

## • 药理与临床 •

## 基于 DNA 甲基化测序技术研究青蒿琥酯干预脑胶质瘤的分子机制

闫向英<sup>1</sup>, 毛霞<sup>1#</sup>, 李涛<sup>1</sup>, Koji Mizuno<sup>2</sup>, Katsuki Okuyama<sup>2</sup>, 林娜<sup>1</sup>, 张彦琼<sup>1\*</sup>, Takashi Sato<sup>2\*</sup>

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 东京药科大学 生物化学系, 东京 192-0392

**摘要:**目的 探究青蒿琥酯干预胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 的药效及其潜在分子机制。方法 采用 Cell Titer-Blue 检测青蒿琥酯对 U87 和 U251 2 种人源胶质母细胞瘤细胞活性和增殖的影响; 流式细胞术检测青蒿琥酯对 2 种细胞周期的调节作用; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测青蒿琥酯对 2 种细胞自噬水平的影响。采用 DNA 甲基化联合网络药理学从表观遗传学层面研究青蒿琥酯干预 GBM 的靶标基因, 并建立蛋白质-蛋白质相互作用网络, 通过计算网络中各节点的网络拓扑特征值, 筛选出青蒿琥酯干预 GBM 的核心靶点并进行生物功能富集分析; 采用 AutoDock v4.2.6 和 AutoDock Vina v1.2.0 软件开展分子对接虚拟计算, 考察青蒿琥酯与其候选关键靶点的结合能力, 并采用 Western blotting 验证青蒿琥酯对 2 种脑胶质瘤细胞中关键靶点表达的影响。**结果** 青蒿琥酯可显著抑制 U87 细胞的活性和增殖 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 而对 U251 细胞的药效不显著; 高剂量青蒿琥酯可影响 2 种细胞周期分布; 高剂量青蒿琥酯可显著提高 U87 细胞中 3 种自噬标志分子[自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 (ATG6 autophagy related 6 homolog, *Beclin1*)、泛素结合蛋白 (ubiquitin-binding protein, *p62*)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, *LC3*)] 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.001$ ), 而仅高剂量青蒿琥酯升高 U251 细胞中 *p62* 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ); 低、中、高剂量青蒿琥酯可显著提高 U87 细胞中 *Beclin1*、*p62*、*LC3B* 蛋白表达水平 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 仅中、高剂量青蒿琥酯可以影响 U251 细胞中 *Beclin1*、*p62*、*LC3B* 蛋白表达。利用给药前后的 U87 与 U251 细胞进行 DNA 甲基化测序与网络药理学整合分析, 在获得青蒿琥酯敏感型和耐药型脑胶质瘤细胞的差异基因集, 以及青蒿琥酯干预 2 种细胞效应基因集的基础上, 发现其干预 2 类脑胶质瘤细胞的关键网络靶标共同参与 GBM 恶性进展密切相关的小血小板衍生生长因子受体  $\alpha$  (platelet derived growth factor receptor  $\alpha$ , *PDGFRA*)-大鼠肉瘤基因 (rat sarcoma viral oncogene homolog, *RAS*)-B-Raf 原癌基因 (B-Raf proto-oncogene, *BRAF*)-丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, *MEK*)-细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, *ERK*) 通路, 且青蒿琥酯与其直接靶标 (*PDGFRA*、*BRAF*) 具有较强的亲和力。Western blotting 实验证实青蒿琥酯可以抑制 U87 和 U251 细胞中关键靶点 *PDGFRA* 和 *BRAF* 蛋白的表达 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。**结论** 青蒿琥酯可能通过靶向调控 *PDGFRA*-*RAS*-*BRAF*-*MEK*-*ERK* 信号通路, 从而抑制 GBM 细胞的生长和扩散, 为青蒿琥酯治疗 GBM 提供了体外实验依据, 也为解决临床抗肿瘤药物的耐药问题提供了新思路和新方法。

**关键词:** 青蒿琥酯; 胶质母细胞瘤; DNA 甲基化分析; 耐药; *PDGFRA*-*RAS*-*BRAF*-*MEK*-*ERK* 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)06-1814-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.013

**Molecular mechanism of artesunate on intervening glioblastoma based on DNA methylation sequencing technology**YAN Xiang-ying<sup>1</sup>, MAO Xia<sup>1</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, Koji Mizuno<sup>2</sup>, Katsuki Okuyama<sup>2</sup>, LIN Na<sup>1</sup>, ZHANG Yan-qiong<sup>1</sup>, Takashi Sato<sup>2</sup>

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Department of Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo 192-0392, Japan

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (8210143224); 中国中医科学院优秀青年科技人才 (创新类) (ZZ15-YQ-029)

作者简介: 闫向英, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: yxy1254253857@163.com

\*通信作者: 张彦琼, 研究员, 主要从事中医药生物信息学研究。E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn

Takashi Sato, 日本东京药科大学教授, 主要从事药理学研究。E-mail: satotak@toyaku.ac.jp

#共同第一作者: 毛霞, 助理研究员, 研究方向为抗炎免疫中药药理学。E-mail: xmao@icmm.ac.cn

**Abstract: Objective** To explore the efficacy and mechanism of artesunate in intervening glioblastoma. **Methods** Cell Titer-Blue was used to detect the effect of artesunate on viability and proliferation of U87 and U251 human glioblastoma cells; Flow cytometry was used to detect the regulation effect of artesunate on two cell cycles; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the effect of artesunate on autophagy level of two kinds of cells. Further, target genes of artesunate intervention in glioblastoma were studied from the epigenetic level by using the analysis strategy of DNA methylation combined with network pharmacology, and a protein-protein interaction network was established. By calculating the network topological eigenvalues of each node in network, core targets of artesunate intervention in glioblastoma were screened out and biological function enrichment analysis was carried out. Finally, AutoDock v4.2.6 and AutoDock Vina v1.2.0 software were used to carry out molecular docking virtual calculation, to investigate the binding ability of artesunate and its candidate key targets, and verify the influence of artesunate on the expressions of key targets in two types of glioma cells by Western blotting. **Results** Artesunate significantly inhibited the activity and proliferation of U87 cells ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), but had no significant effect on U251 cells. High-dose artesunate could affect the distribution of two cell cycles. High-dose artesunate significantly increased the mRNA expression levels of three autophagy markers [ATG6 autophagy related 6 homolog (*Beclin1*), ubiquitin-binding protein (*p62*), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (*LC3*)] in U87 cells ( $P < 0.001$ ), while only high-dose artesunate increased the mRNA expression level of *p62* in U251 cells ( $P < 0.05$ ). Low-, medium- and high-dose of artesunate could significantly improve the expression levels of Beclin1, p62 and LC3B proteins in U87 cells ( $P < 0.05, 0.01$ ), only medium- and high-dose of artesunate could affect Beclin1, p62 and LC3B protein expressions in U251 cells. Furthermore, DNA methylation sequencing and network pharmacologic integration analysis were performed on U87 and U251 cells before and after drug administration, on the basis of obtaining the differential gene sets of artesunate-sensitive and drug-resistant glioma cells, and effector gene sets of two types of cells after artesunate intervention, it was found that key network targets of two types of glioma cells were involved in platelet derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFRA)-rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS)-B-Raf proto-oncogene (BRAF)-mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway, which were closely related to the malignant progression of glioblastoma, and artesunate had strong affinity with its direct targets (PDGFRA and BRAF). Western blotting analysis confirmed that artesunate could inhibit the expressions of PDGFRA and BRAF proteins in U87 and U251 cells ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** Artesunate may exert its medicinal effect on inhibiting the growth and proliferation of glioblastoma cells by targeting PDGFRA-RAS-BRAF-MEK-ERK signaling pathway, which provides an *in vitro* experimental basis for artesunate in treatment of glioblastoma, and also provides new ideas and methods for solving the drug resistance problem of clinical anti-tumor drugs. **Key words:** artesunate; glioblastoma; DNA methylation analysis; drug resistance; PDGFRA-RAS-BRAF-MEK-ERK signaling pathway

胶质瘤是最常见的恶性原发性脑肿瘤，其中胶质母细胞瘤（glioblastoma, GBM）是最普遍及侵袭性最强的一类形式。研究表明，全球每 10 万人就有 0.59~3.69 人患病<sup>[1]</sup>，中位生存期仅有 15 个月<sup>[2]</sup>。目前标准治疗方式主要是手术及放疗或化疗，同时口服替莫唑胺。然而替莫唑胺治疗受到获得性化学抗性的限制，并不能很好地控制脑胶质瘤的转移，5 年生存率低于 5.5%<sup>[3]</sup>。因此，开发 GBM 的新疗法成为现代神经科学和肿瘤学最首要的任务之一。

青蒿琥酯是青蒿素的衍生物，可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[4]</sup>。已有研究证实，青蒿琥酯具有治疗 GBM 的潜能<sup>[5-6]</sup>，但对于抗 GBM 的机制研究尚不充分。随着对表观遗传学的深入研究，DNA 甲基化测序技术也逐渐成熟并被运用到研究多种疾病进展的分析中。研究表明，DNA 甲基化在维持细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及人类肿瘤的发生中起着重要作用。截至目前，大多数关于 GBM 表观遗传改变的研究都指出了 DNA 甲基化的

作用，如全基因组低甲基化、基因特异性低甲基化和高甲基化<sup>[7]</sup>。此外，关于 GBM 的表观遗传学研究发现，表观遗传学修饰与其生物学特征和治疗靶点相关<sup>[8]</sup>。基因启动子甲基化等遗传生物标志物是 GBM 患者重要的预后影响因素，被认为是患者治疗和预后的重要靶点<sup>[9]</sup>。因此，本研究基于给予青蒿琥酯前后人脑星形胶质母细胞瘤 U87 细胞和人胶质瘤 U251 细胞 2 种细胞模型，进行药效观察和细胞功能实验，结合 DNA 甲基化和网络药理学分析，从表观遗传学层面探讨青蒿琥酯干预 GBM 的分子机制，为 GBM 的治疗提供新思路。

## 1 材料

### 1.1 细胞

U87 细胞（批号 CL-0238）、U251 细胞（批号 CL-0237）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

青蒿琥酯（批号 1042850）；替莫唑胺（批号 PHR1437-1G）购自美国 Sigma 公司；CellTiter-Blue<sup>®</sup>

试剂(批号 G8080)购自美国 Promega 公司; PBS (批号 SH30256.01)、DMEM 高糖培养基(批号 8122292)、双抗(批号 SV30010)购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 16000-044)购自美国 Gibco 公司; DNA 含量检测试剂盒(批号 CA1510)购自北京索莱宝科技有限公司; Trizol 试剂(批号 10296028)、逆转录试剂盒(批号 K1691)购自 Invitrogen 公司; 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(ATG6 autophagy related 6 homolog, Beclin1)兔单克隆抗体(批号 A21191)、微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)兔单克隆抗体(批号 A19665)、泛素结合蛋白(ubiquitin-binding protein, p62)兔单克隆抗体(批号 A19700)、血小板衍生生长因子受体  $\alpha$  (platelet derived growth factor receptor  $\alpha$ , PDGFRA)兔单克隆抗体(批号 A2103)、B-Raf 原癌基因(B-Raf proto-oncogene, BRAF)兔单克隆抗体(批号 A21612)购自 ABclonal 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 60004-1-IG)、山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(批号 SA00001-1)购自 Proteintech 公司; 山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(批号 7074S)购自美国 CST 公司; DNeasy 组织试剂盒(批号 69506)购自 Qiagen 公司; EZ DNA 甲基化试剂盒(批号 D5001/D5003)购自 Zymo Research。

### 1.3 仪器

5840R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司); Multiskan GO 全波长酶标仪、ND-2000 型 Nanodrop 超微量分光光度计、3.0 Quibit Fluorometer 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); NovoCyte 流式细胞仪(美国 Agilent 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

U87 细胞和 U251 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养, 于对数生长期传代备用。

### 2.2 Cell Titer-Blue 检测青蒿琥酯对细胞活性和增殖的影响

取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 给药组加入 200  $\mu$ L 含药培养基(分别含 0.000 018、0.000 18、0.001 8、0.018、0.18、1.8、18、180  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯), 对照组加入等体积培养基, 并设置不含细胞的空白孔, 每组设

置 6 个复孔。培养 24 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L Cell Titer-Blue 试剂, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h, 于 560 nm/590 nm 处测定吸光度(A)值, 计算细胞存活率, 探索药物的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, U87 细胞给药组加入 200  $\mu$ L 含药培养基(分别含 0.18、1.8、18  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯), 对照组加入等体积培养基, 每组设置 6 个复孔。分别在培养 3、6、10、20、24 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L Cell Titer-Blue 试剂, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h, 于 560 nm/590 nm 处测定 A 值。U251 细胞给药组加入 200  $\mu$ L 含药培养基(分别含 1.8、18、180  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯), 对照组加入等量培养基, 每组设置 6 个复孔。分别在培养 3、6、10、20、24、48 h 后测定 A 值。

### 2.3 流式细胞术检测青蒿琥酯对细胞周期的影响

取对数生长期的细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 对照组加入完全培养基, U87 细胞给药组加入 22.69  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯, U251 细胞给药组加入 180  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯。处理细胞 24 h 后, 弃去培养基, 用胰酶消化细胞, 离心弃去上清。PBS 清洗细胞 2 遍, 加入 70%乙醇固定细胞, 4 °C 过夜; 离心并弃去上清, 加入 1 mL PBS 重悬细胞, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 清洗细胞, 加入细胞周期染色工作液, 37 °C 避光孵育 30 min 后, 采用流式细胞仪进行细胞周期检测, 结果用 Flow jo v9 软件进行分析。

### 2.4 qRT-PCR 检测青蒿琥酯对细胞自噬相关基因表达的影响

取对数生长期的细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 对照组加入完全培养基, U87 细胞和 U251 细胞给药组加入 180  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯。处理细胞 24 h 后, 用 Trizol 试剂提取 U87 和 U251 细胞的总 RNA, 对其定量, 并按照逆转录试剂盒, 将适量 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模板进行扩增, 进行 qRT-PCR 分析, 引物序列见表 1。

### 2.5 Western blotting 检测青蒿琥酯对细胞自噬及通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期的细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 对照组加入完全培养基, U87 细胞给药组分别加入 11.35、22.69、45.38  $\mu$ g/mL 青蒿琥酯, 阳性对照组加入 100  $\mu$ g/mL 替莫唑胺; U251 细胞给药组分别加入 90、180、360  $\mu$ g/mL 青蒿琥

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>Beclin1</i>	F: GTGCGCTACGCCAGATC R: GATGTGGAAGGTGGCATTGAA
<i>p62</i>	F: TGTGGAACATGGAGGGAAGAG R: TGTGCCTGTGCTGGAACCTTC
<i>LC3</i>	F: GACGGCTTCCTGTACATGGTTT R: TGGAGTCTTACACAGCCATTGC
<i>GAPDH</i>	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA R: CCTGCTTACCACCTTCTTGA

酯, 阳性对照组加入 250 μg/mL 替莫唑胺。处理细胞 24 h 后, 置于冰上裂解提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性后, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 Beclin1 (1:2000)、LC3B (1:2000)、p62 (1:2000)、PDGFRA (1:2000)、BRAF (1:2000) 和 GAPDH (1:5000) 抗体, 4 °C 孵育过夜; 洗涤后加入二抗 (1:5000), 室温孵育 30 min, 洗涤后进行化学发光和成像, 检测目标条带, 采用 Image J 软件对蛋白进行定量分析。

## 2.6 甲基化测序与分析

采用 DNeasy 组织试剂盒从细胞中分离 DNA。采用 Nanodrop 超微量分光光度计和 Qubit Fluorometer 荧光定量仪测定 DNA 的纯度和浓度。使用 EZ DNA 甲基化试剂盒将每个样品的 500 ng DNA 进行亚硫酸氢盐转换, 委托北京致美伊诺生物科技有限公司测序。原始数据在 R v3.5.2 软件中使用 ChAMP v2.16.0 包进行分析, 用 β 值表示 DNA 甲基化水平和各 CpG 位点的甲基化比例。使 BMIQ 对 β 值矩阵进行归一化, 调整 I 型和 II 型探针偏置; 使用 SVA v3.34.0 分析芯片间和芯片上样本位置不同产生的批间差, 使用 Combat 算法对批间差进行校正。非配对样本使用 ChAMP v2.16.0 包的 champ.DMP 函数进行差异甲基化位点 DMP 分析, 配对样本使用等方差双尾配对 *t* 检验。对于计算结果的 *P* 值, 使用 Benjamini & Hochberg 法进行多重假设检验, 减少假阳性。差异分析结果 (adj.*P*<0.05、|Δβ|≥0.2 或 adj.*P*<0.01、|Δβ|≥0.06) 以火山图和热图展示。差异基因功能富集分析通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行。

## 2.7 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建与核心靶点的筛选

选取启动子区域甲基化数据, 根据 *P*<0.05 筛选 U87 (青蒿琥酯敏感型) 和 U251 (青蒿琥酯耐药

型) 胶质母细胞瘤细胞的差异甲基化基因; 根据 adj.*P*<0.01、|Δβ|≥0.81 筛选 U87 和 U251 胶质母细胞瘤细胞给予青蒿琥酯前后的差异甲基化基因。运用 STRING v10.0 软件构建 PPI 网络, 运用 CytoHubba v0.1 计算 PPI 网络中各节点的网络拓扑特征值包括度值、最大集团中心、介数中心性和接近中心性, 筛选 4 者均大于相应中位数的节点为核心靶点。

## 2.8 核心靶点的功能富集分析

利用 DAVID v6.8 对关键网络靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 生物过程和 KEGG 信号通路富集分析 (*P*<0.05), 研究关键网络靶点参与的生物过程并筛选青蒿琥酯干预脑胶质瘤相关的信号通路。

## 2.9 分子对接

从 PDB 蛋白质数据库获取 PDGFRA (ID: 5K5X) 和 BRAF (ID: 7MOX) 的 pdb 格式文件, 使用 AutoDock v4.2.6 对 2 个蛋白进行去水、加氢处理。从 TCMS 数据库下载青蒿琥酯的 mol2 格式文件, 利用 AutoDock v4.2.6 和 AutoDock Vina v1.2.0 进行对接, 计算结合能。使用 Pymol v2.5 进行结果可视化。

## 2.10 统计学分析

应用 Graph Pad Prism v8.0 以及 SPSS v23.0 软件进行统计分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 青蒿琥酯对 U87 细胞的抑制作用强于 U251 细胞

如图 1 所示, 给药 24 h 后, 青蒿琥酯对 U87 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 22.69 μg/mL, 而对 U251 细胞的 IC<sub>50</sub> 则大于 180 μg/mL。与对照组比较, 18 μg/mL 的青蒿琥酯在给药 10~24 h 后, 对 U87 细胞增殖有显著抑制作用 (*P*<0.01、0.001); 而 180 μg/mL 的青蒿琥酯在给药 10 h 后, 可抑制 U251 细胞增殖 (*P*<0.001)。细胞活性和增殖实验结果显示, 青蒿琥酯可抑制 2 种 GBM 细胞, 与 U251 细胞相比, 青蒿琥酯对 U87 细胞更为敏感。

### 3.2 青蒿琥酯可阻滞 U87 和 U251 细胞周期

如图 2 所示, 与对照组比较, 22.69 μg/mL 青蒿琥酯处理后, U87 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期的细胞数量增加 6.2%; 180 μg/mL 青蒿琥酯处理后, U251 细胞的 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数量均增加, 且 S 期细胞数量增加具有显著性差异 (*P*<0.05)。表明青蒿琥酯可抑制 U87 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期, 以及 U251 细胞的 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期。相比于 U251 细胞, 较低剂量的青蒿琥酯更能将 U87 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期, 通过阻止细胞快

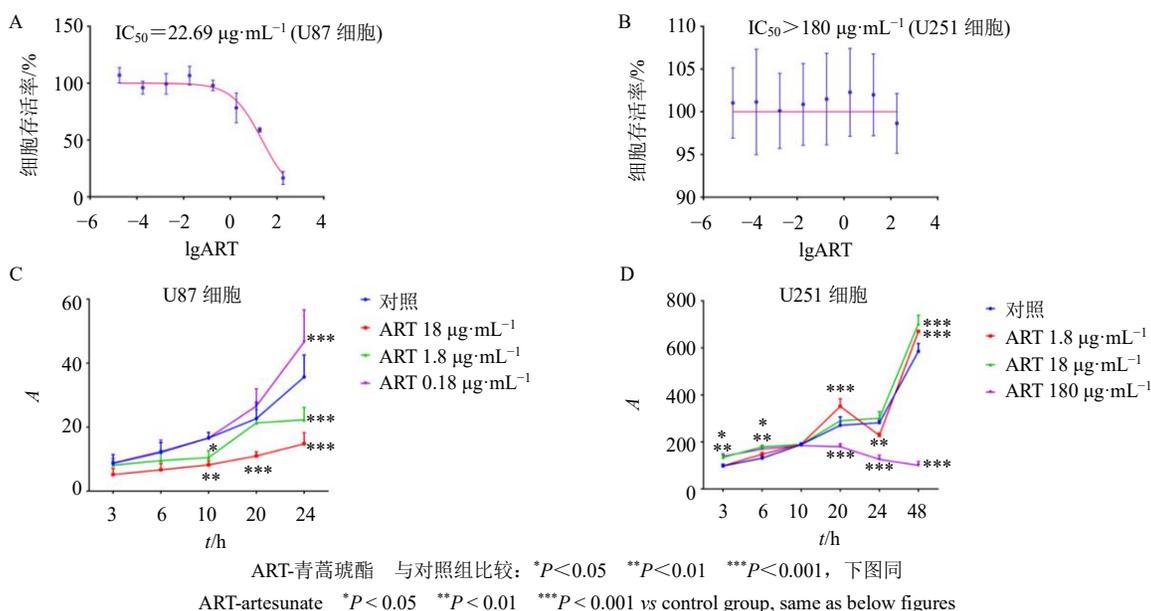


图1 青蒿琥酯对U87和U251细胞活性(A, B)和增殖(C, D)的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of artesunate on activity (A, B) and proliferation (C, D) of U87 and U251 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

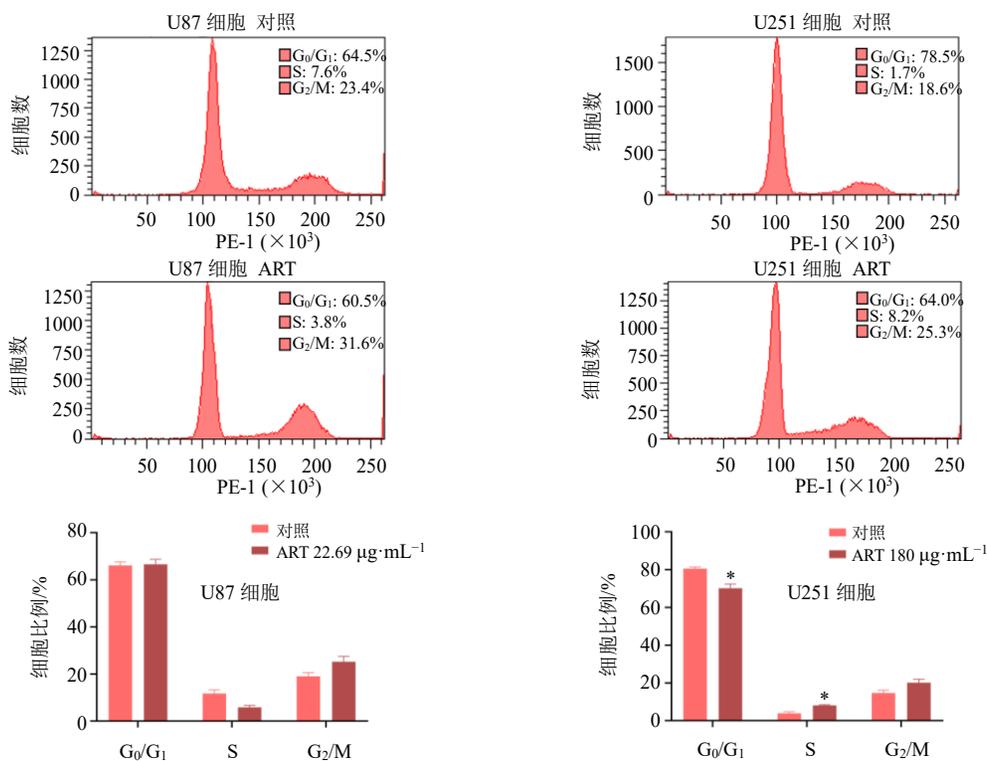


图2 青蒿琥酯对U87和U251细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

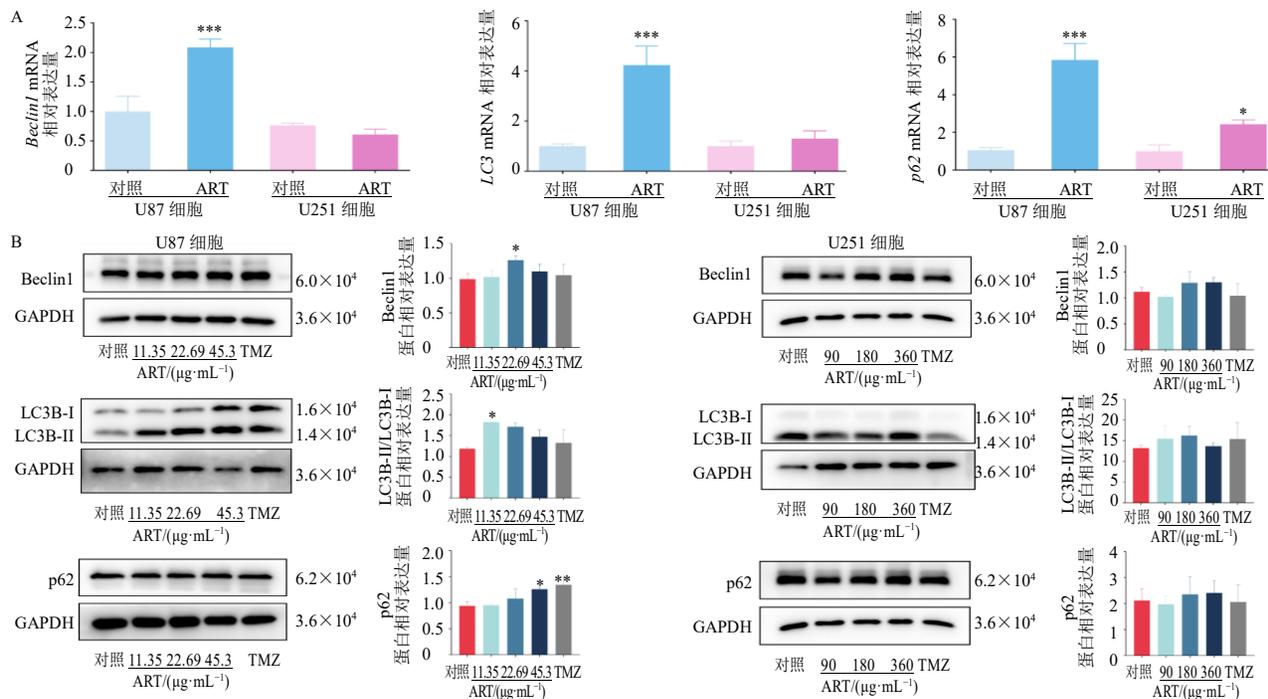
Fig. 2 Effect of artesunate on U87 and U251 cells cycle ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

速增长来抑制 GBM 细胞的活性。

### 3.3 青蒿琥酯可促进 U87 和 U251 细胞的自噬

采用 qRT-PCR 检测经 180 µg/mL 青蒿琥酯处理后 U87 和 U251 细胞的自噬标志分子 (*Beclin1*、*LC3*、*p62*) mRNA 表达水平, 如图 3-A 所示, 180

µg/mL 青蒿琥酯处理后, U87 细胞中 *Beclin1*、*p62*、*LC3* mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 而 U251 细胞中仅 *p62* mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 结果 (图 3-B) 显示, 11.35 µg/mL 的青蒿琥酯显著升高 U87 细胞中 LC3B 蛋白表达水



TMZ-替莫唑胺, 图7同

TMZ-temozolamide, same as fig. 7

图3 青蒿琥酯对 U87 和 U251 细胞自噬相关基因 (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of artesunate on autophagy related genes (A) and proteins (B) expressions in U87 and U251 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

平 ( $P < 0.05$ ), 22.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的青蒿琥酯显著升高 U87 细胞中 Beclin1 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 45.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的青蒿琥酯显著升高 U87 细胞中 p62 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 180、360  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的青蒿琥酯可使 U251 细胞中 Beclin1、p62、LC3B 蛋白表达趋势升高, 但无显著性差异。

### 3.4 甲基化和去甲基化基因分布

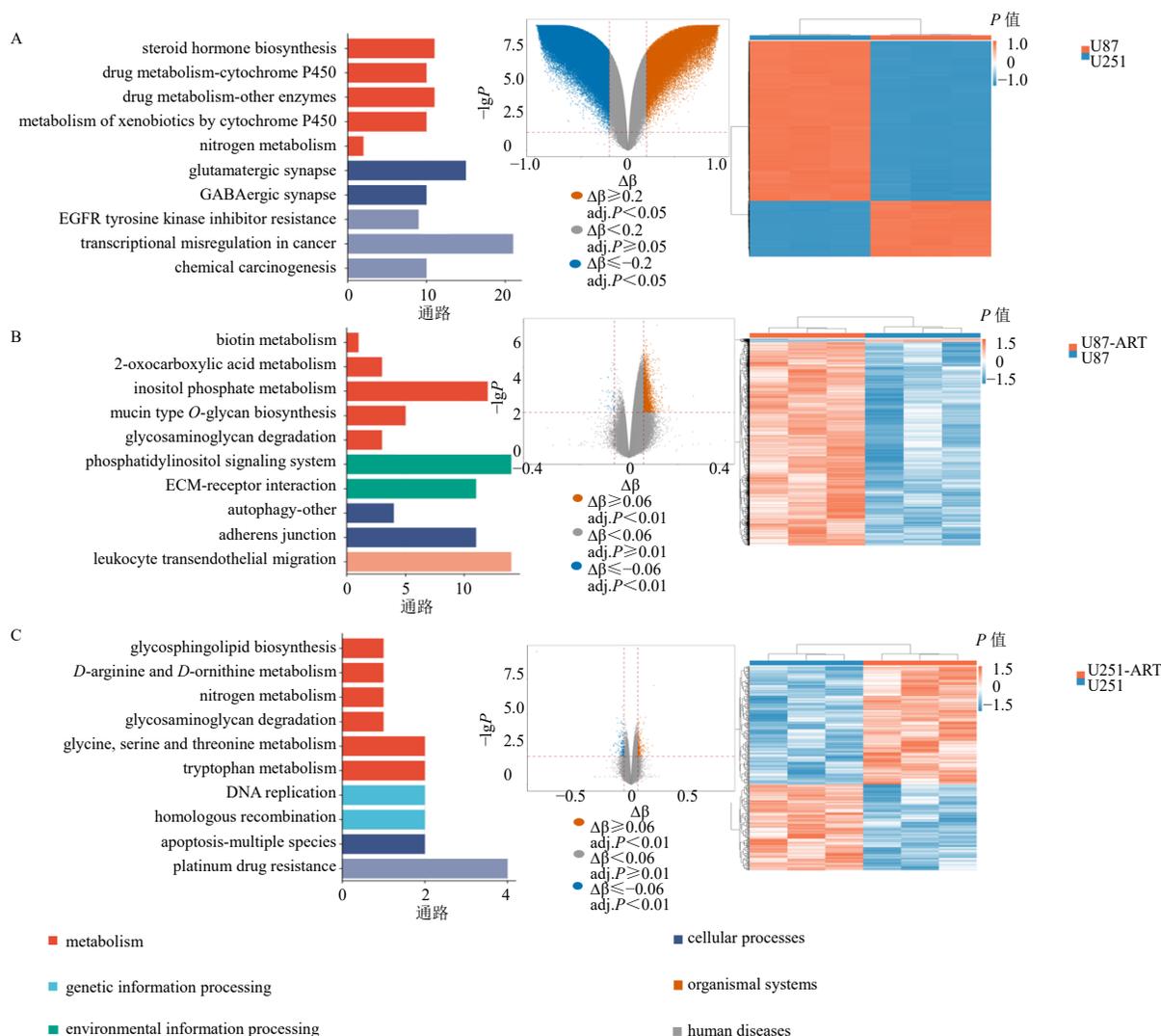
前期的药效和细胞功能实验结果显示, 青蒿琥酯对 U87 细胞较为敏感, 而对 U251 细胞耐药, 为了探究青蒿琥酯在治疗 GBM 中发挥药效的机制以及产生耐药的原因, 本研究将给药前后的 U87 与 U251 细胞进行甲基化测序与分析, 选取启动子区域进行甲基化数据分析。筛选 U87 和 U251 2 种细胞的差异基因数 (U87 vs U251), 得到“U87 与 U251 细胞差异基因集”; 筛选 2 种细胞给予青蒿琥酯前后的差异基因数 (U87 vs U87-ART、U251 vs U251-ART), 得到“青蒿琥酯干预 U87 细胞效应基因集”以及“青蒿琥酯干预 U251 细胞效应基因集”。如图 4 所示, U87 vs U251 中共有 226 058 个差异基因, 其中包括 61 891 个甲基化基因和 164 167 个去甲基化基因; U87 vs U87-ART 中共有 3345 个差异基因, 其中包括 3294 个甲基化基因和 51 个去甲基化基

因; U251 vs U251-ART 中共有 420 个差异基因, 其中包括 243 个甲基化基因和 177 个去甲基化基因。

通过对各组的差异基因进行功能富集, 选取富集度最高的前 10 个通路进行功能模块富集, 主要富集到 6 大功能模块。包括代谢、遗传信息、环境信息、细胞过程、有机系统以及人类疾病。其中 U87 vs U251 主要富集到了代谢 (包括药物代谢-细胞色素 P450 信号通路) 和细胞功能、人类疾病 [包括癌症相关、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 相关信号通路] 功能模块; U87 vs U87-ART 主要富集到了代谢、环境信息 (细胞外基质-受体相互作用信号通路)、细胞功能 (自噬、黏着连接信号通路)、有机系统等功能模块; U251 vs U251-ART 主要富集到了代谢、遗传信息 (基因复制、同源重组信号通路)、细胞功能 (细胞凋亡相关信号通路) 等功能模块。根据以上信息, 初步表明青蒿琥酯具有干预 GBM 的潜能。

### 3.5 青蒿琥酯干预 GBM 的核心靶点筛选

**3.5.1 差异基因筛选** 选取启动子区域甲基化数据, 根据 adj.P 和  $\Delta\beta$ , 筛选青蒿琥酯干预 GBM 效应基因以及青蒿琥酯敏感型和耐药型细胞系差异基因。U87 vs U251 中共有 1881 个差异基因, 其中包



火山图中，甲基化基因用红色表示，去甲基化基因用蓝色表示，未甲基化基因用灰色表示

methylated genes are shown in red, demethylated genes are shown in blue, and unmethylated genes are shown in grey in volcano

图4 U87 vs U251 (A)、U87 vs U87-ART (B) 和 U251 vs U251-ART (C) 差异基因功能模块富集结果、火山图以及热图  
Fig. 4 Enrichment results of functional modules of differentially expressed genes, volcano map and heat map in U87 vs U251 (A), U87 vs U87-ART (B) and U251 vs U251-ART (C)

含 893 个甲基化基因和 988 个去甲基化基因；U87 vs U87-ART 中共有 342 个差异基因，其中包含 181 个甲基化基因和 161 个去甲基化基因；U251 vs U251-ART 中共有 56 个差异基因，其中包含 26 个甲基化基因和 30 个去甲基化基因。

差异基因筛选数据可见，U87 和 U251 2 类细胞差异基因数以及青蒿琥酯给药前后 U87 细胞差异基因数较多，而青蒿琥酯给药前后 U251 细胞差异基因数较少，这与青蒿琥酯对 U87 细胞较敏感，而对 U251 细胞耐药的体外实验结果相呼应。

3.5.2 核心靶点预测 基于 STRING v10.0 软件，挖掘“U87 与 U251 细胞差异基因集”、“青蒿琥酯

干预 U87 细胞效应基因集”以及“青蒿琥酯干预 U251 细胞效应基因集”各自的相互作用关系。如图 5-A 所示，U87 vs U251 中包含 1016 个节点和 2353 对相互作用；U87 vs U87-ART 中包含 288 个节点和 160 对相互作用；U251 vs U251-ART 中包含 53 个节点和 4 对相互作用。

运用 Cyto Hubba v0.1 分别计算 PPI 网络中各节点的网络拓扑特征值（度值、最大集团中心、介数中心性和接近中心性），筛选 4 者均大于相应中位数的节点为关键网络靶标，共得到 290 个 U87 vs U251 核心靶点（最大集团中心为 4、度值为 4、接近中心性为 203.6、介数中心性为 1 220.3）和 53 个

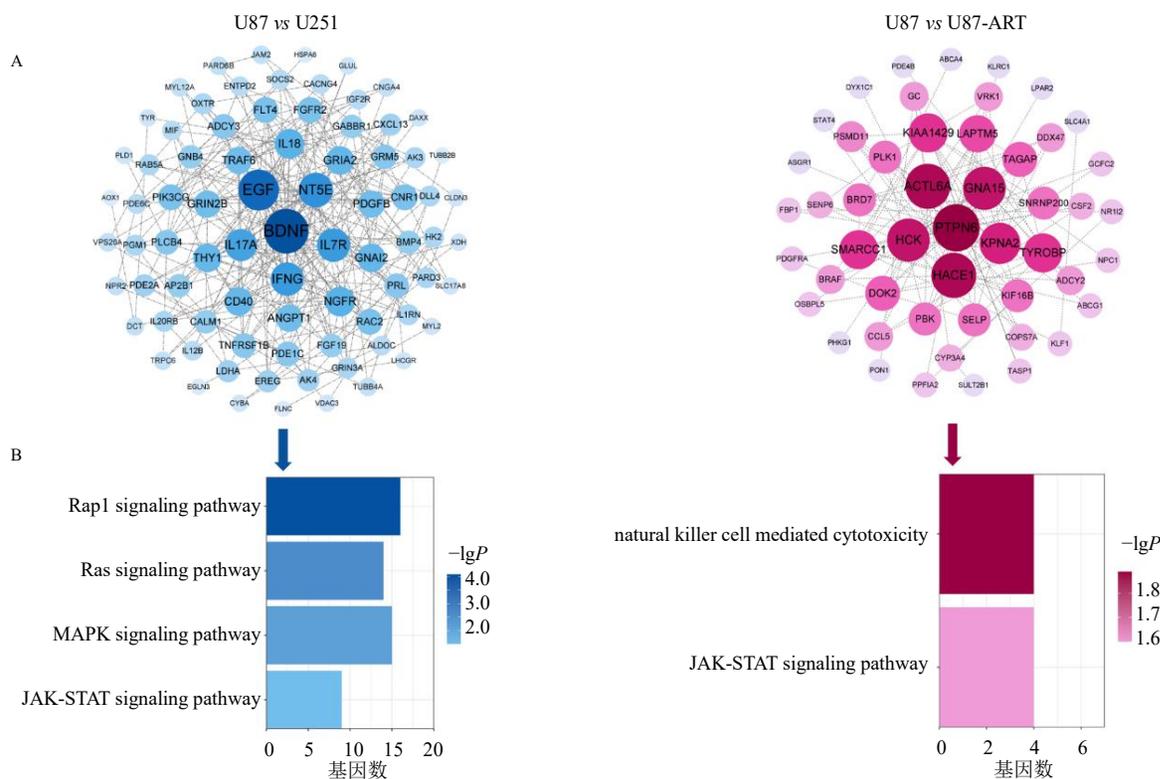


图5 U87 vs U251、U87 vs U87-ART 关键靶点 PPI 网络 (A) 及主要富集通路 (B)

Fig. 5 PPI network (A) and main enrichment pathways (B) of key targets in U87 vs U251 and U87 vs U87-ART

U87 vs U87-ART 核心靶点 (最大集团中心为 2、度值为 2、接近中心性为 13.6、介数中心性为 0)。

### 3.6 核心靶点的富集分析

基于 DAVID v6.8 数据库, 对青蒿琥酯干预 GBM 效应基因以及青蒿琥酯敏感型和耐药型细胞系差异基因的关键网络靶点进行 KEGG 信号通路富集分析。生物功能富集结果显示, U87 vs U251 核心节点共富集到 23 条信号通路 ( $P < 0.05$ ), 包含神经系统相关通路以及与调节细胞功能和免疫-炎症反应相关的信号通路; U87 vs U87-ART 核心节点共富集到 2 条信号通路 ( $P < 0.05$ ), 分别是 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)-信号转导和转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 信号通路和自然杀伤细胞介导的细胞毒性信号通路 (图 5-B)。其中, 与细胞增殖分化密切相关的 JAK-STAT 信号通路为共同富集通路, 对富集到该通路的基因进行分析。

分析结果显示, 该条通路上的基因 *PDGFRA* 与 GBM 密切相关, 该基因发生突变后会促进肿瘤的恶性进展。进一步文献调研发现 *PDGFRA* 和 *BRAF* 普遍在 GBM 患者发生突变。甲基化数据结果也显示, *PDGFRA* 和 *BRAF* 基因在 U87 vs U87-ART 中被甲

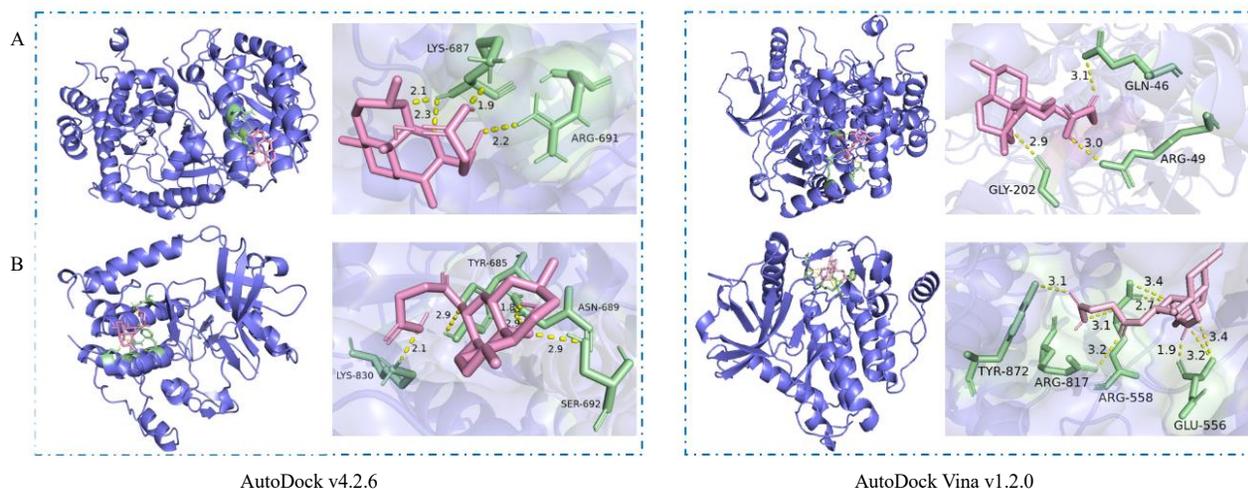
基化沉默 ( $\text{adj.}P < 0.05$ ), 且均与 GBM 的发生发展有关。

### 3.7 青蒿琥酯与关键靶点的分子对接结果分析

采用 AuotDock 和 AutoDock Vina 2 种对接方法考察青蒿琥酯与关键靶点 *BRAF* 和 *PDGFRA* 的结合能力。如图 6 所示, 青蒿琥酯与 *BRAF* 蛋白的结合能分别为  $-22.06$ 、 $-31.4$  kJ/mol, 青蒿琥酯与 *PDGFRA* 蛋白的结合能分别为  $-24.58$ 、 $-34.75$  kJ/mol, 由此看出, 青蒿琥酯与 *BRAF* 和 *PDGFRA* 这 2 种蛋白的结合能力较强。

### 3.8 青蒿琥酯对关键靶点的蛋白表达影响

为了验证青蒿琥酯对 *BRAF* 和 *PDGFRA* 2 种蛋白表达的影响, 用 11.35、22.69、45.38  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯处理 U87 细胞, 90、180、360  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯处理 U251 细胞, 采用 Western blotting 进行检测, 如图 7 所示, 11.35、22.69、45.38  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯均可降低 U87 细胞中 *PDGFRA* 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ 、0.01), 11.35、45.38  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯可降低 *BRAF* 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ); 90、180、360  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯对 U251 细胞中 *PDGFRA* 蛋白表达无显著影响, 90  $\mu\text{g/mL}$  的青蒿琥酯可显著降低 *BRAF* 蛋白表达 ( $P < 0.001$ )。



AutoDock v4.2.6

AutoDock Vina v1.2.0

图 6 青蒿琥酯与 BRAF (A) 和 PDGFRA (B) 蛋白的分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking results of artesunate with BRAF (A) and PDGFRA (B)

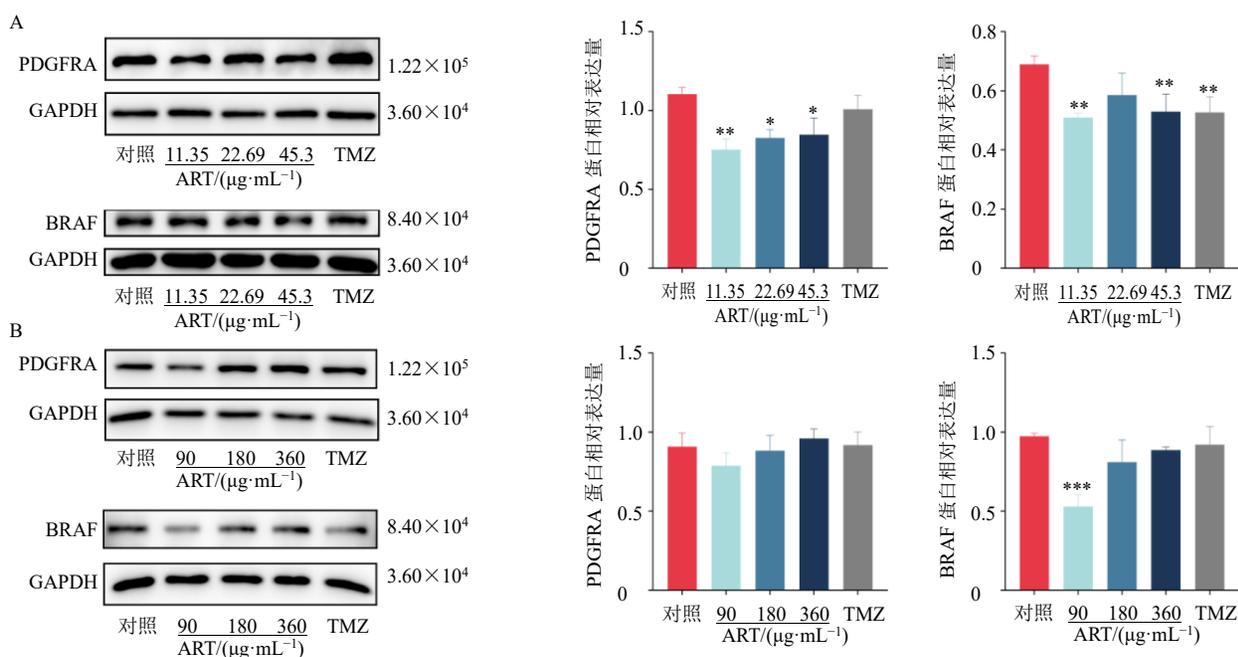


图 7 青蒿琥酯对 U87 (A) 和 U251 (B) 细胞中 PDGFRA 和 BRAF 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of artesunate on PDGFRA and BRAF protein expressions in U87 (A) and U251 (B) cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

脑胶质瘤作为一种中枢神经系统的恶性肿瘤，具有高度侵袭性，因部分临床患者存在化疗耐药性，且肿瘤抑制因子和癌基因的多重功能障碍的存在使其成为最难治疗的恶性肿瘤之一<sup>[10]</sup>。目前主要存在预后差及复发率高等问题，亟需挖掘新的抗 GBM 治疗药物。本研究基于 2 种 GBM 细胞 U87 和 U251 的药效实验和甲基化数据分析，旨在探讨具有抗肿瘤活性的一类青蒿素衍生物青蒿琥酯发挥抗 GBM 的药效，并初步挖掘其作用机制以及临床产生耐药

相关的分子机制。

细胞活性和增殖结果显示，青蒿琥酯对 U87 细胞的抑制作用比 U251 细胞强；中、高剂量的青蒿琥酯从早期开始即可抑制 U87 细胞的增殖，而仅有高剂量青蒿琥酯才能影响耐药型细胞 U251 的增殖。此外，高剂量青蒿琥酯可阻滞 U87 和 U251 脑胶质瘤细胞周期分布，低、中、高剂量青蒿琥酯促进 U87 细胞 3 种自噬标志分子 (Beclin1、p62、LC3) 的表达，而仅有中、高剂量才能影响 U251 细胞的自噬标志分子表达。以上实验表明青蒿琥酯对 U87 细胞

敏感，而对 U251 细胞耐药。为进一步揭示青蒿琥酯在治疗 GBM 中发挥药效的分子机制和潜在的耐药机制，本研究将给药前后的 U87 与 U251 细胞进行甲基化测序与分析，筛选出的核心靶点显著富集于癌症、细胞增殖、凋亡相关通路，其中青蒿琥酯干预 GBM 的关键靶标显著参与了 PDGFRA-大鼠肉瘤基因 (rat sarcoma viral oncogene homolog, RAS) - BRAF-丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) -细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 通路。甲基化数据显示，青蒿琥酯给药后，该通路上的 PDGFRA 和 BRAF 被甲基化沉默，导致其转录和表达受到抑制，进而阻止下游 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路的激活。青蒿琥酯与蛋白质 PDGFRA 和 BRAF 的分子对接结果显示青蒿琥酯与 2 种蛋白质有较好的结合能力。Western blotting 结果证实青蒿琥酯可以抑制 PDGFRA 和 BRAF 2 种关键蛋白在 U87 和 U251 细胞中的表达。

研究表明，GBM 的恶性进展可能与 PDGFRA 的过表达有关<sup>[11]</sup>。PDGFRA 作为细胞表面受体，在调节胚胎发育和细胞增殖中起着重要的作用，可介导 RAS 的激活<sup>[12]</sup>。此外，G34R/V 型胶质瘤 (G34R/V HGGs) 中 PDGFRA 的高激活突变，可观察到明显

的 ERK 磷酸化，表明下游有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) /ERK 途径被激活，促进了肿瘤的发生<sup>[13]</sup>；在 GBM 细胞中，具有 GTP 酶活性的 RAS 蛋白被上游 PDGFRA 激活后，通过与 BRAF 的 N 端结构域结合使 BRAF 活化，参与恶性肿瘤的形成和发展。此外，其突变也与许多癌症类型的预后不良有关<sup>[14]</sup>。突变使 BRAF 蛋白持续激活，磷酸化 MEK，从而诱导 MAP 激酶信号转导途径，并持续作用于下游的唯一底物 ERK 进入细胞核，通过影响 DNA 和蛋白质合成以及细胞周期进入来促进细胞增殖和分化<sup>[15]</sup>，其中 ERK2 还可以通过调节线粒体来促进肿瘤生长<sup>[16]</sup>。相关研究表明，抑制 MAPK/ERK 通路可以逆转阿霉素对乳腺癌的耐药性<sup>[17]</sup>。因此，推测青蒿琥酯缓解 GBM 可能通过调节 PDGFRA 的表达，从而抑制下游 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路；或通过直接抑制 BRAF 及其下游 MEK-ERK 途径，即青蒿琥酯可通过上述 2 条途径切断 MEK-ERK 的信号传导，从而阻止 GBM 细胞的增殖扩散发挥治疗作用 (图 8)。

目前临床前已有多种有效药物靶向 GBM 中的 PDGFRA，包括酪氨酸激酶抑制剂达沙替尼，然而，达沙替尼的单药治疗未能改善成人高级别胶质瘤 (high-grade gliomas, HGG) 的结局<sup>[18]</sup>；此外，BRAF 抑制剂

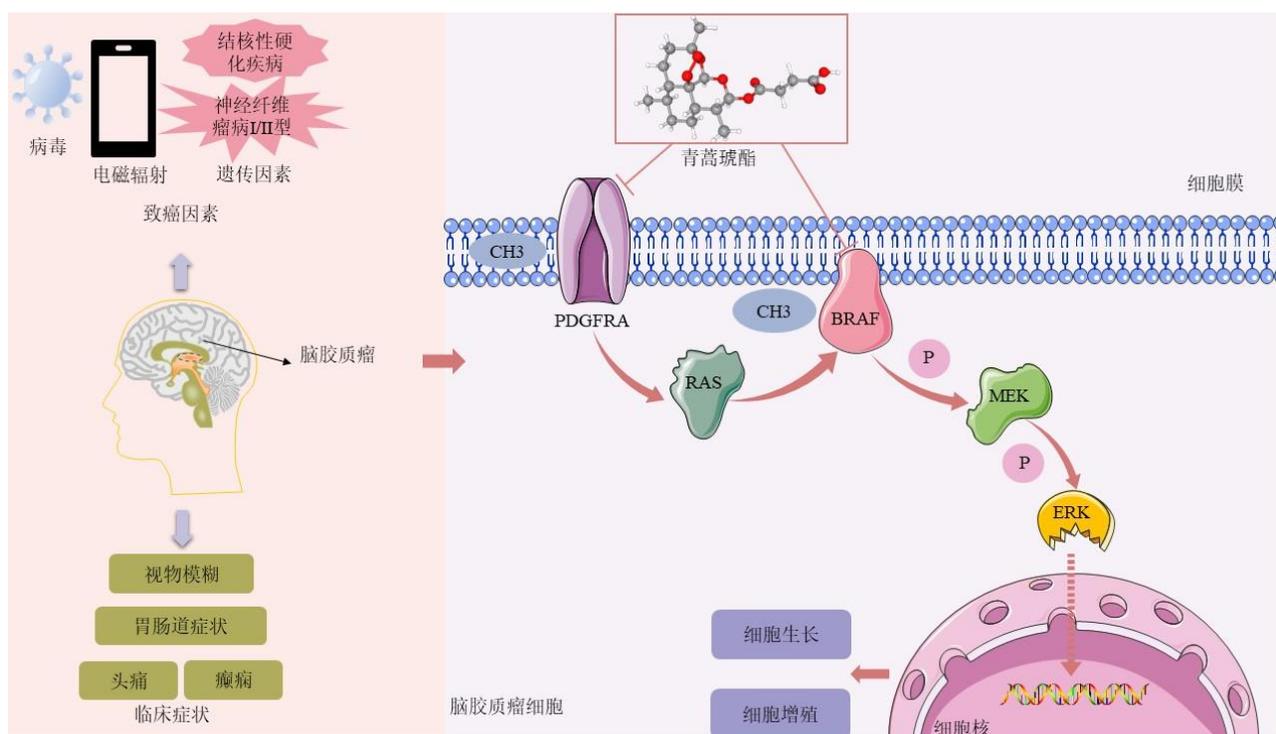


图 8 青蒿琥酯可能通过调节 PDGFRA-RAS-BRAF-MEK-ERK 信号通路来抑制胶质瘤细胞

Fig. 8 Artesunate may inhibit glioblastoma cells by regulating PDGFRA-RAS-BRAF-MEK-ERK signaling pathway

维莫非尼以及达拉非尼也具有抗 GBM 活性<sup>[19-21]</sup>。临床上单纯抑制 PDGFRA 或 BRAF 对 GBM 的疗效有限，而青蒿琥酯不仅可抑制 PDGFRA，还可进一步作用于 BRAF，具有治疗 GBM 的潜能。

综上所述，本研究结合药物对 2 类 GBM 细胞的体外实验和甲基化数据分析，发现青蒿琥酯可能通过抑制 PDGFRA-RAS-BRAF-MEK-ERK 途径，发挥抑制 GBM 细胞的生长和扩散的治疗作用。研究结果不仅为 GBM 提供潜在新的治疗方案，也为临床中 GBM 患者对药物产生耐药的机制探索提供方法学参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Pearson J R D, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2017, 2: 17040.
- [2] Chen S M, Zhang Z Y, Zhang B X, et al. CircCDK14 promotes tumor progression and resists ferroptosis in glioma by regulating PDGFRA [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2): 841-857.
- [3] Xie Y D, Xiao Y, Liu Y Y, et al. Construction of a novel radiosensitivity- and ferroptosis-associated gene signature for prognosis prediction in gliomas [J]. *J Cancer*, 2022, 13(8): 2683-2693.
- [4] 巩会杰, 唐建荣, 姚兰杰, 等. 青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 通路对人大肠癌 CCL229 细胞恶性生物学行为抑制作用的研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2331-2342.
- [5] Wei S P, Liu L L, Chen Z Y, et al. Artesunate inhibits the mevalonate pathway and promotes glioma cell senescence [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 276-284.
- [6] Lian S Z, Shi R Y, Huang X, et al. Artesunate attenuates glioma proliferation, migration and invasion by affecting cellular mechanical properties [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 984-990.
- [7] Kloosterhof N K, de Rooij J J, Kros M, et al. Molecular subtypes of glioma identified by genome-wide methylation profiling [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(7): 665-674.
- [8] Uddin M S, Mamun A A, Alghamdi B S, et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83: 100-120.
- [9] Kurdi M, Katib Y, Faizo E, et al. Association between CD204-expressed tumor-associated macrophages and MGMT-promoter methylation in the microenvironment of grade 4 astrocytomas [J]. *World J Oncol*, 2022, 13(3): 117-125.
- [10] Brennan C W, Verhaak R G, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 462-477.
- [11] Filbin M G, Tirosh I, Hovestadt V, et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq [J]. *Science*, 2018, 360(6386): 331-335.
- [12] Ben Jemii N, Tounsi-Kettiti H, Yaiche H, et al. Dysregulated PDGFR alpha expression and novel somatic mutations in colorectal cancer: Association to RAS wild type status and tumor size [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 440.
- [13] Chen C C L, Deshmukh S, Jessa S, et al. Histone H3.3G34-mutant interneuron progenitors Co-opt PDGFRA for gliomagenesis [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1617-1633.e22.
- [14] 李建英, 毛玉环, 张晓, 等. 循环肿瘤 DNA 与转移性结直肠癌靶向治疗及耐药机制的相关研究 [J]. *实用预防医学*, 2021, 28(12): 1450-1454.
- [15] Avery T Y, Köhler N, Zeiser R, et al. Onco-immunomodulatory properties of pharmacological interference with RAS-RAF-MEK-ERK pathway hyperactivation [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 931774.
- [16] Zou J R, Lei T T, Guo P, et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 759-770.
- [17] Llovet P, Sastre J, Ortega J S, et al. Prognostic value of BRAF, PI3K, PTEN, EGFR copy number, amphiregulin and epiregulin status in patients with KRAS Codon 12 wild-type metastatic colorectal cancer receiving first-line chemotherapy with anti-EGFR therapy [J]. *Mol Diagn Ther*, 2015, 19(6): 397-408.
- [18] Miklja Z, Yadav V N, Cartaxo R T, et al. Everolimus improves the efficacy of dasatinib in PDGFR $\alpha$ -driven glioma [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5313-5325.
- [19] Kaley T, Touat M, Subbiah V, et al. BRAF inhibition in BRAF V600-mutant gliomas: Results from the VE-BASKET study [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(35): 3477-3484.
- [20] Hargrave D R, Bouffet E, Tabori U, et al. Efficacy and safety of dabrafenib in pediatric patients with BRAF V600 mutation-positive relapsed or refractory low-grade glioma: Results from a phase I/IIa study [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(24): 7303-7311.
- [21] Wen P Y, Stein A, van den Bent M, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600E-mutant low-grade and high-grade glioma (ROAR): A multicentre, open-label, single-arm, phase 2, basket trial [J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(1): 53-64.

[责任编辑 李亚楠]