·论　著·

栀子苷增强miR-376b-3p的A-to-I编辑抑制糖酵解从而遏制胶质母细胞瘤恶性进展的体内外研究

武树超，王　博，魏志玄，宋　宇，崔群建，谢宗新

南阳医学高等专科学校第一附属医院神经外科，河南 南阳 473000

［**摘要**］ 背景和目的：胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）具有侵袭性强、复发率高及患者预后极差等特点，深入探索新的有效靶点及抗GBM活性成分，对改善患者预后具有重大意义。腺苷转化成肌苷（adenosine-to-inosine，A-to-I）编辑是转录后修饰的重要形式，在肿瘤发生、发展中扮演着关键角色，但其在GBM中的作用机制及能否作为药物干预靶点尚不清楚。栀子苷是从中药栀子中提取的主要活性成分，具有抗肿瘤潜力。本研究旨在探究栀子苷是否通过调控miR-376b-3p的A-to-I编辑遏制GBM恶性进展，并阐明其分子机制，为GBM治疗提供新策略。**方法：**采用高通量测序定量分析2021年10月—2024年10月在南阳医学高等专科学校第一附属医院就诊的32例GBM患者的癌组织及配对癌旁组织的miR-376b-3p水平，并分析其与RNA依赖性腺苷脱氨酶2（adenosine deaminase acting on RNA type 2，ADAR2）表达及患者预后的相关性。通过体外实验，采用细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）、克隆形成实验、EdU细胞增殖实验、Transwell侵袭实验、划痕实验、葡萄糖消耗、乳酸、细胞能量代谢分析检测栀子苷对人GBM细胞系（U87和U251）增殖、迁移、侵袭及糖酵解功能的影响。结合蛋白质印迹法（Western blot）、定点突变技术和双萤光素酶报告基因实验解析ADAR2介导的miR-376b-3p编辑机制及靶基因转换。采用BALB/c裸鼠（雄性，4~6周龄，每组6只，采用随机数字表法分组）建立裸鼠移植瘤模型评估栀子苷联合编辑型miR-376b-3p的体内抑瘤效应。本研究临床样本收集获南阳医学高等专科学校第一附属医院伦理委员会批准（批号：IRB-Y-L2025139），动物实验获动物伦理委员会批准（批号：IACUC-FJABR-2025022058）。**结果：**临床分析显示，GBM中A-to-I编辑水平与*ADAR2*表达呈正相关性（R^2=0.466，*P*<0.001），且高编辑患者生存期延长（*P*=0.028）。栀子苷显著抑制GBM细胞增殖率、侵袭细胞数量及划痕实验的愈合率并重编程糖酵解代谢（*P*<0.001），其机制为特异性上调*ADAR2*表达，促进miR-376b-3p的A-to-I编辑。机制上，A-to-I编辑使miR-376b-3p靶基因从抑癌因子*CBX7*转换为促癌因子*TMX2*（双萤光素酶报告基因实验证实结合改变，*P*<0.001），导致糖酵解关键通路抑制。*TMX2*过表达可逆转栀子苷联合编辑型miR-376b-3p的抑瘤作用，体内实验进一步证实联合治疗能最大程度地抑制肿瘤生长（*P*<0.001）并下调己糖激酶2（hexokinase 2，HK2）、丙酮酸激酶M2（pyruvate kinase M2，PKM2）和葡萄糖转运蛋白1（glucose transporter 1，GLUT1）的表达。**结论：**栀子苷通过激活ADAR2介导的miR-376b-3p A-to-I编辑，驱动靶基因由*CBX7*向*TMX2*转换，抑制糖酵解重编程从而遏制GBM进展，有望为确立基于RNA编辑的GBM治疗策略提供新的线索。

［**关键词**］ 栀子苷；miR-376b-3p；腺苷转化成肌苷编辑；胶质母细胞瘤；糖酵解

中图分类号：R739.41　**文献标志码：**A

基金项目：河南省二〇二五年科技发展计划项目（252102310070）。

利益冲突：作者声明无利益冲突。

伦理批件：IRB-Y-L2025139，IACUC-FJABR-2025022058。

知情同意：有。

引用本文：武树超, 王　博, 魏志玄, 等. 栀子苷增强miR-376b-3p的A-to-I编辑抑制糖酵解从而遏制胶质母细胞瘤恶性进展的体内外研究［J］. 中国癌症杂志, 2026, 36(5): 436-448.

CC协议：CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: 2025 Henan Provincial Science and Technology Development Program (252102310070).

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: IRB-Y-L2025139, IACUC-FJABR-2025022058.

Informed consent: available.

Cite this article: WU S C, WANG B, WEI Z X, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on geniposide suppressing malignant progression of glioblastoma by enhancing miR-376b-3p A-to-I editing to inhibit glycolysis［J］. Chin Oncol, 2026, 36(5): 436-448.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.05.002

***In vivo* and *in vitro* studies on geniposide suppressing malignant progression of glioblastoma by enhancing miR-376b-3p A-to-I editing to inhibit glycolysis**

WU Shuchao, WANG Bo, WEI Zhixuan, SONG Yu, CUI Qunjian, XIE Zongxin (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan Province, China)

Correspondence to: WU Shuchao E-mail: wushuaoccc@163.com

［**Abstract**］**Background and Purpose:** Glioblastoma (GBM) is characterized by strong invasiveness, high recurrence rate, and extremely poor prognosis. In-depth exploration of new effective targets and anti-GBM active components holds great significance for improving clinical outcomes. Adenosine-to-inosine (A-to-I) editing is a crucial form of post-transcriptional modification and plays a key role in tumorigenesis and progression. However, its mechanistic role in GBM and its potential as a target for pharmacological intervention remain unclear. Geniposide, the primary active compound extracted from the traditional Chinese medicine *Gardenia jasminoides*, has shown anti-tumor potential. This study aimed to investigate whether geniposide suppresses GBM progression by regulating A-to-I editing of miR-376b-3p and elucidate the underlying molecular mechanisms. **Methods:** High-throughput sequencing was used to quantitatively analyze the editing levels of miR-376b-3p in cancer tissues and paired adjacent non-tumor tissues from 32 GBM patients treated at The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College from October 2021 to October 2024. The correlation of these editing levels with the expression of adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) and patient prognosis was further analyzed. *In vitro* assays evaluated geniposide's effects on GBM cell (U87 and U251) proliferation, migration, invasion and glycolytic metabolism using cell counting kit-8 (CCK-8), colony formation assays, EdU cell proliferation assays, Transwell invasion assays, scratch assays, glucose consumption, lactate measurement and cellular energy metabolism analysis. Mechanistic studies involving Western blot, site-directed mutagenesis, and dual-luciferase reporter assays deciphered *ADAR2*-mediated miRNA editing and target switching. A nude mouse xenograft tumor model was established using BALB/C nude mice (male, 4-6 weeks old, n=6 per group, grouped by random number table) to evaluate the *in vivo* anti-tumor effect of geniposide combined with edited miR-376b-3p agomir. The study was approved by the Ethics Committee of First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College (approval number: IRB-Y-L2025139) for clinical samples, and by the Animal Ethics Committee (approval number: IACUC-FJABR-2025022058) for animal experiments. **Results:** Clinical analysis showed that the A-to-I editing level in GBM was positively correlated with *ADAR2* expression (R^2=0.466, P<0.001), and patients with high editing had prolonged survival (P=0.028). Geniposide significantly inhibited the proliferation rate of GBM cells, the number of invasive cells, and the healing rate in scratch assays by reprogramming glycolytic metabolism GBM cells (P<0.001). Its mechanism is to specifically upregulate *ADAR2* expression, thereby promoting A-to-I editing of miR-376b-3p. Mechanistically, A-to-I editing switched miR-376b-3p targeting from the tumor suppressor *CBX7* to the oncogene *TMX2* (dual luciferase assay confirmed altered binding, P<0.001), leading to inhibition of the key glycolysis pathway. *TMX2* overexpression reversed the anti-tumor effects of geniposide combined with edited miR-376b-3p. *In vivo* experiments further confirmed that the combination therapy can most effectively inhibit tumor growth (P<0.001) and downregulate the expression of hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), and glucose transporter 1 (GLUT1). **Conclusion:** Geniposide activates ADAR2-mediated A-to-I editing of miR-376b-3p, redirecting its targeting from *CBX7* to *TMX2* to inhibit glycolytic reprogramming and GBM progression. These findings may provide a novel clue for developing RNA editing-based therapies for GBM.

［**Key words**］Geniposide; miR-376b-3p; Adenosine-to-inosine editing; Glioblastoma; Glycolysis

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤，占所有恶性脑肿瘤的50%以上，在中国年发病率为5~10例/10万人[1]。其中，胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）的恶性程度最高，具有侵袭性强、复发率高及患者预后极差等特点，患者的5年生存率不足10%[2]。目前的标准治疗方式为手术切除联合放化疗，但因肿瘤的浸润性生长及血脑屏障限制，疗效有限且易复发。GBM的分子病理学机制复杂，涉及多个基因突变及表观遗传调控异常。因此，深入探索新的有效靶点及抗GBM活性成分，并阐明其作用机制，对改善患者的临床预后具有重要意义。栀子苷是传统中药栀子的主要环烯醚萜苷类活性成分，具有显著的神经保护、抗炎及抗氧化活性[3-4]。在小鼠缺氧缺血脑损伤模型中，栀子苷通过显著减轻炎症反应发挥神经保护作用，抑制脑组织凋亡、小胶质细胞和星形胶质细胞增殖，从而改善脑损伤[5-6]。近年来研究[7-8]发现，栀子苷可在结肠癌、肝癌等癌症中发挥抗肿瘤活性，但其在GBM中的作用机制尚未明确。

RNA编辑是一种重要的转录后调控机制，由RNA依赖性腺苷脱氨酶（adenosine deaminase acting on RNA type，ADAR）家族酶催化，特异性地将腺苷转化成肌苷（adenosine-to-inosine，

A-to-I），从而改变RNA编码信息，影响蛋白质结构、定位及功能。有研究[9]表明，A-to-I编辑在神经系统发育及功能维持中至关重要。值得注意的是，其在肿瘤（包括GBM）中存在广泛失调，可通过异常编辑关键癌基因、抑癌基因或非编码RNA，参与肿瘤发生、增殖、侵袭、免疫逃逸及治疗抵抗，成为潜在的肿瘤治疗靶点[10]。A-to-I编辑可通过改变miRNA种子序列，重编程其靶基因网络，进而逆转其促癌/抑癌功能[11]。本研究选用免疫缺陷的BALB/c裸鼠作为实验动物，通过皮下移植人源GBM U87细胞系构建异种移植瘤模型。该模型的核心价值在于利用裸鼠T细胞免疫缺陷的特性，能够有效地克服物种间的免疫排斥屏障，使人类肿瘤能够在小鼠体内成功植入并生长，从而为我们提供了一个在活体环境下研究人类肿瘤增殖和对治疗反应的“体内平台”。尽管该模型缺乏完整的人类免疫微环境，但其保留了GBM细胞自身的关键生物学特性，能够直接模拟栀子苷联合编辑型miR-376b-3p对GBM的杀伤或抑制效应。因此，本研究所获得的数据，可为栀子苷联合编辑型miR-376b-3p在GBM患者中的潜在作用提供实验依据，也有助于后续的转化探索，具有一定的临床意义。综上所述，本研究旨在探究栀子苷是否通过介导miR-376b-3p A-to-I编辑，驱动其靶基因转换，进而抑制GBM恶性进展，整合临床样本分析、分子机制解析及动物模型验证，为GBM提供基于RNA编辑调控的新型治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究使用18只无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级BALB/c裸鼠［雄性，4~6周龄，北京药康生物科技有限公司，批号：SCXK（京）2023-0008］；人GBM细胞系U87、T98G、LN-229购自美国模式培养物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）（批号：HTB-14，CRL-1690，CRL-2611），U251购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库（批号：SCSP-559），正常人星形胶质细胞NHA购自美国ScienCell公司（批号：#1801）；栀子苷购自上海宝曼生物科技有限公司，纯度≥98%。

1.2 临床样本

选取2021年10月—2024年10月在南阳医学高等专科学校第一附属医院就诊的32例GBM患者作为研究对象。GBM癌组织及配对癌旁组织（距肿瘤边缘>3 cm）样本均来源于南阳医学高等专科学校第一附属医院2020年批准的“神经肿瘤生物样本库”项目（批号：IRB-Y-L2020251）所收集的存档样本。在该样本库建立时，所有患者均经病理学检查确诊为GBM并签署针对未来医学研究的知情同意书。本研究的具体方案于2025年获得南阳医学高等专科学校第一附属医院伦理委员会的审批（批号：IRB-Y-L2025139）。本研究对所有纳入的GBM患者进行了定期随访，以获取患者的总生存期（overall survival，OS）。随访自患者确诊之日起算，通过门诊复查、电话访谈及查阅电子病历系统相结合的方式进行。所有患者在术后第1年每3个月复查随访1次，术后第2年每6个月复查随访1次，术后第3年开始每年随访1次。OS定义为从确诊之日开始计算到患者死亡日期或最后已知存活的日期。

1.3 模型建立

BALB/c裸鼠购入后，在SPF级动物房适应性饲养1周。将5×10^6个U87细胞皮下接种到裸鼠右腋部位，肿瘤体积达100 mm^3后采用随机数字表法将动物随机分组（每组6只）：对照组（生理盐水腹腔注射）、栀子苷组（40 mg/kg腹腔注射，每天1次）和联合组（栀子苷40 mg/kg+瘤内注射ED-miR-376b-3p agomir，每周2次）。每5 d使用游标卡尺监测肿瘤体积（公式：V=0.5×长×宽^2），30 d后将动物麻醉后处死，剥离肿瘤组织并称重，使用游标卡尺测量肿瘤大小的研究人员对分组信息不知情。剂量选择（40 mg/kg）是基于前期体外的半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}）、预实验（包括初步毒性观察如体重变化）以及在类似模型中显示活性的剂量[12]。将小鼠饲养在南阳医学高等专科学校第一附属医院实验动物中心，给予充足的饮用水和食物，正常光照周期（昼、夜各12 h）。根据本实验室前期的预实验结果，体内实验共使用18只裸鼠，成功成瘤且健康状况良好的动物纳入本研究。本研究的18只裸鼠均成功成瘤并完成了整个实验流程，均被纳入最终分析。在整个实验期间，未观察到与栀子苷或agomir处理相关的预期外严重不良反应。任何动物达到以下任一标准即被实施安乐死：① 肿瘤体积超过2 000 mm^3；② 体重下降超过初始体重的20%；③ 出现无法进食、饮水或严重溃疡等情形。为控制潜在混杂因素，动物笼具在饲养架上的位置定期轮换。本研究经动物伦理委员会批准（批号：IACUC-FJABR-2025022058）。

1.4 细胞培养

人GBM细胞系（U87、T98G、LN-229、U251）及正常人星形胶质细胞NHA培养于含10%胎牛血清（批号：10100147C，美国Gibco

公司）、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基（批号：SH30081.01，美国HyClone公司）中（37 ℃、CO_2体积分数为5%），实验均取对数生长期细胞（融合度80%~90%）。

1.5 细胞增殖实验

利用细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）（批号：C0037，上海碧云天生物技术有限公司）检测细胞增殖能力。以3×10^3个细胞/孔的密度接种于96孔板中，用栀子苷（0~160 μmol/L）处理24或48 h，每孔加入10 μL CCK-8试剂，温育2 h后用BioTek Synergy H1酶标仪（美国Agilent公司）检测450 nm处的吸光度（*D*）值。所有实验独立重复至少3次。

1.6 克隆形成实验

为评估栀子苷及miR-376b-3p不同亚型对U87细胞增殖能力的影响，本研究分别进行了药物处理和基因过表达实验。对于药物实验，将处于对数生长期的U87细胞以500个细胞/孔的密度接种于6孔板中，贴壁24 h后，更换为含40 μmol/L栀子苷（实验组）或等体积二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（溶剂对照组）的培养基。为探究miR-376b-3p及其A-to-I编辑的功能，另设实验组，将细胞分别转染阴性对照（NC）、野生型miR-376b-3p或A-to-I编辑型miR-376b-3p，转染24 h后再以相同低密度接种，以确保克隆源于成功转染的单个细胞。所有组别的细胞均置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养，每3 d更换1次相应培养基，持续培养直至对照组出现肉眼可见的克隆。随后终止培养，弃去培养基，用磷酸缓冲盐溶液（phosphate-buffered saline，PBS）轻柔洗涤，以4%多聚甲醛溶液固定15 min，用0.1%结晶紫溶液染色20 min，流水缓慢冲洗并晾干后，计数细胞数≥50的克隆数。所有实验独立重复至少3次。

1.7 EdU实验

将U87细胞以4×10^3个/孔的密度接种于12孔板中，贴壁24 h后，更换为含指定浓度栀子苷（以等体积DMSO作为溶剂对照）的培养基继续处理24 h。对于基因功能探究，则将细胞分为3组，分别转染阴性对照（NC）、A-to-I编辑型miR-376b-3p或野生型miR-376b-3p，转染24 h后以相同密度接种并培养24 h。随后，所有组别的细胞均统一加入10 μmol/L的EdU工作液，于37 ℃温育2 h。弃去培养基，使用4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min，并参照BeyoClick™ EdU试剂盒（批号：ST067，上海碧云天生物技术有限公司）说明书进行点击化学反应以标记增殖细胞。最后，使用DAPI（德国Sigma公司）复染细胞核5 min，通过荧光显微镜随机选取5个视野拍照，并计算EdU阳性细胞数占总细胞数（DAPI阳性）的百分比。所有实验独立重复至少3次。

1.8 划痕实验

为评估细胞迁移能力，将处于对数生长期的U87或U251细胞以5×10^5个/孔的密度接种于6孔板中，于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养至细胞融合度达90%以上，形成致密单层。使用200 μL无菌移液器吸嘴，垂直于板底背面预先标记的横线，用力均匀地划制“井”字形划痕。用PBS轻柔洗涤2次，以去除划痕产生的悬浮细胞。随后更换为无血清培养基继续培养。分别在划痕后立即（0 h）及培养24 h后，于显微镜下相同位置拍摄划痕图像。采用Image J软件测量各时间点的划痕宽度，并按以下公式计算细胞迁移率：迁移率（%）=［（0 h划痕宽度-24 h划痕宽度）/0 h划痕宽度］×100%。所有实验独立重复至少3次。

1.9 Transwell侵袭实验

采用Transwell小室（8.0 μm孔径，批号：3464，美国Corning公司）评估细胞侵袭能力。实验前，将Matrigel基质胶（批号：354234，美国Corning公司）与无血清培养基按1∶8的比例于4 ℃过夜解冻，并于预冷的Transwell小室上室底部均匀铺覆50 μL，置于37 ℃培养箱中固化1 h。将对数生长期的U87细胞重悬于无血清培养基中，以1×10^5个细胞/孔的密度接种于已包被Matrigel的上室。下室中加入含10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的完全培养基作为趋化剂。将培养板置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中继续培养24 h。培养结束后，用棉签小心擦除上室内未侵袭的细胞。穿透至下室面的细胞经4%多聚甲醛溶液固定15 min，用0.1%结晶紫溶液染色20 min。最后，于光学显微镜下随机选取5个视野进行拍照并计数穿膜细胞数。所有实验独立重复至少3次。

1.10 蛋白质印迹法（Western blot）

使用放射免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液（批号：P0013B，上海碧云天生物技术有限公司）提取细胞总蛋白，并通过二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）法（批号：23227，美国Thermo公司）定量，30 μg蛋白经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）（批号：P0014B，上海碧云天生物技术有限公司）电泳，转聚偏二氟乙烯

（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（批号：GVWP04700，德国Millipore公司），用5%脱脂牛奶封闭1 h，一抗4 ℃温育过夜；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记二抗室温下温育2 h，增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）显影，使用ImageJ软件分析灰度值。所有实验独立重复至少3次。

1.11 实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）

使用TRIzol（批号：15596018CN，美国Invitrogen公司）提取各组细胞总RNA，并利用分光光度计来测定RNA的浓度和纯度。取1 μg总RNA，按照PrimeScript RT试剂盒［批号：RR036A，宝日医生物技术（北京）有限公司］说明书逆转录合成cDNA。使用SYBR PrimeScript RTFQ-PCR试剂盒［批号：RR820A，宝日医生物技术（北京）有限公司］进行定量分析。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算表达量。所有实验独立重复至少3次。

1.12 双萤光素酶报告基因实验

为验证野生型及编辑型miR-376b-3p与靶基因的直接相互作用，将包含预测结合位点的*CBX7/TMX2*基因3'-非翻译区（untranslated region，UTR）野生型（WT）片段克隆至pmiRRB-Report™载体（广州锐博生物技术有限公司）上，同时利用定点突变技术构建其结合位点突变（MUT）的质粒作为对照。将培养于24孔板中的HEK-293细胞共转染miRNA模拟物（或阴性对照NC）和报告质粒，并以pRL-TK质粒（表达海肾萤光素酶）作为内参。48 h后用双萤光素酶试剂盒（美国Promega公司）检测萤光素酶活性。所有实验独立重复至少3次。

1.13 *ADAR*突变及miRNA测序

为探究ADAR酶对miRNA的编辑功能，采用定点突变技术构建*ADAR1*（E912A）与*ADAR2*（E396A）的催化活性缺失突变体，经Sanger测序验证后，将野生型及突变体开放阅读框克隆至pHAGE-V5-puromycin慢病毒表达载体。通过共转染HEK-293细胞（载体+包装质粒psPAX2/pMD2.G）生产慢病毒颗粒，收集病毒上清感染GBM细胞系，经嘌呤霉素筛选获得稳定表达株。采用miRNA高通量测序定量分析miRNA的编辑水平变化。所有实验独立重复至少3次。

1.14 细胞能量代谢分析

使用Seahorse XFe96细胞能量代谢分析系统（美国Agilent公司）实时监测细胞耗氧率（oxygen consumption rate，OCR）和细胞外酸化率（extracellular acidification rate，ECAR）。以2×10^4个细胞/孔的密度接种于XFe96板（批号：103794-100，美国Agilent公司）中，处理24 h后，采用XF Glycolysis Stress Test Kit检测基础ECAR、糖酵解能力（10 mmol/L葡萄糖）及糖酵解储备（1 μmol/L寡霉素）。采用XF Cell Mito Stress Test Kit检测OCR。在记录基线OCR后，通过依次向指定加药孔注入寡霉素（2 μmol/L）、羰基氰化物-对-三氟甲氧基苯腙（FCCP，1 μmol/L）和鱼藤酮/抗霉素A（0.5 μmol/L）来检测线粒体功能。在本研究中，所有Seahorse XFe96检测得到的OCR和ECAR数据，均根据实验结束时的细胞数量进行了归一化处理。所有实验独立重复至少3次。

1.15 葡萄糖消耗及乳酸生成

葡萄糖消耗通过葡萄糖检测试剂盒（批号：ab136955，英国Abcam公司）测量。乳酸生成通过乳酸检测试剂盒（批号：93-K327-100，美国Biovision公司）检测。将处于对数生长期的细胞以适当密度接种于12孔板中，经相应处理后继续培养24 h。收集各孔细胞培养上清液，于4 ℃、12 000×*g*离心10 min以去除细胞碎片。随后，严格按照葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒说明书进行操作，分别测定上清液中残余葡萄糖浓度及乳酸浓度。细胞葡萄糖消耗量通过初始培养基葡萄糖浓度减去培养后上清液葡萄糖浓度计算得出。所有实验独立重复至少3次。

1.16 统计学处理

所有统计分析均使用GraphPad Prism 10.4.2软件进行，实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。数据经Shapiro-Wilk检验符合正态分布，两组间比较采用Student's *t*检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验，生存分析用Kaplan-Meier法及Log-rank检验，使用Pearson线性相关系数分析GBM组织中miR-376b-3p编辑水平与ADAR2表达之间的相关性。所有统计学检验均为双侧检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 A-to-I编辑miR-376b-3p临床相关性探索

为探究GBM发生中RNA编辑的潜在作用，我们收集了32例配对的GBM癌组织及其癌旁组织样本。通过检测发现，GBM癌组织中miR-376b-3p的A-to-I编辑水平（11.58±4.05）显著低于配对的癌旁组织（26.80±7.43）（图1A），进一步证实GBM存在该位点的编辑缺陷。Kaplan-Meier生存分析显示，miR-376b-3p高编辑水平组患者的OS显著优于低编辑水平

组（*P*=0.028，图1B），提示其编辑水平可作为GBM预后的潜在生物标志物。对样本中编辑酶的表达进行检测结果显示，GBM组织的*ADAR2*相对表达量（0.39±0.16）显著低于癌旁组织（0.98±0.17）（图1C），与miR-376b-3p编辑水平变化趋势一致。相关性分析进一步揭示，在GBM样本中，miR-376b-3p编辑水平与*ADAR2*表达呈显著正相关性（R^2=0.466，*P*<0.001，图1D），表明*ADAR2*是调控该位点编辑的关键分子。上述结果提示A-to-I编辑的miR-376b-3p可能参与GBM的发生、发展过程。

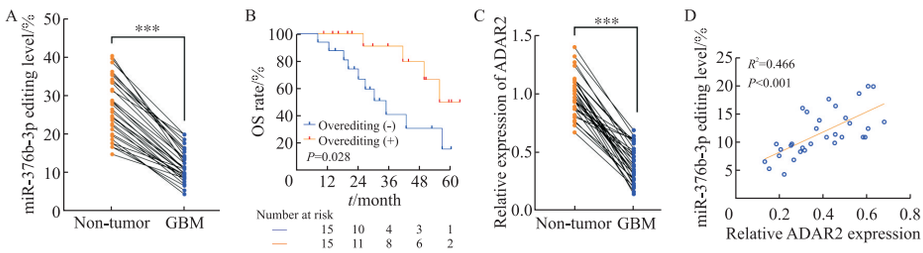

图1　miR−376b−3p A− to−I 编辑的临床意义

Fig. 1　Clinical significance of miR-376b-3p editing

A: Comparison of miR-376b-3p A-to-I editing levels in 32 paired GBM and adjacent normal tissues. B: Kaplan-Meier OS analysis of GBM patients stratified by high and low miR-376b-3p editing levels. C: Comparison of ADAR2 levels in 32 paired GBM and adjacent normal tissues. D: Pearson correlation analysis between miR-376b-3p editing levels and ADAR2 mRNA expression levels in GBM tissues. ***: *P*<0.001, compared with Non-tumor.

2.2　栀子苷抑制GBM细胞增殖、迁移、侵袭及糖代谢

本研究采用CCK-8法检测栀子苷对GBM细胞的细胞毒性作用。结果表明，栀子苷处理能显著抑制GBM细胞的活力，且其抑制作用呈现明显的剂量和时间依赖性（图2A）。进一步分析发现，栀子苷处理24 h的IC_{50}（即具有显著效应但避免过度细胞毒性的剂量）为39.22 μmol/L。基于此，后续实验选用40 μmol/L（接近IC_{50}）作为栀子苷的作用浓度，以探究其抗肿瘤效应及潜在机制。平板克隆形成实验和EdU掺入实验的结果一致显示，与对照组相比，40 μmol/L栀子苷处理显著降低了GBM细胞U87的克隆形成能力和EdU阳性细胞率（图2B~2C），CCK-8法证实栀子苷能有效地抑制GBM细胞U251的增殖活性（图2D）。划痕实验结果显示，栀子苷处理组GBM细胞U87和U251的划痕愈合率（U87：19.88%±3.51%；U251：37.48%±3.89%）显著低于对照组（U87：58.01%±2.55%；U251：76.39%±9.43%），表明其细胞迁移能力受到明显抑制（图2E）。Transwell侵袭实验结果进一步证实，与对照组相比（U87：76.67±10.70个/视野；U251：148.67±14.36个/视野），栀子苷还能有效地抑制GBM细胞侵袭能力（U87：43.67±8.02个/视野；U251：63±8个/视野）（图2F）。鉴于肿瘤细胞异常活跃的糖代谢（尤其是糖酵解）是其快速生长和转移的重要能量来源，我们检测了栀子苷对GBM细胞糖代谢关键指标的影响，结果显示，40 μmol/L栀子苷处理能显著降低GBM细胞的葡萄糖消耗速率和乳酸生成量（图2G）。进一步通过细胞能量代谢分析发现，栀子苷处理显著降低了细胞的ECAR，同时显著提高了细胞的OCR（图2H）。上述结果共同表明，栀子苷能够重编程GBM细胞的能量代谢，抑制其糖酵解途径（Warburg效应）。

2.3　栀子苷通过上调ADAR2促进miR−376b−3p的A−to−I编辑

我们检测了GBM细胞系中miR-376b-3p的A-to-I编辑水平。结果显示，与正常胶质细胞（25.34±4.54）相比，GBM细胞系中miR-376b-3p的编辑水平（U87：13.54±2.94；T98G：16.57±3.99；U251：12.17±1.92；LN229：16.83±2.60）显著降低（图3A），提示其编辑缺失可能与GBM恶性表型相关。值得注意的是，与对照组相比（U87：13.45±2.91；U251：10.91±1.49），经40 μmol/L栀子苷处理后，GBM细胞中miR-376b-3p的A-to-I编辑水平（U87：34.80±4.73；U251：39.32±4.53）显著升高（图3B），表明栀子苷可逆转GBM细胞的编辑缺陷。为解析栀子苷调控编辑的分子机制，我们通过Western blot检测了关键编辑酶ADAR家族的表达。结果显示，栀子苷处理后GBM细胞的ADAR2蛋白表达量显著上调（图3C），提示栀子苷可能通过特异性激活ADAR2促进miR-376b-3p的编辑。为明确*ADAR2*在编辑中的直接作用，我们在GBM细胞中分别过表达野生型*ADAR1*（*ADAR1*-WT）、催化活性缺失型*ADAR1*突变体（*ADAR1*-Mut）、野生型*ADAR2*（*ADAR2*-WT）和催化活性缺失型*ADAR2*突变体（*ADAR2*-Mut）。编辑水平检测结果表明，过表达*ADAR1*-WT或*ADAR1*-Mut后，miR-376b-3p的编辑水平均未发生显著变化；过表达*ADAR2*-WT后，编辑水平显著升高；过表达

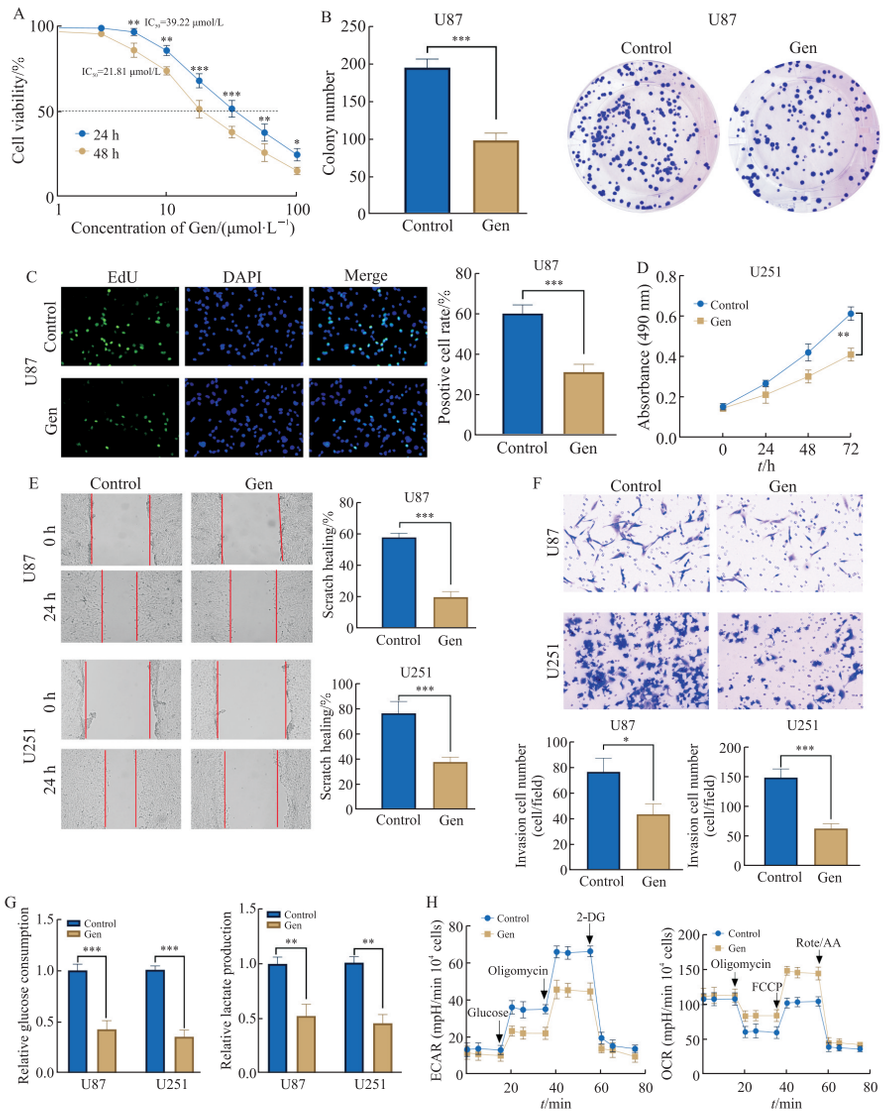

图2　栀子苷对GBM细胞的恶性表型和糖酵解的影响

Fig. 2　Effects of geniposide on proliferation, migration, invasion and glycolysis in GBM cells

A: Cell viability of GBM cells treated with geniposide (0-160 μmol/L) for 24 or 48 h, as measured by CCK-8 assay. B-D: Representative images and quantification of colony formation assay (B), EdU assay (C) and CCK-8 assay (D) after geniposide treatment. E: Representative images at 0 and 24 h and quantitative analysis of wound healing assay. F: Representative images and quantification of cell invasion assessed by Transwell assay. G: Relative glucose consumption (left) and lactate production (right) levels in GBM cells treated with or without geniposide. H: Seahorse analysis of ECAR (left) and OCR (right). *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001.

ADAR2-Mut后，编辑水平与对照组之间的差异无统计学意义（图3D）。上述结果证实miR-376b-3p的A-to-I编辑特异性依赖ADAR2的催化活性，且不受ADAR1的影响。

2.4　野生型与编辑型miR-376b-3p对GBM恶性表型的调控作用

为明确野生型与编辑型miR-376b-3p对GBM恶性表型的功能差异，我们在GBM细胞中分别转染野生型miR-376b-3p模拟物（WT miR-376b-3p）和A-to-I编辑型miR-376b-3p模拟物（ED miR-376b-3p）。RTFQ-PCR检测结果显示，与阴性对照组（NC）（U87：1.00±0.05；U251：0.99±0.04）相比，转染组细胞中对应miRNA的表达水平［U87（WT miR-376b-3p：5.30±0.30；ED miR-376b-3p：4.30±0.25），U251（WT miR-376b-3p：4.62±0.34；ED miR-376b-3p：4.11±0.18）］均显著升高，证实模拟物成功导入并有效表达（图4A）。通过CCK-8、平板克隆形成及EdU掺入实验综合评估增殖能力，结果表明，WT miR-376b-3p组细胞的增殖活力、克隆形成数及EdU阳性率均显著高于阴性对照组；ED miR-376b-3p组则呈现显著抑制效应，上述指标均显著低于阴性对照组（图4B~4E）。上述结果证实野生型miR-376b-3p能够促进GBM细胞增殖，而编辑型则发挥抑制增殖作用。通过划痕愈合实验和Transwell侵袭实验评估运动能力，WT miR-376b-3p组的划痕愈合率（U87：82.86%±3.01%；U251：61.60%±2.88%）及Transwell穿

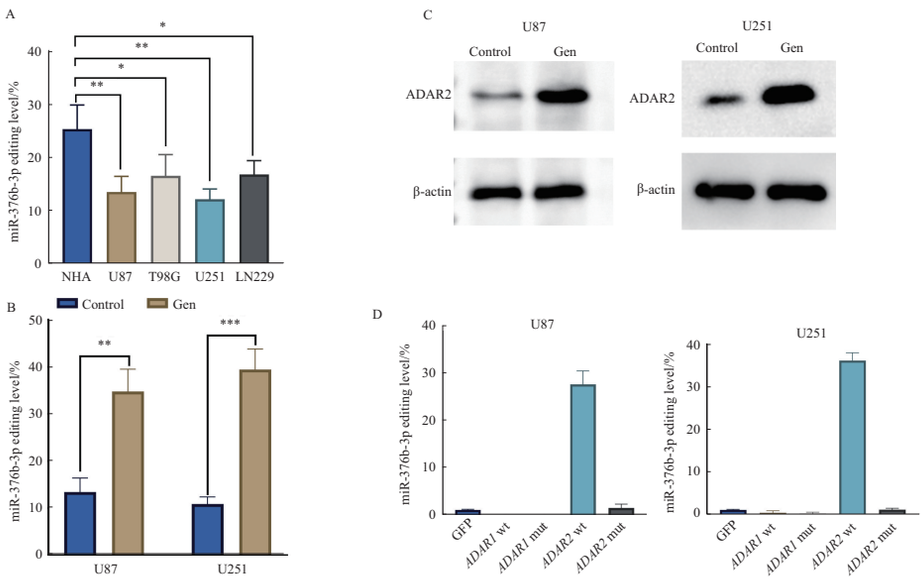

图3 栀子苷对miR-376b-3p A-to-I编辑的影响

Fig. 3 Effect of geniposide on miR-376b-3p editing and the role of ADAR2

A: Comparison of miR-376b-3p A-to-I editing levels in GBM cell lines and normal astrocytes (NHA). B: miR-376b-3p editing levels in GBM cells treated with or without geniposide. C: Western blot analysis of ADAR2 protein expression in U87 (up) and U251 (bottom) cells treated with or without geniposide. D: miR-376b-3p editing levels in U87 (up) and U251 (bottom) cells transfected with *ADAR1* wt/mut or *ADAR2* wt/mut. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

膜细胞数（U87：135.33±10.02个/视野；U251：145.33±11.93个/视野）显著高于NC组的划痕愈合率（U87：46.70%±5.39%；U251：34.31%±2.74%）和穿膜细胞数（U87：93.66±9.71个/视野；U251：92.00±7.00个/视野）；ED miR-376b-3p组的细胞迁移（U87：22.48%±3.48%；U251：19.30%±2.53%）、侵袭（U87：55.33±8.50个/视野；U251：32.67±7.09个/视野）能力均受到显著抑制。上述数据证实编辑型miR-376b-3p可逆转野生型的促转移表型（图4F~4G）。为解析其代谢调控机制，检测糖酵解关键指标：WT miR-376b-3p组细胞的葡萄糖消耗量、乳酸生成量及ECAR显著升高，同时OCR显著降低；ED miR-376b-3p组呈现完全相反的趋势：糖酵解指标显著抑制，而OCR显著提升（图4H~4I）。上述结果表明，野生型miR-376b-3p能够增强Warburg效应，而编辑型则逆转此代谢重编程，促进氧化磷酸化。

2.5 A-to-I编辑介导的miR-376b-3p靶基因转换

为解析编辑型miR-376b-3p功能转换的分子基础，我们通过MiREDiBase数据库（https://ncrnaome.osumc.edu/miredibase/）预测靶基因。编辑型miR-376b-3p的结构如图5A所示。结果显示，野生型miR-376b-3p潜在靶基因为358个，编辑型miR-376b-3p潜在靶基因为1 051个；两者仅存在33个重叠靶基因，表明A-to-I编辑显著改变了miR-376b-3p的靶向特异性（图5B）。在这些预测的靶基因中，*CBX7*被预测为野生型miR-376b-3p的特异性靶标；*TMX2*被预测为编辑型miR-376b-3p的特异性靶标。双萤光素酶报告基因实验结果显示，与对照组相比（1.01±0.06），WT miR-376b-3p显著抑制*CBX7*-WT（0.43±0.11）萤光素酶活性，但对*TMX2*-WT萤光素酶无显著影响，ED miR-376b-3p显著抑制*TMX2*-WT（0.47±0.06）萤光素酶活性，而对*CBX7*-WT萤光素酶无作用（图5C）。该结果证实A-to-I编辑使miR-376b-3p丧失靶向*CBX7*的能力，同时获得靶向*TMX2*的新功能。通过Western blot及RTFQ-PCR检测内源性蛋白和mRNA的表达，U87细胞中，WT miR-376b-3p转染组CBX7表达（0.44±0.09）显著下调，而ED miR-376b-3p（0.98±0.08）组CBX7水平与对照组（1.00±0.07）无显著差异；ED miR-376b-3p转染组TMX2蛋白表达（0.46±0.13）显著下调，而WT miR-376b-3p组TMX2水平未改变（图5D~5E）。同样，U251细胞中，WT miR-376b-3p显著降低CBX7表达而ED miR-376b-3p显著降低TMX2水平（图5F）。此结果在功能层面证实A-to-I编辑通过靶基因转换（*CBX7*→*TMX2*）驱动miR-376b-3p从促癌因子向抑癌因子转变。

2.6 *TMX2*介导栀子苷与编辑型miR-376b-3p抗GBM效应

为明确*TMX2*在栀子苷-编辑型miR-376b-3p通路中的核心作用，设立对照组、栀子苷组（Gen，40 μmol/L）、Gen+编辑型miR-376b-3p模

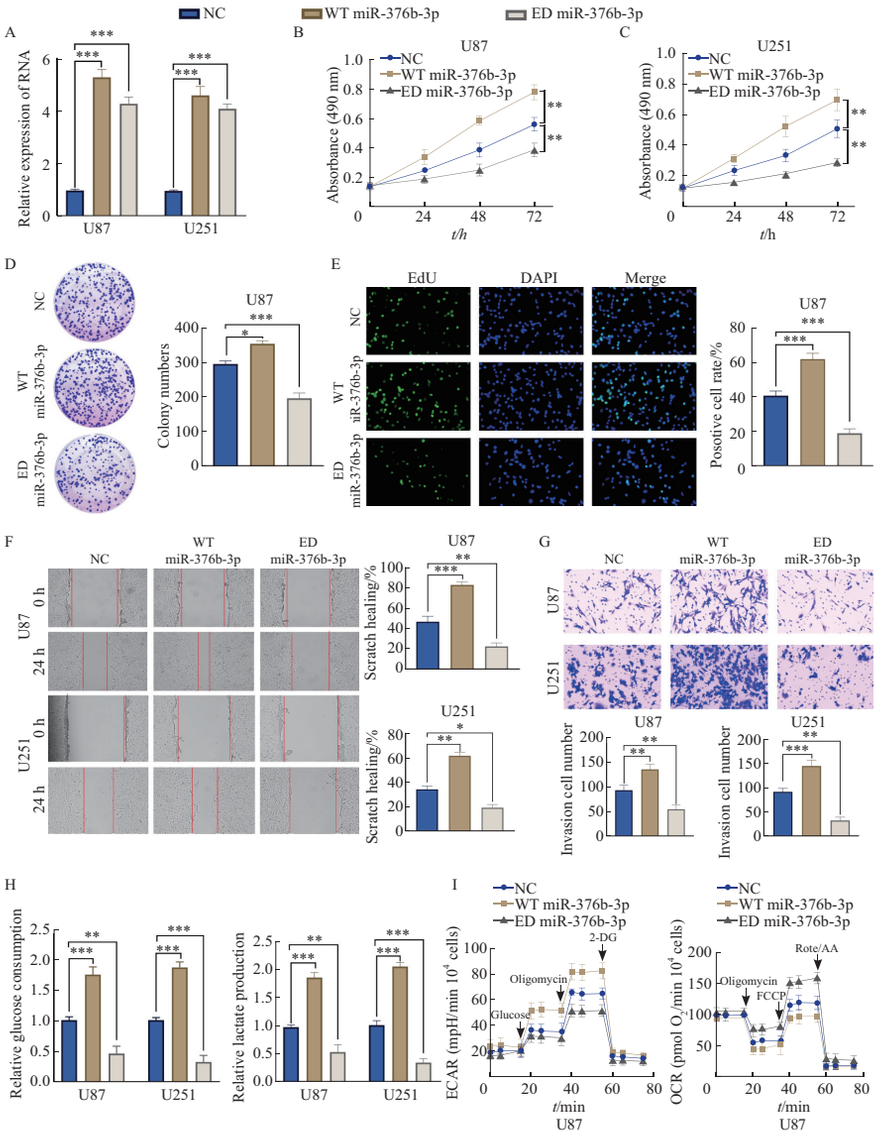

图4　野生型与编辑型miR−376b−3p的功能差异

Fig. 4　Functional analyses of wild-type and edited miR-376b-3p

A: RTFQ-PCR analysis of transfection efficiency for WT or ED miR-376b-3p mimics. B-C: Cell proliferation was assessed by CCK-8 assay after transfection in U87 (B) and U251 (C) cells. D-E: Representative images and quantification of colony formation assay (D) and EdU assay (E). F-G: Representative images and quantitative analysis of wound healing assay (F) and Transwell invasion assay (G). H: Measurements of glucose consumption (left) and lactate production (right) in GBM cells. I: Measurements of ECAR (left) and OCR (right) in GBM cells. *: P<0.05, compared with NC; **: P<0.01, compared with NC; ***: P<0.001, compared with NC.

拟物组（Gen+ED-miR-376b-3p mimics）和Gen+ED-miR-376b-3p mimics+*TMX2*过表达组（Gen+ED-miR-376b-3p mimics+*TMX2*）。Western blot和RTFQ-PCR检测结果显示，与对照组（U87：1.01±0.06；U251：0.98±0.04）相比，栀子苷处理可显著降低TMX2（U87：0.55±0.09；U251：0.53±0.11）的表达（图6A~6B）。进一步研究发现，在栀子苷处理基础上过表达编辑型miR-376b-3p，对TMX2（U87：0.23±0.06；U251：0.22±0.08）表达的抑制作用显著增强。然而，过表达TMX2可有效地逆转由栀子苷和编辑型miR-376b-3p协同导致的TMX2（U87：1.96±0.16；U251：2.34±0.18）下调。为探究上述处理对GBM细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响，我们进行了CCK-8检测、划痕愈合实验和Transwell侵袭实验（图6C~6E）。与对照组相比，栀子苷处理显著抑制了GBM细胞增殖、迁移和侵袭能力。联合过表达编辑型miR-376b-3p后，这种抑制作用进一步增强。重要的是，过表达*TMX2*可显著逆转栀子苷和编辑型miR-376b-3p对GBM细胞增殖、迁移和侵袭的协同抑制效应。此外，我们检测了细胞能量代谢的变化（图6F）。与对照组相比，栀子苷处理显著减少了GBM细胞的葡萄糖消耗量和乳酸生成量，提示其抑制了糖酵解过程。联合过表达编辑型miR-376b-3p后，这种对糖酵解的抑制作用更为显著。然而，*TMX2*的过表达同样能够逆转栀子苷和编辑型miR-376b-3p对葡萄糖消耗和乳酸生成的抑制作用。这些数据共

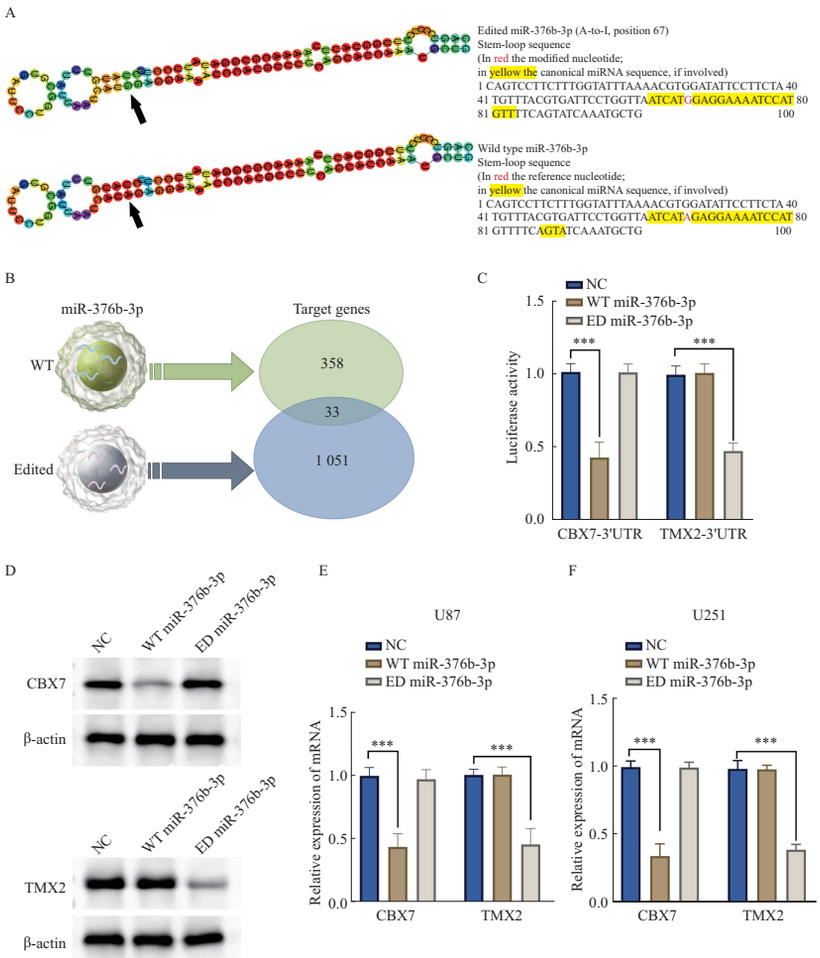

图5 A-to-I编辑介导miR-376b-3p的靶基因转换

Fig. 5 Analysis of target gene switching mediated by A-to-I editing of miR-376b-3p

A: Schematic diagram of the predicted A-to-I editing site (arrow) within the miR-376b-3p sequence. B: Venn diagram comparing predicted target genes of wild-type (WT) and edited (ED) miR-376b-3p. C: Dual-luciferase assay for validating the interaction between miR-376b-3p (WT or ED) and the 3'-UTR of *CBX7* or *TMX2*. D: Western blot analysis of CBX7 and TMX2 expression in GBM cells transfected with WT or ED miR-376b-3p mimics. E, F: RTFQ-PCR analysis of *CBX7* and *TMX2* mRNA expression levels in U87 (E) and U251 (F) cells transfected with WT or ED miR-376b-3p mimics. ***: $P<0.001$, compared with NC.

同证实*TMX2*过表达能系统性地逆转栀子苷与编辑型miR-376b-3p对GBM细胞恶性表型（增殖、迁移、侵袭及糖酵解）的协同抑制作用，从而确立*TMX2*在调控GBM细胞增殖转移潜能中的核心地位。

2.7 编辑型miR-376b-3p增强栀子苷体内抗GBM效应

为评估编辑型miR-376b-3p在GBM治疗中的潜在价值，本研究通过裸鼠异种移植模型开展体内实验。与对照组相比，栀子苷单药治疗可显著抑制移植瘤体积增长；而联合过表达编辑型miR-376b-3p后，肿瘤体积抑制效果较栀子苷组进一步增强（图7A~7B）。栀子苷组的肿瘤重量［（0.31±0.07）g］较对照组［（0.53±0.13）g］显著降低；而栀子苷联合编辑型miR-376b-3p过表达组的肿瘤重量减少程度［（0.12±0.04）g］显著大于栀子苷组，证实编辑型miR-376b-3p可协同增强栀子苷的抑瘤效应（图7C）。Western blot分析表明，栀子苷处理能够显著下调肿瘤组织中糖酵解关键蛋白己糖激酶2（hexokinase 2，HK2）、丙酮酸激酶M2（pyruvate kinase M2，PKM2）和葡萄糖转运蛋白1（glucose transporter 1，GLUT1）的表达；联合编辑型miR-376b-3p过表达后，这三种糖酵解相关蛋白的表达抑制程度较栀子苷组进一步加剧（图7D）。本研究密切监测了接受联合治疗裸鼠的体重变化、活动状态并通过肉眼观察主要器官（心脏、肝脏、脾、肺、肾脏）的情况，未发现明显的急性毒性迹象。上述体内实验结果一致证实，编辑型miR-376b-3p不仅能增强栀子苷对GBM生长的抑制作用，还可协同调控肿瘤能量代谢通路，为确立基于栀子苷联合编辑型miR-376b-3p的协同抗GBM策略提供了实验依据。

3 讨 论

GBM作为中枢神经系统最具侵袭性的原发性肿瘤，因其高度异质性和血脑屏障穿透障碍，

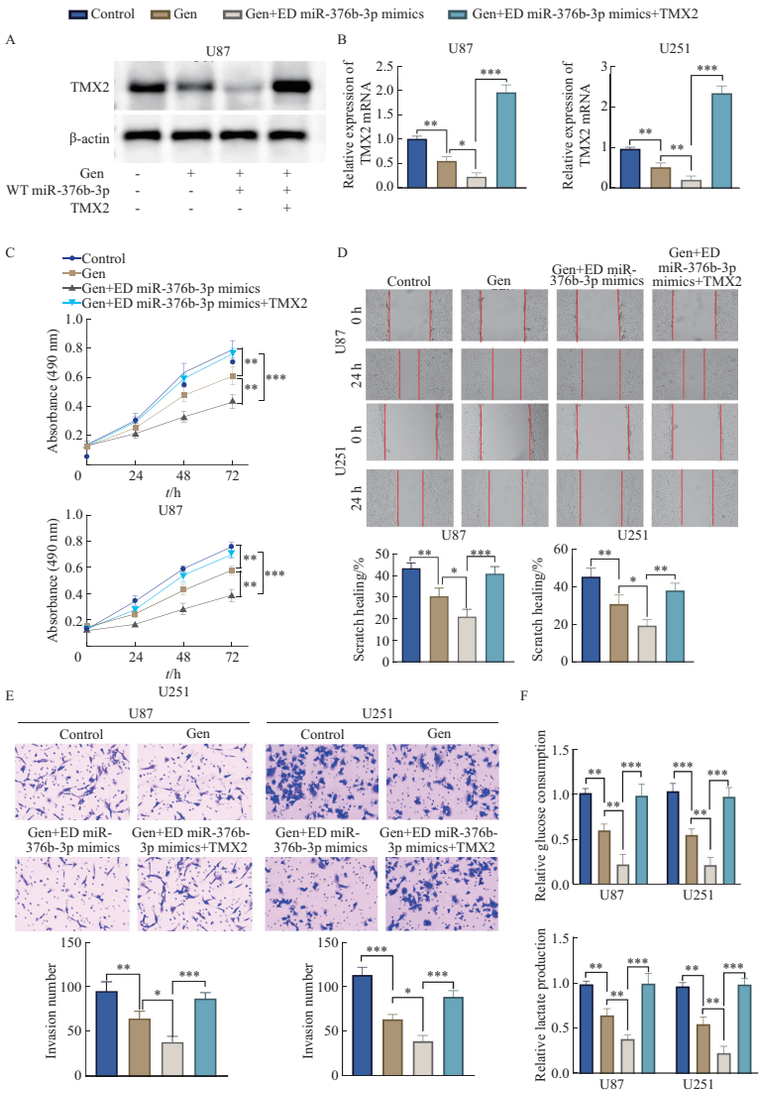

图6　*TMX2*介导栀子苷抗肿瘤作用的功能分析

Fig. 6　Functional analysis of *TMX2* in geniposide-mediated anti-tumor effects

A: Western blot analysis of TMX2 expression in U87 cells under different conditions, including control group, Gen treatment group, ED miR-376b-3p overexpression group, (Gen+ED) group, and (Gen+ED+*TMX2*-overexpression) group. B: RTFQ-PCR analysis of *TMX2* expression in U251 cells under different conditions. C: Cell proliferation assessed by CCK-8 assay in U87 (up) and U251 (bottom) cells under the indicated conditions. D: Representative images and quantification of cell migration by wound healing assay. E: Representative images and quantification of cell invasion by Transwell assay. F: Measurements of glucose consumption (up) and lactate production (bottom) in U87 and U251 cells. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

临床治疗面临巨大挑战[13]。近年来，药用植物天然产物因其多靶点作用特性和低不良反应优势，成为抗GBM药物研发的重要方向。作为传统中药栀子的主要环烯醚萜苷成分，栀子苷抗肿瘤机制研究已从早期的网络药理学预测发展到精准靶向治疗验证。有研究[14]表明，栀子苷对肿瘤具有广泛的治疗潜能。尽管已有研究证实栀子苷在多种肿瘤中具有抗增殖作用，但其分子机制多局限于对经典凋亡通路的调节。本研究的独特性在于，证实了栀子苷能作为一种有效的ADAR2激活剂，通过驱动miR-376b-3p的A-to-I编辑，实现从“促癌”到“抑癌”的功能性逆转。这一发现为中药单体在转录后修饰层面的药理学作用提供了全新的解释维度。

RNA编辑，特别是ADAR酶介导的A-to-I修饰，作为转录后调控的重要机制，在GBM的发生、发展中扮演着关键角色[15]，而miR-376簇也是这一领域的重要研究对象。既往研究指出，在高级别GBM中，*ADAR2*表达水平大幅下调，导致多种miRNA（如miR-589-3p）处于未编辑状态，进而通过靶向抑癌基因促进肿瘤迁移[16]。本研究结果与此趋势高度一致，我们观察到GBM组织中miR-376b-3p的编辑水平显著低于正常组织。然而，与现有文献中侧重于恢复编辑酶表达的基因疗法不同，本研究进一步揭示了其上游的药理学调控机制，证明栀子苷能够特异性上调*ADAR2*的表达（而非*ADAR1*）来逆转这一缺陷。这种选择性激活在临床转化中具有显著意

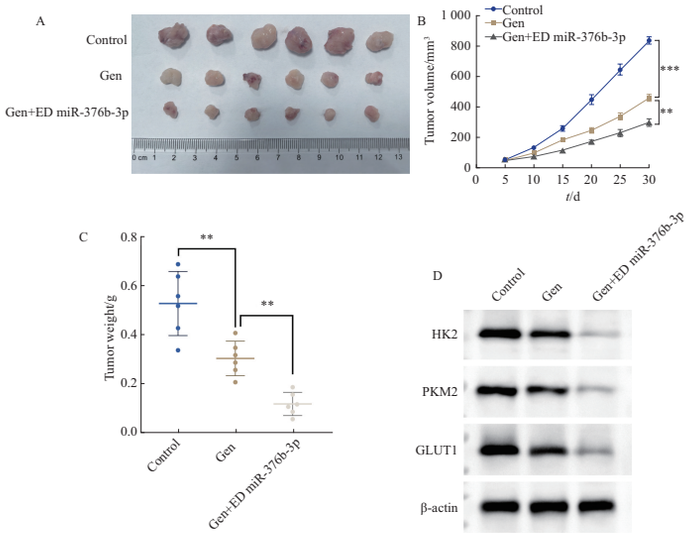

图7　编辑型miR−376b−3p调控栀子苷的体内抗肿瘤功效

Fig. 7　*In vivo* anti-tumor effects of geniposide combined with edited miR-376b-3p

A: Representative photographs of subcutaneous xenograft tumors harvested from each treatment group at the endpoint. B: Tumor volume growth curves of mice in different treatment groups. C: Quantitative comparison of tumor weights from each group at the endpoint. D: Western blot analysis of glycolysis-related proteins (HK2, PKM2, GLUT1) in tumor tissues from each treatment group. *: P<0.05, compared with Gen; **: P<0.01, compared with Gen; ***: P<0.001, compared with Gen.

义，因为*ADAR1*的过度激活往往与某些自身免疫反应相关，而栀子苷对*ADAR2*的选择性上调可能提供了一个更安全的干预窗口。该研究首次揭示了天然小分子化合物栀子苷可通过精准调控ADAR2来逆转GBM中特定的编辑缺陷，为通过药理学手段干预RNA编辑提供了新路径。

A-to-I编辑对miRNA功能的调控主要通过改变种子序列实现靶基因重编程[17]。传统的miRNA研究多关注单一靶标的下调，而本研究通过生物信息学预测和双萤光素酶报告基因实验验证，发现miR-376b-3p通过A-to-I编辑，其种子序列发生改变，使miR-376b-3p的靶谱发生根本性重塑，其功能从野生型的促癌属性（通过靶向*CBX7*）逆转为编辑型的抑癌属性（通过新获得靶向*TMX2*的能力）。这一发现与对miR-376簇的其他研究相互印证并有所推进。例如，Soler等[18]研究发现，超保守转录本uc.160+能通过表观遗传机制调控整个miR-376簇的生物生成，包括促进其pri-miRNA的剪切并增强成熟序列的A-to-I编辑。本研究则揭示，除了内源性非编码RNA对编辑的调控，小分子化合物同样可以成为精准调控该编辑过程的开关。另一方面，关于编辑的功能后果，先前研究[19]已证实，未编辑的miR-376a*通过改变靶基因选择（从*AMFR*转向*RAP2A*）来促进GBM细胞的侵袭。本研究聚焦于miR-376b-3p，同样发现了由编辑驱动的“靶基因转换”现象。上述研究表明，编辑介导的功能重编程可能是miR-376簇成员共有的、关键的抑癌机制。然而，本研究在机制深度上实现了重要跨越，不仅明确了ADAR2（而非ADAR1）是栀子苷发挥作用的关键酶，更首次将这一调控轴与清晰的肿瘤代谢重编程通路完整串联。这与另一项在正常脑中发现的研究[20]结论形成有力的对照与互补，该研究指出ADAR2能以不依赖其编辑活性的方式负调控miR-376b-3p的成熟，且ADAR1与ADAR2的编辑作用存在竞争。本研究结果在肿瘤背景下验证并延伸了这一观点，我们观察到栀子苷处理后，ADAR2的表达上调直接导致了miR-376b-3p编辑水平的升高，且该过程特异性依赖ADAR2的催化活性。对比Widmark等[20]在正常神经系统信号中的发现，本研究将这一机制引入到GBM代谢调控领域，证明同一套RNA编辑机器在不同病理生理学状态下可以产生截然不同的生物学功能。这提示在病理学状态下，ADAR2的功能可能从“成熟过程调控者”转变为“编辑水平决定者”，而栀子苷可能正是通过扭转这一失衡状态来发挥治疗作用。综上所述，本研究不仅确证了栀子苷调节ADAR2介导的RNA编辑这一新机制，更通过与现有文献在miR-376家族成员、调控酶特异性及靶基因功能转换等方面的对比，明确了本研究在神经系统肿瘤能量代谢领域的创新地位。这一发现不仅丰富了中药现代化的分子药理学内涵，也为针对*ADAR2*编辑缺陷型GBM的精准代谢治疗提供了实验依据。

尽管既往文献曾报道栀子苷可能具有中枢活性，但本研究未通过原位脑肿瘤模型或脑组织药物分布实验直接评估其血脑屏障穿透能力。当前实验设计中采用的皮下移植瘤模型与非颅内给药途径，无法为栀子苷的血脑屏障穿透性提供直接

证据。未来需通过专项研究（如脑微透析技术、原位脑瘤药效模型或体外血脑屏障穿透实验）系统评估栀子苷的脑部递送效率，以明确其对中枢神经系统肿瘤的治疗潜力。这一局限性与本研究的核心结论（栀子苷的全身性抗肿瘤作用及机制）无关，但需在针对脑部适应证的转化研究中予以独立验证。未来应进一步设计脑靶向递送系统（如纳米载体）或结构修饰策略，在明确其血脑屏障穿透特性的基础上，拓展其在GBM中的应用。实验仅使用了U87和U251这两种常见GBM细胞系，虽然它们被广泛研究，但其遗传背景经过长期培养可能已发生改变，且无法代表GBM极高的瘤内与瘤间异质性。本研究收集了32对配对样本，样本量相对有限，同时，不同GBM亚型间可能存在显著的分子异质性，*ADAR2*的表达与miR-376b-3p的编辑水平在不同患者群体中的差异，将直接影响该治疗策略的普适性。未来研究需要在更接近人类疾病的原位模型及更多样的患者来源细胞系中进行验证，并积极探索能预测疗效的生物标志物，以推动该发现向精准临床治疗的转化。

本研究系统揭示了栀子苷通过激活ADAR2介导的miR-376b-3p编辑，驱动靶基因从*CBX7*向*TMX2*转换，进而抑制GBM恶性进展的分子通路。这一发现不仅为GBM治疗提供了新策略，也为中药现代化研究提供了分子药理学范式。随着精准医疗技术的发展，整合天然产物多靶点优势和RNA编辑精准调控特性的联合疗法，有望成为克服GBM治疗耐药性的突破点。

第一作者兼通信作者：

武树超（ORCID: 0009-0004-8293-8947），硕士，副主任医师，E-mail: wushuaoccc@163.com。

作者贡献声明：

武树超：数据获取，论文初稿撰写；王博，崔群建：完成关键实验，数据分析；魏志玄，谢宗新：研究总体构思，全程指导；宋宇：统计学分析。

[参 考 文 献]

[1] CHEN Z Y, YE N R, TENG C B, et al. Alternations and applications of the structural and functional connectome in gliomas: a mini-review[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 856808.

[2] ZHANG S, ZHANG S, LUO S Y, et al. Ultrasound-assisted brain delivery of nanomedicines for brain tumor therapy: advance and prospect [J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20 (1): 287.

[3] MA Q, MA Y, SUN S Z, et al. Geniposide improves corticosterone-induced toxicity in PC12 cells through the NMDARs and BDNF pathway[J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(4): 5387-5400.

[4] SHAN Z R, JIA J F, WANG Q J, et al. Network pharmacology-based analysis on geniposide, a component of gardenia jasminoides, beneficial effects to alleviate LPS-induced immune stress in piglets[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 117: 109894.

[5] SUN Q, ZHANG X J, FAN J Y, et al. Geniposide protected against cerebral ischemic injury through the anti-inflammatory effect *via* the NF-κB signaling pathway [J]. Transl Neurosci, 2023, 14(1): 20220273.

[6] LIU F, WANG Y X, YAO W J, et al. Geniposide attenuates neonatal mouse brain injury after hypoxic-ischemia involving the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 102: 101687.

[7] LUO M, WANG Y L, LIU X D, et al. Geniposide suppresses tumor progression through DUOX1-mediated ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Chin Med, 2025, 53(5): 1573-1589.

[8] KIMURA Y, SUMIYOSHI M, TANIGUCHI M. Geniposide prevents tumor growth by inhibiting colonic interleukin-1β and monocyte chemoattractant protein-1 *via* down-regulated expression of cyclooxygenase-2 and thymocyte selection-associated high mobility box proteins TOX/TOX2 in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 110077.

[9] KARAGIANNI K, PETTAS S, CHRISTOFORIDOU G, et al. A systematic review of common and brain-disease-specific RNA editing alterations providing novel insights into neurological and neurodegenerative disease manifestations [J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 465.

[10] ZHANG Y, LI L Y, MENDOZA J J, et al. Advances in A-to-I RNA editing in cancer[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 280.

[11] ROMANO G, LE P, NIGITA G, et al. A-to-I edited miR-411-5p targets MET and promotes TKI response in NSCLC-resistant cells[J]. Oncogene, 2023, 42(19): 1597-1606.

[12] WAN J Y, LONG Y, LIU S Y, et al. Geniposide-loaded liposomes for brain targeting: development, evaluation, and *in vivo* studies[J]. AAPS PharmSciTech, 2021, 22(7): 222.

[13] WAN Q, WU X C, ZHOU J X, et al. The hypoxia-associated high-risk cell subpopulation distinctly enhances the progression of glioma[J]. Adv Sci, 2025, 12(17): 2416231.

[14] HE H F, LI Y, WANG Y, et al. Geniposide inhibits non-small cell lung cancer by regulating proliferation, apoptosis, invasion, migration, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem-like cell property *via* Wnt/β-catenin pathway [J]. Biochem Genet, 2026, 64(1): 707-726.

[15] PAUL D, SINHA A N, RAY A, et al. A-to-I editing in human miRNAs is enriched in seed sequence, influenced by sequence contexts and significantly hypoedited in glioblastoma multiforme [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2466.

[16] CESARINI V, SILVESTRIS D A, TASSINARI V, et al. ADAR2/miR-589-3p axis controls glioblastoma cell migration/invasion [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(4): 2045-2059.

[17] XU S H, ZHOU G P, HE Q Y, et al. A-to-I-edited miR-1251-5p restrains tumor growth and metastasis in lung adenocarcinoma through regulating TCF7-mediated Wnt signaling pathway[J]. Discov Oncol, 2024, 15(1): 587.

[18] SOLER M, DAVALOS V, SÁNCHEZ-CASTILLO A, et al. The transcribed ultraconserved region uc.160+ enhances processing and A-to-I editing of the miR-376 cluster: hypermethylation improves glioma prognosis[J]. Mol Oncol, 2022, 16(3): 648-664.

[19] CHOUDHURY Y, TAY F C, LAM D H, et al. Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells[J]. J Clin Invest, 2012, 122 (11): 4059-4076.

[20] WIDMARK A, SAGREDO E A, KARLSTRÖM V, et al. ADAR1- and ADAR2-mediated regulation of maturation and targeting of miR-376b to modulate GABA neurotransmitter catabolism[J]. J Biol Chem, 2022, 298(3): 101682.

（收稿日期：2025-10-27 修回日期：2025-12-25）

（责任编辑：李广涛）