

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.10.015

论著·基础

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

黄超, 方兴刚, 陈璐, 陈汉玉, 陈曾凤



基金项目: 2022 年度湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2022131)

作者单位: 442000 湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院中西医结合科

通信作者: 方兴刚, E-mail: 957336859@qq.com

【摘要】 **目的** 观察益母草碱调节蛋白激酶 B (Akt)/双微体同源基因 2 (MDM2)/p53 信号通路对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 2022 年 3—9 月于湖北省十堰市太和医院实验室进行实验。采用 CCK-8 法测定不同浓度(0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L)益母草碱处理的小鼠脑胶质瘤细胞 GL261 存活率并筛选出其最佳作用浓度。体外培养 GL261 细胞并随机分为对照组、益母草碱组、益母草碱 + SC79 (Akt 激活剂) 组, 以益母草碱 1.6 mmol/L 和 5 μ mol/L 的 SC79 分组处理后, 采用蛋白免疫印记法检测各组细胞 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达; 采用 CCK-8 法、流式细胞术、细胞划痕实验和 Transwell 实验分别检测各组细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭情况。构建颅内胶质瘤小鼠模型 30 只并随机分为对照组、益母草碱低剂量组、益母草碱中剂量组、益母草碱高剂量组及益母草碱高剂量 + SC79 组, 分组处理后以 TUNEL 染色检测各组小鼠颅内胶质瘤细胞凋亡情况; 以免疫印记法检测各组胶质瘤组织 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达。**结果** (1) 细胞实验: 与对照组比较, 益母草碱组细胞凋亡率、p53 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 存活率、迁移率、侵袭数、p-Akt/Akt 与 p-MDM2/MDM2 降低 ($P < 0.05$); 与益母草碱组比较, 益母草碱 + SC79 组细胞凋亡率、p53 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 存活率、迁移率、侵袭数、p-Akt/Akt 与 p-MDM2/MDM2 升高 ($P < 0.05$)。(2) 动物实验: 与对照组比较, 益母草碱组胶质瘤组织细胞凋亡率、p53 蛋白表达升高 ($t/P = 20.076 / < 0.001$ 、 $7.486 / < 0.001$), p-Akt/Akt 与 p-MDM2/MDM2 降低 ($t/P = 11.769 / < 0.001$ 、 $7.579 / < 0.001$); 与益母草碱组比较, 益母草碱 + SC79 组胶质瘤组织细胞凋亡率、p53 蛋白表达降低 ($t/P = 18.328 / < 0.001$ 、 $7.359 / < 0.001$), p-Akt/Akt 与 p-MDM2/MDM2 升高 ($t/P = 9.640 / < 0.001$ 、 $5.529 / < 0.001$)。**结论** 益母草碱可通过抑制 Akt/MDM2/p53 信号而抑制脑胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭及在小鼠体内生长, 并诱导其凋亡, 最终抑制其恶性进展。

【关键词】 脑胶质瘤; 益母草碱; Akt/MDM2/p53; 恶性生物学行为; 小鼠**【中图分类号】** R739.41 **【文献标识码】** A

The effect of Leonurine regulation on the Akt/MDM2/p53 signaling pathway on the malignant biological behavior of glioma cells Huang Chao, Fang Xinggang, Chen Lu, Chen Hanyu, Chen Zengfeng. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taihe Hospital/Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Hubei Province, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Fang Xinggang, E-mail: 957336859@qq.com

Funding program: Guiding Project of Scientific Research Plan of Hubei Provincial Department of Education in 2022 (B2022131)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Leonurine regulated protein kinase B (Akt)/bimicrosomal homologous gene 2 (MDM2)/p53 signaling pathway on the malignant biological behavior of glioma cells. **Methods** The experiment was conducted in the laboratory of Taihe Hospital in Shiyan City, Hubei Province from March to September 2022. The CCK-8 method was used to determine the survival rate of mouse glioma cells GL261 treated with Leonurine at different concentrations (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mmol/L) and screen for their optimal concentration of action. GL261 cells were cultured in vitro and randomly divided into control group, Leonurine group, and Leonurine + SC79 (Akt activator) group, with 1.6 mmol/L Leonurine and 5 μ mol/L SC79 after grouping, protein immunoblotting was used to detect the expression of Akt/MDM2/p53 pathway related proteins in each group of cells; CCK-8 method, flow cytometry, cell scratch assay, and Transwell assay

were used to detect the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of cells in each group. 30 intracranial glioma mouse models were constructed and randomly divided into a control group, a low-dose group of Leonurine, a medium dose group of Leonurine, a high-dose group of Leonurine, and a high-dose + SC79 group of Leonurine. After grouping, the apoptosis of intracranial glioma cells in each group of mice was detected using TUNEL staining; Immunoblotting was used to detect the expression of Akt/MDM2/p53 pathway related proteins in glioma tissues of each group. **Results** (1) Cell experiment: Compared with the control group, the Leonurine group showed an increase in cell apoptosis rate and p53 protein expression ($P < 0.05$), while survival rate, migration rate, invasion number, p-Akt/Akt, and p-MDM2/MDM2 decreased ($P < 0.05$). Compared with the Leonurine group, the Leonurine + SC79 group showed a decrease in cell apoptosis rate and p53 protein expression ($P < 0.05$), while survival rate, migration rate, invasion number, p-Akt/Akt, and p-MDM2/MDM2 increased ($P < 0.05$). (2) Animal experiment: Compared with the control group, the Leonurine group showed an increase in cell apoptosis rate and p53 protein expression in glioma tissue ($t/P = 20.076 / < 0.001, 7.486 / < 0.001$), while p-Akt/Akt and p-MDM2/MDM2 decreased ($t/P = 11.769 / < 0.001, 7.579 / < 0.001$); Compared with the Leonurine group, the Leonurine + SC79 group showed a decrease in cell apoptosis rate and p53 protein expression in glioma tissue ($t/P = 18.328 / < 0.001, 7.359 / < 0.001$), while p-Akt/Akt and p-MDM2/MDM2 increased ($t/P = 9.640 / < 0.001, 5.529 / < 0.001$). **Conclusion** Leonurine can inhibit the proliferation, migration, invasion, and growth of glioma cells in mice by inhibiting Akt/MDM2/p53 signaling, and induce apoptosis, ultimately inhibiting their malignant progression.

【Key words】 Glioma; Leonurine; Akt/MDM2/p53; Malignant biological behavior; Mice

脑胶质瘤是常见的颅内恶性肿瘤,约占全部颅内肿瘤的 50%,在儿童恶性肿瘤中排第二位,临床疗效差,积极开发改进其治疗技术有重要临床价值^[1-2]。蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/双微体同源基因 2 (mouse double minute 2, MDM2)/p53 通路与癌症的发生、恶性进展关系密切,使该信号失活可抑制肝癌、口腔鳞状细胞癌细胞的恶性进展^[3-4],还可抑制神经胶质瘤细胞的增殖、体内生长和运动,延缓神经胶质瘤的发生及恶性进展^[5-6];由此可知 Akt/MDM2/p53 是脑胶质瘤的重要治疗靶点。益母草碱是自中药益母草中分离出的一种抗肿瘤化合物,在前列腺癌、急性髓细胞白血病中均发挥抗癌活性,且抑制 Akt 信号激活是益母草碱发挥抗癌活性的机制之一^[7-8]。因而预测益母草碱可能通过调节 Akt/MDM2/p53 信号通路而介导脑胶质瘤细胞的恶性生物学行为。本研究通过体外培养小鼠脑胶质瘤细胞 GL261 并构建其颅内胶质瘤小鼠模型,对此预测进行验证分析,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 实验动物:雄性 C57BL/6 小鼠 (SPF 级, 7~8 周龄, 体质量 19~22 g) 购自武汉有度生物科技有限公司, 生产许可证号 SCXK (鄂) 2015-0025, 动物饲养及实验操作符合《实验动物管理条例》; GL261 小鼠胶质瘤细胞购自上海雅吉生物科技有限公司。(2) 试剂、试剂: SC79 (Akt 激活剂, 批号 20220806) 购自上海碧云天生物公司; 益母草碱 (批号 111823-201704) 购自安徽新星药物开发有限责任公司; 兔抗小鼠 p-Akt、Akt、p-MDM2、MDM2、p53、Ki67 及甘油醛-

3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗、辣根过氧化物酶标记 (horseradish peroxidase, HRP) 驴抗兔二抗、膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒、结晶紫染色液、免疫组织化学试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒购自赫澎 (上海) 生物科技有限公司。(3) 仪器、设备: JMB-SA 全波长酶标仪购自上海精若科学仪器有限公司; FACS Calibur 全自动流式细胞仪购自上海佐明机械设备贸易有限公司; PH-3DMC 倒置生物显微镜购自微特视界科技 (深圳) 有限公司; HS-4080 全自动冰冻切片仪购自山东欧莱博医疗器械有限公司; PowerPac HV 电泳与转印设备电源、Trans-Blot[®] 小型蛋白转印槽、Mini-PROTEAN Tetra 小型蛋白垂直电泳槽购自美国伯乐公司。

1.2 细胞实验方法 2022 年 3—9 月于湖北省十堰市太和医院实验室进行实验。

1.2.1 筛选益母草碱对 GL261 细胞的最佳药物作用浓度: 解冻复苏购买的冻存小鼠脑胶质瘤细胞 GL261, 以 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清 + 1% 双抗) 培养, 传代后接种在 96 孔板培养 (1×10^4 个/孔), 细胞进入对数生长期后分别以 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L 浓度益母草碱处理 24 h^[9], 以 0 mmol/L 益母草碱处理细胞做对照组, 同时以不接种细胞的培养孔做空白对照组, 每孔细胞加入 CCK-8 试剂 20 μ l 孵育 1.5 h 后, 按 CCK-8 细胞活力检测试剂盒说明书指导测定各组

细胞吸光度,按下式算出各组细胞存活率:存活率 = (益母草碱处理组吸光度 - 空白对照组吸光度) / (0 mmol/L 益母草碱处理组吸光度 - 空白对照组吸光度) × 100%。

1.2.2 分组处理细胞并采集标本:GL261 细胞传代后接种在 12 孔板 (2.5×10^5 个/孔),随机分为对照组、益母草碱组、益母草碱 + SC79 组,细胞进入对数生长期后分组进行处理:益母草碱组细胞以终浓度益母草碱 1.6 mmol/L 处理,益母草碱 + SC79 组细胞以终浓度 1.6 mmol/L 益母草碱和终浓度 5.0 μ mol/L 的 SC79 联合处理^[10],对照组细胞不做处理,24 h 后收集各组细胞备用。

1.2.3 蛋白免疫印记法检测各组 GL261 细胞 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达情况:以 RIPA 裂解液分别提取 1.2.2 中收集的各组 GL261 细胞总蛋白,测出其浓度后沸水浴内加热变性,每组取出 25 μ g 行电泳实验后电转,将其按分子量大小分离后移到硝酸纤维素膜上,封闭其非特异抗原后分别孵育兔抗小鼠 p-Akt (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-MDM2 (1:1 000)、MDM2 (1:1 000)、p53 (1:2 000)、GAPDH (1:2 000) 一抗,洗膜后孵育 HRP 标记驴抗兔二抗 (1:2 000) 进行抗原抗体反应,洗膜后以化学发光法显影,采集各组蛋白条带图像后以 Image J 软件定量其灰度值,按下式算出其相对表达:待测蛋白相对表达 = 待测蛋白灰度值 / 内参 GAPDH 蛋白灰度值。

1.2.4 CCK-8 法检测各组 GL261 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭情况:GL261 细胞传代接种在 96 孔板并按照 1.2.2 中方法分组处理 24 h,采用 CCK-8 法检测各组细胞存活率,具体方法见 1.2.1。

1.2.4.1 流式细胞术检测各组 GL261 细胞凋亡 GL261 细胞传代接种在 12 孔板并按照 1.2.2 中方法分组处理 24 h,收集各组细胞以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤后计数,每组取 5×10^5 个细胞用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒按其说明指导行 FITC 及 PI 双染,洗涤后置于流式细胞仪内检测各组细胞凋亡率。

1.2.4.2 细胞划痕实验检测各组 GL261 细胞迁移 GL261 细胞传代接种在 12 孔板并按照 1.2.2 中方法分组处理 24 h,收集各组细胞 PBS 洗涤、计数后每组取 5×10^6 个细胞接种在 24 孔板培养 10 h,于每孔中央划一条直线后除去划痕内细胞,以倒置生物显微镜拍照后以 Image J 软件定量各组细胞划痕面积 S0h,继续培养 24 h 后再次拍照后定量各组划痕面积 S24h,按下式计算各组细胞迁移率:迁移率 (%) = (S0h -

S24h) / S0h × 100%。

1.2.4.3 Transwell 实验检测各组 GL261 细胞侵袭:GL261 细胞传代接种在 12 孔板并按照 1.2.2 中方法分组处理 24 h,收集各组细胞 PBS 洗涤、以不含胎牛血清的 DMEM 培养基重悬计数后,每组取 5×10^6 个细胞接种在以基质胶包被的 24 孔 Transwell 板上室并同时于下室中加入 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清 + 1% 双抗),培养 24 h 后取下室细胞洗涤、固定、行结晶紫染色、洗涤,以倒置生物显微镜拍照后以 Image J 软件定量各组侵袭到下室的细胞数量,即为各组细胞侵袭数。

1.3 动物实验方法

1.3.1 构建颅内胶质瘤小鼠模型并筛选其益母草碱最佳作用剂量:参考文献[11]构建颅内胶质瘤小鼠模型,取对数生长期的 GL261 细胞,计数后制成密度为 $2 \times 10^5 / \mu$ l 的单细胞悬液,以 4% 戊巴比妥钠 (0.01 ml/g) 腹腔注射麻醉小鼠后俯卧固定在脑立体定位仪上,头顶去毛备皮后分离暴露颅骨,定位矢状缝右 2 mm、前囟前 1 mm 处开骨窗,于小鼠右侧脑尾状核区接种上述细胞悬液 5 μ l,进针深至硬脑膜下 3 mm,缓慢注射后留针 3 min,然后缓慢拔针并缝合伤口,消毒后继续饲养,共造模 33 只,死亡 3 只,成功 30 只,随机数字表法分为对照组、益母草碱低剂量组、益母草碱中剂量组、益母草碱高剂量组、益母草碱高剂量 + SC79 组,每组 6 只,益母草碱低剂量组、益母草碱中剂量组、益母草碱高剂量组小鼠分别以 90、180、360 ng/g 益母草碱 (于造模后 1 d 开始处理,以生理盐水溶解制为 9、18、36 ng/ μ l 的药液,灌胃 10 μ l/g,1 次/d) 灌胃^[12-13];同时腹腔注射生理盐水 10 μ l/g (于造模后 2 周开始处理,1 次/d);益母草碱高剂量 + SC79 组小鼠以益母草碱 360 ng/g (于造模后 1 d 开始处理,以生理盐水溶解制为 36 ng/ μ l 药液,灌胃 10 μ l/g,1 次/d) 灌胃,同时腹腔注射 SC79 40 μ g/g (于造模后 2 周开始处理,以生理盐水溶解制为 4 μ g/ μ l 的药液,注射 10 μ l/g,1 次/d)^[14],至造模后 3 周给药结束。

1.3.2 小鼠颅内胶质瘤细胞增殖:给药结束 24 h 后颈椎脱臼处死各组小鼠,剪下头颅并解剖取出大脑内胶质瘤组织,OCT 包埋后速冻成块,全自动冰冻切片机制片,复温后置于预冷丙酮内固定,以 3% 过氧化氢酶、兔源抗小鼠 Ki67 一抗依次孵育后,采用免疫组织化学试剂盒按其说明指导行免疫组化染色,封片后以倒置生物显微镜采集任意 6 个视野图片,采用 Image J 软件定量各组 Ki67 阳性细胞数和总细胞数后按下式计算其 Ki67 阳性率:Ki67 阳性率 = Ki67 阳性细胞数 /

总细胞数 × 100%。

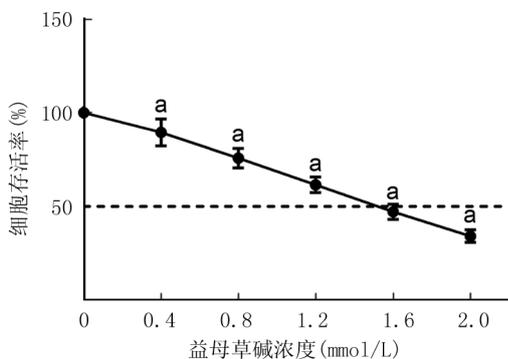
1.3.3 小鼠颅内胶质瘤细胞凋亡情况检测:按 1.3.1 中方法构建颅内胶质瘤小鼠模型 18 只,随机数字表法分为对照组、益母草碱组、益母草碱 + SC79 组,每组 6 只,以 360 ng/g 益母草碱和 40 μg/g 的 SC79 分组处理,具体给药方式见 1.3.3,给药结束 24 h 后颈椎脱臼处死各组小鼠,取颅内胶质瘤组织 0.4 g 置液氮内备用,剩余胶质瘤组织按 1.3.3 中方法做冰冻切片、复温、固定,用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒按其说明指导行 TUNEL 染色,封片后以倒置生物显微镜采集任意 6 个视野图片,采用 Image J 软件定量各组凋亡细胞数和总细胞数后按下式计算其凋亡率:凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

1.3.4 检测各组小鼠颅内胶质瘤组织 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达:取出 1.3.1 中各组小鼠胶质瘤组织分别提取其中总蛋白,进行免疫印迹实验检测其中 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 LSD-*t* 检验;偏态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度益母草碱对 GL261 细胞增殖的影响比较 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L 的益母草碱均可抑制 GL261 细胞增殖,且抑制作用随益母草碱浓度的升高而增强(后续研究选择接近 IC50 值的 1.6 mmol/L 益母草碱),见图 1。

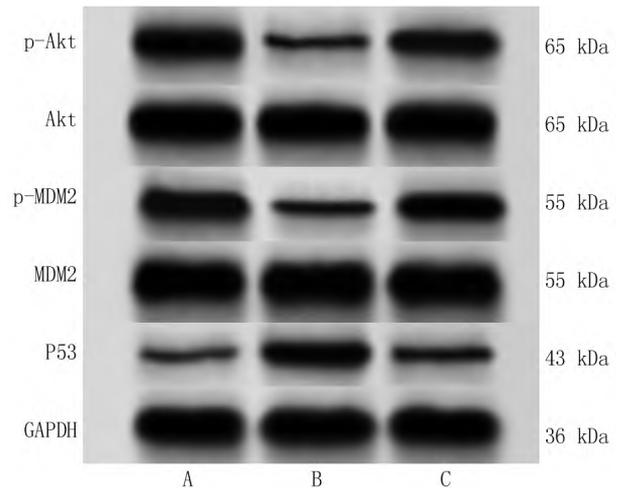


注:与 0 mmol/L 的益母草碱比较, $^a P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度的益母草碱对 GL261 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of Leonurus alkaloids on the survival rate of GL261 cells

2.2 益母草碱对 GL261 细胞 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白的影响比较 与对照组比较,益母草碱组细胞 p-Akt/Akt、p-MDM2/MDM2 降低 ($P < 0.05$), p53 蛋白表达升高 ($P < 0.05$);与益母草碱组比较,益母草碱 + SC79 组细胞 p-Akt/Akt、p-MDM2/MDM2 升高 ($P < 0.05$), p53 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),见图 2、表 1。



注:A. 对照组;B. 益母草碱组;C. 益母草碱 + SC79 组。

图 2 蛋白免疫印迹检测各组 GL261 细胞 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达

Fig. 2 Protein immunoblotting detection of Akt/MDM2/p53 pathway related protein expression in GL261 cells in each group

表 1 各组 GL261 细胞 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Relative expression of Akt/MDM2/p53 pathway related proteins in GL261 cells of each group

组别	n	p-Akt/Akt	p-MDM2/MDM2	p53/GAPDH
对照组	6	0.78 ± 0.14	0.83 ± 0.15	0.19 ± 0.04
益母草碱组	6	0.24 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.09 ^a
益母草碱 + SC79 组	6	0.72 ± 0.12 ^b	0.77 ± 0.16 ^b	0.22 ± 0.05 ^b
F 值		41.936	34.727	106.672
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$;与益母草碱组比较, $^b P < 0.05$ 。

2.3 益母草碱对 GL261 细胞增殖、凋亡、迁移与侵袭的影响比较 与对照组比较,益母草碱组细胞存活率、迁移率与侵袭数降低 ($P < 0.05$), 凋亡率升高 ($P < 0.05$);与益母草碱组比较,益母草碱 + SC79 组细胞存活率、迁移率与侵袭数升高 ($P < 0.05$), 凋亡率降低 ($P < 0.05$),见图 3、图 4、图 5、表 2。

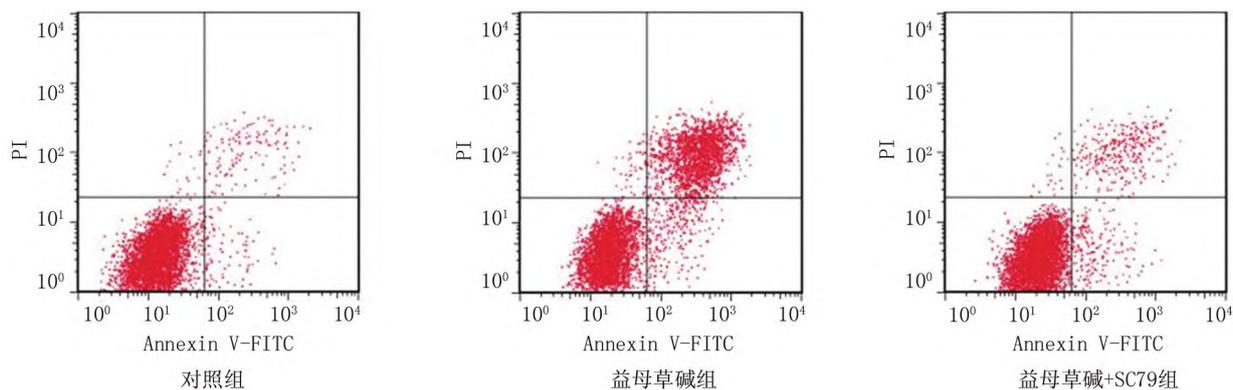


图 3 流式细胞术检测各组 GL261 细胞凋亡

Fig.3 Flow cytometry detection of GL261 cell apoptosis in each group

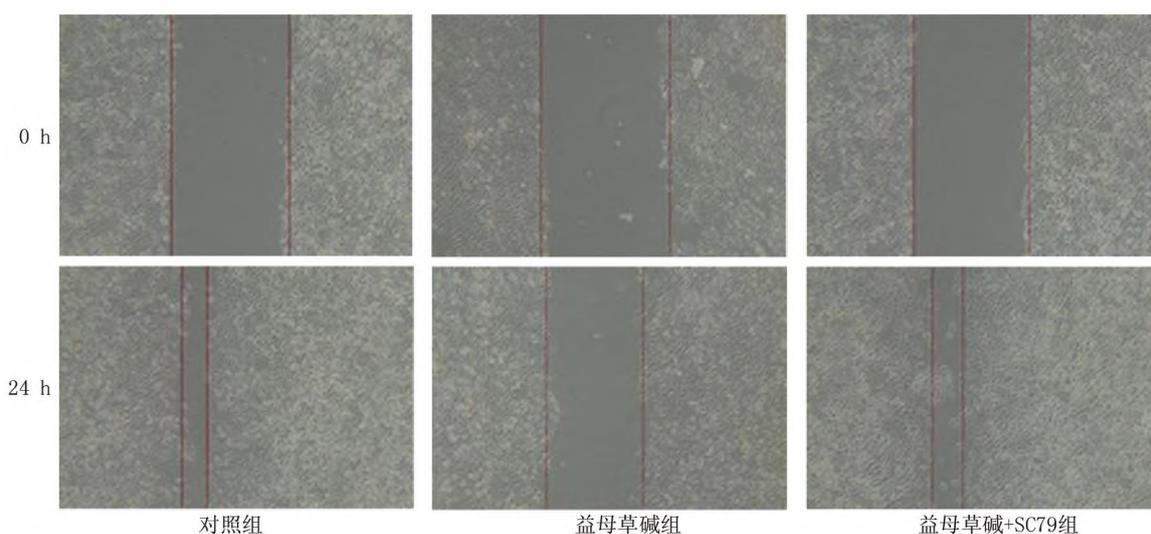


图 4 划痕实验检测各组 GL261 细胞迁移(×200)

Fig.4 Scratch experiment detection of GL261 cell migration in each group(×200)

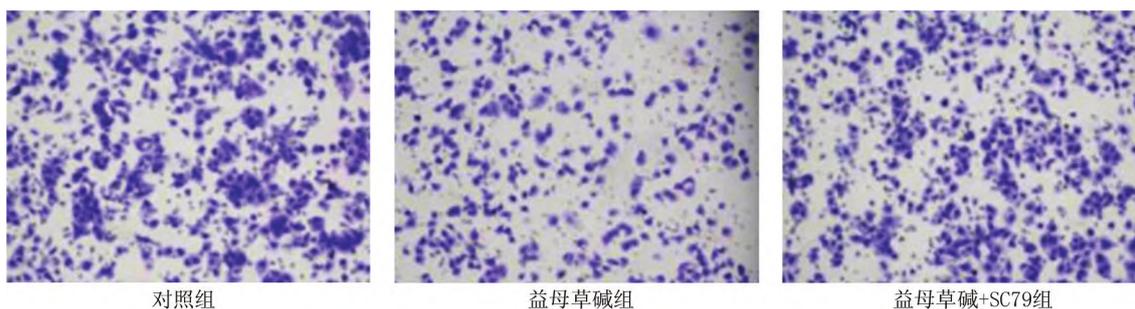


图 5 Transwell 实验检测各组 GL261 细胞侵袭(结晶紫染色, ×200)

Fig.5 Transwell experiment detection of GL261 cell invasion in each group (crystal violet staining, ×200)

2.4 不同剂量益母草碱对小鼠颅内胶质瘤细胞增殖的影响比较 与对照组小鼠颅内胶质瘤 Ki67 阳性率 (65.42 ± 8.83)% 比较,益母草碱低剂量组 (50.14 ±

4.41)%、益母草碱中剂量组 (34.89 ± 3.63)%、益母草碱高剂量组 (19.87 ± 2.04)% 均降低,并呈剂量依赖性 ($F/P = 57.126 / < 0.001$);与益母草碱组比较,益

母草碱 + SC79 组 (59.26 ± 8.12)% 升高 ($t/P = 16.050 / <0.001$), 见图 6。

2.5 益母草碱对小鼠颅内胶质瘤细胞凋亡的影响比较 与对照组小鼠颅内胶质瘤组织细胞凋亡率(5.16 ± 0.87)% 比较, 益母草碱组(40.52 ± 7.13)% 显著升高 ($t/P = 20.076 / <0.001$); 与益母草碱组比较, 益母草碱 + SC79 组 (8.24 ± 2.06)% 显著降低 ($t/P = 18.328 / <0.001$), 见图 7。

2.6 益母草碱对小鼠颅内胶质瘤组织 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白的影响比较 与对照组比较, 益母草碱组胶质瘤组织 p-Akt/Akt、p-MDM2/MDM2 降低 ($P < 0.05$), p53 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与益母草碱组比较, 益母草碱 + SC79 组胶质瘤组织 p-Akt/Akt、

p-MDM2/MDM2 升高 ($P < 0.05$), p53 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 8、表 3。

表 3 各组小鼠颅内胶质瘤组织 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of relative expression of Akt/MDM2/p53 pathway related proteins in intracranial glioma tissues of mice in each group

组别	n	p-Akt/Akt	p-MDM2/MDM2	p53/GAPDH
对照组	6	0.59 ± 0.10	0.66 ± 0.14	0.33 ± 0.06
益母草碱组	6	0.10 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.05 ^a	0.74 ± 0.13 ^a
益母草碱 + SC79 组	6	0.54 ± 0.11 ^b	0.60 ± 0.17 ^b	0.36 ± 0.04 ^b
F 值		58.160	22.071	42.543
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

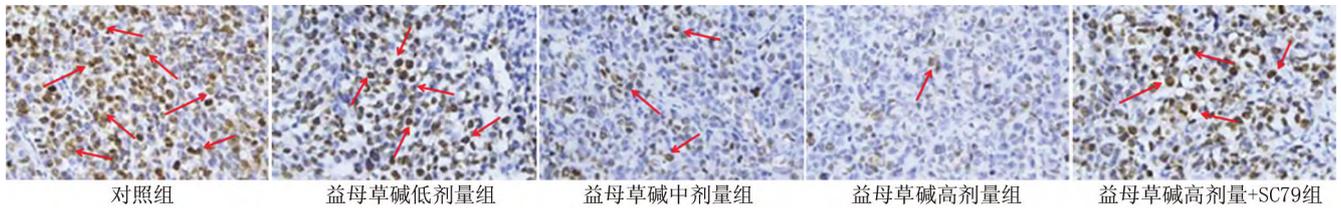
注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与益母草碱组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组 GL261 细胞存活率、凋亡率、迁移率与侵袭数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Survival rate, apoptosis rate, migration rate, and invasion number of GL261 cells in each group

组别	n	存活率(%)	凋亡率(%)	迁移率(%)	细胞侵袭数(个)
对照组	6	100.00 ± 0.00	1.21 ± 0.22	86.22 ± 14.35	264.65 ± 43.68
益母草碱组	6	48.02 ± 6.13 ^a	51.27 ± 8.16 ^a	23.31 ± 3.29 ^a	89.36 ± 15.32 ^a
益母草碱 + SC79 组	6	92.14 ± 15.68 ^b	3.47 ± 1.08 ^b	78.03 ± 16.63 ^b	237.48 ± 50.26 ^b
F 值		49.855	212.209	42.686	34.316
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

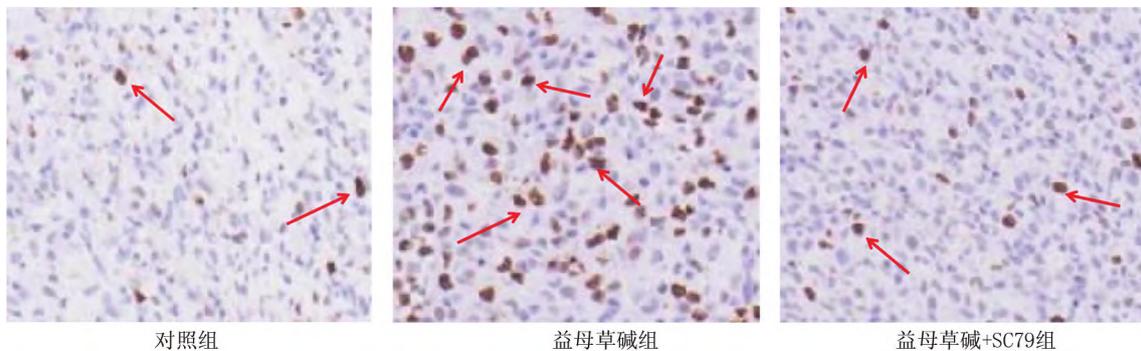
注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与益母草碱组比较, ^b $P < 0.05$ 。



注: 红色箭头表示 Ki67 阳性染色的细胞。

图 6 各组小鼠颅内胶质瘤 Ki67 表达比较 (免疫组化染色, ×200)

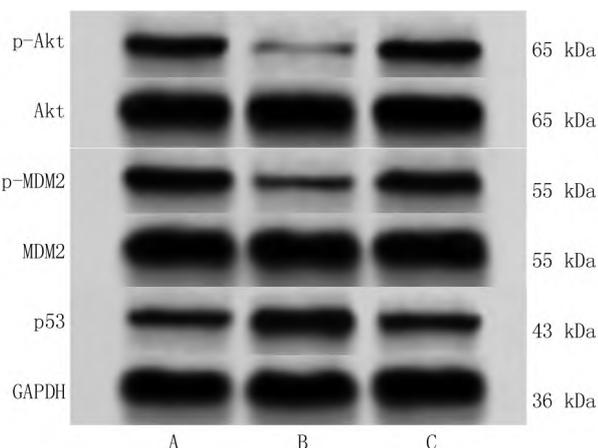
Fig. 6 Ki67 expression in intracranial gliomas of mice in each group (immunohistochemical staining, ×200)



注: 红色箭头表示 TUNEL 阳性染色的凋亡细胞。

图 7 各组小鼠颅内胶质瘤组织细胞凋亡率比较 (TUNEL 染色, ×200)

Fig. 7 Apoptosis rate of intracranial glioma tissue cells in each group of mice (TUNEL staining, ×200)



注:A. 对照组;B. 益母草碱组;C. 益母草碱 + SC79 组。

图 8 蛋白免疫印迹检测各组小鼠颅内胶质瘤组织 Akt/MDM2/p53 通路相关蛋白表达比较

Fig. 8 Protein immunoblotting detection of Akt/MDM2/p53 pathway related protein expression in intracranial glioma tissues of mice in each group

3 讨论

胶质细胞瘤为浸润性生长,与正常脑组织界限不明显,手术治疗难以完全切除,临床中会辅助进行放疗、化疗,虽可延缓病情进展,但复发率高并伴随较大不良反应,因而仍需积极开发新型治疗策略^[15-16]。益母草是我国广泛应用的传统药物,具有较强的抗癌活性^[17]。益母草碱是益母草主要活性成分,研究显示,益母草碱可呈时间和剂量依赖性的方式抑制宫颈癌细胞生长、增殖,并可增强其对顺铂的敏感性^[9];在前列腺癌中,益母草碱可通过促使前列腺癌细胞周期阻滞和凋亡来减轻其恶性生物学行为^[7]。在本研究中,以 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L 益母草碱处理 GL261 细胞均可抑制其增殖,且抑制作用随益母草碱浓度的升高而增强,以 1.6 mmol/L 益母草碱处理 GL261 细胞可升高其凋亡率,并降低其存活率、迁移率、侵袭数,表明益母草碱可抑制脑胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭并促使其凋亡。体内实验显示,90、180、360 ng/g 的益母草碱可降低小鼠胶质瘤组织中 Ki67 阳性表达并呈剂量依赖性,以 360 ng/g 的益母草碱处理颅内胶质瘤模型小鼠可升高胶质瘤组织细胞凋亡率,证实益母草碱可抑制脑胶质瘤细胞在小鼠颅内增殖并诱导其凋亡,揭示益母草碱可减弱脑胶质瘤细胞在体内外增殖活性及促使其凋亡,并可抑制其体外迁移及侵袭,对脑胶质瘤发挥明显抗癌功效。

Akt/MDM2/p53 信号通路可通过调控氧化应激、细胞衰老、DNA 损伤等介导癌症的发生发展^[18]。Akt

磷酸化可促进转录因子 MDM2 的稳定和核易位,从而引发随后的泛素化和肿瘤抑制因子 p53 的降解^[19-20]。据报道,增强 Akt 和 MDM2 磷酸化可降低 p53 表达,驱动致癌物诱导的肺癌、乳头状瘤和肝细胞癌等恶性肿瘤发生^[21]。Zhao 等^[22]发现 Akt/MDM2/p53 参与介导杜鹃酮对肺癌的抗肿瘤过程,Akt 激活剂 SC79 可逆转杜鹃酮对肺癌细胞的抗增殖、促凋亡和促细胞周期阻滞效应。Wang 等^[6]研究证实抑制胶质瘤细胞中的 Akt/MDM2/p53 信号转导可降低胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。此外,Zhuang 等^[8]发现益母草碱在抑制急性髓细胞白血病细胞增殖生长过程中可抑制 Akt 信号激活。本研究结果显示,以 1.6 mmol/L 益母草碱处理 GL261 细胞及其颅内胶质瘤模型小鼠可降低 p-Akt/Akt、p-MDM2/MDM2 并升高 p53 蛋白表达;因而推测益母草碱减轻脑胶质瘤细胞恶性生物学行为可能是通过促使 Akt/MDM2/p53 信号失活实现的。为了验证此推测,本研究以益母草碱和 Akt 激活剂 SC79 联合处理 GL261 细胞及其颅内胶质瘤模型小鼠,结果显示 SC79 可减弱益母草碱对脑胶质瘤细胞增殖、体内生长、迁移、侵袭的抑制作用,消除其对细胞凋亡的促进作用,最终逆转其对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的减轻作用,揭示益母草碱对脑胶质瘤细胞发挥抗癌功效是通过抑制 Akt/MDM2/p53 激活实现的。

综上所述,益母草碱可抑制脑胶质瘤细胞增殖、体内生长、迁移与侵袭,促使其在体内外凋亡,抑制 Akt/MDM2/p53 信号可能是其发挥抗肿瘤作用的机制。本研究证实了益母草碱可作为治疗脑胶质瘤的候选药物,并为其临床应用推广提供了科学依据,有利于开发更有效的脑胶质瘤治疗技术。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

黄超:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;方兴刚:提出研究思路,实施研究过程,分析试验数据,论文修改;陈璐:提出研究思路,分析试验数据,资料搜集整理,论文审核;陈汉玉、陈曾凤:统计学分析,论文修改,论文审核

参考文献

[1] Li G, Li L, Li Y, et al. An MRI radiomics approach to predict survival and tumour-infiltrating macrophages in gliomas [J]. Brain, 2022, 145(3):1151-1161. DOI:10.1093/brain/awab340.

[2] Sioutas G, Nikova A, Birbilis T. Risk factors for pediatric glioma [J]. Folia Med (Plovdiv), 2022, 64(4):566-571. DOI:10.3897/folmed..e64431.

[3] Qi J, Li J, Bie B, et al. miR-3,178 contributes to the therapeutic action of baicalein against hepatocellular carcinoma cells via modulating HDAC10 [J]. Phytother Res, 2023, 37(1):295-309. DOI:10.1002/ptr.7613.

- [4] Mohanty S, Mohapatra P, Shriwas O, et al. CRISPR-based kinome-screening revealed MINK1 as a druggable player to rewire 5FU-resistance in OSCC through AKT/MDM2/p53 axis [J]. *Oncogene*, 2022, 41(45):4929-4940. DOI:10.1038/s41388-022-02475-8.
- [5] Acharya S, Chatterjee S, Chaudhuri S, et al. Akt phosphorylation orchestrates T11TS mediated cell cycle arrest in glioma cells[J]. *Cancer Invest*, 2021, 39(10):854-870. DOI:10.1080/07357907.2021.1986060.
- [6] Wang C, Tu H, Yang L, et al. FOXN3 inhibits cell proliferation and invasion via modulating the AKT/MDM2/p53 axis in human glioma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(17):21587-21598. DOI:10.18632/aging.203499.
- [7] Liang B, Cui S, Zou S. Leonurine suppresses prostate cancer growth in vitro and in vivo by regulating miR-18a-5p/SLC40A1 axis[J]. *Chin J Physiol*, 2022, 65(6):319-327. DOI:10.4103/0304-4920.365459.
- [8] Zhuang Q, Ruan L, Jin T, et al. Anti-leukaemia effects of leonurine in vitro and in vivo[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2021, 40(5):397-407. DOI:10.4149/gpb_2021018.
- [9] Lin M, Pan C, Xu W, et al. Leonurine promotes cisplatin sensitivity in human cervical cancer cells through increasing apoptosis and inhibiting drug-resistant proteins[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:1885-1895. DOI:10.2147/DDDT.S252112.
- [10] Hu D, Meng RY, Nguyen TV, et al. Inhibition of colorectal cancer tumorigenesis by ursolic acid and doxorubicin is mediated by targeting the Akt signaling pathway and activating the Hippo signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(1):11-28. DOI:10.3892/mmr.2022.12898.
- [11] 杨学智, 沈红, 李群, 等. 干扰肿瘤相关巨噬细胞的 P2X4 受体表达可抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(5):658-664. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.05.05.
Yang XZ, Shen H, Li Q, et al. Interfering the expression of P2X4 receptor in tumor-associated macrophages can inhibit the migration and invasion of glioma cells[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2022, 42(5):658-664. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2022.05.05.
- [12] 刘丹, 李志斌, 钟世寿, 等. 益母草冲剂对 III-IV 期宫颈癌放疗患者近期疗效及毒副作用的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(8):1256-1259. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2018.08.027.
Liu D, Li ZB, Zhong SS, et al. Effect of Leonurus infusion on short-term curative effect and toxicity of patients with Stage III-IV Cervical cancer radiotherapy [J]. *Modern Oncology Medicine*, 2018, 26(8):1256-1259. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2018.08.027.
- [13] 朱子聪, 边雨, 高陆, 等. 益母草颗粒 HPLC 指纹图谱及 4 个指标成分含量研究[J]. *中国药房*, 2022, 33(5):586-591. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.13.
Zhu ZC, Bian Y, Gao L, et al. HPLC fingerprint and contents of 4 index components of Leonurus granules [J]. *Chinese Pharmacy*, 2022, 33(5):586-591. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.13.
- [14] Ni RJ, Gao TH, Wang YY, et al. Chronic lithium treatment ameliorates ketamine-induced mania-like behavior via the PI3K-AKT signaling pathway [J]. *Zool Res*, 2022, 43(6):989-1004. DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2022.278.
- [15] Miller JJ. Targeting IDH-Mutant Glioma [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(6):1724-1732. DOI:10.1007/s13311-022-01238-3.
- [16] 段升强, 乔建新, 徐新文, 等. 脑胶质瘤组织中 miR-4744、RIOK2 表达及其对患者预后的预测价值[J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(6):613-619. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.06.010.
Duan SQ, Qiao JX, Xu XW, et al. Expression of miR-4744 and RIOK2 in brain glioma and their prognostic value in patients with glioma [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2023, 22(6):613-619. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.06.010.
- [17] Lee J, Kim C, Lee H, et al. Inhibitory effects of standardized leonurus japonicus extract and its bioactive leonurine on TNF- α -induced muscle atrophy in L6 myotubes [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(12):1896-1904. DOI:10.4014/jmb.2005.05023.
- [18] 于雅勤, 沈加熙, 张虹. 梔子苷对结直肠癌细胞增殖和凋亡及 Akt/MDM2/p53 通路的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2022, 32(1):5-10. DOI:10.1360/zc1998-28-4-366.
Yu YQ, Shen JX, Zhang H. Effects of gardenoside on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells and Akt/MDM2/p53 pathway [J]. *Zhejiang Journal of Integrated Chinese and Western Medicine*, 2022, 32(1):5-10. DOI:10.1360/zc1998-28-4-366.
- [19] 艾孜提艾力·艾海提, 阿克拜尔·买买提, 木合布力·阿布力孜. 一种新型 α -甲基查尔酮的制备、抗宫颈瘤活性及对 Akt-MDM2-p53 信号通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(7):1399-1400. DOI:10.1360/zc2002-32-3-256.
Aizitili A, Eikbel M, Muhebli A. Preparation of a novel α -methylchalcone, its anti-cervical cancer activity and its effect on Akt-MDM2-p53 signaling pathway [J]. *Chinese Pharmacology Bulletin*, 2023, 39(7):1399-1400. DOI:10.1360/zc2002-32-3-256.
- [20] 苏瑞, 李循, 王书恒, 等. Hes1 调控 AKT-MDM2-p53-PTEN 通路的一种物理机制 [J]. *原子与分子物理学报*, 2024, 41(5):131-140. DOI:10.19855/j.1000-0364.2024.056002.
Su R, Li X, Wang SH, et al. A physical mechanism of Hes1 regulating AKT-MDM2-p53-PTEN pathway [J]. *Chinese Journal of Atomic and Molecular Physics*, 2024, 41(5):131-140. DOI:10.19855/j.1000-0364.2024.056002.
- [21] Chibaya L, Karim B, Zhang H, et al. Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(4):e2003193118. DOI:10.1073/pnas.2003193118.
- [22] Zhao Y, Cai J, Shi K, et al. Germacrone induces lung cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via the Akt/MDM2/p53 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6):452-460. DOI:10.3892/mmr.2021.12091.

(收稿日期:2023-05-05)