

灯盏花乙素对非小细胞肺癌细胞 JAK/STAT 信号通路的影响

管亮, 吴云红, 沈燕燕* (邵逸夫医院德清院区/德清县人民医院, 浙江 德清 313200)

摘要: 目的 研究灯盏花乙素对非小细胞肺癌细胞 JAK/STAT 信号通路及其凋亡机制的影响。方法 培养非小细胞肺癌 A549 细胞, 经不同浓度灯盏花乙素处理 24 h 后收集细胞。采用 MTT 法观察细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡; RT-qPCR 法检测 JAK2, STAT3, Pim1 和 Bcl-2 的 mRNA 表达情况; Western blot 检测 JAK2 和 STAT3 蛋白表达水平。结果 MTT 法和流式细胞术结果显示, 灯盏花乙素能降低 A549 细胞的存活率, 促进其凋亡, 并呈剂量依赖效应; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 与对照组比较, 灯盏花乙素各组 JAK2, STAT3, Pim1 和 Bcl-2 的 mRNA 表达降低, JAK2 和 STAT3 蛋白水平下降, 且与加入的灯盏花乙素浓度成反比。结论 灯盏花乙素可以促进非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡, 其机制可能是通过抑制 JAK/STAT 信号转导通路的激活, 减少 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达。

关键词: 非小细胞肺癌; 灯盏花乙素; JAK2; STAT3; 凋亡; Bcl-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)12-1483-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.12.007

引用本文: 管亮, 吴云红, 沈燕燕. 灯盏花乙素对非小细胞肺癌细胞 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1483-1486.

Effects of Scutellarin on JAK/STAT Signal Pathway in Non-small Cell Lung Cancer Cells

GUAN Liang, WU Yunhong, SHEN Yanyan* (Deqing Campus, Sir Run Run Shaw Hospital/ Deqing County People's Hospital, Deqing 313200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of scutellarin on JAK/STAT signaling pathway and its apoptotic mechanism in non-small cell lung cancer cells. **METHODS** Non-small cell lung cancer A549 cells were cultured and collected cells after treatment with different concentrations of scutellarin for 24 h. Cell proliferation was analyzed by MTT method, apoptosis was evaluated by flow cytometry. The mRNA expression of JAK2, STAT3, Pim1 and Bcl-2 were detected by RT-PCR; JAK2 and STAT3 protein were detected by Western blot. **RESULTS** MTT assay and flow cytometry showed that scutellarin reduced the survival rate of A549 cells and promoted its apoptosis in a dose-dependent manner. RT-qPCR and Western blot showed that compared with the control group, the mRNA expression of JAK2, STAT3, Pim1 and Bcl-2 were decreased in the scutellarin group, JAK2 and STAT3 protein were decreased, which were inversely proportional to the concentration of scutellarin. **CONCLUSION** Scutellarin can promote apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells, which may be through inhibition of JAK/STAT signaling pathway activation and reduction of JAK2 and STAT3 protein expression.

KEYWORDS: non-small cell lung cancer; scutellarin; JAK2; STAT3; apoptosis; Bcl-2

非小细胞肺癌是一种常见的肺癌类型, 包括肺腺癌、肺鳞癌和大细胞肺癌等, 占肺癌的 80% 以上。目前我国的肺癌发病率呈逐年上升的趋势, 存在生存率低, 难以早期诊断, 且临床治疗效果欠佳等问题。在非小细胞肺癌的疾病过程中, 不仅存在肿瘤细胞数量的增殖异常, 更重要的是机体对肿瘤细胞的凋亡调控能力明显降低, 肿瘤细胞的凋亡状态影响治疗效果, 因此研究非小细胞肺癌中肿瘤细胞的凋亡机制备受关注^[1]。

灯盏花乙素是从灯盏花植物中提取的化合物, 具有抗血小板聚集、抗炎、抗氧化和神经保护等作用^[2]。研究证实灯盏花乙素具有显著的抗肿瘤

作用, 包括前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤^[3-5], 其可能通过诱导细胞内 DNA 损伤从而抑制肿瘤细胞的增殖^[5]。但关于灯盏花乙素在非小细胞肺癌中的作用及相关机制尚未完全阐明。本实验考察灯盏花乙素对非小细胞肺癌 A549 细胞的凋亡作用, 初步探讨其可能的分子机制。

1 材料

非小细胞肺癌 A549 细胞株(上海中科院细胞生物所); 灯盏花乙素(美国 Sigma 公司, 批号: 054M4728V); 3(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑(MTT)试剂(北京索莱宝公司, 批号: JV872); DMEM 培养基(批号: 1897078)、胎牛血

作者简介: 管亮, 男, 主治医师 Tel: (0572)8076047
(0572)8076047 E-mail: 29326836@qq.com

E-mail: dryzkk@126.com

*通信作者: 沈燕燕, 女, 主治医师 Tel:

清(批号: 42F1376K)均购自美国 Gibco 公司; AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司, 批号: 4293719); DMSO 试剂(北京索莱宝公司, 批号: D8372); Trizol 溶液(美国 Invitrogen 公司, 批号: 190906); 逆转录试剂盒(批号: AHF1306A)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(批号: AH80343A)均购自日本 TAKARA 公司; 引物序列由 Invitrogen 生物公司上海部合成; p-JAK2 抗体、p-STAT3 抗体和内参 β -actin 抗体(批号分别为 3771, 9145, 8457)均购自美国 CST 公司。

3110 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); Multiskan GO 酶标仪、NanoDrop ND-2000 紫外分光光度计均来自美国 Thermo Scientific 公司; 7500 PCR 仪(美国 ABI 公司); 流式细胞仪 Canto II(美国 BD 公司); 蛋白电泳和转印系统 Mini-PROTEAN Tetra Cell/Basic Power Supply、化学发光成像仪 ChemiDocXRS⁺均来自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 A549 细胞培养

将非小细胞肺癌 A549 细胞复苏后加入含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 完全培养基, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。每 2~4 d 传代 1 次。待细胞生长到达 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 适度消化后加完全培养基终止胰蛋白酶的消化作用, 离心收集细胞, 加入培养基制成单细胞悬液以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL 。

2.2 分组

将 96 孔板的细胞分为 4 组, 每组 6 个复孔, 分别为: 对照组(加 PBS 缓冲液), 灯盏花乙素低、中、高剂量组(10, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。药物浓度由预实验筛选得出。培养 24 h 后更换含药新鲜培养液继续培养 24 h。

2.3 MTT 法检测细胞存活率

将药物干预后的 A549 细胞弃培养基, 换无血清培养液并加入 MTT 试剂每孔 20 μL , 孵育 4 h。终止培养, 弃废液, 加入 DMSO(每孔 150 μL), 室温摇匀静置 10 min, 使用酶标仪在 540 nm 波长处测吸光度(A)值。细胞存活率 = $A_{\text{药物组}} / A_{\text{对照组}}$ 。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

胰酶消化细胞, PBS 缓冲液洗涤, 制成单细胞悬液。每管细胞内加入 10 μL AnnexinV-FITC 和 PI 抗体, 避光孵育 20 min。PBS 缓冲液洗涤后, 加入 200 μL PBS 缓冲液制成悬液, 流式细胞仪检

测, Diva 软件进行图形分析。

2.5 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

采用 TRIZOL 法收集 A549 细胞, 提取总 RNA, NanoDrop 仪检测 RNA 浓度和质量。通过逆转录试剂盒将 RNA 逆转录得到 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应条件为 50 °C 2 min, 预变性 95 °C 10 min, 循环 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 计算基因的相对表达量。PCR 引物由上海生工生物公司合成。引物序列如下: JAK2 上游 AGCCTATCGGCATGGAATATCT, 下游 TAACACTGCCATCCCAAGACA; STAT3 上游 CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC, 下游 GGTCAGCATGTTGTACCACAGG; Pim1 上游 TGCCATTAGGCAGCTCTCCCCA, 下游 GCGGCTTCGGCTCGGTCTACT; Bcl-2 上游 CTGTGGTCCACCTGACCCTCCGC, 下游 CGTACAGTTCCACA AAGGCATCCCAGC; β -actin 上游 GGATGCAGAA GGAGATCACTG, 下游 CGATCCACACGGAGTACTTG。

2.6 Western blot 检测蛋白表达

将药物干预后的 A549 细胞弃培养液, PBS 缓冲液洗涤, 加 1 mL RIPA 裂解液, 冰上裂解 15 min。离心后取上清蛋白。上样 20 μL 总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜进行转膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加一抗, 一抗 p-JAK2(1 : 500 稀释)、p-STAT3(1 : 800 稀释)、 β -actin(1 : 1 000 稀释), 4 °C 过夜。再加入二抗(1 : 1 000 稀释), 室温放置 1 h, 显影, 采用凝胶图像 Image J 软件分析目标条带的灰度值反映相关蛋白的表达水平。

以上试验均重复 3 次。

2.7 统计学分析

数据分析采用 SPSS 17.0 软件, 所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 OneWay ANOVA 检验。2 组间差异用未配对样本 t 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灯盏花乙素对 A549 细胞增殖的影响

经不同浓度灯盏花乙素处理 24 h 后, 中剂量组和高剂量组的肺癌 A549 细胞的存活率较对照组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 且具有浓度依赖性, 而低剂量组与对照组相比无明显统计学差异。结果见表 1。

表 1 MTT 法检测不同组间细胞存活率

Tab. 1 MTT assay for cell viability in different groups

组别	细胞存活率/%
对照组	89.21±4.18
灯盏花乙素低剂量组	82.24±6.52
灯盏花乙素中剂量组	78.95±7.41 ¹⁾
灯盏花乙素高剂量组	72.85±6.98 ²⁾

注：与对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

3.2 灯盏花乙素对 A549 细胞凋亡的影响

流式图结果显示，PI+为死细胞，Annexin V+为活细胞。本研究研究群 Annexin V+PI-为早期凋亡细胞，Annexin V+PI+为晚期凋亡细胞。与对照组相比较，经低剂量、中剂量和高剂量灯盏花乙素药物干预后的 A549 细胞出现明显的凋亡情况 ($P<0.01$, $P<0.001$)，且随着药物浓度增加，凋亡越明显。结果见图 1。

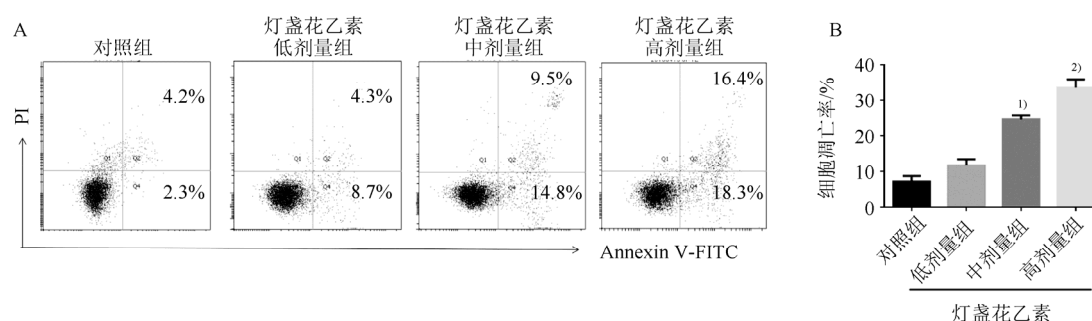


图 1 不同浓度灯盏花乙素对 A549 细胞凋亡的影响

A-流式细胞凋亡检测图；B-细胞凋亡率；与对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ，²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 1 Effects of different concentrations of scutellarin on apoptosis of A549 cells

A-low cytometry detection map; B-apoptosis rate; compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

3.3 灯盏花乙素对 JAK2, STAT3, Pim1 和 Bcl-2 表达的影响

通过 RT-qPCR 检测，发现经灯盏花乙素处理 24 h 后的细胞与对照组相比较，低剂量组可以降低 Bcl-2 的 mRNA 表达 ($P<0.01$)，中剂量组和高剂量组均可以降低 STAT3, Pim1 和 Bcl-2 的 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。结果见图 2。

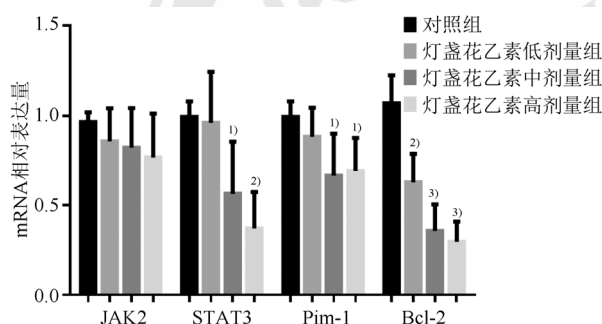


图 2 灯盏花乙素对 JAK2, STAT3, Pim1 和 Bcl-2 表达的影响

与对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 Effects of scutellarin on the expression of JAK2, STAT3, Pim1 and Bcl-2

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

3.4 灯盏花乙素对 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达的影响

与对照组比较，不同浓度灯盏花乙素干预

A549 细胞后，p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的表达明显被抑制 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)，且药物浓度越高，p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白被抑制越明显。结果见图 3。

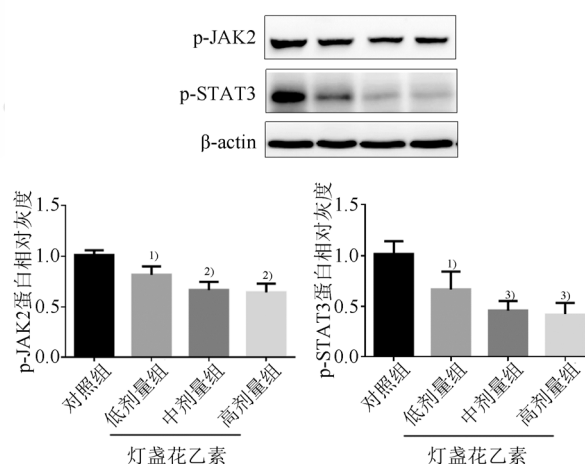


图 3 灯盏花乙素对 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的影响

与对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Effects of scutellarin on p-JAK2 and p-STAT3 proteins

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

4 讨论

非小细胞肺癌是一种发病率高、死亡率高的常见肿瘤疾病。目前对于中晚期和术后复发的非小细胞肺癌患者仍缺乏有效的治疗方案，主要以化疗为

主,但普通化疗效率低、敏感性差、细胞毒性高,存在诸多治疗缺陷。而传统中药具有取材方便、不良反应小等优点,因此研制出能有效治疗肺癌的新中药制剂具有重要的意义和前景。灯盏花乙素为灯盏细辛的黄酮类有效成分,具有活血、止痛、祛风散寒等多种生理功效^[6]。有研究发现,灯盏花乙素能够抑制乳腺癌细胞的增殖,但对正常细胞无明显抑制作用,能选择性杀伤肿瘤细胞^[4]。灯盏花乙素也可以通过调节 ephrinb2 信号通路抑制结肠癌的血管生成和转移^[5]。Li 等^[7]发现灯盏花乙素还能对舌癌细胞周期相关基因和蛋白表达进行调控,直接或间接地改变肿瘤细胞周期、抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡。

本研究表明灯盏花乙素可以明显降低非小细胞肺癌 A549 细胞的存活率,促进肺癌细胞的凋亡,并且呈浓度依赖性。进一步研究发现,灯盏花乙素还能抑制肺癌细胞内 JAK2, STAT3, Pim1 和 Bcl-2 的 mRNA 表达以及 JAK2 和 STAT3 蛋白表达。STAT3 即信号转导和转录激活因子 3,是转录信号家族中的重要成员,对细胞的增殖、凋亡以及细胞周期的调节有着重要的作用^[8]。有文献报道^[9],STAT3 参与肝癌、胃癌、结肠癌等多种肿瘤的形成、转移和浸润,是一个癌基因在肿瘤细胞中呈酪氨酸磷酸化的激活状态。另外,JAK2 和 STAT3 是 JAK/STAT 信号通路中的重要组成部分,活化的 JAK2 通过激活下游 STAT3 的表达引起生物学反应,促进肿瘤细胞的异常增殖、侵袭转移,在肿瘤的发生、发展及侵袭转移等多个环节中有着重要的作用。JAK/STAT 信号通路可激活下游的 Pim1 和 Bcl-2 基因^[10],进而引起细胞凋亡通路的抑制。Pim1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞凋亡、增殖、分化和肿瘤发生过程中起重要作用^[11]。Bcl-2 是 Bcl-2 家族中抑制凋亡的重要成员,在肿瘤细胞中表达异常增高^[12]。因此,灯盏花乙素可能是通过有效抑制 JAK/STAT 信号通路的激活,进而抑制 Pim1 和 Bcl-2 的活化,促进了非小细胞肺癌细胞的凋亡。

本实验通过研究灯盏花乙素对非小细胞肺癌 A549 细胞存活率、凋亡及 JAK/STAT 信号通路的影响,探讨灯盏花乙素在非小细胞肺癌细胞治疗中的影响及可能的作用机制,为其应用于肿瘤治疗提供理论和实验依据。

REFERENCES

- [1] TESTA U, CASTELLI G, PELOSI E. Lung cancers: molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(8): E248.
- [2] 范娅丹, 韩江全. 灯盏花乙素的药理作用及临床应用进展 [J]. *海南医学*, 2017, 28(4): 627-629.
- [3] GAO C, ZHOU Y L, JIANG Z L, et al. Cytotoxic and chemosensitization effects of Scutellarin from traditional Chinese herb *Scutellaria altissima* L. in human prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1491-1499.
- [4] HOU L C, CHEN L, FANG L. Scutellarin inhibits proliferation, invasion, and tumorigenicity in human breast cancer cells by regulating HIPPO-YAP signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2017(23): 5130-5138.
- [5] ZHU P T, MAO M, LIU Z G, et al. Scutellarin suppresses human colorectal cancer metastasis and angiogenesis by targeting ephrinb2 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 5094-5104.
- [6] SHI M N, YANG W M, LIU X. Research progress of scutellarin pharmacological study [J]. *J Kunming Med Univ (昆明医科大学学报)*, 2013, 34(9): 151-154.
- [7] LI H X, FAN H X, WANG Z, et al. Potentiation of scutellarin on human tongue carcinoma xenograft by low-intensity ultrasound [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59473. Doi: 10.1371/journal.pone.0059473.
- [8] HILLMER E J, ZHANG H Y, LI H S, et al. STAT3 signaling in immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016(31): 1-15.
- [9] WANG Z Y, WANG Y, DING L H, et al. Effects of STAT3 gene silencing by ShRNA on colon carcinoma cells and chemotherapy sensitivity to cisplatin [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学)*, 2013, 30(12): 1276-1280.
- [10] AMOYEL M, ANDERSON A M, BACH E A. JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a Drosophila perspective [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 28: 96-103.
- [11] JIMÉNEZGARCÍA M P, LUCENACACACE A, ROBLESFRÍAS M J, et al. Inflammation and stem markers association to PIM1/PIM2 kinase-induced tumors in breast and uterus [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58872-58886.
- [12] CAMPBELL K J, TAIT S. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer [J]. *Open Biol*, 2018, 8(5): 1-11.

收稿日期: 2018-09-26

(本文责编: 沈倩)