

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.007

· 基础研究 ·

## 藤黄酸通过抑制 GLUT-3/AKT 信号通路增强神经胶质瘤 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性

李磊, 刘蕊, 苗成(新乡市中心医院 神经内科, 河南 新乡 453000)

**[摘要]** **目的:** 探索藤黄酸是否能够增强神经胶质瘤 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性, 并进一步探索其增敏机制。 **方法:** 体外培养 U251 细胞, 并分成空白对照组、藤黄酸单独处理组、替莫唑胺单独处理组和联合处理组; 利用 CCK-8 实验检测各组细胞存活率, 利用流式细胞术检测细胞凋亡情况和 ROS 水平变化情况, 利用 Western blotting 实验检测相关蛋白表达量变化情况。 **结果:** CCK-8 法实验中, 四组细胞处理 24 h 后存活率依次为 (98.65±3.68)%、(93.58±2.47)%、(66.81±2.39)% 和 (38.65±4.13)%, 可以看出联合处理组能够大幅提高对替莫唑胺对 U251 细胞增殖的抑制作用 ( $P<0.01$ ); 联合处理组 U251 细胞凋亡比例为 (61.43±2.58)%, 与替莫唑胺单独处理组的 (26.68±1.82)% 相比明显增加 ( $P<0.01$ ); 藤黄酸和替莫唑胺共同处理后能够上调 U251 细胞 ROS 水平和降低 GLUT-3 和 p-AKT 的表达, 抑制 GLUT-3/AKT 信号通路 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。 **结论:** 藤黄酸与替莫唑胺联用能够通过上调 U251 细胞中的 ROS 水平、抑制 GLUT-3 和 AKT 信号通路而增强 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性。

**[关键词]** 神经胶质瘤; U251 细胞; 藤黄酸; 替莫唑胺; 活性氧; GLUT-3/AKT 信号通路

**[中图分类号]** R739.4; R730.53; R730.58 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)08-0879-05

## Gambogic acid enhances sensitivity of glioma U251 cells to temozolomide by inhibiting GLUT-3/ AKT signaling pathway

LI Lei, LIU Rui, MIAO Cheng (Department of Neurology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore whether gambogic acid can enhance the sensitivity of glioma U251 cells to temozolomide and further explore its mechanism. **Methods:** U251 cells were cultured *in vitro* and divided into blank control group, gambogic acid treatment group, temozolomide alone treatment group and combined treatment group. The cells survival rates of cells in each group was detected by CCK-8 assay. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis and changes in ROS level. Western blotting was used to detect the changes in protein expressions. **Results:** CCK-8 results showed that the cells survival rates of the four groups after treatment for 24 h were (98.65±3.68)%, (93.58±2.47)%, (66.81±2.39)% and (38.65±4.13)%, respectively. It can be seen that the combined treatment could significantly increase the inhibitory effect of temozolomide on U251 cells. The proportion of apoptotic U251 cells in the combined treatment group was (61.43±2.58)%, which was significantly higher than that of (26.68±1.82)% in the temozolomide-treated group. Combined treatment of gambogic acid and temozolomide could up-regulate ROS level in U251 cells, reduce the expressions of GLUT-3 and p-AKT, and inhibit the GLUT-3/AKT signaling pathway. **Conclusion:** Gambogic acid combined with temozolomide can enhance the sensitivity of U251 cells to temozolomide by up-regulating ROS level and inhibiting GLUT-3/AKT signaling pathway in U251 cells, and provides a theoretical basis for the application of gambogic acid in the treatment of glioma.

**[Key words]** glioma; U251 cell; gambogic acid; temozolomide; reactive oxygen species; GLUT-3/AKT signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(8): 879-883. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.08.007]

神经胶质瘤是发生在颅内的恶性肿瘤, 其发病率占所有颅内肿瘤的四成以上, 其增殖侵袭能力极强、复发率和病死率极高, 对人类的健康和生命带来了极大的威胁<sup>[1-2]</sup>。在临床的神经胶质瘤治疗中多采用手术切除加全身化疗的方案。替莫唑胺 (temozolomide, TEM) 是近十年来被开发出来的口服 DNA 烷化剂, 对胶质瘤细胞的 DNA 片段进行破坏性修饰, 进而诱导神经胶质瘤细胞凋亡<sup>[3]</sup>。替莫唑胺具有“口服给药、完全吸收、完全利用、组织分布良好、毒副作用

用较小”等特点, 一定程度上改善了神经胶质瘤患者的生存状况, 成为了目前治疗恶性神经胶质瘤的首选治疗药物, 但是替莫唑胺的治疗效果会随着多种

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 201672182)。Project supported by National Natural Science Foundation of China (201672182)

**[作者简介]** 李磊 (1973-), 男, 学士, 副主任医师, 主要从事神经内科疾病研究

**[通信作者]** 李磊 (LI Lei, corresponding author), E-mail: Lilei73@163.com

因素而逐渐降低,因此提高替莫唑胺化疗有效率,增强神经胶质瘤细胞对替莫唑胺的敏感性,在神经胶质瘤的治疗中起着至关重要的作用。

中药及其活性成分运用于抗肿瘤治疗具有不良反应小、价格低廉、易于被患者接受等特点,已广泛被作为化疗的辅助治疗手段。藤黄酸是一种常见中药,藤黄酸(gambogic acid, GAM)是其主要的活性成分,大量研究揭示了藤黄酸通过调控若干条信号通路,对多种肿瘤细胞具有较强的靶向性,具有较强的抗肿瘤活性<sup>[4-5]</sup>。本研究观察藤黄酸处理对替莫唑胺抑制人脑胶质瘤细胞增殖及诱导凋亡作用的影响,探讨单纯替莫唑胺给药组与替莫唑胺联合藤黄酸共同处理组作用于胶质瘤细胞所产生效果的区别,并进一步探索其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与试剂

人神经胶质瘤U251细胞系购自于中国科学院细胞研究所。藤黄酸购自成都维克奇生物科技有限公司,胎牛血清、DMEM培养液均购自美国Hyclone公司,CCK-8试剂盒、AnnexinV/PI试剂盒及DCFH-DA均购自上海碧云天生物公司,活性氧(ROS)清除剂N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)购自北京百奥莱博科技有限公司;所有一抗抗体、辣根过氧化酶山羊抗鼠和抗兔的二抗均购自美国Santa公司,全蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养与实验分组

人神经胶质瘤U251细胞用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素的DMEM培养液置于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养。藤黄酸以DMSO溶解,配制浓度为40 μmol/L;替莫唑胺的浓度为30 μmol/L。实验分为DMSO对照组、藤黄酸组、替莫唑胺组和藤黄酸联合处理组。

### 1.3 CCK-8法检测藤黄酸与替莫唑胺联用对U251细胞增殖的影响

按照每孔中细胞数约为1×10<sup>4</sup>个,将生长状态良好的U251细胞接种至96孔板,待细胞贴壁生长24 h后分组加药,对照组加DMSO,藤黄酸组加40 μmol/L的藤黄酸,替莫唑胺加入30 μmol/L的替莫唑胺,联合处理组加40 μmol/L的藤黄酸和30 μmol/L的替莫唑胺,每组设8个复孔。处理0、3、6、12、24 h后,将10 μl CCK-8试剂加入孔中并在37℃下孵育2 h。随后,通过酶标仪在450 nm处测量光密度(D)值,计算U251细胞各个时间段的细胞存活率并绘制细胞存活率曲线。

### 1.4 流式细胞术检测藤黄酸与替莫唑胺联用对神经

### 胶质瘤U251细胞凋亡的影响

同上分组,分别处理U251细胞3、6、12和24 h后,收集细胞并经过PBS清洗后,利用碧云天Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,加入195 μl的Annexin V-FITC结合液重悬细胞,再加入3 μl Annexin V-FITC与2 μl PI,室温避光孵育15 min,每组加入300 μl PBS,转移至流式管后流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复3次,验证U251细胞的凋亡情况。

### 1.5 流式细胞术检测藤黄酸与替莫唑胺联用对神经胶质瘤U251细胞中ROS水平的影响

同上分组,收集处理完细胞后,弃去上清后PBS洗涤1次。加10 μmol/L的DCFH-DA,37℃恒温水浴锅中避光孵育30 min, PBS洗涤1次,500 μl PBS重悬细胞,转移至流式管后上流式细胞仪检测细胞的ROS水平。

### 1.6 Western Blotting检测细胞周期和凋亡相关蛋白的表达

分组与处理同1.3,收集细胞于离心管中,用蛋白试剂盒提取蛋白。每孔上样20 μg。10%~12%的SDS-PAGE分离蛋白质,并通过半干电转方式将其转移至硝酸纤维素膜上。脱脂乳(5%)封闭1.5 h后, TBST洗涤5次(5 min/次)。加入与细胞凋亡及细胞周期相关的一抗(稀释比例为1:2 000),4℃摇床孵育过夜。将对应一抗回收, TBST洗涤5次(5 min/次),加入对应二抗(HRP标记山羊抗兔及抗鼠IgG),室温摇床孵育1.5 h后, TBST洗涤5次(5 min/次),利用ECL化学发光显色剂进行显色,再通过化学发光成像系统进行拍照。内参选择α-tubulin,并利用ImageJ 1.42q软件对所出条带进行灰度分析。

### 1.7 统计学处理

利用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计学分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞增殖抑制率、细胞凋亡率、细胞各周期细胞变化情况及细胞中凋亡、周期相关蛋白表达量的组间比较采用独立样本t检验,以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

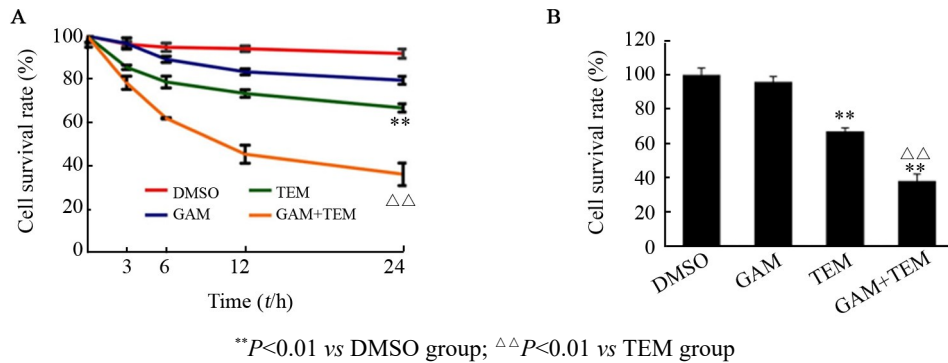
## 2 结果

### 2.1 藤黄酸与替莫唑胺联用对U251细胞增殖的抑制作用

如图1A所示,藤黄酸、替莫唑胺及两者共同处理组的存活率随着处理时间的延长均呈现降低的趋势,并且共同处理组的降低趋势更为明显。处理24 h后的细胞存活率如图1B,藤黄酸单独处理组中U251细胞的存活率与DMSO对照组相比没有差异,表明藤黄酸对U251细胞增殖几乎没有明显的抑制作用;

在替莫唑胺处理组中, U251 细胞的存活率为 (67.58±2.31)%, 与空白对照组相比差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ); 在联合处理中, U251 细胞的存活率降

低至 (38.47±2.78)%, 与替莫唑胺单独处理组相比差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。结果说明藤黄酸能够协同加强替莫唑胺对 U251 细胞增殖的抑制作用。



A: Survival curves of cells at different treatment times in each group; B. Cell survival rate of each group after 24 h treatment

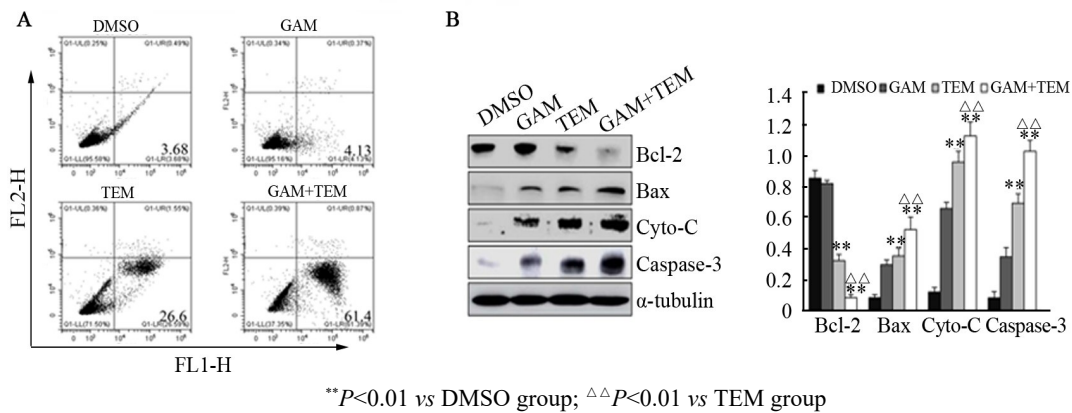
图1 藤黄酸增强替莫唑胺对 U251 细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Gambogic acid enhanced the inhibitory effect of temozolomide on proliferation of U251 cells

### 2.2 藤黄酸与替莫唑胺联用对 U251 细胞的诱导凋亡作用

如图 2A 所示, 藤黄酸单独处理组没有引起 U251 细胞的凋亡; 替莫唑胺处理组凋亡细胞的比例为 (26.6±2.18)%; 在联合处理中, U251 凋亡率上升至 (61.4±3.14)%, 与替莫唑胺单独处理组相比, 差异具有明显的统计学意义 ( $P<0.01$ )。同时对凋亡相关蛋

白进行了检测, 从实验结果图 2B 中可以看出, 替莫唑胺单独处理组和联合处理组处理后, Bcl-2 表达水平降低, Bax、Cytochrome C、Caspase-3 表达量升高; 将替莫唑胺单独处理组和联合处理组进行对比, 两组之间 4 种蛋白表达水平的差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。



A: Apoptosis ratio of each group; B. Changes in expression of apoptosis-related proteins in each group

图2 藤黄酸增强替莫唑胺对 U251 细胞的诱导凋亡作用

Fig.2 Gambogic acid enhanced the apoptosis induction of temozolomide on U251 cells

### 2.3 藤黄酸能与替莫唑胺协同加强对 ROS 的调节作用

如图 3A 所示, 联合处理组中细胞中的 ROS 水平升高, 替莫唑胺单独处理组和藤黄酸单独处理组中 ROS 水平都没有变化。随后在共同处理组中加入了 ROS 清除剂 NAC 后检测凋亡情况, 可以观察到联合处理组中的细胞凋亡水平 (图 3B) 又恢复到与图 2A 中替莫唑胺单独处理组相接近。结果说明, 藤黄酸与替莫唑胺联用可增加 ROS 水平, 而 ROS 水平的升

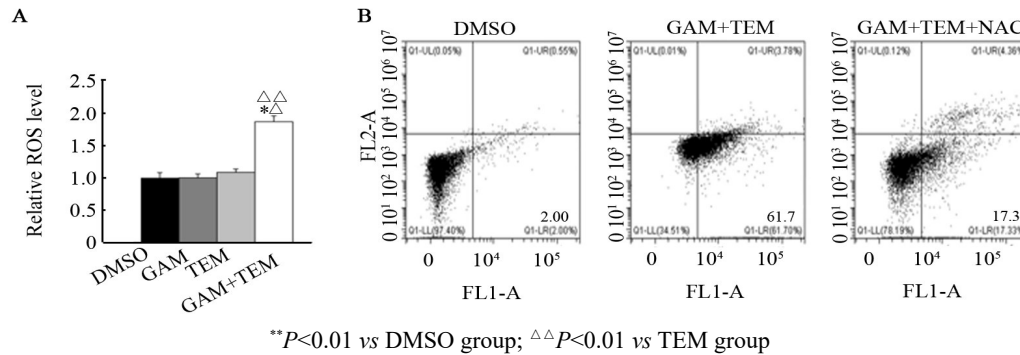
高是诱导细胞凋亡的重要因素之一。

### 2.4 藤黄酸能与替莫唑胺协同加强对 AKT 和 GLUT-3 信号通路的调控作用

结果图 4A 显示, 藤黄酸单独作用对 p-AKT 和 GLUT-3 通路均无影响 ( $P>0.05$ ), 替莫唑胺单独作用能抑制 p-AKT 和 GLUT-3 通路; 当藤黄酸和替莫唑胺联合作用时, 藤黄酸可协同加强替莫唑胺对该两条通路的抑制作用 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 而在两药联合

中再加入 NAC 时,可以使该两条通路恢复到接近 DMSO 对照组的水平,从这些结果可以看出藤黄酸

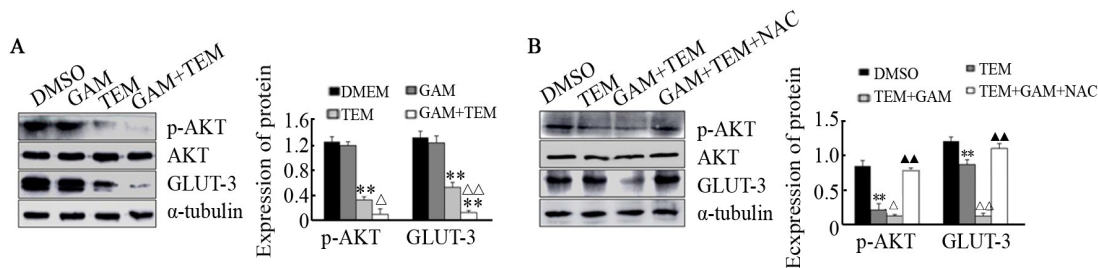
对替莫唑胺的协同作用是通过上调细胞中 ROS 水平而发挥的。



A: Comparison of ROS level in cells of each group; B. NAC blocked the synergistic effect of gambogic acid and temozolomide

图3 藤黄酸与替莫唑胺联用能够增加 U251 细胞中的 ROS 水平

Fig.3 Gambogic acid combined with temozolomide increased ROS level in U251 cells



\*\*P<0.01 vs DMSO group; ΔP<0.05, ΔΔP<0.01 vs TEM group; ▲▲P<0.01 vs TEM+GAM group

A: Effects of gambogic acid and temozolomide on p-AKT/GLUT-3 pathway;

B. NAC blocked the regulation of gambogic acid and temozolomide on p-AKT/GLUT-3 pathway

图4 藤黄酸与替莫唑胺联用能够抑制 U251 细胞中的 AKT/GLUT-3 信号通路

Fig.4 Gambogic acid combined with temozolomide inhibited AKT/GLUT-3 signaling pathway in U251 cells

### 3 讨论

神经胶质瘤的病死率极高,手术后的辅助化疗是抑制神经胶质瘤的复发和病灶转移中的关键,但化疗药物通常会表现出性耐受性差异,因此增加细胞对化疗药物的敏感性,对提高化疗药物的疗效十分重要<sup>[6-8]</sup>。替莫唑胺是一种临床上治疗肿瘤的常用烷化剂,通过诱导胶质瘤细胞的凋亡发挥抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。藤黄酸是中药藤黄的有效物质,在体内外对肝癌、肺癌等多种癌症细胞具有杀伤作用,对正常细胞和正常的造血系统没有明显的毒副作用<sup>[10-11]</sup>。本实验研究了藤黄酸是否能够增强替莫唑胺的抗神经胶质瘤活性,结果显示藤黄酸单独处理不能抑制 U251 细胞的增殖,联合处理组的增殖抑制效果却远超过替莫唑胺单独处理组的效果,可以初步看出藤黄酸能够增强神经胶质瘤 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性。

凋亡过程分为线粒体依赖性凋亡和线粒体非依赖性凋亡,整个过程是否通过线粒体是区分两条通

路的关键。Cytochrome C 是一个线粒体起源的细胞凋亡信号,具有调节能量代谢和调节细胞凋亡的功能,是线粒体凋亡信号通路的关键调控蛋白之一<sup>[12]</sup>。Bcl-2 蛋白家族具有调控 Cytochrome C 释放的功能, Cytochrome C 从线粒体的释放后可以激活 Caspase 级联反应,引发线粒体依赖性凋亡的发生<sup>[13]</sup>。有研究显示,替莫唑胺发挥抗癌作用是通过诱导胶质瘤细胞线粒体依赖性凋亡来实现的。本实验结果同样证明替莫唑胺能够诱导 U251 细胞凋亡,当藤黄酸和替莫唑胺共同处理后,细胞凋亡率较替莫唑胺单独处理上升 35% 左右;并发现 Bcl-2 水平降低, Bax、Cytochrome C、Caspase-3 表达量升高,与替莫唑胺单独处理组相比差异具有统计学意义。因此可以推断,藤黄酸能够增强替莫唑胺对神经胶质瘤 U251 细胞的诱导凋亡作用。

有研究<sup>[14]</sup>表明,癌细胞中的 ROS 水平高于正常细胞,但当癌细胞中的 ROS 水平超过一定范围后会激活细胞中的多条信号通路及多个信号分子。从本

实验结果中可以看出,当替莫唑胺和藤黄酸分别单独处理 U251 细胞后,细胞中的 ROS 水平与对照组相比没有显著性差异,但是当两者一起联用处理后细胞中的 ROS 水平明显上升;当在联合组中加入 ROS 清除剂 NAC 之后,凋亡细胞率降低到和替莫唑胺单独处理组相近的水平,因此可认为共同处理组是通过上调 ROS 水平进而增强替莫唑胺的诱导凋亡作用。

恶性肿瘤组织比正常组织葡萄糖代谢水平显著升高,癌细胞对葡萄糖的摄取量十分巨大,因此癌细胞中的葡萄糖转运体要多于正常细胞。GLUT-3 是细胞转运葡萄糖的载体,抑制 GLUT-3 的表达能够抑制细胞对葡萄糖的摄取。研究<sup>[15]</sup>表明, GLUT-3 在多种实体瘤中超量表达,是一种潜在的肿瘤细胞标志物,虽然目前针对 GLUT-3 蛋白在神经胶质瘤细胞中的研究较少,但其值得进一步探索。AKT 通路是体内重要的生长因子通路,同时也是线粒体凋亡通路和 PI3K/AKT 通路的关键点,可通过磷酸化或与细胞死亡因子相互作用直接或间接调控细胞凋亡,是细胞凋亡中经典的信号通路。藤黄酸和替莫唑胺单独处理组中, GLUT-3 的表达量同对照组没有区别,但是当两者联用后 GLUT-3 的表达量降低,在加入 NAC 之后,其表达又上升到原来的水平;同时替莫唑胺单独处理组能够降低 p-AKT 的表达,而且在共同处理组中降低的水平更低;在加入 NAC 之后, p-AKT 的表达上升到替莫唑胺单独处理的水平。因此可以推断,藤黄酸与替莫唑胺联用能够上调 U251 细胞中的 ROS 水平,抑制 U251 细胞中 GLUT-3 和 p-AKT 的表达进而增强替莫唑胺对 U251 细胞的诱导凋亡能力。有研究<sup>[16]</sup>表明, AKT 通路对大鼠缺氧缺血皮质神经元细胞 GLUT-3 蛋白的总量没有影响,但是 AKT 信号通路影响着 GLUT 在细胞中的转位。因此, GLUT-3 和 AKT 信号通路之间是否存在上下游的关系还需要在以后的研究中进一步的探究。

综合以上实验结果,藤黄酸与替莫唑胺联用能够通过上调 U251 细胞中的 ROS 水平,抑制 GLUT-3 和 AKT 信号通路,进而增强 U251 细胞对替莫唑胺的敏感性,为藤黄酸在抗神经胶质瘤中的应用提供了一定的实验依据。

## [参 考 文 献]

- [1] LEINONEN H M, LIPPONEN E M, VALKAMAA J, et al. Preclinical proof-of-concept, analytical development, and commercial scale production of lentiviral vector in adherent cells[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 6(15): 63-71. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.08.006.
- [2] 邵华, 姜磊, 贾文霄, 等. 脑胶质瘤多序列 MRI 影像学表现及其鉴别诊断价值探讨[J]. *中国 CT 和 MRI 杂志*, 2019, 17(11): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5131.2019.11.001
- [3] 陈伟志, 杨重恒. MR 干细胞标记在替莫唑胺干预脑胶质瘤血管生成及治疗研究中的应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(12): 9-12. DOI: CNKI:SUN:SHYW.0.2015-12-004.
- [4] 郑巍. 藤黄酸抑制膀胱癌细胞生长的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [5] 黄韬. 藤黄酸抑制膀胱癌 T24 细胞增殖并诱导细胞程序性死亡及其机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [6] 赵树鹏, 靳彩玲, 高国军, 等. 槐定碱对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭及相关信号通路的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(3): 360-365. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.011
- [7] 熊焰, 汪奇柏. 丝氨酸和富含精氨酸剪接因子 1 基因通过调控翻译过程影响神经胶质瘤 U87 细胞的增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(9): 983-987. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.008
- [8] TERASHIMA K. Chemotherapy of intracranial gliomas in children [J]. *Prog Neurol Surg*, 2018, 37(31): 162-167. DOI: 10.1159/000467377.
- [9] 丁吉涛, 李明浩, 李琳坤, 等. 替莫唑胺治疗神经胶质瘤患者疗效与安全性的回顾性分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2019(23): 4187-4190. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2019.23.013
- [10] 黄亨亨. 新藤黄酸对小细胞肺癌抗肿瘤作用的体内外研究[D]. 南京: 东南大学, 2018.
- [11] 常佳丽, 方清影, 张变, 等. 叶酸修饰新藤黄酸泡囊对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡作用研究[J]. *江西中医药大学学报*, 2018, 30(1): 84-88.
- [12] JIANG X, WANG X. Cytochrome C-mediated apoptosis[J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 58(73): 87-106. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
- [13] LEE Y J, LEE C. Porcine deltacoronavirus induces caspase-dependent apoptosis through activation of the cytochrome c-mediated intrinsic mitochondrial pathway[J]. *Virus Res*, 2018, 34(253): 112-123. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.008.
- [14] WANG X, LU X, ZHU R, et al. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells via ros-mediated mitochondrial pathway [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(4): 1130-1140. DOI: 10.1007/s11064-016-2147-y.
- [15] FEITOSA S G, VIANA K F, LUNA ECM, et al. Immunohistochemical evaluation of GLUT-3 and GLUT-4 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(7): 1779-1783. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.7.1779.
- [16] 周琳, 高小平, 胡美伦. PI3K/Akt 通路对缺氧缺血皮质神经元细胞 GLUT3 转位的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(9): 845-847. DOI: 1671-8348 (2011) 09-0845-03.

[收稿日期] 2020-03-10

[修回日期] 2020-06-24

[本文编辑] 韩丹