

· 实验研究 ·

# 人参皂苷Rd对锌指E盒结合蛋白1抑制脑胶质瘤细胞增殖和血管生成的影响

陈碧茵 王文武 石淑平 林芳峰

**摘要:**目的:探讨人参皂苷Rd(ginsenoside Rd, GS-Rd)对锌指E盒结合蛋白1(Zinc-finger E-box binding protein 1, ZEB1)在脑胶质瘤血管生成中的分子调控机制的影响。方法:采用qRT-PCR检测ZEB1在脑胶质瘤细胞系中的表达。采用分子对接模拟实验预测与ZEB1结合的小分子。构建ZEB1过表达/沉默表达细胞系研究ZEB1在脑胶质瘤中的调控作用,采用Western blot检测血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)的蛋白表达水平,通过CCK-8实验、血管形成实验检测GS-Rd处理对细胞增殖和血管生成能力的影响。结果:ZEB1在脑胶质瘤细胞中高表达,且促进脑胶质瘤细胞增殖和血管生成。GS-Rd被预测到能与ZEB1结合,并且能明显抑制脑胶质瘤细胞增殖和血管生成。回复实验结果显示,GS-Rd处理可显著抑制ZEB1过表达诱导的脑胶质瘤细胞增殖和血管生成。结论:该研究证实了GS-Rd通过结合ZEB1抑制脑胶质瘤血管生成的分子机制,应用GS-Rd或抑制ZEB1功能可能是抑制脑胶质瘤血管生成和肿瘤生长的可行途径。

**关键词:**脑胶质瘤;血管生成;锌指E盒结合蛋白1;人参皂苷Rd;实验研究

**中图分类号:**R739.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7156(2023)02-0060-05

**DOI:**10.20002/j.issn.1000-7156.2023.02.025

## Inhibitory effect of ginsenoside Rd bound to zinc finger E-box binding protein 1 on cell proliferation and angiogenesis of brain glioma

CHEN Bi-yin, WANG Wen-wu, SHI Shu-ping, et al.

(The Third People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:****Objective:**To approach the molecular regulation mechanism of zinc finger E-box binding protein 1(ZEB1)on angiogenesis of brain glioma.**Methods:**The expression of ZEB1 in cell lines of brain glioma was detected by qRT-PCR.The small molecules bound to ZEB1 were predicted by simulation experiment of molecular docking.The cell lines for overexpression/silence expression of ZEB1 was constructed in order to research the regulating effect of ZEB1 on brain glioma.The protein expression level of vascular endothelial growth factor A(VEGFA)was detected by Western blot.The effect of ginsenoside Rd(GS-Rd)treatment on cell proliferation and angiogenesis was detected by CCK-8 experiment and angiogenesis experiment.**Results:**ZEB1 was highly expressed in cells of brain glioma, and promoted the cell proliferation and angiogenesis of brain glioma.It was predicted that GS-Rd could bind to ZEB1 and significantly inhibit the cell proliferation and angiogenesis of brain glioma.The results of rescue experiment showed that GS-Rd treatment could significantly inhibit the cell proliferation and angiogenesis of brain glioma induced by overexpression of ZEB1.**Conclusion:**This research confirms the molecular mechanism of ZEB1-bound GS-Rd inhibiting angiogenesis of brain glioma.The application of GS-Rd or inhibition of ZEB1 function may be a feasible approach to inhibiting angiogenesis and tumor growth of brain glioma.

**Keywords:**brain glioma,angiogenesis,zinc finger E-box binding protein 1(ZEB1),ginsenoside Rd(GS-Rd),experimental research

基金项目:福建省自然科学基金项目(编号:2020J01767)。

作者简介:陈碧茵,女,硕士,副主任医师,福建中医药大学附属第三人民医院(福州 350108);王文武、石淑平、林芳峰,单位同第一作者。

通讯作者:王文武,E-mail:boiyw\_4657@163.com

脑胶质瘤是最常见、最具侵袭性的原发性脑恶性肿瘤之一,复发率和死亡率高。脑胶质瘤细胞可以通过分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)和其他促血管生成因子,促进血管内皮细胞的生长。同时,胶质血管内皮细胞能分泌多种促进肿瘤生长的

因子,促进脑胶质瘤细胞的生长。因此,探究影响脑胶质瘤血管生成的分子调控机制非常必要。

锌指E盒结合蛋白1(Zinc-finger E-box binding protein 1,ZEB1)是转录因子网络的主要元件。有研究显示,ZEB1可以上调VEGF的表达并刺激乳腺癌血管生成<sup>[1]</sup>。Chen等<sup>[2]</sup>研究表明ZEB1受到miR-23b的负调控,进而抑制胶质瘤细胞的血管生成、迁移和侵袭能力。上述研究并未完全揭示ZEB1在调节脑胶质瘤血管生成中的作用机制,笔者拟进一步探寻在脑胶质瘤中影响ZEB1调控作用的新机制。

该研究探究了人参皂苷Rd(ginsenoside Rd,GS-Rd)对ZEB1的影响以及在脑胶质瘤细胞增殖和血管生成中发挥的调控作用,为进一步认识脑胶质瘤血管生成机制提供了新的见解。

## 1 材料与方法

1.1 细胞培养和药物处理:人胶质瘤细胞系U373(BNCC338603)、A172(BNCC341782)、U87(BNCC337885)和U251(BNCC337874),以及人正常脑胶质细胞系HEB(BNCC338123)、人皮静脉内皮细胞HUVECs(BNCC337632)均购自北纳生物(BNCC,中国)。所有细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下,培养在DMEM培养基(10%FBS,Gibco,美国)中。GS-Rd(C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub>,CAS号52705-93-8,纯度≥98%)购自ChemFaces(中国),溶解于DMSO中,储存浓度为500μM,用培养基稀释至100μM用于处理细胞。

1.2 细胞转染:si-ZEB1和oe-ZEB1及其各自的阴性对照(NC)均由Ribobio公司合成(中国)。当细胞融合达到50%左右时,使用Lipofectamine 3000(Invitrogen,美国)瞬时转染细胞。48 h后收集细胞。

1.3 qRT-PCR检测:根据制造商的方案,使用Trizol(Invitrogen,美国)从细胞中分离总RNA。用One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit(Takara Biomedical Technology,日本)检测ZEB1的表达水平,以GAPDH为内源性对照。qRT-PCR使用7500 Real-time PCR System(Applied Biosystems,美国)分析。使用2<sup>-ΔΔCT</sup>方法计算RNA的相对表达水平。ZEB1的上游引物为5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3',下游引物为5'-CTGGCTCTTCAAGTGCC-3',GAPDH的上游引物为5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3',下游

引物为5'-GGGTCGTTGATGGCAACA-3'。

1.4 Western blot实验:Western blot的具体操作步骤按照前述方法进行<sup>[3]</sup>。该研究所用的一抗:兔抗血管内皮生长因子A(Vascular Endothelial Growth Factor A,VEGFA,ab46154)和免抗GAPDH(ab181602),二抗:羊抗兔IgG(ab205718),均购自Abcam(英国)。

1.5 CCK-8实验:CCK-8检测试剂盒(Beyotime,中国)用于检测细胞增殖能力。将细胞以2 000个细胞/孔的密度接种在96孔板中,培养0 h、24 h、48 h、72 h后每个孔加入10 μL CCK-8溶液在37℃下孵育2 h。使用酶标仪在450 nm处测定OD值。

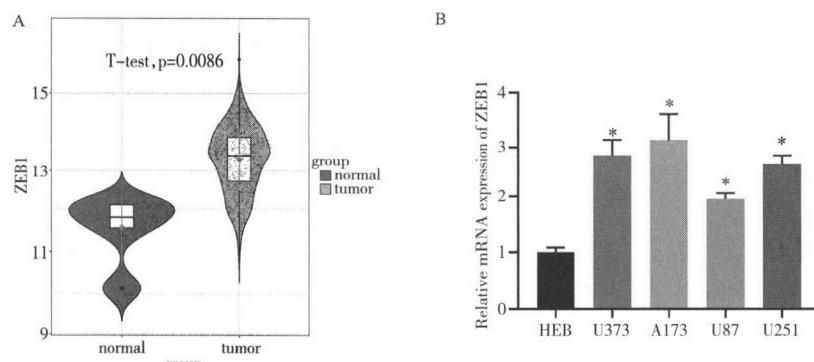
1.6 血管生成实验:Matrigel(Corning,美国)基质胶在4℃下解冻过夜。将75 μL基质胶添加到预冷的96孔板中,然后在37℃下培养60 min。将细胞悬浮液以2.5×10<sup>4</sup>个细胞/孔的密度添加到96孔板中。待细胞贴壁后,用转染脑胶质瘤细胞条件培养基(cultured medium,CM)替换原培养基。培养4~6 h后,显微镜下拍照。

1.7 分子对接模拟:为了进行分子对接分析,从蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)中获得了目标蛋白ZEB1的结构。除去额外配体和所有非标准残基(水,N-乙酰氨基葡萄糖和锌)作为参照蛋白。添加缺失的氢,并分配残基的最佳电离状态。从小分子药物数据库(<https://go.drugbank.com/>)下载潜在靶向小分子结构。使用Autodock进行分子对接并得到结合能。用Pymol处理对接的结果进行可视化并导出图片。

1.8 数据分析:所有实验至少进行3次。数据以“均值±标准差”表示。所有统计分析均在GraphPad Prism version 6中进行。统计评估采用两组间的双尾Student's-t检验或单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 ZEB1在脑胶质瘤异常上调:TCGA数据库分析表明,与癌旁正常组织比较,ZEB1在脑胶质瘤组织中显著高表达( $P=0.0086$ )(图1A)。qRT-PCR结果显示,ZEB1在脑胶质瘤细胞系中显著高表达( $P<0.01$ )(图1B)。表明ZEB1在脑胶质瘤异常上调。

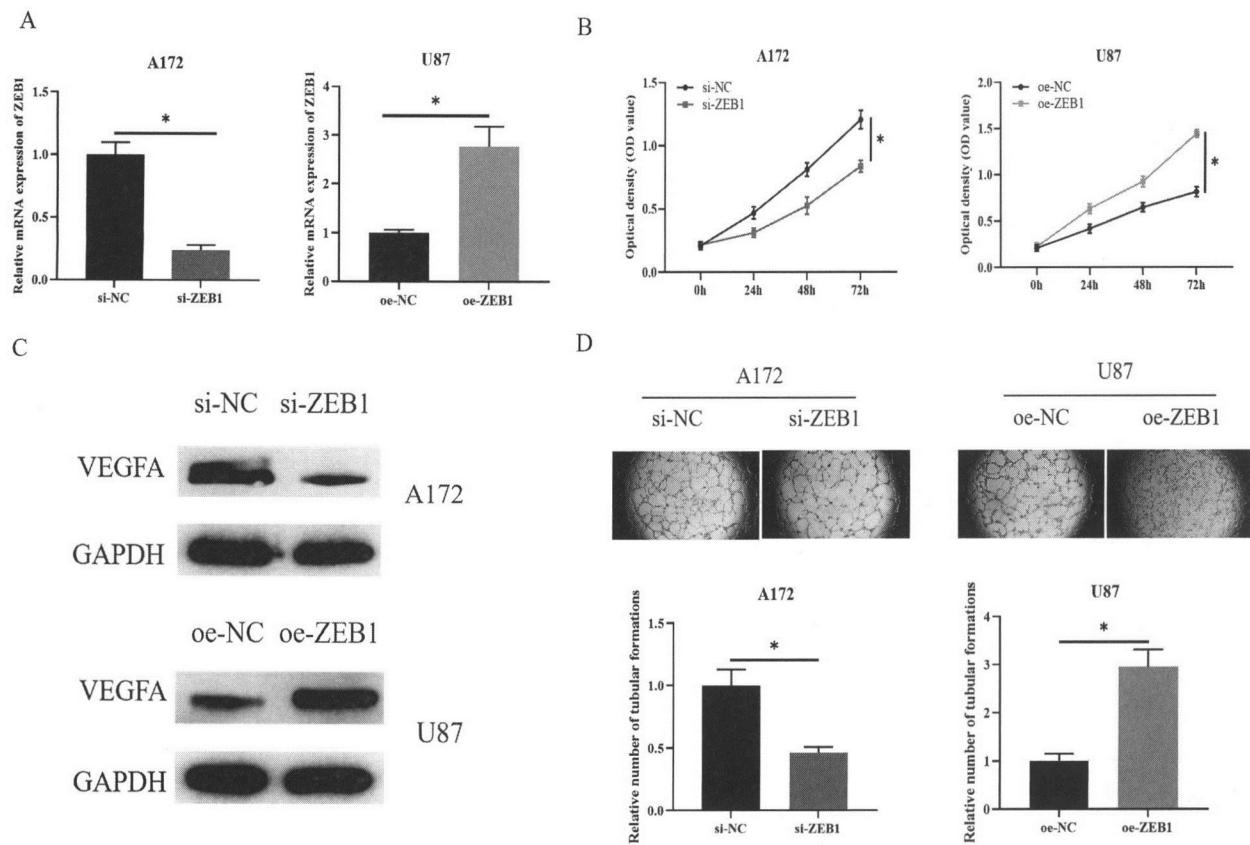


注:A:Expression of ZEB1 in gliomas and adjacent tissues;B:The expression of ZEB1 in four glioma cell lines(U373,A172,U87 and U251)and normal human brain glial cells(HEB)was detected by qRT-PCR;\* $P<0.050$ 。

图1 ZEB1在脑胶质瘤异常上调

**2.2 过表达ZEB1促进脑胶质瘤细胞增殖和血管生成:**qRT-PCR结果显示,ZEB1沉默表达后A172细胞的ZEB1表达水平显著低于对照组( $P=0.0002$ );ZEB1过表达后U87细胞的ZEB1表达水平显著高于对照组( $P=0.0017$ )(图2A)。CCK-8结果显示ZEB1沉默表达后A172细胞的增殖能力显著低于对照组( $P=0.0018$ );ZEB1过表达后U87细胞的增殖能力显著高于对照组( $P<0.0001$ )(图2B)。Western blot结

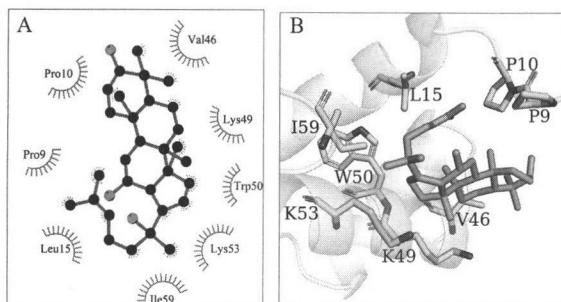
果显示,与对照组比较,ZEB1沉默表达细胞中VEGFA的蛋白表达水平显著降低,而ZEB1过表达细胞中VEGFA的蛋白表达水平显著增加(图2C)。血管形成实验结果显示,相较于对照组,si-ZEB1处理显著抑制了血管形成( $P=0.0024$ ),oe-ZEB1处理显著促进了血管形成( $P=0.0010$ )(图2D)。以上结果表明,过表达ZEB1可显著促进脑胶质瘤细胞的增殖和血管生成能力。



注:A:qRT-PCR experiment to verify the transfection efficiency of ZEB1;B:CCK-8 assay was used to determine the cell viability of cells in different treatment groups;C:Western blot was used to detect the protein expression level of VEGFA in cells in different treatment groups;D:Detection of angiogenesis in HUVECs treated with different conditioned medium;\* $P<0.050$ 。

图2 过表达ZEB1促进脑胶质瘤细胞增殖和血管生成

**2.3 GS-Rd是ZEB1的潜在靶向药物:**见图3。

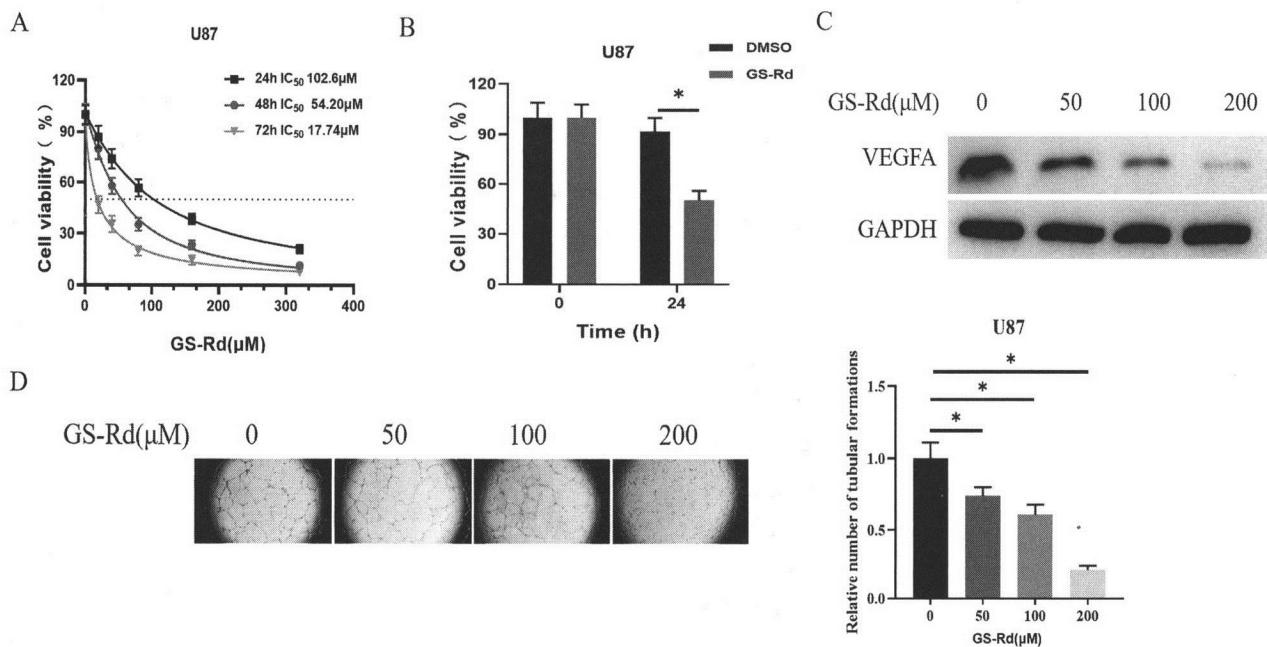


注:A:Combination mode diagram of GS-Rd and ZEB1;B:The 3D molecular docking model is used to simulate the binding mode of GS-Rd and ZEB1.

图3 GS-Rd是ZEB1的潜在靶向药物

生物信息学模拟结果表明GS-Rd与ZEB1的结合可能性较大。通过计算机模拟,可视化GS-Rd与ZEB1具有潜在结合关系(图3A-3B)。推测GS-Rd是ZEB1的潜在靶向药物。

**2.4 GS-Rd抑制脑胶质瘤细胞增殖和血管生成:**CCK-8结果显示,U87在GS-Rd中24 h、48 h和72 h的IC50值分别为102.6  $\mu$ M、54.20  $\mu$ M和17.74  $\mu$ M(图4A)。细胞杀伤实验结果显示,与单独使用DMSO比较,GS-Rd处理显著抑制了U87细胞活力( $P=0.0019$ )(图4B)。Western blot结果显示,不同浓度(50  $\mu$ M、100  $\mu$ M和200  $\mu$ M)的GS-Rd处理24 h均显著抑制了VEGFA的蛋白表达(图4C)。血管形成实验结果显示,GS-Rd处理以剂量依赖性方式显著抑制HUVEC细胞血管形成( $P<0.01$ )(图4D)。以上结果表明,GS-Rd可显著抑制脑胶质瘤细胞增殖和血管形成。

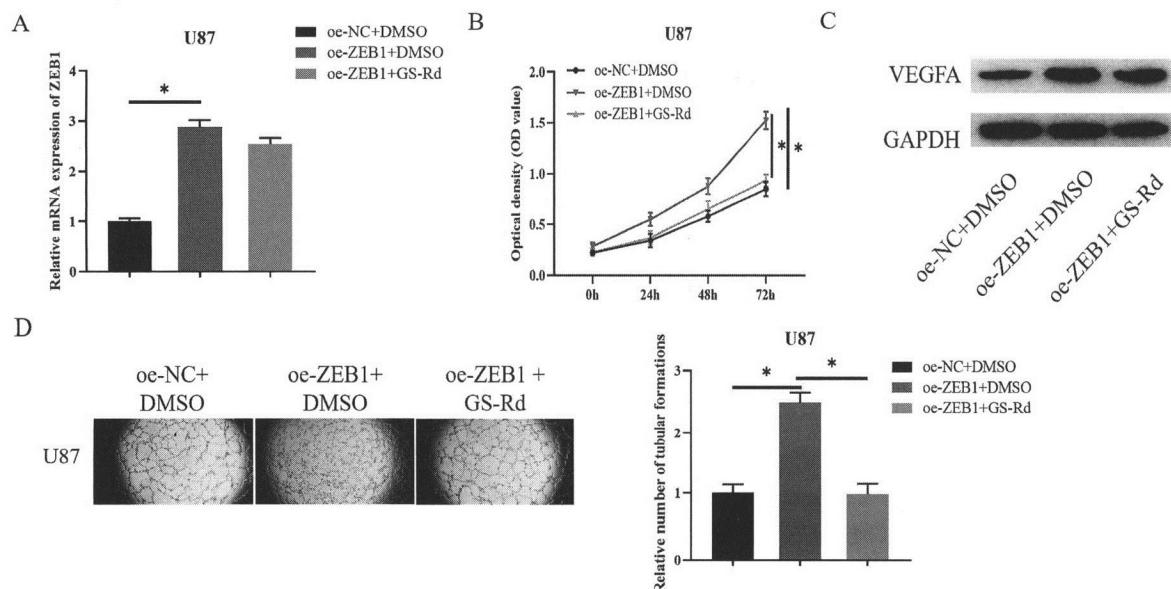


注:A:U87细胞被暴露于GS-Rd的增加浓度(100 μM)24 h,48 h和72 h分别,并且GS-Rd对人胶质瘤细胞的IC<sub>50</sub>值由CCK-8测定;B:用GS-Rd(100 μM)或DMSO处理U87细胞24 h,用CCK-8测定人胶质瘤U87细胞的活力;C:Western blot被用于检测在GS-Rd(0 μM,50 μM,100 μM,200 μM)处理24 h后VEGFA蛋白表达水平;D:检测HUVECs在GS-Rd(0 μM,50 μM,100 μM,200 μM)处理24 h后的血管生成,\*P<0.050。

图4 GS-Rd抑制脑胶质瘤细胞增殖和血管生成

2.5 GS-Rd可以抑制ZEB1引起的脑胶质瘤增殖和血管生成:qRT-PCR结果显示,与oe-NC+DMSO组相比,oe-ZEB1+DMSO组ZEB1 mRNA表达水平显著增高( $P<0.0001$ ) (图5A)。CCK-8分析结果显示,GS-Rd处理后显著抑制了ZEB1过表达脑胶质瘤细胞的增殖能力( $P=0.0006$ ) (图5B)。Western blot结果显示,与oe-NC+DMSO组比较,oe-ZEB1+DMSO组细胞中VEGFA的蛋白表达水平显著增

加,而与oe-ZEB1+DMSO组比较,oe-ZEB1+GS-Rd组细胞中VEGFA的表达水平明显降低(图5C)。血管形成实验结果显示,相较于oe-NC+DMSO组,oe-ZEB1+DMSO组HUVECs血管生成能力显著增强( $P=0.0012$ ),而相较于oe-ZEB1+DMSO组,oe-ZEB1+GS-Rd组HUVECs血管生成能力显著减弱( $P=0.0017$ ) (图5D)。GS-Rd可显著抑制ZEB1诱导的脑胶质瘤细胞增殖和血管生成。



注:A:检测ZEB1 mRNA表达水平;B:不同治疗组细胞活力由CCK-8方法测定;C:Western blot被用于检测不同治疗组VEGFA蛋白表达水平;D:不同条件培养液中HUVECs的血管生成被检测,\*P<0.050。

图5 GS-Rd可以抑制ZEB1引起的脑胶质瘤增殖和血管生成

### 3 讨论

血管生成是产生肿瘤相关新生血管的生理过程,由促血管生成因子和抗血管生成因子的正常平衡控制。研究表明,VEGFA是最显著的促血管生成因子之一,在促进多种人类肿瘤的血管生成中起着至关重要的作用。由于恶性脑胶质瘤具有很强的血管侵袭性,因此,揭示脑胶质瘤血管生成的分子机制对于个体化治疗具有重要意义。

ZEB1是EMT过程中的重要转录因子,参与胚胎发育、纤维化和肿瘤进展等多种生命过程。在血管生成的相关研究中,Rong Fu等<sup>[4]</sup>研究表明内皮细胞ZEB1的缺失可减少H型血管形成。Xia等<sup>[5]</sup>研究表明lncRNA FGD5-AS1通过结合miR-454-3p上调ZEB1增加VEGFA的表达,从而促进非小细胞肺癌的血管生成。该研究证实了ZEB1在脑胶质瘤中发挥促癌作用。细胞功能实验结果显示,ZEB1促进脑胶质瘤细胞增殖和血管生成,与前人的研究结果一致。另外,有研究研究表明ZEB1在肿瘤中受到人参提取物的调控。例如,人参皂苷Rg3在鼻咽癌细胞中抑制了ZEB1的表达<sup>[6]</sup>。该研究通过生信分子对接研究表明GS-Rd是ZEB1的潜在靶向药物。

人参皂甙Rd化学式为C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub>·3H<sub>2</sub>O,是从中草药人参中分离出来的生物活性化学物质,可在抗炎、抗衰老、神经保护中发挥重大作用,对乳腺癌、宫颈癌、胃癌、结直肠癌等具有显著的抗增殖、转移,促凋亡作用。研究表明,在人脑胶质瘤中,GS-Rd可能通过抑制端粒酶活性,下调Bcl-2和hTERT的表达来抑制人神经胶质瘤U251细胞的增殖并促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。最近,Liu等<sup>[8]</sup>研究表明GS-Rd通过上调miR-144-5p表达抑制胶质母细胞瘤细胞增殖。该研究表明GS-Rd以时间和剂量依赖的方式抑制人胶质瘤细胞株的细胞活力,并且GS-Rd的处理显著减少了HUVEC管状结构的形成,与前人研究一致。我们在进一步的探究中表明用GS-Rd处理ZEB1过表达的脑胶质瘤细胞后,脑胶质瘤细胞的增殖和血管生成能力明显受到抑制。由此可知,GS-Rd可能是一种有前途的抗血管生成药物,在人类脑胶质瘤中具有显著的抗肿瘤活性。

综上所述,该研究证实了GS-Rd通过抑制ZEB1的表达抑制脑胶质瘤细胞的增殖和血管生成,首次揭示了GS-Rd调节ZEB1在脑胶质瘤细胞血管生成过程中的作用。由于该

研究仅在细胞水平对GS-Rd/ZEB1在脑胶质瘤血管生成中的作用进行了初步探究,尚未在动物水平和临床水平进行验证,这是该研究的不足之处。未来本团队将进一步寻找GS-Rd/ZEB1轴调控的下游信号通路,并通过动物实验和临床试验深入探究GS-Rd/ZEB1轴在脑胶质瘤中的功能。该研究结果不仅为脑胶质瘤的血管生成提供了新的机制,而且为脑胶质瘤的抗血管生成治疗提供了潜在的靶点。

### 参考文献:

- [1] Liu L,Tong Q,Liu S,et al.ZEB1 Upregulates VEGF Expression and Stimulates Angiogenesis in Breast Cancer [J].PLoS One, 2016,11(2):e0148774.
- [2] Chen L,Zhang K,Shi Z,et al.A lentivirus-mediated miR-23b sponge diminishes the malignant phenotype of glioma cells in vitro and in vivo [J].Oncol Rep,2014,31(4):1573-1580.
- [3] Yao H,Hou G,Wang QY,et al.LncRNA SPRY4-IT1 promotes progression of osteosarcoma by regulating ZEB1 and ZEB2 expression through sponging of miR-101 activity [J].Int J Oncol,2020,56(1):85-100.
- [4] Fu R,Lv WC,Xu Y,et al.Endothelial ZEB1 promotes angiogenesis-dependent bone formation and reverses osteoporosis [J].Nat Commun,2020,11(1):460.
- [5] Xia Y,Wang WC,Shen WH,et al.Thalidomide suppresses angiogenesis and immune evasion via lncRNA FGD5-AS1/miR-454-3p/ZEB1 axis-mediated VEGFA expression and PD-1/PD-L1 checkpoint in NSCLC [J].Chem Biol Interact,2021(349):109652.
- [6] Wang D,Wu C,Liu D,et al.Ginsenoside Rg3 Inhibits Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Suppresses Epithelial Mesenchymal Transition [J].Biomed Res Int,2019(2019):8407683.
- [7] Gu B,Wang J,Song Y,et al.The inhibitory effects of ginsenoside Rd on the human glioma U251 cells and its underlying mechanisms [J].J Cell Biochem,2019,120(3):4444-4450.
- [8] Liu GM,Lu TC,Sun ML,et al.Ginsenoside Rd Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Up-Regulating the Expression of miR-144-5p [J].Biol Pharm Bull,2020,43(10):1534-1541.

(收稿日期:2022-11-08)

本文编辑:宋雨