

度洛西汀通过诱导 G0/G1 期细胞周期阻滞抑制神经胶质瘤生长的机制研究

曾巽凌^{1,2}, 郑湘锦², 李晨², 李悦³, 陈孟莉²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100853; ³解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853

摘要:背景 已有研究发现度洛西汀(duloxetine, DUL)对肺癌及胰腺癌细胞具有细胞毒性作用, 但其对胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的作用及潜在机制尚不明确。目的 研究度洛西汀对 GBM 的抗肿瘤作用及潜在机制。方法 采用不同浓度度洛西汀(10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$)分别处理人胶质母细胞瘤细胞系 U87 和 U251, 设置空白对照组和 300 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺(temozolomide, TMZ)处理组作为对照。通过 CCK-8 和 Transwell 实验评估度洛西汀对 GBM 细胞增殖、迁移和侵袭的影响; 流式细胞术检测细胞周期分布; 结合转录组测序分析潜在机制; 通过 qPCR 和 Western blot 实验检测 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)、p21 和 p27 的 mRNA 和蛋白表达水平; 使用 Autodock Vina 分子对接软件模拟度洛西汀与 Skp2 蛋白的结合能力。结果 度洛西汀抑制 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.05$)。在 U87 细胞中, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀处理组的活性抑制率分别 18.06% \pm 3.91%、47.37% \pm 1.42% 和 64.85% \pm 0.90%(均 $P < 0.001$), 相比对照组提高了 G0/G1 期细胞比例(64.76% \pm 1.2%、72.18% \pm 1.22%、79.03% \pm 2.25% vs 55.72% \pm 0.91%, 均 $P < 0.001$)。转录组测序及验证实验表明, 度洛西汀可下调 Skp2 的 mRNA 和蛋白表达, 同时上调 p21 和 p27 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$)。分子对接结果显示度洛西汀与 Skp2 有较高的结合亲和力(-30.96 kJ/mol)。结论 度洛西汀能够抑制 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并通过调控 Skp2-p21/p27 信号通路诱导 G0/G1 期阻滞, 为 GBM 的治疗提供了新的研究思路。

关键词:度洛西汀; 胶质母细胞瘤; 细胞增殖; 细胞周期; S 期蛋白激酶相关蛋白

中图分类号:R737.1

文献标志码:A

文章编号:2095-5227(2025)03-0230-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24120602

引用本文: 曾巽凌, 郑湘锦, 李晨, 等. 度洛西汀通过诱导 G0/G1 期细胞周期阻滞抑制神经胶质瘤生长的机制研究[J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (3): 230-238.

Mechanism of duloxetine inhibiting glioma growth by inducing G0/G1 phase cell cycle arrest

ZENG Xunling^{1,2}, ZHENG Xiangjin², LI Chen², LI Yue³, CHEN Mengli²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Pharmacy, Medical Supplies Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: CHEN Mengli. Email: chenmengli_pla@163.com

Abstract: Background Previous studies have shown that duloxetine (DUL) exhibits cytotoxicity in lung and pancreatic cancer cells, but its effects and mechanisms in glioblastoma (GBM) remain unclear. **Objective** To investigate the anti-tumor effects of duloxetine on GBM and its potential mechanisms. **Methods** Human glioblastoma cell lines U87 and U251 were treated with duloxetine at different concentrations (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$), with a blank control group and a 300 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide (TMZ) treatment group established as controls. CCK-8 and Transwell assays were used to evaluate the effects of duloxetine on cell proliferation, migration, and invasion. Flow cytometry was used to analyze changes in the cell cycle. Potential mechanisms were explored by transcriptome sequencing. The expression of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), p21, and p27 at both mRNA and protein levels was measured using qPCR and Western blotting. Molecular docking was performed using Autodock Vina to simulate the binding affinity between duloxetine and the Skp2 protein. **Results** Duloxetine significantly inhibited GBM cell proliferation, migration, and invasion ($P < 0.05$). In U87 cells, the inhibition rates at 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$ of duloxetine were 18.06% \pm 3.91%, 47.37% \pm 1.42%, and 64.85% \pm 0.90%, respectively ($P < 0.001$). Compared with the control group,

收稿日期: 2024-12-06

基金项目: 省部级课题

第一作者: 曾巽凌, 在读硕士, 药师. Email: zxl970605@163.com

通信作者: 陈孟莉, 博士, 研究员. Email: chenmengli_pla@163.com

duloxetine treatment markedly increased the proportion of U87 cells in the G0/G1 phase ($64.76\% \pm 1.2\%$, $72.18\% \pm 1.22\%$, and $79.03\% \pm 2.25\%$ vs $55.72\% \pm 0.91\%$, $P < 0.001$). RNA-seq and validation experiments demonstrated that duloxetine downregulated Skp2 mRNA and protein expression while upregulating p21 and p27 mRNA and protein levels ($P < 0.05$). Molecular docking revealed that duloxetine exhibited high binding affinity with Skp2 (-30.96 kJ/mol). **Conclusion** Duloxetine inhibits GBM cell proliferation, migration, and invasion, and induces G0/G1 cell cycle arrest by regulating the Skp2-p21/p27 signaling pathway, providing a new perspective for GBM treatment.

Keywords: duloxetine; glioblastoma; cell proliferation; cell cycle; S-phase kinase-associated protein

Cited as: Zeng XL, Zheng XJ, Li CH, et al. Mechanism of duloxetine inhibiting glioma growth by inducing G0/G1 phase cell cycle arrest[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(3): 230-238.

脑胶质瘤是起源于神经胶质细胞的中枢神经系统肿瘤，是最常见的原发恶性脑肿瘤之一，在WHO分级中，胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)为最高级别(IV级)肿瘤，也是最常见和最具侵袭性的胶质瘤类型，占有原发性恶性脑肿瘤的49%^[1]。GBM病程进展迅速，预后差，尽管采用手术、放疗、化疗、靶向治疗等综合治疗措施，患者的生存期仍低于2年^[2]。因此，迫切需要开发针对GBM的新治疗策略，以改善患者的预后。

抑郁症是胶质瘤常见并发症之一^[3]。研究表明，胶质瘤患者的抑郁症发病率是无肿瘤患者的5倍^[4]。抑郁症通过影响免疫反应、慢性应激和内分泌系统等多种生物学途径，显著影响肿瘤的发生和发展^[5]。一项回顾性研究显示，三环类抗抑郁药的使用与胶质瘤风险呈负相关^[6]，氟西汀、舍曲林和艾司西酞普兰等抗抑郁药也已被发现具有抗肿瘤作用^[7-9]。度洛西汀作为选择性5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂，临床上广泛用于治疗抑郁症及慢性疼痛相关疾病^[10]。已有研究表明，度洛西汀对肺癌和胰腺癌具有抗肿瘤作用^[11-12]，但其对GBM的抗肿瘤作用及其潜在机制尚未得到研究。本研究通过对人GBM细胞系U87和U251的体外实验，探讨度洛西汀的抗肿瘤效果及其分子机制，为度洛西汀在GBM治疗中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Multiskan 型全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); Attune Nxt 型流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); CFX96 型实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad, 美国); Mini-PROTEAN 型垂直电泳设备电泳仪(Bio-Rad, 美国)。

1.2 主要药品与试剂

盐酸度洛西汀(批号HY-B0161A, 纯度99.91%)购自美国MedChemExpress公司; 替莫唑

胺(temozolomide, TMZ; 货号HY-17364, 纯度99.96%)购自美国MedChemExpress公司; DMEM培养基(货号C11995500BT)购自美国Gibco公司; 胎牛血清(货号164210-50)购自武汉普诺赛生命科技有限公司; CCK-8试剂盒(货号C0038)购自上海碧云天生物科技有限公司; 细胞周期检测试剂盒(货号CCS012)购自杭州联科生物技术股份有限公司; Skp2、p21、p27和 β -actin抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(货号分别为2652T、2947T、3686T和7074S)购自美国CST公司; 逆转录试剂盒和定量PCR检测试剂盒(货号分别为R423和Q711)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 细胞系与细胞培养

人GBM细胞系U87和U251由中国医学科学院协和药物研究赠予。将U87和U251细胞分别接种于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基(以下称“完全培养基”), 在37°C、5% CO₂的湿润恒温培养箱中培养。实验使用对数生长期的细胞。

1.4 CCK-8实验检测细胞活力

将U87与U251细胞(3×10^3 /孔)接种于96孔板, 每孔加入200 μ L不同浓度的度洛西汀(0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、80、100 μ mol/L)或TMZ(10、50、100、200、300、400、500、600、800、1 000 μ mol/L), 对照组加入完全培养基, 每组设3个复孔。孵育24 h、48 h、72 h后, 弃去培养基, 每孔加入100 μ L 10% CCK-8溶液, 避光孵育40 min后于酶标仪450 nm处测定吸光度(OD值)。细胞增殖抑制率计算公式: 抑制率=(1-实验组OD值/对照组OD值) \times 100%。根据实验结果计算IC₅₀值, 并确定后续实验中度洛西汀的低、中、高浓度组(分别为10、20、30 μ mol/L), TMZ干预浓度为300 μ mol/L, 对照组仅加入完全培养基。

1.5 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭水平

按上文1.4节所述给药浓度, 使用度洛西汀或TMZ干预U87和U251细胞24 h后, 进行迁移实

验。将细胞(4×10^4 /孔)接种于Transwell小室, 上室加入200 μL 无血清培养基, 下室加入600 μL 完全培养基, 孵育19 h(侵袭实验孵育24 h)。在侵袭实验中, 先将基质胶(1:7比例混合, 总量32 μL)铺于Transwell小室上方, 孵育30 min使其凝固后, 放置于培养箱中过夜, 其他步骤与迁移实验一致。孵育结束后, 使用4%多聚甲醛固定细胞, PBS洗涤, 结晶紫染色后晾干。显微镜下拍照并使用Image J软件计数细胞数量。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

取U87和U251细胞进行铺板, 按上文1.4节所述给药浓度, 使用度洛西汀或TMZ干预细胞24 h, 收集PBS洗涤后的细胞, 加入1 mL DNA Staining solution和10 μL Permeabilization solution, 混匀。室温避光孵育30 min后, 使用流式细胞仪检测各组细胞的细胞周期分布情况。

1.7 转录组测序

将U87细胞铺板, 根据上文1.4节所述给药浓度, 使用度洛西汀干预细胞24 h, 随后用PBS洗涤并收集细胞。使用TRIzol法提取总RNA, 并将提取后的RNA样本经液氮速冻后转移至 -80°C 冰箱保存。文库构建和测序由北京易科拜德科技有限公司完成, 使用Illumina Novaseq 6000平台进行测序, 生成150 bp双端读长的测序数据。差异表达基因分析及火山图绘制使用DESeq (2010) R包完成, 筛选标准为校正后的 $P(Q) < 0.005$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 。基因本体(GO)富集分析和KEGG通路分析使用由clusterProfiler软件(V 4.0.1)完成, 通路显著性筛选标准为 $Q < 0.05$ 。

1.8 实时定量PCR实验检测Skp2、p21和p27的mRNA表达

按上文1.4节所述给药浓度, 使用度洛西汀干预细胞24 h, 收集PBS洗涤后的细胞, 用TRIzol法提取总RNA并反转录为cDNA。PCR反应体系为正、反向引物各0.4 μL , cDNA模板5 μL , mix 10 μL , ddH₂O 4.2 μL ; 反应条件为 95°C 预变性5 min, 95°C 变性10 s, 55°C 退火15 s, 72°C 延伸20 s, 循环40次, 72°C 终延伸10 min。以GAPDH为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析Skp2、p27与p21的mRNA表达水平, 并归一化至对照组。PCR引物序列及产物长度见表1。

1.9 Western blot实验检测Skp2、p21和p27的蛋白表达

Western blot实验检测GBM细胞中相关蛋白表

达水平。取U87和U251细胞进行铺板, 按上文1.4节所述给药浓度, 使用度洛西汀和(或)TMZ干预细胞24 h, 收集PBS洗涤后的细胞, 加入蛋白裂解液裂解, 提取总蛋白经定量后进行变性处理。取变性蛋白样品适量, 进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 湿法转膜, 加入含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液于室温下封闭2 h, 洗膜后加入Skp2、p21、p27和 β -actin一抗(稀释比例为1:1 000), 4°C 下孵育过夜。洗膜, 加入相应二抗(稀释比例为1:8 000), 室温下孵育1.5 h。ECL化学发光显影后成像。分析各个条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.10 分子对接模拟

使用AutoDock Vina软件模拟度洛西汀与Skp2蛋白结合情况。于PubChem数据库获取度洛西汀的化学结构, 使用ChemBio 3D软件生成度洛西汀的三维结构并进行构象优化。在蛋白质数据库(PDB, <http://www.rcsb.org>)中获取Skp2蛋白的晶体结构, 去除水分子并添加氢原子和电荷。利用AutoDock Vina软件模拟度洛西汀与Skp2蛋白的分子对接, 选择结合能最低的结合模式进行分析。使用PyMol软件将度洛西汀与Skp2蛋白的相互作用可视化为3D图。

1.11 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析。每个实验至少重复3次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 度洛西汀对GBM细胞活性的影响

与对照组比较, 度洛西汀处理24 h后GBM细胞活性降低, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀对U87的抑制率分别为 $18.06\% \pm 3.91\%$ 、 $47.37\% \pm 1.42\%$ 和 $64.85\% \pm 0.90\%$ (均 $P < 0.001$); 对U251细胞的抑制率分别为 $0.59\% \pm 0.12\%$ 、 $2.98\% \pm 1.55\%$ 和 $35.25\% \pm 1.72\%$ 。度洛西汀对GBM细胞的抑制效果呈浓度依赖性($P < 0.001$), 且U87细胞相较于U251细胞对度洛西汀处理表现出更高的敏感性。在处理U87细胞24 h后, 度洛西汀和TMZ的 IC_{50} 值分别为20.64 $\mu\text{mol/L}$ 和330.10 $\mu\text{mol/L}$, 在处理U251细胞24 h后, 度洛西汀和TMZ的 IC_{50} 值为

表 1 引物序列及产物长度

目的基因	上游 下游	产物长度/bp
Skp2	F: ATGCCCAATCTGTCCATCT R: CACCGACTGAGTGATAGGTGT	111
p27	F: CAGGGAAGCGCATTGTGATC R: GCGTGTCTCAGAGTTAGCACA	180
p21	F: CCTCATCCCGTGTCTCCTTT R: CAGGGCAGAGGAAGTACTGAAG	150
GAPDH	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	101

34.20 $\mu\text{mol/L}$ 和 457.90 $\mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

2.2 度洛西汀对 GBM 细胞迁移和侵袭能力的影响

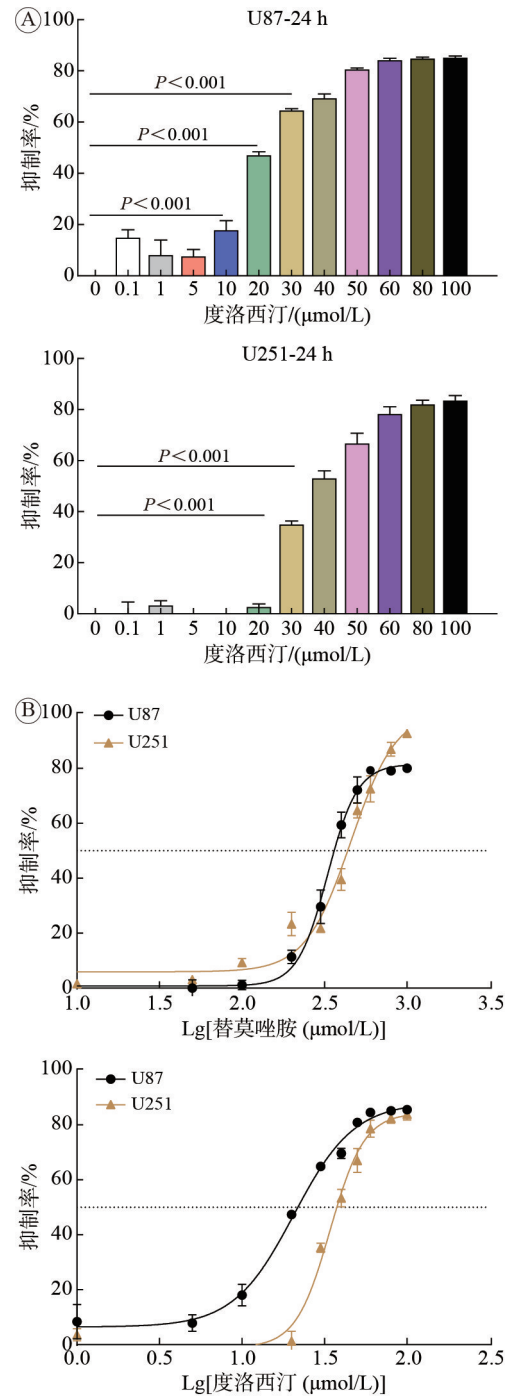
与对照组比较, 经度洛西汀和 TMZ 处理后 GBM 迁移和侵袭细胞数量减少 ($P < 0.001$), 且高浓度度洛西汀组对 GBM 细胞迁移和侵袭的抑制效果优于 TMZ 组 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 度洛西汀对 GBM 细胞周期的影响

与对照组比较, 度洛西汀显著改变了 GBM 细胞周期分布。流式细胞术结果显示, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀处理后, U87 细胞 G0/G1 期的比例分别为 64.76% \pm 1.2%、72.18% \pm 1.22% 和 79.03% \pm 2.25%, 显著高于对照组的 55.72% \pm 0.91% (P 均 < 0.001); 同时, S 期细胞的比例下降, 对照组为 35.7% \pm 2.42%, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组分别降至 23.51% \pm 1.98%、15.1% \pm 1.22% 和 14.11% \pm 1.63% (均 $P < 0.001$)。在 U251 细胞中, 仅 30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀处理增加了 G0/G1 期细胞比例, 从对照组的 48.3% \pm 1.33% 升至 69.81% \pm 1.18% ($P < 0.001$)。此外, TMZ 处理使 GBM 细胞 G2/M 期的比例增加 ($P < 0.001$)。这些结果表明, 度洛西汀通过诱导 G0/G1 期阻滞发挥作用, 而 TMZ 则主要通过增加 G2/M 期比例调控 GBM 细胞周期。见图 3。

2.4 转录组学测序分析

转录组分析结果显示, U87 细胞经 30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀处理 24 h 后, 与对照组比较, 共检测到 3 745 个差异基因表达 (筛选标准: $Q < 0.005$ 且 $|\log_2[\text{fold change}]| \geq 1$), 其中 2 069 个基因显著上调, 1 676 个基因显著下调。KEGG 通路富集分析显示, 细胞自噬 ($P = 5.37\text{e-}05$)、蛋白质在内质网中的加工 ($P = 0.000 2$) 以及细胞周期 ($P = 0.009$) 等通路显著富集, 特别是细胞周期通路中的关键调控因子 p21 (上调 2.76 倍) 和 p27 (上调 1.54 倍) 的显著上调, 以



A: 不同浓度的度洛西汀处理对 GBM 细胞活性(24 h)的影响;
B: 度洛西汀与 TMZ 对 GBM 细胞的 IC₅₀ 曲线。

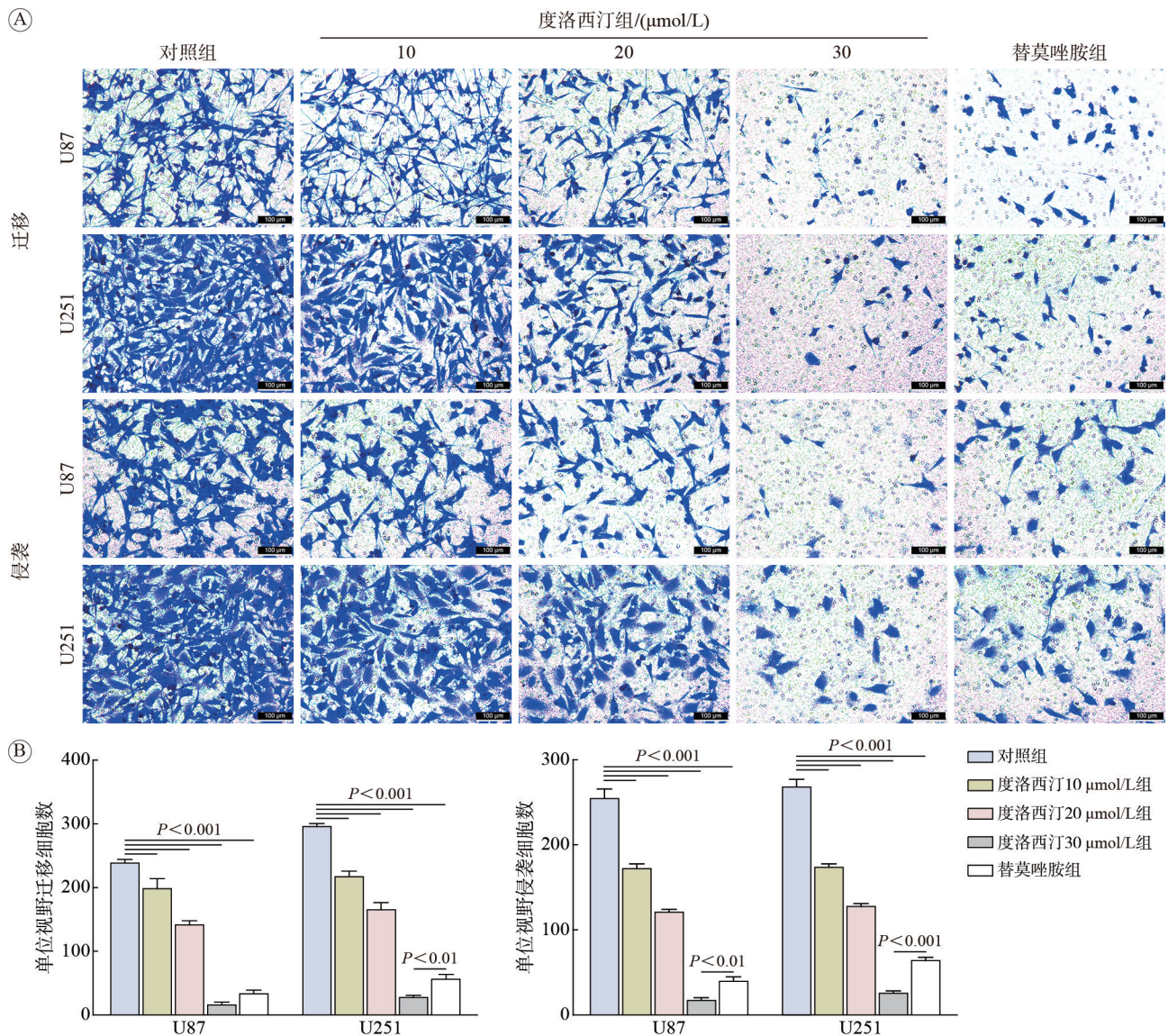
图 1 度洛西汀对 GBM 细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of duloxetine on cell viability in GBM cells

及 Skp2 (下调 1.63 倍) 的显著下调, 进一步支持了度洛西汀可能通过诱导细胞周期阻滞发挥抗 GBM 作用。图 4 为差异表达基因的分布及显著通路的基因富集结果, 提示这些通路可能在度洛西汀的抗肿瘤作用机制中发挥重要作用。

2.5 RT-qPCR 验证转录组测序结果

Skp2 的过度表达已在多种癌症类型中广泛报



A: Transwell 实验检测 GBM 细胞的迁移、侵袭能力(100 \times); B: 迁移和侵袭细胞计数。

图 2 度洛西汀对 GBM 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 2 Effect of duloxetine on migration and invasion of GBM cells

道, 且与不受控的细胞增殖密切相关^[13]。在转录组测序结果中发现 p21 和 p27 基因表达显著上调, Skp2 基因表达显著下调。为了进一步验证和探究度洛西汀对上述基因表达的影响, 采用 qPCR 技术对 Skp2、p21 和 p27 的 mRNA 表达水平进行检测。结果显示, 与对照组比较, 度洛西汀处理后 U87 细胞中 Skp2 的 mRNA 表达降低($P < 0.001$), 而 p21 和 p27 的 mRNA 表达升高($P < 0.001$)。见图 5。

2.6 度洛西汀对 Skp2、p21 和 p27 的蛋白表达影响

Western blot 结果显示, 与对照组比较, 随度洛西汀浓度的增加, U87 细胞内 Skp2 蛋白表达逐渐下降($P < 0.05$)。同时, p21 和 p27 蛋白表达上调($P < 0.05$)。相比之下, U251 细胞中 Skp2、p21 和

p27 蛋白表达水平仅在 30 $\mu\text{mol/L}$ 度洛西汀处理下出现变化($P < 0.001$)。见图 6。

2.7 度洛西汀和 TMZ 的联合治疗抑制 U87 细胞增殖

已有研究表明, 抑制 Skp2 能够增强肿瘤细胞对 TMZ 的敏感性^[14]。基于此, 为初步探究了度洛西汀与 TMZ 联合治疗的作用效果。实验选择低于所得 IC_{50} 值的浓度(TMZ 为 300 $\mu\text{mol/L}$, 度洛西汀为 20 $\mu\text{mol/L}$)对 U87 细胞进行联合处理。CCK-8 实验结果显示, 联合治疗组的细胞抑制率优于任一单药治疗组($P < 0.001$)。此外, 采用 Western blot 检测度洛西汀与 TMZ 处理后的 U87 细胞内 Skp2、p27 和 p21 蛋白表达水平。结果表明, 与对照组比

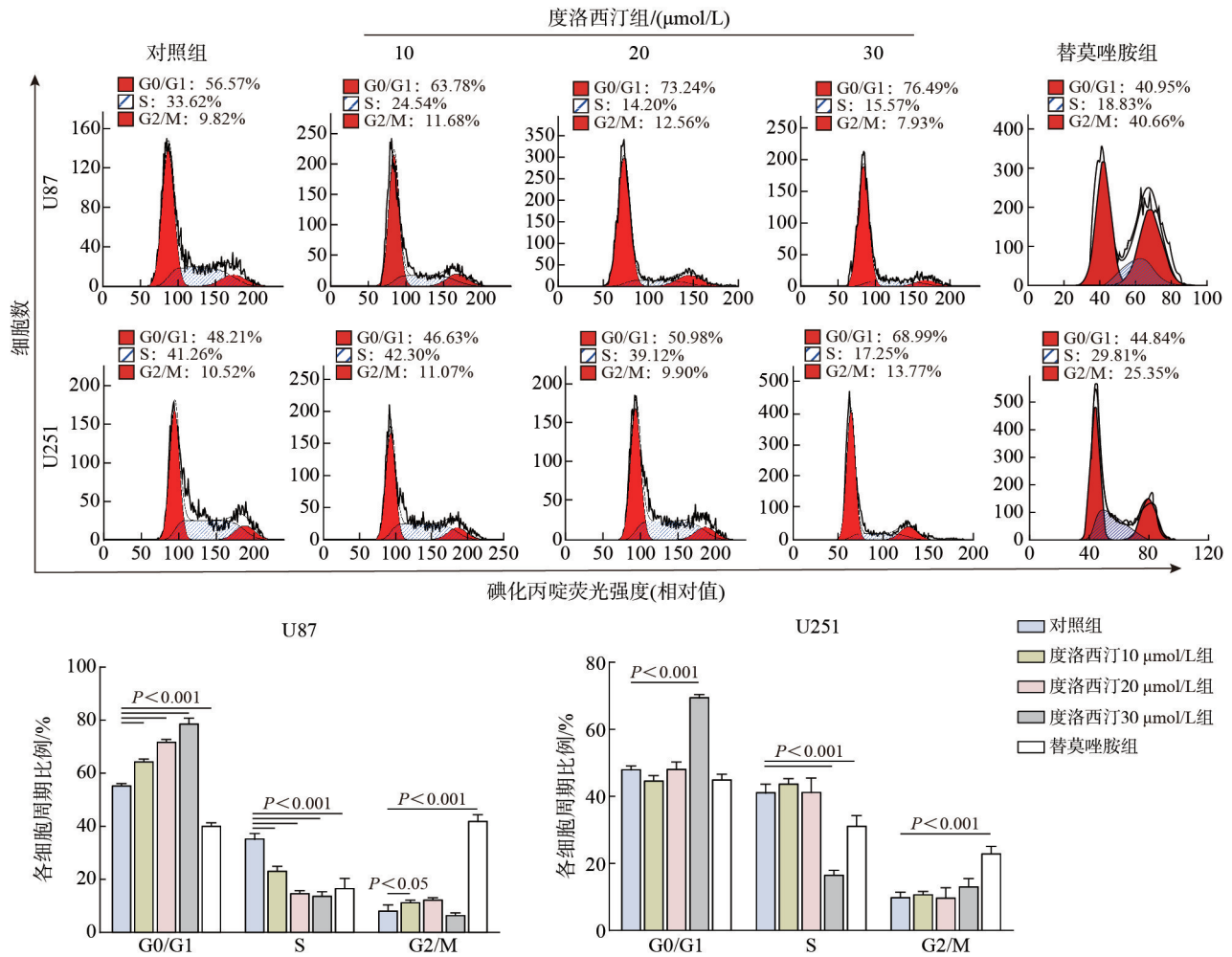


图3 度洛西汀对GBM细胞周期的影响
Fig. 3 Effect of duloxetine on the cell cycle of GBM cells

较，单独使用TMZ处理时，U87细胞Skp2蛋白的表达未发生变化($P>0.05$)，而联合治疗降低了U87细胞中Skp2的蛋白表达，并进一步上调p21和p27的蛋白表达($P<0.001$)。这些结果提示，度洛西汀可能通过调控Skp2-p21/p27信号通路，增强TMZ对U87细胞的抑制作用。见图7。

2.8 度洛西汀与Skp2蛋白分子对接结果

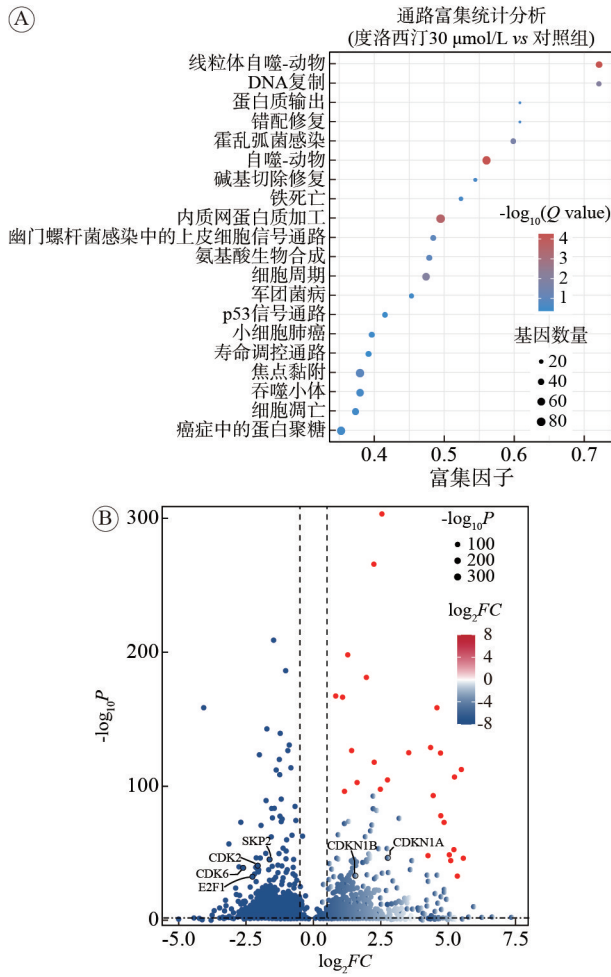
度洛西汀与Skp2结合亲和力为-30.96 kJ/mol，表明二者存在较为稳定的相互作用^[15]。见图8。

3 讨论

度洛西汀常用于治疗中重度抑郁症、骨关节炎、神经病理性疼痛以及成年肿瘤患者因化疗引起的周围神经病变性疼痛^[10]。近期研究显示，度洛西汀通过调节免疫和炎症状态在胰腺腺癌细胞中表现出抗增殖作用，同时它还能诱导非小细胞肺癌细胞凋亡，增强肺癌细胞对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的敏感性^[11-12]。由于度洛西汀

具有良好的脂溶性，能够透过血脑屏障并在大脑皮质中富集，本研究初步探讨其抗GBM的潜在作用。结果表明，度洛西汀可以显著抑制GBM细胞的增殖、迁移和侵袭能力，同时诱导GBM细胞周期阻滞。

肿瘤细胞的一个显著特征是其无限增殖的能力，而细胞周期调控的失常使这些细胞能够逃避正常的细胞周期检查点，从而持续分裂^[16]。Skp2是一种F-box蛋白，也是SCF(Skp1-Cullin-F-box)E3泛素连接酶复合物的关键组分，通过识别并结合下游蛋白p21和p27，利用泛素-蛋白酶体途径介导它们的降解^[17]。p21与p27是两种重要的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂，能够通过抑制Cyclin E/Cdk2和Cyclin D/Cdk4/6复合物的活性，阻止细胞从G1期进入S期，从而在细胞周期检查点发挥重要的调控作用^[18-19]。Skp2的过度表达可加速p21与p27的降解，使肿瘤细胞不受控制的增殖。研究表明，Skp2在多种类型的肿瘤中过表达，已被视



A: KEGG通路富集分析的前20条通路; B: 差异表达基因火山图。

图4 转录组测序结果

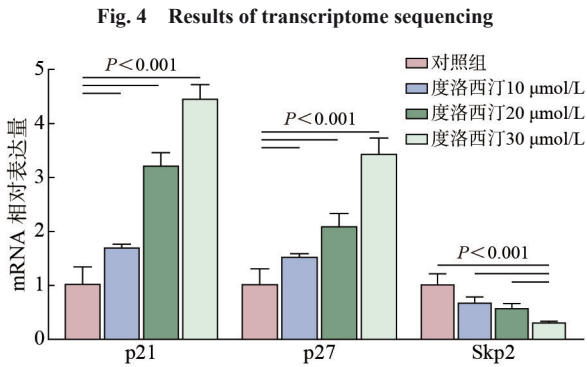


图5 度洛西汀对U87细胞Skp2、p21和p27的mRNA表达影响

为肿瘤预后不良的重要指标之一^[20-21]。Skp2不仅促进细胞周期进程，还通过调节EMT相关蛋白和细胞骨架重组增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力，并能通过激活肿瘤微环境中的信号通路进一步促进侵袭行为，抑制Skp2可降低肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[22-23]。这些结果均提示Skp2是一个重要的肿瘤治疗靶点。

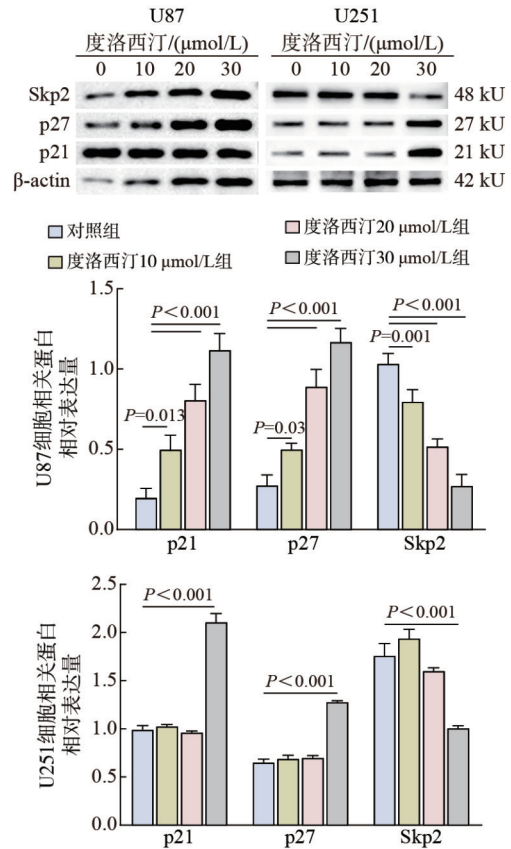
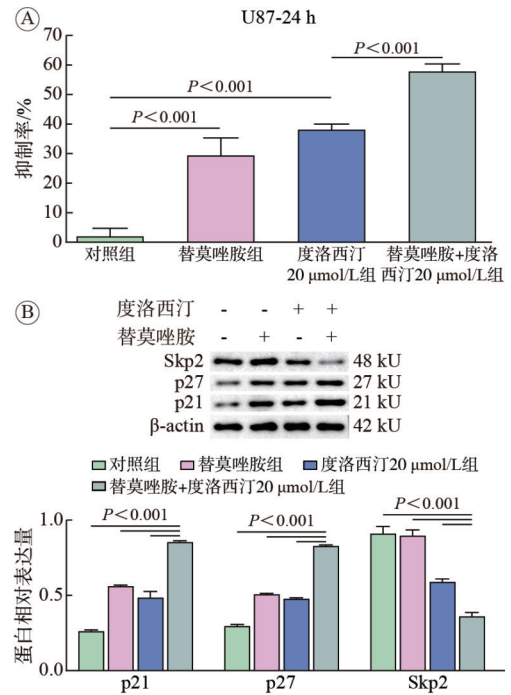


图6 度洛西汀对U87细胞、U251细胞中Skp2、p21和p27的蛋白表达影响

Fig. 6 Effect of duloxetine on expression of Skp2, p21 and p27 protein in U87 cells and U251 cells



A: 度洛西汀和TMZ联合治疗可抑制U87细胞增殖; B: 联合治疗对U87细胞中细胞周期相关蛋白表达的影响及蛋白水平定量分析。

图7 度洛西汀和TMZ的联合治疗效果

Fig. 7 Combined effect of duloxetine and TMZ

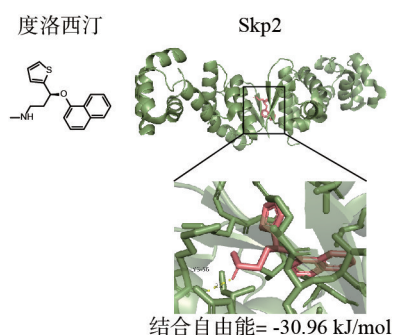


图8 度洛西汀与Skp2蛋白对接情况

Fig. 8 Molecular docking of duloxetine with Skp2 protein

本研究结果表明, 度洛西汀通过下调Skp2表达, 阻断了其对p21和p27的降解, 导致p21和p27的积累, 从而诱导G0/G1期阻滞, G0/G1期阻滞可以限制GBM细胞的增殖能力, 降低了肿瘤细胞群体扩增的速度。除了直接抑制Skp2表达, 干扰Skp2-SCF复合物的结合同样是一种有效的治疗策略^[13]。本研究发度洛西汀与Skp2具有较好的结合能力, 但度洛西汀是否通过与Skp2结合导致SCF-Skp2泛素连接酶失活, 从而减少对p21和p27的泛素化降解作用, 仍需进一步深入研究。

TMZ作为GBM的一线治疗药物, 主要通过诱导DNA损伤引发细胞凋亡, 但其疗效受限于耐药性的产生。已有研究表明, Skp2的高表达是TMZ耐药的重要机制之一^[14]。本研究结果显示, 度洛西汀与TMZ联合治疗下调了Skp2表达, 并且联合治疗的抑制效果优于任一单药治疗组。这表明度洛西汀可能通过下调Skp2表达, 增强TMZ对GBM细胞增殖的抑制作用。该结果与已有研究一致, 支持Skp2作为调控TMZ敏感性的潜在靶点。

值得注意的是, Skp2不仅在细胞周期调控与蛋白质降解的过程中发挥重要作用, 还可能通过某些机制参与慢性应激和抑郁相关的神经生物学过程。研究表明, Skp2抑制剂SMIP004与NSC689857在非应激和慢性应激小鼠中发挥抗抑郁作用, 提示Skp2可能是抑郁症治疗的潜在分子靶点^[24-25]。Skp2抑制剂有望直接调控与抑郁症相关的神经生物学机制, 这也为进一步探索度洛西汀抗抑郁作用提供了新的研究思路。

本研究存在一定的局限性: (1)虽探讨了度洛西汀对GBM细胞的影响, 但未深入研究U87与U251细胞的敏感性差异, 未来需在更多GBM细胞系中验证其广泛适用性; (2)未能在体内实验中进一步验证度洛西汀的抗肿瘤效果; (3)未对度洛西汀抑制GBM细胞迁移和侵袭的具体机制展开深入

研究。此外, 虽然研究显示度洛西汀与TMZ联合治疗对U87细胞具有显著的细胞抑制作用, 但其协同效应尚未明确, 未来需采用更严谨的Combination Index法及更多浓度组合实验加以验证。Skp2的下游靶点及其在TMZ耐药中的具体调控机制仍需进一步研究, 以明确其在耐药性形成中的作用。

综上所述, 度洛西汀能够抑制GBM细胞的增殖, 降低其迁移和侵袭能力, 并诱导G0/G1期细胞周期阻滞。这些作用可能与度洛西汀抑制Skp2表达、上调p21和p27表达相关。此外, 本研究提示度洛西汀可能通过调控Skp2-p21/p27信号通路增强TMZ对GBM细胞的抑制效果, 并为克服TMZ耐药问题和优化GBM治疗策略提供了潜在的研究方向。

作者贡献 曾巽凌: 实验设计, 实验操作, 实验数据分析处理, 论文撰写; 郑湘锦: 细胞培养, 实验操作; 李晨: 实验设计; 李悦: 实验数据分析处理; 陈孟莉: 实验设计, 文章审阅。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: zengxi19765@163.com。

参考文献

- Schaff LR, Mellinshoff IK. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review [J]. JAMA, 2023, 329 (7): 574-587.
- Tan AC, Ashley DM, López GY, et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70 (4): 299-312.
- Rooney AG, Carson A, Grant R. Depression in cerebral glioma patients: a systematic review of observational studies [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103 (1): 61-76.
- Løppenthin K, Johansen C, Larsen MB, et al. Depressive symptoms in Danish patients with glioma and a cancer-free comparison group [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2020, 18 (9): 1222-1229.
- Wang YH, Li JQ, Shi JF, et al. Depression and anxiety in relation to cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis of cohort studies [J]. Mol Psychiatry, 2020, 25 (7): 1487-1499.
- Bielecka-Wajdman AM, Ludyga T, Machnik G, et al. Tricyclic antidepressants modulate stressed mitochondria in glioblastoma multiforme cells [J]. Cancer Control, 2018, 25 (1): 1073274818798594.
- Yang CJ, Tan ZL, Yang JD, et al. Fluoxetine inactivates STAT3/NF-κB signaling and promotes sensitivity to cisplatin in bladder cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164: 114962.
- Baldissera AB, Boia-Ferreira M, Basilio ABC, et al. Sertraline as a potential cancer therapeutic approach: Biological relevance of TCTP in breast cancer cell lines and tumors [J]. Adv Med Sci, 2023, 68 (2): 227-237.
- Chen VC, Huang SL, Huang JY, et al. Combined

- administration of escitalopram oxalate and nivolumab exhibits synergistic growth-inhibitory effects on liver cancer cells through inducing apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (16): 12630.
- 10 Rodrigues-Amorim D, Olivares JM, Spuch C, et al. A systematic review of efficacy, safety, and tolerability of duloxetine [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 554899.
 - 11 Jang SK, Kim G, Ahn SH, et al. Duloxetine enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to EGFR inhibitors by REDD1-induced mTORC1/S6K1 suppression [J]. *Am J Cancer Res*, 2024, 14 (3): 1087-1100.
 - 12 Kajiwaru I, Sano M, Ichimaru Y, et al. Duloxetine improves cancer-associated pain in a mouse model of pancreatic cancer through stimulation of noradrenaline pathway and its antitumor effects [J]. *Pain*, 2020, 161 (12): 2909-2919.
 - 13 Feng TY, Wang P, Zhang XL. Skp2: a critical molecule for ubiquitination and its role in cancer [J]. *Life Sci*, 2024, 338: 122409.
 - 14 Wu J, Su HK, Yu ZH, et al. Skp2 modulates proliferation, senescence and tumorigenesis of glioma [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 71.
 - 15 Wang J, Zhang ZL, Li Q, et al. Network pharmacology and molecular docking reveal the mechanisms of curcumin activity against esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1282361.
 - 16 Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23 (1): 74-88.
 - 17 Jia J, Li R, Sun JY, et al. Small-molecule compounds inhibiting S-phase kinase-associated protein 2: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1122008.
 - 18 Shamloo B, Usluer S. p21 in cancer research [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (8): E1178.
 - 19 Razavipour SF, Harikumar KB, Slingerland JM. p27 as a transcriptional regulator: new roles in development and cancer [J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (17): 3451-3458.
 - 20 Zhou HL, Zhou L, Guan Q, et al. Skp2-mediated MLKL degradation confers cisplatin-resistant in non-small cell lung cancer cells [J]. *Commun Biol*, 2023, 6 (1): 805.
 - 21 Yu XF, Zhou L, Liu WB, et al. Skp2 stabilizes Mcl-1 and confers radioresistance in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (3): 249.
 - 22 Li YT, Maimaitirexiati G, Wang J, et al. Long non-coding RNA linc00657 up-regulates Skp2 to promote the progression of cervical cancer through lipid reprogramming and regulation of immune microenvironment [J]. *Cytokine*, 2024, 176: 156510.
 - 23 Wang HC, Luo CW, Chen TY, et al. Skp2-mediated Zeb1 expression facilitates cancer migration by a ubiquitination-independent pathway [J]. *Life Sci*, 2022, 311 (Pt A): 121135.
 - 24 Liu QQ, Cheng L, Li F, et al. NSC689857, an inhibitor of Skp2, produces antidepressant-like effects in mice [J]. *Behav Pharmacol*, 2024, 35 (4): 227-238.
 - 25 Wang D, Xu X, Wu Y, et al. SMIP004: a compound with antidepressant-like activities in mouse models [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 843: 260-267.

(责任编辑:孟晓彤)

(上接第229页)

- 14 冀肖健, 朱剑. 从影像学角度看骶髂关节病变的鉴别诊断 [J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44 (12): 1011-1017.
- 15 Moon SJ, Lee S, Hwang J, et al. Performances of machine learning algorithms in discriminating sacroiliitis features on MRI: a systematic review [J]. *RMD Open*, 2023, 9 (4): e003783.
- 16 Bordner A, Aouad T, Medina CL, et al. A deep learning model for the diagnosis of sacroiliitis according to Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria with magnetic resonance imaging [J]. *Diagn Interv Imaging*, 2023, 104 (7/8): 373-383.
- 17 Nicolaes J, Tselenti E, Aouad T, et al. Performance analysis of a deep-learning algorithm to detect the presence of inflammation in MRI of sacroiliac joints in patients with axial spondyloarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2025, 84 (1): 60-67.
- 18 Zhang K, Liu CR, Pan JL, et al. Use of MRI-based deep learning radiomics to diagnose sacroiliitis related to axial spondyloarthritis [J]. *Eur J Radiol*, 2024, 172: 111347.
- 19 Willesen ST, Hadsbjerg AE, Møller JM, et al. MRI-based synthetic CT: a new method for structural damage assessment in the spine in patients with axial spondyloarthritis - a comparison with low-dose CT and radiography [J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, 83 (6): 807-815.
- 20 Li H, Tao X, Liang T, et al. Comprehensive AI-assisted tool for ankylosing spondylitis based on multicenter research outperforms human experts [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1063633.
- 21 Redeker I, Tsiami S, Eicker J, et al. Identification of a machine learning-based diagnostic model for axial spondyloarthritis in rheumatological routine care using a random forest approach [J]. *RMD Open*, 2024, 10 (4): e004702.
- 22 Jia WY, Chen S, Yang LL, et al. Ankylosing spondylitis prediction using fuzzy K-nearest neighbor classifier assisted by modified JAYA optimizer [J]. *Comput Biol Med*, 2024, 175: 108440.
- 23 辛培锦, 任翠, 秦思源, 等. 基于骶髂关节MRI影像学特征和临床参数诊断中轴型脊柱关节炎的列线图模型 [J]. *磁共振成像*, 2023, 14 (11): 113-120.
- 24 Hu ZY, Wang Y, Ji XJ, et al. Radiomics-based machine learning model to phenotype hip involvement in ankylosing spondylitis: a pilot study [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1413560.
- 25 Dorfner FJ, Vahldiek JL, Donle L, et al. Anatomy-centred deep learning improves generalisability and progression prediction in radiographic sacroiliitis detection [J]. *RMD Open*, 2024, 10 (4): e004628.
- 26 Kennedy J, Kennedy N, Cooksey R, et al. Predicting a diagnosis of ankylosing spondylitis using primary care health records-a machine learning approach [J]. *PLoS One*, 2023, 18 (3): e0279076.
- 27 Wang RS, Dasgupta A, Ward MM. Predicting probability of response to tumor necrosis factor inhibitors for individual patients with ankylosing spondylitis [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5 (3): e222312.

(责任编辑:孟晓彤)