

常春藤皂苷元抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移并诱导其凋亡

樊庆葵^{1,2},余南琼^{1,2},胡美纯²,余同辉²

摘要 目的 探讨常春藤皂苷元(HDG)对胶质母细胞瘤(GBM)细胞增殖、迁移和凋亡的影响及机制。方法 人GBM细胞株U87、U251和人脑胶质细胞株(HEB)为研究对象,以HDG 0 μmol/L(或0 mg/kg)为对照组,实验组分别给予不同浓度HDG;噻唑蓝法(MTT)、EdU染色及细胞平板克隆检测HDG对GBM细胞增殖的影响;锥虫蓝染色检测HDG对GBM细胞死亡的影响;细胞划痕、Transwell实验检测HDG对GBM细胞迁移和侵袭的影响;Annexin V-FITC、JC-10染色及Western blot检测细胞凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2-Associated X的蛋白质Bax、肿瘤蛋白p53、胱天蛋白酶3(cleaved-caspase-3),分析HDG对GBM细胞凋亡的影响;BALB/C小鼠肿瘤异种移植实验分析HDG对GBM体内荷瘤的影响。结果 与对照组(HDG 0 μmol/L)比较,HDG对U87、U251细胞的增殖、迁移和侵袭有显著抑制作用,且与HDG剂量呈依赖关系;锥虫蓝染色结果显示HDG导致GBM细胞的死亡数量明显增多;HDG明显诱导U87、U251细胞的线粒体膜电位下降、凋亡细胞数量增加以及凋亡相关蛋白Bax、p53、cleaved-caspase3的表达上调和Bcl-2的表达下调;HDG显著抑制BALB/C小鼠皮下GBM的大小、GBM细胞Ki67的阳性率并导致GBM细胞大量死亡;HDG对人HEB细胞以及荷瘤小鼠肝脏无明显毒性作用。结论 HDG对GBM细胞的增殖、迁移和侵袭有显著抑制作用且诱导其凋亡,HDG诱导GBM细胞凋亡的机制可能通过介导线粒体损伤及调控p53、Bcl-2/Bax表达。

关键词 常春藤皂苷元;胶质母细胞瘤;增殖;迁移;凋亡

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0852-12
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.017

2024-01-17 接收

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2022CFB394);湖北省科技计划项目(编号:2016CFB491);湖北省卫生健康委员会科研项目(编号:WJ2019Q022);湖北科技学院医学科研专项基金(编号:2022YKY07、2022YKY08)

作者单位:湖北科技学院医学部¹药学院、²基础医学院,咸宁437100

作者简介:樊庆葵,女,硕士研究生;

余同辉,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xnsth@hbust.edu.cn;

胡美纯,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: humei-chun.530@163.com

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见、最具侵袭性的原发性恶性脑肿瘤^[1]。GBM细胞具有异质性高,呈弥漫性浸润、侵入性高、异常血管生成等特点^[2]。由于目前治疗方法缺乏理想的临床疗效,GBM的临床治疗仍面临着巨大挑战^[3]。小分子药物具有能穿过细胞膜、作用于细胞内靶点、组织渗透性更好、能部分通过血脑屏障、没有免疫原性和广谱性等优点,已成为GBM分子靶向治疗的研究热点。

常春藤皂苷元(hederagenin, HDG)主要来源于常春藤、防风、金银花、白头翁、威灵仙等中草药,分子式为C₃₀H₄₈O₄,属于五环三萜类化合物^[4]。研究^[5]表明,HDG有抗肿瘤、抗抑郁、抗菌抗炎、抗糖尿病等多种药理作用,可以穿过血脑屏障并迅速分布到脑脊液中。目前,关于HDG对GBM的作用尚缺乏深入研究,该研究旨在通过体内外实验探讨HDG对GBM细胞的增殖、迁移和凋亡的作用,为开发HDG成为治疗GBM的小分子靶向药物提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人胶质母细胞瘤U87、U251细胞株和人脑胶质细胞株HEB为该实验室保存。

1.1.2 实验动物 6周龄SPF级BALB/C小鼠15只,雄性,体质量(20 ± 2)g,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。

1.1.3 药物 HDG(分析标准品,HPLC ≥ 98%,CAS号465-99-6,批号:B20167)购自上海源叶公司。

1.1.4 试剂 DMEM培养基(批号:C11995500BT)、胎牛血清(批号:12483020)和胰蛋白酶(批号:8122307)均购自美国Gibco公司;四甲基偶氮唑盐(MTT,批号:ST1537-250 mg)、二甲基亚砜(DMSO,批号:ST038-100 ml)、锥虫蓝染色细胞存活率检测试剂盒(批号:C0011)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(批号:C1062S)、BeyoClick™ EdU-488细

胞增殖检测试剂盒(批号:C0071S)、Ki-67(批号:AF1738)、二氨基联苯胺(DAB,批号:P0202)均购自上海碧云天公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10,批号:BL726A,规格:100T)、苏木精伊红染液(hematoxylin-eosin staining,HE)(批号:BL700A,规格:100 ml × 2)购自合肥 Biosharp 公司。Matrigel 包被的 Transwell 小室(批号:354480)购自美国 Corning 公司;抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bax、caspase-3、p53(批号:AC001、A0208、A0207、A0263)均购自武汉 ABclonal 公司。

1.1.5 仪器 倒置荧光显微镜(日本 Olympus Corporation 公司,型号:IX73);1300 SERIES A2 超净工作台、CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);多功能酶标检测仪(美国 BioTek 公司,型号:Epoch2);低温离心机(美国 Eppendorf 公司,型号:5424R);ChemiDoc MP 蛋白印迹-多功能成像系统、1645050 电泳仪和 Gene Pulser Xcell 电转仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 U87、U251 和 HEB 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基的培养皿中,在温度 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞长到 85% 时进行细胞传代,将处于对数期的细胞用于实验。

1.2.2 细胞增殖检测

1.2.2.1 MTT 检测法 U87、U251 和 HEB 细胞接种于 96 孔板。每孔细胞数密度 5×10^3 个/孔,按每孔 100 μ l 细胞悬液加入 96 孔板中置于培养箱培养 24 h 后,弃板孔内培养基,加入用培养基稀释至不同浓度(0、10、20、40、80 μ mol/L)的 HDG,每个浓度梯度设置 6 个复孔,放入培养箱继续培养 24、48、72 h 后加入 MTT,避光继续培养 4 h 后取出加入 DMSO,置于摇床上室温混匀 15 min,使用酶标仪 490 nm 的吸光度(optical density, OD)进行检测。GraphPad Prism 8 软件绘制出细胞生存曲线并计算出 IC₅₀ 值。细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 对照组 OD 值)/对照组 OD 值,设定对照组细胞存活率为 1。

1.2.2.2 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测 将 U251 细胞和 U87 细胞分别接种到 24 孔板中, 3×10^4 个/孔。待细胞生长至汇合度约 80% 左右时,配置工作液并 37 °C 预热后将工作液加入板中,继续孵育细胞 2 h。EdU 标记细胞完成后,去除培养液,并加入 1 ml 固定液,室温固定 15 min。去除固定液,

洗涤液洗涤细胞 3 次后每孔加入 1 ml 通透液,室温孵育 15 min。去除通透液,每孔用洗涤液洗涤细胞 2 次。最后参照试剂盒说明书配制反应液并加入孔中,室温避光孵育 30 min。孵育结束后吸除反应液,洗涤液洗涤 3 次。并使用 Hoechst 33342 进行细胞核染色,室温避光孵育 10 min,结束后用洗涤液洗涤 3 次,随后即可进行荧光检测。

1.2.3 细胞克隆形成实验 将处于对数生长期的细胞胰酶消化后接种于 6 孔板中,各实验组接种 1×10^3 个细胞/孔。24 h 后加入含不同浓度 HDG 的培养基,继续培养至绝大多数单个克隆细胞数大于 50% 为止;克隆完成后,PBS 洗涤 3 次,每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 3 次;每孔加入 0.1% 结晶紫染色细胞 20 min;PBS 洗涤细胞数次后晾干,拍照并用 Image J 对图片进行处理,最后用 GraphPad Prism 8 软件进行统计。

1.2.4 细胞迁移和侵袭实验 细胞横向迁移,每孔加入约 5×10^5 个细胞。24 h 后进行划痕并用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入含不同浓度 HDG 的培养基,放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。按 0 h、24 h 拍照。细胞的纵向迁移和侵袭实验:上室铺 Matrigel 胶(只侵袭用的小室加入),加入 Matrigel 胶后,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h,孵育结束,弃 Matrigel 胶,取对数生长期 U87 和 U251 细胞,用无血清培养基培养 8 h 后,以 1×10^5 个/孔接种于上室,下室分别加入含不同浓度 HDG 的培养基,24 h 后终止培养,取出小室,吸弃培养基,用棉签轻轻擦去 Matrigel 胶和未穿膜的表面细胞,4% 多聚甲醛固定小室里的细胞,再用结晶紫染色,干燥后显微镜下拍照并统计结果。

1.2.5 锥虫蓝染色细胞存活率检测 U87、U251 细胞接种于 24 孔板。每孔细胞数密度 5×10^6 个/孔,按每孔 3 000 μ l 细胞悬液加入 24 孔板中置于培养箱培养 24 h 后,弃板孔内培养基,加入用培养基稀释至不同浓度(0、10、20、40、80 μ mol/L)的 HDG,继续培养 24 h 后重悬细胞,吸取 100 μ l 重悬的细胞,加入 100 μ l 锥虫蓝染色液,轻轻混匀,染色 3 min,吸取少量经过染色的细胞,用血细胞计数板拍照计数。细胞存活率 = (细胞总数 - 蓝色细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞凋亡检测 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤,将 U251 细胞和 U87 细胞分别接种到 24 孔板中, 3×10^4 个/孔。待细胞生长至汇合度约 80% 左右时,加入不同浓度的 HDG

处理 24 h。然后弃去培养基, PBS 洗 1 次, 每孔分别加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液、5 μl Annexin V-FITC、10 μl 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀。室温避光孵育 20 min, 随后置于冰浴中。荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.7 线粒体膜电位检测 以 JC-10 为荧光探针快速灵敏地检测细胞的线粒体膜电位变化, 从而指示早期的细胞凋亡。将 U251 细胞和 U87 细胞分别接种到 24 孔板中, 3×10^4 个/孔。待细胞生长至汇合度约 80% 左右时, 加入不同浓度的 HDG 处理 24 h。之后弃旧液, 加入阳性对照并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内避光孵育 20 min。随后弃旧液, PBS 洗涤, 每孔各加入 200 μl 的培养基和工作液, 充分混匀后培养箱中再孵 20 min。弃旧液加入配好的染色缓冲液, 洗 2 次, 最后加入 PBS 进行拍照。

1.2.8 肿瘤异种移植动物实验 动物实验经湖北科技学院动物伦理委员会批准, 并按照机构和国际动物护理和使用指南进行。6 周龄雄性 BALB/C 小鼠 15 只, 在无特定病原体动物室 (SPF) 中饲养; 深度麻醉后, 将含有 5×10^7 U87 细胞的 100 μl 无菌 PBS 溶液注射到 BALB/C 小鼠背部皮下; 当肿瘤体积达到一定标准后, 将小鼠随机分为对照组、低剂量组和高剂量组 (每组 $n = 5$); 低剂量组和高剂量组小鼠每日给予 HDG 灌胃 20 mg/kg 和 40 mg/kg^[6]。每隔 1 d 按以下公式计算肿瘤体积: 体积 = 长 \times 宽² \times 0.52 (单位为 cm^3), 同时每天测量体质量; 14 d 后, 处死小鼠, 收集肿瘤和肝脏。

1.2.9 Western blot 实验 U251 细胞和 U87 细胞分别接种到 10 cm 的细胞培养皿中, 待细胞生长至汇合度约 80% 左右时, 加入不同浓度的 HDG 处理 24 h。取出培养皿放置于冰面上, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 冲洗 3 遍。每皿加入 150 μl 细胞裂解工作液, 冰上裂解 30 min, 将裂解好的细胞放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冷冻离心机 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液, BCA 法蛋白定量测定配平。取得蛋白后采用 Western blot 法进行实验, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 二抗孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 使用 ECL 发光液曝光显影。

1.2.10 HE 及免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色 将脱水组织固定在 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋并切成 4 μm 切片。将组织块脱蜡、再水化并用 HE 染色, 将切片放在盖玻片上后在显微镜下观察。为了抑制内源性过氧化物酶活性, 将组织

切片脱蜡、再水化并在 3% H_2O_2 中处理以进行免疫组织化学染色, 然后在枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中对载玻片进行抗原修复。将组织片冷却至室温后, 用 0.1% Triton X-100 进行封闭和透化, 将切片在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的加湿室中用 Ki-67 处理过夜, 此后, 加入 HRP 标记的二抗, 室温反应 1 h, 使用底物二氨基联苯胺识别抗体, 并用苏木精对载玻片进行复染色。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 One-way ANOVA 进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验独立重复 3 次。

2 结果

2.1 HDG 对 GBM 细胞和 HEB 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示 (图 1), 与对照组比较, 经不同浓度 HDG (0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, U251 细胞和 U87 细胞的增殖活力均有明显的抑制, 且与 HDG 浓度呈依赖关系, 差异有统计学意义 ($F_{\text{U87}} = 22.6, F_{\text{U251}} = 39.13; P < 0.05$); 根据细胞生存曲线, HDG 作用 24 h 后, U251 的 IC_{50} 值为 $(25.20 \pm 4.55) \mu\text{mol/L}$; U87 的 IC_{50} 值为 $(40.32 \pm 3.67) \mu\text{mol/L}$; 而随着 HDG 给药浓度的增加, 与对照组相比较, HEB 细胞活力几乎没有变化 ($F_{\text{HEB}} = 165.4, P > 0.05$)。

细胞克隆形成实验结果 (图 2) 显示, 与对照组相比, 经不同浓度 HDG (2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, U251、U87 细胞的体外克隆形成呈剂量依赖性抑制, 差异有统计学意义 ($F_{\text{U87}} = 151.80, F_{\text{U251}} = 82.59; P < 0.01$)。

为进一步验证 HDG 对 GBM 细胞增殖的影响, 通过 EdU-488 细胞增殖检测结果 (图 3) 显示, 与对照组相比, 经不同浓度 HDG (10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, U251、U87 细胞的 EdU-488 染色阳性细胞数目随给药浓度升高而明显减少 ($F_{\text{U87}} = 290.60, F_{\text{U251}} = 84.01; P < 0.05$); 表明 HDG 呈浓度依赖性抑制 GBM 细胞的增殖。上述结果均表明 HDG 具有显著抑制 GBM 细胞增殖的作用。

2.2 HDG 对 GBM 细胞迁移和侵袭的影响

细胞划痕实验结果 (图 4) 所示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 对照组相比较, 经不同浓度 HDG (10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, U251、U87 细胞的横向迁移明显受到抑制, 且与 HDG 浓度呈依赖性关系, 差异有统计学意义 ($F_{\text{U87}} = 212.0, F_{\text{U251}} = 22.5; P < 0.05$)。

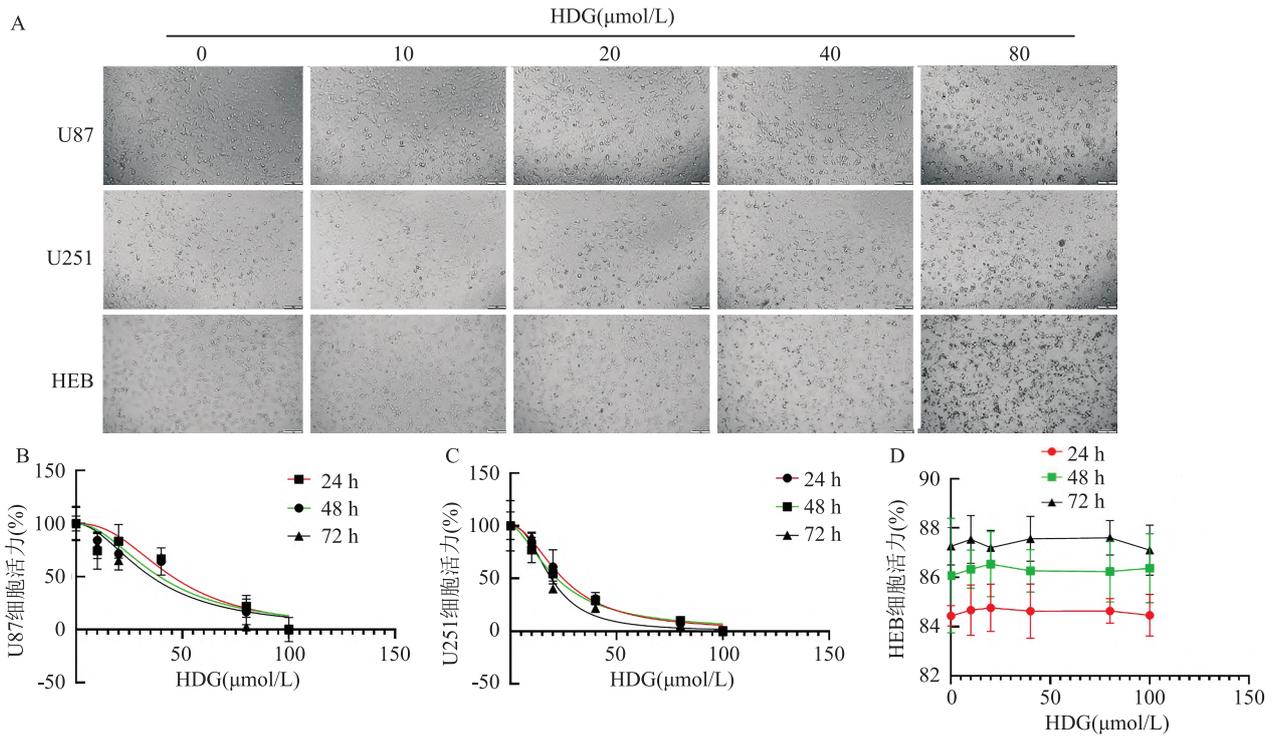


图1 MTT 检测 HDG 对 GBM 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: HDG 作用后的 GBM 细胞白光图 $\times 100$; B-D: 细胞增殖率统计结果

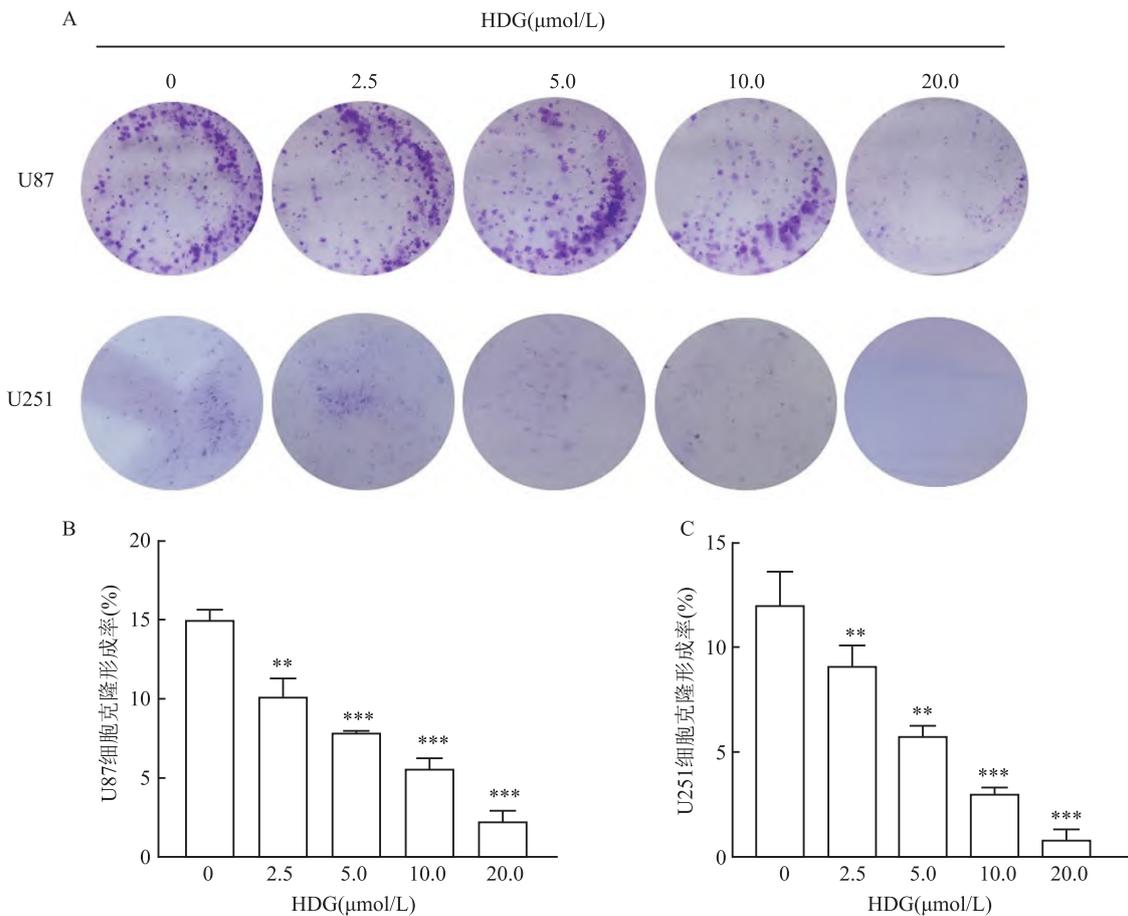


图2 HDG 对 GBM 细胞克隆形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 克隆形成实验结晶紫染色结果 $\times 1.5$; B、C: U87 和 U251 细胞克隆形成率统计; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

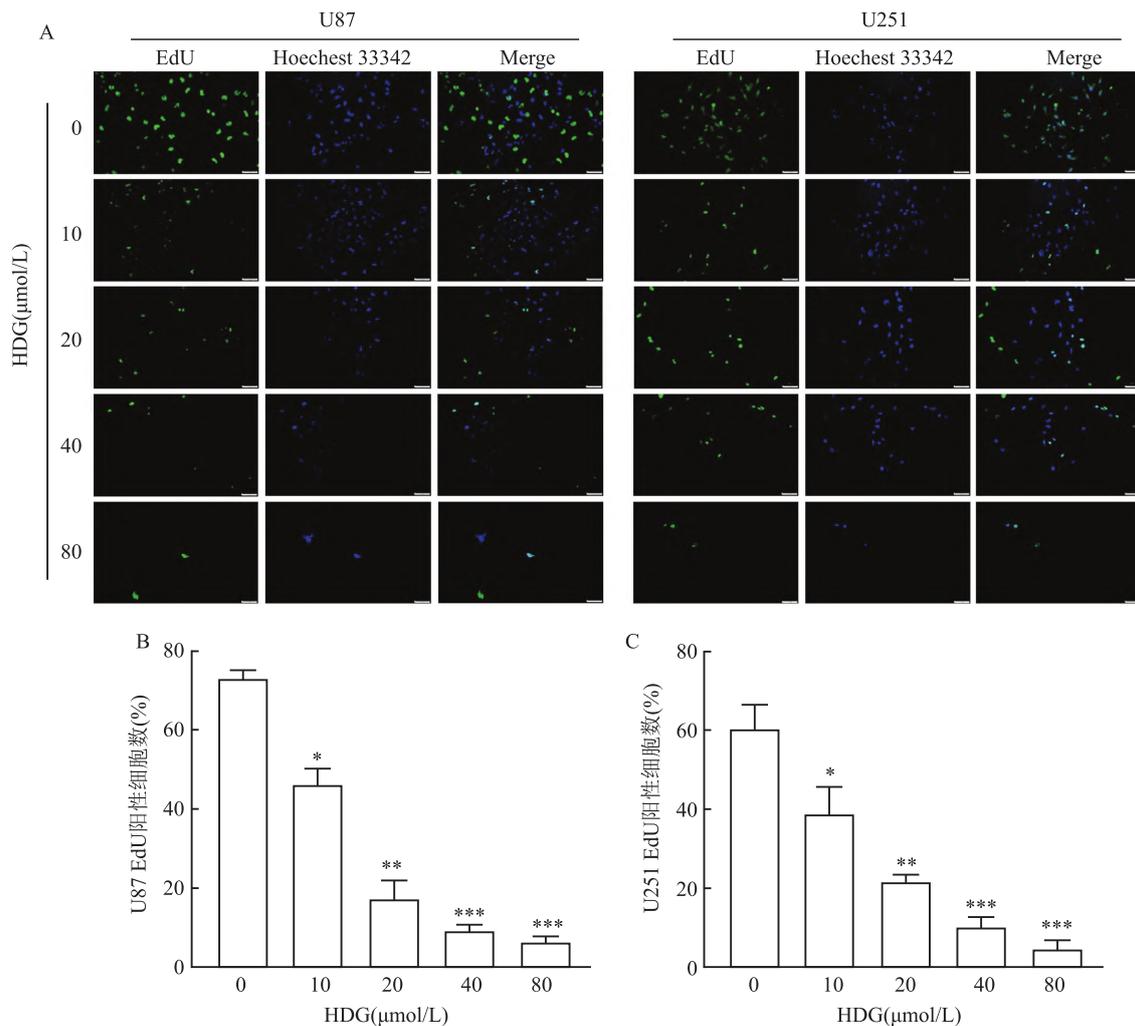


图3 EdU-488染色显示HDG对GBM细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A:EdU 荧光染色照片 ×100;B、C:EdU 阳性细胞数百分比;与0 μmol/L 对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Transwell 法检测细胞的纵向迁移和侵袭能力(如图5)显示,与0 μmol/L 对照组比较,经不同浓度 HDG(10、20、40 μmol/L)处理 24 h 后,U251、U87 细胞的纵向迁移与侵袭能力都明显受到抑制,且与 HDG 浓度呈依赖关系,差异有统计学意义(U87: $F_{侵袭} = 64.42, F_{迁移} = 141.80$; U251: $F_{侵袭} = 45.70, F_{迁移} = 265.50; P < 0.05$)。上述结果说明,HDG 对 GBM 细胞的迁移和侵袭有显著抑制作用,且与 HDG 浓度呈依赖关系。

2.3 HDG 对 GBM 细胞活性的影响 细胞活性染料锥虫蓝染色结果(图6)显示,0 μmol/L 对照组 U87 细胞的存活率为 0.820 ± 0.024 ,经不同浓度 HDG(10、20、40、80 μmol/L)处理 24 h 后,其存活率分别为 0.803 ± 0.012 、 0.743 ± 0.009 、 0.530 ± 0.024 、 0.273 ± 0.025 ,差异有统计学意义($F = 231, P < 0.05$);0 μmol/L 对照组 U251 细胞的存活率为

0.820 ± 0.022 ,经不同浓度 HDG(10、20、40、80 μmol/L)处理 24 h 后,其存活率分别为 0.777 ± 0.017 、 0.703 ± 0.021 、 0.403 ± 0.026 、 0.177 ± 0.021 ,差异有统计学意义($F = 331.1, P < 0.05$)。结果说明 HDG 呈浓度依赖性诱导 GBM 细胞死亡。

2.4 HDG 对 GBM 细胞凋亡的影响 细胞凋亡试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)检测细胞死亡情况,结果(图7)显示,与0 μmol/L 对照组比较,经不同浓度 HDG(10、20、40 μmol/L)处理 24 h 后,U251、U87 细胞早期凋亡(Annexin V⁺/PI⁻)的比例随 HDG 浓度的增加而显著增加,差异有统计学意义($F_{U87} = 320.0, F_{U251} = 588.6; P < 0.05$),提示 HDG 诱导 GBM 细胞的凋亡。

JC-10 探针测量线粒体膜电位变化,结果如图8所示,与阴性对照组(HDG 0 μmol/L)比较,经不同浓度 HDG(10、20、40 μmol/L)处理 24 h 后,U251、

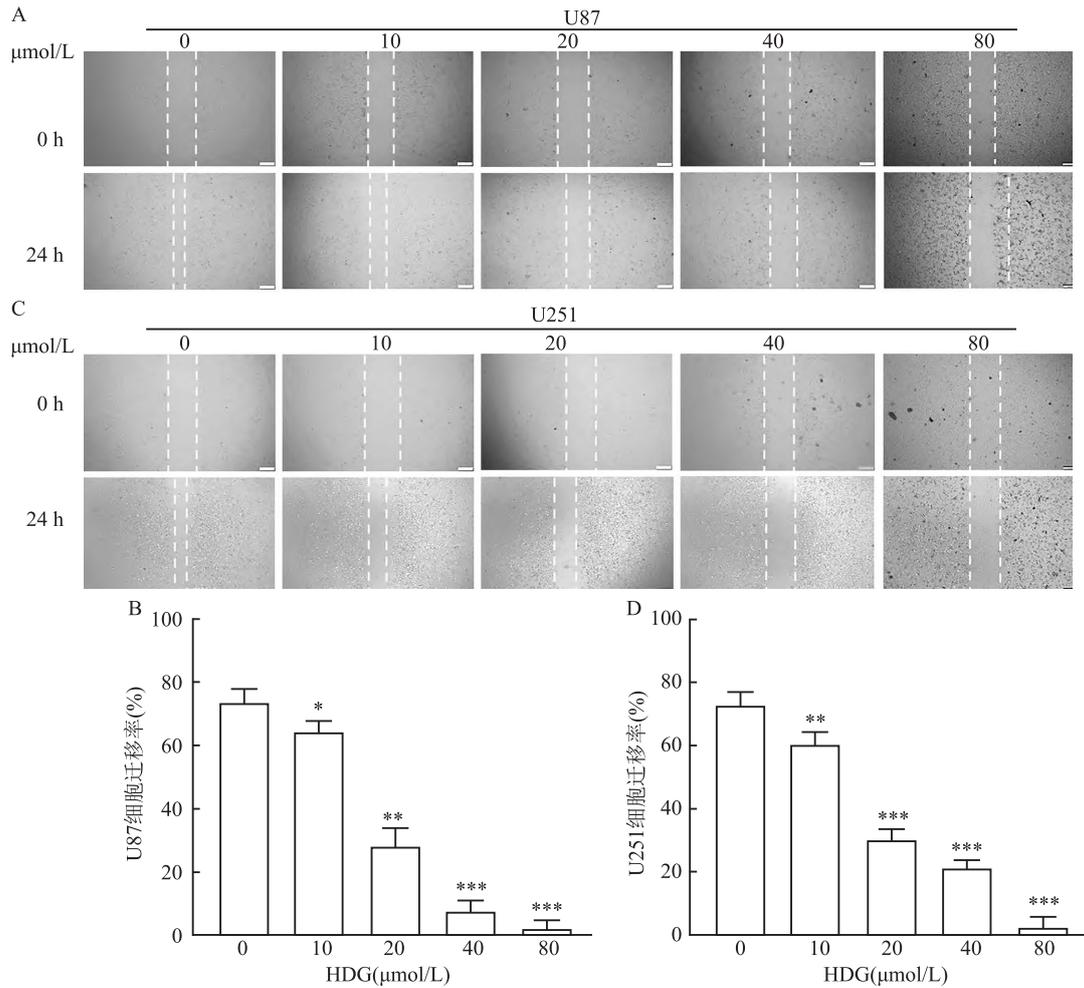


图4 HDG对GBM细胞横向迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A、C:U87和U251细胞横向迁移白光图 ×200;B、D:U87和U251迁移率统计;与0 μmol/L组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

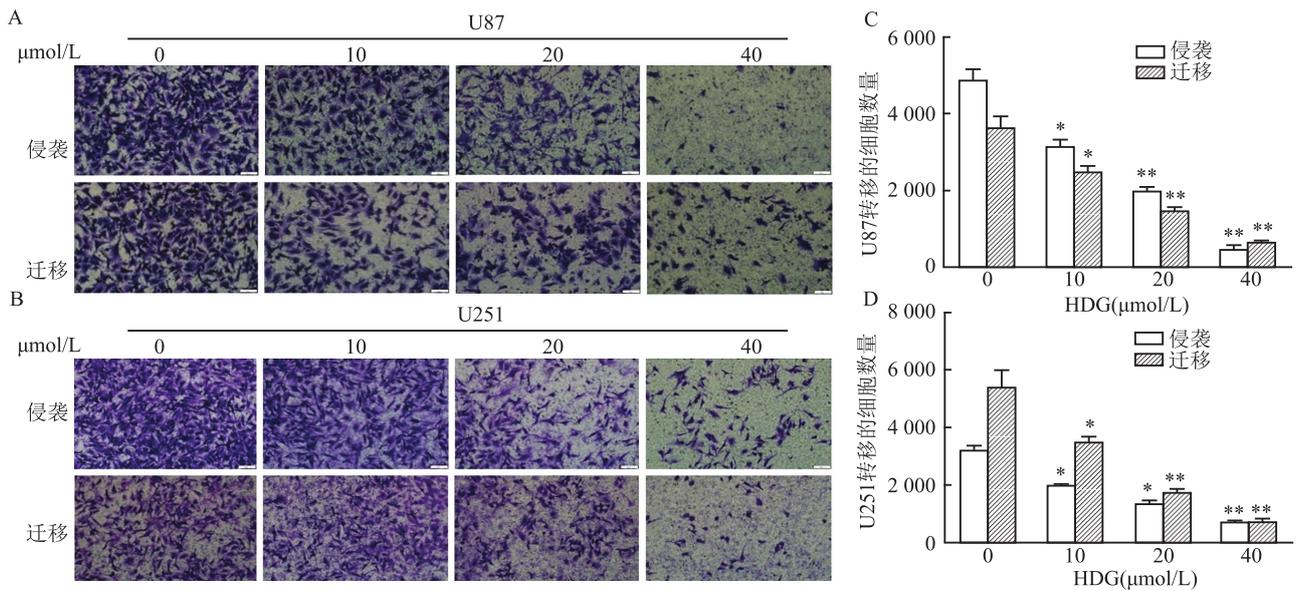


图5 HDG对GBM细胞纵向迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A、B:HDG对U87和U251细胞纵向迁移和侵袭作用的镜下图 ×50;C、D:U87和U251迁移细胞数统计;与0 μmol/L组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

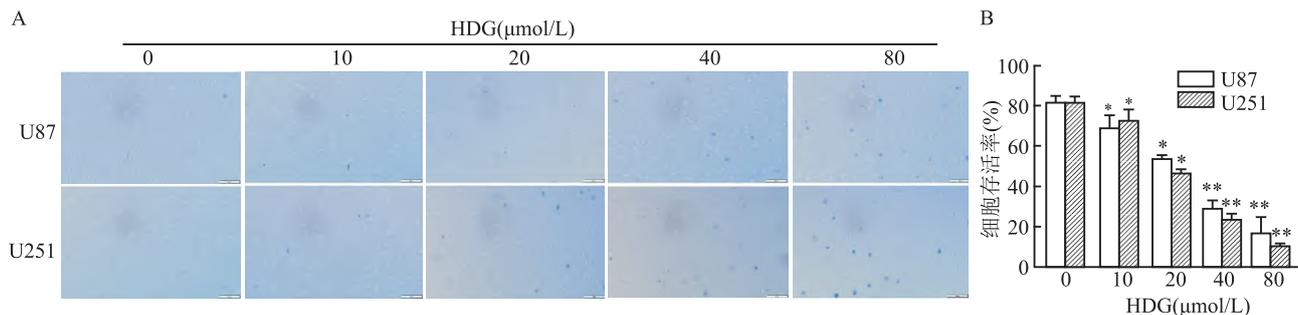


图6 HDG对GBM细胞死亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: 锥虫蓝染色白光图 ×100; B: 细胞存活率统计结果; 与0 μmol/L 对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

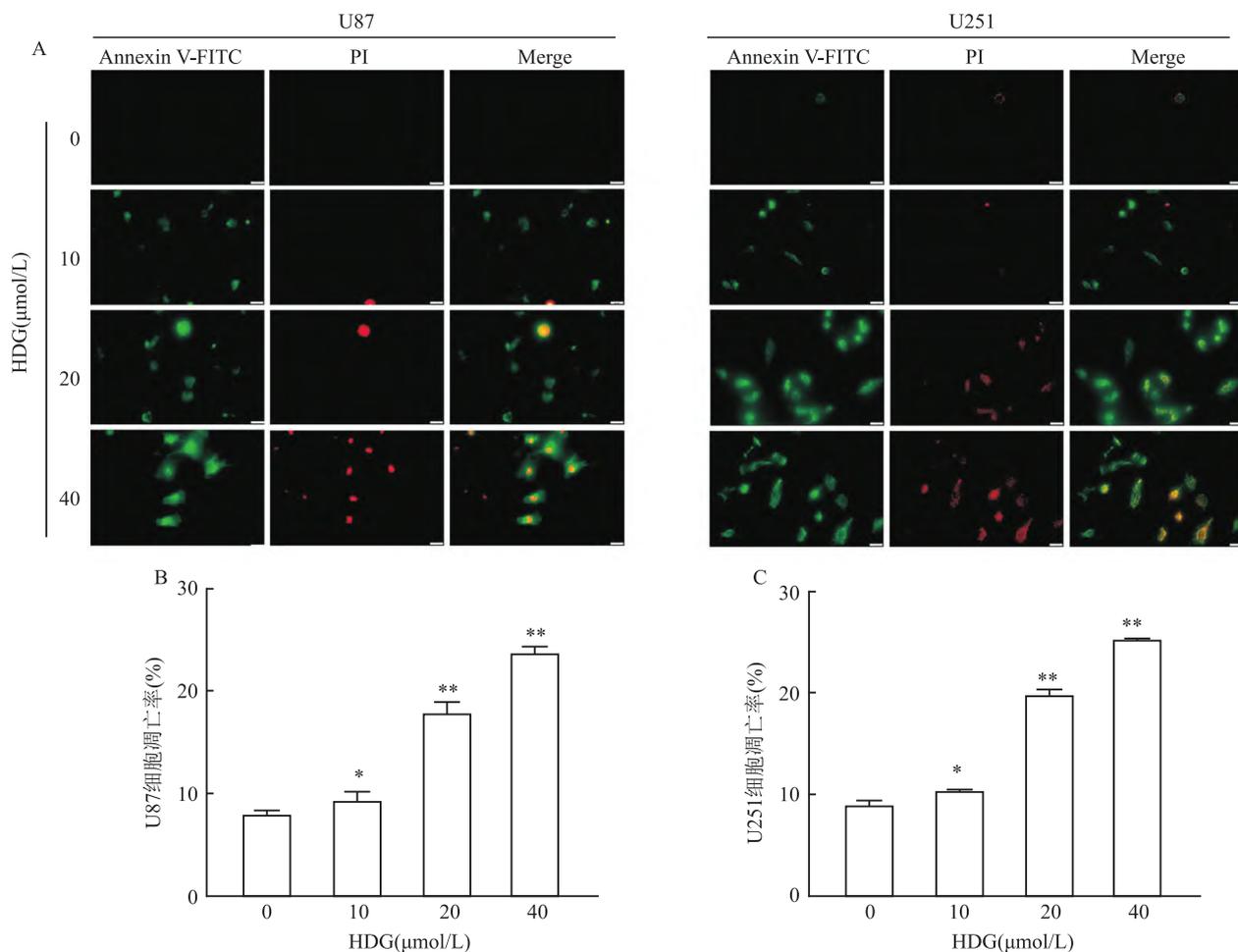


图7 HDG对GBM细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 荧光图 ×20; B、C: 细胞凋亡率统计结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

U87 细胞表现出 JC-10 单体 (绿色) 的积累增强而 JC-10 聚集体 (红色) 减少, 说明随着 HDG 给药浓度的增高, GBM 细胞线粒体膜电位下降程度越来越显著 ($F_{U87} = 227.90, F_{U251} = 76.23; P < 0.05$)。结果提示 HDG 可能触发 GBM 细胞的线粒体依赖性细胞凋亡。

Western blot 结果 (图9) 显示, 与 0 μmol/L 对照组比较, 经不同浓度 HDG (10、20、40、80 μmol/L) 处理 24 h 后, U251、U87 细胞的 p53、Bax、cleaved-caspase-3 的表达显著上调, 而 Bcl-2 的表达显著下调, 且 Bcl-2/Bax 比值明显下降, 差异有统计学意义 ($F_{U87} = 144.1, F_{U251} = 193.2; P < 0.05$)。

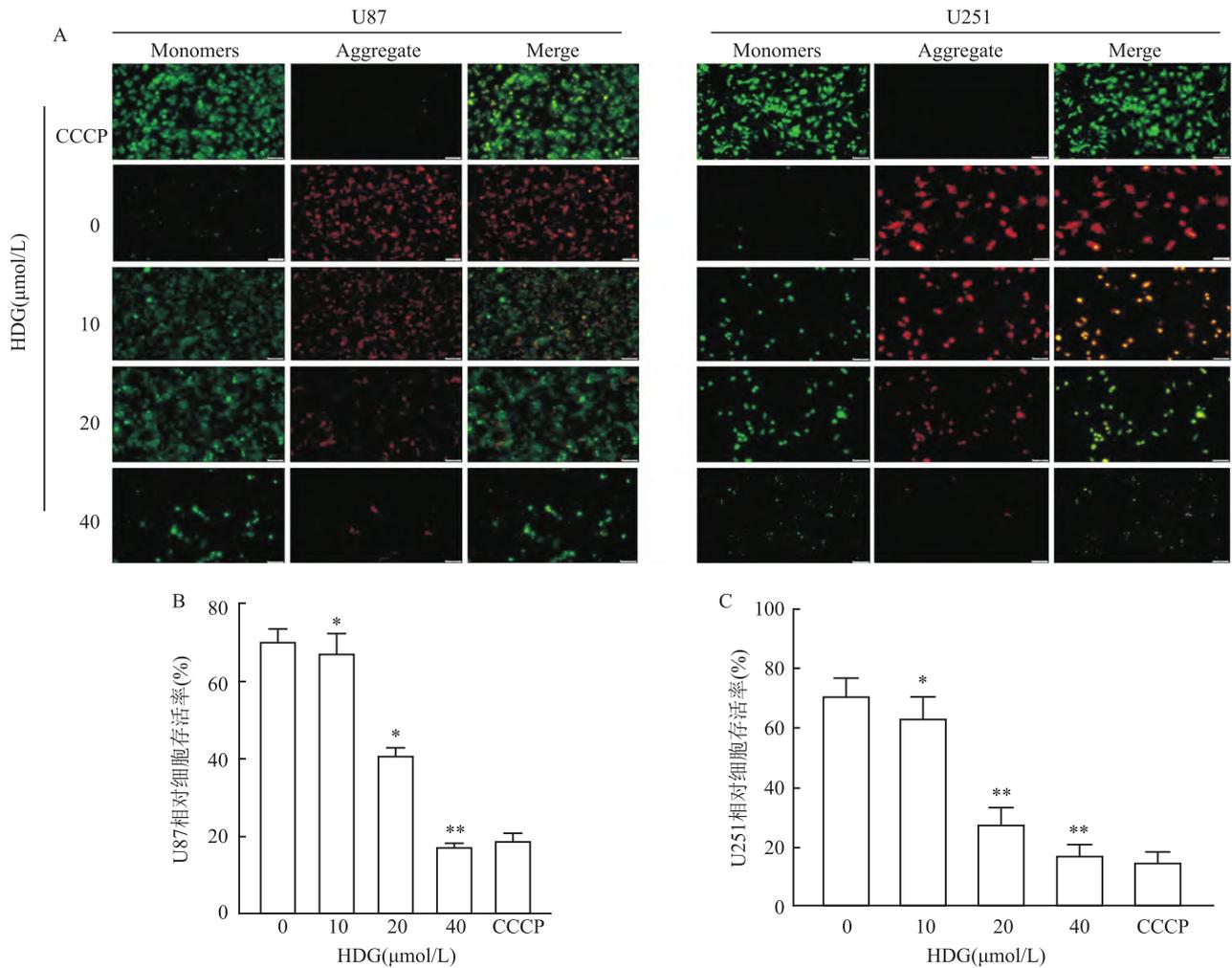


图8 HDG对GBM细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: JC-10 荧光图 $\times 50$; B, C: 正常细胞与线粒体膜电位降低细胞比值的统计结果; CCCP 组: 阳性对照组; 与阴性对照组 (HDG 0 $\mu\text{mol/L}$) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 HDG对GBM细胞体内增殖的影响 U87细胞的BALB/C小鼠皮下异种移植模型实验结果显示:与Control组比较,经不同浓度HDG(20、40 mg/kg)治疗后,HDG治疗组的肿瘤大小、体积均小于Control组($P < 0.05$),而各实验组小鼠的体质量均相对稳定(图10A、10B);小鼠的肝脏肉眼形态及肝/体比在治疗组与Control组之间无明显差异(图10C, $F = 0.014$)。组织形态观察显示(图10D),Control组GBM细胞密集、异型性明显、死亡细胞少见,而HDG治疗组的GBM细胞疏松且大量细胞死亡;Control组GBM细胞的Ki67阳性率接近20%,而HDG治疗组GBM细胞的Ki67阳性率显著降低;对照组、HDG治疗组小鼠肝脏的组织形态均无异常改变。

体内实验结果提示,HDG对GBM细胞的体内增殖有显著抑制作用且诱导细胞死亡,而其体内毒

性作用不明显。

3 讨论

GBM是恶性程度IV级的神经胶质瘤,极具侵袭性和致命性^[7],目前仍以手术治疗、放疗和化疗为主要治疗手段,但由于肿瘤浸润性生长,与脑组织间无明显边界,除早期肿瘤小且位于适当部位者外,难以做到全部切除,一般都主张综合治疗,即术后配合以放射治疗、化学治疗等,但治疗效果很不理想。

从天然植物中寻找抗肿瘤药物是抗肿瘤药物开发应用的一项有效策略^[8]。HDG属五环三萜类化合物,首次在常春藤叶中发现^[9]。近年来因其具有强烈的抗肿瘤活性而受到广泛关注^[5]。研究^[10-11]显示,HDG在肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌研究中均证实其具有抗肿瘤作用。

根据该研究结果显示,MTT实验、EdU-488染色

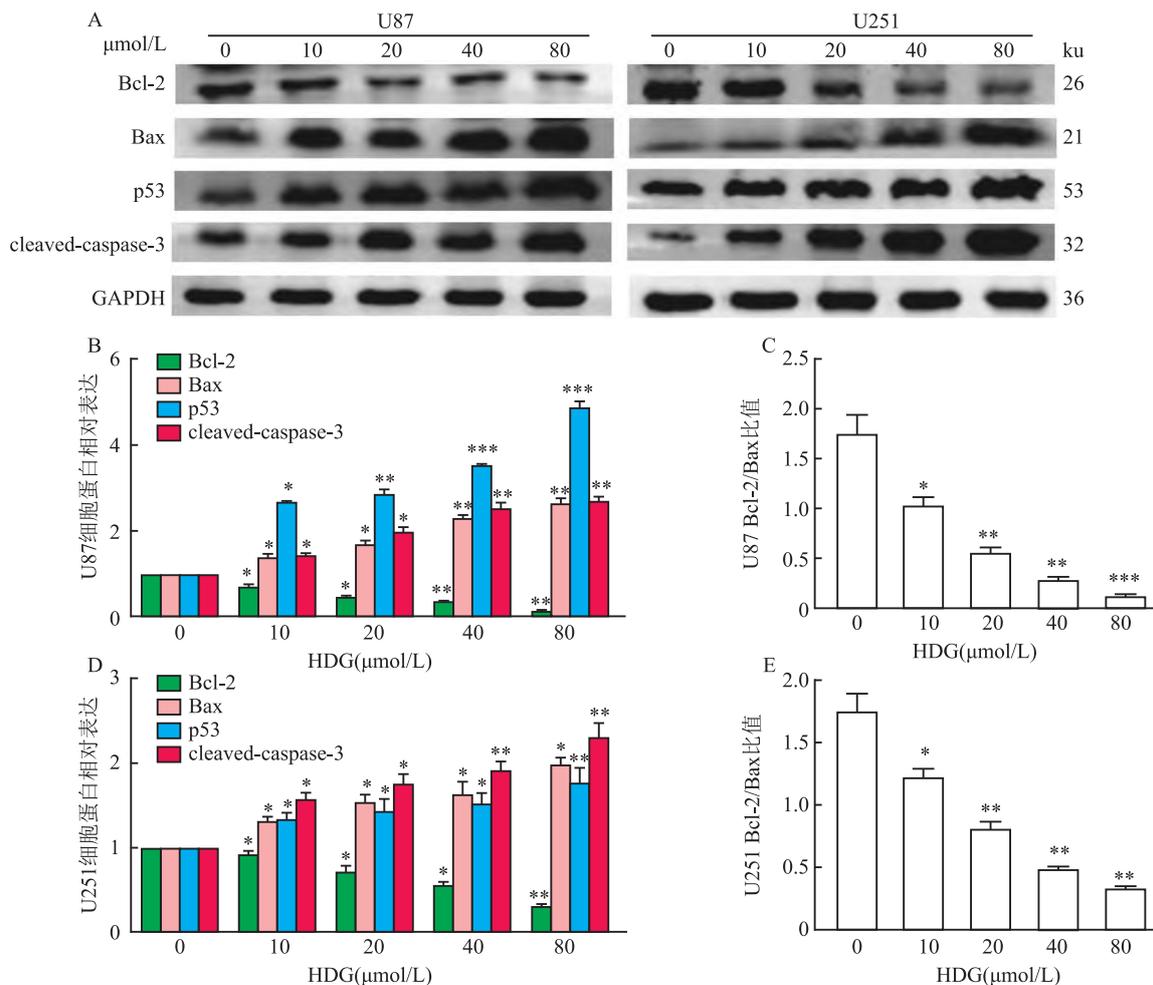


图9 HDG对GBM细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Western blot 显色结果; B, D: 相关蛋白表达水平的统计结果; C, E: Bcl-2/Bax 比值的统计结果; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表明 HDG 在体外明显抑制 GBM 细胞的增殖, 克隆形成实验显示 HDG 抑制 GBM 细胞的体外克隆形成, 小鼠肿瘤异种移植动物实验显示 HDG 抑制小鼠皮下 GBM 体积的增大, 且经 HDG 治疗后小鼠皮下 GBM 的细胞排列疏松且大量细胞死亡或脱落、Ki67 阳性率显著降低, 说明 HDG 在体内外均可抑制 GBM 细胞的生长; 通过细胞划痕实验和 Transwell 实验的结果, 验证了 HDG 对 GBM 细胞的迁移和侵袭有明显抑制作用; 小鼠异种移植的组织学观察及体外 GBM 细胞锥虫蓝染色均显示 HDG 可以诱导 GBM 细胞死亡, 而 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测则证实 HDG 诱导 GBM 细胞的凋亡, 说明 HDG 对 GBM 细胞有毒性作用, 诱导细胞凋亡是其抗肿瘤作用的有效方式之一; 而 HDG 对人 HEB 细胞的增殖无显著抑制及形态改变, 且对经其治疗的荷瘤小鼠肝脏的肉眼形态和组织结构没有明显影响, 说明

HDG 对正常组织、细胞的毒性作用不明显。上述结果提示, HDG 可以抑制 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭且诱导其凋亡, 而对正常组织、细胞无明显毒性作用, 因而 HDG 具有成为抗 GBM 药物的潜在开发应用价值。

大量研究^[12]显示, Bcl-2 家族和 caspase 家族蛋白在细胞凋亡信号转导通路尤其是线粒体依赖的凋亡途径中发挥了重要的调控作用。Bcl-2 与 Bax 共属同一个家族, 通过控制线粒体膜的通透性来调节凋亡激活物。Bcl-2 是迄今研究最深入、最广泛的凋亡调控基因之一, 可通过其疏水区锚定于线粒体外膜、外核膜及部分内质网膜表面, 是阻止凋亡早期征象发生的重要因子^[13]。Bax 为促凋亡蛋白代表, 多以非活性单体形式分布于胞质中, 只有在接收到凋亡信号刺激被激活后, 才破坏线粒体膜的完整性, 并与 Bcl-2 等抑制凋亡的蛋白对抗并阻止其抗凋亡作

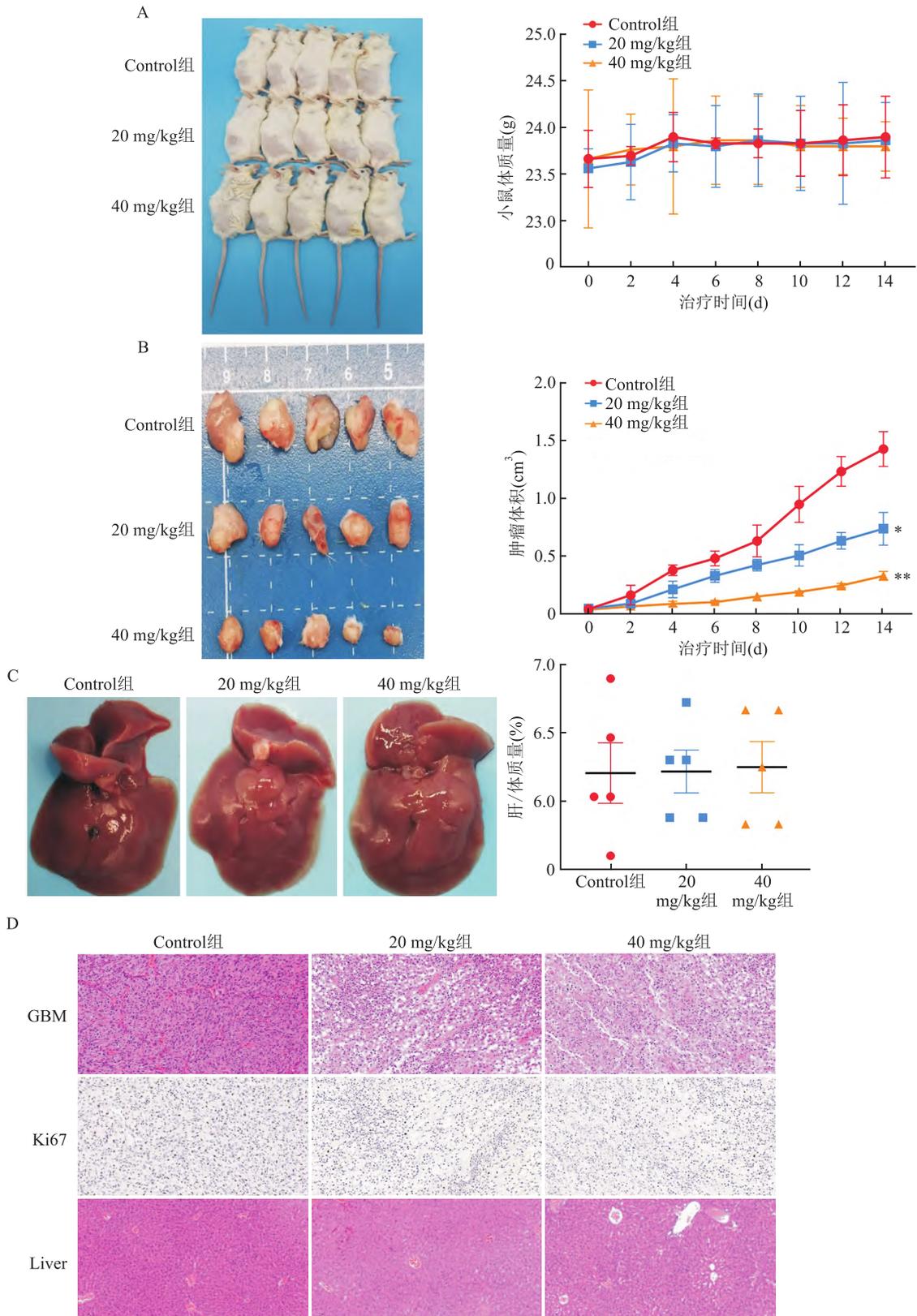


图 10 HDG 对 GBM 细胞在小鼠体内增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A: 各实验组小鼠在实验终点时的形态及小鼠的体质量变化曲线; B: 各实验组小鼠荷瘤的大小及肿瘤生长曲线; C: 各实验组小鼠肝脏的肉眼形态及肝脏/体质量比率; D: 各实验组小鼠荷瘤(GBM) HE $\times 100$ 、Ki67 表达 IHC $\times 100$ 、肝脏(Liver) HE $\times 100$ 的组织形态或表达情况; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

用的发挥^[12]。Bax 二聚体在膜上打开通道,增加膜的通透性,Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体,降低通透性。Bcl-2 与 Bax 的比值越大,说明抗凋亡能力越强。caspase 为促凋亡蛋白,在细胞内可以通过多种不同的途径被活化,然后切割并激活下游的 caspase 分子,介导细胞凋亡^[14]。p53 是重要的转录因子,调控着肿瘤的发生和凋亡,细胞可以经过以 p53 为核心的信号转导机制进行基因修复引起细胞周期阻滞或诱导细胞凋亡^[15]。为了进一步探明 HDG 诱导 GBM 细胞发生凋亡的分子机制,该研究结果显示,HDG 诱导 GBM 细胞线粒体膜电位的下降;且随着 HDG 给药浓度的增加,GBM 细胞的 p53、Bax、cleaved-caspase-3 的表达显著上调,而 Bcl-2 的表达显著下调,Bcl-2/Bax 比值明显下降,说明 HDG 可能通过引起线粒体损伤及调控 p53、Bcl-2/Bax 的机制来诱导 GBM 细胞的凋亡。

综上所述,该研究表明 HDG 抑制 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭,且可能通过引起线粒体损伤及调控 p53、Bcl-2/Bax 的机制来诱导 GBM 细胞的凋亡;而 HDG 对正常组织、细胞没有明显毒性作用,因而,HDG 具有成为抗 GBM 药物的潜在价值。该研究为 HDG 开发应用于抗 GBM 的临床治疗提供了一定理论支持和实验证据;关于 HDG 抗 GBM 作用的具体机制,尚有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17–48.

[2] 朱君,朱正春,秦学金,等. lncRNA MEG3 对脑胶质瘤细胞替莫唑胺获得性耐药的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10):1621–6,1632.

[3] Luo H, Zhang H, Mao J, et al. Exosome-based nanoimmunotherapy targeting TAMs, a promising strategy for glioma [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 235.

[4] Ma W, Huang Q, Xiong G, et al. The protective effect of Hederagenin on pulmonary fibrosis by regulating the Ras/JNK/NFAT4 axis in rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(6): 1131–8.

[5] Zeng J, Huang T, Xue M, et al. Current knowledge and development of hederagenin as a promising medicinal agent: A comprehensive review [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(43):24188–202.

[6] 吴铁林,李升,杨森. 常春藤皂苷元通过 JNK/p38 MAPK 信号通路抑制膀胱癌细胞体外和裸鼠体内增殖能力的相关研究[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2022, 16(6):681–4.

[7] 李鑫,刘畅,薛春红,等. 胶质瘤中 LINC01152 的表达及其对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(4):622–9.

[8] Wang X, Lu J, Guo G, et al. Immunotherapy for recurrent glioblastoma: Practical insights and challenging prospects [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 299.

[9] Rodríguez-Hernández D, Barbosa L C A, Demuner A J, et al. Hederagenin amide derivatives as potential antiproliferative agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 168: 436–46.

[10] 白芙婷,姜怡,郭宇航,等. 萜萜酰胺调控 STAT3/HIF-1 α 通路抑制三阴性乳腺癌细胞增殖[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(7):1140–5.

[11] Liu Z, Zheng Q, Chen W, et al. Chemosensitizing effect of Paris Saponin I on Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in lung cancer cells via p38 MAPK, ERK, and Akt signaling pathways [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 125: 760–9.

[12] 刘美玲,洪宏海,王征. CARM1 通过调控 Bax/Bcl-2 表达和 Caspase-3 活性进而调控肝癌生长作用[J]. *世界肿瘤研究*, 2019, 9(3):90–7.

[13] 何显静,郑英,李初谊,等. 阿克替苷通过调控 JNK 信号通路促进肝癌细胞自噬与凋亡的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(9):2343–51.

[14] Guo J, Zhang K, Ji Y, et al. Effects of ethyl pyruvate on myocardial apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins after ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(3): 281–3.

[15] Liu J, Tao X, Zhu Y, et al. NMNAT promotes glioma growth through regulating post-translational modifications of P53 to inhibit apoptosis [J]. *Elife*, 2021, 10:e70046.

HDG inhibits the proliferation and migration of GBM cells and induces their apoptosis

Fan Qingkui^{1,2}, Yu Nanqiong^{1,2}, Hu Meichun², She Tonghui²

(¹School of Pharmacy, ²School of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100)

Abstract Objective To investigate the effects of hederagenin (HDG) on proliferation, migration, invasion and apoptosis of glioblastoma (GBM) cells and involved mechanism. **Methods** Human GBM cell lines U87, U251 and human brain glial cell line (HEB) were selected as the study subjects, and HDG 0 $\mu\text{mol/L}$ (or 0 mg/kg) was

网络出版时间:2024-04-29 17:08:52 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240429.1146.030

TEAD1/TEAD4 基因多态性与非贲门胃癌变关系的研究

阎小霞¹,董文杰¹,张云翔²,高芳²,贾彦彬¹

摘要 目的 探讨 TEA 转录因子 1 (TEAD1) 基因单核苷酸多态性 (SNP) rs2304733、TEA 转录因子 4 (TEAD4) SNP rs7135838 和 rs1990330 与非贲门胃癌变发病风险的关系。方法 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测正常对照组血清样本中抗幽门螺杆菌 (Hp) 的特异性抗体,根据抗体滴度将 470 例正常对照组分为 Hp 感染阴性组 ($n = 223$) 和阳性组 ($n = 247$)。在 450 例非贲门胃癌病例组和 470 例对照组中,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对各 SNP 位点进行基因分型,采用非条件性

Logistic 回归评估各 SNP 位点与非贲门胃癌变发病风险的关系。结果 TEAD1、TEAD4 各 SNP 位点均与 Hp 感染没有关联;TEAD1 rs2304733 与非贲门胃癌的发病风险相关,与携带 TT 基因型者相比,携带 CT 基因型及 CC 基因型者均增加了非贲门胃癌的发病风险 (CT vs TT: $OR = 2.321$, 95% CI : 1.690 ~ 3.188; CC vs TT: $OR = 5.140$, 95% CI : 1.080 ~ 24.463);TEAD4 rs1990330 与非贲门胃癌发病风险相关,与携带 GG 基因型者相比,携带 GT 基因型者增加了非贲门胃癌的发病风险 ($OR = 2.405$, 95% CI : 1.480 ~ 3.908);TEAD4 rs7135838 与非贲门胃癌的发病风险无关联;TEAD1 rs2304733、TEAD4 rs7135838 以及 rs1990330 对非贲门胃癌发病风险存在交互作用 ($P < 0.05$)。结论 在包头地区汉族人群中,TEAD1 rs2304733、TEAD4 rs1990330 在 Hp 感染中不起主要作用,在非贲门胃癌发病风险中可能起一定作用;TEAD4 rs7135838 在 Hp 感染以及非贲门胃癌发病风险中可能均不起主要作用;TEAD1 rs2304733、TEAD4 rs1990330 对非贲门胃癌发病风险的协同效应最强,为最佳交互模型。

关键词 TEA 转录因子 1;TEA 转录因子 4;基因多态性;幽门螺杆菌;非贲门胃癌

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0863-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.018

2023-12-15 接收

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(编号:2020LH08004、2021MS08054);内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(编号:202201370);包头医学院创新团队发展计划项目(编号:byextd-06);包头医学院花蕾计划项目(编号:HL2021034)

作者单位:包头医学院¹基础医学与法医学院、²医学技术与麻醉学院,包头 014040

作者简介:阎小霞,女,硕士研究生;

高芳,女,副教授,责任作者,E-mail:34646929@qq.com;

贾彦彬,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jyb690318@hotmail.com

used as the control group. MTT, EdU staining and cell plate cloning were used to detect the effect of HDG on the proliferation of GBM cells. Trypan blue staining was used to detect GBM cell death affected by HDG. The effects of HDG on migration and invasion of GBM cells were detected by cell scratch and Transwell assay. To analyze the effects of HDG on apoptosis of GBM cells, apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, p53 and cleaved caspase-3 were detected by Western blot. Mitochondrial potential change was detected by JC-10 staining, and apoptotic cell count was displayed by Annexin V-FITC staining. The effect of HDG on tumor bearing in GBM was analyzed by xenotransplantation in BALB/C mice. **Results** Compared with the control group (HDG 0 $\mu\text{mol/L}$), HDG significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of U87 and U251 cells, and they were dependent on the use dose of HDG. Trypan blue staining showed that HDG obviously increased death number of GBM cells. The mitochondrial potential of GBM cells was remarkably decreased, the number of apoptotic GBM cells obviously increased, the expressions of apoptosis-related proteins p53, Bax, cleaved-caspase3 were up-regulated and Bcl-2 was down-regulated by HDG in U87 and U251 cells. HDG significantly inhibited the size of subcutaneous GBM, the Ki67 positive rate of GBM cells and caused a large number of GBM cells to die in BALB/C mice. HDG had no obvious toxic effect on human HEB cells and the liver of tumor-bearing mice. **Conclusion** HDG can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of GBM cells and induce the apoptosis of them. The mechanism of HDG induced apoptosis of GBM cells may be through mitochondrial damage and regulation of p53 and Bcl-2/Bax expression.

Key words hederagenin; glioblastoma; proliferation; migration; apoptosis