

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.003

黄芩素通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制人胶质母细胞瘤细胞 MGMT 表达*

卫翔宇 陈 正 沈 霖 李世亭 郑学胜[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院神经外科 上海 200092)

摘要 目的:研究黄芩素在体外对人胶质母细胞瘤 T98G 细胞和 GBM-X 细胞 MGMT(O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶)表达的作用以及相关的信号通路机制。**方法:**将 T98G 细胞和 GBM-X 细胞在常氧和缺氧条件下分成对照组与处理组,采用 Western Blot (蛋白质印迹法)检测黄芩素作用于两种细胞 72 h 后 MGMT 及其相关信号通路蛋白的表达水平,CCK-8 试验检测黄芩素、替莫唑胺以及二者联用对两种细胞的毒性作用,探讨联合用药的可能性。**结果:**T98G 细胞常氧/缺氧条件下黄芩素处理组 MGMT 蛋白表达水平(0.757 ± 0.058 , 0.714 ± 0.049)较对照组(1.000 ± 0.101 , 1.000 ± 0.072)显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),GBM-X 细胞常氧/缺氧条件下黄芩素处理组 MGMT 蛋白表达水平(0.843 ± 0.027 , 0.697 ± 0.052)相比对照组(1.000 ± 0.031 , 1.000 ± 0.082)明显降低($P < 0.01$, $P < 0.01$)。同对照组相比,T98G、GBM-X 细胞黄芩素处理后 TCF1/TCF7(T 细胞因子)、LEF1(淋巴样增强因子)、Survivin(生存素)蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义。经 CCK8 试剂检测,T98G、GBM-X 细胞药物作用 24、48、72 h 后,替莫唑胺组与对照组相比无明显统计学差异,黄芩素联合替莫唑胺组较对照组吸光度值显著降低,差异有统计学意义。**结论:**黄芩素可通过调控 Wnt/ β -catenin (β -连环蛋白)信号通路稳定抑制人胶质母细胞瘤细胞 MGMT 蛋白表达,黄芩素联合替莫唑胺可降低 MGMT 阳性胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的耐药性,增强替莫唑胺细胞毒作用,发挥替莫唑胺化疗效果。

关键词:黄芩素;T98G 细胞;GBM-X 细胞;MGMT;Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R-33; R739.41; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)08-1414-05

Baicalein Inhibits MGMT Expression in Glioblastoma by Modulating Wnt/ β -catenin Pathway*

WEI Xiang-yu, CHEN Zheng, SHEN Lin, LI Shi-ting, ZHENG Xue-sheng[△]

(Department of Neurosurgery, Xin Hua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of baicalein on the expression of MGMT in human glioblastoma T98G cells and GBM-X cells in vitro and the related signaling pathways. **Methods:** Divide T98G cells and GBM-X cells into control group and experimental group under normoxia and hypoxia conditions. Then detect the expression of MGMT and related signal channel proteins by Western Blot after 72h treatment and detect the cytotoxicity of baicalein, temozolomide and combined pharmacotherapy by CCK-8 test to explore the possibility of combination therapy. **Results:** The expression of T98G cells MGMT protein in the baicalein treatment group (0.757 ± 0.058 , 0.714 ± 0.049) was significantly lower than that of the control group (1.000 ± 0.101 , 1.000 ± 0.072) under normoxia/hypoxia condition ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group (1.000 ± 0.031 , 1.000 ± 0.082), the expression of MGMT protein in GBM-X cells in the experimental group (0.843 ± 0.027 , 0.697 ± 0.052) decreased significantly under normoxia/hypoxia condition ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the expression level of TCF1/TCF7, LEF1 and Survivin protein decreased significantly after baicalein treatment in T98G and GBM-X cells. After CCK8 detection, there was no significant difference between the temozolomide group and the control group after 24, 48 and 72 h in T98G and GBM-X cells, but the value of CCK8 in the combination of baicalein and temozolomide group was significantly lower than that of the control group with the difference statistically significant. **Conclusions:** Baicalein stably inhibits the expression of MGMT in human glioblastoma cells by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and reduces temozolomide resistance of MGMT positive glioblastoma cells and then enhances the cytotoxic effect of temozolomide.

Key words: Baicalein; T98G cells; GBM-X cells; MGMT; Wnt/ β -catenin pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.41; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)08-1414-05

* 基金项目:上海市科学技术委员会科研项目(14DZ1930303)

作者简介:卫翔宇(1993-),硕士研究生,主要研究方向:恶性胶质瘤的复发与演进,E-mail: weixiangyu.ok@163.com

[△] 通讯作者:郑学胜(1975-),副主任医师、硕士生导师,主要研究方向:恶性胶质瘤的复发与演进,

电话:021-25078005, E-mail: zhengxuesheng@xinhumed.com.cn

(收稿日期:2017-11-29 接受日期:2017-12-25)

前言

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是恶性程度最高的 WHO IV级胶质瘤,预后极差。当前规范治疗为手术最大范围安全切除+替莫唑胺 (temozolomide, TMZ)化疗同步放疗联合辅助化疗^[1]。替莫唑胺可使 DNA 甲基化,促使肿瘤细胞凋亡,但其耐药现象难以避免。O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 是 TMZ 耐药的主要原因,正常表达的 MGMT 可以移除鸟嘌呤 6 号氧原子的甲基基团,抑制 TMZ 的细胞毒作用,降低疗效,促进复发。因此 MGMT 启动子甲基化有助于延长患者生存期^[2,3]。O⁶-苄基鸟嘌呤 (O⁶-benzylguanine, O⁶-BG)是近年来出现的 MGMT 不可逆拮抗剂,但有研究表明 O⁶-BG 可造成骨髓抑制,限制了临床应用及推广^[4]。黄芩素,又称为黄芩苷元、5,6,7-三羟基黄酮等,是一种从唇形科植物黄芩的干燥根分离出的单体,属于黄酮类化合物,具有抗氧化、抗血栓、抗菌、抗炎等广泛的生物学活性^[5-7]。近年来,研究报道显示,黄芩素在抗肿瘤(包括胶质瘤细胞)作用方面具有一定的效果,其抗肿瘤机制包括抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、调控细胞信号转导、抗肿瘤侵袭和转移、减轻瘤周水肿、增加紧密连接等,主要涉及 Wnt/ β -catenin 等信号通路^[8-10]。本文通过体外实验研究黄芩素对胶质母细胞瘤细胞中 MGMT 蛋白表达的影响,并检测了 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄芩素(上海同田生物技术股份有限公司);替莫唑胺(美国 Sigma 公司);人胶质瘤 T98G 细胞(中国科学院细胞中心提供);人胶质瘤 GBM-X 细胞(从本课题纳入患者的肿瘤组织内提取而来的胶母细胞);胰蛋白酶、DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、凝胶快速配制试剂盒、anti-GAPDH 鼠抗、anti-MGMT 鼠抗、CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);HRP-羊抗兔二抗、HRP-羊抗鼠二抗、anti- β -catenin 兔抗、anti-TCF1/TCF7 兔抗、anti-LEF1 兔抗、anti-Survivin 兔抗(美国 CST 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 T98G 细胞、GBM-X 细胞均用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,2-3 天更换 1 次培养液,待细胞密度达 80%时即用胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 试剂配制 替莫唑胺、黄芩素原粉分别以 DMSO 溶解成 10 mmol·L⁻¹、5 mmol·L⁻¹ 储存液,避光放置于 -20℃ 冰箱妥善保存。临用前用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素)于 15 mL 离心管内分别配置成 50 μ mol·L⁻¹、40 μ mol·L⁻¹ 的终浓度溶液,避免反复冻融。

1.2.3 Western Blot 检测 MGMT 蛋白表达 为明确黄芩素对 T98G 细胞、GBM-X 细胞有无稳定抑制作用,将 2 种细胞接种于细胞培养皿内培养,分为① 常氧对照组(DMEM 培养);② 常

氧处理组(黄芩素作用);③ 缺氧对照组(DMEM 培养,1% O₂,5% CO₂,37℃);④ 缺氧处理组(黄芩素作用,1% O₂,5% CO₂,37℃)。药物作用 72 h 后通过 RIPA 裂解液(+PMSF)、蛋白上样缓冲液提取和制作细胞总蛋白样品,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定样品蛋白浓度。用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配制分离胶、浓缩胶,上样电泳后将蛋白湿转至 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4℃ 冰箱孵育过夜。用 TBST 溶液洗膜后二抗室温条件下于摇床上孵育 1 h。使用 E-CL 显色曝光,使用凝胶成像系统扫描分析并通过 Image J 软件计算灰度值。

1.2.4 Western Blot 检测 β -catenin 信号通道蛋白 按照如上方法收集 2 种细胞常氧状态下对照组与黄芩素处理组的细胞总蛋白,经 Western Blot 检测 β -catenin、TCF1/TCF7、LEF1、Survivin 等 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白,明确黄芩素对 β -catenin 信号通路有无抑制作用。

1.2.5 CCK-8 试验细胞毒性检测 预备 3 块无菌 96 孔板,将 T98G 细胞、GBM-X 细胞定量接种至孔内(用细胞计数板将细胞定量为 5000 个/孔),每块 96 孔板包括 T98G 和 GBM-X 对照组、黄芩素组、替莫唑胺组、黄芩素联合替莫唑胺组,每组 4 个复孔,每孔 100 μ L DMEM 培养基。药物作用 24 h 后,从无菌培养箱内取出① 号 96 孔板,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,在培养箱内继续孵育 2 h 后使用酶标仪测定吸光度(波长 450 nm)。药物作用 48 h、72 h 后依次取出② 号、③ 号 96 孔板,按上述方法测定吸光值,最后整理数据,进行统计分析。

1.3 统计学方法

采用统计学分析处理软件 SPSS 22.0 版对本实验数据进行统计分析。以上所有实验过程均独立重复 3 次,统计结果以 "均数 $\pm$ 标准差" 表示,采用的统计学方法为两独立样本 t 检验(正态分布时)和单因素方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T98G、GBM-X 细胞中 MGMT 蛋白表达水平检测

提取常氧/缺氧状态下对照组和黄芩素作用 72 h 后 T98G、GBM-X 细胞总蛋白,用 Western Blotting 检测 MGMT 蛋白表达水平。我们的结果显示:常氧状态下,T98G 黄芩素处理组 MGMT 表达水平(0.757 $\pm$ 0.058)较对照组(1.000 $\pm$ 0.101)显著减少(P<0.05,图 1),GBM-X 黄芩素处理组 MGMT 表达水平(0.843 $\pm$ 0.027)明显低于对照组(1.000 $\pm$ 0.031)(P<0.01,图 1)。缺氧状态下,T98G 细胞处理组(0.714 $\pm$ 0.049)相比对照组 MGMT 表达(1.000 $\pm$ 0.072)明显降低(P<0.01,图 2),GBM-X 细胞处理组 MGMT 表达水平(0.697 $\pm$ 0.052)较对照组(1.000 $\pm$ 0.082)显著降低(P<0.01,图 2)。结果提示无论在常氧还是缺氧状态下,黄芩素在体外均可以稳定抑制人胶质母细胞瘤 T98G、GBM-X 细胞中 MGMT 蛋白的表达。

2.2 黄芩素联合替莫唑胺明显增强替莫唑胺细胞毒作用

将 T98G、GBM-X 细胞以 5000 个/孔接种至 96 孔板内,分为对照组、黄芩素组、替莫唑胺组、黄芩素联合替莫唑胺组。24、48、72 h 后取出对应的 96 孔板,加入 10% CCK8 试剂孵育 2 小时后测定各组在 450 nm 处吸光值。我们结果显示,T98G 细

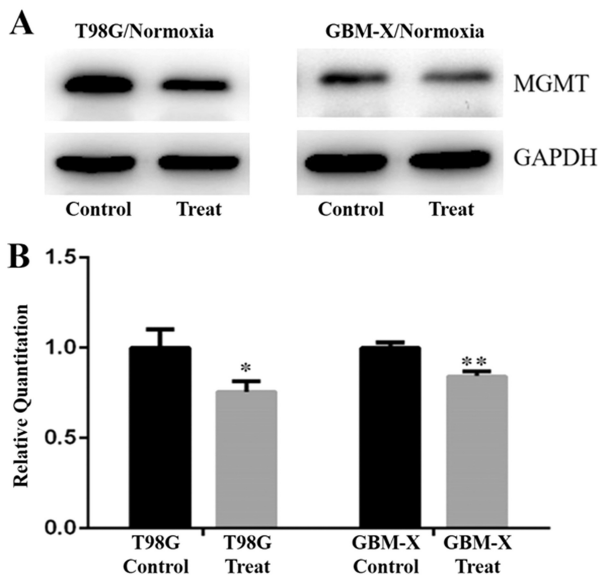


图1 常氧条件下 T98G、GBM-X 细胞 MGMT 蛋白表达水平

Fig.1 Expression of MGMT protein in T98G and GBM-X cells under aerobic condition. Note: * $P < 0.05$, T98G Ctrl vs. Treat, ** $P < 0.01$, GBM-X Ctrl vs. Treat.

胞药物作用 24、48 h 后,替莫唑胺组 (1.212 ± 0.092 ; 3.239 ± 0.102)较 24、48h 对照组 (1.236 ± 0.122 , 3.146 ± 0.059)吸光度值无明显变化,黄芩素组 (1.026 ± 0.168)、黄芩素联合替莫唑胺组 (0.977 ± 0.047)CCK8 OD 值较 24 h 对照组 (1.236 ± 0.122)明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 3A),黄芩素组 (2.862 ± 0.212)、黄芩素联合替莫唑胺组 (2.540 ± 0.154)48 h CCK8 OD 值较对照组 (3.146 ± 0.059)显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.001$,图 3A)。药物作用 72 h 后,T98G 细胞联合作用组 (3.330 ± 0.094)较对照组 (3.532 ± 0.048)显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 3A),而黄芩素组 (3.448 ± 0.083)、替莫唑胺组 (3.500 ± 0.060)较对照组 (3.532 ± 0.048)无明显差别。GBM-X 细胞药物作用 24 h 后,与对照组 (1.078 ± 0.117)相比黄芩素组 (1.026 ± 0.073)、替莫唑胺组 (1.120 ± 0.089)对细胞增殖无明显影响,联合作用组 (0.900 ± 0.083)较对照组 (1.078 ± 0.117)显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 3B),药物作用 48h 后,替莫唑胺组 (3.247 ± 0.068)无明显改变,而黄芩素组 (2.848 ± 0.077)、联合作用组 (2.259 ± 0.055)较对照组 (3.162 ± 0.148)显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$,图 3B)。GBM-X 细胞经药物作用 72h 后,黄芩素组 (3.153 ± 0.085)、黄芩素联合替莫唑胺组 (3.072 ± 0.193)较对照组 (3.458 ± 0.017)OD 值下降明显 ($P < 0.01$, $P < 0.001$,图 3B),而替莫唑胺组 (3.466 ± 0.045)无明显差异。结果提示替莫唑胺对 MGMT 表达阳性的胶质母细胞瘤 T98G、GBM-X 细胞增殖无明显作用,黄芩素作用 48 h 后可明显抑制 T98G、GBM-X 细胞的增殖,当其联合替莫唑胺时可在任何时间段抑制两种细胞的增殖,可能是通过抑制 MGMT 表达从而降低两种细胞对替莫唑胺的耐药性,由此显著提高替莫唑胺对肿瘤细胞的毒性作用,增强了其对于人胶质母细胞瘤细胞的化疗效果。

2.3 黄芩素抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白

提取黄芩素药物作用 72 h 后的 T98G、GBM-X 细胞总蛋

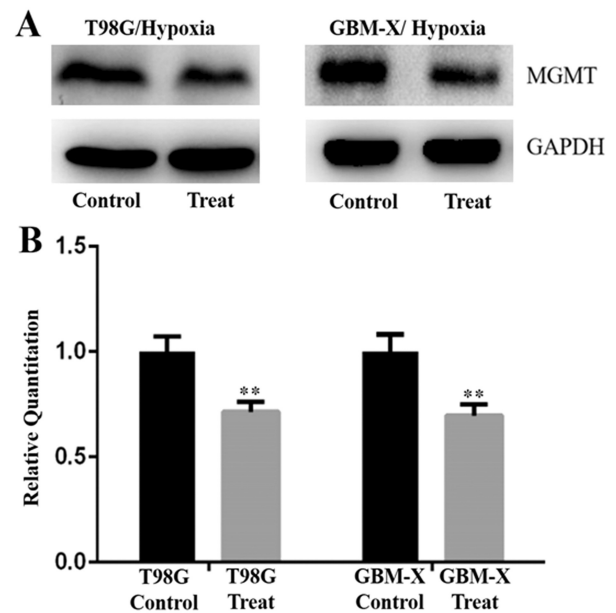


图2 缺氧条件下 T98G、GBM-X 细胞 MGMT 蛋白表达水平

Fig.2 Expression of MGMT protein in T98G and GBM-X cells under hypoxia. Note: ** $P < 0.01$, T98G Ctrl vs. Treat, GBM-X Ctrl vs. Treat.

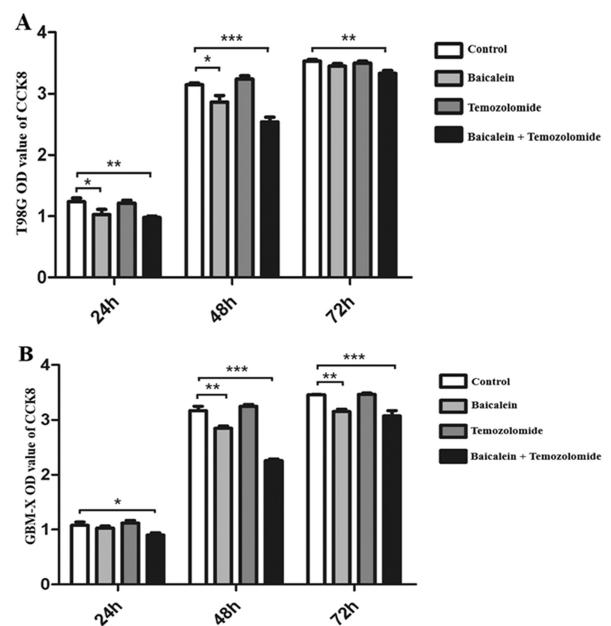


图3 CCK-8 法测定细胞增殖速度

Fig.3 Detection of T98G and GBM-X cell proliferation by CCK8. Note: * $P < 0.05$, 24h T98G Ctrl vs. 24h T98G Baicalein, ** $P < 0.01$, 48h GBM-X Ctrl vs. 48h GBM-X Baicalein, *** $P < 0.001$, 72h GBM-X Ctrl vs. Baicalein+ Temozolomide.

白,用 Western Blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达水平。结果显示,T98G 细胞处理组中 β -catenin 蛋白表达量 (0.845 ± 0.119)较对照组 (1.000 ± 0.136)无明显改变,但 TCF1/TCF7、LEF1、Survivin 蛋白表达量 (0.748 ± 0.063 , 0.893 ± 0.045 , 0.869 ± 0.037)较对照组 (1.000 ± 0.117 , 1.000 ± 0.047 , 1.000 ± 0.041)均显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4A,图 4B),GBM-X 细胞黄芩素处理组 β -catenin 蛋白表达量 (0.936 ± 0.170)较对照组 (1.000 ± 0.172)无明显差异,但 TCF1/TCF7、LEF1、Survivin 蛋白表达量 (0.895 ± 0.013 , $0.660 \pm$

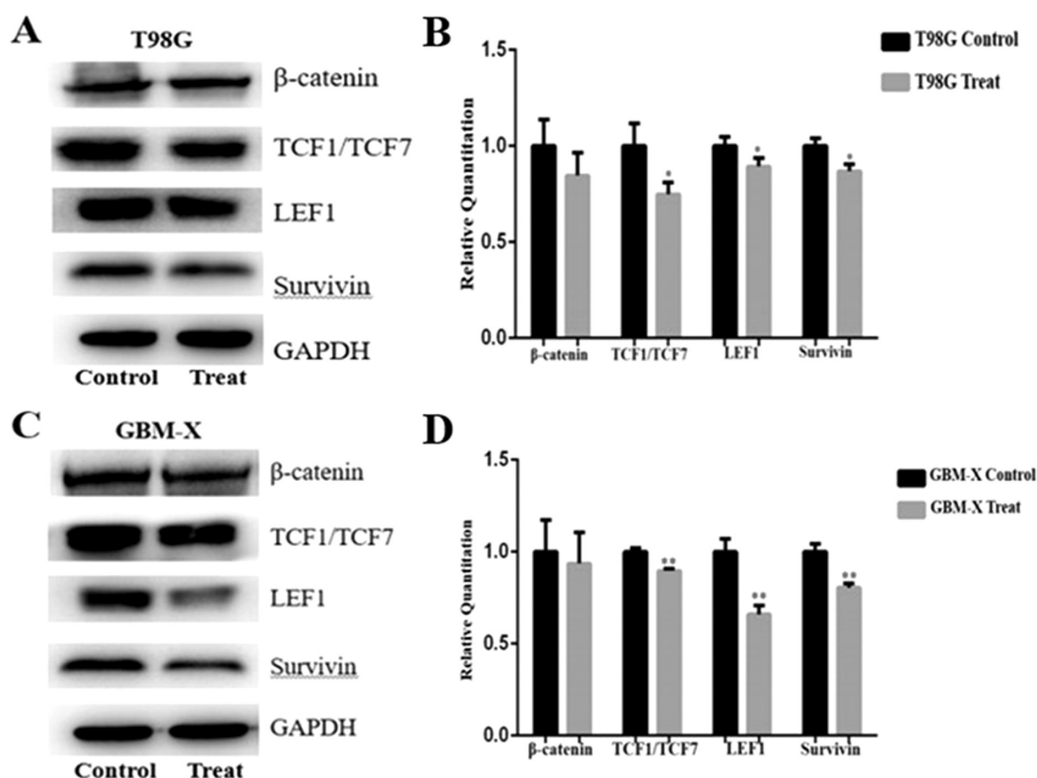


图4 T98G、GBM-X 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通道蛋白表达水平

Fig.4 Expression of Wnt/ β -catenin signal channel protein in T98G and GBM-X cells. Note: * $P < 0.05$, T98G Ctrl vs. TCF1/TCF7, ** $P < 0.01$, GBM-X Ctrl vs. LEF1.

0.047, 0.805 ± 0.023) 较对照组 (1.000 ± 0.020 , 1.000 ± 0.070 , 1.000 ± 0.043) 均显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4C, 图 4D)。结果提示黄芩素虽然对 β -catenin 蛋白无明显影响, 但可能通过调控 Wnt/ β -catenin 下游信号通路相关分子 TCF1/TCF7、LEF1、Survivin 等抑制人胶质母细胞瘤细胞 MGMT 蛋白表达。

3 讨论

作为最常见的原发性颅内肿瘤, 胶质瘤以星形细胞起源肿瘤最多见, 而胶质母细胞瘤是恶性程度最高的 WHO IV 级星形细胞肿瘤, 其生长迅速, 侵袭性强, 预后极差^[1]。替莫唑胺是当前化疗的首选药物, 治疗初期对 MGMT 表达阴性即 MGMT 启动子甲基化的胶质母细胞瘤患者具有一定疗效, 可适当延长患者无进展生存期, 但对 MGMT 正常表达的胶母疗效差^[12,13]。O⁶-苄基鸟嘌呤 (O⁶-benzylguanine (O⁶-BG)) 作为一种 MGMT 不可逆拮抗剂理论上可增强替莫唑胺疗效延长患者生存期, 但由于骨髓抑制使其临床应用受限^[14]。因此, 临床上迫切需要开发毒性小、疗效确切的新型化疗药物改善胶母患者生存质量。

黄芩素作为一种中药单体^[15,16], 多篇文献已对其抗肿瘤 (包括胶质瘤) 作用及机制有所阐释, 包括抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、调控细胞信号转导等^[17-20], 但未有文献从抑制 MGMT 表达这一方面着手进行研究。本实验采用 Western Blot、CCK8 等方法证实黄芩素通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路^[21]可体外稳定抑制胶质母细胞瘤细胞 MGMT 表达, 联合替莫唑胺可显著增强替莫唑胺对胶母细胞

的细胞毒作用, 为进一步从动物实验和体内实验方面探索黄芩素奠定理论基础, 为胶质瘤化疗提供新的思路。

Francesca Pistollato, L Persano 等提出将胶质母细胞瘤分为内层、中间层、外层三部分, 肿瘤的内层是缺氧环境, 缺氧环境中的胶质母细胞瘤细胞 MGMT 高度表达, 较中间层、外层胶质母细胞 MGMT 表达明显升高, 表现出对替莫唑胺的高度耐药^[22,23]。因此为明确黄芩素对缺氧条件下胶质母细胞 MGMT 表达有无抑制作用, 我们特将部分胶质母细胞移送至缺氧培养箱内培养, 以研究黄芩素是否稳定抑制 MGMT 表达。本研究结果显示, 无论胶质母细胞瘤细胞处于有氧/缺氧状态, 黄芩素能稳定显著抑制 T98G 细胞、GBM-X 细胞 MGMT 蛋白表达水平, 处理组相较于对照组差异有统计学意义 (图 1, 图 2)。因此我们将黄芩素视为一种潜在的类似于 O⁶-苄基鸟嘌呤的 MGMT 拮抗剂。为了进一步检测黄芩素联合替莫唑胺相比单一替莫唑胺作用于 MGMT 阳性胶质母细胞的细胞毒作用, 我们开展了 24 h、48 h、72 h 多时间节点的 CCK8 试验。T98G 细胞 CCK8 试验结果显示 (图 3A), 药物作用 24 h、48 h 后, 替莫唑胺组细胞增殖速度即 CCK8 OD 值较对照组无明显差异, 黄芩素组、黄芩素联合替莫唑胺组与对照组相比有明显差异, 差异有统计学意义。药物作用 72 h 后, 黄芩素组、替莫唑胺组与对照组相比无明显差异, 联合作用组有明显差异, 差异有统计学意义。GBM-X 细胞 CCK8 试验结果显示 (图 3B), 药物作用 24 h 后, 黄芩素联合替莫唑胺组与对照组相比 OD 值显著降低, 黄芩素组、替莫唑胺组无明显变化。药物作用 48 h、72 h 后, 替莫唑胺组无明显变化, 黄芩素组、黄芩素联合替莫唑胺作用组 OD 值显著降低,

差异有统计学意义。综合分析表明替莫唑胺对 MGMT 表达阳性的胶质母细胞无明显细胞毒作用, 即 MGMT 表达阳性的 T98G、GBM-X 细胞对替莫唑胺天然耐药, 但联用黄芩素后因黄芩素可显著抑制 MGMT 蛋白表达, 降低 MGMT 阳性胶质母细胞对替莫唑胺的耐药性, 从而增强替莫唑胺的细胞毒效应, 使替莫唑胺重新发挥化疗作用, 显著抑制细胞增殖。同时, 为了初步探索黄芩素抑制 MGMT 表达的作用机制, 阅读相关文献后我们决定从 Wnt/ β -catenin 这一信号通路着手。黄芩素分别作用 T98G、GBM-X 细胞 72h 后, 提取细胞总蛋白, 经 Western Blot 检测我们发现虽然药物处理组 β -catenin 蛋白表达量较对照组下降无统计学意义, 但其下游的 TCF1/TCF7、LEF1 以及 Survivin 蛋白表达量相比对照组明显下降, 差异有统计学意义, 表明黄芩素可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路下游分子抑制 MGMT 蛋白表达。

综上所述, 黄芩素通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, 抑制 β -catenin 下游蛋白表达水平, 进而稳定抑制 MGMT 表达阳性的胶质母细胞瘤细胞 MGMT 表达水平。黄芩素联用替莫唑胺可显著增强替莫唑胺的细胞毒作用, 使其更好发挥化疗功效。

参考文献(References)

- [1] Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(11): 1027-1037
- [2] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996
- [3] Jayamanne D, Wheeler H, Cook R, et al. Survival improvements with adjuvant therapy in patients with glioblastoma[J]. *ANZ J Surg*, 2017
- [4] Koch D, Hundsberger T, Boor S, et al. Local intracerebral administration of O (6)-benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma[J]. *J Neurooncol*, 2007, 82(1): 85-89
- [5] Patwardhan RS, Pal D, Checker R, et al. Baicalein induces cell death in murine T cell lymphoma via inhibition of thioredoxin system[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 91(Pt A): 45-52
- [6] Lai CC, Huang PH, Yang AH, et al. Baicalein Attenuates Lung Injury Induced by Myocardial Ischemia and Reperfusion [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(4): 791-811
- [7] Kwak HJ, Yang D, Hwang Y, et al. Baicalein protects rat insulinoma INS-1 cells from palmitate-induced lipotoxicity by inducing HO-1[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176432
- [8] Kim SD, Lee YJ, Baik JS, et al. Baicalein inhibits agonist- and tumor cell-induced platelet aggregation while suppressing pulmonary tumor metastasis via cAMP-mediated VASP phosphorylation along with impaired MAPKs and PI3K-Akt activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92(2): 251-265
- [9] Wang FR, Jiang YS. Effect of treatment with baicalein on the intracerebral tumor growth and survival of orthotopic glioma models [J]. *J Neurooncol*, 2015, 124(1): 5-11
- [10] Nakahata N, Tsuchiya C, Nakatani K, et al. Baicalein inhibits Raf-1-mediated phosphorylation of MEK-1 in C6 rat glioma cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 461(1): 1-7
- [11] Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, et al. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 434-452
- [12] Castro GN, Cayado-Gutierrez N, Zoppino FC, et al. Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2): 253-265
- [13] Roh TH, Park HH, Kang SG, et al. Long-term outcomes of concomitant chemoradiotherapy with temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients: A single-center analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(27): e7422
- [14] Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, et al. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine 5-day regimen with recurrent malignant glioma[J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(5): 556-561
- [15] Bie B, Sun J, Li J, et al. Baicalein, a Natural Anti-Cancer Compound, Alters MicroRNA Expression Profiles in Bel-7402 Human Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1519-1531
- [16] Chai Y, Xu J, Yan B. The anti-metastatic effect of baicalein on colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 2317-2323
- [17] Gao L, Chen B, Li J, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway inhibits the proliferation and apoptosis of U87 glioma cells via different mechanisms[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181346
- [18] Denysenko T, Annovazzi L, Cassoni P, et al. WNT/beta-catenin Signaling Pathway and Downstream Modulators in Low- and High-grade Glioma[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016, 13(1): 31-45
- [19] Cui D, Ren J, Shi J, et al. R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by downregulating Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 73: 72-81
- [20] Lu T, Bao Z, Wang Y, et al. Karyopherin beta1 regulates proliferation of human glioma cells via Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1189-1197
- [21] Wickstrom M, Dyberg C, Milosevic J, et al. Wnt/beta-catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8904
- [22] Persano L, Pistollato F, Rampazzo E, et al. BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1alpha stability and MGMT expression[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e412
- [23] Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(5): 851-862