

. 实验研究 .

秋水仙碱对胶质瘤细胞系化疗敏感性的影响

吴 宇 朱馨艺 江洪祥 陈谦学

【摘要】目的 探讨秋水仙碱对胶质瘤细胞系化疗敏感性的影响及其机制。方法 采用不同浓度的替莫唑胺(TMZ)处理人脑胶质瘤细胞系 U87 和 A172 细胞,构建 TMZ 耐药细胞系 U87/TR 和 A172/TR,再使用秋水仙碱(10、30 ng/ml)干预 1、2、3 d,采用细胞计数法、BrdU 法和流式细胞术检测细胞活力、细胞增殖和细胞周期。生物信息学方法分析胶质瘤组织差异表达的微小 RNA(miRNAs),并预测其靶基因;然后,采用 qRT-PCR 检测 U-87/TR 和 A172/TR 细胞中这些 miRNAs 的表达情况,调控 miRNAs 的表达以观察秋水仙碱效应的变化。结果 秋水仙碱显著抑制 U87/TR 和 A172/TR 细胞的增殖活力($P<0.05$),呈时间依赖性和剂量依赖性($P<0.05$),而且显著阻滞 U87/TR 和 A172/TR 的有丝分裂,使细胞阻滞在 G0/G1 期。30 ng/ml 秋水仙碱显著增加 TMZ 对 U87/TR 和 A172/TR 细胞增殖的抑制效果($P<0.05$),明显降低 TMZ 的 IC50 值($P<0.05$)。生信分析显示,胶质瘤组织 miR-330-3p、miR-491-5p、miR-6782-5p、miR-31-5p、miR-330-5p、miR-137 和 miR-433-3p 呈差异表达,秋水仙碱明显上调 U87/TR 和 A172/TR 细胞 miR-330-3p 的表达($P<0.05$)、明显抑制 miR-330-3p 靶基因 ErbB 的表达($P<0.05$)。抑制 miR-330-3p 表达明显逆转秋水仙碱的生物学效应($P<0.05$)。结论 秋水仙碱可以抑制 TMZ 耐药的胶质瘤细胞的增殖,其机制可能涉及到 miR-330-3p/ErbB 信号通路的调节。

【关键词】胶质瘤;U87 细胞;A172 细胞;替莫唑胺;秋水仙碱;化疗敏感性

【文章编号】1009-153X(2024)02-0097-08 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Effect of colchicine on the sensitivity of glioma cells to temozolomide chemotherapy

WU Yu, ZHU Xin-yi, JIANG Hong-xiang, CHEN Qian-xue. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of colchicine on the sensitivity of glioma cells to temozolomide (TMZ) chemotherapy and its mechanism. Methods Different concentrations of TMZ were used to treat human glioma cell lines U87 and A172, and to construct TMZ-resistant cell lines U87/TR and A172/TR. After colchicine (10, 30 ng/ml) treatment for 1, 2, and 3 days, cell viability, cell proliferation, and cell cycle were detected by cell counting, BrdU method, and flow cytometry, respectively. The differentially expressed microRNAs (miRNAs) in glioma tissues were analyzed by bioinformatics methods, and their target genes were predicted. Then, qRT-PCR was used to detect the expression of these miRNAs in U87/TR and A172/TR cells, and the expression of miRNAs was regulated to observe the changes of colchicine effects. Results Colchicine significantly inhibited the proliferation of U87/TR and A172/TR cells ($P<0.05$), with time- and dose-dependent manners ($P<0.05$). Colchicine significantly blocked mitosis of U87/TR and A172/TR cells, and induced cell cycle arrest in the G0/G1 Phase. Colchicine at the concentration of 30 ng/ml significantly increased the inhibitory effect of TMZ on proliferation of U87/TR and A172/TR cells ($P<0.05$), and significantly reduced the IC50 value of TMZ ($P<0.05$). Bioinformatics analysis showed that miR-330-3p, miR-491-5p, miR-6782-5p, miR-31-5p, miR-330-5p, miR-137, and miR-433-3p were differentially expressed in glioma tissues. Colchicine significantly upregulated the expression of miR-330-3p in U87/TR and A172/TR cells ($P<0.05$), and significantly inhibited the expression of miR-330-3p target gene ErbB ($P<0.05$). Inhibition of miR-330-3p significantly reversed the biological effects of colchicine ($P<0.05$). Conclusions Colchicine can inhibit the proliferation of TMZ-resistant glioma cells, and the mechanism may be involved in the regulation of miR-330-3p/ErbB signaling pathway.

【Key words】Glioma; U87 cells; A172 cells; Temozolomide; Colchicine; Chemotherapy sensitivity

胶质母细胞瘤是一种高度恶性的中枢神经系统肿瘤,呈浸润性生长,与正常脑组织之间没有明显边界,因此手术难以完全切除,即使采用手术切除结合

术后放化疗,总体疗效也较差^[1、2]。替莫唑胺(temozolomide, TMZ)与放疗联合治疗较单独放疗显著改善胶质母细胞瘤病人的预后,目前已成为胶质母细胞瘤的标准化疗药物^[3]。然而,许多胶质母细胞瘤病人对 TMZ 表现出耐药性^[4],因此,寻找有效降低胶质母细胞瘤对 TMZ 耐药的方法一直是神经外科领域的重要课题。研究发现,秋水仙碱可干扰肿瘤细胞的蛋白质代谢,抑制 RNA 聚合酶的活性,从而

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.02.008
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(吴 宇、朱馨艺、江洪祥、陈谦学)
通信作者:陈谦学,Email:chenqx666@whu.edu.cn

诱导多种肿瘤细胞凋亡,如乳腺癌细胞和肝癌细胞^[5-6]。本研究探索秋水仙碱对胶质瘤化疗敏感性的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 恶性胶质瘤细胞系 U87 和 A172 购自中国科学院细胞库,采用 RPMI-1640 培养基(美国 Invitrogen 公司)培养,培养基含有 10% 胎牛血清(美国 Invitrogen 公司)、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 建立 TMZ 耐药胶质瘤细胞系 根据参考文献[7]报道的方法诱导 TMZ 耐药的 U87 和 A172 细胞株。收集对数生长期 U87 和 A172 细胞,通过梯度递增培养基中 TMZ 浓度(0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 mg/L),从含有低浓度的 TMZ 的培养基培养细胞,待细胞生长稳定后 2 周,增加 TMZ 药物浓度,如此往复,6 个月后即可诱导出对 TMZ 耐药的细胞株,并将其分别命名为 U87/TR 和 A172/TR。

1.3 细胞活性实验 取对数生长期的 U87/TR 和 A172/TR 细胞,接种 96 孔板(5×10³ 个/孔)培养 3 h,然后添加秋水仙碱(10、30 ng/ml;美国 Sigma-Aldrich 公司),每个浓度设置 3 个平行孔,继续培养 1、2、3 d,每孔加入 10 μl CCK-8 试剂(上海碧云天生物技术股份有限公司)孵育 2 h,使用自动酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度(optical density, OD)。按照以下公式计算细胞存活率和药物对细胞的抑制率:细胞生长抑制率(%)=[(对照组 OD 值-用药组 OD 值)/对照组 OD 值]×100%。计算半数抑制药物浓度(IC₅₀ 值)。

1.4 BrdU 实验 将 U87/TR 和 A172/TR 细胞接种在 24 孔板中,并用二甲基亚砜或 30 ng/ml 秋水仙碱处理 24 h,之后将 BrdU(美国 Sigma-Aldrich 公司)添加到培养基中继续培养 4 h。然后,使用多聚甲醛室温固定细胞 15 mins,并在室温下使用 3% 牛血清蛋白封闭细胞 1 h,之后加入抗 BrdU 抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司)在 4 ℃ 下孵育过夜。使用 PBS 缓冲液清洗细胞后,使用 DAPI 避光孵育细胞 10 min。最后在荧光显微镜下,随机选择非重叠视野计算 BrdU 阳性细胞数。

1.5 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的 U87/TR 和 A172/TR 细胞,待细胞长至 80% 融合度时, PBS 缓冲液洗涤细胞,加入 1 ml 胰蛋白酶(美国 Invitrogen 公司)消化细胞。随后离心、弃上清,加入 1.5 ml 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞后离心,弃上清,加入 3.5 ml 无水乙醇 4 ℃ 固定 30 min, PBS 缓冲液清

洗细胞两遍后,加入 200 μl PBS 缓冲液和 2 μl RNA-ase A 溶液(0.25 mg/ml) 37 ℃ 孵育 30 min。最后向细胞悬液中加入 0.5 ml 碘化丙啶(50 μg/ml)溶液(美国 Southern Biotechnology 公司),室温下避光染色 30 min, PBS 缓冲液清洗后,流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 生信分析 通过 Gene Expression Omnibus 数据库下载基因芯片数据集 GSE90603 和 GSE112009,分析胶质瘤组织和正常脑组织 miRNA 的表达谱的变化。通过 TartgetScan7.1 数据库、StarBase 数据库、miRBD 数据库和 miRWalk 数据库来筛选 miR-330-3p 的下游基因。基因富集分析使用 Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org/>)和 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)完成。

1.7 细胞转染 将 U87/TR 和 A172/TR 细胞以 1×10⁶ 个/ml 的密度接种于 60 mm 培养板,培养 24 h 后进行细胞转染。miR-330-3p 抑制剂(miR inhibitors)及对照 miRNA(广州锐博生物科技有限公司),按照 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)说明书进行细胞转染。转染 24 h 后,用 qRT-PCR 检测转染效率。

1.8 qRT-PCR 检测 收集 U87/TR 和 A172/TR 细胞,按照总 RNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司)说明书提取总 RNA,使用逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)将总 RNA 逆转录为 cDNA,利用 Primer premier 5.0 软件设计目的基因及内参基因 U6 的 qRT-PCR 引物,以 cDNA 为模板,使用 Tsingke PCR kit 进行 PCR 扩增。然后使用 SYBR Premix-Ex-Taq 和 ABI7300 系统进行 qRT-PCR。反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 35 个循环, 72 ℃ 总延伸 5 min。反应体系为 20 μl,以 U6 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算细胞 miRNAs 表达水平。引物由上海生工生物工程技术有限公司公司合成,引物序列:miR-330-3p 上游引物 5'-TATAGCAAAGCACACGGCCTGC-3',下游引物 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3';内参 U6 上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.9 统计学分析 使用 Graphad Prism 8.0 软件进行作图和统计学分析;正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 student's-t 检验和单因素方差分析;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 秋水仙碱对 U87/TR 和 A172/TR 细胞增殖和细胞周期的影响 秋水仙碱显著抑制 U87/TR 和 A172/TR

的细胞活力($P<0.05$,图 1A),并呈时间依赖性和剂量依赖性($P<0.05$,图 1A);而且,秋水仙碱显著抑制 U87/TR 和 A172/TR 细胞增殖($P<0.05$,图 1B、1C),显著阻滞 U87/TR 和 A172/TR 的有丝分裂,使细胞阻滞在 G0/G1 期(图 1D、1E)。

2.2 秋水仙碱对 U87/TR 和 A172/TR 化疗敏感性的影响 30 ng/ml 秋水仙碱显著增加 TMZ 对 U87/TR 和 A172/TR 的抑制效果($P<0.05$;图 2),明显降低 TMZ 的 IC50 值($P<0.05$;图 2)。这提示秋水仙碱增强 U87/TR 和 A172/TR 对 TMZ 的化疗敏感性。

2.3 秋水仙碱对 U87/TR 和 A172/TR 细胞 miR-330-

3p 表达的影响 生信分析结果显示,与正常脑组织相比,数据集 GSE90603 胶质瘤组织有 480 个 miRNA 下调,593 个 miRNA 上调;数据集 GSE112009 有 892 个 miRNA 在低级别胶质瘤中低表达,695 个 miRNA 在高级别胶质瘤中高表达。两组数据合并分析发现有 8 个 miRNA (miR-330-3p、miR-491-5p、miR-6782-5p、miR-31-5p、miR-330-5p、miR-137 和 miR-433-3p)呈差异表达(图 3A、3B)。U87/TR 和 A172/TR 细胞系体外实验结果显示,30 ng/ml 秋水仙碱使 U87/TR 和 A172/TR 细胞系 7 个 miRNA (miR-330-3p、miR-491-5p、miR-6782-5p、miR-31-5p、miR-330-

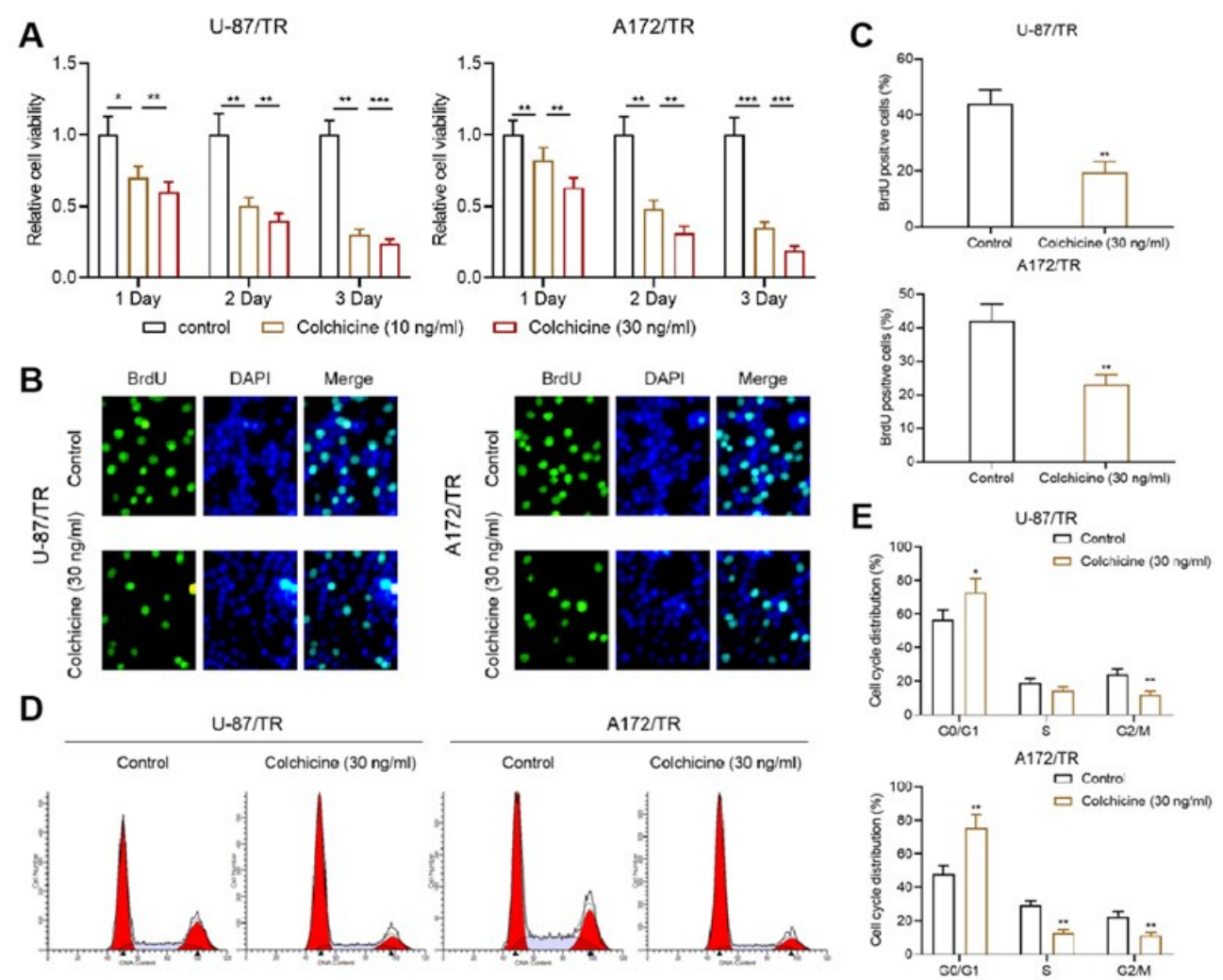


图1 秋水仙碱对胶质瘤TMZ耐药细胞系U87/TR和A172/TR细胞增殖和细胞周期的影响

A. CCK-8法检测秋水仙碱(0、10、30 ng/ml)对U87/TR和A172/TR细胞活力的影响;B、C. BrdU实验检测30 ng/ml秋水仙碱对U87/TR和A172/TR细胞增殖能力的影响;D、E. 流式细胞术检测30 ng/ml秋水仙碱对U87/TR和A172/TR细胞周期的影响;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Figure 1 Effect of colchicine on proliferation and cell cycle of glioma TMZ-resistant cell lines U87/TR and A172/TR
A: Effect of colchicine (0, 10, 30 ng/ml) on the viability of U87/TR and A172/TR cells detected by CCK-8 assay. B-C. Effect of 30 ng/ml colchicine on the proliferation of U87/TR and A172/TR cells detected by BrdU assay. D-E: Effect of 30 ng/ml colchicine on the cell cycle of U87/TR and A172/TR cells detected by flow cytometry. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

5p、miR-137 和 miR-433-3p)显著上调,其中 miR-330-3p 上调最明显,而 miR-4706 显著下调(图 3C),于是,我们选择 miR-330-3p 进行后续研究。

2.4 下调 miR-330-3p 表达逆转秋水仙碱对 U87/TR 和 A172/TR 细胞的生物学效应 qRT-PCR 检测结果显示,成功转染 miR-330-3p 抑制剂,明显下调 miR-330-3p 的表达($P<0.05$;图 4A)。抑制 miR-330-3p 明显逆转秋水仙碱的生物学效应($P<0.05$;图 4B~D)。

2.5 秋水仙碱调控 miR-330-3p/ErbB 信号通路 通过 TartgetScan7.1 数据库、StarBase 数据库、miRBD 数据库和 miRWalk 数据库来筛选 miR-330-3p 的下游基因(图 5A),通过 GO、KEGG 富集分析 miR-330-3p 下

游靶基因 ErbB(图 5B、5C)。秋水仙碱显著抑制 U87/TR 和 A172/TR 细胞系 ErbB 蛋白的表达($P<0.05$;图 5D),而抑制 miR-330-3p 可逆转此作用($P<0.05$;图 5D)。

3 讨论

尽管 TMZ 的临床应用显著延长了胶质瘤病人的生存期,但仅不到一半的病人对 TMZ 敏感,肿瘤细胞对 TMZ 耐药制约了病人在化疗中的临床效益^[8-10]。因此,深入研究胶质瘤对 TMZ 耐药的分子机制具有重要临床意义。本研究发现,秋水仙碱能显著抑制 TMZ 耐药胶质瘤细胞系的细胞活性和增殖能力,并诱导细胞周期阻滞,提示秋水仙碱可能是 TMZ

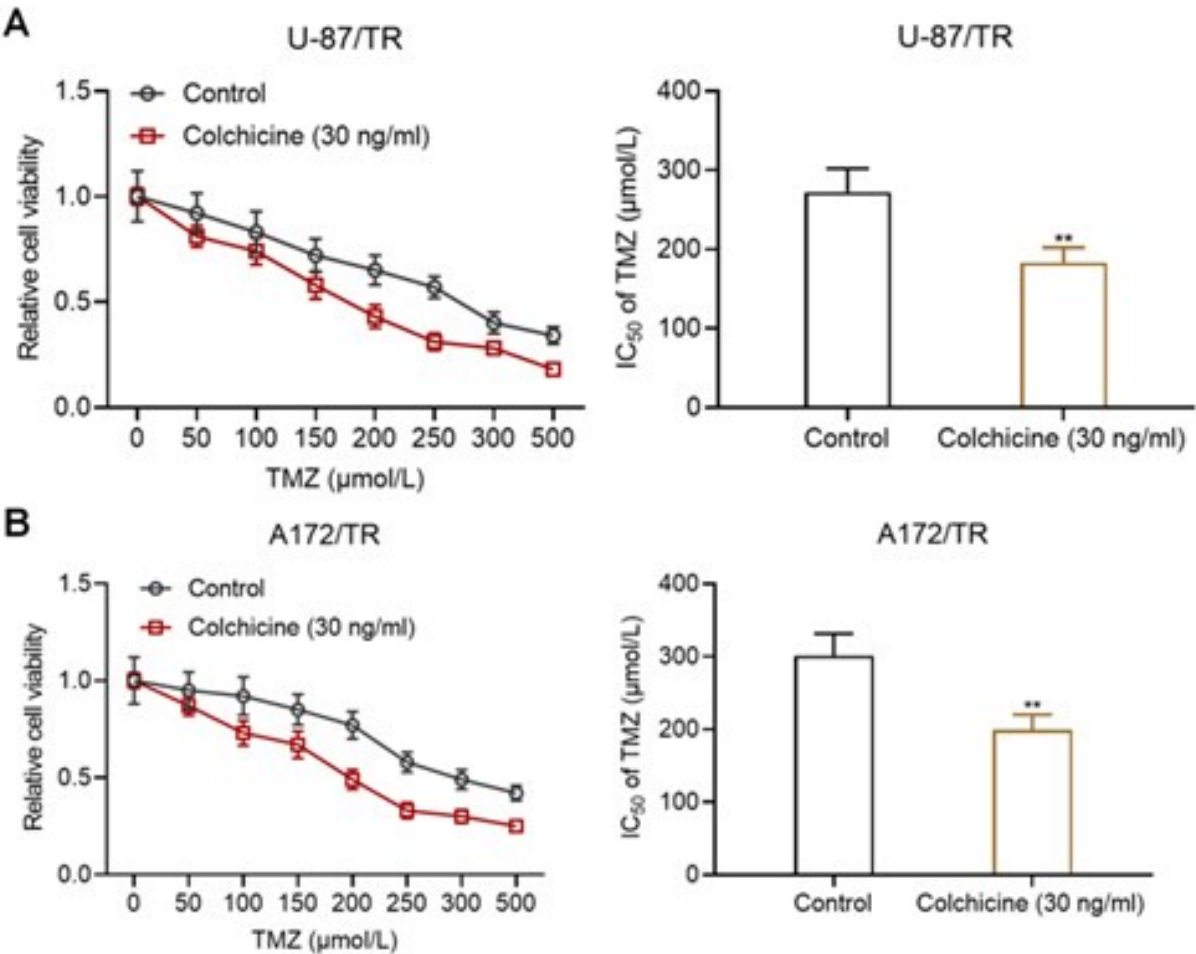


图2 秋水仙碱对胶质瘤TMZ耐药细胞系U87/TR和A172/TR化疗敏感性的影响

A. CCK-8法检测不同浓度TMZ和30 ng/ml秋水仙碱共处理U87/TR细胞24 h后细胞活力,并计算TMZ的IC₅₀值;B. CCK-8法检测不同浓度TMZ和30 ng/ml秋水仙碱共处理A172/TR细胞24 h后细胞活力,并计算TMZ的IC₅₀值;* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Figure 2 Effect of colchicine on chemotherapy sensitivity of glioma TMZ-resistant cell lines U87/TR and A172/TR

A: The cell viability of U87/TR cells was detected by CCK-8 at 24 h after co-treatment with different concentrations of TMZ and 30 ng/ml colchicine, and the IC₅₀ value of TMZ was calculated. B: The cell viability of A172/TR cells was detected by CCK-8 at 24 h after co-treatment with different concentrations of TMZ and 30 ng/ml colchicine, and the IC₅₀ value of TMZ was calculated. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

的潜在增敏剂。

近年来,研究发现秋水仙碱具有抗肿瘤作用,其机制包括抑制微管蛋白二聚体的形成、干扰微管的正常功能,从而阻止细胞有丝分裂时纺锤体的形成,进而抑制细胞分裂,最终导致细胞周期停滞、凋亡和细胞死亡^[11-13]。有研究报道,秋水仙碱可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡,并且表现出时间和剂量依赖性^[14]。另有研究表明,秋水仙碱通过抑制基质金属蛋白酶9的活性以及FAK/SRC复合物和paxillin的磷酸化,从而抑制下咽癌细胞的增殖和侵袭能力^[15]。值得注意的是,秋水仙碱衍生物AD1具有抗胶质瘤活性,机制可能是扰乱胶质瘤细胞微管的聚合,提高活性氧水平,并促进细胞自噬^[16]。本研究发现秋水仙碱可以抑制胶质瘤耐药细胞系的增

殖、阻滞细胞周期。这为治疗胶质瘤病人,尤其是TMZ抵抗的病人,提供了新的研究方向。

miRNAs 是一类长度为 18~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA,在转录后水平上调节靶基因的翻译,从而影响细胞的增殖、分化和凋亡等多种生理和病理过程^[17]。既往研究表明,miR-330-3p 在胶质瘤中发挥重要的调节作用,例如,miR-330-3p 在胶质瘤组织中显著下调,其过表达可通过下调 CELF1 的表达来抑制肿瘤细胞的增殖和迁移^[18];而且,miR-330-3p 在胶质瘤组织和细胞中低表达与病人预后不良密切相关^[19]。本研究发现,秋水仙碱显著上调胶质瘤 TMZ 耐药细胞 miR-330-3p 的表达,抑制 miR-330-3p 的活性可以逆转秋水仙碱的化疗增敏作用。我们的结果表明,秋水仙碱逆转了胶质瘤细胞对 TMZ 的

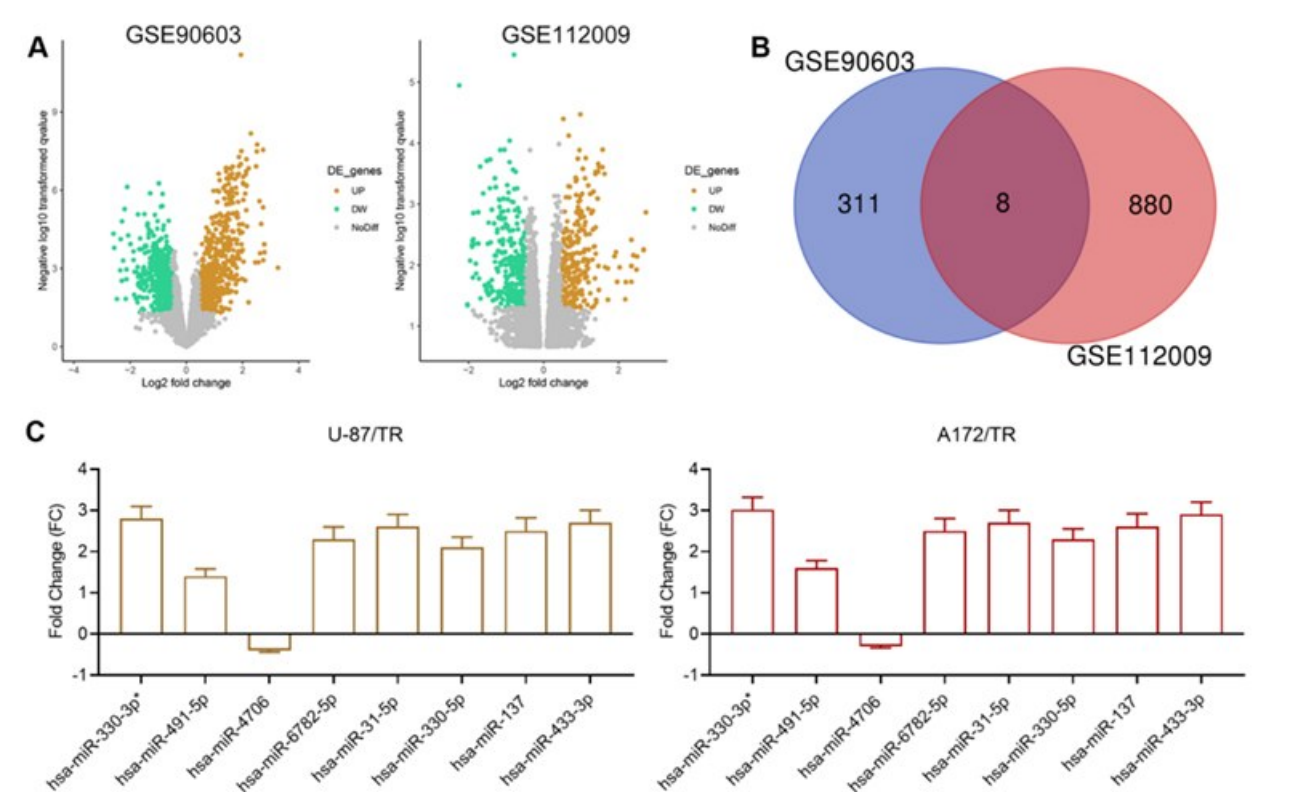


图3 miR-330-3p在胶质瘤组织和胶质瘤TMZ耐药细胞系U-87/TR和A172/TR中的表达情况

A. 通过GEO数据库下载数据集GSE90603和GSE112009,分析胶质瘤组织差异表达的miRNAs,绿色点为胶质瘤组织中下调基因,棕色点为胶质瘤组织中上调基因;B. 韦恩图分析展示两个数据集共同下调的miRNAs;C. qRT-PCR检测U-87/TR和A172/TR细胞秋水仙碱处理后miRNAs的表达变化

Figure 3 Expression of miR-330-3p in glioma tissues and glioma TMZ-resistant cell lines U-87/TR and A172/TR
A: Data sets GSE90603 and GSE112009 were downloaded from GEO database to analyze the differentially expressed miRNAs in glioma tissues, with the green dots representing the down-regulated genes in glioma tissues, and the brown dots representing the up-regulated genes in glioma tissues. B: Venn diagram analysis showed the miRNAs that were down-regulated in both data sets. C: qRT-PCR detected the expression changes of miRNAs in U-87/TR and A172/TR cells after colchicine treatment.

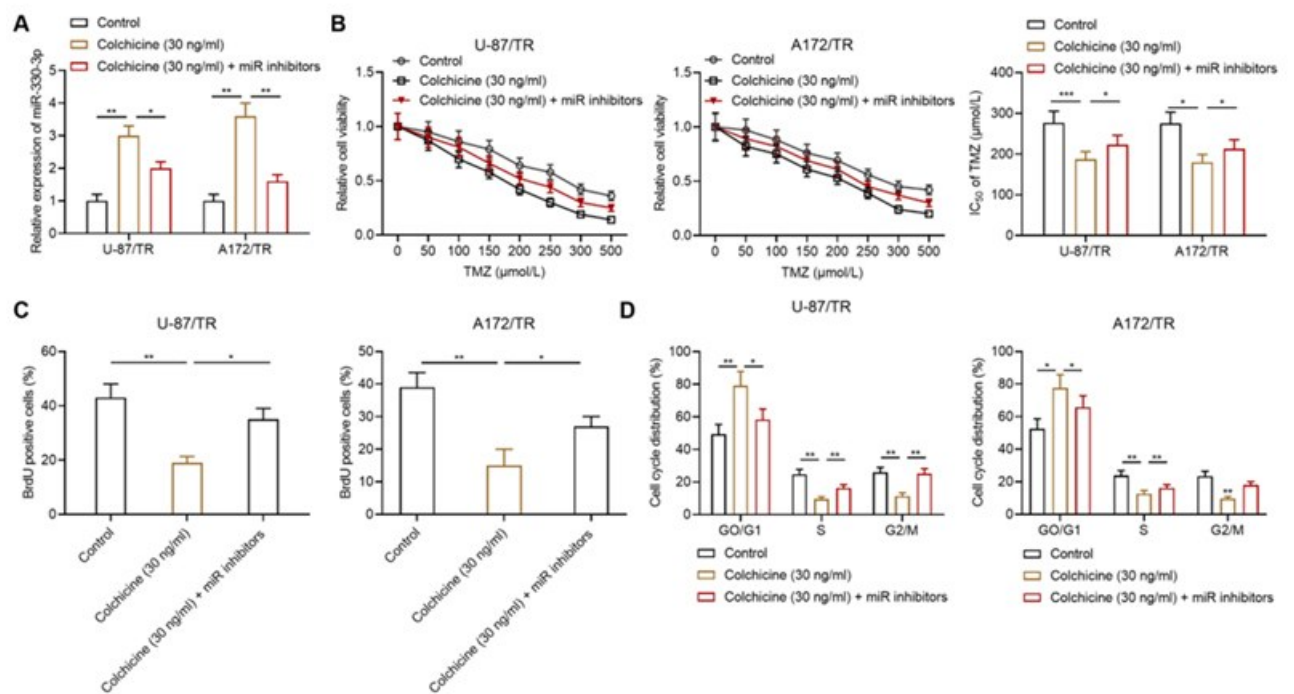


图4 miR-330-3p 抑制剂明显逆转秋水仙碱对胶质瘤TMZ耐药细胞系U-87/TR和A172/TR的效应

A. qRT-PCR检测U-87/TR和A172/TR细胞miR-330-3p的表达水平;B. CCK-8法检测TMZ对U-87/TR和A172/TR细胞活性的影响;C. BrdU检测TMZ对U-87/TR和A172/TR细胞增殖能力的影响;D. 流式细胞术检测TMZ对U-87/TR和A172/TR细胞周期分布的影响;* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Figure 4 miR-330-3p inhibitor significantly reversed colchicine's effect on glioma TMZ-resistant cell lines U-87/TR and A172/TR

A: qRT-PCR detection of miR-330-3p expression levels in U-87/TR and A172/TR cells. B: CCK-8 assay detection of TMZ effects on the viability of U-87/TR and A172/TR cells. C: BrdU detection of TMZ effects on the proliferation abilities of U-87/TR and A172/TR cells. D: Flow cytometry detection of TMZ effects on the cell cycle distributions of U-87/TR and A172/TR cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

耐药性,miR-330-3p可能介导了这一生物学活性。

ErbB家族属于表皮生长因子受体家族,包括EGFR、HER2、HER3和HER4等四个受体,具有胞外结构域、跨膜结构域和胞质酪氨酸激酶结构域^[20]。当ErbB家族成员与其配体结合时,会激活各种细胞内信号通路,调节细胞生长、存活和迁移等多种细胞过程^[21]。ErbB在胶质瘤中的作用机制已经受到广泛研究,作为ErbB家族成员,EGFR在胶质瘤组织中高度表达,可通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导自噬,从而促进胶质瘤细胞的生长^[22]。研究表明,ErbB通路被lncRNA SNHG16异常激活,进而激活PI3K/AKT通路,促进胶质瘤细胞的生长^[23]。本研究发现,ErbB通路的活性受miR-330-3p的调控,秋水仙碱通过上调miR-330-3p的表达,抑制ErbB通路的活性。

总之,本研究表明秋水仙碱可以抑制TMZ耐药的胶质瘤细胞的增殖,其机制可能涉及到miR-330-3p/ErbB信号通路的调节。然而,本研究仍然存在一

些不足之处:首先,本研究仅为体外细胞研究,秋水仙碱提高TMZ活性的生物学效应需要进一步的动物实验和临床研究来验证。其次,秋水仙碱是否可以通过调节其他信号通路来增加胶质瘤细胞对其他化疗药物的敏感性,目前尚不清楚。最后,秋水仙碱穿越血脑屏障的能力将决定其在临床上的应用前景。

【利益冲突声明】:本文不存在任何利益冲突。

【作者贡献声明】:吴宇负责设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析、文章撰写;朱馨艺负责采集数据、分析/解释数据;江洪祥参与修改文章;陈谦学提供研究经费、修改文章。

【参考文献】

[1] XU S, TANG L, LI X, *et al.* Immunotherapy for glioma: current management and future application [J]. Cancer Lett, 2020, 476: 1-12.

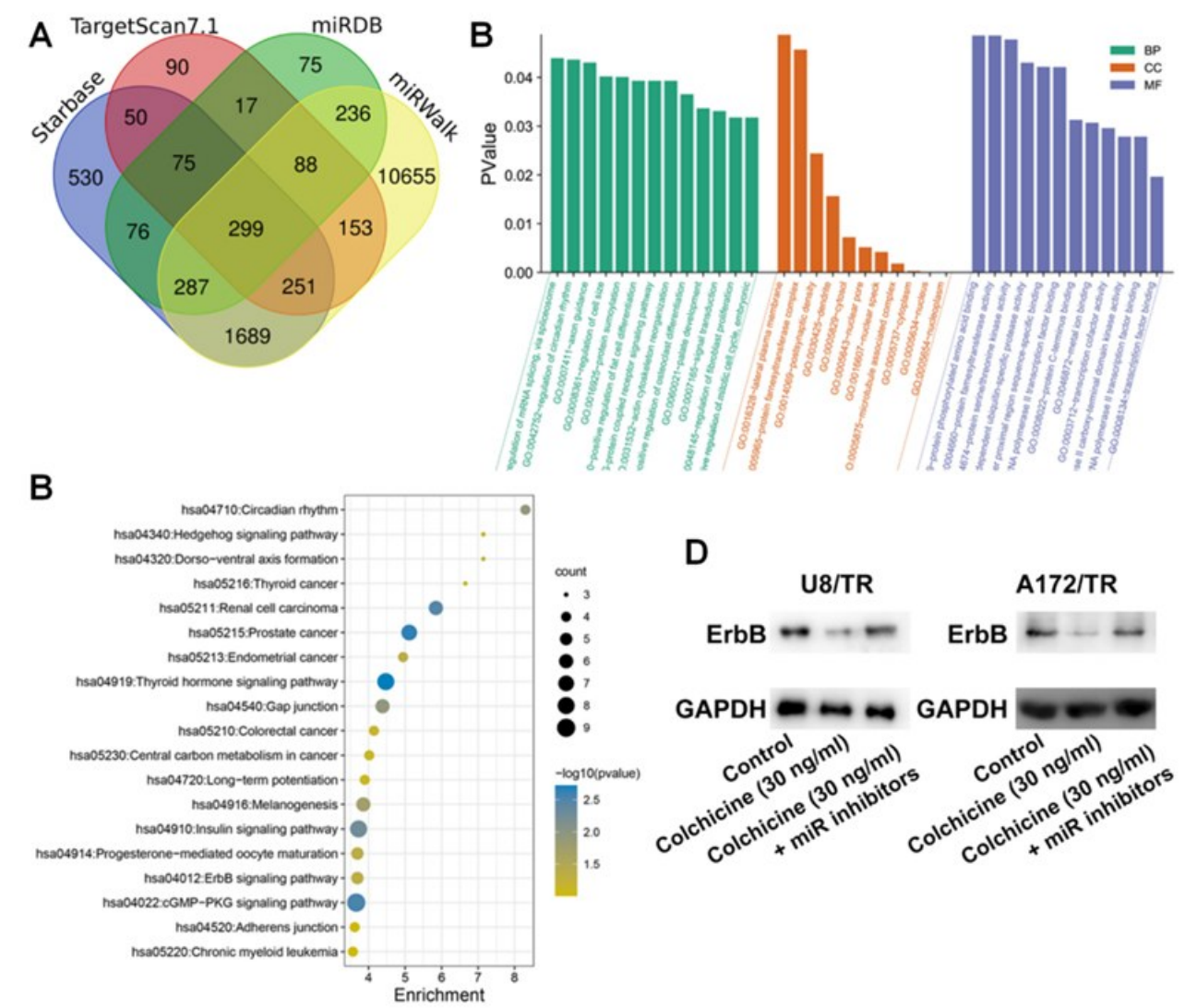


图5 秋水仙碱通过调控 miR-330-3p/ErbB 信号通路增强胶质瘤TMZ耐药细胞系U-87/TR和A172/TR对TMZ的化疗敏感性

A. 通过生物信息学网站TargetScan、StarBase、miRDB和miRWalk对miR-330-3p的下游靶点进行预测;B. 采用DAVID数据库对miR-330-3p的下游靶基因进行GO富集分析;C. 采用DAVID数据库对miR-330-3p下游靶基因进行KEGG富集分析;D. 采用免疫印迹法检测秋水仙碱和miR-330-3p抑制剂对ErbB表达的影响

Figure 5 Colchicine enhanced the chemotherapy sensitivity of glioma TMZ-resistant cell lines U-87/TR and A172/TR to TMZ by regulating miR-330-3p/ErbB signaling pathway

A: The downstream targets of miR-330-3p were predicted through bioinformatics websites TargetScan, StarBase, miRDB and miRWalk. B: GO enrichment analysis of the downstream target genes of miR-330-3p was performed using DAVID database. C: KEGG enrichment analysis of the downstream target genes of miR-330-3p was performed using DAVID database. D: The effect of colchicine and miR-330-3p inhibitor on ErbB expression was detected by Western blotting.

[2] BUSH NA, CHANG SM, BERGER M S. Current and future strategies for treatment of glioma [J]. Neurosurg Rev, 2017, 40(1): 1-14.

[3] TANG JH, YANG L, CHEN J X, *et al.* Bortezomib inhibits growth and sensitizes glioma to temozolomide (TMZ) via down-regulating the FOXM1-Survivin axis [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 81.

[4] PATRIZZ A, DONO A, ZOROFCHIAN S, *et al.* Glioma and temo-

zolomide induced alterations in gut microbiome [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 21002.

[5] GHAWANMEH AA, CHONG KF, SARKAR SM, *et al.* Colchicine prodrugs and codrugs: chemistry and bioactivities [J]. Eur J Med Chem, 2018, 144: 229-242.

[6] AWAD AS, ELARINY HA, SALLAM AS. The possible protective effect of colchicine against liver damage induced by renal ischemia-

reperfusion injury: role of Nrf2 and NLRP3 inflammasome [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2020, 98(12): 849–854.

[7] HUANG CG, GUO ZT, CHEN QX, *et al.* The cell cycle and P-glycoprotein expression changes of drug-resistance cell lines of U251 induced by temozolomide after radiation exposure [J]. Chin J Exp Surg, 2014, 31(9): 1883–1885.

黄从刚, 郭振涛, 陈谦学, 等. 胶质瘤 U251 耐替莫唑胺细胞株放射照射后细胞周期及 P-糖蛋白表达变化[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(9): 1883–1885.

[8] XIONG L, WANG F, QI X. Advanced treatment in high-grade gliomas [J]. J Buon, 2019, 24(2): 424–230.

[9] TOM MC, CAHILL DP, BUCKNER JC, *et al.* Management for different glioma subtypes: are all low-grade gliomas created equal [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2019, 39: 133–145.

[10] DING C, YI X, WU X, *et al.* Exosome-mediated transfer of circRNA CircNFIX enhances temozolomide resistance in glioma [J]. Cancer Lett, 2020, 479: 1–12.

[11] YAN L, HUANG H, ZHANG Y, *et al.* Involvement of p53-dependent apoptosis signal in antitumor effect of Colchicine on human papilloma virus (HPV)-positive human cervical cancer cells [J]. Biosci Rep, 2020, 40(3): BSR20194065.

[12] DUAN Y, LIU W, TIAN L, *et al.* Targeting tubulin-colchicine site for cancer therapy: inhibitors, antibody-drug conjugates and degradation agents [J]. Curr Top Med Chem, 2019, 19(15): 1289–1304.

[13] JOHNSON L, GOPING IS, RIEGER A, *et al.* Novel colchicine derivatives and their anti-cancer activity [J]. Curr Top Med Chem, 2017, 17(22): 2538–2558.

[14] SUN Y, LIN X, CHANG H. Proliferation inhibition and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells under the influence of colchicine [J]. J Buon, 2016, 21(3): 570–575.

[15] CHO JH, JOO YH, SHIN EY, *et al.* Anticancer effects of colchicine on hypopharyngeal cancer [J]. Anticancer Res, 2017, 37(11): 6269–6280.

[16] FANG KM, LIU JJ, LI CC, *et al.* Colchicine derivative as a potential anti-glioma compound [J]. J Neurooncol, 2015, 124(3): 403–412.

[17] RUPAIMOOLE R, SLACK FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203–222.

[18] WANG H, LIU G, LI T, *et al.* MiR-330-3p functions as a tumor suppressor that regulates glioma cell proliferation and migration by targeting CELF1 [J]. Arch Med Sci, 2020, 16(5): 1166–1175.

[19] ZHU B, LIU W, LIU H, *et al.* LINC01094 down-regulates miR-330-3p and enhances the expression of MSI1 to promote the progression of glioma [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 6511–6521.

[20] WANG Z. ErbB receptors and cancer [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1652: 3–35.

[21] OPRITA A, BALOI SC, STAICU GA, *et al.* Updated insights on EGFR signaling pathways in glioma [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 587.

[22] LIU Y, YANG L, LIAO F, *et al.* MiR-450a-5p strengthens the drug sensitivity of gefitinib in glioma chemotherapy via regulating autophagy by targeting EGFR [J]. Oncogene, 2020, 39(39): 6190–6202.

[23] ZHOU XY, LIU H, DING ZB, *et al.* lncRNA SNHG16 promotes glioma tumorigenicity through miR-373/EGFR axis by activating PI3K/AKT pathway [J]. Genomics, 2020, 112(1): 1021–1029.

(2023-09-28 收稿, 2024-02-06 修回)

~~~~~

(上接第 96 页)

[9] ZHU XQ, LI XM, ZHAO YD, *et al.* Effects of senegenin against hypoxia/reoxygenation-induced injury in PC12 cells [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(5): 353–361.

[10] KHO AR, HONG DK, KANG BS, *et al.* The effects of atorvastatin on global cerebral ischemia-induced neuronal death [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4385.

[11] YADOLLAH-DAMAVANDI S, SHARIFI ZN, ARANI HZ, *et al.* Atorvastatin prevents the neuron loss in the hippocampal dentate gyrus region through its anti-oxidant and anti-apoptotic activities [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(1): 76–86.

[12] GONG M, HUANG W, SHI Z, *et al.* Relationship between plasma exosomes miR-212 and miR-132 and the severity of craniocerebral injury and Rotterdam CT score [J]. Chin J Clin Neurosurg, 2021, 26(9): 676–678.

龚铭杰, 黄 炜, 施振华, 等. 血浆外泌体 miR-212、miR-132 与颅脑损伤严重程度和 Rotterdam CT 评分的关系[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(9): 676–678.

[13] LUTHER KM, HAAR L, MCGUINNESS M, *et al.* Exosomal miR-21a-5p mediates cardioprotection by mesenchymal stem cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 119: 125–137.

[14] YAO X, WANG Y, ZHANG D. MicroRNA-21 confers neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway [J]. J Mol Neurosci, 2018, 65(1): 43–53.

(2023-04-17 收稿, 2023-12-26 修回)