

JSH-23联合Stattic靶向NF- κ B和STAT3双信号转导通路抑制胶质瘤细胞增殖和迁移实验研究

任泉 李佳博 王旭亚 张锦浩 张一鸣 范吉康 易立 张辰 于圣平 杨学军

【摘要】 目的 探讨JSH-23联合Stattic靶向抑制核因子- κ B(NF- κ B)和信号转导与转录激活因子3(STAT3)双信号转导通路对间质型胶质母细胞瘤细胞增殖和迁移能力以及NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白表达的影响。方法 自肿瘤基因组学图谱计划官网下载529例胶质瘤患者转录组测序结果,生物信息学分析RelA/P65和STAT3与间质型胶质母细胞瘤标志物的相关性,以及NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白在间质型、经典型和前神经型胶质母细胞瘤中的表达。体外培养的人胶质瘤细胞系U87MG和U251MG分别经JSH-23、Stattic、JSH-23和Stattic联合处理,细胞毒性实验计算两种药物的半数抑制浓度(IC₅₀),药物协同实验评估两种药物的协同作用;CCK-8法和平板克隆实验检测肿瘤细胞增殖能力,细胞划痕实验和Transwell实验检测肿瘤细胞迁移能力,Western blotting法检测NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白P65、磷酸化P65(p-P65)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)以及CD44的相对表达量。结果 (1)生物信息学分析显示,RelA/P65 mRNA和STAT3 mRNA与间质型胶质母细胞瘤标志物CD44、CXCR4、CHI3L1、IL-4R、TRADD呈正相关($r = 0.206 \sim 0.605$,均 $P < 0.01$),且间质型胶质母细胞瘤NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白表达水平最高、经典型其次、前神经型最低。(2)细胞毒性实验显示,JSH-23对U87MG和U251MG细胞的IC₅₀为59.39和56.21 $\mu\text{mol/L}$,Stattic为0.96和1.08 $\mu\text{mol/L}$ 。药物协同实验显示,JSH-23为40~80 $\mu\text{mol/L}$ 以及Stattic为0.50~1 $\mu\text{mol/L}$ 时对U87MG细胞的协同效应最高,JSH-23为40 $\mu\text{mol/L}$ 以及Stattic为1 $\mu\text{mol/L}$ 时对U251MG细胞的协同效应最高,并且最终确定JSH-23的终浓度为60 $\mu\text{mol/L}$,Stattic为1 $\mu\text{mol/L}$ 。(3)经JSH-23、Stattic、JSH-23和Stattic联合处理后,U87MG和U251MG细胞增殖活性降低(均 $P = 0.000$),集落形成率减少(均 $P = 0.000$),细胞迁移率降低(均 $P < 0.05$),结晶紫染色阳性细胞数目减少(均 $P = 0.000$),以及P65(均 $P = 0.000$)、p-P65(均 $P = 0.000$)、STAT3(均 $P = 0.000$)、p-STAT3(均 $P = 0.000$)和CD44(均 $P = 0.000$)相对表达量降低,尤以JSH-23和Stattic联合处理后降低最显著(均 $P < 0.01$)。结论 JSH-23联合Stattic靶向抑制NF- κ B和STAT3双通路可以有效抑制间质型胶质母细胞瘤细胞的增殖和迁移能力,并下调NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白的表达。

【关键词】 胶质母细胞瘤; NF- κ B; STAT3转录因子; 细胞增殖; 细胞运动; 肿瘤细胞,培养的

JSH-23 combined with Stattic inhibits proliferation and migration of glioma cells by targeting NF- κ B and STAT3 signaling pathways

REN Xiao¹, LI Jia-bo¹, WANG Xu-ya¹, ZHANG Jin-hao¹, ZHANG Yi-ming¹, FAN Ji-kang¹, YI Li², ZHANG Chen¹, YU Sheng-ping¹, YANG Xue-jun¹

¹Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

²Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

Corresponding author: YANG Xue-jun (Email: ydenny@126.com)

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2022.05.011

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81872063);京津冀基础研究合作专项[项目编号:19JCZDJC64200(Z)]

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经外科(任泉,李佳博,王旭亚,张锦浩,张一鸣,范吉康,张辰,于圣平,杨学军);430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科(易立)

通讯作者:杨学军,Email:ydenny@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of JSH - 23 combined with Stattic targeting inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and signal transducer and activator of transcription factor 3 (STAT3) signaling pathways on the proliferation and migration ability of mesenchymal glioblastoma cells and the expressions of NF- κ B pathway and STAT3 pathway-related proteins. **Methods** The mRNA-seq results of 529 glioma patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA). Bioinformatics was used to analyze the correlation between RelA/P65 and STAT3 and the markers of mesenchymal glioblastoma, as well as the expression of NF- κ B pathway and STAT3 pathway-related proteins in mesenchymal, classical and proneural glioblastoma. The human glioma cell lines U87MG and U251MG in vitro were treated with JSH-23, Stattic, JSH-23 and Stattic, respectively. The half-inhibitory concentration (IC_{50}) of the two drugs was calculated by cytotoxicity assay, and the synergistic effect of the two drugs was observed by drug synergistic assay. CCK-8 assay and colony-forming assay were used to detect the proliferation activity of tumor cells. Wound healing assay and Transwell assay were used to detect the migration ability of tumor cells. Western blotting was used to detect the relative expressions of NF- κ B pathway and STAT3 pathway-related proteins P65, phosphorylated P65 (p-P65), STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and CD44. **Results** 1) Bioinformatics analysis showed that RelA/P65 mRNA and STAT3 mRNA were positively correlated with mesenchymal glioblastoma markers CD44, CXCR4, CHI3L1, IL-4R and TRADD ($r = 0.206-0.605$; $P < 0.01$, for all); the expressions of NF- κ B pathway and STAT3 pathway-related proteins in mesenchymal glioblastoma were the highest, followed by classical glioblastoma, and the lowest in proneural glioblastoma. 2) The cytotoxicity assay showed the IC_{50} of JSH-23 on U87MG and U251MG cells were 59.39 and 56.21 $\mu\text{mol/L}$, and Stattic were 0.96 and 1.08 $\mu\text{mol/L}$. The drug synergistic assay showed that the synergistic effect of JSH-23 at 40-80 $\mu\text{mol/L}$ and Stattic at 0.50-1 $\mu\text{mol/L}$ on U87MG was the highest, and the synergistic effect of JSH-23 at 40 $\mu\text{mol/L}$ and Stattic at 1 $\mu\text{mol/L}$ on U251MG was the highest. The final concentration of JSH-23 was 60 $\mu\text{mol/L}$ and Stattic was 1 $\mu\text{mol/L}$. 3) After the combined treatment of JSH-23, Stattic, JSH-23 and Stattic, the proliferation activity of U87MG and U251MG cells decreased ($P = 0.000$, for all), the colony forming efficiency decreased ($P = 0.000$, for all), the cell mobility decreased ($P < 0.05$, for all), and the positive cell numbers of crystal violet staining decreased ($P = 0.000$, for all). The relative expressions of P65 ($P = 0.000$, for all), p-P65 ($P = 0.000$, for all), STAT3 ($P = 0.000$, for all), p-STAT3 ($P = 0.000$, for all) and CD44 ($P = 0.000$, for all) were decreased, especially after JSH-23 combined with Stattic treatment ($P < 0.01$, for all). **Conclusions** JSH-23 combined with Stattic targeting inhibition of NF- κ B and STAT3 signaling pathways can effectively inhibit the proliferation and migration ability of mesenchymal glioblastoma cells, and down-regulate the relative expressions of NF- κ B pathway and STAT3 pathway-related proteins.

【Key words】 Glioblastoma; NF-kappa B; STAT3 transcription factor; Cell proliferation; Cell movement; Tumor cells, cultured

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872063), and Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Project [No. 19JCZDJC64200 (Z)].

Conflicts of interest: none declared

脑胶质瘤是常见的原发性颅内肿瘤,5年病死率仅次于胰腺癌和肺癌,是难治性和预后极差的肿瘤之一,其中胶质母细胞瘤的恶性程度最高,占原发性中枢神经系统恶性肿瘤的49.1%^[1]。尽管最大程度切除肿瘤并辅以术后同步放化疗和替莫唑胺序贯化疗的标准治疗可以有效延长胶质母细胞瘤患者总生存期(OS),但是中位生存期(MST)仍不足15个月^[2],其5年生存率仅为6.8%^[1]。核因子- κ B (NF- κ B)是一种广泛表达于动物细胞的转录因子,在介导诸多间质分化相关特征中发挥重要作用^[3]。哺乳动物NF- κ B家族包括5种蛋白,即RelA/P65、RelB、c-Rel、NF- κ B1/P50以及NF- κ B2/P52。业已证实NF- κ B信号转导通路参与胶质瘤的发生、发展、

转移等多个过程,尤其在间质型胶质母细胞瘤中异常激活,具有显著抑制细胞凋亡的作用^[4]。JSH-23是一种NF- κ B转录活性抑制剂,相对分子质量为 240.34×10^3 ,通过抑制P65核转运发挥抗胶质母细胞瘤作用^[5]。信号转导与转录激活因子3(STAT3)是多种癌基因信号转导通路激活的关键节点,在正常细胞中的激活十分短暂,但在50%~90%的肿瘤细胞中呈持续激活状态,特别是胶质母细胞瘤的STAT3通路激活最显著^[6],有66%~83%的胶质母细胞瘤STAT3通路呈持续激活状态^[7-8]。Stattic为非肽类小分子STAT3抑制剂,相对分子质量为 211.19×10^3 ,通过阻止Tyr705位点STAT3磷酸化有效抑制STAT3二聚体激活和核易位^[9],与Polo样激

酶1(PLK1)抑制剂联合应用可以通过抑制Myc蛋白而促进胶质母细胞瘤细胞凋亡^[10]。NF- κ B通路和STAT3通路均在胶质母细胞瘤中异常激活,单独抑制其中一条通路无法达到有效治疗目的,而且与单药治疗相比,药物联合治疗可发挥协同作用,减少药物剂量和不良反应。鉴于此,本研究探究JSH-23和Stattic靶向抑制NF- κ B和STAT3双通路能否改善胶质母细胞瘤细胞表型,进而抑制肿瘤进展。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞来源 人胶质瘤细胞系U87MG和U251MG购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,以含体积分数为10%胎牛血清(FBS)的DMEM完全培养基置于37℃、含5%二氧化碳的恒温培养箱中培养,每2天更换培养液,3~4d进行传代培养。

2. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:JSH-23(规格:5 mg)和Stattic(规格:25 mg)由美国Selleck Chemicals公司提供;DMEM培养基为美国Gibco公司产品;RIPA溶液、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)、磷酸酶抑制剂、BCA蛋白定量试剂盒和体积分数为2.5%的结晶紫染色液均购自北京索莱宝生物科技有限公司;I抗工作液包括兔抗人P65、磷酸化P65(p-P65)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)和CD44单克隆抗体(均1:1000),购自美国Cell Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG II抗(1:3000)和山羊抗鼠IgG II抗(1:5000)购自北京中山金桥生物技术有限公司;CCK-8试剂盒由北仁化学科技(北京)有限公司提供。(2)仪器与设备:含5%二氧化碳的恒温培养箱为美国Thermo Fisher Scientific公司产品,Synergy 2多功能酶标仪(精密度:0.001 OD)由美国BioTek公司提供,PowerPac HC电泳仪(精密度:电流1 mA,电压1 V,功率1 W)由美国Bio-Rad公司提供,IX73倒置显微镜(精密度:×600)为美国Olympus公司产品,G:BOX Chemi XT4化学发光/荧光/凝胶成像系统(分辨率420万像素)购自英国Syngene公司。

二、实验方法

1. 生物信息学分析 肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)数据从其官网(<https://cancergenome.nih.gov/>)下载,包含529例胶质瘤患者转录组测序

(mRNA-seq)结果,Pearson相关分析验证RelA/P65和STAT3与间质型胶质母细胞瘤标志物CD44、CXCR4、CHI3L1、白细胞介素-4受体(IL-4R)和TRADD的相关性,采用R语言ClusterProfiler包分析NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白在间质型、经典型和前神经型胶质母细胞瘤中的表达水平。

2. 药物毒性实验与协同实验 分别将U87MG和U251MG细胞接种于96孔板,每组3个复孔,每孔细胞数2000个,恒温培养箱孵育12 h。以不含胶质瘤细胞的空白孔作为空白对照组,不添加JSH-23或Stattic的胶质瘤细胞作为正常对照组。(1)药物毒性实验:培养细胞更换JSH-23终浓度为2.50、5、10、20、40、80和160 μ mol/L或者Stattic终浓度为0.25、0.50、1、2、4、8和16 μ mol/L的DMEM完全培养基。各组细胞均置于恒温培养箱中孵育72 h,更换为100 μ l不含胎牛血清的DMEM培养基,随即每孔加入CCK-8试剂10 μ l孵育1 h,酶标仪测定450 nm处光密度值(OD值)并计算细胞抑制率[细胞抑制率(%)=(正常对照孔OD_{450nm}-实验孔OD_{450nm})/(正常对照孔OD_{450nm}-空白对照孔OD_{450nm}) \times 100%],采用GraphPad Prism 8软件(<http://www.graphpad.com/>)绘制细胞抑制率与药物浓度的标准曲线,并计算JSH-23或Stattic的半数抑制浓度(IC₅₀)。(2)药物协同实验:培养细胞分别以JSH-23终浓度为10、20、40、80、160 μ mol/L和Stattic终浓度为0.25、0.50、1、2、4 μ mol/L两两混合,以不同浓度的两种药物联合处理细胞,恒温培养箱孵育72 h,每孔加入CCK-8试剂10 μ l继续孵育1 h,酶标仪测定OD_{450nm}值。采用Bliss独立模型评估药物协同效应,分别计算实际联合抑制率(F)和预测联合抑制率(P),F(%)=(正常对照孔OD_{450nm}-实验孔OD_{450nm})/(正常对照孔OD_{450nm}-空白对照孔OD_{450nm}) \times 100%,P(%)=F(J)+F(S)-F(J) \times F(S),其中F(J)为JSH-23单药实际抑制率、F(S)为Stattic单药实际抑制率;再计算Bliss值,Bliss值=F值-P值,Bliss值为正表示协同作用、为负表示拮抗作用、为零表示仅简单叠加,以Bliss值 \geq 15%表示联合用药具有协同作用^[11-12]。

3. CCK-8法检测肿瘤细胞增殖活性 分别将U87MG和U251MG细胞接种于96孔板,每组3个复孔,每孔细胞数2000个,分别以JSH-23(终浓度为60 μ mol/L)、Stattic(终浓度1 μ mol/L)以及JSH-23和Stattic联合处理细胞,置于恒温培养箱中孵育,于药物处理后第0、1、2、3和4天同一时间加入CCK-8试

剂 10 μl 孵育 1 h, 以不添加 JSH-23 或 Stattic 的胶质瘤细胞作为正常对照组, 酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。采用 GraphPad Prism 8 软件绘制肿瘤细胞增殖活性与药物治疗时间的标准曲线。

4. 平板克隆实验检测肿瘤细胞集落形成率 分别将 U87MG 和 U251MG 细胞接种于 6 孔板, 每组设 3 个复孔, 每孔细胞数为 500 个, 细胞贴壁生长后分别予 JSH-23(终浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$)、Stattic(终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 JSH-23 和 Stattic 联合处理细胞, 置恒温培养箱中培养 14 d 以形成细胞集落, 以不添加 JSH-23 或 Stattic 的胶质瘤细胞作为正常对照组; 倾倒入培养基, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 浸洗 2 次, 室温下以体积分数为 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min, 2.5% 结晶紫染色液染色 5 min, 流动的双蒸水缓慢洗去染色液, 空气干燥。于光学显微镜下拍照, 采用 Image J 软件 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) 计数细胞集落数并计算集落形成率 [集落形成率 (%) = 细胞集落数 / 接种细胞数 \times 100%]。

5. 细胞划痕实验检测肿瘤细胞迁移率 将传代的 U87MG 和 U251MG 细胞分别接种于 6 孔板, 每组设 3 个复孔, 每孔细胞数为 150×10^3 个, 以 JSH-23(终浓度 60 $\mu\text{mol/L}$)、Stattic(终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 JSH-23 和 Stattic 联合处理细胞, 以不添加 JSH-23 或 Stattic 的胶质瘤细胞作为正常对照组。待细胞生长覆盖孔板底, 以 1 ml 无菌吸管尖端垂直于孔板划横线, 各孔间尽量减少划痕距离的误差, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 更换新鲜的 DMEM 完全培养基, 恒温培养箱孵育 48 h, 光学显微镜下测量孵育 48 h 时的细胞间距并计算细胞迁移率 [细胞迁移率 (%) = (细胞间距 0 h - 细胞间距 48 h) / 细胞间距 0 h \times 100%]。

6. Transwell 实验检测肿瘤细胞结晶紫染色阳性细胞数目 将传代的 U87MG 和 U251MG 细胞分别接种于 24 孔板, 每组设 3 个复孔, 每孔细胞数 10×10^3 个, 以 JSH-23(终浓度 60 $\mu\text{mol/L}$)、Stattic(终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 JSH-23 和 Stattic 联合处理细胞, 以不添加 JSH-23 或 Stattic 的胶质瘤细胞作为正常对照组。实验组每孔加入 500 μl DMEM 完全培养基, 配制下层培养液, 以趋化肿瘤细胞向下运动; 将 Transwell 小室嵌套于 24 孔板中; 将胰蛋白酶消化的 U87MG 或 U251MG 细胞加入不含血清的 DMEM 培养基中吹打均匀为细胞悬液, 配制上层培养液。各孔自上层培养液取 300 μl (细胞数 10×10^3 个) 加入 Transwell 小室, 置恒温培养箱孵育 24 h, 取出

Transwell 小室, 清洗、擦拭、固定, 以 2.5% 结晶紫染色液染色 5 min。于光学显微镜下 ($\times 100$) 拍照, 采用 Image J 软件计数阳性细胞数目, 结晶紫染色呈紫色为阳性细胞。

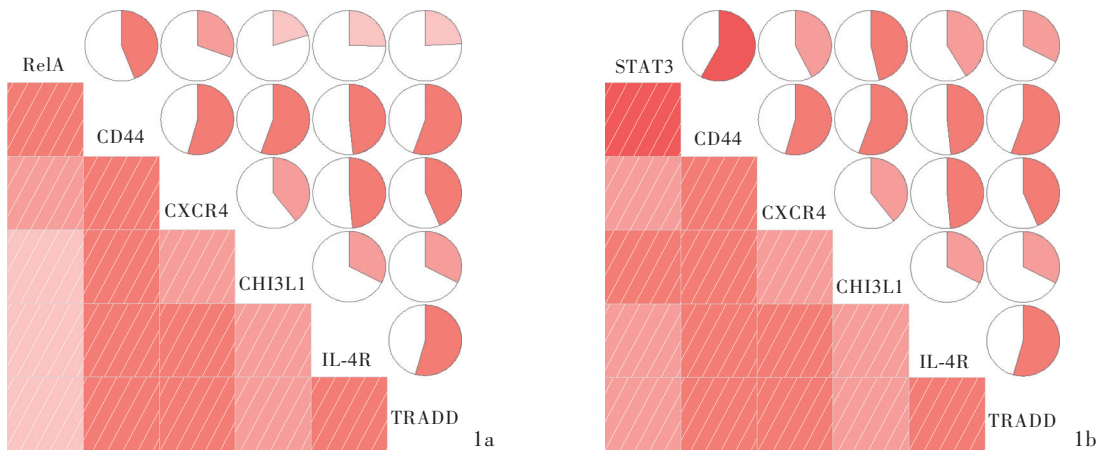
7. Western blotting 法检测 NF- κ B 通路和 STAT3 通路相关蛋白相对表达量 将传代的 U87MG 和 U251MG 细胞分别接种于大皿, 当细胞融合度达 60% ~ 70% 时, 分别以 JSH-23(终浓度 60 $\mu\text{mol/L}$)、Stattic(终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 JSH-23 和 Stattic 联合处理细胞, 以不添加 JSH-23 或 Stattic 的胶质瘤细胞作为正常对照组。恒温培养箱培养 72 h, RIPA 裂解液 (PMSF、磷酸酶抑制剂和 RIPA 溶液以 1 : 1 : 100 比例配制) 提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白含量后, 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 转膜, 牛奶封闭后加入 I 抗工作液包括兔抗人 P65、p-P65、STAT3、p-STAT3 以及鼠抗人 β -肌动蛋白 (β -actin), 均 1 : 1000, 再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗 (1 : 3000) 和山羊抗鼠 IgG II 抗 (1 : 5000)。凝胶成像仪采集目的条带, 采用 Image J 软件分析目的蛋白灰度值, 以 β -actin 作为内参照物, 计算目的蛋白相对表达量。

8. 统计分析方法 采用 GraphPad Prism 8.0 软件行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD- t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

生物信息学分析显示, 胶质母细胞瘤患者 RelA/P65 mRNA 和 STAT3 mRNA 与间质型胶质母细胞瘤标志物 CD44 ($r = 0.437, P = 0.000; r = 0.605, P = 0.000$)、CXCR4 ($r = 0.326, P = 0.000; r = 0.413, P = 0.000$)、CHI3L1 ($r = 0.206, P = 0.002; r = 0.485, P = 0.000$)、IL-4R ($r = 0.257, P = 0.001; r = 0.404, P = 0.000$)、TRADD ($r = 0.242, P = 0.001; r = 0.338, P = 0.000$) 均呈正相关关系 (图 1)。间质型、经典型和前神经型胶质母细胞瘤表达矩阵显示, 间质型 NF- κ B 通路和 STAT3 通路相关蛋白表达水平最高, 经典型其次, 前神经型最低且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$, 图 2)。

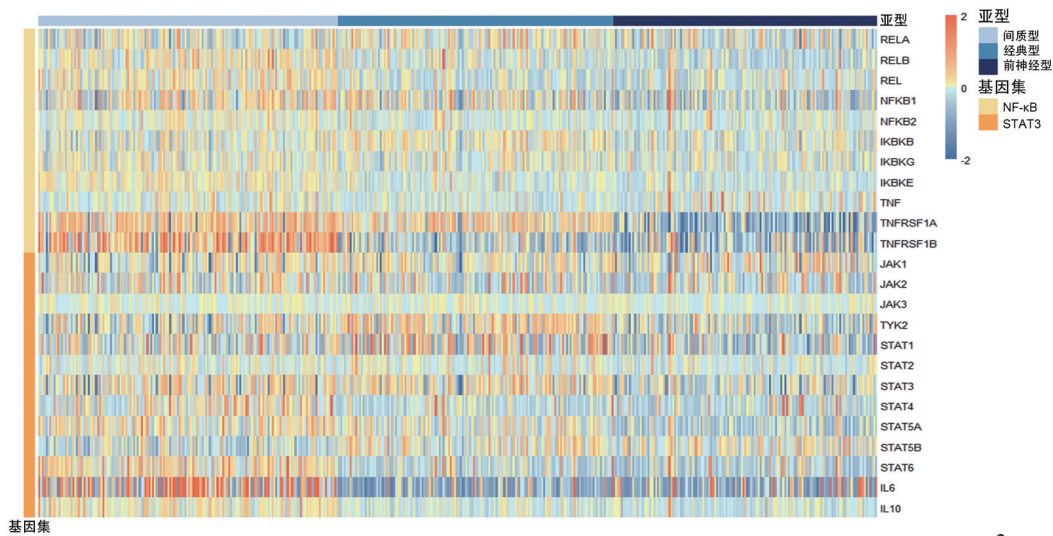
药物毒性实验显示, JSH-23 2.50、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 对 U87MG 和 U251MG 细胞的抑制率



IL-4R, 白细胞介素-4受体; STAT3, 信号转导与转录激活因子3

图1 生物信息学分析所见 1a RelA/P65 mRNA与间质型胶质母细胞瘤标志物CD44、CXCR4、CHI3L1、IL-4R和TRADD呈正相关 1b STAT3 mRNA与间质型胶质母细胞瘤标志物CD44、CXCR4、CHI3L1、IL-4R和TRADD呈正相关

Figure 1 Bioinformatics analysis findings RelA/P65 mRNA was positively correlated with the markers of glioblastoma: CD44, CXCR4, CHI3L1, IL-4R and TRADD (Panel 1a). STAT3 mRNA was positively correlated with markers of glioblastoma: CD44, CXCR4, CHI3L1, IL-4R and TRADD (Panel 1b).



NF-κB, 核因子-κB; STAT3, 信号转导与转录激活因子3

图2 表达矩阵显示NF-κB通路和STAT3通路相关蛋白在间质型、经典型以及前神经型胶质母细胞瘤中的表达分布

Figure 2 The expression matrix showed the distribution of NF-κB pathway and STAT3 pathway related proteins in mesenchymal, classical and proneural glioblastoma.

分别为(2.97 ± 0.78)%和(4.19 ± 2.14)%、(5.43 ± 1.22)%和(8.28 ± 0.80)%、(9.55 ± 1.09)%和(12.70 ± 1.72)%、(17.55 ± 1.49)%和(23.24 ± 0.80)%、(34.97 ± 1.46)%和(42.48 ± 1.97)%、(60.90 ± 3.19)%和(56.14 ± 1.56)%、(80.36 ± 1.64)%和(78.72 ± 1.37)% ,其IC₅₀分别为59.39和56.21 μmol/L; Stattic 0.25、0.50、1、2、4、8、16 μmol/L对U87MG和U251MG细胞的抑制率为(4.29 ± 0.17)%和(2.67 ± 0.93)%、

(20.85 ± 0.97)%和(12.09 ± 1.25)%、(51.17 ± 1.37)%和(50.62 ± 0.97)%、(85.28 ± 0.97)%和(76.17 ± 1.16)%、(93.21 ± 0.90)%和(91.96 ± 0.30)%、(97.38 ± 0.21)%和(97.33 ± 1.30)%、(99.98 ± 0.02)%和(99.84 ± 0.16)% ,其IC₅₀分别为0.96和1.08 μmol/L。药物协同实验显示, JSH-23和Stattic均在较大范围内表现出对U87MG和U251MG细胞的协同效应,其中,U87MG细胞在JSH-23为40~80 μmol/L和Stattic为0.50~

1 $\mu\text{mol/L}$ 时获得最高协同效应, U251MG 在 JSH-23 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 Stattic 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时获得最高协同效应, 结合两种药物对 U87MG 和 U251MG 细胞的 IC_{50} , 最终选择 JSH-23 60 $\mu\text{mol/L}$ 和 Stattic 1 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的药物终浓度。

CCK-8 法显示, 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性差异有统计学意义 ($P = 0.000, 0.000$; 表 1); 与正常对照组相比, JSH-23 组、Stattic 组和 JSH-23 + Stattic 组肿瘤细胞增殖活性均降低 (均 $P = 0.000$), 尤以 JSH-23 + Stattic 组降低最显著 (均 $P = 0.000$, 表 2)。表明经 JSH-23 和 Stattic 联合处理后, 胶质瘤细胞增殖能力显著降低。

平板克隆实验显示, 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞集落形成率差异有统计学意义 ($P = 0.000, 0.000$; 表 3); 与正常对照组相比, JSH-23 组、Stattic 组和 JSH-23 + Stattic 组肿瘤细胞集落形成率均减少 (均 $P = 0.000$), 尤以 JSH-23 + Stattic 组减少最显著 (均 $P = 0.000$; 表 4, 图 3)。该结果亦表明经 JSH-23 和 Stattic 联合处理后, 胶质瘤细胞增殖能力显著降低。

细胞划痕实验显示, 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞迁移率差异具有统计学意义 ($P = 0.000, 0.000$; 表 5); 与正常对照组相比, JSH-23 组 ($P = 0.005, 0.004$)、Stattic 组 ($P = 0.001, 0.018$) 以及 JSH-23 + Stattic 组 ($P = 0.000, 0.000$) 细胞迁移率均降低, 特别是 JSH-23 + Stattic 组降低最显著 (均 $P < 0.05$, 表 6)。表明经 JSH-23 和 Stattic 联合处理后, 胶质瘤细胞迁移能力显著降低。

Transwell 实验显示, 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞结晶紫染色阳性细胞数目差异有统计学意义 ($P = 0.000, 0.000$; 表 7); 与正常对照组相比, JSH-23 组、Stattic 组和 JSH-23 + Stattic 组阳性细胞数目均减少 (均 $P = 0.000$), 尤以 JSH-23 + Stattic 组减少最为显著 (均 $P = 0.000$; 表 8, 图 4)。该结果亦表明经 JSH-23 和 Stattic 联合处理后, 胶质瘤细胞迁移能力显著降低。

Western blotting 法显示, 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞 P65 ($P = 0.000, 0.000$)、p-P65 ($P = 0.000, 0.000$)、STAT3 ($P = 0.004, 0.000$)、p-STAT3 ($P = 0.001, 0.001$) 和 CD44 ($P = 0.000, 0.000$) 蛋白相对表达量差异均有统计学意义 (表 9, 10); 与正常对照组相比, JSH-23 组、Stattic 组和 JSH-23 + Stattic 组细胞 P65 (均 $P = 0.000$)、p-P65 (均 $P = 0.000$)、STAT3

(均 $P = 0.000$)、p-STAT3 (均 $P = 0.000$) 和 CD44 (均 $P = 0.000$) 相对表达量下降, 尤以 JSH-23 + Stattic 组下降最显著 (均 $P < 0.01$; 表 11, 12; 图 5)。表明经 JSH-23 和 Stattic 联合处理后, NF- κ B 通路和 STAT3 通路相关蛋白相对表达量显著下降。

讨 论

胶质母细胞瘤的分子分型包括经典型、前神经型和间质型^[13], 前神经型预后最好; 间质型预后最差, 表现出高度缺氧坏死和炎症反应等特点, 并常发生上皮间质转化 (EMT)^[14]。同一胶质瘤的不同区域可以表现出不同的亚型特征, 如血管周围肿瘤细胞主要为前神经型, 缺氧坏死区主要为间质型; 一种亚型可以随着时间的推移发生恶性进展, 向另一种亚型转化。Phillips 等^[15]指出, 部分前神经型胶质母细胞瘤复发时可向表型更恶性的间质型转化。因此, 胶质母细胞瘤的分子分型是对所有肿瘤细胞亚型特征在时间和空间基础上加权的结果。

NF- κ B 作为转录因子, 在间质型胶质母细胞瘤中呈高表达, 可以有效调控下游基因的表达, 其结构性激活对肿瘤的发生、发展具有重要影响。STAT3 作为诸多致癌信号转导通路的汇聚点, 亦在间质型胶质母细胞瘤中呈高表达, 可以通过上调 VasoRin 表达以激活 Notch1, 进而促使胶质母细胞瘤的发生^[16], 因此认为, 靶向抑制 STAT3 通路是一种有应用前景的治疗策略。NF- κ B 通路和 STAT3 通路是间质型胶质母细胞瘤中激活较显著的通路, 主导并参与包括表型维持、上皮间质转化、肿瘤干细胞特性维持和自我更新、免疫抑制性微环境等在内的生物学行为^[17]。本研究生物信息学分析显示, 间质型胶质母细胞瘤 NF- κ B 通路和 STAT3 通路表达水平最高; Western blotting 法也显示, 药物联合靶向 NF- κ B 和 STAT3 双通路后间质型胶质母细胞瘤生物学标志物 CD44 表达量显著降低。

NF- κ B 通路和 STAT3 通路在间质型胶质母细胞瘤中异常激活, 靶向单一通路无法达到抗肿瘤效果, 究其原因, 可能是由于肿瘤异常激活的信号转导通路众多、单药剂量较大导致药物毒性增加、单药长期应用导致耐药等。因此, 本研究采用药物联合抑制 NF- κ B 和 STAT3 双通路以治疗间质型胶质母细胞瘤。JSH-23 和 Stattic 作为 NF- κ B 通路和 STAT3 通路抑制剂, 具有相对分子质量较小、脂溶性较好等特点, 可透过血-脑屏障, 故采用 JSH-23 联合

表1 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性的比较 ($\bar{x} \pm s, OD_{450\text{nm}}$)

Table 1. Comparison of proliferation activity of U87MG and U251MG cells in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, OD_{450\text{nm}}$)

组别	样本数*	U87MG	U251MG
正常对照组(1)	3	1.13 ± 0.01	2.22 ± 0.08
JSH-23组(2)	3	0.61 ± 0.01	1.50 ± 0.05
Stattic组(3)	3	0.49 ± 0.02	1.18 ± 0.05
JSH-23 + Stattic组(4)	3	0.24 ± 0.01	0.66 ± 0.03
F值		3482.000	419.100
P值		0.000	0.000

*2000 cells per well at inoculation, 接种时每孔细胞数为 2000 个

表3 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞集落形成率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3. Comparison of colony forming efficiency of U87MG and U251MG cells in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本数*	U87MG	U251MG
正常对照组(1)	3	18.73 ± 1.14	20.73 ± 1.47
JSH-23组(2)	3	8.87 ± 1.10	6.47 ± 0.61
Stattic组(3)	3	7.80 ± 0.72	9.20 ± 0.60
JSH-23 + Stattic组(4)	3	1.93 ± 0.50	1.73 ± 0.50
F值		177.700	247.800
P值		0.000	0.000

*500 cells per well at inoculation, 接种时每孔细胞数为 500 个

表2 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞增殖活性的两两比较

Table 2. Pairwise comparison of proliferation activity of U87MG and U251MG cells in different treatment groups

组间两两比	U87MG		U251MG	
	t值	P值	t值	P值
(1):(2)	83.654	0.000	13.790	0.000
(1):(3)	61.335	0.000	19.559	0.000
(1):(4)	163.401	0.000	33.310	0.000
(2):(3)	10.960	0.000	7.190	0.002
(2):(4)	51.809	0.000	23.576	0.000
(3):(4)	22.099	0.000	14.579	0.000

表4 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞集落形成率的两两比较

Table 4. Pairwise comparison of colony forming efficiency of U87MG and U251MG cells in different treatment groups

组间两两比	U87MG		U251MG	
	t值	P值	t值	P值
(1):(2)	10.794	0.000	15.484	0.000
(1):(3)	14.063	0.000	12.551	0.000
(1):(4)	23.398	0.000	21.126	0.000
(2):(3)	1.403	0.233	5.528	0.005
(2):(4)	9.916	0.000	10.356	0.000
(3):(4)	11.555	0.000	16.513	0.000

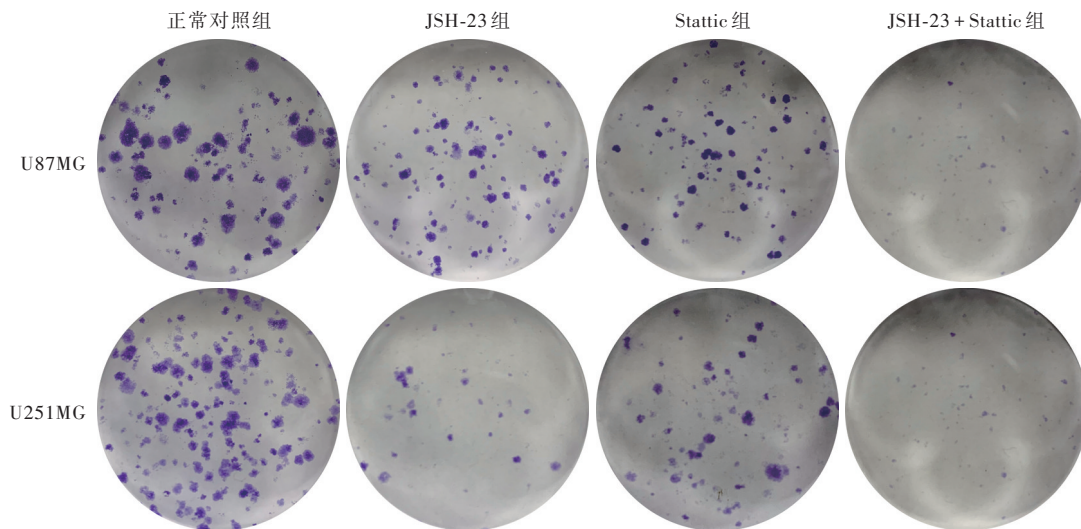


图3 平板克隆实验,经JSH-23和Stattic联合处理的U87MG和U251MG细胞集落形成率显著减少 结晶紫染色
Figure 3 Colony-forming assay showed that the colony forming efficiency of U87MG and U251MG cells was significantly reduced by JSH-23 and Stattic combined treatment. Crystal violet staining

Stattic精准靶向抑制NF-κB和STAT3双通路。本研究药物毒性实验显示,JSH-23对U87MG和U251MG细胞的IC50分别为59.39和56.21 μmol/L, Stattic为

0.96和1.08 μmol/L;药物协同实验显示,JSH-23为40~80 μmol/L和Stattic为0.50~1 μmol/L对U87MG细胞的协同效应最高,JSH-23为40 μmol/L和Stattic

表 5 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞迁移率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 5. Comparison of cell mobility of U87MG and U251MG cells in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本数*	U87MG	U251MG
正常对照组(1)	3	61.41 ± 1.88	89.73 ± 5.16
JSH-23组(2)	3	47.95 ± 3.83	57.47 ± 8.10
Stattic组(3)	3	42.63 ± 3.30	71.07 ± 6.60
JSH-23 + Stattic组(4)	3	25.42 ± 2.94	25.73 ± 6.12
F 值		70.450	50.370
P 值		0.000	0.000

*150 × 10³ cells per well at inoculation, 接种时每孔细胞数 150 × 10³ 个

表 7 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞结晶紫染色阳性细胞数目的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{个}$)

Table 7. Comparison of positive cell numbers of crystal violet staining of U87MG and U251MG cells in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \text{number}$)

组别	样本数*	U87MG	U251MG
正常对照组(1)	3	67.67 ± 2.52	98.67 ± 5.51
JSH-23组(2)	3	26.00 ± 2.00	22.33 ± 1.16
Stattic组(3)	3	20.00 ± 2.65	39.67 ± 2.52
JSH-23 + Stattic组(4)	3	3.00 ± 1.00	5.00 ± 1.00
F 值		493.300	509.800
P 值		0.000	0.000

*10 × 10³ cells per well at inoculation, 接种时每孔细胞数 10 × 10³ 个

表 6 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞迁移率的两两比较

Table 6. Pairwise comparison of cell mobility of U87MG and U251MG cells in different treatment groups

组间两两比	U87MG		U251MG	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1):(2)	5.268	0.005	5.818	0.004
(1):(3)	8.557	0.001	3.858	0.018
(1):(4)	17.833	0.000	13.845	0.000
(2):(3)	1.821	0.143	2.253	0.087
(2):(4)	8.078	0.001	5.412	0.006
(3):(4)	6.736	0.003	8.719	0.001

表 8 不同处理组 U87MG 和 U251MG 细胞结晶紫染色阳性细胞数目的两两比较

Table 8. Pairwise comparison of positive cell numbers of crystal violet staining of U87MG and U251MG cells in different treatment groups

组间两两比	U87MG		U251MG	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1):(2)	22.451	0.000	23.495	0.000
(1):(3)	22.610	0.000	16.876	0.000
(1):(4)	41.361	0.000	28.893	0.000
(2):(3)	3.133	0.035	10.843	0.000
(2):(4)	17.816	0.000	19.654	0.000
(3):(4)	10.410	0.000	22.173	0.000

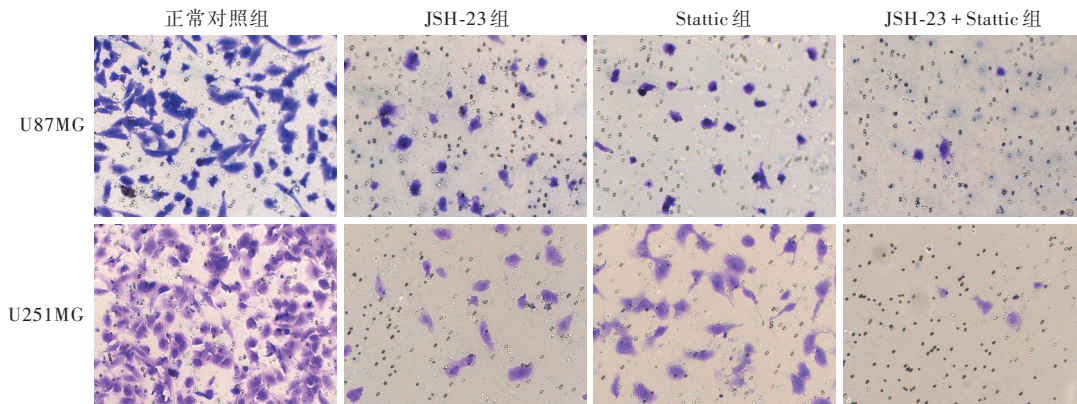


图 4 光学显微镜观察显示,经 JSH-23 和 Stattic 联合处理的 U87MG 和 U251MG 细胞阳性细胞数目显著减少 结晶紫染色 中倍放大

Figure 4 Light microscopy showed the number of positive cells in U87MG and U251MG cells treated with JSH-23 and Stattic decreased significantly Crystal violet staining Median power magnified

为 1 μmol/L 对 U251MG 细胞的协同效应最高,故认为, JSH-23 联合 Stattic 靶向抑制 NF-κB 和 STAT3 双通路可对胶质母细胞瘤产生协同抑制作用,并确定 JSH-23 的终浓度为 60 μmol/L 和 Stattic 为 1 μmol/L。进一步的 CCK-8 法和平板克隆实验显示, JSH-23、

Stattic 以及 JSH-23 和 Stattic 联合处理 U87MG 和 U251MG 细胞后,肿瘤细胞增殖活性降低、集落形成率减少,尤以 JSH-23 和 Stattic 联合处理后增殖活性和集落形成率最低,表明二者联合可以有效抑制肿瘤细胞的增殖;细胞划痕实验和 Transwell 实验显

表 9 不同处理组 U87MG 细胞 P65、p-P65、STAT3、p-STAT3 和 CD44 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 9. Comparison of relative expressions of P65, p-P65, STAT3, p-STAT3 and CD44 proteins in U87MG cells treated with different drugs ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数*	P65	p-P65	STAT3	p-STAT3	CD44
正常对照组(1)	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
JSH-23组(2)	3	0.500 ± 0.001	0.583 ± 0.017	0.721 ± 0.017	0.752 ± 0.032	0.426 ± 0.036
Stattic组(3)	3	0.927 ± 0.004	0.856 ± 0.022	0.549 ± 0.016	0.551 ± 0.004	0.724 ± 0.010
JSH-23 + Stattic组(4)	3	0.349 ± 0.017	0.198 ± 0.001	0.378 ± 0.047	0.398 ± 0.030	0.079 ± 0.007
<i>F</i> 值		4508.000	2962.000	279.300	570.300	1881.000
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.004	0.001	0.000

*300 × 10³ cells per well at inoculation, 接种时每孔细胞数 300 × 10³ 个。p-P65, phosphorylated P65, 磷酸化 P65; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3, 信号转导与转录激活因子 3; p-STAT3, phosphorylated STAT3, 磷酸化 STAT3。The same for tables below

表 10 不同处理组 U251MG 细胞 P65、p-P65、STAT3、p-STAT3 和 CD44 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 10. Comparison of relative expressions of P65, p-P65, STAT3, p-STAT3 and CD44 proteins in U251MG cells treated with different drugs ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数*	P65	p-P65	STAT3	p-STAT3	CD44
正常对照组(1)	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
JSH-23组(2)	3	0.474 ± 0.140	0.353 ± 0.017	0.950 ± 0.009	0.828 ± 0.012	0.420 ± 0.001
Stattic组(3)	3	0.740 ± 0.016	0.487 ± 0.008	0.917 ± 0.010	0.766 ± 0.023	0.634 ± 0.014
JSH-23 + Stattic组(4)	3	0.277 ± 0.014	0.253 ± 0.029	0.420 ± 0.015	0.555 ± 0.018	0.267 ± 0.019
<i>F</i> 值		1854.000	1099.000	2133.000	408.400	2072.000
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

表 11 不同处理组 U87MG 细胞 P65、p-P65、STAT3、p-STAT3 和 CD44 蛋白相对表达量的两两比较

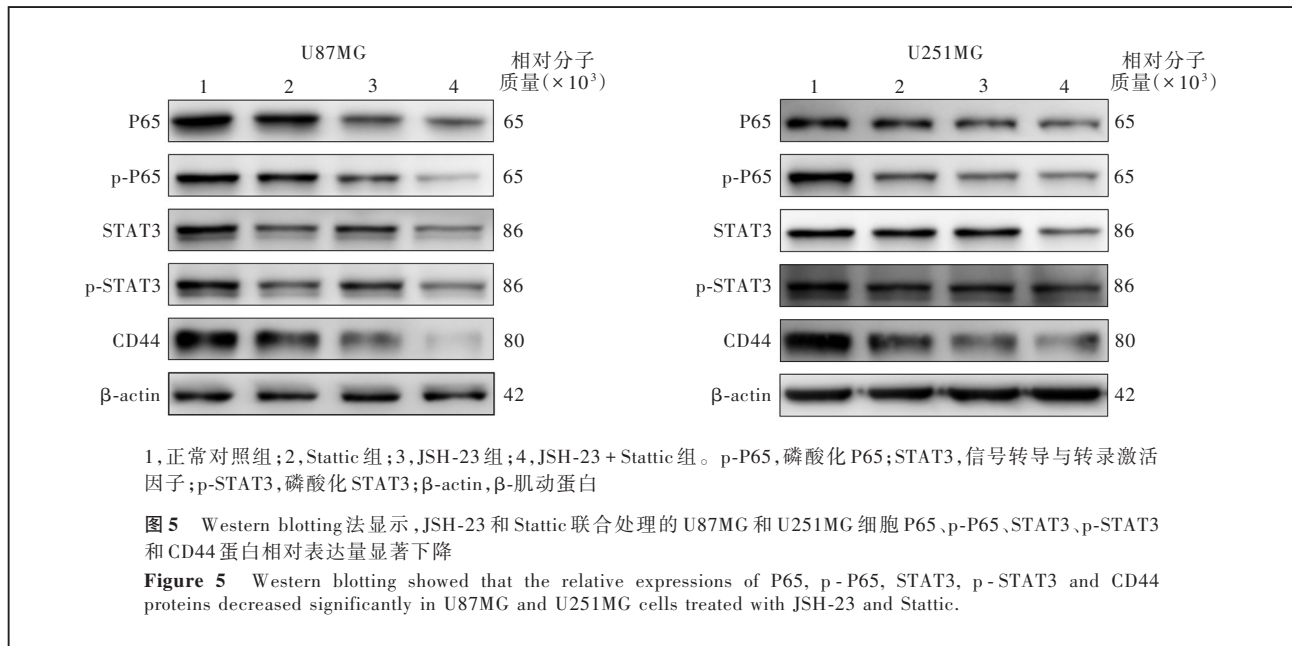
Table 11. Pairwise comparison of relative expressions of P65, p-P65, STAT3, p-STAT3 and CD44 proteins in U87MG cells between different treatment groups

组间两两比	P65		p-P65		STAT3		p-STAT3		CD44	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	1219.032	0.000	41.967	0.000	27.973	0.000	13.533	0.000	27.515	0.000
(1):(3)	35.513	0.000	11.454	0.000	47.696	0.000	218.810	0.000	46.716	0.000
(1):(4)	66.428	0.000	1431.759	0.000	22.763	0.000	34.893	0.000	218.920	0.000
(2):(3)	202.961	0.000	17.011	0.000	12.495	0.000	10.885	0.000	13.764	0.000
(2):(4)	15.450	0.000	38.631	0.000	11.790	0.000	14.043	0.000	16.277	0.000
(3):(4)	57.702	0.000	52.161	0.000	5.923	0.004	8.789	0.001	89.006	0.000

表 12 不同处理组 U251MG 细胞 P65、p-P65、STAT3、p-STAT3 和 CD44 蛋白相对表达量的两两比较

Table 12. Pairwise comparison of relative expressions of P65, p-P65, STAT3, p-STAT3 and CD44 proteins in U251MG cells between different treatment groups

组间两两比	P65		p-P65		STAT3		p-STAT3		CD44	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	64.925	0.000	67.294	0.000	9.498	0.000	25.675	0.000	1327.096	0.000
(1):(3)	28.169	0.000	112.070	0.000	13.773	0.000	17.378	0.000	44.217	0.000
(1):(4)	90.886	0.000	44.027	0.000	68.082	0.000	43.362	0.000	65.221	0.000
(2):(3)	21.677	0.000	12.588	0.000	4.166	0.014	4.086	0.015	25.866	0.000
(2):(4)	17.325	0.000	5.140	0.007	52.965	0.000	22.263	0.000	13.552	0.000
(3):(4)	38.001	0.000	13.328	0.000	47.553	0.000	12.515	0.000	26.282	0.000



示,经JSH-23、Stattic以及JSH-23和Stattic联合处理U87MG和U251MG细胞后,肿瘤细胞迁移率降低、结晶紫染色阳性细胞数目减少,尤以JSH-23和Stattic联合处理后迁移率和阳性细胞数目最低,表明二者联合可有效抑制肿瘤细胞的迁移;Western blotting法显示,JSH-23、Stattic以及JSH-23和Stattic联合处理U87MG和U251MG细胞后,NF- κ B通路和STAT3通路相关蛋白P65、p-P65、STAT3、p-STAT3和CD44相对表达量下降,尤以JSH-23和Stattic联合处理后上述蛋白相对表达量最低,表明二者联合可以通过抑制P65磷酸化和核易位以阻止间质型胶质母细胞瘤的进展。

本研究U87MG和U251MG细胞均属人星形细胞胶质瘤细胞系,细胞系年久多变,故前期检测中行细胞短串联重复序列(STR)鉴定,与美国模式培养物集存库(ATCC)中细胞STR数据匹配率达100%。Cheng等^[18]指出,U87MG细胞是一种被标记为间质型恶性胶质瘤的细胞系,故认为其属于间质型胶质母细胞瘤细胞系;同时,U87MG和U251MG细胞均高表达CD44,故认为二者均属间质型胶质母细胞瘤细胞系。JSH-23联合Stattic靶向抑制NF- κ B和STAT3双通路治疗胶质母细胞瘤的策略,不仅抑制肿瘤细胞增殖和迁移等自身特性,更精确到胶质母细胞瘤分子分型,为胶质瘤的个体化治疗提供了新的靶点和策略。然而,JSH-23和Stattic目前仍属实验用药,尚未正式应用于临床,本研究仅为针对胶质母细胞的体外实验,后续将进一步探究NF- κ B

和STAT3通路下游基因的共同表达情况,同时建立裸鼠实验模型以验证联合用药的效果,以为胶质母细胞瘤的治疗策略提供新的思考。此外,本研究的生物信息学分析仅限于TCGA数据库,尚无国内临床数据,后续将收集国内胶质瘤数据进一步研究。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014–2018[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(12 Suppl 2):iii1-105.
- [2] Aliferis C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: pathogenesis and treatment[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 152:63-82.
- [3] Yamini B. NF- κ B, mesenchymal differentiation and glioblastoma [J]. *Cells*, 2018, 7:125.
- [4] Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, Wang S, Gumin J, Raj D, Kodama Y, Raghunathan A, Olar A, Joshi K, Pelloski CE, Heimberger A, Kim SH, Cahill DP, Rao G, Den Dunnen WFA, Boddeke HWGM, Phillips HS, Nakano I, Lang FF, Colman H, Sulman EP, Aldape K. Mesenchymal differentiation mediated by NF - κ B promotes radiation resistance in glioblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24:331-346.
- [5] Hu YH, Jiao BH, Wang CY, Wu JL. Regulation of temozolomide resistance in glioma cells via the RIP2/NF- κ B/MGMT pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27:552-563.
- [6] Li JB, Tong LQ, Yi L, Liu PD, Xie Y, Wang XY, Yang XJ. ACT001 inhibits the neurosphere formation and stemness maintenance of U87 - MG glioma stem cells through STAT3 signaling pathway [J]. *Zhonghua Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2019, 35:1160-1166.[李佳博,童鹿青,易立,刘沛东,解杨,王旭亚,杨学军. ACT001通过STAT3信号通路抑制U87-MG胶质瘤干细胞的成球能力及干性维持的实验研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2019, 35:1160-1166.]

- [7] Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours [J]. *Nature*, 2010, 463:318-325.
- [8] Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rhee J, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23:839-852.
- [9] Lin L, Jou D, Wang Y, Ma H, Liu T, Fuchs J, Li PK, Lü J, Li C, Lin J. STAT3 as a potential therapeutic target in ALDH⁺ and CD44⁺/CD24⁺ stem cell-like pancreatic cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49:2265-2274.
- [10] Wang H, Tao Z, Feng M, Li X, Deng Z, Zhao G, Yin H, Pan T, Chen G, Feng Z, Li Y, Zhou Y. Dual PLK1 and STAT3 inhibition promotes glioblastoma cells apoptosis through MYC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533:368-375.
- [11] Hammerlindl H, Ravindran Menon D, Hammerlindl S, Emran AA, Torrano J, Sproesser K, Thakkar D, Xiao M, Atkinson VG, Gabrielli B, Haass NK, Herlyn M, Krepler C, Schaidler H. Acetylsalicylic acid governs the effect of sorafenib in RAS-mutant cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24:1090-1102.
- [12] Zhao W, Sachsenmeier K, Zhang L, Sult E, Hollingsworth RE, Yang H. A new bliss independence model to analyze drug combination data [J]. *J Biomol Screen*, 2014, 19:817-821.
- [13] Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, Satani N, Martinez - Ledesma E, Zheng S, Chang E, Gabriel Sauvé CE, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB, Sulman EP, Nam DH, Verhaak RGW. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33:152.
- [14] Zeng Y, Xiao HL, Guo QN. Progress in the mechanism of mesenchymal transformation in glioblastoma [J]. *Zhen Duan Bing Li Xue Za Zhi*, 2019, 26:533-538. [曾英, 肖华亮, 郭乔楠. 胶质母细胞瘤上皮间叶转化机制研究进展 [J]. *诊断病理学杂志*, 2019, 26:533-538.]
- [15] Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9:157-173.
- [16] Fan M, Pfeffer LM. The STAT3 and hypoxia pathways converge on Vasorin to promote stemness and glioblastoma tumorigenesis through Notch1 stabilization [J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5:35.
- [17] Yi L, Guo GC, Li JB, Fan XG, Li T, Tong LQ, Liu PD, Wang XY, Yuan F, Yu SQ, Huang Q, Yang XJ. IKBKE, a prognostic factor preferentially expressed in mesenchymal glioblastoma, modulates tumoral immunosuppression through the STAT3/PD-L1 pathway [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10:e130.
- [18] Cheng W, Zhang C, Ren X, Jiang Y, Han S, Liu Y, Cai J, Li M, Wang K, Liu Y, Hu H, Li Q, Yang P, Bao Z, Wu A. Bioinformatic analyses reveal a distinct Notch activation induced by STAT3 phosphorylation in the mesenchymal subtype of glioblastoma [J]. *J Neurosurg*, 2017, 126:249-259.

(收稿日期:2022-05-07)

(本文编辑:彭一帆)

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2022.05.018

· 读者 · 作者 · 编者 ·

更正:胶质母细胞瘤复发与假性进展功能磁共振成像研究进展**Erratum to Progress of fMRI on the recurrence and pseudoprogression in glioblastoma**

由于作者本人疏忽,特申请将《中国现代神经疾病杂志》2022年第22卷第4期“胶质母细胞瘤复发与假性进展功能磁共振成像研究进展”^[1]第319页作者单位:300350 天津市环湖医院医学影像科(冯全志,韩彤),天津市脑血管与神经变性重点实验室(韩彤)改为300350 天津大学环湖医院医学影像科(冯全志、韩彤),天津市脑血管与神经变性重点实验室(韩彤);英文作者单位¹Department of Medical Imaging, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China 改为¹Department of Medical Imaging, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin University, Tianjin 300350, China。特此更正。

参考文献

- [1] 冯全志, 韩彤. 胶质母细胞瘤复发与假性进展功能磁共振成像研究进展 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2022, 22:319-325. [Feng QZ, Han T. Progress of fMRI on the recurrence and pseudoprogression in glioblastoma [J]. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2022, 22:319-325.]

天津大学环湖医院医学影像科 冯全志 韩彤