

# 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

高松 潘强 曾峥 孙健 杨学军

**【摘要】 目的** 对沙利度胺联合替莫唑胺杀伤 U251 胶质瘤细胞的机制进行体外研究,为制订沙利度胺与替莫唑胺联合化疗方案提供理论依据。**方法** 经体外培养的人胶质瘤细胞系 U251 分别接受替莫唑胺(100  $\mu\text{mol/L}$ )、沙利度胺(100  $\mu\text{g/L}$ )、替莫唑胺与沙利度胺联合治疗,噻唑蓝(MTT)法检测不同抗肿瘤药物处理组肿瘤细胞增殖活性;流式细胞术分析细胞增殖周期;检测经吖啶橙标记的酸性囊性细胞器数目;原位末端标记(TUNEL)法观察肿瘤细胞凋亡情况;Western blotting 法检测肿瘤自噬及凋亡相关蛋白表达变化。**结果** 与替莫唑胺和沙利度胺单药治疗相比,替莫唑胺与沙利度胺联合治疗对 U251 细胞生长的抑制更为明显(均  $P=0.000$ ),且可诱导肿瘤细胞周期阻滞于  $G_0\sim G_1$  期,以及发生凋亡和自噬。两药联合治疗后,U251 细胞微管相关蛋白 1 轻链 3 和 Caspase-3 表达水平高于替莫唑胺组和沙利度胺组(均  $P=0.000$ )。**结论** 沙利度胺联合替莫唑胺治疗 U251 细胞可以上调自噬及凋亡相关基因表达水平,同时诱导凋亡及自噬性死亡,从而达到对 U251 胶质瘤细胞的杀伤作用。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 替莫唑胺; 细胞凋亡; 自噬; 流式细胞术; 细胞,培养的; 体外研究

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.05.007

**Study on mechanism of thalidomide combined with temozolomide to suppress proliferation of U251 glioma cell in vitro** GAO Song, PAN Qiang, ZENG Zheng, SUN Jian, YANG Xue-jun. Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China  
Corresponding author: YANG Xue-jun (Email: ydenny@yahoo.com)

**【Abstract】 Objective** To provide a more reasonable regimen of temozolomide and thalidomide, and study the mechanism of these 2 drugs in inhibiting the proliferation and growth of U251 glioma cell in vitro. **Methods** Human glioma cell line U251 was cultured in vitro and divided into different treatment groups for 3 d: temozolomide group (100  $\mu\text{mol/L}$ ), thalidomide group (100  $\mu\text{g/L}$ ), temozolomide (100  $\mu\text{mol/L}$ ) with thalidomide group (100  $\mu\text{g/L}$ ) and vehicle control group. After different treatment for 3 d, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was adopted for the determination of cell viability, and cell cycle was analysed by flow cytometry. After labeled with acridine orange (AO), autophagy vesicles were quantitatively detected by flow cytometry. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was employed in observing and detecting the apoptosis of treated cells. Western blotting was used in examining the autophagy and apoptosis-related proteins. **Results** Compared with the 2 drugs used alone, temozolomide with thalidomide imposed more obvious inhibition on tumor cell growth ( $P=0.000$ , for all). Combination of 2 drugs induced tumor cell cycle arrest in  $G_0\sim G_1$ . Both of autophagic and apoptotic cell death could be induced by temozolomide with thalidomide in U251. In two-drug treatment group, the expression of autophagy-related microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) and apoptosis-related Caspase-3 was significantly higher in transcriptional level in comparing with single drug treatment group ( $P=0.000$ , for all). **Conclusion** Temozolomide combined with thalidomide may induce 2 types of programmed cell death—apoptotic and autophagic cell death by up-regulating the expression of related genes in U251 glioma cell, thereby, the combination of these 2 drugs may suppress the proliferation and growth of U251 glioma cell in vitro.

**【Key words】** Glioma; Temozolomide; Apoptosis; Autophagy; Flow cytometry; Cells, cultured; In vitro

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30571904);

国家自然科学基金资助项目(项目编号:30772228)

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经外科

通信作者:杨学军(Email:ydenny@yahoo.com)

恶性胶质瘤约占中枢神经系统肿瘤的 50%，具有弥漫性浸润性生长的生物学特性<sup>[1]</sup>。手术联合放射治疗或药物化疗的综合策略是当今治疗恶性胶质瘤的原则；而随着对胶质瘤分子学特点研究的深入，提高药物化疗疗效即成为这一策略中的重要环节<sup>[2]</sup>。替莫唑胺(TMZ)为咪唑四嗪类衍生物，作为口服新型烷化剂，它具有较强的细胞毒性作用，可有效穿过血-脑屏障并不经肝脏酶系统代谢。然而，替莫唑胺单药化疗易诱导肿瘤细胞对其产生耐药性且其高昂的药物价格已影响到临床的推广使用。因此，将替莫唑胺与其他抗肿瘤药物联合应用进行药物化疗，成为提高替莫唑胺疗效-价格比的必然趋势。沙利度胺(THD)是一种谷氨酸衍生物，具有抗血管生成作用<sup>[3]</sup>，恶性胶质瘤的富血供特性使抗血管生成治疗成为可行的治疗途径。已有多项Ⅱ期临床试验结果证实，替莫唑胺与沙利度胺联合治疗胶质瘤的疗效显著优于两种药物单独应用<sup>[4]</sup>。但是这两种药物联合应用杀伤胶质瘤细胞的机制至今并不十分清楚，在本项研究中，我们拟就沙利度胺联合替莫唑胺杀伤 U251 胶质瘤细胞的药理学机制进行体外研究。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 细胞系来源 人类胶质母细胞瘤细胞系 U251 由天津市神经病学研究所提供，贴壁生长，细胞稳定传代 10 次用于本次试验。

2. 试剂与药品 DMEM 培养基(含体积分数为 10%胎牛血清、4 mmol/L 谷氨酸、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素)购自美国 Gibco 公司。替莫唑胺原药(100 mg/L, 纯度 98%)由天津天士力集团惠赠，沙利度胺原药(100 mg/ml, 纯度 98%)购于江苏常州制药厂有限公司；两种药物均溶解于体积分数为 10%的二甲亚砷(DMSO, 美国 Sigma-Aldrich 公司)保存，使用时稀释至所需浓度，二甲亚砷终浓度维持在 <0.1%，对细胞生长不产生影响。噻唑蓝(MTT)及吖啶橙(AO)由美国 Sigma-Aldrich 公司提供。原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒购自瑞士罗氏(Roche)公司。免疫试剂中 I 抗[为山羊抗人微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3)和 Caspase-3 单克隆抗体，所有 I 抗工作浓度均为 1:100]，以及免疫组织化学检测试剂盒[含生物素标记的兔抗山羊 IgG II 抗(1:100)和辣根过氧化物酶标记的链霉菌

卵白素(1:100)]均购自美国 Santa Cruz 公司。

3. 实验仪器 Bio-Tek ELX800UV 分光光度仪购自美国 Bio Tek 公司。流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。Modifit LT 2.0 软件和 Cell Quest 软件均为美国 Becton Dickinson 公司产品。UVI 光密度扫描仪由美国 Syngene 公司提供。

### 二、实验方法

1. 肿瘤细胞的药物处理 由于替莫唑胺半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)约为 200 mmol/L，故本实验所用替莫唑胺药物浓度确定为其临床可达到的血药浓度，为 100 μmol/L。沙利度胺药物浓度按照临床稳定血药浓度设定于 100 μg/L。经体外培养的胶质瘤细胞按照不同的药物处理方式共分为以下 4 组：(1)替莫唑胺组(TMZ 组)，给予替莫唑胺 100 μmol/L。(2)沙利度胺组(THD 组)，给予沙利度胺 100 μg/L。(3)替莫唑胺与沙利度胺联合治疗组(联合治疗组，TMZ + THD 组)，同时给予替莫唑胺 100 μmol/L 和沙利度胺 100 μg/L。(4)溶媒对照组(对照组)，给予同等剂量的二甲亚砷。

2. MTT 法检测肿瘤细胞增殖活性 MTT 法检测替莫唑胺和沙利度胺在 U251 胶质瘤细胞中的细胞毒性。肿瘤细胞以 2000 个/孔(2000 个/0.10 ml)的密度接种于 96 孔培养板中，37.1 °C 孵育过夜；分别加入不同抗肿瘤药物处理 1、2、3 和 4 d，每孔加入 300 μl MTT 溶液(0.50 mg/ml)，共反应 4 h，以体积分数为 10%十二烷基磺酸钠(SDS) - 0.10 mol/L 盐酸中止反应，弃上清，二甲亚砷溶解甲臞结晶，Bio-Tek ELX800UV 分光光度仪测定 490 nm 处光密度(OD)值，重复实验 3 次。不同抗肿瘤药物处理组与对照组光密度值比值即为细胞存活率。

3. 流式细胞术分析细胞周期 应用抗肿瘤药物处理 3 d 后进行细胞周期分析。胰蛋白酶消化 U251 细胞使其脱壁，体积分数为 70%乙醇固定 24 h，滴入 100 g/ml 的 RNase A(美国 Sigma-Aldrich 公司)消化 RNA，排除干扰，碘化丙啶(PI)染色 30 min 后进行流式细胞术分析，氩离子激光器激发波长为 488 nm，Modifit LT 2.0 软件分析数据，重复试验 3 次。不同生长期肿瘤细胞所占比例显示于流式细胞术分析图右侧。

4. 流式细胞术定量检测吖啶橙染色的酸性囊性细胞器 抗肿瘤药物处理 3 d 后，采用吖啶橙(质量终浓度为 1 μg/ml)染色细胞 15 min，胰蛋白酶消化使细胞脱壁，不含酚红培养基收集脱壁细胞。氩离

子激光器激发波长为488 nm,流式细胞术测定  $10 \times 10^3$  个细胞发出的绿色(510 ~ 530 nm)和红色( $\geq 650$  nm)荧光,Cell Quest 软件分析数据;Q1与Q2象限比例即为阳性细胞。

5. TUNEL法检测细胞凋亡 随机选择经抗肿瘤药物处理3 d后的肿瘤细胞,适量胰蛋白酶消化成单细胞悬液后爬片,质量分数为4%多聚甲醛固定15 min,磷酸盐缓冲液冲洗2 min( $\times 2$ 次)。按照TUNEL检测试剂盒说明书进行凋亡细胞染色,苏木素复染3 s,自来水冲洗。梯度乙醇脱水(50%、70%、85%、95%和100%乙醇各脱水1 min),二甲苯透明1 min( $\times 2$ 次),中性树胶封片。滴加磷酸盐缓冲液,随机选择10个高倍视野,光学显微镜观察并计数凋亡细胞数目,共计数200 ~ 500个细胞,拍照。计数发生凋亡的细胞数目。

6. Western blotting法检测细胞自噬及凋亡相关基因 采集经不同抗肿瘤药物处理的肿瘤细胞行Western blotting检测。以100  $\mu$ l十二烷基磺酸钠上样缓冲液煮沸收获蛋白质,4  $^{\circ}$ C、离心半径5.50 cm、12 000 r/min 高速离心15 min,20  $\mu$ l上样量,体积分数为8%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜后封闭,加入I抗和辣根过氧化物酶标记的II抗进行孵育。化学发光底物按照1:1比例混匀,滴加于PVDF膜,X胶片适度曝光后行 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)二次杂交,即于70  $^{\circ}$ C水浴洗膜30 min [62.50 mmol/L Tris - HCl (pH值6.80),体积分数为2%十二烷基磺酸钠,100 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇],同法以小鼠 $\beta$ -肌动蛋白单克隆抗体作为内参照物。采用UVI光密度扫描仪检测靶蛋白和 $\beta$ -肌动蛋白每一杂交图像的峰面积值,以峰面积比值表示蛋白质表达水平。

三、统计分析方法

采用SPSS 13.0统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析和两因素多水平析

因设计资料的方差分析,两两比较行 $q$ 检验;细胞周期以率(%)表示,行 $\chi^2$ 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞增殖活性分析

MTT法结果如图1,表1所示,与溶媒对照组比较,经抗肿瘤药物处理2 d后替莫唑胺组和联合治疗组肿瘤细胞生长均明显受到抑制( $P = 0.000$ ),且随着时间的推移抑制程度逐渐增强;而沙利度胺组在药物处理第1 ~ 4天时均未对肿瘤细胞生长产生明显抑制作用( $P > 0.05$ );与替莫唑胺组相比,联合治疗组肿瘤细胞生存率存在明显差异(均 $P = 0.000$ )。提示:不同抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞增殖的作用存在差异。

二、替莫唑胺与沙利度胺联合治疗对胶质母细胞瘤细胞增殖周期的影响

采用流式细胞术对不同抗肿瘤药物处理组U251细胞进行细胞周期分析,由图2,3可见,溶媒对照组处于 $G_0 \sim G_1$ 期的U251细胞约为44.20%,S期为40.50%, $G_2 \sim M$ 期为15.30%;替莫唑胺组、沙利度胺组和联合治疗组U251细胞停滞于 $G_0 \sim G_1$ 期者分别为20.30%、55.80%和73.00%,S期者为34.20%、19.60%和11.40%, $G_2 \sim M$ 期者为45.50%、24.70%和

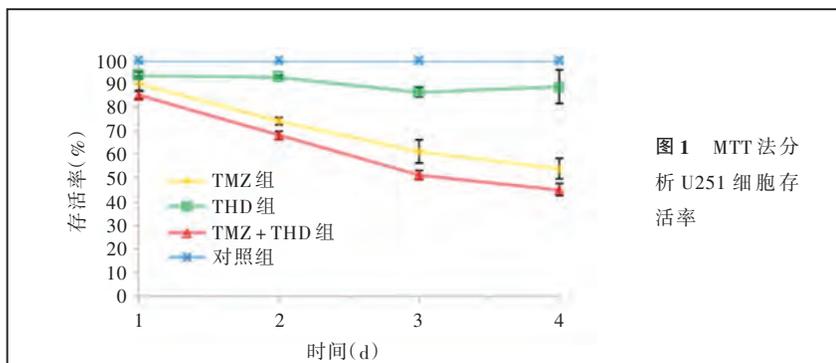


图1 MTT法分析U251细胞存活率

表1 不同抗肿瘤药物处理组U251细胞存活率的比较( $\bar{x} \pm s$ , %)

组 别	样本例数	第1天	第2天	第3天	第4天
溶媒对照组	3	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
TMZ组	3	92.06 $\pm$ 1.68	77.83 $\pm$ 0.73	74.10 $\pm$ 1.64	71.74 $\pm$ 5.76
THD组	3	98.07 $\pm$ 0.04	97.09 $\pm$ 0.45	95.09 $\pm$ 1.55	95.39 $\pm$ 1.55
TMZ+THD组	3	79.27 $\pm$ 1.22	61.74 $\pm$ 4.73	53.70 $\pm$ 1.81	50.74 $\pm$ 2.61
F值		151.513	122.099	461.733	105.977
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

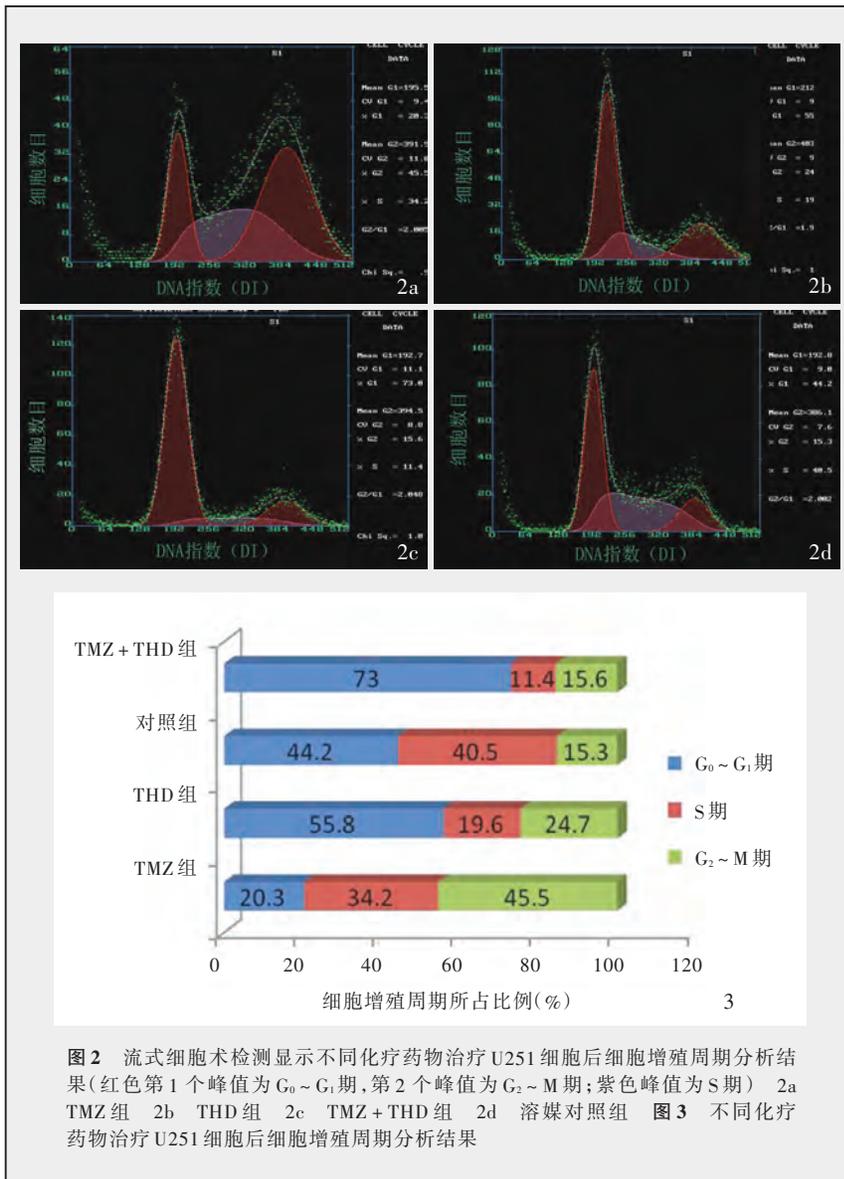


图 2 流式细胞术检测显示不同化疗药物治疗 U251 细胞后细胞增殖周期分析结果(红色第 1 个峰值为 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期,第 2 个峰值为 G<sub>2</sub>~M 期;紫色峰值为 S 期) 2a TMZ 组 2b THD 组 2c TMZ+THD 组 2d 溶媒对照组 图 3 不同化疗药物治疗 U251 细胞后细胞增殖周期分析结果

15.60%。替莫唑胺诱导 U251 细胞发生 G<sub>2</sub>~M 期阻滞;而联合治疗组细胞 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期平均值大于其他各组,S 期平均值小于其他各组,所产生的 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期阻滞效应高于其他化疗药物处理组( $\chi^2 = 78.452, P = 0.032$ )。表明:替莫唑胺和沙利度胺联合治疗与替莫唑胺单药治疗相比,可使肿瘤细胞增殖周期阻滞效应由 G<sub>2</sub>~M 期提前至 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期。

### 三、酸性囊性细胞器的流式细胞术分析

细胞自噬过程的特点即酸性囊性细胞器(AVOs)的形成,Q1 与 Q2 象限的比例代表阳性细胞,即具有酸性囊性细胞器的细胞比例。如图 4,表 2 所示,经不同抗肿瘤药物处理 3 d 后沙利度胺组 U251 细胞酸性囊性细胞器无明显增加;而替莫唑胺组和联合治疗组 U251 细胞酸性囊性细胞器明显增

加,与替莫唑胺单药治疗组 [(9.41 ± 0.99)%] 相比,联合治疗组代表自噬发生程度的酸性囊性细胞器指标显著增加 [(36.05 ± 1.99)%,  $P = 0.000$ ]。提示:替莫唑胺与沙利度胺联合治疗可在 U251 胶质瘤细胞系中诱导更为明显的自噬发生,而且沙利度胺尚具有促进替莫唑胺诱导自噬发生的作用,但其自身并不诱导自噬发生。

### 四、抗肿瘤药物诱导胶质瘤细胞凋亡的观察

图 5,表 3 结果显示,不同抗肿瘤药物处理组中以联合治疗组凋亡细胞数目最高,差异具有统计学意义( $P = 0.000$ ),而替莫唑胺组和沙利度胺组与阴性对照组比较,凋亡细胞数目差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

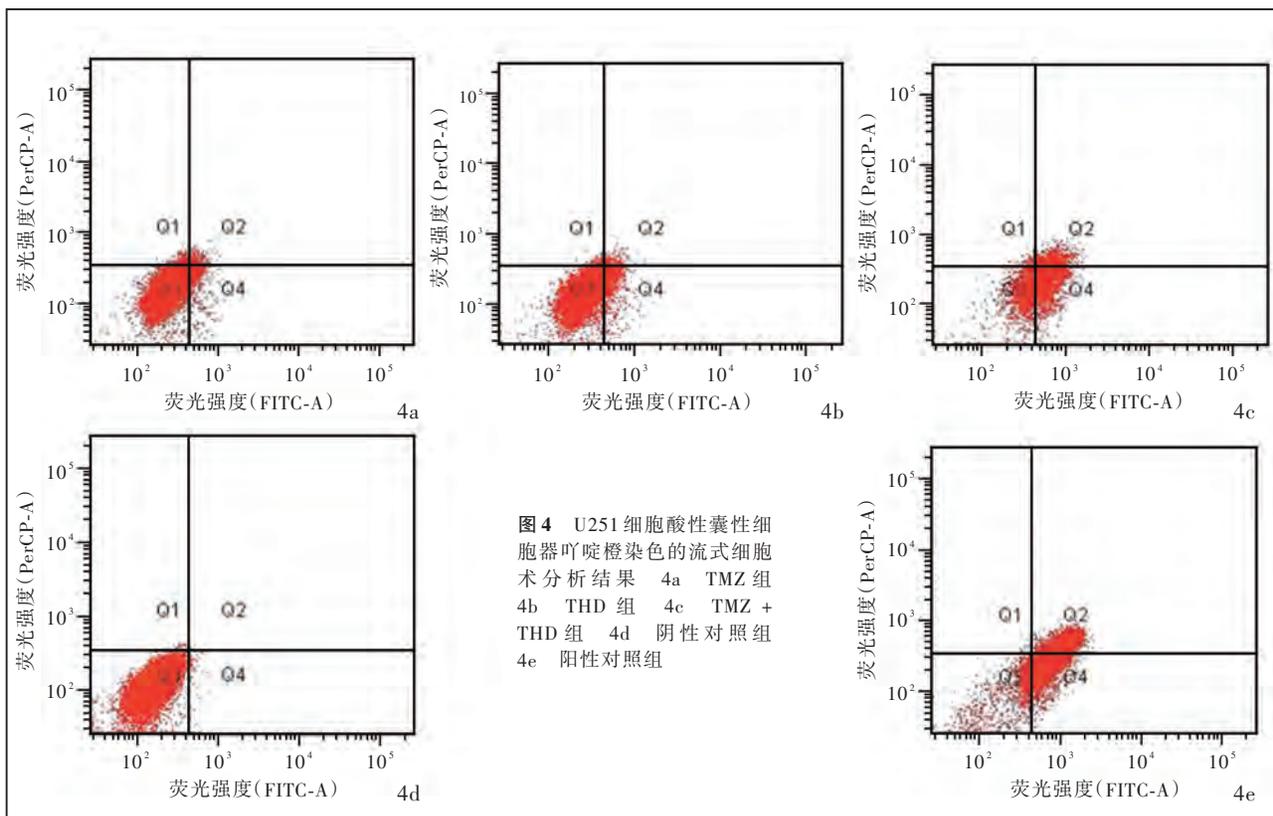
### 五、自噬及凋亡相关基因的分析

由图 6 和表 4,5 可见,替莫唑胺组和联合治疗组 U251 细胞 MAP1LC3 表达水平上调 ( $P = 0.000$ ),而沙利度胺组 U251 细胞 MAP1LC3 表达水平无明显变化 ( $P = 0.051$ ),联合治疗组 U251 细胞 MAP1LC3 表达上调

程度高于替莫唑胺组 ( $P = 0.000$ )。与此同时,联合治疗组 U251 细胞 Caspase-3 活化亚基 P-17 表达水平也明显上调 ( $P = 0.000$ ),而替莫唑胺组和沙利度胺组则无明显改变 ( $P = 0.173$ )。

## 讨 论

由于恶性胶质瘤的侵袭性生长特性,难以通过手术大范围彻底切除。因此,药物化疗对进一步杀死残留的肿瘤细胞发挥着十分重要的作用。纳入 12 项随机对照临床研究的 Meta 分析结果表明,药物化疗确实可以延长胶质瘤患者的生存期<sup>[5]</sup>;而且替莫唑胺也被多中心 III 期临床试验所证实,配合放射治疗较单纯放射治疗对延长胶质瘤患者生存期更为有效<sup>[6]</sup>。然而,药物化疗对胶质瘤的治疗效果还



组别	样本例数	荧光活性	F值	P值
TMZ组	3	9.41 ± 0.99		
THD组	3	2.69 ± 0.74		
TMZ + THD组	3	36.05 ± 1.99	417.444	0.000
阴性对照组	3	1.08 ± 0.12		
阳性对照组	3	17.78 ± 1.35		

不十分理想,其有效率较低,对患者生存期无显著延长效果。如何提高药物化疗之疗效是亟待解决的问题,目前已取得的共识是:制订合理的药物联合化疗方案是提高药物化疗疗效的途径之一。沙利度胺联合替莫唑胺的抗胶质瘤疗效已经多项II期临床试验所验证,能够延长患者中位生存期。有观点认为,这两种药物是通过不同的药理学机制发挥各自的作用从而实现了对胶质瘤细胞的抑制作用:替莫唑胺对胶质瘤细胞的杀伤是通过其细胞毒性作用,而沙利度胺则发挥其抗血管生成作用而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[7]</sup>。本实验室的前期相关研究发现,将沙利度胺单独加入经体外培养的恶性胶质瘤细胞培养液中,对胶质瘤细胞的生长几无影响,但

若同时加入替莫唑胺和沙利度胺共同进行体外培养时,肿瘤细胞生长抑制现象则明显强于单独加入替莫唑胺<sup>[7]</sup>。因为血管生成效应对经体外培养的肿瘤细胞的生长无明显影响,由此我们推测,沙利度胺可能通过一定的分子药理学途径加强替莫唑胺的肿瘤细胞杀伤效应。

自噬性死亡(apoptotic cell death)是以细胞自噬为基础的一种死亡方式,与凋亡一并称为“程序性死亡(PCD)”。虽然两种程序性死亡都是受细胞内信号转导通路的调控,但其发生机制、发生过程和细胞形态改变方面存在明显差异。Kanzawa等<sup>[8]</sup>认为,替莫唑胺是通过诱导肿瘤细胞发生自噬性死亡而非凋亡达到杀伤肿瘤细胞的目的。因此我们设想,沙利度胺可能通过某些药理学机制增强替莫唑胺诱导的自噬性死亡,与此同时,两种药物联合应用亦促进了肿瘤细胞发生凋亡的过程。自噬过程,就是将细胞质蛋白质分割成可降解的成分,降解过程须依赖溶酶体的参与方能完成,由于溶酶体是富含酸性水解酶的消化性细胞器,故自噬的另一特征是酸性囊性细胞器的形成和增加。鉴于此,我们采用活细胞吖啶橙染色以检测和定量酸性囊性细胞器。之所以选择吖啶橙,是由于该染料为一

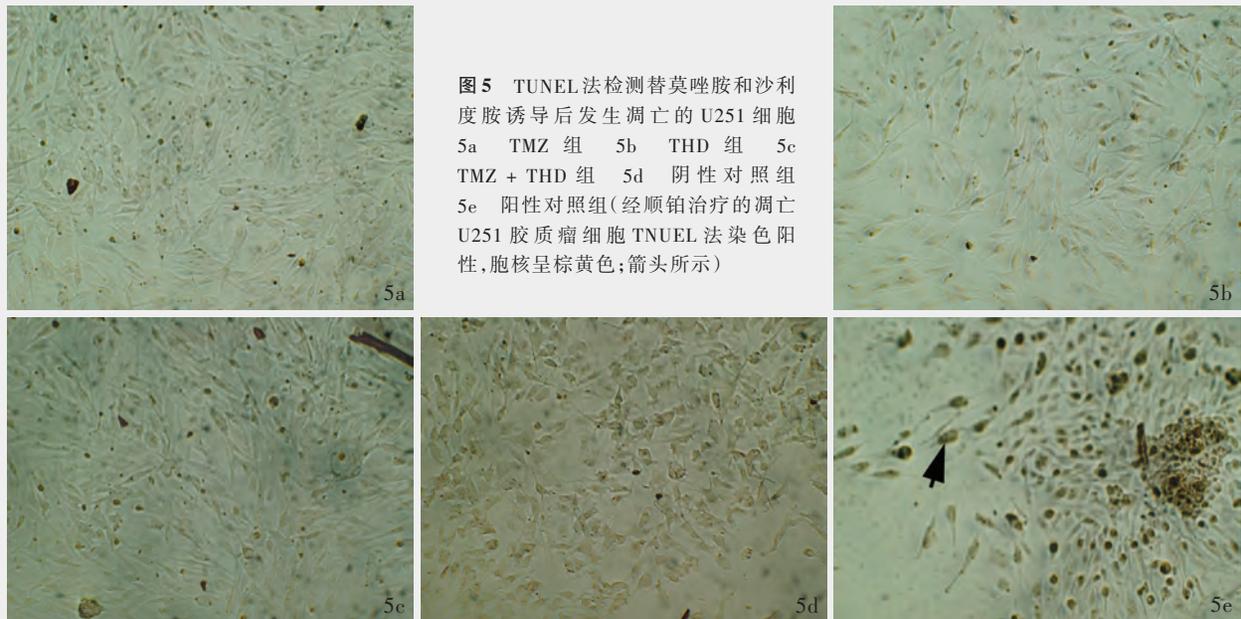


图5 TUNEL法检测替莫唑胺和沙利度胺诱导后发生凋亡的U251细胞  
5a TMZ组 5b THD组 5c TMZ + THD组 5d 阴性对照组  
5e 阳性对照组(经顺铂治疗的凋亡U251胶质瘤细胞TUNEL法染色阳性,胞核呈棕黄色;箭头所示)

表3 不同抗肿瘤药物处理组凋亡细胞数目的比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本例数(视野)	凋亡细胞	F值	P值
TMZ组	10	4.31 ± 2.01		
THD组	10	4.97 ± 1.94		
TMZ + THD组	10	38.38 ± 4.84	209.366	0.000
阴性对照组	10	3.39 ± 2.42		
阳性对照组	10	31.25 ± 4.29		

表4 不同抗肿瘤药物处理组MAP1LC3和Caspase-3表达水平的比较( $\bar{x} \pm s, \text{灰度值}$ )

组别	样本例数	MAP1LC3	Caspase-3
溶媒对照组	3	0.23 ± 0.08	0.54 ± 0.09
TMZ组	3	1.54 ± 0.11	1.82 ± 0.17
THD组	3	0.46 ± 0.14	0.73 ± 0.25
TMZ + THD组	3	2.10 ± 0.09	0.82 ± 0.08

表5 不同抗肿瘤药物处理组MAP1LC3和Caspase-3表达水平的析因设计方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F值	P值
<b>MAP1LC3</b>					
TMZ组	18.720	2	9.360	65.194	0.000
THD组	0.012	2	0.006	1.861	0.051
TMZ + THD组	28.159	2	14.079	574.462	0.000
误差	0.263	8	0.032		
<b>Caspase-3</b>					
TMZ组	0.134	2	0.067	0.968	0.180
THD组	0.082	2	0.041	1.134	0.220
TMZ + THD组	19.234	2	9.617	213.467	0.000
误差	0.097	8	0.010		

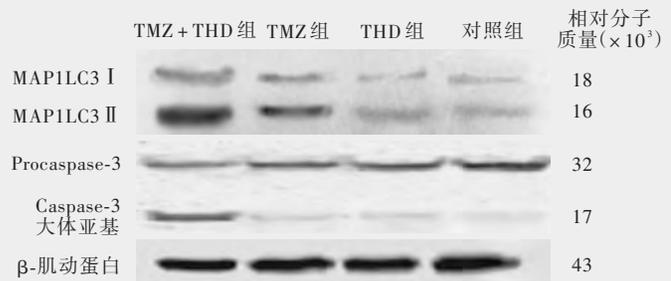


图6 Western blotting法检测MAP1LC3及Caspase-3在不同抗肿瘤药物处理组的表达变化,各处理组中以TMZ + THD组表达水平最高,THD组最低

种溶酶体趋向性制剂,当它不带电荷时可以自由通过生物膜,在发生自噬细胞的内在酸性条件下,吖啶橙可以质子化并在酸性的囊腔中聚集,其激发滤光片波长约为488 nm,阻断滤光片波长为515 nm,经激发后发出亮红色的荧光<sup>[9,10]</sup>。检测吖啶橙染色

的酸性囊性细胞器,是一种定量检测自噬的可靠方法。目前至少已经分离鉴定出27种参与自噬的特异性基因,统称为Atg(autophagy related gene)基因,另外还有50余种相关基因。在这些基因中,MAP1LC3(简称LC3)是参与哺乳动物自噬的重要基

因之一。*LC3* 需首先经历泛素化翻译后修饰过程,再定位于自噬体膜表面。哺乳动物的 *LC3* 合成后,在 Atg4 同源物的催化下其羧基末端(C 末端)5 个氨基酸残基被切割下来,暴露出 C 末端的甘氨酸残基。这种经过加工的 *LC3* 称为 *LC3-I*,定位于细胞质中。之后,*LC3-I* 在哺乳动物 E1 泛素化酶 Atg7 和 E2 泛素化酶 Atg3 的催化下,与自噬囊泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)相结合,称为 *LC3-II*,在电泳过程中,*LC3-II* 的迁移速度快于 *LC3-I*。因此,*LC3* 的免疫印迹检测通常可出现两条电泳条带:*LC3-I* 的表观相对分子质量为  $18 \times 10^3$ ; *LC3-II* 的表观相对分子质量为  $16 \times 10^3$ <sup>[11]</sup>。*LC3-II* 数目的多少与自噬囊泡数目成正比,当哺乳动物体细胞发生自噬时,细胞内 *LC3* 及 *LC3-I* 向 *LC3-II* 的转化均明显增加,因此,通过检测细胞内 *LC3-II* 数目的变化,可以判断肿瘤细胞状态,以及其自噬是被诱导还是被抑制。

在细胞和基因水平对肿瘤细胞自噬进行研究的同时,在本研究中,我们还对经药物处理后的肿瘤细胞凋亡进行了检测,在翻译水平,我们将 *caspase-3* 作为反映细胞凋亡发生程度的目标基因。*Caspases* 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,其激活和超常表达均可引起细胞凋亡,因此又称为死亡蛋白酶,可通过与众多蛋白质因子的相互作用而调控细胞凋亡<sup>[12]</sup>。在已发现的 14 个家族成员中,*Caspase-3* 处于凋亡有序级联反应的下游,是 *Caspases* 家族中最重要的凋亡执行者之一,作为多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,*Caspase-3* 的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志。*Caspase-3* 可以通过 Fas 介导的死亡信号转导途径,降解凋亡抑制蛋白 Bcl-2。*Caspase-3* 被 *Caspases* 家族上游成员激活并水解为活性酶形式,形成级联反应,催化参与 DNA 修复的聚 ADP-核糖聚合酶(PARP)的裂解,同时细胞外基质接触位点 DFF、CAD 等核酸内切酶的活化,可使 DNA 在核小体连接处被切割,产生成倍于 180~200 bp 大小的 DNA 片段;进而裂解细胞的关键结构蛋白和管家蛋白,使细胞失去正常形态和位于细胞-细胞、细胞-细胞外基质接触位点上的 VMEKK-1、FAK 等蛋白激酶失活,细胞失去与环境之间的联系,进一步加速凋亡进程<sup>[13-16]</sup>。在正常状况下,细胞质中的 *Caspase-3* 无活性,以 Procaspase-3 形式存在;当细胞接受凋亡刺激时,它被系列反应所激活,进而诱导细胞发生凋亡。

本实验结果显示,经体外培养的 U251 胶质瘤细

胞予以沙利度胺联合替莫唑胺治疗后,可通过上调 MAP1LC3 表达水平而诱导肿瘤细胞发生增强的自噬性死亡;与此同时,两种药物联合应用还可通过激活肿瘤细胞 *Caspase-3* 的表达,促进细胞凋亡。通过上述两种形式促进和增强程序性细胞死亡作用,沙利度胺联合替莫唑胺可使肿瘤细胞周期阻滞于  $G_0 \sim G_1$  期,明显抑制肿瘤细胞的增殖。本研究初步揭示了沙利度胺联合替莫唑胺杀伤 U251 胶质瘤细胞的体外机制。

#### 参 考 文 献

- [1] Prados MD, Levin V. Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol*, 2000, 27(3 Suppl 6):1-10.
- [2] Gottardo NG, Gajjar A. Chemotherapy for malignant brain tumors of childhood. *J Child Neurol*, 2008, 23:1149-1159.
- [3] Shingu T, Fujiwara K, Böglér O, et al. Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int J Cancer*, 2009, 124:1060-1071.
- [4] Ulasov IV, Sonabend AM, Nandi S, et al. Combination of adenoviral vivo therapy and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through autophagic and apoptotic cell death in vivo. *Br J Cancer*, 2009, 100:1154-1164.
- [5] Spiegel BM, Esrailian E, Laine L, et al. Clinical impact of adjuvant chemotherapy in glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *CNS Drugs*, 2007, 21:775-787.
- [6] Hart MG, Grant R, Garside R, et al. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008, 8:CD007415.
- [7] 潘强, 杨学军, 高松, 等. 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] Kanzawa T, Germano IM, Komata T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*, 2004, 11:448-457.
- [9] Zhang H, Kong X, Kang J, et al. Oxidative stress induced parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol Sci*, 2009, 110:376-388.
- [10] Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*, 2003, 63:2103-2108.
- [11] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 9:5720-5728.
- [12] Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjection with active caspase-3, -6, -7 and -8. *J Neurosci*, 2000, 20:8384-8389.
- [13] Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:6252-6256.
- [14] Ge P, Luo Y, Fu S, et al. Autophagy: a strategy for malignant gliomas' resistance to therapy. *Med Hypotheses*, 2009, 73:45-47.
- [15] Tiwari M, Bajpai VK, Sahasrabudhe AA, et al. Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced autophagy at a lower dose enhances cell death in malignant glioma cells. *Carcinogenesis*, 2008, 29:600-609.
- [16] Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, et al. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol*, 2007, 31:753-760.

(收稿日期:2010-07-03)