

## 甲氟喹对胶质瘤细胞的放射增敏作用

缪雨季<sup>1</sup>, 周倬<sup>2</sup>, 常青<sup>3</sup>

1. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009; 2. 南京航空航天大学, 江苏 南京 211106; 3. 无锡市第八人民医院, 江苏 无锡 214000

**【摘要】目的:**研究甲氟喹对胶质瘤细胞的放射增敏作用,并对其进行初步探索。**方法:**取指数生长期的胶质瘤U251细胞,采用CCK-8检测法研究甲氟喹作用后U251细胞的存活率;细胞克隆形成实验评估甲氟喹对U251细胞的放射增敏效果;流式细胞技术检测甲氟喹联合X射线作用后U251细胞的活性氧水平和细胞凋亡率,探索联合作用下U251细胞的死亡机制。**结果:**甲氟喹对胶质瘤细胞具有良好的放射增敏效果,其对U251细胞的最大放射增敏比为1.64。X射线联合甲氟喹作用于U251细胞后,细胞的凋亡水平增加,活性氧水平增加,活性氧抑制剂谷胱甘肽能抑制X射线联合甲氟喹作用诱导的U251细胞凋亡。**结论:**甲氟喹对U251细胞有放射增敏作用,其作用机制可能为通过增加细胞活性氧水平、诱导细胞凋亡导致放射敏感性增加。

**【关键词】**胶质瘤;U251细胞;甲氟喹;放射增敏;凋亡;活性氧

**【中图分类号】**R811

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2021)01-0006-05

## The radiosensitization effect of mefloquine combined with X-ray on glioma cells

MIAO Yuji<sup>1</sup>, ZHOU Zhuo<sup>2</sup>, CHANG Qing<sup>3</sup>

1. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China; 2. Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, China; 3. Wuxi No.8 People's Hospital Group, Wuxi 214000, China

**Abstract: Objective** To study the radiosensitization effect of mefloquine on glioma cells and to explore its mechanism. **Methods** The glioma U251 cells at the exponential growth period were sampled and their survival rate after mefloquine action was studied by CCK-8 assay; cell clone formation experiments were used to evaluate the radiosensitization effect of mefloquine on U251 cells; flow cytometry was used to detect the active oxygen level and apoptosis rate of U251 cells after mefloquine combined with X-ray, and the death mechanism of U251 cells under the combined effect was explored. **Results** Mefloquine had a good radiosensitization effect on glioma cells, and its maximum radiosensitization ratio to U251 cells was 1.64. After X-ray combined with mefloquine acted on U251 cells, the level of cell apoptosis increased, and the level of reactive oxygen species increased. The active oxygen inhibitor glutathione can inhibit U251 cell apoptosis induced by X-ray combined with mefloquine. **Conclusion** Mefloquine has a radiosensitizing effect on U251 cells, and it is probably through increasing the level of cellular reactive oxygen species and inducing apoptosis that mefloquine can lead to increased radiosensitivity.

**Keywords:** glioma; U251 cells; mefloquine; radiosensitization; apoptosis; ROS

### 前言

放射治疗是常用的治疗人胶质瘤的手段,但由于胶质瘤细胞具有一定的辐射抗性,降低了放疗效果。放射增敏剂能够增强电离辐射杀伤肿瘤细胞的能力,有效应对肿瘤细胞的辐射抗性。但放射增敏剂存在一些缺点:放射增敏剂本身毒性大,不能顺利达到病灶等,这些缺点限制了放射增敏剂的应用。

甲氟喹是治疗疟疾和预防疟疾的常见药物<sup>[1-2]</sup>,研究发现其可通过抑制蛋白质的合成进一步强化X射线对肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[3]</sup>。甲氟喹还可以通过线粒体途径促进肿瘤细胞凋亡,细胞凋亡是X射线杀灭肿瘤细胞的形式之一<sup>[4]</sup>。此外甲氟喹还具有电效应和模拟效应,能顺利到达病灶且毒性较低<sup>[5-6]</sup>。本文以上述几点为理论基础,通过体外细胞实验,探究甲氟喹对胶质瘤U251细胞的放射增敏效果,以期治疗脑胶质瘤提供新思路。

**【收稿日期】**2020-09-04

**【基金项目】**江苏省医学创新团队(CXTDA2017029);江苏省卫生健康委科研基金(S2017002)

**【作者简介】**缪雨季,硕士研究生,研究方向:放射生物, E-mail: js-myj@jscdc.cn

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞株与主要试剂

人脑胶质瘤U251细胞来自中国科学院上海分子

生物研究所。DMEM(美国GIBCO公司)完全培养液, 10% 灭活胎牛血清(美国Hyclone公司), 置37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。甲氟喹(mefloquine)购自上海百灵威化学技术有限公司, 谷胱甘肽(Glutathione, GSH)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒及DCFH-DA 活性氧试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 放射源及照射条件

所用照射源为直线加速器(Primus-M, 西门子, 德国), 使用6 MV X射线进行照射, 照射野为20 cm×20 cm, 机架角为180°, 细胞培养板底面放置1.5 cm厚硅胶组织作为补偿, 源皮距为100 cm, 剂量率为300 cGy/min, 室温下照射。照射后的细胞置37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中继续培养至指定时间。

1.3 药物毒性实验

取对数生长期状态良好的细胞, 胰酶消化后, 制成单细胞悬液, 加入100 μL至96孔板种, 密度为1×10<sup>4</sup>个细胞/孔, 放入37℃培养箱中孵育24 h。弃掉孔内培养液, 加入100 μL含有不同浓度甲氟喹的培养液至孔中, 同时设置对照组、空白组, 且每个组别设置5个复孔。继续孵育24 h, 向每孔中加入CCK-8溶液。继续在37℃培养箱中孵育4 h, 然后用酶标仪, 选择波长为450 nm检测其D<sub>λ</sub>值变化。根据5个复孔的平均值, 计算得到细胞存活率。

1.4 辐射增敏实验及数据分析

取对数生长期状态良好的细胞, 胰蛋白酶消化后, 制成单细胞悬液, 加入1 mL细胞悬液至六孔板中, 每孔约500个细胞。将六孔板置于培养箱中培养24 h后, 弃掉孔中的旧培养液, 加入含有不同浓度的甲氟喹培养液1 mL, 继续培养24 h。用X射线照射细胞, X射线剂量为0、2、4、6、8 Gy。随后弃掉原培养液, 用PBS清洗细胞两遍, 重新加入新鲜培养液。继续培养, 每隔3 d更换一次培养液, 同时在显微镜下观察细胞克隆形成数目。至第8天时, 细胞克隆数目明显, 终止培养, 用吉姆萨染液染色。在显微镜下计数, 以50个细胞以上细胞团为一个克隆数, 统计克隆数, 计算克隆形成率。采用Origin8.0软件, 根据单靶多击模型拟合细胞存活曲线, 求得放射生物学参数, 计算放疗增敏比(Sensitive Enhancement Ratio, SER)。

1.5 细胞凋亡检测实验

选择对数生长期状态良好的细胞, 制成单细胞悬液, 均匀接种于六孔板中, 放入培养箱中培养24 h。设置空白对照组、甲氟喹组、照射组、甲氟喹照射组。

甲氟喹组、甲氟喹照射组加入含有甲氟喹的培养液。在37℃培养箱中孵育24 h后, X射线组的细胞受到6 Gy照射, 其余处理条件与空白对照组完全相同。随后弃掉原培养液, 重新加入新鲜培养液置于37℃培养箱中继续培养, 待72 h后, 取出六孔板, 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。

1.6 细胞胞浆活性氧检测

细胞分组及处理与细胞凋亡检测实验相同。按照说明书检测各组细胞的活性氧水平。

1.7 统计学处理

数据采用SPSS21.0软件进行分析, 计量资料符合正太分布以均数±标准差表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用SNK法。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲氟喹对胶质瘤细胞的增殖抑制作用

如图1所示, 胶质瘤细胞的存活率随着甲氟喹浓度升高而逐渐下降, 呈现明显的剂量效应关系。采用Origin8.0软件分析得到IC<sub>20</sub>值(细胞存活率为80%的甲氟喹浓度)为43 μmol/L。为了避免或尽量减少药物本身对细胞的毒性作用, 放射增敏使用的甲氟喹浓度不应超过其IC<sub>20</sub>值<sup>[7]</sup>。故本文主要研究20、40 μmol/L浓度的甲氟喹对U251细胞的放射增敏作用。

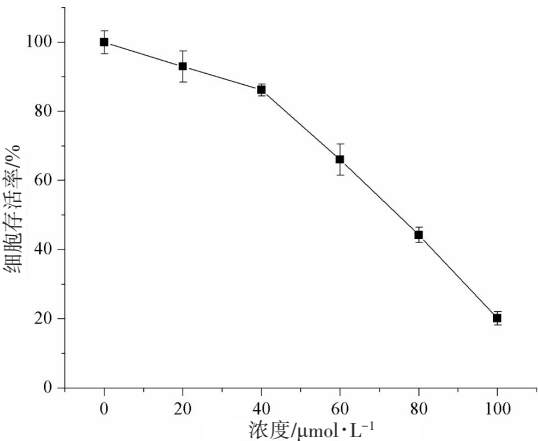


图1 不同浓度甲氟喹作用下U251细胞的存活率  
Fig.1 Survival rate of U251 cells under different concentrations of mefloquine

2.2 甲氟喹对胶质瘤细胞的放射增敏作用

本研究以SER作为评价辐射增敏剂增敏效果的主要指标, 其计算方法为: SER=单纯照射组D<sub>0</sub>/加药照射组D<sub>0</sub>值。式中, D<sub>0</sub>为细胞的平均致死剂量, 单位: Gy。克隆形成实验用于分别计算甲氟喹组和无甲氟喹组U251细胞的平均致死剂量D<sub>0</sub>。如图2所

示:随着照射剂量的增加,对照组和甲氟喹组细胞存活分数均显著降低。甲氟喹照射组的U251细胞存活分数低于相应的照射组细胞的存活分数( $P<0.05$ )。

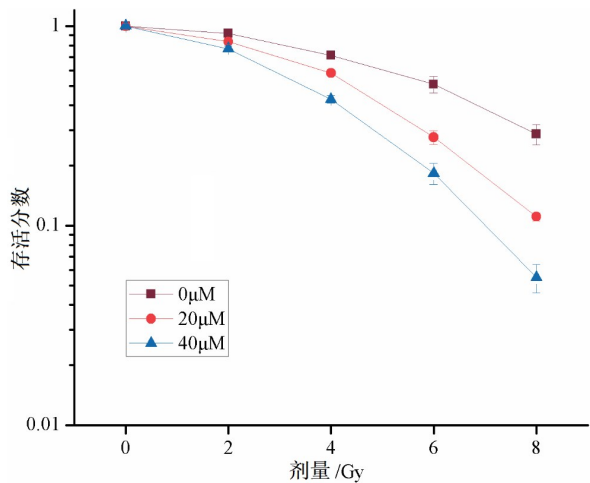


图2 甲氟喹联合X射线作用后U251细胞的存活分数  
Fig.2 Survival fraction of U251 cells after being treated with mefloquine combined with X-ray

根据体外细胞剂量存活曲线的单击多靶模型,其公式为: $S = 1 - (1 - e^{(-D/D_0)})^n$ ,式中, $S$ 为存活分数, $D$ 为受照剂量(单位:Gy), $D_0$ 为细胞的平均致死剂量(单位:Gy), $n$ 为靶点数目, $e$ 为自然对数。将甲氟喹联合X射线作用U251细胞后的剂量信息和存活分数代入该公式中拟合得到相应的 $D_0$ 值、 $n$ 值,结果见表1。

表1 甲氟喹联合X射线作用U251细胞集落存活曲线参数  
Tab.1 Colony survival curve parameters of U251 cells treated with mefloquine and X-ray

甲氟喹浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	平均致死剂量/Gy	靶点数目	SER
0	3.66	3.08	-
20	2.55	3.35	1.44
40	2.23	2.88	1.64

2.3 甲氟喹联合X射线照射对胶质瘤U251细胞凋亡的影响

细胞凋亡是常见的电离辐射诱导细胞死亡的形式。由表2可以看出,U251细胞在X射线照射后第3天,甲氟喹组与对照组相比,细胞凋亡率明显上升,说明甲氟喹能够增加X射线诱导的U251细胞凋亡。

2.4 甲氟喹联合X射线引起胶质瘤U251细胞活性氧水平变化

图3为X射线照射后第3天的DFCH-DA平均荧

表2 甲氟喹联合6 Gy X射线作用后第3天U251细胞的凋亡率( $n=3$ )  
Tab.2 Apoptotic rate of U251 cellsthe third day after being treated with mefloquine combined with 6 Gy X-ray ( $n=3$ )

照射剂量/Gy	甲氟喹浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	0	20	40
0	(2.66±0.53)%	(4.96±0.42)%	(5.99±0.69)%
6	(10.72±0.77)%	(21.60±0.83)%*	(25.68±0.96)%*

\*表示与0  $\mu\text{mol/L}$  6 Gy组比较, $P<0.05$

光强度图。从图中数据可以看出,40  $\mu\text{mol/L}$  和20  $\mu\text{mol/L}$  甲氟喹照射组与照射组相比,DCFH-DA平均荧光强度均大幅上升。以上结果证明甲氟喹可以提高X射线照射导致的U251细胞活性氧水平增加。

2.5 甲氟喹联合X射线诱导活性氧水平升高与细胞凋亡的关系

为了进一步研究活性氧水平升高与甲氟喹联合X射线诱导的U251细胞凋亡的关系,选用活性氧清除剂GSH处理甲氟喹照射组的U251细胞。结果如图4所示,对不同剂量水平甲氟喹处理的U251细胞,其X射线照射后GSH处理组凋亡率均低于相应对照组。以上结果提示,GSH清除U251细胞内多余的活性氧后,甲氟喹联合X射线引起细胞凋亡增加的效应得到了显著抑制,说明活性氧水平升高可能是甲氟喹增加X射线作用后U251细胞凋亡率的机制之一。

3 讨论

甲氟喹是人工合成的4-喹啉-甲醇衍生物,具有抗疟疾<sup>[8]</sup>、抗血吸虫<sup>[9-10]</sup>、抑制肿瘤细胞增殖<sup>[11-12]</sup>的作用。研究表明甲氟喹可以诱导Hela细胞凋亡,伴随着线粒体膜电位增加,活性氧水平上升,ATP水平降低,mTOR信号通路被抑制<sup>[4]</sup>。Sukhai等<sup>[13]</sup>采用甲氟喹作用于急性白血病细胞,发现其通过渗透入白血病细胞的溶酶体中,破坏溶酶体蛋白,进而有选择性地杀死白血病细胞及干细胞。应用多种喹啉类药物对乳腺癌细胞进行药物毒性实验,发现甲氟喹的效果好于其他喹啉类化合物,如环丙沙星和左氧氟沙星<sup>[14-15]</sup>。甲氟喹对MDA-MB-231细胞具有诱导凋亡的作用,同时它能作用于细胞溶酶体,使溶酶体内pH值改变,致使溶酶体内的多种活性酶失活,不能发挥正常功能,进而影响细胞生物体自噬进程<sup>[16]</sup>。因而,我们选择甲氟喹为研究对象,探究其对脑胶质瘤U251细胞的作用。本研究发现甲氟喹作用后的U251细胞增殖能力明显下降,提示甲氟喹能够抑制U251细胞增殖。



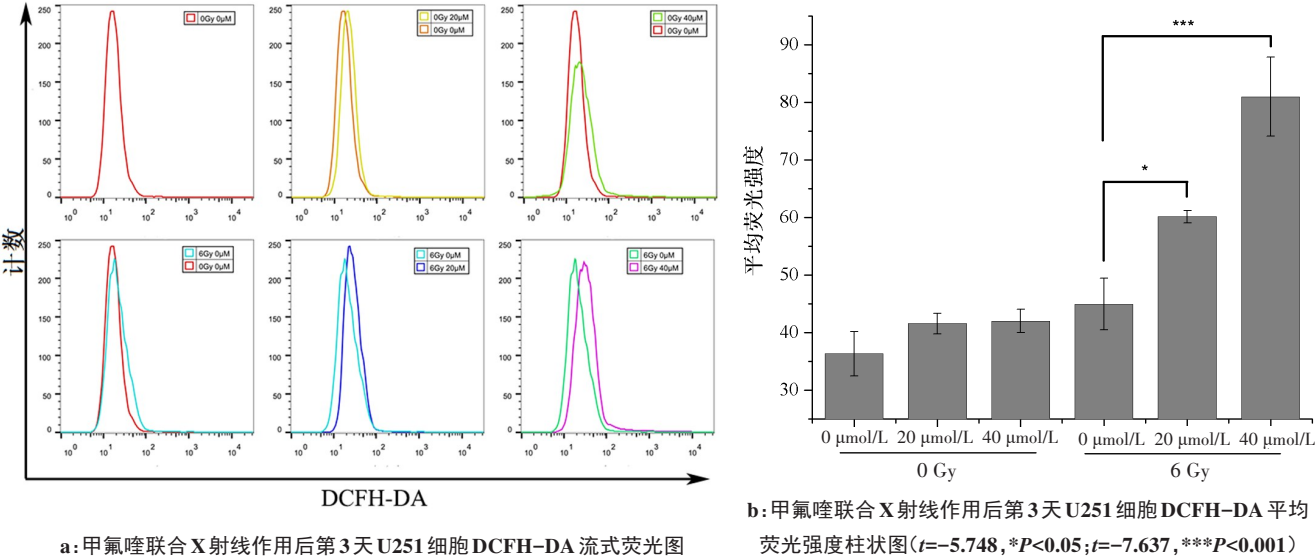


图 3 甲氟喹联合 6 Gy X 射线作用后第 3 天 U251 细胞的活性氧水平

Fig.3 ROS level in U251 cells on the third day after being treated with mefloquine and 6 Gy X-ray

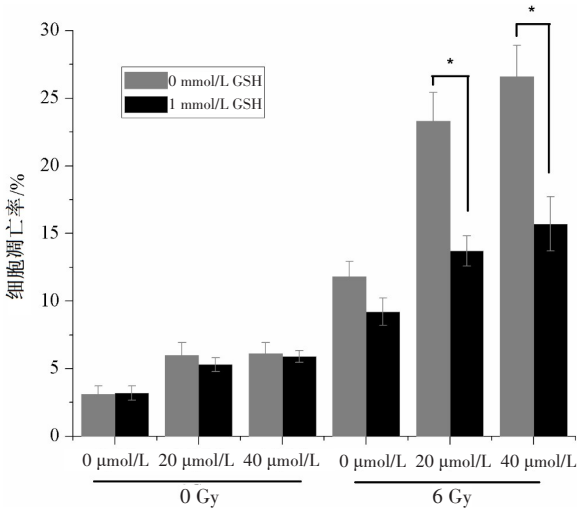


Fig.4 Apoptosis rate of U251 cells on the third day after being treatment with GSH ( $*P<0.05$ )

目前脑胶质瘤放疗增敏剂成为研究热点。Zong 等<sup>[17]</sup>用纳米粒子修饰替莫唑胺,实现了对神经胶质瘤的放疗协同效应。Katagi 等<sup>[18]</sup>发现 GSK-J4 能显著抑制胶质瘤的细胞 DNA 双链修复基因的表达,与放疗联用提高了动物的存活率。Lu 等<sup>[19]</sup>研究了 5 个稀土氧化物纳米粒子的细胞毒性和放疗增敏效果。本研究以增敏比 SER 为指标,通过绘制细胞存活曲线,计算  $D_0$  和 SER,研究甲氟喹对 U251 细胞的放疗增敏效果。结果表明,甲氟喹可以增加 U251 细胞对 X 射线的敏感性,20、40  $\mu\text{mol/L}$  甲氟喹的放疗增敏比分别为 1.44 和 1.64。同时,本研究发现甲氟喹能够增加 U251 细胞的凋亡率,且这一效应幅度在 X 射线照射后会显著增加。

活性氧是一些高活泼的含氧化学物质的统称,正常细胞内含有一定含量的活性氧,但活性氧升高会导致细胞凋亡或者其他损伤。研究表明活性氧含量升高能够使线粒体通透性转运孔开放,导致细胞色素 C 释放,从而诱导细胞凋亡<sup>[20]</sup>;细胞内质网应激时也会产生大量的活性氧,诱发细胞凋亡,这些结论说明活性氧与细胞凋亡有着重要联系。为此,本论文研究了甲氟喹照射组和照射组的 U251 细胞的活性氧水平,并通过活性氧清除剂 GSH 探索甲氟喹对于细胞照射后凋亡率增加与活性氧水平的关系。研究发现 X 射线照射后 U251 细胞活性氧水平升高,甲氟喹联合辐照 U251 细胞提高的凋亡率可通过活性氧清除剂 GSH 处理得到显著降低,此结果提示活性氧水平上升是甲氟喹联合 X 射线作用后诱导 U251 细胞凋亡的机制之一。Liu 等<sup>[21]</sup>在研究纳米银粒子对胶质瘤的放疗增敏效应时,发现纳米银粒子联合 X 射线能够诱导胶质瘤细胞活性氧水平增加,并且细胞凋亡率也随活性氧水平上升而增加。姚建新等<sup>[16]</sup>证实茛菪碱能增加 X 射线照射后 MDA-MB-231 细胞内的活性氧水平,促进细胞凋亡。本研究结果与上述研究结果类似,提示活性氧水平增加是甲氟喹增加 X 射线作用后 U251 细胞凋亡率上升的的机制之一。

综上所述,甲氟喹能够抑制人脑胶质瘤 U251 细胞的增殖,增强 U251 细胞放射敏感性,其作用机制可能与增加细胞内活性氧水平有关。本文对甲氟喹的增敏机制作了初步探索,但对其具体转换分子机制并不清楚,需要进行后续探索。本研究为以后深入探究甲氟喹的抗癌作用提供了基础,为提高癌症的放射治疗效果提供了新思路。

## 【参考文献】

- [1] 贾雪冬, 刘明亮. 近年抗生素研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2012, 33(3): 109-118.  
JIA X D, LIU M L. Progress in antibiotics research in recent years[J]. Foreign Medicine (Antibiotics Volume), 2012, 33(3): 109-118.
- [2] PALMER K J, HOLLIDAY S M, BROGDEN R N. Mefloquine: a review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy[J]. Drugs, 1993, 45(3): 430-475.
- [3] WONG W, BAI X, SLEEBES B E, et al. Mefloquine targets the Plasmodium falciparum 80S ribosome to inhibit protein synthesis[J]. Nat Microbiol, 2017(2): 17031.
- [4] LI H, JIAO S, LI X, et al. Therapeutic effects of antibiotic drug mefloquine against cervical cancer through impairing mitochondrial function and inhibiting mTOR pathway[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(1): 43-50.
- [5] 王江, 柳红. 氟原子在药物分子设计中的应用[J]. 有机化学, 2011, 31(11): 1785-1798.  
WANG J, LIU H. Application of fluorine atom in drug molecular design[J]. Organic Chemistry, 2011, 31(11): 1785-1798.
- [6] 郑素贞, 曹晓雁, 周强, 等. 含氟醇类化合物应用及合成研究进展[J]. 化工生产与技术, 2012, 19(5): 6-12.  
ZHENG S Z, CAO X Y, ZHOU Q, et al. Progress in the application and synthesis of fluoroalcohols [J]. Chemical Production and Technology, 2012, 19(5): 6-12.
- [7] CHITHRANI D B, JELVEH S, JALALI F, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy[J]. Radiat Res, 2010, 173(6): 719-728.
- [8] GUIDI M, MERCIER T, AOURI M, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of the artesunate-mefloquine fixed dose combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in African children[J]. Malar J, 2019, 18(1): 139.
- [9] 肖树华, 薛剑. 甲氟喹抗血吸虫及其他蠕虫作用的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(2): 131-138.  
XIAO S H, XUE J. Progress in the study of the effect of mefloquine on schistosoma and other worms[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitosis, 2012, 30(2): 131-138.
- [10] KIM J, CHIO A, KIM Y K, et al. Co-treatment with the anti-malarial drugs mefloquine and primaquine highly sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing P-gp inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(3): 655-660.
- [11] NEVIN R L. Unexpectedly low rates of neuropsychiatric adverse effects associated with mefloquine repurposed for the treatment of glioblastoma[J]. Cancer, 2019, 125(8): 1384-1385.
- [12] MARAKA S, GROVES M D, MAMMOSER A G, et al. Phase 1 lead-in to a phase 2 factorial study of temozolomide plus memantine, mefloquine, and metformin as postradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma[J]. Cancer, 2019, 125(3): 424-433.
- [13] SUKHAI M A, PRABHA S, HURRE R, et al. Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 315-328.
- [14] RODRIGUESFA, BOMFIM I S, CAVALCANTI B C, et al. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents[J]. Chem Biol Drug Des, 2014, 83(1): 126-131.
- [15] SHARMA N, THOMAS S, GOLDEN E B, et al. Inhibition of autophagy and induction of breast cancer cell death by mefloquine, an antimalarial agent[J]. Cancer Lett, 2012, 326(2): 143-154.
- [16] 姚建新, 姚志峰, 李占峰, 等. 茚麦明碱对人乳腺癌MDA-MB-231细胞放射增敏作用[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23(2): 147-152.  
YAO J X, YAO Z F, LI Z F, et al. The radiosensitization effect of piperine on human breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. Journal of Interventional Radiology, 2014, 23(2): 147-152.
- [17] ZONG Z, HUA L, WANG Z, et al. Self-assembled angiopep-2 modified lipid-poly (hypoxic radiosensitized polyprodrug) nanoparticles delivery TMZ for glioma synergistic TMZ and RT therapy[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1): 34-44.
- [18] KATAGI H, LOUIS N, UNRUH D, et al. Radiosensitization by histone H3 demethylase inhibition in diffuse intrinsic pontine glioma[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(18): 5572-5583.
- [19] LU V M, CRAWSHAY W F, WHITE B, et al. Cytotoxicity, dose-enhancement and radiosensitization of glioblastoma cells with rare earth nanoparticles[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 132-143.
- [20] 刘卉, 刘延香. 细胞凋亡与活性氧[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(10): 1830-1832.  
LIU H, LIU Y X. Apoptosis and reactive oxygen species[J]. Modern Oncology, 2008, 16(10): 1830-1832.
- [21] LIU Z, TAN H, ZHANG X, et al. Enhancement of radiotherapy efficacy by silver nanoparticles in hypoxic glioma cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(Sup 3): S922-S930.

(编辑:黄开颜)