

. 实验研究 .

# 阿苯达唑抑制胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长

胡 玥 薛小燕 李子超 罗晓星 毛星刚

**【摘要】目的** 探讨阿苯达唑(ABZ)对胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长的影响。**方法** 将术中获取的胶质母细胞组织消化为单细胞悬液用无血清干细胞培养基进行培养胶质母细胞瘤干细胞(GSC),用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养胶质瘤细胞系U87、U251、U172,以25、50、100、200 ng/ml的终浓度ABZ作用细胞,采用MTT法检测细胞增殖。右侧腋窝皮下注射0.2 ml( $5 \times 10^6$ 个细胞)GSC及U87细胞悬液构建胶质瘤裸鼠模型,将30只胶质瘤裸鼠模型随机分为6组,GSC和U87细胞移植各3组,每种移植瘤模型均分为模型组(腹腔注射等体积DMSO)、低剂量ABZ组(腹腔注射ABZ,50 mg/kg)、高剂量ABZ组(腹腔注射ABZ,100 mg/kg)。定时测量肿瘤长径与短径,计算肿瘤体积;PCR法和免疫印迹法检测裸鼠肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)mRNA和蛋白表达水平。**结果** ABZ对GSC、U87、U251和A172细胞生长均具有明显抑制效果( $P < 0.05$ ),而且抑制效果具有浓度依赖性( $P < 0.05$ ),浓度 $> 50$  ng/ml抑制效果较好。腹腔注射ABZ后,高剂量和低剂量ABZ组移植瘤体积增长较对照组均明显减慢( $P < 0.05$ )。高剂量ABZ组和低剂量ABZ组肿瘤VEGF mRNA和蛋白表达水平较对照组均明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** ABZ可以抑制胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长,可能与抑制肿瘤细胞增殖和血管生成有关。

**【关键词】** 胶质母细胞瘤;细胞增殖;血管生成;肿瘤生长;阿苯达唑;裸鼠移植瘤模型

**【文章编号】** 1009-153X(2019)06-0348-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

## Albendazole inhibits tumor growth in nude mice model of glioma

HU Yue<sup>1</sup>, XUE Xiao-yan<sup>1</sup>, LI Zi-chao<sup>2</sup>, LUO Xiao-xing<sup>1</sup>, MAO Xing-gang<sup>2</sup>. 1. Department of Pharmacology, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of albendazole (ABZ) on tumor growth in nude mice model of glioma. **Methods** The glioblastoma tissue obtained during the operation was digested into single cell suspension and cultured in serum-free glioblastoma stem cell (GSC) medium. The glioma cell lines U87, U251, and U172 were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum. All the cultured cells were treated with ABZ with a final concentration of 25, 50, 100, 200 ng/ml, respectively. The proliferation rates of cultured cells were detected by MTT assay. The nude mice model of glioma was established using subcutaneous injection of 0.2 ml ( $5 \times 10^6$  cells) GSC and U87 cells suspension into the right armpit. Thirty nude mice models were randomly divided into 6 groups, 3 groups of GSC and 3 groups of U87. Each transplantation model was divided into model group (intraabdominal injection of equal volume DMSO), low dose ABZ group (intraabdominal injection of ABZ, 50 mg/kg) and high dose ABZ group (intraabdominal injection of ABZ, 100 mg/kg). The long diameter and short diameter of the tumor were measured regularly to calculate the tumor volume, and the mRNA and protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissues of nude mice were detected by PCR and immunoblotting, respectively. **Results** ABZ had a significant inhibitory effect on the growth of GSC, U87, U251 and A172 cells in a concentration-dependent manner, and the inhibitory effect was better when the concentration was more than 50 ng/ml. After intraabdominal injection of ABZ, the growth of tumor volume in high dose and low dose ABZ group was significantly slower than that in control group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of VEGF mRNA and protein in high dose and low dose ABZ groups were significantly lower than those in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ABZ can inhibit the growth of glioma in nude mice, which may be related to the inhibition of tumor cell proliferation and angiogenesis of tumor.

**【Key words】** Glioblastoma; Albendazole; Angiogenesis; Cell proliferation; Nude mice

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.06.010

基金项目:国家自然科学基金(81671302;51675411);空军军医大学基金(2018JSTS05)

作者单位:710032 西安,空军军医大学药理学教研室(胡玥、薛小燕、罗晓星);710032 西安,空军军医大学西京医院神经外科(李子超、毛星刚)

通讯作者:罗晓星,E-mail:xxluo@fmmu.edu.cn

毛星刚,E-mail:xingmao@163.com

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人最常见的原发性恶性脑肿瘤,呈浸润性生长,手术难以完全切除,具有放、化疗抵抗性,易复发,预后差。目前,手术联合术后放、化疗综合治疗的中位生存期在12~15个月<sup>[1]</sup>。缺氧是GBM形成致瘤性、生成血管及进行肿瘤代谢的前提<sup>[1]</sup>。我们采用Lamb等<sup>[2]</sup>报道的生物信息学分析方法,以缺氧为靶点筛选小分子药物,发现阿苯达唑(albendazole, ABZ)是针对GBM缺

氧反应分子网络的潜在治疗药物。本文通过胶质瘤细胞系体外培养以及胶质瘤裸鼠模型,探讨ABZ对胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长的影响,为临床利用ABZ辅助治疗GBM提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 ABZ对胶质瘤细胞增殖的作用** 根据参考文献[3,4]进行胶质瘤干细胞(glioblastoma stem cell, GSC)的培养:将术中获取的GBM组织消化为单细胞悬液,用无血清干细胞培养基[含DMEM-F12、表皮生长因子(20 ng/ml)、碱性成纤维细胞生长因子(20 ng/ml)、B27(1:50);美国Invitrogen公司]培养传代,出现不贴壁的、呈神经球样的细胞,为GSC。人脑胶质瘤细胞U87、U251、A172(北京百欧博伟生物技术有限公司)用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。

用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解ABZ并稀释后,以25、50、100、200 ng/ml的终浓度加入到细胞培养液中,并在细胞换液时重新加入药物,以维持药物浓度。对照组加入等体积的DMSO。

将上述培养的细胞接种于96孔板,每种细胞接种5 000个。接种0、2、4、7 d,加入MTT溶液(美国Promega公司)孵育1 h,检测499 nm吸光度值,每组重复3次,绘制相应的生长曲线。

**1.2 ABZ对移植瘤生长的影响** 将0.2 ml( $5 \times 10^6$ 个细胞,用台盼蓝染色法确定细胞存活率在90%以上)GSC及U87细胞悬液注射于裸鼠右侧腋窝皮下。将30只移植瘤裸鼠模型随机分成6组,每组各5只, GSC模型和U87模型各3组。每种移植瘤模型均分为模型组(腹腔注射等体积DMSO)、低剂量ABZ组(腹腔注射ABZ, 50 mg/kg)、高剂量ABZ组(腹腔注射ABZ, 100 mg/kg)。隔天给药一次,共给药4周。每隔3天,用游标卡尺测量肿瘤的最大长径(a)和与其垂直的最大短径(b),计算肿瘤体积= $ab^2/2$ <sup>[5]</sup>。观察至8周,采取过量麻醉药物处死裸鼠,分离肿瘤组织并放入-80℃低温冰箱保存备用。

**1.3 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA水平检测** 采取实时定量PCR检测肿瘤组织VEGF mRNA表达水平。分离裸鼠肿瘤组织,采用Trizol Reagent(美国Invitrogen公司)提取总RNA,逆转录为cDNA,然后利用SYBR在ABI7700PCR仪器上运行PCR,进行定量分析。

**1.4 VEGF蛋白水平检测** 采用免疫印迹法检测肿瘤组织VEGF蛋白表达水平。研磨分离出的裸鼠肿瘤组织,加入RIPA裂解缓冲液,置于摇床裂解1 h后,

离心提取蛋白上清液。蛋白定量后,取30 μg蛋白样品加样到6%聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,后转到硝酸纤维素膜上,用含有0.1% Tween 20的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBST)稀释的脱脂牛奶室温封闭1 h。然后,加入一抗4℃孵育过夜:VEGF(1:500;美国Abcam公司)、内参β-Actin(1:500 000;美国Abcam公司)。再用PBST洗膜3次,每次5 min,用结合有过氧化物酶的二抗孵育。PBST洗涤后用化学发光剂显色。

**1.5 统计学分析** 采用SPSS 13.0软件进行分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ABZ抑制体外培养胶质瘤细胞增殖** 生长曲线结果显示,ABZ对GSC、U87、U251和A172细胞生长均具有明显抑制效果( $P < 0.05$ ),而且抑制效果具有浓度依赖性( $P < 0.05$ ),浓度 $> 50$  ng/ml抑制效果较好。见图1。

**2.2 ABZ抑制裸鼠肿瘤生长** GSC和U87裸鼠移植瘤结果显示,腹腔注射ABZ后,高剂量和低剂量ABZ组移植瘤体积增长较对照组均明显减慢( $P < 0.05$ )。见图2。

**2.3 ABZ下调移植瘤VEGF的表达** PCR和免疫印迹分析结果显示,高剂量ABZ组和低剂量ABZ组肿瘤VEGF mRNA和蛋白表达水平较对照组均明显降低( $P < 0.05$ )。见图3。

## 3 讨论

GBM具有复杂的分子生物学特性,其中较为重要的调控分子包括表皮生长因子、张力蛋白同源的磷酸酶、肿瘤抑制蛋白P53以及VEGF等<sup>[6]</sup>。而在药物治疗方面,血脑屏障阻碍及具有耐药性的CSC的存在会造成GBM的恶化与复发等<sup>[7]</sup>。因此,寻找有效治疗GBM的药物,具有重要的临床价值。

缺氧是GBM细胞微环境中重要因素,参与GBM的多个生物学过程,包括CSC维持、能量代谢调控、细胞增殖、血管发生等,因此GBM缺氧调控分子是重要的治疗靶点<sup>[8]</sup>。其次,缺氧也是血管发生的重要促进因素,尤其是促进血管发生的重要生长因子VEGF,在缺氧环境下表达上升<sup>[9]</sup>。本研究选择阿苯达唑是建立在前期针对GBM缺氧反应分子网路的研究的基础上<sup>[1]</sup>。在小分子库中,我们通过生物信息学分析<sup>[2]</sup>,发现ABZ具有抑制GBM缺氧调控分子的

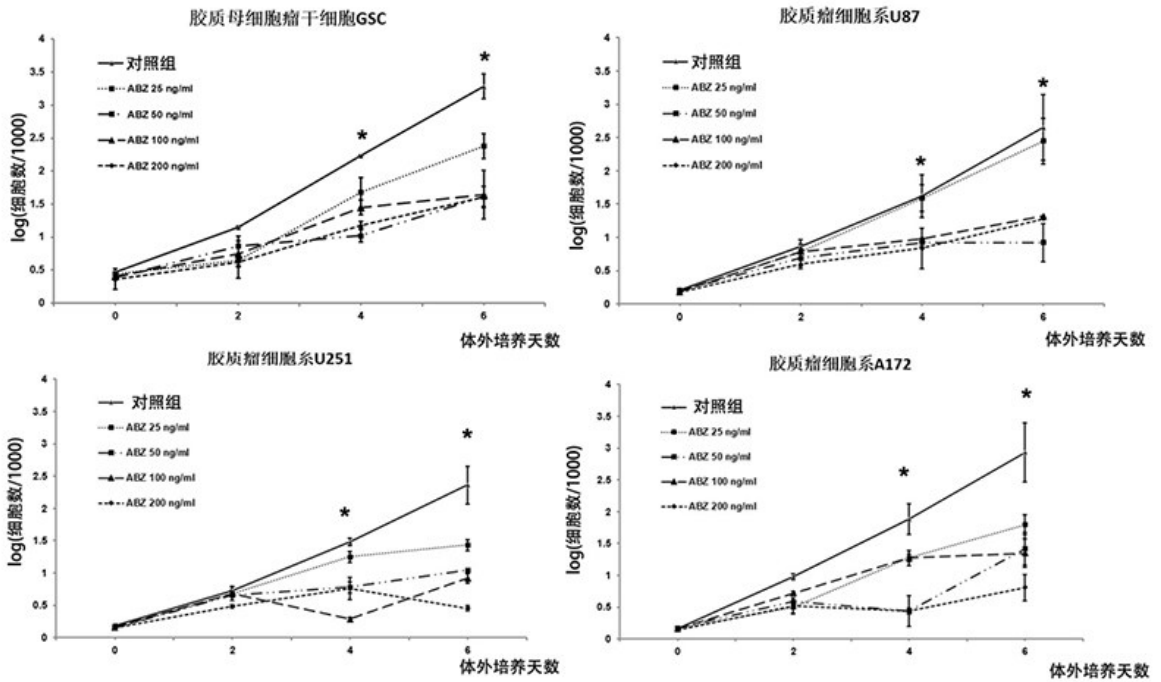


图1 ABZ对胶质母细胞瘤细胞系细胞增殖的影响与对照组相应值比,\* P<0.05;ABZ. 阿苯达唑

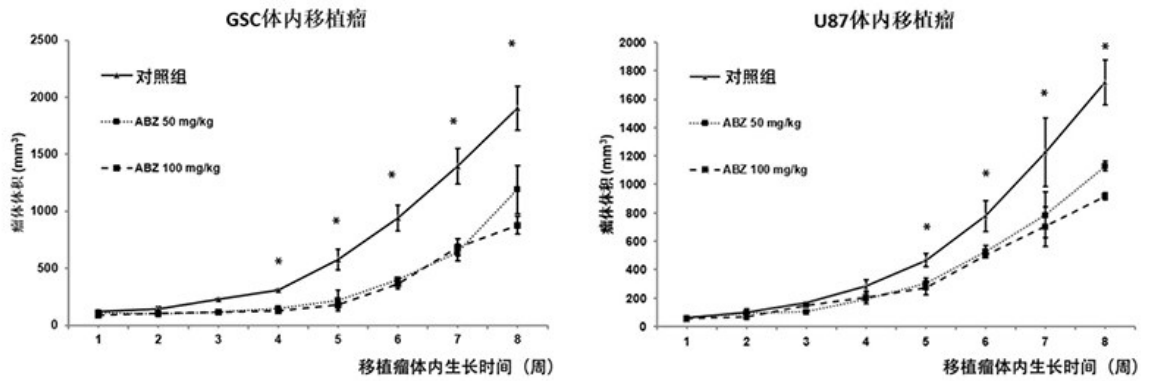


图2 ABZ对胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长的影响与对照组相应值比,\* P<0.05;ABZ. 阿苯达唑;GSC. 胶质瘤干细胞

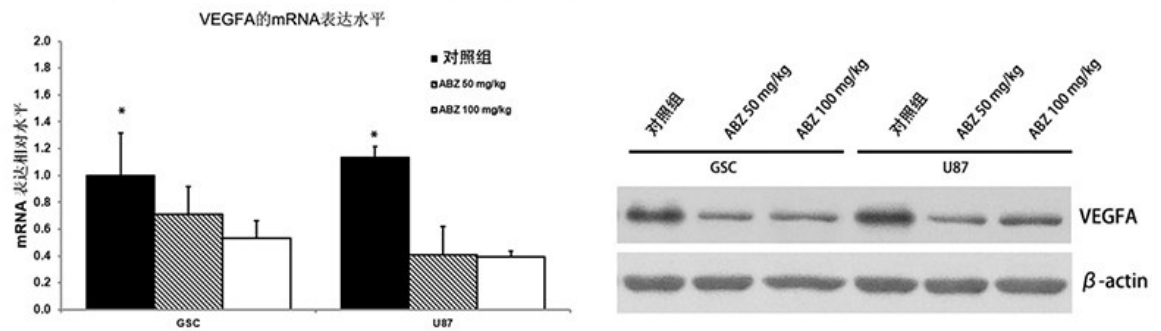


图3 ABZ对胶质瘤裸鼠模型肿瘤VEGF表达的影响与对照组相应值比,\* P<0.05;ABZ. 阿苯达唑;GSC. 胶质瘤干细胞;VEGF. 血管内皮生长因子

作用。本实验结果表明,ABZ具有抑制GBM细胞增殖和VEGF表达的作用。其机制可能与ABZ对缺氧分子及细胞代谢的作用有关。糖原代谢、葡萄糖代谢<sup>[6]</sup>对GBM的发生发展具有重要作用,其中比较重要的一个特征是Warburg效应,指GBM细胞的能量代谢模式,即使在氧份充足的情况下,也倾向于采取无氧糖酵解的方式获取能量,即在葡萄糖代谢过程中,丙酮酸转化为乳糖而非进入三羧酸循环<sup>[7]</sup>。另外,缺氧是导致GBM代谢异常的重要因素,缺氧可通过调控无氧糖酵解过程中的许多关键分子和酶的表达,例如葡萄糖转运体、PFK1、HK2、LDHA等,进一步促进GBM细胞的Warburg效应<sup>[7]</sup>。ABZ作用于细胞的葡萄糖、糖原代谢,因此可通过对葡萄糖、糖原代谢过程的调控最终影响GBM的缺氧反应,从而发挥抑制肿瘤生长及血管发生的作用。

综上所述,ABZ可以抑制胶质瘤裸鼠模型肿瘤生长,可能与抑制肿瘤细胞增殖和血管生成有关。

#### 【参考文献】

- [1] Mao XG, Xue XY, Wang L, *et al.* CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(7): 865-879.
- [2] Lamb J, Crawford ED, Peck D, *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease [J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1929-1935.
- [3] Mao XG, Guo G, Wang P, *et al.* Maintenance of critical properties of brain tumor stem-like cells after cryopreservation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(5): 775-786.
- [4] Mao XG, Zhang X, Xue XY, *et al.* Brain tumor stem-like cells identified by neural stem cell marker CD15 [J]. *Transl Oncol*, 2009, 2(4): 247-57.
- [5] 张芸,纪惜鑫,臧爱民,等.双嵌合抗原受体T细胞靶向治疗恶性胶质瘤的实验研究[J].*中国临床药理学杂志*, 2018, 34(14):1655-1658.
- [6] Agnihotri S, Zadeh G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(2): 160-1672.
- [7] Colwell N, Larion M, Giles AJ, *et al.* Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells [J]. *Neuro-oncology*, 2017, 19(7): 887-896.
- [8] Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(5): 1-13.
- [9] 陈石蕊,李金城,李子超,等.缺氧与脑胶质细胞瘤的抗血管治疗耐药机制[J].*中华神经外科疾病研究杂志*, 2018, 17(4):376-378.

(2019-04-10收稿,2019-05-14修回)