

斑蝥酸钠抑制JAK2/STAT3信号通路对胃癌细胞增殖及凋亡的影响

刘兴红¹, 刘瑾², 陈海艳², 郭宇航²

Effects of Sodium Cantharidinate on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cells by Inhibiting JAK2/STAT3 Pathway

LIU Xinghong¹, LIU Jin², CHEN Haiyan², GUO Yuhang²

1. Department of Ultrasound Intervention, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710001, China; 2. Department of Oncology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710001, China

Abstract: Objective To study the effects of sodium cantharidinate (SC) on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells through JAK2/STAT3 pathway. **Methods** Gastric cancer cell line SGC-7901 was cultured and treated with different concentrations of SC (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 $\mu\text{mol/L}$) and then transfected with control plasmid or JAK2 plasmid. Cell survival rate, apoptosis rate, and the expression levels of p-JAK2, p-STAT3, p-p38, p-ERK, and p-JNK were detected after 48 h of treatment. **Results** The results indicated that 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 $\mu\text{mol/L}$ of SC inhibited cell proliferation, and the survival rate decreased with an increase in SC concentration ($P < 0.05$). SC doses of 1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ were selected for the subsequent experiments. Compared with the control group, the apoptosis rate of the 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SC group exhibited no significant difference ($P > 0.05$), while those of the 2.0 and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC groups increased significantly ($P < 0.05$). The expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 significantly decreased ($P < 0.05$), while no significant difference was noted in the expression levels of p-p38, p-ERK, and p-JNK ($P > 0.05$) in the 1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC groups. The JAK2 plasmid was transfected simultaneously with the 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC treatment; the expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 and the survival rate increased, whereas the apoptosis rate decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** SC inhibits the growth and promotes the apoptosis of gastric cancer cells, and its mechanism may be related to the inhibition of JAK2/STAT3 pathway activation.

Key words: Gastric cancer; Sodium cantharidininate; Proliferation; Apoptosis; JAK2/STAT3 pathway

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 研究斑蝥酸钠 (SC) 通过JAK2/STAT3通路对胃癌细胞增殖及凋亡的调控作用。**方法** 用不同浓度SC (0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理胃癌细胞株SGC-7901, 转染对照质粒或JAK2质粒。处理48 h后检测细胞存活率、凋亡率及p-JAK2、p-STAT3、p-p38、p-ERK、p-JNK的表达水平。**结果** 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{mol/L}$ SC处理后, 胃癌SGC-7901细胞增殖受到抑制。随着SC浓度增加, 细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 选择SC剂量1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。与对照组比较, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组的细胞凋亡率无显著变化 ($P > 0.05$), 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组的细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$); 1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组的p-JAK2、p-STAT3表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p-p38、p-ERK、p-JNK的表达水平无显著变化 ($P > 0.05$); 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC处理的同时转染JAK2质粒, 细胞中p-JAK2、p-STAT3的表达水平及细胞存活率增加、凋亡率降低 ($P < 0.05$)。**结论** SC能抑制胃癌SGC-7901细胞生长、促进胃癌细胞凋亡, 其机制可能与抑制JAK2/STAT3通路激活有关。

关键词: 胃癌; 斑蝥酸钠; 增殖; 凋亡; JAK2/STAT3通路

中图分类号: R735.2

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

胃癌是消化道发病率最高的恶性肿瘤, 多数患

者确诊时已属中晚期, 缺乏特异性治疗药物, 治疗后的复发率、转移率、死亡率均较高^[1-2]。斑蝥酸钠维生素B6是一种抗肿瘤中成药, 国内相关的临床研究证实该药用于胃癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌能够杀伤癌细胞^[3-6]。国内一项细胞实验证实斑蝥酸钠 (sodium cantharidinate, SC) 能显著抑制胃癌SGC-7901细胞的增殖, 但相关的分子机制尚不十分清楚^[7]。

收稿日期: 2024-04-03; 修回日期: 2024-05-19

作者单位: 1. 710001 西安, 西安国际医学中心医院超声介入科; 2. 710001 西安, 西安国际医学中心医院肿瘤二科

作者简介: 刘兴红 (1985-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的临床工作, ORCID: 0009-0007-5229-0635

近些年关于中药抗肿瘤的机制研究认为Janus激酶2 (JAK2) /信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 通路、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 通路、p38通路、c-Jun氨基末端激酶 (JNK) 等信号通路介导的细胞凋亡与多种中药材或其活性成分的抗肿瘤作用有关。本研究将分析SC对胃癌细胞增殖和凋亡的调控机制, 并从JAK2/STAT3、ERK、p38、JNK信号通路分析相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人胃癌细胞株SGC-7901购自美国ATCC公司。

1.2 试剂

SC购自美国Cayman公司, CCK8试剂盒购自杭州联科美讯生物医药技术公司, Annexin V荧光双染凋亡试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、p38、p-p38、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、 β -actin一抗购自美国Abcam公司。

1.3 仪器

恒温细胞培养箱 (BIC-100型) 购自上海儒一恒温设备中心, 倒置显微镜 (DMi8型) 购自德国徕卡公司, 流式细胞仪 (Gallios型) 购自美国贝克曼库尔特公司, 全自动化学发光成像系统 (WD-9423B/C型) 购自北京六一生物科技公司。

1.4 细胞培养及给药

SGC-7901细胞复苏后在含有10%胎牛血清的培养基中贴壁培养, 每2 d更换1次培养基, 待细胞密度生长至80%~90%后用0.25%胰蛋白酶进行消化传代, 调节至适宜的细胞密度后接种在96孔培养板或6孔培养板, 48 h后进行给药, 对照组用不含药物的培养基处理, 不同浓度SC组用含有0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{mol/L}$ SC的培养基处理; 对照质粒组用脂质体转染对照质粒, 质粒终浓度1.0 $\mu\text{g/ml}$; 对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组用脂质体转染对照质粒, 质粒终浓度1.0 $\mu\text{g/mL}$, 同时加入浓度4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC; JAK2质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组用脂质体转染JAK2质粒, 质粒终浓度1.0 $\mu\text{g/mL}$, 同时加入浓度4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC。

1.5 细胞增殖的检测

将 1×10^4 个SGC-7901细胞接种在96孔培养板中, 分组处理48 h后每孔加入10 μl CCK8试剂, 孵育1 h后将培养板放入酶标仪, 设置波长为450 nm, 检测吸光度, 按照 $[(\text{实验孔吸光度}-\text{空白孔吸光度})/(\text{对照孔吸光度}-\text{空白孔吸光度})] \times 100\%$ 计算

细胞存活率。

1.6 细胞凋亡的检测

将 1×10^7 个SGC-7901细胞接种在6孔培养板中, 分组处理48 h后消化收集细胞, 用缓冲液重悬后进行Annexin V-FITC、PI染色, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 蛋白表达的检测

将 1×10^7 个SGC-7901细胞接种在6孔培养板中, 分组处理48 h后, 裂解液提取细胞中的蛋白, 用BCA法检测蛋白浓度, 将30 μg 蛋白样品用于Western blot实验, 步骤如下: 将蛋白样本加入聚丙烯酰胺凝胶中, 按照100 V 20 min、120 V 90 min进行电泳, 分离不同分子量的蛋白后进行湿膜, 将蛋白样品转移至硝酸纤维素膜。将硝酸纤维素膜放入5%脱脂牛奶、室温封闭1 h, 洗膜3次后, 将硝酸纤维素膜放入JAK2一抗 (1:600)、p-JAK2一抗 (1:1 000)、STAT3一抗 (1:1 000)、p-STAT3一抗 (1:400)、p38一抗 (1:800)、p-p38一抗 (1:800)、ERK一抗 (1:1 000)、p-ERK一抗 (1:1 000)、JNK一抗 (1:600)、p-JNK一抗 (1:600)、 β -actin一抗 (1:3 000), 4℃下孵育过夜。次日洗膜3次后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000), 室温孵育1 h, 最后在膜上加入电化学发光工作液, 在全自动化学发光成像系统显影得到蛋白条带, 分析条带灰度值, 计算p-p38、p-ERK、p-JNK、p-JAK2和p-STAT3的蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

采用SPSS22.0软件进行统计学分析, 实验数据均为计量资料, 以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用单因素方差分析One-Way ANOVA进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

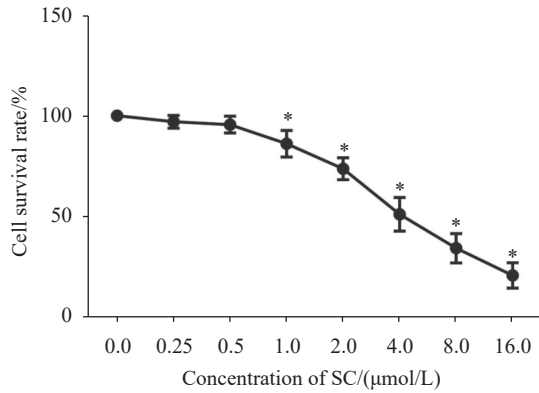
2 结果

2.1 不同浓度SC对胃癌SGC-7901细胞增殖的调控作用

与对照组比较, 0.25、0.5 $\mu\text{mol/L}$ SC处理后不影响细胞增殖 ($P=0.612$ 、 0.487); 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{mol/L}$ SC处理后细胞增殖受到抑制, 且随着SC浓度增加, 细胞存活率降低 ($P=0.009$), 见图1。选择1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC进行后续实验。

2.2 不同浓度SC对胃癌SGC-7901细胞凋亡的调控作用

与对照组比较, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组的细胞凋亡率无显著变化 ($P=0.324$), 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组的细胞凋亡率显著增加 ($P=0.013$ 、 0.003), 且随着SC浓度增加, 细胞凋亡率增加, 见图2。



*: $P < 0.05$, compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$ SC)

图1 不同浓度斑蝥酸钠(SC)对胃癌SGC-7901细胞增殖的调控作用

Figure 1 Regulation effect of different concentrations of sodium cantharidinate (SC) on the proliferation of SGC-7901 cells

2.3 不同浓度SC对胃癌SGC-7901细胞中信号通路转导的调控作用

与对照组比较, 1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组细胞中p-p38、p-ERK、p-JNK的表达水平差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), p-JAK2 ($P = 0.024$ 、0.004、 < 0.001) 和p-STAT3 ($P = 0.022$ 、0.002、 < 0.001) 的表达水平显著降低。随着SC浓度增加, p-JAK2和p-STAT3的表达水平降低, 见图3。

2.4 转染JAK2质粒对4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC调控胃癌细胞中JAK2/STAT3通路的影响

对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组SGC7901细胞中p-JAK2和p-STAT3的表达水平低于对照质粒组, JAK2质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组SGC7901细胞中p-JAK2和p-STAT3的表达水平高于对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组 (均 $P < 0.001$), 提示转染JAK2质粒能逆转4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC对JAK2/STAT3通路的抑制作用, 见图4。

2.5 转染JAK2质粒对4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC调控胃癌SGC-7901细胞增殖和凋亡的影响

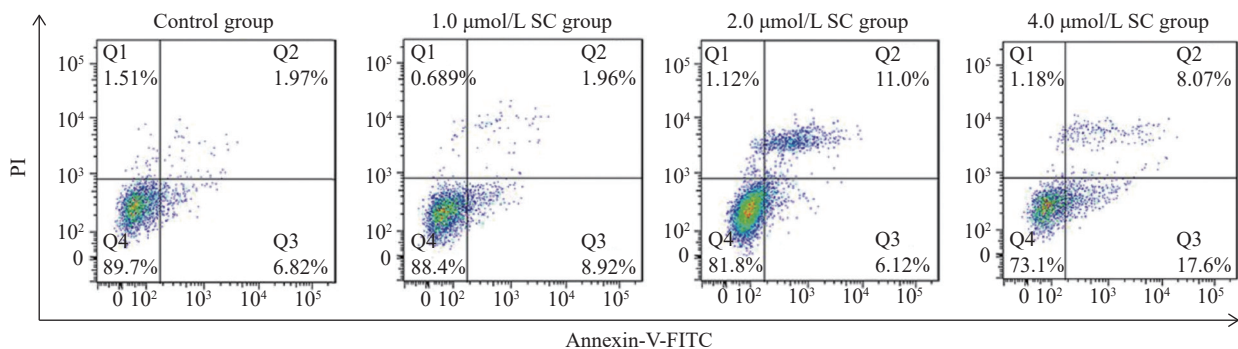
对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组SGC-7901细胞的存活率低于对照质粒组, 凋亡率高于对照质粒组 (均 $P < 0.001$); JAK2质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组SGC-7901细胞的存活率高于对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组, 凋亡率低于对照质粒+4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC组 ($P < 0.05$), 提示转染JAK2质粒逆转4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC对细胞增殖的抑制和对凋亡的促进作用, 见图5。

3 讨论

斑蝥素是从中药材斑蝥中提取到的抗肿瘤药物, 虽然其作用明确, 但因药物的毒副作用显著, 临床应用受限。随着近些年对斑蝥素研究的深入, SC、去甲斑蝥素等斑蝥素类衍生物被证实具有高效、低毒的抗肿瘤作用, SC用于恶性肿瘤化疗患者的辅助治疗能够增进化疗的近期疗效、减轻化疗的不良反应^[3-5]。也有研究报道, SC能够协同顺铂发挥抗癌作用, 增加宫颈癌细胞对顺铂的敏感性^[6]。但是目前关于SC抗肿瘤的分子生物学作用及机制尚缺乏充足的基础研究证据。

梁金龙等的研究显示, 细胞实验证实斑蝥素、SC和斑蝥酸镁均能抑制胃癌SGC-7901细胞的增殖, 且呈浓度依赖性^[7]。本研究将不同浓度SC处理胃癌SGC-7901细胞, 结果显示, SC能够以浓度依赖性的方式降低胃癌SGC-7901细胞存活率, 与梁金龙等的结果一致。诱导细胞凋亡是中药材及其活性成分、衍生物发挥抗肿瘤作用的重要途径之一。相关研究结果显示, SC能促进肝癌细胞、骨肉瘤细胞凋亡, 具有促进癌细胞凋亡作用^[8-9], 本研究结果亦显示, 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC显著增加胃癌SGC-7901细胞的凋亡率。

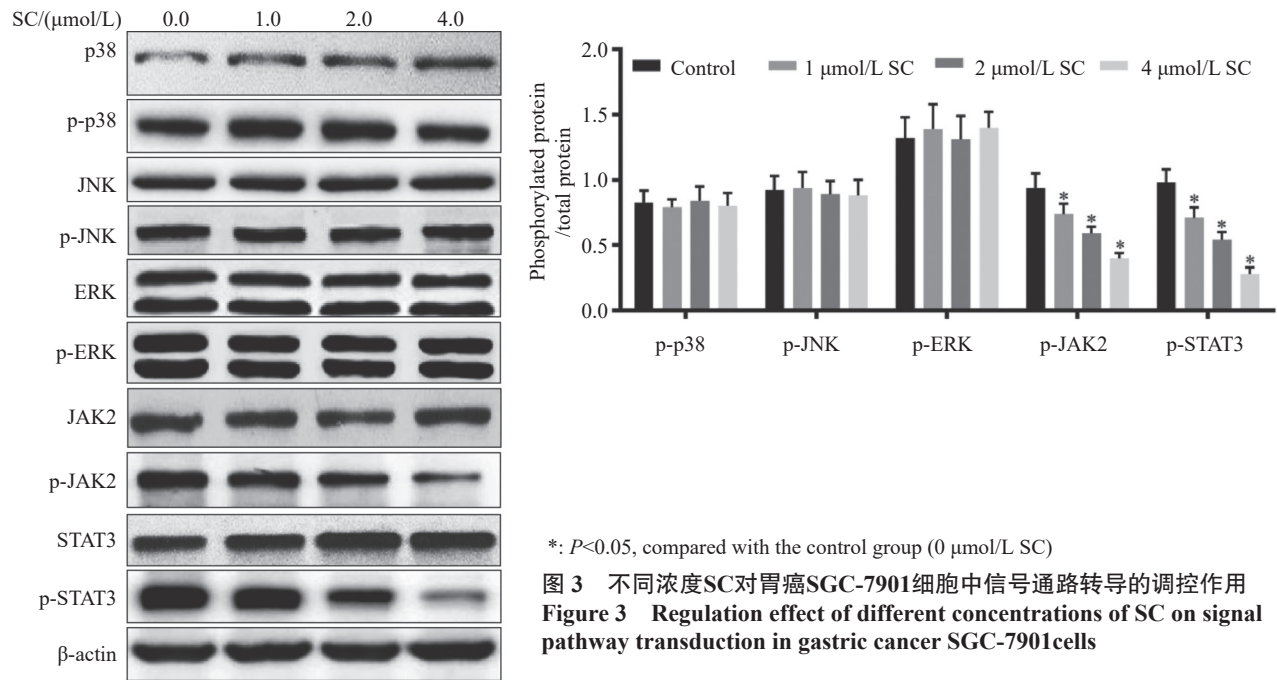
恶性肿瘤细胞的增殖和凋亡调控受到复杂信号通路的调控, 目前参与胃癌细胞凋亡调控的信号通路包括JAK2/STAT3、ERK、p38、JNK等。已有临



2.0 $\mu\text{mol/L}$ and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC group vs. the control group (0 $\mu\text{mol/L}$ SC), $P < 0.05$.

图2 不同浓度SC对胃癌SGC7901细胞凋亡的调控作用

Figure 2 Regulation effect of different concentrations of SC on the apoptosis of SGC7901 cells



*: $P < 0.05$, compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$ SC)

图3 不同浓度SC对胃癌SGC-7901细胞中信号通路转导的调控作用
Figure 3 Regulation effect of different concentrations of SC on signal pathway transduction in gastric cancer SGC-7901 cells

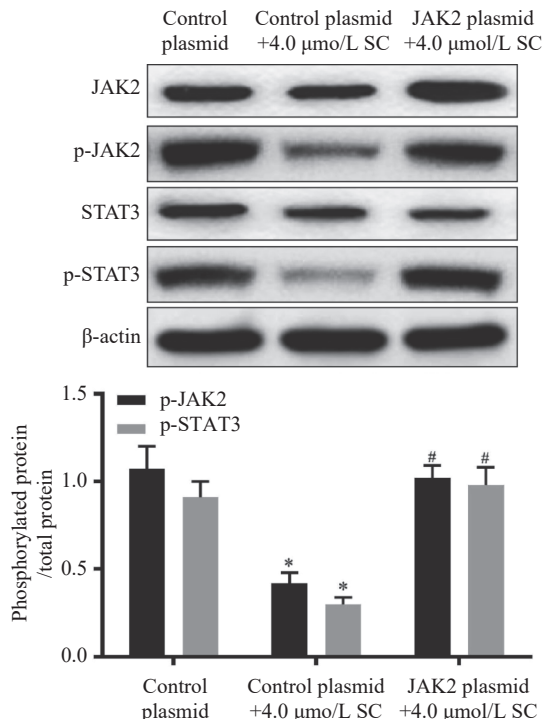
床研究证实胃癌组织中上述通路中磷酸化信号分子的表达水平发生显著变化且与肿瘤的病理进展、患者的生存预后不良有关^[10-12]。本研究结果证实不同浓度SC处理后均抑制胃癌SGC-7901细胞中p-JAK2、

p-STAT3的表达,但不影响p-p38、p-ERK、p-JNK的表达,提示SC抑制胃癌SGC-7901细胞中JAK2/STAT3通路的激活,但不直接调控ERK、p38、JNK通路,调控JAK2/STAT3可能是SC影响胃癌SGC-7901细胞增殖和凋亡的相关分子机制。

已有多项研究证实JAK2/STAT3信号通路参与胃癌的发生发展过程,过表达JAK2显著促进胃癌细胞增殖、抑制胃癌细胞凋亡^[13-14];反过来敲低JAK2或STAT3显著抑制胃癌细胞增殖、促进胃癌细胞凋亡^[15-16]。本研究证实胃癌SGC-7901细胞中JAK2/STAT3通路受到SC调控,而ERK、p38、JNK通路不受SC调控。为进一步阐明JAK2/STAT3通路在SC调控胃癌细胞增殖和凋亡中的分子生物学作用,本研究采用转染质粒的方式进行JAK2和STAT3的过表达。在4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC处理的同时转染JAK2质粒后,SC抑制p-JAK2、p-STAT3表达的作用被逆转,p-JAK2、p-STAT3的表达明显增加;同时,SC抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用也发生逆转。以上结果为SC通过JAK2/STAT3通路调控胃癌SGC-7901细胞增殖和凋亡提供了直接的实验证据。

本研究通过细胞实验对SC在胃癌SGC-7901细胞中的生物学作用及机制展开了探索,但受限于实验条件,未能开展SC用于胃癌移植瘤裸鼠干预的动物实验,这是本研究的不足之处。

综上,本研究的细胞实验结果显示,SC在胃癌的发生发展中起抑癌作用,其机制与抑制JAK2/STAT3通路激活有关。



*: $P < 0.05$, compared with the control plasmid group; #: $P < 0.05$, compared with the control plasmid + 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC group

图4 转染JAK2质粒对4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC调控胃癌细胞中JAK2/STAT3通路的影响

Figure 4 Effect of the transfection of JAK2 plasmid on 4.0 $\mu\text{mol/L}$ SC regulating the JAK2/STAT3 pathway in gastric cancer cells

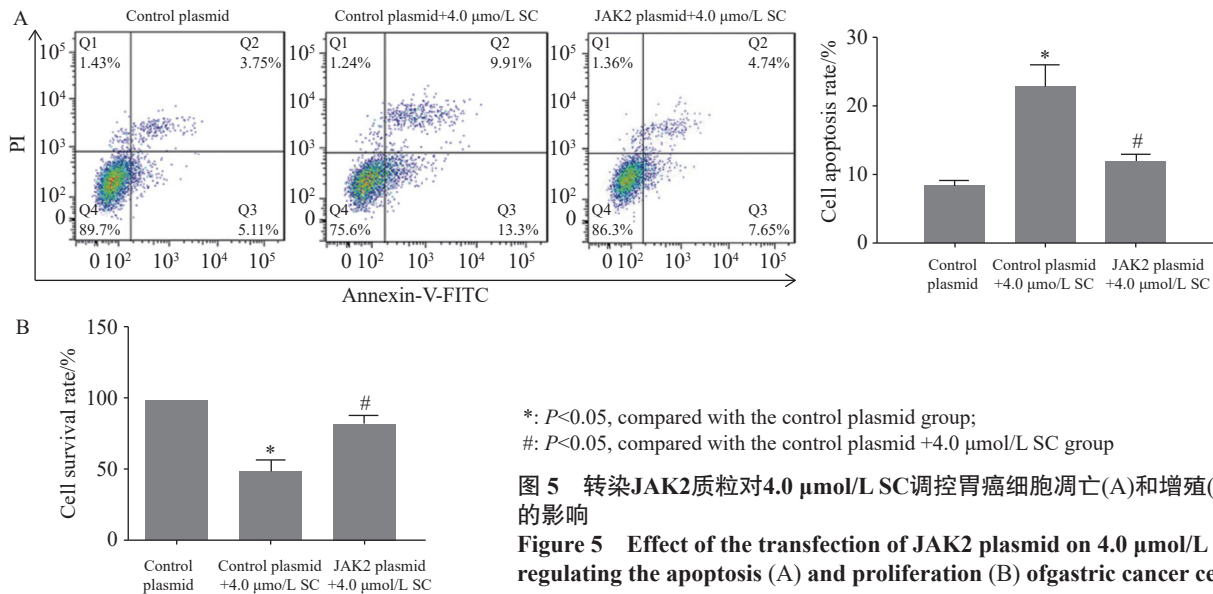


图5 转染JAK2质粒对4.0 μmol/L SC调控胃癌细胞凋亡(A)和增殖(B)的影响
Figure 5 Effect of the transfection of JAK2 plasmid on 4.0 μmol/L SC regulating the apoptosis (A) and proliferation (B) of gastric cancer cells

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58. [Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang, 2017, 44(1): 52-58.]
- Lin Y, Zheng Y, Wang HL, et al. Global Patterns and Trends in Gastric Cancer Incidence Rates (1988-2012) and Predictions to 2030[J]. Gastroenterology, 2021, 161(1): 116-127. e8.
- 甘云辉, 李应军, 李凤霞, 等. 斑蝥酸钠维生素B6注射液联合SOX方案对晚期胃癌患者miR-18a、miR-34a及免疫细胞计数的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2021, 26(12): 1551-1555. [Gan YH, Li YJ, Li FX, et al. Effects of sodium cantharidinate and vitamin B6 injection combined with SOX regimen on miR-18a, miR-34a and immune cell counts in patients with advanced gastric cancer[J]. Xian Dai Xiao Hua Ji Jie Ru Zhen Liao, 2021, 26(12): 1551-1555.]
- Zhu M, Liu X, Zhou C, et al. Effect of sodium cantharidinate/vitamin B6 injection on survival, liver function, immune function, and quality of life in patients with hepatocellular carcinoma: Protocol for a meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(34): e21952.
- Xiao Z, Wang C, Tan Z, et al. Clinical efficacy and safety of sodium cantharidinate plus chemotherapy in non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of 38 randomized controlled trials[J]. J Clin Pharm Ther, 2019, 44(1): 23-38.
- Chen X, Zhou M, Fan W, et al. Combination of Sodium Cantharidinate with Cisplatin Synergistically Hampers Growth of Cervical Cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 13(15): 171-183.
- 梁金龙, 谢铭, 杨雪峰, 等. 斑蝥素、斑蝥酸钠和斑蝥酸镁抑制人胃癌SGC-7901细胞增殖的研究[J]. 安徽医药, 2016, 20(3): 441-444. [Liang JL, Xie M, Yang XF, et al. Research on Cantharidin, Sodium cantharidinate and magnesium cantharidate Inhibition of proliferation of human gastric cancer cell SGC-7901[J]. Anhui Yi Yao, 2016, 20(3): 441-444.]

- Tao R, Sun WY, Yu DH, et al. Sodium cantharidinate induces HepG2 cell apoptosis through LC3 autophagy pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 1233-1239.
- Kong DL, Liu Y, Wang JY, et al. Sodium cantharidinate suppresses human osteosarcoma MG-63 cell proliferation and induces cell cycle arrest by inhibition of PI3K/AKT activation[J]. Oncol Rep, 2019, 41(2): 1351-1358.
- He S, Liao G, Liu Y, et al. Overexpression of STAT3/pSTAT3 was associated with poor prognosis in gastric cancer: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20014-20023.
- Lee H, Kim WJ, Kang HG, et al. Upregulation of LAMB1 via ERK/c-Jun Axis Promotes Gastric Cancer Growth and Motility[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 626.
- Li Y, Li D, Zhao M, et al. Long noncoding RNA SNHG6 regulates p21 expression via activation of the JNK pathway and regulation of EZH2 in gastric cancer cells[J]. Life Sci, 2018, 208: 295-304.
- Yuan K, Ye J, Liu Z, et al. Complement C3 overexpression activates JAK2/STAT3 pathway and correlates with gastric cancer progression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 9.
- Chen JF, Wu P, Xia R, et al. STAT3-induced lncRNA HAGLROS overexpression contributes to the malignant progression of gastric cancer cells via mTOR signal-mediated inhibition of autophagy[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 6.
- Wei KL, Chou JL, Chen YC, et al. Epigenetic Silencing of STAT3-Targeted miR-193a, by Constitutive Activation of JAK/STAT Signaling, Leads to Tumor Progression Through Overexpression of YWHAZ in Gastric Cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 575667.
- Yang H, Xu W. STAT3 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer by enhancing mesothelial-mesenchymal transition[J]. Biol Chem, 2021, 402(6): 739-748.

[编辑: 尤婷婷; 校对: 刘红武]

作者贡献:

刘兴红: 研究设计、实验开展、论文写作
刘瑾、陈海艳: 数据收集和统计分析
郭宇航: 研究和实验指导、论文审核