

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.03.004

替莫唑胺对 U251 干细胞细胞周期及细胞增殖的影响*

李根华 张 浩 刘 阳 孔令胜 马辉福 靳 峰

(济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029)

摘 要 **目的** 研究化疗药物 TMZ 对胶质瘤 U251 细胞和 U251 干细胞的细胞周期以及细胞增殖活性的影响。**方法** 从胶质瘤 U251 细胞系中用免疫磁珠法分选出胶质瘤干细胞, CCK-8 检测细胞增殖速度。用不同浓度的化疗药物 TMZ 分别干预 U251 及其干细胞, 分别在干预后 24h、48h、72h 收集细胞, 流式细胞仪检测 U251 及其干细胞的细胞周期变化, CCK-8 检测 TMZ 干预前后细胞增殖变化。**结果** U251 细胞增殖速度明显高于 U251 干细胞。TMZ 能使 U251 细胞的细胞周期停留在 G2/M 期, U251 干细胞则停留在 S 期, 细胞增殖停止。随着药物浓度增高和干预时间的延长, U251 细胞及干细胞细胞周期停滞, 抑制细胞增殖的效果越明显。相同作用时间内同一药物浓度, TMZ 对干细胞的增殖抑制作用弱于 U251 细胞。**结论** TMZ 能有效抑制 U251 及其干细胞, 使细胞周期停滞, 降低胶质瘤细胞及其干细胞的增殖速度, 抑制肿瘤细胞增殖。TMZ 对抑制 U251 细胞增殖的作用强于 U251 干细胞, 这可能是肿瘤耐药的机制不同。

关键词 胶质瘤; 干细胞; TMZ; 细胞周期; 细胞增殖

中图分类号: R739.41 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2013)06-166-05

The effect of temozolomide on cell cycle and proliferation of cancer stem cells isolated from glioblastoma U251 cells

LI Gen-hua, ZHANG Hao, LIU Yang, et al

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To analyse the change of cell cycle and proliferation in the glioblastoma U251 cells and its cancer stem cells with chemotherapy drug temozolomide intervention. **Methods** The cancer stem cells from glioblastoma U251 cells were isolated by using immune magnetic beads. The change of cell cycle and cell proliferation rate was detected by flow cytometric and CCK-8 after the intervention with different drug concentrations (0 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$) at different time points (24h, 48h, 72h). **Results** The CD133+ stem cells speed of cell proliferation was significantly lower than U251 cells in the same time and condition of culture. The cell cycle of U251 cells stayed in the G2/M period and its cancer stem cells stayed in S period respectively after drug temozolomide intervention. The cell proliferation rate was obviously inhibited with the increasing of drug concentration and intervention time. But the cell proliferation inhibition of stem cells was weaker than U251 cells under the same drug concentration and the same intervention time. **Conclusion** The cell cycle and cell proliferation speed were inhibited after intervention with temozolomide, but the inhibition was stronger in U251 cells than stem cells after TMZ intervention with the same condition, which may be the different mechanism of drug resistance between U251 cells and stem cells.

Key words: Glioma; Stem cells; TMZ; Cell cycle; Cell proliferation

多形性胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是中枢神经系统最常见的原发肿瘤,即使

采用多种治疗手段,包括手术、放疗和化疗,其预后仍极差,生存时间小于 12 个月^[1]。尽管近期研究显示,以替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)为基础的放化疗能使患者病情得到明显的改善,但经此类治疗的患者无进展期生存时间仅有 7.9 个月,全期生存时间也仅有 14.6 个月^[2]。我们实验的主要目的

* [基金项目] 国家自然科学基金项目资助(批准号:81071779);山东省中青年科学家科研奖励基金资助(批准号:BS2010YY006)

△ [通信作者] 靳峰, E-mail: jinfengsdjn@163.com

是研究化疗药物 TMZ 对胶质瘤 U251 细胞及其干细胞的细胞周期的影响,找出 TMZ 抑制肿瘤细胞及干细胞增殖的规律,为胶质瘤的治疗提供新的方法和思维。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

胶质瘤细胞 U251 来源于人脑多形性胶质母细胞瘤,购买于中国典型培养物保藏中心;改良 Eagle 培养基(DMEM/F12)(1:1)培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清 PI 试剂盒购自杭州四季青公司;表皮生长因子(EGF);碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),白血病抑制因子(LIF)均购自美国 Pepro Tech 公司;胰蛋白酶(trypsin);B27 由 Gibco 公司生产;兔抗人 CD133 抗体;免疫磁珠(CD133⁺)细胞分选试剂盒为德国 Miltenyi Biotec 公司产品;CCK-8 试剂盒购于日本同仁化学研究所;Multiskan 酶标仪为 Thermo 公司产品。

1.2 细胞培养方法

1.2.1 血清培养基 U251 细胞在含有 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml 和链霉素 100μg/ml 的 DMEM/F12 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中连续培养。

1.2.2 无血清培养基 选取对数生长期的 U251 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化 5min,10% 胎牛血清培养基中和终止消化,滴管反复轻轻敲打贴壁细胞使其脱落成单细胞悬液,收集单细胞悬液至试管,1000r/min,离心 5min,弃掉上清液,DMEM/F12 重悬细胞漂洗 1 遍,1000r/min,离心 5min,弃掉上清液,收集细胞接种到含有 EGF(20ng/ml)、bFGF(20ng/ml)、LIF(10ng/ml)、B27(1×)的 DMEM/F12 无血清培养基中^[3-4],置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中连续培养,待其培养 7~9d,形成细胞球样细胞球,胰酶消化后,200 目滤网过滤制成单细胞悬浮液,计数后参照课题组之前使用免疫磁珠试剂盒分选方法^[5],加入 CD133 试剂,4℃ 孵育 30min,分选出 CD133⁺ 细胞,并将分选出的细胞用无血清培养基培养。

1.3 细胞增殖活性及 TMZ 细胞毒性检测

按照实验设计分组,提前 24h 在 96 孔板接种 U251 细胞 10000 个/孔,U251 干细胞 10000 个/孔,次日吸掉 96 孔板培养基后按上述设计每孔加 100μl 配制的 TMZ 培养基(U251 为血清培养基+

TMZ,U251 干细胞为干细胞培养基+TMZ),TMZ 浓度分别为空白对照、25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L、400μmol/L(空白对照为 DMSO 代替 TMZ),每孔设 2 个副孔。分别在 TMZ 干预 24h、48h、72h 后弃掉培养基,每孔加 100μl 配制好的 CCK-8(DMEM/F12:CCK-8=9:1),37℃ 温箱孵育 90min,上机检测,检测波长 450nm,参照波长 630nm。

1.4 细胞周期检测

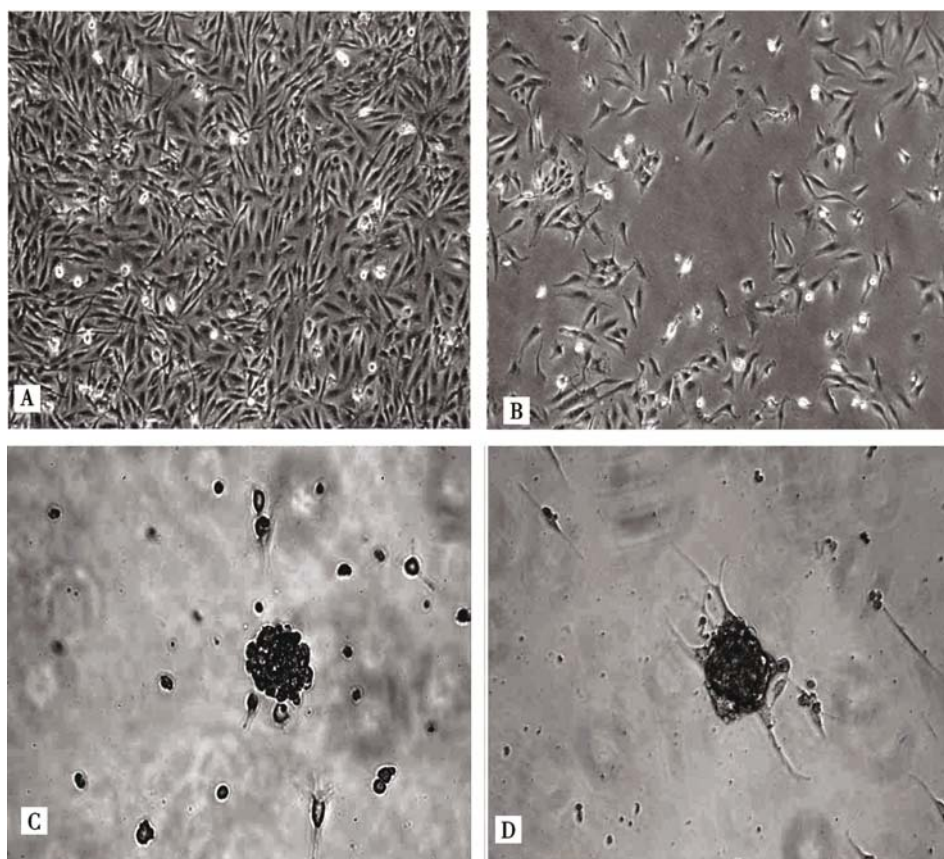
按照上述实验设计分组,U251 干细胞球胰酶消化、血清中和后制成单细胞悬浮液,收集细胞,1000r/min,离心 5min,弃掉上清。加入预冷 1× PBS 漂洗 1 遍。加 70% 酒精轻轻吹打均匀固定 4℃ 过夜,次日离心弃掉酒精,PBS 漂洗 1 遍,弃掉上清,每步可残留约 50μl 液体以免吸走细胞,加 500μl 配制好的 PI 染色液 C 染色缓冲液:PI(20×):RNaseA(50×)=50:2.5:1,37℃ 温箱孵育 30min,4℃ 冰盒待检。流式细胞仪采用激发波长 488nm 检测红色荧光,同时检测光散射情况,采用流式细胞仪自带分析软件分析数据。

2 结果

2.1 TMZ 对 U251 细胞及其干细胞活性影响及 TMZ 细胞毒性

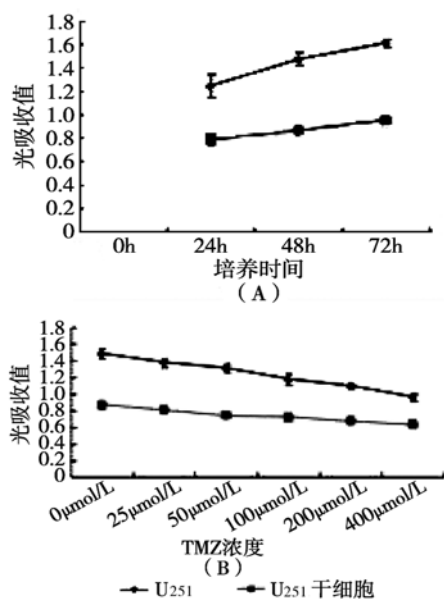
用 400μmol/L 的 TMZ 干预 U251 细胞及其干细胞 48h 后,发现贴壁的 U251 细胞增殖速度明显低于空白对照组,细胞密度明显小于对照组,培养基可见较多细胞碎片。U251 干细胞在 TMZ 干预 48h 后,光镜下可见细胞活性状态明显差于对照组,干细胞球完整性形态改变,有细胞裂解现象(图 1)。研究显示随着 TMZ 浓度增加和干预时间的延长,U251 细胞和 U251 干细胞增殖受到抑制越明显,单位体积内细胞密度越低,裂解越多。

CCK-8 试剂盒连续检测 U251 及其干细胞 72h 细胞增殖发现 U251 细胞增殖速度明显快于 U251 干细胞,TMZ 干预后能抑制 U251 及其干细胞增殖速度,并且随着 TMZ 浓度增加抑制效果增强,同一浓度时,随着干预时间的延长,抑制增殖效果也加强。同一药物浓度和干预时间,CCK-8 检测研究发现 TMZ 对 U251 干细胞抑制趋势弱于 U251 细胞,说明肿瘤干细胞比肿瘤细胞有更强的药物抵抗性(图 2)。



A: U251 细胞 TMZ 干预对照 B: U251 细胞 TMZ 400 $\mu\text{mol/L}$
C: U251 干细胞 TMZ 干预对照 D: U251 干细胞 TMZ 400 $\mu\text{mol/L}$
(A 和 B 倒置相差显微 $\times 40$; C 和 D 倒置相差显微 $\times 100$)

图 1 TMZ 抑制 U251 细胞及其干细胞增殖



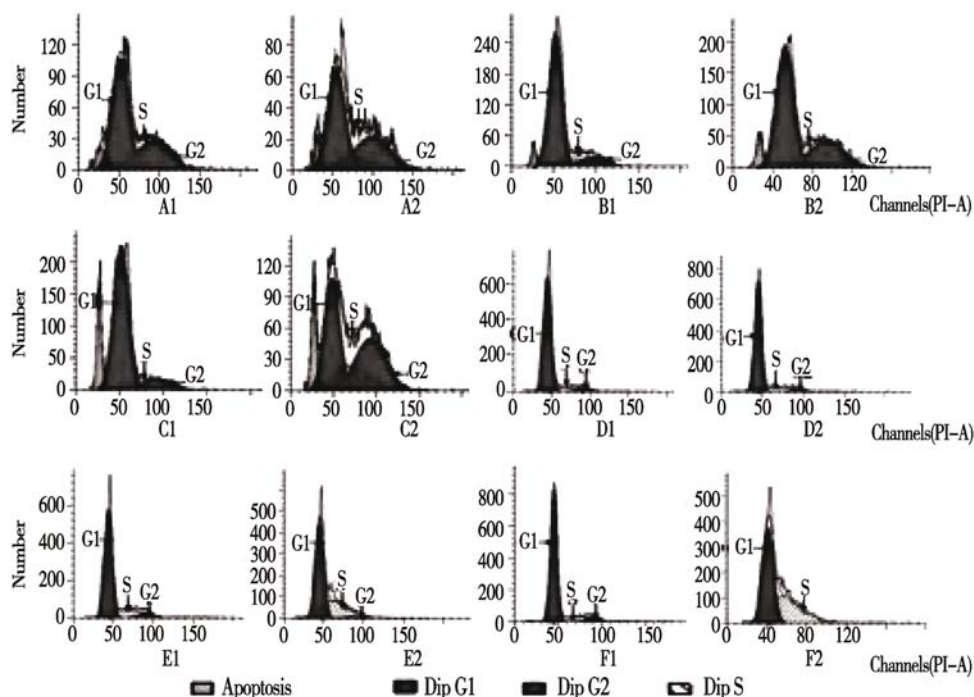
A: 72h 细胞增殖后细胞光吸收值

B: TMZ 干预 48h 后细胞光吸收值

图 2 TMZ 对 U251 及其干细胞活性的影响

2.2 400 $\mu\text{mol/L}$ TMZ 干预后 24h、48h、72h 细胞周期变化

研究结果发现, TMZ 干预 U251 后, 随着 TMZ 浓度和干预时间的延长, 细胞周期在 G2/M 期的比例增加。而 TMZ 干预 U251 干细胞后, 随着 TMZ 浓度和干预的时间的延长, 细胞周期则是在 S 期停滞所占的比例增加。说明 TMZ 对肿瘤 U251 细胞和 U251 干细胞作用机制可能有所不同, 导致细胞周期的改变存在差异。这也许是肿瘤干细胞成为化疗耐药和失败的根本原因。在 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ 干预 24h、48h、72h 后, U251 在 G2/M 期比例分别增加 $(1.4 \pm 0.2)\%$ 、 $(18.61 \pm 1.1)\%$ 、 $(24.27 \pm 1.1)\%$ 。U251 干细胞在 S 期比例分别增加 $(2.66 \pm 0.13)\%$ 、 $(14.3 \pm 0.5)\%$ 、 $(30.76 \pm 1.2)\%$ (图 3)。



A1、B1、C1 分别是 U251 细胞 24h、48h、72h 空白对照组细胞周期，D1、E1、F1 分别是 U251 干细胞 24h、48h、72h 空白对照组细胞周期。A2、B2、C2 分别是 TMZ 干预 U251 细胞 24h、48h、72h 的细胞周期，D2、E2、F2 分别是 TMZ 干预 U251 干细胞 24h、48h、72h 的细胞周期。

图 3 TMZ 干预后细胞周期变化

3 讨论

多形性胶质母细胞瘤是最常见、最致命的肿瘤，其中期生存时间 1a 左右。目前，GBM 的治疗的难关是原位复发、侵袭性生物学行为和弥散浸润性生长。尽管随着手术技术更新、放疗和多种抗癌药物的联合应用，但恶性胶质瘤的治愈希望仍渺茫^[6]。肿瘤干细胞假说认为肿瘤细胞中有干细胞样特性的一个亚族细胞被称为肿瘤干细胞，肿瘤干细胞被视为化疗耐药的介质，导致肿瘤形成^[7]。CD133 为一种新型的 120KD 五跨膜细胞表面蛋白，已被证明是造血干细胞的标记，近期实验数据也证实 CD133 是大脑肿瘤的干细胞标记物^[8]。我们利用免疫磁珠法成功从 U251 细胞系中分离出 CD133⁺ 干细胞，并在无血清培养基中培养后成功形成细胞球，经 Nestin、GFAP、 β -tubulin 等免疫细胞化学染色证实细胞球具有神经干细胞特性，并且实验发现 U251 干细胞在相同条件下对化疗药物 TMZ 的抵抗性强于 U251 肿瘤细胞，间接证明在肿瘤化疗耐药中干细胞可能起着关键作用，对此我们从化疗药物对肿瘤干细胞细胞周期的影响入手，寻找肿瘤干细胞和肿瘤细胞对同一化疗药物疗效存在差异的不同机制，进一步解释肿瘤干细胞在肿

瘤发生、发展过程中的作用。

TMZ 目前已经成为恶性胶质细胞瘤标准治疗手段的不可缺少的一部分。作为一种新型烷化剂，TMZ 是 194KD 的小分子亲脂性分子，能口服和高效通过血脑屏障。TMZ 在脑和脑脊液的分布能达到血浆浓度的 30%~40%，此外，相比传统的化疗药物其具有较低的对造血祖细胞的细胞毒性，降低对机体的毒副作用。TMZ 与手术切除和放疗联合应用能延长 GBM 患者生存时间，成为胶质瘤治疗的一线化疗药物^[9]。我们实验研究中用不同浓度的 TMZ 干预 U251 及其干细胞，并于药物干预 24h、48h、72h 收集处理细胞，用流式细胞仪检测细胞周期变化，结果显示 TMZ 干预胶质瘤 U251 细胞后，随着 TMZ 干预时间的延长，细胞周期在 G2/M 期变化的越明显，与之前 Kanzawa T 等^[9]研究报道的一致，说明 TMZ 对细胞周期的影响与干预时间有关。而同时对 TMZ 干预胶质瘤 U251 干细胞的研究发现 TMZ 干预后干细胞的细胞周期均停滞在 S 期，而且随着干预时间的延长，停留在 S 期细胞越多，与 Cui B 等^[10]研究发现 TMZ 在抑制 DNA 合成时存在双相性、在第 2 个 S 期长效抑制 DNA 合成的结果类似。说明 TMZ 对 U251

和 U251 干细胞的药理学作用机制存在差异,肿瘤细胞和肿瘤干细胞生物学特性不同,证实 U251 干细胞和 U251 细胞之间对化疗药物产生的细胞毒效应不同。因此,研究化疗药物对肿瘤细胞及其干细胞增殖和细胞周期的不同影响,进一步阐释肿瘤耐药机制,可以为胶质瘤靶向化疗耐药的进一步研究提供新靶点。

目前常用化疗药物都是针对肿瘤细胞,不能有效清除肿瘤实体内所有细胞,而肿瘤干细胞被认为是肿瘤复发和化疗耐药的重要原因^[11],肿瘤干细胞理论为治疗胶质瘤提出了新的思路,靶向肿瘤干细胞的治疗已成为治愈胶质瘤,克服胶质瘤耐药和复发的根本解决途径,我们实验用临床一线药物 TMZ 干预胶质瘤 U251 及 U251 干细胞,发现 TMZ 作用于胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞不同细胞周期而发挥效应的不同机制,为进一步研究靶向干细胞药物治疗奠定实验基础。

参考文献:

- [1] Boumendjel A, McLeer-Florin A, Champelovier P, et al. A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agent and an inhibitor of P-gp and BCRP in in-vitro and in-vivo glioblastoma models[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 242-253.
- [2] Ryu CH, Yoon WS, Park KY, et al. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-resistant Glioma cells[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 987495.
- [3] Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells[J]. Cell Death Differ, 2006, 13: 1238-1241.
- [4] Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cell-much more complex than expected[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 128-139.
- [5] Jin F, Zhao L, Zhao Hy, et al. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes[J]. Neuroscience, 2008, 154(2): 541-550.
- [6] Qiu B, Zhang D, Tao J, et al. A simplified and modified procedure to culture brain glioma stem cells from clinical specimens[J]. Oncol Lett, 2012, 3(1): 50-54.
- [7] Tchorz JS, Tome M, Cloetta D, et al. Constitutive Notch2 signaling in neural stem cells promotes tumorigenic features and astroglial lineage entry[J]. Cell Death Dis, 2012, 3: 1-9.
- [8] Donovan LK, Potter NE, Warr T, et al. A prominin-1-rich pediatric glioblastoma:abiologic behavior is determined by oxygen tension-modulated CD133 expression but not accompanied by underlying molecular profiles[J]. Transl Oncol, 2012, 5(3): 141-154.
- [9] Kanzawa T, Germano IM, Komata T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 448-457.
- [10] Cui B, Johnson SP, Bullock N, et al. Decoupling of DNA damage response signaling from DNA damage underlies temozolomide resistance in glioblastoma cells[J]. J Biomed Res, 2010, 24(6): 424-435.
- [11] Lima FR, Kahn SA, Soletti RC, et al. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(2): 338-349.

(收稿日期 2013-04-12)

• 读者 • 作者 • 编者 •

作者书写参考文献须知

作者论文中引用的参考文献应为亲自阅读过的主要文章;按照文中首次出现的次序编写,在引文句末右上角用方括号注明,如^[1]、^[3-6]。论著的引用文献择其主要者,一般不超过 10 篇;综述不超过 25 篇。应引用公开发行的新的研究著作,勿引译文、文摘、转载、内部资料等。尽量不引用教科书。

引用参考文献的题录及外语拼写和著录符号容易出现错误,请按下列顺序及格式仔细核对,如有错误,将退回作者修正。格式如下:

1. 期刊文章

[序号] 作者姓名(3 位作者姓名,之间用逗号隔开;3 位作者以上者,只写前 3 位作者,后加“等”或“et al”)。题目[J]。刊名(外文刊名缩写按 Index Medicus 格式)。年,卷(期):起页-止页。

2. 专著

[序号] 作者姓名。书名[M]。版次(第 1 版略)。出版地:出版社,出版年:起页-止页。

3. 专著中析出文献

[序号] 作者姓名。题目[M]。主编姓名。书名。版次。出版地:出版社,出版年:起页-止页。

本刊编辑部