

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.001>

· 论著 ·

替莫唑胺对人脑胶质瘤 U87 细胞增殖和血管生成的抑制作用

曾令华, 黄锐, 刘少政, 秦国文

(广西壮族自治区人民医院神经外科, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)对人胶质瘤U87细胞体内外生长及血管生成的影响。方法: 利用流式细胞分析法测定TMZ诱导的U87细胞周期进程; 利用EdU法检测TMZ对U87细胞增殖活性的影响; 利用CCK-8法测定TMZ对U87细胞存活性的作用; 利用裸鼠成瘤实验检测TMZ在体内对U87异体移植瘤生长的作用; 免疫组织化学法检测肿瘤中Ki-67, BDNF及CD31表达, 利用鸡胚绒毛尿囊膜(chicken chorioallantoic membrane, CAM)模型检测TMZ对体内血管生成的影响; ELISA实验检测TMZ对U87细胞中血管生成相关蛋白VEGF, TGF- β 和FGF的分泌水平的影响。结果: TMZ增加了U87细胞中G₀/G₁, G₂期细胞的比例, 降低了S期细胞的比例, 抑制了U87细胞在体外的存活和增殖。TMZ治疗抑制了裸鼠移植瘤的增长及肿瘤中血管内皮标志物的表达, 降低了U87细胞中血管生成相关蛋白的水平。结论: TMZ在体内外抑制了胶质瘤U87细胞增殖和血管的生成, 这种抑制作用可能与降低Ki-67, BDNF, VEGF, TGF- β 和FGF蛋白表达相关。

[关键词] 替莫唑胺; 胶质瘤; 血管生成

Inhibitory effect of temozolomide on proliferation and angiogenesis in human glioma U87 cells

ZENG Linghua, HUANG Rui, LIU Shaozheng, QIN Guowen

(Department of Neurological Surgery, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of Temozolomide (TMZ) on the growth and angiogenesis of human glioma U87 cells in vitro and in vivo. **Methods:** Flow cytometry was used to determine the cell cycle progression of U87 cells induced by TMZ, EdU method was used to detect the effect of TMZ on the proliferation activity of U87 cells, CCK-8 method was used to determine the effect of TMZ on the survival of U87 cells, nude mice tumorigenesis experiment was used to detect the effect of TMZ on the growth of U87 xenografts in vivo, and immunohistochemical method was used to detect the expressions of Ki-67, BDNF and CD31 in tumors. Angiogenesis was detected by chicken chorioallantoic membrane (CAM) model. The effect of TMZ on the secretion of angiogenesis-related proteins VEGF, TGF- β and FGF in U87 cells were detected by ELISA. **Results:** TMZ increased the proportion of G₀/G₁ and G₂ phase cells in U87 cells, decreased the proportion of S phase cells and inhibited the survival and proliferation of U87 cells in vitro. TMZ therapy inhibited the growth

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-26

通信作者 (Corresponding author): 曾令华, Email: 26855300@qq.com

of transplanted tumors and the expression of vascular endothelial markers in nude mice, and rEdUced the level of angiogenesis-related proteins in U87 cells. **Conclusion:** TMZ inhibits the angiogenesis of glioma U87 cells in vitro and in vivo. This inhibitory effect may be associated with decreased the protein expressions of Ki-67, BDNF, VEGF, TGF- β and FGF.

Keywords temozolomide; glioma; angiogenesis

胶质瘤是中枢神经系统常见的原发肿瘤,也是颅内发病率和致死率最高的恶性肿瘤,约占颅内肿瘤的40%^[1]。胶质瘤由于发病位置特殊,且呈快速浸润性生长,目前治疗效果并不理想^[2]。胶质瘤发病和进展机制并不完全清楚,但肿瘤血管生成能促进胶质瘤进展^[3-4]。替莫唑胺(temozolomide, TMZ)被广泛应用于黑色素瘤、脑垂体瘤和颅内转移瘤的治疗^[5-7]。但TMZ对胶质瘤血管生成中的作用尚不明确。因此,本研究通过体内外实验观察TMZ对人胶质瘤U87细胞增殖和血管形成能力的影响,探讨TMZ抑制胶质瘤血管新生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

将人胶质瘤U87细胞系(American Type Culture Collection, 美国)在添加了2 mmol/L 谷氨酰胺, 10%胎牛血清(Gibco, 美国)、100 U/mL青霉素(HyClone, 美国)的DMEM培养基(Thermo Fisher Scientific, 美国), 37 °C和5%CO₂的细胞培养箱中培养。

1.2 PI 染色及 FCM 检测细胞周期

收集指数生长期U87细胞,消化制成单细胞悬液,取 5×10^5 个细胞接种于6孔板中,24 h后加入TMZ(规格:50 mg/粒,批号20170324,江苏天士力帝益药业有限公司)溶液至终浓度为120 $\mu\text{mol/mL}$ ^[8], 2×10^5 个细胞接种于对照孔,培养48 h后,消化收集细胞,PBS离心洗涤1次,冰预冷的70%乙醇固定1 h,离心,弃乙醇,用PBS离心洗涤1次,弃上清,加入反应缓冲液制成单细胞悬液,再加入PI,避光反应30 min后,用流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)进行检测和分析。

1.3 CCK-8 检测细胞生存率

U87细胞按照2 000个/孔的密度接种于96孔培养板中,给予120 $\mu\text{mol/mL}$ TMZ,以未用

TMZ处理的作为对照组。处理结束后,每孔加入10 μL CCK-8染色液(Sigma-Aldrich, 美国),在37 °C细胞培养箱中孵育3 h后,将细胞培养板置于酶标仪(Bio-Rad, 美国)上,在450 nm处测定各孔吸光度值。

1.4 EdU 检测细胞增殖活性

按EdU试剂盒(Sigma-Aldrich, 美国)说明书中的方法进行。取指数生长期U87细胞,以每孔 1×10^5 个细胞接种于96孔板中,培养至正常生长阶段,用120 $\mu\text{mol/mL}$ TMZ处理24 h。用全培养基按1 000:1的比例稀释EdU溶液,制备成50 $\mu\text{mol/L}$ 的EdU反应液。每孔加入100 μL 孵育2 h,弃培养基,每孔加入4%多聚甲醛-PBS 50 μL ,室温固定30 min。每孔加入1 \times Apollo染色反应液100 μL ,避光室温脱色30 min后,弃染色反应液,用DAPI进行DNA染色,于倒置荧光显微镜(Olympus, 日本)下观察并采图。染色结果使用ImagePro Plus 6软件(Media Cybernetics, 美国)定量统计分析。

1.5 ELISA 试验

为测定U87分泌的VEGF, TGF- β 和FGF的水平,将 8×10^5 个细胞接种到6孔培养板中,用新鲜含TMZ的培养基和不含TMZ的培养基分别培养48 h,收集细胞上清液,分别用特异性的VEGF, TGF- β 和FGF的ELISA试剂盒(均来自Westang Bio-Tech, 上海)按照说明书步骤进行鉴定对应的VEGF, TGF- β 和FGF水平。

1.6 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成形态学检测

按文献[9]方法制备鸡胚绒毛尿囊膜(chicken chorioallantoic membrane, CAM)模型,将受精鸡蛋置于(37 \pm 0.5) °C水浴恒温箱中孵化,在孵化7 d的鸡胚气室端开1个直径1 cm的小窗,暴露尿囊膜,将发育完好的鸡蛋分成2组,每组10只。将预先制备好的含TMZ的甲基纤维素膜放在绒毛尿囊膜血管较少的部位,用灭菌透明胶带封窗后继续孵化,48 h后去除胶带,用10%甲醛固定,待血管内血液凝固后,以甲基纤维素膜为中

心剪下CAM(0.5 cm×0.5 cm), 贴于载玻片上, 观察计数, 以甲基纤维素膜为中心统计大、中、小血管数。

1.7 实验动物及分组

BALB/C裸鼠购自广西医科大学实验动物中心(SCXK桂2014-0001), 饲养于广西医科大学实验动物中心动物房(SYXK桂2014-0003)。动物实验由广西医科大学动物管理与使用委员会批准(批准号20180216A)。在6~7周龄的雄性BALB/C裸鼠体内建立胶质瘤异种移植瘤。将胶质瘤细胞U87调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 细胞悬液与Matrigel(BD, 美国)以1:1比例混匀, 接种于裸鼠右肩胛皮下, 每只接种0.1 mL。当肿瘤生长到100~200 mm³时, 裸鼠随机分为对照组与TMZ组, 每组各10只。对照组: 皮下注射生理盐水0.1 mL/只。TMZ组: 腹腔注射TMZ 50 mg/(kg·d)。连续治疗5 d。给药期间观察裸鼠的一般情况及移植瘤生长情况, 每5 d测量1次肿瘤体积, 计算公式为: 体积=长度×宽度²/2, 连续观察40 d, 实验结束时, 用颈椎脱位处死小鼠, 取异种移植瘤组织称重, 甲醛固定, 石蜡包埋, 准备HE染色和免疫组织化学染色。

1.8 HE 染色和免疫组织化学染色

将组织切成2 mm厚, 并在4%多聚甲醛中浸泡过夜。每个切片在石蜡中处理包埋并切成5 μm厚的切片。将石蜡切片干燥45 min, 然后在二甲苯中脱蜡2次, 每次15 min, 梯度乙醇中脱水, 并在流动的自来水中漂洗2 min。此后, 将载玻片用苏木精染色5 min, 在自来水中洗涤, 在1%酸性醇中分化, 在1%氨水中变蓝, 再用伊红复染1 min。然后将载玻片在流动的自来水中冲洗, 通过在浓度逐渐下降的乙醇中脱水, 在二甲苯中处理后, 用中性胶固定。用光学显微镜(Olympus, 日本)观察载玻片并拍照。

将切片在二甲苯中脱蜡, 使用梯度乙醇脱水, 然后在0.01 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中用高压釜煮沸20 min。用0.3%的过氧化氢阻断内源性过氧化物活性, 并用正常山羊血清孵育切片, 以减少非特异性结合。组织切片分别用抗Ki-67抗体(1:500; Santa Cruz)、抗BDNF抗体(1:500; Santa Cruz)、抗CD31抗体(1:500; Santa Cruz)在4 ℃下孵育过夜。免疫组织化学EnVision二步染色法参照试剂盒说明书进行。以PBS代替一抗作为阴性对照。组织抗原修复均采用高温高压修复处理, 最

终在光学显微镜(Olympus, 日本)下成像。

1.9 统计学处理

数据在满足正态分布和方差齐的条件下, 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并利用Graphpad Prism软件进行后续统计学分析。两组数据比较采用t检验。当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMZ 在体外抑制 U87 细胞的增殖

流式细胞术检测结果显示: TMZ作用于U87细胞后, 出现明显的凋亡峰, 与对照组细胞比较, 其凋亡率显著增加(图1A)。同时, 经TMZ处理后的U87细胞相对于对照组细胞, G₀/G₁期($P < 0.01$)和G₂期($P < 0.01$)细胞比例增加, S期细胞比例明显降低($P < 0.001$; 图1A, 1B)。EdU染色结果显示: TMZ降低了DNA合成时EdU的掺入, 导致TMZ处理的U87细胞的红色荧光强度显著小于对照细胞($P < 0.01$; 图1C, 1D)。此外, CCK-8实验结果表明: 经TMZ处理后U87细胞生长率明显降低($P < 0.001$; 图1E)。

2.2 TMZ 对鸡胚绒毛尿囊膜血管形态的影响

TMZ作用48 h后, 无死胚出现。TMZ组周围CAM血管数量明显减少, 血管的分布未见杂乱、包绕等, 且血管普遍变细, 血管形态异常, 尤为显著的是细小血管数显著减少($P < 0.01$, 图2)。

2.3 TMZ 在体内抑制 U87 细胞的增殖

裸鼠成瘤实验结果显示: 经TMZ治疗后的肿瘤体积较小(图3A), 重量明显减轻($P < 0.01$, 图3B)。肿瘤HE染色结果(图3C)表明: 两组细胞均能在裸鼠体内产生人胶质瘤异种移植瘤。免疫组织化学染色结果表明: TMZ治疗组BDNF和Ki-67(反映细胞增殖状态的蛋白质)的表达显著降低($P < 0.01$, 图3C~3E)。

2.4 TMZ 在体内外抑制胶质瘤的血管生成

采用免疫组织化学检测肿瘤组织中的CD31, 结果显示: 经TMZ治疗的裸鼠移植瘤中CD31阳性微血管数量较少($P < 0.01$, 图4A, 4B)。采用ELISA实验检测细胞中的VEGF, TGFβ和FGF, 结果显示: 与对照组相比, 经TMZ处理的U87细胞的VEGF, TGFβ和FGF的分泌量显著下调(均 $P < 0.01$; 图4C~4E)。

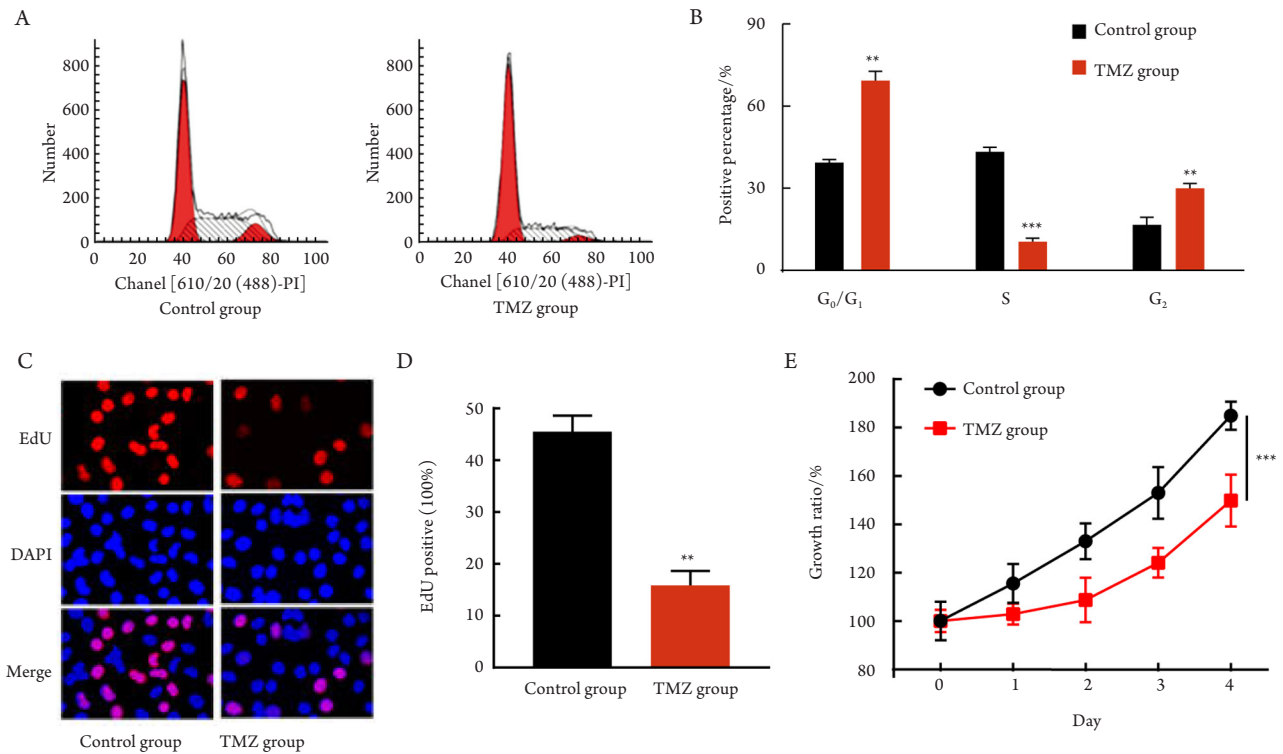


图1 TMZ在体外抑制U87细胞的增殖

Figure 1 TMZ inhibits U87 cell proliferation in vitro

(A, B) 流式细胞术分析TMZ对U87细胞凋亡和细胞周期的影响; (C, D) EdU染色检测TMZ对U87细胞增殖活性的影响; (E) CCK-8实验检测TMZ对U87生存率的影响。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(A, B) Flow cytometry was used to analyze the effect of TMZ on U87 cell apoptosis and cell cycle; (C, D) EdU staining was used to detect the effect of TMZ on U87 cell proliferation activity; (E) CCK-8 test was used to detect the effect of TMZ on U87 survival rate. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

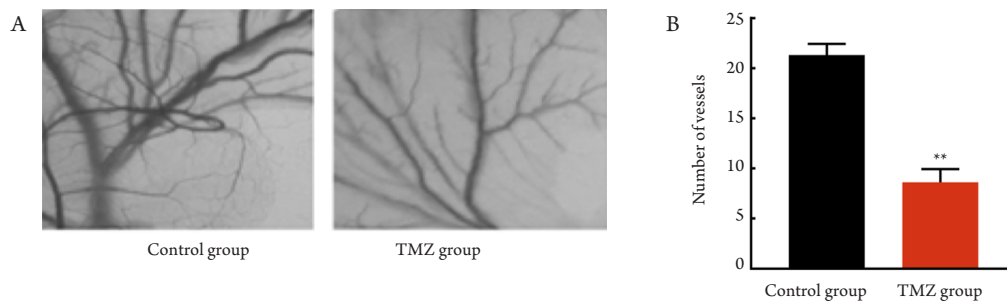


图2 TMZ对CAM新生血管生成的影响($\times 200$)

Figure 2 Effects of TMZ on angiogenesis of CAM ($\times 200$)

(A) 两组代表性的鸡胚绒毛尿囊膜血管生成形态; (B) 新生血管数的统计数据。与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

(A) Representative images of angiogenesis on chicken embryo chorioallantoic membrane in the 2 groups; (B) Statistics data of new vessels in the two groups. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

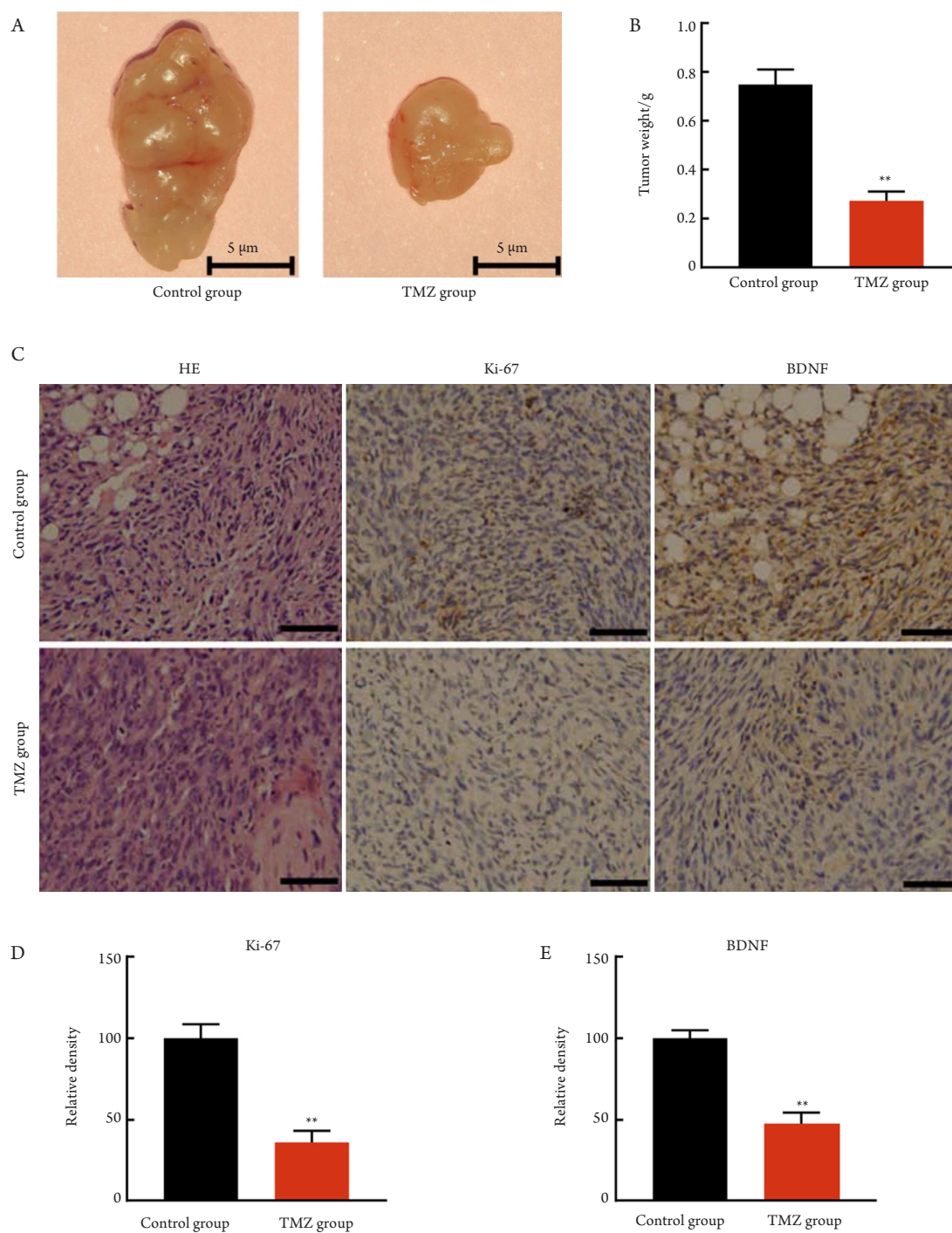


图3 TMZ在体内抑制U87细胞的增殖

Figure 3 TMZ inhibits the growth of U87 cells in vivo

(A) 移植瘤代表图; (B) 移植瘤的重量; (C) HE染色显示两组细胞均能形成相当于人脑胶质瘤的异种移植瘤。免疫组织化学检测移植瘤BDNF和Ki-67的表达($\times 200$); (D) 两组移植瘤中Ki-67相对表达量; (E) 两组移植瘤中BDNF相对表达量。与对照组相比, $**P < 0.01$ 。

(A) The representative figure of transplanted tumors (scale bar: 5 mm); (B) The tumor weight was measured for each xenograft; (C) HE staining showed that both groups of cells could form xenografted tumors. The expression of BDNF and Ki-67 in transplanted tumors was detected by immunohistochemistry ($\times 200$); (D) The relative expression of Ki-67 in the 2 groups of transplanted tumors; (E) The relative expression of BDNF in the two groups of transplanted tumors. Compared with control group, $**P < 0.01$.

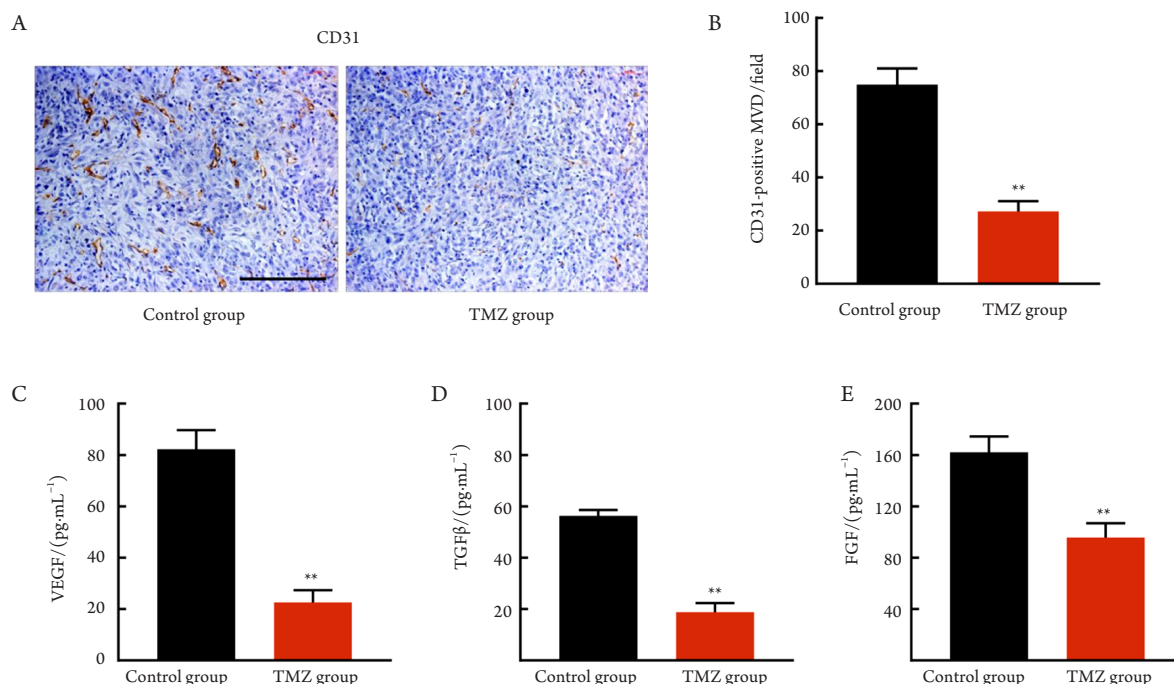


图4 TMZ在体内外抑制胶质瘤的血管生成

Figure 4 TMZ inhibits angiogenesis of glioma in vitro and in vivo

(A)移植瘤组织中CD31的典型免疫组织化学染色图像(比例尺, 100 μm); (B)移植瘤中CD31表达定量分析; (C-E)ELISA测定TMZ处理的U87细胞血管生成相关蛋白的分泌水平。与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

(A) Typical immunohistochemical staining images of CD31 in transplanted tumors (scale bar: 100 μm); (B) Quantitative analysis of CD31 expression in transplanted tumors; (C-E) ELISA determination of angiogenesis-related protein secretion in U87 cells treated with TMZ. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

3 讨论

神经胶质瘤是目前常见的神经外科肿瘤之一, 该病主要特征是肿瘤细胞弥漫性浸润生长, 无明确边界, 无限增殖, 具有高度侵袭性, 因而增加了治疗的难度^[1-2]。目前, TMZ仍是治疗GBM的标准化疗药物。TMZ是一种口服抗肿瘤烷化剂, 能够通过血脑屏障直达病灶, 具有突出的抗肿瘤作用。研究^[10-11]表明: TMZ在生理pH值条件下转变为活性化合物5-(3-甲基三氮烯-1-基)咪唑-4-甲酰胺(MTIC), 它能够使细胞内DNA鸟嘌呤第6位氧原子甲基化, 进而抑制肿瘤细胞生长、增殖, 诱导癌细胞凋亡。且已有研究^[8,12]发现TMZ能够体外抑制脑胶质瘤细胞生长和增殖。本研究结果与以前研究结果相似, 发现TMZ使胶质瘤U87细胞中S期比例下降, G_0/G_1 期比例上升, 抑制细胞增殖, 且在体内能抑制异种移植瘤的生长。

胶质瘤的生长和转移与血管生成密切相关^[3-4,13]。胶质瘤细胞在有限的养分和空间的环境下高速增

殖, 造成了缺氧和缺营养的肿瘤微环境, 而肿瘤血管生成为高速增殖的胶质瘤细胞提供了赖以生存和生长的氧气和营养物质^[3], 且肿瘤新生微血管是胶质瘤细胞浸润和转移提供通道^[4]。此外, 肿瘤血管生成是胶质瘤预后不良的独立危险因素^[13]。因此, 研究血管新生对治疗胶质瘤具有重大意义。而关于TMZ对胶质瘤发展过程中肿瘤血管新生的研究尚少。本研究的体外实验发现TMZ可使CAM血管生成减少, 并进一步在异种移植瘤组织中发现TMZ能抑制CD31的表达。而CD31是反映肿瘤组织中新生血管的标志物^[3-4]。

肿瘤的血管生成依赖于肿瘤细胞临近的内皮细胞活化, 而内皮细胞活化增殖则与促进内皮细胞增殖的促进因子相关^[14]。肿瘤微环境会促使肿瘤细胞分泌众多促进内皮细胞增殖和血管新生的生长因子, 如VEGF^[3-4], TGF- β ^[4], FGF^[15]等。本实验进一步观察TMZ对胶质瘤U87细胞VEGF, TGF β 和FGF分泌的影响, 发现TMZ抑制U87细胞VEGF, TGF- β , FGF的分泌。

综上, 本研究发现TMZ能抑制胶质瘤U87细胞

增殖和肿瘤血管生成, 进一步扩展了TMZ的药物作用范围。

参考文献

1. Sundararajan V, Bohensky MA, Moore G, et al. Mapping the patterns of care, the receipt of palliative care and the site of death for patients with malignant glioma[J]. *J Neurooncol*, 2014, 116(1): 119-126.
2. Claus EB, Walsh KM, Wiencke JK, et al. Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information[J]. *Neurosurg Focus*, 2015, 38(1): E6.
3. Navone SE, Guarnaccia L, Cordiglieri C, et al. Aspirin affects tumor angiogenesis and sensitizes human glioblastoma endothelial cells to temozolomide, bevacizumab, and sunitinib, impairing vascular endothelial growth factor-related signaling[J]. *World Neurosurg*, 2018, 120: e380-e391.
4. Dai D, Huang W, Lu Q, et al. miR 24 regulates angiogenesis in gliomas[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 358-368.
5. 崔传亮, 盛锡楠, 连斌, 等. 阿帕替尼联合替莫唑胺治疗常规治疗失败的晚期黑色素瘤的疗效分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(6): 548-552.
CUI Chuanliang, SHENG Xinan, LIAN Bin, et al. Efficacy of apatinib combined with temozolomide in the treatment of advanced melanoma patients after conventional treatment failure[J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2017, 22(6): 548-552.
6. 王嘉嘉, 梁军潮, 伍犹梁, 等. 伽玛刀联合替莫唑胺治疗脑转移瘤的假性进展1例[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015, 20(6): 279-280.
WANG Jiajia, LIANG Junchao, WU Youliang, et al. Gamma knife combined with temozolomide in the treatment of brain metastases: a case report[J]. *Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery*, 2015, 20(6): 279-280.
7. 吴志峰, 王守森. 替莫唑胺在治疗难治性垂体瘤及垂体癌的研究现状[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2015, 3(3): 280-282.

- WU Zhifeng, WANG Shousen. Research situation of temozolomide in the treatment of refractory pituitary tumor and pituitary carcinoma[J]. *Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research*, 2015, 3(3): 280-282.
8. 李鹤松, 叶艳. 替莫唑胺对胶质瘤细胞U251凋亡的影响[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(4): 723-727.
LI Hesong, YE Yan. Influence of temozolomide on apoptosis of glioma cell line U251[J]. *Drugs & Clinic*, 2018, 33(4): 723-727.
 9. 贺国安, 罗进贤, 张添元, 等. 改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术--无气室孵育法[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2003, 42(2): 126-128.
HE Guo'an, LUO Jinxian, ZHANG Tianyuan, et al. Improved chick chorioallantoic membrane technique—incubation without air chamber[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, 42(2): 126-128.
 10. Fukai J, Koizumi F, Nakao N. Enhanced anti-tumor effect of zoledronic acid combined with temozolomide against human malignant glioma cell expressing O6-methylguanine DNA methyltransferase[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104538.
 11. Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, et al. Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83629.
 12. 郭珊珊, 朱仲玲, 徐辉, 等. 替莫唑胺酯对脑胶质瘤的作用及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(13): 1271-1275.
GUO Shanshan, ZHU Zhongling, XU Hui, et al. Effects of temozolomide ester on glioma cells and its possible mechanisms[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2015, 31(13): 1271-1275.
 13. Hung AL, Garzon-Muvdi T, Lim M. Biomarkers and immunotherapeutic targets in glioblastoma[J]. *World Neurosurg*, 2017, 102: 494-506.
 14. Zhang Y, Liu NM, Wang Y, et al. Endothelial cell calpain as a critical modulator of angiogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(6): 1326-1335.
 15. Guo P, Wang Y, Dai C, et al. Ribosomal protein S15a promotes tumor angiogenesis via enhancing Wnt/ β -catenin-induced FGF18 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2018, 37(9): 1220-1236.

本文引用: 曾令华, 黄锐, 刘少政, 秦国文. 替莫唑胺对人脑胶质瘤U87细胞增殖和血管生成的抑制作用[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(7): 1381-1387. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.001

Cite this article as: ZENG Linghua, HUANG Rui, LIU Shaozheng, QIN Guowen. Inhibitory effect of temozolomide on proliferation and angiogenesis in human glioma U87 cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(7): 1381-1387. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.001