

刘喜红,杜晓丹,范孟杨,等. miR-328-3p-Akt/mTOR 轴在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长中的作用及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 697-705.

Liu XH, Du XD, Fan MY, et al. Role and mechanism of miR-328-3p-Akt/mTOR axis in the inhibition of glioma cell growth by triptolide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 697-705.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.001

miR-328-3p-Akt/mTOR 轴在雷公藤甲素抑制 脑胶质瘤细胞生长中的作用及机制研究

刘喜红,杜晓丹,范孟杨,徐柳清,赵培源*

(河南中医药大学医学院,郑州 450046)

【摘要】 目的 以 U251 细胞和原位胶质瘤小鼠模型为研究对象,观察 miR-328-3p 对脑胶质瘤细胞生长和凋亡的影响,探讨 miR-328-3p-Akt/mTOR 轴在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长中的作用及机制。方法 在 U251 细胞中过表达 miR-328-3p,再结合雷公藤甲素的处理,采用 qRT-PCR、CCK8、克隆形成实验、流式细胞术、Western Blot 等方法检测 miR-328-3p 在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞 U251 生长中的作用;构建 miR-328-3p 稳定过表达的原位胶质瘤小鼠模型,采用 qRT-PCR 和小动物活体成像体内验证 miR-328-3p 在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长的作用。结果 miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞和组织中表达降低,其表达水平与原发性和复发性脑胶质瘤患者总生存率呈正相关;miR-328-3p 与雷公藤甲素可以协同作用抑制脑胶质瘤细胞的生长,促进脑胶质瘤细胞的凋亡,抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活。结论 miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞中起到抑癌基因的作用,雷公藤甲素可能通过 miR-328-3p 促进脑胶质瘤细胞凋亡,抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活,进而抑制脑胶质瘤细胞的生长。

【关键词】 脑胶质瘤;雷公藤甲素;miR-328-3p;凋亡

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0697-09

Role and mechanism of miR-328-3p-Akt/mTOR axis in the inhibition of glioma cell growth by triptolide

LIU Xihong, DU Xiaodan, FAN Mengyang, XU Liuqing, ZHAO Peiyuan*

(School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: ZHAO Peiyuan. E-mail: prayertcm@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of miR-328-3p on the growth and apoptosis of glioma cells, and explore the role and mechanism of the miR-328-3p-Akt/mTOR axis in inhibition of glioma cell growth by triptolide using U251 cells and a xenograft model in nude mice. **Methods** miR-328-3p overexpression were induced after treatment of with triptolide in U251 cells. qRT-PCR, CCK-8, colony formation assays, flow cytometry, and Western Blot were performed to assess the role of miR-328-3p in inhibition of U251 cells by triptolide. A xenotransplanted tumor model was established with stable miR-328-3p expression to verify the role of miR-328-3p in inhibition of glioma cells by triptolide using qRT-PCR and small animal imaging *in vivo*. **Results** miR-328-3p expression in glioma cells and tissues was decreased, and its expression level was positively correlated to the overall survival rate of patients with primary and recurrent glioma.

【基金项目】国家自然科学基金青年科学基金项目(82004108,82104579),河南省科技攻关项目(202102310180),河南省自然科学基金青年科学基金项目(202300410258),河南中医药大学2022年度研究生科研创新类项目(2022KYCX019)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82004108, 82104579), Scientific and Technological Project in Henan Province (202102310180), Natural Science Foundation of Henan Province (202300410258), 2022 Postgraduate Scientific Research Innovation Project of Henan University of Chinese Medicine (2022KYCX019).

【作者简介】刘喜红(1986—),女,讲师,博士,研究方向:中医药防治中枢系统肿瘤。Email:lxhong423@163.com

【通信作者】赵培源(1990—),男,讲师,博士,研究方向:中医药防治中枢系统肿瘤。Email:prayertcm@163.com

miR-328-3p cooperated with triptolide to inhibit glioma cell growth, promote glioma cell apoptosis, and inhibit activation of the Akt/mTOR signaling pathway. **Conclusions** miR-328-3p is a tumor suppressor gene in glioma. Triptolide promotes apoptosis of glioma cells, inhibits activation of the Akt/mTOR signal pathway, and inhibits glioma cell growth through miR-328-3p.

【Keywords】 glioma; triptolide; miR-328-3p; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑胶质瘤是指来源于脑神经胶质细胞的肿瘤,是最常见的原发性颅内肿瘤,约占中枢神经系统恶性肿瘤的 81%^[1]。我国脑胶质瘤年发病率为 5 ~ 8/10 万,5 年病死率在全身肿瘤中仅次于胰腺癌和肺癌^[2]。胶质母细胞瘤是临床上最常见的,最具侵袭性的脑胶质瘤(WHO 分级为 IV 级),发病率为 3.2/10 万^[3]。尽管临床上采用手术后使用烷化剂替莫唑胺进行联合放化疗的标准治疗方案,患者的中位生存期仍不超过 2 年^[4]。因此,开发新的脑胶质瘤治疗药物并探索其分子机制至关重要。

雷公藤为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. 根的木质部,是我国传统的中药材,具有活血化瘀、清热解毒、消肿散结、杀虫止血的作用^[5]。雷公藤甲素是从中药雷公藤中提取的一种重要的二萜类活性化合物,具有显著的抗炎、免疫抑制、抗癌等作用,目前被认为是最有可能从传统医学转化为现代医学的活性化合物之一^[6]。雷公藤甲素可以抑制癌细胞地生长并在多种肿瘤的临床前研究中表现出较强地抗癌活性^[7]。目前,雷公藤甲素的衍生物正在进行癌症治疗的 I/II 期临床试验^[8]。前期研究结果显示,雷公藤甲素可以通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活抑制脑胶质瘤细胞的生长^[9],但具体的作用机制仍需进一步阐明。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类在物种间高度保守的小非编码 RNA,能够通过抑制信使 RNA (mRNA) 翻译或促进 mRNA 降解,进而在转录水平调节基因表达^[10]。由于它们在人体组织和体液中表达丰富,且具有作为疾病生物标志物的潜在用途,miRNA 已成为基础和转化生物医学研究的一个重要领域^[11-13]。在过去的 20 年中,miRNA 在各种癌症进展中的作用得到广泛的研究,多种 miRNA 被证明可以作为诊断和预后的潜在癌症生物标志物,为癌症筛查和治疗提供了新的视角^[14]。研究表明,胶质母细胞瘤患者血清细胞外囊泡中 miR-328-3p 的表达水平与患者的生存率密切相关^[15],但 miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞中的作用机制尚不清晰。

基于此,本研究以 miR-328-3p 为切入点,通过

体内外实验深入探讨 miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞中的作用,明确雷公藤甲素是否通过 miR-328-3p 抑制脑胶质瘤细胞的生长,为脑胶质瘤的诊断和预后提供新的理论基础,更为探索中药活性成分防治脑胶质瘤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

用于构建原位胶质瘤小鼠模型的 36 只 4 ~ 6 周龄 SPF 级健康雄性 BALB/c-nu 小鼠,体重 18 ~ 20 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2019-0008】。饲养于温度为 22 ± 2℃,湿度为 55% ± 10%,12 h/12 h 光/暗循环,饲养于河南中医药大学动物实验研究中心【SYXK(豫)2021-0015】。本实验通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审批(DWLL202003255)。

1.1.2 细胞

HMC3 小胶质细胞, A172、U251 和 U87-MG 脑胶质瘤细胞均购自国家实验细胞资源共享平台。

1.1.3 主要试剂与仪器

雷公藤甲素购自美国 Sigma 公司(38748-32-2); CCK8 检测试剂盒(SX536)购自日本同仁;胎牛血清(26219003)、DMEM 基础培养基均购自上海康宁公司(2123162); miR-328-3p (MQPS0001063-1-100)和 U6 (MQPS0000002-1-200)引物、miR-328-3p-mimics (miR10000752-1-5)均购自广州锐博生物科技有限公司; cleaved-caspase 3、8、9 (GR325748-3、GR324663-2、GR221670-16)和 cleaved-PARP (GR3292031-9)抗体, p-AKT (GR291298-7)抗体, p-mTOR (GR284919-23)抗体均购自英国 Abcam 公司; Lipofectamine 2000 (CN2478853)和 TRIzol (335911)试剂均购自美国 Thermo Fisher 公司; Fastking RT Kit (X0320)试剂购自北京天根生化科技有限公司; 结晶紫 (C11640836)购自上海麦克林生化科技有限公司; PBS (G0002)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI (2139335)

试剂盒购自美国 BD 公司; PVDF 膜 (ROHB74434) 购自美国 Merck Millipore 公司; D-luciferin (40902ES01) 购自上海叶森生物科技有限公司; 慢病毒 (LPK001) 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

PCR 扩增仪和酶标仪 (Bio-Rad; 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI; 美国); 化学发光成像仪 (Bio-Rad; 美国); 流式细胞仪 (BD; 美国); 脑立体定位仪 (瑞沃德; 中国); 小动物活体成像仪 (PerkinElmer; 美国)。

1.2 方法

1.2.1 原位胶质瘤小鼠模型的建立及处理

取 36 只 4 ~ 6 周龄的 SPF 级雄性 BALB/c-nu 小鼠, 随机分组, 每组 6 只, 分别为慢病毒对照组, 慢病毒高表达 miR-328-3p 组, 慢病毒对照 + 甲素组, 慢病毒高表达 miR-328-3p + 甲素组。使用脑立体定位仪将 5×10^5 个慢病毒荧光素酶载体介导的 miR-328-3p 稳定过表达的 U87 胶质瘤细胞悬液接种于小鼠大脑右侧尾状核区, 建立原位脑胶质瘤小鼠动物模型。7 d 后给予雷公藤甲素处理, 其中慢病毒对照 + 雷公藤甲素组和慢病毒高表达 miR-328-3p + 雷公藤甲素组给予 0.4 mg/kg 的雷公藤甲素, 慢病毒对照组和慢病毒高表达 miR-328-3p 组给予同等体积生理盐水, 腹腔注射, 隔日 1 次, 共 7 次。在甲素处理后的第 0、7 和 14 天, 用 15 mg/mL D-luciferin 感染荷瘤小鼠, 并使用 IVIS 光谱设备进行生物发光成像观察肿瘤生长状况。

1.2.2 qRT-PCR

组织和细胞总 RNA 的提取参照美国 Thermo Fisher 公司 TRIzol 试剂操作说明书, miRNA 逆转录使用北京天根公司的 Fastking RT 试剂盒, 通过逆转录 PCR 合成 cDNA, 使用美国 KAPA SYBR FAST qPCR 试剂盒进行扩增。miR-328-3p 特异性引物从广州锐博生物科技有限公司获得。U6 所用引物 (正向引物: 5'-CTCGCTCGGCAGCACA-3', 反向引物: 5'-AACGCTCTCACGAATTTGCGT-3')。结果使用 QuantStudio Q7 实时 PCR 系统 (ThermoFisher, MA, USA) 进行分析。U6 用作 miRNA 内参, 根据比较 CT 值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 对 miRNA 表达进行相对定量分析。

1.2.3 细胞的接种和转染

U251 细胞所用培养基为含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素 (145394) 的

DMEM 培养基, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中静置培养, 当细胞融合度达到 60% 左右时, 对细胞进行转染。转染方法按照 Invitrogen 公司提供的 Lipofectamine 2000 的说明书进行, 每组设 3 个复孔。将 5×10^4 个细胞用 500 μ L 无抗生素的培养基接种至 24 孔板中, 用 50 μ L Opti-MEM 培养基分别稀释 miR-328-3p mimics、mimics control 和 Lipofectamine 2000, 室温静置 5 min。轻柔混匀 Lipofectamine 2000 和 miR-328-3p mimics 或 mimics control, 室温静置 20 min。随后将上述混合液均匀加入每个孔, 并前后轻轻摇动细胞板, 放入培养箱中继续培养。转染 24 h 后, 用雷公藤甲素处理。

1.2.4 细胞增殖-毒性实验

取状态良好的对数期 U251 细胞, 消化并计数后, 按照 2500 个细胞/孔的密度接种至 96 孔培养板中, 置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。过夜培养 24 h 待细胞贴壁后, 用雷公藤甲素处理细胞, 对照组加入相同体积的 DMSO, 每组设置 5 个平行重复。24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37℃ 孵育 1 h。用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度。每组实验独立重复 3 次。细胞存活率按照如下公式算: 细胞存活率 = [(实验孔 - 空白孔) / (对照孔 - 空白孔)] \times 100%, 抑制率 = 1 - 细胞存活率。得到细胞增殖抑制率后, 利用 GraphPad Prism 软件计算细胞的半数生长抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.2.5 克隆形成实验

U251 细胞转染 24 h 后, 将生长状态良好处于对数生长期的 U251 细胞接种于 6 孔培养板中, 每组 3 个复孔。待细胞贴壁后, 用 0.0003 μ mol/L 的雷公藤甲素处理细胞, 24 h 后, 更换新鲜培养基继续培养, 每隔 3 d 进行换液并观察细胞形态, 显微镜下观察克隆大小。培养大约 10 d 待孔中大多数单个细胞克隆中细胞数大于 50 个, 克隆清晰可见为止, 弃上清, PBS 洗涤细胞 1 次。每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 4℃ 冰箱固定 60 min, PBS 洗 2 次。使用 0.1% 的结晶紫染液染色 20 min。PBS 洗涤细胞数次, 晾干后拍照并计数克隆数。

1.2.6 细胞凋亡检测

采用 BD 公司的 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒用流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。步骤如下: 用 0.1% 不含 EDTA 的胰酶消化处于对数生长期的 U251, 室温 2000 r/min 离心细胞 5 min, 收集细胞。

用预冷的 $1 \times$ PBS 洗涤 3 次,离心 5 min。加入 $100 \mu\text{L}$ 的 $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞,再加入 $7.5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 标记细胞,混匀后,避光,室温孵育 15 min。上机前 5 min 加入 $5 \mu\text{L}$ 的 PI 染液,30 min 内完成上机。

1.2.7 Western Blot

使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白。蛋白质浓度通过 BCA 蛋白质测定法测定。通过 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质样品,转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,将膜在 4°C 下与 cleaved caspase 3 (1:1000), cleaved caspases 8 (1:3000), cleaved caspase 9 (1:3000), cleaved PARP (1:3000), p-Akt (1:3000), p-mTOR (1:3000) 和 β -actin (1:5000) 孵育。用含有 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液 (TBS) 洗涤条带 3 次,用 HRP 标记的二抗孵育 1 h。与 ECL 发光溶液孵育后,用 Bio-Rad

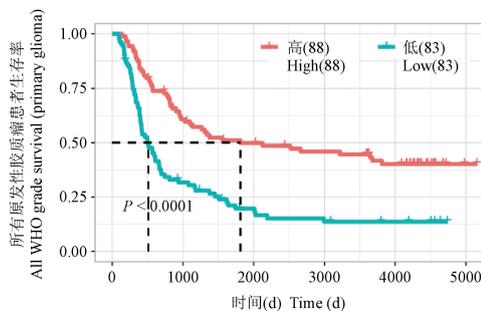
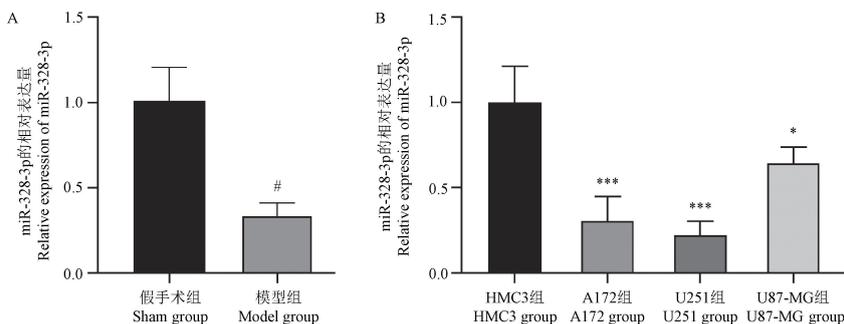


图 1 miR-328-3p 表达水平与脑胶质瘤患者生存率的相关性

Figure 1 Correlation between miR-328-3p expression level and survival probability of glioma

2.2 miR-328-3p 在脑胶质瘤组织和细胞中表达降低

qRT-PCR 结果显示,在原位胶质瘤小鼠模型中,与假手术组相比,模型组中 miR-328-3p 的表达



注:与假手术组比较, # $P < 0.05$;与 HMC3 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 miR-328-3p 的相对表达水平

Note. Compared with the sham group, # $P < 0.05$. Compared with the HMC3 group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Relative expression levels of miR-328-3p

ChemiDocMP 发光成像系统检测条带。

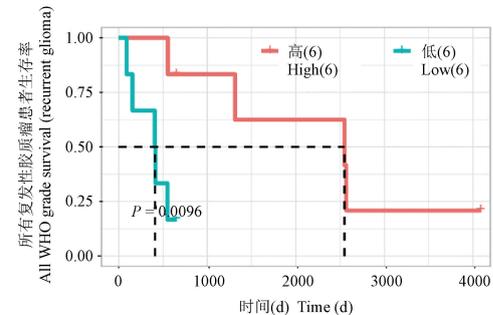
1.3 统计学分析

所有数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。两组之间比较使用 Student's *t*-test 检验,多组比较采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-328-3p 的表达水平与脑胶质瘤患者总生存率呈正相关

为了研究 miR-328-3p 在脑胶质瘤中的作用,通过中国胶质瘤基因组图谱 (Chinese glioma genome atlas, CGGA) 数据库分析了 miR-328-3p 与脑胶质瘤患者总生存率之间的关系。结果显示,miR-328-3p 与原发性和复发性脑胶质瘤患者的总生存率相关,低表达 miR-328-3p 的患者生存率显著低于高表达 miR-328-3p 的患者 (图 1)。



水平降低 (图 2A)。与小胶质细胞 HMC3 组相比,miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞 A172、U251 和 U87-MG 中的表达明显下调 (图 2B);且在 U251 细胞中表达差异最明显,故后续选择 U251 细胞作为研究对象。

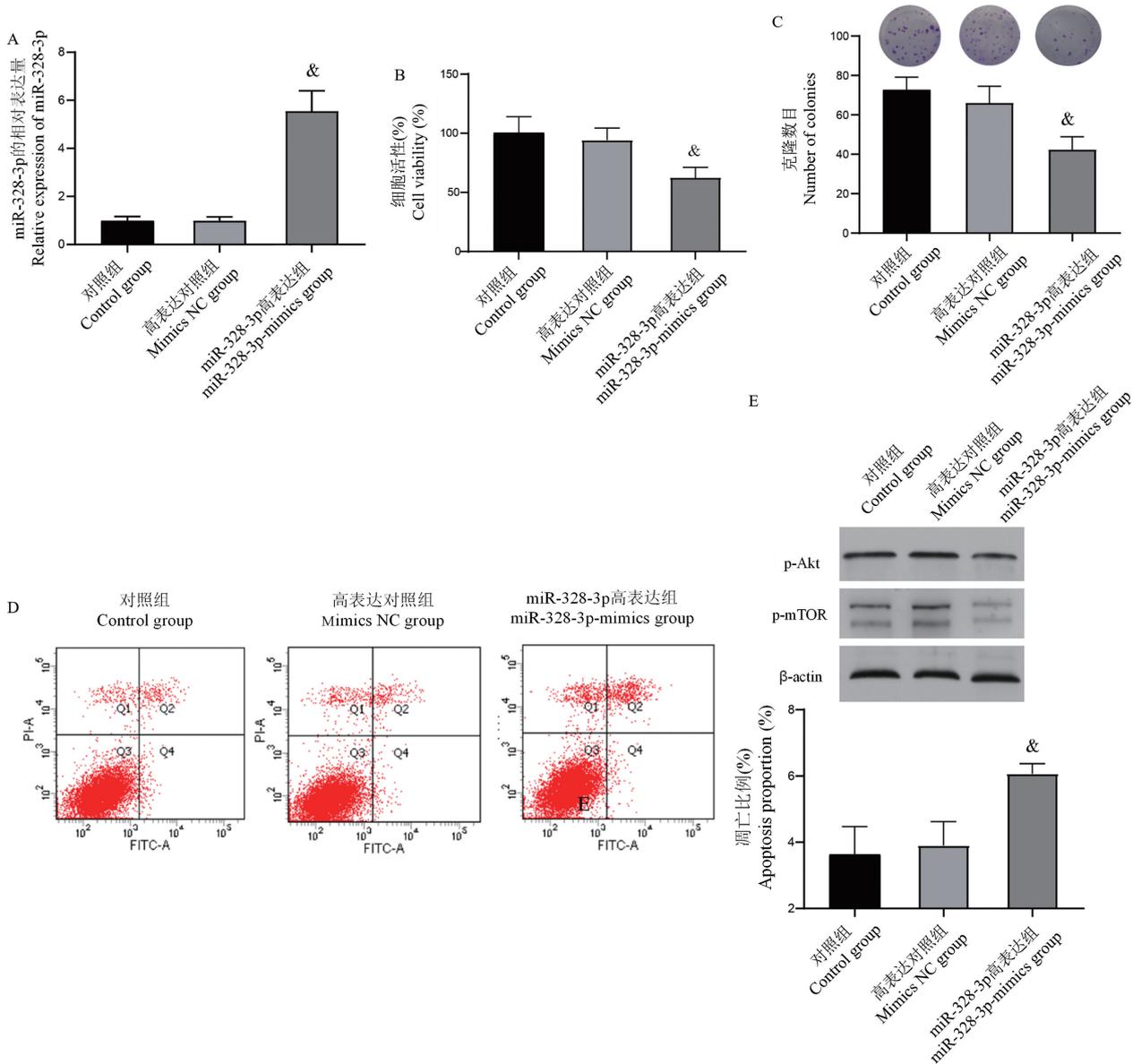
2.3 miR-328-3p 过表达抑制脑胶质瘤细胞的生长,促进凋亡和抑制 Akt/mTOR 通路的激活

在 U251 细胞中转染 miR-328-3p-mimics 过表达 miR-328-3p,结果显示 miR-328-3p 高表达组 miR-328-3p 的表达明显上调(图 3A)。图 3B 和图 3C 结果显示,与高表达对照组相比较,miR-328-3p 高表达组细胞的生存能力和克隆形成能力均下降。FITC-AnnexinV/PI 双染色法结果显示,与高表达对照组相比较,miR-328-3p 高表达组细胞的凋亡率升高(图 3D)。与高表达对照组相比较,miR-328-3p

高表达组 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平降低(图 3E)。

2.4 miR-328-3p 过表达增强雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长、促进凋亡和 Akt/mTOR 活化的效应

0.03、0.1、0.3、1 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素处理 U251 细胞后,与对照组相比,0.1、0.3、1 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素组细胞的存活率下降,IC₅₀为 0.32 $\mu\text{mol/L}$,故后续选择 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤甲素作为处理剂量(图 4A)。雷公藤甲素处理后,与高表达对照组相比,miR-328-3p 高表达 + 甲素组 miR-328-3p 的表达水



注:与高表达对照组比较,[&] $P < 0.05$ 。

图 3 miR-328-3p 过表达对脑胶质瘤细胞生长、凋亡和 Akt/mTOR 信号通路的影响

Note. Compared with the mimics NC group, [&] $P < 0.05$.

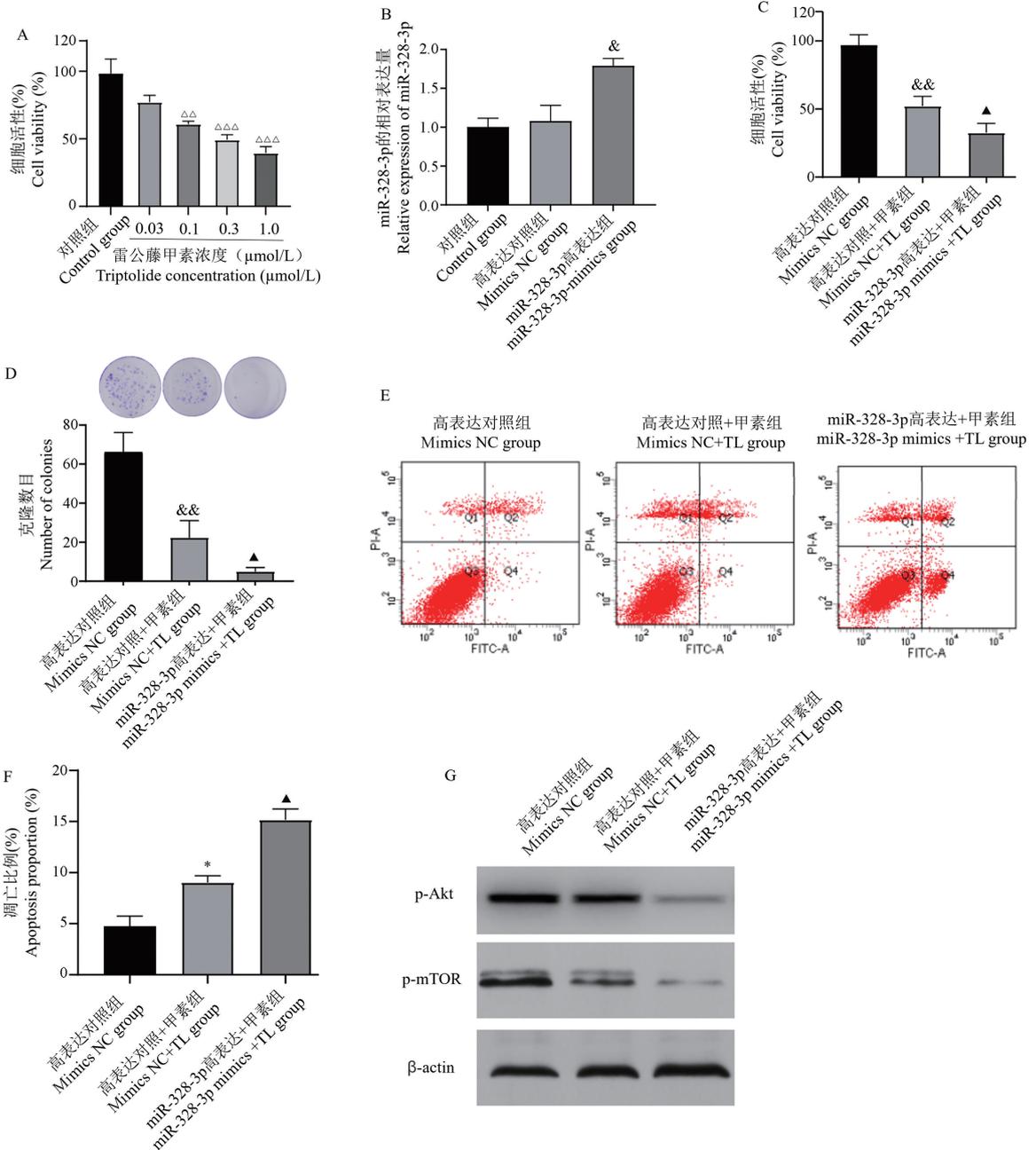
Figure 3 miR-328-3p overexpression regulated the abilities of viability, apoptosis and Akt/mTOR signaling pathway in glioma cells

平明显上调(图 4B)。与高表达对照组相比,高表达对照 + 甲素组细胞的生存能力和克隆形成能力降低;与高表达对照 + 甲素组相比,miR-328-3p 高表达 + 甲素组细胞的生存能力和克隆形成能力明显下调(图 4C 和 4D)。与高表达对照组相比,高表达对照 + 甲素组细胞的凋亡率升高,Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平降低。而 miR-328-3p 高表达 +

甲素组细胞的凋亡率较高表达对照 + 甲素组明显升高,Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平较较高表达对照 + 甲素组显著降低(图 4F,4F,4G)。

2.5 雷公藤甲素可以通过 miR-328-3p 调节 Akt-mTOR 通路抑制脑胶质瘤细胞的生长

为了确定 miR-328-3p 在体内对胶质瘤的影响,通过慢病毒高表达 miR-328-3p 建立了荧光素酶修



注:与对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$;与高表达对照组比较, $\&P < 0.05$, $\&\&P < 0.01$;与高表达对照 + 甲素比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

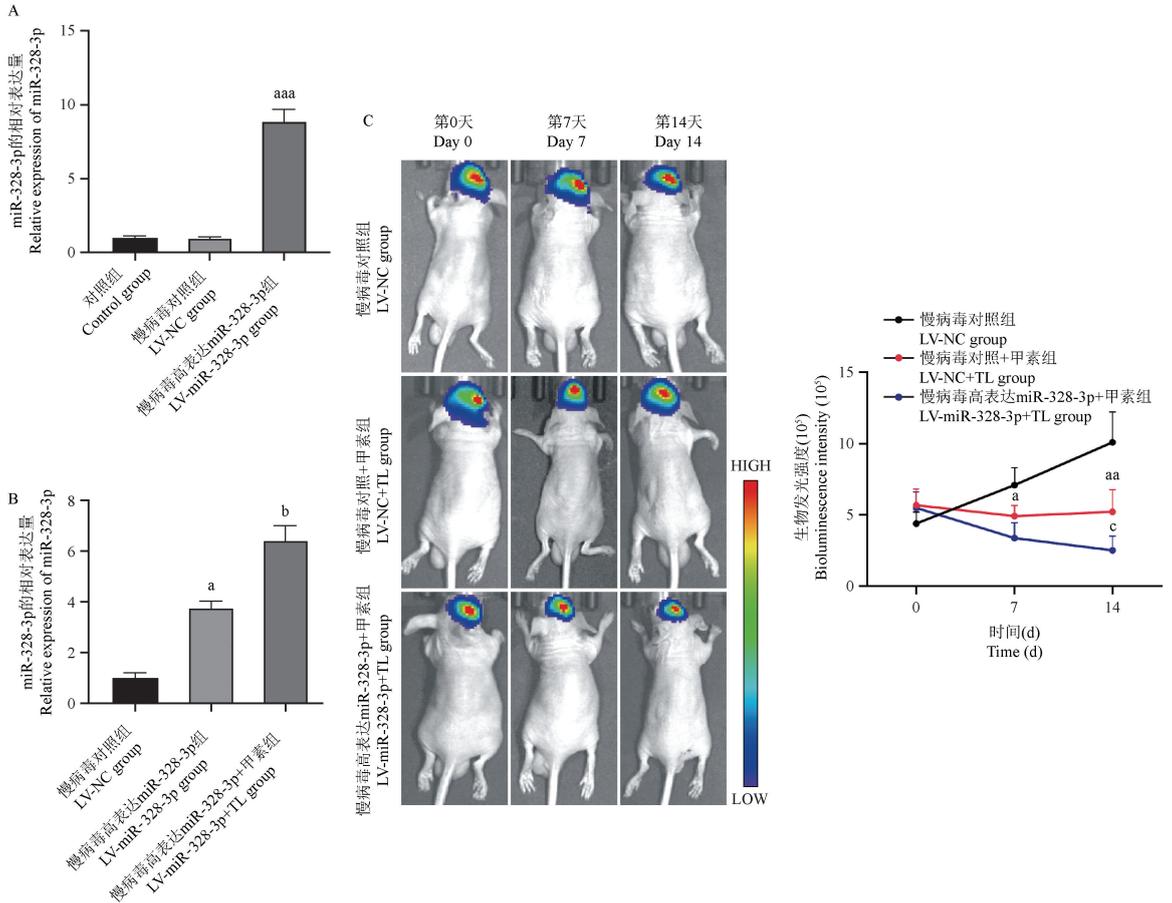
图 4 雷公藤甲素通过 miR-328-3p 调节脑胶质瘤细胞生长、凋亡和 Akt/mTOR 信号通路

Note. Compared with the control group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$. Compared with the mimics NC group, $\&P < 0.05$, $\&\&P < 0.01$. Compared with the mimics NC + TL group, $\blacktriangle P < 0.05$.

Figure 4 Triptolide regulated the glioma cell viability, apoptosis and Akt/mTOR signaling pathway by targeting miR-328-3p

饰的 U87 胶质瘤细胞,并将其用于异种移植模型(图 5A)。造模 7 d 后,用 0.4 mg/kg 的雷公藤甲素处理模型小鼠,腹腔注射,隔天 1 次,共 7 次(14 d)。在甲素处理后的第 0、7 和 14 天,通过小动物活体成像系统检测肿瘤的大小。qRT-PCR 结果显示,与慢病毒对照组比较,慢病毒高表达 miR-328-3p 组 miR-328-3p 的表达水平显著上调(图 5A),与慢病毒高

表达 miR-328-3p 组比较,慢病毒高表达 miR-328-3p + 甲素组 miR-328-3p 的表达水平上调(图 5B)。小动物活体成像结果显示,在甲素处理后的第 7 和 14 天,与慢病毒对照组比较,慢病毒对照 + 甲素组脑胶质瘤组织明显变小。在甲素处理后的第 14 天,与慢病毒对照 + 甲素组比较,慢病毒高表达 miR-328-3p + 甲素组脑胶质瘤组织明显缩小(图 5C)。



注:与慢病毒对照组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$,^{aaa} $P < 0.001$;与慢病毒高表达 miR-328-3p 组比较,^b $P < 0.05$;与慢病毒对照 + 甲素比较,^c $P < 0.05$ 。

图 5 miR-328-3p 与雷公藤甲素协同作用抑制脑胶质瘤细胞的体内生长

Note. Compared with the LV-NC group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$. Compared with the LV-miR-328-3p group, ^b $P < 0.05$. Compared with the LV-NC+TL group, ^c $P < 0.05$.

Figure 5 miR-328-3p inhibits the growth of brain glioma cells by synergistic action with triptolide *in vivo*

3 讨论

作为临床上最具侵袭性的脑肿瘤,胶质母细胞瘤具有快速生长和高侵袭性的特征。雷公藤甲素已被证明具有广泛的抗肿瘤活性^[16]。课题组之前的研究表明,雷公藤甲素可以通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活抑制脑胶质瘤细胞的生长^[9]。本

研究从 miRNA 的角度探讨了雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长的作用机制。首先,本研究提供了证据,表明 miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞中起到抑癌基因的作用,miR-328-3p 过表达可以通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡和抑制 Akt/mTOR 信号通路激活的方式抑制脑胶质瘤细胞的生长。这一发现丰富了 miRNA 在脑胶质瘤细胞中的作用及机制研究。

其次,本研究证明雷公藤甲素可以通过促进脑胶质瘤细胞中 miR-328-3p 的表达水平进而抑制脑胶质瘤细胞的生长。这可能为脑胶质瘤的治疗提供新的治疗策略。

癌细胞对化疗药物的耐药性仍然是成功治疗癌症的障碍之一。因此,开发新的抗癌药物具有重要意义^[17]。目前基于药用植物的天然产物或其衍生物已经开发多种药物并广泛应用于临床,如吗啡、阿司匹林、青蒿素和紫杉醇^[18]。作为中药雷公藤的主要活性成分,越来越多的证据表明雷公藤甲素在体外和体内对胰腺癌、胶质瘤、肺癌和乳腺癌等具有明显的抑制作用,显示出广谱的抗肿瘤和增敏效应^[17,19]。例如雷公藤甲素可以作为超级增强子调节剂,通过调控超级增强子的活性,重新编程胰腺癌的细胞“对话”和分子信号,从而发挥抗肿瘤作用^[20]。雷公藤甲素通过抑制 β -catenin 介导的上皮-间质转化抑制非小细胞肺癌的生长和转移^[21]。在多发骨髓瘤中,雷公藤甲素可以通过调节组蛋白去甲基化酶 LSD1 和 JMJD2B 的表达,有效抑制细胞的生长,诱导细胞周期停滞和凋亡^[22]。研究表明,雷公藤甲素对恶性胶质瘤的增殖具有明显的抑制作用,暗示了雷公藤甲素作为治疗胶质瘤的候选药物的潜力和前景^[23-24]。然而,雷公藤甲素在脑胶质瘤中的作用机制尚不清晰,需要进一步研究。

AKT/mTOR 信号通路在细胞生存、生长、增殖、血管生成、转录、翻译和代谢等过程中起着至关重要的作用^[25]。研究发现,AKT/mTOR 信号通路在多种癌症中被过度激活,临床试验也证明, Akt/mTOR 信号通路的抑制可以导致肿瘤的消退^[26]。研究表明 miRNA 在肿瘤的起源和发展中起着重要作用。例如, Nan 等^[27] 的研究表明, miRNA-451 可以通过抑制 PI3K/Akt/Snail 信号通路和靶向 CAB39 阻断上皮间充质转化来抑制胶质瘤细胞生长和增殖。MiR-26a 通过靶向 PTEN 激活 PI3K/Akt 信号通路,促进胶质瘤中人脑微血管内皮细胞的增殖、迁移、血管生成^[28]。MiR-182 通过靶向 FBXW7 促进胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭并抑制凋亡^[29]。研究表明,胶质母细胞瘤患者血清外泌体中 miR-328-3p 的表达水平与健康对照组具有显著性差异,同时该研究采用机器学习方法构建的包含 miR-328-3p 在内的多变量诊断模型对 GBM 具有极高的准确性^[30]。然而, miR-328-3p 在脑胶质瘤细胞中的作用及是否参与了雷公藤甲素对胶质瘤的抑制作用,目

前尚未明确。基于 CGGA 数据库, 本研究发现, miR-328-3p 的表达水平与临床患者的预后密切相关。接下来,通过功能获得性实验表明, miR-328-3p 可以抑制胶质瘤细胞的增殖并诱导其凋亡,这意味着 miR-328-3p 在脑胶质瘤中作为肿瘤抑制 miRNA 发挥作用。本研究进一步阐明, miR-328-3p 通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活抑制脑胶质瘤细胞的生长,而雷公藤甲素可以上调 miR-328-3p 的表达水平,和 miR-328-3p 协同作用通过抑制 Akt/mTOR 信号通路的激活而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。这些证据表明 miR-328-3p 在脑胶质瘤的进展中起关键作用,并在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞的生长和促进凋亡中发挥调节作用。

综上所述,目前的研究证实雷公藤甲素和 miR-328-3p 在体外细胞和体内胶质瘤异种移植模型中发挥着重要作用。miR-328-3p 的上调可以通过抑制 Akt/mTOR 信号通路来抑制胶质瘤细胞的增殖和诱导凋亡,表明 miR-328-3p 是胶质瘤细胞中的肿瘤抑制 miRNA。此外,雷公藤甲素通过上调 miR-328-3p 抑制胶质瘤细胞的生长,可能为胶质瘤的分子靶向治疗提供新思路 and 潜在靶点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Xu S, Tang L, Li X, et al. Immunotherapy for glioma: current management and future application [J]. Cancer Lett, 2020, 476: 1-12.
- [2] 国家卫生健康委员会医政医管局, 中国抗癌协会脑胶质瘤专业委员会, 中国医师协会脑胶质瘤专业委员会. 脑胶质瘤诊疗指南(2022 版) [J]. 中华神经外科杂志, 2022, 38(8): 757-777.
Medical Administration of the NHC, CACA Committee of Glioma, CMDA-Committee of Glioma. Guidelines for diagnosis and treatment of glioma (2022 edition) [J]. Chin J Neurosurg, 2022, 38(8): 757-777.
- [3] Nicholson JG, Fine HA. Diffuse glioma heterogeneity and its therapeutic implications [J]. Cancer Discov, 2021, 11(3): 575-590.
- [4] Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 51: 50-58.
- [5] 冯雪, 方赛男, 高雨鑫, 等. 雷公藤制剂安全性的循证评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 425-439.
Feng X, Fang SN, Gao YX, et al. Evidence-based evaluation on safety of *Tripterygium wilfordii* preparations [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(3): 425-439.
- [6] Gao J, Zhang Y, Liu X, et al. Triptolide: pharmacological spectrum, biosynthesis, chemical synthesis and derivatives [J].

- Theranostics, 2021, 11(15): 7199–7221.
- [7] Cai J, Yi M, Tan Y, et al. Natural product triptolide induces GSDME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 190.
- [8] Noel P, von Hoff DD, Saluja AK, et al. Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(5): 327–341.
- [9] Liu X, Zhao P, Wang X, et al. Triptolide induces glioma cell autophagy and apoptosis via upregulating the ROS/JNK and downregulating the Akt/mTOR signaling pathways [J]. Front Oncol, 2019, 9: 387.
- [10] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6249.
- [11] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.
- [12] Yoon AJ, Wang S, Kutler DI, et al. microRNA-based risk scoring system to identify early-stage oral squamous cell carcinoma patients at high-risk for cancer-specific mortality [J]. Head Neck, 2020, 42(8): 1699–1712.
- [13] Citron F, Armenia J, Franchin G, et al. An integrated approach identifies mediators of local recurrence in head and neck squamous carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14): 3769–3780.
- [14] He B, Zhao Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2628–2647.
- [15] Tzaridis T, Reiners KS, Weller J, et al. Analysis of serum miRNA in glioblastoma patients: CD44-based enrichment of extracellular vesicles enhances specificity for the prognostic signature [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7211.
- [16] Liu X, Zhao P, Wang X, et al. Celestrol mediates autophagy and apoptosis via the ROS/JNK and Akt/mTOR signaling pathways in glioma cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 184.
- [17] Hou ZY, Tong XP, Peng YB, et al. Broad targeting of triptolide to resistance and sensitization for cancer therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 771–780.
- [18] Tong L, Zhao Q, Datan E, et al. Triptolide: reflections on two decades of research and prospects for the future [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38(4): 843–860.
- [19] Hou W, Liu B, Xu H. Triptolide: medicinal chemistry, chemical biology and clinical progress [J]. Eur J Med Chem, 2019, 176: 378–392.
- [20] Noel P, Hussein S, Ng S, et al. Triptolide targets super-enhancer networks in pancreatic cancer cells and cancer-associated fibroblasts [J]. Oncogenesis, 2020, 9(11): 100.
- [21] Deng QD, Lei XP, Zhong YH, et al. Triptolide suppresses the growth and metastasis of non-small cell lung cancer by inhibiting β -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(9): 1486–1497.
- [22] Wen L, Chen Y, Zeng LL, et al. Triptolide induces cell-cycle arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells *in vitro* via altering expression of histone demethylase LSD1 and JMJD2B [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(1): 109–119.
- [23] Yu D, Zheng F, Wang L, et al. Novel stable isotope-resolved metabolomics method for a small number of cells using chip-based nano-electrospray mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2021, 93(41): 13765–13773.
- [24] Zhao G, Newbury P, Ishi Y, et al. Reversal of cancer gene expression identifies repurposed drugs for diffuse intrinsic pontine glioma [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 150.
- [25] Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: biological and therapeutic significance [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 147–160.
- [26] Alzaharani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125–132.
- [27] Nan Y, Guo L, Lu Y, et al. miR-451 suppresses EMT and metastasis in glioma cells [J]. Cell Cycle, 2021, 20(13): 1270–1278.
- [28] Wang ZF, Liao F, Wu H, et al. Glioma stem cells-derived exosomal miR-26a promotes angiogenesis of microvessel endothelial cells in glioma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 201.
- [29] Liu S, Liu H, Deng M, et al. miR-182 promotes glioma progression by targeting FBXW7 [J]. J Neurol Sci, 2020, 411: 116689.
- [30] Ebrahimkhani S, Vafae F, Hallal S, et al. Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis [J]. NPJ Precis Oncol, 2018, 2: 28.

[收稿日期] 2023-02-22