

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.03.002

## 柯里拉京对神经胶质瘤 U373MG 细胞增殖和迁移能力的影响\*

陈俊<sup>1,2▲</sup> 周佳彬<sup>2▲</sup> 李根华<sup>2</sup> 秦咸蕴<sup>2</sup> 靳峰<sup>2△</sup>(<sup>1</sup> 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; <sup>2</sup> 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

**摘要** 目的 探究柯里拉京(Corilagin)对人脑胶质瘤 U373MG 细胞增殖活性和迁移能力的影响。方法 培养 U373MG 细胞,分别应用不同浓度的 Corilagin(25、50、100、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 干预 U373MG 细胞,培养不同时间(24、48、72h)后收集细胞,Cell Counting Kit-8 检测药物干预后细胞增殖活性的变化,细胞划痕实验检测 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin 对 U373MG 细胞迁移能力的影响。结果 随着 Corilagin 浓度的升高以及培养时间的延长,U373 MG 细胞的生长密度和体积明显降低,胞体出现皱缩,并可见大量散在的细胞碎片,细胞的生长受到明显抑制;与对照组相比,U373MG 细胞的存活率随着 Corilagin 药物浓度的升高和培养时间的延长而明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),在含 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin 的培养液培养 24、48 和 72h 后 U373MG 细胞迁移度均明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 Corilagin 能有效抑制 U373MG 细胞的增殖活性和迁移能力。

**关键词** 柯里拉京;U373MG;胶质瘤细胞;细胞增殖;迁移

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)06-158-04

### Effect of Corilagin on cell proliferation and migration ability of glioma U373MG cells

CHEN Jun<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiabin<sup>2</sup>, LI Genhua<sup>2</sup>, QIN Xianyun<sup>2</sup>, JIN Feng<sup>2</sup>(<sup>1</sup> School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013, China;<sup>2</sup> Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of Corilagin on proliferation and migration of glioblastoma U373MG cells. **Methods** Glioblastoma U373MG cells were cultured. The cells were intervened by different Corilagin concentrations(25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) at different time( 24, 48, 72h ), and then collected to detect the change of cell proliferation with Cell Counting Kit-8. The effect of 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin on the migration ability of U373MG cells was examined by cell scratch assay. **Results** With the increase of Corilagin concentration and the prolongation of culture time, compared with the control group, the growth density and volume of U373 MG cells were significantly reduced. Meanwhile, the cell bodies shrunk, a large number of scattered cell debris were observed, and the cell growth was significantly inhibited. Compared with the control group, the survival rate of U373MG cells was decreased significantly with the increase of Corilagin drug concentration and the prolongation of culture time( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the migration of U373MG cells was significantly decreased after 24, 48 and 72h of culture with 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Corilagin can effectively inhibit the proliferation and migration of U373MG cells.

**Keywords:** Corilagin; U373MG; Glioma cells; Cell proliferation; Migration

\* [基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2016HL34); 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

▲ 陈俊, 济宁医学院 2016 级研究生; 周佳彬, 天津医科大学 2016 级研究生

胶质细胞瘤 (Glioblastoma, GBM) 是颅内最常见的恶性肿瘤,其以侵袭性强、增殖速度快和术后易复发为显著特点<sup>[1]</sup>。即使经过手术、放疗和化疗等综合治疗后,患者的平均生存时间也只有 18 个月左右<sup>[2]</sup>。而且,治疗 GBM 的一线化疗药物替莫唑胺 (Temozolomide, TMZ) 已表现出明显的耐药性。目前,具有抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup> 和神经保护<sup>[5]</sup> 等作用的柯里拉京 (Corilagin) 关注度与探索价值越来越高。本实验以不同浓度的 Corilagin 干预 U373 MG 细胞,并检测药物干预后不同时间段的细胞增殖活性及迁移能力的变化,观察 Corilagin 对胶质瘤细胞的影响,并为 Corilagin 的临床运用提供一个新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

U373MG 胶质瘤细胞系 (中国典型培养物保藏中心); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 青-链霉素双抗 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); PBS 磷酸缓冲液 (普诺赛生命科技有限公司); Corilagin (美国 Sigma 公司); Cell CountingKit-8 (CCK-8) 试剂盒 (碧云天生物技术研究); MK3 型酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 U373MG 细胞培养

取 U373MG 细胞接种在含有完全培养基 (RPMI-1640 + 1% 青-链霉素双抗 + 10% FBS) 的 25cm<sup>2</sup> 的透气细胞培养瓶中,置于恒温细胞培养箱 (37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度) 中进行培养。每日用显微镜观察细胞的生长状况,每 2 日更换一次细胞培养液,当肿瘤细胞铺满培养瓶底约 80% (48 ~ 72h) 时即可传代,如此循环培养,直至所需细胞数。

### 1.3 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性

选取培养的 U373MG 细胞接种于 96 孔板上,每孔约 5000 个 (100μl) 细胞,完全培养基培养 24h 后弃掉培养基,重新加入 RPMI-1640 100μl,24h 后再弃掉 96 孔板中的 RPMI-1640 培养基,配制的含不同浓度的 Corilagin 培养液 (完全培养基 + Corilagin), Corilagin 浓度分别为 25、50、100、200μmol · L<sup>-1</sup> (以 0μmol · L<sup>-1</sup> 为对照组,用 RPMI-1640 代替),按实验设计每孔加 100μl,每组均设 3 个复孔,分别干预 24、48、72h,并分别加入 100μl RPMI-

1640 + CCK-8 混合液 (RPMI-1640: CCK-8 = 10: 1),置于恒温培养箱中培养 2h 后,用酶标仪检测每个孔的吸光度值,每个检验重复 3 次,检测波长 450nm,参照波长 630nm。计算细胞存活率 (%) = [(干预组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] × 100%。

### 1.4 细胞划痕实验

选培养至传代的 U373MG 细胞接种于 6 孔板中,每孔约 2 × 10<sup>5</sup> 个 (2ml) 细胞,正常培养 24h 后,用无菌枪头 (10μl) 均匀划痕,并用 PBS 冲洗掉细胞碎片,更换细胞培养液,实验组培养液含 Corilagin 浓度为 200μmol · L<sup>-1</sup>,对照组为不加 Corilagin 的培养液,再继续培养 24、48 和 72h,在显微镜下每 24h 观察 1 次,并测量细胞的迁移距离,拍照记录并计算细胞迁移度,迁移度 (%) = (划痕时两侧距离 - 检测时两侧距离) / 划痕时两侧距离 × 100%。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行分析,数据以均数 ± 标准差的形式表示,采用 *t* 检验进行组间比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 U373MG 细胞形态观察

未经 Corilagin 干预的 U373MG 细胞,其状态良好,铺满孔底,紧密贴壁生长,并且细胞结构完整,胞体大致呈圆形、多角形、椭圆形等。而 25、50、100、200μmol · L<sup>-1</sup> 浓度 Corilagin 干预 U373MG 细胞后,随着药物浓度的升高或者干预时间的延长,U373MG 细胞的形态逐渐发生变化,细胞有不同程度皱缩,细胞生长密度逐渐降低,并可见大量散在的细胞碎片,细胞生长受到明显抑制。

### 2.2 Corilagin 对 U373MG 细胞增殖活性的影响

U373MG 细胞经不同浓度 Corilagin 干预 24、48、72h 后,经 CCK-8 试剂盒检测发现,在干预时间相同的条件下,与对照组相比,U373MG 细胞的存活率随着 Corilagin 浓度的增加而逐渐降低,差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); 在药物浓度相同的条件下,与对照组相比,U373MG 细胞的存活率随着 Corilagin 干预时间的延长逐渐降低,差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 1。

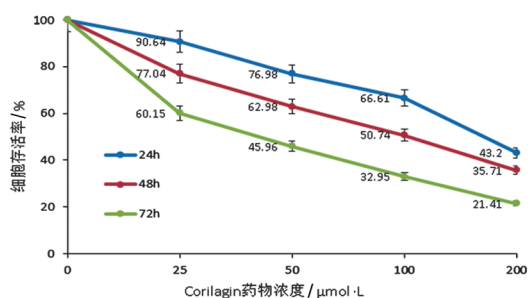


图 1 Corilagin 对 U373MG 细胞存活率的影响

### 2.3 Corilagin 对 U373MG 细胞迁移的影响

与对照组相比,在含  $200\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin 血清培养基中培养 24、48 和 72h 后 U373MG 细胞的迁移度均明显降低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1、图 2。

表 1 两组 U373MG 细胞不同时间点迁移能力的比较

| 组别                                                 | U373MG 细胞迁移度/%   |                  |                  |
|----------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                                    | 24h              | 48h              | 72h              |
| 对照组                                                | $35.36 \pm 4.27$ | $66.42 \pm 8.25$ | $93.27 \pm 8.16$ |
| $200\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Corilagin 组 | $11.27 \pm 3.18$ | $34.26 \pm 7.22$ | $48.75 \pm 9.54$ |
| <i>t</i>                                           | 7.84             | 5.08             | 6.14             |
| <i>P</i>                                           | <0.01            | <0.01            | <0.01            |

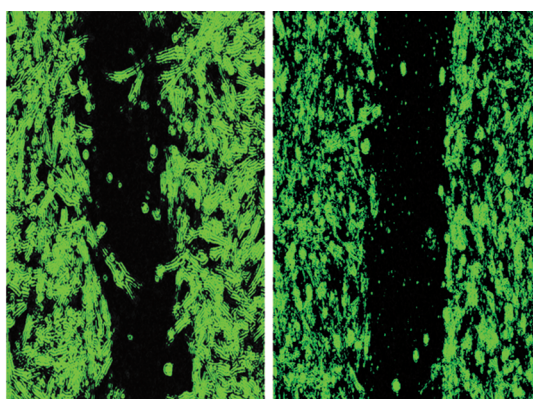
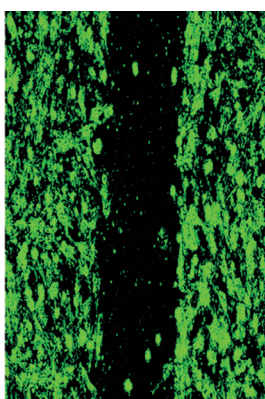
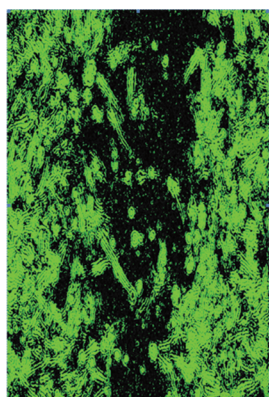
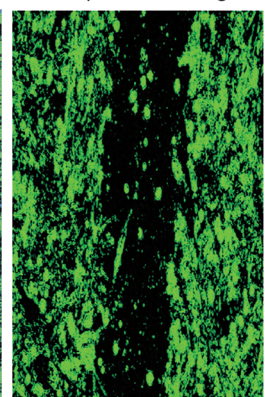
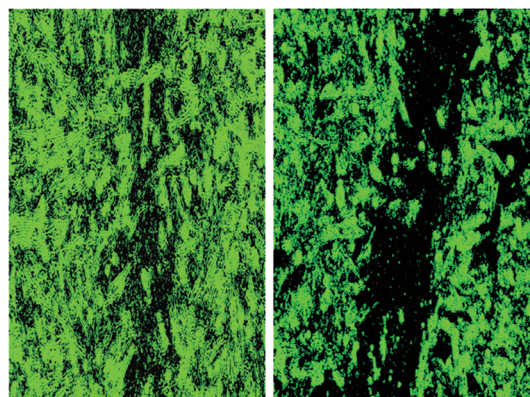
24h-0μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组24h-200μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组48h-0μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组48h-200μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组72h-0μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组72h-200μmol·L<sup>-1</sup> Corilagin 组

图 2 各组 U373MG 细胞迁移能力比较 (×100)

### 3 讨论

脑胶质瘤具有侵袭性强和复发率高的特点<sup>[6-7]</sup>,经过手术切除后行化疗等标准治疗后,胶质瘤患者的生存期依旧很低<sup>[8]</sup>,而且,治疗 GBM 的一线化疗药物 TMZ 已存在明显的耐药性<sup>[9]</sup>,因此,目前迫切需要一种新的化疗药物来替换或提高 TMZ 的疗效。Corilagin 又名柯子次鞣素,属天然植物多酚单宁酸类化合物,分子式是  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$ ,分子量 634.46,为白色针晶状粉末,是蜜柑草总甙抗肿瘤作用的主要活性成分<sup>[10-11]</sup>。Corilagin 具有多种药理作用,主要涉及抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup>、神经保护<sup>[5]</sup>等作用,应用前景良好,已有大量研究人员对其作用机制进行了密切关注及探索。

本文应用 Corilagin 干预胶质瘤 U373MG 细胞,发现随着药物浓度的增加或者干预时间的延长,Corilagin 促使胶质瘤 U373MG 细胞的增殖活性逐渐降低;U373MG 细胞划痕实验的迁移度降低,说明 Corilagin 能够有效抑制 U373MG 细胞的生长。通常细胞增殖与细胞程序性凋亡是正常的生理过程,并维持在一个平衡状态<sup>[12]</sup>,如果能够打破细胞增殖与凋亡之间的平衡状态,那么就可对肿瘤的生长进行有效的干预<sup>[13]</sup>,因而,可通过干涉细胞增殖及程序性凋亡等途径对肿瘤进行治疗<sup>[14]</sup>。本文结果显示,U373MG 细胞在不受药物干预的情况下培养不同时间后进行 CCK-8 检测,细胞生长不受抑制;U373MG 细胞在 Corilagin 干预下生长遭到抑制,U373MG 细胞增殖活性与培养时间呈负性依赖关系。在药物浓度相同的条件下,Corilagin 对

U373MG 细胞的抑制作用随着药物干扰时间的延长逐渐增强,并且细胞裂解也越严重。在干预时间相同的条件下,随着药物浓度的增加,Corilagin 对 U373MG 细胞的抑制作用,以及细胞的裂解程度越来越明显。通过划痕实验证实,U373MG 细胞在含有  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Corilagin 的培养基中培养 24、48 和 72h 后,U373MG 细胞的迁移度均明显低于对照组,说明 Corilagin 对 U373MG 细胞的生长具有明显的抑制作用。

综上所述,Corilagin 能有效抑制人脑胶质瘤 U373MG 细胞的增殖活性和迁移能力,为 Corilagin 能否应用于胶质瘤的临床化学治疗提供一个新的实验依据。

# 参考文献:

- [1] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820. DOI: 10. 1007/s00401-016-1545-1.
- [2] Alphonché E. Glioblastoma treatments: an account of recent industrial developments [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 879. DOI: 10. 3389/fphar. 2018. 00879.
- [3] Ding YB, Huang LX, Chen J, et al. Corilagin attenuates the parkinsonism in japanese encephalitis virus induced parkinsonism [J]. *Transl Neurosci*, 2018, 9: 13-16. DOI: 10. 1515/tnsci-2018-0003.
- [4] Tong YP, Zhang GY, Li Y, et al. Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018. DOI: 10. 1111/jcmm. 13647.
- [5] Deng Y, Li XD, Li X, et al. Corilagin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the mitochondrial apoptotic and death receptor pathways [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 2545-2552. DOI: 10. 3892/or. 2018. 6396.
- [6] Liu P, Yu JY, Tian XY, et al. The effect of downregulation of Stathmin gene on biological behaviors of U373 and U87-MG glioblastoma cells [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 16. DOI: 10. 1186/s40659-018-0160-0.
- [7] Seystahl K, Wick W, Weller M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma—An update [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 389-408. DOI: 10. 1016/j. critrevonc. 2016. 01. 018.
- [8] 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, 27(17): 178-179. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-7484. 2017. 17. 25.
- [9] Milani R, Brognara E, Fabbri E, et al. Corilagin induces high levels of apoptosis in the temozolomide-resistant T98G glioma cell line [J]. *Oncol Res*, 2017. DOI: 10. 3727/096504017X14928634401187.
- [10] 刘阳, 靳峰. 柯里拉京在脑胶质瘤治疗中的应用前景 [J], *中国临床神经外科杂志*, 2014, 19(7): 444-445. DOI: 1009-153X(2014)07-0444-02.
- [11] 周广洲, 陈俊, 靳峰. 柯里拉京对人脑胶质瘤细胞 U251 生物学特性的影响 [J]. *济宁医学院学报*, 2018, 41(4): 246-249. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 04. 005.
- [12] Li X, Deng Y, Zheng ZZ, et al. Corilagin, a promising medicinal herbal agent [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 43-50. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2018. 01. 030.
- [13] Yang WT, Li GH, Li ZY, et al. Effect of corilagin on the proliferation and NF- $\kappa$ B in U251 glioblastoma cells and U251 glioblastoma stem-like cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 1418309. DOI: 10. 1155/2016/1418309.
- [14] Balça-Silva J, Matias D, Carmo AD, et al. Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018: S1044-S579X(18)30072-5. DOI: 10. 1016/j. semcancer. 2018. 09. 007.

(收稿日期 2018-10-13)

(本文编辑:石俊强)