

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.004

## 小分子化合物 WAY-312 通过周期阻滞与凋亡诱导抑制胶质母细胞瘤干细胞增殖及自我更新

车虹宇<sup>1</sup>, 沈阳<sup>1</sup>, 刘雪娇<sup>1,2</sup> (1. 徐州医科大学 第一临床医学院 神经系统疾病研究所, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医科大学附属医院 神经外科, 江苏 徐州 221000)

**[摘要]** **目的:** 探讨从小分子化合物库中筛选获得的小分子化合物 WAY-312 对胶质母细胞瘤干细胞(GSC)增殖与自我更新能力的抑制作用及分子机制。**方法:** 通过肿瘤球形形成实验与细胞活力检测技术, 对小分子化合物库开展系统性化合物筛选; 以筛选得到的小分子抑制剂 WAY-302386(按化合物序号将其命名为 WAY-312)为研究对象, 采用 CCK-8 法、WB 法、流式细胞术及 Caspase-Glo 3/7 活性检测法, 检测 WAY-312 在不同浓度下对 GSC 增殖能力、干性标志物表达、细胞周期分布及凋亡水平的影响, 明确 WAY-312 对 GSC 干性维持、自我更新能力的调控效应, 进一步阐明 WAY-312 对 GSC 细胞周期进程和细胞凋亡的作用机制。**结果:** WAY-312 可有效抑制 GSC 存活 ( $P < 0.05$ ); WAY-312 显著抑制 GSC 肿瘤球形形成数目和大小 ( $P < 0.05$ ), WAY-312 处理细胞后降低干性标志物 SOX2、OLIG2、BMI1 的表达水平; WAY-312 可有效抑制 GSC 的自我更新能力 ( $P < 0.05$ ); WAY-312 通过调控细胞周期相关蛋白 Cyclin B1、CDK4、CDK6 的表达, 诱导 GSC 细胞周期阻滞于 G2/M 期 ( $P < 0.05$ ); WAY-312 诱导 GSC 凋亡, 增加凋亡相关蛋白 cleaved-PARP、BAX 的表达, 降低 BCL2 的表达, 经 WAY-312 处理后增强 GSC 的 Caspase-3/7 活性。**结论:** WAY-312 可呈浓度依赖性抑制 GSC 增殖、干性维持及自我更新能力, 诱导 GSC 周期阻滞于 G2/M 期并促进细胞凋亡。

**[关键词]** 胶质母细胞瘤干细胞; WAY-312; 自我更新; 细胞增殖; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R739.41; R730.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 05-0500-09

## Small-molecule compound WAY-312 inhibits proliferation and self-renewal of glioblastoma stem cells through cell cycle arrest and apoptosis induction

CHE Hongyu<sup>1</sup>, SHEN Yang<sup>1</sup>, LIU Xuejiao<sup>1,2</sup> (1. Institute of Nervous System Diseases, First College for Clinical Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China; 2. Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study investigated the inhibitory activity and potential mechanism of WAY-312, a small-molecule compound derived through screening of a small-molecule compound library, against the growth and self-renewal capacity of glioblastoma stem cells (GSCs). **Methods:** Systematic compound screening was conducted on the small molecule compound library through tumor sphere formation assays and cell viability assays; the small molecule inhibitor WAY-302386 (named WAY-312 according to its compound number) obtained through screening was used as the research object. CCK-8 method, Western blot, flow cytometry, and Caspase-Glo 3/7 activity detection method were used to detect the effects of WAY-312 on the proliferation ability, stemness marker expression, cell cycle distribution, and apoptosis level of glioblastoma stem cells at different concentrations. The regulatory effect of WAY-312 on GSC stemness maintenance and self-renewal ability was clarified, and the mechanism of WAY-312 on GSC cell cycle progression and apoptosis was further elucidated. **Results:** WAY-312 can effectively inhibit the survival of GSCs ( $P < 0.05$ ); WAY-312 significantly inhibits the number and size of tumor spheroids formed in GSCs ( $P < 0.05$ ), and treatment with WAY-312 reduces the expression levels of stemness marker proteins SOX2, OLIG2, and BMI1; WAY-312 can effectively inhibit the self-renewal ability of GSCs ( $P < 0.05$ ); WAY-312 induces GSC cell cycle arrest at the G2/M phase by regulating the expression of cell cycle-related proteins Cyclin B1, CDK4, and CDK6 ( $P < 0.05$ ); WAY-312 induces apoptosis in GSCs, increases the expression of apoptosis-related proteins cleaved-PARP and BAX, reduces the expression of BCL2, and enhances Caspase-3/7 activity in GSCs after treatment with WAY-312. **Conclusion:** WAY-312 can inhibit GSC proliferation, stemness maintenance, and self-renewal ability, induce GSC cell cycle arrest at

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(BK20251768)

**[作者简介]** 车虹宇, 女, 硕士生

**[通信作者]** 刘雪娇(扫码获取作者通信方式)



G2/M phase, and promote cell apoptosis in a concentration-dependent manner.

**[Key words]** glioblastoma stem cell (GSC); WAY-312; self-renewal; cell proliferation; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(5): 500-509. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.004]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)约占中枢神经系统(central nervous system, CNS)恶性肿瘤的49.1%<sup>[1]</sup>, GBM侵袭性强、异质性强、耐药性显著<sup>[2]</sup>, 对患者生命构成严重威胁。自20世纪以来, GBM的治疗始终是医学界面临的重大挑战, 即便采用标准强化治疗方案, 患者中位生存期仍不足15个月, 凸显了该疾病现有治疗策略的局限性与提高疗效的迫切性<sup>[3-4]</sup>。胶质母细胞瘤干细胞(glioblastoma stem cell, GSC)作为GBM的“种子细胞”, 具有强大的自我更新能力及多向分化潜能, 是肿瘤发生、进展、复发及耐药的核心驱动因素, 因此靶向清除GSC已成为改善GBM患者预后的关键治疗方向<sup>[5-7]</sup>。已有研究表明, 靶向调控GSC活性的化合物(如NCD38、线粒体复合物抑制剂等)已为GBM的治疗提供了新的思路<sup>[8-9]</sup>, 但现有药物仍面临特异性不足与疗效有限等困境, 因此, 临床亟需开发新型高效的GSC靶向抑制剂。本研究旨在利用小分子化合物库筛选可有效抑制GSC增殖与自我更新的候选化合物, 并深入探讨其作用机制及体内抗肿瘤活性, 以期靶向GSC的胶质瘤治疗策略提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

GSC1、GSC2、GSC3、GSC21、GSC63细胞均从实验室获取的人GBM肿瘤组织中分离获得, 用干细胞专用培养基培养; 该培养基以神经元细胞基础培养基为基础, 添加L-谷氨酰胺、B27补充液、青霉素、链霉素、两性霉素B、人重组碱性成纤维细胞生长因子(human recombinant FGF-2)及人重组表皮生长因子(human recombinant EGF)。细胞置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

### 1.2 主要试剂及仪器

多样性化合物母核库(Cat. No. L3600)购自美国Selleck公司, 神经元细胞基础培养基(T710KJ)、L-谷氨酰胺(S220JV)、B27补充液(S441J7)、青链霉素混合液(S110JV)、两性霉素B(S170J7)、FGF-2(P701J7)、EGF(P720J7)均购自上海源培生物科技股份有限公司, Caspase-Glo 3/7活性检测试剂盒(G8090)购自美国Promega公司, 流式细胞术凋亡试剂盒(E-CK-A211)、流式细胞术周期试剂盒(E-CK-A351)购自武汉Elabscience生物科技股份有限公司, CCK-8试剂盒(VC5001L)购自徐州Vicmed生物工程有限公司, CDK4抗体(#12790S)、CDK6抗体(#3136S)、GAPDH抗体

(#97166)、Cyclin B1抗体(#12231)、cleaved-PARP抗体(#5625)、OLIG2抗体(#65915)、BMI1抗体(#6964S)、SOX2抗体(#3579S)、BCL2抗体(#4223S)及BAX抗体(#2772S)购自美国Cell Signaling Technology公司, HRP-山羊抗小鼠IgG(H+L)(BF03001)、HRP-山羊抗兔IgG(H+L)(BF03008)购自北京Biodragon免疫技术有限公司, PVDF膜(IPVH00010)购自美国Merck Life Science公司, BCA蛋白浓度试剂盒(P0010)购自上海Beyotime生物技术股份有限公司。

流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国Becton Dickinson公司, 倒置相差显微镜(37XBE)、荧光倒置显微镜(IX71+DP721)购自日本Olympus公司, 多功能酶标仪购自美国BioTek公司, 标准型脑立体定位仪购自深圳瑞沃德科技有限公司, 伯托小动物活体成像仪购自德国伯托生物科技有限公司。

### 1.3 肿瘤球形形成实验检测WAY-312对GSC肿瘤球形形成能力的影响

制备GSC1单细胞悬液、计数, 按每孔约 $2 \times 10^3$ 个细胞接种至96孔板, 每组设3个复孔。对照组加入培养基, 实验组加入含不同浓度化合物的培养基, 随后将96孔板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养7~12 d, 每3 d补液1次。当对照组肿瘤球直径大于100 μm时终止培养, 记录每孔细胞肿瘤球数量, 进行统计分析。

### 1.4 CCK-8法检测WAY-312对GSC细胞活力的影响

GSC以每孔 $4 \times 10^3$ 个细胞接种到96孔板, 每组设3个复孔。根据实验分组加入药物干预, 对照组加入等量0.1% DMSO, 混匀后培养72 h。每孔加入10 μL CCK-8试剂, 继续孵育2 h。使用酶标仪检测各孔450 nm波长处的光密度(D)值。

### 1.5 WB法检测WAY-312对GSC干性标志物及周期/凋亡相关蛋白表达的影响

GSC分别经不同浓度WAY-312及0.1% DMSO处理72 h, 离心去除上清。加入放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation, RIPA)裂解液, 该裂解液为磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂混合液按1:100的比例与RIPA裂解液混匀配制而成。吹打混匀并放置于4℃摇床旋转裂解至少30 min。4℃、12 000 r/min离心15 min, 吸取上清总蛋白, 采用BCA法进行蛋白定量。

蛋白样品经恒压电泳后, 120 V恒压电转。室温下用3% BSA封闭2 h, 再用1×TBST缓冲液洗膜3次, 每次10 min。加入一抗4℃孵育过夜, 洗膜后加入1:4 000比例稀释的HRP-山羊抗兔/鼠IgG二抗室

温孵育 2 h。洗涤后在 Bio-Rad 全自动曝光机显影板上, 均匀滴加预配制的增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影液进行曝光。

#### 1.6 有限稀释实验检测 WAY-312 对 GSC 自我更新能力的影响

GSC 经 0.1% DMSO 和 12.5、25、50、100 nmol/L 的 WAY-312 预处理后, 制备单细胞悬液并计数。每孔按 1、5、10、20、40、80、160 个细胞分别接种于 96 孔板, 每组设 10 个复孔, 每 3 d 更换新鲜干细胞培养基。每日在显微镜下观察各孔肿瘤球形成情况, 记录实验数据并分析。

#### 1.7 细胞计数法检测 WAY-312 对 GSC 增殖的影响

取对数生长期的 GSC, 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔板。实验组加入不同浓度的含 WAY-312 的培养基, 每个实验组设 3 个平行孔, 每 3 d 补充适量新鲜培养基。分别在培养第 3、6、9、12 d 进行细胞计数, 记录并统计分析细胞生长速率。

#### 1.8 流式细胞术检测 WAY-312 对 GSC 细胞周期分布与凋亡的影响

取对数生长期的 GSC 制成单细胞悬液, 以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞的密度接种于 6 孔板。实验组用 50、100、200 nmol/L 的 WAY-312 处理, 对照组用等量 0.1% DMSO 处理。培养 72 h 后, 800 r/min 的转速离心 5 min, 离心后弃去上清液, 收集细胞沉淀。每管中加入 500  $\mu$ L 经 4  $^{\circ}$ C 预冷的 PBS, 洗涤 2~3 次, 以 800 r/min 离心 5 min 弃上清。在避光条件下, 根据实验所需加入不同染料。细胞周期实验加入含核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染料, 细胞凋亡试验加入 Annexin V-FITC/PI 染料, 涡旋混匀后转移到上样管中, 室温避光孵育 15 min 后上机检测, 并用流式细胞术分析软件分析周期分布情况及细胞凋亡情况。

#### 1.9 Caspase-Glo 3/7 法检测 WAY-312 对 GSC 凋亡相关分子活性的影响

GSC 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。实验组加入不同浓度的 WAY-312, 对照组加入 0.1% DMSO, 均处理 72 h。每孔加入与培养基等体积的 Caspase-Glo 3/7 活性检测试剂, 室温避光孵育 10 min。使用 GloMax Luminometer 检测每组样品的发光强度, 以此反映 Caspase-3/7 活性。

#### 1.10 WAY-312 对 GSC 原位移植瘤小鼠模型肿瘤生长及生存期的影响

本研究中的动物实验方案已获得徐州医科大学伦理委员会的批准 (伦理批准号: 202207s093)。21 只 6 周龄 BALB/c 品系裸鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(苏)2018-0008,

饲养于无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级环境, 温度  $(22 \pm 2)^{\circ}$ C, 湿度  $(50 \pm 5)\%$ 。异氟烷麻醉后, 在立体定位仪引导下向小鼠右侧纹状体注射带有稳定表达萤光素酶 (luciferase) 的胶质瘤干细胞 GSC63, 构建 GSC 原位肿瘤模型。成瘤后, 随机分成 2 组: WAY-312 治疗组 ( $n = 11$ ) 与对照组 ( $n = 10$ )。2 组分别原位注射药物 WAY-312 或等体积 PBS, 每周给药 1 次, 共 4 周。每组取 3 只小鼠用于监测肿瘤生长, 每隔 7 d 用小动物活体成像监测肿瘤大小, 记录荧光强度。剩余小鼠用于记录荷瘤小鼠生存时间, 用 GraphPad Prism 9.0 软件分析生存差异并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线 (以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义)。

#### 1.11 统计学处理

本研究的全部实验均经 3 次独立重复, 实验结果图为各实验的代表性结果。使用软件 GraphPad Prism 9.5.1 进行数据处理和统计, 并且绘制实验结果图, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用两独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素或双因素方差分析。采用 Kaplan-Meier 法对动物进行生存分析, 通过 log-rank 检验比较两组间生存时间的差异。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 筛选获得可显著抑制 GSC 增殖与成球的小分子化合物

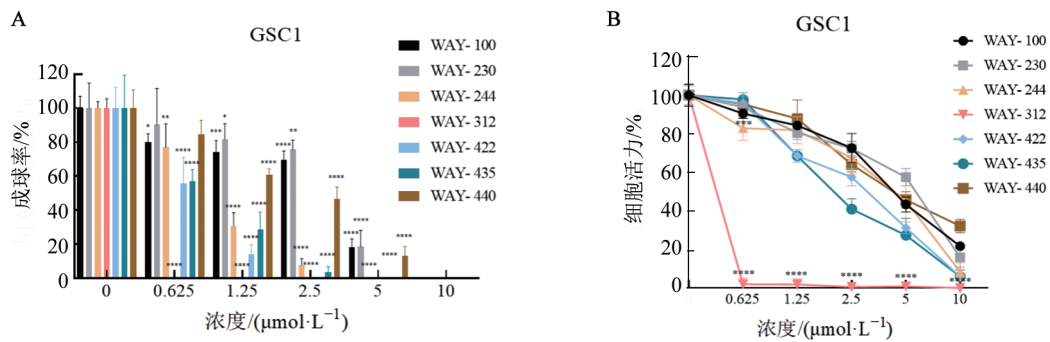
为筛选对 GSC 具有高效抑制活性的新型化合物, 采用肿瘤球形成及 CCK-8 实验, 对购买的多样化化合物库中的化合物进行活性筛选。用 10  $\mu$ mol/L 浓度进行初筛, 获得了 7 种活性较好的小分子化合物, 根据化合物序号分别命名为 WAY-100、WAY-230、WAY-244、WAY-312、WAY-422、WAY-435 和 WAY-440。进一步对这 7 种小分子化合物进行不同浓度的活性验证, 发现它们对 GSC1 成球能力与增殖均具有显著的抑制作用, 且呈浓度依赖性抑制 (图 1)。相较于其他化合物, WAY-312 对 GSC1 肿瘤球形成及细胞活力的抑制作用最强, 且在低浓度 (625 nmol/L) 即可完全杀伤 GSC1 细胞。因此, 本研究选择 WAY-312 作为后续实验的小分子化合物。

### 2.2 WAY-312 抑制多种 GSC 细胞系的活力及增殖

为分析 WAY-312 对胶质瘤干细胞的广谱抑制能力, 采用 WAY-312 处理 GSC1、GSC2、GSC3、GSC21 4 种细胞系, CCK-8 法检测细胞活力。结果显示, WAY-312 对 4 种 GSC 均具有显著抑制作用, 其中对 GSC1 的抑制相对较弱 (与 0 nmol/L 相比, 在 20 nmol/L 时  $P < 0.05$  有显著统计学意义), 对 GSC2 的抑制作用

最强(与 0 nmol/L 相比,在低浓度 0.8 nmol/L 时即有  $P < 0.05$  显著统计学意义)(图 2)。因此选择 GSC1 和

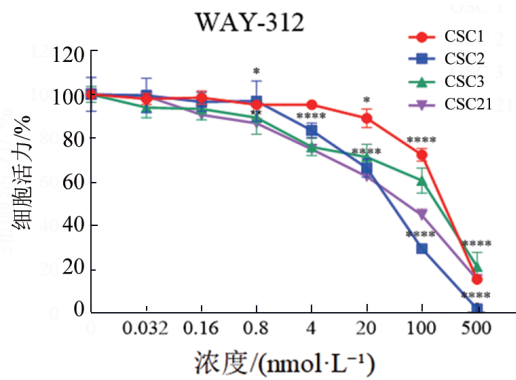
GSC2 细胞系开展后续研究。



A: 肿瘤球形成实验检测化合物对 GSC1 成球的抑制作用; B: CCK-8 法检测各化合物对 GSC1 活力的影响(双因素方差分析将各浓度加药组与相应的 0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  组进行比较并进行多重比较检验,为了清晰展示结果,只标注具有显著差异的有效浓度)。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

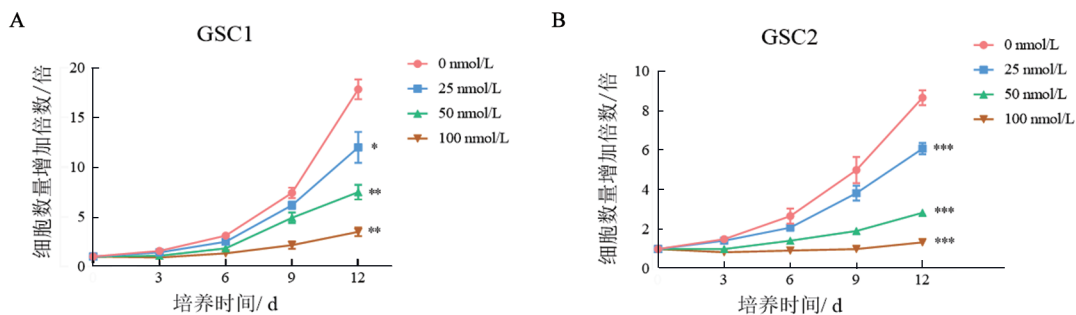
图 1 WAY-312 等 7 种化合物对 GSC1 成球能力(A)和细胞活力(B)的抑制作用



双因素方差分析将各 GSC 不同浓度加药组与相应的 0 nmol/L 组进行比较,并进行多重比较检验。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 2 WAY-312 对 GSC 活力的抑制作用



加药组与 0 nmol/L 组相比,  $n = 3$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 3 WAY-312 对 GSC1(A)和 GSC2(B)细胞生长的抑制作用

WB 法检测 WAY-312 对 GSC 干性标志物蛋白表达水平的影响,结果显示干性标志物蛋白 SOX2、OLIG2、BMI1 的表达水平随 WAY-312 浓度升高而有降低趋势(图 4D、E)。

#### 2.4 WAY-312 抑制 GSC 的自我更新能力

为了探讨 WAY-312 对 GSC 自我更新能力的影

响,进行体外有限稀释实验,结果(图 5)显示,对照组 GSC1 和 GSC2 的肿瘤球形成数目与接种细胞数目呈良好线性关系,而 WAY-312 处理组该线性关系被破坏,提示 WAY-312 可显著抑制 GSC 的自我更新能力。

#### 2.3 WAY-312 抑制 GSC 肿瘤球形成及干性标志物表达

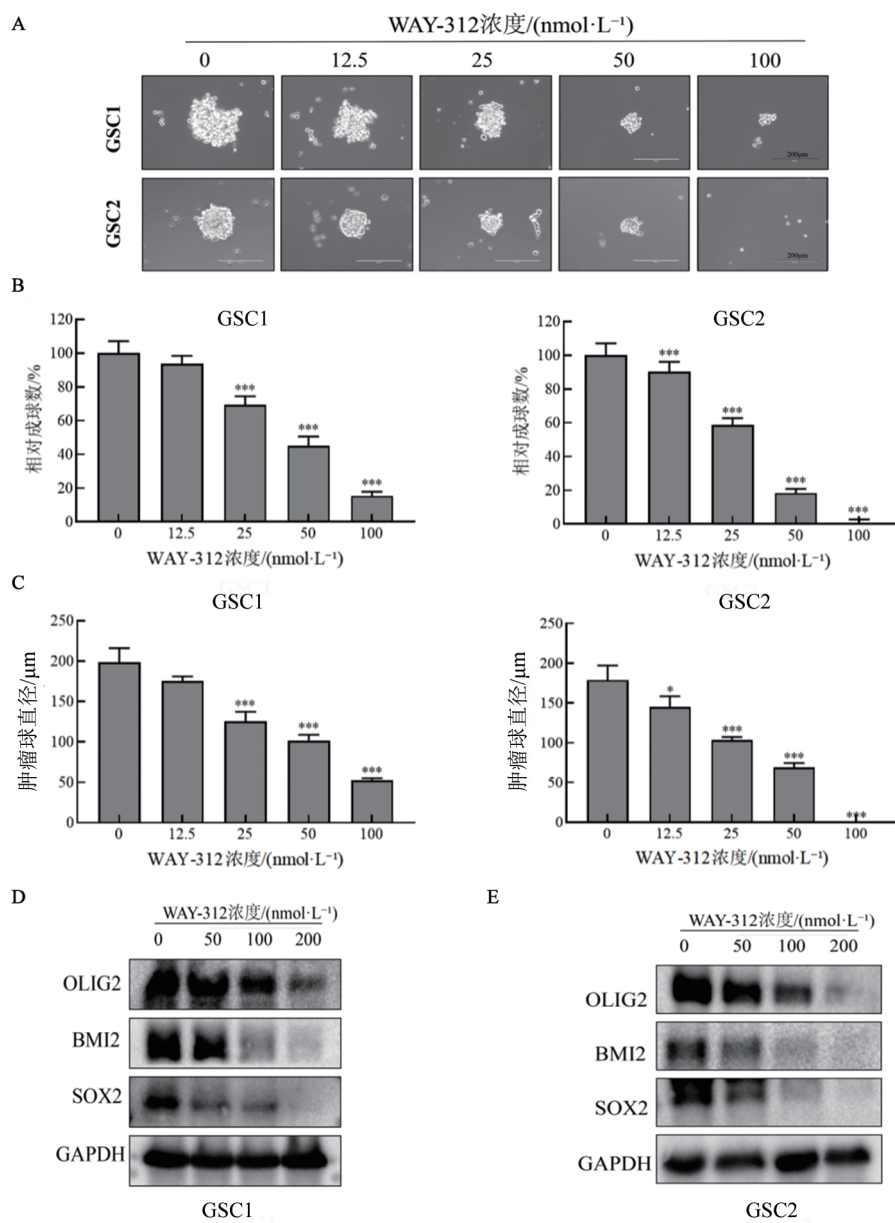
为进一步验证 WAY-312 对 GSC 肿瘤球形成能力的影响,用不同浓度的 WAY-312 处理 GSC1 和 GSC2 细胞,统计两种 GSC 细胞成球数目与大小。结果如图 4 所示,与对照组相比,WAY-312 可显著抑制 GSC1 和 GSC2 肿瘤球的数目及大小,且该抑制作用呈一定的浓度依赖性趋势(图 4A~C)。

#### 2.5 WAY-312 诱导 GSC 细胞周期阻滞于 G2/M 期

流式细胞术检测 WAY-312 对 GSC 周期进程的影

响,结果(图 6A~D)显示,WAY-312 处理可显著增加 G2/M 期细胞百分比,而降低 G1 期细胞百分比 ( $P < 0.05$ )。WB 实验结果(图 6E、F)显示,随着

WAY-312 浓度增加,GSC1 和 GSC2 中周期相关蛋白 Cyclin B1、CDK4 及 CDK6 的表达水平均呈下降趋势。



A: 检测 WAY-312 对肿瘤球形成的抑制作用(标尺= 200 μm);B、C:肿瘤球数目及肿瘤球大小统计(加药组与 0 nmol/L 组相比,  $n = 3$ , \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ );D、E:WB 法检测 WAY-312 对 GSC 干性标志物蛋白表达水平的影响。

图4 WAY-312 抑制 GSC 的肿瘤球形成和干性维持

### 2.6 WAY-312 促进 Caspase-3/7 活化进而诱导 GSC 细胞凋亡

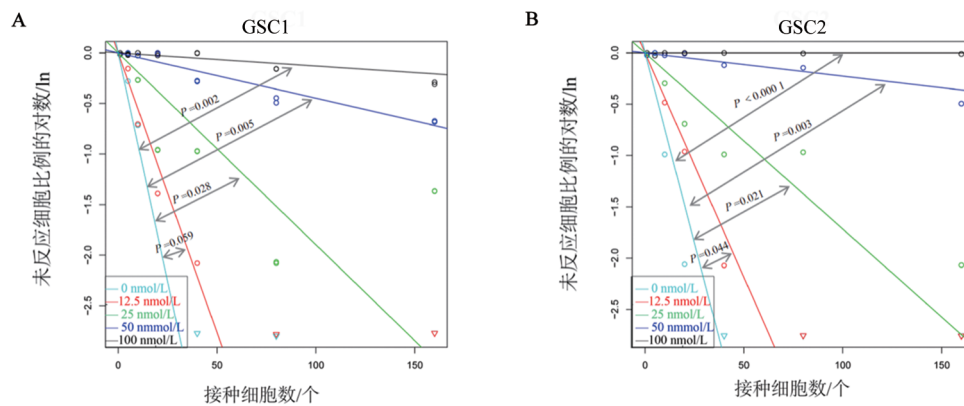
流式细胞术检测各处理组的细胞凋亡率,结果(图 7A~D)显示,随 WAY-312 浓度增大,GSC1 和 GSC2 的细胞凋亡率也相应增加( $P < 0.05$ ),表明 WAY-312 可显著诱导 GSC 细胞凋亡。

通过 WB 实验进一步检测 WAY-312 对凋亡关键蛋白 cleaved-PARP、BAX、BCL2 表达的影响。如图 7E、F 所示,WAY-312 处理可上调促凋亡蛋白 cleaved-

PARP 和 BAX 的表达,同时下调抗凋亡蛋白 BCL2 的表达,该结果与流式细胞术检测到的 WAY-312 诱导 GSC 凋亡的结果一致。前期实验结果已证实 WAY-312 可诱导 GSC 凋亡并调控相关蛋白表达。如图 8 所示,WAY-312 可显著增加 Caspase-3/7 活性,且该激活作用呈一定的浓度依赖性趋势。

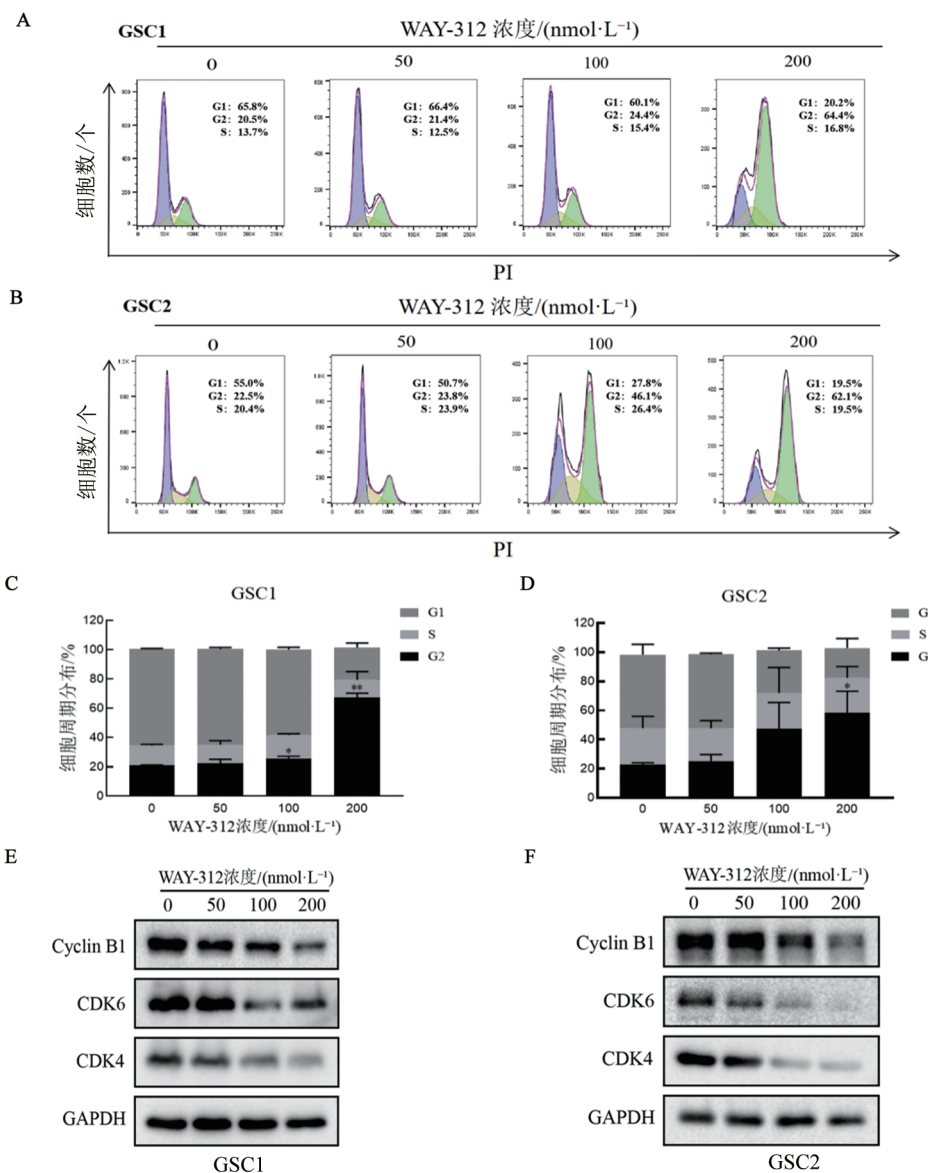
### 2.7 WAY-312 抑制 GSC 原位移植瘤生长并延长荷瘤小鼠生存期

为了探讨 WAY-312 对 GSC 体内成瘤的抑制作



有限稀释实验采用非线性拟合似然比检验,加药组均与 0 nmol/L 组相比,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

图5 WAY-312对GSC1(A)和GSC2(B)自我更新能力的抑制作用



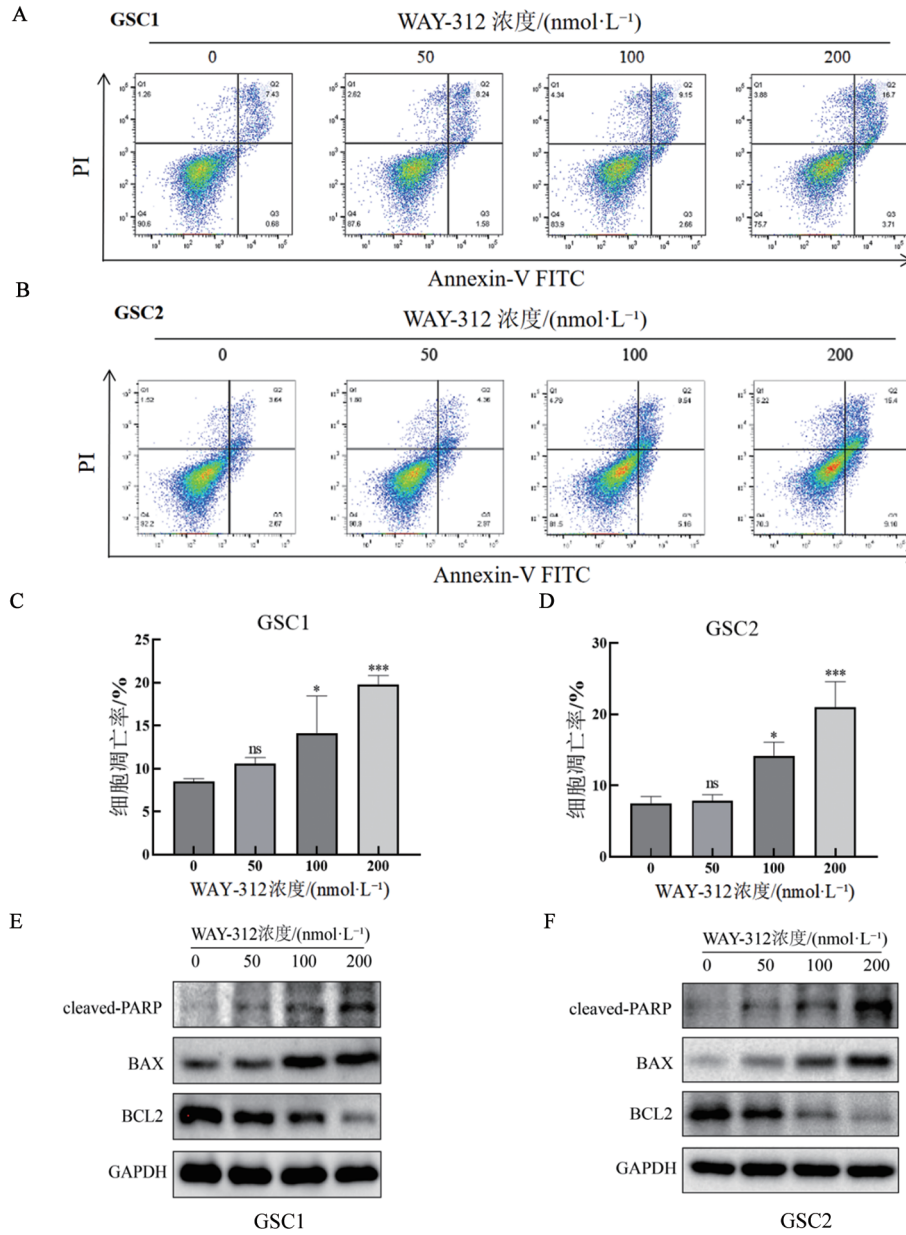
A~D: 流式细胞术检测 WAY-312 对 GSC 细胞周期的影响, 统计分析为加药组与 0 nmol/L 组 G2/M 期细胞百分比相比 ( $n = 3$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); E、F: WB 法检测 WAY-312 对 GSC 细胞周期相关蛋白表达水平的影响。

图6 WAY-312 诱导 GSC1 和 GSC2 周期阻滞于 G2/M 期并下调相关细胞周期蛋白表达

用, 构建了小鼠颅内 GSC 原位异种移植瘤模型(图 9A)。小动物活体成像结果表明, 经 WAY-312 治疗后

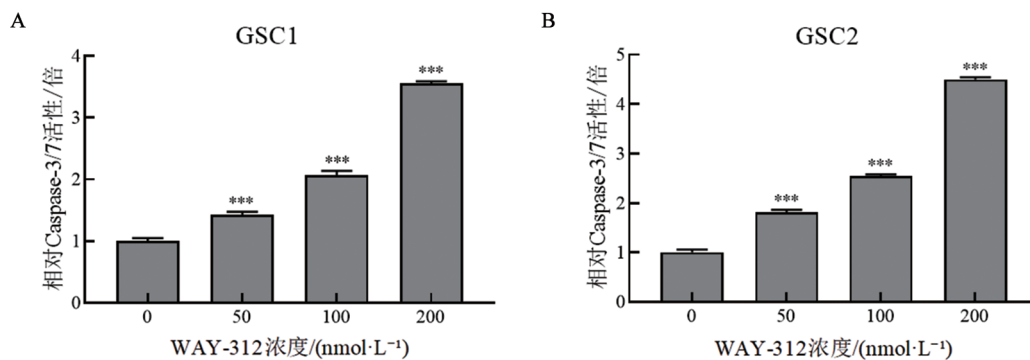
的荷瘤小鼠颅内肿瘤生长受到了显著抑制(图 9C、D)。生存分析结果显示, WAY-312 治疗延长了荷瘤

小鼠的平均生存时间,从对照组的(25.9 ± 3.4)d延长至 WAY-312 治疗组的(50.3 ± 8.3)d(各组例数分别为 7 和 8, 无删失数据)。



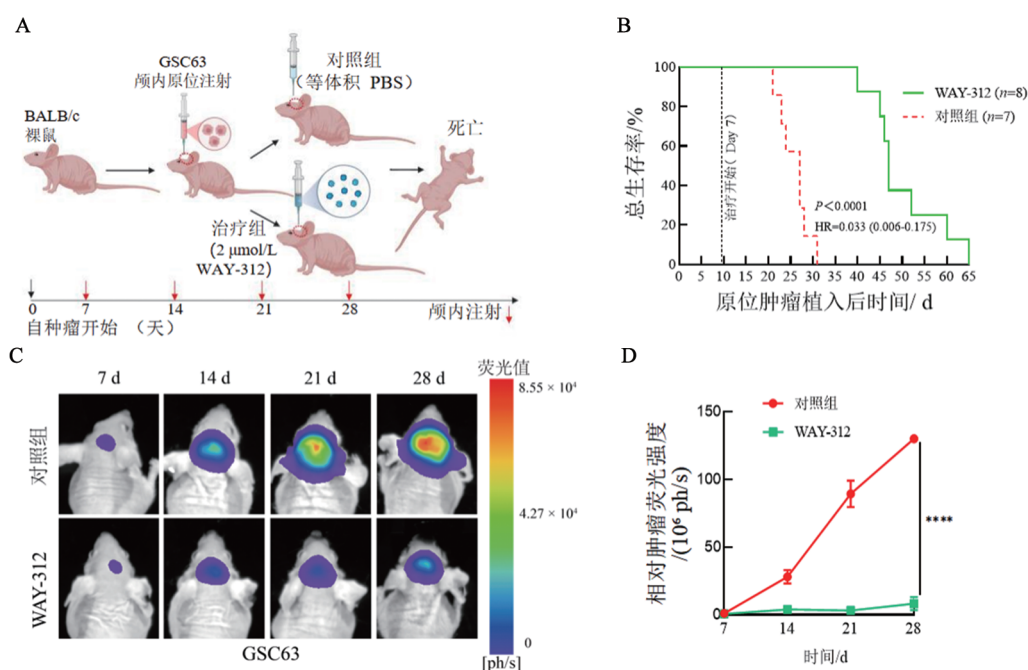
A~D:流式细胞术检测 WAY-312 对 GSC 凋亡的影响(加药组与 0 nmol/L 组相比,  $n = 3$ , \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ); E、F: WB 法检测 WAY-312 对 GSC 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响。

图 7 WAY-312 诱导 GSC1 和 GSC2 凋亡



$n = 3$ , 加药组与 0 nmol/L 组相比, \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 8 WAY-312 激活 GSC1 和 GSC2 中 Caspase-3/7 活性



A: 动物实验设计和给药方案示例图, 裸鼠被分成对照组和 WAY-312 治疗组; B: Kaplan-Meier 生存曲线分析不同治疗组荷瘤鼠的生存时间; C、D: 小动物成像动态监测小鼠颅内肿瘤生长情况, 并对荧光信号值进行统计分析 ( $n = 3$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ )。

图9 WAY-312 抑制 GSC 原位移植瘤生长并延长小鼠生存期

### 3 讨论

GBM 作为中枢神经系统恶性程度最高的肿瘤, 其高复发率和高致死率的核心原因在于 GSC。由于 GSC 具有自我更新能力与多向分化潜能, 使肿瘤逃避传统手术、放化疗的杀伤作用, 因此靶向 GSC 的治疗策略已成为突破 GBM 治疗瓶颈的关键方向<sup>[10]</sup>。小分子抑制剂具有靶点广泛、给药便捷、易穿透血脑屏障等优势, 已成为 GSC 靶向治疗的重要研究载体<sup>[11-12]</sup>。本研究从小分子化合物库中筛选获得新型抑制剂 WAY-312, 验证了其对 GSC 干性维持、增殖及凋亡的调控作用, 初步探讨其潜在的作用机制, 为 GBM 的精准治疗提供新的实验依据与候选药物。

GSC 的肿瘤球形成能力是其维持干性的典型特征<sup>[13]</sup>, 其高度自我更新能力亦是肿瘤复发的核心原因之一, 其通过激活 Wnt、AKT、mTOR 等信号通路维持肿瘤异质性, 促进免疫逃逸, 进而实现治疗抵抗<sup>[14-16]</sup>。本研究通过肿瘤球形成实验、有限稀释实验及细胞活力实验证实, 小分子抑制剂 WAY-312 在低浓度下即可显著抑制 GSC 的肿瘤球形成效率与自我更新能力, 且呈浓度依赖性。已知干细胞的成球能力及干性维持对其存活与生长至关重要。干性维持能力可使 GSC 长期存活并持续增殖, 是其抵抗靶向治疗的关键因素之一<sup>[17]</sup>。为进一步明确 WAY-312 调控 GSC 干性的分子机制, 本研究检测了经典干性相关标志物<sup>[18]</sup>SOX2、OLIG2、BMI1 的蛋白表达水平。结果显

示, 随 WAY-312 浓度升高, SOX2、OLIG2、BMI1 的蛋白表达水平逐渐下降。已有研究证实, SOX2 蛋白作为干细胞核心调控因子, 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路维持 GSC 的自我更新与肿瘤起始能力<sup>[19]</sup>; OLIG2 与 BMI1 蛋白则可通过调控 Notch 信号通路参与 GSC 的干性维持与化疗耐药。本研究发现 WAY-312 可同步下调 SOX2、OLIG2、BMI1 的表达, 说明 WAY-312 具有多靶点调控优势, 可以更全面地抑制 GSC 的干性特征。

癌细胞的细胞周期相关蛋白活性失调 (导致细胞周期紊乱与失控生长) 及凋亡逃逸 (同样引发细胞无序增殖) 是其异常增殖的核心特征<sup>[20]</sup>。流式细胞术结果提示, WAY-312 可使 GSC1 和 GSC2 均阻滞于 G2/M 期, 同时显著诱导 GSC 凋亡。Cyclin B1 作为广泛研究的细胞周期蛋白, 为 G2/M 期调控的关键分子, 对有丝分裂启动至关重要。而 CDK4、CDK6 是细胞周期蛋白依赖性激酶家族中的关键分子, 同时也是细胞能从 G1 期进入 S 期的关键酶<sup>[21]</sup>。本研究通过 WB 结果显示, WAY-312 可以浓度依赖性下调 Cyclin B1、CDK4、CDK6 的蛋白表达, 提示 WAY-312 可能通过协同抑制 G1 期向 S 期转换与 G2/M 期进程, 实现对 GSC 细胞周期的双重调控。此外, 本研究发现 WAY-312 可显著诱导 GSC 发生凋亡。Caspase 家族是一类胞内蛋白酶, 在细胞凋亡过程中发挥关键作用, 其中 Caspase-3/7 是凋亡执行阶段的核心分子<sup>[22]</sup>, 凋亡激活后 PARP 可被特异性剪切为 cleaved-PARP,

可以直接反映凋亡的发生和进展。WAY-312 处理细胞后可上调促凋亡蛋白 cleaved-PARP、BAX 的表达, 下调抗凋亡蛋白 BCL2 的表达, 同时提高 Caspase-3/7 活性, 促进 PARP 切割, 提示 WAY-312 可通过激活内源性凋亡通路诱导 GSC 凋亡。已有研究<sup>[23]</sup>表明, BCL2 作为抗凋亡蛋白家族核心成员, 其高表达可导致 GSC 逃避凋亡、产生化疗耐药; 与此同时, BAX 作为 BCL2 家族中的促凋亡蛋白, 其表达升高可拮抗 BCL2 的抗凋亡作用, 启动细胞凋亡。本研究中 WAY-312 可显著下调 BCL2/BAX 比值, 并且同时上调 cleaved-PARP 蛋白表达, 进一步增强凋亡诱导效应, 说明其凋亡调控机制更为全面, 为克服 GSC 凋亡逃逸提供了新思路。

本研究通过筛选获得了对 GSC 具有显著抑制活性的小分子化合物 WAY-312, 证实其可有效抑制 GSC 的干性维持与增殖能力。进一步体外实验验证, WAY-312 的抑制效应可能通过调控 GSC 的细胞周期与凋亡功能得以实现。体内实验也证实 WAY-312 可以抑制 GSC 移植瘤的生长, 延长荷瘤鼠生存。综上, 该研究为靶向清除 GSC 治疗 GBM 提供了实验基础。下一步研究将聚焦于探索化合物 WAY-312 抑制 GSC 生存和干性的潜在靶点与相关信号通路, 对深入开展小分子抑制剂抗脑胶质瘤的研究及临床转化应用具有重要意义。

**[利益冲突声明]** 所有作者声明无利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] LI K, DUAN M Y, LU Q, et al. Advances in neuroscientific mechanisms and therapies for glioblastoma[J]. *iScience*, 2025, 28(9): 113347. DOI:10.1016/j.isci.2025.113347.
- [2] OSTROM Q T, CIOFFI G, WAITE K, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014-2018[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(Suppl): iii1-iii105. DOI:10.1093/neuonc/noab200.
- [3] BARI D B, PARDESHI C V. Monoclonal antibodies-anchored quantum dots-based delivery strategies for glioblastoma treatment: challenges and applications[J]. *Adv Pharm Bull*, 2025, 15(2): 341-358. DOI:10.34172/apb.025.44026.
- [4] CHEN Z X, WANG H W, WANG S, et al. USP9X deubiquitinates ALDH1A3 and maintains mesenchymal identity in glioblastoma stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(5): 2043-2055. DOI:10.1172/jci126414.
- [5] LIU Z Y, YU K, CHEN K L, et al. USP18 deubiquitinates and stabilizes SOX9 to promote the stemness and malignant progression of glioblastoma[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11: 237. DOI:10.1038/s41420-025-02522-9.
- [6] NI K X, LIU Y K, DI P G, et al. Chromobox protein homolog 7 suppresses the stem-like phenotype of glioblastoma cells by regulating the myosin heavy chain 9-NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11: 74. DOI:10.1038/s41420-025-02362-7.
- [7] BAO S D, WU Q L, MCLENDON R E, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760. DOI: 10.1038/nature05236.
- [8] ALEJO S, PALACIOS B, VENKATA P P, et al. Abstract 6263: Lysine-specific histone demethylase 1A (KDM1A/LSD1) inhibition attenuates DNA double-strand break repair and augments efficacy of temozolomide in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(7\_Suppl): 6263. DOI:10.1158/1538-7445.am2023-6263.
- [9] DATTA S, SEARS T, CORTOPASSI G, et al. Repurposing FDA approved drugs inhibiting mitochondrial function for targeting glioma-stem like cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111058. DOI:10.1016/j.biopha.2020.111058.
- [10] CZARNYWOJTEK A, BOROWSKA M, DYRKA K, et al. Glioblastoma multiforme: the latest diagnostics and treatment techniques[J]. *Pharmacology*, 2023, 108(5): 423-431. DOI:10.1159/000531319.
- [11] KENCHAPPA R S, RADNAI L, YOUNG E J, et al. MT-125 inhibits non-muscle myosin II A and II B and prolongs survival in glioblastoma[J]. *Cell*, 2025, 188(17): 4622-4639. DOI: 10.1016/j.cell.2025.05.019.
- [12] SWEHA S R, CHUNG C, NATARAJAN S K, et al. Epigenetically defined therapeutic targeting in H3.3G34R/V high-grade gliomas [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(615): eabf7860. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf7860.
- [13] WANG Q, JIA S N, WANG D, et al. A combination of BRD4 and HDAC3 inhibitors synergistically suppresses glioma stem cell growth by blocking GLI1/IL6/STAT3 signaling axis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(12): 2542-2553. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-20-0037.
- [14] ALVARADO A G, THIAGARAJAN P S, MULKEARNS-HUBERT E E, et al. Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(4): 450-461. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.001.
- [15] GRINAT J, HEUBERGER J, VIDAL R O, et al. The epigenetic regulator Mll1 is required for Wnt-driven intestinal tumorigenesis and cancer stemness[J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 6422. DOI: 10.1038/s41467-020-20222-z.
- [16] YIN J X, DING F S, CHENG Z C, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification of LINC00839 maintains glioma stem cells and radiation resistance by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14: 417. DOI:10.1038/s41419-023-05933-7.
- [17] HE P, DAI Q, WU X J. New insight in urological cancer therapy: from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to application of nano-biomaterials[J]. *Environ Res*, 2023, 229: 115672. DOI: 10.1016/j.envres.2023.115672.
- [18] YANG T, ZENG Y, LI Y, et al. Par6/SOX2 interact to modulate stemness maintenance in glioma by regulating the EGFR/PI3K/AKT signaling cascade[J]. *Oncogene*, 2025, 44(46): 4441-4461. DOI:10.1038/s41388-025-03595-7.
- [19] YANG L Q, SHI P F, ZHAO G C, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020,

- 5: 8. DOI:10.1038/s41392-020-0110-5.
- [20] MA L, BIAN M Y, GAO H, et al. A novel 3-acyl isoquinolin-1(2H)-one induces G2 phase arrest, apoptosis and GSDME-dependent pyroptosis in breast cancer[J]. PLoS One, 2022, 17(5): e0268060. DOI:10.1371/journal.pone.0268060.
- [21] SOBECKI M, MROUJ K, COLINGE J, et al. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels[J]. Cancer Res, 2017, 77(10): 2722-2734. DOI:10.1158/0008-5472.can-16-0707.
- [22] SAHOO G, SAMAL D, KHANDAYATARAY P, et al. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(10): 5805-5837. DOI: 10.1007/s12035-023-03433-5.
- [23] SHI L, CHEN J, YANG J, et al. miR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity[J]. Brain Res, 2010, 1352: 255-264. DOI:10.1016/j.brainres.2010.07.009.
- [收稿日期] 2026-02-13 [修回日期] 2026-04-18  
[本文编辑] 黄静怡