

瑞香素诱导人胶质母细胞瘤 U-251 细胞自噬的机制研究

商义¹, 覃亚亚², 张小东³, 冯松⁴

(1. 川北医学院第二附属医院, 四川 南充 637000; 2. 达州市中心医院, 四川 达州 635000; 3. 川北医学院附属医院, 四川 南充 637000; 4. 达川区人民医院, 四川 达州 635000)

【摘要】目的: 探讨瑞香素诱导人胶质母细胞瘤 U-251 细胞自噬的机制。**方法:** 用不同浓度瑞香素处理 U-251 细胞 48 h 后, 采用透射电镜观察 U-251 细胞内自噬体的数量及形成情况; Western blot 法检测并比较自噬相关蛋白 mTOR、P62、Beclin-1、LC-3 的表达水平。**结果:** 与对照组比较, 40、80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瑞香素处理 48 h 后, U-251 细胞后内自噬体的数量均增加 ($P < 0.05$); mTOR、Beclin-1 和 LC-3 蛋白的表达水平均升高 ($P < 0.05$); P62 蛋白的表达水平均降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。**结论:** 瑞香素可能通过上调 mTOR、Beclin-1 和 LC-3 蛋白的表达, 下调 P62 蛋白的表达以促进 U251 细胞自噬发生。

【关键词】 瑞香素; 人胶质母细胞瘤 U-251 细胞; 自噬; P53/mTOR 通路

【中图分类号】 R96 **【文献标志码】** A

Research on the mechanism of daphnetin-induced autophagy in human glioblastoma U-251 cells

SHANG Yi¹, QIN Ya-ya², ZHANG Xiao-dong³, FENG Song⁴

(1. The Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. Dazhou Central Hospital, Dazhou 635000; 3. Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 4. Dachuan District People's Hospital, Dazhou 635000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of daphnetin-induced autophagy in human glioblastoma U-251 cells. **Methods:** After U-251 cells were treated with different concentrations of daphnetin for 48 h, the number and formation of autophagosomes in U-251 cells were observed by transmission electron microscopy. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins mTOR, P62, Beclin-1 and LC-3. **Results:** Compared with the control group, the number of autophagosomes in U-251 cells was increased after treatment with 40, 80 and 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ daphnetin for 48 h. The expression levels of mTOR, Beclin-1 and LC-3 proteins were increased, while the expression level of P62 protein was decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Daphnetin may promote autophagy in U251 cells by up-regulating the expression of mTOR, Beclin-1 and LC-3 proteins and down-regulating the expression of P62 protein.

【Key words】 Daphnetin; Glioblastoma U251 cells; Autophagy; P53/mTOR pathway

自噬在癌症发生发展过程中具有多种作用, 从抑制肿瘤到促进肿瘤生长和存活, 这些差异可能与肿瘤类型、肿瘤分期及免疫微环境等有关^[1]。自噬是细胞代谢的重要机制, 目前被认为是治疗肿瘤新靶点^[2]。胶质母细胞瘤是最常见和最具侵袭性的原发性脑肿瘤, 约占恶性原发性脑肿瘤的 45%^[3]。目前认为激活或抑制自噬的都是治疗胶质母细胞瘤的有效疗法^[4]。瑞香素是天然香豆素化合物, 具有抗炎、抗肿瘤、抗增殖、抗氧化、免疫调节等药理作用^[5-6]。多项研究^[7-10]表明, 瑞香素对自噬有调节作用, 而自噬又接受 P53 及 RRM2 的调控。目前认

为 P53 既能调节自噬, 又受自噬的反馈调节^[11], 而敲除 RRM2 基因和 RR 抑制剂治疗可诱导自噬^[12]。课题组前期研究^[13]表明, 瑞香素可调节 P53、RRM2 的表达, 这可能与瑞香素调节自噬有关。本研究旨在探讨瑞香素对胶质母细胞瘤 U-251 细胞自噬的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

恶性胶质瘤细胞株 (U-251 MG) 由川北医学院基础医学院创新平台提供。瑞香素 (北京索莱宝科

技公司), DMEM 培养基 (GIBCO 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司); mTOR、Beclin-1、P62、LC-3 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 羊抗兔 IgG 抗体 (北京华兴博创生物技术中心); 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); Bio-Radchemi Doc XRS + 化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad)。透射电镜 (日立 HT7700); 电镜超薄切片机 (莱卡 EM UC7)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U-251 MG 细胞使用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素的培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 于倒置显微镜观察细胞生长情况, 取对数生长期细胞做后续实验。

1.2.2 Western blot 检测自噬相关蛋白表达分别用 0 (对照组)、40、80 和 160 μg/mL 的瑞香素处理 U-251 MG 细胞 48 h 后, 加入适量的 RIPA 裂解细胞提取蛋白, BCA 法蛋白定量, 样品在 10% SDS-PAGE 行电泳, 后电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, mTOR、Beclin-1、P62、LC-3 和 GAPDH 兔来源一抗于 4 °C 孵育 15 h 后, 山羊抗兔二抗于室温孵育 2 h, 发光试剂 (ECL) 显影, 凝胶成像系统成像, 其结果用软件 Image J 进行分析。

1.2.3 透射电镜观察 U251 细胞内自噬体 瑞香素 (80 μg/mL) 处理 U-251 细胞 48 h 后, 收集预处理

好的细胞团, 加入 2.5% 戊二醛溶液于 4 °C 固定 3 h 后行电镜包埋。细胞块经 1% 锇酸 (OsO₄), 再依次经梯度乙醇及环氧丙烷脱水、环氧丙烷与 Epon812 混合液和 Epon812 浸透。待标本完全硬化后, 切取 80 nm 厚的超薄切片并行醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 利用透射电镜观察 U251 细胞内自噬体的形态和数量, 并进行拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较行独立样本 *t* 检验, 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 瑞香素对自噬相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 80、160 μg/mL 瑞香素处理 U251 细胞 48 h 后, mTOR、Beclin-1 和 LC-3 的蛋白表达水平均呈剂量依赖性升高 (P < 0.05), 而 P62 的蛋白表达水平则呈剂量依赖性降低 (P < 0.05); 40 μg/mL 瑞香素处理 48 h 后, mTOR、Beclin-1 和 LC-3 的蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05), P62 的蛋白表达水平下降 (P < 0.05)。见图 1。

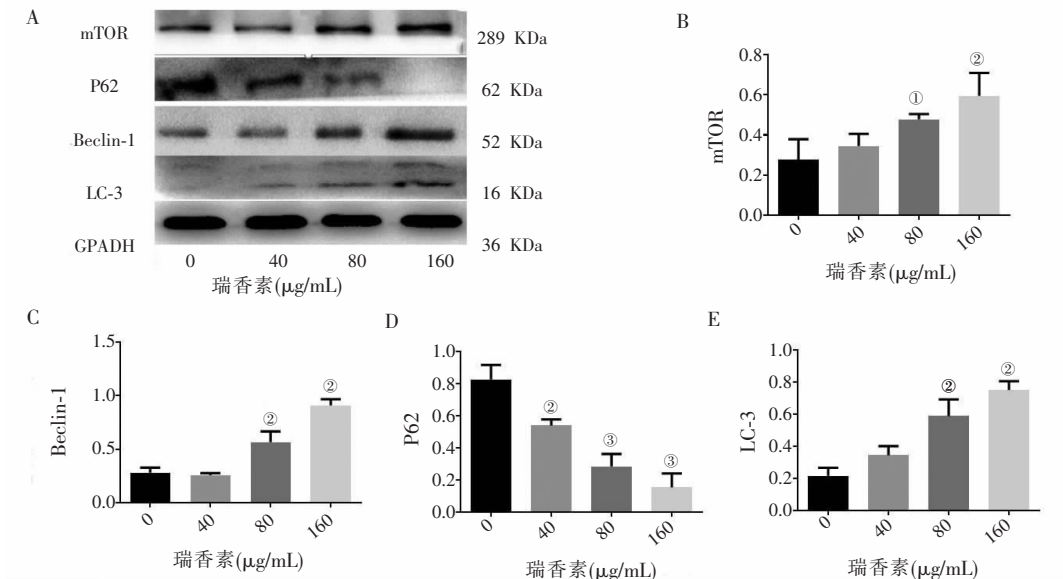


图 1 瑞香素对 U251 细胞自噬相关蛋白表达的影响 (n=3)

A. 0、40、80、160 μg/mL 瑞香素处理 U251 细胞 48 h 后 U251 细胞内 mTOR、Beclin-1、P62、LC-3 蛋白印迹图;

B-E. 蛋白相对表达量。①P < 0.05; ②P < 0.01; ③P < 0.001, 与对照组比较。

2.2 瑞香素对 U251 细胞自噬的影响

瑞香素 (80 μg/mL) 处理 U-251 细胞 48 h 后, 对照组可见大量内质网、高尔基复合体等正常细胞器,

自噬体较少; 瑞香素处理组可见 U-251 细胞发生明显自噬, 细胞内见大量圆形或类圆形、大小不一的自噬体, 自噬体内包裹有细胞器或胞浆。见图 2。

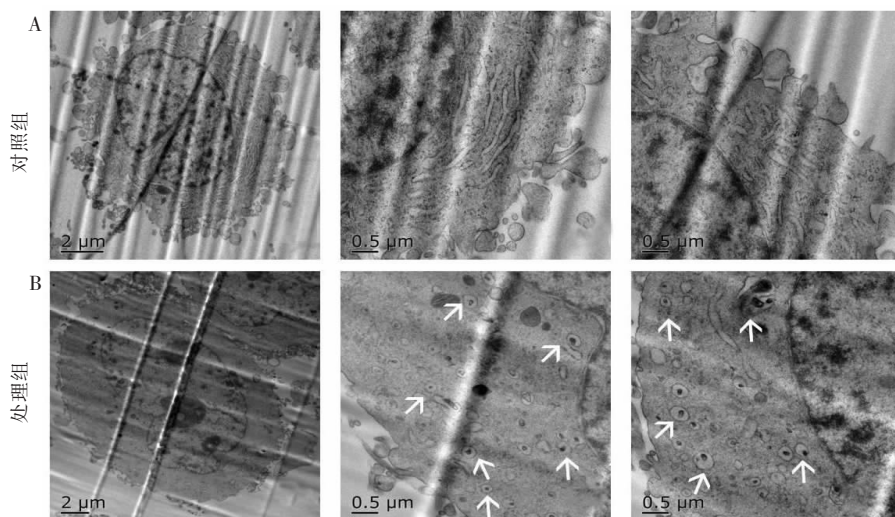


图 2 透射电镜观察瑞香素对 U251 细胞自噬的影响

A. 对照组; B. 处理组。白色箭头示自噬体。

3 讨论

自噬是高度保守的细胞自我分解代谢过程,作用为在应急情况下提高细胞生存率,并维持细胞内稳态及代谢平衡,其功能的改变或缺失,与肿瘤的发生密切相关^[14]。自噬在肿瘤的发展中起双重作用,作用结果主要取决于肿瘤的类型、阶段或遗传背景^[15]。在肿瘤发生早期阶段,自噬可通过调控蛋白质和细胞器质量,进而控制细胞功能(如维持基因组稳定性,防止慢性组织损伤、细胞损伤和炎症、诱导细胞凋亡),抑制肿瘤的发生;而在肿瘤发展的晚期,自噬可提高肿瘤细胞生存率,产生耐药,并帮助其免疫逃避。机制与维持线粒体功能、肿瘤的代谢、生长和存活,减少 DNA 损伤,促进肿瘤增殖等相关^[16]。

本课题组前期研究^[17]证实瑞香素能抑制 U251 细胞增殖,其机制与调控 P53/RRM2 通路有关。自噬由多种基因和多条信号通路共同调控,其中 P53、RRM2 对自噬均有调节作用。大量研究^[18-19]证实 P53 能调节自噬,而自噬又能抑制 P53 激活,其可能还存在一种反馈调节机制;同时还有研究^[10]表明 RRM2 能调节自噬。据此推测瑞香素抑制 U251 细胞增殖可能与其调控 U251 细胞自噬有关,因此,本研究拟对瑞香素能否调控 U251 细胞自噬及其机制进行研究。首先,本研究在电镜下观察发现瑞香素处理后 U251 细胞内自噬体的数量增加,证实瑞香素确实能促进 U251 细胞自噬,提示瑞香素抑制 U251 细胞增殖与其促进该细胞自噬有关。关于瑞香素促进 U251 细胞自噬的机制,可能与 P53 调节自噬与 P53/mTOR 通路有关,PI3K/Akt/mTOR 是自噬调控的经典通路,参与肿瘤发生、进展和耐药性中的作用,是调控自噬治疗肿瘤的重要通路。其激

活过程为细胞因子刺激 PI3K,导致 PI3K 被激活,进一步活化 Akt,使 Akt 发生磷酸化,之后将信号传至 mTOR,触发 mTOR 磷酸化,从而激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,调控下游相关因子,对细胞自噬发挥抑制作用^[20-21]。因此推测 mTOR 是诱导自噬的关键分子。另外,Beclin1 是自噬体形成过程中的必需分子,可与 PI3K 蛋白形成复合物,参与溶酶体的形成,调控自噬体的形成与成熟^[22]。而 LC3 是膜相关蛋白,附着于自噬体的膜上,是自噬体的标记蛋白,包括 LC3-I 和 LC3-II 两种剪切形式。自噬发生时 LC3-I 向 LC3-II 转化,存在一个生成-降解的动态过程,二者比值与自噬程度有关;LC3-II 是发生自噬的标志性蛋白,还可根据 LC3-II 的积聚程度,判断自噬的改变^[23-24]。P62 是一种多功能转接器蛋白与凋亡和自噬过程有关,且在细胞凋亡中充当信号核心^[25]。P62 的聚集可导致基因组不稳定、抑制自噬,进而导致肿瘤的发生,还与肿瘤增殖、侵袭、转移有关^[26]。同时在多种肿瘤细胞中均发现 P62 的异常表达(如肝癌、肺癌、乳腺癌等)。因此 P62 可作为肿瘤治疗的靶点,特别是在肿瘤发生的早期。

为进一步探讨瑞香素促进 U251 细胞自噬的机制,本研究采用 Western Blot 检测了不同浓度瑞香素对 U251 细胞内上述自噬相关蛋白(mTOR、Beclin-1、P62 和 LC-3)表达的影响。结果显示,瑞香素浓度为 80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,U251 细胞内 mTOR、Beclin-1 和 LC-3 蛋白的表达均升高($P < 0.05$),而 P62 蛋白的表达则降低($P < 0.05$)。本研究结果中关于 LC-3 蛋白表达的升高和自噬体的增多均提示瑞香素能促进 U251 细胞自噬,其机制可能与其上调 mTOR、Beclin-1 的表达、下调 P62 蛋白的表达有关^[27]。

自噬作为癌症预防和治疗的有​​效干预策略。一方面,其作为一种程序性细胞死亡,广泛存在于各种癌症中,作为肿瘤抑制途径发挥作用,促进致癌分子的降解,最终预防癌症的发展;另一方面,自噬可协调和参与肿瘤发生过程中,并调节该生物过程中的多种信号通路^[28]。胶质母细胞瘤的治疗敏感性受肿瘤对凋亡细胞死亡的内在抵抗力的限制,而促进自噬可促进该肿瘤细胞死亡,故认为促进自噬是治疗胶质母细胞瘤的有效方法^[29]。

综上,瑞香素可通过增强 U-251 细胞的自噬抑制其增殖,其机制可能与其上调 mTOR、Beclin-1 的表达和下调 P62 蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(8): 560–575.
- [2] Jain V, Singh MP, Amaravadi RK. Recent advances in targeting autophagy in cancer[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2023, 44(5): 290–302.
- [3] 廖雅芳, 孙辉, 袁春露, 等. 网络药理学、分子对接结合实验验证探讨知母皂苷 A III 治疗胶质母细胞瘤的作用机制[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(6): 73–81.
- [4] Yang K, Niu L, Bai Y, et al. Glioblastoma: targeting the autophagy in tumorigenesis[J]. *Brain Research Bulletin*, 2019, 153: 334–340.
- [5] 冷雨, 李清山, 何克, 等. 瑞香素调节 AMPK/mTOR 信号通路对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞自噬和凋亡的影响[J]. *河北医药*, 2023, 45(22): 3365–3369, 3376.
- [6] 温亚, 李燕, 白思怡, 等. 瑞香素调节 STING/TBK1/IRF3 信号通路对脓毒症大鼠免疫炎症反应的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2024, 45(5): 822–827.
- [7] Fan X, Xie M, Zhao F, et al. Daphnetin triggers ROS-induced cell death and induces cytoprotective autophagy by modulating the AMPK/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer[J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153465.
- [8] 樊思越, 王文昊, 罗宁烽, 等. 瑞香素药动学、毒理学、生物活性的研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(2): 524–528.
- [9] Li ZN, Shu Y, Chen CG, et al. Acquired tamoxifen resistance is surmounted by GW8510 through ribonucleotide reductase M2 downregulation-mediated autophagy induction[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 528(3): 554–560.
- [10] Jiang HP, Zhang DZ, Aleksandrovich KD, et al. RRM2 mediates the anti-tumor effect of the natural product pectolarigenin on glioblastoma through promoting CDK1 protein degradation by increasing autophagic flux[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 887294.
- [11] Rahman MA, Park MN, Rahman MH, et al. p53 modulation of autophagy signaling in cancer therapies: perspectives mechanism and therapeutic targets[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 761080.
- [12] Yang PM, Lin LS, Liu T-P. Sorafenib inhibits ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2) in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 117.
- [13] 冯松, 张小东, 覃亚亚, 等. 基于网络药理学分析瑞香素抗多种肿瘤的作用机制及体外实验验证[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(1): 144–152.
- [14] Lei Y, Klionsky DJ. The emerging roles of autophagy in human diseases[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1651.
- [15] Miller DR, Thorburn A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(7): 906–918.
- [16] Ishaq M, Ojha R, Sharma AP, et al. Autophagy in cancer: Recent advances and future directions[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 66: 171–181.
- [17] 张进, 王顺和, 汪兰, 等. 人参皂苷 Rg1 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬延缓小鼠脑衰老的研究[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(7): 987–993.
- [18] 阎希芮, 王艺蓉, 楚敏, 等. D-半乳糖通过 p53 调节自噬和凋亡损伤小鼠耳蜗毛细胞[J]. *中华耳科学杂志*, 2025, 23(01): 101–107.
- [19] Rahman MA, Park MN, Rahman MH, et al. p53 modulation of autophagy signaling in cancer therapies: perspectives mechanism and therapeutic targets[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 761080.
- [20] Zhu J, Ao H, Liu M, et al. UBE2T promotes autophagy via the p53/AMPK/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1): 374.
- [21] Xu Z, Han X, Ou D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(2): 575–587.
- [22] Hill SM, Wrobel L, Rubinsztein DC. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2019, 26(4): 617–629.
- [23] Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un) related functions[J]. *FASEB Journal*, 2016, 30(12): 3961–3978.
- [24] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [25] Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1405.
- [26] Tao M, Liu T, You Q, et al. p62 as a therapeutic target for tumor[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 193: 112231.
- [27] 梅峥嵘, 洪晔, 袁中文, 等. 瑞香素对阿尔茨海默病模型小鼠自噬的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(17): 2198–2203.
- [28] Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, et al. Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 134: 116–137.
- [29] Meyer N, Henkel L, Linder B, et al. Autophagy activation, lipotoxicity and lysosomal membrane permeabilization synergize to promote pimozone- and loperamide-induced glioma cell death[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3424–3443.

(收稿日期: 2024-10-18

修回日期: 2024-11-24)