

芬苯达唑通过激活自噬抑制肺腺癌细胞增殖及侵袭、迁移能力

黄子祺, 李彦奇, 戴纪刚, 郑鸿*

陆军军医大学第二附属医院 胸外科, 重庆 400037

摘要: **目的** 探究芬苯达唑对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响以及自噬与迁移、侵袭的关系。**方法** 将人肺腺癌 A549、H358 细胞分为对照组及芬苯达唑 (1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 组。用 CCK-8 法及细胞计数法检测细胞增殖水平, 用划痕实验及 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力, 通过 RT-qPCR 及蛋白免疫印迹法检测上皮-间充质转化 (EMT) 相关蛋白的 mRNA 及蛋白表达水平, 通过转录组测序并分析自噬相关基因及其表达量。用自噬抑制剂氯喹 (5、10 $\mu\text{mol/L}$) 与芬苯达唑 (5 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞后再通过划痕及 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力。**结果** 与对照组相比, 芬苯达唑各浓度处理组能显著抑制 A549 和 H358 细胞活性及迁移、侵袭能力 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 随着芬苯达唑药物浓度增加, N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、细胞角蛋白 (Cytokeratin)、纤维连接蛋白 (FN1) mRNA 相对表达逐渐下降 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 紧密连接蛋白 (Occludin)、波形蛋白 (Vimentin) mRNA 表达水平在低浓度时较高, 随着芬苯达唑药物浓度增加 Occludin、Vimentin mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与对照组相比, 随着芬苯达唑药物浓度增加, N-cadherin、Cytokeratin、FN1、Occludin 蛋白相对表达量显著降低, 而 Vimentin 蛋白相对表达水平随药物浓度降低而增高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。基因差异热图显示, 芬苯达唑处理后自噬相关基因 (MAP1LC3B、ATG5、ULK3、Bax、ATG16L1) 表达量增高, 芬苯达唑的浓度增加使自噬相关蛋白重组人自噬效应蛋白 (Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3 (LC3) -II/LC3-I 相对蛋白表达量升高, 选择性自噬接头蛋白 P62 表达量明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。在使用了氯喹阻断自噬后, 可以逆转芬苯达唑引起的细胞增殖、迁移及侵袭 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001) 抑制作用。**结论** 芬苯达唑可以通过促进自噬从而抑制了肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

关键词: 芬苯达唑; 肺腺癌; 自噬; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)07-1671-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.07.003

Fenbendazole inhibits the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cell by activating autophagy

HUANG Ziqi, LI Yanqi, DAI Jigang, ZHENG Hong

Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract: Objective To explore the effects of fenbendazole on the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells and the relationship between autophagy and migration invasion. **Methods** A549 and H358 cells were divided into control group and fenbendazole group (1, 2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$). Cell proliferation level was detected by CCK-8 method and cell counting method, cell migration and invasion ability was detected by scratch assay and Transwell assay, mRNA and protein expression levels of epithelial-mesenchymal transformation (EMT) related proteins were detected by RT-qPCR and western blot. Autophagy related genes and their expression levels were analyzed by transcriptome sequencing. The cells were treated with autophagy inhibitors chloroquine (5, 10 $\mu\text{mol/L}$) and fenbendazole (5 $\mu\text{mol/L}$), and then the migration and invasion ability of the cells were detected by scratch and Transwell assay. **Results** Compared with control group, different concentration fenbendazole treatment groups significantly inhibited the activity, migration and invasion ability of A549 and H358 cells ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). With the increase of fenbendazole concentration, the relative mRNA expressions of N-cadherin, Cytokeratin, and FN1 decreased gradually ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Occludin and Vimentin mRNA expression levels were higher at low concentration, and decreased with the increase of fenbendazole

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81972190); 陆军军医大学第二附属医院青年博士人才孵化计划 (2022YQB012)

作者简介: 黄子祺, 女, 博士, 研究方向为寄生虫药物抗肿瘤作用。E-mail: huangziqi@tmmu.edu.cn

*通信作者: 郑鸿, 男, 研究员, 博士, 研究方向为寄生虫药物抗肿瘤作用。E-mail: ziecoe@tmmu.edu.cn

concentration ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with control group, the relative expression of N-cadherin, Cytokeratin, FN1, and Occludin decreased significantly with the increase of fenbendazole concentration. The relative expression level of Vimentin protein increased with the decrease of drug concentration ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The thermal map of gene difference showed that the expression of autophagy related genes (*MAP1LC3B*, *ATG5*, *ULK3*, *Bax*, *ATG16L1*) increased after fenbendazole treatment, and the expression of autophagy related proteins Beclin-1 and LC3-II/LC3-I increased with the increase of fenbendazole concentration. The expression of P62 showed a decreased trend ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). After chloroquine was used to block autophagy, the inhibitory effects of fenbendazole on cell proliferation, migration and invasion could be reversed ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Fenbendazole can inhibit the proliferation, migration, and invasion abilities of lung adenocarcinoma cells by activating autophagy.

Key words: fenbendazole; lung adenocarcinoma; autophagy; proliferation; invasion; migration

原发性支气管肺癌是我国发病率和死亡率最高的癌症, 其中非小细胞肺癌是最常见的类型。肿瘤细胞离开原发病灶向远处转移是恶性肿瘤发展的重要表现。目前, 肺腺癌药物治疗方式包括化疗、靶向药物、免疫治疗药物、抗血管生成药物及双特异性抗体药物等。但经过综合治疗后, 仍然会出现耐药及复发转移, 致使患者预后较差, 因此仍然需要探索和寻找新的治疗药物或增敏策略。抗肿瘤新药的开发需要大量研发成本和时间, 而由于寄生虫病和癌症之间的相似性以及多年来抗寄生虫药物的成功临床管理, 有望从现有抗寄生虫药物中寻找和开发潜在的新抗肿瘤药物^[1]。自噬是一种保守的分解和代谢的过程, 可以将功能失调或受损的蛋白质和细胞器等代谢降解以维持生物大分子的合成^[2]。自噬与癌症有着密切关系, 近年来有研究表明, 自噬在肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移中具有重要的调节作用, 进而影响药物治疗效果, 激活自噬可以通过多种信号途径, 如磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号途径等抑制一些癌细胞增殖、上皮-间充质转化 (EMT) 过程及癌症的转移, 提示靶向调控自噬具有抑制肺癌发生发展的重要作用。

苯并咪唑类驱虫药, 如甲苯咪唑、阿苯达唑和氟苯达唑是治疗广谱寄生虫蠕虫的长期药物, 它可以干扰微管的形成、葡萄糖摄取和 ATP 的形成, 从而抑制寄生虫存活和繁殖^[3]。芬苯达唑是一类苯丙咪唑类的药物, 已广泛用于人和动物中抗肠道寄生虫, 其作用机理有 2 种理论, 一种认为药物通过抑制线虫的延胡索酸还原酶而发挥驱虫作用, 另一种理论认为抑制蠕虫线粒体的电子传递体系和电子传递体偶联的磷酸化反应, 抑制与微管形成有关的葡萄糖转运系统, 进而使 ATP 的合成受阻^[4]。研究报道, 芬苯达唑是一种微管靶向剂, 在体外实验中可以干扰癌细胞有丝分裂微管形成, 抑制癌细胞增殖。

此外, 其还干扰癌细胞葡萄糖摄取和代谢、破坏癌细胞线粒体及 p53 的稳定, 促进癌细胞凋亡^[5-7]。

本研究旨在探讨芬苯达唑对肺腺癌的自噬及增殖、侵袭和迁移能力的影响, 为抗寄生虫药物老药新用治疗肿瘤提供新的理论依据和见解。

1 材料与方法

1.1 试剂及抗体

芬苯达唑 (质量分数 99.84%, 批号 29107)、氯喹 (质量分数 99.89%, 批号 159402)、二甲基亚砜 (批号 344768) 均购于美国 MedChem Express 公司。将芬苯达唑溶解在 DMSO 中至浓度为 100 mmol/L, 储存在 -80°C , 并在实验前用培养基稀释至操作浓度。CCK-8 试剂盒购买于上海碧云天生物技术股份有限公司。N-钙黏蛋白抗体 (N-cadherin, 批号 4)、细胞角蛋白抗体 (Cytokeratin, 批号 1)、波形蛋白抗体 (Vimentin, 批号 2)、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 抗体 (LC3A/B, 批号 5)、整合素 1 抗体 (SQSTM1/P62, 批号 4)、Beclin-1 抗体 (批号 6)、 β -actin 抗体 (批号 5) 均购于美国 Cell Signaling Technology。纤维连接蛋白抗体 (FN1, 批号 QC49725-42173)、紧密连接蛋白抗体 (Occludin, 批号 098M4799V) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 细胞及培养

人肺腺癌细胞系 (A549、H358) 购自中国科学院细胞库。2 株细胞均在含有 10% 胎牛血清、青霉素-链霉素-谷氨酰胺的培养基中培养, 并置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中。

1.3 CCK-8 实验

将 A549 和 H358 细胞用胰蛋白酶消化, 以每孔 100 μL 、4 000 个细胞接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔。在细胞培养箱孵育 24 h, 分为对照组 (不加药) 和芬苯达唑组 (0、1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。药物处理 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h 后, 使用 Spectramax I3 酶标仪测量 450

nm 处的吸光度 (A)。通过 A 值计算细胞活力并绘制曲线。在自噬抑制实验中,与芬苯达唑同时加入 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹进行共处理,24 h 后按上述方式进行检测。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}$$

1.4 细胞计数实验

将 A549 和 H358 细胞以 1×10^6 个细胞、2 mL 接种在 6 孔板中,细胞培养箱孵育 24 h 后加入不同浓度 (0、1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 的芬苯达唑,续孵育 24 h 后,胰蛋白酶消化后离心, PBS 重悬后用血细胞计数器手动计数。

1.5 划痕实验

A549 和 H358 细胞在 6 孔板 (1×10^6) 上铺板,当细胞贴壁后,通过用一次性 1 mL 枪头做水平划痕以获得无细胞的空间, PBS 洗去脱落细胞并吸尽,加入含有不同浓度 (0、1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 芬苯达唑的无血清培养基。0 时刻组在划痕完成后立即在显微镜下拍摄划痕区域,24、48 h 组在划痕完成分别在 24、48 h 时在显微镜下拍摄划痕区域,用 Image J 软件进行处理分析。在自噬抑制实验中,与芬苯达唑 5 $\mu\text{mol/L}$ 同时加入 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹进行共处理,并单独设置氯喹 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,0、24、48 h 后按上述方式进行检测。

1.6 Transwell 侵袭实验

在 24 孔板中加入 500 μL 含不同浓度 (0、1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 的芬苯达唑及 10% 胎牛血清的培养基,将基质胶与无血清培养基以 1:8 的比例稀释后 (60 μL) 加入 Transwell 小室中,后将 Transwell 小室至于 24 孔板中,取 1×10^5 、200 μL 的 A549 和 H358 细胞悬液加入上室,置于细胞孵箱中培养 24 h。取出小室后,24 孔板弃培养基,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗后加入结晶紫染色液染色 30 min。最后在显微镜下进行细胞计数。在自噬抑制实验中,与芬苯达唑 5 $\mu\text{mol/L}$ 同时加入 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹进行共处理,并单独设置氯喹 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,24 h 后按上述方式进行检测。

1.7 RT-qPCR 实验

使用 Trizol 试剂对 A549 细胞进行裂解及提取总 RNA。用 PrimeScriptTM RT 试剂和 gDNA Eraser Kit 进行逆转录。使用 TB Green Premix Ex TaqTM 和 Bio-Rad CFX96 PCR 系统 (美国 Bio-Rad) 和 CFX Manager 软件 (Bio-Rad) 检测 cDNA 样品。引物序列为: N-cadherin 上游引物: 5'-TCAGGCGTCTGTA

GAGGCTT-3', 下游引物: 5'-ATGCACATCCTTCGATAAGACTG-3'; Cytokeratin 上游引物: 5'-AGAGTGGACCAACTGAAGAGT-3', 下游引物: 5'-ATTCTCTGCATTTGTCCGCTT-3'; Occludin 上游引物: 5'-ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC-3', 下游引物: 5'-GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT-3'; Vimentin 上游引物: 5'-GACGCCATCAACACCGAGTT-3', 下游引物: 5'-CTTTGTCTGTTGGTTAGCTGGT-3'; FN1 上游引物: 5'-CGGTGGCTGTCAGTCAAAG-3', 下游引物: 5'-AAACCTCGGCTTCCTCCATAA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3', 下游引物: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'。

1.8 转录组测序及数据分析

将 1×10^6 个 A549 细胞接种在 6 孔板中并生长过夜后分别用 0、5 $\mu\text{mol/L}$ 芬苯达唑处理细胞 24 h,每个浓度各 3 个复孔。用 Trizol 试剂进行裂解和总 RNA 提取。后交由上海生工生物公司进行常规转录组测序。比较 0 (对照)、5 $\mu\text{mol/L}$ 芬苯达唑处理后的自噬相关基因的表达。

1.9 蛋白免疫印迹

将 1×10^6 个 A549 细胞接种在 6 孔板中并生长过夜后分别用 0、1、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 芬苯达唑处理细胞 24 h。重悬于含有蛋白酶抑制剂的 100 μL 裂解缓冲液中,冰上孵育 15 min 后离心收集上层清液。通过 BCA 蛋白测定法测量上清液中总蛋白浓度。总蛋白通过 10% SDS-PAGE 分离、电泳转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用牛血清白蛋白封闭 1 h,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与一抗 (N-cadherin、Snail、Keratin 17、Occludin、Vimentin、FN1、LC3、P62、Beclin-1, 1:1 000) 孵育过夜。将 PVDF 膜与二抗 (1:20 000) 在室温下孵育 2 h。通过 ECL 试剂盒 (碧云天) 发光显影蛋白条带,拍照后用 Image J 软件进行处理和分析。

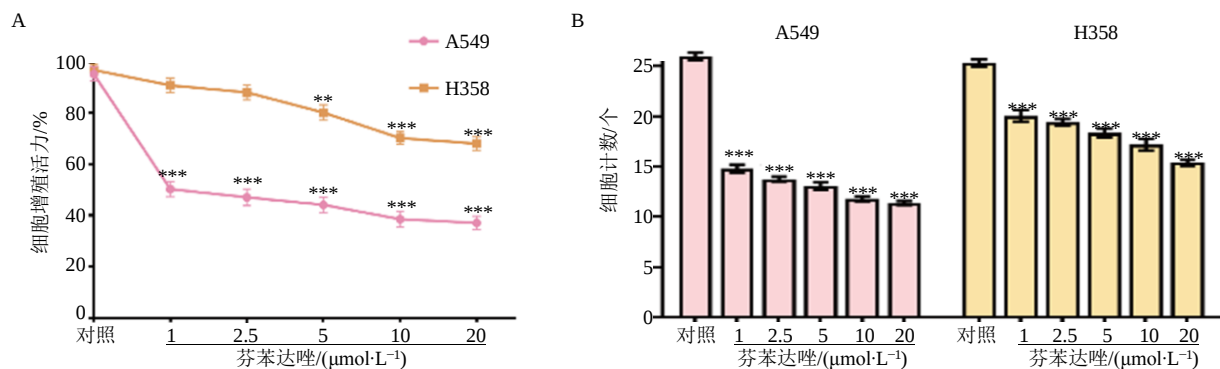
1.10 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析,多组间比较用单因素方差分析并进行事后检验。

2 结果

2.1 芬苯达唑对肺腺癌细胞增殖的影响

为了研究芬苯达唑在体外抑制人肺腺癌细胞增殖效果,使用 CCK8 法测定芬苯达唑处理 A549 和 H358 细胞 24 h 后的细胞活力,见图 1。随着芬苯达



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 细胞增殖活力 (A) 和细胞计数 (B) 情况 ($n = 3$)

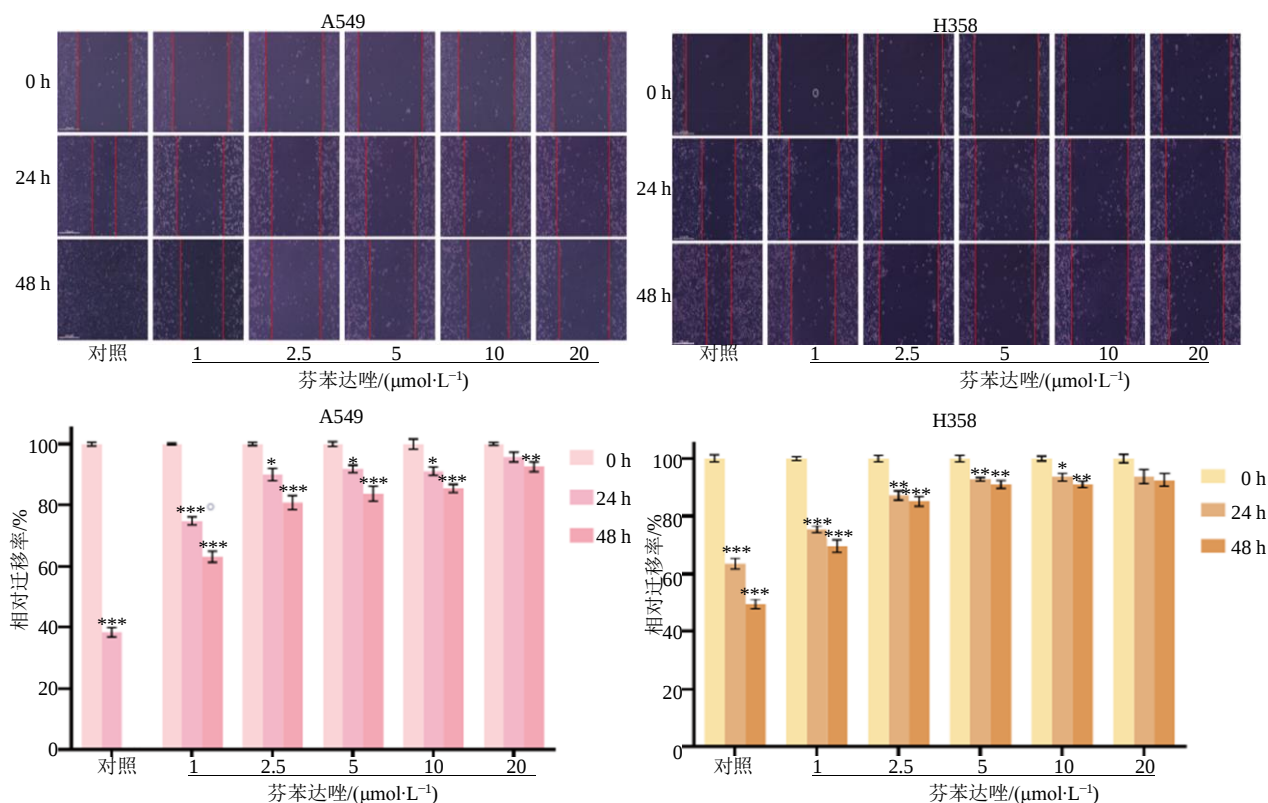
Fig. 1 Cell viability (A) and cell count (B) ($n = 3$)

唑浓度的增加, A549 和 H358 细胞的增殖活力逐渐下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 其中芬苯达唑对 A549 细胞的增殖活力影响较 H358 细胞更为显著, 且在较低浓度时就能显著抑制 A549 细胞增殖活性 ($P < 0.001$), A549 细胞的 IC_{50} 值 $1.232 \mu\text{mol/L}$, 见图 1A。经芬苯达唑作用后, A549 和 H358 的细胞计数均显著减少 ($P < 0.001$), 见图 1B。结果表明, 芬苯达唑

在体外以浓度相关性方式有效地抑制了肺腺癌细胞增殖。

2.2 芬苯达唑对肺腺癌细胞迁移能力的影响

为了评估芬苯达唑对人肺腺癌细胞迁移能力的影响, 对 A549 和 H358 细胞进行划痕实验, 见图 2。结果表明, 与 0 h 组相比, 在不同浓度芬苯达唑处理 24、48 h 后能够有效抑制细胞迁移 ($P < 0.05$ 、



与 0 h 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 0 h group.

图 2 在不同浓度下 A549 和 H358 细胞迁移情况 ($n = 3$)

Fig. 2 A549 and H358 cell migration at various concentration ($n = 3$)

0.01、0.001), 且呈浓度和时间相关性。

2.3 芬苯达唑抑制人肺腺癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, 在芬

苯达唑作用 24 h 后, 且随着药物浓度增加, A549 和 H358 细胞穿膜数量显著降低 ($P<0.001$), 表明芬苯达唑显著抑制了细胞侵袭, 见图 3。

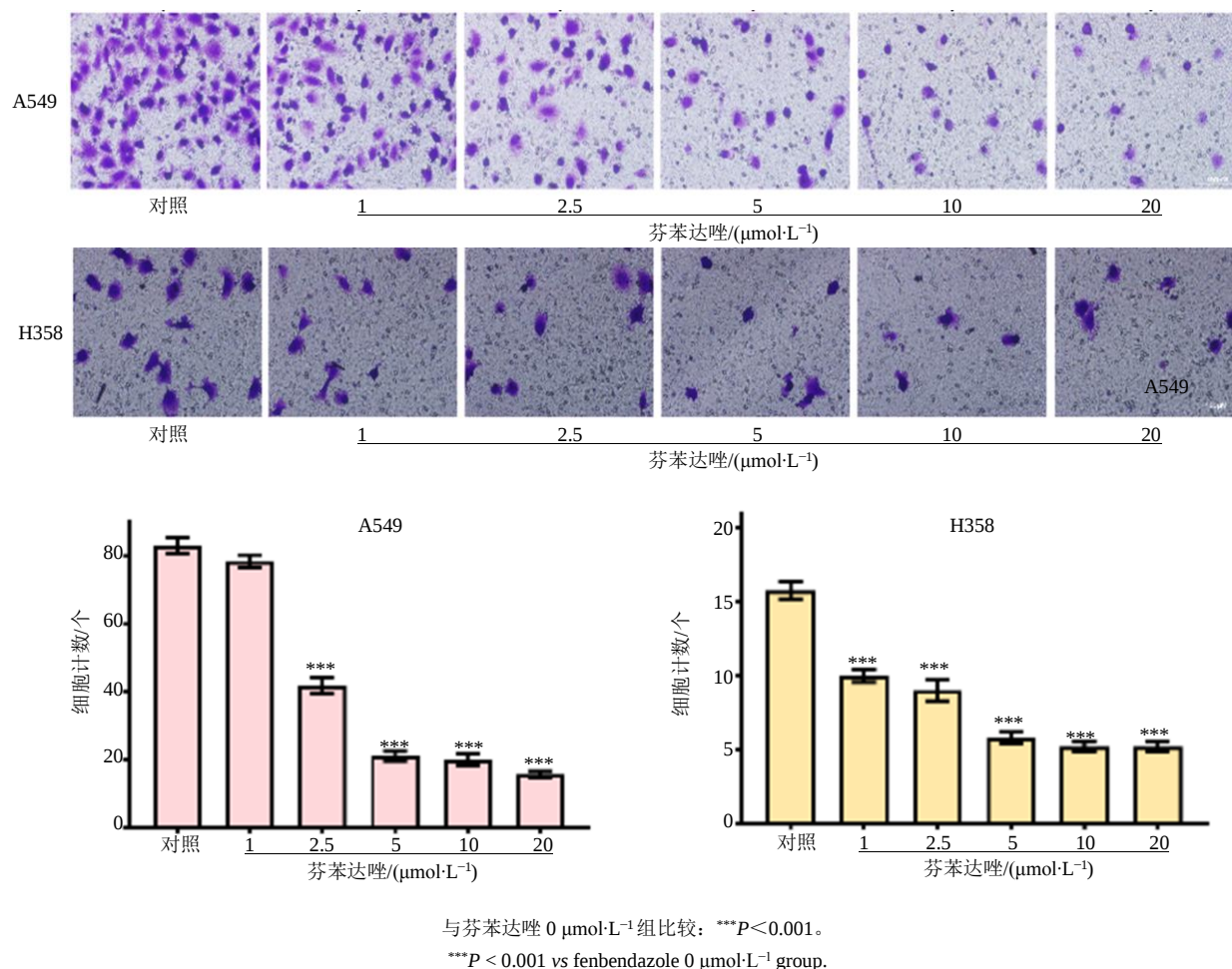


图 3 在不同浓度芬苯达唑下 A549 和 H358 细胞侵袭情况 ($n = 5$, $\times 200$)

Fig. 3 A549 and H358 cell invasion at various concentration of fenbendazole ($n = 5$, $\times 200$)

2.4 芬苯达唑对于细胞侵袭迁移相关 mRNA 和蛋白表达水平的影响

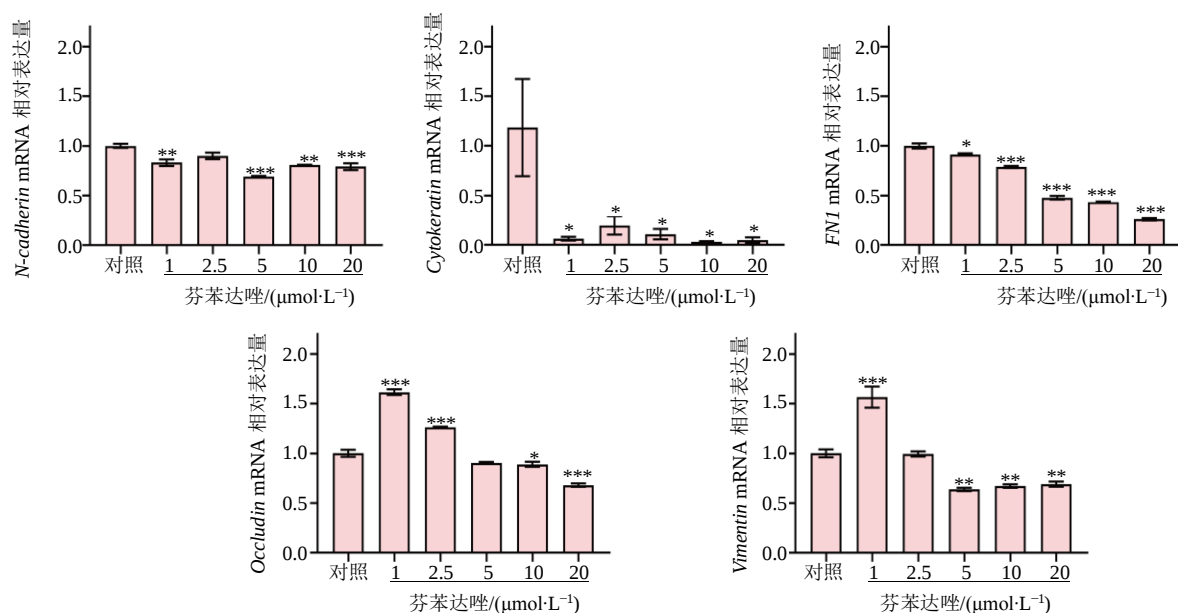
由于 A549 细胞株对芬苯达唑更为敏感, 效果较明显, 故后使用 A549 细胞进行检测上皮-间充质转化相关 mRNA 及蛋白标志物 *N-cadherin*、*Cytokeratin*、*FN1*、*Occludin*、*Vimentin* mRNA 表达。与对照组相比, 随着芬苯达唑药物浓度增加, *N-cadherin*、*Cytokeratin*、*FN1* mRNA 相对表达逐渐下降 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); *Occludin*、*Vimentin* mRNA 表达水平在低浓度时较高, 随着芬苯达唑药物浓度增加 *Occludin*、*Vimentin* mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 见图 4。

与对照组相比, 随着芬苯达唑药物浓度的增加,

N-cadherin、*Cytokeratin*、*FN1*、*Occludin* 的蛋白相对表达量显著降低, 而 *Vimentin* 蛋白相对表达水平随药物浓度降低而增高 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 见图 5。

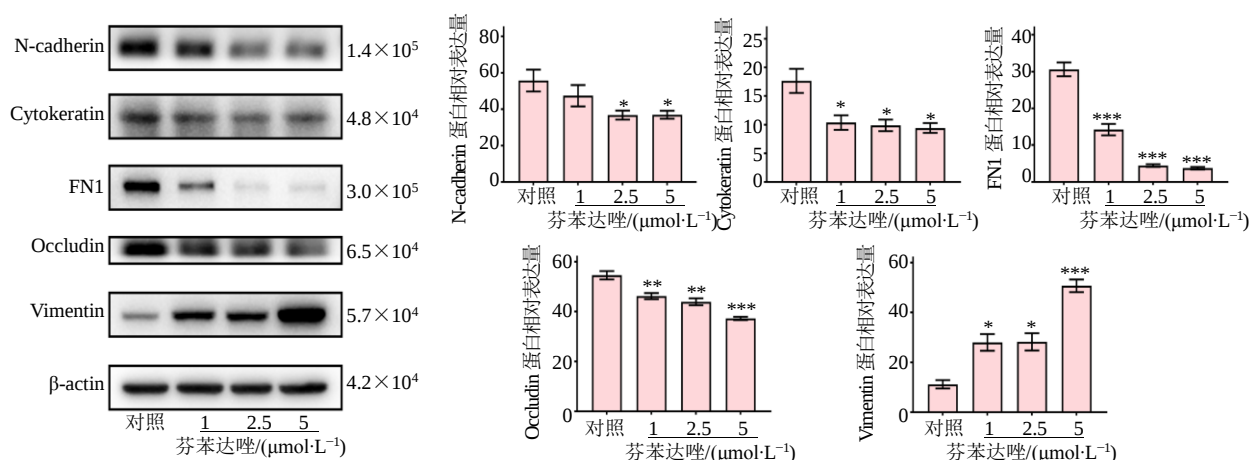
2.5 芬苯达唑通过自噬相关途径影响人肺腺癌的侵袭迁移

通过常规转录组测序的结果筛选出自噬相关基因, 并使用热图进行结果展示, 见图 6。结果显示芬苯达唑处理后, A549 细胞内自噬相关基因 *MAP1LC3B* (*LC3*) mRNA 水平上调 1.42 倍 ($P<0.001$), *ATG5* mRNA 水平上调 1.26 倍 ($P=0.025$), *ULK3* mRNA 水平上调 1.25 倍 ($P=0.044$), *ATG16L1* mRNA 水平上调 1.51 倍 ($P=0.003$), *Bax* mRNA 水



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 不同浓度下芬苯达唑对 A549 细胞上皮-间充质转化相关的 mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 4 Effect of various concentration of fenbendazole on A549 cells relative mRNA expression levels of EMT ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 5 不同浓度的芬苯达唑对上皮-间充质转化相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 5 Effect of various concentration of fenbendazole on the expression level of EMT related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

平上调 1.26 倍 ($P = 0.006$), 提示芬苯达唑可能激活肺腺癌细胞自噬。

2.6 芬苯达唑对细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

为了验证转录组测序结果以及明确芬苯达唑对细胞自噬的影响, 利用 Western blotting 实验检测了芬苯达唑处理后 A549 细胞内自噬相关蛋白的变化。结果显示, 在芬苯达唑的浓度增加自噬相关蛋白

Beclin-1、LC3-II/LC3-I 相对蛋白表达量呈升高趋势, SQSTM1/P62 表达量呈现降低趋势 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 见图 7。

2.7 自噬抑制剂对人肺腺癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响

使用氯喹处理人肺腺癌细胞阻断自噬后, 发现氯喹 10 μmol/L 可以削弱芬苯达唑对 A549 细胞的



图 6 自噬相关基因表达量热图

Fig. 6 Expression level of autophagy-related genes hot map

增殖抑制作用, 呈浓度相关性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。而 H358 细胞仅在高浓度的芬苯达唑中氯喹的逆转作用具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见图 8。

在划痕和 Transwell 实验中, 24 h 时, 芬苯达唑 $10 \mu\text{mol/L}$ + 氯喹 $10 \mu\text{mol/L}$ 组 A549 和 H358 细胞

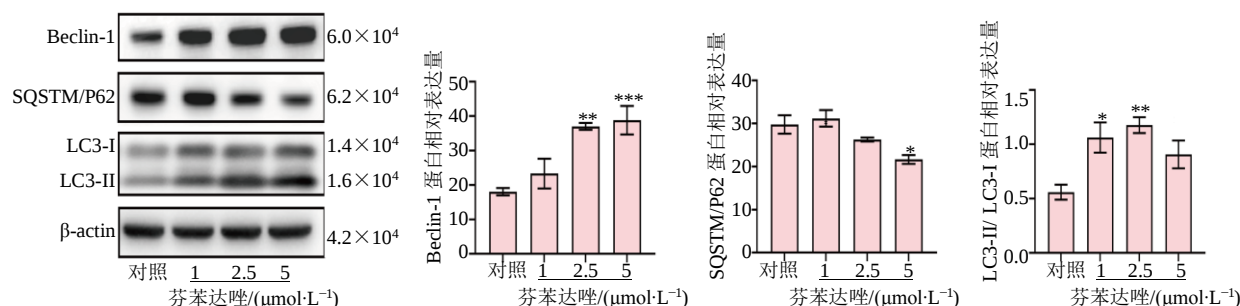
的相对迁移率显著低于芬苯达唑单独处理组 ($P < 0.01$ 、 0.001)，表明氯喹可以逆转芬苯达唑引起的 A549、H358 细胞侵袭和迁移能力降低的作用，见图 9、10。

3 讨论

尽管目前已有多种药物用于肺腺癌的临床治疗, 然而现有药物在临床应用中会出现响应率低、耐药及复发等问题, 使得综合治疗后肺腺癌患者的预后仍然不理想。另一方面, 新药的发现与开发面临耗时长、成本高及风险高等困难, 因此“老药新用”成为了当前比合成新型药物更快、更经济、低风险策略。

近些年有研究报道, 苯并咪唑类药物可能具有抗肿瘤活性^[8]。芬苯达唑则是苯并咪唑类化合物中的一种抗肠道寄生虫药物, 是一种广谱、高效且低毒性的药物。相对于人或动物细胞而言, 芬苯达唑更倾向于干扰寄生虫微管蛋白的稳定性, 还参与葡萄糖的摄取与代谢, 从而杀死寄生虫, 因此被成功应用于治疗寄生虫感染。目前常见的化疗药物如紫杉醇、秋水仙碱等均均为微管靶向剂。由此推断, 芬苯达唑也可能能够干扰癌细胞微管蛋白稳定性, 抑制肿瘤细胞生长, 从而具有抗肿瘤的潜力。已有的研究显示, 芬苯达唑破坏非小细胞肺癌细胞中微管蛋白网络的稳定性, 细胞微管框架扭曲, 影响正常细胞周期进行, 导致细胞周期停滞于 G_2/M 期^[5]。此外, 在体外实验中, 芬苯达唑也显著抑制了多种癌细胞的增殖、侵袭迁移与集落的形成, 诱导癌细胞的凋亡与焦亡等。其引起细胞凋亡的主要通路有抑制癌细胞葡萄糖摄取与代谢^[5]; 诱导癌细胞中氧化应激导致过量活性氧 (ROS) 累积^[6]; 通过激活 p38-MAPK 通路使得凋亡调节蛋白 Caspase-9 和 Bax 表达显著增加^[6]; 抑制 PI3K/Akt 通路、RAF/MEK/ERK 通路和 STAT1 水平^[9]; 增强 p53 活性水平及诱导常见 p53 靶基因的 mRNA 水平^[10]; 诱导内质网应激以及线粒体膜去极化、释放细胞色素 c 激活 Caspase-3 诱导细胞凋亡^[10]。除此之外, 芬苯达唑还可通过 NF- κ B/NLRP3/GSDMD 通路促进胶质母细胞瘤 U87 和 U251 细胞中 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD-N 的表达触发细胞焦亡^[8]。本研究也发现, 芬苯达唑可以显著抑制肺腺癌细胞增殖且呈浓度相关性, 但其中的作用分子机制是否与凋亡或其他细胞死亡方式相关还值得进一步研究探索。

转移复发是肿瘤恶化的重要标志, 出现转移复

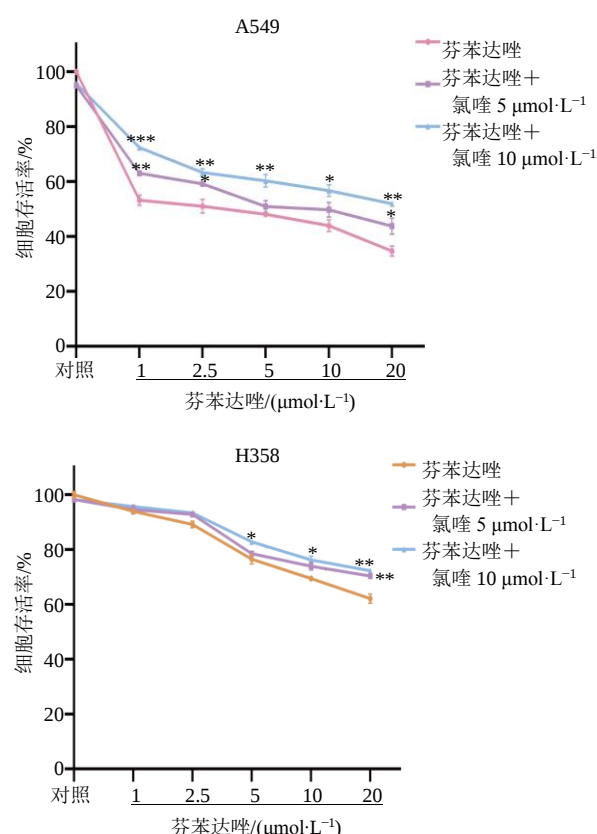


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 不同浓度的芬苯达唑对自噬相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of various concentration of fenbendazole on the expression level of autophagy related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与芬苯达唑相同浓度组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs fenbendazole at same concentration.

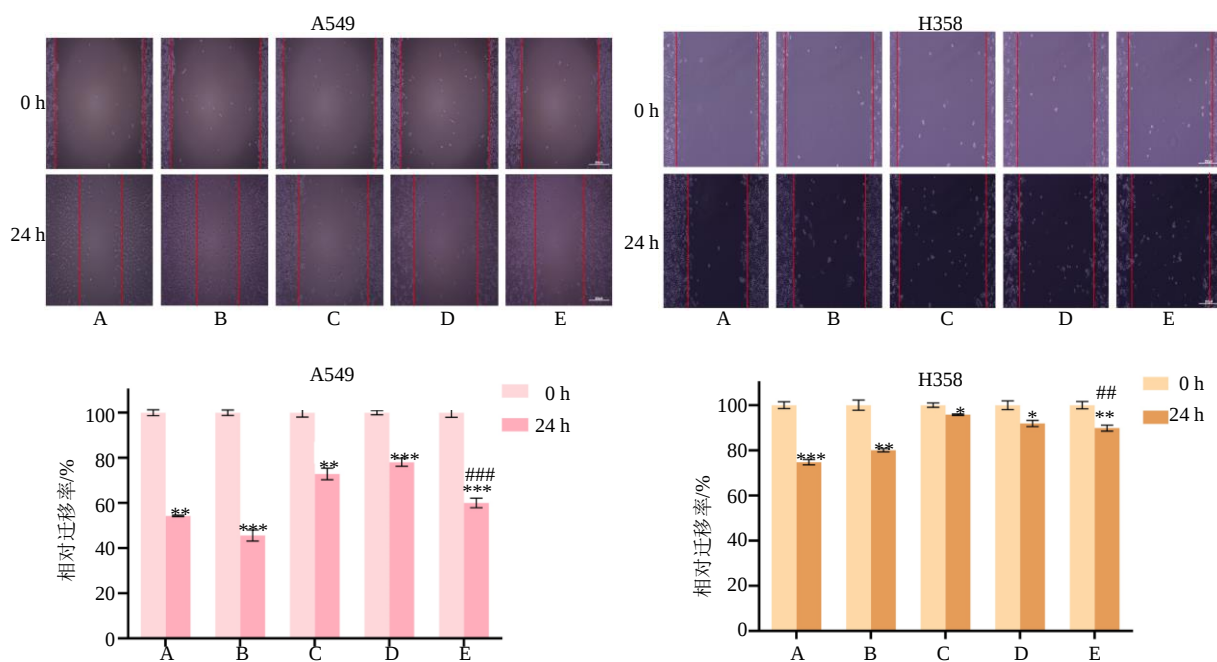
图 8 使用氯喹与芬苯达唑共作用后对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of using chloroquine and fenbendazole in combination on cell proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

发的患者往往预后较差,而肿瘤细胞发生上皮-间充质转化事在肿瘤转移过程中最重要的第一步,抑制肿瘤细胞这一转变过程能够显著抑制转移发生。上皮-间充质转化是肿瘤细胞活动侵袭性间充质能力的一个过程,包括细胞连接的丢失、细胞骨架的

重排以及细胞外基质重塑^[11]。EMT 涉及不同的信号通路: TGF- β 、BMP、RTK、Akt/mTOR 信号通路等等,这些途径通过增加间充质细胞标志物的表达,减少上皮细胞标志物表达,最终将上皮细胞的表型转变为间充质干细胞^[12]。通过肿瘤细胞经过上皮-间充质转化后,具有免疫逃逸的能力,可以从肿瘤原发部位转移至其他器官组织等。本研究发现,在使用芬苯达唑后,肺腺癌细胞的侵袭迁移能力被显著抑制,且 EMT 相关的 *N-cadherin*、*Cytokeratin*、*FN1* mRNA 相对表达水平及蛋白表达水平随药物浓度增高而降低,说明芬苯达唑具有抑制肺腺癌细胞转移的潜力。有研究发现,除了调控 EMT 相关分子的表达之外,芬苯达唑还可以通过下调基质金属蛋白酶 2/9、 β -连环蛋白以及 *Slug* 转录因子表达,抑制 *Hela* 细胞及胶质母细胞瘤 U87 和 U251 细胞的迁移与侵袭^[6,8],这些结果说明芬苯达唑对肿瘤细胞 EMT 的抑制作用可能会通过多种途经,同时也支持本研究的发现。

自噬是一种高度保守的分解代谢过程,通过将受损的细胞器、病原体和聚集的蛋白转至溶酶体并被溶酶体分解,在维持细胞稳态方面发挥着重要作用^[13],在肿瘤转移中,自噬是一把“双刃剑”,可以抑制或促进癌症的进展,在不同癌症类型、不同阶段以及不同的肿瘤微环境有着不同的作用^[14]。在癌细胞转移的早期阶段,自噬可能是通过调节 EMT 中关键蛋白的不稳定性抑制上皮间充质转化过程抑制癌细胞转移^[15-16]。自噬主要受 PI3K/Akt/mTOR、Beclin-1、p53 和 JAK/STAT 等信号通路控制^[17]。自噬可以通过 PI3K/Akt/mTOR、p38 MAPK、Erk1/2 和 SIRT1 介导的信号通路等抑制 EMT,在本研究中发现,芬苯达唑通过上调自噬相关基因(如 *ATG16L1*、

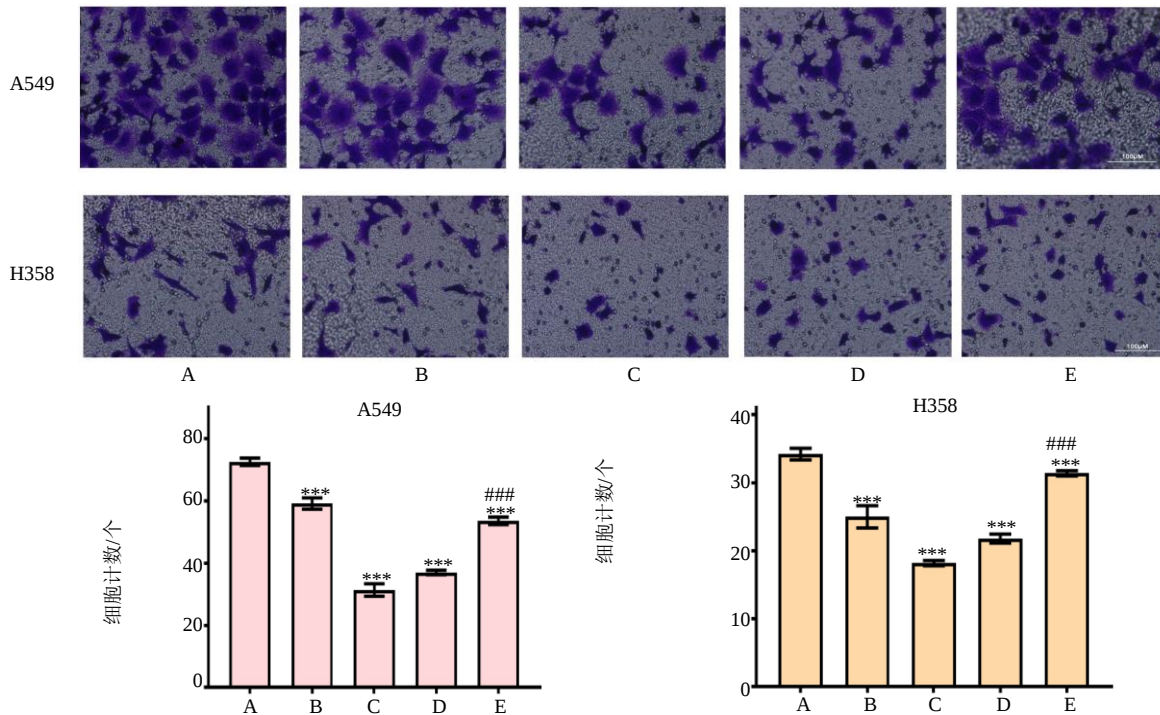


A-对照, B-氯喹 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C-芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-氯喹 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E-氯喹 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与 0 h 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 与 C 组 0 h 比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$

A-control, B-chloroquine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C-fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-chloroquine $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E- chloroquine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 0 h group, ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs C group at 0 h.

图 9 使用氯喹与芬苯达唑共作用后对细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 9 Effect of using chloroquine and fenbendazole in combination on cell migration ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)



A-对照, B-氯喹 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C-芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-氯喹 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E-氯喹 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +芬苯达唑 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与 对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 与 C 组比较: #### $P < 0.001$ 。

A-control, B-chloroquine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C-fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-chloroquine $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E- chloroquine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +fenbendazole $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, #### $P < 0.001$ vs C group.

图 10 使用氯喹与芬苯达唑共作用后对细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $\times 200$)

Fig. 10 Effect of using chloroquine and fenbendazole in combination on cell invasion ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $\times 200$)

ATG4A、Bax、BECN1、CCL2、VAMP3 等), 且通过检测 LC3、Beclin-1、P62 蛋白表达水平, 提示芬苯达唑能够诱导肺腺癌细胞自噬。氯喹是一种自噬体-溶酶体融合抑制剂, 在体外和体内严重影响内溶酶体系统和高尔基复合体, 通过减少自噬体-溶酶体融合来损害基础自噬通量^[18]。目前, 还未有研究表明芬苯达唑是通过自噬相关途径抑制癌细胞的增殖及侵袭迁移。本研究发现, 芬苯达唑可能激活了自噬上游的信号通路, 进而上调的自噬相关基因的转录。而氯喹反向实验说明芬苯达唑这种促进自噬的行为可能会抑制肺腺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力。这为芬苯达唑用于肿瘤治疗或辅助现有肿瘤治疗药物提供的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Y Q, Zheng Z, Liu Q X, *et al.* Repositioning of antiparasitic drugs for tumor treatment [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 670804.
- [2] Kimmelman A C, White E. Autophagy and tumor metabolism [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1037-1043.
- [3] Nath J, Paul R, Ghosh S K, *et al.* Drug repurposing and relabeling for cancer therapy: Emerging benzimidazole antihelminthics with potent anticancer effects [J]. *Life Sci*, 2020, 258: 118189.
- [4] 王宏磊, 刘义明, 徐飞, 等. 芬苯达唑的药理作用及其在动物生产中的应用的研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(5): 67-73.
- [5] Dogra N, Kumar A, Mukhopadhyay T. Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11926.
- [6] Peng Y, Pan J, Ou F T, *et al.* Fenbendazole and its synthetic analog interfere with HeLa cells' proliferation and energy metabolism via inducing oxidative stress and modulating MEK3/6-p38-MAPK pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 361: 109983.
- [7] Duan Q W, Liu Y F, Rockwell S. Fenbendazole as a potential anticancer drug [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(2): 355-362.
- [8] Ren L W, Li W, Zheng X J, *et al.* Benzimidazoles induce concurrent apoptosis and pyroptosis of human glioblastoma cells via arresting cell cycle [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 194-208.
- [9] Shimomura I, Yokoi A, Kohama I, *et al.* Drug library screen reveals benzimidazole derivatives as selective cytotoxic agents for KRAS-mutant lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 451: 11-22.
- [10] Dogra N, Mukhopadhyay T. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate leads to a potent cytotoxic effect in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30625-30640.
- [11] Polyak K, Weinberg R A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 265-273.
- [12] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [13] Mowers E E, Sharifi M N, Macleod K F. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(10): 1751-1766.
- [14] White E, DiPaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5308-5316.
- [15] Gugnoni M, Sancisi V, Gandolfi G, *et al.* Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy [J]. *Oncogene*, 2017, 36(5): 667-677.
- [16] Babaei G, Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Jaghi N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110909.
- [17] Chen H T, Liu H, Mao M J, *et al.* Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 101.
- [18] Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion [J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1435-1455.

[责任编辑 高源]