

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.007

· 基础研究 ·

连翘苷经 HMGB1/RAGE 通路抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖、侵袭及上皮间质转化

刘明, 冯晓崧, 张寅, 刘熙鹏, 柳永达, 张秀峰, 乔建新(河北北方学院附属第一医院 神经外科, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:**探究连翘苷(PHN)调节高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)信号通路对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭及上皮间质转化(EMT)的影响。**方法:**将人胶质瘤U251细胞分为PHN-0组(0 μmol/L PHN处理)、PHN低、中和高剂量组(PHN-50、PHN-100、PHN-200组,分别用50、100和200 μmol/L PHN处理)、PHN + pcDNA-NC组(转染pcDNA-NC质粒后200 μmol/L PHN处理)和PHN + HMGB1组(转染过表达HMGB1质粒后200 μmol/L PHN处理)。CCK-8法和克隆形成实验检测各组细胞的增殖能力,流式细胞术检测各组细胞的凋亡水平,Transwell实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力,ELISA检测各组细胞分泌IL-8水平,免疫荧光法检测各组细胞中神经钙黏素(N-cadherin)和上皮钙黏素(E-cadherin)阳性率,WB法检测各组细胞中Toll样受体4(TLR4)、核因子-κB(NF-κB)、HMGB1、RAGE、N-cadherin、E-cadherin、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(BAX)蛋白的表达水平。**结果:**与PHN-0组相比,PHN-50、PHN-100、PHN-200组U251细胞增殖活力、克隆形成数、迁移和侵袭数、IL-8分泌水平、N-cadherin阳性率及其蛋白表达、TLR4、NF-κB、HMGB1、RAGE、cyclin D1、CDK2蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率、E-cadherin阳性率及其蛋白表达、BAX/Bcl-2比值均显著升高(均 $P < 0.05$);同时过表达HMGB1则可逆转PHN对U251细胞增殖、迁移、侵袭及EMT的抑制作用和对凋亡的促进作用(均 $P < 0.05$)。**结论:**PHN通过HMGB1/RAGE信号通路抑制胶质瘤U251细胞增殖、侵袭及EMT进程。

[关键词] 连翘苷;高迁移率族蛋白B1;晚期糖基化终产物受体;胶质瘤;U251细胞;增殖;侵袭;上皮间质转化

[中图分类号] R739.41; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 10-1053-07

Phillyrin inhibits the proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of glioma U251 cells *via* the HMGB1/RAGE signaling pathway

LIU Ming, FENG Xiaosong, ZHANG Yin, LIU Xipeng, LIU Yongda, ZHANG Xiufeng, QIAO Jianxin (Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of phillyrin (PHN) on the proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of glioma U251 cells by adjusting the high mobility group protein B1 (HMGB1)/receptor of advanced glycation endproduct (RAGE) signaling pathway. **Methods:** Human glioma U251 cells were assigned into the PHN-0 group (treated with 0 μmol/L PHN), the low, medium, and high-dose PHN groups (PHN-50, PHN-100, PHN-200 groups, treated with 50, 100, and 200 μmol/L PHN respectively), the PHN + pcDNA-NC group (treated with 200 μmol/L PHN after transfection of pcDNA-NC plasmid), and the PHN + HMGB1 group (treated with 200 μmol/L PHN after transfection of overexpressed HMGB1 plasmid). The proliferation ability of cells in each group was detected by the CCK-8 method and the clone formation assay. The apoptosis level of cells in each group was detected by flow cytometry. The migration and invasion abilities of cells in each group were detected by the Transwell assay. ELISA was used to detect the IL-8 secretion level of cells in each group. Immunofluorescence was used to detect the positive rates of N-cadherin and E-cadherin in cells of each group. WB assay was performed to detect the expression levels of Toll like receptor 4 (TLR4), nuclear factor-kappa B (NF-κB), HMGB1, RAGE, N-cadherin, E-cadherin, cell cycle protein D1 (cyclin D1), cyclin dependent kinase 2 (CDK2), B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (BAX) proteins in cells of each group. **Results:** Compared with those in the PHN-0 group, the proliferation activity, the number of clone formation, the numbers of invasion and migration, IL-8 secretion levels, the positive rate and protein expression of N-cadherin, and the expressions of TLR4, NF-κB, HMGB1,

[基金项目] 2023年张家口市市级科技计划项目(No. 2322180D)

[作者简介] 刘明(1980—),男,硕士,副主任医师、副教授,主要从事颅内肿瘤的研究

[通信作者] 刘明(扫码获取作者通信方式)



RAGE, cyclin D1 and CDK2 protein in the PHN-50, PHN-100, and PHN-200 groups decreased significantly (all $P < 0.05$); and the apoptosis rate, the positivity rate and protein expression of E-cadherin, and the BAX/Bcl-2 ratio increased significantly (all $P < 0.05$). At the same time, overexpression of HMGB1 could reverse the inhibitory effects of PHN on the proliferation, migration, invasion and EMT of U251 cells, as well as its promoting effect on the apoptosis (all $P < 0.05$). **Conclusion:** PHN inhibits the proliferation, invasion and EMT progression of glioma U251 cells through the HMGB1/RAGE signaling pathway.

[Key words] phillyrin (PHN); high mobility group protein B1 (HMGB1); receptor of advanced glycation endproduct (RAGE); glioma; U251 cell; proliferation; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(10): 1053-1059. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.007]

脑胶质瘤是一种起源于神经胶质细胞的原发性脑肿瘤,其引起的头痛、恶心、呕吐、癫痫、视力模糊等症状主要与肿瘤占位效应及累及脑功能区相关,目前尚无有效治疗方法,总体预后较差^[1]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程赋予胶质瘤细胞迁移和侵袭能力,加快肿瘤细胞扩散与进展^[2]。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)是一种核蛋白,可通过结合晚期糖基化终产物受体(receptor of advanced glycation endproduct, RAGE)促进肿瘤细胞增殖和迁移^[3],在胶质瘤恶性进展中发挥重要作用^[4]。连翘苷(phillyrin, PHN)是中药连翘的主要活性成分,具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤等药理作用,并可抑制多种实体瘤生长^[5]。此外,PHN还表现出神经保护作用,如在帕金森病模型中促进神经元恢复,并通过改善小胶质细胞极化抑制神经炎症与血脑屏障损伤^[6-7]。然而,PHN在胶质瘤中的作用尚不明确。本研究基于HMGB1/RAGE信号通路探究PHN对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭及EMT进程的影响,旨在为胶质瘤的治疗提供潜在策略与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要药品与试剂

人胶质瘤 U251 细胞购于中国科学院细胞库。DMEM 培养基和胎牛血清购于武汉普诺赛生命科技有限公司, PHN 购于维克奇生物科技有限公司, CCK-8 试剂购于深圳市尚唯生物科技有限公司, 多聚甲醛和免疫固定液购于上海碧云天生物技术股份有限公司, 结晶紫购于上海源叶生物科技有限公司, 白介素-8(IL-8)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司, DAB 工作液购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司, HMGB1 和神经钙黏素(N-cadherin)抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司, RAGE、上皮钙黏素(E-cadherin)、Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子- κ B (NF- κ B)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (BAX) 和 β -actin 以及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二

抗均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养、分组及转染

U251 细胞在含 90%DMEM 培养基和 10% 胎牛血清的完全培养基中于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。实验分为 PHN-0 组(0 μ mol/L PHN), PHN 低、中和高剂量组 (PHN-50、PHN-100、PHN-200 组, 分别用 50、100 和 200 μ mol/L PHN 处理)。培养 24 h 后进行后续实验。剂量设置依据前期预实验结果: PHN 作用于 U251 细胞 24 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)为 206.2 μ mol/L, 故选取上述梯度浓度处理细胞。另设回补实验组, U251 细胞分别转染过表达 HMGB1 质粒或阴性对照 pcDNA-NC 质粒, 再用 200 μ mol/L PHN 处理, 分别标记为 PHN + HMGB1 组和 PHN + pcDNA-NC 组。

1.3 CCK-8 法检测 PHN 对 U251 细胞增殖的影响

将各组对数生长期 U251 细胞, 用胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液, 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 每个孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液作用 1 h, 上酶标仪检测 450 nm 处的光密度(D)值。以 D 值表示细胞的增殖能力。

1.4 克隆形成实验检测 PHN 对 U251 细胞克隆形成能力的影响

将各组对数生长期 U251 细胞接种到 6 孔板(8 \times 10² 个细胞/孔)中, 根据 1.2 分组处理 2 周。用 4% 多聚甲醛固定后, 0.1% 结晶紫溶液中染色 15 min, 在光学显微镜下观察并拍摄, 用 ImageJ 软件对每个孔中的细胞集落进行计数。

1.5 流式细胞术检测 PHN 对 U251 细胞凋亡的影响

将各组 U251 细胞按照 1.2 分组处理 24 h, 洗涤 3 次, 避光环境下加入 195 μ L 结合缓冲液重悬, 依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI, 反应 15 min, 上流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.6 Transwell 实验检测 PHN 对 U251 细胞迁移与侵袭的影响

进行侵袭实验的 Transwell 上室预铺基质胶, 迁移实验的上室不预铺基质胶。将各组密度为 1×10^5 个/mL 的 U251 细胞悬浮于无血清培养基中, 取 200 μ L 加入上室, 下室中加入 500 μ L 含 20% 胎牛血清的完全培养基, 在培养箱处理 24 h。取出小室, 4% 多聚甲醛固定、0.1%

结晶紫染色移动至下室的细胞。倒置显微镜下随机取5个视野拍照并计数迁移与侵袭细胞数。

1.7 ELISA检测PHN对U251细胞分泌IL-8的影响

取各组U251细胞,按照1.2分组处理24 h,收集各组细胞的培养基,离心取上清液用于ELISA测定。将50 μ L标准溶液或稀释10倍的上清样品移入预涂有抗IL-8单克隆抗体的96孔板的单孔中,并加入HRP标记的抗IL-8检测抗体。用TMB底物显色,终止液停止反应,在波长为450 nm的酶标仪检测D值,并根据标准曲线计算IL-8水平。

1.8 免疫荧光法检测PHN对U251细胞中N-cadherin和E-cadherin表达的影响

将各组U251细胞接种于预铺赖氨酸的圆形盖玻片上,待细胞贴壁后,用4%多聚甲醛溶液固定20 min。洗涤3次,用10%山羊血清37 $^{\circ}$ C封闭15 min,吸去封闭液。分别滴加按照说明稀释的N-cadherin和E-cadherin荧光抗体,4 $^{\circ}$ C下处理12 h。洗涤3次后,加入对应的荧光标记二抗稀释液,室温下避光处理1 h,洗涤3次。在DAPI工作液中室温避光染核30 s,漂洗后封片。荧光显微镜下随机选取5个视野拍照,ImageJ软件计数阳性细胞并计算百分比。

1.9 WB法检测PHN对U251细胞中HMGB1、RACE及EMT、细胞周期与凋亡相关蛋白表达的影响

使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取各组U251细胞总蛋白,采用BCA试剂盒测量蛋白质浓度,取蛋白质样品(20 μ g/泳道)在10% SDS-PAGE中分离,将蛋白质条带转移到聚偏二氟乙烯膜上。在含5% BSA

的TBST缓冲液中封闭2 h后,将膜与HMGB1(1:5 000)、RAGE(1:1 000)、N-cadherin(1:2 000)、E-cadherin(1:1 000)、TLR4(1:2 000)、NF- κ B(1:2 000)、cyclin D1(1:1 000)、CDK2(1:1 000)、BAX(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)和 β -actin(1:1 000)一抗中4 $^{\circ}$ C下处理过夜。在HRP标记山羊抗兔二抗(1:5 000)中室温下处理1 h。使用ECL试剂和成像系统检测蛋白条带,以ImageJ软件对蛋白质条带进行定量分析。

1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复5次。采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据均符合正态分布和方差齐性,单因素方差分析比较多组间差异,LSD检验比较任意两组间差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PHN抑制U251细胞增殖和克隆形成能力

CCK-8法和克隆形成实验检测结果(表1,图1A)显示,与PHN-0组相比,PHN-50、PHN-100、PHN-200组U251细胞增殖能力和克隆形成数目均显著降低(均 $P < 0.05$);与PHN-200组、PHN + pcDNA-NC组相比,PHN + HMGB1组U251细胞的增殖能力和克隆形成数目均显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明,低、中、高剂量PHN均显著抑制U251细胞的增殖;而同时过表达HMGB1则可逆转PHN的抑制作用,恢复细胞的增殖能力。

表1 PHN及HMGB1对U251细胞增殖和凋亡的影响

分组	细胞增殖(D_{450})	克隆形成数/个	细胞凋亡率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
PHN-0组	1.17 \pm 0.13	158.60 \pm 13.31	2.87 \pm 0.33	165.40 \pm 17.19	139.60 \pm 15.07
PHN-50组	0.89 \pm 0.09*	129.40 \pm 10.35*	17.28 \pm 2.14*	129.80 \pm 13.52*	108.20 \pm 11.61*
PHN-100组	0.65 \pm 0.07* $^{\Delta}$	100.20 \pm 9.72* $^{\Delta}$	32.75 \pm 3.62* $^{\Delta}$	95.60 \pm 10.21* $^{\Delta}$	76.80 \pm 8.03* $^{\Delta}$
PHN-200组	0.42 \pm 0.05* $^{\Delta}$	74.60 \pm 8.29* $^{\Delta}$	46.31 \pm 5.06* $^{\Delta}$	63.20 \pm 6.73* $^{\Delta\#}$	48.60 \pm 5.14* $^{\Delta}$
PHN + pcDNA-NC组	0.44 \pm 0.05* $^{\Delta}$	72.40 \pm 7.64* $^{\Delta}$	44.09 \pm 4.85* $^{\Delta}$	66.00 \pm 7.09* $^{\Delta}$	46.40 \pm 5.28* $^{\Delta}$
PHN + HMGB1组	1.09 \pm 0.11 $^{\Delta}$	112.40 \pm 12.82 $^{\Delta}$	5.62 \pm 5.97 $^{\Delta}$	153.60 \pm 17.82 $^{\Delta}$	121.80 \pm 13.56 $^{\Delta}$

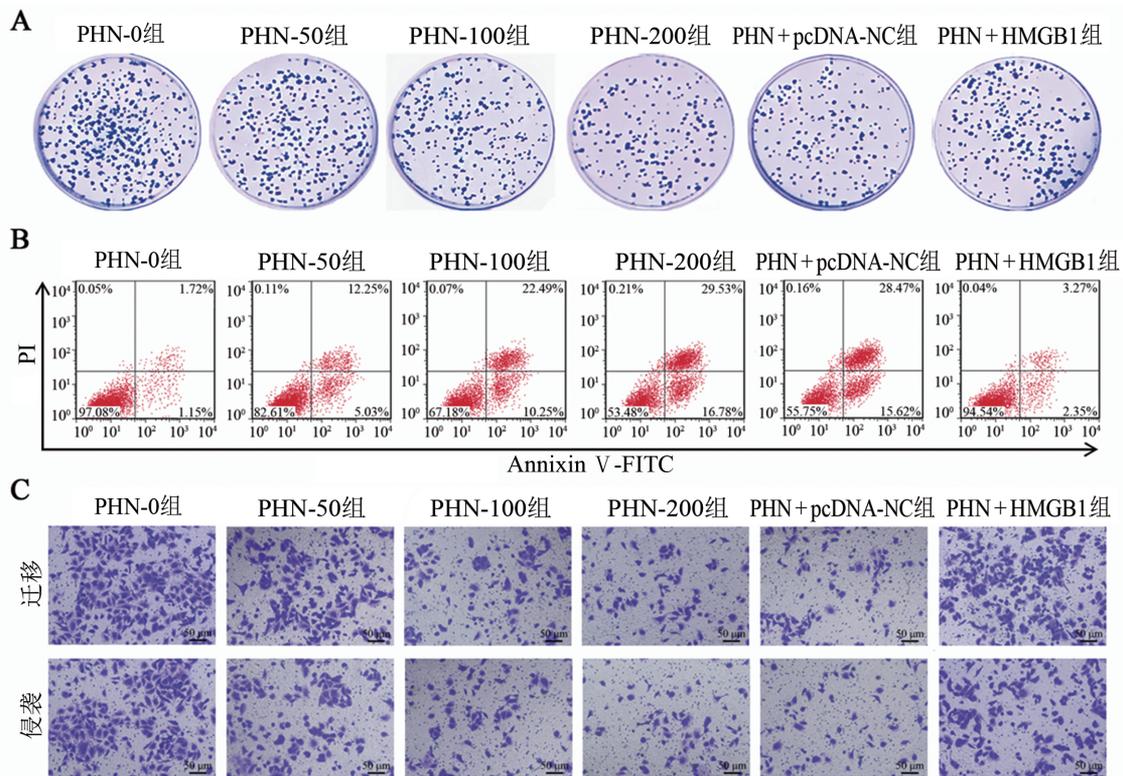
与PHN-0组比较,* $P < 0.05$;与PHN-50组比较, $^{\Delta}$ $P < 0.05$;与PHN-200组和PHN + pcDNA-NC组比较, $^{\Delta}$ $P < 0.05$ 。

2.2 PHN促进U251细胞凋亡

流式细胞术检测结果(表1,图1B)显示,与PHN-0组相比,PHN-50、PHN-100、PHN-200组U251细胞凋亡率均显著升高(均 $P < 0.05$);与PHN-200组、PHN + pcDNA-NC组相比,PHN + HMGB1组U251细胞凋亡率均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,低、中、高剂量PHN均促进U251细胞凋亡,而同时过表达HMGB1则逆转PHN的凋亡促进作用。

2.3 PHN抑制U251细胞迁移和侵袭

Transwell实验检测结果(表1,图1C)显示,与PHN-0组相比,PHN-50、PHN-100、PHN-200组U251细胞迁移和侵袭数量均显著减少(均 $P < 0.05$);与PHN-200组、PHN + pcDNA-NC组相比,PHN + HMGB1组U251细胞迁移和侵袭数量均显著增加(均 $P < 0.05$)。结果表明,低、中、高剂量PHN均显著降低U251细胞的迁移与侵袭能力,而同时过表达HMGB1则可逆转PHN的抑制作用,恢复细胞的迁移与侵袭能力。



A: 克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力; B: 流式细胞术检测细胞的凋亡水平; C: Transwell 实验检测细胞的迁移及侵袭能力 (结晶紫染色)。

图1 PHN 及 HMGB1 对 U251 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

2.4 PHN 抑制 U251 细胞 TLR4、NF-κB 和 IL-8 水平

WB 法和 ELISA 检测结果(图 2A, 表 2)显示, 与 PHN-0 组相比, PHN-50、PHN-100、PHN-200 组 U251 细胞 TLR4、NF-κB 和 IL-8 分泌水平均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与 PHN-200 组、PHN + pcDNA-NC 组

相比, PHN + HMGB1 组 U251 细胞 TLR4、NF-κB 和 IL-8 分泌水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明, PHN 抑制 TLR4/NF-κB 通路并下调 IL-8 分泌水平, 同时过表达 HMGB1 则可显著逆转 PHN 的上述抑制作用。

表 2 PHN 及 HMGB1 对 U251 细胞 TLR4、p-NF-κB/NF-κB 和 IL-8 分泌水平以及 N-cadherin 和 E-cadherin 表达的影响

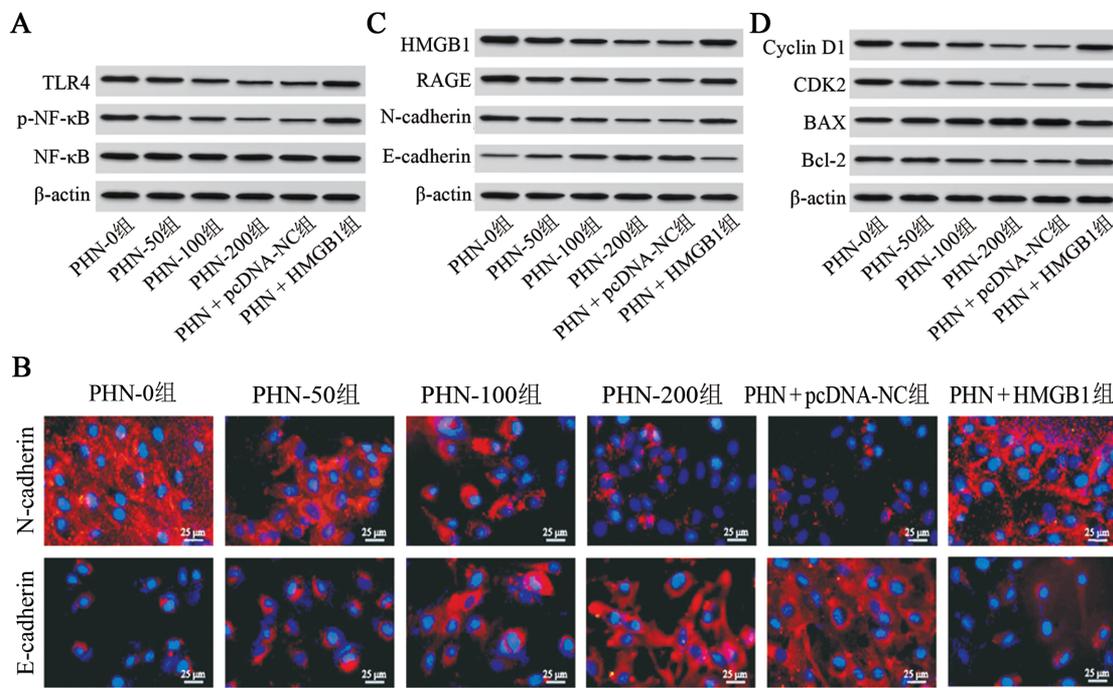
分组	TLR4	p-NF-κB/NF-κB	IL-8(pg/mL)	N-cadherin 阳性率/%	E-cadherin 阳性率/%
PHN-0 组	0.89 ± 0.08	0.97 ± 0.09	435.61 ± 47.28	70.24 ± 7.25	26.98 ± 3.09
PHN-50 组	0.64 ± 0.06*	0.72 ± 0.08*	331.06 ± 35.74*	52.63 ± 5.67*	42.35 ± 4.68*
PHN-100 组	0.42 ± 0.05* ^Δ	0.54 ± 0.06* ^Δ	247.70 ± 26.18* ^Δ	37.86 ± 4.09* ^Δ	53.64 ± 5.29* ^Δ
PHN-200 组	0.29 ± 0.03* ^Δ	0.40 ± 0.05* ^Δ	165.53 ± 19.24* ^Δ	24.79 ± 3.13* ^Δ	66.91 ± 6.68* ^Δ
PHN + pcDNA-NC 组	0.31 ± 0.04* ^Δ	0.42 ± 0.04* ^Δ	170.14 ± 18.29* ^Δ	26.52 ± 2.94* ^Δ	63.59 ± 6.62* ^Δ
PHN + HMGB1 组	0.81 ± 0.08 [▲]	0.89 ± 0.07 [▲]	422.38 ± 40.51 [▲]	66.12 ± 6.79 [▲]	30.24 ± 3.11 [▲]

与 PHN-0 组比较, * $P < 0.05$; 与 PHN-50 组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与 PHN-200 组和 PHN + pcDNA-NC 组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

2.5 PHN 调控 U251 细胞 EMT 进程

免疫荧光法和 WB 法检测结果(图 2B、C, 表 2、3)显示, 与 PHN-0 组相比, PHN-50、PHN-100、PHN-200 组 U251 细胞 N-cadherin 阳性率及其蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$), E-cadherin 阳性率及其蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$); 与 PHN-200 组、PHN +

pcDNA-NC 组相比, PHN + HMGB1 组 U251 细胞 N-cadherin 阳性率及其蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$), E-cadherin 阳性率及其蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明, PHN 下调 U251 细胞 N-cadherin 表达、上调 E-cadherin 表达, 而同时过表达 HMGB1 则逆转 PHN 的 EMT 抑制效应。



A: WB法检测细胞中TLR4、NF-κB和p-NF-κB蛋白表达; B: 免疫荧光法检测细胞中N-cadherin和E-cadherin阳性表达; C: WB检测细胞中HMGB1、RAGE、N-cadherin和E-cadherin蛋白表达; D: WB检测细胞中cyclin D1、CDK2、BAX和Bcl-2蛋白表达。

图2 PHN及HMGB1对U251细胞HMGB1/RAGE通路及EMT、周期和凋亡相关蛋白表达的影响

2.6 PHN调控U251细胞HMGB1、RAGE及细胞周期与凋亡相关蛋白表达

WB法检测结果(图2C、D,表3)显示,与PHN-0组相比,PHN-50、PHN-100、PHN-200组U251细胞HMGB1、RAGE和cyclin D1和CDK2蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$),BAX/Bcl-2蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$);与PHN-200组、PHN + pcDNA-NC组

相比,PHN + HMGB1组U251细胞HMGB1、RAGE和cyclin D1和CDK2蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$),BAX/Bcl-2蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,PHN下调HMGB1/RAGE通路及其下游的cyclin D1、CDK2蛋白水平,提高BAX/Bcl-2比值;同时过表达HMGB1可显著逆转PHN的上述效应。

表3 PHN及HMGB1对U251细胞HMGB1、RAGE、N-cadherin、E-cadherin和cyclin D1、CDK2、BAX/Bcl-2蛋白表达的影响

分组	HMGB1	RAGE	N-cadherin	E-cadherin	cyclin D1	CDK2	BAX/Bcl-2
PHN-0组	1.26 ± 0.14	1.08 ± 0.12	0.89 ± 0.10	0.23 ± 0.04	0.96 ± 0.08	1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.11
PHN-50组	0.99 ± 0.11*	0.85 ± 0.09*	0.71 ± 0.07*	0.44 ± 0.05*	0.73 ± 0.06*	0.82 ± 0.07*	1.35 ± 0.23*
PHN-100组	0.72 ± 0.08* [△]	0.62 ± 0.07* [△]	0.54 ± 0.06* [△]	0.63 ± 0.07* [△]	0.50 ± 0.05* [△]	0.54 ± 0.05* [△]	1.68 ± 0.27* [△]
PHN-200组	0.47 ± 0.06* [△]	0.50 ± 0.06* [△]	0.37 ± 0.06* [△]	0.83 ± 0.09* [△]	0.31 ± 0.02* [△]	0.33 ± 0.04* [△]	1.95 ± 0.34* [△]
PHN + pcDNA-NC组	0.45 ± 0.06* [△]	0.51 ± 0.05* [△]	0.38 ± 0.05* [△]	0.81 ± 0.09* [△]	0.33 ± 0.03* [△]	0.35 ± 0.05* [△]	1.93 ± 0.32* [△]
PHN + HMGB1组	1.19 ± 0.13 [▲]	1.02 ± 0.09 [▲]	0.82 ± 0.08 [▲]	0.26 ± 0.03 [▲]	0.89 ± 0.07 [▲]	0.94 ± 0.08 [▲]	1.03 ± 0.10 [▲]

与PHN-0组比较,* $P < 0.05$;与PHN-50组比较,[△] $P < 0.05$;与PHN-200组和PHN + pcDNA-NC组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

3 讨论

脑胶质瘤约占颅内肿瘤的80%,目前脑胶质瘤的主要治疗方法有手术、放疗和化疗,尽管上述疗法有所改进,但该类型肿瘤细胞的巨大遗传变异性易导致耐药性的产生^[8]。研究^[9]表明,靶向肿瘤细胞的EMT过程可能是治疗胶质瘤的可行方法。EMT转录

因子的部分激活可以增加肿瘤细胞的运动性,不仅作用于细胞的集体迁移过程,甚至作用于单个肿瘤细胞的迁移,有利于肿瘤细胞的侵袭和扩散,从而进一步导致肿瘤的生长和转移。EMT具有多种典型的分子标志物,例如N-cadherin的表达及E-cadherin的缺失,一些正在临床试验中的药物,通过抑制穿膜受体蛋白的信号转导限制EMT过程,增强替莫唑胺在

体内和体外治疗人神经胶质瘤的疗效^[10]。PHN是一种黄酮类成分,存在于连翘、桂花和黄花菜等生物中,因其多样的生物活性和潜在应用性备受学术界关注。近期研究^[11-13]显示,PHN可抑制肺癌细胞EMT并诱导细胞凋亡,PHN可以通过调节生长因子抑制宫颈癌细胞的恶性生物学行为,且PHN还可通过激活Hippo/YAP信号通路抑制结肠癌细胞增殖、迁移与侵袭。本研究发现,不同浓度PHN处理人胶质瘤细胞,会降低U251细胞增殖活性,减少克隆形成数及侵袭和迁移细胞数量,并提高细胞凋亡率,表明PHN能够抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭并促进细胞凋亡;免疫荧光染色发现,经PHN处理后的U251细胞,N-cadherin阳性率降低,E-cadherin阳性率升高,WB法验证了该变化趋势,表明PHN可能通过延缓EMT进程抑制细胞的迁移和侵袭。细胞凋亡可由内源性线粒体途径诱导,其中Bcl-2和BAX是两种重要蛋白。Bcl-2阻止线粒体外膜的透化,其高表达抑制细胞凋亡。BAX促进线粒体外膜的透化,并具有促凋亡作用。因此,BAX/Bcl-2比值的变化在细胞凋亡的调节中很重要^[14]。细胞周期进程受cyclin和CDK的组合调节,当cyclin和CDK被激活时,会形成复合物来调节细胞周期的不同阶段,其中CDK2是调节细胞S期的主要复合物^[15]。只有当细胞在S期被阻断时,才会发生cyclin D1蛋白表达的下调^[14]。本研究通过WB法检测相关蛋白表达水平的变化,发现PHN显著下调CDK2和cyclin D1,显著上调BAX/Bcl-2比值,说明PHN可能通过阻滞S期抑制胶质瘤细胞增殖,通过线粒体途径诱导细胞凋亡。以上结果证实,PHN具有抗胶质瘤进展的潜力。

HMGB1是一种高度保守的核蛋白,广泛存在于哺乳动物细胞中,在生理状态下,其主要位于细胞核内,与DNA结合,参与维持核小体的结构稳定、调节基因转录等多种细胞核内的生理过程^[16]。HMGB1结构特点是包含两个与DNA结合的结构域和一个酸性的C-末端,赋予了其与DNA以及其他蛋白质相互作用的能力,通过弯曲DNA结构,帮助转录因子与DNA结合,从而促进基因的表达^[17]。RAGE是一种穿膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,主要表达于免疫细胞、血管内皮细胞和神经细胞等多种细胞表面^[18]。在胶质瘤中,HMGB1可以从坏死或受损的肿瘤细胞释放到细胞外环境,细胞外的HMGB1作为一种损伤相关分子模式的分子,能够与肿瘤细胞膜上的RAGE结合,激活了细胞内信号通路中的关键激酶,激酶磷酸化后可以促进细胞周期相关蛋白的表达,从而促进肿瘤细胞的增殖^[19]。HMGB1与RAGE结合还可激活在细胞骨架重组过程中发挥关键作用

的小G蛋白,调节肌动蛋白纤维的聚合和解聚,从而改变细胞的形态,促进肿瘤细胞形成,增强其迁移能力^[20];HMGB1/RAGE信号通路还可以上调基质金属蛋白酶的表达,降解细胞外基质成分,促进肿瘤细胞的侵袭^[21]。HMGB1作为一种炎症介质,通过RAGE激活NF- κ B信号通路,诱导一系列炎症因子如IL-8的表达,炎症反应的异常激活是脑胶质瘤预后不良的部分原因,肿瘤相关巨噬细胞在炎症因子的作用下,会分泌一些生长因子和细胞因子,进一步支持肿瘤细胞的持续生长和发展^[22]。抑制脑胶质瘤大鼠HMGB1 mRNA转录与蛋白表达能够减小脑肿瘤体积^[23],因此靶向HMGB1及其受体是一种很有前途的脑胶质瘤治疗方法。本研究发现,PHN处理的U251细胞HMGB1和RAGE蛋白表达降低,同时炎症指标(TLR4、NF- κ B和IL-8)水平均显著降低,表明PHN能够抑制HMGB1/RAGE信号通路进而抑制瘤细胞炎症反应。在U251细胞中转染HMGB1过表达质粒后明显干扰了PHN对胶质瘤细胞增殖的抑制作用,表明PHN可能是通过阻止HMGB1/RAGE信号通路转导降低细胞周期蛋白表达,调节EMT及凋亡相关蛋白表达,进而抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和EMT,诱导细胞凋亡。

综上所述,PHN抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和EMT的机制与抑制HMGB1/RAGE信号通路有关。本研究阐述了PHN对胶质瘤的抗肿瘤作用及其机制,为临床应用提供理论基础。然而,本研究仍存在一定局限性,所有实验仅基于U251细胞,缺乏体内实验及其他细胞模型验证;对HMGB1/RAGE与TLR4/NF- κ B等炎症信号的交互机制尚未深入探讨;虽仅采用过表达回复实验,缺乏RAGE抑制剂、基因敲除或其他阻断实验,尚不足以充分验证RAGE介导通路的必要性。后续需在多种细胞及动物模型中系统评价PHN药效,结合临床样本分析其与该通路的相关性,并深入解析PHN对肿瘤微环境的综合调控,为其临床转化提供更充分依据。

[参考文献]

- [1] WELLER M, WEN P Y, CHANG S M, *et al.* Glioma[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 33[2025-02-19]. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00516-y>. DOI: 10.1038/s41572-024-00516-y.
- [2] HE X, GUO Y D, YU C J, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition is the main way in which glioma-associated microglia/macrophages promote glioma progression[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1097880[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36969175/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1097880.
- [3] CHEN R C, KANG R, TANG D L. The mechanism of HMGB1 secretion and release[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 91-102. DOI:

- 10.1038/s12276-022-00736-w.
- [4] YAN C L, YANG Z J, CHEN P, *et al.* GPR65 sensing tumor-derived lactate induces HMGB1 release from TAM *via* the cAMP/PKA/CREB pathway to promote glioma progression[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 105[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38576043/>. DOI: 10.1186/s13046-024-03025-8.
- [5] ZHOU C Y, LU M Y, CHENG J L, *et al.* Review on the pharmacological properties of phillyrin[J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(12): 3670[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35744798/>. DOI: 10.3390/molecules27123670.
- [6] QI L F R, LIU Y C, LIU S, *et al.* Phillyrin promotes autophagosome formation in A53T- α Syn-induced Parkinson's disease model *via* modulation of REEP1[J/OL]. *Phytomedicine*, 2024, 134: 155952[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39178680/>. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155952.
- [7] JIANG Q, WEI D, HE X J, *et al.* Phillyrin prevents neuroinflammation-induced blood-brain barrier damage following traumatic brain injury *via* altering microglial polarization[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 719823[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34744713/>. DOI: 10.3389/fphar.2021.719823.
- [8] YASINJAN F, XING Y, GENG H Y, *et al.* Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1255611[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37744349/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1255611.
- [9] REN C Y, CHANG X, LI S W, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition expression profile stratifies human glioma into two distinct tumor-immune subtypes[J/OL]. *Brain Sci*, 2023, 13(3): 447[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36979257/>. DOI: 10.3390/brainsci13030447.
- [10] LU Y B, SUN T J, CHEN Y T, *et al.* Targeting the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer stem cells for a better clinical outcome of glioma[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820948053[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33089751/>. DOI: 10.1177/1533033820948053.
- [11] TANG X, TENG J J, LU K Y. Phillyrin sensitizes lung cancer cells to ferroptosis through inhibiting FTH1/SLC7A11 axis[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2024, 62(1): 8-19. DOI: 10.5414/CP204475.
- [12] 申红梅, 王丽霞, 冯绪强, 等. 连翘脂素调节HIF-1 α /VEGF信号通路对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2024, 32(9): 1820-1825. DOI: 10.13404/j.cnki.cjbh.2024.09.005.
- [13] 郑成富, 周贵丰, 李青, 等. 连翘苷通过激活Hippo-YAP信号通路抑制结肠癌LS180细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(6): 566-572. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.004.
- [14] XIE J, YANG M R, HU X, *et al.* Moringa oleifera lam. isothiocyanate quinazolinone derivatives inhibit U251 glioma cell proliferation through cell cycle regulation and apoptosis induction[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11376[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37511135/>. DOI: 10.3390/ijms241411376.
- [15] SONG M L, ZHANG N, CAO F M, *et al.* PKNOX2 suppresses lung cancer cell proliferation by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR axis[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(5): 217[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37123214/>. DOI: 10.3892/etm.2023.11917.
- [16] TANG D L, KANG R, ZEH H J, *et al.* The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery[J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(12): 824-841. DOI: 10.1038/s41577-023-00894-6.
- [17] XUE J M, SUAREZ J S, MINAAI M, *et al.* HMGB1 as a therapeutic target in disease[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3406-3419. DOI: 10.1002/jcp.30125.
- [18] REDDY V P, ARYAL P, SONI P. RAGE inhibitors in neurodegenerative diseases[J/OL]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1131[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37189749/>. DOI: 10.3390/biomedicines11041131.
- [19] PATRA S, ROY P K, DEY A, *et al.* Impact of HMGB1 on cancer development and therapeutic insights focused on CNS malignancy[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(3): 189105[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38701938/>. DOI: 10.1016/j.bbcan.2024.189105.
- [20] FAN A Q, GAO M X, TANG X H, *et al.* HMGB1/RAGE axis in tumor development: unraveling its significance[J/OL]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1336191[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38529373/>. DOI: 10.3389/fonc.2024.1336191.
- [21] TSAI W E, LIU Y T, KUO F H, *et al.* Crocetin enhances temozolomide efficacy in glioblastoma therapy through multiple pathway suppression[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2024, 21(3): 320-336. DOI: 10.2174/0115672026332275240731054001.
- [22] OTAZU G K, DAYYANI M, BADIE B. Role of RAGE and its ligands on inflammatory responses to brain tumors[J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 770472[2025-02-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34975408/>. DOI: 10.3389/fncel.2021.770472.
- [23] 徐大伟, 刁玉领, 惠磊, 等. 沙棘多糖对脑胶质瘤大鼠的抑瘤作用及对HMGB1、MGMT及TLR4表达的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(1): 51-56. DOI: 10.12102/j.issn.1672-1349.2023.01.008.

[收稿日期] 2025-02-20

[修回日期] 2025-09-10

[本文编辑] 党瑞山