

【基础研究】

通信作者:靳 峰(1973-),男,山东济宁人,博士,主任医师,教授,研究方向:显微神经外科与肿瘤干细胞研究;E-mail: jinfengsdjn@163.com。

提供新的方法及思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 胶质瘤 TJ905 细胞来源于人脑 GBM,由天津肿瘤医院赠送;达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle media;nutrient mixture F-12, DMEM/F12)(1:1)、双抗购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购于碧云天生物技术研究;MK3 型酶标仪购于美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 TJ905 细胞培养 TJ905 细胞在含 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胎牛血清、青霉素 $100\times 10^3\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和链霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMEM 完全培养基中,将 TJ905 细胞以每瓶 2×10^5 个接种于底面积为 25 cm^2 的透气细胞培养瓶中进行单层培养,加入含 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胎牛血清培养基 3 mL (在 DMEM/F12 的培养基中加入胎牛血清 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、青霉素 $100\times 10^3\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和链霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中,连续单层培养。每日显微镜观察细胞生长情况,隔日更换培养液,当肿瘤细胞呈对数生长期时(铺满培养瓶底约 80% 时)即可传代,如此循环培养至所需的细胞数^[5]。

1.3 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性 单层培养的 TJ905 细胞接种于 96 孔板,每孔 $5\ 000$ 个($100\text{ }\mu\text{L}$),血清培养基培养 24 h 后吸掉 96 孔板中的培养基,加入 DMEM/F12 $100\text{ }\mu\text{L}$, 24 h 后弃掉 96 孔板中的 DMEM/F12,按实验设计每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 配制的不同浓度的 TMZ(血清培养基 + TMZ),TMZ 浓度为 0 、 50 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为对照组,用 DMEM/F12 代替),每组设 3 个复孔,药物分别干预 24 、 48 、 72 h ,并分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ DMEM/F12 + CCK-8 液(DMEM/F12 : CCK-8 = $10:1$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育 2 h 后,用酶标仪检测每孔吸光度值,每个检验重复 3 次,检测波长 450 nm ,参照波长 630 nm 。

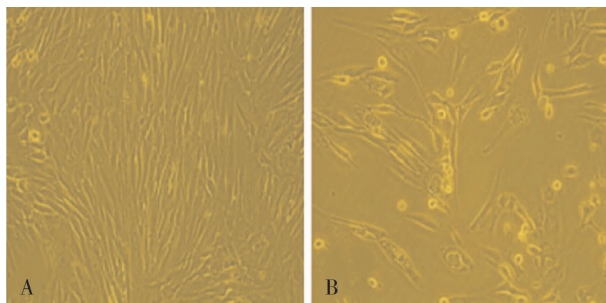
1.4 细胞划痕实验 选单层培养的 TJ905 细胞接种于 6 孔板,每孔 2×10^5 个(2 mL)正常培养,待单层细胞长满培养板底面积约 80% 时,用无菌消毒的加液器枪头($10\text{ }\mu\text{L}$)均匀做划痕,并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)轻柔冲去细胞碎片,使用无血清培养液培养 24 h 后,更换细胞培养

液(含胎牛血清的 DMEM/F12),实验组培养液含 TMZ 浓度为 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对照组不加 TMZ,继续培养 24 、 48 、 72 h ,每组设 5 个平行孔,在倒置显微镜下观察,测量细胞迁移的程度,照相记录并计算迁移度,迁移度($\%$) = (划痕时两侧距离 - 检测时两侧距离) / 划痕时两侧距离 $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理 所有实验数据均 3 次平行实验取平均值获得。应用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMZ 对 TJ905 细胞形态的影响 结果见图 1。TMZ 干预 6 孔板中的 TJ905 细胞 72 h 后于倒置显微镜下观察,结果显示,未经 TMZ 干预的 TJ905 细胞生长状态良好,铺满孔底,呈贴壁生长,细胞结构完整,胞体呈圆形、多角形、椭圆形等。 0 、 50 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 干预 TJ905 细胞后观察发现,随药物浓度的升高,细胞的密度开始降低,细胞形态也发生变化,细胞出现皱缩,增殖受到明显抑制,并可见少量散在的细胞碎片;随着药物干预时间的增加,TJ905 细胞形态发生变化逐渐明显,贴壁的细胞呈圆形,少量细胞开始悬浮,细胞密度较前更低,细胞增殖受到抑制更加明显,并可见大量的散在细胞碎片。



A:正常培养的 TJ905 细胞;B: $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 干预 TJ905 细胞 72 h 。

图 1 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 对 TJ905 细胞形态的影响($\times 200$)

Fig.1 Effect of $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ on morphology of TJ905 cells($\times 200$)

2.2 TMZ 对 TJ905 细胞生长的抑制作用 结果见表 1。TJ905 细胞经不同浓度的 TMZ 干预 24 、 48 、 72 h 后,经 CCK-8 试剂盒检测发现,在相同药物干预时间的条件下,随着培养液中 TMZ 浓度的增加,TJ905 细胞的存活率逐渐降低($P < 0.05$);在相同药物浓度条件下,TJ905 细胞存活率随 TMZ 干预时间的延长而降低($P < 0.05$)。

表1 TMZ 对 TJ905 细胞存活率的影响

Tab.1 Effect of TMZ on survival rate of TJ905 cells ($\bar{x} \pm s$)

TMZ 浓度	TJ905 细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	97.23 \pm 5.50 ^a	72.49 \pm 10.24 ^{ae}	56.40 \pm 8.73 ^{aef}
100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	79.78 \pm 11.17 ^{ab}	65.37 \pm 6.22 ^{abe}	46.34 \pm 4.39 ^{abef}
200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	60.45 \pm 15.99 ^{abc}	48.59 \pm 12.33 ^{abce}	30.21 \pm 9.94 ^{abcef}
400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	51.66 \pm 13.85 ^{abcd}	39.16 \pm 8.79 ^{abcde}	26.83 \pm 6.71 ^{abcdef}

注:与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较^a $P < 0.05$;与 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较^b $P < 0.05$;与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较^c $P < 0.05$;与 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较^d $P < 0.05$;与 24 h 比较^e $P < 0.05$;与 48 h 比较^f $P < 0.05$ 。

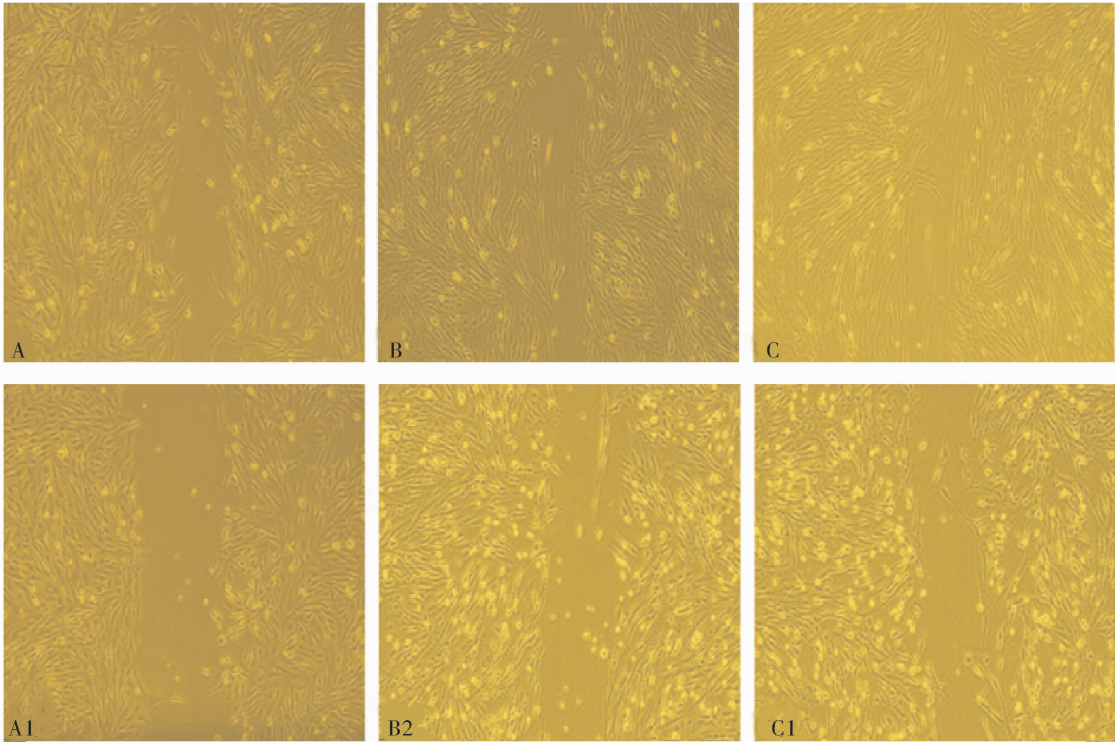
2.3 TMZ 对 TJ905 细胞迁移的抑制作用 结果见表 2、图 2。细胞划痕实验显示,400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

TMZ 能抑制 TJ905 细胞的迁移能力,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组相比,400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 能明显降低 TJ905 细胞的迁移度。划痕后的 TJ905 细胞在含 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 血清培养基中培养 24、48、72 h 后 TJ905 细胞迁移度均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 对 TJ905 细胞迁移的影响
Tab.2 Effect of 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ on migration ability of TJ905 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	TJ905 细胞迁移度/%		
	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	50.36 \pm 1.01	64.35 \pm 1.25	75.13 \pm 0.87
400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	7.14 \pm 0.58 ^a	21.19 \pm 0.86 ^a	38.02 \pm 0.61 ^a

注:与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较^a $P < 0.05$ 。



A、B、C:TJ905 细胞划痕 24、48、72 h;A1、B1、C1:TMZ 干预 TJ905 细胞划痕 24、48、72 h。

图2 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 对 TJ905 细胞迁移能力的影响($\times 100$)

Fig.2 Effect of 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ on migration ability of TJ905 cells($\times 100$)

3 讨论

人胶质瘤 TJ905 细胞株与人实质肿瘤性质相似,是研究胶质瘤常用的细胞株;通常细胞增殖与细胞程序性凋亡是正常的生理过程,其维持在一个平衡状态,如果能够调节细胞增殖与凋亡之间的平衡,则可对肿瘤的生长进行有效干预,因此,可通过干预细胞增殖及程序性凋亡等途径对肿瘤进行治疗^[6]。诱导细胞凋亡是杀灭肿瘤细胞的主要机制之一^[7]。

目前 TMZ 已经成为治疗恶性胶质细胞瘤标准

手段的一部分,TMZ 是烷化剂类抗肿瘤药物,能高效通过血-脑脊液屏障,在脑组织、脑脊液的浓度可达到血浆浓度的 30% ~ 40%^[8]。与传统的化学治疗药物相比,TMZ 细胞毒性主要是对 DNA 链的甲基化作用,引起 DNA 单链或双链断裂,阻断 DNA 复制,导致肿瘤细胞死亡^[9-10]。TMZ 不会引起 DNA 链的化学交联,对造血祖细胞的细胞毒性较低,降低了对机体的毒副作用^[11]。

本实验结果显示,TJ905 细胞在不受药物干预的情况下培养不同时间后进行 CCK-8 检测,细胞生

长不受抑制;TJ905 细胞在 TMZ 干预下生长受到抑制,TJ905 细胞活性与培养时间呈依赖关系。在相同药物浓度条件下,随着药物干预时间的增加,TJ905 细胞受到抑制作用越强,细胞裂解越严重。在相同干预时间条件下,随着干预药物浓度的增加,TJ905 细胞受到抑制作用、细胞裂解程度越明显。通过划痕实验证实,TJ905 细胞在含有 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 培养液中培养 24、48 和 72 h 后细胞迁移度均低于对照组,说明 TMZ 能够抑制 TJ905 细胞的生长。

对于 TMZ 抑制 TJ905 细胞活性及迁移性的机制尚不明确。研究发现,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)对胶质瘤细胞的侵袭及转移起关键作用,因为这类酶能够分解细胞外基质中的各种蛋白,破坏组织学屏障,从而利于肿瘤细胞的侵袭^[12-13],因此抑制肿瘤细胞 MMPs 的活性,有利于抑制胶质瘤细胞的侵袭及扩散。有研究发现,TMZ 能够通过抑制 MMPs 活性进一步起到抑制胶质瘤迁移的作用^[14]。关于 TMZ 对胶质瘤 TJ905 细胞的迁移、生长抑制作用的确切分子机制还需继续探索。

综上所述,TMZ 能抑制人脑胶质瘤 TJ905 细胞的增殖活性及迁移能力,能有效促进细胞凋亡,为 TMZ 应用于胶质瘤临床化学治疗提供了直接理论依据。

参考文献:

[1] Xu L W, Chow K K, Lim M, *et al.* Current vaccine trials in glioblastoma: a review[J]. *J Immunol Res*, 2014, 10(1155): 796-804.

[2] 何远志, 徐国政. 塞来昔布联合替莫唑胺对胶质瘤 U251 细胞作用研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(5): 285-288.

[3] Zou Y, Wang Q, Li B, *et al.* Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 411-416.

[4] Sai K, Li W Y, Chen Y S, *et al.* Triptolide synergistically enhances

temozolomide-induced apoptosis and potentiates inhibition of NF- κ B signaling in glioma initiating cells[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(2): 485-503.

[5] Chang L, Su J, Jia X, *et al.* Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 12(7): 235-244.

[6] 梁俊君, 黄韶华, 董征学, 等. 汉黄芩素对胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡、Survivin 及 Caspase-3 表达的影响[J]. *中国现代医生*, 2013, 15(51): 5-7.

[7] 牛慧彦, 王鑫, 张萌, 等. 雷帕霉素联合多西紫杉醇对肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(1): 23-25.

[8] 张东勇, 吴安华, 王运杰, 等. 替莫唑胺抑制胶质瘤细胞系 U251 体外侵袭能力的研究[J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2013, 11(2): 108-112.

[9] Pyko I V, Nakada M, Sabit H, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O⁶-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(10): 2206-2217.

[10] Lam N, Chambers C R. Temozolomide plus radiotherapy for glioblastoma in a Canadian province: efficacy versus effectiveness and the impact of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase promoter methylation[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2012, 18(2): 229-238.

[11] Ortiz L D, Syro L V, Scheithauer B W, *et al.* Temozolomide in aggressive pituitary adenomas and carcinomas[J]. *Clinics*, 2012, 67(1): 119-123.

[12] Lindroos J, Husa J, Mitterer G, *et al.* Human but not mouse adipogenesis is critically dependent on LMO3[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 62-74.

[13] Roomi M W, Kalinovskiy T, Niedzwiecki A, *et al.* Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2): 887-894.

[14] Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, *et al.* Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(4): 457-467.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:杨 博)