

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.05.0412

论著

雷洛昔芬抑制胶质瘤及与替莫唑胺协同作用的研究

邱天¹, 刘恺宁², 王广秀¹, 张安玲¹, 王虎², 贾志凡¹

(1.天津医科大学总医院神经病学研究所神经肿瘤实验室, 天津 300052; 2.天津市环湖医院神经外科, 天津 300350)

摘要 目的:探究雷洛昔芬(Ralo)对胶质瘤生物学行为的影响以及 Ralo 联合替莫唑胺(TMZ)用药的效果。方法:采用 CCK-8 实验测定 B2-17 细胞系和 TJ905 细胞系中 Ralo 和 TMZ 的半数抑制浓度(IC50),根据 IC50 值将细胞分为 4 个处理组分为二甲亚砜(DMSO)组、Ralo 组(B2-17 18.5 μmol/L, TJ905 20 μmol/L)、TMZ 组(B2-17 1 100 μmol/L, TJ905 1 412.4 μmol/L)和 Ralo+TMZ 组(B2-17 Ralo 14.7 μmol/L +TMZ 140.03 μmol/L, TJ905 Ralo 16.5 μmol/L +TMZ 160.6 μmol/L)。采用 CCK-8 实验、细胞划痕实验、Transwell 实验、Annexin V 凋亡实验评价对胶质瘤细胞系增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学行为的影响。采用 Western 印迹(WB)检测基质金属蛋白酶(MMP)2、增殖细胞核抗原抗体(PCNA)、胱天蛋白酶 3(Caspase3)以及 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白(Bcl-2)表达情况。根据两种药物的 IC50 值分别设置浓度梯度,根据结果计算联合作用指数。结果:与 DMSO 组相比,Ralo 组、TMZ 组以及 Ralo +TMZ 组的存活率都明显下降(B2-17: $t=0.282, 0.211, 0.201$, 均 $P<0.05$; TJ905: $t=0.308, 0.267, 0.379$, 均 $P<0.05$); Ralo 组和 TMZ 组凋亡率明显升高($t=5.254, 7.162, 6.769, 8.623$, 均 $P<0.05$), 相比 Ralo 组与 TMZ 组, Ralo+TMZ 组细胞的凋亡率明显上升($F=25.54, 14.71$, 均 $P<0.05$)。药物处理 48 h 后,与 DMSO 组相比, Ralo 组($t=6.607, 4.743$, 均 $P<0.05$)、TMZ 组($t=6.607, 4.743$, 均 $P<0.05$)的间隙愈合率均出现明显降低。Ralo 和 TMZ 联合使用后,间隙愈合率相比 Ralo 组和 TMZ 组显著降低($F=65.94, 41.70$, 均 $P<0.05$); WB 结果显示, Ralo 组 MMP2、PCNA、Bcl-2 的表达降低 ($t=10.26, 14.69, t=7.107, 10.77, t=13.78, 23.53$, 均 $P<0.01$), Caspase3 表达显著升高($t=5.147, 8.595$, 均 $P<0.01$)。TMZ 组同样降低了 PCNA($t=9.541, 11.83$, 均 $P<0.01$)、MMP2($t=9.973, 10.48$, 均 $P<0.01$)、Bcl-2($t=18.16, 29.43$, 均 $P<0.01$)的表达,上调了 Caspase3 的表达($t=10.50, 11.85$, 均 $P<0.001$)。此外,相较于 Ralo 组和 TMZ 组, Ralo+TMZ 组 MMP2、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量均进一步降低($F=85.38, 213.5$, 均 $P<0.001$; $F=98.55, 30.08$, 均 $P<0.01$; $F=5.391, 206.9$ 均 $P<0.05$), 同时 Caspase3 表达量进一步升高($F=144.3, 36.92$, 均 $P<0.001$)。结论: Ralo 抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭、迁移能力,并诱导细胞凋亡, Ralo 和 TMZ 联合存在协同作用。

关键词 胶质瘤; 雷洛昔芬; 替莫唑胺

中图分类号 R651.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)05-0412-09

Study on the inhibitory effect of raloxifene on glioma cells and combination therapy with temozolomide

QIU Tian¹, LIU Kaining², WANG Guangxiu¹, ZHANG Anling¹, WANG Hu², JIA Zhifan¹

(1. Department of Neuro-oncology, Institute of Neurology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Neurosurgery, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of raloxifene (Ralo) on the biological behavior of glioma and the therapeutic efficacy of Ralo combined with temozolomide (TMZ). **Methods:** The half-maximal inhibitory concentration (IC50) of Ralo and TMZ in B2-17 and TJ905 cell lines was determined using the CCK-8 assay. Based on the IC50 values, the cells were divided into four treatment groups: dimethyl sulfoxide (DMSO) control group, Ralo monotherapy group (B2-17 18.5 μmol/L; TJ905 20 μmol/L), TMZ monotherapy group (B2-17 1 100 μmol/L; TJ905 1 412.4 μmol/L), and Ralo+TMZ combination therapy group (B2-17: Ralo 14.7 μmol/L + TMZ 140.03 μmol/L; TJ905: Ralo 16.5 μmol/L + TMZ 160.6 μmol/L). The effects of the biological behaviors of glioma cell lines, such as proliferation, apoptosis, migration, and invasion were evaluated through CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell invasion assays, and Annexin V apoptosis assay, and Western blotting was used to detect the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cysteinyl aspartate specific protease (Caspase3), and B-cell lymphoma-2 protein (Bcl-2). Concentration gradients of the two drugs were established based on their respective IC50 values, and the combination index (CI) was calculated to assess drug interactions. **Results:** Compared to the DMSO control group, Ralo monotherapy, TMZ monotherapy, and Ralo+TMZ combination therapy significantly reduced cell viability (B2-17: $t=0.282, 0.211, 0.201$, all $P<0.05$; TJ905: $t=0.308, 0.267, 0.379$, all $P<0.05$). Apoptosis rates were markedly increased in Ralo and TMZ group ($t=5.254, 7.162, 6.769, 8.623$, all $P<0.05$), with the Ralo+TMZ combination therapy group showing further enhancement compared to the Ralo monother-

基金项目 国家自然科学基金(30872985, 81101915); 天津市卫生健康科技项目(MS20024)

作者简介 邱天(1999-), 男, 学士, 研究方向: 外科学(神经外科); 通信作者: 贾志凡, E-mail: jiazhfan@163.com, 王虎, E-mail: tiger_rui@163.com。

apy and TMZ monotherapy ($F=25.54, 14.71$, both $P<0.05$). After 48 hours of drug treatment, compared to the DMSO control group, the wound healing rates were significantly reduced in both the Ralo group ($t=6.607, 4.743$, both $P<0.05$) and TMZ group ($t=6.607, 4.743$, both $P<0.05$). The Ralo+TMZ combination further suppressed wound healing rates compared to Ralo monotherapy and TMZ monotherapy group ($F=65.94, 41.70$, both $P<0.05$). Western blotting analysis revealed that Ralo downregulated MMP-2 ($t=10.26, 14.69$, both $P<0.01$), PCNA ($t=7.107, 10.77$, both $P<0.01$), and Bcl-2 ($t=13.78, 23.53$, both $P<0.01$), while upregulating Caspase3 ($t=5.147, 8.595$, both $P<0.01$). TMZ similarly reduced PCNA ($t=9.541, 11.83$, both $P<0.01$), MMP-2 ($t=9.973, 10.48$, both $P<0.01$), and Bcl-2 expression ($t=18.16, 29.43$, both $P<0.01$), and increased Caspase3 expression ($t=10.50, 11.85$, both $P<0.001$). Compared to Ralo monotherapy and TMZ monotherapy group, the Ralo+TMZ combination group showed further downregulation of MMP-2, PCNA, and Bcl-2 protein expression ($F=85.38, 213.5$, both $P<0.001$; $F=98.55, 30.08$, both $P<0.01$; $F=5.391, 206.9$, both $P<0.05$), along with a more pronounced upregulation of Caspase3 ($F=144.3, 36.92$, both $P<0.001$). **Conclusion:** Ralo suppresses the proliferation, invasion, and migration of glioma cells while inducing apoptosis, and its combination with TMZ exhibits a synergistic antitumor effect.

Key words glioma; raloxifene; temozolomide

胶质瘤源自神经胶质细胞,是神经外科最常见的肿瘤之一,占颅内肿瘤发病率的第1位,其恶性程度高,预后极差。目前,临床主要应用的化疗药物为替莫唑胺(TMZ),但在临床应用中常出现明显的耐药性,大大削弱了TMZ的治疗效果,因此需要寻找新的辅助药物、增强肿瘤细胞对药物的敏感性,以增强TMZ的治疗效果。他莫昔芬(tamoxifen, TAMO),作为第一代选择性雌激素受体调节剂(SERM),具有抑制胶质瘤细胞的增殖^[1-2]、促进U251和U87细胞对光动力治疗的反应^[3]以及耐药胶质瘤细胞株凋亡^[4]的作用,并且已有在临床治疗中与TMZ等联合应用的报告^[5-6]。

雷洛昔芬(Ralo)作为第二代SERM^[7],通过调节雌激素受体的活性,展现出对胰腺癌、前列腺癌等恶性肿瘤的抑制作用,且不良反应少于TAMO^[8]。此外,针对中枢神经系统疾病,Ralo可以改善轻度认知障碍,从而减缓阿尔兹海默病的进展^[9],但目前Ralo在胶质瘤中的作用研究较少,有报道在胶质母细胞瘤缺氧状态下,Ralo可以通过抑制应激颗粒解聚并破坏翻译调控,从而促进胶质瘤细胞死亡^[10],但Ralo能否对胶质瘤的具体生物学行为产生影响还知之甚少。本研究选用B2-17和TJ905两个胶质瘤细胞系,其结果可以相互印证,拟对Ralo以及Ralo联合TMZ应用对于胶质瘤的生物学行为影响进行检测,并对相应蛋白表达情况进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及试剂 Ralo、TMZ以及Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)购自上海MCE生物科技有限公司。胎牛血清购自新西兰NEWZERUM公司,基质胶(Matrigel)、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)以及可穿透性细胞培养小室(Transwell)均购自美国Corning公司,细胞凋亡试剂盒

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I购自美国BD Bioscience公司。高效RIPA裂解液、苯甲磺酰氟(PMSF)和广谱蛋白Marker均购自中国南京诺唯赞生物科技有限公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒购自中国北京索莱宝生物科技有限公司。蛋白印迹(WB)实验所用基质金属蛋白酶(MMP)2抗体、B淋巴细胞瘤-2基因蛋白(Bcl-2)抗体、增殖细胞核抗原(PCNA)抗体、半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体及二抗山羊抗兔IgG均购自中国武汉三鹰生物技术有限公司。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)彩色(红色)凝胶超快速配制试剂盒购自中国武汉塞维尔生物科技有限公司。偏二氟乙烯(PVDF)膜、超敏发光液均购自美国MERCK公司。

胶质瘤细胞系B2-17和TJ905细胞由天津医科大学神经病学研究所神经肿瘤实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 胶质瘤细胞培养 胶质瘤细胞系B2-17和TJ905细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于含5%二氧化碳的37℃恒温培养箱中。每个细胞系分4组:DMSO组、Ralo组、TMZ组和Ralo+TMZ组。DMSO组加入0.1%DMSO,其余3组加入含相应IC50浓度的药物处理,

1.2.2 CCK-8实验 检测选取生长状态良好的对数生长期细胞制作细胞悬液,在96孔板中接种细胞悬液(100 μL/孔),每孔3 000个细胞。将培养板置于培养箱(37℃,5% CO₂)中培养24 h,待细胞达到指数生长期时,吸出各孔培养基,向培养板加入不同浓度的药物进行干预。将96孔板在培养箱(37℃,5% CO₂)培养一段时间后,每孔加入10 μL CCK-8试剂,在37℃下避光孵育2 h,孵育结束后使用酶标仪检测各孔在450 nm波长的吸光度(OD值)按公式计算

出不同药物浓度处理下的细胞移植率。细胞移植率计算公式为:细胞抑制率(%)=[(Ac-As)/(Ac-Ab)]×100%;As:无实验组吸光度(含细胞、培养基、CCK-8溶液和药物溶液);Ac:对照组吸光度(含细胞、培养基、CCK-8溶液,不含药物);Ab:空白组吸光度(含培养基、CCK-8溶液,不含细胞、药物)。

1.2.2.1 细胞系半数抑制浓度(IC₅₀)检测 在B2-17细胞系中设置的Ralo浓度梯度为12、14、16、18、20、22、24 μmol/L;TMZ浓度梯度为800、1 000、1 200、1 400、1 600和1 800 μmol/L。在TJ905细胞系设置的相同的Ralo和TMZ的浓度梯度,检测细胞的IC₅₀值。

1.2.2.2 细胞系增殖检测 将B2-17和TJ905细胞系分为4组:DMSO组(加入0.1%DMSO),Ralo组(B2-17 18.5 μmol/L, TJ905 20 μmol/L),TMZ组(B2-17 100 μmol/L, TJ-905 1 412.4 μmol/L)和Ralo+TMZ组(B2-17Ralo 14.7 μmol/L+TMZ 140.03 μmol/L, TJ-905Ralo 16.5 μmol/L+TMZ 160.6 μmol/L),于12、24、36、48和72 h分别检测96孔板中各组细胞相对应的CCK-8值。

1.2.2.3 联合作用指数(CI)值检测 根据Ralo和TMZ的IC₅₀分别设置浓度梯度为1/32倍IC₆₀、1/16倍IC₅₀、1/8倍IC₅₀、1/4倍IC₅₀、1/2倍IC₅₀、1倍IC₅₀、2倍IC₅₀、4倍IC₅₀、8倍IC₅₀的Ralo和TMZ处理组以及Ralo和TMZ两种药物联合给药的处理组,作用于B2-17和TJ905细胞,检测联合用药时两种药物的IC₅₀值。使用CI值来定量评估Ralo和TMZ的治疗效果^[10],CI值为:CI=IC_{50R1}/IC_{50R2}+IC_{50T1}/IC_{50T2}。其中,IC_{50R1}和IC_{50T1}为Ralo和TMZ联合用药时的IC₅₀值,IC_{50R2}和IC_{50T2}为Ralo和TMZ单独用药的IC₅₀值。此外,CI值定量定义为CI=1(叠加效应),CI<1(协同效应),CI>1(拮抗效应)。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡 用不含EDTA的胰酶消化细胞,收集到离心管内。1 000 r/min离心5 min,沉淀细胞。加入约1 mL 4℃预冷的PBS,重悬细胞,再次离心沉淀细胞,小心吸除上清,1:9稀释Binding Buffer,结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞悬液浓度至5×10⁶个/mL;取100 μL的细胞悬液于5 mL流式管中,加入5 μL Annexin V/FITC混匀后于室温避光孵育5 min;加入5 μL的碘化丙啶溶液(PI),并加400 μL PBS,立刻进行流式检测。

1.2.4 Transwell实验检测细胞侵袭 准备基质胶4℃解冻Matrigel。将枪头、离心管与放有Transwell小室的24孔板放入冰盒预冷,并用预冷枪头将Matrigel混匀。基质胶铺板:稀释Matrigel(Matrigel和无血清培养基以1:5的比例稀释),吸取60 μL稀释

后的Matrigel,垂直加入Transwell上室中,均匀平铺在底部。放入培养箱(37℃,5%CO₂)中孵育3 h,使Matrigel聚合成薄膜。制作细胞悬液:取汇合度达70%~80%的细胞进行消化并离心弃废液,然后用无血清培养基重悬细胞,计数后调整细胞密度至2.5×10⁵/mL。接种细胞:在24孔板下室加入500 μL含10%FBS培养基。然后用镊子将Transwell小室置于24孔板内,每孔加入200 μL细胞悬液到Transwell上室中。培养箱培养24 h后可进行固定染色。细胞固定:取出Transwell小室,吸走培养基,用棉签轻轻擦拭Matrigel和上室内的细胞。在24孔板干净的孔中加入4%多聚甲醛600 μL,将小室放入后固定20~30 min。细胞染色及计数:弃去固定液,PBS洗1遍,用0.1%结晶紫染色5~10 min,PBS清洗3遍,在10倍显微镜下选取5个视野观察细胞并计数。每个细胞系分4组:DMSO组、Ralo、TMZ组和Ralo+TMZ组。DMSO组加入0.1%DMSO,其余3组加入含相应IC₅₀浓度药物。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 细胞计数后铺板,保证每组细胞铺板密度一致,且密度控制在第2天长满单层;第2天用200 μL枪头垂直于六孔板底部直线划痕,吸去培养基,PBS轻柔洗3次,充分洗去漂浮细胞。换无血清培养基,于显微镜下观察划痕,挑选5个视野拍照并记录划痕0 h情况;于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养48 h后,随机选择5个视野(100×)拍照记录;计算各图划痕区域的面积。间隙愈合率的计算公式为:(0 h时间隙面积-拍摄时间隙面积)/0 h时间隙面积×100%。

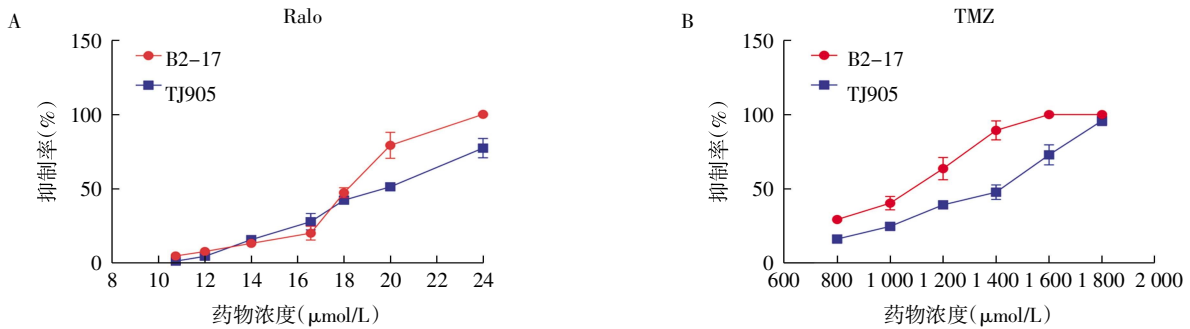
1.2.6 蛋白质提取及western印迹(WB)分析 提取细胞系中的蛋白,检测蛋白浓度,准备上样样品,每个样品均上样20 μg,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至PVDF膜上。用5%的脱脂牛奶在室温下封闭1.5 h。对一抗原液按照比例(1:1 000)进行稀释,将PVDF膜进行放入相应的一抗溶液中,于4℃冰箱中慢摇过夜。次日取出抗体孵育盒,加入二抗(1:5 000),于摇床上慢摇1 h,结束后弃去二抗,洗膜。准备超敏发光液,使用全自动曝光仪器进行曝光。保存图像,并录蛋白条带名称和日期。采用Image J软件分析蛋白图像灰度值。本研究使用的抗体是MMP2、Caspase3、Bcl-2、PCNA、GAPDH(均为1:1 000稀释)。

1.3 统计学处理 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计及计算分析为GraphPad Prism 10和Qri-gin。两组间差异用Student t检验,两组以上的比较采用单因素方差分析(One way-ANOVA),P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法测量 Ralo TMZ 以及 Ralo+TMZ 对胶质瘤细胞的 IC50 由 CCK-8 实验测得,在 B2-17 细

胞系中,Ralo 的 IC50 为 18.5 μ mol/L, TMZ 的 IC50 为 1 100 μ mol/L,在 TJ905 细胞系中 Ralo 和 TMZ 的 IC50 分别为 20 μ mol/L 和 1 412.4 μ mol/L(图 1A、B)。



注: A:CCK-8 实验检测 Ralo 在 TJ905 和 B2-17 细胞系中的 IC50;B:CCK-8 实验检测 TMZ 在 TJ905 和 B2-17 细胞系中的 IC50;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

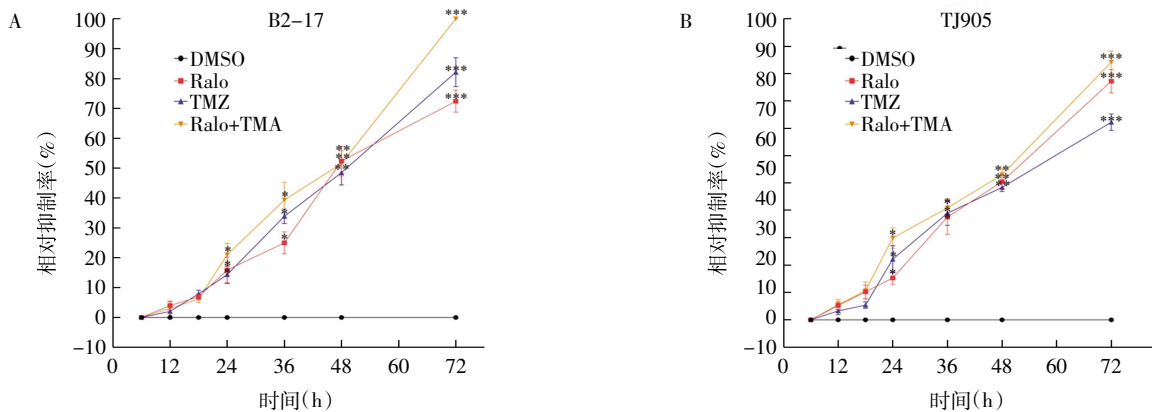
图 1 B2-17 和 TJ905 胶质瘤细胞的 Ralo 及 TMZ 的 IC50 测定

Fig.1 IC50 determination of Ralo and TMZ in B2-17 and TJ905 glioma cells

2.2 CCK8 显示药物处理后胶质瘤细胞的增殖情况与 DMSO 组相比,Ralo 组、TMZ 组以及 Ralo 与 TMZ 联用组的存活率都明显下降 (B2-17: $t=0.282$ 、 0.211 、 0.201 , 均 $P < 0.05$; TJ905: $t=0.308$ 、 0.267 、

0.379 , 均 $P < 0.05$)。此外,在两种细胞中,与 Ralo 与 TMZ 联用组相比,Ralo 组、TMZ 组抑制率均明显降低(图 2A、B)。

2.3 流式细胞检测细胞凋亡 在 B2-17 和 TJ905



注: A:CCK-8 实验检测 B2-17 细胞系增殖能力;B:CCK-8 实验检测 TJ905 细胞系增殖能力;DMSO 组:对照组;与对照组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;DMSO:二甲基亚砷;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 2 Ralo、TMZ 和 Ralo 联合 TMZ 抑制 B2-17 和 TJ905 细胞增殖能力

Fig.2 Ability of Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ to inhibit the proliferation of B2-17 and TJ905 cells

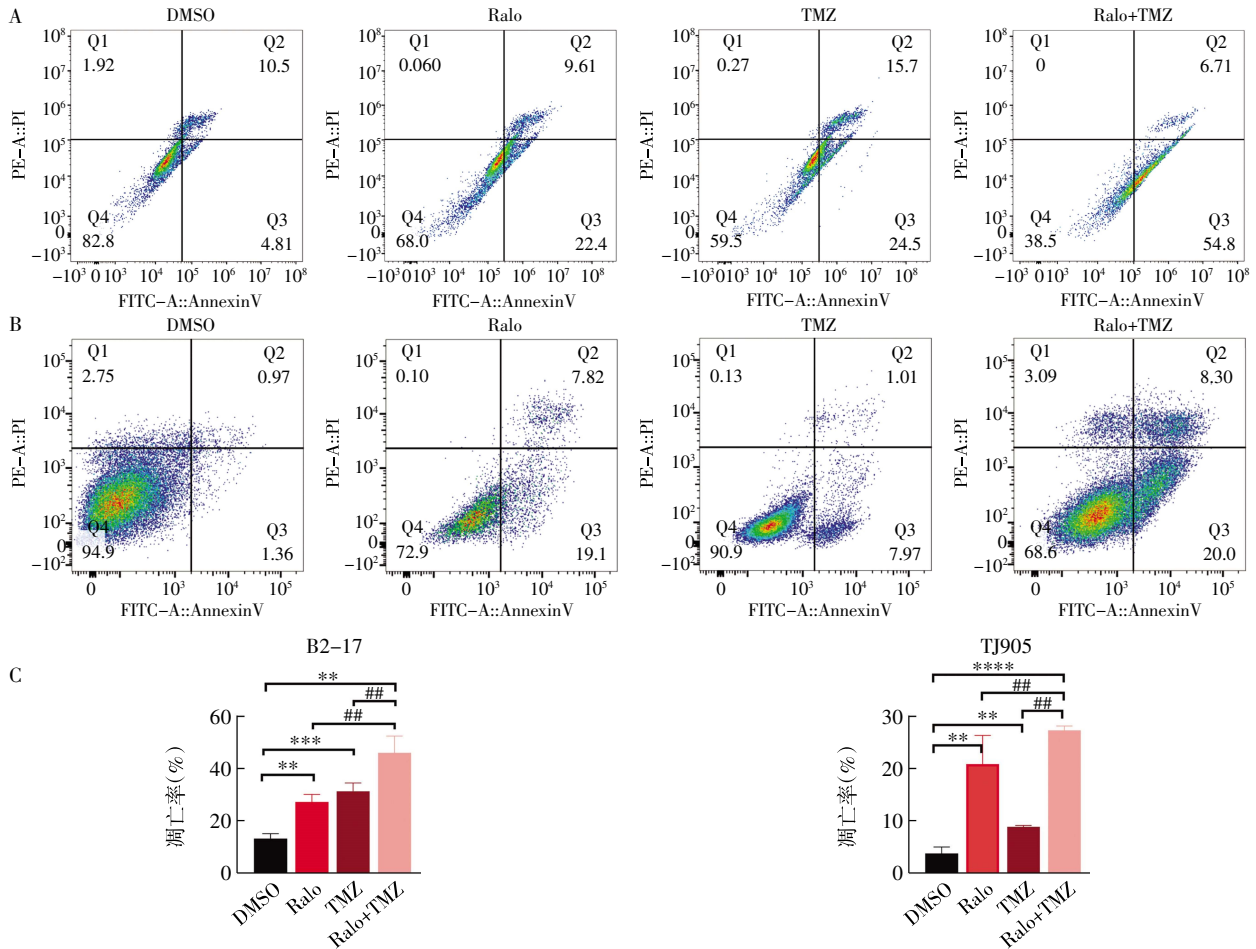
细胞中,与 DMSO 组相比,Ralo 处理组和 TMZ 处理组凋亡率明显升高 ($t=5.254$ 、 7.162 、 6.769 、 8.623 , 均 $P < 0.05$),与 Ralo 组、TMZ 组相比,Ralo+TMZ 组细胞凋亡率明显上升 ($F=25.54$ 、 14.71 , 均 $P < 0.05$) (图 3A~C)。

中,与对照组相比,Ralo 组 ($t=6.607$ 、 4.743 , 均 $P < 0.05$)、TMZ 组的间隙愈合率也出现明显降低 ($t=6.607$ 、 4.743 , 均 $P < 0.05$),与 Ralo 组、TMZ 组相比,Ralo 和 TMZ 联合组间隙愈合率显著降低 ($F=65.94$ 、 41.70 , 均 $P < 0.05$,图 5A~C)。

2.4 Transwell 显示胶质瘤细胞的侵袭情况 Transwell 结果显示,在 B2-17 和 TJ905 细胞中,与对照组相比,Ralo 组 ($t=7.049$ 、 11.50 , 均 $P < 0.05$)和 TMZ 组细胞穿膜数减少 ($t=5.955$ 、 18.64 , 均 $P < 0.05$),同时与 Ralo 组与 TMZ 组相比,联合用药组细胞的穿膜数显著减少 ($F=48.62$ 、 16.88 , 均 $P < 0.05$,图 4A、B)。

2.6 药物联用联合作用指数值测定 实验结果表明,在 B2-17 细胞中,联合用药时 Ralo 和 TMZ 的 IC50 值分别为 14.7、140.03 μ mol/L;而在 TJ905 细胞中,分别为 16.5、160.6 μ mol/L。在单独使用 TMZ 时,B2-17 细胞和 TJ905 细胞的 IC50 值分别为 1 100、1 412.4 μ mol/L;单独使用 Ralo 时,它们分别为 18.5、20 μ mol/L。在 B2-17 细胞和 TJ905 细胞中,Ralo 和 TMZ 的 CI 值分别为 0.82 和 0.91(图 6A、B)。

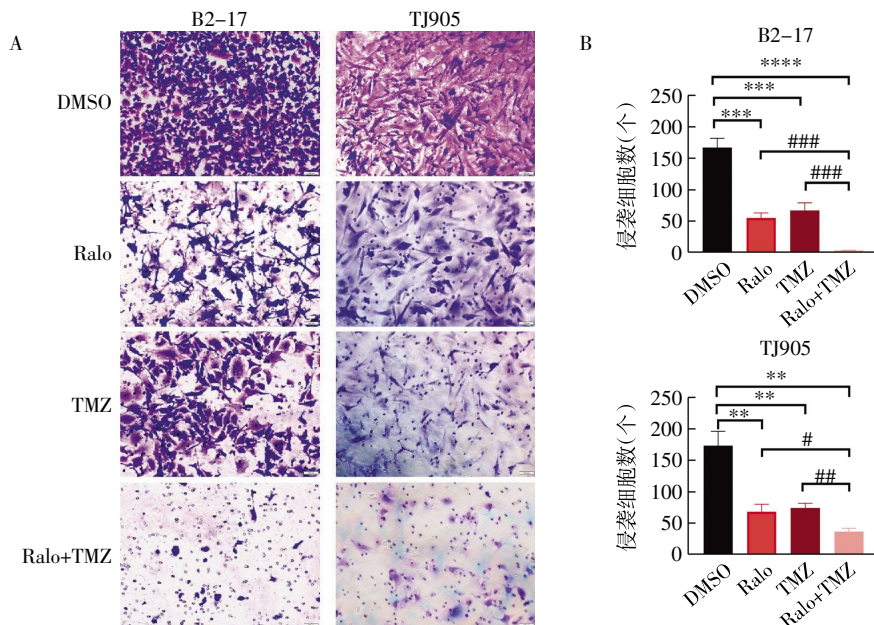
2.5 划痕实验显示胶质瘤细胞迁移情况 实验结果显示,药物处理 48 h 后,在 B2-17 和 TJ905 细胞



注:A:B2-17 细胞系给药后细胞凋亡率检测;B:TJ905 细胞系给药后细胞凋亡率检测;C:B2-17、TJ905 细胞系凋亡率统计学分析;DMSO 组:对照组;与对照组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与联合用药组相比,## $P<0.01$;DMSO:二甲基亚砷;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 3 Ralo、TMZ 和 Ralo 联合 TMZ 对 B2-17 和 TJ905 细胞凋亡的影响

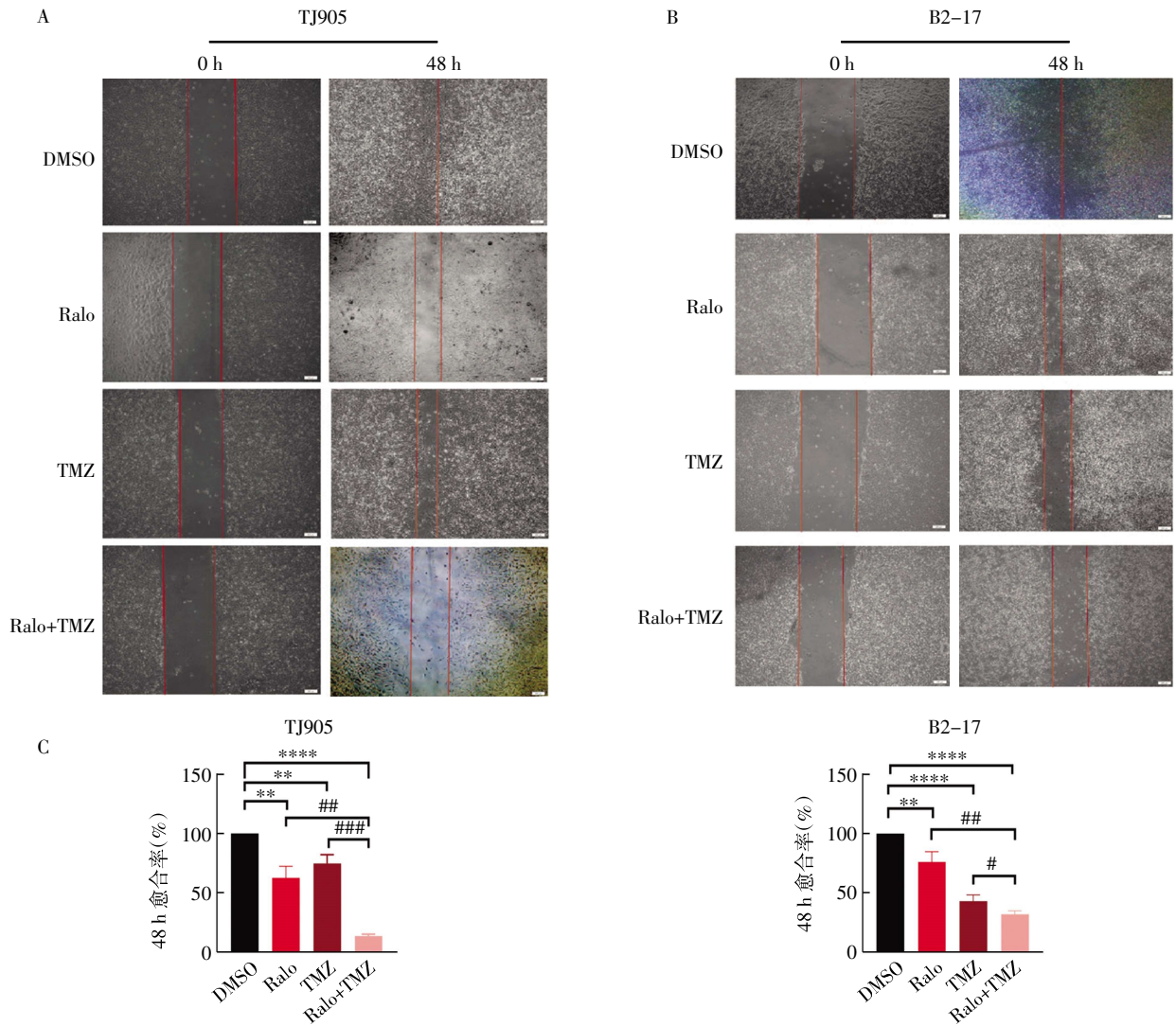
Fig.3 Effects of Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ on apoptosis of B2-17 and TJ-905 cells



注:A:使用 Transwell 实验检测 TJ905 和 B2-17 细胞系的侵袭能力;B:TJ905 和 B2-17 细胞系侵袭能力统计学分析;DMSO 组:对照组;与对照组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与联合用药组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;DMSO:二甲基亚砷;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 4 Ralo、TMZ 和 Ralo 联合 TMZ 对 B2-17 和 TJ905 细胞系侵袭能力的影响

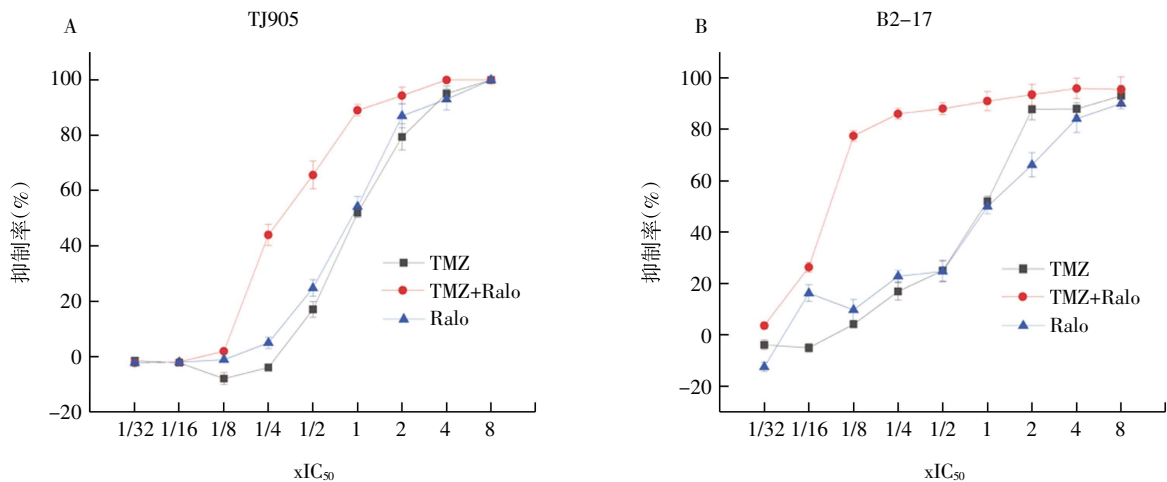
Fig.4 Effects of Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ on the invasive ability of B2-17 and TJ905 cells



注:A:使用细胞划痕检测 TJ905 细胞系的迁移能力;B:使用细胞划痕检测 B2-17 细胞系的迁移能力;C:TJ905 和 B2-17 细胞系迁移能力统计学分析;DMSO 组:对照组;与对照组相比,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$;与联合用药组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;DMSO:二甲基亚砜;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 5 Ralo、TMZ 和 Ralo 联合 TMZ 对 B2-17 和 TJ905 细胞系迁移能力的影响

Fig.5 Effects of Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ on the migratory capacity of B2-17 and TJ-905 cell lines



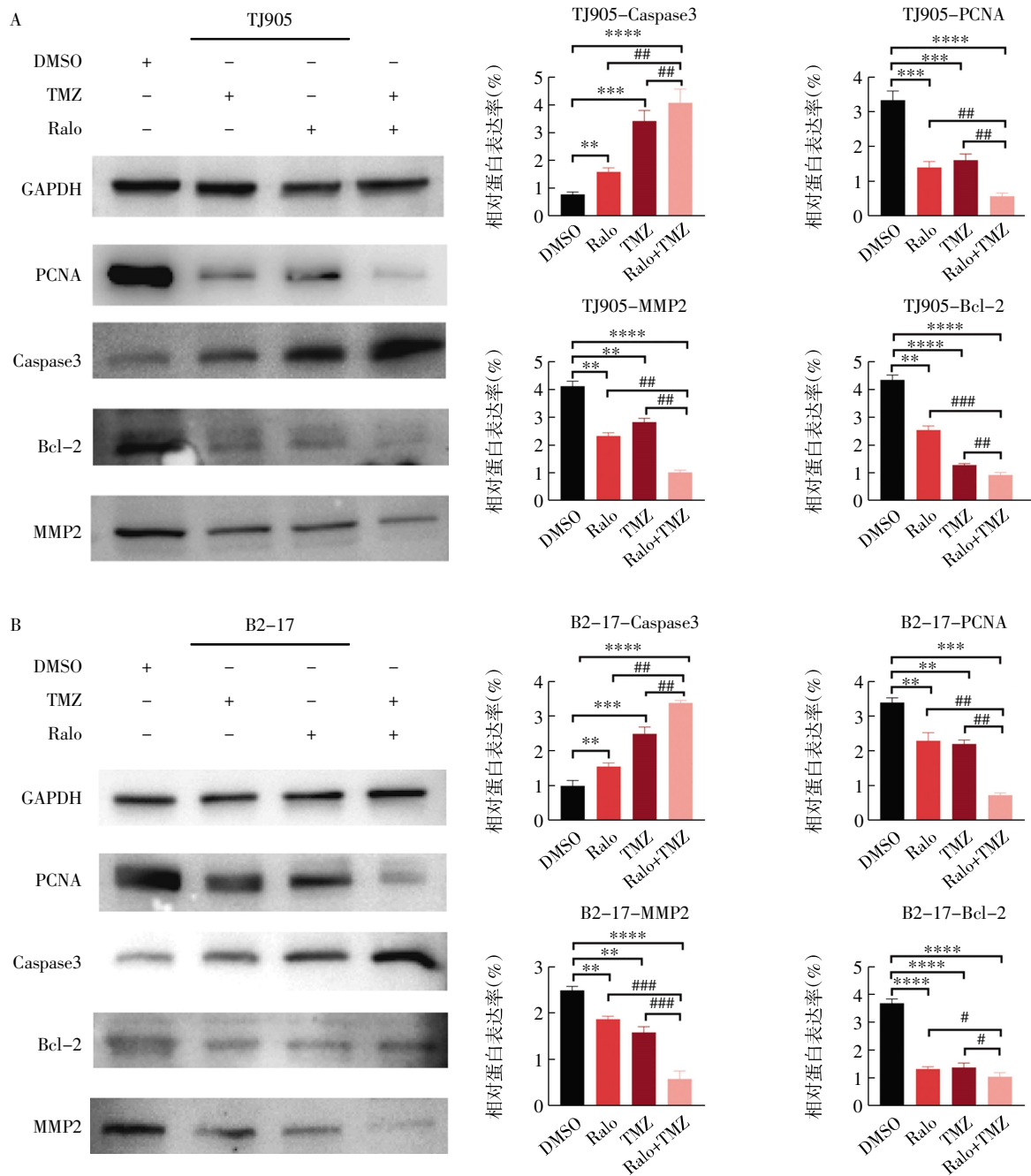
注:A:CCK-8 实验测定 TJ905 细胞系中 CI 值;B:CCK-8 实验测定 B2-17 细胞系中 CI 值;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 6 Ralo、TMZ 和 Ralo 联合 TMZ 对 TJ905 和 B2-17 细胞系 TMZ 和 Ralo IC50 值的影响

Fig.6 Effect of Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ on TMZ and Ralo IC50 values of TJ905 and B2-17 cell lines

2.7 Ralo 对胶质瘤细胞的 MMP2、PCNA、Bcl-2 以及 Caspase3 表达的影响 WB 结果显示,在 B2-17 和 TJ905 细胞中,Ralo 组 MMP2、PCNA 的表达降低($t=10.26、14.69,t=7.107、10.77$,均 $P<0.01$)。Ralo 通过下调 Bcl-2 的表达($t=13.78、23.53$,均 $P<0.01$)和上调 Caspase3($t=5.147、8.595$,均 $P<0.01$)表达以诱导细胞凋亡(图 7A、B)。在 TMZ 组中 PCNA 的表达也出现明显下调($t=9.541、11.83$,均 $P<0.01$)、MMP2

表达下调($t=9.973、10.48$,均 $P<0.01$)、Bcl-2 表达下调($t=18.16、29.43$,均 $P<0.01$),Caspase3 表达上升($t=10.50、11.85$,均 $P<0.001$,图 7A、B),此外,相较于 Ralo 组和 TMZ 组,Ralo+TMZ 组,MMP2、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量均进一步降低($F=85.38、213.5$,均 $P<0.001$; $F=98.55、30.08$,均 $P<0.01$; $F=5.391、206.9$,均 $P<0.05$),同时 Caspase3 表达量进一步升高($F=144.3、36.92$,均 $P<0.001$,图 7A、B)。



注:A: 使用 WB 实验检测 TJ905 细胞系中的 PCNA、Caspase3、Bcl-2、MMP2 蛋白表达情况;B: 使用 WB 实验检测 B2-17 细胞系中的 PCNA、Caspase3、Bcl-2、MMP2 蛋白表达情况;DMSO 组:对照组;与对照组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与联合用药组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;DMSO:二甲基亚砜;Ralo:雷洛昔芬;TMZ:替莫唑胺

图 7 Ralo、TMZ 以及 Ralo 联合 TMZ 处理的 TJ905 和 B2-17 细胞系中的 MMP2、PCNA、Caspase3 和 Bcl-2 的表达

Fig.7 MMP2, PCNA, Caspase3 and Bcl-2 expression in TJ905 and B2-17 cell lines treated with Ralo, TMZ and Ralo combined with TMZ

3 讨论

胶质瘤作为成人最常见以及最具侵袭性的原发性脑肿瘤,其高级别胶质瘤的恶性程度较高。目前针对胶质瘤的临床治疗方法主要是手术切除病灶联合术后放疗以及以 TMZ 为主的化疗,但由于胶质瘤增殖迅速并且对放化疗高度耐受,导致胶质瘤患者临床预后极差,中位生存期约 1 年。因此,积极寻找新的分子治疗靶点,改善胶质瘤患者的预后势在必行。针对胶质瘤的药物有学者提出雌激素受体可以作为胶质瘤的治疗靶点^[12]。他莫昔芬作为第一代 SERM,已有研究证明其可以针对 CXCL12-CXCR4-CXCR7 轴从而抑制胶质瘤^[13]。这说明 SERM 在胶质瘤治疗中可能具有一定的潜力。Ralo 作为第二代 SERM,其可根据靶器官和个体情况,发挥雌激素激动或者拮抗作用,因此常被用于治疗乳腺癌和绝经后骨质疏松症^[14]。同时 Ralo 近年来也被用于神经系统疾病和精神疾病的治疗^[15]。除乳腺癌外,Ralo 对于其他癌症的也具有一定的抑制作用^[16-18]。以上研究提示 Ralo 在胶质瘤的治疗中或许有一定前景,但其对胶质瘤细胞的具体行为学影响尚不明确。因此,本研究使用 CCK-8 实验、Transwell 实验、流式细胞术、细胞划痕实验、WB 实验针对 Ralo 对胶质瘤的生物行为影响进行了检测。

本研究表明,Ralo 能够抑制胶质瘤细胞增殖、侵袭、迁移,并诱导肿瘤细胞凋亡。而 Ralo 和 TMZ 的联合应用可以取得更强的抑瘤效果,Ralo 和 TMZ 均可通过下调 PCNA、MMP2 表达从而抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭,并通过调控 Bcl-2 和 Caspase3 的表达来诱导肿瘤细胞凋亡。Ralo 和 TMZ 对于抑制胶质瘤恶性进展具有协同作用,联合用药可减少 TMZ 的用药剂量,减少其不良反应,降低肿瘤细胞对 TMZ 的耐药性,增加肿瘤细胞对 TMZ 的药物敏感性。这表明 Ralo 可以作为 TMZ 治疗胶质瘤的辅助用药。

细胞侵袭和细胞迁移是肿瘤转移的核心步骤,涉及肿瘤细胞突破基底膜并侵入周围组织或脉管系统。在这一过程中,MMP-2 因其对细胞外基质(ECM)的降解能力,成为驱动侵袭性表型的关键分子。MMP-2 通过靶向降解 IV 型胶原和明胶,破坏 ECM 的物理屏障,为肿瘤细胞迁移开辟路径。此外,MMP-2 还能切割非基质蛋白(如生长因子结合蛋白、细胞黏附分子),释放潜伏的促侵袭信号。临床研究表明,MMP-2 高表达与多种癌症(如乳腺癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤)的侵袭深度、淋巴结转移及不良预后显著相关。在本次研究中通过 Transwell 实

验和细胞划痕实验证实了 Ralo 可以有效抑制胶质瘤细胞的侵袭和迁移能力,并通过 WB 实验证实了 Ralo 对 MMP-2 的抑制作用,以及 Ralo 和 TMZ 联用的协同作用。

细胞凋亡是程序性死亡的核心形式,由 Bcl-2 家族和 Caspase 蛋白酶精密调控。Bcl-2 家族分为抗凋亡(如 Bcl-2、Bcl-xL)和促凋亡成员(如 Bax、Bak),通过控制线粒体外膜通透性(MOMP)决定细胞命运:抗凋亡蛋白抑制 MOMP,维持线粒体完整性;促凋亡蛋白在应激信号下激活,释放细胞色素 C,触发 Caspase9 介导的凋亡小体形成,最终激活执行者 Caspase3。Caspase3 通过切割核纤层蛋白、细胞骨架组分和 DNA 酶,导致细胞结构解体与 DNA 断裂,完成凋亡程序。如何诱导肿瘤细胞凋亡始终是肿瘤药物治疗中的重点问题。在本次研究中通过流式细胞术检测了在 Ralo 处理后细胞的凋亡率变化,结果显示 Ralo 可以有效诱导细胞凋亡,然后通过 WB 实验检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Caspase3 的变化,实验结果证实了 Ralo 可以通过影响 Bcl-2 和 Caspase3 蛋白,促进细胞凋亡。

PCNA 是 DNA 复制与修复的核心调控蛋白,其环状三聚体结构作为“分子滑动夹”包裹 DNA,为 DNA 聚合酶提供平台,确保复制高效性。在细胞周期中,PCNA 于 S 期表达达峰,是评估细胞增殖活性的关键标志物,在本次研究中,利用 CCK-8 实验证实了 Ralo 对胶质瘤增殖的抑制作用,WB 结果显示了 Ralo 对 PCNA 的抑制作用。

TMZ 是目前临床上唯一能显著延长胶质瘤患者总生存期的化疗药物,胶质瘤细胞可能因为具有固有的耐药基因,或者通过表观遗传获得对 TMZ 的耐药性。因此 TMZ 在给药过程中常因耐药,出现药物失效或疗效降低,因此需要探索具有协同作用的药物组合来逆转单一 TMZ 治疗的耐药。通过 CI 值测定证实了 Ralo 和 TMZ 在胶质瘤治疗方面的协同作用。

综上所述,Ralo 可以通过影响胶质瘤的生物行为来抑制胶质瘤进展,Ralo 与 TMZ 的联合使用抑制肿瘤效果优于单药。Ralo 在胶质瘤治疗中的作用仍需要进行更多的临床试验和研究来验证其疗效和安全性。未来的研究可以进一步探索 Ralo 在胶质瘤治疗中的最佳用药剂量、用药时机以及与其他药物的联用策略。同时,还需要深入研究 Ralo 的作用机制,以更好地理解其在胶质瘤治疗中的作用。

参考文献:

- [1] TSENG S H, WANG C H, LIN S M, et al. Activation of c-Jun N-

- terminal kinase 1 and caspase 3 in the tamoxifen-induced apoptosis of rat glioma cells[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(5):285-293.
- [2] HARMALKAR M, UPRAITY S, KAZI S, et al. Tamoxifen-induced cell death of malignant glioma cells is brought about by oxidative-stress-mediated alterations in the expression of BCL2 family members and is enhanced on miR-21 inhibition[J]. *Mol Neurosci*, 2015, 57(2):197-202.
- [3] JIANG F, CHO K K, MIKKELSE T, et al. Tamoxifen increases photodynamic therapeutic response of U87 and U25 in human glioma cells[J]. *Neurooncol*, 2002, 5(1):51-58.
- [4] HE W, LIU R, YANG S H, et al. Chemotherapeutic effect of tamoxifen on temozolomide-resistant gliomas[J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(3):293-300.
- [5] PATEL S, DIBIASE S, MEISENBERG B, et al. Phase I clinical trial assessing temozolomide and tamoxifen with concomitant radiotherapy for treatment of high-grade glioma[J]. *Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 82(2):739-742.
- [6] BRANDES AA, ERMANI M, TURAZZI S, et al. Procarbazine and high-dose tamoxifen as a second-line regimen in recurrent high-grade gliomas: a phase II study[J]. *Clin Oncol*, 1999, 17(2):645-650.
- [7] ABU F R, BRZEZINSKI A, DANENBERG H D. Raloxifene: cardiovascular considerations[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2007, 7(8):871-876.
- [8] GRESE T A, SLUKA J P, BRYANT H U, et al. Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(25):14105-14110.
- [9] VEENMAN L. Raloxifene as treatment for various types of brain injuries and neurodegenerative diseases: a good start[J]. *Mol Sci*, 2020, 21(20):75-86.
- [10] ATTWOOD K M, ROBICHAUD A, WESTHAVER L P, et al. Raloxifene prevents stress granule dissolution, impairs translational control and promotes cell death during hypoxia in glioblastoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):989
- [11] CHOU T C, TALALAY P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22:27-55.
- [12] GONZÁLEZ-MORA A M, GARCIA-LOPEZ P. Estrogen receptors as molecular targets of endocrine therapy for glioblastoma[J]. *Mol Sci*, 2021, 22(22):12404.
- [13] GONÇALVES T L, DE ARAÚJO L P, Pereira Ferrer V. Tamoxifen as a modulator of CXCL12-CXCR4-CXCR7 chemokine axis: a breast cancer and glioblastoma view[J]. *Cytokine*, 2023, 170:156344.
- [14] SAJI S, KUROI K. Application of selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment according to their intrinsic nature[J]. *Breast Cancer*, 2008, 15(4):262-269.
- [15] LI Z, WANG Y, WANG Z, et al. Estradiol and raloxifene as adjunctive treatment for women with schizophrenia: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials[J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2023, 147(4):360-372.
- [16] POZIOS I, SEEL NN, HERING NA, et al. Raloxifene inhibits pancreatic adenocarcinoma growth by interfering with ERβ and IL-6/gp130/STAT3 signaling[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2021;44(1):167-177.
- [17] MA Y, ZHENG Y, JI Y, et al. Raloxifene, identified as a novel LSD1 inhibitor, suppresses the migration of renal cell carcinoma[J]. *Future Med Chem*, 2021, 13(6):533-542.
- [18] PALMER H, NIMICK M, MAZUMDER A, et al. Raloxifene suppresses tumor growth and metastasis in an orthotopic model of castration-resistant prostate cancer[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(4):853.

(2024-12-13 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》关于“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算说明

在医学论文中，“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用，但“ppm、ppb、ppt”既不是数学符号，更不是单位符号，只是表示数量份额的英文名词缩写（英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion）。在实际研究中，仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果，作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言，换算前需了解体积比还是质量比。1 μg/mL 是质量-体积比，如果溶液的密度是 1 g/mL，则 1 μg/mL 相当于 1 ppm；如果溶液密度不是 1 g/mL，则需要换算。

对大气中的污染物而言，常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示（如 cm³/m³、mL/m³），换算关系是：1 ppm=1 cm³/m³=10⁻⁶，1 ppb=10⁻⁹，1 ppt=10⁻¹²；质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示（如 mg/m³、g/m³），换算关系是：C=22.4 X/M，式中：X 为污染物以 mg/m³ 表示的浓度值，C 为污染物以 ppm 表示的浓度值，M 为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为：1 ppm=1 mg/kg=1 000 μg/kg，1 ppb=1 μg/kg=10⁻³ mg/kg，1 ppt=1 ng/kg=10⁻⁶ mg/kg。

本刊编辑部