论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1426-04

阿苯达唑对耐药卵巢癌细胞糖酵解的影响

何迎盈[1],刘娜娜[1],罗治彬[2],李少林[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院核医学教研室[1];401520 重庆,重庆市合川区人民医院肿瘤血液科[2])

[摘要] **目的** 探讨阿苯达唑(albendazole,ABZ)对人耐顺铂卵巢癌SKOV-3/DDP细胞糖酵解的影响。**方法** 通过溴化二甲噻唑二苯四氨唑(MTT)比色法检测ABZ对卵巢癌SKOV-3/DDP细胞体外增殖的影响,求得抑制率分别为0%、25%、50%、75%时所对应的ABZ的浓度,实验分为对照组、IC_{25}组、IC_{50}组和IC_{75}组,每组给予相应浓度的ABZ处理,并且按照ABZ作用时间再将每组分为12、24、36 h亚组。按照分组,在设定的时间点,分别用比色法测定己糖激酶(hexokinase,HK)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase,PK)活性,用酶标仪法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)的活性,用RT-PCR法测定Akt mRNA和Myc mRNA的表达。**结果** 经过不同浓度的ABZ处理SKOV-3/DDP细胞发现,ABZ能抑制SKOV-3/DDP细胞体外生长($P<0.05$),呈剂量依赖性,抑制率为0%所对应的ABZ浓度为0 μmol/L,抑制率25%的浓度(IC_{25})为(1.43±0.21)μmol/L,抑制率50%的浓度(IC_{50})为(8.64±0.74)μmol/L,抑制率75%的浓度(IC_{75})为(52.48±3.99)μmol/L。与对照组相比,经过ABZ处理的SKOV-3/DDP细胞的HK、PK、LDH活性明显降低($P<0.05$),且Akt基因和Myc基因的表达下调($P<0.05$)。**结论** ABZ能够抑制SKOV-3/DDP细胞糖酵解酶活性,并能下调糖酵解相关基因的表达。

[关键词] 耐药卵巢癌细胞;阿苯达唑;糖酵解

[中图法分类号] Q493.4;R737.31;R978.6 [文献标志码] A

Effect of albendazole on glycolysis of cisplatin-resistant ovarian cancer cells

He Yingying[1], Liu Nana[1], Luo Zhibin[2], Li Shaolin[1] ([1]Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Hematology, Peoples' Hospital of Hechuan District, Chongqing, 401520, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of albendazole (ABZ) on glycolysis of human cisplatin-resistant ovarian cancer SKOV3/DDP cells. **Methods** Proliferation of SKOV3/DDP cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry after treatment with ABZ *in vitro*. SKOV3/DDP cells were divided into control group, IC_{25} group, IC_{50} group, and IC_{75} group according to the concentration of ABZ with an inhibition rate of 0%, 25%, 50%, and 75%. Each group was further divided into 12, 24 and 36 h subgroups according to the action time of ABZ at a certain concentration. Activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by colorimetry and ELISA, respectively, and expression of Akt mRNA and Myc mRNA was detected by RT-PCR at the setting time points. **Results** ABZ inhibited the proliferation of SKOV3/DDP cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$) with an inhibition rate of 0%, 25%, 50% and 75% at the concentration of 0, 1.43±0.21, 8.64±0.74 and 52.48±3.99 μmol/L, respectively, in control group, IC_{25} group, IC_{50} group and IC_{75} group. The activities of LDH, HK, PK and the expression levels of Akt mRNA and Myc mRNA were significantly lower in IC_{25} group, IC_{50} group and IC_{75} group than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** ABZ can inhibit the activities of glycolytic enzymes and down-regulate the expression of glycolysis-related genes *in vitro*.

[**Key words**] drug-resistant ovarian cancer cell;albendazole;glycolysis

Corresponding author: Luo Zhibin, E-mail: luozhibincq@126.com

[通信作者] 罗治彬,E-mail: luozhibincq@126.com

Warburg 效应揭示即使在有氧环境中,肿瘤细胞获取能量也主要依靠糖酵解。虽然目前对 Warburg 效应的机制尚未完全明白,但许多学者认为肿瘤细胞活跃的糖酵解与糖酵解酶的活化[1-3]、Akt[4]及 Myc[5]基因的激活有关。有研究[6]发现抑制糖酵解,阻断肿瘤细胞能量来源,可以杀死肿瘤细胞。

阿苯达唑(albendazole,ABZ)属于苯并咪唑氨甲酸乙酯类抗寄生虫药物,通过抑制寄生虫肠细胞摄取葡萄糖,降低 PK、LDH 等活性,阻止三磷酸腺苷(ATP)产生,耗竭糖原而使虫体死亡[7]。国外研究发现,ABZ 通过微管蛋白聚合[8]而诱导肿瘤细胞凋亡,并且 ABZ 还能抑制肿瘤血管形成[9]和乏氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1,HIF-1)的表达[10],掀起了研究 ABZ 抗肿瘤的热潮,但几乎没有它对肿瘤细胞能量代谢的研究。既然 ABZ 能够抑制寄生虫能量代谢,故研究 ABZ 是否能够抑制肿瘤细胞,尤其是耐药肿瘤细胞的糖代谢是我们课题的出发点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人耐顺铂卵巢癌 SKOV-3/DDP 细胞株购买于中国医学科学院肿瘤细胞库。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清和 RMPI1640 培养基购自 Gibco 公司。ABZ 购自 AccuStandard 公司,纯度为 97.5%。MTT 和二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司。HK、PK 和 LDH 活性测定试剂盒购自南京建成公司。RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、引物、β-actin、*Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 ABZ 对 SKOV-3/DDP 细胞增殖的影响

将状态良好的 SKOV-3/DDP 细胞接种于 96 孔板,细胞数为 8×10^3/孔,并设定空白对照孔和阴性对照孔,然后加入 10% FBS 的 1640 培养基在 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱孵育过夜。细胞贴壁后,小心吸去孔内液体,在实验孔加入 ABZ 溶液,使其终浓度为 1、2、4、8、16、32、64、128 μmol/L,空白和阴性对照孔加入 10% FBS 培养基。每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后,加入5 mg/ml MTT 20 μl,避光 37 ℃孵育 4 h 后,小心吸去孔内液体,再加入 150 μl DMSO,酶标仪在 490 nm 处测定其光密度值[D(490)],计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = {1 -[实验孔 D(490)值 - 空白对照孔 D(490)值]/[阴性对照孔 D(490)值 - 空白对照孔 D(490)值]} ×100%。按照实验结果,将实验分为对照组、IC_{25}组、IC_{50}组及 IC_{75}组。

1.2.2 HK、PK、LDH 活性检测

1.2.2.1 样本收集与处理 SKOV-3/DDP 细胞接种于 6 孔板中,密度为 1×10^6/孔。细胞贴壁后,加入含不同浓度 ABZ 的培养液,其终浓度为 0.0、1.5、8.0、50.0 μmol/L。在 12、24、36 h 分别用胰酶消化并收集细胞,生理盐水漂洗 2 次,最后加入 0.5 ml 生理盐水制成细胞悬液移至 2 ml 的玻璃匀浆管冰上手动匀浆 3 min。将样本保存在 -20 ℃。3 个时间点的样本一起测定。

1.2.2.2 样本蛋白浓度测定 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明进行加样,酶标仪在 562 nm 处测定其光密度,绘制标准曲线,计算各样本的蛋白浓度。

1.2.2.3 HK 活性检测 按照 HK 测试盒说明书进行加样,并在分光光度计 340 nm 处测定 A_1 和 A_2 值,计算 HK 酶活力。HK 活性(U/g) = (A_2 - A_1)/毫摩尔消光系数 ×1/(反应时间 × 比色皿光径) × 反应系统中样本稀释倍数/匀浆蛋白含量(g/ml)。

1.2.2.4 PK 活性检测 按照 PK 测试盒说明书进行加样,并在分光光度计 340 nm 处测定 A_1 和 A_2 值,计算 PK 酶活性。PK 活性(U/g) = (A_1 - A_2)/毫摩尔消光系数 ×1/(反应时间 × 比色皿光径) ×(反应液总体积 ÷ 取样量)/匀浆蛋白含量(g/ml)。

1.2.2.5 LDH 活性检测 按照 LDH 测试盒说明书进行加样,在酶标仪 450 nm 处测定光密度值[D(450)],计算 LDH 活性。LDH 活性(U/g) = [$D(450)_{测定孔}$ - $D(450)_{对照孔}$]/[$D(450)_{标准孔}$ - $D(450)_{空白孔}$] × 标准浓度(2 mmol/L) ÷ 匀浆蛋白含量(g/ml)。

在不同时间点测得 HK、PK 及 LDH 活性,并将各实验组的酶活性与对应对照组的酶活性比较,求得相对活性。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 Akt、Myc 表达

1.2.3.1 样本收集及总 RNA 提取 SKOV3/DDP 细胞接种于 6 孔板中,细胞数为 1×10^6/孔。待细胞贴壁后,各组加入含不同浓度 ABZ 的培养液,其终浓度为 0、1.5、8.0、50.0 μmol/L。在 12、24、36 h 分别离心后弃去培养液,加入 PBS 轻洗,离心弃去液体,重复 2 次,再用 Trizol 法提取总 RNA。并用 Thermo Nanodrop 仪检测,质量良好,无降解和蛋白污染。

1.2.3.2 逆转录 每个标本以 1 μg 总 RNA 为模板按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。

1.2.3.3 PCR 检测 Akt mRNA 引物上游:5′-GGCACACACTCTAACTGAAAGC-3′,下游:5′-GCTGCATCTGTGATCCCTTCT-3′,扩增长度为 333 bp。PCR 条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 30 个循环,再 72 ℃延伸 10 min。Myc mRNA 引物上游:5′-CAGGAACTATGACCTCGACTAG-3′,下游:5′-GTCGCAGATGAAACTCTGGTTC-3′,扩增长度为 328 bp。PCR 条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 30 个循环,再 72 ℃延伸 10 min。β-actin 为内对照,引物上游为:5′-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3′,下游为 5′-GAAAGGGTGTAAACGCAACTA-3′,扩增长度为 678 bp。PCR 条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 32 个循环,再 72 ℃延伸 10 min。将各标本的 PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并在凝胶成像系统下成像,用 Quantity One 进行灰度值分析,

表1 ABZ对糖酵解酶活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

糖酵解酶	组别		相对活性(%)	糖酵解酶	组别		相对活性(%)	糖酵解酶	组别		相对活性(%)
己糖激酶	对照组	12 h	1.00±0.00	丙酮酸激酶	对照组	12 h	1.00±0.00	乳酸脱氢酶	对照组	12 h	1.00±0.00
		24 h	1.00±0.00			24 h	1.00±0.00			24 h	1.00±0.00
		36 h	1.00±0.00			36 h	1.00±0.00			36 h	1.00±0.00
	IC_{25}组	12 h	0.92±0.12[c]		IC_{25}组	12 h	0.83±0.11[a]		IC_{25}组	12 h	0.90±0.03[abc]
		24 h	0.53±0.08[abc]			24 h	0.67±0.09[ab]			24 h	0.73±0.02[abc]
		36 h	0.35±0.04[abc]			36 h	0.37±0.04[ab]			36 h	0.70±0.01[abc]
	IC_{50}组	12 h	0.92±0.06[c]		IC_{50}组	12 h	0.77±0.06[ac]		IC_{50}组	12 h	0.78±0.00[abc]
		24 h	0.40±0.03[abc]			24 h	0.54±0.07[abc]			24 h	0.56±0.02[abc]
		36 h	0.24±0.05[abc]			36 h	0.16±0.03[abc]			36 h	0.49±0.01[abc]
	IC_{75}组	12 h	0.94±0.04[c]		IC_{75}组	12 h	0.73±0.09[ac]		IC_{75}组	12 h	0.64±0.03[abc]
		24 h	0.31±0.01[abc]			24 h	0.32±0.01[abc]			24 h	0.34±0.02[abc]
		36 h	0.18±0.02[abc]			36 h	0.09±0.01[abc]			36 h	0.11±0.01[abc]

a：$P<0.05$，与对应的对照组比较；b：$P<0.05$，不同浓度ABZ相同时间两两比较；c：$P<0.05$，与同组不同ABZ作用时间两两比较

并与相应内参的灰度值进行比较求出相对灰度值。以上步骤均重复3次。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 18.0统计软件，样本均数差别的多重比较采用单因素多水平LSD法方差分析。

2 结果

2.1 ABZ处理SKOV-3/DDP细胞后MTT检测结果

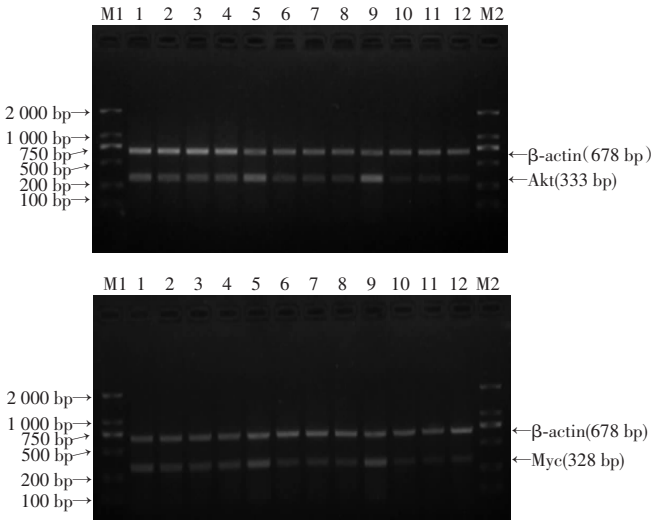
ABZ对SKOV3/DDP细胞增殖的抑制率随ABZ作用浓度的增高而提高。利用SPSS18.0软件回归分析，求得了抑制率为0%、25%、50%、75%所对应的ABZ浓度分别为(μmol/L)：0.00±0.00、1.43±0.21、8.64±0.74、52.48±3.99。根据上述结果，结合实际，将实验分为对照组、IC_{25}组、IC_{50}组和IC_{75}组，各组对应的ABZ作用浓度分别为(μmol/L)：0.0、1.5、8.0、50.0，并按照ABZ作用时间将各组分为12、24、36 h 3个亚组。

2.2 HK、PK、LDH活性检测结果

在不同时间点求得HK、PK及LDH的相对活性，并将ABZ对酶活性的影响从浓度依赖性和时间依赖性两方面进行分析。结果发现，对照组SKOV3/DPP细胞PK及LDH活性很高，ABZ对HK、PK及LDH的活性均有明显抑制作用。当ABZ作用12 h后，HK活性无明显下降，但随作用时间的延长，HK活性明显下降，即ABZ对HK活性的抑制具有时间依赖性，且在ABZ处理24 h及36 h后，HK活性随ABZ作用浓度的提高，降低得更明显，即ABZ对HK活性的抑制具有浓度依赖性。ABZ作用12 h后，PK活性虽然比相应对照组明显下降，但在IC_{25}组、IC_{50}组与IC_{75}组组间无统计学差异，在24 h及36 h时，3组间PK活性比较均有统计学差异，说明ABZ作用24、36 h后，ABZ对PK活性的抑制有浓度依赖性，但IC_{25}浓度的ABZ对HK活性的抑制并不随作用时间的延长而更明显，但IC_{50}、IC_{75}浓度的ABZ的抑制作用可随时间延长而更明显，即IC_{50}、IC_{75}浓度的ABZ对PK的抑制有时间依赖性。ABZ对LDH活性的抑制有明显的浓度依赖性和时间依赖性(表1)。

2.3 Akt基因和Myc基因表达

用Quantity One软件对各组样本的Akt、Myc基因RT-PCR产物电泳凝胶进行灰度值分析，求出相对表达水平后，从ABZ抑制Akt及Myc基因表达的浓度依赖性和时间依赖性两方面进行分析。ABZ作用SKOV3/DDP细胞12 h后，不能明显地抑制Akt、Myc mRNA的表达，随着作用时间的延长，实验组与对照组比较，表达水平明显下降，说明ABZ对两种基因表达的下调具有时间依赖性，但IC_{25}组、IC_{50}组及IC_{75}组组间无明显统计学差异，即阿苯达唑对两种基因表达的抑制无浓度依赖性(图1，表2)。



M1：标准；1～4：分别为作用12 h的对照组、IC_{25}组、IC_{50}组、IC_{75}组；5～8：分别为作用24 h的对照组、IC_{25}组、IC_{50}组、IC_{75}组；9～12：分别为作用36 h的对照组、IC_{25}组、IC_{50}组、IC_{75}组；M2：标准

图1 ABZ作用后Akt、Myc mRNA的RT-PCR检测结果

表 2 ABZ 对 Akt、Myc mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别		Akt	Myc
对照组	12 h	0.78 ± 0.05	0.91 ± 0.05
	24 h	1.14 ± 0.06	0.94 ± 0.03
	36 h	1.25 ± 0.05	0.92 ± 0.01
IC_{25}组	12 h	0.76 ± 0.04[b]	0.95 ± 0.09[b]
	24 h	0.52 ± 0.04[ab]	0.76 ± 0.06[ab]
	36 h	0.34 ± 0.03[ab]	0.57 ± 0.05[ab]
IC_{50}组	12 h	0.78 ± 0.05[b]	0.91 ± 0.04[b]
	24 h	0.52 ± 0.03[ab]	0.75 ± 0.05[ab]
	36 h	0.36 ± 0.05[ab]	0.57 ± 0.03[ab]
IC_{75}组	12 h	0.76 ± 0.05[b]	0.93 ± 0.03[b]
	24 h	0.53 ± 0.05[ab]	0.71 ± 0.05[ab]
	36 h	0.37 ± 0.03[ab]	0.56 ± 0.04[ab]

a: $P<0.05$,与相应的对照组比较; b: $P<0.05$,同组不同 ABZ 作用时间两两比较

3 讨论

卵巢癌是病死率最高的妇科肿瘤[11],以上皮癌为主。手术切除和以铂类为基础的化疗是目前治疗卵巢癌常用且有效的手段。卵巢上皮癌对化疗敏感但易产生耐药[12],是目前最大的临床难题,且常表现为多药耐药(multidrug resistance, MDR)。有研究报道,糖酵解与肿瘤恶性程度[13]及肿瘤耐药[14]相关。

自从 Warburg 效应被发现后,针对肿瘤糖酵解的研究就从未停止过。很多研究都表明通过抑制糖酵解,减少肿瘤细胞的 ATP 来源可以饿死肿瘤,如抑制 HK 活性诱导了肝癌细胞凋亡[15],抑制 LDH 活性阻止了肿瘤进展[16],调节 Akt 基因诱导了卵巢癌细胞死亡[17]。

ABZ 是在临床上应用多年的抗寄生虫药物,安全有效且价格低廉。国外研究已证实阿苯达唑具有抗肿瘤效应,但尚少报道过 ABZ 对肿瘤细胞糖酵解的影响。本实验发现, SKOV3/DDP 细胞 PK 和 LDH 活性非常高,糖酵解相当活跃,这可能与其高度恶性及耐药有关。经过 ABZ 作用后,SKOV3/DDP 细胞的 HK、PK、LDH 活性明显降低,并且其 Akt、Myc 基因的表达也明显下调,糖酵解受到了明显抑制。结合其他学者[18]的报道,我们大胆推测,ABZ 可通过抑制 SKOV3/DDP 细胞的糖酵解,阻断其能量来源,不仅可以饿死耐药卵巢癌细胞,甚至对其耐药性也会产生影响,这种设想将在我们下一步研究中证实,从而为耐药卵巢癌的治疗寻找到一种作用机制广泛、安全有效的药物,而且其低廉的价格,能造福更多的患者。

参考文献:

[1] Hsu P P, Sabatini D M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. Cell, 2008, 134(5): 703 - 707.

[2] Mathupala S P, Ko Y H, Pedersen P L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 9(1): 17 - 24.

[3] Luo W, Semenza G L. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells[J]. Oncotarget, 2011, 2(7): 551 - 556.

[4] Robey R B, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19 (1): 25 - 31.

[5] Dang C V. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism[J]. Cancer Res , 2010, 70(3): 859 - 862.

[6] Gatenby R A, Gillies R J. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007,39(7/8): 1358 - 1366.

[7] Li Q Z, Hao Y H, Gao X J, *et al*. The target of benzimidazole carbamate against cysticerci cellulosae[J]. Agricultural Sci China, 2007, 6 (8): 1009 - 1017.

[8] Chu S W, Badar S, Morris D L, *et al*. Potent inhibition of tubulin polymerisation and proliferation of paclitaxel-resistant 1A9PTX22 human ovarian cancer cells by albendazole[J]. Anticancer Res, 2009, 29 (10): 3791 - 3796.

[9] Pourgholami M H, Cai Z Y, Wang L, *et al*. Inhibition of cell proliferation, vascular endothelial growth factor and tumor growth by albendazole[J]. Cancer Invest, 2009, 27(2): 171 - 177.

[10] Pourgholami M H, Cai Z Y, Badar S, *et al*. Potent inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1alpha by albendazole[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 143.

[11] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 - 300.

[12] Alvero A B, Chen R, Fu H H, *et al*. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance[J]. Cell Cycle, 2009, 8(1): 158 - 166.

[13] Sattler U G, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis[J]. Int J Radiat Biol, 2009, 85(11): 963 - 971.

[14] Milane L, Duan Z, Amiji M. Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning[J]. Cancer Cell Int, 2011, 11: 3.

[15] Kim W, Yoon J H, Jeong J M, *et al*. Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase Ⅱ inhibitor in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(9): 2554 - 2562.

[16] Le A, Cooper C R, Gouw A M,*et al*. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(5): 2037 - 2042.

[17] Priebe A, Tan L, Wahl H, *et al*. Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(2): 389 - 395.

[18] Xu R H, Pelicano H, Zhou Y, *et al*. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia[J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 613 - 621.

(收稿:2011-11-30;修回:2011-12-19)

(编辑 汪勤俭)