

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2026.08.018

论著 · 基础

积雪草苷调节 Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路对脑胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响

杨娇, 扈玉华, 徐跃娇, 卢文鹏, 周川, 玉壮, 王曼, 何堃宇



基金项目: 雄安新区科技创新专项项目(2023XAGG0072); 河北省自然科学基金资助项目(H2023206260)

作者单位: 070001 河北雄安, 雄安宣武医院神经外科(杨娇、周川、玉壮、王曼、何堃宇); 050000 石家庄, 河北医科大学

第二医院神经外科(扈玉华、卢文鹏); 100053 北京, 首都医科大学宣武医院神经外科(徐跃娇)

通信作者: 扈玉华, E-mail: huyuhua2000@ 163.com

【摘要】目的 探讨积雪草苷(Asi) 调节 Ras/Raf/Mek/Erk 通路对脑胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

方法 2025 年 3—8 月于河北省心脏与代谢重点实验室进行实验。将 U87 细胞分为 U87 细胞组、积雪草苷低剂量(Asi-L) 组、积雪草苷高剂量(Asi-H) 组、激活剂(ML-098) 组、积雪草苷高剂量+通路激活剂(Asi-H+ML-098) 组。CCK-8 法和 EdU 实验检测细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; 划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 小室检测细胞侵袭活性; Western-blot 实验检测 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白水平。将 U87 细胞注射到裸鼠体内构建异种移植瘤模型, 将小鼠分为模型(Model) 组、积雪草苷低剂量(Asi-L) 组、积雪草苷高剂量(Asi-H) 组。测量肿瘤体积并称重, HE 染色观察肿瘤组织的基本形态结构; 免疫组化法检测 Ki-67、Cleaved caspase 3 阳性表达; Western-blot 实验检测 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白水平。**结果** 与 U87 细胞组比较, Asi-L 组、Asi-H 组 U87 细胞存活率和 EdU 阳性细胞率、划痕愈合率、侵袭细胞数、Ras/Raf/Mek/Erk 通路和 c-Myc 蛋白表达量下降, p53 蛋白表达量和细胞凋亡率升高($P<0.01$), 而 ML-098 组 U87 细胞存活率和 EdU 阳性细胞率、划痕愈合率、侵袭细胞数、Ras/Raf/Mek/Erk 通路和 c-Myc 蛋白表达量升高, p53 蛋白表达量和细胞凋亡率降低($P<0.01$); 与 Asi-H 组比较, Asi-H+ML-098 组细胞存活率和 EdU 阳性细胞率、划痕愈合率、侵袭细胞数、Ras/Raf/Mek/Erk 通路和 c-Myc 蛋白表达量升高, p53 蛋白表达量和细胞凋亡率降低($P<0.01$)。动物实验显示, 与 Model 组比较, Asi-L 组、Asi-H 组裸鼠肿瘤质量和体积、Ki-67 阳性率及 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达量下降, Cleaved caspase 3 阳性率升高($P<0.01$)。**结论** Asi 可能通过抑制 Ras/Raf/Mek/Erk 通路活性, 抑制脑胶质瘤 U87 细胞增殖、迁移、侵袭和肿瘤生长。

【关键词】 脑胶质瘤细胞; 积雪草苷; 增殖、侵袭; Ras/Raf/Mek/Erk 通路; 作用机制; 小鼠**【中图分类号】** R739.41; R285.5**【文献标识码】** A

The effects of asiaticoside on the proliferation, migration and invasion of glioma cells by regulating the Ras/Raf/Mek/Erk signaling pathway Yang Jiao^{*}, Hu Yuhua, Xu Yueqiao, Lu Wenpeng, Zhou Chuan, Yu Zhuang, Wang Man, He Kunyu.^{*} Department of Neurosurgery, Xiongan Xuanwu Hospital, Hebei, Xiongan New Area 070001, China
Funding program: Xiongan New Area Scientific and Technological Innovation Special Project(2023XAGG0072); Hebei Natural Science Foundation Project (H2023206260)

Corresponding author: Hu Yuhua, E-mail: huyuhua2000@ 163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of asiaticoside (Asi) regulating the Ras/Raf/Mek/Erk pathway on the proliferation, migration and invasion of glioma cells. **Methods** Experiments were conducted at the Hebei Provincial Key Laboratory of Cardiology and Metabolism from March 2025 to August 2025. U87 cells were divided into the U87 cell group, low-dose and high-dose asiaticoside (Asi-L, Asi-H) groups, activator (ML-098) group, and high-dose asiaticoside + pathway activator (Asi-H+ML-098) group. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay and EdU assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. The scratch assay was used to measure cell migration ability, and the Transwell chamber was used to measure cell invasion activity. The expression of Ras/Raf/Mek/Erk pathway proteins was detected by Western blot. U87 cells were injected into nude mice to construct xenograft tumor models, and the mice were divided into the model group, low-dose and high-dose asiaticoside (Asi-L, Asi-H) groups. Tumor volume and weight were measured, and the basic morphological structure of the tumor tissue was observed by HE staining. The positive expressions of Ki-67 and cleaved caspase-3

were detected by immunohistochemistry. In addition, the protein expressions of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway were detected by Western blot. **Results** Compared with the U87 cell group, the Asi-L and Asi-H groups exhibited decreased U87 cell viability, EdU-positive cell rate, wound healing rate, number of invasive cells, activity of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, and expression of c-Myc protein, while showing increased expression of p53 protein and cell apoptosis rate ($q/P=8.981/<0.001$, $5.730/<0.001$, $8.490/<0.001$, $18.632/<0.001$, $7.473/<0.001$, $19.106/<0.001$, $13.580/<0.001$; $q/P=34.571/<0.001$, $17.540/<0.001$, $9.460/<0.001$, $19.852/<0.001$, $19.702/<0.001$, $27.924/<0.001$, $20.096/<0.001$). In contrast, the ML-098 group showed elevated cell viability, EdU-positive cell rate, wound healing rate, number of invasive cells, activity of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, and expression of c-Myc protein, along with reduced expression of p53 protein and a decreased cell apoptosis rate ($q/P=4.616/<0.001$, $3.344/0.007$, $3.573/0.005$, $3.582/0.005$, $14.537/<0.001$, $3.753/<0.001$, $4.384/0.001$). Compared with the Asi-H group, the Asi-H+ML-098 group exhibited increased cell viability, EdU-positive cell rate, wound healing rate, number of invasive cells, activity of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, and expression of c-Myc protein, along with decreased expression of p53 protein and a reduced cell apoptosis rate ($q/P=12.462/<0.001$, $11.458/<0.001$, $12.734/<0.001$, $9.267/<0.001$, $14.537/<0.001$, $5.435/<0.001$, $12.041/<0.001$). Animal experiments showed that compared with the model group, the Asi-L and Asi-H groups exhibited reduced tumor mass and volume, lower Ki-67 positive rate, and decreased expression of Ras/Raf/MEK/ERK pathway proteins, along with an increased cleaved caspase-3 positive rate ($q/P=7.452/<0.001$, $4.771/<0.001$, $4.576/0.002$, $6.519/<0.001$, $5.367/<0.001$, $6.286/<0.001$, $5.534/<0.001$, $10.996/<0.001$; $q/P=18.398/<0.001$, $13.103/<0.001$, $16.228/<0.001$, $18.447/<0.001$, $11.628/<0.001$, $12.655/<0.001$, $12.572/<0.001$, $15.244/<0.001$). **Conclusion** Asiaticoside may inhibit the proliferation, migration, invasion, and tumor growth of glioblastoma U87 cells by suppressing the activity of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway.

【Key words】 Glioma cells; Asiaticoside; Proliferation, Invasion; Ras/Raf/Mek/Erk pathway; Mechanism; Mice

脑胶质瘤是原发性颅内肿瘤中一种常见的恶性肿瘤。由于胶质瘤细胞具有极强的增殖、侵袭和迁移能力,因此极易造成肿瘤复发^[1]。在胶质瘤复杂的分子网络中,Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路的异常激活扮演着重要角色。该通路通过接收细胞外生长因子信号,经 Ras、Raf、Mek 逐级磷酸化,最终激活下游效应分子 Erk,进而调控与肿瘤恶性进展密切相关的细胞进程^[2]。研究证实,Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路在脑胶质瘤组织中呈异常高激活状态,其激活水平与肿瘤的恶性程度、侵袭能力及患者预后密切相关^[3]。积雪草苷(asiaticoside, Asi)是从传统中药积雪草中提取的三萜皂苷类化合物,具有广泛的药理活性^[4-6]。在抗癌方面,目前已有研究表明,Asi 可通过调控 Yes 相关蛋白 1(Yes-associated protein 1, YAP1)/血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 信号通路抑制乳腺癌细胞的增殖和血管生成^[7]。然而,关于 Asi 对脑胶质瘤的抑制作用及作用机制,目前尚未见明确报道。本研究采用体外细胞实验辅以动物实验,以人脑胶质瘤细胞系(U87 细胞)为模型,探讨 Asi 对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响,为阐明 Asi 抗胶质瘤的分子机制提供新的实验证据,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 实验对象/细胞: SPF 级 BALB/c 裸鼠购自山东艾莱克生物科技有限公司 [SCXK(鲁) 2022 0007] 5 周龄、体质量 18~20 g,在 SPF 级动物房内适应性饲养 1 周(室温 22~25℃,相对湿度 40%~60%,

12 h 光照/12 h 黑暗昼夜循环,自由摄食),确保小鼠健康状态稳定。本研究经动物伦理委员会审核批准(2025-R-169)。U87 细胞,购自南京万木春生物科技有限公司。(2) 试剂:积雪草苷(上海研谨生物科技有限公司,货号: B20586); ML-098(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号: M333495); CCK-8 试剂盒(上海弗元生物科技有限公司,货号: 600001); DMEM 培养基、细胞凋亡检测试剂盒(北京百奥创新科技有限公司,货号: 11995115-E-CK-A252); HE 染色试剂盒(上海远慕生物科技有限公司,货号: F4713); Ki-67、Cleaved caspase3、Ras、p-Erk、Erk 抗体(英国 Abcam 公司,货号: 16667、32042、52939、201015、54230); p-Raf、Raf、p-Mek、Mek、c-Myc、p53、GAPDH 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号: 9421、9422、9121、9122、9402、9282、5174)。(3) 仪器设备: SpectraMax iD5 酶标仪购自北京悦昌行科技有限公司; FCK-50C 荧光显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司; DSZ5000X 倒置生物显微镜购自陕西鹏展科技有限公司; Transwell 小室购自北京思齐生物技术有限公司; 3404 Midi 40 CO₂ 培养箱购自北京博为高科生物科技有限公司; CyFlow Cube6 流式细胞仪购自广州吉源生物科技有限公司。

1.2 实验方法 2025 年 3—8 月于河北省心脏与代谢重点实验室进行实验。

1.2.1 细胞培养及 Asi 剂量筛选: 将 U87 细胞接种于 DMEM 培养基并置于 CO₂ 培养箱中培养,将生长对数

期的细胞接种于 96 孔板, Asi 以 0、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 干预细胞 24 h, 检测细胞存活率。将 U87 细胞随机分为 U87 细胞组、积雪草苷低剂量(Asi-L) 组、积雪草苷高剂量(Asi-H) 组、Ras 激活剂(ML-098) 组、积雪草苷高剂量+Ras 激活剂(Asi-H+ML-098) 组。其中 Asi-L 组、Asi-H 组细胞分别在含 21、42 $\mu\text{mol/L}$ Asi 的培养基中培养, ML-098 组细胞在含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ML-098 的培养基中培养^[7], Asi-H+ML-098 组细胞在含 42 $\mu\text{mol/L}$ Asi 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ML-098 的培养基中培养, U87 细胞组细胞正常培养。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型构建: 将细胞悬液(约 2×10^6 个 U87 细胞) 200 μl 注射到裸鼠右侧前肢腋下。待肿瘤大小约 100 mm^3 时, 将裸鼠随机分为模型(Model) 组、积雪草苷低剂量(Asi-L) 组、积雪草苷高剂量(Asi-H) 组, 每组 6 只。其中 Asi-L 组、Asi-H 组裸鼠分别灌胃 Asi 20、40 mg/kg , Model 组裸鼠灌胃等量生理盐水。3 周后处死裸鼠, 完整剥离肿瘤测量其体积并称重^[8]。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 CCK-8 法检测细胞存活率: 将对数生长期细胞接种至 96 孔板, 贴壁后按分组处理培养, 48 h 后向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl , 继续避光孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的 OD 值, 计算细胞存活率 = (处理组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.2 EdU 实验检测细胞活性: 将 U87 细胞接种到含有爬片的 24 孔板中, 贴壁后按分组处理培养。24 h 后向每孔中加入 EdU 工作液继续孵育 2 h, 漂洗细胞并经固定、透化、Click 反应液反应、Hoechst 33342 染色后, 使用荧光显微镜进行观察和拍照, 计算 EdU 阳性率 = EdU 阳性细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡: 收集药物处理后的各组细胞上清液及消化后的细胞, 离心弃上清液, 加入 PBS 重悬细胞后再次离心。加入 Binding Buffer 重悬细胞, 取细胞悬液(约 1×10^5 个细胞) 100 μl 至流式管中, 依次加入 Annexin V-FITC 和 PI(各 5 μl) 避光孵育后, 1 h 内于流式细胞仪上机检测。

1.3.4 划痕实验检测细胞迁移: 将对数生长期细胞接种至 6 孔板中, 培养至细胞融合形成完整单层, 然后按实验分组进行相应的药物干预, 药物作用结束后, 用无菌移液器枪头垂直于培养板底面划一条均匀的直线划痕, 分别在划痕后 0 h 和 24 h 在倒置显微镜下同一视野(选取划痕清晰且无边缘破损的区域) 拍摄图像。使用 Image J 软件测量划痕区域的宽度, 计算划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕

宽度 $\times 100\%$ 。

1.3.5 Transwell 小室实验检测细胞侵袭: 将 Matrigel 基质胶均匀铺于 Transwell 小室上室, 向 Transwell 小室下室加入含 10% 胎牛血清的完全培养基(作为趋化因子), 将分组干预后的 U87 细胞悬液接种于上室, 将 Transwell 培养板置于培养箱中孵育 24 h 后取出小室, 用棉签轻轻拭去上室面未穿透的细胞, 4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色, 在倒置显微镜下计数穿过膜的细胞数量。

1.3.6 Western-blot 检测细胞 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白水平: 收集各组处理后的细胞加入 RIPA 裂解液使细胞充分裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 使用 BCA 法测定样本蛋白浓度。调整浓度统一后 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白变性, 取 20 μg 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离、电转至 PVDF 膜上、5% 脱脂奶粉封闭后, 分别与 Ras、Raf、p-Raf、Mek、p-Mek、Erk、p-Erk、c-Myc、p53 及 β -actin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 次日用 TBST 充分洗涤膜后, 将其放入用辣根过氧化物酶(HRP) 标记的二抗中, 室温摇床孵育 2 h。将 ECL 化学发光液滴加在 PVDF 膜的表面, 室温反应 2 min 后, 于凝胶成像系统中曝光显影。使用 Image J 分析软件对条带的灰度值进行定量。目的蛋白的相对表达量以目的条带与 β -actin 灰度值的比值表示。

1.3.7 HE 染色检测裸鼠肿瘤组织病理形态: 取部分裸鼠肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定、常规梯度脱水、石蜡包埋、切片(4 μm) 与固片。将切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 浸入苏木素染色 8 min, 自来水冲洗返蓝, 1% 盐酸乙醇分化 5 s; 随后伊红染色 2 min, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。于光镜下观察。

1.3.8 免疫组化法检测裸鼠 Ki-67、Cleaved caspase3 蛋白表达: 取裸鼠肿瘤组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复, 3% 过氧化氢室温封闭内源性过氧化物酶 10 min, 5% 牛血清白蛋白室温封闭 30 min, 滴加 Ki-67、Cleaved caspase-3 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 PBS 洗涤后滴加二抗室温孵育 30 min, DAB 显色、苏木素复染、盐酸乙醇分化、返蓝, 脱水、透明、中性树胶封片后, 于光学显微镜下观察, 以阳性细胞率表示蛋白的表达量。

1.3.9 Western blot 检测裸鼠肿瘤组织 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达: 取部分裸鼠肿瘤组织加入 RIPA 裂解液匀浆后, 离心收集上清液。按“1.3.6”的处理方法进行检测。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 27.0 软件对数据进行处理分析。计数资料以频数或构成比 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Asi 干预 U87 细胞的浓度筛选 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组 (100.00 ± 0) % 比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 组 (87.25 ± 6.74) %、20 $\mu\text{mol/L}$ 组 (74.58 ± 5.92) %、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 (56.62 ± 4.10) %、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 (39.77 ± 4.05) %、80 $\mu\text{mol/L}$ 组 (20.39 ± 2.60) % 的 U87 细胞存活率依次降低 ($F/P = 268.225 / < 0.001$)。经 Graphpad prism 软件计算得 Asi 对 U87 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 42 $\mu\text{mol/L}$,选取 IC_{50} (42 $\mu\text{mol/L}$) 及 $1/2 IC_{50}$ (21 $\mu\text{mol/L}$) 浓度的 Asi 进行后续实验。

2.2 Asi 对 U87 细胞增殖活性的影响 与 U87 细胞组比较,Asi-L 组、Asi-H 组 U87 细胞存活率和 EdU 阳性细胞率均降低 ($q/P = 8.981 / < 0.001$ 、 $5.730 / < 0.001$ 、 $34.571 / < 0.001$ 、 $17.540 / < 0.001$) ,ML-098 组 U87 细胞存活率和 EdU 阳性细胞率升高 ($q/P = 4.616 / < 0.001$ 、 $3.344 / 0.007$) ;与 Asi-L 组比较,Asi-H 组 U87 细胞存活率和 EdU 阳性细胞率降低 ($q/P = 12.462 / < 0.001$ 、 $11.458 / < 0.001$) ;与 Asi-H 组比较,Asi-H+ML-098 组细胞存活率和 EdU 阳性细胞率升高 ($q/P = 9.688 / < 0.001$ 、 $10.881 / < 0.001$) ,见表 1。

2.3 Asi 对 U87 细胞凋亡的影响 与 U87 细胞组 (8.17 ± 1.24) % 比较,Asi-L 组 (26.68 ± 3.10) %、Asi-H

表 1 各组 U87 细胞存活率、EdU 阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Tab.1 Comparison of survival rates and EdU cell positivity rate of U87 cells among different groups

组 别	<i>n</i>	细胞存活率	EdU 阳性细胞率
U87 细胞组	6	100.00±0	56.38±4.20
Asi-L 组	6	83.39±4.53 ^a	43.02±3.87 ^a
Asi-H 组	6	55.26±3.17 ^{ab}	21.67±2.42 ^{ab}
ML-098 组	6	112.91±6.85 ^a	64.25±3.95 ^a
Asi-H+ML-098 组	6	74.50±3.69 ^c	37.81±2.71 ^c

注:与 U87 细胞组比较,^a $P < 0.05$;与 Asi-L 组比较,^b $P < 0.05$;与 Asi-H 组比较,^c $P < 0.05$ 。

组 (42.37 ± 3.98) % 细胞凋亡率均升高 ($q/P = 13.580 / < 0.001$ 、 $20.096 / < 0.001$) ,ML-098 组 (5.25 ± 1.06) % 细胞凋亡率降低 ($q/P = 4.384 / 0.001$) ;与 Asi-L 组比较,Asi-H 组凋亡率升高 ($q/P = 7.618 / < 0.001$) ;与 Asi-H 组比较,Asi-H+ML-098 组 (19.60 ± 2.37) % 细胞凋亡率下降 ($q/P = 12.041 / < 0.001$) 。

2.4 Asi 对 U87 细胞划痕愈合率、侵袭细胞数的影响 与 U87 细胞组比较,Asi-L 组、Asi-H 组 U87 细胞划痕愈合率和侵袭细胞数均降低 ($q/P = 8.490 / < 0.001$ 、 $18.632 / < 0.001$ 、 $9.460 / < 0.001$ 、 $19.852 / < 0.001$) ,ML-098 组划痕愈合率和侵袭细胞数升高 ($q/P = 3.573 / 0.005$ 、 $3.582 / 0.005$) ;与 Asi-L 组比较,Asi-H 组划痕愈合率和侵袭细胞数降低 ($q/P = 10.508 / 0.005$ 、 $10.043 / < 0.001$) ;与 Asi-H 组比较,Asi-H+ML-098 组划痕愈合率和侵袭细胞数升高 ($q/P = 12.734 / < 0.001$ 、 $9.267 / < 0.001$) ,见图 1、表 2。

2.5 Asi 对 U87 细胞 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达的影响 与 U87 细胞组比较,Asi-L 组、Asi-H 组 U87

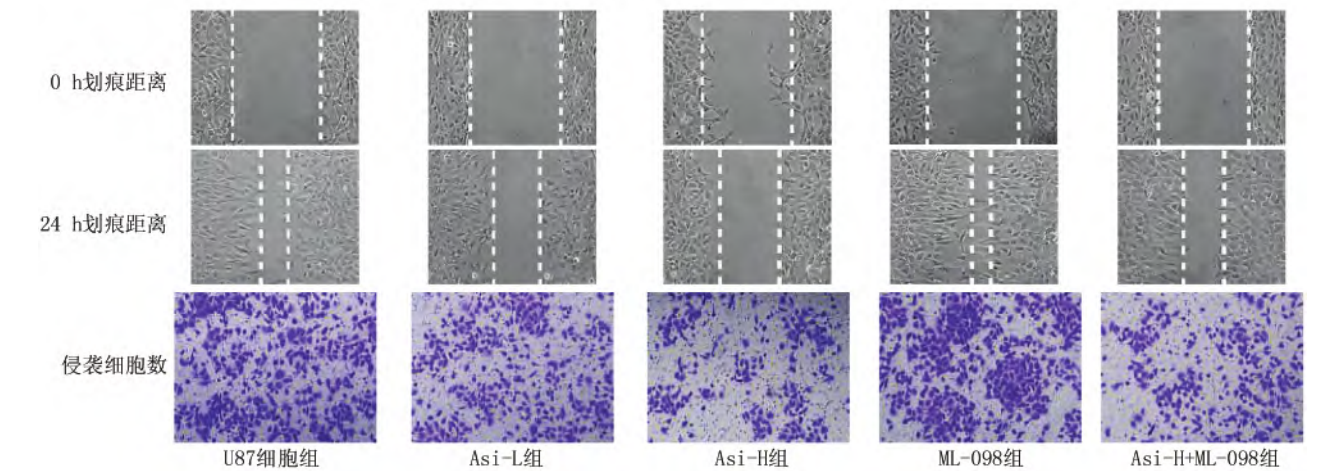


图 1 各组细胞划痕愈合率、侵袭细胞数检测(划痕实验,×100; Transwell 小室实验,×200)
Fig.1 Detection of wound healing rate and invasive cell number in each group

表 2 各组 U87 细胞划痕愈合率、侵袭细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of wound healing rate and number of invasive cells of U87 cells among different groups

组 别	n	划痕愈合率(%)	侵袭细胞数(个)
U87 细胞组	6	70.92±4.01	147.41±8.16
Asi-L 组	6	52.63±3.43 ^a	105.28±7.24 ^a
Asi-H 组	6	33.50±2.85 ^{ab}	68.42±5.33 ^{ab}
ML-098 组	6	79.37±4.18 ^a	166.80±10.45 ^a
Asi-H+ML-098 组	6	56.01±3.26 ^c	99.67±6.31 ^c

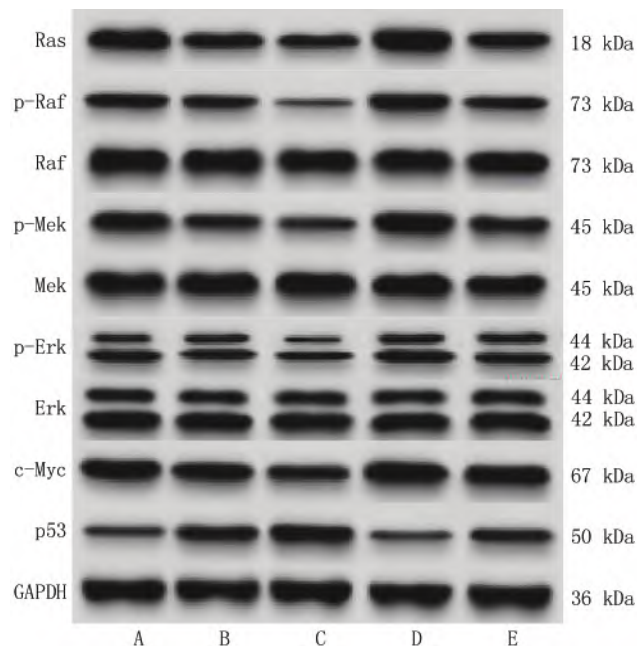
注: 与 U87 细胞组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Asi-L 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 Asi-H 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

细胞 Ras/Raf/Mek/Erk 通路($q/P = 11.437 / < 0.001$ 、 $12.810 / < 0.001$ 、 $13.300 / < 0.001$ 、 $10.119 / < 0.001$, $q/P = 24.434 / < 0.001$ 、 $28.991 / < 0.001$ 、 $23.408 / < 0.001$ 、 $24.033 / < 0.001$) 和 c-Myc 蛋白表达量($q/P = 7.473 / < 0.001$, $19.702 / < 0.001$) 依次降低, p53 蛋白表达量依次升高($q/P = 19.106 / < 0.001$, $27.924 / < 0.001$); 而 ML-098 组通路($q/P = 10.917 / < 0.001$ 、 $9.439 / < 0.001$ 、 $5.852 / < 0.001$ 、 $7.589 / < 0.001$) 和 c-Myc 蛋白表达量升高($q/P = 14.537 / < 0.001$), p53 蛋白表达量降低($q/P = 3.753 / < 0.001$); 与 Asi-H 组比较, Asi-H+ML-098 组通路($q/P = 14.557 / < 0.001$ 、 $18.878 / < 0.001$ 、 $13.832 / < 0.001$ 、 $16.444 / < 0.001$) 和 c-Myc 蛋白表达量($q/P = 14.537 / < 0.001$) 升高, p53 蛋白表达量降低($q/P = 5.435 / < 0.001$), 见图 2、表 3。

2.6 Asi 对裸鼠移植瘤大小的影响 与 Model 组比较, Asi-L 组、Asi-H 组肿瘤质量和体积均减小($q/P = 7.452 / < 0.001$ 、 $4.771 / < 0.001$, $18.398 / < 0.001$ 、 $13.103 / < 0.001$); 与 Asi-L 组比较, Asi-H 组肿瘤质量和体积减小($q/P = 12.369 / < 0.001$ 、 $9.587 / < 0.001$), 见图 3、表 4。

2.7 Asi 对裸鼠肿瘤病理变化的影响 Model 组小鼠肿瘤组织细胞排列密集紊乱, 呈弥漫性分布; Asi-L 组和 Asi-H 组细胞排列密度降低, 细胞核体积缩小、核分裂象减少, 肿瘤细胞恶性表型明显改善, 见图 4。

2.8 Asi 对裸鼠移植瘤 Ki-67、Cleaved caspase 3 蛋白表达的影响 与 Model 组比较, Asi-L 组、Asi-H 组肿瘤组织 Ki-67 阳性率均显著降低($q/P = 4.576 / 0.002$,



注: A. U87 细胞组; B. Asi-L 组; C. Asi-H 组; D. ML-098 组; E. Asi-H + ML-098 组。

图 2 各组 U87 细胞相关蛋白电泳图

Fig.2 Western blot analysis of related protein expression in U87 cells among different groups

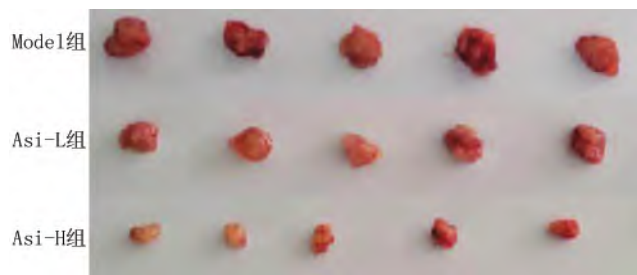


图 3 各组裸鼠移植瘤大小

Fig.3 Transplanted tumor size in nude mice of each group

$16.228 / < 0.001$), Cleaved caspase 3 阳性率均升高($q/P = 10.996 / < 0.001$, $15.244 / < 0.001$); 与 Asi-L 组比较, Asi-H 组肿瘤组织 Ki-67 阳性率降低($q/P = 9.132 / < 0.001$), Cleaved caspase 3 阳性率升高($q/P = 6.061 / < 0.001$), 见图 5、表 5。

表 3 各组 U87 细胞 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of Ras/Raf/Mek/Erk pathway protein expression levels in U87 cells among different groups

组 别	n	Ras	p-Raf/Raf	p-Mek/Mek	p-Erk/Erk	c-Myc	p53
U87 细胞组	6	0.92±0.04	0.65±0.04	0.87±0.04	0.74±0.03	1.15±0.06	0.24±0.03
Asi-L 组	6	0.70±0.05 ^a	0.46±0.03 ^a	0.62±0.04 ^a	0.58±0.04 ^a	0.93±0.04 ^a	0.63±0.04 ^a
Asi-H 组	6	0.45±0.03 ^{ab}	0.22±0.04 ^{ab}	0.43±0.03 ^{ab}	0.36±0.03 ^{ab}	0.57±0.04 ^{ab}	0.81±0.04 ^{ab}
ML-098 组	6	1.13±0.06 ^a	0.79±0.03 ^a	0.98±0.07 ^a	0.86±0.05 ^a	1.28±0.06 ^a	0.16±0.02 ^a
Asi-H+ML-098 组	6	0.73±0.05 ^c	0.50±0.04 ^c	0.69±0.04 ^c	0.62±0.04 ^c	0.95±0.05 ^c	0.52±0.04 ^c

注: 与 U87 细胞组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Asi-L 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 Asi-H 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

表 4 各组裸鼠移植瘤质量、体积比较 (x̄±s)

Tab.4 Comparison of transplanted tumor mass and volume among nude mice in each group

组 别	n	肿瘤质量(g)	肿瘤体积(mm ³)
Model 组	5	1.32±0.09	1286.41±135.07
Asi-L 组	5	0.94±0.07 ^a	925.70±101.64 ^a
Asi-H 组	5	0.43±0.06 ^{ab}	412.37±63.29 ^{ab}

注: 与 Model 组比较, ^aP<0.05; 与 Asi-L 组比较, ^bP<0.05。

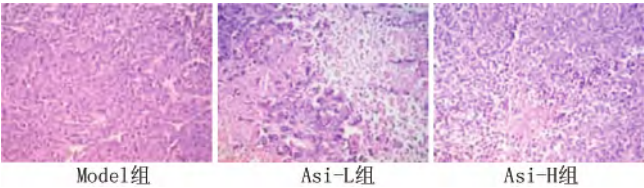


图 4 各组裸鼠肿瘤形态观察(HE 染色,×100)
Fig.4 Tumor morphology observed by HE staining

表 5 各组裸鼠肿瘤组织 Ki-67、Cleaved caspase 3 蛋白阳性表达比较 (x̄±s,%)

Tab.5 Positive expression of Ki-67 and Cleaved caspase 3 proteins in tumor tissues of each group

组 别	n	Ki-67 阳性率	Cleaved caspase 3 阳性率
Model 组	5	61.21±4.32	8.35±1.52
Asi-L 组	5	47.36±5.21 ^a	31.52±4.46 ^a
Asi-H 组	5	22.58±3.11 ^{ab}	52.40±6.28 ^{ab}

注: 与 Model 组比较, ^aP<0.05; 与 Asi-L 组比较, ^bP<0.05。

2.9 Asi 对裸鼠肿瘤组织 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达的影响 与 Model 组比较,Asi-L 组、Asi-H 组肿瘤组织 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达量均下降($q/P=6.519/<0.001$ 、 $5.367/<0.001$ 、 $6.286/<0.001$ 、 $5.534/<0.001$ 、 $18.447/<0.001$ 、 $11.628/<0.001$ 、 $12.655/<0.001$ 、 $12.572/<0.001$); 与 Asi-L 组比较,Asi-H 组肿瘤组织 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达量下降($q/P=6.903/<0.001$ 、 $5.534/<0.001$ 、 $6.708/<0.001$ 、 $7.683/<0.001$), 见图 6、表 6。

3 讨 论

脑胶质瘤的高增殖、迁移侵袭能力是导致临床治

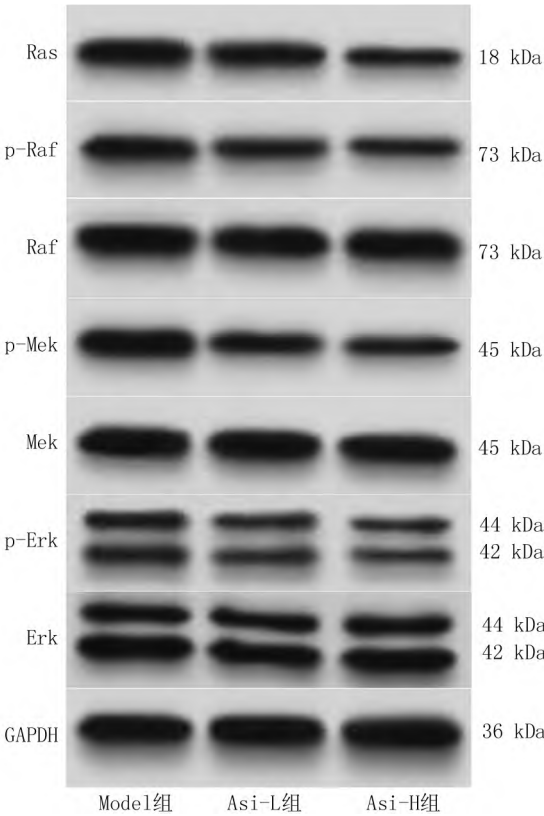


图 6 各组裸鼠肿瘤组织相关蛋白电泳图

Fig.6 Western blot bands of related proteins in tumor tissues of each group

疗失败和预后不良的重要因素^[9]。尽管手术联合放化疗的综合治疗方案已广泛应用,但癌细胞的增殖、迁移等恶性生物学特性仍难以有效控制。Asi 作为从传统中药积雪草中提取的核心活性成分,已在多种肿瘤研究中证实具有抗增殖、抗侵袭的药理活性^[10]。既往研究表明,Asi 可调节肿瘤微环境、提高自然杀伤细胞的抗肿瘤能力,可抑制结直肠癌细胞、食管癌细胞等多种癌细胞的恶性生物学行为,减缓癌症恶性进展^[11-13]。本研究结果显示,Asi 可降低 U87 细胞增殖活性,提示 Asi 对脑胶质瘤细胞增殖具有明显的抑制作用。这一结果与既往 Asi 在肺癌、膀胱癌等肿瘤细胞中的研究结论一致,进一步扩展了 Asi 在脑胶质瘤

表 6 各组裸鼠肿瘤组织 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白表达量比较 (x̄±s)

Tab.6 Comparison of Ras/Raf/Mek/Erk pathway protein expression in tumor tissues among different groups

组 别	n	Ras	p-Raf/Raf	p-Mek/Mek	p-Erk/Erk
Model 组	5	0.87±0.03	0.74±0.03	0.93±0.05	0.82±0.04
Asi-L 组	5	0.70±0.05 ^a	0.62±0.04 ^a	0.75±0.04 ^a	0.68±0.04 ^a
Asi-H 组	5	0.52±0.03 ^{ab}	0.48±0.04 ^{ab}	0.60±0.03 ^{ab}	0.46±0.05 ^{ab}

注: 与 Model 组比较, ^aP<0.05; 与 Asi-L 组比较, ^bP<0.05。

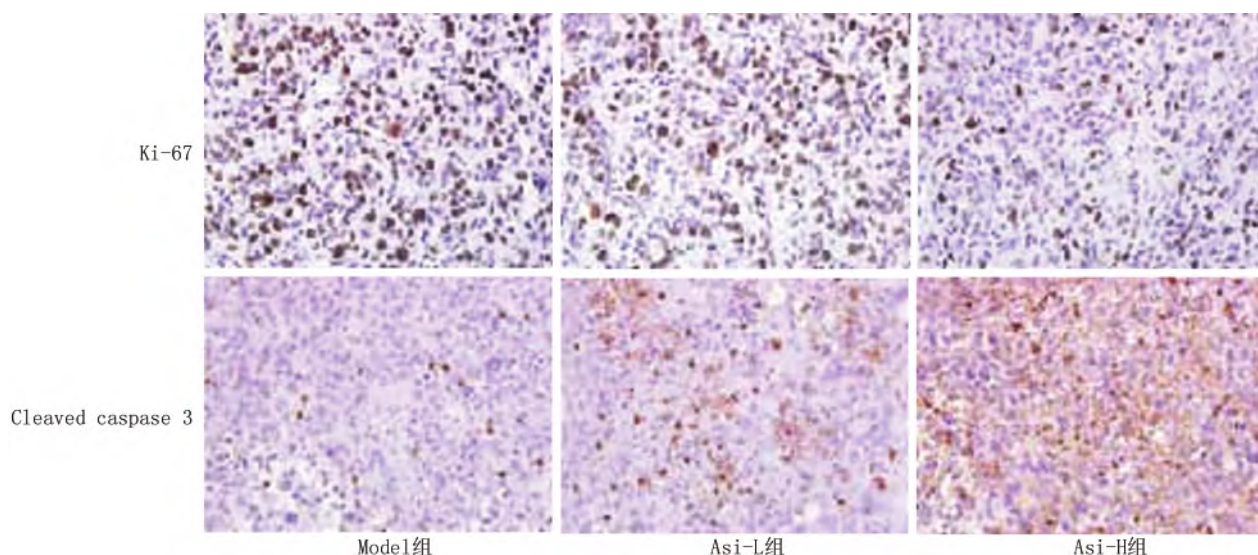


图 5 各组裸鼠 Ki-67、Cleaved caspase 3 蛋白阳性表达(免疫组化,×100)

Fig.5 Positive expression of Ki-67 and Cleaved caspase 3 proteins in each group

中的抗肿瘤作用^[4-13]。此外,本研究进一步从凋亡调控角度验证了 Asi 的抗肿瘤效应,结果显示,Asi 可提高 U87 细胞凋亡率。以上实验结果说明 Asi 可通过抑制增殖、促进凋亡的双重调控模式,实现对肿瘤细胞恶性增殖的遏制。脑胶质瘤细胞的强迁移与侵袭能力是导致肿瘤浸润性生长、手术无法彻底切除及术后复发的主要原因^[14]。本研究结果显示,Asi 可降低 U87 细胞的迁移和侵袭活性,体现出 Asi 对脑胶质瘤细胞迁移侵袭类型的调控作用。与以往研究 Asi 在其他癌症中的作用效果相同^[17]。以上结果提示,若 Asi 能用于临床用药,可能有利于缩小肿瘤的浸润范围,为手术切除创造更有利的条件;同时减少肿瘤细胞数量,降低术后复发风险。

Ras/Raf/Mek/Erk 通路作为 MAPK 信号通路的核心分支,在癌症中多呈异常激活状态,通过促进肿瘤细胞的恶性生物学行为,成为驱动癌症进展的关键分子机制^[18-19]。研究显示,Ras/Raf/Mek/Erk 通路在脑胶质瘤中常呈异常激活并促进肿瘤的恶性进展^[20]。该通路的持续激活可通过调节 c-Myc 和 p53 的表达,从而协同增强肿瘤细胞的恶性表型^[21]。c-Myc 是神经胶质瘤的促癌分子,主要驱动细胞增殖、侵袭并抑制凋亡^[22-23];而 p53 是抑癌分子,核心功能是阻滞细胞周期、诱导凋亡^[24-25]。本研究结果显示,ML-098(激活剂)激活 Ras/Raf/Mek/Erk 通路可加强 U87 细胞的增殖、迁移等恶性生物学行为,说明 Ras/Raf/Mek/Erk 通路的激活促进脑胶质瘤的恶性进展。Asi 可降低 U87 细胞中 Ras/Raf/Mek/Erk 通路及 c-Myc 蛋白表达,提高 p53 蛋白表达,这一调控趋势与 Asi 对 U87 细胞恶性表型的抑制效应高度一致,提示 Asi 可通过抑制

Ras/Raf/Mek/Erk 通路的激活进而抑制 U87 细胞增殖、促进细胞凋亡。为进一步验证通路抑制与 Asi 抗肿瘤效应的因果关系,本研究同时以高剂量 Asi 和 ML-098 干预细胞,结果显示,ML-098 可显著逆转 Asi 对 U87 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用,同时逆转 Asi 对 Ras/Raf/Mek/Erk 通路的下调效应及对 c-Myc、p53 蛋白的调控作用,这一结果进一步证明 Ras/Raf/Mek/Erk 通路是 Asi 发挥抗脑胶质瘤作用的关键靶点。既往研究表明,Asi 可通过调节 TGF- β /SMAD 信号通路抑制三阴性乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[26]。本研究通过 Asi 调控 Ras/Raf/Mek/Erk 通路的作用机制进一步丰富了 Asi 的多靶点抗肿瘤活性。此外,本研究通过裸鼠异种移植瘤模型进一步显示,Asi 干预可显著抑制移植瘤生长,下调移植瘤组织中 Ras/Raf/Mek/Erk 通路蛋白及增殖标志物 Ki-67 的阳性表达,上调凋亡标志物 Cleaved caspase-3 的阳性表达。体内、外实验结果的高度一致性,充分验证了 Asi 抗脑胶质瘤效应的稳定性与可靠性。

4 结 论

综上,本研究证实,Asi 能够有效抑制脑胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡,其作用机制与抑制 Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路的活化密切相关。体外及体内实验共同表明,Asi 通过阻断该通路关键分子的磷酸化,发挥抗胶质瘤作用。本研究为 Asi 作为一种潜在的天然抗肿瘤药物开发及临床转化应用提供了坚实的实验依据与理论支撑。后续研究可采用基因沉默技术和分子对接等方法,进一步明确 Asi 与通路关键靶点的直接结合位点及作用方式;同时深入开

展药代动力学及长期安全性评价,为 Asi 的临床转化提供科学依据。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

杨娇、扈玉华: 设计研究方案,实施研究过程,论文撰写; 徐跃峤、卢文鹏: 提出研究思路,分析实验数据; 周川、玉壮: 课题设计,论文撰写,进行统计学分析; 王曼、何堃宇: 实施研究过程,资料搜集整理,论文修改

参考文献

- [1] Chai X, Zhang Y, Zhang W, et al. Tumor metabolism: A new field for the treatment of glioma [J]. Bioconj Chem, 2024, 35(8): 1116-1141. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.4c00287.
- [2] Song YL, Bi ZF, Liu Y, et al. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials [J]. Genes Dis, 2022, 10(1): 76-88. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.05.006.
- [3] Zhang S, Li J, Jin Q, et al. CAMK2B impacts the proliferation, invasion, and migration of glioma cells via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. Oncol Res, 2025, 33(10): 2961-2979. DOI: 10.32604/or.2025.064300.
- [4] He ZL, Hu YY, Zhang Y, et al. Asiaticoside exerts neuroprotection through targeting NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine, 2024, 127: 155494. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155494.
- [5] Razif R, Fadilah NIM, Ahmad H, et al. Asiaticoside-loaded multi-functional bioscaffolds for enhanced hyperglycemic wound healing [J]. Biomedicines, 2025, 13(2): 277. DOI: 10.3390/biomedicines13020277.
- [6] Guo MM, Ying Y, Chen Y, et al. Asiaticoside inhibits breast cancer progression and tumor angiogenesis via YAP1/VEGFA signal pathway [J]. Heliyon, 2024, 10(18): e37169. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e37169.
- [7] 张小龙, 王军委, 李岩, 等. 车叶草苷调节 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路对肝细胞癌细胞活性及裸鼠移植瘤生长的影响 [J]. 联勤军事医学, 2024, 38(9): 729-734, 757. DOI: 10.13730/j.issn.2097-2148.2024.09.001.
- [8] 刘志超, 党同科, 满高亚, 等. 积雪草苷通过 cAMP/PKA/CREB 信号通路抑制肝细胞癌 Huh7 细胞的恶性生物学行为 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2025, 32(3): 294-300. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.009.
- [9] Gong G, Jiang L, Zhou J, et al. Advancements in targeted and immunotherapy strategies for glioma: Toward precision treatment [J]. Front Immunol, 2025, 15: 1537013. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1537013.
- [10] Al-Saeedi FJ. Asiaticoside increases Caspase-9 activity in MCF-7 cells and inhibits TNF- α and IL-6 expression in nude mouse xenografts via the NF- κ B pathway [J]. Molecules, 2023, 28(5): 2101. DOI: 10.3390/molecules28052101.
- [11] Guo Y, Xu J, Jia Y, et al. Asiaticoside modulates human NK cell functional fate by mediating metabolic flexibility in the tumor micro-environment [J]. Phytomedicine, 2024, 133: 155921. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155921.
- [12] 曹杰, 王海峰, 曲琰, 等. 积雪草苷调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对结肠癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 南开大学学报: 自

然科学版, 2024, 57(2): 15-21.

- [13] 刘双双, 朱正帅, 杨子林, 等. 积雪草苷调节 HIF-1 α /VEGF 信号通路对食管癌细胞上皮-间质转化和放疗敏感性的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2025, 54(2): 150-155. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.02.010.
- [14] Zhang Y, Liu J, Yang G, et al. Asiaticoside inhibits growth and metastasis in non-small cell lung cancer by disrupting EMT via Wnt/ β -Catenin pathway [J]. Environ Toxicol, 2024, 39(11): 4859-4870. DOI: 10.1002/tox.24359.
- [15] Jin M, He K, Zhen S, et al. Asiaticoside enhances the effect of propofol on the invasion, ferroptosis and immune escape of bladder cancer [J]. Drug Dev Res, 2024, 85(6): e22242. DOI: 10.1002/ddr.22242.
- [16] Li Q, Wan C, Zhang Z, et al. CTSC promoted the migration and invasion of glioma cells via activation of STAT3/SERPINA3 axis [J]. Gene, 2024, 893: 147948. DOI: 10.1016/j.gene.2023.147948.
- [17] Zhang Y, Han Y, Dong J, et al. Asiaticoside down-regulates HIF-1 α to inhibit proliferation, migration, and angiogenesis in thyroid cancer cells [J]. Balkan Med J, 2024, 41(1): 23-29. DOI: 10.4274/balkanmedj.galenos.2023.2023-7-123.
- [18] Hendrikse CSE, Theelen PMM, van der Ploeg P, et al. The potential of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) signaling pathway inhibitors in ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. Gynecol Oncol, 2023, 171(5): 83-94. DOI: 10.1016/j.ygyno.2023.01.038.
- [19] Xiao J, Wang W, Dan J. Nalbuphine suppresses leukemia stem cells and acts synergistically with chemotherapy drugs via inhibiting Ras/Raf/Mek/Erk pathway [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(8): 922-928. DOI: 10.2174/1871520623666221213120258.
- [20] Zajac A, Sumorek-Wiadro J, Maciejczyk A, et al. The engagement of Ras/Raf/MEK/ERK and PLC γ 1/PKC pathways regulated by TrkB receptor in resistance of glioma cells to elimination upon apoptosis induction [J]. Neuropharmacology, 2025, 262: 110204. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2024.110204.
- [21] Trejo-Solis C, Castillo-Rodríguez RA, Serrano-García N, et al. Metabolic roles of HIF1, c-Myc, and p53 in glioma cells [J]. Metabolites, 2024, 14(5): 249. DOI: 10.3390/metabo14050249.
- [22] Wang J, Ruan S, Yu T, et al. Upregulation of HAS2 promotes glioma cell proliferation and chemoresistance via c-myc [J]. Cell Signal, 2024, 120: 111218. DOI: 10.1016/j.cellsig.2024.111218.
- [23] 崔旭旭, 刘璐, 张洁. 华蟾素通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路和 EMT 抑制结肠癌侵袭和转移的实验研究 [J]. 疑难病杂志, 2024, 23(12): 1507-1512. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.12.018.
- [24] 黄超, 方兴刚, 陈璐, 等. 益母草碱调节 Akt/MDM2/p53 信号通路对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22(10): 1090-1097. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.10.015.
- [25] Feng YY, Jin X, Pan MX, et al. LRP5 enhances glioma cell proliferation by modulating the MAPK/p53/cdc2 pathway [J]. Int J Med Sci, 2025, 22(4): 990-1001. DOI: 10.7150/ijms.99920.
- [26] Huang X, Jia Z, Li X, et al. Asiaticoside hampers epithelial-mesenchymal transition by promoting PPAR γ expression and suppressing P2RX7-mediated TGF- β /Smad signaling in triple-negative breast cancer [J]. Phytother Res, 2023, 37(5): 1771-1786. DOI: 10.1002/ptr.7692.

(收稿日期: 2025-12-29)