

## 小檗碱对人胶质瘤 T98G 细胞迁移和侵袭的抑制作用及其机制

孙玉学<sup>1</sup>, 刘自强<sup>1</sup>, 吴豪<sup>2</sup>, 赵黎明<sup>1</sup>, 高涛<sup>1</sup>, 黄海燕<sup>3</sup>, 栗超跃<sup>1</sup>

(1. 河南省人民医院神经外科, 河南 郑州 450000; 2. 河南省人民医院重症医学科, 河南 郑州 450000;  
3. 吉林大学第一医院神经外科, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** **目的:** 探讨小檗碱 (BBR) 对人胶质瘤 T98G 细胞脂肪酸的调控作用及细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 阐明其潜在的作用机制。**方法:** 对数生长期 T98G 细胞分为对照组和不同浓度 (25、50 及 100 mg·L<sup>-1</sup>) BBR 组, 采用细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移率, Transwell 小室实验检测各组细胞侵袭率。对数生长期 T98G 细胞分为对照组和 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR 组, 质谱法检测 2 组细胞中脂肪酸含量。对数生长期 T98G 细胞分为对照组和不同浓度 (50、100 及 150 mg·L<sup>-1</sup>) BBR 组, 采用 Western blotting 法检测各组细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、磷酸化 AKT (p-AKT)、固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP-1) 和脂肪酸合成酶 (FASN) 蛋白表达水平。应用基因沉默技术抑制 FASN 表达, 将对数生长期 T98G 细胞分为对照组、shFASN1 组和 shFASN2 组, 采用 Western blotting 法检测各组细胞中 FASN 蛋白表达水平, 克隆形成实验检测各组细胞克隆形成情况, 细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移率。**结果:** 与对照组比较, 不同浓度 BBR 组细胞迁移率和侵袭率呈浓度依赖性降低 ( $P < 0.01$ ), 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR 组细胞中各类脂肪酸含量明显降低 ( $P < 0.01$ )。与对照组比较, 150 mg·L<sup>-1</sup> BBR 组细胞中 p-PI3K、p-AKT、SREBP-1 和 FASN 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 100 和 150 mg·L<sup>-1</sup> BBR 组细胞中 SREBP-1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。抑制 FASN 表达后, 与对照组比较, shFASN1 组和 shFASN2 组细胞中 FASN 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且 shFASN2 组细胞中 FASN 蛋白表达水平低于 shFASN1 组 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, shFASN1 组和 shFASN2 组细胞中克隆形成数明显减少, 细胞迁移率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且 shFASN2 组细胞迁移率明显低于 shFASN1 组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** BBR 通过降低细胞中 PI3K/AKT/SREBP-1/FASN 通路相关蛋白的表达干扰胶质瘤 T98G 细胞中脂肪酸合成, 进而降低其迁移和侵袭能力。

**[关键词]** 小檗碱; 胶质瘤; 脂肪酸; 细胞迁移; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R285.5; R739.41 **[文献标志码]** A

## Inhibitory effect of berberine on migration and invasion of human glioma T98G cells and its mechanism

SUN Yuxue<sup>1</sup>, LIU Ziqiang<sup>1</sup>, WU Hao<sup>2</sup>, ZHAO Liming<sup>1</sup>, GAO Tao<sup>1</sup>, HUANG Haiyan<sup>3</sup>, LI Chaoyue<sup>1</sup>

(1. Department of Neurosurgery, People's Hospital, Henan Province, Zhengzhou 45000, China;  
2. Department of Intensive Care Medicine, People's Hospital, Henan Province, Zhengzhou 45000, China;  
3. Department of Neurosurgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the regulatory effect of berberine (BBR) on fatty acids in the human glioma T98G cells and its effect on the cell proliferation, migration, and invasion, and to clarify its potential

**[收稿日期]** 2023-04-10

**[基金项目]** 河南省科技厅自然科学基金项目 (222300420359); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20180101158JC)

**[作者简介]** 孙玉学 (1986—), 男, 河南省新乡市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事胶质瘤发病机制和治疗方面的研究。

**[通信作者]** 栗超跃, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: lichao Yue@zju.edu.cn)

mechanism. **Methods:** The T98G cells at logarithmic growth phase were divided into control group and different concentrations (25, 50, and 100 mg·L<sup>-1</sup>) of BBR groups. Cell wound healing assay was used to detect the migration rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the invasion rates of the cells in various groups. The T98G cells at logarithmic growth phase were divided into control group and 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR group, and Mass spectrometry was used to detect the fatty acid contents in the cells in two groups. The T98G cells at logarithmic growth phase were divided into control group and different concentrations (50, 100, and 150 mg·L<sup>-1</sup>) of BBR groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), and fatty acid synthase (FASN) in the cells in various groups. The expression of FASN was suppressed by gene silencing technology, and the T98G cells at logarithmic growth phase were divided into control group, shFASN1 group, and shFASN2 group. Western blotting method was used to detect the expression levels of FASN protein in the cells in various groups; clone formation assay was used to detect the clone formation of the cells in various groups; cell wound healing assay was used to detect the migration rates of the cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the migration rates and invasion rates of the cells in different concentrations of BBR groups were decreased in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ), and the fatty acid content in the cells in 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the expression levels of p-PI3K, p-AKT, SREBP-1, and FASN proteins in the cells in 150 mg·L<sup>-1</sup> BBR group were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the expression level of SREBP-1 protein in the cells in 100 and 150 mg·L<sup>-1</sup> BBR groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). After suppression of FASN expression, compared with control group, the expression levels of FASN protein in the cells in shFASN1 and shFASN2 groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression level of FASN protein in the cells in shFASN2 group was lower than that in shFASN1 group ( $P < 0.05$ ); compared with control group, the numbers of clone formation and migration rates of the cells in shFASN1 and shFASN2 groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the migration rate of the cells in shFASN2 group was significantly lower than that in shFASN1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** BBR interferes with fatty acid synthesis in the glioma T98G cells by reducing the expression of the PI3K/AKT/SREBP-1/FASN pathway related proteins, and decrease their migration and invasion capabilities.

**KEYWORDS** Berberine; Glioma; Fatty acid; Cell migration; Cell invasion

胶质瘤是最常见的颅内原发性恶性肿瘤, 由于其浸润性生长和放化疗抵抗, 预后较差, 因此胶质瘤的治疗一直是研究的热点<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示: 脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, FASN) 水平与胶质瘤的世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 分级呈正相关关系, 减肥药奥利司他可明显抑制 FASN 表达, 进而有效抑制胶质瘤的增殖。YASUMOTO 等<sup>[4]</sup>报道: 抑制 FASN 表达能有效抑制胶质瘤干细胞球的形成, 表明 FASN 与胶质瘤细胞增殖、侵袭及其恶性程度有密切关联。因此, 干扰胶质瘤脂肪酸合成的药物具有治疗胶质瘤的潜在价值。

TAN 等<sup>[5]</sup>研究发现: 小檗碱 (berberine, BBR) 具有抑制乳腺癌细胞中脂肪酸合成关键酶 FASN 的作用, 可通过抑制脂类合成有效抑制乳腺

癌生长。BBR 为黄连提取物, 是天然中药, 安全性高且对脑部缺血再灌注损伤具有保护作用<sup>[6]</sup>。既往研究<sup>[7-8]</sup>显示: BBR 可以通过多个位点抑制胶质瘤生长。目前胶质瘤化疗药物主要为替莫唑胺, 但 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 能够修复替莫唑胺导致的 DNA 损伤, 使替莫唑胺化疗效果减弱, 因此本研究选取 MGMT 高表达且对替莫唑胺敏感性较差的 T98G 胶质瘤细胞<sup>[9]</sup>, 探讨 BBR 通过调控胶质瘤细胞中脂肪酸合成进而抑制胶质细胞瘤迁移和侵袭的作用, 为治疗 MGMT 高表达的胶质瘤提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人胶质瘤 T98G 细胞和 293T 细胞购自美国典型菌种保藏中心

(American Type Culture Collection, ATCC) 细胞库。BBR (四川克洛玛生物科技有限公司) 溶于 DMSO 制备  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  母液备用。DMEM、MEM 和 Opti MEM 培养基及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司), 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 和  $\beta$ -actin 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), 固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein-1, SREBP-1) 和 FASN 抗体 (英国 Abcam 公司), RIPA 裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒 (南京碧云天生物技术有限公司), shFASN 空载质粒、shFASN 干扰质粒 1 和 shFASN 干扰质粒 2 (上海权阳生物科技有限公司), Lipo2000 转染试剂 (美国 ThermoFisher 公司)。倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 电泳仪和转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

**1.2 细胞培养及传代** 人胶质瘤 T98G 细胞采用含有 10% FBS 的 MEM 培养基培养, 293T 细胞采用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度的培养箱中培养, 2~3 d 更换 1 次培养基, 融合度达到 80% 时进行传代, 取对数生长期细胞进行后续实验。

**1.3 细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移率** 收集对数生长期 T98G 细胞并调整细胞密度为  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 接种于 6 孔细胞培养板中, 分为对照组和不同浓度 (25、50 及  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) BBR 组, 每组设 3 个复孔, 恒温培养箱中过夜。观察细胞长满, 白色  $10 \mu\text{L}$  枪头垂直划痕。洗除划下的细胞, 分别加入含 0、25、50 和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR 的无血清培养基, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度的恒温培养箱中培养, 0 和 24 h 时取样, 采集图像。实验重复 3 次, 计算各组细胞迁移率。细胞迁移率 =  $(0 \text{ h 划痕宽度} - 24 \text{ h 划痕宽度}) / 0 \text{ h 划痕宽度} \times 100\%$ 。

**1.4 Transwell 小室实验检测各组细胞侵袭率** 实验前 1 d 将基质胶 ( $8 \sim 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中融化过夜, 基质胶采用预冷的无血清 MEM 按 1:9 稀释 (稀释至  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每孔中加入  $40 \mu\text{L}$  稀释好的基质胶, 于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 5 h。水化基底膜: 吸出小室中残余液体, 每孔加入  $70 \mu\text{L}$  无血清 MEM 培养液,  $37^\circ\text{C}$  作用 30 min, 吸去培养基; 取对数生长期 T98G 细胞, 细胞分组见 “1.3”, 每

孔中加  $2 \times 10^5$  个细胞, 24 孔细胞培养板下室加入  $600 \mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的培养基, 继续培养 24 h。避光处分别将 0、25、50 和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR 加入各孔中, 每组设 3 个复孔。24 h 后弃去孔中培养基, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色, 取下 Transwell 滤膜。200 倍显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞并计数, 采集图像。计算细胞侵袭率。细胞侵袭率 = 实验组穿膜细胞数 / 对照组穿膜细胞数  $\times 100\%$ 。

**1.5 质谱法检测 2 组细胞中脂肪酸含量** 色谱柱: TG-5MS ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ ); 升温程序:  $80^\circ\text{C}$  保持 1 min, 以  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升温至  $200^\circ\text{C}$ , 然后以  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升温至  $250^\circ\text{C}$ , 再以  $2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升温至  $270^\circ\text{C}$ , 保持 3 min。进样口温度  $290^\circ\text{C}$ , 载气流速  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 不分流进样, 开阀时间 1 min。质谱条件: 离子源温度  $280^\circ\text{C}$ , 传输线温度  $280^\circ\text{C}$ , 溶剂延迟时间 5 min。扫描范围  $30 \sim 400 \text{ amu}$ , 电子轰击离子源 (electron impact ion source, EI)  $70 \text{ eV}$ 。对数生长期 T98G 细胞培养至细胞融合 70% 左右, 分为对照组和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR 组, 分别加入等量 DMSO 和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR, 培养 48 h, 洗涤收集冻存, 共收集约 100 mg 细胞样品。称取 80 mg 样品加入  $100 \mu\text{L}$  十九烷酸甲酯内标。继续加入 2% 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL,  $85^\circ\text{C}$  水浴锅中水浴 30 min, 加入 14% 三氟化硼甲醇溶液 3 mL, 于  $85^\circ\text{C}$  水浴锅中水浴 30 min。水浴完成后, 温度降至室温, 将 1 mL 正己烷加入至离心管中, 震荡萃取静置分层。取上层清液加入  $100 \mu\text{L}$  正己烷定容至 1 mL, 滤膜滤过上机检测细胞中各类脂肪酸含量。

**1.6 Western blotting 法检测各组细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1 和 FASN 蛋白表达水平** 对数生长期 T98G 细胞分为对照组和不同浓度 (50、100 及  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) BBR 组, 于冰上收集各组细胞, 采用预冷的 PBS 缓冲液漂洗细胞。适量 RIPA 裂解液裂解细胞, 取上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白上样量为  $30 \sim 50 \mu\text{g}$ , PVDF 膜转膜。TBS 配置的 5% 脱脂奶粉常温封闭 1 h, 加入对应稀释的一抗 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1 和 FASN 抗体,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 加入对应的二抗孵育 1 h, 洗膜; 加入 ECL 显色液作用 20 s。应用凝胶成像系统采集条带图集。采用 AlphaEaseFC 软件分

析蛋白条带灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值 $\times 100\%$ 。

### 1.7 shFASN 慢病毒包装质粒及转染 T98G 细胞

收集对数生长期 293T 细胞进行计数, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 培养箱中过夜。将  $1.5 \mu\text{g}$  包装混合质粒和  $0.5 \mu\text{g}$  表达质粒 (空载质粒、shFASN1 质粒和 shFASN2 质粒) 加入至  $250 \mu\text{L}$  无血清 Opti MEM 中。轻轻吹打混匀, 室温孵育 5 min。取  $1.5 \text{ mL}$  灭菌 EP 管, Lipo2000 溶于  $250 \mu\text{L}$  无血清 Opti MEM 培养基, 吹打混匀。室温孵育 5 min。将 DNA 溶液和 Lipo2000 溶液吹打混匀, 室温孵育 20 min。将 DNA-Lipo2000 加入  $1 \text{ mL}$  Opti MEM 培养基中, 轻柔混匀。去除原培养基, 将  $1.5 \text{ mL}$  含有 DNA-Lipo2000 复合物的培养基加入至培养孔中, 培养过夜。移除原培养基, 补充含  $10\%$  FBS 的新鲜 MEM 培养基  $1.5 \text{ mL}$ 。转染后 48 h 收获含病毒的上清, 离心后测定病毒滴度备用。细胞转染: 收集对数生长期 T98G 细胞并计数, 调整细胞密度为  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔  $1 \text{ mL}$  细胞混悬液, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  和饱和湿度的恒温培养箱中过夜。根据细胞数量加入适量慢病毒, 继续培养过夜。荧光显微镜 (激发波长为  $460 \sim 550 \text{ nm}$ ) 观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达情况, 转染慢病毒细胞呈绿色, 去除含病毒培养基, 加入  $2 \text{ mL}$  新鲜培养基继续培养 24 h。加入适量嘌呤霉素进行转染细胞筛选。根据病毒转染情况将 T98G

细胞分为对照组、shFASN1 组和 shFASN2 组, 采用 Western blotting 法检测各组细胞中 FASN 蛋白表达水平, 方法见 “1.6”。

### 1.8 克隆形成实验及细胞划痕愈合实验检测各组细胞克隆形成情况和细胞迁移率

收集 shFASN 稳定转染的各组 T98G 细胞进行计数, 调整细胞密度为  $1 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ , 接种于 6 孔细胞培养板中, 每组设 3 个复孔, 每孔  $1 \text{ mL}$  细胞混悬液, 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  和饱和湿度的恒温培养箱中过夜。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 约 10 d 终止培养。加入  $4\%$  多聚甲醛  $2 \text{ mL}$  室温避光固定细胞 20 min, 加入适量  $1\%$  结晶紫溶液染色 10 min, 洗去染色液干燥。低倍显微镜观察大于 50 个细胞的克隆形成情况。细胞分组同上, 采用细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移率, 方法见 “1.3”。

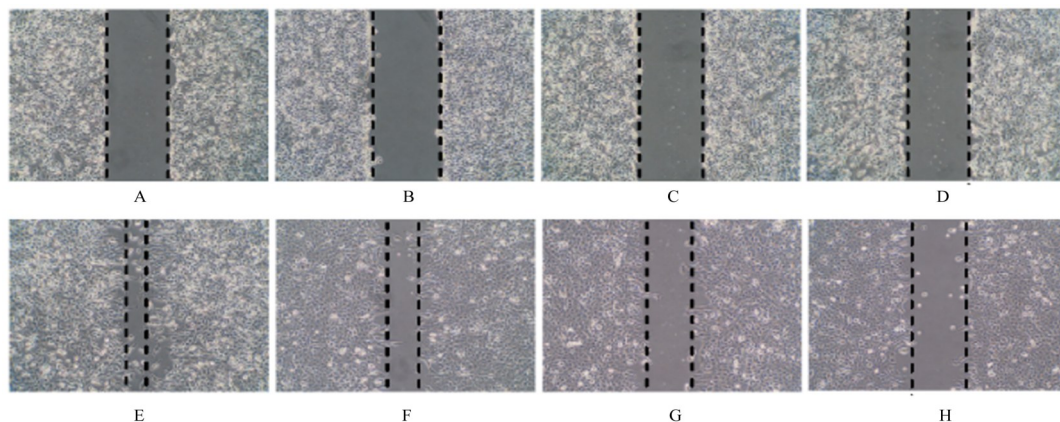
### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞迁移率和细胞侵袭率, 各类脂肪酸含量和各组细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1 及 FASN 蛋白表达水平, 均呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间样本均数比较采用两独立样本  $t$  检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞迁移率和侵袭率

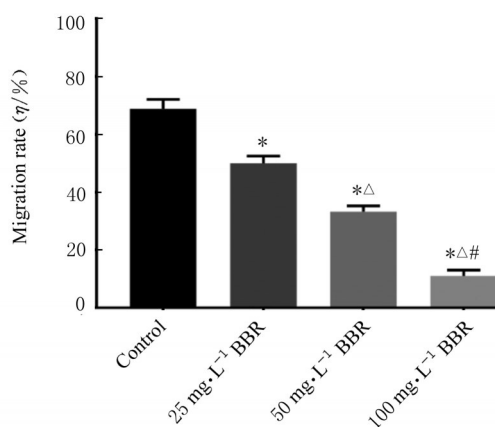
与对照组比较, 不同浓度 BBR 组细胞迁移距离呈浓度依赖性减少, 细胞迁移率呈浓度依赖性降低 ( $P < 0.01$ )。见图 1 和 2。



A—D: 0h; E—H: 24 h; A, E: Control group; B, F:  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR group; C, G:  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR group; D, H:  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BBR group.

图1 细胞划痕愈合实验检测各组细胞迁移情况( $\times 100$ )

Fig. 1 Migration of cells in various groups detected by cell scratch healing assay( $\times 100$ )



\* $P < 0.01$  compared with control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with 25 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; # $P < 0.01$  compared with 50 mg·L<sup>-1</sup> BBR group.

图2 各组细胞迁移率

Fig. 2 Migration rates of cells in various groups

与对照组比较,不同浓度BBR组跨膜细胞数呈浓度依赖性减少,细胞侵袭率呈浓度依赖性降低( $P < 0.01$ )。见图3和4。

**2.2 2组细胞中脂肪酸含量** 与对照组比较,100 mg·L<sup>-1</sup> BBR组细胞中各类脂肪酸含量明显降低( $P < 0.01$ )。见表1。

**2.3 各组细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1和FASN蛋白表达水平** 与对照组比较,100和150 mg·L<sup>-1</sup> BBR组细胞中p-PI3K、p-AKT和FASN蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),150 mg·L<sup>-1</sup> BBR组细胞中SREBP-1蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),不同浓度BBR组细胞中PI3K和AKT蛋白表达水平差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图5和表2。

**2.4 沉默FASN基因后各组细胞中FASN蛋白表达水平** 与对照组(100.12%±6.22%)比较,shFASN1组和shFASN2组细胞中FASN蛋白表达

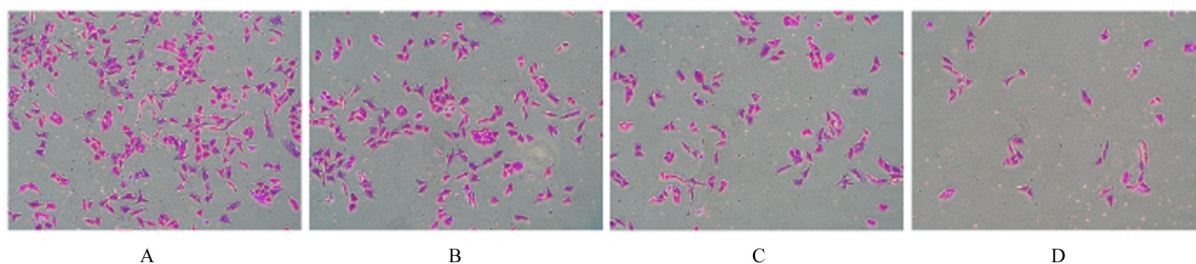
水平(65.75%±12.34%和50.26%±8.15%)明显降低( $P < 0.01$ );与shFASN1组比较,shFASN2组细胞中FASN蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。见图6。

**2.5 沉默FASN基因后各组细胞中克隆形成数和细胞迁移率** 与对照组比较,shFASN1组和shFASN2组细胞中克隆形成数明显减少;与shFASN1组比较,shFASN2组细胞中克隆形成数进一步减少。见图7。与对照组(75%±3%)比较,shFASN1组和shFASN2组细胞迁移率(52%±3%和30%±2%)明显降低( $P < 0.01$ );与shFASN1组比较,shFASN2组细胞迁移率进一步降低( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

胶质瘤的快速生长和侵袭给胶质瘤的治疗带来了众多挑战,而胶质瘤的特点之一是过多合成和利用脂类物质,尤其是脂肪酸在胶质瘤细胞突触形成和生物合成中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示:FASN的表达水平与胶质瘤WHO分级呈正相关关系。在星形胶质瘤细胞、反应性星形胶质细胞和巨噬细胞共存的组织中,脂肪酸生物合成增加,并与复发性胶质母细胞瘤患者生存期较短有密切关联<sup>[1]</sup>,而肿瘤的生长能力也主要取决于肿瘤本身蛋白质和脂肪合成的能力<sup>[11]</sup>。脂肪酸是细胞器和生物膜的重要组成成分,在肿瘤增殖和迁移过程中发挥重要作用<sup>[10,12]</sup>,下调脂肪酸合成能够抑制肿瘤生长<sup>[13]</sup>,脂肪酸合成可促进胶质瘤恶性进展<sup>[14]</sup>。因此抑制胶质瘤脂肪酸合成对于胶质瘤的治疗具有重要的临床价值。

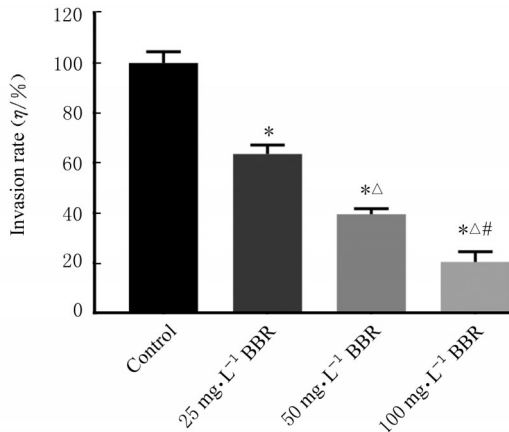
MGMT高表达的T98G胶质瘤细胞对替莫唑胺相对不敏感<sup>[9]</sup>。本研究结果显示:BBR作用于胶质瘤T98G细胞后,其迁移和侵袭能力明显降



A: Control group; B: 25 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; C: 50 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; D: 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR group.

图3 Transwell小室实验检测各组细胞侵袭情况(结晶紫,×200)

Fig. 3 Invasion of cells in various groups detected by Transwell chamber assay (Crystal violet, ×200)



\* $P < 0.01$  compared with control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with 25 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; # $P < 0.01$  compared with 50 mg·L<sup>-1</sup> BBR group.

图4 各组细胞侵袭率

Fig. 4 Invasion rates of cells in various groups

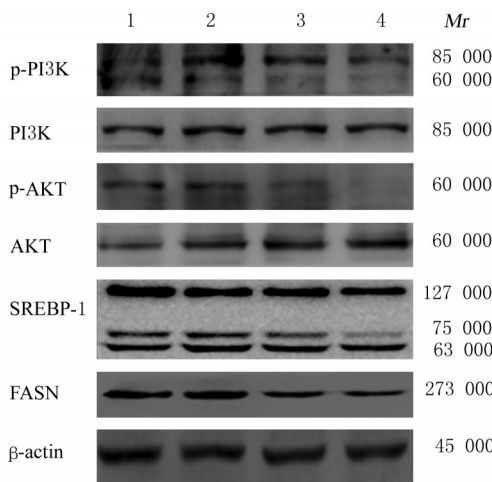
表1 2组细胞中各类脂肪酸含量

Tab. 1 Contents of fatty acids in cells in two groups

( $n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Saturated fatty acid	Mono-unsaturated fatty acid	Polyunsaturated fatty acid	Total fatty acid
Control	100.03 ± 5.33	103.26 ± 3.18	103.25 ± 3.17	102.43 ± 2.43
100 mg·L <sup>-1</sup> BBR	60.46 ± 2.35*	64.43 ± 1.32*	70.49 ± 2.01*	65.23 ± 2.13*

\* $P < 0.01$  compared with control group.



Lane 1: Control group; Lane 2: 50 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; Lane 3: 100 mg·L<sup>-1</sup> BBR group; Lane 4: 150 mg·L<sup>-1</sup> BBR group.

图5 Western blotting 法检测各组细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1 和 FASN 蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, SREBP-1, and FASN proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

低, 表明 BBR 对 T98G 细胞有明显的抑制作用。采用胶质瘤 GL261 细胞制备脑内成瘤模型, 质谱成像法定量检测结果<sup>[15]</sup>显示: 胶质瘤组织中脂肪酸延长酶活性是周围健康脑组织的 8 倍, 表明 FASN 在胶质瘤中发挥重要作用。本研究采用质谱法对胶质瘤 T98G 细胞中脂肪酸含量进行检测, 结果显示: 与对照组比较, BBR 作用于胶质瘤 T98G 细胞后细胞中脂肪酸含量明显降低, 说明 BBR 具有降低胶质瘤细胞内脂肪酸含量作用。在脂肪酸合成过程中 FASN 发挥重要作用, 是脂肪酸合成的关键酶<sup>[16]</sup>, 研究<sup>[17-18]</sup>显示: 肿瘤细胞通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 进一步提高 FASN 表达, 促进肿瘤细胞中脂肪酸合成。SREBP-1 为 FASN 上游蛋白, 在脂肪酸合成和脂肪酸链延伸过程中发挥重要

作用<sup>[19-20]</sup>, SREBP-1 可出现可变剪切, 显示为多条带。抑制 SREBP-1 表达与减少脂肪酸合成有关。研究<sup>[21]</sup>显示: 降低 SREBP-1 的表达可抑制胶质瘤 C6 细胞脂肪酸合成。因此, SREBP-1 和 FASN 在胶质瘤的脂肪酸合成过程中发挥关键作用。

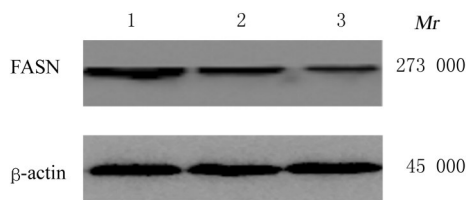
本研究进一步探讨 BBR 降低 T98G 细胞中脂肪酸含量的机制。当 BBR 作用于胶质瘤 T98G 细胞后, p-PI3K 蛋白呈现双条带, 显示 p85 和 p55 2 个磷酸化位点均受到 BBR 抑制<sup>[22]</sup>, p-PI3K 蛋白表达水平降低, 而 p-AKT、SREBP-1 和 FASN 蛋白均出现下调, 表明 BBR 在胶质瘤 T98G 细胞中可以抑制 p-PI3K、p-AKT、SREBP-1 和 FASN 蛋白表达, 并且呈浓度依赖性。脂肪酸合成的主要转录调控因子 SREBP-1 的断裂和核易位由 AKT 介导<sup>[16]</sup>, 在结肠癌中, 放射治疗敏感性增加与抑制 FASN 活性和 PI3K/AKT 磷酸化有关联<sup>[23]</sup>, 而 SREBP-1/FASN 受 PI3K/AKT 信号通路调控<sup>[24]</sup>。本研究结果表明: BBR 降低胶质瘤 T98G 细胞中脂肪酸含量及抑制胶质瘤细胞迁移和侵袭, 与 PI3K/AKT/SREBP-1/FASN 信号通路调控有关联。为进一步验证 FASN 表达与 T98G 胶质瘤细胞迁移和侵袭能

表2 各组细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、SREBP-1和FASN蛋白表达水平

Tab. 2 Expression levels of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, SREBP-1, and FASN proteins in cells in various groups

 $(n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%)$ 

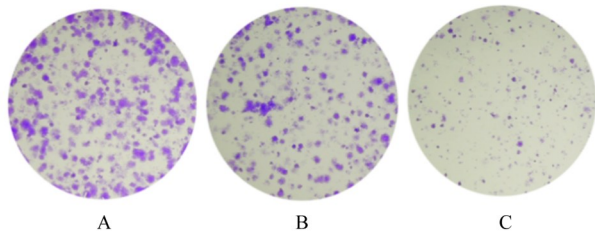
Group	p-PI3K protein	PI3K protein	p-AKT protein	AKT protein	SREBP-1 protein	FASN protein
Control	100.05±3.03	100.03±5.11	100.02±6.12	100.12±2.51	100.11±5.32	100.23±7.92
BBR(mg·L <sup>-1</sup> )						
50	97.23±8.33	123.93±7.58	88.73±7.23	128.65±3.45	92.12±9.15	92.33±6.43
100	74.22±6.18*	116.25±8.59	58.32±11.02**	130.04±6.52	88.32±7.95	85.78±8.11*
150	67.95±15.32**	112.21±5.23	9.45±6.56**	132.29±4.67	77.28±13.12**	73.43±9.13**

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

Lane 1: Control group; Lane 2: ShFASN1 group; Lane 3: ShFASN2 group.

图6 沉默FASN基因后各组细胞中FASN蛋白表达电泳图

Fig. 6 Electrophoregram of expression of FASN protein in cells in various groups after silencing FASN gene



A: Control group; B: ShFASN1 group; C: ShFASN2 group.

图7 克隆形成实验检测沉默FASN基因后各组细胞中克隆形成情况(结晶紫)

Fig. 7 Clone formation of cells in various groups after silencing FASN gene detected by clone formation assay (Crystal violet)

力的关系,采用基因沉默技术干扰胶质瘤T98G细胞中FASN蛋白表达,结果显示:抑制FASN蛋白表达后T98G细胞克隆形成数明显减少,而细胞克隆可以反映细胞群体依赖性和增殖能力,也可以反映肿瘤的恶性程度,表明抑制FASN蛋白表达可明显抑制胶质瘤细胞增殖;同时胶质瘤T98G细胞迁移率明显降低,表明通过抑制FASN蛋白表达可以有效抑制胶质瘤T98G细胞的迁移能力。

综上所述,BBR可通过PI3K/AKT/SREBP-1/FASN信号通路干扰胶质瘤细胞中脂肪酸合成,进而抑制MGMT高表达的胶质瘤T98G细胞迁移及侵袭能力。本研究结果将为研发以BBR为有效成分的天然药物治疗胶质瘤提供参考。

## 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

## 作者贡献声明:

孙玉学和刘自强参与研究实施过程、数据采集和论文撰写,吴豪和高涛参与数据的统计学分析,赵黎明参与文献整理和分析,黄海燕参与研究方案制定,栗超跃参与论文修订和审校。

## [参考文献]

- [1] AL-DALAHMAH O, ARGENZIANO M G, KANNAN A, et al. Re-convolving the compositional landscape of primary and recurrent glioblastoma reveals prognostic and targetable tissue states[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2586.
- [2] WANG L M, ENGLANDER Z K, MILLER M L, et al. Malignant glioma[J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1405: 1-30.
- [3] GRUBE S, DÜNISCH P, FREITAG D, et al. Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis[J]. J Neurooncol, 2014, 118(2): 277-287.
- [4] YASUMOTO Y, MIYAZAKI H, VAIDYAN L K, et al. Inhibition of fatty acid synthase decreases expression of stemness markers in glioma stem cells[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147717.
- [5] TAN W, ZHONG Z F, WANG S P, et al. Berberine regulated lipid metabolism in the presence of C75, compound C, and TOFA in breast cancer cell line

- MCF-7 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 396035.
- [6] WANG X Y, ZHANG J M, WANG S S, et al. Berberine modulates gut microbiota to attenuate cerebral ferroptosis induced by ischemia-reperfusion in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175782.
- [7] SUN Y X, HUANG H Y, ZHAN Z X, et al. Berberine inhibits glioma cell migration and invasion by suppressing TGF- $\beta$ 1/COL11A1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 625: 38-45.
- [8] LIU Z Q, CHEN Y, GAO H J, et al. Berberine inhibits cell proliferation by interfering with wild-type and mutant P53 in human glioma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12151-12162.
- [9] TSUJI S, NAKAMURA S, SHODA K, et al. NMDA receptor signaling induces the chemoresistance of temozolomide via upregulation of MGMT expression in glioblastoma cells [J]. *J Neurooncol*, 2022, 160 (2): 375-388.
- [10] RÖHRIG F, SCHULZE A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 732-749.
- [11] FLÖTER J, KAYMAK I, SCHULZE A. Regulation of metabolic activity by p53 [J]. *Metabolites*, 2017, 7(2): 21.
- [12] BRAULT C, SCHULZE A. The role of glucose and lipid metabolism in growth and survival of cancer cells [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2016, 207: 1-22.
- [13] FLAVENY C A, GRIFFETT K, EL-GENDY B E L D, et al. Broad anti-tumor activity of a small molecule that selectively targets the Warburg effect and lipogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(1): 42-56.
- [14] ZHAN Y, QIAO W, YI B L, et al. Dual role of pseudogene TMEM198B in promoting lipid metabolism and immune escape of glioma cells [J]. *Oncogene*, 2022, 41(40): 4512-4523.
- [15] SCHWAIGER-HABER M, STANCLIFFE E, ANBUKUMAR D S, et al. Using mass spectrometry imaging to map fluxes quantitatively in the tumor ecosystem [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2876.
- [16] GUO D L, PRINS R M, DANG J L, et al. EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antilipogenic therapy [J]. *Sci Signal*, 2009, 2 (101): ra82.
- [17] LI L, PILO G M, LI X L, et al. Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(2): 333-341.
- [18] ZAYTSEVA Y Y, RYCHAHOU P G, GULHATI P, et al. Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1504-1517.
- [19] OSBORNE T F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(42): 32379-32382.
- [20] HORTON J D, GOLDSTEIN J L, BROWN M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [21] DAMIANO F, GIANNOTTI L, GNONI G V, et al. Quercetin inhibition of SREBPs and ChREBP expression results in reduced cholesterol and fatty acid synthesis in C6 glioma cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 117: 105618.
- [22] RUSH J, MORITZ A, LEE K A, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 94-101.
- [23] HAN L Y, DAI W X, LUO W Q, et al. Enhanced *de novo* lipid synthesis mediated by FASN induces chemoresistance in colorectal cancer [J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 562.
- [24] ZHU L, DU W, LIU Y P, et al. Prolonged high-glucose exposure decreased SREBP-1/FASN/ACC in Schwann cells of diabetic mice via blocking PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5777-5789.