

尿石素 B 对胶质母细胞瘤 U251 细胞生物学行为的影响

刘翠兰¹, 赵 娣¹, 代娟娟², 王 丹¹, 李 晨¹, 刘 松³

摘要 目的 检测尿石素 B(UB)对胶质母细胞瘤细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及细胞周期的影响和机制。方法 用不同剂量的 UB 处理胶质母细胞瘤 U251 细胞,运用 CCK-8 方法、克隆形成、划痕愈合、Transwell 侵袭实验检测 UB 对 U251 细胞增殖、迁移、侵袭的影响;用流式细胞术检测 UB 对细胞周期和凋亡的调控作用;运用 Western blot 方法检测 UB 对下游信号通路蛋白 ERK、AKT、p38、JNK 磷酸化水平的影响。结果 与对照组相比,24 h 和 48 h 时,UB 可降低 U251 细胞的吸光度值($P < 0.01$),且呈浓度依赖性;UB 可减低细胞克隆形成百分比($P < 0.01$);UB 能降低划痕愈合百分比($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);UB 能降低侵袭细胞数量百分比($P < 0.01$);UB 能显著诱导细胞凋亡($P < 0.01$),并使细胞周期阻滞于 G₂/M 期($P < 0.01$);UB 能显著提高 ERK 的磷酸化水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并抑制 AKT 的磷酸化水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 UB 能抑制胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡和细胞周期,并调控 ERK 和 AKT 的磷酸化水平。

关键词 尿石素 B;U251 细胞;增殖;迁移;侵袭;细胞凋亡;细胞周期

中图分类号 R 739.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0187-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.005

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是中枢神经系统最普遍、最具破坏性的原发性恶性肿瘤,其特点是生长速度快、侵袭性强^[1]。手术联合化疗、放疗是治疗的主要手段,但 GBM 患者的生存率仍然较低^[2]。天然化合物因其成本低、生物利用度高、毒

性小、具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤活性而受到越来越多的关注。尿石素 B(urolithin B, UB)是鞣花丹宁和鞣花酸的肠道微生物代谢产物之一^[3]。近年来,人们对尿石素的生物功能进行了体外和体内的研究,包括抗炎活性、抗肿瘤增殖、抗氧化活性、对脂质代谢的有益作用和延长寿命^[4]。但是 UB 对 GBM 活性的影响尚无报道。本研究在体外实验中探究了 UB 对 GBM 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及细胞周期的影响,及其对下游信号通路蛋白的影响,该研究为探究 GBM 的治疗药物提供新的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 UB 购自美国 Sigma 公司;RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;兔抗 Phospho-p38、兔抗 p38、兔抗 Phospho-JNK、兔抗 JNK、兔抗 Phospho-AKT、兔抗 AKT、兔抗 ERK、兔抗 Phospho-ERK、鼠抗 β -actin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;驴抗鼠二抗和羊抗兔二抗均购于美国 Li-COR 公司;CCK-8 试剂盒购自美国 MCE 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒和 PI/RNase 染色液均购自美国 BD 公司。主要仪器:双红外激光成像系统(美国 Li-COR 公司);SpectraMax M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);IX53 光学显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养 人胶质母细胞瘤 U251 细胞系购自中国科学院细胞库。U251 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。UB 用 DMSO 溶解配置成 0.2 mol/L 的母液。

1.3 Western blot 细胞用 RIPA 裂解液裂解,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度定量。蛋白复合物用 12% SDS-PAGE 进行电泳,湿转法转至 PVDF 膜,用 pH 7.4 的 TBST 缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% Tween-20)溶解的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入一抗 Anti-p-p38 (1 : 1 000), Anti-p38 (1 : 1 000), Anti-p-JNK (1 : 1 000), Anti-JNK(1 : 1 000), Anti- β -actin

2021-09-04 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81601189);山东省自然科学基金(编号:ZR2014HQ080、ZR2017PH028);滨州医学院科研计划与科研启动基金(编号:BY2016KYQD23、BY2018KJ21、BY2019KJ02)

作者单位:滨州医学院附属医院¹ 代谢与神经精神疾病研究所、² 肿瘤研究实验室、³ 甲状腺乳腺外科,滨州 256603

作者简介:刘翠兰,女,助理研究员;

李 晨,男,讲师,责任作者,E-mail:lc_0625@163.com;

刘 松,男,主治医师,责任作者,E-mail:290442131@qq.com

com

(1 : 2 000), Anti-p-AKT(1 : 1 000), Anti-AKT(1 : 1 000), Anti-ERK(1 : 1 000) 及 Anti-p-ERK(1 : 1 000), 4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 4 次, 每次 10 min, 加入二抗室温摇床孵育 1 h。然后 TBST 洗膜 4 次, 经双红外激光成像系统成像并识别灰度进行分析。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 取对数期细胞, 0.25% 胰酶-EDTA 消化后细胞计数, 接种 96 孔细胞培养板, 每孔接种 3 000 个细胞。实验分为对照组和不同浓度的 UB 处理组(20、40、80、120、160、200 $\mu\text{mol/L}$), 培养 24 h 后, 分别加入溶媒和不同浓度的 UB, 继续分别培养 24、48 h, 根据 CCK-8 试剂盒说明书, 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 置于培养箱继续培养 1~4 h 后, 用 SpectraMax M5 酶标仪检测 450 nm 吸光度值。

1.5 克隆形成实验检测细胞增殖能力 取对数期细胞, 接种 12 孔板, 每孔接种 500 个细胞, 分为对照组和不同浓度的 UB 处理组(40、80、160 $\mu\text{mol/L}$), 培养 24 h 后, 分别加入溶媒和不同浓度的 UB 处理, 药物处理 48 h 后换液, 加入不含药物的含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 12 d。去除培养基, PBS 洗涤 2 遍, 甲醇固定 20 min, PBS 洗涤 3 遍, 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤后观察拍照。

1.6 划痕愈合实验检测细胞迁移能力 取对数期细胞接种 6 孔板, 每孔接种 1×10^6 个细胞, 24 h 后, 用 200 μl 移液器吸头做“井”字划痕, PBS 洗涤 3 次, 加入无血清培养基及不同浓度的 UB(0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 继续培养, 0、24 h 和 48 h 时显微镜下观察并拍照。用 ImageJ 软件计算划痕距离, 划痕愈合百分比 = (0 h 划痕宽度 - 培养后划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 侵袭实验检测细胞迁移能力 Matrigel 基质胶用 PBS 按照 1 : 8 的比例稀释, 取 80 μl 基质胶稀释液加入 Transwell 上室中, 37℃ 培养箱放置 2 h。取对数期细胞, 用无血清 DMEM 培养基将细胞浓度调整至 1×10^5 个/ml, 取 150 μl 细胞悬液加入 Transwell 上室, 同时加入不同浓度 UB(0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)。下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基。培养 24 h 后, 取出小室甲醇固定 20 min, PBS 洗涤后, 加入 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤后, 显微镜下观察拍照。取随机 3 个视野进行统计。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 细胞凋亡检测, 取对数期细胞接种于 6 孔板, 细胞用不同

浓度 UB(0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, 用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞, 冰预冷的 PBS 洗涤 3 遍, 500 μl 1 \times binding buffer 重悬细胞, 加入 5 μl FITC 染色 15 min, 在上机检测前 5 min 加入 PI 染色。细胞充分重悬后, 上机检测并分析细胞凋亡数据。

细胞周期检测, 取对数期细胞接种于 6 孔板, 细胞用不同浓度的 UB(0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, 消化并收集细胞, PBS 洗涤 3 遍, 加入冰预冷的 70% 的乙醇 4℃ 固定过夜, PBS 洗涤 3 遍, 然后用 PI/RNase 染色液避光染色 15 min。细胞充分重悬后, 上机检测并用 Modfit 软件分析数据。

1.9 统计学处理 实验数据采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行统计分析并制图。各组细胞相对吸光度值、克隆形成率、划痕愈合率、Transwell 侵袭相对细胞数量、凋亡细胞比值、不同周期细胞百分比及蛋白表达水平数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用 One-way ANOVA 进行单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UB 对 U251 细胞增殖能力及克隆形成的影响

与对照组相比, UB 对 U251 细胞的增殖活性有明显影响, 且呈浓度依赖性。进一步分析显示, 在 24 h 时, 20、40、80、120、160、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 UB 处理组 U251 细胞的吸光度相对值与对照组细胞相比均降低, 差异有统计学意义 ($F = 429.10; P < 0.01$)。在 48 h 时, 20、40、80、120、160、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 UB 处理组 U251 细胞的吸光度相对值与对照组细胞比较均降低, 差异有统计学意义 ($F = 431.20; P < 0.01$)。见图 1A。

与对照组相比, UB 对 U251 细胞的克隆形成活性有明显影响, 且呈浓度依赖性。进一步分析显示, 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 UB 处理组 U251 细胞的克隆形成率与对照组细胞相比均降低, 差异有统计学意义 ($F = 131.10, P < 0.01$) (图 1B、C)。

2.2 UB 对 U251 细胞迁移和侵袭能力的影响

与对照组相比, UB 对 U251 细胞的迁移能力有明显影响, 且呈浓度依赖性。进一步分析显示, 在 24 h 时, 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 UB 处理组 U251 细胞的划痕愈合率与对照组细胞相比降低, 差异有统计学意义 ($F = 22.51, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 48 h 时, 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 UB 处理组 U251 细胞的划痕愈合率与对照组细胞比较均降低, 差异有统计学意义 ($F = 39.36, P < 0.01$) (图 2A、B)。

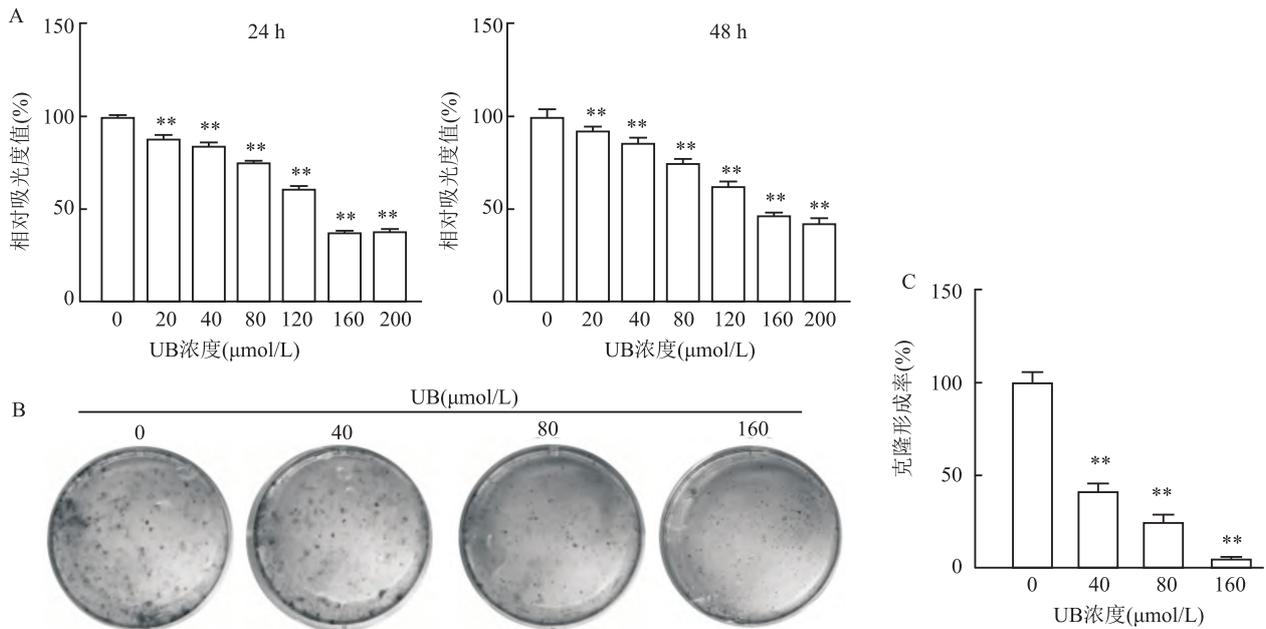


图1 CCK-8法和细胞克隆形成实验检测UB对U251细胞增殖能力的影响

A: CCK-8法检测不同时间点不同浓度UB对细胞相对吸光度值的影响; B: 细胞克隆形成实验检测不同浓度UB对细胞克隆形成的影响; C: 克隆形成率; 与0 μmol/L对照组比较: ** $P < 0.01$

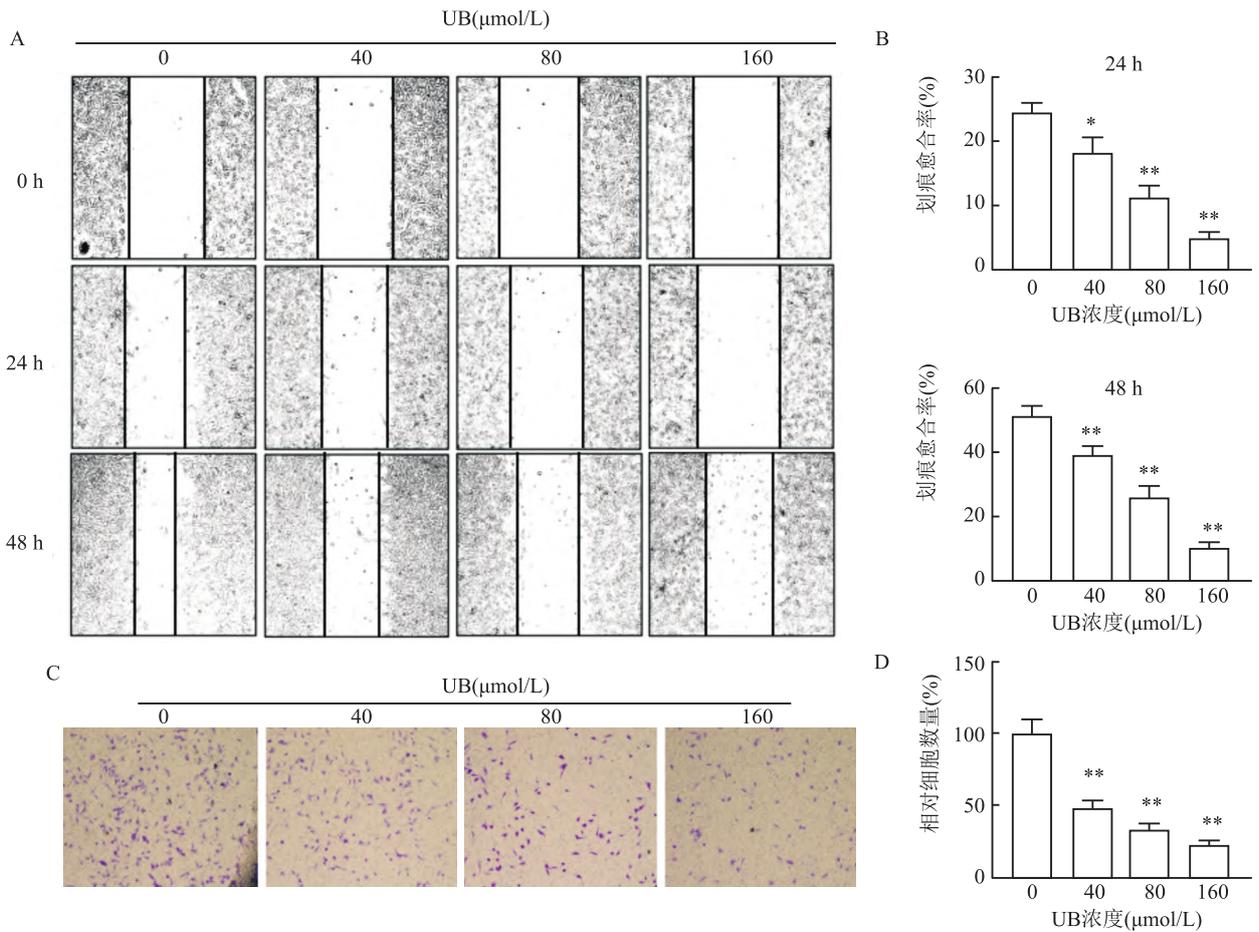


图2 划痕愈合实验和Transwell小室法检测UB对U251细胞迁移和侵袭能力的影响

A: 不同时间点不同浓度UB对细胞划痕愈合的影响 $\times 40$; B: 划痕愈合率; C: 不同浓度UB对细胞侵袭能力的影响 $\times 100$; D: 发生侵袭的相对细胞数量; 与0 μmol/L对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与对照组相比,UB对U251细胞的侵袭能力有明显影响,且呈浓度依赖性。进一步分析显示,40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组U251细胞发生侵袭的相对细胞数量与对照组相比降低,差异有统计学意义($F = 31.59, P < 0.01$) (图2C、D)。

2.3 UB对U251细胞凋亡和细胞周期的影响 与对照组相比,UB对U251细胞的凋亡有明显影响,且呈浓度依赖性。进一步分析显示,40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组U251细胞凋亡相对值与对照组细胞相比升高,差异有统计学意义($F = 51.05, P < 0.01$) (图3A、C)。与对照组相比,40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组U251细胞的周期有明显影响。进一步分析显示,与对照组细胞相比,高浓度UB处理组U251细胞处于 G_0/G_1 期细胞的比值降

低($F = 6.18, P < 0.01$), G_2/M 期细胞的比值升高($F = 11.39, P < 0.01$),差异有统计学意义(图3B、D),而对处于S期细胞的比值没有影响($F = 0.58, P > 0.05$),差异无统计学意义。

2.4 UB对U251细胞下游信号通路的调节作用

如图4所示,与对照组相比,80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组能增加ERK蛋白的磷酸化水平,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),40 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组ERK蛋白磷酸化水平的改变没有显著变化;80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组AKT蛋白的磷酸化水平与对照组相比降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),40 $\mu\text{mol/L}$ 的UB处理组与对照组相比,AKT蛋白的磷酸化水平没有显著变化;UB对p38和JNK磷酸化水平的影响没有统计学意义。

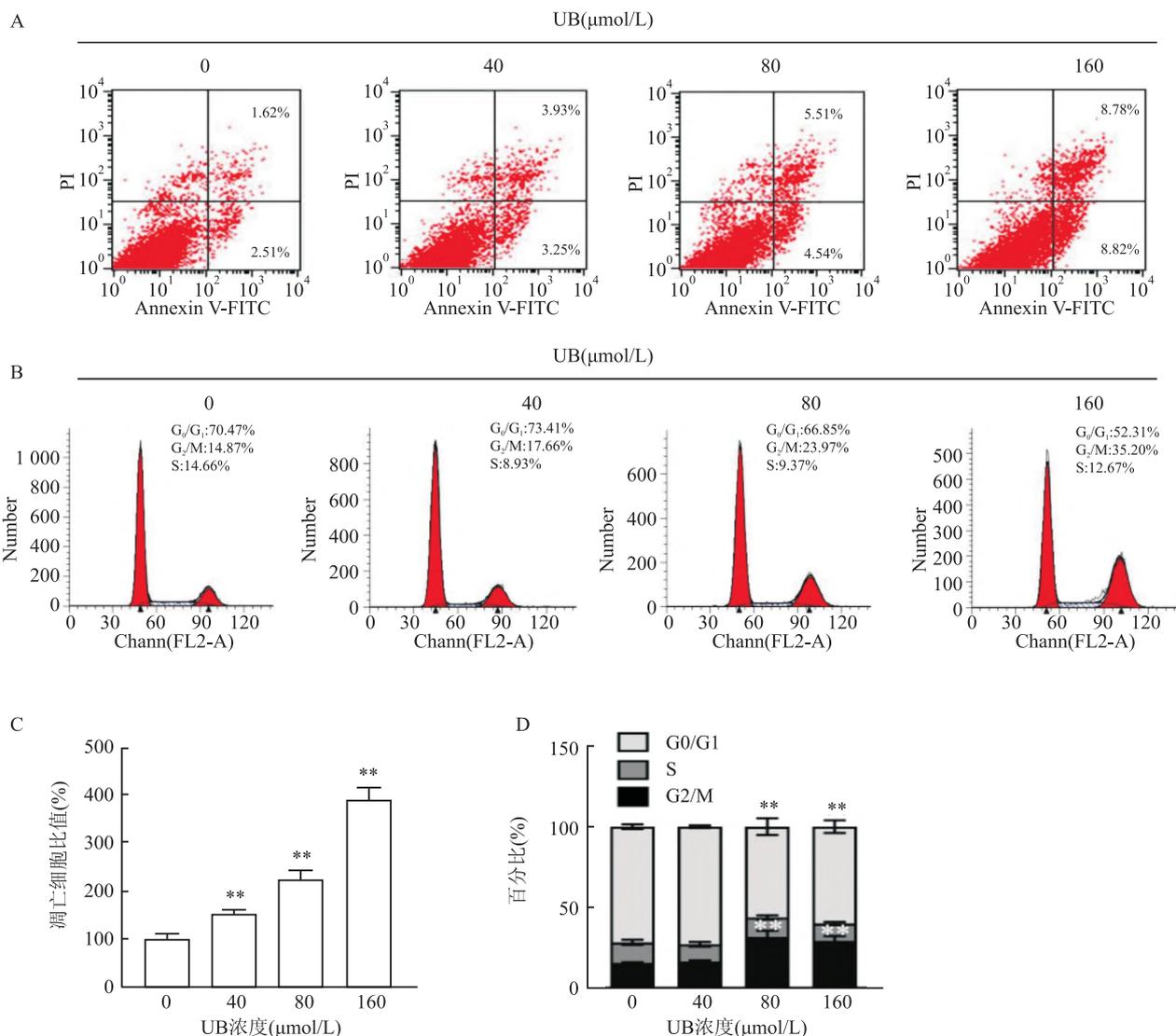


图3 不同浓度的UB对细胞凋亡及细胞周期的影响

A:不同浓度UB对细胞凋亡的影响;B:不同浓度UB对细胞周期的影响;C:凋亡细胞比值;D:细胞周期各时期细胞百分比;与0 $\mu\text{mol/L}$ 对对照组比较:** $P < 0.01$

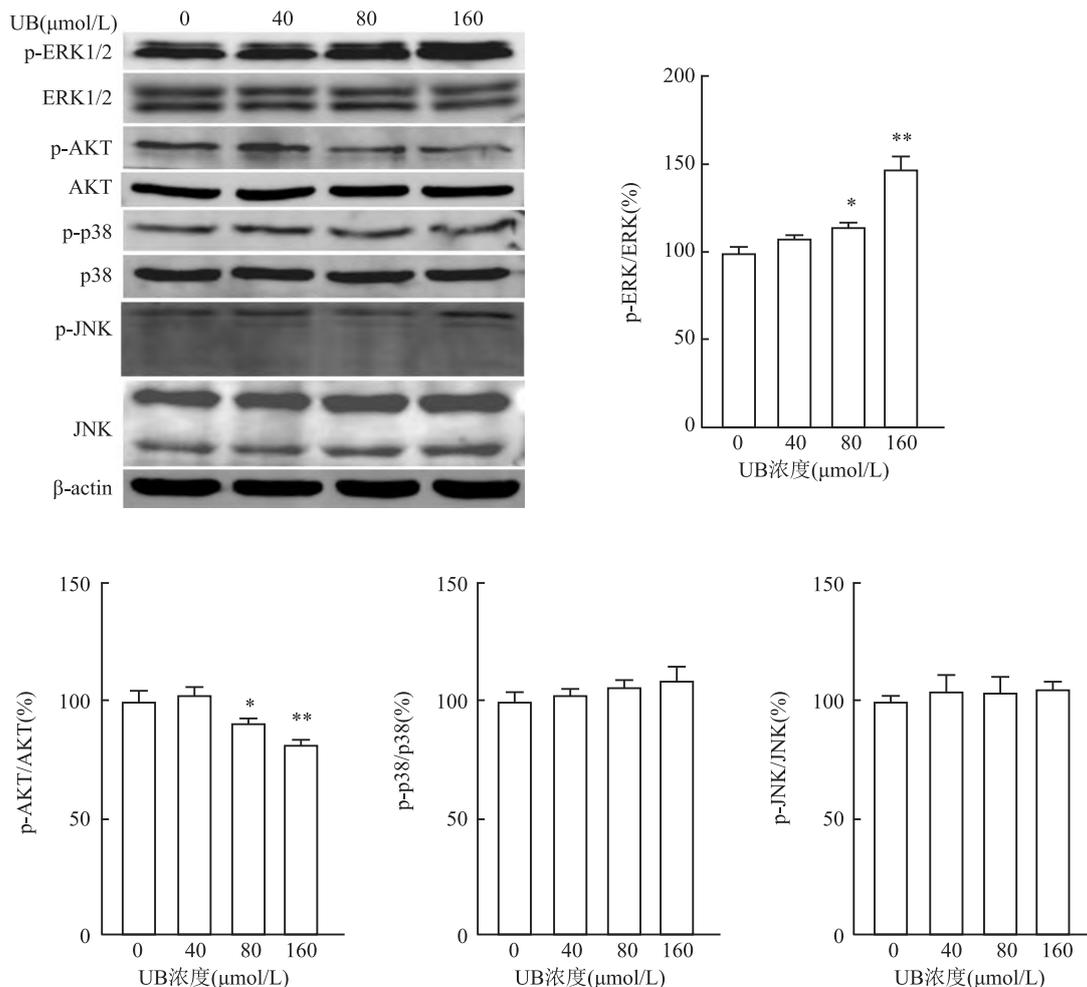


图4 UB对下游信号通路蛋白的影响

与0 μmol/L对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

鉴于 GBM 的病死率非常高,因此,研制延长 GBM 患者生存时间、提高其生活质量的治疗策略和药物,特别是能够穿透血脑屏障治疗 GBM 细胞的药物势在必行。天然化合物/草药在历史上被认为是一种重要的治疗药物的来源。在现代医学中,大约 40% 的新合成药物是天然产物或来自天然化合物。据估计,大多数抗微生物和抗癌药物来自天然产物,天然产物已成为治疗重大疾病的新颖药物或重要先导化合物的主要源泉^[5]。

文献报道天然产物中鞣花丹宁和鞣花酸的肠道微生物代谢产物包括尿石素 A (UA)、尿石素 B (UB)、尿石素 C (UC) 和尿石素 D (UD)^[6]。UB 可以抑制肝癌细胞^[7]、黑色素瘤细胞^[8]、前列腺癌^[9] 等肿瘤细胞的生长。本研究评价了 UB 对 GBM 细胞生长繁殖的抑制活性及其机制,并发现 UB 可以

诱导 GBM 细胞凋亡和影响细胞周期的变化,表明 UB 具有较好肿瘤抑制效果。ERK、AKT 蛋白在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[9],本研究显示 UB 可以促进 ERK 的磷酸化水平,并抑制 AKT 的磷酸化,与文献^[10]报道尿石素 C 可以促进葡萄糖诱导的 ERK 激活,UB 抑制 AKT、信号通路结果一致^[11]。虽然有文献^[12]报道 UB 具有抑制重组人单胺氧化酶 A 酶的活性,但是其发挥肿瘤抑制效果的下游作用分子或基因尚不清楚,还需要进一步深入研究。血脑屏障的通透性是化疗药物在 GBM 治疗中的重要限制因素,因为血脑屏障是给药 GBM 的物理和生理屏障。因此,传统的治疗方法是通过血脑屏障来治疗中枢神经系统。研究^[13]报道 UB 可以通过血脑屏障,外周给予 UB 具有神经保护的功能^[14]。UB 穿透血脑屏障的能力使其成为治疗 GBM 极具潜力的药物。

综上所述,本研究系统研究了 UB 对 GBM 细胞

增殖、迁移及侵袭的抑制活性,及其诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞的作用。同时研究了 UB 对下游信号通路 ERK 和 AKT 的调节作用。因此,本研究为探究 GBM 的致病机制和靶向治疗提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Barnholtz-Sloan J S, Ostrom Q T, Cote D. Epidemiology of brain tumors[J]. *Neurol Clin*, 2018, 36(3): 395–419.
- [3] Espín J C, Larrosa M, García-Conesa M T, et al. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 270418.
- [4] 尹培培, 闫林林, 曹若愚, 等. 鞣花酸代谢产物——尿石素的研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 36(7): 256–60.
- [5] Rodrigues T, Reker D, Schneider P, et al. Counting on natural products for drug design [J]. *Nat Chem*, 2016, 8(6): 531–41.
- [6] Kang I, Buckner T, Shay N F, et al. Improvements in metabolic health with consumption of ellagic acid and subsequent conversion into urolithins: evidence and mechanisms [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(5): 961–72. ?
- [7] Lv M Y, Shi C J, Pan F F, et al. Urolithin B suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma through inducing the inactivation of Wnt/beta-catenin signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17273–82.
- [8] Wang S T, Chang W C, Hsu C, et al. Antimelanogenic effect of urolithin A and urolithin B, the colonic metabolites of ellagic acid, in B16 melanoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(32): 6870–6.
- [9] 柯小平, 李经纬, 李莉, 等. PGE2/PGE2-R 介导的 RAS/ERK 及 PI3K/AKT 信号途径与子宫肌瘤发病机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5): 673–7.
- [10] Toubal S, Oiry C, Bayle M, et al. Urolithin C increases glucose-induced ERK activation which contributes to insulin secretion [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, 34(5): 571–80.
- [11] Xu J L, Yuan C H, Wang G H, et al. Urolithins attenuate LPS-induced neuroinflammation in BV2 microglia via MAPK, Akt, and NF-κB signaling pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(3): 571–80.
- [12] Singh R, Chandrashekarappa S, Vemula P K, et al. Microbial metabolite urolithin B inhibits recombinant human monoamine oxidase A enzyme [J]. *Metabolites*, 2020, 10(6): 258.
- [13] Gasperotti M, Passamonti S, Tramer F, et al. Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination? [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6(8): 1341–52.
- [14] Yuan T, Ma H, Liu W, et al. Pomegranate's neuroprotective effects against Alzheimer's disease are mediated by urolithins, its ellagitannin-gut microbial derived metabolites [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7(1): 26–33.

Effect of urolithin B on the biological behavior of glioblastoma U251 cell

Liu Cuilan¹, Zhao Di¹, Dai Juanjuan², Wang Dan¹, Li Chen¹, Liu Song³

(¹The Institute for Metabolic and Neuropsychiatric Disorders, ²Cancer Research Institute,

³Dept of Thyroid and Breast Surgery, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of Urolithin B (UB) on proliferation, migration, invasion, apoptosis and cell cycle of glioblastoma cells. **Methods** The effects of UB on the proliferation, migration and invasion of glioblastoma U251 cells were detected by CCK-8, clone formation assay, scratch healing assay, Transwell invasion assay respectively. The regulation effect of UB on cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the effects of UB on the phosphorylation levels of downstream signaling pathway proteins ERK, AKT, p38 and JNK. **Results** Compared with the control group, at 24 h and 48 h, the absorbance value of U251 cells was decreased by UB ($P < 0.01$) in a dose dependent manner. UB reduced the percentage of cell clone formation ($P < 0.01$). The percentage of the scratch healing area was reduced by UB ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The percentage of the number of invaded cells was reduced by UB ($P < 0.01$). UB could induce apoptosis ($P < 0.01$) and cause the cells to stagnate in G₂/M phase ($P < 0.01$). UB could significantly inhibit the phosphorylation of ERK ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and AKT ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** UB can inhibit proliferation, migration, invasion, apoptosis and cell cycle of glioblastoma cells, and regulate the phosphorylation levels of ERK and AKT.

Key words Urolithin B; U251 cell; proliferation; migration; invasion; apoptosis; cell cycle