

β -细辛醚逆转 P-糖蛋白介导胶质瘤替莫唑胺耐药机制的研究

普建林¹, 付 静¹, 李 忠¹, 盖雪松², 李 黎^{2*}

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 云南省第一人民医院, 云南 昆明 650032)

摘要: **目的** 探讨 β -细辛醚(β -asarone)对 P-糖蛋白(P-gp)介导的胶质瘤替莫唑胺(TMZ)耐药的逆转作用及其可能机制。**方法** 采用 TMZ 对 U251 细胞进行体外分步诱导,建立对 TMZ 耐药的 U251/TMZ 细胞系。氮唑蓝(MTT)法计算半数抑制浓度(IC₅₀)及耐药指数(RF)。采用 β -asarone(360 μ M)处理 U251 细胞,通过 qRT-PCR、Western blot 检测细胞中 P-gp/MDR1 和 vimentin 的表达。流式细胞术检测 β -asarone(360 μ M、450 μ M)与 TMZ 共给药对细胞凋亡的影响。**结果** 通过体外分步诱导法成功构建对 TMZ 具有稳定耐药性的 U251/TMZ 细胞株。U251/TMZ 耐药细胞较 U251 亲本细胞 P-gp 表达显著增加($P<0.01$)。U251 细胞经 β -asarone 处理后,与 U251 组相比, β -asarone 组细胞的凋亡率显著增加,侵袭能力降低,P-gp、vimentin 蛋白和 mRNA 表达显著下调($P<0.01$, $P<0.05$)。与 TMZ 组相比,TMZ+ β -asarone 组 P-gp、vimentin 蛋白和 mRNA 表达显著降低,联合给药对诱导细胞凋亡和抑制侵袭性效果更好($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。**结论** β -asarone 可以逆转 P-gp 介导的胶质瘤 TMZ 耐药,与 TMZ 联合给药可能通过下调 P-gp 表达来诱导细胞凋亡,抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。

关键词: β -细辛醚;P-糖蛋白;胶质瘤;替莫唑胺;耐药性

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2025)04-0078-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2025.04.012

Effect of β -asarone on Reverse P-gp Mediated Mechanism of Temozolomide Resistance in Glioma

PU Jianlin¹, FU Jing¹, LI Zhong¹, GAI Xuesong², LI Li²

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the reversal effect of β -asarone on P-glycoprotein (P-gp)-mediated temozolomide (TMZ) resistance in glioma and its possible mechanisms. **Methods** TMZ-resistant U251/TMZ cell line was induced by the stepwise revulsion with TMZ. The half inhibitory concentration (IC₅₀) and resistance index (RF) were calculated by the azole blue (MTT) assay. U251 cells were treated with β -asarone (360 μ M), and the expression of P-gp/MDR1 and vimentin in the cells was detected by qRT-PCR and Western blot. Flow cytometry detected the effect of β -asarone (360 μ M, 450 μ M) co-administered with TMZ on apoptosis. **Results** The U251/TMZ cell line with stable resistance to TMZ was successfully constructed using the in vitro stepwise induction method. the P-gp expression of U251/TMZ-resistant cells was significantly increased compared with that of U251 parental cells($P<0.01$). After U251 cells were treated with β -asarone, the apoptosis rate of cells in the β -asarone group was significantly increased, the invasive ability was decreased, and the protein and mRNA expression of P-gp and vimentin were significantly down-regulated compared with those in the U251 group ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the TMZ group, the protein and mRNA expression of P-gp and vimentin were significantly reduced in the TMZ+ β -asarone group, and the co-administration of TMZ+ β -asarone was more effective in inducing apoptosis and inhibiting invasiveness ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). **Conclusion** β -asarone can reverse P-gp-mediated TMZ resistance in glioma, and co-administration with TMZ may induce apoptosis and inhibit glioma cell migration and invasion by down-regulating P-gp expression.

KEY WORDS: β -asarone; P-glycoprotein; glioma; temozolomide; drug resistance

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160442);云南省生物医药重大专项(202302AA310022);昆明医科大学联合专项(202001AY070001-127);云南省兴滇英才支持计划(XDYC-YLWS-2023-0065)

作者简介: 普建林(1999-),男,在读硕士研究生,E-mail: pj1359814@163.com

* **通信作者:** 李 黎(1970-),女,主任医师,研究方向:中西医结合防治脑肿瘤,E-mail: Khyy_ll@163.com

胶质瘤是中枢神经系统最常见的脑肿瘤,约占所有原发性脑肿瘤的 30%和恶性脑肿瘤的 80%^[1]。恶性胶质瘤最根本的治疗策略是手术切除。然而,由于缺乏明确的肿瘤边界,肿瘤的浸润性以及扩大切除易导致术后神经功能缺损等风险,致使胶质瘤全切率较低^[2]。目前恶性胶质瘤的标准治疗包括手术、放疗和(或)替莫唑胺(temozolomide, TMZ)辅助化疗^[3]。TMZ 是新诊断胶质瘤患者的推荐药物,它可以通过血脑屏障产生抗肿瘤功效^[4]。当 TMZ 与放射治疗联合使用时, TMZ 的辐射致敏特性会增加辐射诱导的癌细胞凋亡,延长胶质瘤患者的中位生存期^[5]。然而,即使采用一系列进行性辅助治疗,高级别胶质瘤患者的预后仍然很差,中位生存率仅为 15 个月,5 年生存率仅为 6.8%^[6]。胶质瘤化疗药物的临床疗效往往因血脑屏障和化疗耐药而受到限制^[7]。

ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白是最常见和最大的跨膜蛋白外排泵家族,它通过促进外源性药物(如 TMZ)在细胞和血脑屏障水平的外排而表现出治疗耐药性^[8]。ABC 转运蛋白主要包括 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药蛋白(MRP)和脑癌耐药蛋白(BCRP),它们通常在肿瘤细胞膜上过表达,在耐药过程中发挥重要作用^[9]。P-gp 是第一个在中国仓鼠卵巢肿瘤细胞膜中发现的与耐药有关的 ABC 转运蛋白。据报道,近 60%的化疗药物被 P-gp 识别,然后转运到细胞外,从而导致细胞内药物积累减少,治疗活性降低^[10]。在胶质瘤治疗期间,表现出 TMZ 耐药和肿瘤复发的临床患者的组织样本中 P-gp 水平升高^[11]。在胶质母细胞瘤细胞中,编码 P-gp 的 MDR1 基因的敲低会导致 TMZ 介导的细胞死亡增强,这表明 MDR1 基因在 TMZ 耐药中起重要作用^[12]。

通过开发天然药物化合物来避免 P-gp 介导的药物外排,是增强胶质瘤中 TMZ 活性的可行策略^[13]。天然产物具有毒性小、生物利用度高、物理稳定性好等优点,便于临床试验^[14]。一些天然化合物如黄酮类、生物碱类、香豆素类、萜类和其他植物提取物已被证明可以靶向 ABC 转运蛋白,增强胶质瘤化疗敏感性^[15-17]。β-asarone 是我国前期研究证实的中药石菖蒲挥发油的主要成分,具有广泛的抗胶质瘤活性^[18]。β-asarone 能够穿透血脑屏障并分布于脑内^[19],它可以影响中枢神经系统,保护神经元免于凋亡^[20-21]。此

外,β-asarone 通过阻断 HnRNP A2/B1 信号通路来抑制 U251 细胞的侵袭和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程^[22]。重要的是,β-asarone 和左旋多巴共给药可以通过加速左旋多巴的转化来提高大鼠脑内多巴胺的水平^[23]。尽管许多研究评价了 β-asarone 在胶质瘤治疗中的作用,但很少有研究关注 β-asarone 联合其他抗癌药物在诱导胶质瘤细胞凋亡、侵袭和逆转化疗耐药的潜力。此外,β-asarone 可能通过多种途径和靶点发挥其治疗作用,这使得其作用机制的阐明更加困难。因此,为深入探讨其在逆转耐药性方面的作用及机制,本研究采用 TMZ 对 U251 细胞进行体外分步诱导,构建对 TMZ 耐药的 U251/TMZ 细胞株,阐明 P-gp 表达对胶质瘤 TMZ 耐药性的影响;并进一步探讨了 β-asarone 治疗对克服胶质瘤 TMZ 耐药的协同效应,然后观察 β-asarone 与 TMZ 联合给药在调控 EMT 和诱导细胞凋亡方面的潜能。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 人胶质瘤细胞 U251 购于中国科学院昆明细胞库。替莫唑胺购于江苏天士力帝益药业有限公司;β-细辛醚购于北京拜尔迪生物技术有限公司;胎牛血清 10%, DMEM 培养基, PBS 缓冲液, 二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT 溶液)和 0.25%胰酶均购自 Biosharp 北京兰杰柯科技有限公司;RIPA 裂解液(索莱宝)、BCA 蛋白提取试剂盒(碧云天)、一抗 ABC 转运蛋白 MDR1/P-gp(ab284553)和 EMT 标志物 vimentin(ab92547)、山羊抗兔二抗(赛默飞),内参 GAPDH 抗体(ab8245)均购自美国 Abcam 公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于江凯基生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒购自北京天根生化有限公司;PrimeScriptRT Master Mix 和 TB Green Premix Ex Taq II 购于 TAKARA 北京宝日医生物有限公司。

1.2 细胞培养及替莫唑胺耐药细胞株建立 U251 细胞复苏后将细胞悬液置于 10 倍体积以上含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 5%CO₂、37℃、95%湿度条件下恒温培养箱中培养。待细胞密度达到 80%~90%时用 0.25%胰酶消化后以 1:2 比例传代培养,并进行冻存保种。

采用逐步递增药物浓度、周期性给药的方式构建

对 TMZ 具有稳定耐药性的 U251/TMZ 耐药细胞株。参照文献 [24] 以及在正式诱导培养前所做的预实验中得出的最佳诱导的药物作用浓度梯度为:0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ 。本实验初始诱导剂量 TMZ 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 最高诱导剂量 TMZ 16 $\mu\text{g/mL}$ 。诱导期间每 2 d 更换含 TMZ 培养液 1 次。当初始诱导剂量诱导 2 周, 细胞生长稳定后开始倍增药物诱导剂量, 每个剂量保持培养 10 d~12 d。经 6 个月诱导培养所得耐药细胞命名为 U251/TMZ; 为使 U251/TMZ 的耐药性稳定不变, 此后每月加入 16 $\mu\text{g/mL}$ 的 TMZ 培养 1 周。

1.3 MTT 法检测 U251/TMZ 细胞株对 TMZ 的耐药指数 收集对数生长期细胞, 调整至 4×10^5 单细胞悬液, 于 96 孔板中每孔加入 100 μL 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育至细胞单层铺满 96 孔平底板, 加入浓度梯度的药物。以不同浓度的 TMZ (0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$), 每孔 100 μL , 设 6 个复孔。恒温箱中孵育 24 h, 倒置显微镜下观察。用 PBS 冲洗 2~3 遍后, 每孔加入 50 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。终止培养, 吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 450 nm 处测量各孔的吸光值。重复 3 次, 取平均值。

1.4 细胞分组与给药 参照文献 [25] 及预实验中确定的给药梯度, 我们采用不同浓度的 β -细辛醚处理 U251 亲本细胞, 分别作用 24 h、48 h 和 72 h, 发现给药后 48 h 疗效稳定。因此, 我们选择 48 h 作为给药时间。对于 U251 细胞, β -细辛醚的 IC_{50} 值为 720 μM , 浓度确定为 $1/2 \text{ IC}_{50}$, 即 β -asarone 的最佳浓度为 360 μM 。实验分为 4 组: U251 组 (未经诱导的 U251 细胞)、TMZ 组 (正常培养的 U251/TMZ 细胞)、 β -细辛醚组 (β -asarone 360 μM 处理 U251 细胞)、共给药组 (β -asarone 360 μM , TMZ 300 μM)。

1.5 Western blot 检测蛋白表达 取对数生长期的 U251 细胞和药物处理后的 U251 细胞加入裂解液裂解 30 min (冰上操作), 提取总蛋白采用 BCA 法行蛋白浓度检测。取每种蛋白 10 μL 上样 ($n=4$)、于 SDS-PAGE 电泳后进行转膜操作, 膜用封闭液 (2.5 g 脱脂奶粉溶于 50 mL TBST 中) 室温封闭 2 h。滴加一抗

P-gp (1 : 3 000)、vimentin (1 : 3 000) 及内参 GAPDH (1 : 5 000) 置于摇床上低速振荡 1 h 后放入冰箱 (4 $^\circ\text{C}$) 孵育过夜, 次日一抗室温复摇 40 min, 二抗 (1 : 5 000) 置于摇床上振荡孵育 1 h。化学发光法显影曝光 (显影液 1 : 1 配制), 凝胶成像系统拍照并计算条带相对灰度值, 以目的蛋白/内参蛋白的比值计算蛋白相对表达水平。

1.6 qRT-PCR 取各组细胞, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物由上海生工合成 (表 1)。反应结束后获取 Ct 值, 以 GAPDH 作为内参, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法进行统计分析。

表 1 目的基因引物序列

Primer name	Sequences	Size(bp)
Pgp-F	GATTGCTCACCGCTGTCCAC	82
Pgp-R	CGTGCCATGCTCCTTGACTCTG	
vimentin-F	TGAATGACCGCTTCGCCAACTAC	140
vimentin-R	CTCCCGCATCTCCTCCTCGTAG	
GAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	112
GAPDH-R	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

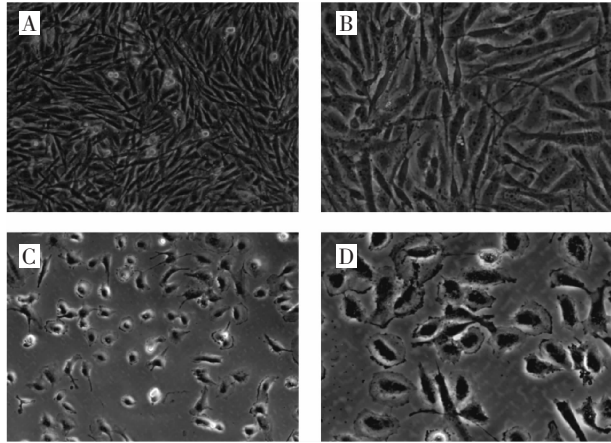
1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 4 组细胞置于六孔板, 细胞数为 1×10^5 /孔培养 48 h。取出细胞, 预冷的 PBS 洗涤 1~2 遍, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞。1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 重悬细胞并计数。取 5 万~10 万重悬的细胞离心后, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温 (20 $^\circ\text{C}$ ~25 $^\circ\text{C}$) 避光孵育 10 min。离心后, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 5 min。流式细胞仪检测凋亡率。

1.8 统计学分析 所有数据采用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行分析。结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 U251 细胞呈梭形或多角形, 排列紧密、大小均匀、边界清楚, 核大偶可见多核, 表

面有突起(图 1 A、B);耐药细胞系 U251/TMZ 细胞呈不规则多边形,边界不清,突出减少,核不规则,胞体黑色颗粒物明显增多(图 1 C、D)。



注:A、B:U251 细胞;C、D:U251/TMZ 细胞;A、C:×100 倍;B、D:×200 倍

图 1 U251 和 U251/TMZ 细胞形态

2.2 检测 U251/TMZ 细胞株的耐药指数(RF) 以 TMZ 的浓度对数值为横坐标,不同 TMZ 浓度下 U251 和 U251/TMZ 细胞的存活率为纵坐标,绘制剂量-反应曲线,如图 2 所示,TMZ 对 U251/TMZ 细胞作用的剂量-反应曲线右移,表明 U251/TMZ 细胞对 TMZ 具有一定的抗性;由回归方程求出 U251 细胞和 U251/TMZ 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀),U251 细胞的 IC₅₀ 值为 2.65 μg/mL,U251/TMZ 细胞的 IC₅₀ 值为 32.89 μg/mL,计算得出 U251/TMZ 的耐药指数(RF) 约为 U251 的 12 倍。

2.3 P-gp 对胶质瘤 TMZ 耐药性的影响 为明确 ABC 转运蛋白表达对胶质瘤 TMZ 耐药性的影响,通过 Western-blot 检测胶质瘤 U251 细胞和 U251/TMZ 耐药细胞中 P-gp 的表达情况。结果如图 3 所示,

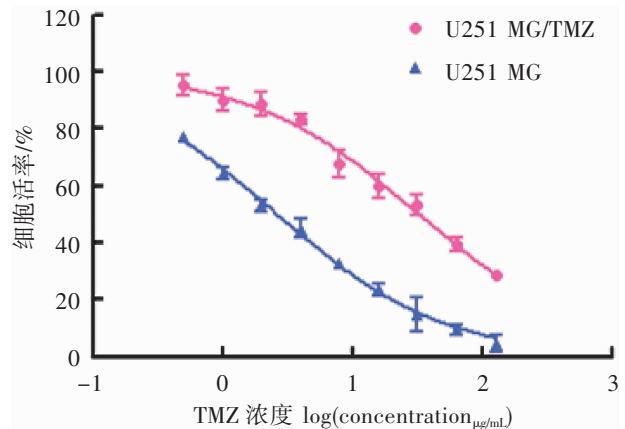


图 2 TMZ 对 U251 和 U251/TMZ 细胞的剂量-反应曲线

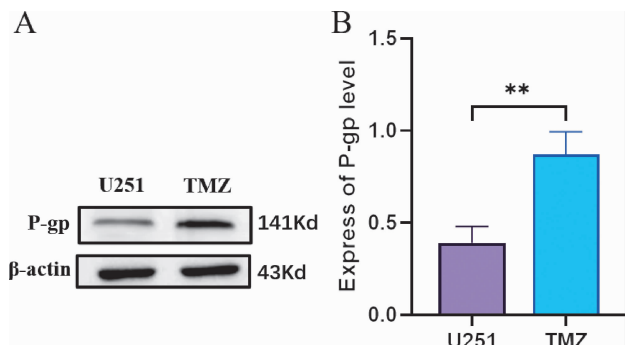


图 3 P-gp 对胶质瘤 TMZ 耐药性的影响

U251 组中 P-gp 蛋白有表达,提示 U251 细胞具有原发性耐药的表现;TMZ 化疗后,与 U251 组比较,TMZ 组中 P-gp 蛋白表达量显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 β-细辛醚与 TMZ 联合用药可降低 P-gp 的表达

与 U251 组比较,β-asarone 组的 P-gp 表达降低($P<0.05$)。与 β-asarone 组相比,TMZ+β-asarone 组的 P-gp 表达降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。β-asarone 与 TMZ 共给药组的 P-gp 表达量明显低于 TMZ 组($P<0.01$)(图 4,表 2)。

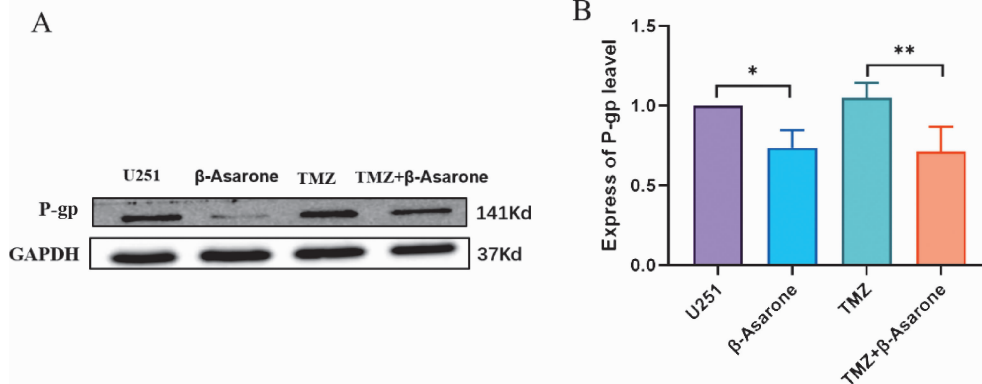


图 4 western blot 检测各组中 P-gp 的表达

2.5 β -细辛醚和 TMZ 联合给药可降低 MDR1 mRNA 的表达 为了研究共给药对 P-gp 表达的影响,我们还通过 qRT-PCR 检测了胶质瘤 U251 细胞中 MDR1 mRNA 的表达水平。与 U251 组相比, β -asarone 组的 MDR1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与 β -asarone 组相比, TMZ+ β -asarone 组的 MDR1 mRNA 表达下调,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。 β -asarone 和 TMZ 联合给药组的 MDR1 mRNA 表达低于 TMZ 单独给药组 ($P<0.001$) (图 5,表 3)。

2.6 β -细辛醚与 TMZ 共给药抑制上皮-间充质转化 为明确 P-gp 是否影响胶质瘤细胞的侵袭性表型,经 P-gp 抑制剂(β -asarone)处理胶质瘤 U251 细胞后,利用 western blot、qRT-PCR 检测 EMT 标志物波形蛋白(vimentin)的表达。结果如图 6、表 2 和表 3 所示,与 U251 组相比, β -asarone 组的 vimentin 及 vimentin mRNA 表达降低 ($P<0.05$); β -asarone 与

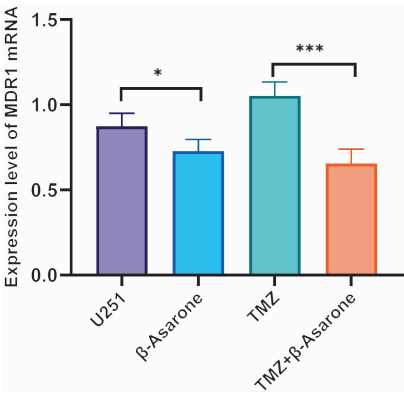


图 5 qRT-PCR 检测各组中 MDR1 mRNA 的表达

TMZ 共给药组的 vimentin 及 vimentin mRNA 表达明显下调 ($P<0.01$, $P<0.001$)。与 β -asarone 组相比, TMZ+ β -asarone 组的 vimentin 及 vimentin mRNA 表达无明显差异 ($P>0.05$)。与 TMZ 相比, β -asarone 与 TMZ 共给药组的 vimentin 及 vimentin mRNA 表达明显下调 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

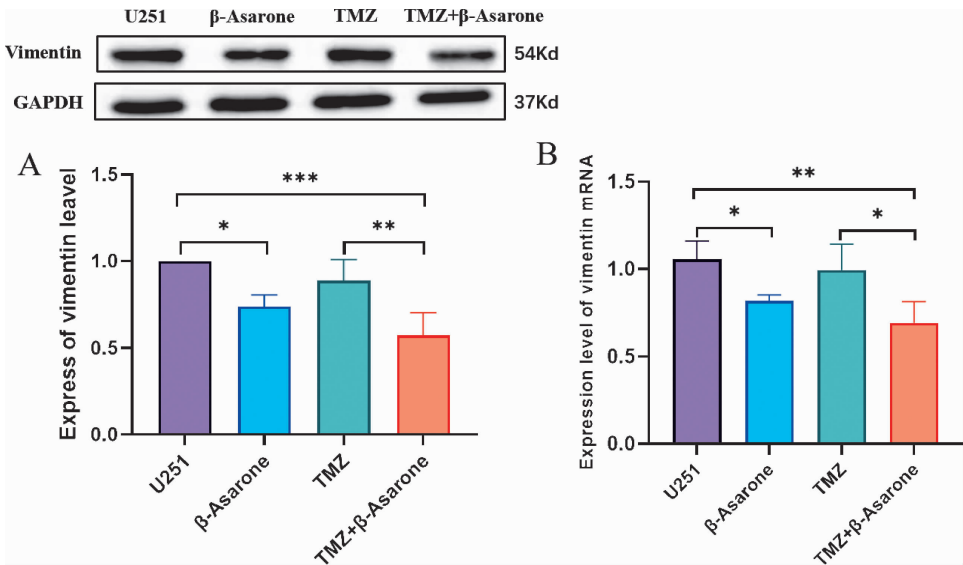


图 6 western blot 和 qRT-PCR 检测 vimentin 的表达

表 2 各组胶质瘤细胞中 P-gp、vimentin 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	P-gp	vimentin
U251 组	1.00±0.00	1.00±0.00
β -asarone 组	0.70±0.08 [#]	0.74±0.68 [#]
TMZ 组	1.29±0.93 [#]	0.89±1.21
TMZ+ β -asarone 组	0.96±0.12 ^{**}	0.57±1.32 ^{####}

注:与 U251 组比较,[#] $P<0.05$,^{###} $P<0.001$;与 TMZ 组比较,^{**} $P<0.05$

表 3 各组胶质瘤细胞中 MDR1、vimentin mRNA

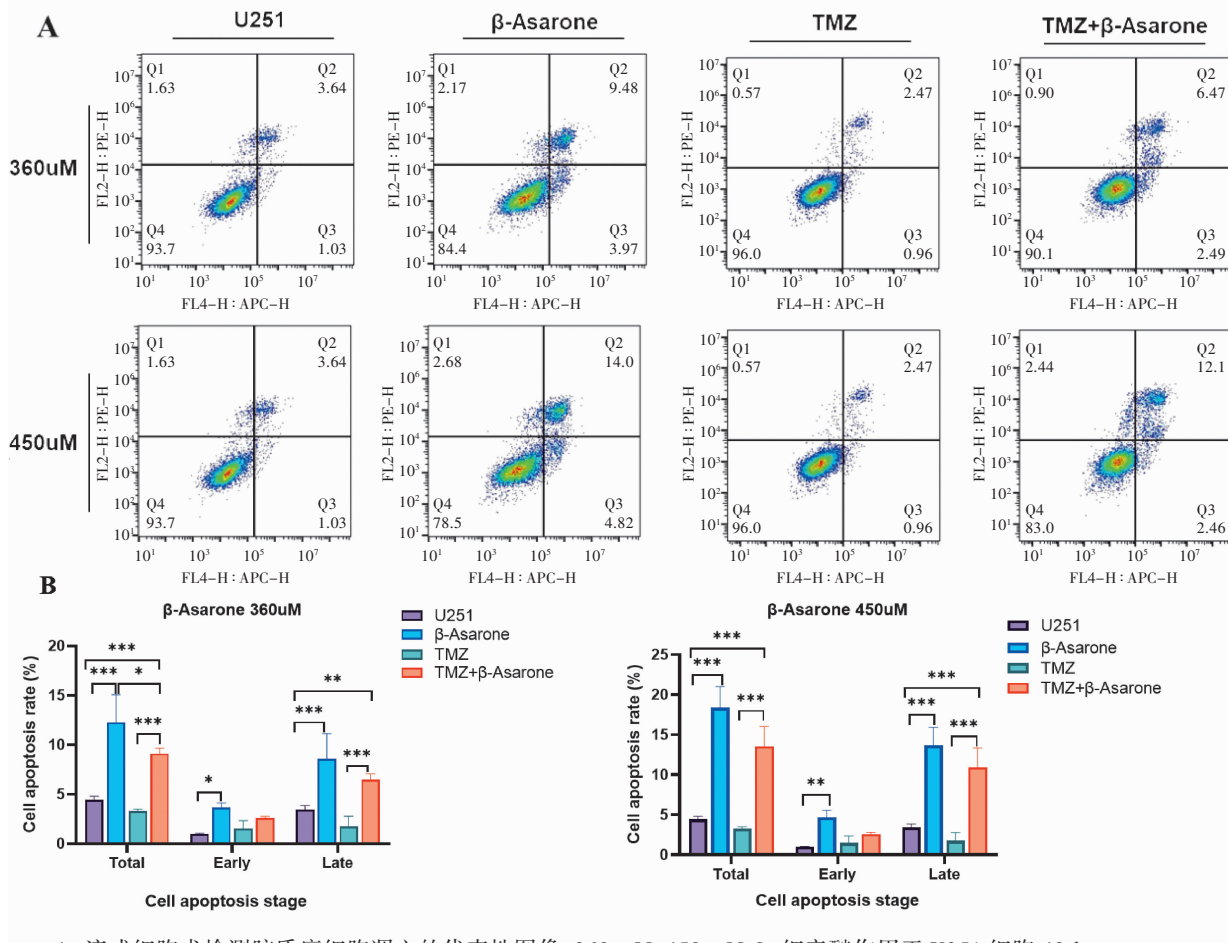
表达比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	MDR1 mRNA	vimentin mRNA
U251 组	1.08±0.47	1.06±1.04
β -asarone 组	0.87±0.35 [#]	0.82±0.35 [#]
TMZ 组	3.50±1.05 ^{##}	0.90±1.50
TMZ+ β -asarone 组	0.90±0.37 ^{***}	0.70±1.21 ^{##}

注:与 U251 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与 TMZ 组比较,^{*} $P<0.05$,^{***} $P<0.001$

2.7 β-细辛醚与 TMZ 共给药促进胶质瘤细胞凋亡

在相同药物浓度下,与 U251 组相比,β-asarone 处理后胶质瘤 U251 细胞凋亡率显著增加,尤其是晚期凋亡细胞 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。TMZ 与 β-asarone 共给药组与 U251 组或 TMZ 组相比,显著促进

了胶质瘤细胞凋亡 ($P<0.001$)。为了进一步探讨不同浓度的 β-asarone 对胶质瘤细胞凋亡的影响,我们选择 360 μM 和 450 μM 两个浓度梯度进行对照研究。与 360 μM β-asarone 处理组相比,450 μM β-asarone 处理组细胞表现出更严重的细胞凋亡(图 7A、B,表 4)。



A. 流式细胞术检测胶质瘤细胞凋亡的代表性图像,360 μM、450 μM β-细辛醚作用于 U251 细胞 48 h;

B. 比较 3 组细胞早期(右下象限)、晚期(右上象限)和总凋亡细胞百分比,各组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 7 β-细辛醚(β-asarone)联合 TMZ 对胶质瘤细胞凋亡的影响

表 4 β-细辛醚(β-asarone)处理后各组胶质瘤细胞凋亡情况($\bar{x} \pm s$)

药物浓度	组别	细胞凋亡率(%)		
		Total	Early-stage	Late-stage
360 μM	U251	4.47±0.35	1.00±0.69	3.46±0.41
	β-asarone	12.29±2.81 ^{###}	3.70±4.26 [#]	8.60±2.55 ^{###}
	TMZ	3.29±0.23	1.52±0.82	1.77±1.01
	TMZ+β-asarone	9.12±0.47 ^{#####}	2.63±0.13	6.49±0.60 ^{#####}
450 μM	U251	4.47±0.35	1.00±0.69	3.46±0.41
	β-asarone	18.36±2.67 ^{###}	4.69±0.92 [#]	13.68±2.26 ^{###}
	TMZ	3.29±0.23	1.52±0.82	1.77±1.01
	TMZ+β-asarone	13.52±2.53 ^{#####}	2.62±0.18	10.90±2.44 ^{#####}

注:与 U251 组比较,* $P<0.05$,[#] $P<0.01$,^{###} $P<0.001$;与 TMZ 组比较,*** $P<0.001$

3 讨论

胶质瘤仍然是最致命的肿瘤类型,临床预后差。尽管在使用改进的诊断方法和开发新的靶向治疗方面取得积极进展,但患者总体生存率并没有显著提高^[26-27]。TMZ 是一种口服咪唑四嗪烷基化剂,已成为恶性胶质瘤治疗的首选化疗药物。TMZ 的主要细胞毒性作用是通过形成 O6-甲基鸟嘌呤病变,导致肿瘤细胞凋亡、自噬和细胞衰老^[28-29]。然而,TMZ 的临床疗效在许多患者中受到内在耐药和获得性耐药的限制^[29-30]。阐明 TMZ 耐药机制和探索有效克服治疗耐药的新策略是成功治疗胶质瘤的关键。人胶质瘤 U251 细胞对化疗和放疗具有耐药性,这使它们成为研究耐药机制的理想模型^[31]。基于前期对大鼠 C6 胶质瘤细胞的研究,我们采用逐步递增药物浓度、周期性给药的方式,历时 6 个月,成功地诱导出对 TMZ 具有稳定耐药性的 U251/TMZ 耐药细胞株。Western blot 结果显示,U251 组中 P-gp 蛋白有表达,提示 U251 细胞具有原发性耐药的表现;TMZ 化疗后,TMZ 组中 P-gp 蛋白表达量显著增加。结果表明胶质瘤细胞耐药性是原发性和获得性耐药共同作用的结果,且 P-gp 表达上调是导致 TMZ 化疗耐药的主要机理之一。因此,P-gp 和其他 ABC 转运蛋白可能是有助于提高 TMZ 疗效的潜在靶点。

β -asarone 作为一种具有抗癌活性的中药石菖蒲挥发油的主要成分,可能通过增强 TMZ 透过细胞膜进入胶质瘤细胞,从而抑制肿瘤生长并抑制 P-gp 和 MDR1 的表达来促进治疗^[32]。本研究进一步表征了 β -asarone 与 TMZ 联合用药在克服化疗耐药方面的潜力。结果发现 Western blot 和 qRT-PCR 的总体趋势保持一致, β -asarone 处理组的 P-gp 和 MDR1 mRNA 表达水平均显著降低,其中 β -asarone 与 TMZ 共给药组效果更好。另一项研究报道, β -asarone 可以诱导胶质瘤 U251 细胞凋亡和细胞周期阻滞,其作用机制可能与抑制 HnRNP A2/ B1 介导的信号通路有关^[18]。本文通过采用不同浓度的 β -asarone 处理 U251 细胞,结果显示高浓度的 β -asarone 能够显著增强胶质瘤细胞凋亡,并且联合给药 TMZ 效果更好。EMT 是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。EMT 的典型特征是上皮细胞连接蛋白(如 E-cadherin)的缺失,以及间充质标记物(如 vimentin)的

增加^[33-34]。已知 EMT 增强胶质瘤的侵袭性和迁移能力,促进其恶性转化^[35]。因此,我们需进一步确定 β -asarone 对 EMT 的影响。研究结果与 Li 等^[22]发现类似, β -asarone 处理后胶质瘤细胞中的 vimentin 和 vimentin mRNA 表达下调,其中共给药组的 vimentin 抑制效果更好,提示 β -asarone 可能阻断胶质瘤细胞的 EMT 过程。

综上, β -asarone 可以竞争性的与膜上的耐药蛋白 MDR1/P-gp 结合来逆转胶质瘤耐药, β -asarone 对 TMZ 化疗胶质瘤具有一定的协同作用。此外, β -asarone 与 TMZ 联合给药可能通过下调 P-gp 的表达来促进细胞凋亡,抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。但本研究仅为体外初步探讨,尚需进一步的体内和临床前研究来验证观察到的协同效应。此外,我们证实了 β -asarone 通过抑制 P-gp 功能与 TMZ 协同具有抗胶质瘤作用, β -asarone 是否还能通过调控其他 ABC 转运蛋白发挥协同作用有待深入研究。

参考文献:

- [1] OSTROM Q T,PRICE M,NEFF C,et al. CBTRUS statistical report:primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2016–2020[J]. *Neuro Oncol*,2023,25(12 Suppl 2):iv1–iv99.
- [2] YOUNG J S,MORSHED R A,HERVEY–JUMPER S L,et al. The surgical management of diffuse gliomas: current state of neurosurgical management and future directions [J]. *Neuro Oncol*,2023,25(12):2117–2133.
- [3] XU S,TANG L,LI X,et al. Immunotherapy for glioma: current management and future application[J]. *Cancer Lett*,2020,476:1–12.
- [4] SHAW R,BASU M,KARMAKAR S, et al. MGMT in TMZ –based glioma therapy:multifaceted insights and clinical trial perspectives[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*,2024,1871(3):119673.
- [5] COMPTER I,EEKERS D B P,HOEBEN A,et al. Chloroquine combined with concurrent radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a phase IB trial[J]. *Autophagy*,2021,17(9):2604–2612.
- [6] SRIVASTAVA R,DODDA M,ZOU H,et al. Tumor niches:perspectives for targeted therapies in glioblastoma[J]. *Antioxid Redox Signal*,2023,39(13–15):904–922.
- [7] ZOU Y, WANG Y, XU S, et al. Brain co-delivery of

- temozolomide and cisplatin for combinatorial glioblastoma chemotherapy[J]. *Adv Mater*,2022,34(33):e2203958.
- [8] TOMAR M S,KUMAR A,SRIVASTAVA C,et al. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*,2021,1876 (2): 188616.
- [9] ROBEY R W,PLUCHINO K M,HALL M D,et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2018,18(7):452-464.
- [10] WANG C,LI Q,XIAO J,et al. Nanomedicine-based combination therapies for overcoming temozolomide resistance in glioblastomas[J]. *Cancer Biol Med*,2023,20(5): 325-343.
- [11] SCHAICH M, KESTEL L, PFIRRMANN M, et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients[J]. *Ann Oncol*,2009, 20(1):175-181.
- [12] MUNOZ J L, RODRIGUEZ-CRUZ V, GRECO S J, et al. Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13 (10):2399-2411.
- [13] SAJID A, RAHMAN H, AMBUDKAR S V. Advances in the structure,mechanism and targeting of chemoresistance-linked ABC transporters[J]. *Nat Rev Cancer*,2023, 23(11):762-779.
- [14] BHARATHIRAJA P,YADAV P,SAJID A,et al. Natural medicinal compounds target signal transduction pathways to overcome ABC drug efflux transporter-mediated multidrug resistance in cancer[J]. *Drug Resist Updat*,2023, 71:101004.
- [15] CAO Y, SHI Y, CAI Y, et al. The effects of traditional Chinese medicine on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and approaches for studying the herb-P-glycoprotein interactions[J]. *Drug Metab Dispos*,2020, 48 (10):972-979.
- [16] DANTZIC D, NOEL P, MERIEN F, et al. The effects of synthetically modified natural compounds on ABC transporters[J]. *Pharmaceutics*,2018,10(3):127.
- [17] BRUNOMFG,DAVID S P C,MARIA-JOSE U F. Overcoming multidrug resistance: flavonoid and terpenoid nitrogen-containing derivatives as ABC transporter modulators[J]. *Molecules*,2020,25(15):3364.
- [18] LI L,YANG Y,WU M,et al. β-asarone induces apoptosis and cell cycle arrest of human glioma U251 cells via suppression of HnRNP A2/B1-mediated pathway in vitro and in vivo[J]. *Molecules*,2018,23(5):1072.
- [19] FANG Y Q, SHI C, LIU L, et al. Analysis of transformation and excretion of β-asarone in rabbits with GC-MS[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37 (3):187-190.
- [20] ZHANG S,XUE Z F,HUANG L P,et al. Dynamic expressions of Beclin 1 and tyrosine hydroxylase in different areas of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*,2013,33(7):973-981.
- [21] LIU L,FANG Y Q,XUE Z F,et al. Beta-asarone attenuates ischemia-reperfusion-induced autophagy in rat brains via modulating JNK, p-JNK, Bcl-2 and Beclin-1[J]. *Eur J Pharmacol*,2012,680(1-3):34-40.
- [22] LI L,WU M,WANG C,et al. β-asarone inhibits invasion and EMT in human glioma U251 cells by suppressing splicing factor HnRNP A2/B1 [J]. *Molecules*,2018,23 (3):671.
- [23] HUANG L,DENG M,ZHANG S,et al. Coadministration of β-asarone and levodopa increases dopamine in rat brain by accelerating transformation of levodopa:a different mechanism from Madopar[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2014,41(9):685-690.
- [24] 潘强. 替莫唑胺耐药的恶性胶质瘤细胞系耐药特性演变的研究[D]. 天津:天津医科大学,2010.
- [25] WANG N,HAN Y,LUO L,et al. β-asarone induces cell apoptosis, inhibits cell proliferation and decreases migration and invasion of glioma cell[J]. *Biomed Pharmacother*,2018,106:655-664.
- [26] WELLER M, WEN P Y, CHANG S M, et al. Glioma[J]. *Nature Reviews Disease Primers*,2024,10(1):33.
- [27] SCHAFF L R, MELLINGHOFF I K. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review[J]. *Jama*,2023,329(7):574-587.
- [28] SYRO L V, ROTONDO F, CAMARGO M, et al. Temozolomide and pituitary tumors:current understanding,unresolved issues,and future directions[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*,2018,9:318.
- [29] KARVE A S,DESAI J M,GADGIL S N,et al. A review of approaches to potentiate the activity of temozolomide against glioblastoma to overcome resistance[J]. *Int J Mol Sci*,2024,25(6):3217.

- 颗粒药味的物质基础研究[J]. 中国现代中药, 2020, 22(5): 672-689.
- [59] 王毅, 李翔, 张俊华, 等. 基于网络药理学的宣肺败毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2249-2256.
- [60] 王汉, 宋红新, 王敦方, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨宣肺败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用机制[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(18): 1361-1372.
- [61] 张建斌, 赵裕沛, 乔汪大治, 等. 新型冠状病毒肺炎恢复期患者的中医康复策略[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(1): 45-48, 52.
- [62] 王富乐, 于晨阳, 许旻, 等. 从“肺热论”辨治新型冠状病毒感染恢复期[J]. 中国民间疗法, 2024, 32(10): 6-8.
- [63] 刘耀远, 黄明, 熊可, 等. 张伯礼教授治疗新型冠状病毒肺炎恢复期临证经验[J]. 世界中医药, 2023, 18(22): 3250-3253.
- [64] 吴维真, 张峻宁, 王佳怡, 等. 基于“清阳出上窍”理论辨证论治新型冠状病毒肺炎后遗嗅觉障碍[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(11): 2302-2307.
- [65] 王吉磊, 司廷林, 刘世宾, 等. 从少阳病论治新型冠状病毒肺炎并味觉减退验案 1 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(6): 70-72.
- [66] 段翔宇, 钟新林. 钟新林治疗新型冠状病毒奥密克戎变异株感染后遗症之失眠验案举隅 [J]. 中医临床研究, 2023, 15(33): 39-42.
- [67] 张德鑫, 张伟, 阎小燕. 基于网络药理学探讨补阳还五汤治疗新型冠状病毒肺炎继发肺纤维化的潜在机制[J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(15): 83-86.
- (收稿日期: 2024-08-28)

(上接第 85 页)

- [30] CHEN Y, WU J, ZHAI L, et al. Metabolic regulation of homologous recombination repair by MRE11 lactylation [J]. Cell, 2024, 187(2): 294-311. e21.
- [31] LI Z Q, ZHANG G S, LIU R Q, et al. Anti-glioma effects of ligustilide or n-butylphthalide on their own and the synergistic effects with temozolomide via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Onco Targets Ther, 2023, 16: 983-994.
- [32] WANG N, ZHANG Q, NING B, et al. β -Asarone promotes temozolomide's entry into glioma cells and decreases the expression of P-glycoprotein and MDR1 [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 368-374.
- [33] LIU Y, ZHAO S, CHEN Y, et al. Vimentin promotes glioma progression and maintains glioma cell resistance to oxidative phosphorylation inhibition[J]. Cell Oncol (Dordr), 2023, 46(6): 1791-1806.
- [34] NORONHA C, RIBEIRO A S, TAIPA R, et al. Cadherin expression and EMT: a focus on gliomas[J]. Biomedicines, 2021, 9(10): 1328.
- [35] ZHANG Y, XIANG Z, CHEN L, et al. PSMA2 promotes glioma proliferation and migration via EMT[J]. Pathol Res Pract, 2024, 256: 155278.
- (收稿日期: 2024-10-12)

(上接第 90 页)

- [16] 杨涛, 黄海, 彭志浩, 等. 案例式立体教学法在急腹症临床见习教学改革中的应用[J]. 中国继续医学教育, 2022, 14(3): 1-4.
- [17] 王靖, 滕红林, 戴王颖. CTTM 教学法在脊柱外科实习教学中的应用研究[J]. 中国高等医学教育, 2020(2): 104-105.
- [18] TAKEUCHI H, OMOTO K, OKURA K, et al. Effects of team-based learning on fixed prosthodontic education in a Japanese school of dentistry[J]. J Dent Educ, 2015, 79(4): 417-423.
- [19] 李明琰, 刘燕, 何文凯. CBL 教学法在心内科住院医师规范化培训中的应用[J]. 卫生职业教育, 2019, 37(9): 144-145.
- [20] 刘健, 杨爽, 董森, 等. 以岗位胜任力为导向的教学模式及教学评价在中西医结合临床专业研究生培养中的应用[J]. 云南中医药大学学报, 2024, 47(2): 109-112.
- [21] 陈贵儒, 孙慧敏, 黄蓉蓉. 我国中西部 6 所三级甲等医院护士患者安全文化认知现状及影响因素分析[J]. 护理安全, 2019, 19(8): 1189-1194.
- [22] 鲁超, 姬芳勤, 汪卓赞, 等. 安徽省某三级综合医院医务人员对患者安全文化认知现状研究[J]. 中国卫生事业管理, 2016, 34(10): 739-741.
- (收稿日期: 2024-11-16)