

本文引用格式:武海博,梁燕,沈雷,等.选择性MAO-B抑制剂TM-5对胶质瘤U87细胞自噬和凋亡的影响[J].

安徽医学,2023,44(10):1163-1167.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.004

· 基础医学 ·

选择性MAO-B抑制剂TM-5对胶质瘤U87细胞自噬和凋亡的影响

武海博 梁燕 沈雷 范展 傅国惠

[摘要] **目的** 探讨选择性单胺氧化酶B(MAO-B)抑制剂TM-5对胶质瘤U87细胞体外自噬及凋亡的影响。**方法** 正常培养胶质瘤细胞株U87,随机分为6组:对照组不做处理,5、10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5组分别予以5、10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5处理细胞,每组设3个复孔。采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测促凋亡蛋白Bcl-2相关蛋白X(Bax)、抑凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的基因表达;蛋白质免疫印迹(WB)检测细胞凋亡相关蛋白Bax和切割后半胱氨酸蛋白酶3(cleaved caspase-3)以及自噬相关标志蛋白Beclin-1、自噬相关蛋白1轻链-II(LC3-II)和P62表达。**结果** 与对照组比较,10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5组U87细胞存活率降低($P < 0.05$),选取5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5组(细胞存活率 $> 50\%$)进行后续实验。与对照组比较,10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5组相对细胞凋亡率、细胞中LC3-II和Bax蛋白相对表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5组U87细胞中促凋亡基因Bax mRNA相对表达水平、Beclin-1和cleaved caspase-3蛋白相对表达量升高,抑凋亡基因Bcl-2 mRNA、P62蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TM-5可抑制胶质瘤U87细胞存活,可上调Beclin-1、LC3-II、Bax和cleaved caspase-3,下调Bcl-2和P62表达,诱导细胞自噬和凋亡。

[关键词] TM-5;选择性MAO-B抑制剂;胶质瘤;细胞增殖;细胞凋亡;自噬

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.004

Effects of selective MAO-B inhibitor TM-5 on autophagy and apoptosis of glioma U87 cells

WU Haibo, LIANG Yan, SHEN Lei, FAN Zhan, FU Guohui

Department of Neurology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

Funding project: Henan Medical Science and Technology Research Program Joint Construction Project (No. LHGJ20191452); Science and Technology Research Project of Henan Provincial Department of Science and Technology (No. 202102310408)

Corresponding author: FU Guohui, fgh377818@sina.com

[Abstract] **Objective** To explore the effects of selective monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitor TM-5 on autophagy and apoptosis of glioma U87 cells. **Methods** The normally cultured glioma cells U87 were randomly divided into control group (no treatment), 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 groups (5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ of TM-5), with 3 experimental pores in each group. The cells activity was detected by MTT. Apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of pro-apoptosis protein Bax and anti-apoptosis protein Bcl-2 genes were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of apoptosis-related proteins (Bax, cleaved caspase-3) and autophagy related markers (Beclin-1, LC3-II, P62) were detected by Western blot (WB). **Results** Compared with the control group, the survival rate of U87 cells decreased in 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 groups ($P < 0.05$). The follow-up experiments were performed under certain concentration (5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$, cells survival rate $> 50\%$). Compared with the control group, relative apoptosis rate of U87 cells and relative expression levels of LC3-II and Bax proteins increased in 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 groups ($P < 0.05$). Compared with control group, relative expression levels of pro-apoptosis gene Bax mRNA, Beclin-1 and cleaved caspase-3 proteins increased, while relative expression levels of anti-apoptosis gene Bcl-2 mRNA and P62 protein decreased in 5, 10 and 25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** TM-5 can inhibit the survival of glioma U87 cells, up-regulate Beclin-1, LC3-II, Bax and cleaved caspase-3, down-regulate Bcl-2 and P62, and induce autophagy and apoptosis.

[Key words] TM-5; Selective MAO-B inhibitor; Glioma; Cell proliferation; Apoptosis; Autophagy

基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号:LHGJ20191452);河南省科技厅科技攻关项目(编号:202102310408)

作者单位:473000 河南南阳 南阳市中心医院神经内科

通信作者:傅国惠, fgh377818@sina.com

胶质瘤是一种病因不详、损伤性极大的中枢神经系统肿瘤,严重威胁人类健康^[1]。手术治疗是目前临床医治恶性胶质瘤的主要方式,但脑胶质瘤细胞严重浸润周围正常脑组织,手术切除因需要确保神经功能和必要的生理功能而无法彻底清除肿瘤;患者术后改善效果不佳,存活率较低且极易复发^[2-3]。由于胶质瘤细胞具有失控性增殖、侵袭性生长、细胞凋亡速度减慢等恶性细胞行为,也给胶质瘤的治疗带来巨大困难^[4-5]。因此,寻找新的治疗药物防治胶质瘤,具有重要的临床实用价值。单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)存在于大多数哺乳动物,包括单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A, MAO-A) 和单胺氧化酶 B (monoamine oxidase B, MAO-B) 两种同工酶,能够催化多种胺类(5-羟色胺、组胺、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素)氧化脱氨,导致神经递质失活^[6]。研究显示,MAO-B 抑制剂对神经退行性疾病(如帕金森和阿尔茨海默症)具有潜在的治疗潜力^[7]。在人胶质瘤中也检测到 MAO-B 活性显著性增加,与正常星形胶质细胞相比,肿瘤来源的星形胶质细胞中 MAO-B 的含量明显增高,其过表达可能与恶性胶质瘤有关^[8-9]。因此,抑制 MAO-B 将成为治疗胶质瘤的新靶点。笔者前期研究发现,新型查尔酮衍生物 TM-5 可选择性抑制 MAO-B 活性,其 IC₅₀ 为 (0.022±0.01) μM (SI = 2618)^[10]。但 TM-5 是否可在胶质瘤中发挥抗肿瘤活性尚不清楚,本研究以人胶质瘤细胞株 U87 为研究对象,观察 TM-5 对 U87 细胞存活的影响及可能作用机制,为恶性胶质瘤的新型药物开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人类胶质瘤细胞株 U87,源于恶性神经胶质瘤,上皮样细胞,购自中科院上海生化所。

1.2 实验材料 DMEM/F12 培养基(货号:11320033,规格:500 mL,美国 Gibco 公司);胎牛血清(货号:BC-SE-FBS01-500 mL,规格:500 mL,南京生航生物技术公司);二甲基亚砜(货号:D5879,规格:100 mL,美国 Sigma 公司);噻唑蓝[3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT]试剂、SYBR 荧光定量试剂盒(货号:C0009S、D7260-5 mL,规格:500 次、5 mL,上海碧云天生物技术公司);异硫氰酸荧光素标记膜联蛋白 V/碘化丙啶(annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡试剂盒(货号:70-AP101-100,规格:100T,杭州联科生物技术有限公司);反转录试剂盒(货号:K1622,规格:100 rxns,美国 Thermo Scientific 公司);兔源 Bcl-2 相关蛋白 X (Bcl-2 associated protein X, Bax, 货号:ab53154,免疫亲和纯化,浓度:1 mg/mL,规格:100 μg)、Beclin-1(货号:ab53154,蛋白 A 纯化,浓度:0.634 mg/

mL,规格:40 μg)、P62(货号:ab264313,免疫亲和纯化,浓度:1 mg/mL,规格:100 μg)、切割后半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3, 货号:ab2302,免疫亲和纯化,浓度:0.5 mg/mL,规格:50 μg)、β-tubulin(货号:ab179513,蛋白 A 纯化,浓度:2.151 mg/mL,规格:40 μg)、鼠源自噬相关蛋白 1 轻链-Ⅱ (microtubule-associated protein 1 light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ, 货号:ab53154,蛋白 A 纯化,浓度:0.43 mg/mL,规格:100 μg) 蛋白一抗(美国 Abcam 公司);山羊源抗兔/鼠蛋白二抗(货号:CYZ-C04041、CYZ-C04042,规格:1 mg,武汉艾美捷科技公司)。流式细胞仪(型号:NovoCyte 2060R,杭州艾森生物有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(型号:Iq5,美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 TM-5 的合成及配制 将 3 mmol 5,6-二甲氧基茚酮和 9 mmol 50% 氢氧化钾加入 10 mL 乙醇中,室温搅拌 30 min,再加入 3.3 mmol 对二甲胺基苯甲醛,继续室温搅拌 72 h,经薄层色谱法检测反应,将反应液倒入碎冰中,搅拌下调 pH = 6,4℃下静置过夜,次日,抽滤,滤饼用乙醇重结晶,4℃下静置过夜,抽滤后将滤饼烘干,即得黄色目标化合物 TM-5,其合成路线见图 1。TM-5 分子式为 (Z)-2-[4-(二甲胺基)苯亚甲基]-5,6-二甲氧基-2,3-二氢-1H-茚-1-酮[(Z)-2-(4-(Dimethylamino)benzylidene)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (TM-5)],浅黄色固体,熔点为 117.8~119.1℃,收率为 83.1%,纯度为 98.6%。以二甲基亚砜为溶剂,再用 pH 7.4 缓冲液梯度稀释,滤膜过滤除菌后备用。

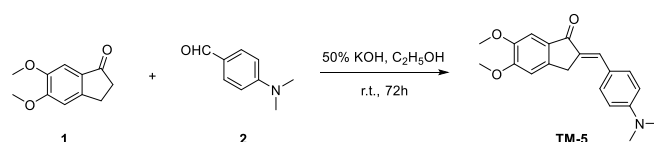


图 1 化合物 TM-5 的合成图示

1.3.2 细胞培养 预先配制含 10% 胎牛血清、100 mg/L 链霉素和 1×10⁵ U/L 青霉素的 DMEM/F12 培养基(以下简称培养基),用适量培养基悬浮 U87 细胞,设置培养条件为 5% CO₂、37℃,细胞贴壁生长繁殖至 80%~90% 汇合度时传代培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3.3 MTT 实验检测细胞活力 将 U87 细胞以 1×10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板,100 μL/孔,每组 3 个复孔,随机分为 7 组:对照组不做处理,溶剂组待细胞贴壁后加入二甲基亚砜,5、10、25、50、100 μmol/L TM-5 组待细胞贴壁后分别加入 5、10、25、50、100 μmol/L TM-5 处理细胞,培养 24 h,再加入 0.5 mg/mL MTT 试剂每孔 50 μL,继续孵育 4 h,终止培养后加入二甲基亚砜,每

孔 100 μL , 避光下放置摇床 15 min, 使结晶物充分溶解, 用酶联免疫检测仪测量各孔的吸光度值(OD 492 nm), 细胞存活率=测试组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\%$, 筛选细胞存活率 $>50\%$ 的浓度进行后续实验。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将 U87 细胞以 1.0×10^5 个/毫升接种于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 每组 3 个复孔, 按各组处理后培养 24 h 收集细胞, 调整细胞密度为 1.0×10^6 个/毫升, 缓冲液洗涤两次, 加入预冷 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞, 分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液, 避光下孵育 10 min, 再混入 1 $\times$ 结合缓冲液, 上流式细胞仪检测, 右上象限(晚期凋亡细胞)与右下象限(早期凋亡细胞)细胞率之和为细胞凋亡率, 再计算相对细胞凋亡率=测试组细胞凋亡率/对照组细胞凋亡率 $\times 100\%$ 。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测细胞中 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 水平 将 U87 细胞以 1.0×10^5 个/毫升接种于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 每组 3 个复孔, 按各组处理后培养 24 h 收集细胞, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 模板。构建 qRT-PCR 反应体系: EvaGreen 2X qPCR MasterMix 5 μL 、Forward Primer (10 μM) 0.3 μL 、Reverse Primer (10 μM) 0.3 μL 、Nuclease-free H_2O 3.4 μL 、模板 cDNA 1 μL , 其中引物系列见表 1。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平, 相对表达水平=测试组 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平/对照组 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达水平 $\times 100\%$ 。

1.3.6 蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)检测细胞中相关蛋白表达 将 U87 细胞以 1.0×10^5 个/毫升接种

于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 每组 3 个复孔, 按各组处理后培养 24 h 收集细胞, 提取细胞总蛋白, 各组取 40 μg 变性蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 再电转至 PVDF 膜, 室温封闭 1 h, 添加蛋白一抗(稀释比 1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加山羊源抗兔/鼠蛋白二抗室温孵育 1 h, ECL 显色发光检测后显影, 应用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值, 计算 Bax、LC3、Beclin 1、P62 和 cleaved-caspase-3 蛋白条带灰度值与 β -tubulin 比值, 表示目的蛋白表达量, 蛋白相对表达量=测试组目的蛋白表达量/对照组目的蛋白表达量 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism5 软件进行统计学分析; 符合正态分布数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TM-5 对 U87 细胞活力的影响 MTT 实验结果显示, 与对照组比较, 用 10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 处理后 U87 细胞存活率降低($P<0.05$)。见表 2。选取细胞存活率 $>50\%$ 的浓度进行后续实验, 即 5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组。

表 2 各组 U87 细胞存活率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	细胞存活率(%)
对照组	3	100.00
溶剂组	3	99.32 $\pm$ 2.91
5 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组	3	93.31 $\pm$ 4.85
10 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组	3	87.45 $\pm$ 8.08 ^{①②}
25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组	3	73.82 $\pm$ 9.49 ^{①②③④}
50 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组	3	18.79 $\pm$ 7.53 ^{①②③④⑤}
100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组	3	6.16 $\pm$ 1.48 ^{①②③④⑤⑥}
F 值		132.256
P 值		<0.001

注: 与对照组比较, ^① $P<0.05$; 与溶剂组比较, ^② $P<0.05$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组比较, ^③ $P<0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组比较, ^④ $P<0.05$; 与 25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组比较, ^⑤ $P<0.05$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组比较, ^⑥ $P<0.05$ 。

2.2 TM-5 对 U87 细胞凋亡的影响 与对照组比较, 10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组 U87 细胞相对细胞凋亡率升高($P<0.05$)。见表 3、图 2。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列
Bax	上游: 5'-TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG-3' 下游: 5'-GTCCAGCCCATGATGTTCT-3'
Bcl-2	上游: 5'-ATGTGTGTGGAGAGCTCAAC-3' 下游: 5'-AGCAGC-CAGGAGAAATCA-3'
GAPDH	上游: 5'-AACGGATTGCTCGTATTGG-3' 下游: 5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'

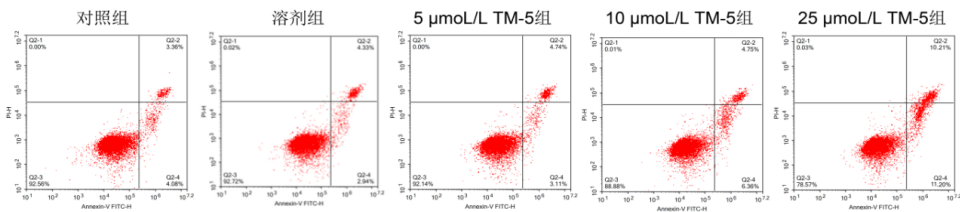


图 2 TM-5 对 U87 细胞凋亡的影响(流式细胞术实验)

表3 各组U87细胞相对细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	相对细胞凋亡率(%)
对照组	3	100.00
溶剂组	3	102.06±5.73
5 μmol/L TM-5组	3	108.23±2.73
10 μmol/L TM-5组	3	148.70±4.91 ^{①②③}
25 μmol/L TM-5组	3	276.90±11.71 ^{①②③④}
F值		420.416
P值		<0.001

注:与对照组比较,^① $P < 0.05$;与溶剂组比较,^② $P < 0.05$;与5 μmol/L TM-5组比较,^③ $P < 0.05$;与10 μmol/L TM-5组比较,^④ $P < 0.05$ 。

2.3 TM-5对U87细胞中Bax mRNA、Bcl-2 mRNA相对表达水平的影响 与对照组比较,5、10、25 μmol/L TM-5组U87细胞中促凋亡基因Bax mRNA相对表达水平升高,抑凋亡基因Bcl-2 mRNA相对表达水平降低($P < 0.05$)。见表4。

2.4 TM-5对U87细胞中自噬及凋亡相关蛋白相对表达量的影响 与对照组相比,5、10、25 μmol/L TM-5组U87细胞中Beclin-1和cleaved caspase-3蛋白相对

表4 各组U87细胞中Bax mRNA、Bcl-2 mRNA相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
对照组	3	100.00	100.00
溶剂组	3	99.17±4.18	101.54±4.66
5 μmol/L TM-5组	3	154.62±4.83 ^{①②}	86.89±8.39 ^{①②}
10 μmol/L TM-5组	3	178.64±15.20 ^{①②③}	57.63±7.73 ^{①②③}
25 μmol/L TM-5组	3	227.19±10.38 ^{①②③④}	25.42±6.38 ^{①②③④}
F值		117.191	82.334
P值		<0.001	<0.001

注:Bax为B细胞淋巴瘤/白血病-2基因相关X蛋白;Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2基因;与对照组比较,^① $P < 0.05$;与溶剂组比较,^② $P < 0.05$;与5 μmol/L TM-5组比较,^③ $P < 0.05$;与10 μmol/L TM-5组比较,^④ $P < 0.05$ 。

表达量升高,P62蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);10、25 μmol/L TM-5组LC3-II和Bax蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。见表5、图3。

表5 各组U87细胞中自噬及凋亡相关蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	Beclin-1	LC3-II	P62	Bax	cleaved caspase-3
对照组	3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
溶剂组	3	98.13±4.09	97.97±4.95	103.88±5.95	102.13±6.25	100.84±4.30
5 μmol/L TM-5组	3	182.58±8.01 ^{①②}	135.62±6.68 ^{①②}	76.68±4.99 ^{①②}	155.31±6.94 ^{①②}	134.01±23.95 ^{①②}
10 μmol/L TM-5组	3	214.29±12.15 ^{①②③}	184.21±7.94 ^{①②③}	50.82±4.48 ^{①②③}	187.83±5.62 ^{①②③}	163.95±11.43 ^{①②③}
25 μmol/L TM-5组	3	276.95±11.25 ^{①②③④}	209.78±5.52 ^{①②③④}	28.28±4.73 ^{①②③④}	224.09±9.85 ^{①②③④}	208.81±13.78 ^{①②③④}
F值		248.627	231.810	152.714	202.686	34.794
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Beclin-1为BH3域自噬蛋白;LC3-II为微管相关蛋白轻链3 II;P62为自噬选择性底物;Bax为B细胞淋巴瘤/白血病-2基因相关X蛋白;cleaved caspase-3为切割后天冬氨酸蛋白水解酶3;与对照组比较,^① $P < 0.05$;与溶剂组比较,^② $P < 0.05$;与5 μmol/L TM-5组比较,^③ $P < 0.05$;与10 μmol/L TM-5组比较,^④ $P < 0.05$ 。

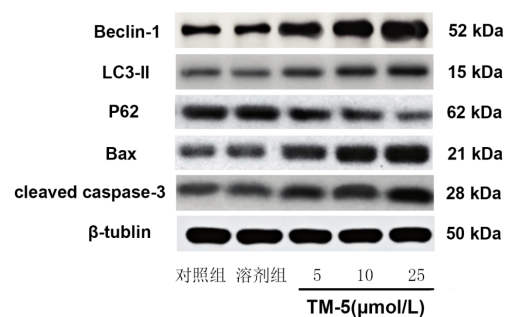


图3 TM-5对U87细胞中自噬及凋亡相关蛋白表达的影响(Western blot检测)

3 讨论

胶质瘤细胞生长速度快、破坏性强,急需开发新型

药物帮助改善患者预后^[11]。MAO抑制剂是临床常用的抗抑郁药物,通过抑制MAO的降解,提高突触有效介质浓度,发挥抗抑郁作用^[12]。邵根宝等^[13]研究发现,MAO抑制剂可诱导胶质瘤U251细胞分化,这将有助于提高胶质瘤的治疗效果;Marconi等^[14]发现,新型MAO-B抑制剂—Cmp5和Cmp3,可促进氧化应激,诱导细胞周期阻滞,并降低胶质瘤细胞迁移能力,从而在高级别胶质瘤发挥抗肿瘤作用。同时,Irwin等^[15]通过近红外荧光光学成像技术,发现静脉注射5 mg/kg MAO抑制剂是靶向脑肿瘤的最佳剂量,可安全用于胶质瘤的治疗。上述研究表明,MAO抑制剂在胶质瘤的治疗中具有一定潜力。

笔者前期研究发现,合成新型MAO-B抑制剂TM-5,在阿尔茨海默病中有良好的神经保护作用,但是否也可抑制胶质瘤尚不清楚^[10]。本研究检测了人胶

质瘤细胞株 U87 在 TM-5 处理后细胞增殖和凋亡的变化,结果显示,与对照组比较,10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组细胞存活率降低,10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组相对细胞凋亡率升高,提示 MAO-B 抑制剂 TM-5 对 U87 细胞具有抑制作用。Inaba-Hasegawa 等^[16]研究结果显示,MAO-B 可抑制胶质瘤细胞中神经保护基因表达,敲低其表达可调控 Bcl-2、脑源性神经营养因子和胶质细胞系源性神经营养因子水平。由此提出猜测,TM-5 可能通过调控 Bcl-2 表达,在胶质瘤中发挥作用。本研究中,与对照组比较,5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ TM-5 组 U87 细胞中促凋亡基因 Bax mRNA 相对表达水平升高,抑凋亡基因 Bcl-2 mRNA 相对表达水平降低,表明 TM-5 可能通过调控 Bax、Bcl-2 基因表达,诱导细胞凋亡。

自噬是细胞完成细胞器更新和物质代谢的重要过程,对细胞凋亡有双向调节作用,营养物质缺乏的情况下,适度的自噬可促进细胞存活,但过量自噬会导致细胞死亡^[17-18]。促凋亡信号因子刺激下细胞启动自噬,LC3-I 转化为 LC3-II 并转移至自噬体膜上,偶联 P62 蛋白参与自噬体的形成^[19-20]。抑凋亡蛋白 Bcl-2 也是重要的自噬调节因子,可结合自噬标识蛋白 Beclin 1 并抑制其诱导的细胞自噬^[21]。本研究中 Western blot 检测发现,TM-5 可上调 Beclin 1、LC3-II 表达,下调 P62,诱导细胞自噬;同时,TM-5 处理后 U87 细胞中 Bax 和凋亡执行蛋白 cleaved caspase-3 表达也升高,说明 TM-5 可能通过调控上述蛋白表达,诱导 U87 细胞自噬和凋亡,从而降低 U87 细胞存活率。

综上所述,TM-5 可抑制胶质瘤 U87 细胞存活,其作用机制可能是上调 Beclin-1、LC3-II、Bax 和 cleaved caspase-3,下调 Bcl-2 和 P62 表达,诱导细胞自噬和凋亡。本研究提出新型化合物 TM-5 有望成为治疗人胶质瘤的候选药物,但其是否存在其他作用途径还有待深入分析。

参考文献

- [1] WIRSCHING H G, GALANIS E, WELLER M. Glioblastoma [J]. *Handb Clin Neurol*, 2016(134):381-397.
- [2] 叶震,陈康,文学艳,等.长链非编码RNA在胶质瘤替莫唑胺耐药中的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(9): 990-994.
- [3] CHAVDA V, PATEL V, YADAV D, et al. Therapeutics and research related to glioblastoma: advancements and future targets [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(3):186-198.
- [4] DE BIASE G, GARCIA D P, BOHNEN A, et al. Perioperative management of patients with glioblastoma[J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2021, 32(1):1-8.
- [5] BAGLEY S J, KOTHARI S, RAHMAN R, et al. Glioblastoma clinical trials:current landscape and opportunities for improvement [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(4):594-602.
- [6] ALJANABI R, ALSOUS L, SABBAAH D A, et al. Monoamine oxidase (MAO) as a potential target for anticancer drug design and development [J]. *Molecules*, 2021, 26(19):6019.
- [7] ÖZDEMİR Z, ALAGÖZ M A, BAĞÇICIOĞLU Ö F, et al. Monoamine oxidase-B (MAO-B) inhibitors in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(29):6045-6065.
- [8] SHARPE M A, BASKIN D S. Monoamine oxidase B levels are highly expressed in human gliomas and are correlated with the expression of HIF-1 α and with transcription factors Sp1 and Sp3 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3):3379-3393.
- [9] SHARPE M A, HAN J, BASKIN A M, et al. Design and synthesis of a MAO-B-selectively activated prodrug based on MPTP: a mitochondria-targeting chemotherapeutic agent for treatment of human malignant gliomas [J]. *Chem Med Chem*, 2015, 10(4):621-628.
- [10] WANG K, YU L, SHI J, et al. Multifunctional indanone - chalcone hybrid compounds with anti- β -amyloid (A β) aggregation, monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition and neuroprotective properties against Alzheimer's disease [J]. *Med Chem Res*, 2019, 28:1912-1922.
- [11] 龙艳春,朱佳斌,赵晓瑾,等.褪黑素和尼莫司汀对胶质瘤细胞 EMT 及侵袭迁移能力影响协同作用[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(11):819-826.
- [12] DUARTE P, CUADRADO A, LEÓN R. Monoamine oxidase inhibitors:from classic to new clinical approaches[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2021, 264:229-259.
- [13] 邵根宝,薄丹丹,韩晓娟,等.单胺氧化酶抑制剂诱导胶质瘤细胞的体外分化[J]. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(3): 524-529.
- [14] MARCONI G D, GALLORINI M, CARRADORI S, et al. The up-regulation of oxidative stress as a potential mechanism of novel MAO-B inhibitors for glioblastoma treatment [J]. *Molecules*, 2019, 24(10):2005.
- [15] IRWIN R W, ESCOBEDO A R, SHIH J C. Near-infrared monoamine oxidase inhibitor biodistribution in a glioma mouse model[J]. *Pharm Res*, 2021, 38(3):461-471.
- [16] INABA-HASEGAWA K, SHAMOTO-NAGAI M, MARUYAMA W, et al. Type B and A monoamine oxidase and their inhibitors regulate the gene expression of Bcl-2 and neurotrophic factors in human glioblastoma U118MG cells: different signal pathways for neuroprotection by selegiline and rasagiline [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2017, 124 (9):1055-1066.
- [17] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in human diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(16):1564-1576.
- [18] LIU J, QIN X, MA W, et al. Corilagin induces apoptosis and autophagy in NRF2-addicted U251 glioma cell line[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5):320.
- [19] ZHAO M, ZHANG Y, JIANG Y, et al. YAP promotes autophagy and progression of gliomas via upregulating HMGB1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):99.
- [20] DENG D, LUO K, LIU H, et al. p62 acts as an oncogene and is targeted by miR-124-3p in glioma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:280.
- [21] SUMOREK-WIADRO J, ZAJĄC A, BĄDZIUL D, et al. Coumarins modulate the anti-glioma properties of temozolomide [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881:173207.

(2022-11-21 收稿)

(本文编校:崔月婷,张迪)