DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.04.005

· 临床医学 ·

柯里拉京对人脑胶质瘤细胞 U251 生物学特性的影响*

周广洲[1,2▲]　陈　俊[1▲]　靳　峰[2△]

([1] 济宁医学院,济宁 272067;[2] 济宁医学院附属医院,济宁 272029)

摘　要　目的　观察柯里拉京(Corilagin)对人脑胶质瘤细胞 U251 生物学特性的影响。**方法**　体外培养 U251 细胞,应用 200μg/ml 的柯里拉京分别干预 U251 细胞 24、48 和 72h 后收集细胞,应用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测药物干预前后细胞凋亡活性变化;细胞划痕实验检测 200μg/ml Corilagin 对 U251 细胞迁移能力的影响。**结果**　Corilagin 可促进 U251 细胞的凋亡,U251 细胞凋亡率随着培养液中 Corilagin 培养时间的延长而增加($P<0.05$);Corilagin 可抑制 U251 细胞的迁移,200μg/ml Corilagin 的培养液培养 24、48 和 72h 后 U251 细胞迁移度均低于对照组($P<0.05$)。**结论**　Corilagin 对 U251 细胞有显著的体外细胞毒性作用,能有效促进 U251 细胞的凋亡和减弱 U251 细胞的迁移,但其具体的作用机制还有待进一步研究。

关键词　柯里拉京;U251 细胞;胶质瘤;细胞凋亡;迁移

中图分类号:R285　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2018)08-246-04

Effect of corilagin on the biological characteristics of human glioma U251 cells

ZHOU Guangzhou[1,2▲], *CHEN Jun*[1▲], *JIN Feng*[2△]

([1] *Jining Medical University, Jining* 272067, *China*;

[2] *The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining* 272029, *China*)

Abstract: ***Objective***　To study the effect of corilagin on the biological characteristics of human glioma U251 cells. ***Methods***　Glioma U251 cells were cultured in vitro. The cells were intervened by corilagin of 200μg/ml concentrations at different time points (24, 48, 72h). Then the cells were collected to detect the change of cell apotosis with Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit. The effect of 200μg/ml corilagin on cell migration was assessed by cell scuffing test. ***Results***　Corilagin can promote the apoptosis of U251 cells. With the extension of Corilagin culture time, the apoptosis of U251 cells increased significantly showing a large number of scattered cell debris, and the apoptosis rate of U251 cells increased with the increase of the culture time of Corilagin ($P<0.05$); Corilagin can inhibit the migration of U251 cells. The migration of U251 cells after 200μg/ml Corilagin cultured for 24h, 48h and 72h was lower than that of the control group ($P<0.05$). ***Conclusion***　Corilagin has significant cytotoxic effect in vitro on U251 cells, which can effectively promote the apoptosis of U251 cells and weaken the migration of U251 cells, but its specific mechanism of action remains to be further studied.

Keywords: Corilagin; U251 cells; Glioma; Cell apotosis; Migration

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是目前最常见的颅内恶性肿瘤,多发于神经外胚层,占颅内肿瘤的 40% ~50%[1]。该肿瘤增殖速度快、浸润性生长和术后易复发,即使在成功切除、放疗和化疗(替莫唑胺)治疗后,肿瘤复发率仍然很高,导致治疗效果非常差[2]。柯里拉京(Corilagin)具有抗肿瘤[3]、抗炎[4]和保肝作用[5]等。然而,由于复杂而低效的提取方法,它的药理性能很少受到关注。近年来,随着萃取技术的发展,Corilagin 比以往更

*[基金项目]国家自然科学基金资助项目(8107779);山东省自然科学基金(ZR2016HL34);山东省优秀中青年科学家奖励基金(BS2010YY006);山东省高等学校科技计划项目(J16LL05)

△[通信作者]靳峰,E-mail:jinfengsdjn@163.com

▲ 周广洲,济宁医学院 2015 级研究生

▲ 陈俊,济宁医学院 2016 级研究生

容易获得。因此,人们开始重新关注其抗肿瘤、保肝和抗炎活性。本实验通过在不同时间点分别用 200μg/ml Corilagin 干预胶质瘤细胞,分析 Corilagin 对人脑胶质瘤 U251 细胞的影响,为胶质瘤的进一步药物治疗提供新的研究思路。

1　材料与方法

1.1　材料

U251 细胞系(中国典型培养物保藏中心);DMEM/F12(上海博升生物科技有限公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);PBS 缓冲液(普诺赛生命科技有限公司);双抗(美国 Solarbio 公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);DMSO(美国 Sigma 公司);柯里拉京(美国 Sigma 公司);细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.2　U251 细胞培养

取出 U251 细胞系放在含有 DMEM / F12 和 10% FBS 的细胞完全培养基中,在 37℃,5% CO_2 的饱和湿度的恒温细胞培养箱中进行培养。培养基每 1 ~2 天更新 1 次。

1.3　凋亡试剂盒检测细胞凋亡

将细胞接种到 6 孔板中,实验组每孔加 2ml 配制的含 200μg/ml Corilagin 的培养基,对照组每孔加入 2ml 完全培养基,分别干预 24、48、72h,每组都设 3 个复孔,培养结束后,根据凋亡试剂盒说明书上的程序对细胞进行染色,染色完成即通过流式细胞仪进行检测,其中 AnnexinV-FITC 显示为绿色荧光,PI 显示为红色荧光。记录 AnnexinV-FITC(+)PI(+)和 AnnexinV-FITC(+)PI(-)作为凋亡细胞,每次计数 10000 个细胞,计算各组凋亡率。

1.4　细胞划痕实验

在恒温箱中取出接种于 6 孔板生长良好的胶质瘤 U251 细胞,吸尽培养液后,用直尺在 6 孔板背后用记号笔均匀画横线,用无菌 10μl 移液管头与标尺比齐,尽可能在 6 孔板后方的水平线上均匀划行;用 200μg/ml 药物浓度的柯里拉京干预细胞 3 个时间点(24、48、72h),每组设置 5 个平行孔;最终将 6 孔板放置于荧光倒置显微镜下观察细胞迁移情况;测量并记录细胞迁移距离;细胞迁移度(%)=(划痕时两侧细胞距离 - 检测时两侧细胞距离)/划痕时两侧细胞距离 ×100%。

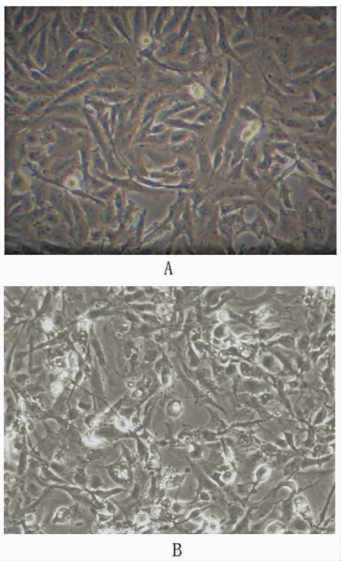
1.5　统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。

2　结果

2.1　U251 细胞形态观察

在恒温箱中分别取出接种于 6 孔板生长良好的胶质瘤 U251 细胞,分别用不同药物浓度的 Corilagin 3 个不同时间点(24、48、72h)干预细胞,然后放在荧光倒置显微镜下观察,可以发现未经 Corilagin 干预的 U251 细胞生长良好,具有完整的细胞结构,并附着于 6 孔板的壁上(见图 1A)。200μg/ml Corilagin 干预 72h 后,细胞变小,细胞密度减少,细胞碎片增多,细胞凋亡增加(见图 1B)。



注:A,正常培养的 U251;B,200μg/ml Corilagin 干预 U251 细胞 72h

图 1　200μg/ml Corilagin 对 U251 细胞的影响(×100)

2.2　Corilagin 促进 U251 细胞凋亡

U251 细胞经 200μg/ml 的 Corilagin 干预 24、48、72h 后,经凋亡试剂盒检测发现,在 200μg/ml 浓度干预下,U251 细胞凋亡率随 Corilagin 干预时间的延长而增高($P<0.05$)。见表 1。

表 1　两组 U251 细胞不同时间点细胞凋亡率比较(%)

组别	24h	48h	72h
对照组	0.04 ±0.02	0.06 ±0.01	0.05 ±0.07
实验组	41.33 ±3.34	47.55 ±2.72	55.89 ±2.86
t	21.41	30.24	33.81
P	<0.05	<0.05	<0.05

2.3　Corilagin 能有效抑制 U251 细胞的迁移

Corilagin 能抑制 U251 细胞的迁移能力，与对照组相比，200μg/ml Corilagin 能明显降低 U251 细胞的迁移度。划痕后的 U251 细胞在含 200μg/ml Corilagin 血清培养基中培养 24、48、72h 后 U251 细胞迁移度均低于对照组，差异有统计学意义（均 $P<0.05$）。见图 2、表 2。

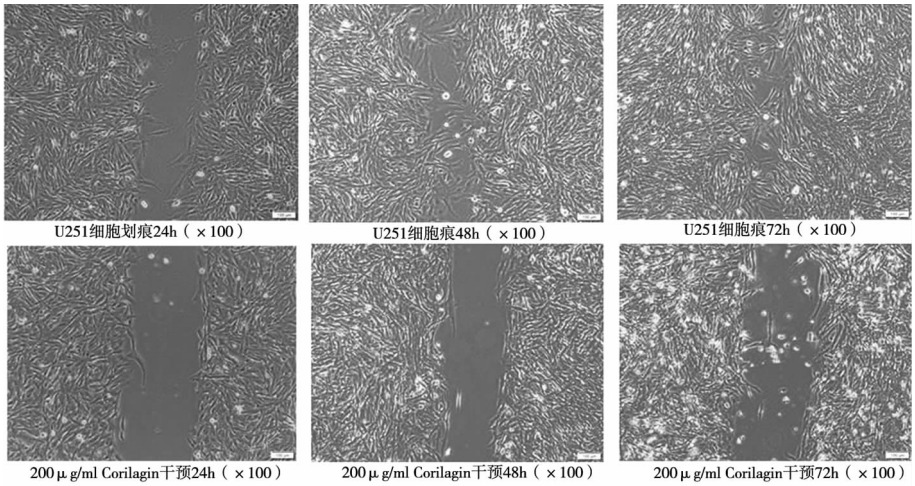


图 2　200μg/ml Corilagin 对 U251 细胞迁移能力的影响（×100）

表 2　两组 U251 细胞不同时间点迁移能力的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	U251 细胞迁移度/%		
	24h	48h	72h
对照组	54.10±2.76	72.50±7.46	96.71±10.07
实验组	25.87±3.24	31.05±2.28	52.82±8.25
t	11.49	9.20	5.84
P	<0.05	<0.05	<0.05

3　讨论

胶质瘤是一种最常见的脑肿瘤类型，具有侵袭性强和复发率高的特点[6]，尽管经过手术、化疗、放疗等综合治疗后，胶质瘤患者的中位生存期仍仅有 18 个月[7]。为提高胶质瘤患者的临床治疗效果，目前迫切需要一种新的治疗方法来替代传统的手段。根据肿瘤增殖/凋亡理论[8]，肿瘤的形成跟细胞增殖与凋亡的失衡有很大关系，因此，探索诱导肿瘤细胞凋亡的相关药物及其作用靶点，能够为恶性肿瘤的治疗提供新的思路和实验依据。

本文应用 Corilagin 干预神经胶质瘤 U251 细胞，发现随着药物干预时间延长，Corilagin 促使胶质瘤 U251 细胞的凋亡率逐渐增高，胶质瘤 U251 细胞的迁移度降低，说明 Corilagin 能够抑制胶质瘤 U251 细胞的生长。细胞凋亡是由基因控制的细胞程序性死亡过程，它对哺乳动物的发育和维持机体平衡方面起着关键作用[9]，它可以消除任何不必要或不需要的细胞，并且这是一个受到严格控制的过程。有多种因素可导致凋亡途径被激活，包括 DNA 损伤或不受控制的增殖[10]。细胞凋亡有细胞内和细胞外两种途径激活。细胞内途径激活信号包括 DNA 损伤、生长因子剥夺和细胞因子剥夺，最常见的细胞外途径激活信号是由受损或感染的细胞免疫系统的细胞毒性 T 细胞产生的死亡诱导信号来介导[11]。对于 Corilagin 促进胶质瘤 U251 细胞凋亡及抑制其迁移的机制尚不十分明确。Livin（又称 KIAP 或 ML-IAP）是细胞凋亡蛋白抑制因子家族中的一员。该蛋白在细胞凋亡、细胞增殖和细胞周期中起关键作用。Livin 在胶质瘤 U251 细胞中的表达显著高于人脑胶质细胞[12]。Corilagin 可能通过抑制 Livin 的表达从而促进 U251 细胞凋亡。研究发现，基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）通过对细胞外基质中的各种蛋白的分解，破坏体内的组织学屏障，从而使胶质瘤更容易浸润和转移[13]，因此，抑制胶质瘤细胞侵袭及扩散的方法就是首先要抑制肿瘤细胞中 MMPs 的活性。已经有研究发现，中草药提取物 Corilagin 能够有效抑制 MMPs 的活性，可以显著抑制胶质瘤在体内迁移和扩散[14]。但是 Corilagin 作为一种新药，关于其对胶质瘤 U251 细胞的确切分子机制尚不完全清楚，还需要进一步探索。

综上所述，Corilagin 能促进人脑胶质瘤 U251 细胞的凋亡，并抑制其迁移能力，说明 Corilagin 对胶质瘤细胞具有较强的细胞毒作用。该结论补充了胶质瘤细胞的凋亡、耐药理论，揭示了新型化疗药物 Corilagin 对胶质瘤细胞生物学特性的影响。尽管本研究还存在一定的局限性，但是 Corilagin 的上述作用为胶质瘤的治疗拓宽了思路，对恶性胶质瘤的临床治疗提供了理论依据。

参考文献：

[1] Madany M, Thomas TM, Edwards L, et al. Immunobiology and immunotherapeutic targeting of glioma stem cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 853: 139-166. DOI: 10.1007/978-3-319-16537-0_8.

[2] 刘永吉，魏明华，张永斌，等. 胶质母细胞瘤的治疗现状[J]. 中国保健营养，2017，(17)：178-179. DOI：10.3969/j. issn. 1004-7484. 2017. 17. 257.

[3] Jia L, Jin H, Zhou J, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF-beta signaling pathways [J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 33. DOI: 10.1186/1472-6882-13-33.

[4] Jin F, Cheng D, Tao JY, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis[J]. BMC Gastroenterol, 2013, 13: 79. DOI: 10.1186/1471-230X-13-79.

[5] Cheng JT, Lin TC, Hsu FL. Antihypertensive effect of corilagin in the rat [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1995, 73 (10): 1425-1429.

[6] 汪翔，周修明，张协军，等. STAT3 信号通路在恶性脑胶质瘤中的研究进展[J]. 中华神经医学杂志，2016，(3)：245-250. DOI：10. 3760/cma. j. issn. 1671-8925. 2016. 03. 006.

[7] 杨凯元，任晓辉，林松. 生酮饮食疗法在脑胶质瘤治疗中的研究现状[J]. 中华神经外科杂志，2018，(1)：94-97. DOI：10. 3760/cma. j. issn. 1001-2346. 2018. 01. 022.

[8] Lopes RB, Gangeswaran R, Mc Neish IA, et al. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy [J]. Cancer, 2007, 120(11): 2344-2352. DOI: 10. 1002/ijc. 22554.

[9] 李帅，张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展[J]. 山东医药，2017 (37)：103-106. DOI：10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2017. 37. 036.

[10] Lopez J. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within [J]. British journal of cancer, 2015, 112 (6): 957-962. DOI: 10. 1038/bjc. 2015. 85.

[11] Zaman S, Wang R. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies [J]. Leukemia&lymphoma, 2014, 55 (9): 1980-1992. DOI: 10. 3109/10428 194. 2013. 855307.

[12] Jin F, Zhao L, Guo YJ, et al. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells [J]. Brain research, 2010, 1336: 103-111. DOI: 10. 1016/j. brainres. 2010. 04. 005.

[13] Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 887-894. DOI: 10. 3892/ijo. 2014. 2465.

[14] Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, et al. Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas[J]. Cancer Med, 2013, 2(4): 457-467. DOI: 10. 1002/cam4. 104.

（收稿日期　2017-08-03）
（本文编辑：石俊强）

（上接第 245 页）

[7] Pedreira WR, Sarkis JES, Rodrigues C, et al. Determination of trace amounts of rare earth elements in high pure lanthanum oxide by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS) and high-performance liquid chromatgraphy (HPLC) techniques [J]. Journal of Alloys and Compounds, 2002, 344: 17-20. DOI: 10. 1016/S0925-8388(02)00297-9.

[8] 夏金虹. 紫外可见分光光度法用于 La、Ce 定量分析近况[J]. 玉林师范学院学报，2001，(03)：77-79.

[9] 严方，高文苗，罗文平，等. 原子吸收法测定催化剂中的镧含量[J]. 中国测试，2009，35(1)：82.

[10] 石克，谢静，罗立骏，等. 原子吸收分光光度法测定制何首乌中的铁黑[J]. 药物分析杂志，2011，31(3)：584. DOI：10. 16155/j. 0254-1793. 2011. 03. 016.

[11] 王大祥，王倩倩. 石墨炉法测定地表水中镉的方法学研究[J]. 河南水利与南水北调，2015，(14)：95，106.

（收稿日期　2017-12-01）
（本文编辑：石俊强）