

# 柴胡皂苷 D 调控 miR-34a 对胶质瘤细胞 C6 增殖与自噬的影响

刘晓熙, 赵鹏伟, 张静, 于慧玲

(内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010020)

**【摘要】目的:** 探讨柴胡皂苷 D 调控 miR-34a 对胶质瘤细胞 C6 增殖与自噬的影响。**方法:** 分别以终浓度为 0、3、6、9、12、15  $\mu\text{mol/L}$  的柴胡皂苷 D 作用胶质瘤细胞 C6 后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力; Western blot 和 RT-qPCR 检测胶质瘤细胞 C6 中自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin1 表达情况。将胶质瘤细胞 C6 分成 4 组: 对照组 (Control 组)、柴胡皂苷 D 组 (Ssd 组)、柴胡皂苷 D + miR-34a 阴性对照转染组 (Ssd + miR-34a NC 组)、柴胡皂苷 D + miR-34a inhibitor 转染组 (Ssd + miR-34a inhibitor 组), CCK-8 法检测 miR-34a NC 和 miR-34a inhibitor 在柴胡皂苷 D 处理后对胶质瘤细胞 C6 增殖能力的影响; Western blot 检测各组胶质瘤细胞 C6 中自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II 和 Beclin-1 的蛋白表达情况。**结果:** 经过不同浓度的柴胡皂苷 D 处理 48 h 后, 胶质瘤细胞 C6 增殖能力明显下降, 自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin1 表达水平均升高 ( $P < 0.05$ ); 胶质瘤细胞 C6 中 miR-34a 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。转染后, Ssd 组胶质瘤细胞 C6 增殖率、LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin1 表达水平与 Ssd + miR-34a NC 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组胶质瘤细胞 C6 增殖率低于 Control 组和 Ssd + miR-34a inhibitor 组, LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin1 表达水平均高于 Control 组和 Ssd + miR-34a inhibitor 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Ssd + miR-34a inhibitor 组胶质瘤细胞 C6 增殖率低于 Control 组, LC3-II/LC3-I 比值高于 Control 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 柴胡皂苷 D 可能是通过调控 miR-34a 来抑制胶质瘤细胞 C6 增殖和诱导自噬发生。

**【关键词】** 胶质瘤; 柴胡皂苷 D; miR-34a; 增殖; 自噬

**【中图分类号】** R739.41 **【文献标志码】** A

## Effect of regulation of miR-34a by saikosaponin D on the proliferation and autophagy of glioma cell line C6

LIU Xiao-xi, ZHAO Peng-wei, ZHANG Jing, YU Hui-ling

(Department of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010020, Inner Mongolia, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of saikosaponin D regulating miR-34a on the proliferation and autophagy of glioma cell line C6. **Methods:** Take the final concentration as 0, 3, 6, 9, 12 and 15  $\mu\text{mol/L}$  after treating glioma cell C6 with saikosaponin D, the cell proliferation ability was detected by CCK-8, and the autophagy related proteins Beclin1, LC3-II/LC3-I, and gene expression in glioma cell C6 were detected by Western blot and qRT PCR. Divide glioma cell C6 into four groups: control group (Control group), saikosaponin D group (Ssd group), saikosaponin D + miR-34a negative control transfection group (Ssd + miR-34a NC group), saikosaponin D + miR-34a inhibitor transfection group (Ssd + miR-34a inhibitor group), and detected the effects of miR-34a NC and miR-34a inhibitor on the proliferation ability of glioma cell C6 after treatment with saikosaponin D, Western blot was used to detect the protein expression of autophagy related proteins LC3-I, LC3-II, and Beclin-1 in C6 glioma cells of each group. **Results:** After treatment with different concentrations of saikosaponin D for 48 h, the proliferation ability of glioma cells C6 was decreased, the ratio of autophagy-related protein LC3II/LC3-I was increased, and the expression level of Beclin1 was increased. There was no statistically significant difference in C6 proliferation rate, LC3 II/LC3-I ratio, and Beclin1 expression level between the Ssd group and the Ssd + miR-34a NC group ( $P > 0.05$ ). The proliferation rate of C6 glioma cells in the Ssd group and Ssd + miR-34a NC group was lower than that in the Control group and Ssd + miR-34a inhibitor group. The LC3 II/LC3-I ratio and Beclin1 expression level were higher than those in the Control group and Ssd + miR-34a inhibitor group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The proliferation rate of C6 glioma cells in the Ssd + miR-34a inhibitor group was lower than that in the Control group, and the LC3 II/LC3-I ratio was higher than

**基金项目:** 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2019MS08153)

**作者简介:** 刘晓熙 (1993 -), 女, 硕士研究生。E-mail: 13847336250@163.com

**通讯作者:** 于慧玲, 博士, 教授。E-mail: 1977126430@qq.com

those in the Control group, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Chaihu saponin D may inhibit the proliferation of glioma cell C6 and induce autophagy by regulating miR-34a.

**【Key words】** Glioma; Chaihu saponin D; MiR-34a; Proliferation; Autophagy

胶质瘤起源于神经胶质细胞,是颅内最为常见的原发性恶性肿瘤,调查<sup>[1]</sup>显示,胶质瘤发病率达到 3.69/10 万。目前临床上对于胶质瘤的治疗以手术、化疗为主,但多数患者临床疗效仍然较差,5 年总生存率不超过 35%<sup>[2]</sup>。故寻找新的有效治疗靶点和方案,对改善患者预后尤为重要。近年来,中医药在临床肿瘤治疗获得了一定成果,柴胡作为常用中药之一,其化学活性成份也受到明显关注。柴胡皂苷类是柴胡最具代表性的化学活性成分,含有多种单体,其中柴胡皂苷 D 药理活性最强,在抗肿瘤方面存在明显生物活性<sup>[3]</sup>。以往研究<sup>[4]</sup>显示,柴胡皂苷 D 可以抑制胶质瘤细胞体内外移植瘤生长、迁移和侵袭。但关于柴胡皂苷 D 调控胶质瘤细胞 C6 的具体机制尚处于探索中。miR-34a 属于肿瘤抑制基因,能够调控多种因子表达继而影响肿瘤增殖、凋亡等<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>显示,miR-34a 可以抑制脑胶质瘤侵袭、转移。基于此,本研究拟进行细胞实验,观察柴胡皂苷 D 能否抑制胶质瘤细胞 C6 增殖和诱导其自噬,并验证柴胡皂苷 D 是否可通过调控 miR-34a 来影响胶质瘤细胞 C6 生物学行为。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

胶质瘤细胞 C6(南京凯基生物科技发展有限公司),柴胡皂苷 D(四川维克奇生物科技发展有限公司),7300 全自动荧光定量 PCR 仪及实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 ABI 公司),总 RNA 提取 Trizol 试剂及 Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司),放射沉淀免疫试验(RIPA)裂解液(北京索莱宝科技有限公司),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司),TBST 液、Western 印迹转膜缓冲液、Western 印迹一抗稀释液及 Western 印迹二抗稀释液(上海雅酶生物医药科技有限公司),凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),总蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠酶标二抗 IgG(北京博奥生物技术有限公司),CCK-8 试剂(上海尚宝生物科技发展有限公司),miR-34a 及 U6 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉

素对胶质瘤细胞 C6 培养,培养箱环境:温度 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。当细胞融合至 70% ~ 80% 时,将其分为 6 组,分别予以终浓度为 0、3、6、9、12、15 μmol/L 的柴胡皂苷 D 处理 48 h。

1.2.2 CCK-8 实验 在 96 孔板中进行胶质瘤细胞 C6 接种,浓度为每孔  $6 \times 10^3$  个细胞,之后在培养箱中孵育 24 h,再加入 CCK-8 溶液 10 μL/每孔,继续孵育 2 h,去上清,加入 DMSO 150 μL/孔,低速振荡 5 min,通过酶标检测仪检测波长在 450 nm 处吸光度(OD 值),计算不同浓度柴胡皂苷 D 处理下胶质瘤细胞 C6 的增殖率。每组设置 6 个复孔,独立重复实验 3 次。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot) 各组胶质瘤细胞 C6 中加入 RIPA 裂解液,冰上孵育 30 min,3 000 r/min 离心,提取细胞总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度,加入一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜,二抗在 37 °C 水溶箱中孵育 1 h 后,TBST 液洗涤 5 min × 3 次,加入显色液,通过凝胶成像系统检测蛋白条带表达情况,内参半定量分析胶质瘤细胞 C6 中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-I、LC3-II 的蛋白表达水平。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR) 采用 Trizol 试剂提取各组胶质瘤细胞 C6 总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,行荧光定量 PCR 扩增,反应体系为 10 μL,样品管和内参(U6)管均设复管。预变性:95 °C 30 s,循环 1 次;反应条件:95 °C 1 min,95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,循环 40 次。反应结束后,根据仪器自带软件分析荧光信号,获取 Ct 值。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算胶质瘤细胞 C6 中 miR-34a mRNA 表达水平。miR-34a 上游引物:5'-ACACTC-CAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAG-3',下游引物:5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCG-3'。

1.2.5 细胞转染 当胶质瘤细胞 C6 融合至 70% ~ 80% 时,在 6 孔板中铺  $6 \times 10^5$  个细胞,将细胞分成 4 组:对照组(Control 组)、柴胡皂苷 D 组(Ssd 组)、柴胡皂苷 D + miR-34a 阴性对照转染组(Ssd + miR-34a NC 组)、miR-34a inhibitor 转染 + 柴胡皂苷 D 组(Ssd + miR-34a inhibitor 组)。对照组不予任何处理;Ssd 组使用 9 μmol/L 柴胡皂苷 D 处理 48 h;将 miR-34a inhibitor、miR-34a NC 分别转染至胶质瘤细胞 C6,室温下静置 20 min,分别加入到培养孔中,再继续孵育 4 h。miR-34a inhibitor + Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组转染后,进行培养基更换,再用 9 μmol/L 柴胡皂苷 D 处理 48 h。转染操作均按照 Li-

pofectamine 2000 试剂盒说明书进行,并检测各组胶质瘤细胞 C6 中 miR-34 基因表达情况和自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II 和 Beclin-1 的蛋白表达情况。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 柴胡皂苷 D 对胶质瘤细胞 C6 增殖及自噬的影响

3、6、9、12、15  $\mu\text{mol/L}$  组的柴胡皂苷 D 处理后的胶质瘤细胞 C6 增殖率均低于 0  $\mu\text{mol/L}$  组 ( $P < 0.05$ ); Beclin1 表达水平均高于 0  $\mu\text{mol/L}$  组 ( $P < 0.05$ ), LC3-II/LC3-I 高于 0  $\mu\text{mol/L}$  组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 柴胡皂苷 D 对胶质瘤细胞 C6 增殖及自噬的影响 [ $\bar{x} \pm s, n(\%)$ ]

组别	胶质瘤细胞 C6 增殖率 (%)	自噬相关蛋白	
		Beclin1	LC3-II/LC3-I
0 $\mu\text{mol/L}$ 组	97.44 $\pm$ 7.35	0.75 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.04
3 $\mu\text{mol/L}$ 组	85.51 $\pm$ 6.03 *	0.82 $\pm$ 0.08 *	0.51 $\pm$ 0.07 *
6 $\mu\text{mol/L}$ 组	71.30 $\pm$ 5.47 *	0.90 $\pm$ 0.09 *	0.73 $\pm$ 0.09 *
9 $\mu\text{mol/L}$ 组	58.62 $\pm$ 5.12 *	1.01 $\pm$ 0.09 *	1.00 $\pm$ 0.10 *
12 $\mu\text{mol/L}$ 组	53.94 $\pm$ 4.79 *	1.06 $\pm$ 0.10 *	1.12 $\pm$ 0.11 *
15 $\mu\text{mol/L}$ 组	49.28 $\pm$ 4.38 *	1.10 $\pm$ 0.11 *	1.19 $\pm$ 0.13 *
<i>F</i> 值	304.361	66.335	393.293
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

### 2.2 柴胡皂苷 D 对胶质瘤细胞 C6 miR-34a 表达的影响

3、6、9、12、15  $\mu\text{mol/L}$  组的柴胡皂苷 D 处理后的胶质瘤细胞 C6 miR-34a 表达水平均高于 0  $\mu\text{mol/L}$  组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 柴胡皂苷 D 对胶质瘤细胞 C6miR-34a 表达的影响

组别	miR-34a 表达水平
0 $\mu\text{mol/L}$ 组	100.45 $\pm$ 8.31
3 $\mu\text{mol/L}$ 组	131.78 $\pm$ 12.74 *
6 $\mu\text{mol/L}$ 组	169.30 $\pm$ 14.28 *
9 $\mu\text{mol/L}$ 组	208.54 $\pm$ 19.66 *
12 $\mu\text{mol/L}$ 组	230.61 $\pm$ 21.85 *
15 $\mu\text{mol/L}$ 组	247.29 $\pm$ 22.73 *
<i>F</i> 值	321.657
<i>P</i> 值	<0.001

\*  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

### 2.3 miR-34a 转染对胶质瘤细胞 C6 增殖及自噬的影响

Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组、Ssd + miR-34a inhibitor 组胶质瘤细胞 C6 增殖率均低于 Control 组; LC3-II/LC3-I 及 Beclin1 表达水平均高于 Control 组 ( $P < 0.05$ ), Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组胶质瘤细胞 C6 增殖率均低于 Ssd + miR-34a inhibitor 组; LC3-II/LC3-I 及 Beclin1 表达水平均高于 Ssd + miR-34a inhibitor 组 ( $P < 0.05$ )。见图 1-图 2 及表 3。

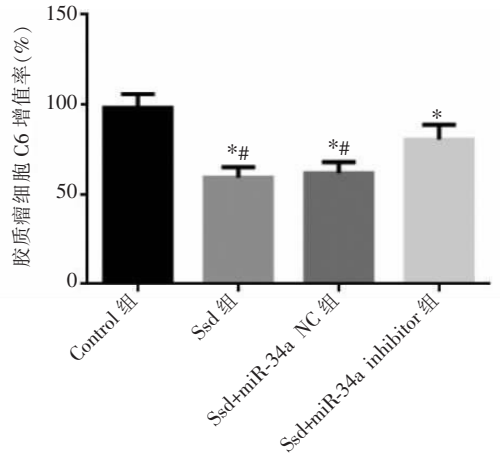


图 1 各组胶质瘤细胞 C6 增殖率比较

\* $P < 0.05$ , 与 Control 组比较; # $P < 0.05$ , 与 Ssd+miR-34a inhibitor 组比较。

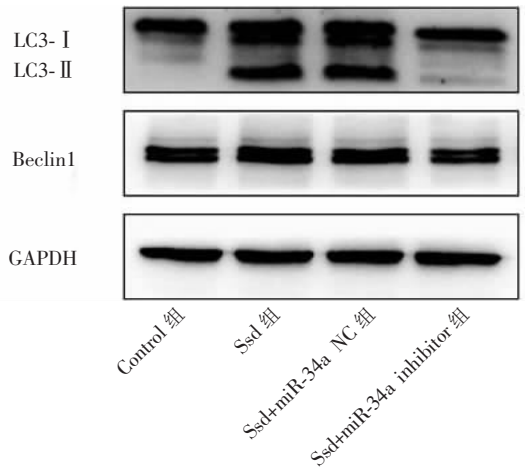


图 2 四组胶质瘤细胞 C6 自噬相关蛋白表达比较

表 3 各组胶质瘤细胞 C6 自噬相关蛋白灰度值比较

组别	LC3-II/LC3-I	Beclin1
Control 组	0.03	0.51
Ssd 组	1.05 **	0.71 **
Ssd + miR-34a NC 组	1.02 **	0.68 **
Ssd + miR-34a inhibitor 组	0.15 *	0.49 *
<i>F</i> 值	402.475	26.968
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

\*  $P < 0.05$ , 与 Control 组比较; #  $P < 0.05$ , 与 Ssd + miR-34a inhibitor 组比较。

### 3 讨论

胶质瘤恶性程度高,具有侵袭性强、治愈率低、复发率高等特点,发病率及致死率在中枢神经系统肿瘤中均处于第一位,对人类健康威胁大。随着中医药学的发展和在临床上的推广,通过中药来预防和治理肿瘤也越发受到重视,探讨中医药在抗肿瘤方面的作用机制已成为医学研究热点。

柴胡皂苷是柴胡主要活性成分,其中柴胡皂苷 D 活性最显著。近年来研究<sup>[7]</sup>发现,柴胡皂苷 D 具有多种药理作用,包括保肝、抗肿瘤、抗癫痫等。时薛丽等<sup>[8]</sup>研究显示,柴胡皂苷 D 可以抑制胃癌细胞生长和迁移。党锋等<sup>[9]</sup>研究认为,柴胡皂苷 D 可通过诱导结直肠癌细胞自噬来抑制癌细胞增殖。自噬是一种分解代谢过程,细胞自噬与其衰老、凋亡均为非常重要的生物学现象,在生物生长和发育中起到了重要作用。报道指出,细胞自噬异常与恶性肿瘤发生和发展存在密切关联<sup>[10-12]</sup>。细胞自噬会受到自噬相关基因以及多种信号通路的调控,细胞收到相关信号或经过刺激后,能够启动 III 型磷脂酰肌醇激酶(VPS34)与 Beclin1 结合,形成吞噬泡后和自噬相关因子进行组装对接并形成自噬小体,待其成熟后再与溶酶体进行结合,最终降解细胞内物质,起到自噬作用。Beclin1 可以调控自噬体膜合成,继而调控细胞自噬,故而 Beclin1 蛋白表达水平也能在一定程度上显示细胞自噬情况<sup>[13]</sup>。功能延伸为细胞自噬过程的重要环节,在功能延伸阶段,LC3-I 可转化为 LC3-II 并存在于自噬体膜上,在各类自噬接头中起到重要作用,故而 LC3-II/LC3-I 比值可以反映细胞自噬情况<sup>[14]</sup>。以往关于柴胡皂苷 D 与癌细胞自噬的研究<sup>[9]</sup>显示,柴胡皂苷 D 会影响人结直肠癌细胞 SW480 中 LC3 相关蛋白水平,自噬抑制剂 3-MA,可以对柴胡皂苷 D 诱导的结直肠癌细胞自噬进行负向调控。本研究探讨柴胡皂苷 D 对胶质瘤细胞 C6 增殖和自噬的影响,结果显示,经柴胡皂苷 D 处理 48 h 后,胶质瘤细胞 C6 增殖率明显受到抑制,且随着柴胡皂苷 D 浓度增加,增殖率逐渐下降,在浓度为 9  $\mu\text{mol/L}$  时增殖受限最为显著,故而选择将 9  $\mu\text{mol/L}$  作为后期工作浓度。自噬结果显示,经柴胡皂苷 D 处理后,自噬相关蛋白 Beclin1 表达水平及 LC3-II/LC3-I 明显升高,提示柴胡皂苷 D 可以诱导胶质瘤细胞自噬,抑制其增殖。

目前有关柴胡皂苷 D 是通过何种途径影响胶质瘤细胞自噬的研究报道很少。有研究<sup>[15]</sup>发现,经

小柴胡汤处理过的神经胶质细胞瘤中 miR-34a 表达水平随着小柴胡汤作用时间延长而升高。miR-34a 是 miR-34 家族成员,可以调控多种靶基因(如抑癌基因 p53)表达和信号通路(如 Wnt、TGF- $\beta$ /Smad3/4 信号通路)活性,继而影响肿瘤细胞生物学行为<sup>[16]</sup>。过去研究<sup>[17]</sup>显示,miR-34a 能够调控 TGF- $\beta$ /Smad4 信号通路而促使细胞自噬发生,继而降低结肠癌细胞耐药性。在视网膜母细胞瘤和骨肉瘤的研究中也发现,miR-34a 能够促进癌细胞自噬发生<sup>[18-19]</sup>。这些研究结果提示,miR-34a 与癌细胞自噬关系密切,其表达水平升高促进癌细胞自噬发生。本次研究分析 miR-34a 转染对胶质瘤细胞 C6 增殖及自噬的影响,结果发现与 Control 组相比,Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组和 Ssd + miR-34a inhibitor 组胶质瘤细胞 C6 增殖率均明显下降,而自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 明显升高,且与 Ssd + miR-34a inhibitor 组相比,Ssd 组、Ssd + miR-34a NC 组对肿瘤增殖的抑制作用更为显著,自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 和 Beclin1 表达水平更高,提示提示柴胡皂苷 D 可能是通过调控 miR-34a 实现来诱导胶质瘤细胞 C6 自噬。

综上,胶质瘤细胞 C6 实验从细胞水平验证了柴胡皂苷 D 可以抑制胶质瘤细胞 C6 增殖和诱导自噬发生,这种作用机制可能是通过调控 miR-34a 实现的。

### 参考文献

- [1] 程荆,范燕琴,周汉,等. TGF- $\beta$  信号通路在胶质瘤中的作用及分子机制[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(4): 245-247.
- [2] 张静,于慧玲,赵鹏伟,等. 柴胡皂苷 d 通过 AKT/mTOR 信号通路调控胶质瘤 C6 细胞自噬[J]. 中国癌症防治杂志, 2022, 14(6):606-610.
- [3] Zou C, Hu X, Wu Y, *et al.* Protective role of Saikosaponin d in d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*  $\delta$   $\times$  *Epinephelus fuscoguttatus*  $\eta$ ) [J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737601.
- [4] 徐敬轩,杨岩,张勋,等. 柴胡皂苷 D 通过下调 miR-517a 调节胶质瘤细胞体外和体内移植瘤生长[J]. 医学分子生物学杂志, 2020, 17(1): 33-39.
- [5] Abtahi NA, Naghib SM, Ghalekohneh SJ, *et al.* Multifunctional stimuli-responsive niosomal nanoparticles for co-delivery and co-administration of gene and bioactive compound; in vitro and in vivo studies [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 429: 132090.
- [6] 涂其武,沈晓黎. miR-34a 通过 MMP2 抑制脑胶质瘤细胞侵袭和转移[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(8): 1115-1120.

(下转第 17 页)