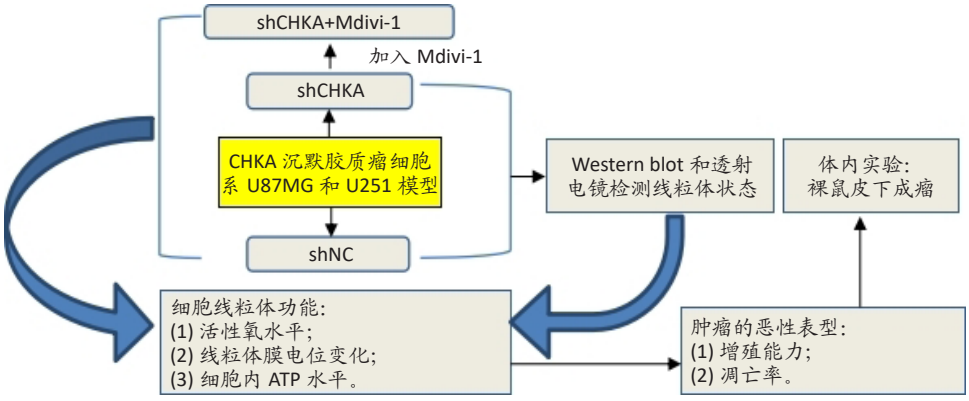
胆碱激酶 α 沉默诱导线粒体功能障碍影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡

赵 阳[1]，李嘉麟[2]，吴 箫[1]，邹有瑞[3]，刘 阳[3]，马 辉[3]

https://doi.org/10.12307/2026.540
采用日期：2025-01-20
修回日期：2025-04-03
在线日期：2025-04-26
中图分类号：
R459.9；R318；R739.41
文章编号：
2095-4344(2026)01-00130-09
文献标识码：B

文章快速阅读： 胆碱激酶 α 与胶质瘤细胞线粒体功能的关键联系



文题释义：

胶质瘤： 是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤，其中胶质母细胞瘤恶性程度最高，具有高度侵袭性和异质性，现有治疗手段难以显著延长患者的生存期。胆碱激酶α作为磷脂代谢的关键酶，与肿瘤细胞增殖和代谢重编程密切相关。胆碱激酶α的高表达与胶质瘤的侵袭性和恶性呈正相关，但具体作用机制尚不明确。

线粒体功能： 线粒体是细胞能量代谢的中心，负责维持ATP生成、氧化还原平衡和凋亡调控。肿瘤细胞常表现出线粒体功能异常，包括活性氧水平升高和线粒体膜电位紊乱，这有助于肿瘤细胞的生存和增殖。

摘要

背景： 胆碱激酶α是磷脂代谢的关键酶，参与磷脂酰胆碱的合成，在维持细胞膜完整性和信号传导中起重要作用。研究表明，胆碱激酶α在多种肿瘤中高表达，与细胞增殖、代谢重编程和肿瘤进展密切相关。作为潜在的治疗靶点，胆碱激酶α在肿瘤代谢和线粒体功能中的作用尚需进一步探讨。

目的： 评估胆碱激酶α对胶质瘤U87MG和U251细胞增殖和凋亡的影响及机制。

方法： 将胆碱激酶α沉默慢病毒及空载对照病毒转染至胶质瘤U87MG和U251细胞中，通过透射电镜观察线粒体形态，利用Western blot检测线粒体结构和功能蛋白的表达，活性氧荧光探针检测细胞内的活性氧水平，JC-1试剂盒检测线粒体膜电位，化学发光法测定细胞内ATP含量，CCK-8检测细胞增殖能力，流式细胞术检测细胞凋亡水平；然后采用线粒体分裂抑制剂Mdivi-1保护胆碱激酶α沉默慢病毒细胞的线粒体功能。最后皮下注射U87MG细胞构建裸鼠皮下肿瘤模型，观察胆碱激酶α沉默前后以及使用线粒体分裂抑制剂Mdivi-1后裸鼠肿瘤生长情况。

结果与结论： ①与空载对照组细胞相比，胆碱激酶α沉默慢病毒组U87MG和U251细胞的线粒体出现明显空泡化和线粒体嵴断裂等结构异常现象，线粒体结构和功能相关蛋白TOM20、ACO2和ATP5A表达均显著下降($P < 0.01$，$P < 0.001$)，SOD2表达显著上升($P < 0.01$，$P < 0.000\ 1$)，活性氧荧光强度显著增加($P < 0.01$)，线粒体膜电位和ATP水平显著降低($P < 0.01$，$P < 0.001$)，细胞增殖能力降低($P < 0.01$)，凋亡水平提高($P < 0.001$)；②加入Mdivi-1处理后，U87MG和U251细胞的活性氧荧光强度降低($P < 0.05$，$P < 0.01$)，线粒体膜电位和ATP水平均显著恢复($P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$)，细胞增殖能力提高($P < 0.05$，$P < 0.01$)，凋亡水平下降($P < 0.05$)；③此外，体外裸鼠皮下成瘤实验显示，与空载对照组相比，胆碱激酶α沉默慢病毒组U87MG细胞形成的皮下肿瘤质量和生长速度显著降低($P < 0.000\ 1$)，Mdivi-1处理后，肿瘤质量和生长速度显著增加($P < 0.000\ 1$)；④结果表明，胆碱激酶α沉默诱导线粒体功能障碍影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡。

关键词： 胆碱激酶α；胶质母细胞瘤；线粒体功能；Mdivi-1；活性氧；线粒体膜电位；增殖；凋亡

Choline kinase alpha silencing affects proliferation and apoptosis in glioma cells by inducing mitochondrial dysfunction

Zhao Yang[1], Li Jialin[2], Wu Xiao[1], Zou Yourui[3], Liu Yang[3], Ma Hui[3]

[1]Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; [2]Tianjin Hospital, Tianjin 300000, China; [3]General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Zhao Yang, Master candidate, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

[1] 宁夏医科大学，宁夏回族自治区银川市 750004；[2] 天津市天津医院，天津市 300000；[3] 宁夏医科大学总医院，宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者： 赵阳，男，1998 年生，汉族，宁夏医科大学在读硕士，主要从事胶质瘤的研究。

通讯作者： 马辉，博士，教授，宁夏医科大学总医院，宁夏回族自治区银川市 750004

https://orcid.org/0000-0001-5801-549X(马辉)；https://orcid.org/0009-0002-1715-0227(赵阳)

基金资助： 国家自然科学基金项目 (82460469)，项目负责人：马辉；宁夏自然科学基金项目 (2024AAC03591)，项目负责人：刘阳；宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03559)，项目负责人：马辉

引用本文： 赵阳，李嘉麟，吴箫，邹有瑞，刘阳，马辉 . 胆碱激酶 α 沉默诱导线粒体功能障碍影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):130-138.

Corresponding author: Ma Hui, PhD, Professor, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Choline kinase alpha is a key enzyme in phospholipid metabolism, involved in the synthesis of phosphatidylcholine, and plays an important role in maintaining cell membrane integrity and signal transduction. Research has shown that choline kinase alpha is highly expressed in various tumors and is closely related to cell proliferation, metabolic reprogramming, and tumor progression. As a potential therapeutic target, the role of choline kinase alpha in tumor metabolism and mitochondrial function still needs further exploration.

OBJECTIVE: To evaluate the effects and the underlying mechanisms of choline kinase alpha on the proliferation and apoptosis of glioma U87MG and U251 cells.

METHODS: Short hairpin RNA of choline kinase alpha and its empty vector control were transfected into U87MG and U251 glioma cells. Mitochondrial morphology was observed by transmission electron microscopy. Mitochondrial structure and functional protein levels were assessed by western blot assay. Reactive oxygen species levels in cells were measured using a reactive oxygen species fluorescent probe. Mitochondrial membrane potential was assessed with a JC-1 assay. Intracellular adenosine triphosphate levels were measured by chemiluminescence. Cell proliferation was evaluated using a CCK-8 assay. Apoptosis levels were analyzed by flow cytometry. The mitochondrial fission inhibitor Mdivi-1 was used to protect the mitochondrial function of the choline kinase α-silenced lentiviral cells. Finally, U87MG cells were subcutaneously injected to construct a subcutaneous tumor model in nude mice. The tumor growth in nude mice was observed before and after choline kinase alpha silencing and after the use of the mitochondrial fission inhibitor Mdivi-1.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the empty control group, the mitochondria of U87MG and U251 cells in the choline kinase alpha silencing lentivirus group exhibited significant structural abnormalities in mitochondria, such as vacuolization and cristae disruption. The expressions of mitochondrial structure and function-related proteins TOM20, ACO2, and ATP5A were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$), the expression of SOD2 was significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.000\ 1$), the fluorescence intensity of reactive oxygen species was significantly increased ($P < 0.01$), the mitochondrial membrane potential and adenosine triphosphate level were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$), the cell proliferation ability was reduced ($P < 0.01$), and the apoptosis level was increased ($P < 0.001$). (2) Following Mdivi-1 treatment, the fluorescence intensity of reactive oxygen species in U87MG and U251 cells decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), mitochondrial membrane potential and adenosine triphosphate levels were significantly restored ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), cell proliferation ability was improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and apoptosis level was decreased ($P < 0.05$). (3) In addition, the *in vitro* subcutaneous tumor formation experiment of nude mice showed that compared with the empty control group, the mass and growth rate of subcutaneous tumors formed by U87MG cells in the choline kinase alpha silencing lentivirus group were significantly reduced ($P < 0.000\ 1$). After Mdivi-1 treatment, the mass and growth rate of tumors were significantly increased ($P < 0.000\ 1$). (4) The results show that choline kinase alpha silencing affects the proliferation and apoptosis of glioma cells by inducing mitochondrial dysfunction.

Key words: choline kinase alpha; glioblastoma; mitochondrial function; Mdivi-1; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential; proliferation; apoptosis

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82460469 (to MH); Ningxia Natural Science Foundation, No. 2024AAC03591 (to LY); Ningxia Natural Science Foundation, No. 2022AAC03559 (to MH)*

How to cite this article: *ZHAO Y, LI JL, WU X, ZOU YR, LIU Y, MA H. Choline kinase alpha silencing affects proliferation and apoptosis in glioma cells by inducing mitochondrial dysfunction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):130-138.*

0 引言 Introduction

胶质瘤是中枢神经系统中最常见且侵袭性最强的恶性肿瘤，占所有恶性脑肿瘤的一半，具有高度异质性和恶性进展的特性[1-3]，尽管近年来在手术、放疗和化疗方面取得了一些进展，但患者的生存期为12–18个月[2]。因此，深入了解胶质瘤的分子机制并探索新的治疗靶点，对于提高患者预后具有重要意义。

胆碱激酶α(choline kinase alpha，CHKA)是一种参与细胞膜磷脂合成的重要酶，在多种癌症中具有高表达水平且与预后相关[4-5]。CHKA通过促进磷脂酰胆碱的合成，参与了细胞膜的形成和维持，是细胞增殖和存活的重要调控因子[6]。线粒体具有复杂的功能和信息处理网络，在肿瘤的进展中起着关键作用，保护膜结构和线粒体功能是重要的治疗目标之一[7-9]。研究表明，CHKA在胶质瘤中的异常表达可能与肿瘤恶性生长和侵袭性行为密切相关[10]。基于此，CHKA已成为胶质瘤治疗研究中的一个潜在靶点。CHKA参与线粒体磷脂生物合成酶的功能障碍或缺失会导致细胞呼吸功能障碍，影响线粒体蛋白质组装和稳定性，并导致线粒体形态异常甚至死亡[11]。因此，探究CHKA与线粒体功能的关系及治疗价值也非常重要。

线粒体在维持细胞能量代谢、调控细胞凋亡以及氧化应激反应中发挥着核心作用[12]。线粒体功能异常导致能量代谢障碍和活性氧的产生，进而导致线粒体膜电位改变以及对细胞凋亡和化疗药物的抵抗，这在胶质瘤的发病机制中起着重要的作用[13]。Mdivi-1是一种特异性线粒体分裂抑制剂，主要通过抑制线粒体相关动力蛋白的活性，阻止线粒体的异常分裂，从而维护线粒体功能[14]。

该研究旨在探讨沉默CHKA表达诱导线粒体功能障碍对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响。假设CHKA的沉默会导致线粒体功能障碍，如线粒体膜电位降低、活性氧水平升高和ATP含量减少，进而抑制肿瘤的恶性表型。通过Mdivi-1的干预，可以在一定程度上减弱沉默CHKA对肿瘤的抑制作用，从而验证线粒体功能障碍在CHKA影响胶质瘤恶性表型中的关键作用，并寻找CHKA治疗胶质瘤的潜在应用价值和机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 通过分子生物学、细胞生物学以及动物模型实验相结合的方法，系统评估CHKA沉默对胶质瘤细胞线粒体功能及增殖、凋亡的影响，探讨CHKA在胶质瘤发生发展中的作用机制。

1.2 时间及地点 实验于2024年4–10月在宁夏颅脑疾病重点实验室和宁夏医科大学实验动物中心完成。

1.3 材料 胶质瘤细胞系U87MG和U251均购自中国科学院上海细胞库；高糖型DMEM培养基和胎牛血清购自Gibco

公司；胰蛋白酶、青－链霉素购自北京索莱宝科技有限公司；Mdivi-1 购自美国 MCE 公司；CHKA 沉默慢病毒及其对照慢病毒由上海吉凯生物科技有限公司设计并合成；兔抗人 CHKA(ab88053) 抗体购自英国 Abcam 公司；兔抗人 SOD2(24127-1-AP)、ATP5A(14676-1-AP)、TOM20(11802-1-AP)、ACO2(11134-1-AP) 和 GAPDH(60004-1-Ig) 抗体购自 Proteintech 公司；羊抗兔 IgG 荧光二抗 (1 ： 1 000) 购自武汉 Abbkine 公司；全蛋白提取试剂盒、BCA 法蛋白质定量试剂盒和凋亡试剂盒购自江苏凯基公司；增强型活性氧检测试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 购自武汉北莱茵公司；增强型 ATP 检测试剂盒和 CCK-8 试剂购自上海碧云天有限公司；透射电镜购自日本 Olympus 公司；倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司；共聚焦荧光显微镜购自德国蔡司公司；细胞培养箱、酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司；电泳仪、转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司；离心机购自日本 Himac 公司；流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 人胶质细胞瘤细胞系 U87MG 和 U251 采用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青－链霉素的 DMEM 高糖型培养基，于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。

1.4.2 慢病毒转染 按照说明书取 U87MG、U251 细胞按照 5×10^7 L^{-1} 细胞浓度制备成单细胞悬液，均匀接种在 6 孔板中，每孔 2 mL，培养 16 h 后，以感染复数为 5 的病毒量，按照病毒体积计算公式：体积 =(感染复数 × 细胞数目)/ 病毒滴度，计算 CHKA 沉默慢病毒 (shCHKA) 及空载对照病毒 (shNC) 所需要的病毒体积。加入 960 μL 新鲜培养基、40 μL HiTransGP 和所需的病毒体积，继续培养 12 h，观察细胞生长情况，更换新鲜 DMEM 培养基，继续培养 72 h 后，通过荧光显微镜检测荧光信号的强度和分布，ImagePro Plus 6.0 图像分析软件分析后确认转染效率。最后使用含 2 μg/mL Puromycin 的培养基筛选细胞，48 h 后改用含 1 μg/mL Puromycin 的培养基继续培养细胞。

1.4.3 药物处理及细胞分组 将 U87MG、U251 细胞分别分为 shNC 组、shCHKA 组和 shCHKA+Mdivi-1 组。利用线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 保护线粒体功能 [15]。将 Mdivi-1 溶解于二甲基亚砜中，工作浓度为 10 μmol/L，然后对 shCHKA+Mdivi-1 组细胞进行干预，shNC 组和 shCHKA 组加入等量的二甲基亚砜，干预 48 h[16]。

1.4.4 蛋白免疫印迹法检测 收集 U87MG 和 U251 细胞，利用全蛋白提取试剂盒 (含蛋白酶和磷酸酶抑制剂) 充分裂解细胞，12 000 r/min 离心 5 min，收集上清液作为全细胞蛋白提取物。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，按照实验需求调整蛋白浓度一致。以 40 μL/ 孔的上样量行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后将凝胶上的蛋白以 250 mA、90 min 转到 PVDF 膜上，PVDF 膜放入 5% BSA 中室温封闭 1 h，加入兔抗人 CHKA(1 ： 2 000)、SOD2(1 ： 5 000)、ATP5A(1 ： 5 000)、TOM20(1 ： 2 000)、ACO2(1 ： 5 000)、GAPDH(1 ： 10 000)，4 ℃摇床过夜，TBST 清洗 3 次，每次 5 min，加入羊抗兔荧光二抗 (1 ： 1 000)，室温孵育 2 h，再用 TBST 清洗 3 次后曝光。实验重复 3 次。采用 ImagePro Plus 6.0 图像分析软件对条带进行灰度值分析。

1.4.5 细胞内活性氧检测 参照增强型活性氧检测试剂盒说明书操作，将各组胶质瘤细胞以 1×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中，培养 3 d 后，用无血清培养液清洗 2 次，将稀释好的 2′，7′－二氯荧光素二乙酸酯 (2′，7′-dichlorofluorescin diacetate，DCFH-DA) 工作液加入到细胞中，37 ℃孵育 20 min，用无血清培养液清洗 3 次，共聚焦荧光显微镜下观察、拍照，采用 ImagePro Plus 6.0 图像分析软件对各组细胞活性氧荧光强度进行定量分析，实验重复 3 次。

1.4.6 JC-1 线粒体膜电位检测 参照增强型线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行操作，将各组胶质瘤细胞以 1×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中，培养 3 d 后，加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，混匀后放入 37 ℃细胞培养箱中孵育 20 min，吸除上清液，用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，加入 1 mL 细胞培养液，共聚焦荧光显微镜下观察并拍照，采用 ImagePro Plus 6.0 图像分析软件对各组细胞线粒体膜电位水平进行定量分析，实验重复 3 次。

1.4.7 细胞内 ATP 含量检测 参照 ATP 检测试剂盒说明书进行操作，将各组胶质瘤细胞以 1×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中，培养 3 d 后，吸除培养液，每孔加入 200 μL 裂解液，反复吹打或晃动培养板使裂解液充分接触裂解细胞，裂解后 4 ℃、12 000×*g* 离心 5 min，取上清，同时将 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释为 0.01，0.03，0.1，0.3，1，3，10 μmol/L，各取 20 μL 标准品和样品分别置入检测孔中，迅速用微量移液器混匀，用化学发光仪测定 RLU 值。根据标准曲线计算出样品中 ATP 的浓度。

1.4.8 CCK-8 实验 将各组胶质瘤细胞以 1×10^3 个 / 孔密度接种于 96 孔板内，分别培养 0，24，48，72 h 后换液，每孔加入 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂，继续培养 1.5 h，用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。

1.4.9 凋亡检测 采用凯基公司的 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒，检测各组胶质瘤细胞凋亡情况。将各组胶质瘤细胞以 1×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板内，培养 3 d 后，PBS 洗涤 2 次，重悬在 500 μL Binding Buffer 中，依次加入 5 μL Annexin V

和 5 μL PI，混合后避光孵育 15 min，上 BD Accuri C6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4.10 裸鼠成瘤实验 18 只 4–6 周龄的 SPF 级 BALB/c-nu 小鼠，雌雄不限，体质量 18–20 g，购自宁夏医科大学动物中心，许可证号：SYXK(宁)2020-0001。实验动物每 6 只分笼饲养，动物房温度为 20–26 ℃，相对湿度保持在 40%–60%，自由进食水和饲料，适应性饲养 7 d 后进行实验。

实验方案由宁夏医科大学实验动物伦理审查委员会批准 (编号：IACUC-NYLAC-2023-109)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

使用预冷的 PBS 将 shNC 组和 shCHKA 组的 U87MG 细胞制备成细胞悬液并计数，取 100 μL 细胞悬液 (细胞数为 10^6 个) 注射至裸鼠右侧腋窝皮下 [17]。待肿瘤成型后，持续进行如下处理：shNC 组和 shCHKA 组小鼠 (n=6) 腹腔注射 0.1% 二甲基亚砜水溶液，shCHKA+Mdivi-1 组小鼠 (n=6) 腹腔注射 Mdivi-1 [25 mg/(kg•d)[18]，用 0.1% 二甲基亚砜水溶液溶解]，每隔 5 d 测量肿瘤直径 [19]，25 d 后取出瘤体并测量肿瘤的体积和质量。

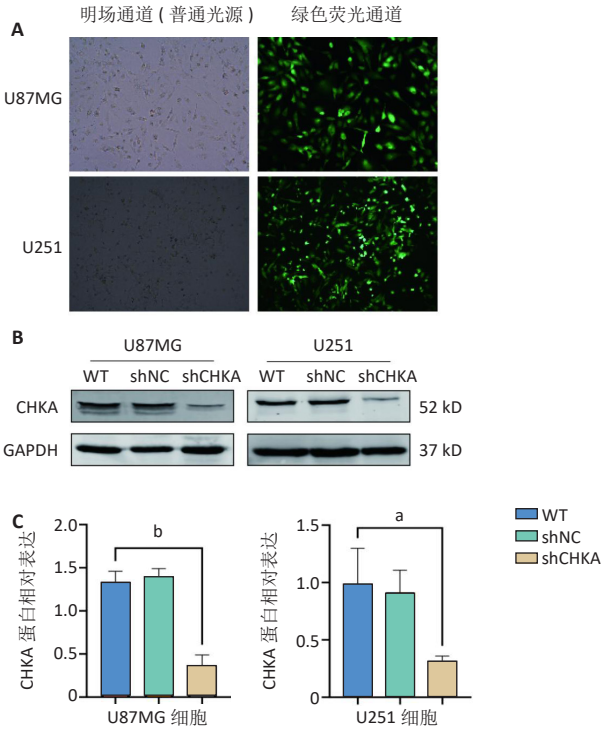
1.5 主要观察指标 各组胶质瘤细胞中 TOM20、ACO2、ATP5A 和 SOD2 蛋白表达、线粒体超微结构、活性氧水平、线粒体膜电位和 ATP 含量、增殖能力和凋亡率；各组小鼠的肿瘤体积和肿瘤质量。

1.6 统计学分析 采用 Graphpad Prism 8.0.2 进行统计学分析。各组数据表示为 $\bar{x}\pm s$，两组间比较采用 t 检验，所有实验重复 3 次，P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经宁夏医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 构建 CHKA 沉默 U87MG 和 U251 细胞模型 利用慢病毒转染对 U87MG 和 U251 细胞进行敲减，荧光显微镜显示：CHKA 敲减组 (shCHKA)U87MG 和 U251 细胞的转染效率达到 80% 以上 (**图 1A**)。Western blot 结果显示：shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞 CHKA 蛋白表达较野生 (WT) 组显著降低 (P < 0.05，P < 0.001，**图 1B**，**C**)。

2.2 CHKA 沉默对 U87MG 和 U251 细胞线粒体结构和形态的影响 透射电子显微镜观察结果显示，与 shNC 组 U87MG 和 U251 细胞比较，shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞线粒体结构紊乱，出现线粒体肿胀、线粒体空泡化 (**图 2A**)；Western blot 实验结果显示 (**图 2B**，**C**)，shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞中 ACO2、TOM20 和 ATP5A 蛋白表达水平均较 shNC 组显著降低 (P < 0.01，P < 0.001)，提示 CHKA 沉默导致线粒体结构破坏和功能减弱 [20-22]；而 SOD2 蛋白表达水平显著升高



图注：图 A 为 CHKA 沉默慢病毒转染细胞的显微镜图片 (×200)；B 为 Western blot 检测 CHKA 的表达；C 为 Western blot 定量结果分析，$^a P$ < 0.05，$^b P$ < 0.001。CHKA：胆碱激酶 α；WT：野生细胞组，无病毒转染；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒。

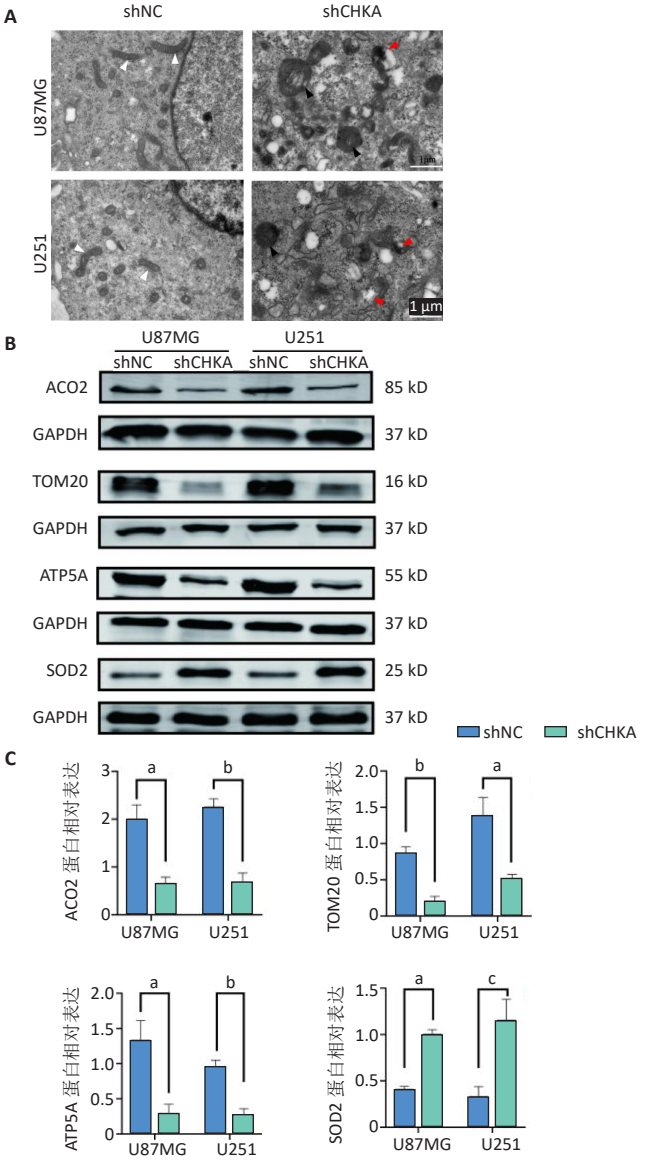
图 1 | 构建 CHKA 表达水平降低的 U87MG 和 U251 细胞模型

Figure 1 | Constructing U87MG and U251 cell models with reduced choline kinase alpha (CHKA) expression

(P < 0.01，P < 0.000 1)，可能是细胞为应对线粒体功能障碍引发的活性氧积累而激活的代偿性抗氧化反应 [23]。

2.3 CHKA 沉默对 U87MG 和 U251 细胞线粒体功能的影响 为了进一步明确 CHKA 沉默对线粒体功能的影响，分别检测了 CHKA 沉默前后 U87MG 和 U251 细胞活性氧、线粒体膜电位和细胞 ATP 含量的变化。利用荧光显微镜对各组细胞的活性氧水平进行检测，结果显示 shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞内活性氧荧光强度较 shNC 组显著升高 (P < 0.01，**图 3A**，**D**)。利用聚集体与单体的 JC-1 荧光比值来评估各组细胞的线粒体膜电位，荧光图像中红色荧光表示 JC-1 聚集体 (高膜电位)，绿色荧光表示 JC-1 单体 (低膜电位)，结果显示 shCHKA 组 JC-1 聚集体 / 单体荧光比值较低，这表明 CHKA 沉默后 U87MG 和 U251 细胞的线粒体膜电位水平显著降低 (P < 0.01，P < 0.001，**图 3B**，**E**)。利用化学发光法检测各组细胞内 ATP 水平的变化，结果以纳米摩尔 (nmol) 表达，结果显示 shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞内 ATP 水平较 shNC 组显著降低 (P < 0.01，**图 3C**)。

2.4 CHKA 沉默对 U87MG 和 U251 细胞增殖和凋亡的影响 该研究验证了 CHKA 沉默会引起 U87MG 和 U251 细胞线粒体结构和功能的一系列损伤，同时活性氧增加等线粒体异常现

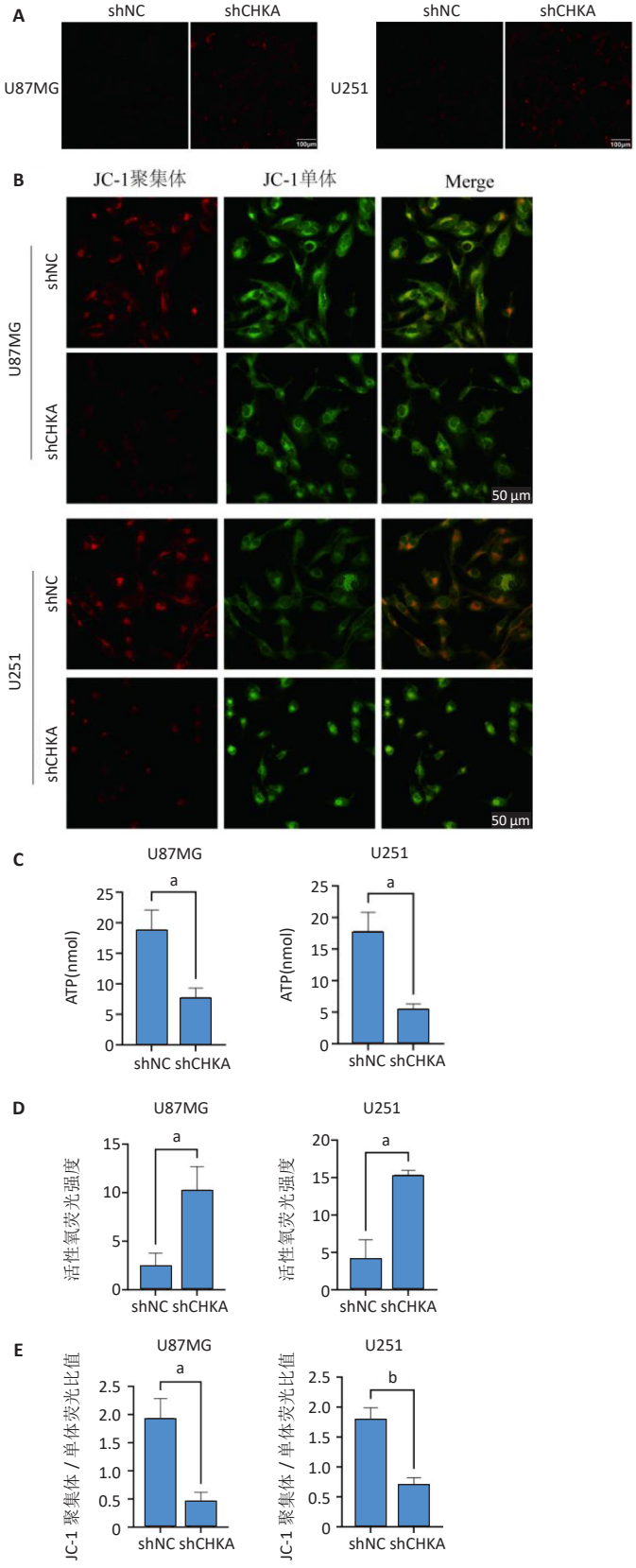


图注：图 A 为透射电子显微镜观察线粒体结构，白色箭头代表正常线粒体结构，黑色箭头代表严重肿胀的线粒体，红色箭头代表线粒体空泡化；B 为 Western blot 检测线粒体相关蛋白的表达；C 为 Western blot 定量结果分析。[a]$P < 0.01$，[b]$P < 0.001$，[c]$P < 0.000\ 1$。CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒。

图 2 | CHKA 沉默后 U87MG 和 U251 细胞线粒体形态和结构蛋白表达变化

Figure 2 | **Changes in mitochondrial morphology and structural protein expression in U87MG and U251 cells after choline kinase alpha (CHKA) silencing**

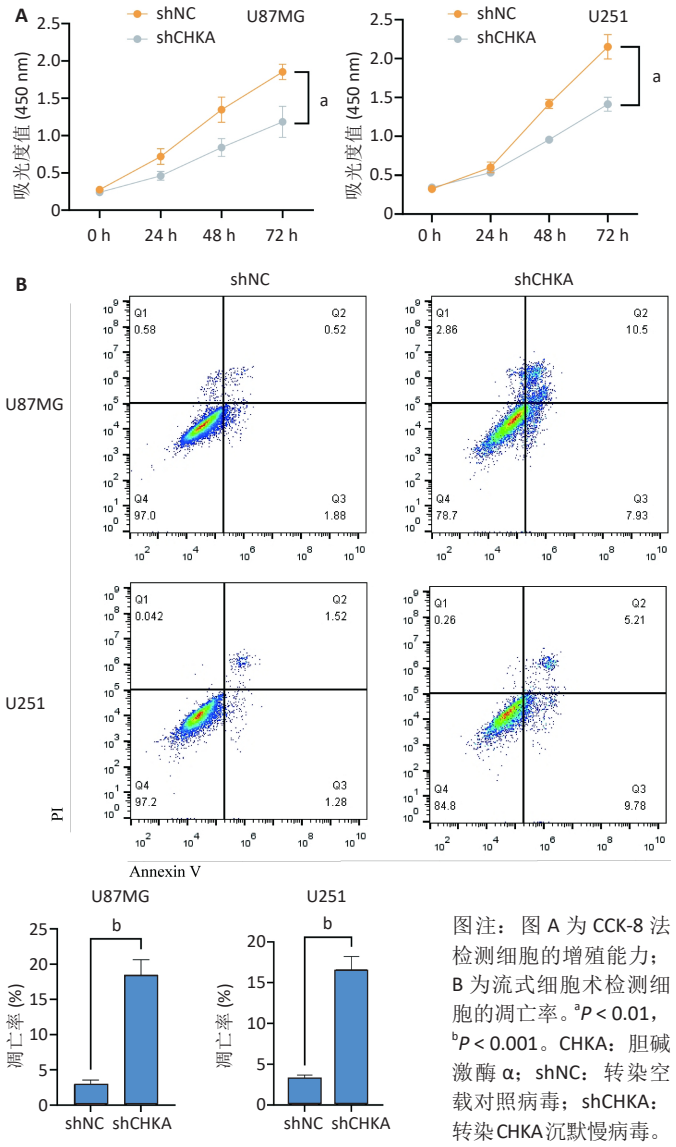
象是细胞早期凋亡的标志事件之一[24-25]，因此猜测 CHKA 沉默可以引起 U87MG 和 U251 细胞增殖能力和凋亡水平的变化。利用 CCK-8 实验检测各组 U87MG 和 U251 细胞的增殖能力，结果显示 shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞的增殖能力较 shNC 组显著减弱（$P < 0.01$，**图 4A**）。利用流式细胞术检测各组 U87MG 和 U251 细胞的凋亡率，结果显示 shCHKA 组 U87MG 和 U251 细胞的凋亡率较 shNC 组显著升高（$P < 0.001$，**图 4B**）。综上所述，通过在胶质瘤细胞中沉默 CHKA，验证了 CHKA 沉默后胶质瘤细胞的线粒体发生了功能障碍，并可能



图注：图 A 为共聚焦显微镜观察细胞内活性氧荧光强度；B 为共聚焦显微镜观察细胞内 JC-1 荧光强度；C 为化学发光法测定细胞内 ATP 含量；D 为活性氧荧光强度定量分析；E 为 JC-1 荧光强度定量分析。[a]$P < 0.01$，[b]$P < 0.001$。CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒。

图 3 | CHKA 沉默对 U87MG 和 U251 细胞线粒体功能的影响

Figure 3 | **Effect of choline kinase alpha (CHKA) silencing on mitochondrial function in U87MG and U251 cells**



图注：图 A 为 CCK-8 法检测细胞的增殖能力；B 为流式细胞术检测细胞的凋亡率。$^{a}P < 0.01$，$^{b}P < 0.001$。CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒。

图 4 | CHKA 沉默对 U87MG 和 U251 细胞增殖和凋亡的影响

Figure 4 | **Effect of choline kinase alpha (CHKA) silencing on proliferation and apoptosis of U87MG and U251 cells**

进一步导致细胞增殖能力减弱和凋亡水平增加，影响了胶质瘤细胞的生长和恶性表型。

2.5 Mdivi-1 对植入 CHKA 沉默 U87MG 细胞的裸鼠皮下肿瘤生长的影响 为体内体外共同验证以上结论，皮下植入 U87MG 胶质瘤细胞，记录肿瘤 0–25 d 体积变化，25 d 切除肿瘤并记录肿瘤大小和肿瘤质量，结果显示：shCHKA 组的裸鼠瘤体质量较 shNC 组明显减轻，生长速度显著降低 ($P < 0.000\ 1$)；同时为了明确 CHKA 沉默是通过改变线粒体功能从而导致胶质瘤的抑制作用，在 CHKA 沉默的基础上腹腔注射线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1，保护线粒体功能，反向验证 CHKA 沉默后对胶质瘤的抑制作用。结果显示：shCHKA+Mdivi-1 组的裸鼠瘤体质量较 shCHKA 组显著增加，生长速度显著变快 ($P < 0.000\ 1$，**图 5**)。

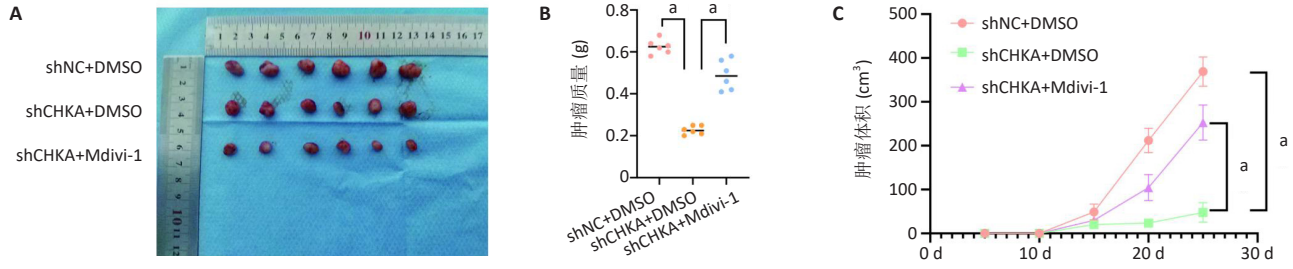
2.6 Mdivi-1 对 CHKA 沉默的 U87MG 和 U251 细胞线粒体功能的影响 shCHKA+Mdivi-1 组 U87MG 和 U251 细胞内活性氧荧光强度较 shCHKA 组显著降低 ($P < 0.05$，$P < 0.01$，**图 6A，D**)。shCHKA+Mdivi-1 组 U87MG 和 U251 细胞线粒体膜电位较 shCHKA 组显著升高 ($P < 0.01$，**图 6B，E**)。shCHKA+Mdivi-1 组 U87MG 和 U251 细胞内 ATP 水平较 shCHKA 组显著升高 ($P < 0.01$，$P < 0.001$，**图 6C**)。

2.7 Mdivi-1 对 CHKA 沉默的 U87MG 和 U251 细胞增殖和凋亡的影响 CCK-8 实验结果显示 shCHKA+Mdivi-1 组 U87MG 和 U251 细胞的增殖能力较 shCHKA 组显著增强 ($P < 0.05$，$P < 0.01$，**图 7A**)。流式细胞术结果显示 shCHKA+Mdivi-1 组 U87MG 和 U251 细胞凋亡率较 shCHKA 组显著降低 ($P < 0.05$，**图 7B，C**)。

3 讨论 Discussion

线粒体是细胞能量代谢、凋亡调控和氧化应激的重要调节中心 [26-28]。该研究中，CHKA 沉默后细胞线粒体形态发生明显异常，如空泡化和线粒体嵴断裂，这些都是线粒体功能受损的典型表现 [29]。已有研究表明，胆碱激酶在肿瘤细胞中的作用与线粒体功能密切相关，CHKA 沉默后可能通过影响线粒体膜的磷脂合成，从而导致线粒体结构的破坏 [30]。线粒体形态的改变通常伴随着能量代谢紊乱和氧化应激增加，从而促进细胞死亡并抑制增殖。该研究进一步显示，CHKA 沉默显著降低了线粒体相关结构和功能蛋白 (如 TOM20、ACO2 和 ATP5A) 的表达，并且线粒体膜电位和 ATP 水平显著下降，这与之前的研究一致 [31]，表明 CHKA 在维持线粒体功能和能量平衡中起着重要作用。线粒体功能下降往往会导致细胞代谢的重编程，增加氧化应激水平，从而影响细胞的生长和存活。

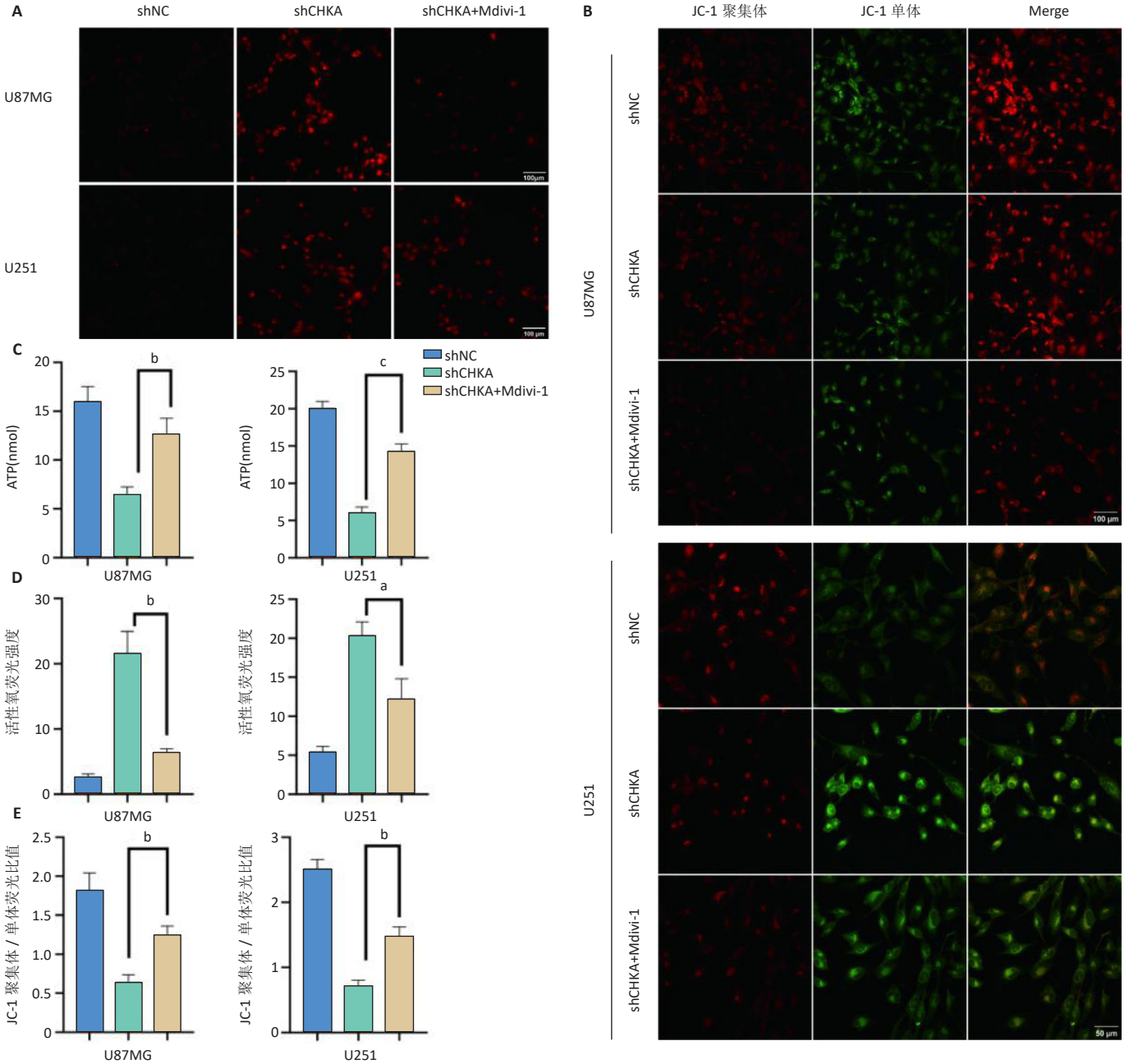
课题组以往研究发现，CHKA 在不同级别胶质瘤中的表达差异显著，且与患者预后密切相关，提示 CHKA 的表达可作为胶质瘤患者诊断和判断患者预后的指标 [32]，并且 CHKA 表达下调会影响胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性表型 [33-35]。CHKA 作为磷脂代谢的关键酶，主要功能是催化胆碱转化为磷酸胆碱，从而参与磷脂酰胆碱的合成。磷脂酰胆碱是细胞膜的重要组成部分，尤其在神经系统中，磷脂对膜的稳定性、神经递质的释放以及信号传导等至关重要。神经系统的磷脂种类丰富且含量较高，这可能反映了 CHKA 在维持神经细胞膜完整性、突触功能和神经递质传递中的潜在重要性 [30]。抑制 CHKA 可能导致神经系统磷脂代谢紊乱，从而影响膜的稳定性和神经功能。目前，有研究表明 CHKA 抑制剂在治疗肿瘤时可能具有一定的神经毒性，表现为神经元的膜功能受损和神经递质释放障碍 [36]，因此在开发以



图注：图 A 为各组裸鼠皮下肿瘤图像；B 为各组裸鼠皮下肿瘤质量；C 为各组裸鼠皮下肿瘤生长曲线。[a]$P < 0.000\,1$。DMSO：二甲基亚砜；CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒；Mdivi-1：线粒体分裂抑制剂。

图 5 | Mdivi-1 对植入 CHKA 沉默 U87MG 细胞的裸鼠皮下肿瘤生长的影响

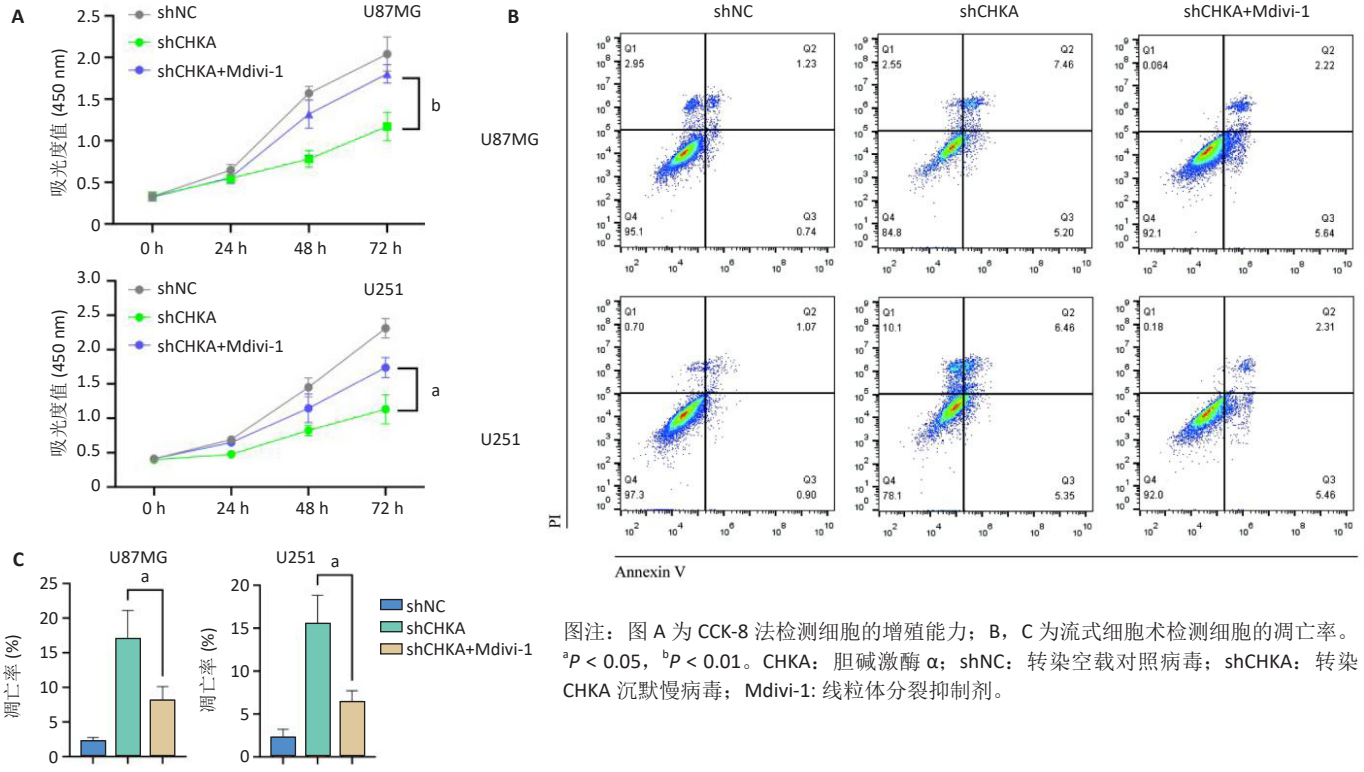
Figure 5 | **Effect of Mdivi-1 on growth of subcutaneous tumors derived from choline kinase alpha (CHKA) silenced U87MG cells in nude mice**



图注：图 A 为共聚焦显微镜观察细胞内活性氧荧光强度；B 为共聚焦显微镜观察细胞内 JC-1 荧光强度；C 为化学发光法测定细胞内 ATP 含量；D 为活性氧荧光强度定量分析；E 为 JC-1 荧光强度定量分析。[a]$P < 0.05$，[b]$P < 0.01$，[c]$P < 0.001$。CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒；Mdivi-1：线粒体分裂抑制剂。

图 6 | Mdivi-1 对 CHKA 沉默的 U87MG 和 U251 细胞线粒体功能的影响

Figure 6 | **Effect of Mdivi-1 on mitochondrial function in U87MG and U251 cells silenced by choline kinase alpha (CHKA)**



图注：图 A 为 CCK-8 法检测细胞的增殖能力；B，C 为流式细胞术检测细胞的凋亡率。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。CHKA：胆碱激酶 α；shNC：转染空载对照病毒；shCHKA：转染 CHKA 沉默慢病毒；Mdivi-1: 线粒体分裂抑制剂。

图 7 ｜ Mdivi-1 对 CHKA 沉默的 U87MG 和 U251 细胞增殖和凋亡的影响

Figure 7 ｜ **Effect of Mdivi-1 on proliferation and apoptosis of U87MG and U251 cells silenced by choline kinase alpha (CHKA)**

CHKA 为靶点的抗肿瘤治疗策略时，需要特别关注对正常神经系统功能的影响。在研究中发现，CHKA 沉默显著抑制了 U87MG 和 U251 胶质瘤细胞的增殖能力，并通过流式细胞术检测发现细胞凋亡水平显著上升，这也表明 CHKA 在胶质瘤细胞的生长和存活中起着至关重要的作用。已有研究表明，CHKA 通过调节磷脂代谢，促进细胞膜的合成，并参与细胞周期调控和凋亡途径 [37]。该研究结果表明，CHKA 沉默可能通过破坏线粒体功能并引发氧化应激，导致细胞增殖受阻和凋亡增加。

Mdivi-1 作为线粒体分裂抑制剂，该研究主要探索 CHKA 影响线粒体功能及潜在治疗机制。Mdivi-1 通过抑制 DRP1 的活性，抑制了线粒体过度分裂，恢复了线粒体膜电位，并降低了活性氧的产生 [38]，这一结果表明 Mdivi-1 对 CHKA 沉默导致的线粒体损伤具有明显的保护作用，可能通过调节线粒体动力学和维持线粒体网络的完整性来实现，从而为细胞提供能量支持 [39]。研究表明，Mdivi-1 通过改善线粒体动力学，恢复细胞的代谢平衡，进而促进癌细胞的生长 [40]。该实验结果显示，Mdivi-1 能够有效缓解 CHKA 沉默引起的线粒体功能损伤，并在一定程度上恢复细胞的增殖能力。在裸鼠皮下肿瘤模型中，CHKA 沉默组 U87MG 细胞形成的肿瘤体积明显小于对照组，而 Mdivi-1 处理后肿瘤体积显著增大，这表明 CHKA 沉默抑制了肿瘤的生长，而 Mdivi-1 通过恢复线粒体功能促进了肿瘤的生长。通过 Mdivi-1 的干预，进一步明确了 CHKA 改变线粒体功能的潜在靶点，为靶向线粒体动力学的肿瘤治疗策略提供了新的研究依据和思路。

该研究为 CHKA 在胶质瘤细胞线粒体功能调节中的作用提供了新的证据，并且提出通过调节线粒体动力学可能成为胶质瘤治疗的潜在策略。线粒体作为细胞能量和代谢的核心，调控其功能和动力学可能为治疗胶质瘤提供新的治疗靶点。未来的研究可以进一步探索 CHKA 和线粒体动力学的交互作用，并结合线粒体分裂抑制剂，如 Mdivi-1，开展临床前研究，以评估这种组合治疗在胶质瘤中的应用潜力。

致谢：感谢宁夏医科大学提供学习平台，感谢马辉老师的教导与支持，感谢课题组各位师兄师姐给予的指导及帮助。

作者贡献：实验设计为赵阳、李嘉麟，实验实施为赵阳、吴箫，指标检测为赵阳、邹有瑞，实验数据分析处理为赵阳、刘阳，文献检索为赵阳、李嘉麟、吴箫，论文撰写为赵阳、李嘉麟，文章校对为马辉。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] TAN AC, ASHLEY DM, LÓPEZ GY, et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA Cancer J Clin. 2020;70(4): 299-312.
[2] THOMAS AA, BRENNAN CW, DEANGELIS LM, et al. Emerging therapies for glioblastoma. JAMA Neurol. 2014;71(11):1437-1444.
[3] LAN Z, LI X, ZHANG X. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. Int J Mol Sci. 2024;25(5):3040.
[4] MA Q, JIANG H, MA L, et al. The moonlighting function of glycolytic enzyme enolase-1 promotes choline phospholipid metabolism and tumor cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023;120(15): e2209435120.
[5] GOKHALE S, XIE P. ChoK-Full of Potential: Choline Kinase in B Cell and T Cell Malignancies. Pharmaceutics. 2021;13(6):911.
[6] GLUNDE K, BHUJWALLA ZM. Choline kinase alpha in cancer prognosis and treatment. Lancet Oncol. 2007;8(10):855-857.
[7] ZONG Y, LI H, LIAO P, et al. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. Signal Transduct Target Ther. 2024;9(1):124.
[8] GRANATH-PANELO M, KAJIMURA S. Mitochondrial heterogeneity and adaptations to cellular needs. Nat Cell Biol. 2024;26(5):674-686.
[9] DECKER ST, FUNAI K. Mitochondrial membrane lipids in the regulation of bioenergetic flux. Cell Metab. 2024;36(9):1963-1978.
[10] ZOU Y, HUANG L, SUN S, et al. Choline Kinase Alpha Promoted Glioma Development by Activating PI3K/AKT Signaling Pathway. Cancer Biother Radiopharm. 2021. doi: 10.1089/cbr.2021.0294.
[11] HORVATH SE, DAUM G. Lipids of mitochondria. Prog Lipid Res. 2013; 52(4):590-614.
[12] BEREITER-HAHN J, JENDRACH M. Mitochondrial dynamics. Int Rev Cell Mol Biol. 2010;284:1-65.
[13] LEÃO BARROS MB, PINHEIRO DDR, BORGES BDN. Mitochondrial DNA Alterations in Glioblastoma (GBM). Int J Mol Sci. 2021;22(11):5855.
[14] PENG Y, ZHAO T, RONG S, et al. Young small extracellular vesicles rejuvenate replicative senescence by remodeling Drp1 translocation-mediated mitochondrial dynamics. J Nanobiotechnology. 2024; 22(1):543.
[15] PARK SW, KIM KY, LINDSEY JD, et al. A selective inhibitor of drp1, mdivi-1, increases retinal ganglion cell survival in acute ischemic mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(5):2837-2843.
[16] ZHANG WK, YAN JM, CHU M, et al. Bunyavirus SFTSV nucleoprotein exploits TUFM-mediated mitophagy to impair antiviral innate immunity. Autophagy. 2025;21(1):102-119.
[17] YANG Z, YANG Z, HU Z, et al. UAP1L1 plays an oncogene-like role in glioma through promoting proliferation and inhibiting apoptosis. Ann Transl Med. 2021;9(7):542.
[18] 李艳花 , 张晓娟 , 张思羽 , 等 .Mdivi-1 通过抑制少突胶质细胞凋亡信号通路发挥髓鞘保护作用 [J]. 中国病理生理杂志 ,2024,40(3): 527-534.
[19] STRIBBLING SM, RYAN AJ. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. Nat Protoc. 2022;17(9):2108-2128.
[20] PADALKO V, POSNIK F, ADAMCZYK M. Mitochondrial Aconitase and Its Contribution to the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2024;25(18):9950.
[21] PANDA PK, NAIK PP, MEHER BR, et al. PUMA dependent mitophagy by Abrus agglutinin contributes to apoptosis through ceramide generation. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2018;1865(3):480-495.
[22] TANG D, KROEMER G, KANG R. Targeting cuproplasia and cuproptosis in cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2024;21(5):370-388.
[23] DING D, LI N, GE Y, et al. Current status of superoxide dismutase 2 on oral disease progression by supervision of ROS. Biomed Pharmacother. 2024;175:116605.
[24] JENKINS BC, NEIKIRK K, KATTI P, et al. Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics. Trends Biochem Sci. 2024;49(4):346-360.
[25] KENNY TC, BIRSOY K. Mitochondria and Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2024;14(12):a041534.
[26] SUOMALAINEN A, NUNNARI J. Mitochondria at the crossroads of health and disease. Cell. 2024;187(11):2601-2627.
[27] LI Y, ZHANG H, YU C, et al. New Insights into Mitochondria in Health and Diseases. Int J Mol Sci. 2024;25(18):9975.
[28] ZHANG Y, YAN H, WEI Y, et al. Decoding mitochondria's role in immunity and cancer therapy. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2024; 1879(4):189107.
[29] LIU BH, XU CZ, LIU Y, et al. Mitochondrial quality control in human health and disease. Mil Med Res. 2024;11(1):32.
[30] ARLAUCKAS SP, POPOV AV, DELIKATNY EJ. Choline kinase alpha-Putting the ChoK-hold on tumor metabolism. Prog Lipid Res. 2016;63:28-40.
[31] MIYAKE T, PARSONS SJ. Functional interactions between Choline kinase α, epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. Oncogene. 2012;31(11):1431-1441.
[32] 黄灵 , 邹有瑞 , 马悦 , 等 . 胆碱激酶 α 在不同级别胶质瘤中的表达差异及临床意义 [J]. 中国癌症杂志 ,2021,31(10):892-898.
[33] 岳芳倩 , 邹有瑞 , 孙胜玉 , 等 . 敲低胆碱激酶 α(CHKA) 抑制 U87MG 人胶质瘤细胞增殖和侵袭及迁移 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 , 2020,36(8):724-728.
[34] 岳芳倩 , 邹有瑞 , 孙胜玉 , 等 . 胆碱激酶 α 抑制剂 MN58b 对 U87 胶质瘤干细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志 ,2021, 37(12):1468-1471.
[35] LI J, ZHAO Y, WU X, et al. Choline kinase alpha regulates autophagy-associated exosome release to promote glioma cell progression. Biochem Biophys Res Commun. 2025;746:151269.
[36] RUBIO-RUIZ B, SERRÁN-AGUILERA L, HURTADO-GUERRERO R, et al. Recent advances in the design of choline kinase α inhibitors and the molecular basis of their inhibition. Med Res Rev. 2021;41(2):902-927.
[37] CHEN X, QIU H, WANG C, et al. Molecular structure and differential function of choline kinases CHKα and CHKβ in musculoskeletal system and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2017;33:65-72.
[38] CASSIDY-STONE A, CHIPUK JE, INGERMAN E, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. Dev Cell. 2008;14(2):193-204.
[39] SONG N, MEI S, WANG X, et al. Focusing on mitochondria in the brain: from biology to therapeutics. Transl Neurodegener. 2024;13(1):23.
[40] RODRIGUES T, FERRAZ LS. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer. Biochem Pharmacol. 2020;182: 114282.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)