

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.22.005
文章编号: 1005-8982 (2023) 22-0024-08

实验研究·论著

蝙蝠葛苏林碱调控 Akt/mTOR 信号通路对 胶质瘤细胞增殖及自噬的影响*

殷海棠¹, 文志鹏², 杨继红², 李明², 李琴³, 赵青青⁴, 肖坚⁵

(1. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 贵州医科大学附属医院
2. 药学部, 3. GCP 中心, 4. 临床医学研究中心, 贵州 贵阳 550004;
5. 中南大学湘雅医院 药学部, 湖南 长沙 410008)

摘要: 目的 探讨蝙蝠葛苏林碱(DAS)对胶质瘤 U251 和 U87 细胞生长与增殖的影响及其分子机制。**方法** 用 2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS(DAS 组)、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺(TMZ 组)和空白对照(对照组)处理 U251 和 U87 细胞。采用 CCK-8 法检测 DAS 对细胞活力的影响, 细胞集落形成和 Edu 实验检测 DAS 对细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 DAS 对细胞凋亡的影响, 透射电镜观察自噬小体的形成, Western blotting 检测 DAS 对胶质瘤细胞凋亡、自噬和 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** CCK-8 结果显示, 与对照组比较, 不同浓度 DAS 组胶质瘤细胞活力逐渐降低($P < 0.05$), DAS 组细胞活力低于 TMZ 组($P < 0.05$)。胶质瘤 U251 和 U87 细胞 IC_{50} 分别为 5.11 $\mu\text{mol/L}$ 和 6.35 $\mu\text{mol/L}$ 。Edu 和克隆结果显示, DAS 能抑制胶质瘤细胞增殖, 且随着药物浓度升高细胞增殖逐渐减少($P < 0.05$)。流式细胞术结果显示, DAS 能诱导胶质瘤细胞凋亡, 且随着药物浓度升高细胞凋亡增加($P < 0.05$)。DAS 能增加胶质瘤细胞 Bax、LC3 II/I、p62、p-AKT、p-mTOR 蛋白相对表达量($P < 0.05$), 降低抗凋亡 Bcl-2 蛋白相对表达量($P < 0.05$)。透射电镜结果显示, DAS 能增加胶质瘤细胞中自噬囊泡($P < 0.05$)。**结论** DAS 可以抑制胶质瘤细胞活力与增殖, 并促进胶质瘤细胞凋亡, 这可能与 DAS 激活 Akt/mTOR 信号通路抑制自噬有关。

关键词: 胶质瘤; 蝙蝠葛苏林碱; 增殖; 自噬; Akt/mTOR 信号通路
中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A

Effects of daurisorline on proliferation and autophagy of glioma cells through Akt/mTOR signaling pathway*

Yin Hai-tang¹, Wen Zhi-peng², Yang Ji-hong², Li Ming², Li Qin³, Zhao Qing-qing⁴, Xiao Jian⁵
(1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Department of Pharmacy, 3. GCP Center, 4. Clinical Medical Research Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 5. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of daurisorline (DAS) on growth and proliferation of glioma U251 and U87 cells and its underlying mechanisms. **Methods** U251 and U87 cells were treated with different concentrations of daurisorline (2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$, DAS groups), 10.0 $\mu\text{mol/L}$ of temozolomide (TMZ group), or left untreated (control group). The CCK-8 assay was used to detect the influence of DAS on cell viability, colony formation assay and EdU assay were used to evaluate the impact of DAS on cell proliferation, and flow cytometry was used to analyze the effect of DAS on cell apoptosis. The formation of autophagosomes was observed under the

收稿日期: 2023-08-08

* 基金项目: 贵州省科技计划项目(No: 黔科合基础-ZK[2021]一般 563); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(No: gzwkj2022-026)
[通信作者] 文志鹏, E-mail: 85493245@qq.com; Tel: 0851-86774148

transmission electron microscopy. Western blotting was performed to detect the expressions of proteins associated with apoptosis, autophagy and Akt/mTOR signaling pathway in glioma cells. **Results** The CCK-8 assay showed that cell viability of glioma cells treated with DAS was decreased in a concentration-dependent manner compared with that in the control group ($P < 0.05$). In addition, the cell viability in the DAS group was lower than that in the TMZ group ($P < 0.05$). The IC₅₀ of glioma U251 and U87 cells was 5.11 $\mu\text{mol/L}$ and 6.35 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The Edu assay and colony formation assay demonstrated that DAS suppressed the proliferation of glioma cells, and that the cell proliferation was successively inhibited with the increase in the drug concentration ($P < 0.05$). Flow cytometry exhibited that DAS induced apoptosis of glioma cells, and apoptosis aggravated with the increase in the drug concentration ($P < 0.05$). Western blotting revealed that DAS increased the relative protein expressions of Bax, LC3 II/I, p62, p-AKT, and p-mTOR ($P < 0.05$) but decreased the relative expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein in glioma cells ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy displayed that DAS promoted the formation of autophagosomes in glioma cells ($P < 0.05$). **Conclusions** DAS inhibits the viability and proliferation and promotes apoptosis of glioma cells, which may be associated with the suppression of autophagy by activating the AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords: glioma; daurisolone; proliferation; autophagy; Akt/mTOR signaling pathway

胶质瘤是一种常见的成人中枢神经系统原发性恶性脑瘤,具有侵袭性强、病死率高、预后差等特点,患者生存期仅有 12~15 个月,5 年生存期约为 5.5%^[1]。胶质瘤治疗方式主要包括手术、放射治疗和化学药物治疗^[2]。替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)是临床治疗胶质瘤的一线药物,不良反应大,选择性差,疗效不理想^[3]。因此,探寻新的抗胶质瘤药物对改善患者预后有一定意义。

自噬是在一系列信号通路调控下细胞利用溶酶体降解自身细胞质蛋白和受损细胞器的生物学过程^[4]。自噬过程一般包括自噬小泡成核、内膜扩张、自噬小体形成、自噬小体与溶酶体融合、底物降解 5 个阶段。近年来研究表明,自噬对多种肿瘤发生、发展有重要调控作用,抑制自噬可以阻碍包括胶质瘤在内多种肿瘤的发生^[5]。因此,以自噬为靶点探索新的胶质瘤治疗分子机制,可能为胶质瘤治疗提供新的方向。蝙蝠葛苏林碱(Daurisolone, DAS)是从中药蝙蝠葛根茎中提取的四氢异喹啉类天然生物碱^[6]。DAS 具有丰富的药理作用,被用于癫痫^[7]、心血管^[8]、肿瘤^[9]等疾病的研究与治疗。近年来研究发现,DAS 具有良好的抗肿瘤活性,但其在胶质瘤中的作用尚未明确。本研究旨在探索 DAS 抗胶质瘤的作用及其潜在分子生物学机制,为阐明 DAS 抗胶质瘤的药理作用提供基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑胶质瘤细胞系 U251 和 U87(中国科学院上

海生物化学与细胞生物学研究所)。DAS(上海蓝木化工有限公司),CCK-8 试剂(北京兰杰柯科技有限公司),胎牛血清(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、4%多聚甲醛、结晶紫染色液、RIPA Lysis Buffer RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Edu 试剂盒、BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光液)(上海碧云天生物技术股份有限公司),细胞凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司),Bax、Bcl-2、p-Akt(Ser473)、p-mTOR(Ser448)、Akt、mTOR、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(武汉三鹰生物技术股份有限公司),LC3B、SQSTM1/P62 抗体(美国 CST 公司)。

酶标仪、5%二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司),透射电子显微镜(日本 JEOL 公司),流式细胞仪(美国 Beckman 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),细胞培养超净台(新加坡 Esco 公司),化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏 U251 和 U87 细胞,置于 T25 培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM),移入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养。待细胞汇合度达 80%~90%按 1:3 传代或冷冻保存。取培养 3 代后细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞活力测定 将细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,设置对照组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ DAS 组、

5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ TMZ组。每组设置3个复孔,培养72 h后,用含10 μL CCK-8的100 μL DMEM替换原培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养1 h,使用酶标仪在450 nm处测光密度(optical density, OD)值。

1.2.3 Edu 实验 将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,用不同浓度的DAS处理72 h后弃掉培养液,PBS洗涤3次,4%多聚甲醛固定15 min,0.3% Triton X-100 孵育10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤3次,按试剂盒说明书进行操作,加入Hoechst 33342溶液避光孵育10 min,倒置荧光显微镜拍照,用Image J软件计算阳性细胞。

1.2.4 克隆实验 将细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种于6孔板中,设置3组:对照组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中持续培养2周,4% (v/v)多聚甲醛固定细胞20 min,0.1% (w/v)结晶紫染色10 min,PBS洗涤3次,对6孔板进行拍照,用Image J软件计算各组的克隆形成数。

1.2.5 细胞凋亡 将细胞计数后按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中。设置3组:对照组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组。培养72 h后,用不含EDTA的胰酶消化细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,将沉淀用500 μL loading buffer重悬,加入5 μL 膜联蛋白 Annexin V-FITC和5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI),暗室染色10 min,流式细胞仪检测,通过FlowJo分析细胞凋亡。

1.2.6 透射电镜观察自噬囊泡的形成 将细胞用3%戊二醛和1%四氧化锇酸固定,丙酮脱水,812环氧树脂包埋,制片,醋酸铀和柠檬酸铅染色15 min后,用透射电子显微镜观察细胞自噬囊泡的形成情况。

1.2.7 Western blotting检测细胞相关蛋白表达 用含蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟,PMSF)的RIPA裂解液裂解细胞,收集上清液。使用BCA蛋白测定试剂测定蛋白浓度。SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times)以1:4 (v/v)的比例加入蛋白上清样品,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴10 min。将蛋白质加入到SDS-PAGE凝胶泳道电泳,蛋白印迹转移至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h,分别用一抗GAPDH(1:5 000)、Bel-2(1:2 000)、Bax(1:5 000)、p62(1:1 000)、LC3B(1:1 000)、Akt(1:5 000)、p-Akt(1:1 000)、mTOR(1:5 000)和p-mTOR(1:2 000)在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜孵育条带,洗涤

3次,加入相应二抗(1:5 000)常温下孵育1 h,滴加ECL化学发光液,用化学发光成像系统观察印迹条带,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用Graph Pad Prism 8.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAS抑制胶质瘤细胞活力

对照组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组U251和U87细胞活力比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组U251和U87细胞活力均低对照组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ DAS组。因此以5.0和10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS作为后续研究浓度,对比DAS、TMZ对U251和U87细胞活力影响。见表1。

表1 4组U251和U87细胞活力比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	U251细胞	U87细胞
对照组	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
2.5 $\mu\text{mol/L}$ DAS组	79.06 \pm 3.67	85.11 \pm 3.61
5.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组	56.24 \pm 4.71 [†]	60.65 \pm 4.57 [†]
10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组	28.22 \pm 4.92 [†]	34.51 \pm 5.61 [†]
F值	190.300	151.300
P值	0.000	0.000

注: [†]与对照组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ DAS组比较, $P < 0.05$ 。

对照组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ TMZ组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组U251细胞活力分别为(100.00 \pm 0.00)%、(89.19 \pm 1.98)%、(28.22 \pm 4.92)%,经方差分析,差异有统计学意义($F = 336.100$, $P = 0.000$);10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组细胞活力低于10.0 $\mu\text{mol/L}$ TMZ组($P < 0.05$)。对照组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ TMZ组、10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组U87细胞活力分别为(100.00 \pm 0.00)%、(92.37 \pm 2.12)%、(34.51 \pm 5.61)%,经方差分析,差异有统计学意义($F = 1397.000$, $P = 0.000$);10.0 $\mu\text{mol/L}$ DAS组细胞活力低于10.0 $\mu\text{mol/L}$ TMZ组($P < 0.05$)。DAS在胶质瘤细胞U251和U87的IC₅₀分别为5.11 $\mu\text{mol/L}$ 和6.35 $\mu\text{mol/L}$ 。见图1。

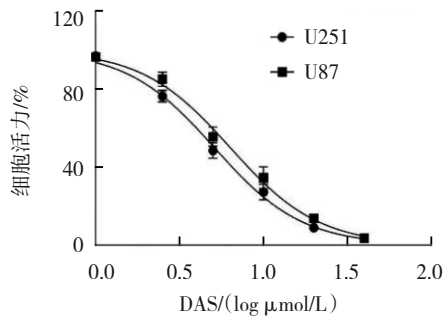


图 1 DAS在胶质瘤细胞U251和U87中的IC50

2.2 DAS抑制胶质瘤细胞增殖

对照组、5.0 μmol/L DAS组、10.0 μmol/L DAS组

U251和U87细胞Edu阳性率比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,不同浓度DAS组细胞Edu阳性率降低($P < 0.05$),且组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明呈浓度依赖性。见表2和图2。

对照组、5.0 μmol/L DAS组、10.0 μmol/L DAS组U251和U87细胞克隆形成数比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,不同浓度DAS组细胞克隆形成数减少($P < 0.05$),且组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明呈浓度依赖性。见表2和图2。

表 2 3组U251和U87细胞增殖情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Edu 阳性率/%		克隆形成数/个	
	U251 细胞	U87 细胞	U251 细胞	U87 细胞
对照组	71.33 ± 1.52	29.66 ± 1.52	494.66 ± 32.24	623.00 ± 42.03
5.0 μmol/L DAS组	43.43 ± 1.46 ^①	17.80 ± 0.72 ^①	176.00 ± 10.81 ^①	412.66 ± 36.07 ^①
10.0 μmol/L DAS组	30.76 ± 0.68 ^{①②}	10.53 ± 0.50 ^{①②}	84.33 ± 9.29 ^{①②}	235.66 ± 15.30 ^{①②}
F 值	784.800	270.200	319.000	102.500
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与5.0 μmol/L DAS组比较, $P < 0.05$ 。

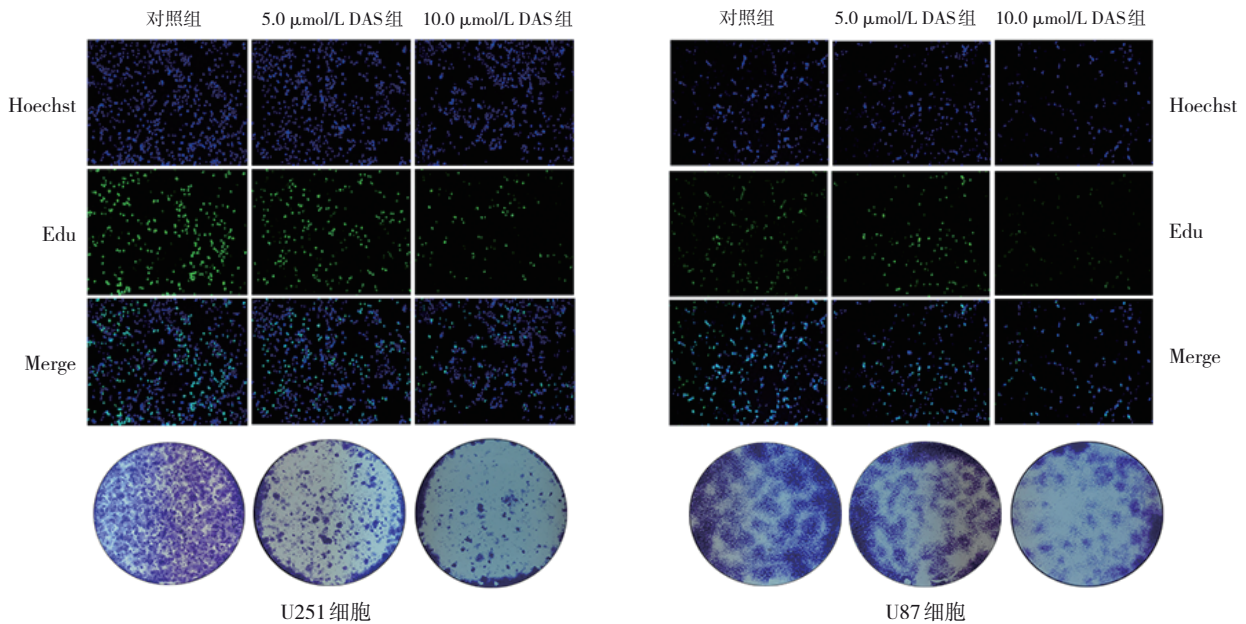


图 2 不同浓度 DAS 对细胞增殖的影响

2.3 DAS促进胶质瘤细胞凋亡

对照组、5.0 μmol/L DAS组、10.0 μmol/L DAS组U251和U87细胞凋亡率比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,不同浓度DAS组细胞凋亡率升高($P < 0.05$),且组间两两比较

差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明呈浓度依赖性。见表3和图3。

对照组、5.0 μmol/L DAS组和10.0 μmol/L DAS组U251和U87细胞Bax、Bcl-2蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与

表 3 3组U251和U87细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	U251细胞	U87细胞
对照组	2.18 ± 0.17	2.46 ± 0.87
5.0 μmol/L DAS组	6.68 ± 0.71 ^①	6.39 ± 0.60 ^①
10.0 μmol/L DAS组	12.51 ± 1.74 ^{①②}	11.63 ± 2.2 ^{①②}
F值	67.390	30.620
P值	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与5.0 μmol/L DAS组比较, $P < 0.05$ 。

对照组比较, 不同浓度 DAS 组 Bax 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白相对表达量降低 ($P <$

0.05)。见表 4 和图 4。

2.4 DAS对胶质瘤细胞自噬的影响

对照组、5.0 μmol/L DAS 组、10.0 μmol/L DAS 组 U251 和 U87 细胞 p62、LC3 II/I 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 不同浓度 DAS 组 p62、LC3 II/I 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 5。

对照组、10.0 μmol/L DAS 组自噬囊泡分别为 (2 ± 1) 和 (40 ± 8) 个, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.758, P = 0.037$), 10.0 μmol/L 组自噬囊泡数高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 6。

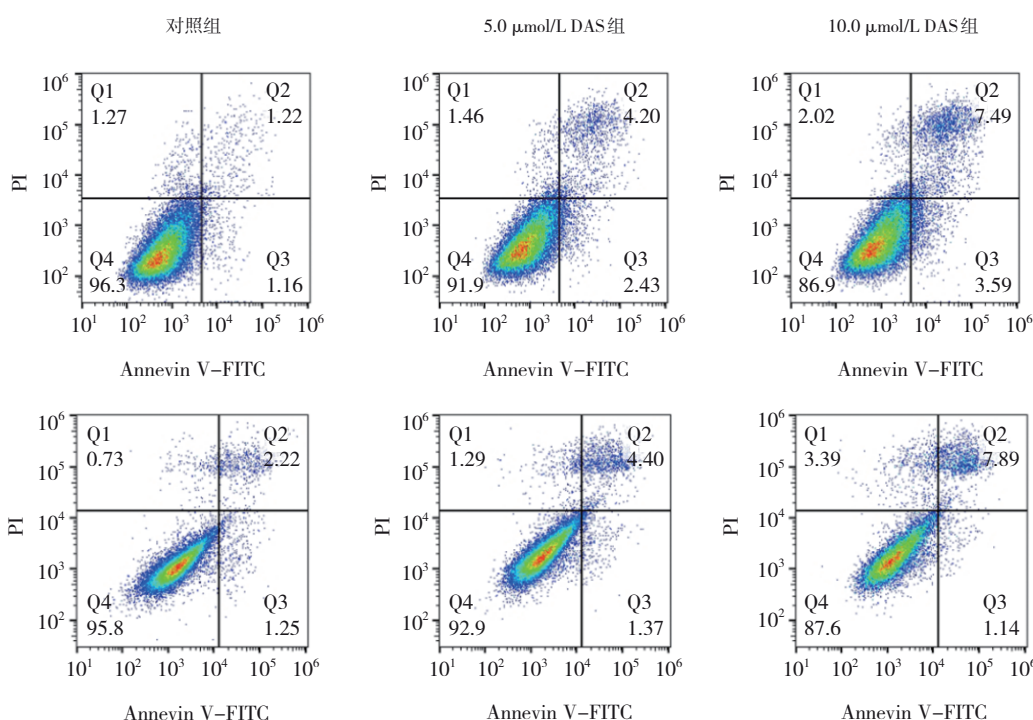


图 3 不同浓度 DAS 对细胞凋亡的影响

表 4 3组U251和U87细胞Bax、Bcl-2蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

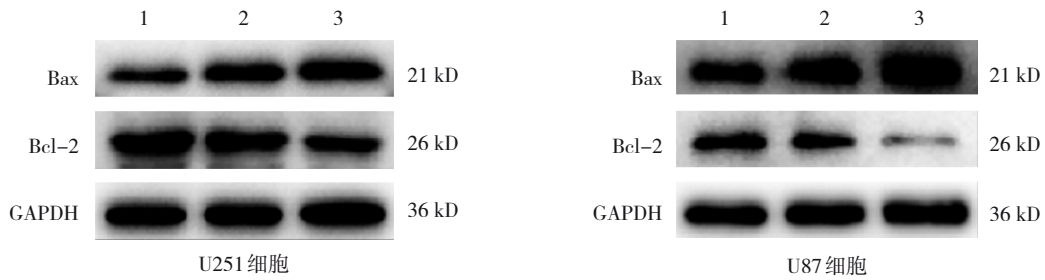
组别	U251细胞		U87细胞	
	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
对照组	0.66 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.01	0.38 ± 0.03
5.0 μmol/L DAS组	0.77 ± 0.04 ^①	0.42 ± 0.03 ^①	0.64 ± 0.02 ^①	0.28 ± 0.04 ^①
10.0 μmol/L DAS组	0.90 ± 0.02 ^{①②}	0.32 ± 0.01 ^{①②}	0.82 ± 0.07 ^{①②}	0.10 ± 0.00 ^{①②}
F值	27.350	29.190	29.700	56.460
P值	0.001	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与5.0 μmol/L DAS 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 DAS调控 AKT/mTOR 细胞信号通路

对照组、5.0 μmol/L DAS 组、10.0 μmol/L DAS 组 U251

和 U87 细胞 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);



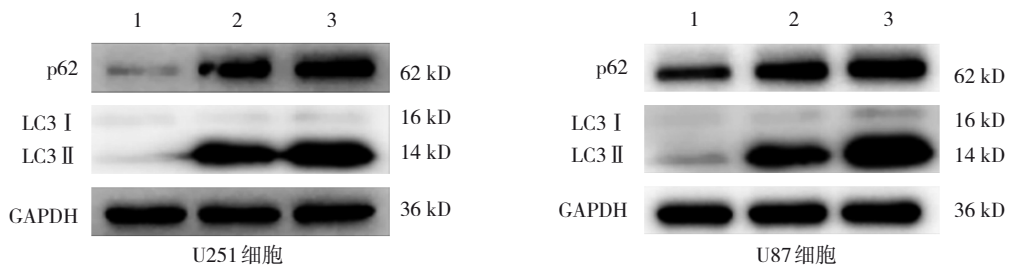
1: 对照组; 2: 5.0 μmol/L DAS 组; 3: 10.0 μmol/L DAS 组。

图 4 3 组 U251 和 U87 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白的表达

表 5 3 组 U251 和 U87 细胞 LC3 II / I、p62 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	U251 细胞		U87 细胞	
	LC3 II / I 蛋白	p62 蛋白	LC3 II / I 蛋白	p62 蛋白
对照组	0.11 ± 0.00	0.28 ± 0.06	0.10 ± 0.00	0.26 ± 0.02
5.0 μmol/L DAS 组	1.15 ± 0.01 ^①	0.64 ± 0.11 ^①	0.50 ± 0.03 ^①	0.39 ± 0.01 ^①
10.0 μmol/L DAS 组	1.36 ± 0.05 ^{①②}	0.95 ± 0.14 ^{①②}	0.68 ± 0.08 ^{①②}	0.49 ± 0.02 ^{①②}
F 值	1 104.000	27.120	80.900	71.260
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 5.0 μmol/L DAS 组比较, $P < 0.05$ 。



1: 对照组; 2: 5.0 μmol/L DAS 组; 3: 10.0 μmol/L DAS 组。

图 5 3 组 U251 和 U87 细胞 LC3 II / I、p62 蛋白的表达

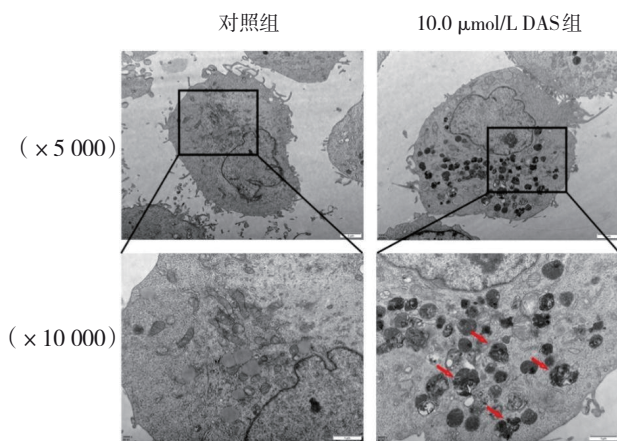
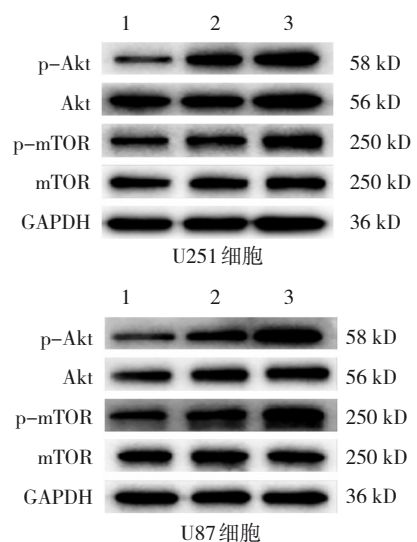


图 6 DAS 对 U251 细胞自噬囊泡影响
(醋酸铀和柠檬酸铅双染色)

与对照组比较, 不同浓度 DAS 组 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见图 7 和表 6。



1: 对照组; 2: 5.0 μmol/L DAS 组; 3: 10.0 μmol/L DAS 组。

图 7 3 组 U251 和 U87 细胞 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白的表达

表 6 3组 U251 和 U87 细胞 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	U251 细胞		U87 细胞	
	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
对照组	0.47 ± 0.03	0.71 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.41 ± 0.03
5.0 μmol/L DAS 组	0.86 ± 0.01 ^①	0.95 ± 0.05 ^①	0.91 ± 0.00 ^①	0.66 ± 0.04 ^①
10.0 μmol/L DAS 组	1.15 ± 0.03 ^{①②}	1.25 ± 0.12 ^{①②}	1.21 ± 0.05 ^{①②}	0.90 ± 0.06 ^{①②}
F 值	413.900	30.290	112.400	76.280
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与 5.0 μmol/L DAS 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

胶质瘤是发生率和病死率均排在首位的中枢神经系统恶性肿瘤，目前的治疗方式虽能提高患者生存率，但总体效果不佳。因此，寻找高效、低毒的新型抗胶质瘤化合物是目前胶质瘤研究领域的热点。本研究发现，DAS 通过激活 Akt/mTOR 信号通路抑制自噬，进而抑制胶质瘤细胞增殖并诱导其凋亡。

DAS 是防己科蝙蝠葛属藤本植物蝙蝠葛的干燥根茎，即中药北豆根的成分之一。近年来随着 DAS 抗肿瘤的研究不断深入，WANG 等^[10]发现 DAS 可以通过靶向 MEK1/2 激酶抑制食管鳞状细胞癌的生长。HUANG 等^[11]发现 DAS 介导 HAKAI 蛋白稳定性，抑制膀胱癌的血管生成和上皮间质转化。ZHANG 等^[12]研究表明，DAS 可以使 RhoA/ROCK2 介导的 Akt 和 ERK-p38 MAPK 信号通路失活，抑制肝癌血管生成。但 DAS 在胶质瘤中的作用和机制不甚明确。本研究发现随着 DAS 浓度升高，胶质瘤细胞增殖受抑制，凋亡率升高，同时促凋亡蛋白 Bax 表达增加，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低，表明 DAS 有潜在的抑制胶质瘤作用。

近年来研究发现，凋亡与自噬相互调控、相互影响，抑制自噬会促进细胞凋亡^[13-14]。细胞内正常水平的自噬对清除细胞中聚集蛋白与受损细胞器至关重要，自噬功能缺陷会导致受损蛋白与细胞器在细胞内过度积累，后者会产生细胞毒性导致细胞凋亡^[15]。同时，自噬也是清除胞质内受损线粒体的主要途径^[16]。抑制自噬导致受损线粒体在胞质内堆积与 ROS 水平上升，促发细胞发生氧化应激，诱导细胞凋亡^[17]。ZHANG 等^[18]研究表明，异甘草素通过 p38/MAPK 轴抑制自噬，促进胰腺癌细胞死亡。重楼皂甙 II 通过 mTOR 途径抑制自噬，诱导肺癌细胞凋亡^[19]。自噬不仅在维持细胞生长发育中扮演重要角色，同时在肿瘤的生长和转移中发挥至关重要的调

控作用^[20-21]。LC3 是自噬的标志性蛋白，LC3- I 向 LC3- II 转变或 LC3- II 表达增加都被认为是自噬激活的标志^[22]。本研究发现，DAS 干预后胶质瘤细胞 LC3- II 表达升高。自噬降解底物蛋白 p62 能与 LC3 结合选择性地进入自噬体，通过溶酶体介导的自噬途径被降解^[23]。本研究检测 p62 蛋白表达发现，DAS 处理后胶质瘤细胞 p62 蛋白表达升高，表明 DAS 抑制胶质瘤细胞自噬。同时，透射电镜结果发现 DAS 组胶质瘤细胞自噬囊泡增加，进一步证实 DAS 抑制自噬囊泡晚期的降解过程。综上所述，本研究提示 DAS 可能通过抑制自噬，诱导细胞凋亡。

Akt/mTOR 信号通路在心血管疾病^[24]、氧化应激^[25]、肿瘤等^[26]多种疾病中发挥重要的自噬调节作用。当该通路以磷酸化形式激活时，会抑制自噬的发生^[27]。有研究表明，三七皂苷 R1 通过激活 Akt/mTOR 信号通路，调控缺血心肌脂质代谢^[28]。蛋白激酶 N2 通过抗氧化应激和激活 mTOR，降低过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤和凋亡^[29]。m6A 脱甲基酶 ALKBH5 介导的 DDIT4-AS1 通过激活 mTOR，维持胰腺癌细胞干性，降低化疗敏感性^[30]。以上研究均表明 Akt/mTOR 信号通路在自噬中扮演重要角色。同样本研究发现 DAS 干预后，胶质瘤细胞 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达显著升高，提示 DAS 抑制自噬的分子机制可能与 Akt/mTOR 信号通路有关。

综上所述，本研究证实了 DAS 对胶质瘤的抗肿瘤作用。DAS 抑制胶质瘤细胞活力和增殖，并促进其凋亡，其机制可能与 DAS 上调 Akt/mTOR 信号通路，抑制自噬有关。但本研究仅在细胞水平验证 DAS 对胶质瘤细胞的作用，在动物模型中是否存在同样的作用和机制，有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] OSTROM Q T, PRICE M, NEFF C, et al. CBTRUS Statistical

- Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019[J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(Suppl 5): v1-v95.
- [2] VARGAS LÓPEZ A J. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(3): 502-503.
- [3] 高行, 王滨, 孙绍伟, 等. 替莫唑胺在恶性胶质瘤治疗方面的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2022, 12(14): 36-39.
- [4] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3): 167-185.
- [5] OU M, CHO H Y, FU J, et al. Inhibition of autophagy and induction of glioblastoma cell death by NEO214, a perillyl alcohol-rolipram conjugate[J]. *Autophagy*, 2023. DOI: Org/10.1080/15548627.2023.2242696.
- [6] WU M Y, WANG S F, CAI C Z, et al. Natural autophagy blockers, dauricine (DAC) and daurisolone (DAS), sensitize cancer cells to camptothecin-induced toxicity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77673-77684.
- [7] OSMAKOV D I, KOSHELEV S G, LYUKMANOVA E N, et al. Multiple modulation of acid-sensing ion channel 1a by the alkaloid daurisolone[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 1-17.
- [8] QIAN J Q. Cardiovascular pharmacological effects of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12): 1086-1092.
- [9] 王坤. 蝙蝠葛苏林碱增效顺铂肺癌化疗的效果及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [10] WANG D, ZHANG W, ZHANG X, et al. Daurisolone suppresses esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo by targeting MEK1/2 kinase[J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(4): 517-531.
- [11] HUANG K, CHEN Q, DENG L, et al. Daurisolone inhibiting tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by mediating HAKAI protein stability[J]. *Iran J Pharm Res*, 2022, 21(1): e129798.
- [12] ZHANG X, ZHANG J G, MU W, et al. The role of daurisolone treatment in hepatocellular carcinoma: Inhibiting vasculogenic mimicry formation and enhancing sensitivity to sorafenib[J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153740.
- [13] 徐明瑶, 谢胜, 黎丽群等. 自噬-凋亡平衡调控在结直肠癌中的作用及中药干预研究进展[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231592.
- [14] TANAKAT, WARNER B M, MICHAEL D G, et al. LAMP3 inhibits autophagy and contributes to cell death by lysosomal membrane permeabilization[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1629-1647.
- [15] ROTIMI D E, SINGH S K. Interaction between apoptosis and autophagy in testicular function[J]. *Andrologia*, 2022, 54(11): e14602.
- [16] ABATE M, FESTA A, FALCO M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139-153.
- [17] DONG L, HE J, LUO L, WANG K. Targeting the interplay of autophagy and ROS for cancer therapy: an updated overview on phytochemicals[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(1): 92.
- [18] ZHANG Z, CHEN W Q, ZHANG S Q, et al. Isoliquiritigenin inhibits pancreatic cancer progression through blockade of p38 MAPK-regulated autophagy[J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154406.
- [19] JIAO Y, XIN M, XU J, et al. Polyphyllin II induced apoptosis of NSCLC cells by inhibiting autophagy through the mTOR pathway[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1781-1789.
- [20] 吴亚梅, 李濛, 李佳雯等. 自噬在胎儿生长发育及妊娠并发症中的作用[J]. *国际妇产科学杂志*, 2023, 50(2): 121-126.
- [21] 龚永媚, 房子倩, 徐昊, 等. 木犀草素对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡及自噬的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(14): 1-6.
- [22] 窦婷婷, 金玲, 池宇欣, 等. 自噬的检测方法及其在相关疾病中的研究进展[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(9): 111-116.
- [23] DEBNATH J, GAMMOH N, RYAN K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560-575.
- [24] 孟祥飞, 周心如, 黄婧, 等. 白桦脂酸改善脓毒症大鼠心血管功能与 AKT/mTOR 及 AKT/AMPK 通路调控自噬有关[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(6): 840-847.
- [25] 吴浩, 符丽珍, 赵勇, 等. 桔梗皂苷 D 通过介导 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节氧化应激改善糖尿病肾病模型大鼠肾损伤[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2022, 36(3): 170-176.
- [26] 关月宏, 刘桂梅, 刘雨思, 等. 柴胡皂苷 D 通过 Akt/mTOR 通路调控胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡及自噬[J/OL]. *中国中药杂志*, 2023, DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230713.401.
- [27] CHEN H, ZHU T, HUANG X, et al. Xanthatin suppresses proliferation and tumorigenicity of glioma cells through autophagy inhibition via activation of the PI3K-Akt-mTOR pathway[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2023, 11(1): e01041.
- [28] LEI W, YAN Y, MA Y, et al. Notoginsenoside R1 regulates ischemic myocardial lipid metabolism by activating the AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 905092.
- [29] WANG L, ZHANG L. Protein kinase N2 reduces hydrogen peroxide-induced damage and apoptosis in PC12 Cells by antioxidative stress and activation of the mTOR pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2483669.
- [30] ZHANG Y, LIU X, WANG Y, et al. The m(6)A demethylase ALKBH5-mediated upregulation of DDIT4-AS1 maintains pancreatic cancer stemness and suppresses chemosensitivity by activating the mTOR pathway[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 174.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 殷海棠, 王志鹏, 杨继红, 等. 蝙蝠葛苏林碱调控 Akt/mTOR 信号通路对胶质瘤细胞增殖及自噬的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(22): 24-31.

Cite this article as: YIN H T, WEN Z P, YANG J H, et al. Effects of daurisolone on proliferation and autophagy of glioma cells through Akt/mTOR signaling pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(22): 24-31.