

IDO1 抑制剂联合替莫唑胺对人脑胶质瘤的协同抗肿瘤作用研究

田文源, 陈飞虹*

(东南大学, 化学化工学院, 江苏 南京 211189)

摘要: 本研究主要研究新型吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO1) 抑制剂 NLG-919 联合化疗药物替莫唑胺对人脑胶质瘤的生长抑制作用及其作用机制。通过 MTT 法检测 NLG-919 和替莫唑胺单独使用及联合使用后的肿瘤生长作用; 通过集落形成实验、侵袭实验和迁移实验检测 NLG-919 和替莫唑胺单独使用及联合使用后对人脑胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响; 采用流式细胞术进行细胞凋亡、周期、活性氧 (ROS) 产生以及线粒体膜电位 (JC-1) 检测实验, 比较单独用药和联合用药的抗肿瘤效果; 通过免疫荧光实验检测 IDO1 的表达水平和高效液相色谱仪检测犬尿氨酸表达水平探究 NLG-919 协同替莫唑胺的抗肿瘤作用机制。结果显示, 相比于替莫唑胺, NLG-919 具有较弱的体外增殖抑制作用, 其作用于 U251 细胞和 U87 细胞 72 h 后的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别是 26.9 和 30.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但当其与化疗药物替莫唑胺联合使用后可显著增加替莫唑胺的抗胶质瘤活性。与单独用药相比, 联合用药组具有更强的抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移的能力。联合用药提高了替莫唑胺诱导细胞凋亡的能力, 其作用机制可能与诱导 ROS 的增加以及线粒体膜电位的损伤有关, 同时, 联合用药提高了替莫唑胺诱导细胞周期阻滞的能力, 抑制胶质瘤的生长。此外, NLG-919 可以显著下调人脑胶质瘤细胞的 IDO1 表达, 在与替莫唑胺联用后抑制效果有所增强, 并且有效地阻断色氨酸代谢产生犬尿氨酸。总之, IDO1 抑制剂 NLG-919 和替莫唑胺在抗癌治疗方面表现出显著的协同作用, 为人脑胶质瘤的临床联合治疗候选药物提供了选择基础。

关键词: IDO1 抑制剂; 替莫唑胺; 脑胶质瘤; 抗肿瘤; 联合用药

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)03-0707-09

Anti-tumor activity and mechanisms of IDO1 inhibitor in combined treatment with temozolomide on human glioma cell lines

TIAN Wen-yuan, CHEN Fei-hong*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, China)

Abstract: We analyzed the anticancer effect and mechanism of the novel indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor NLG-919 combined with temozolomide (TMZ) on human glioma cell lines. The anti-tumor activity of NLG-919 and temozolomide after single and combined treatments was detected by MTT assay. Colony formation assay, invasion assay and migration assays were used to detect the effects of NLG-919 and temozolomide alone or in combination on proliferation, invasion and migration of human glioma cells. A flow cytometry assay was used to detect cell apoptosis, cell cycle arrest, reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial membrane potential damage (JC-1). An immunofluorescence assay was used to detect the expression level of IDO1 and HPLC was used to detect the expression level of *L*-kynurenine (Kyn) to explore the anti-tumor mechanism of NLG-919 and temozolomide. The results show that NLG-919 had a weak *in vitro* inhibitory effect compared to that of temozolomide. The IC_{50} of NLG-919 on U251 cells and U87 after 72 h was 26.9 and 30.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. However, when NLG-919 was used in combination with temozolomide, its anti-glioma activity was significantly

收稿日期: 2021-08-04; 修回日期: 2021-10-21.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173852).

*通讯作者 Tel: 13813839472, E-mail: chenfeihong@seu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1141

increased. Compared with the single treatment, the combination treatment had a potent ability to inhibit proliferation, invasion and migration of glioma cells. Combination treatment improved the capacity of temozolomide to induce cell cycle arrest and inhibit the growth of glioma cells. NLG-919 significantly down-regulated the expression and activity of IDO1 in glioma cells, and the inhibitory effect was improved after combination with temozolomide, and effectively blocked the production of Kyn through the metabolism of *L*-tryptophan (Trp). In conclusion, the IDO1 inhibitor NLG-919 and temozolomide showed synergistic effects in the anticancer therapy of human glioma cell lines.

Key words: indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitor; temozolomide; glioma; anti-tumor; combinational treatment

目前,人脑胶质瘤已成为最具致病性、最常见的成人脑恶性肿瘤之一,是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,多数患者预后较差,放化疗联合只能使患者生存时间延长2~4个月^[1-3]。最有效的治疗方法是最大限度切除、化疗和放疗,但存活时间仍只有15个月。人脑胶质瘤具有发病率高、复发率高和局部侵袭等特点,并受到多种因素的调控^[4-6]。替莫唑胺(TMZ)是治疗人脑胶质瘤的一线化疗药物,其口服的生物利用度接近100%,并且容易通过血脑屏障。TMZ主要通过DNA甲基化和干扰错配修复机制发挥抗肿瘤作用,但随着治疗时间的延长容易产生耐药性与其他不良反应,疗效逐渐降低^[7]。

免疫治疗作为一种新的肿瘤治疗方法,可以通过激活和恢复癌症患者天然的免疫系统来识别和清除肿瘤细胞,具有广阔的发展前景。肿瘤的免疫治疗主要包括逆转肿瘤免疫逃逸和靶向杀伤肿瘤细胞。最新研究表明,色氨酸(Trp)分解代谢产生犬尿氨酸(Kyn)这一途径在脑胶质瘤的发病机制中具有重要作用^[8-12],在肿瘤细胞中Kyn的积累以及Trp的不断消耗会造成效应T细胞(T_{eff})以及自然杀伤细胞(NK)的抑制,激活了调节性T细胞(T_{reg}),导致肿瘤微环境产生免疫抑制作用,促进肿瘤免疫逃逸^[13]。研究表明,吲哚胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、吲哚胺2,3-双加氧酶2(IDO2)和色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)启动犬尿氨酸途径是一种肿瘤免疫逃逸的新机制,其抑制剂已经成为癌症免疫治疗的新策略^[14-16]。

IDO在多种人类癌症中表达,如恶性黑色素瘤、卵巢癌和结直肠癌,并且IDO表达水平在临床上与不良临床结果及肿瘤进展相关^[17-19]。IDO的表达导致Trp的局部消耗和具有毒性的Trp分解代谢物的积累,会使 T_{eff} 或NK细胞凋亡和生长停滞^[20-22]。已有报道认为,人类胶质母细胞组织中IDO高表达,并且在继发性胶质母细胞瘤中IDO的表达增加^[23]。在一些其他癌症中,研究报告也同样指出IDO抑制具有抗肿瘤作用^[24-26]。NLG-919是一种咪唑异吲哚,被证明是有效的IDO1抑制剂,可阻断IDO1介导的免疫抑制途径并导致免疫激活,显示出 T_{eff} 的剂量依赖性激活和增殖,

使已建立的肿瘤显著消退^[27]。目前,NLG-919对晚期实体瘤的治疗研究进展已进入临床I期^[28]。本研究通过将IDO1抑制剂NLG-919与替莫唑胺联合使用探究其对人脑胶质瘤的治疗效果,旨在为脑胶质瘤患者治疗提供新的治疗思路。

材料与方法

细胞 人脑胶质瘤细胞株U251、U87,购买于上海ATCC细胞库。

药物 IDO1抑制剂NLG-919(成都海品信医药有限公司),替莫唑胺(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号:85622-9391)。

试剂与仪器 DMEM培养基、RPMI-1640培养基、胰酶、PBS缓冲液、多聚甲醛溶液、细胞通透液Triton-100、细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI)、细胞周期检测试剂盒(RNase A/PI)、活性氧荧光探针(DCFH-DA)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)以及溴化四氮唑蓝(MTT)购自江苏凯基生物技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自阿拉丁试剂公司。

给药方法 将对数生长期的U251和U87细胞收集起来,离心后用DMEM完全培养基(DMEM不完全培养基:胎牛血清=10:1)重悬并将其接种于6孔板中且每孔细胞数约为 2×10^5 个,等细胞完全贴壁后,移除培养基并用PBS洗涤3次后加入新的含药培养基。阴性对照组不加入任何药物,将 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLG-919和 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ分别加入U251和U87细胞中,联合给药组分别加入两种药物各 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,后进行细胞凋亡、细胞周期阻滞、活性氧产生、线粒体膜电位下降检测和免疫荧光实验;将 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLG-919和 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ分别加入U251和U87细胞中,联合给药组分别加入两种药物各 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后进行集落形成实验、迁移和侵袭实验。

MTT法测定药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用 将处于对数生长期的细胞收集起来并加入一定量的完全培养基稀释成为每毫升含 4×10^4 个的细胞悬液,后接

种在 96 孔板内并在 37 °C 的条件下培养 24 h, 等细胞完全贴壁后吸出培养基并加入新的培养基。将药物稀释成 5 个不同浓度依次加入孔内, 每组浓度药物设置 3 个平行对照实验组, 每孔体积均为 100 μL , 培养 72 h 后每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 10 μL , 作用 4 h 后吸出培养基和药物并在每个孔内加入 DMSO 130 μL 。放在摇床上孵育 10 min 后在吸光度为 490 nm 的条件下用酶标仪测出每个孔的 A 值, 利用 SPSS18 软件计算出半数抑制浓度 (IC_{50}) 值, 其抑制率的计算方法: 抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{空白组}}$ 。以上实验重复 3 次。

采用联合作用指数 (combined index, CI) 判断两种药物的协同性, CI 计算方法: $\text{CI} = \text{DA}/\text{ICX}_A + \text{DB}/\text{ICX}_B$ (A 和 B 代表两种不同药物, ICX_A 和 ICX_B 是两种药物单独使用使生长抑制率达 X 时的药物浓度, DA 和 DB 是两药联合使用使生长抑制率达 X 时两种药物的浓度), $0.9 \leq \text{CI} \leq 1.1$ 为叠加作用, $0.8 \leq \text{CI} < 0.9$ 为低度协同作用, $0.6 \leq \text{CI} < 0.8$ 为中度协同作用, $0.4 \leq \text{CI} < 0.6$ 为高度协同作用, $0.2 \leq \text{CI} < 0.4$ 为强协同作用。

脑胶质瘤细胞集落形成实验 将对数生长期的 U251 和 U87 细胞消化后收集并稀释为每毫升 1×10^4 个的细胞悬液接种于 6 孔板中, 待贴壁后给药, 在 37 °C 和 5% CO_2 的条件下培养 2 周。当大多数的克隆细胞数多于 50 个时停止, 吸去培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 的多聚甲醛固定 20 min。洗去固定液, 每孔加入 2 mL 结晶紫溶液染色 15 min, 吸去并洗涤 3 次, 在空气中干燥 24 h 后可进行拍照并计算细胞克隆形成率。

脑胶质瘤细胞迁移和侵袭实验 接种后的细胞长满整个孔后吸出培养基, 然后用统一规格的 10 μL 枪头在孔内划出 3 道平行的直线凹槽, 并且保证宽度相同, 用 PBS 洗去脱落的细胞, 加入新的培养基和药物培养 24 h 后拍照并计算细胞的迁移抑制率, 迁移抑制率 = $(1 - \text{实验组迁移细胞数}/\text{对照组迁移细胞数}) \times 100\%$ 。

将对数生长期的 U251 和 U87 细胞消化后收集并用不含胎牛血清的 DMEM 不完全培养基稀释为每毫升 1×10^4 个的细胞悬液, 均匀分散于侵袭小室内, 分别加入 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NLG-919、TMZ 以及两种药物联合给药, 同时在侵袭小室下层加入完全培养基诱导侵袭。等待细胞侵袭完成后, 取出侵袭小室并用棉球擦去侵袭小室上表皮细胞, 用 0.1% 结晶紫对侵袭小室染色 20 min, 在白光显微镜下拍照获取侵袭图像, 侵袭抑制率 = $(1 - \text{实验组侵袭细胞数}/\text{对照组侵袭细胞数}) \times 100\%$ 。

细胞凋亡实验 给药处理后的细胞重悬于 500 μL 的缓冲液, 并加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL 染色 20 min, 通过流式细胞仪检测两种细胞的凋亡率。

细胞周期阻滞实验 给药处理后的细胞重悬于 500 μL 的 75% 冰乙醇中, 放置于 -20 °C 条件下固定 12 h。以 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 5 min 后倒掉上清液, 按照体积比为 1:9 加入 RNase A 与 PI 染液共 500 μL , 避光染色 20 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

活性氧 (ROS) 产生检测实验 给药处理后的细胞重悬于缓冲液中并加入 DCFH-DA 染色 20 min 后用流式细胞仪检测 ROS 产生的水平。

线粒体膜电位 (JC-1) 检测实验 给药处理后的细胞重悬于缓冲液中, 并加入 JC-1 探针染色 20 min, 流式细胞仪对线粒体膜电位下降程度进行测定。

免疫荧光实验 接种于培养皿的细胞经过给药处理后加入 4% 多聚甲醛溶液对细胞进行固定, 20 min 后移去固定液并加入浓度为 0.5% 的细胞通透液 Triton-100 对细胞进行透化, 20 min 后移去通透液并用 PBS 清洗 3 次, 加入质量分数为 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 在 4 °C 下与相应的一抗孵育过夜, 随后与相应的二抗在 37 °C 下孵育 2 h, DAPI 染色 10 min 后通过荧光共聚焦显微镜进行成像。

高效液相 (HPLC) 测定 Kyn 表达 给药处理后的细胞加入 20% 的三氯乙酸孵育 30 min, 进行蛋白质沉淀。孵育结束后再次以 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 30 min, 收集上清液用于 Trp 和 Kyn 的检测。HPLC 的检测条件: 流动相为乙腈和水 (乙腈:水 = 60:40), 流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测的波长为 254 nm。

统计学方法 本研究通过 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 不同的数据资料表达方式如: 剂量数据为 $(\bar{x} \pm s)$, 两组间比较用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 组间的差异显著, 数据差异有意义。

结果

1 NLG-919 与 TMZ 联用对人脑胶质瘤 U251 和 U87 细胞生长抑制的影响

采用 MTT 法测定 NLG-919 和替莫唑胺单独及联合使用对人肿瘤细胞 U251 和 U87 的体外作用。图 1 显示应用 5、10、20、30 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 处理 U87 细胞和 U251 细胞 72 h 后, 细胞增殖抑制率增加, 从中可以发现 TMZ 浓度超过 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后再升高其浓度, 两种胶质瘤细胞的抑制率升高不明显, 故联合用药浓度选择 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。应用同种浓度梯度的 NLG-919 处理 U87 和 U251 细胞 72 h 后, 细胞增殖抑制率增加, 结果提示, NLG-919 浓度超过 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后再升高其浓度, 两种胶质瘤细胞的抑制率升高不明显, 故联合用药浓度同样选择 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

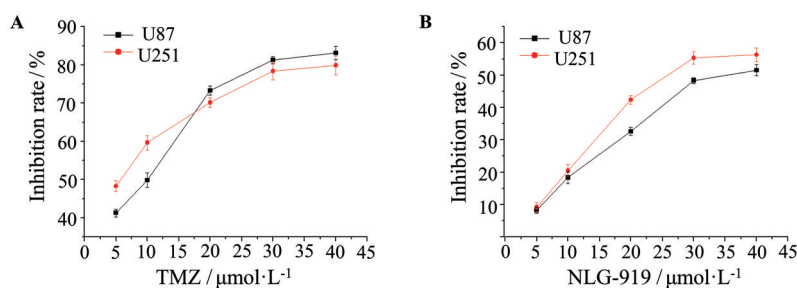


Figure 1 Effects of different concentrations of temozolomide (TMZ, 5, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NLG-919 (5, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 72 h on the inhibitory rate of proliferation of U87 and U251 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表1结果显示,在药物作用72 h后,两种药物均能抑制U251和U87细胞的增殖,替莫唑胺对两种细胞系的细胞毒性均优于NLG-919,且两种药物联合使用较TMZ单独使用对U87细胞和U251细胞的半数抑制浓度(IC_{50})值分别由(10.9 ± 0.98) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(6.192 ± 0.52) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 降低至(3.798 ± 0.26) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(3.111 ± 0.18) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明NLG-919与替莫唑胺联合使用具有较好的协同作用。

Table 1 The *in vitro* cytotoxicity evaluation of the selected drugs to human glioma cells for 72 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Cell	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	NLG-919	TMZ	Combination
U251	26.905 ± 2.12	6.192 ± 0.52	3.111 ± 0.18
U87	30.701 ± 2.91	10.9 ± 0.98	3.798 ± 0.26

通过联合作用指数 (combined index, CI) 判断两种药物的协同性。在U87细胞中,NLG-919与TMZ的CI指数为 0.617 ± 0.023 ,为中度协同作用;在U251细胞,NLG-919与TMZ的CI指数为 0.471 ± 0.016 ,为高度协同作用,表明NLG-919与TMZ对人脑胶质瘤的抑制作用并非叠加作用,而呈现协同效应。

2 NLG-919与TMZ联用对人脑胶质瘤U251和U87细胞增殖能力的影响

以平板克隆形成法观察NLG-919与替莫唑胺单独或联合使用对体外细胞增殖的作用来判断药物的体

外抗肿瘤活性。结果显示,集落形成实验结果与细胞生长抑制结果一致,这两种药物均可以有效抑制U251和U87细胞的增殖,与单独使用TMZ相比,联合用药显示出更有效的抑制作用,表明NLG-919与TMZ具有协同抑制胶质瘤增殖的作用(图2)。

3 NLG-919与TMZ联用对人脑胶质瘤U251和U87细胞迁移和侵袭能力的抑制作用

实验结果显示,与单独使用TMZ相比,NLG-919与TMZ联用组对U251细胞和U87细胞的迁移能力具有更明显的抑制作用(图3A)。此外,两种胶质瘤细胞侵袭到Transwell小室另一侧的数量明显降低(图3B),表明两种药物联用对胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力的抑制作用最强($P < 0.05$),实验表明NLG-919协同TMZ抑制U87和U251细胞的侵袭和转移能力($P < 0.05$)。

4 NLG-919与TMZ联用对人脑胶质瘤U251和U87细胞凋亡诱导作用

为了更好地探究MTT实验中观察到的联合抗增殖活性的潜在机制,将TMZ和NLG-919两种药物单独或联合作用于U87细胞和U251细胞,并通过流式细胞术进行FITC/PI染色来量化凋亡细胞的百分比,如图4所示,在U87细胞中联合给药处理24 h后诱导凋亡细胞百分比增加:对照组为 $2.932\% \pm 0.04\%$,TMZ实验组为 $29.86\% \pm 1.02\%$,NLG-919实

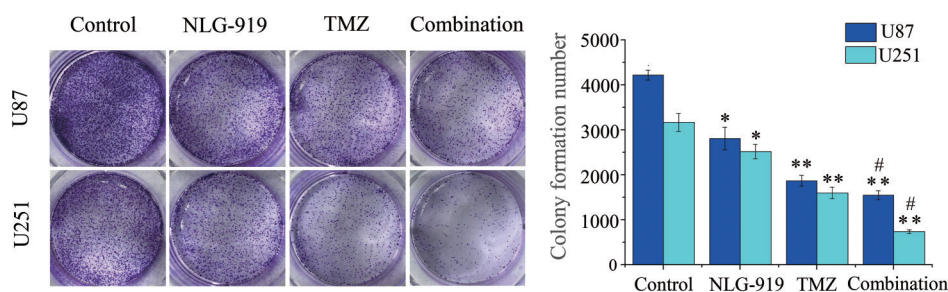


Figure 2 Effects of NLG-919 and TMZ on proliferation of human glioma U251 and U87 cells. Colony formations of U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 14 days (NLG-919 eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs TMZ-treated groups

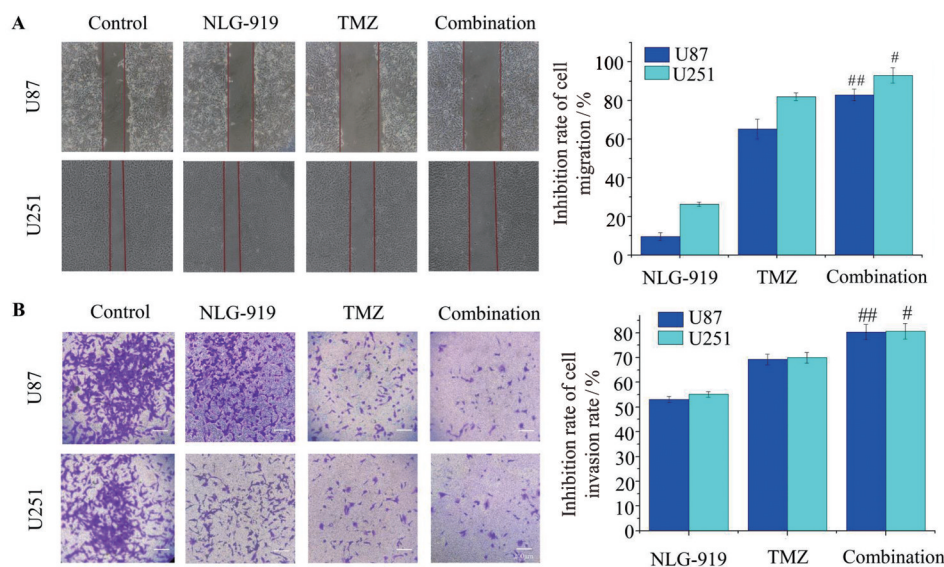


Figure 3 Inhibition of migration and invasion of human glioma U251 and U87 cells by NLG-919 and TMZ. A: Migration abilities of U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: Invasion abilities of U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ vs TMZ-treated groups

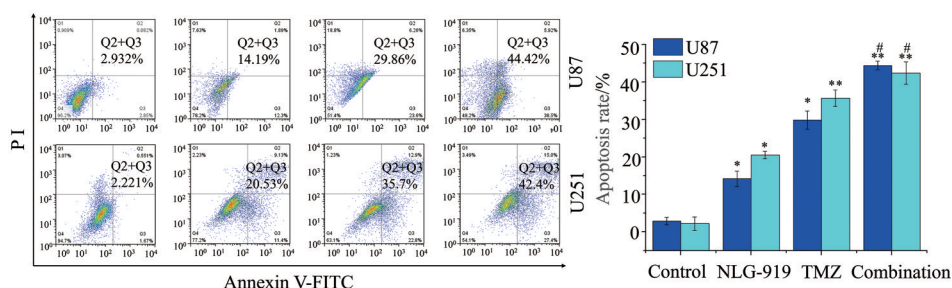


Figure 4 Effects of NLG-919 and TMZ on apoptosis of human glioma U251 and U87 cells. U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). U251 and U87 cells were resuspended in a $500 \mu\text{L} 1 \times$ buffer and stained with Annexin V-FITC and PI $5 \mu\text{L}$ each for 20 min. The cells were detected by flow cytometry. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs control; $^{\#}P < 0.05$ vs TMZ-treated groups

验组为 $14.19\% \pm 1.15\%$, TMZ 和 NLG-919 联用为 $44.42\% \pm 2.28\%$; 在 U251 细胞中联合给药处理 24 h 后诱导凋亡细胞百分比增加: 对照组为 $2.221\% \pm 0.02\%$, TMZ 实验组为 $35.7\% \pm 1.79\%$, NLG-919 实验组为 $20.53\% \pm 1.59\%$, TMZ 和 NLG-919 联用为 $42.4\% \pm 1.98\%$ 。值得注意的是, 在两种胶质瘤细胞中, 与单独使用 TMZ 作用相比, 联合治疗显著诱导胶质瘤细胞凋亡 ($P < 0.05$)。实验表明 NLG-919 与 TMZ 联用相较于单独用药, 具有更有效的诱导人脑胶质瘤凋亡作用。

5 NLG-919 与 TMZ 联用对人脑胶质瘤 U251 和 U87 细胞周期分布的影响

为了研究联合用药在胶质瘤细胞中的抗增殖机

制, 本研究检测了不同给药组对胶质瘤细胞周期的影响。如图 5 所示, 在 U87 细胞中, 对照组的 G2-M 期细胞百分比为 $30.58\% \pm 2.23\%$, 在 NLG-919 给药过后, G2-M 期细胞百分比为 $70.48\% \pm 1.08\%$, 明显提高 ($P < 0.01$), 表明 NLG-919 可以在 U87 细胞中将细胞周期阻滞在 G2-M 期, 且效果要优于单独使用 TMZ, 然而当 NLG-919 与 TMZ 联用后对于细胞的周期阻滞并未有明显提高。在 U251 细胞中, 对照组的 G0-G1 期细胞百分比为 $8.23\% \pm 0.14\%$, NLG-919 与 TMZ 联用组的 G0-G1 期细胞百分比明显增加, 达到 $71.29\% \pm 2.89\%$, 且优于单独使用 TMZ ($P < 0.05$), 表明在 U251 细胞中, 二者联用通过将细胞周期阻滞于 G0-G1 期, 从而抑制细胞生长。

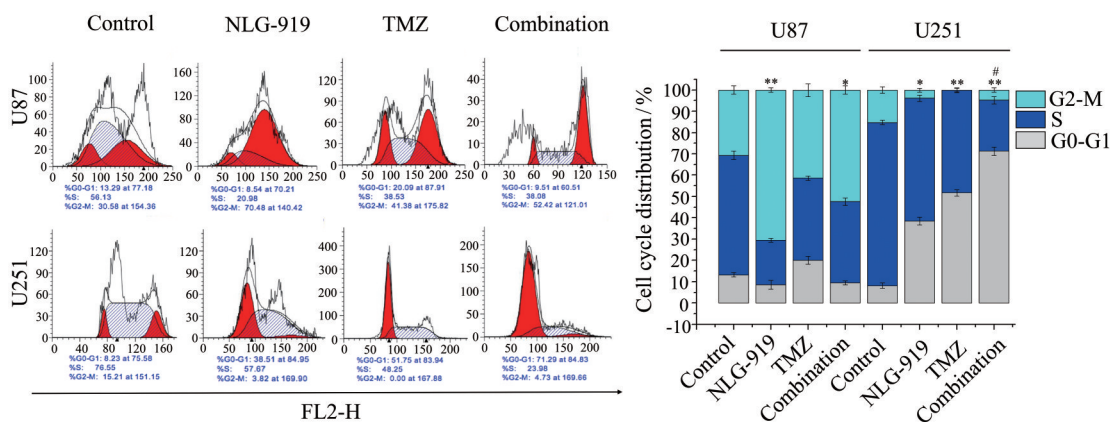


Figure 5 Effects of NLG-919 and TMZ on cell cycle distribution in human glioma U251 and U87. U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). U251 and U87 cells were resuspend in a 500 μL mixed solution (RNaseA:PI = 1:9), and the cell cycle was detected by flow cytometer; data were analyzed using ModFit LT 3.3 software. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs TMZ-treated groups

6 NLG-919与TMZ联用对人脑胶质瘤U251和U87细胞ROS产生的影响

ROS与许多人类疾病有关(包括肿瘤在内),是化疗药物起作用的前提条件^[29-31],当药物进入细胞发生作用时,细胞内的谷胱甘肽(GSH)会与药物结合,导致细胞内氧化还原失去平衡,诱导ROS的产生,造成氧化应激,过量的ROS会造成细胞的损伤。如图6所示,与对照组和单独用药组相比,联用NLG-919与TMZ可以诱导大量的ROS累积,展现出更强的抗肿瘤作用。

7 NLG-919与TMZ联用对人脑胶质瘤U251和U87细胞线粒体膜电位的影响

ROS的提高通常伴随着线粒体膜电位损伤,线粒体也是ROS产生的主要场所。ROS的累积会对线粒体的主要蛋白造成严重的氧化损伤,进而诱导细胞凋亡,因此线粒体膜电位的下降是药物作用导致肿瘤细胞早期凋亡的重要标志^[32]。如图7所示,本研究通过对线粒体膜电位检测发现,在U251和U87细

胞中,联合使用后可以显著降低线粒体膜电位。与单一使用TMZ相比,联合用药可以使线粒体膜电位下降程度分别提升到7.0% ($P < 0.01$)和10.2% ($P < 0.01$)。

8 NLG-919通过下调胶质瘤细胞IDO1表达与TMZ发挥协同抗肿瘤作用

研究表明,IDO1在人脑胶质瘤组织中高表达,并且在恶性转化的继发性胶质母细胞瘤组织中表达增加。由于NLG-919是IDO1抑制剂,因此通过免疫荧光实验进一步检测两种胶质瘤细胞中IDO1的表达,如图8所示,NLG-919抑制了U251细胞和U87细胞中IDO1的表达,TMZ的影响弱于NLG-919,当两种药物联合使用后,可以抑制IDO1的表达。

9 NLG-919可以有效下调胶质瘤细胞的Kyn表达水平

IDO1的高表达会导致具有毒性的Trp分解代谢物Kyn的不断增多,该产物的积累会使同种反应性T细胞或自然杀伤细胞的凋亡和生长停滞。当IDO1的

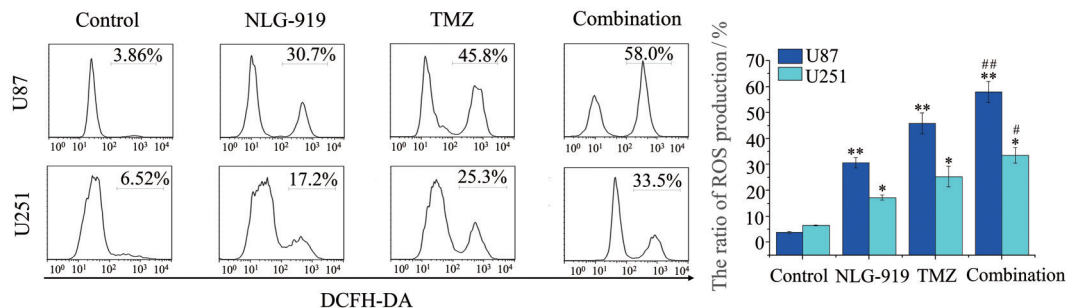


Figure 6 Effects of NLG-919 and TMZ on ROS in human glioma U251 and U87 cells. U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). U251 and U87 cells were resuspended in buffer and stained with H2DCFDA (DCFH-DA). The level of ROS production was detected by flow cytometry. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs TMZ-treated groups

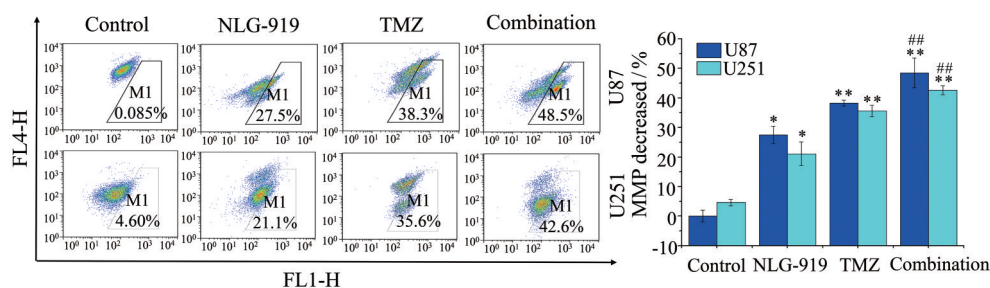


Figure 7 Effects of NLG-919 and TMZ on mitochondrial membrane potential in human glioma U251 and U87 cells. U251 and U87 cells were analyzed in comparison with NLG-919, TMZ and the combinational treatment after incubation for 24 h (NLG-919 eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TMZ eq·dose $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). U251 and U87 cells were resuspended in $1 \times$ buffer and stained by adding JC-1 probe. The decrease degree of mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs TMZ-treated groups

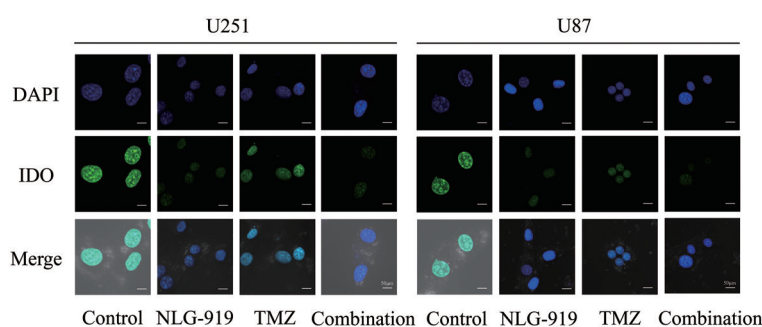


Figure 8 Representative results showing the IDO1 expression in human glioma cells after treatment with NLG-919 ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and TMZ ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The scale bar represents $50 \mu\text{m}$. Immunofluorescence images were captured by magnification in a 40-fold confocal microscope

表达和活性被抑制后, Kyn 的产生也将得到抑制。本研究通过高效液相色谱仪检测人脑胶质瘤细胞中 Kyn 和 Trp 的表达水平。实验结果如图 9 所示, 在 U87 细胞和 U251 细胞中, 与空白组相比, NLG-919 能够有效地抑制 Kyn 的产生, 导致 Trp 的水平明显提高, 这一结果与 IDO1 的表达水平有关, 表明通过抑制 IDO1 的表达和活性可以更好地阻断 Trp 代谢产生 Kyn, 进一步验证 NLG-919 可以有效地抑制 IDO1 的表达和活性。

讨论

目前, 恶性胶质瘤作为原发性的脑肿瘤是最致命的癌症形式之一, 主要治疗方式为手术切除、放疗和化疗, 但新确诊患者的死亡率仍旧很高。随着病情的加重, 患者可能出现颅内压力升高以及神经功能障碍, 癌细胞的生长具有浸润性和侵袭性, 影响周边组织的正常功能。TMZ 作为治疗脑胶质瘤的一线化疗药物, 具有较高的细胞杀伤力, 但对 TMZ 敏感的肿瘤细胞也会随着化疗的进行逐渐产生获得性耐药, 这严重地影响术后的化疗效果。新的研究表明, 犬尿氨酸途径是产生 Kyn 的 L-Trp 分解代谢的主要途径, 在胶质瘤的发病机制中发挥着重要的作用。NLG-919 是一种咪唑异吡

啉, 它可阻断 IDO1 介导的免疫抑制途径并导致免疫激活, 并可以使效应 T 细胞的剂量依赖性激活和增殖, 从而达到抑制肿瘤的效果, NLG-919 作为新型的 IDO1 抑制剂与 TMZ 联用具有较好的协同作用, 其机制可能涉及: ① NLG-919 能通过诱导 ROS 的产生对线粒体进行氧化损伤, 从而诱导细胞凋亡, 增强化疗药物 TMZ 的疗效比率; ② Kyn/Trp 与胶质瘤的病理分级呈正相关^[33]。NLG-919 作为新型 IDO1 抑制剂, 通过阻断犬尿氨酸途径, 减少 L-Trp 的消耗及 Kyn 的积累, 逆转肿瘤免疫逃逸, 延长了人脑胶质瘤患者的存活时间。

本研究初步表明, NLG-919 与 TMZ 联用后具有更高的人脑胶质瘤细胞抑制作用, 能够协同抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。NLG-919 与 TMZ 联用可以诱导人脑胶质瘤细胞的周期阻滞, 同时诱导 ROS 的产生以及线粒体膜电位的降低来共同促进肿瘤细胞的凋亡, 此外, 两者联用对 IDO1 具有较好的抑制作用。IDO1 可能是一种较可靠的人脑胶质瘤患者预后指标, 并且是恶性胶质瘤的重要治疗靶点之一。关于两者联合用药来逆转 TMZ 耐药及其机制作用, 将成为本课题组日后研究的重点。

综上所述, NLG-919 能够提高替莫唑胺的抗肿瘤

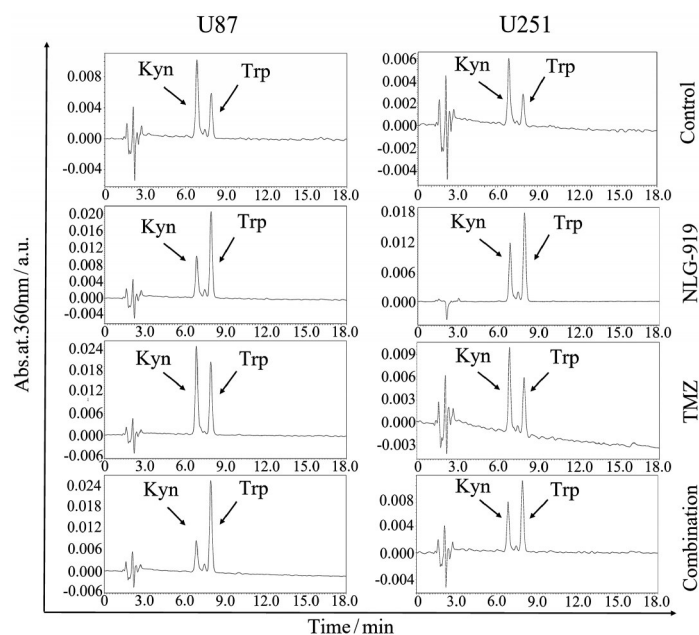


Figure 9 High performance liquid chromatography (HPLC) determination. NLG-919 could effectively down-regulate the expression level of *L*-kynurenine (Kyn) in glioma cells. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (acetonitrile:water = 60:40), the flow rate was $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, and the detection wavelength was 254 nm

作用, 两者能够更好地发挥协同抗肿瘤治疗效果, 两种药物联用为人脑胶质瘤的治疗提供了较好的临床治疗和研究基础。

作者贡献: 田文源负责实验研究、论文撰写和论文修改; 陈飞虹负责实验设计、论文撰写和论文修改。

利益冲突: 本文作者声明无利益冲突。

References

- [1] Herbert S, Walter S. 5-ALA in the management of malignant glioma [J]. *Laser Surg Med*, 2018, 50: 399-419.
- [2] Gaelle T, Konstantin M, Pierre R, et al. Prognostic significance of MEOX2 in gliomas [J]. *Modern Pathol*, 2019, 32: 774-786.
- [3] Xu B, Li AQ, Jiang GF. Research progress of glioma cell origin [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2018, 34: 566-571.
- [4] Tanja E, Barbara C, Jens S, et al. An advanced glioma cell invasion assay based on organotypic brain slice cultures [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18: 103.
- [5] Mehta S, Lo CC. Developmentally regulated signaling pathways in glioma invasion [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 385-402.
- [6] Ostrom QT, Bauchet L, Davis F, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16: 896-913.
- [7] Pu B, Gao JJ. Influences of temozolomide combined with radiation therapy in VEGF and IL-8 expressions of glioma patients [J]. *Genomics Applied Biol (基因组学与应用生物学)*, 2016, 35: 3285-3291.
- [8] Adams S, Braidy N, Bessede A, et al. The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 5649-5657.
- [9] Adams S, Charles T, Kerrie L, et al. Involvement of the kynurenine pathway in human glioma pathophysiology [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e112945.
- [10] Batista CE, Csaba J, Otto M, et al. Imaging correlates of differential expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human brain tumors [J]. *Mol Imaging Biol*, 2009, 11: 460-466.
- [11] Guastella AR, Michelhaugh SK, Klinger NV, et al. Tryptophan PET imaging of the kynurenine pathway in patient-derived xenograft models of glioblastoma [J]. *Mol Imaging*, 2016, 15: 1536012116644881.
- [12] Zhai LJ, Lauing KL, Chang AL, et al. The role of IDO in brain tumor immunotherapy [J]. *Neurooncol*, 2015, 123: 395-403.
- [13] Qian S, Zhang M, Chen QL, et al. IDO as a drug target for cancer immunotherapy: recent developments in IDO inhibitors discovery [J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 7575-7581.
- [14] Holmgaard RB, Dmitriy Z, Yanyun L, et al. Tumor-expressed IDO recruits and activates MDSCs in a Treg-dependent manner [J]. *Cell Rep*, 2015, 13: 412-424.
- [15] Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor [J]. *Nature*, 2011, 478: 197-203.
- [16] Pilotte L, Pierre L, Vincent S, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 2497-2502.
- [17] Riesenberger R, Weiler C, Spring O, et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma [J].

- Clin Cancer Res, 2007, 13: 6993-7002.
- [18] Takao M, Okamoto A, Nikaido T, et al. Increased synthesis of indoleamine-2,3-dioxygenase protein is positively associated with impaired survival in patients with serous-type, but not with other types of ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2007, 17: 1333-1339.
- [19] Urakawa H, Nishida Y, Nakashima H, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in high grade osteosarcoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 1005-1012.
- [20] Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, et al. The tryptophan catabolite *L*-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46⁺ and NKG2D⁺ activating receptors and regulates NK-cell function [J]. *Blood*, 2006, 108: 4118-4125.
- [21] Lee GK, Park HJ, Macleod M, et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division [J]. *Immunology*, 2002, 107: 452-460.
- [22] Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1363-1372.
- [23] Mitsuka K, Kawataki T, Satoh E, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and correlation with pathological malignancy in gliomas [J]. *Neurosurgery*, 2013, 72: 1031-1038.
- [24] Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of *L*-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 792-801.
- [25] Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 312-319.
- [26] Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 1269-1274.
- [27] Zhai QY, Chen YC, Xu JN, et al. Lymphoma immunochemotherapy: targeted delivery of doxorubicin *via* a dual functional nanocarrier [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14: 3888-3895.
- [28] Asha N, Hao ZL, Ramses S, et al. A phase I study of NLG919 for adult patients with recurrent advanced solid tumors [J]. *J Immuno Ther Cancer*, 2014, 2: P250.
- [29] Makiya N. Reactive oxygen species in tumor metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266: 53-59.
- [30] Calatrava-Pérez E, Bright SA, Achermann S, et al. Glycosidase activated release of fluorescent 1,8-naphthalimide probes for tumor cell imaging from glycosylated 'pro-probes' [J]. *Chem Commun*, 2016, 52: 13086-13089.
- [31] Marian V, Dieter L, Jan M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 44-84.
- [32] Chua EYD, Davey GE, Chin CF, et al. Stereochemical control of nucleosome targeting by platinum-intercalator antitumor agents [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 5284-5296.
- [33] Badawy AA. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2017, 10: 1178646917691938.