

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.008

· 临床研究(专题) ·

PFKFB3在胶质瘤组织中的表达及其对H4细胞恶性生物学行为的影响

陈向荣¹, 杜菊梅², 吴宗涛¹ (1. 陕西省安康市中医医院 神经外科, 陕西 安康 725000; 2. 陕西中医药大学第二附属医院 脑病科, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] **目的:** 探讨恶性胶质瘤组织中糖酵解限速酶 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 同工酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3) 的表达水平及 PFKFB3 抑制剂 PFK15 对胶质瘤 H4 细胞增殖、迁移、克隆形成和体内成瘤的影响。**方法:** 采集 2015 年 2 月 1 日至 2016 年 1 月 31 日安康市中医医院神经外科手术切除的 31 例恶性脑胶质瘤及相应瘤旁组织标本, 应用免疫组化技术和 Western blotting 检测胶质瘤和瘤旁组织中 PFKFB3 的表达水平。用不同浓度的 (1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$) PFK15 抑制胶质瘤 H4 细胞的 PFKFB3 表达, 通过 MTT 法、EdU 细胞增殖实验、细胞划痕实验、Transwell 侵袭实验、克隆形成实验和裸鼠体内成瘤实验分别观察 PFK15 对 H4 细胞增殖、迁移、侵袭、克隆形成和体内成瘤的影响。**结果:** PFKFB3 在胶质瘤组织中阳性率显著高于瘤旁组织 [(80.60 \pm 8.98)% vs (41.57 \pm 10.16)%, $P < 0.05$]。MTT 和 EdU 实验结果显示, PFK15 可明显抑制 H4 的增殖活性 ($P < 0.05$), 且抑制作用具有浓度依赖性。PFK15 处理后的 H4 细胞迁移、侵袭和克隆形成能力明显低于对照组 (均 $P < 0.05$)。注射 PFK15 的裸鼠 H4 细胞移植瘤体积明显小于对照组裸鼠 [(254.15 \pm 154.25) vs (801.52 \pm 224.25) mm^3 , $P < 0.01$]。**结论:** PFKFB3 在恶性胶质瘤组织中高表达, 下调 PFKFB3 可显著抑制胶质瘤 H4 细胞的恶性生物学行为和体内成瘤, PFKFB3 可作为恶性胶质瘤生物治疗潜在的分子靶点。

[关键词] 恶性胶质瘤; H4 细胞; 糖酵解; 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 同工酶 3; PFK15

[中图分类号] R739.41; R73-35⁺4; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0363-07

Expression of PFKFB3 in brain glioma tissues and its effect on malignant biological behaviors of H4 cells

CHEN Xiangrong¹, DU Jumei², WU Zongtao¹ (1. Department of Neurosurgery, Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang 725000, Shaanxi, China; 2. Department of Encephalopathy, the Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 (PFKFB3) in malignant glioma tissues and the effects of inhibitor of PFKFB3 (PFK15) on the proliferation, migration, invasion, clone formation and tumorigenesis of H4 cells. **Methods:** Malignant brain glioma tissues and corresponding paratumor tissues from 31 patients, who were hospitalized in Department of Neurosurgery, Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine during February 1, 2015 to January 31, 2016 for operative treatment, were collected for this study. Immunohistochemistry and western blotting assays were applied to detect the expression of PFKFB3 in collected tissues. PFKFB3 in H4 cells were blocked by PFK15 (1.25, 2.5, 5.0 $\mu\text{mol/L}$). The effect of PFK15 on proliferation, migration, clone formation and tumorigenesis of H4 cells were determined by MTT assay, EdU incorporation assay, wound healing assay, Transwell assay, clone formation assay and *in vivo* xenograft bearing nude mice model respectively. **Results:** Positive expression rate of PFKFB3 was significantly higher in malignant glioma tissues compared with normal adjacent tissues [(80.60 \pm 8.98)% vs (41.57 \pm 10.16)%, $P < 0.05$]. The results of MTT assay and EdU incorporation assay indicated that PFK15 significantly inhibited the proliferation of H4 cells in a concentration dependent manner. The migration, invasion and clone formation activity of H4 cells were significantly reduced by treatment with PFK15 (all $P < 0.05$). In tumor bearing nude mice, the tumor volume of mice treated with PFK15 was significantly smaller than that of mice from control group [(254.15 \pm 154.25) vs [801.52 \pm 224.25] mm^3 , $P < 0.05$). **Conclusion:** PFKFB3 was highly expressed in malignant glioma tissues. Blocking of PFKFB3 by PFK15 significantly reduced the malignant biological behaviors and tumorigenesis of H4 cells *in vitro* and *in vivo*, which may

[基金项目] 陕西中医药大学科研基金资助项目 (No.2016QN22)。Project supported by the Scientific Research Program of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine (No.2016QN22)

[作者简介] 陈向荣 (1984-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事神经外科基础和临床相关研究, E-mail: 327970679@qq.com

[通信作者] 吴宗涛 (WU Zongtao, corresponding author), 副主任医师, 主要从事神经外科基础和临床相关研究, E-mail: lzs201610@163.com

serve as a promising target for the treatment of malignant gliomas.

[Key words] malignant gliomas; H4 cell; glycolysis; phosphofructokinase-2/fructose-2, 6-bisphosphatase 3 (PFKFB3); PFK15

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 363-369. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.008]

恶性胶质细胞瘤(胶质瘤)占原发性脑肿瘤的60%以上,是成人最常见的原发性脑肿瘤^[1-3]。脑胶质瘤呈浸润性生长,与脑组织无明确分界,手术治疗仅能在保存神经功能的前提下尽可能切除肿瘤组织,常难以彻底切除,导致脑胶质瘤预后较差,患者中位生存期仅为10~12个月^[1-2]。因此,研究胶质瘤的发生发展的相关机制,对于寻求更好的治疗方法有重要的临床意义。有研究^[4-5]证实,大多数恶性肿瘤细胞产生能量的方式是糖酵解,且糖酵解与恶性肿瘤的发生发展及转移密切相关。6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2同工酶3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3,PFKFB3)是磷酸果糖激酶(phosphofructokinase,PFK)的一种亚型,是糖酵解过程中重要的限速酶,其在部分肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和转移中起重要作用^[6-8]。糖酵解中涉及的限速酶可能是恶性肿瘤治疗的重要靶点。但目前尚未见胶质瘤中糖酵解限速酶的表达情况及其在胶质瘤发生发展中作用的研究报道。本课题通过检测脑恶性胶质瘤组织中 PFKFB3 表达水平以及 PFKFB3 抑制剂 PFK15 对胶质瘤 H4 细胞增殖、迁移、克隆形成和体内成瘤的影响,以期恶性胶质瘤的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 临床资料

采用2015年2月1日至2016年1月31日在安康市中医医院神经外科手术切除的31例恶性脑胶质瘤标本及相应瘤旁组织,所有标本均由两位病理医师独立诊断,并结合患者临床表现、影像学及组织学特点确诊。患者年龄8~72岁,中位年龄37.81岁;男性9例,女性22例;病变部位:额叶16例,顶叶2例,颞叶10例,枕叶3例;病理类型(除7例无分类资料外):星形胶质细胞瘤8例,成胶质细胞瘤10例,少突胶质细胞瘤6例;肿瘤(WHO)分期:I-II期14例,III-IV期17例;所有患者均无饮酒爱好,多数患者无吸烟爱好(7例吸烟外)。标本获取前均告知患者并签署知情同意书,研究方案经安康市中医医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系及主要试剂

人胶质瘤H4细胞来源于中国典型培养物保藏中心。胰蛋白酶、双抗(青霉素+链霉素)胎牛血清(FBS)、DMEM培养基(美国Hyclone公司),基质胶(美国BD公司),RIPA裂解液(上海生工生物工程有限公司),含DAPI封片剂(武汉谷歌生物科技有限公司),ECL化学发光试剂盒(美国Thermo Fisher),

PFKFB3一抗 β -actin(美国Sigma公司),PFK15(美国Selleck生物科技有限公司),Transwell小室(美国Corning公司),EdU试剂盒(广州锐博生物科技有限公司)。

1.3 免疫组化法检测胶质瘤组织中 PFKFB3 的表达

标本取材后切成小块组织,4%多聚甲醛固定、常规制片(片厚4 μ m)。脱蜡、梯度乙醇入水、高压抗原修复、羊血清37 $^{\circ}$ C孵育切片20 min,甩去血清,滴加PFKFB3一抗(1:200)或Ki-67一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。滴加相应辣根过氧化物酶标记的二抗约50 μ l完全覆盖切片,37 $^{\circ}$ C孵育20 min。PBS缓冲液漂洗后,滴加链霉亲和素-过氧化物酶,37 $^{\circ}$ C孵育20 min。PBS缓冲液漂洗后,于光镜下显色。苏木精复染、常规脱水和封片,光镜下观察PFKFB3阳性细胞的百分比。评分采用:(1)阳性着色细胞数:随机观察5个高倍视野(\times 200)/张切片,计算阳性细胞百分比,然后统计该样本平均阳性细胞百分比;(2)染色强度:随机拍摄5个高倍视野(\times 200)/张切片,利用Image-Pro Plus软件统计PFKFB3着色强度。染色评分由2名经验丰富的病理医师进行双盲阅片完成,取其平均值。

1.4 细胞培养

将胶质瘤H4细胞培养于含10% FBS的DMEM培养基中,置于37 $^{\circ}$ C、95%湿度、5% CO₂、饱和湿度条件下,隔天换液,每3 d传代一次。

1.5 Western blotting 检测胶质瘤组织中 PFKFB3 蛋白的表达

收获组织总蛋白,BCA法测蛋白浓度。按所测蛋白浓度计算样品和NaCl、5 \times 上样缓冲液体积后,将其混合并置于95 $^{\circ}$ C水浴锅中水浴5 min。配制聚丙烯酰胺凝胶,80 V恒压下蛋白电泳至分离胶与浓缩胶界面时换为120 V电压,然后200 mA,2 h恒流下将蛋白转至PVDF膜。封闭2 h后,以PFKFB3(1:1 000)、 β -actin(1:10 000)抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min。二抗孵育2 h, TBST洗膜3次,每次10 min。化学发光剂显色后,蛋白凝胶成像系统分析样品中目标蛋白的相对含量。

1.6 MTT法检测PFK15对H4细胞增殖的影响

取对数期生长的H4细胞,调整细胞悬液浓度加入96孔板:每孔加入100 μ l,使细胞调密度为 $1\times 10^3\sim 1\times 10^4$ /孔。细胞分为对照组和实验组,实验组细胞分别加入终浓度为1.25、2.5、5.0 μ mol/L的PFK15;对照组加入等体积PBS。于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱孵育0~72 h,每孔加入10 μ l MTT溶液(5 mg/ml),继续培养

4 h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入100 μl 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪于波长490 nm处测量各孔的光密度(D)值。实验重复3次。

1.7 EdU细胞增殖实验检测PFK15对H4细胞增殖的影响

将H4细胞以 1×10^5 /孔加入12孔板,当细胞汇合度达50%~60%时,将细胞分为对照组和实验组,实验组分别加入终浓度为1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的PFK15;对照组加入等体积PBS。EdU溶液用细胞培养基稀释(1:1 000)制成50 $\mu\text{mol/L}$ 的EdU培养基。加入100 μl 培养基/孔孵育2 h,弃培养基。PBS清洗细胞1~2次,加入50 μl 细胞固定液(即含4%多聚甲醛的PBS)室温孵育30 min,弃固定液;加入50 μl 甘氨酸(2 mg/ml)溶液/孔,脱色摇床孵育5 min后,弃甘氨酸溶液;加入100 μl PBS/孔,脱色摇床清洗5 min,弃PBS。加入100 μl 的Apollo[®]染色反应液,避光、室温、脱色摇床孵育30 min后,弃染色反应液;加入100 μl 甲醇/孔清洗1~2次,PBS清洗1次。用含有DAPI封片剂封片。荧光显微镜下观察并拍照,增殖细胞核被标EdU试剂标记为绿色。每张玻片随机选取5个视野,统计增殖细胞占总细胞比例。实验重复3次。

1.8 细胞划痕实验检测PFK15对H4细胞迁移的影响

将对数生长期的H4细胞接以 5×10^5 /孔接种于6孔板中,培养24 h后,以20 μl 黄色无菌吸头沿培养孔的正中划一道划痕,PBS轻轻冲洗并吸收游离细胞。其中实验组细胞中分别加入终浓度为1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的PFK15。分别统计各组中划痕区域内细胞数目并与对照组进行统计学比较。实验重复3次。

1.9 Transwell侵袭实验检测PFK15对H4细胞侵袭能力的影响

将铺有基质胶Transwell小室置于24孔板上,在下室加入500 μl 含有不同浓度的PFK15(1.25、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养基,小室内加入300 μl 无血清培养基垂悬的H4细胞。培养24 h后,从培养箱中取出Transwell小室,PBS清洗,用棉签擦去上层基质胶和细胞,95%乙醇固定10 min,结晶紫染色10 min,PBS冲洗3次,显微镜下观察并拍照。分别统计各组中穿过基质胶的细胞数目并与对照组进行统计学比较。实验重复3次。

1.10 克隆形成实验检测PFK15对H4细胞克隆形成率的影响

取对数生长期的H4细胞,0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,悬浮在10%胎牛血清的DMEM培养液中备用。每组细胞分别以每皿50、100、200个

细胞密度分别接种含10 ml 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温培养液的皿中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。实验组加入2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的PFK15;对照组加入等体积PBS。置于培养箱连续培养,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用PBS小心浸洗2次。加4%多聚甲醛固定细胞5 ml固定15 min。去固定液,加适量GIMSA染色液孵育15 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。最后计算克隆形成率,克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.11 裸鼠体内成瘤模型的构建和观察

将对数生长期的H4细胞以PBS重悬制成细胞密度为 1×10^7 /ml悬液,取200 μl 注射于裸鼠腹侧皮下(每组各8只),实验组裸鼠每隔2 d经尾静脉给与PFK15(15 mg/kg),连续注射3次。对照组裸鼠注射等量的PBS。观察并测量和记录肿瘤大小。肿瘤体积计算公式为:1/2(长 \times 宽 \times 厚)。观察期结束后,处死裸鼠,取下肿瘤标本及肺组织,制成石蜡切片,用免疫组化染色法检测体内肿瘤组织中Ki-67表达水平。

1.12 统计学处理

应用SPSS20.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料以百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFKFB3蛋白在胶质瘤组织中高表达

免疫组化染色结果(图1A)显示,肿瘤组织内PFKFB3着色部位(褐色)主要位于细胞浆内,且PFKFB3蛋白在胶质瘤组织中阳性表达率显著高于肿瘤旁组织[(80.60 \pm 8.98)% vs (41.57 \pm 10.16)%, $t=5.886$, $P < 0.05$]。Western blotting检测结果(图1B,C)显示,胶质瘤组织中PFKFB3蛋白的表达水平明显高于肿瘤旁组织($t=5.249$, $P < 0.01$)。

2.2 PFK15抑制胶质瘤细胞的增殖

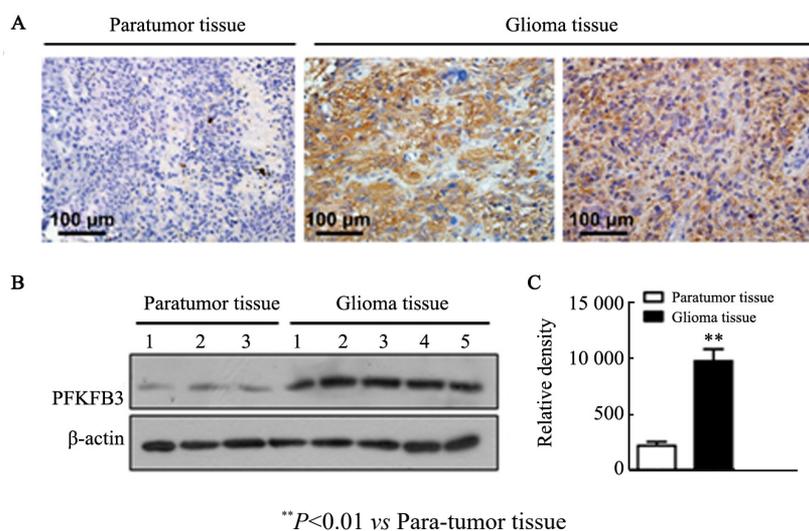
MTT细胞增殖实验结果(图2A)显示,36 h后3种不同浓度PFK15的H4细胞增殖活性低于对照组细胞,呈明显的浓度依赖性,尤以5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制作用最强($F=18.35$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EdU实验结果(图2B、C)证实,PFK15明显抑制H4细胞的增殖活性($F=22.07$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明,下调PFKFB3表达,可抑制胶质瘤细胞的增殖能力。

2.3 PFK15抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭

细胞划痕愈合实验结果(图3A、B)显示,刮除细胞24 h后,PFK15处理组H4细胞划痕愈合率明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Transwell侵袭实验检

测结果(图3C,D)发现,PFK15处理组H4细胞穿膜数量明显少于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果证实

PFK15抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力。

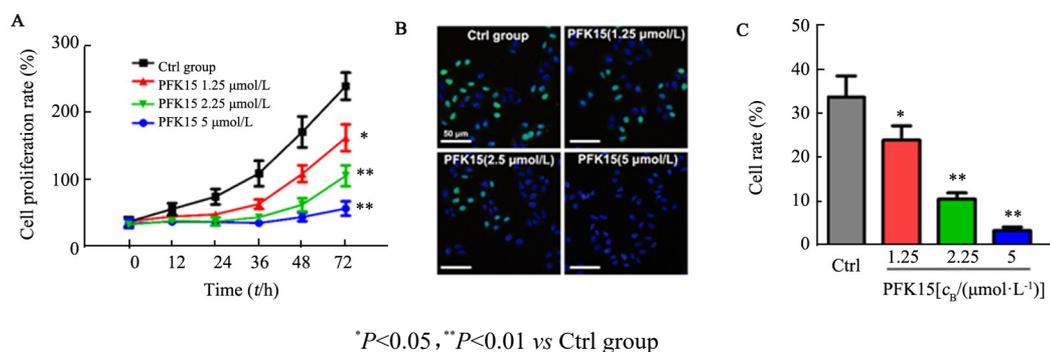


** $P<0.01$ vs Para-tumor tissue

A: Expression of PFKFB3 in glioma tissues and paratumor tissues (Immunohistochemistry staining, $\times 200$); B: Expression of PFKFB3 in glioma tissues and paratumor tissues detected by Western blotting; C: Relative density of Western blotting

图1 PFKFB3蛋白在恶性胶质瘤和瘤旁组织中的表达

Fig. 1 Expression of PFKFB3 protein in malignant glioma tissues and paratumor tissues



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Ctrl group

A: Proliferation rate of H4 cells after treated with PFK15; B: Proliferation of H4 cells after treated with PFK15 determined by EdU assay (EdU staining, $\times 200$); C: Quantitative data of EdU assay

图2 PFK15抑制恶性胶质瘤H4细胞增殖活性

Fig. 2 PFK15 suppressed the proliferation activity of malignant glioma cells

2.4 PFK15抑制胶质瘤细胞克隆形成

细胞克隆形成实验结果(图4A)显示,实验组加入终浓度为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 的PFK15时,当接种相同数量的H4细胞时,细胞克隆形成的数目明显少于对照组($t=7.176, 5.78, 8.27$;均 $P<0.05$);PFK15可明显降低恶性胶质瘤细胞克隆形成的比例($t=6.547, 6.94, 9.52$;均 $P<0.01$;图4B)。以上结果说明,PFKFB3可能在胶质瘤细胞克隆形成中起重要作用,抑制PFKFB3可降低胶质瘤细胞增殖活性。

2.5 PFK15抑制胶质瘤细胞体内成瘤

成功建立裸鼠皮下胶质瘤模型。注射PFK15(15 mg/kg)后,实验组裸鼠的肿瘤体积明显小于对照

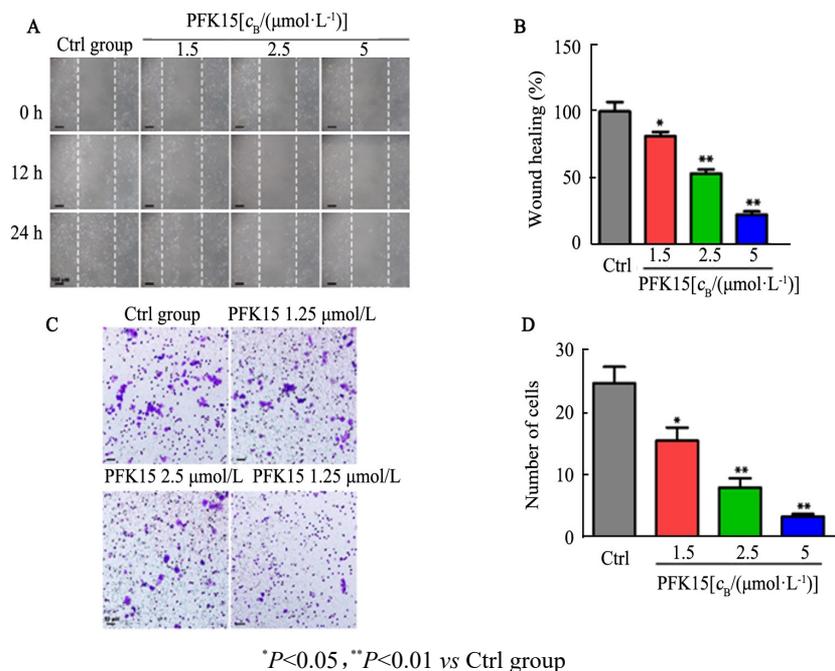
组肿瘤($t=10.57, P<0.01$;图5A);肿瘤质量也明显低于对照组肿瘤($t=3.372, P<0.01$;图5B)。免疫组化染色结果(图5B)显示,实验组肿瘤组织中ki-67表达水平明显低于对照组肿瘤组织($t=4.571, P<0.01$;图5C)。以上结果表明,PFK15明显抑制胶质瘤H4细胞体内成瘤活性。

3 讨论

根据中国国家癌症中心发布的《2015年中国癌症统计》显示,仅2015年中国就有429.2万例新发肿瘤病例和281.4万例癌症死亡病例,这相当于平均每天有12000人罹患肿瘤、7500人死于癌症^[9-10]。恶性

胶质瘤是人类常见的肿瘤之一^[3,11]。目前胶质瘤的治疗主要为手术、中医药、放疗、化疗和 γ 刀等^[12],其疗效不尽人意,患者5年生存率低于50%。因此,研究胶质瘤的发病机制和治疗靶点具有重要的现实意义。近年来肿瘤生物治疗发展迅速,为胶质瘤的治

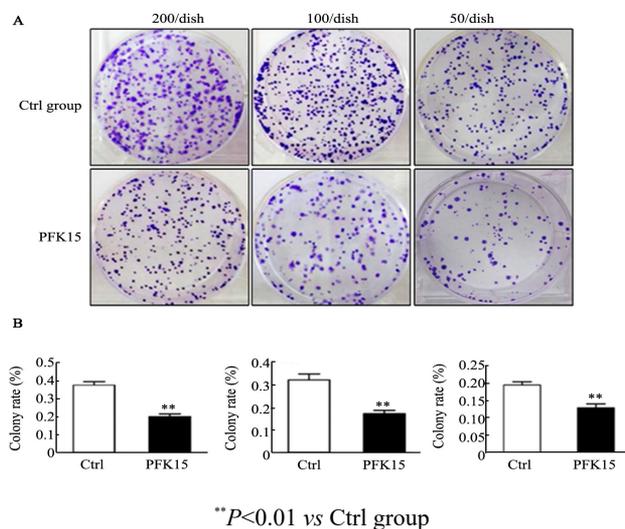
疗提供了新的方法^[13],用于胶质瘤治疗的分子靶向药物逐渐增多,如各种激酶抑制剂和单克隆抗体等^[14-16]。尽管取得了一些疗效,但仍然不能满足临床需要。



A: Effects of PFK15 on the migration of H4 cells detected by wound healing assay; B: Quantitative data of the Wound healing assays; C: Effect of PFK15 on invasion of H4 cells analyzed by transwell system (Crystal violet staining, $\times 200$); D: Quantitative data of the invasion assays using Transwell chamber system

图3 PFK15抑制恶性胶质瘤细胞迁移和侵袭

Fig. 3 PFK15 suppressed the migration and invasion of malignant glioma cells



A: PFK15 suppressed the clone formation of H4 cells (gimsa staining, $\times 200$); B: Quantitative data of clone formation of H4 cells

图4 PFK15抑制恶性胶质瘤细胞克隆形成

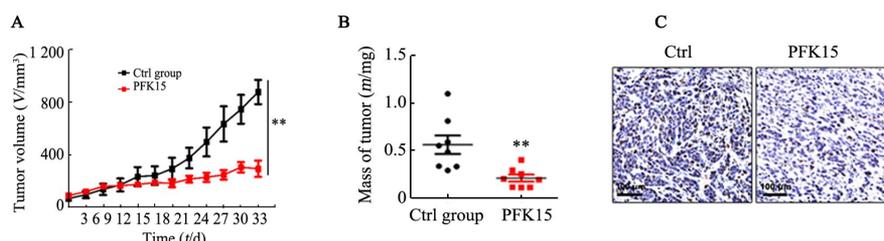
Fig. 4 PFK15 suppressed the clone formation of malignant glioma cells

有研究^[4,17]表明,肿瘤细胞的一个普遍特点是即使在氧含量正常的情况下,葡萄糖摄取量和乳酸的

积累量也会逐渐升高,利用糖酵解作为主要能量代谢的来源,获得更高的糖分解能力,使得葡萄糖转变

为乳酸来产生ATP,这种现象被称为Warburg效应。Warburg效应代表着肿瘤细胞对葡萄糖利用方式由氧化磷酸化到糖酵解的转变,现在被认为是肿瘤的一大特征。肿瘤细胞糖酵解增强主要是由于糖酵解关键酶的表达或者活性增强。己糖激酶2(HK2)、磷酸果糖酶(PFK)、M2型丙酮激酶(PKM2)等糖酵解

关键酶已经成为肿瘤标志物,它们的表达与活性可以影响肿瘤的糖酵解,进而影响肿瘤细胞的增殖。PFKFB3在肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和转移中起重要作用^[6-8],因此阻断PFKFB3可能成为肿瘤治疗的新方法。



** $P < 0.01$ vs Ctrl group

A,B: Volume and mass of the harvested xenograft tumors; C: Ki-67 expression in in xenograft tumor tissues were determined by immunohistochemical staining ($\times 200$)

图5 PFK15抑制恶性胶质瘤细胞体内成瘤

Fig. 5 PFK15 suppressed the tumorigenesis of malignant glioma cells

本研究首先通过免疫组化和Western blotting手段检测了胶质瘤患者标本中的糖酵解限速酶PFKFB3的表达,结果发现胶质瘤中PFKFB3的表达水平明显高于肿瘤旁组织($P < 0.01$)。正是这种肿瘤细胞相对特异性的表达,使得PFKFB3具有成为肿瘤治疗靶点的分子基础。随后,利用PFKFB3的抑制剂PFK15抑制胶质瘤中PFKFB3的表达,MTT试验和EdU试验结果显示,不同浓度的PFK15(1.25、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$)可明显地抑制胶质瘤细胞的增殖活性,且抑制作用具有浓度依赖性。恶性胶质瘤的生长特点是浸润性生长,与正常脑组织无明显界限。划痕试验和Transwell试验结果显示,PFK15可抑制胶质瘤细胞迁移和侵袭。通过裸鼠体内成瘤实验观察PFK15(15 mg/kg)对胶质瘤细胞体内成瘤能力和增殖活性的影响,结果发现实验组裸鼠肿瘤质量和体积明显小于对照组($P < 0.01$),证明PFK15可以抑制胶质瘤细胞体内成瘤活性。组织免疫组化染色结果显示,实验组胶质瘤组织中ki-67表达水平明显低于对照组肿瘤标本,表明PFK15可抑制胶质瘤H4细胞体内增殖活性。

本研究中体外实验和动物实验所用的PFK15浓度均是参考了相关文献和说明书以及预试验结果确定的。体外细胞实验时,PFK15溶解于培养基中,因此以摩尔浓度为单位更为合理;但在动物实验中,药物的剂量与动物的重量有关,为了消除体质量对药物效果的影响,采用了以单位体质量(kg)接受的PFK15为计量单位。

综上所述,本研究表明,胶质瘤中糖酵解限速酶

PFKFB3表达水平明显高于瘤旁组织。更重要的是,体外细胞实验和体内动物实验结果证实,抑制胶质瘤细胞中的PFKFB3,可以明显抑制胶质瘤的增殖、侵袭、转移和体内成瘤,证明抑制PFKFB3可以取得抑制肿瘤的实际效果。胶质瘤细胞有较正常细胞更高水平的糖酵解,而作为糖酵解过程中重要的限速酶PFKFB3,可作为胶质瘤生物治疗的分子靶点,为胶质瘤的治疗提高新思路。当然,本研究还存在一些不足,如采用的是恶性胶质瘤裸鼠皮下移植瘤模型,其与大脑内原发的恶性胶质瘤存在一定的差异,特别是血脑屏障的存在可能对PFK15进入脑组织的效率产生一定的影响。因此,本研究要想应用于临床,还需要解决如何将PFK15有效的递送至大脑内的问题。相信随着纳米技术的发展,该问题将会得到很好的解决。

[参考文献]

- [1] 师蔚,郭振宇. 脑胶质瘤发病机制、诊断与治疗的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(9): 869-871. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2007.09.002.
- [2] 张倩,曹蓓. 胶质瘤的免疫治疗研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(8): 856-859. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2016.08.021.
- [3] 李焱,王雄伟. EGFR及其下游通路在胶质瘤治疗中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(10): 1204-1206. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2011.10.029.
- [4] 严家文,钟俊,王国成,等. 靶向肿瘤糖酵解途径用于肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 2014(5): 550-556.
- [5] 李克乾,邵增务. 糖酵解与恶性肿瘤[J]. 国际骨科学杂志, 2011, 32(4): 243-246. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2011.04.012.

- [6] LI H M, YANG J G, LIU Z J, et al. Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma[J/OL]. *J Exp Clin Cancer*, 2017, 36(1): 7 [2017-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219669/>. DOI: 10.1186/s13046-016-0481-1.
- [7] CHEN L, ZHAO J, TANG Q, et al. PFKFB3 control of cancer growth by responding to circadian clock outputs[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24324[2017-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832144/>. DOI: 10.1038/srep24324.
- [8] ZHU Y, LI J, QIAO C, et al. PFKFB3 is a crucial target in the treatment of tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myelogenous leukemia[J/OL]. *Blood*, 2016, 128(22): 3936[2017-05-10]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/3936?sso-checked=true>. DOI: <https://doi.org/>.
- [9] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [10] 曾倩, 崔芳芳, 宇传华, 等. 中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J]. *中国卫生统计*, 2016, 33(2): 321-323.
- [11] 姚智强, 卢亦成. 人脑胶质瘤发病分子机制及其临床应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1): 90-94. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.01.020.
- [12] FRIEDMAN H S, KERBY T, CALVERT H. Temozolomide and treatment of malignant glioma[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(7): 2585-2597 [2017-05-10]. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/6/7/2585.long>. DOI: Published July 2000.
- [13] 程远, 黎军和. PD-1/PD-L1 抑制剂在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. *广东医学*, 2016, 37(21): 3301-3304. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2016.21.048.
- [14] 武志, 刘建雄. 多靶点抑制剂联合细胞毒药物治疗恶性胶质瘤的疗效研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40(6): 560-563. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.06.013.
- [15] SATHORNSUMETEE S, REARDON D A, DESJARDINS A, et al. Molecularly targeted therapy for malignant glioma[J]. *Cancer*, 2007, 110(1):13-24. DOI: 10.1002/cncr.22741.
- [16] KONDO Y, HOLLINGSWORTH E F, KONDO S. Molecular targeting for malignant gliomas(review)[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(5):1101-1109. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijco.24.5.1101>.
- [17] 李志艳, 张小燕, 唐海林, 等. M2型丙酮酸激酶调控肿瘤细胞能量代谢的研究进展简[J]. *广东医学*, 2016, 37(18): 2829-2831. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.2016.18.035.

[收稿日期] 2017-05-12

[修回日期] 2017-07-10

[本文编辑] 党瑞山