

. 实验研究 .

# 土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡的影响

张 旭 田召辉 郭 琳 姜永利

**【摘要】目的** 探讨土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。**方法** 体外培养人胶质瘤 U251 细胞，取对数期生长的 U251 细胞分为空白对照组和土木香内酯(浓度分别为 2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ )组，每组各 10 个复孔。使用 MTT 法检测 U251 细胞的增殖抑制率，采用流式细胞术检测 U251 细胞的凋亡率，免疫印迹法检测 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  蛋白表达，使用 RT-PCR 检测 c-Myc、Cyclin D1 mRNA 的表达水平。**结果** 随土木香内酯浓度增加，U251 细胞增殖抑制率明显增高( $P<0.05$ )，细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ )。与空白对照组相比，土木香内酯组 U251 细胞 PDK1、Akt 和 GSK3 $\beta$  蛋白表达水平均无明显差异( $P>0.05$ )，但 PDK1、Akt 和 GSK3 $\beta$  蛋白的磷酸化水平均显著降低( $P<0.05$ )。随着土木香内酯浓度的增加，U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 的表达水平明显降低( $P<0.05$ )。**结论** 土木香内酯抑制人胶质瘤 U251 细胞的增殖并促进其凋亡，其作用机制可能是通过调节 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路有关，且在一定范围内呈浓度依赖性。

**【关键词】** 胶质瘤；U251 细胞；细胞增殖；细胞凋亡；土木香内酯；PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  通路；c-Myc；Cyclin D1

**【文章编号】** 1009-153X(2020)01-0032-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

## Effects of alantolactone on the apoptosis of human glioma cell line U251 cells

ZHANG Xu<sup>1</sup>, TIAN Zhao-hui<sup>1</sup>, GUO Lin<sup>1</sup>, LOU Yong-li<sup>2</sup>. 1. Department of Neurosurgery, General Hospital, Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan 467000 China; 2. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Municipal Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University Zhengzhou, 450000, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of alantolactone on the apoptosis of human glioma cell line U251 cells and its mechanism. **Methods** Human glioma U251 cells were cultured in vitro, and then they were divided into blank control group, experimental group I in which U251 cells were treated with 2.5  $\mu\text{mol/L}$  alantolactone, experimental group II in which U251 cells were treated with 5.0  $\mu\text{mol/L}$  alantolactone and experimental group III in which U251 cells were treated with 10.0  $\mu\text{mol/L}$  alantolactone. The MTT assay was used to detect the proliferation of U251 cells and the apoptosis of U251 cells was detected by flow cytometry 24 hours after the treatment with different doses drug. The protein expressions of phosphoinositid-dependent kinase (PDK1), protein kinase B (Akt) and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in the U251 cells were detected by Western blot. The expressions of c-Myc and cyclin D1 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The results of MTT assay showed that the different doses of alantolactone effectively inhibited the proliferation of U251 cells ( $P<0.05$ ), and the inhibition rate of U251 cells proliferation increased with the increase of the dose of alantolactone. Flow cytometry results showed that the apoptosis rates of the U251 cells were significantly higher in all the experimental groups than that in the blank control group ( $P<0.05$ ), and the apoptosis of U251 cells induced by alantolactone is significantly dose-dependent ( $P<0.05$ ). There were insignificant differences in the levels of PDK1, Akt and GSK3 $\beta$  protein expressions in U251 between the experimental group and blank control group and among all the experimental groups ( $P>0.05$ ), but the levels of phosphorylated protein expression were significantly lower in all the experimental groups than that in the blank control group ( $P<0.05$ ). The results of RT-PCR showed that the levels of c-Myc and cyclin D1 mRNA expressions in the U251 cells were significantly lower in the all the experimental groups than those in the blank control group ( $P<0.05$ ) and the down-regulation of the levels of c-Myc and cyclin D1 induced by alantolactone was significantly dose-dependent ( $P<0.05$ ). **Conclusion** It is suggested that alantolactone can inhibit the proliferation and promotes apoptosis of human glioma cell line U251 cells in a dose-dependent manner possibly by the regulation of the expressions of the proteins related to PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway and cell cycle factors.

**【Key words】** Alantolactone; PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  pathway; U251 cells; Proliferation; Cell apoptosis; Expression

胶质瘤是颅内最常见的一种原发性恶性肿瘤，  
doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.01.011  
基金项目:2016 年河南省医学科技攻关计划(201602379)  
作者单位:467000 河南平顶山,平煤神马医疗集团总医院神经外科  
(张 旭、田召辉、郭 琳);450000 郑州,郑州大学附属郑州市中心  
医院神经外科(姜永利)

呈弥漫性无限增殖,即使采用手术联合放、化疗等治疗,预后仍不理想<sup>[1,2]</sup>。土木香内酯具有抗炎、抗氧自由基等药理活性<sup>[3]</sup>。研究发现,土木香内酯通过消耗癌细胞内谷胱甘肽是促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,活化肝癌细胞内蛋白酶水解酶,进而诱导癌细胞凋亡<sup>[4]</sup>。抑制癌细胞增殖是抗癌

的重要手段之一。癌细胞增殖涉及多种因子的调控,如周期素 D1(cyclin D1)、c-Myc、周期素依赖激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4)等<sup>[5]</sup>。另外,磷酸肌醇依赖激酶-1(phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)/糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )通路在细胞增殖中发挥重要作用<sup>[6-8]</sup>。本文探讨土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组 人胶质瘤 U251 细胞(上海中国科学院)置于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(上海经科化学科技有限公司)中,在恒温培养箱中培养,取处于对数期的 U251 细胞制成浓度为 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml 的混悬液,每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板中,培养至细胞完全贴壁后,以 1:10 将母液稀释,制成 100  $\mu$ mol/L 浓度,分别加入浓度为 2.5、5、10  $\mu$ mol/L 的土木香内酯(纯度 > 98%, 20 mg/支,南京道斯夫生物科技有限公司)。同时设空白对照组。

1.2 U251 细胞增殖抑制率的检测 土木香内酯作用 24 h 后,每孔各加入 20  $\mu$ l MTT 溶液,4 h 后停止培养,去上清。每孔加入二甲基亚砷溶液,使用摇床低速充分振荡。测量吸光度(optic Density, OD)。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%<sup>[9]</sup>。

1.3 U251 细胞凋亡率的检测 土木香内酯作用 48 h 后,离心 5 min,去上清,制作单细胞悬液。在 Annexin V-PI 染色液中避光染色,采用流式细胞仪(Thermo 公司)检测细胞凋亡率。

1.4 U251 细胞 PDK1、Akt、GSK3 $\beta$  蛋白表达的检测 使用免疫印迹法检测。加入缓冲液,加热 5 min,低温离心 5 min,裂解细胞,取上清液。使用 BCA 法测定蛋白浓度,使用湿转法将目标蛋白转移至硝酸纤维素膜上,室温下用脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,使用 PBST 洗膜,加入二抗,室温下孵育 2 h 后,ECL 发光试剂显影。对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参 $\beta$ -actin 条带灰度值<sup>[2]</sup>。

1.5 U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 表达的检测 使用 RT-PCR 法进行检测。在-80 $^{\circ}$ C 下研磨提取总 RNA,将 RNA 反转录生成 cDNA 后,进行 RT-PCR。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算 c-Myc、CylinD1 mRNA 的表达量<sup>[2]</sup>。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件处理,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析和 LSD-t 检验;计

数资料采用 $\chi^2$ 检验; $P<0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 土木香内酯对 U251 细胞增殖抑制率的影响 随土木香内酯浓度增加,OD 值均明显降低( $P<0.05$ ),而细胞增殖抑制率明显增高( $P<0.05$ )。见表 1。

2.2 土木香内酯对 U251 细胞凋亡率的影响 随土木香内酯浓度增加,细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ )。见图 1。

2.3 土木香内酯对 U251 细胞 PDK1、Akt、GSK3 $\beta$  蛋白表达的影响 与空白对照组相比,木香内酯组 U251 细胞 PDK1、Akt 和 GSK3 $\beta$  蛋白表达水平均无明显差异( $P>0.05$ ),但 PDK1、Akt 和 GSK3 $\beta$  蛋白的磷酸化水平均显著降低( $P<0.05$ )。见图 2。

2.4 土木香内酯对 U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 表达的影响 随着土木香内酯浓度的增加,c-Myc、CyclinD1 mRNA 的表达水平明显降低( $P<0.05$ )。见表 2、图 3。

3 讨论

胶质瘤具有高侵袭性、高异型性、对现有的化疗药物敏感性差等特点,术后极易复发,生存期短<sup>[10-11]</sup>。因此,寻找新的、有效的、副作用小的治疗药物,对抑制胶质瘤的疾病进展具有重要的临床意义。

土木香内酯具有多种生物活性,对体外培养的肺癌细胞系和乳腺癌细胞,既能抑制细胞增殖,又诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本文发现土木香内酯能有效抑制 U251 细胞的增殖,促进其凋亡。

PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路在细胞增殖与凋亡中发挥着关键作用<sup>[8]</sup>。PDK1 是 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路中的关键分子<sup>[13-15]</sup>。研究表明,Akt 信号通路参与诱导鳞癌细胞上皮间质转化的发生,促进肿瘤细胞侵袭、转移<sup>[6]</sup>。本文结果显示,与空白对照组相比,土木香内酯组 U251 细胞 PDK1、Akt 和 GSK3 $\beta$  蛋白的表达水平无差异( $P>0.05$ ),但蛋白磷酸化水平均较明显降低( $P<0.05$ )。可见,土木香内酯对 U251

表 1 各组人胶质瘤细胞 U251 吸光度值和增殖抑制率比较

分组	吸光度值	增殖抑制率
空白对照组	0.696 $\pm$ 0.042	0
土木香内酯 2.5 $\mu$ mol/L	0.501 $\pm$ 0.023**	(27.3 $\pm$ 7.93)**
土木香内酯 5.0 $\mu$ mol/L	0.328 $\pm$ 0.018*	(53.9 $\pm$ 4.09)*
土木香内酯 10.0 $\mu$ mol/L	0.082 $\pm$ 0.009**	(89.3 $\pm$ 1.63)**

注:与空白对照组相应值比较,\*  $P<0.05$ ;与土木香内酯 5  $\mu$ mol/L 组相应值比较,#  $P<0.05$

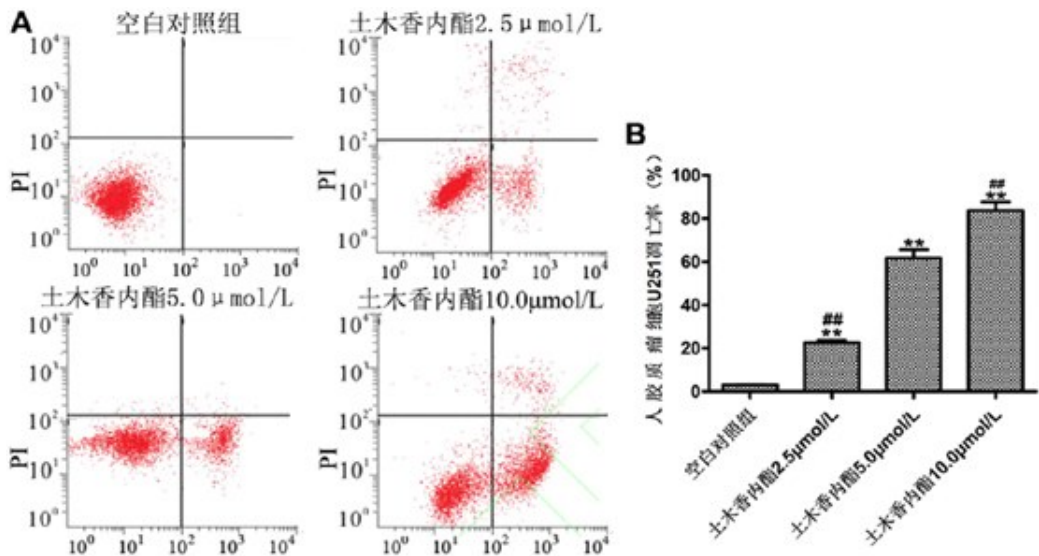


图 1 土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞凋亡的影响  
与空白对照组相应值比较, \*\*  $P<0.05$ ; 与土木香内酯 5 μmol/L 比较, ##  $P<0.05$

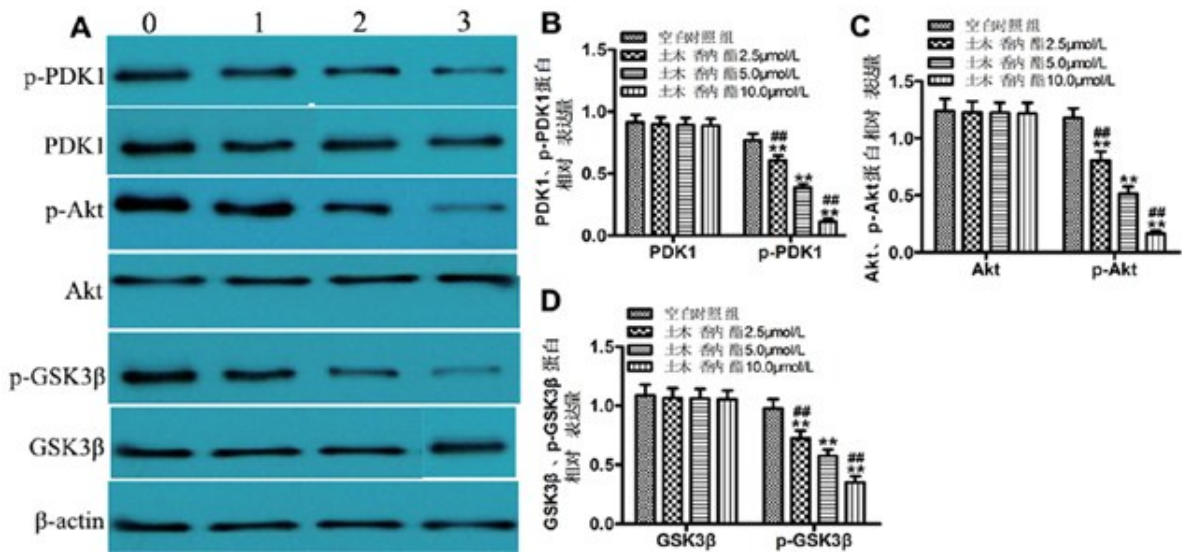


图 2 土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞 PDK1/Akt/GSK3β 蛋白表达的影响  
与空白对照组相应值比较, \*\*  $P<0.05$ ; 与土木香内酯 5 μmol/L 比较, ##  $P<0.05$

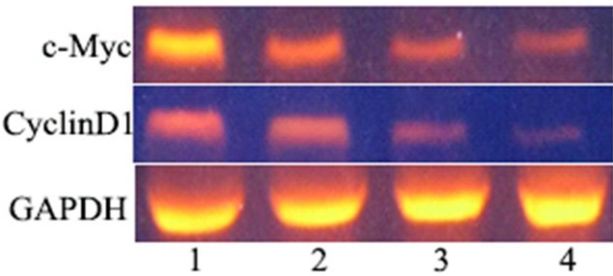


图 3 土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 表达的影响  
1. 空白对照组; 2. 土木香内酯 2.5 μmol/L; 3. 土木香内酯 5.0 μmol/L;  
4. 土木香内酯 10.0 μmol/L

表 2 土木香内酯对人胶质瘤 U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 的表达影响

分组	c-Myc	CyclinD1
空白对照组	0.763±0.061	0.893±0.065
土木香内酯 2.5 μmol/L	0.629±0.057 <sup>*</sup>	0.676±0.053 <sup>#</sup>
土木香内酯 5.0 μmol/L	0.444±0.053 <sup>*</sup>	0.501±0.041 <sup>*</sup>
土木香内酯 10.0 μmol/L	0.186±0.021 <sup>*</sup>	0.268±0.032 <sup>#</sup>

注: 与空白对照组相应值比较, \*  $P<0.05$ ; 与土木香内酯 5 μmol/L 比较, #  $P<0.05$



细胞增殖、凋亡的调控可能与 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路有关。

细胞增殖涉及多种因子,如 c-Myc、CyclinD1、mTOR 等<sup>[7]</sup>。有研究发现,土木香内酯通过抑制 CyclinD1 的表达,阻滞细胞周期 G1/S 的转换,进而抑制 HS-5 细胞及多发性骨髓瘤细胞增殖<sup>[16]</sup>。本文结果表明,土木香内酯干预后,U251 细胞 c-Myc、CyclinD1 mRNA 的表达水平均明显降低( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖性( $P<0.05$ )。

综上所述,土木香内酯抑制人胶质瘤 U251 细胞的增殖并促进其凋亡,其作用机制可能是通过调节 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路及细胞周期因子的表达有关,且在一定范围内呈浓度依赖性。

【参考文献】

[1] Liu XR, Li YQ, Hua C, *et al.* Oxidative stress inhibits growth and induces apoptotic cell death in human U251 glioma cells via the caspase-3-dependent pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(21): 4068-4075.

[2] 郭培中,杨小梅,龚业莉,等.白藜芦醇诱导人胶质瘤细胞 U251 增殖抑制与凋亡的作用研究[J].*中华中医药学刊*, 2017,35(5):1094-1096.

[3] 靳文军,谭小武.土木香内酯抗肿瘤的研究进展[J].*中国现代医药杂志*,2017,19(8):101-104.

[4] Ding Y, Wang H, Niu J, *et al.* Induction of ROS overload by alantolactone prompts oxidative dna damage and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 558.

[5] 李文梅,刘佳佳,高凤兰.周期素依赖性激酶 10 与肿瘤[J].*中国老年学杂志*,2017,37(5):1281-1282.

[6] Zhang X, Jiang G, Sun M, *et al.* Cytosolic THUMPD1 promotes breast cancer cells invasion and metastasis via the AKT-GSK3-Snail pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8):

13357-13366.

[7] 韩秀,陈曦,唐宇,等. LDHB 调控 PDK1/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路促进脑胶质瘤细胞生长的研究[J]. *中国细胞生物学学报*,2018,40(4):551-559.

[8] 张琪,杨光华,刘少鹏,等. ADAM17-shRNA 通过 Akt/GSK3 $\beta$  信号通路促进 HT29 结肠癌细胞的凋亡[J]. *中国普外基础与临床杂志*,2018,25(5):534-539.

[9] 苗锐,赵耀,杨荣军,等. 紫草素对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*,2016,16(19):3646-3649.

[10] 洪音,孟浩,徐浚. MDM2 和 p53 基因在胶质瘤中表达及与其发生发展关系的荟萃分析[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*,2016,15(6):514-518.

[11] 胡淑丽. C-MYC 和 MDM2 在人脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤基础与临床*,2018,31(1):7-9.

[12] 姚瑶,孙月月,夏丹丹,等. 土木香内酯对 RPMI-8226 细胞的增殖抑制作用及其相关机制研究[J]. *中国实验血液学杂志*,2015,23(5):1336-1340.

[13] Döppler H, Storz P. Differences in metabolic programming define the site of breast cancer cell metastasis [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(4): 536-537.

[14] 涂业桃,舒静,田文林,等. 下调血管生成素基因表达对膀胱癌移植瘤生长及 p-AKT、p-GSK3 $\beta$ 、p-mTOR 表达的影响[J]. *广东医学*,2015,36(4):501-504.

[15] Jin Z, Cheng X, Feng H, *et al.* Apatinib inhibits angiogenesis via suppressing akt/gsk3beta/ang signaling pathway in anaplastic thyroid cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4): 1471-1484.

[16] Yao Y, Xia D, Bian Y, *et al.* Alantolactone induces G1 phase arrest and apoptosis of multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(8): 1122-1133.

(2018-09-19 收稿,2018-12-13 修回)

(上接第 31 页)

[7] Kendir S, Acar HI, Comert A. Window anatomy for neurosurgical approaches [J]. *J Neurosurg*, 2009, 111: 365-370.

[8] Ribas GC, Yasuda A, Ribas EC. Surgical anatomy of micro-neurosurgical sulcal key points [J]. *Neurosurgery*, 2006, 59: 177-210.

[9] Hwang SC, Im SB, Kim BT, *et al.* Safe entry point for twist-drill craniostomy of a chronic subdural hematoma [J]. *J Neurosurg*, 2009, 110: 1265-1270.

[10] Lee SJ, Hwang SC, Im SB. Twist-Drill or burr hole craniostomy for draining chronic subdural hematomas: how to choose it for chronic subdural hematoma drainage [J]. *Korean J Neurotrauma*, 2016, 12: 107-111.

[11] Horn EM, Feiz-Erfan I, Bristol RE. Bedside twist drill craniostomy for chronic subdural hematoma: a comparative study [J]. *Surg Neurol*, 2006, 65: 150-154.

(2019-04-21 收稿,2019-05-28 修回)