

Rac1 抑制剂联合替莫唑胺协同抑制胶质瘤细胞增殖活性和侵袭能力的体外研究

韩晓勇 王希瑞 赵志煌 尚金星 尹港峰 杨学军

【摘要】 目的 探讨 Rac1 抑制剂联合替莫唑胺对胶质瘤细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力的协同抑制作用。方法 分别以 Rac1 抑制剂、替莫唑胺、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺于体外培养人胶质瘤细胞系 U87 和 U251, 噻唑蓝法、细胞迁移实验和细胞侵袭实验检测胶质瘤细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力。结果 经 Rac1 抑制剂、替莫唑胺、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺培养后, U87 和 U251 细胞增殖活性均降低(均 $P < 0.05$), 且替莫唑胺的抑制作用强于 Rac1 抑制剂(均 $P < 0.05$), Rac1 抑制剂联合替莫唑胺的抑制作用更强(均 $P < 0.05$); U87 和 U251 细胞迁移能力[U87: 空白对照(78.00 ± 11.53) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂(39.00 ± 9.53) 细胞数/低倍视野、替莫唑胺(42.00 ± 8.54) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺(18.67 ± 10.54) 细胞数/低倍视野, $P = 0.001, 0.001, 0.000$; U251: 空白对照(75.00 ± 4.00) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂(37.00 ± 5.56) 细胞数/低倍视野、替莫唑胺(36.00 ± 9.00) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺(14.33 ± 5.50) 细胞数/低倍视野, 均 $P = 0.000$] 和侵袭能力[U87: 空白对照(64.33 ± 4.04) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂(30.33 ± 3.51) 细胞数/低倍视野、替莫唑胺(24.00 ± 2.64) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺(11.00 ± 2.00) 细胞数/低倍视野, 均 $P = 0.000$; U251: 空白对照(77.33 ± 3.06) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂(40.67 ± 4.04) 细胞数/低倍视野、替莫唑胺(37.33 ± 4.51) 细胞数/低倍视野、Rac1 抑制剂联合替莫唑胺(15.33 ± 2.52) 细胞数/低倍视野, 均 $P = 0.000$] 均降低, 尤以二者联合应用降低更明显(迁移能力_{U87}: $P = 0.021, 0.011$; 迁移能力_{U251}: $P = 0.002, 0.003$; 侵袭能力_{U87}: $P = 0.000, 0.001$; 侵袭能力_{U251}: 均 $P = 0.000$)。结论 Rac1 抑制剂和替莫唑胺均可抑制胶质瘤细胞的增殖活性、迁移能力和侵袭能力, 二者联合应用更具协同抑制作用。

【关键词】 神经胶质瘤; rac1 GTP 结合蛋白质; 替莫唑胺(非 MeSH 词); 细胞增殖; 肿瘤浸润; 肿瘤细胞, 培养的

Study on synergistic effect of Rac1 inhibitor and temozolomide in inhibiting proliferation and invasiveness of glioma cells in vitro

HAN Xiao-yong¹, WANG Xi-rui¹, ZHAO Zhi-huang¹, SHANG Jin-xing¹, YIN Gang-feng¹, YANG Xue-jun²

¹Department of Neurosurgery, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China

²Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: HAN Xiao-yong (Email: 280703766@qq.com)

【Abstract】 Objective To investigate whether Rac1 inhibitor has a synergistic effect on temozolomide (TMZ) in inhibiting the proliferation, migration and invasiveness of glioma cells. **Methods** Human glioma cell lines U87 and U251 were cultured by Rac1 inhibitor, TMZ or Rac1 inhibitor combined with TMZ. They were divided into 4 groups: control group, Rac1 inhibitor group, TMZ group and Rac1 inhibitor + TMZ group. The proliferation, migration and invasiveness of glioma cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), migration assay and Transwell assay. **Results** After cultured by Rac1 inhibitor, TMZ or Rac1 inhibitor + TMZ, the cell proliferation of U87 and U251 were inhibited ($P < 0.05$, for all). The inhibiting effect of TMZ was stronger than Rac1 inhibitor ($P < 0.05$, for all), while Rac1 inhibitor + TMZ was much stronger ($P < 0.05$, for all). U87 and U251 migration [cells/low power field (LPF)] in Rac1

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2016.08.009

作者单位: 061000 河北省沧州市中心医院神经外科(韩晓勇, 王希瑞, 赵志煌, 尚金星, 尹港峰); 300052 天津医科大学总医院神经外科(杨学军)

通讯作者: 韩晓勇 (Email: 280703766@qq.com)

inhibitor group (39.00 ± 9.53 , 37.00 ± 5.56), TMZ group (42.00 ± 8.54 , 36.00 ± 9.00) and Rac1 inhibitor + TMZ group (18.67 ± 10.54 , 14.33 ± 5.00) was lower than that in control group (78.00 ± 11.53 , 75.00 ± 4.00), and the differences were significant (U87: $P = 0.001$, 0.001 , 0.000 ; U251: $P = 0.000$, for all). U87 and U251 cell invasiveness (cells/LPF) in Rac1 inhibitor group (30.33 ± 3.51 , 40.67 ± 4.04), TMZ group (24.00 ± 2.64 , 37.33 ± 4.51) and Rac1 inhibitor + TMZ group (11.00 ± 2.00 , 15.33 ± 2.52) was lower than that in control group (64.33 ± 4.04 , 77.33 ± 3.06), and the differences were significant (U87: $P = 0.000$, for all; U251: $P = 0.000$, for all). In paired comparison among different groups, the migration (U87: $P = 0.021$, 0.011 ; U251: $P = 0.002$, 0.003) and invasiveness (U87: $P = 0.000$, 0.001 ; U251: $P = 0.000$, 0.000) of cells in Rac1 inhibitor + TMZ group were significantly decreased than those in other groups. **Conclusions** Both Rac1 inhibitor and temozolomide can inhibit the proliferation, migration and invasiveness of glioma cells, while Rac1 inhibitor has a significantly synergistic effect on temozolomide.

【Key words】 Glioma; rac1 GTP - binding protein; Temozolomide (not in *MeSH*); Cell proliferation; Neoplasm invasiveness; Tumor cells, cultured

胶质瘤是临床最常见的原发性中枢神经系统恶性肿瘤,以恶性程度最高的胶质母细胞瘤为例,若仅予支持治疗,患者中位生存期不足3个月,约97%患者于发病12个月内死亡;即使予手术切除,术后辅助放射治疗和替莫唑胺(TMZ)序贯治疗的标准方案,患者中位生存期也仅为12~16个月^[1]。胶质瘤细胞的高增殖活性和侵袭能力,是患者预后不良的关键因素。替莫唑胺作为一种新型口服烷化剂,可以较好地透过血-脑屏障,普遍应用于高级别胶质瘤的药物化疗,可以显著提高患者中位生存期,但对化疗药物的耐受程度限制了其疗效的提高,因此,有必要寻找一种联合治疗方案,以提高替莫唑胺的疗效^[2]。Ras相关C3肉毒素底物1(Rac1)蛋白作为Rho GTP酶超家族成员,可以调节细胞伪足前端的肌动蛋白聚合,在胶质母细胞瘤中呈高表达,与肿瘤细胞的增殖活性和侵袭能力密切相关,抑制Rac1蛋白活性,可以显著降低胶质母细胞瘤细胞的增殖活性和侵袭能力^[3]。Rac1抑制剂和替莫唑胺联合作用于胶质瘤细胞会产生怎样的效果? Rac1抑制剂能否增加替莫唑胺对胶质瘤细胞的抑制作用?本研究拟通过胶质瘤细胞系U87和U251的体外实验加以验证。

材料与方 法

一、实验材料

1. 细胞系来源 人胶质瘤细胞系U87和U251均购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,稳定传代10代后用于本实验。

2. 药品与试剂 替莫唑胺由天津天士力制药集

团股份有限公司提供,二甲亚砜(DMSO)为美国Sigma公司产品,噻唑蓝(MTT)溶液、DMEM培养液、胎牛血清(FBS)均购自美国Invitrogen Gibco公司,Rac1抑制剂NSC23766为德国Merck公司产品。Transwell穿透小室购自美国Merck Millipore公司,NanoDrop ND-1000型紫外分光光度计由美国Thermo公司提供,Olympus IX-70型倒置相差显微镜为日本Olympus公司产品。

二、实验方法

1. 细胞培养与分组 人胶质瘤细胞系U87和U251均置于含体积分数为10%的胎牛血清DMEM培养基中,于37℃、体积分数为5%二氧化碳、饱和湿度常规培养,3d更换1次培养基,细胞融合率达80%时传代培养。替莫唑胺溶解于10% DMSO溶液(100 mg/ml)保存,实验时以DMEM培养液稀释至所需浓度。细胞培养过程中,DMSO浓度始终维持在<0.10%以下,此浓度不会对细胞生长产生影响。将处于对数生长期的U87和U251细胞制成密度为 100×10^3 /ml的细胞悬液后分为4组。(1)空白对照组(对照组):加入等体积的DMSO溶液作为对照。(2)Rac1抑制剂组:常规培养24h后,加入Rac1抑制剂NSC23766(100 μmol/L)继续培养2h。(3)替莫唑胺组(TMZ组):常规培养24h后,加入溶解于DMSO溶液的替莫唑胺,DMEM培养液稀释至所需浓度(10 μmol/L),继续培养2h。(4)Rac1抑制剂联合替莫唑胺组(Rac1抑制剂+TMZ组):于常规培养24h后,加入Rac1抑制剂NSC23766(100 μmol/L)和含替莫唑胺(10 μmol/L)的DMEM培养液后继续培养2h。

2. MTT法检测胶质瘤细胞增殖活性 将4组肿

瘤细胞以 $2 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ 的密度接种于 96 孔培养板中, 分别于接种后 1、2、3、4、5、6 和 7 d, 在每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 200 μl DMSO 溶液 (100 mg/ml), 轻摇 20 min, 紫外分光光度计测定 570 nm 波长处光密度值 (OD 值), 每组重复实验 3 次, 取平均值。

3. 细胞迁移实验 取处于对数生长期的 U87 和 U251 细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 终止消化后置入含 10% 胎牛血清的完全培养基中, 制成密度为 $100 \times 10^3/\text{ml}$ 的细胞悬液, 将细胞悬液平铺于六孔板, 继续培养至细胞融合率达 70% ~ 80%。然后以规格为 200 μl 的枪头顶端尽量垂直于六孔板底部划痕, 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 去除划痕上的残留细胞, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱中培养, 4 组分别加入不同处理试剂, 24 h 后于倒置相差显微镜下观察细胞迁移程度。随机选取 3 个不重复视野 ($\times 100$), 计数迁移至空白处的细胞数, 每组重复实验 3 次, 取平均值。

4. Transwell 细胞侵袭实验 取 4 组肿瘤细胞 $100 \times 10^3/200 \mu\text{l}$, BD Matrigel 基质胶 70 μl 均匀平铺于 Transwell 的聚碳酸酯膜上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预置 2 h 聚合成凝胶备用。每组设 3 个复孔, 上室每孔加入 200 μl 细胞悬液 (含 100×10^3 个肿瘤细胞), 下室每孔加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。将装有 Transwell 的培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱中培养 24 h, 弃上室培养液, 取出小室, 以湿棉签擦去聚碳酸酯膜上未穿过膜的细胞, 行苏木素染色, 冲洗后封片, 于倒置相差显微镜下观察迁移至膜下的细胞数。分别于每张膜的中央部分和周围部分随机选取 3 个不重复视野 ($\times 100$), 计数迁移至膜下的细胞数, 每组重复实验 3 次, 取平均值。

三、统计分析方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理与分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组肿瘤细胞不同观察时间点增殖活性的比较采用重复测量设计的方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验; 各组肿瘤细胞迁移能力和侵袭能力的比较, 采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、胶质瘤细胞增殖活性的比较

与对照组相比, Rac1 抑制剂组、TMZ 组和 Rac1

抑制剂 + TMZ 组 U87 和 U251 细胞增殖活性均降低 (均 $P < 0.05$), 其中, TMZ 组较 Rac1 抑制剂组降低得更明显 (均 $P < 0.05$), Rac1 抑制剂 + TMZ 组较 TMZ 组和 Rac1 抑制剂组降低得更明显 (均 $P < 0.05$), 表明 Rac1 抑制剂和替莫唑胺均可抑制胶质瘤细胞增殖活性, 替莫唑胺的抑制作用强于 Rac1 抑制剂, 而二者联合应用抑制效果更明显, 提示 Rac1 抑制剂有增强替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖活性的作用 (表 1 ~ 3)。

二、胶质瘤细胞迁移能力的比较

与对照组相比, Rac1 抑制剂组、TMZ 组和 Rac1 抑制剂 + TMZ 组 U87 和 U251 细胞迁移能力均降低 ($P < 0.05$), 尤以 Rac1 抑制剂 + TMZ 组显著 (均 $P < 0.05$), 表明 Rac1 抑制剂和替莫唑胺均可抑制胶质瘤细胞迁移能力, 二者联合抑制效果更明显, 提示 Rac1 抑制剂有增强替莫唑胺抑制胶质瘤细胞迁移能力的作用 (图 1; 表 4, 5)。

三、胶质瘤细胞侵袭能力的比较

与对照组相比, Rac1 抑制剂组、TMZ 组和 Rac1 抑制剂 + TMZ 组 U87 和 U251 细胞侵袭能力均降低 (均 $P < 0.05$), 尤以 Rac1 抑制剂 + TMZ 组显著 (均 $P < 0.05$), 表明 Rac1 抑制剂和替莫唑胺均可抑制胶质瘤细胞侵袭能力, 二者联合抑制效果更明显, 提示 Rac1 抑制剂有增强替莫唑胺抑制胶质瘤细胞侵袭能力的作用 (图 2; 表 6, 7)。

讨 论

胶质瘤是临床常见的原发性中枢神经系统恶性肿瘤, 占成人颅内肿瘤的 40% ~ 50%, 目前世界卫生组织 (WHO) 将胶质瘤分为 I ~ IV 级 4 个级别, 肿瘤级别越高、患者预后越差^[4]。由于胶质瘤细胞具有较强的增殖活性、迁移能力和侵袭能力, 即使采取手术切除辅以术后放射治疗和药物化疗的标准治疗方案, 仍易在肿瘤残腔周围或远隔部位复发, 导致患者死亡。研究显示, 靶向治疗或免疫抑制治疗效果甚微^[5], 患者预后不甚理想。

替莫唑胺作为一种新型口服烷化剂在胶质瘤的药物化疗中获得临床医师的广泛关注^[6]。研究显示, 口服替莫唑胺即具有较好的抗肿瘤特性, 且具有易透过血-脑屏障、药物毒性作用小等优点^[7-9]。临床研究证实, 替莫唑胺可以明显延长胶质瘤患者的生存期^[10]。关于替莫唑胺药理学机制, 王健等^[11]认为, 不仅与其活性化合物 5-(3-甲基三氮烯-1-基)

表 1 各组胶质瘤细胞不同观察时间点增殖活性的比较($\bar{x} \pm s, OD_{570\text{nm}}$)

Table 1. Comparison of glioma cell proliferation in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, OD_{570\text{nm}}$)

Group	N	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
U87								
Control (1)	3	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
Rac1 inhibitor (2)	3	100.00 ± 0.00	97.14 ± 3.92	95.91 ± 0.97	92.87 ± 1.96	95.57 ± 2.84	91.02 ± 2.91	92.33 ± 3.90
TMZ (3)	3	100.00 ± 0.00	92.44 ± 3.94	81.12 ± 4.22	74.20 ± 2.22	69.08 ± 2.22	61.81 ± 4.34	56.11 ± 1.80
Rac1 inhibitor + TMZ (4)	3	100.00 ± 0.00	85.39 ± 5.33	70.65 ± 2.09	60.30 ± 2.82	51.62 ± 2.55	45.06 ± 0.75	32.47 ± 3.27
U251								
Control (1)	3	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
Rac1 inhibitor (2)	3	100.00 ± 0.00	94.15 ± 0.80	97.68 ± 2.55	92.94 ± 1.70	94.75 ± 0.95	96.45 ± 3.56	97.48 ± 2.23
TMZ (3)	3	100.00 ± 0.00	87.83 ± 2.07	72.35 ± 2.14	68.69 ± 4.80	56.11 ± 1.43	54.65 ± 2.16	46.26 ± 5.36
Rac1 inhibitor + TMZ (4)	3	100.00 ± 0.00	75.62 ± 5.25	66.18 ± 4.78	51.92 ± 1.44	42.70 ± 4.51	32.17 ± 2.02	24.03 ± 1.80

TMZ, temozolomide, 替莫唑胺

表 2 各组胶质瘤细胞不同观察时间点增殖活性的重复测量设计的方差分析表

Table 2. ANOVA of repeated measurement design on glioma cell proliferation in each group at different time points

Source of variation	SS	MS	df	F value	P value	Source of variation	SS	MS	df	F value	P value
U87						U251					
Treatment	17 819.912	5939.970	3	1186.632	0.000	Treatment	28 256.817	9418.942	3	620.563	0.000
Time	7 892.753	7892.751	1	1101.214	0.000	Time	9 259.172	9259.168	1	1736.980	0.000
Treatment × time	6 533.681	2177.886	3	303.860	0.000	Treatment × time	9 374.870	3124.841	3	586.211	0.000
Error between groups	40.050	5.011	8			Error between groups	121.434	15.180	8		
Error within group	57.344	7.166	8			Error within group	42.651	5.333	8		

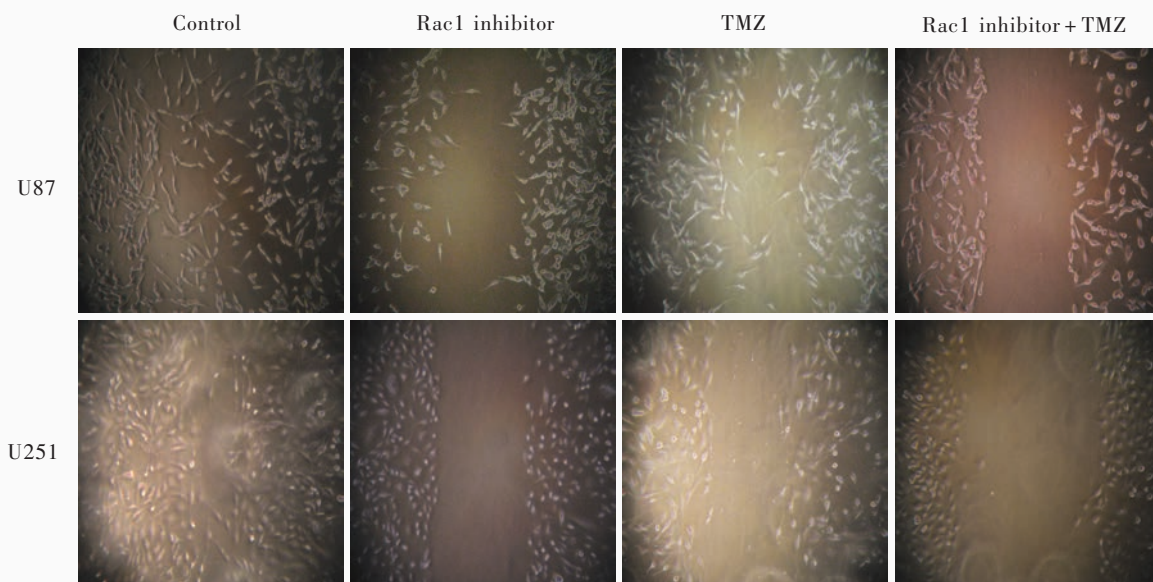
表 3 不同处理组胶质瘤细胞同一观察时间点增殖活性的两两比较

Table 3. Paired comparison of glioma cell proliferation among different groups at the same time point

Paired comparison	2 d		3 d		4 d		5 d		6 d		7 d	
	t value	P value	t value	P value	t value	P value	t value	P value	t value	P value	t value	P value
U87												
(1):(2)	1.262	0.275	7.267	0.002	6.311	0.003	2.701	0.054	5.341	0.006	3.404	0.027
(1):(3)	3.323	0.029	7.751	0.001	20.179	0.000	24.081	0.000	15.255	0.000	42.177	0.000
(1):(4)	4.740	0.009	24.361	0.000	24.355	0.000	32.914	0.000	127.512	0.000	35.785	0.000
(2):(3)	1.468	0.217	5.916	0.004	10.952	0.000	12.712	0.000	9.692	0.001	14.593	0.000
(2):(4)	3.070	0.037	19.004	0.000	16.430	0.000	19.942	0.000	26.455	0.000	20.360	0.000
(3):(4)	1.836	0.140	3.863	0.018	6.714	0.003	8.939	0.001	6.585	0.003	10.972	0.000
U251												
(1):(2)	12.551	0.000	1.572	0.192	7.147	0.002	9.535	0.001	1.722	0.160	1.953	0.123
(1):(3)	10.127	0.001	22.338	0.000	11.290	0.000	52.870	0.000	36.340	0.000	17.356	0.000
(1):(4)	8.040	0.001	12.252	0.000	57.701	0.000	22.004	0.000	57.941	0.000	72.806	0.000
(2):(3)	4.904	0.008	13.136	0.000	8.243	0.001	38.816	0.000	17.373	0.000	15.268	0.000
(2):(4)	6.043	0.004	10.060	0.001	31.777	0.000	19.552	0.000	21.754	0.000	44.255	0.000
(3):(4)	3.744	0.020	2.042	0.111	5.791	0.004	4.910	0.008	13.142	0.000	6.802	0.002

咪唑-4-酰胺(MTIC)的细胞毒性有关,也与其可以有效降低胶质瘤细胞增殖活性和侵袭能力密切相关。机体内 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶

(MGMT)活性可以使患者对替莫唑胺产生耐药性,限制替莫唑胺的临床疗效,因此,亟待寻找一种能够良好透过血-脑屏障的药物以增强替莫唑胺疗效。



TMZ, temozolomide, 替莫唑胺。The same for figure below

图1 倒置相差显微镜观察显示,对照组U87和U251细胞在划痕处融合明显,迁移至划痕处的细胞较多,Rac1抑制剂组和TMZ组迁移至划痕处的U87和U251细胞相对较少,Rac1抑制剂+TMZ组U87和U251细胞迁移能力明显下降,迁移至划痕处的细胞极少 低倍放大

Figure 1 Inverted phase-contrast microscopy showed that U87 and U251 cells in control group were fused obviously in the scratch, and a lot of cells migrated to the scratch, while less cells in Rac1 inhibitor group and TMZ group migrated to the scratch. Migration of U87 and U251 cells in Rac1 inhibitor + TMZ group decreased significantly, and only a few cells migrated to scratch. low power magnified

表4 各组胶质瘤细胞迁移能力的比较($\bar{x} \pm s$, 细胞数/低倍视野)

Table 4. Comparison of glioma cell migration in each group ($\bar{x} \pm s$, cells/LPF)

Group	N	U87	U251
Control (1)	3	78.00 ± 11.53	75.00 ± 4.00
Rac1 inhibitor (2)	3	39.00 ± 9.53	37.00 ± 5.56
TMZ (3)	3	42.00 ± 8.54	36.00 ± 9.00
Rac1 inhibitor + TMZ (4)	3	18.67 ± 10.54	14.33 ± 5.00
<i>F</i> value		19.362	39.424
<i>P</i> value		0.001	0.000

TMZ, temozolomide, 替莫唑胺

表5 不同处理组胶质瘤细胞迁移能力的两两比较

Table 5. Paired comparison of cell migration among different groups

Paired comparison	U87		U251	
	<i>t</i> value	<i>P</i> value	<i>t</i> value	<i>P</i> value
(1):(2)	39.000	0.001	38.000	0.000
(1):(3)	36.000	0.001	39.000	0.000
(1):(4)	59.332	0.000	60.673	0.000
(2):(3)	-3.001	0.684	1.001	0.851
(2):(4)	20.334	0.021	22.671	0.002
(3):(4)	23.332	0.011	21.672	0.003

Rac1 蛋白是一种广泛存在于细胞中的重要信号转导分子,与多种恶性肿瘤的发生与发展密切相关。Rac1 基因定位于第7号染色体p22,相对分子质量为 29×10^3 ,含7个外显子。Rac1 蛋白可以结合并水解鸟苷酸,具有两种活性状态,分别为结合GTP的激活态和结合GDP的非激活态,其生物学活性主要受鸟苷酸转换因子、GTP酶激活蛋白和鸟嘌呤核苷酸解离抑制因子的调节,正是由于这两种活性状态的相互转换使Rac1 蛋白在细胞增殖、分化与凋亡、细胞运动与粘附,以及转录因子的调控中起“分

子开关”作用^[12]。目前研究显示,在胶质瘤细胞侵袭和转移过程中,肿瘤细胞伪足的形成和粘附至关重要,而在该环节中,Rac1 蛋白调控伪足前端肌动蛋白骨架聚合,从而影响肿瘤细胞片状伪足的形成,在肿瘤细胞迁移、侵袭中发挥重要作用^[13]。Rac1 蛋白可以激活下游p21 活化蛋白激酶(PAK),活化PAK/单丝氨酸蛋白激酶1(LIMK1)/cofilin 信号转导通路,进而使肿瘤细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力显著增强^[14]。

抑制Rac1 蛋白活性能否与替莫唑胺协同作用,

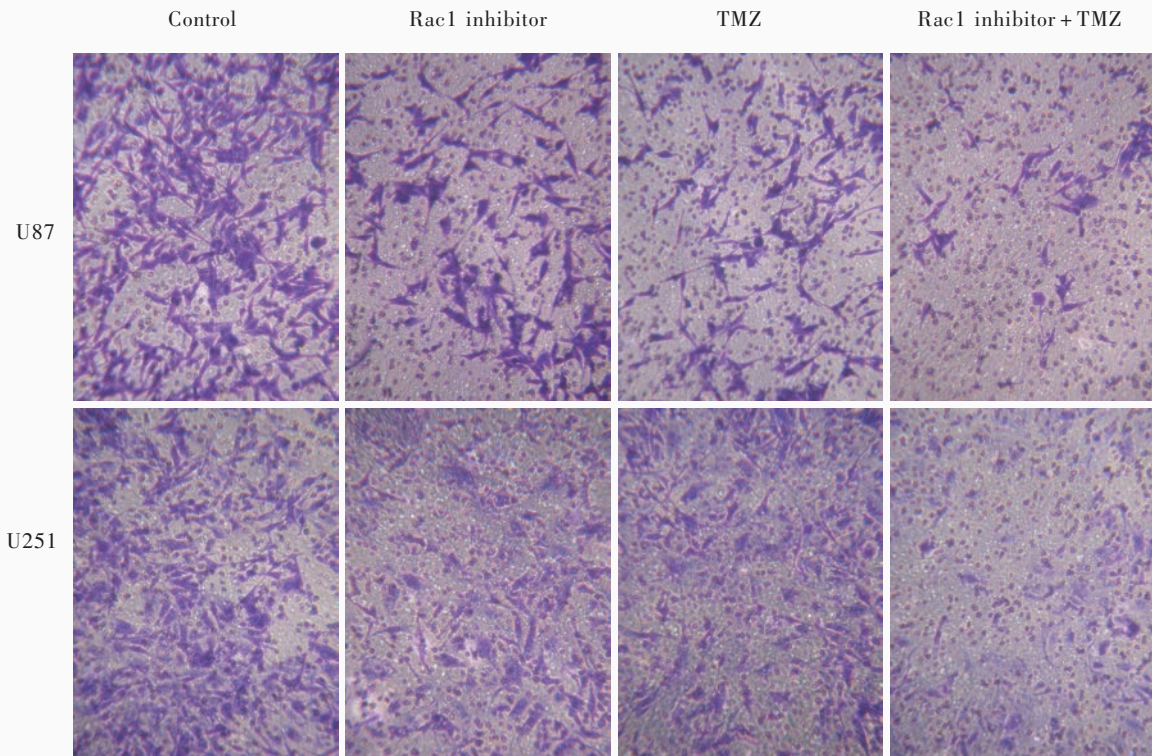


图2 倒置相差显微镜观察显示,对照组侵袭至膜下表面的U87和U251细胞较多,Rac1抑制剂组和TMZ组侵袭至膜下表面的U87和U251细胞相对较少,Rac1抑制剂+TMZ组U87和U251细胞侵袭能力明显下降,侵袭至膜下表面的细胞极少苏木素染色 低倍放大

Figure 2 Inverted phase-contrast microscopy showed that a lot of U87 and U251 cells in control group invaded to the surface below the membrane, while less cells in Rac1 inhibitor group and TMZ group invaded to the surface below the membrane. The invasiveness of cells in Rac1 inhibitor + TMZ group decreased significantly, and only a few invaded to the surface below the membrane. Hematoxylin staining low power magnified

表6 各组胶质瘤细胞侵袭能力的比较($\bar{x} \pm s$, 细胞数/低倍视野)

Table 6. Comparison of glioma cell invasiveness in each group ($\bar{x} \pm s$, cells/LPF)

Group	N	U87	U251
Control (1)	3	64.33 ± 4.04	77.33 ± 3.06
Rac1 inhibitor (2)	3	30.33 ± 3.51	40.67 ± 4.04
TMZ (3)	3	24.00 ± 2.64	37.33 ± 4.51
Rac1 inhibitor + TMZ (4)	3	11.00 ± 2.00	15.33 ± 2.52
F value		131.803	129.926
P value		0.000	0.000

TMZ, temozolomide, 替莫唑胺

表7 不同处理组胶质瘤细胞侵袭能力的两两比较

Table 7. Paired comparison of cell invasiveness among different groups

Paired comparison	U87		U251	
	t value	P value	t value	P value
(1):(2)	34.000	0.000	36.672	0.000
(1):(3)	40.332	0.000	40.000	0.000
(1):(4)	53.331	0.000	62.001	0.000
(2):(3)	6.330	0.039	3.332	0.292
(2):(4)	19.332	0.000	25.333	0.000
(3):(4)	13.000	0.001	22.000	0.000

进而抑制胶质瘤细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力,尚待进一步研究。本研究对胶质瘤细胞系U87和U251先予Rac1抑制剂处理,再加入替莫唑胺,采用MTT法、细胞划痕实验和Transwell实验比较其与单纯予Rac1抑制剂或替莫唑胺处理的胶质瘤细胞的增殖活性、迁移能力和侵袭能力,结果显示,经Rac1抑制剂、替莫唑胺、Rac1抑制剂联合替莫唑胺

处理后,U87和U251细胞增殖活性、迁移能力和侵袭能力均降低,尤以二者联合应用时降低得更显著,表明Rac1抑制剂和替莫唑胺均可抑制胶质瘤细胞增殖,二者联合抑制效果更明显,提示Rac1抑制剂有增强替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖活性的作用。U87细胞系是胶质母细胞瘤细胞系,其增殖活性、迁移能力和侵袭能力强于U251细胞系,本实验

结果与两种肿瘤细胞系特征基本相符。Rac1抑制剂NSC23766可以有效抑制肿瘤细胞的迁移能力和侵袭能力,而对肿瘤细胞增殖活性影响不大,替莫唑胺具有较强的抑制肿瘤细胞增殖活性能力,故二者联合应用可达到协同增强抑制作用效果。

Rac1抑制剂通过抑制肿瘤细胞伪足形成,联合替莫唑胺自身的抗肿瘤细胞增殖、侵袭作用,从多个途径协同抑制胶质瘤细胞的增殖活性、迁移能力和侵袭能力。本研究为Rac1抑制剂与替莫唑胺的联合应用提供了理论指导,为进一步有效抑制胶质瘤的侵袭和转移提供了新的治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Wang HG, Jia Q, Zhang SS, Wang JW, Liu BL. Expressions and significance of vimentin and NF- κ B in invasive glioma. *Zhongguo Wei Qin Xi Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2015, 20:276-278. [王红光, 贾强, 张述升, 王均伟, 刘宝龙. 波形蛋白、NF- κ B促进胶质瘤侵袭性的表达相关性及其意义. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015, 20:276-278.]
- [2] Wang JW, Chen ZB, Wu JC. Effect of temozolomide on the biological activity of human glioma cells. *Zhongguo Shi Yong Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2015, 18:35-37. [王建国, 陈治标, 吴津成. 替莫唑胺对人脑胶质瘤细胞生物活性的影响. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 18:35-37.]
- [3] Han XY, Shang JX, Zhao ZH, Wang XR, Yin GF. Expression of Rac1 in glioma and its relationships with migration and invasion of glioma cells. *Zhongguo Wei Qin Xi Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2015, 20:517-520. [韩晓勇, 尚金星, 赵志煌, 王希瑞, 尹港峰. Rac1在胶质瘤中的表达及其与胶质瘤细胞迁移、侵袭的关系. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015, 20:517-520.]
- [4] Wei YH, Hou BQ. Analysis of the correlation of IGF-2 and IGFBP-2 with the invasion ability of glioma. *Kunming Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015, 36:92-95. [魏亚辉, 侯保秋. IGF-2及IGFBP-2与脑神经胶质瘤侵袭能力的相关性分析. *昆明医科大学学报*, 2015, 36:92-95.]
- [5] Yang XJ. Current situation and prospect of biological treatment of malignant glioma. *Zhonghua Shen Jing Wai Ke Ji Bing Yan Jiu Za Zhi*, 2013, 12:289-292. [杨学军. 恶性胶质瘤生物治疗的现状及前景. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2013, 12:289-292.]
- [6] Grimm SA, Marymont M, Chandler JP, Muro K, Newman SB, Levy RM, Jovanovic B, McCarthy K, Raizer JJ. Phase I study of arsenic trioxide and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with malignant gliomas. *J Neurooncol*, 2012, 110:237-243.
- [7] Pan Q, Yang XJ, Gao S, Ji YW, Zhang WG, Li Y, Wang W, Dong XT, Wang HM. Study on mechanism of temozolomide-resistant human glioma cell line U251/TR changed by temozolomide in vitro. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2009, 9:583-588. [潘强, 杨学军, 高松, 纪延伟, 张文高, 李瑜, 王维, 董雪涛, 王华民. 替莫唑胺改变人胶质瘤细胞系U251耐药机制的体外研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2009, 9:583-588.]
- [8] Gao S, Pan Q, Zeng Z, Sun J, Yang XJ. Study on mechanism of thalidomide combined with temozolomide to suppress proliferation of U251 glioma cell in vitro. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2010, 10:533-539. [高松, 潘强, 曾峥, 孙健, 杨学军. 沙利度胺联合替莫唑胺杀伤U251胶质瘤细胞机制的体外研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:533-539.]
- [9] Sun J, Yang XJ, Yang SY. Multicenter randomized controlled study of temozolomide versus semustine in the treatment of recurrent malignant glioma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013, 93:165-168.
- [10] Minniti G, Scaringi C, De Sanctis V, Lanzetta G, Falco T, Di Stefano D, Esposito V, Enrici RM. Hypofractionated stereotactic radiotherapy and continuous low-dose temozolomide in patients with recurrent or progressive malignant gliomas. *J Neurooncol*, 2013, 111:187-194.
- [11] Wang J, Jia YS, Zhao XQ, Qin LJ. Effect of temozolomide on the glioma invasiveness and its possible mechanism. *Lin Chuang Yu Shi Yan Bing Li Xue Za Zhi*, 2014, 30:1259-1262. [王健, 贾永森, 赵喜庆, 秦丽娟. 替莫唑胺对胶质瘤侵袭性的影响及可能机制. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30:1259-1262.]
- [12] Ren M, Jiang H, Su Q. Research progress on the role of Rac1 in tumor development. *Zhongguo Xian Dai Yi Yao Za Zhi*, 2015, 17:109-112. [任妹, 姜浩, 苏琦. Rac1在肿瘤发展中作用的研究进展. *中国现代医药杂志*, 2015, 17:109-112.]
- [13] Parri M, Chiarugi P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 2010, 8:23.
- [14] Mashiach-Farkash E, Rak R, Elad-Sfadia G, Haklai R, Carmeli S, Kloog Y, Wolfson HJ. Computer-based identification of a novel LIMK1/2 inhibitor that synergizes with salirasib to destabilize the actin cytoskeleton. *Oncotarget*, 2012, 3:629-639.

(收稿日期:2016-07-05)

下期内容预告 本刊2016年第9和10期报道专题为神经免疫性疾病,重点内容包括:他汀类调脂药神经肌肉系统不良反应;炎性肌肉病研究进展;肌炎发展史;吉兰-巴雷综合征100年;视神经脊髓炎研究进展;中国学者海外报道;动脉粥样硬化斑块易损性炎症标志物及其临床意义;抗3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抗体实验室检测及临床意义;神经肌肉病临床生物资源数据库建立及应用;白细胞介素-2R β 基因多态性与重症肌无力关联性研究;重症肌无力患者血清抗AChR抗体、抗Titin抗体和抗RyR抗体检测及临床意义;眼肌型重症肌无力临床研究;免疫性坏死性肌病临床研究;吸烟与多发性硬化和视神经脊髓炎谱系疾病发病风险相关性研究;抗神经元表面抗体相关脑炎23例临床分析;Th1、Th2和Th7细胞与颈动脉粥样硬化性缺血性卒中相关性研究;吉兰-巴雷综合征48例临床分析;临床孤立综合征合并抗N-甲基-D-天冬氨酸受体脑炎一例