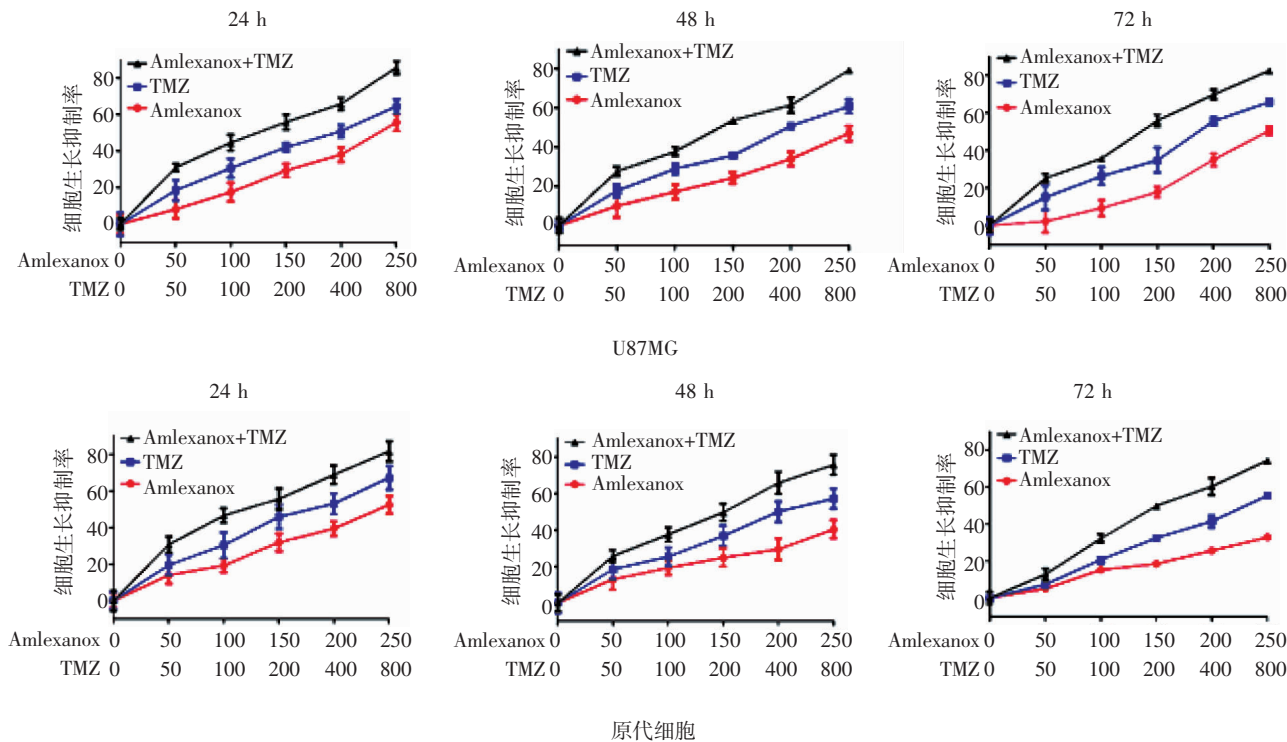
2 结果

2.1 TMZ 联合 amlexanox 显著抑制肿瘤细胞增殖 U87 MG 和原代 GBM 细胞经不同浓度的单药或联合药物处理 24、48、72 h。CCK-8 结果显示, TMZ 或 amlexanox 对肿瘤细胞增殖能力的抑制作用随药物浓度增加而增强(图 1)。与其他 3 组比较, TMZ+amlexanox 组 U87 MG 和原代 GBM 细胞增殖能力明显抑制(图 1)。而且, TMZ 组和 amlexanox 组 U87 MG 72 h 药物半抑制浓度(IC_{50})分别为 200 μmol/L 和 600 μmol/L,二者联合处理后 IC_{50} 分别降至 130 μmol/L (TMZ) 和 180 μmol/L。TMZ+amlexanox 组原代 GBM 细胞 72 h 药物 IC_{50} 值也显著降低。依据 IC_{50} 值, 本研究分别选择 TMZ:100 μmol/L 和 amlexanox:50 μmol/L 进行后续实验。

2.2 TMZ 联合 amlexanox 能有效抑制 Akt 激活 Western 印迹实验结果显示,无论是 U87 MG 细胞还是原代 GBM 细胞,不同处理方式均不能改变细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白质表达量,但 TMZ 组 p-Akt 表达量轻度升高,amlexanox 组 IKBKE 表达量明显降低。TMZ+amlexanox 组 U87 MG 和原代 GBM 细胞中 p-Akt 和 p-mTOR 表达水平显著降低(图 2)。

2.3 TMZ 联合 amlexanox 能显著抑制细胞侵袭和迁移能力 划痕实验结果表明, TMZ+amlexanox 组 U87 MG 和原代 GBM 细胞划痕愈合面积显著低于 TMZ 组和 amlexanox 组($P < 0.001$, 图 3A、2B), Transwell 迁移实验结果也表明, TMZ+amlexanox 组 U87 MG 和原代 GBM 细胞 24 h 后穿出小室细胞数量显著低于 TMZ 组和 amlexanox 组($P < 0.05$, 图 3C、D)。Transwell 侵袭实验结果表明, TMZ+amlexanox 组 U87 MG 和原代 GBM 细胞穿出数量显著降低($P < 0.01$, 图 3C、3D)。

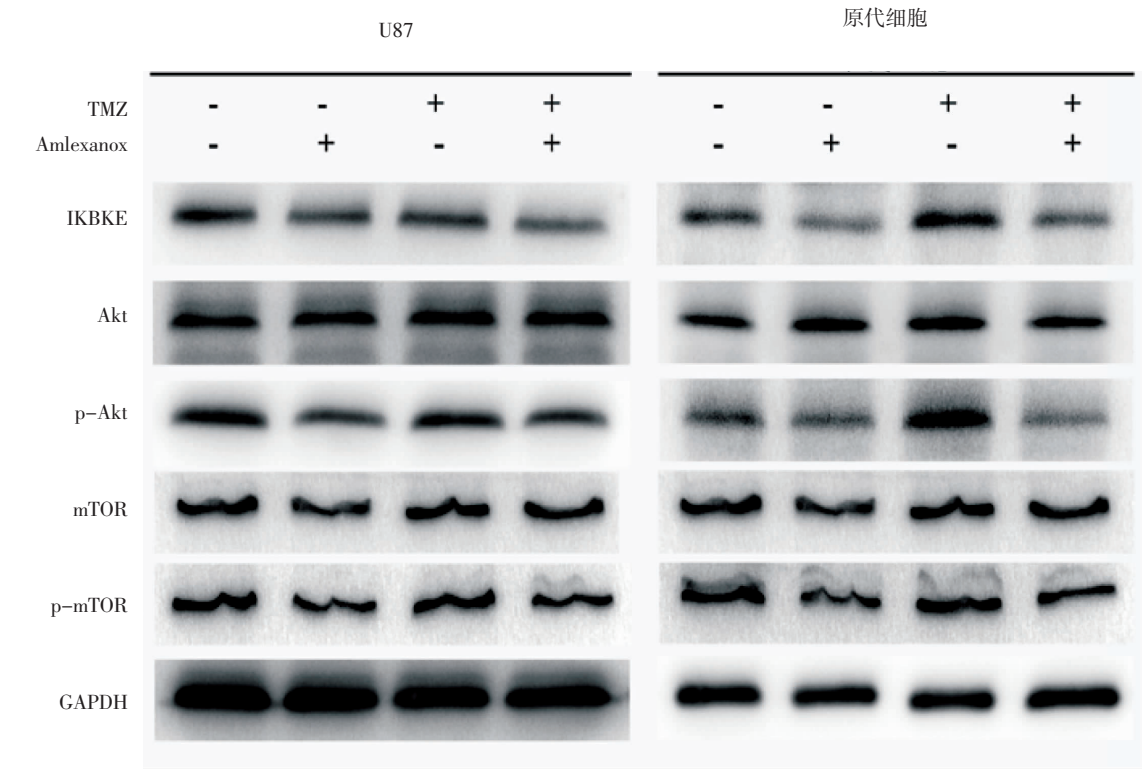
2.4 TMZ 联合 amlexanox 抑制裸鼠颅内肿瘤生长 动物实验结果如图 4A、4B、4C 所示, TMZ 组裸鼠颅内肿瘤体积略小于对照组,而 TMZ+amlexanox 组裸鼠颅内肿瘤体积显著小于 TMZ 组和对照组,且 TMZ+amlexanox 组裸鼠生存中位数也显著高于 TMZ 组和对照组(31 d 比 25.5 d 和 21 d)。HE 结果也提示, TMZ+amlexanox 组裸鼠颅内肿瘤体积显著小于另外两组(图 4D)。另外,与体外细胞实验结果一致, IHC



注:TMZ:替莫唑胺

图 1 TMZ 联合 amlexanox 对 U87 MG 和原代 GBM 细胞增殖能力的影响

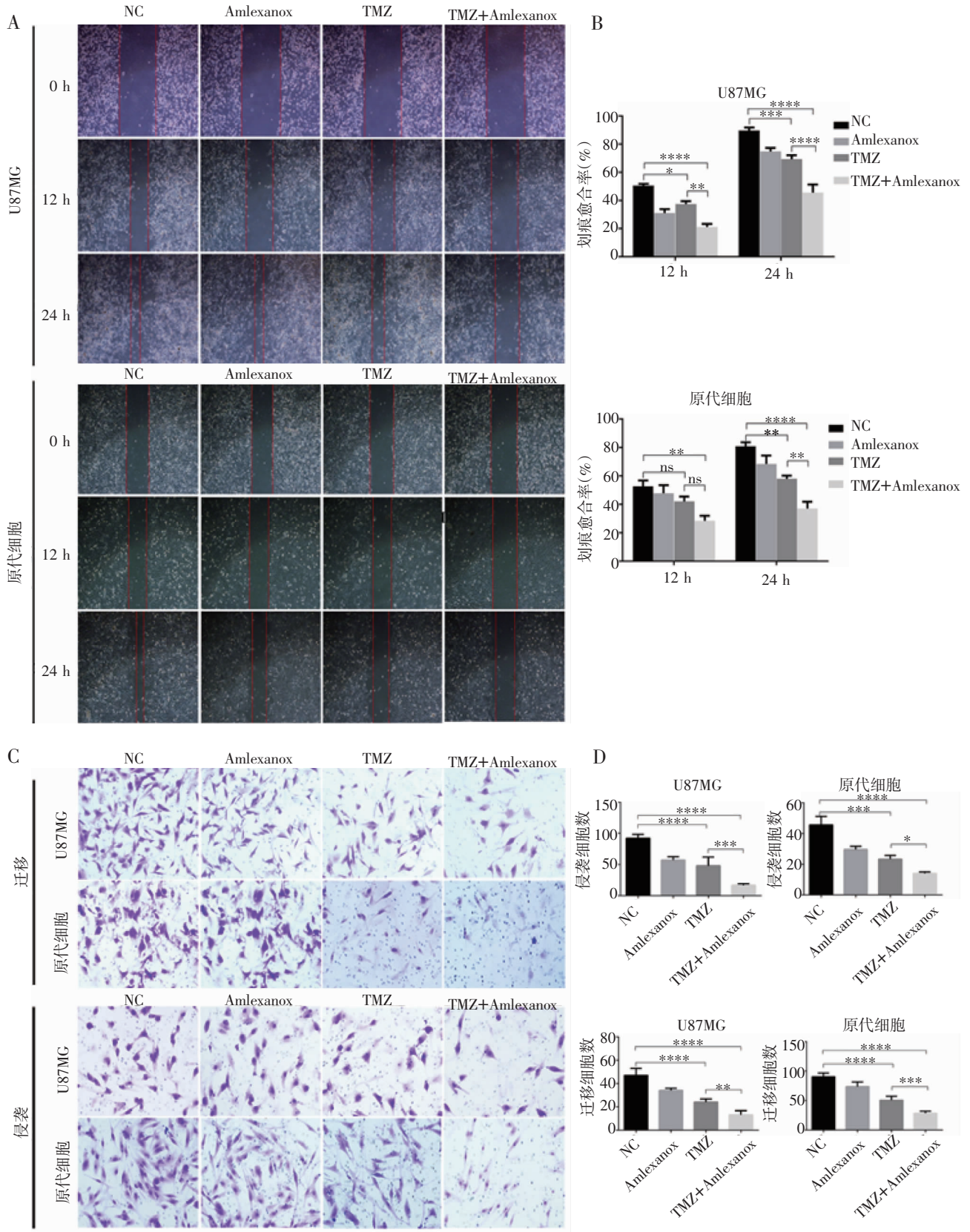
Fig 1 Effect of TMZ combined with amlexanox on proliferation of U87 MG and primary GBM cells



注:TMZ:替莫唑胺;IKKBE:核因子 κ -B 激酶抑制剂;Akt:蛋白激酶 B;p-Akt:磷酸化 Akt;mTOR:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;p-mTOR:磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 TMZ 联合 amlexanox 对 U87 MG 和原代细胞中 IKKBE、Akt、mTOR 等蛋白表达的影响

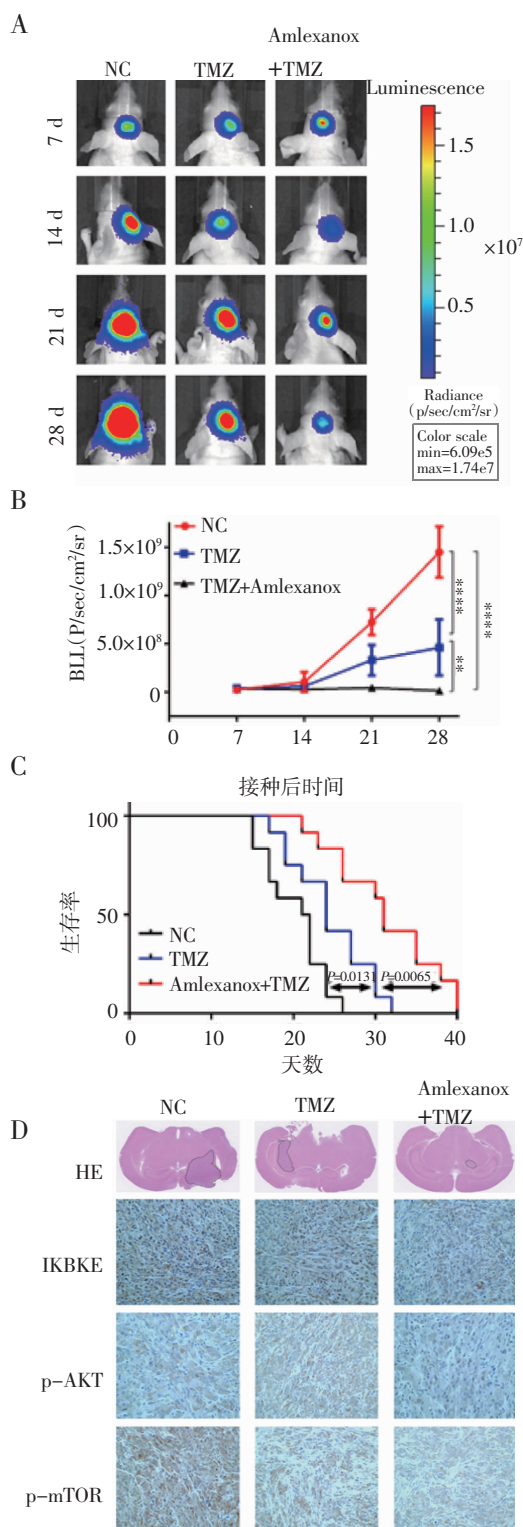
Fig 2 Effect of TMZ combined with amlexanox on the expression of IKKBE, Akt, mTOR and other proteins for U87 MG and primary GBM cells



注:A: U87 MG 和原代细胞经 0、12、24 h 处理后典型的划痕实验图;B: U87 MG 和原代细胞划痕实验统计分析柱状图;C: U87 MG 和原代细胞经 24 h 处理后典型的 Transwell 迁移和侵袭图 ($\times 200$);D: U87 MG 和原代细胞 Transwell 迁移和侵袭实验统计分析柱状图;NC: 阴性对照;TMZ: 替莫唑胺;Amlexanox+TMZ 组与 TMZ 组比较, $*P<0.05$; Amlexanox+TMZ 组与 NC 组、Amlexanox+TMZ 组与 TMZ 组和 TMZ 组与 NC 组比较, $**P<0.01$; Amlexanox+TMZ 组与 TMZ 组和 TMZ 组与 NC 组比较, $***P<0.005$; Amlexanox+TMZ 组与 TMZ 组、Amlexanox+TMZ 组与 NC 组和 TMZ 组与 NC 组比较, $****P<0.001$

图 3 TMZ 联合 amlexanox 对 U87 MG 细胞和原代细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig 3 Effect of TMZ combined with amlexanox on the migration and invasion of U87 MG and primary GBM cells



注:A:颅内接种原代GBM细胞7、14、21、28 d后,典型的动物成像图;B:裸鼠颅内肿瘤大小统计分析柱状图;C:颅内肿瘤裸鼠模型生存分析;D:颅内肿瘤典型的HE图和典型的IKBKE、p-Akt、p-mTOR IHC图($\times 200$);Amlexanox+TMZ组与TMZ组比较,** $P < 0.01$; Amlexanox+TMZ组与NC组和TMZ组与NC组比较,**** $P < 0.0001$; NC:阴性对照;TMZ:替莫唑胺;HE:苏木素伊红染色;IKBKE:核因子 κ -B激酶抑制剂;p-Akt:磷酸化蛋白激酶B;p-mTOR:磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

图4 TMZ联合amlexanox对裸鼠颅内肿瘤的影响

Fig 4 Effect of TMZ combined with amlexanox on orthotopic intracranial tumors of nude mice

结果表明, TMZ+amlexanox组 p-Akt 和 p-mTOR 在颅内肿瘤中表达水平明显降低(图4D)。

3 讨论

TMZ 普遍用于胶质瘤治疗, 诱导DNA加合物形成是TMZ产生细胞毒性最主要机制^[14]。尽管TMZ能改善GBM患者预后, 但易产生耐药性^[15]。临床上迫切需要一种针对胶质瘤患者更有效的治疗措施。本研究利用一系列实验证明TMZ联合小分子抑制剂 amlexanox, 能有效抑制U87 MG细胞和原代GBM细胞增殖、侵袭和迁移能力, 并能显著抑制裸鼠颅内肿瘤生长和延长裸鼠生存期。

耐药性的产生是治疗胶质瘤患者失败的最主要原因。Akt 作为重要的细胞蛋白质, 其异常激活参与多种细胞活动, 如细胞增殖、生存、糖代谢等。日益增多的研究证实, Akt 激活与TMZ耐药性相关, 而且TMZ能诱导Akt异常激活更增加肿瘤细胞对TMZ耐药性^[16-17]。大量研究已经证实, 抑制Akt通路能降低肿瘤细胞对TMZ耐药性, 增强其细胞毒性作用^[18-22]。其中Bi等^[19]证实Cordycepin能通过激活AMP活化蛋白激酶(AMPK)和抑制Akt通路, 抑制胶质瘤细胞增殖、促进凋亡。Wu等^[20]证实FK228能通过抑制磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/Akt/mTOR通路促进胶质瘤细胞凋亡, 并抑制裸鼠颅内肿瘤生长。本研究也表明, TMZ联合 amlexanox 能显著抑制 p-Akt 和 p-mTOR 表达水平, 进而抑制细胞增殖能力。Amlexanox 作为IKBKE的选择性抑制剂, 不仅能调节糖代谢^[23], 还能通过抑制Hippo通路而发挥抗肿瘤作用^[13]。另外, IKBKE在乳腺癌和小细胞肺癌中参与Akt的异常激活^[16, 24]。因此, 本研究发现, amlexanox 能增强TMZ对胶质瘤细胞毒性作用, 可能与 amlexanox 抑制IKBKE活性而抑制 p-Akt 表达并逆转TMZ诱导Akt激活有关。

综上所述, 本研究证实TMZ联合 amlexanox 能显著抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力, 并能显著抑制原代GBM细胞在裸鼠颅内成瘤。Amlexanox 能降低肿瘤细胞对TMZ耐药性, 增强TMZ细胞毒性作用, 可能与 amlexanox 抑制IKBKE活性而部分逆转TMZ诱导Akt激活有关。这为TMZ联合小分子抑制剂治疗胶质瘤提供新的临床治疗思路。

参考文献:

- [1] Uribe D, Torres A, Rocha J D, et al. Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: role of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling[J]. Mol Aspects Med, 2017, 55:140
- [2] Guan H, Zhang H, Cai J, et al. IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF- κ B[J]. J Pathol, 2011, 223(3):436

- [3] Yu Z, Xie G, Zhou G, et al. NVP-BEZ235, a novel dual PI3K-mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells[J]. Cancer Lett, 2015, 367(1):58
- [4] Qian Z, Zhou S, Zhou Z, et al. miR146b5p suppresses glioblastoma cell resistance to temozolomide through targeting TRAF6[J]. Oncol Rep, 2017, 38(5):2941
- [5] Stritzelberger J, Distel L, Buslei R, et al. Acquired temozolomide resistance in human glioblastoma cell line U251 is caused by mismatch repair deficiency and can be overcome by lomustine[J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20(4):508
- [6] Liu J F, Tsao Y T, Hou C H. Fractalkine CX3CL1 induced intercellular adhesion molecule-1-dependent tumor metastasis through the CX3CR1 PI3K Akt NF- κ B pathway in human osteosarcoma[J]. Oncotarget, 2017, 8: 54136
- [7] Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva O K, et al. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4861
- [8] Xie X, Zhang D, Zhao B, et al. I κ B kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(16): 6474
- [9] Bell J. Amlexanox for the treatment of recurrent aphthous ulcers[J]. Clin Drug Invest, 2005, 25 (9): 555
- [10] Makino H, Saijo T, Ashida Y, et al. Mechanism of action of an antiallergic agent, amlexanox(AA-673), in inhibiting histamine release from mast cells[J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987, 82(1): 66
- [11] Beyett T S, Gan X, Reilly S M, et al. Carboxylic acid derivatives of amlexanox display enhanced potency toward TBK1 and IKKepsilon and reveal mechanisms for selective inhibition[J]. Mol Pharmacol, 2018, 94(4):1210
- [12] Oral E A, Reilly S M, Gomez A V, et al. Inhibition of IKK ϵ and TBK1 improves glucose control in a subset of patients with type 2 diabetes[J]. Cell Metab, 2017, 26(1):157
- [13] Liu Y, Lu J, Zhang Z, et al. Amlexanox, a selective inhibitor of IK-BKE, generates anti-tumoral effects by disrupting the Hippo pathway in human glioblastoma cell lines[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3022
- [14] Drablos F, Feyzi E, Aas P A, et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(11):1389
- [15] Yang W B, Chuang J Y, Ko C Y, et al. Dehydroepiandrosterone induces temozolomide resistance through modulating phosphorylation and acetylation of Sp1 in glioblastoma[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(4): 56(4): 2301
- [16] Guo J P, Coppola D, Cheng J Q. IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(43):37389
- [17] Caporali S, Levati L, Starace G, et al. AKT is activated in an ataxia-telangiectasia and Rad3-related-dependent manner in response to temozolomide and confers protection against drug-induced cell growth inhibition[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(1):173
- [18] Zou W, Ma X, Hua W, et al. Caveolin-1 mediates chemoresistance in cisplatin-resistant ovarian cancer cells by targeting apoptosis through the Notch-1/Akt/NF-kappaB pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 3256
- [19] Bi Y, Li H, Yi D, et al. Cordycepin augments the chemosensitivity of human glioma cells to temozolomide by activating AMPK and inhibiting the AKT signaling pathway[J]. Mol Pharm, 2018, 15(11):4912
- [20] Wu Y, Dong L, Bao S, et al. FK228 augmented temozolomide sensitivity in human glioma cells by blocking PI3K/AKT/mTOR signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 462
- [21] Lee J E, Lim J H, Hong Y K, et al. High-dose metformin plus temozolomide shows increased anti-tumor effects in glioblastoma *in vitro* and *in vivo* compared with monotherapy[J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(4): 1331
- [22] Zhou W, Wang J, Qi Q, et al. Matrine induces senescence of human glioblastoma cells through suppression of the IGF1/PI3K/AKT/p27 signaling pathway[J]. Cancer Med, 2018, 7(9): 4729
- [23] Reilly S M, Chiang S H, Decker S J, et al. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice[J]. Nat Med, 2013, 19(3): 313
- [24] Challa S, Guo J P, Ding X, et al. IKBKE is a substrate of EGFR and a therapeutic target in non-small cell lung cancer with activating mutations of EGFR[J]. Cancer Res, 2016, 76(15):4418

(2020-03-28 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅