

基于 JAK/STAT 通路研究没食子酸抗结肠癌作用机制

阿丽亚·依拉木, 阿布都艾则孜·艾尔肯, 古丽娜·卡里曼江,
艾尔菲丁·阿尼娃尔, 木巴拉克·伊明江*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017)

[摘要] 目的:探讨没食子酸(GA)对人结肠癌细胞 HCT-116 和 Caco-2 活性和细胞内 Janus 激酶(JAK)/信号转导与转录激活因子(STAT)信号通路,抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的影响讨论其作用机制。方法:设立 GA 组、空白组及 5-氟尿嘧啶(5-FU, 0.05 g·L⁻¹)组,通过细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测 GA (0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)处理 HCT-116 和 Caco-2 细胞 12, 24, 48, 72 h 增殖抑制率,选取有效抑制增殖的 GA 浓度;结晶紫染色法检测细胞集落形成能力;划痕实验检测细胞迁移;荧光探针法(DCFH-DA)检测细胞活性氧(ROS)水平;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测细胞上清液中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JAK2, 磷酸化(p)-JAK2, STAT3, p-STAT3, Bcl-2 和 Bax 的表达变化。结果:CCK-8 结果显示,与空白组比较,GA(0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组 2 种细胞在 12, 24, 48, 72 h 后细胞增殖抑制率升高(P<0.05, P<0.01),并呈现浓度与时间依赖效应;与 5-FU 组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组 2 种细胞在 12, 24, 48, 72 h 后细胞增殖抑制率显著升高(P<0.01),呈现时间依赖效应。与空白组比较,两种细胞 GA(0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组细胞集落形成数显著降低(P<0.01),细胞集落形成抑制率显著升高(P<0.01),划痕愈合率显著降低(P<0.01),细胞内 ROS 荧光强度显著升高(P<0.01),上清液中 IL-6, TNF-α 表达降低(P<0.05, P<0.01),以上均呈现浓度依赖效应;与 5-FU 组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组细胞划痕愈合率显著降低(P<0.01),细胞内 ROS 荧光强度显著升高(P<0.01),细胞上清液中 IL-6, TNF-α 表达降低(P<0.05, P<0.01)。Western blot 显示,与空白组比较,GA(0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组 2 种细胞内 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 表达明显降低(P<0.01),而 Bax 蛋白表达增加(P<0.05, P<0.01),p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bcl-2/Bax 显著降低(P<0.01),以上均呈现浓度依赖效应;与 5-FU 组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组 2 种细胞内 p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2 表达降低(P<0.05, P<0.01),而 Bax 蛋白表达升高(P<0.05, P<0.01),p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bcl-2/Bax 降低(P<0.05, P<0.01)。结论:GA 可抑制结肠癌 HCT-116 和 Caco-2 细胞活性,其机制可能与增加细胞内 ROS 的积累,下调肿瘤微环境中的炎症因子 IL-6, TNF-α 的表达和 JAK/STAT 信号通路中 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达,进而下调 Bcl-2,上调 Bax 有关。

[关键词] 没食子酸; 结肠癌; Janus 激酶(JAK); 信号转导与转录激活因子(STAT); B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0091-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220426

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211210.2204.005.html>

[网络出版日期] 2021-12-14 14:15

Study on Anti-colorectal Cancer Mechanism of Gallic Acid Based on JAK/STAT Pathway

Elham Aliya, Arken Abdulaziz, Kalimanjan Gulina, Anwar Arfidin, Iminjan Mubarak*
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of gallic acid (GA) on human colon cancer HCT-116 and Caco-2 cell activities, intracellular Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription factor (STAT) signaling pathway, and the expression of anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and pro-

[收稿日期] 20210918(007)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2021D01C259)

[第一作者] 阿丽亚·依拉木,在读硕士,从事天然药物抗肿瘤机制研究,E-mail:965175578@qq.com

[通信作者] *木巴拉克·伊明江,博士,副教授,从事天然药物抗肿瘤机制研究,E-mail:896612093@qq.com

apoptotic protein B-cell lymphoma-2-associated X protein (Bax), so as to explore its underlying molecular mechanism. **Method:** Following the classification of cells into GA group, blank group, and 5-fluorouracil (5-FU, $0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) group, the HCT-116 and Caco-2 cells were treated with GA ($0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12, 24, 48, and 72 h, respectively, and the cell proliferation inhibition rates were determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay to select the GA concentration that effectively inhibited proliferation. The colony formation ability was detected by crystal violet staining and the migration of cells by scratch test. The level of reactive oxygen species (ROS) was measured using a fluorescent probe (DCFH-DA). The expression of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell supernatant were determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The expression levels of JAK2, phosphorylated (p)-JAK2, STAT3, p-STAT3, Bcl-2, and Bax were assayed by Western blot. **Result:** CCK-8 assay showed that after 12, 24, 48, and 72 h of treatment, GA ($0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the proliferation of HCT-116 and Caco-2 cells in a dose- and time-dependent manner, and the inhibition rates were higher than those in the blank control group. Compared with the 5-FU group, GA ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) enhanced the inhibition of cell proliferation in a time-dependent manner. Compared with the blank control group, GA ($0.1, 0.15, \text{ and } 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly decreased the number of cell colonies ($P<0.01$), increased the inhibition rate of cell colony formation ($P<0.01$), diminished the scratch healing rate ($P<0.05, P<0.01$), elevated the fluorescence intensity of intracellular ROS ($P<0.01$), and down-regulated the expression of IL-6 and TNF- α in the supernatant ($P<0.01$) in a dose-dependent manner. Compared with the 5-FU group, GA ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) decreased the scratch healing rate ($P<0.01$), enhanced the fluorescence intensity of intracellular ROS ($P<0.01$), and down-regulated the levels of IL-6 and TNF- α in cell supernatant ($P<0.01$). According to Western blot analysis, compared with the blank control group, GA ($0.1, 0.15, 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) obviously lowered the expression of p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and Bcl-2/Bax ($P<0.01$) and raised Bax protein expression ($P<0.05, P<0.01$) in a dose-dependent manner. Compared with the 5-FU group, GA ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) down-regulated the expression of p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and Bcl-2/Bax ($P<0.05, P<0.01$) and up-regulated the expression of Bax protein ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** GA significantly inhibits the proliferation of HCT-116 and Caco-2 cells, which may be related to the increased accumulation of intracellular ROS, down-regulation of inflammatory factors IL-6 and TNF- α , p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in JAK/STAT signaling pathway, and Bcl-2, and up-regulation of Bax.

[Keywords] gallic acid (GA); colorectal cancer; Janus kinase (JAK); signal transducer and activator of transcription (STAT); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax)

结肠癌是一种具有高发病率及致死率的消化道恶性肿瘤^[1],据全球癌症统计,2020年结肠癌的发病率位居世界第4位,每年约有115万人被诊断为结肠癌^[2]。目前,临床上多采用手术为主,化疗为辅的方法治疗结肠癌,但在治疗过程中的复发、远处转移和药物不良反应是医学界待解决的难题^[3],因此开发安全、有效、经济的中药天然药为原料的靶向药物成为研究热点。

没食子酸(GA)是一种在没食子、五倍子、石榴皮等药用植物中普遍存在的多酚类化合物,对消化道肿瘤具有良好的抑制效果^[4]。最新研究表明,GA可以通过Janus激酶(JAK)/信号转导与转录激活因子(STAT)信号通路抑制非小细胞肺癌A549细胞的

活性^[5],该通路参与肿瘤细胞中多种生物变异过程的调控,过度激活与结肠癌的发生发展也有着千丝万缕的关系^[6-7]。据报道,GA对结肠癌细胞增殖和迁移的抑制作用及对细胞凋亡和自噬的诱导作用受到多种信号通路的调控^[8-9],但学者还未明确GA能否通过调控JAK/STAT信号通路达到抑制结肠癌细胞活性的目的。为了深入探究GA抑制结肠癌细胞活性的作用与JAK/STAT信号通路的相关性,本研究通过检测GA对人源结肠癌细胞HCT-116和Caco-2内活性氧(ROS)积累和肿瘤微环境中的炎症因子白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达, JAK/STAT信号通路相关蛋白JAK2, STAT3,磷酸化(p)-JAK2, p-STAT3,和其下游抗凋

亡蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),促凋亡蛋白B细胞淋巴瘤-2相关X(Bax)表达的影响讨论其作用机制,为相关临床治疗提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞 人结肠癌细胞株 HCT116 和 Caco-2 购自武汉普诺赛生物科技有限公司(批号分别为201201D11,201228D50),收到后传至第3代备用。

1.2 药物 没食子酸(GA)对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号406K022)20 mg;5-氟尿嘧啶(5-FU)(北京索莱宝科技有限公司,批号1209KG022)50 mg。

1.3 试剂 高糖DMEM细胞培养基,进口澳洲胎牛血清(FBS),磷酸盐缓冲液(PBS)(以色列Biological Industries公司,批号分别为2043176,04-002-1C,2038149);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒,活性氧荧光探针(DCFH-DA)试剂盒(Biosharp公司,批号分别为7010000,BL714A);二甲亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号WXBC7821V);IL-6,TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL14113,JL10208);脱脂奶粉(德国Biofrox公司,批号1172GR100);JAK2,p-JAK2,STAT-3,p-STAT-3,Bcl-2,Bax单抗(美国CST公司,批号分别为3230T,3771S,4904T,9145T,4223T,2772T); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为BS-0061R,BS-40295G-HRP);结晶紫染液(上海如吉生物科技发展有限公司,批号SJH0244)。

1.4 仪器 Forma371型细胞培养箱,Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher公司);H17502型高速离心机(湖南湘仪器械有限公司);HHS-11-1型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司);MAX-A6003型电子天平(深圳无限量衡器有限公司);SX-500型高压灭菌锅(北京天美科学仪器有限公司);TS2型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);PP-1150 Power B型蛋白电泳仪和转膜仪(北京凯元信瑞仪器有限公司);FE0723凝胶图像分析软件(美国Fluor Chem E公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含有10% FBS,1%青霉素和链霉素的DMEM培养液,置于37℃,5%CO₂无菌培养箱。细胞生长至培养皿面积的70%左右时,用适量胰酶消化传代,其中HCT-116消化1 min,Caco-2消化5 min。

2.2 药物的配制 称取GA和5-FU各1 mg溶解于DMSO溶液1 mL中,制备成1 g·L⁻¹ GA母液和5-FU母液,置于-20℃冰箱备用,使用时用完全培养基稀释成相应浓度的工作液。

2.3 CCK8法检测细胞增殖 取对数生长的HCT-116和Caco-2细胞,胰酶消化后分别以每孔2 000个细胞均匀接种在96孔板里。待24 h细胞贴壁后去除培养液,除空白组外,给药组用0.02,0.05,0.1,0.15,0.2 g·L⁻¹的GA和0.05 g·L⁻¹ 5-FU[前期实验得5-FU干预2种细胞24 h时半数抑制浓度(IC₅₀) \approx 0.05 g·L⁻¹,故选用此质量浓度的5-FU]处理,每组浓度设4个复孔。分别培养12,24,48,72 h,按照试剂盒指南操作,用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度A,通过公式计算细胞增殖抑制率=(1-A_{药物组}/A_{空白组}) \times 100%,用SPSS 26.0计算IC₅₀。

2.4 结晶紫染色法观察细胞集落形成能力 取对数生长期的HCT-116和Caco-2细胞,以GA(0.1,0.15,0.2 g·L⁻¹)组,空白组及5-FU组分别于培养箱中培养48 h,3 d换液1次。继续培养12 d,对细胞进行PBS清洗,加入结晶紫染色液染色,计算集落形成抑制率。集落形成抑制率=(1-集落数/接种细胞数) \times 100%。

2.5 划痕实验检测细胞迁移 取对数生长期的HCT-116和Caco-2细胞培养至铺满六孔板,采用1 mL枪头进行划痕,细胞分组与2.4项一致,孵育细胞24 h,在显微镜下观察并采集图片,使用Image J软件进行愈合面积分析。

2.6 DCFH-DA检测细胞ROS水平 取对数生长期的HCT-116和Caco-2细胞培养至铺满六孔板,分组与2.4项一致,孵育细胞24 h,弃上清,PBS清洗,按照说明书加入DCFH-DA适量在37℃条件下孵育细胞30 min。PBS洗涤细胞后观察荧光,并采集图片。

2.7 ELISA试剂盒检测IL-6和TNF- α 表达 取对数生长期的HCT-116和Caco-2细胞,细胞分组与2.4项一致,每组至少设3个复孔,按ELISA试剂盒说明书配制标准品溶液操作,在450 nm波长处用空白孔调零后测定各孔的A,绘制标准曲线并计算样品浓度。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测JAK2,p-JAK2,STAT3,p-STAT3,Bcl-2,Bax蛋白表达 取对数生长期的HCT-116和Caco-2细胞,分组与2.4项一致,培养24 h。用PBS洗涤1次,使用RIPA裂解缓冲液提取细胞样品的总蛋白。根据相对分

子质量大小选择适宜浓度的SDS-PAGE凝胶,进行电泳转膜。TBST洗膜3次,用5%脱脂奶粉封闭1.5 h,再用TBST洗膜3次,4℃下与一抗(1:1 000)孵育过夜。TBST洗膜3次,室温孵育二抗(1:8 000)1 h, TBST洗膜3次,显色,以 β -actin为内参,使用Image J软件进行灰度值分析。

2.9 统计学分析 使用SPSS 26.0进行数据分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验(方差齐)或Dunnett's T3检验(方差不齐),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 GA对HCT-116和Caco-2细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of GA on proliferation inhibition rate of HCT-116 and Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞类型	12 h	24 h	48 h	72 h
GA	0.02	HCT-116	5.62 \pm 1.23 ¹⁾	11.73 \pm 1.28 ²⁾	10.24 \pm 0.69 ²⁾	20.44 \pm 1.22 ²⁾
			9.66 \pm 2.21 ¹⁾	24.68 \pm 1.48 ²⁾	31.06 \pm 1.51 ²⁾	32.75 \pm 1.15 ²⁾
			14.64 \pm 2.65 ²⁾	37.35 \pm 1.2 ²⁾	46.86 \pm 1.51 ²⁾	58.43 \pm 0.93 ²⁾
			31.38 \pm 2.29 ²⁾	49.54 \pm 1.75 ²⁾	62.39 \pm 0.86 ²⁾	70.62 \pm 0.98 ²⁾
			42.63 \pm 2.82 ^{2,4)}	60.01 \pm 1.26 ^{2,4)}	78.35 \pm 0.98 ^{2,4)}	86.54 \pm 1.02 ^{2,4)}
5-FU	0.05	Caco-2	37.14 \pm 1.21 ²⁾	50.74 \pm 0.88 ²⁾	67.49 \pm 0.89 ²⁾	81.55 \pm 1.39 ²⁾
			3.02 \pm 0.62 ¹⁾	7.10 \pm 0.48 ²⁾	11.54 \pm 1.42 ²⁾	15.51 \pm 0.74 ²⁾
			12.30 \pm 1.29 ²⁾	14.49 \pm 1.17 ²⁾	23.05 \pm 0.59 ²⁾	31.59 \pm 2.44 ²⁾
			19.24 \pm 0.74 ²⁾	28.25 \pm 1.58 ²⁾	42.19 \pm 1.70 ²⁾	53.41 \pm 1.71 ²⁾
			22.04 \pm 1.05 ²⁾	47.05 \pm 0.67 ²⁾	59.47 \pm 1.77 ²⁾	66.01 \pm 0.71 ²⁾
5-FU	0.05	Caco-2	27.99 \pm 0.57 ^{2,4)}	58.37 \pm 0.92 ^{2,4)}	76.20 \pm 1.76 ^{2,4)}	80.30 \pm 2.08 ^{2,4)}
			20.20 \pm 1.12 ²⁾	39.78 \pm 1.27 ²⁾	61.46 \pm 0.98 ²⁾	74.71 \pm 1.28 ²⁾

注:空白组细胞增殖抑制率为0;与同时点空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与同时点5-FU组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~8同)。

3.2 GA对细胞集落形成的影响 与空白组比较,GA(0.1,0.15,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞集落形成数显著降低($P < 0.01$),细胞集落形成抑制率显著升高($P <$

3 结果

3.1 GA对细胞增殖的影响 与空白组比较,GA(0.02,0.05,0.1,0.15,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞在12,24,48,72 h细胞增殖抑制率明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈现浓度与时间依赖效应;与5-FU组比较,GA(0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞在12,24,48,72 h后细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.01$),呈时间依赖效应。计算得GA处理2种细胞24 h的 IC_{50} 分别为0.148,0.153 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,见表1。选择1/2倍 IC_{50} (0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),1倍 IC_{50} (0.15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),3/2倍 IC_{50} (0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)3个质量浓度进行后续实验。

0.01),抑制效果呈现浓度依赖性,GA(0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞均无集落形成,细胞集落形成抑制率为100%。见表2,图1。

表2 GA对HCT-116和Caco-2细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

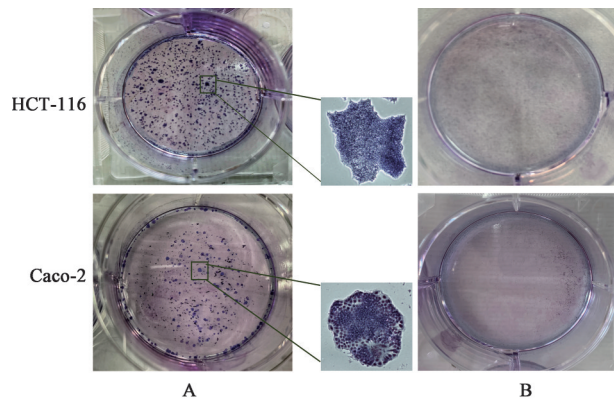
Table 2 Effect of GA on colony formation of HCT-116 and Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	集落数/个		集落形成抑制率/%	
		HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2
空白		184 \pm 16	143 \pm 10 ²⁾	38.67 \pm 5.31	52.33 \pm 3.40 ²⁾
GA	0.1	34 \pm 7 ²⁾	25 \pm 7 ²⁾	88.67 \pm 2.33 ²⁾	91.78 \pm 2.8 ²⁾
		9 \pm 3 ²⁾	3 \pm 2 ²⁾	97.11 \pm 1.03 ²⁾	99.11 \pm 0.68 ²⁾
		0 \pm 0 ²⁾	0 \pm 0 ²⁾	100.00 \pm 0.00 ^{2,4)}	100 \pm 0.00 ²⁾
5-FU	0.05	0 \pm 0 ²⁾	0 \pm 0 ²⁾	100 \pm 0.00 ²⁾	100 \pm 0.00 ²⁾

3.3 GA对细胞迁移的影响 与空白组比较,GA(0.1,0.15,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞划痕愈合率显著降低($P < 0.01$),呈现浓度依赖效应;与5-FU组比较,GA(0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞划痕愈合率显著降低($P <$

0.01)。见表3。

3.4 GA对细胞中ROS水平的影响 与空白组比较,GA(0.1,0.15,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组2种细胞内ROS荧光强度显著升高($P < 0.01$),并呈现浓度依赖性效应;与



A. 空白组; B. GA(0.2 g·L⁻¹)组
图1 GA对HCT-116和Caco-2细胞集落形成的影响(结晶紫, ×200)

Fig. 1 Effect of GA on colony formation of HCT-116 and Caco-2 cells (crystal violet, ×200)

表3 GA对HCT-116和Caco-2细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of GA on migration rate of HCT-116 and Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	划痕愈合率/%	
		HCT-116	Caco-2
空白		100.00±0.00	100.00±0.00
GA	0.1	70.14±1.45 ²⁾	82.87±1.76 ²⁾
	0.15	57.32±2.41 ²⁾	61.76±2.15 ²⁾
	0.2	20.07±1.70 ^{2,4)}	33.74±1.57 ^{2,3)}
5-FU	0.05	27.93±1.95 ²⁾	36.48±1.69 ²⁾

5-FU组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组细胞内ROS荧光强度显著升高($P<0.01$)。见表4,图2。

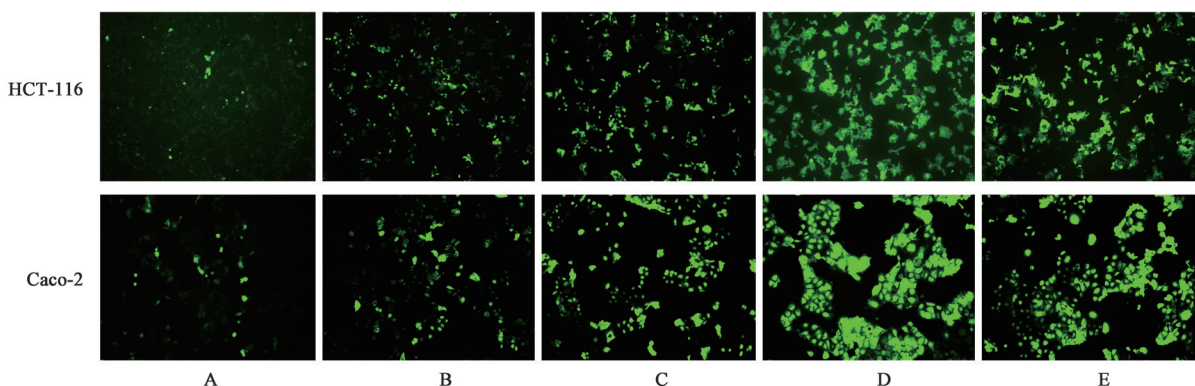
3.5 GA对细胞上清液中IL-6, TNF- α 表达的影响
与空白组比较,GA(0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组2种细

表4 GA对HCT-116和Caco-2细胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of GA on expression of ROS in HCT-116 and Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	ROS荧光强度/%	
		HCT-116	Caco-2
空白		3.51±1.05	3.34±0.84
GA	0.1	7.23±0.04 ²⁾	11.52±3.24 ²⁾
	0.15	16.46±3.74 ²⁾	22.70±7.47 ²⁾
	0.2	43.54±3.09 ^{2,4)}	53.54±14.98 ^{2,4)}
5-FU	0.05	26.75±3.53 ²⁾	28.72±6.63 ²⁾

胞上清液中IL-6, TNF- α 表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),并呈现浓度依赖性效应;与5-FU组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组细胞上清液中IL-6, TNF- α 表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

3.6 GA对HCT-116和Caco-2细胞中JAK2, STAT3, p-JAK2, p-STAT3, Bax, Bcl-2蛋白表达的影响
与空白组比较,GA(0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组两种细胞内JAK2, STAT3蛋白表达差异无统计学意义, p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.01$), Bax蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$), p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bcl-2/Bax均显著降低($P<0.01$),且具有浓度依赖性趋势;与5-FU组比较,GA(0.2 g·L⁻¹)组2种细胞内JAK2, STAT3蛋白表达差异无统计学意义, p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$), Bax蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$), p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bcl-2/Bax均降低($P<0.05, P<0.01$)。见表6~8,图3。



A. 空白组; B~D. GA(0.1, 0.15, 0.2 g·L⁻¹)组; E. 5-FU组(图3同)
图2 GA对HCT-116和Caco-2细胞内ROS水平的影响(DCFH-DA, ×40)

Fig. 2 Effect of GA on expression of ROS in HCT-116 and Caco-2 cells (DCFH-DA, ×40)

4 讨论

近年来炎症性肠病(IBD)患者发生结肠癌的风

险大幅升高^[10-11],患者服用非甾体抗炎药可在一定程度上降低肿瘤的发生和IBD的癌变率^[12-13],因此

表5 GA对HCT-116和Caco-2细胞上清液中IL-6, TNF- α 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	IL-6		TNF- α	
		HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2
空白		12.96±0.80	13.59±0.5	21.32±1.42	13.55±0.57
GA	0.1	11.00±0.40 ¹⁾	11.52±3.24 ¹⁾	19.35±1.02 ¹⁾	10.08±0.24 ²⁾
	0.15	9.91±0.20 ¹⁾	9.48±0.27 ²⁾	18.31±0.28 ¹⁾	9.67±0.69 ²⁾
	0.2	7.74±0.30 ^{2,3)}	6.74±0.46 ^{2,3)}	14.81±0.70 ^{2,4)}	7.90±0.51 ^{2,3)}
5-FU	0.05	8.85±0.31 ²⁾	8.67±0.64 ²⁾	17.03±0.53 ²⁾	9.36±0.17 ²⁾

表6 GA对HCT-116和Caco-2细胞中JAK2, P-JAK2, P-JAK2/JAK2表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	JAK2/ β -actin		p-JAK2/ β -actin		p-JAK2/JAK2	
		HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2
空白		1.09±0.16	1.10±0.13	1.14±0.06	1.28±0.05	1.06±0.11	1.06±0.11
GA	0.1	0.99±0.08	1.19±0.24	0.87±0.10 ²⁾	1.07±0.25 ²⁾	0.89±0.13 ²⁾	0.90±0.08 ²⁾
	0.15	1.05±0.10	1.02±0.80	0.65±0.07 ²⁾	0.56±0.03 ²⁾	0.62±0.08 ²⁾	0.55±0.05 ²⁾
	0.2	1.00±0.10	0.95±0.05	0.49±0.08 ^{2,4)}	0.41±0.05 ^{2,4)}	0.49±0.03 ^{2,4)}	0.42±0.04 ^{2,4)}
5-FU	0.05	1.09±0.15	0.93±0.10	0.61±0.10 ²⁾	1.00±0.40 ²⁾	0.56±0.04 ²⁾	0.53±0.05 ²⁾

表7 GA对HCT-116和Caco-2细胞中STAT3, p-STAT3, p-STAT3/STAT3表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	STAT3/ β -actin		p-STAT3/ β -actin		p-STAT3/STAT3	
		HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2
空白		0.89±0.15	1.08±0.06	1.06±0.14	1.03±0.18	1.21±0.10	1.21±0.10
GA	0.1	0.87±0.09	1.12±0.22	0.87±0.16 ²⁾	1.10±0.24 ²⁾	0.98±0.09 ²⁾	0.94±0.03 ²⁾
	0.15	0.81±0.04	1.00±0.08	0.65±0.04 ²⁾	0.67±0.21 ²⁾	0.80±0.01 ²⁾	0.66±0.18 ²⁾
	0.2	0.90±0.05	0.95±0.09	0.48±0.08 ^{2,4)}	0.53±0.23 ^{2,4)}	0.54±0.53 ^{2,4)}	0.58±0.22 ^{2,3)}
5-FU	0.05	0.91±0.02	0.97±0.19	0.56±0.03 ²⁾	0.60±0.20 ²⁾	0.61±0.04 ²⁾	0.60±0.14 ²⁾

表8 GA对HCT-116和Caco-2细胞中Bax, Bcl-2, Bcl-2/Bax表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Bax/ β -actin		Bcl-2/ β -actin		Bcl-2/Bax	
		HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2	HCT-116	Caco-2
空白		0.50±0.09	0.52±0.09	1.18±0.19	1.30±0.44	2.55±0.92	2.45±0.40
GA	0.1	0.59±0.11 ¹⁾	0.62±0.16 ²⁾	0.87±0.11 ²⁾	1.07±0.30 ²⁾	1.51±0.28 ²⁾	1.73±0.12 ²⁾
	0.15	0.69±0.07 ¹⁾	0.72±0.15 ²⁾	0.75±0.13 ²⁾	0.81±0.02 ²⁾	1.08±0.13 ²⁾	1.17±0.23 ²⁾
	0.2	0.88±0.11 ^{2,3)}	0.88±0.19 ^{2,4)}	0.65±0.12 ^{2,3)}	0.68±0.04 ^{2,4)}	0.78±0.10 ^{2,3)}	0.82±0.21 ^{2,3)}
5-FU	0.05	0.78±0.03 ²⁾	0.79±0.21 ²⁾	0.71±0.15 ²⁾	0.74±0.04 ²⁾	0.82±0.17 ²⁾	0.93±0.15 ²⁾

具有抗炎功效的天然药物被认为是潜在的具有抗肿瘤活性的良药。GA可以从没食子、五倍子、石榴皮等药用植物中提取获得,在抗炎抗肿瘤等方面具有良好的功效^[14]。本研究从GA的抗炎和促氧化作用作为切入点,选择炎-癌转变机制当中重要的一条信号轴JAK/STAT信号通路来阐述GA抗肿瘤的分

子机制^[15-16]。

JAK是一类非受体酪氨酸家族,STAT是JAK的底物,被JAK磷酸化的STAT可形成二聚体进入细胞核中诱导下游基因转录,此途径为JAK/STAT信号通路^[17]。JAK/STAT信号通路调节多个基因的表达,与肿瘤的发生及形成具有密切关联^[18-20]。

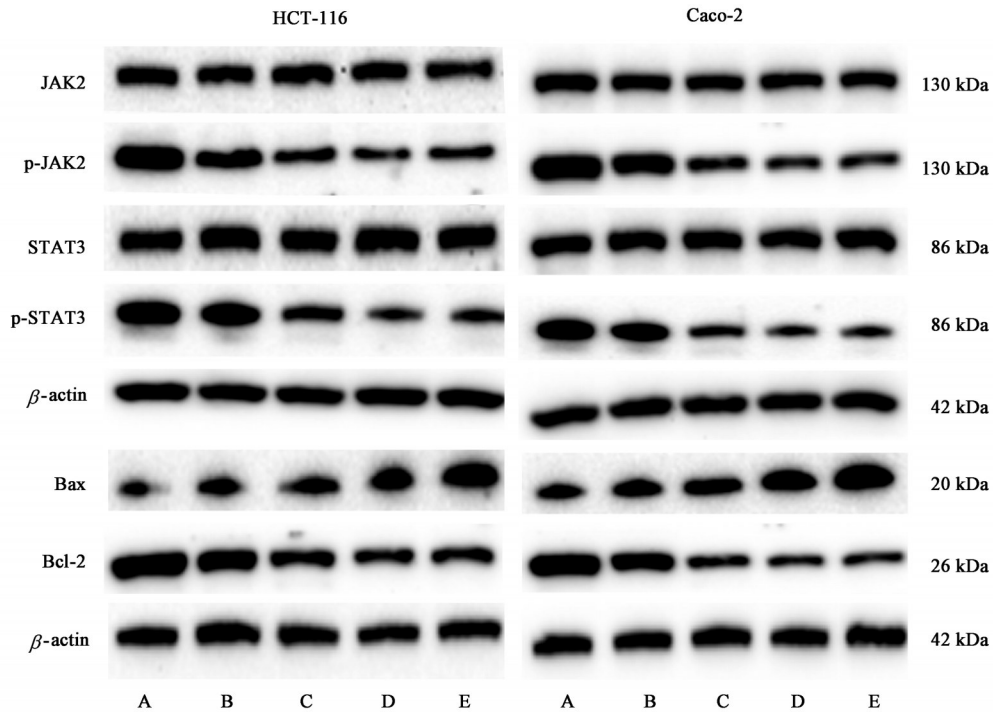


图3 GA对HCT-116和Caco-2细胞中JAK2, STAT3, p-JAK2, p-STAT3, Bax, Bcl-2蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of GA on expression of JAK2, STAT3, p-JAK2, p-STAT3, Bax, Bcl-2 in HCT-116 and Caco-2 cells

哺乳动物细胞中有4个JAK(JAK1, JAK2, JAK3和TYK2)和7个STAT(STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b和STAT6)^[21],在肿瘤发病过程中起到重要调控作用的蛋白是STAT3^[22-23]。IL-6和TNF- α 等炎症因子多存在于肿瘤微环境中,肿瘤微环境中的各类细胞因子对肿瘤细胞的存活有关键的促进作用^[24],他们会连接JAK进一步激活JAK/STAT3信号通路,进而调控Bcl-2家族相关蛋白表达影响肿瘤细胞凋亡^[25]。JAK/STAT3信号通路一旦被激活会诱发多种疾病^[26],已有大量研究表明,这一信号通路的激活与结肠癌的发生有密切联系^[27-29]。

ROS是细胞内的一类氧元素的单电子还原产物,可调节多种信号转导途径,参与调节增殖、凋亡等生物过程,ROS被大量活化会造成肿瘤细胞线粒体的损伤,和细胞对过度氧化应激的抵抗力下降,最终杀伤肿瘤细胞^[30]。据报道,多种化疗药的作用原理就是通过过度激活ROS诱导肿瘤细胞凋亡^[31]。研究证明ROS可通过抑制磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(PKB/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)途径促使肿瘤细胞凋亡^[32]。这一信号传导途径与凋亡密切相关,磷酸化的PI3K可通过产生信使激活下游的Akt,进而调控Bcl-2家族相关蛋白表达影响肿瘤细胞凋亡^[33]。磷酸化的Akt亦可激活下

游的mTOR,活化的mTOR通过协调蛋白质合成、线粒体呼吸、线粒体生物合成等众多过程进一步影响细胞凋亡,最终导致肿瘤的快速进展^[34-35]。另外, JAK2被激活之后可以进一步激活PI3K,其下游的mTOR进一步激活STAT3^[36],这表明PI3K/Akt/mTOR与JAK/STAT途径密切相关,肿瘤的发生和发展是通过这些通路蛋白的相互作用和共同促进来维持的^[37-38]。见图4。

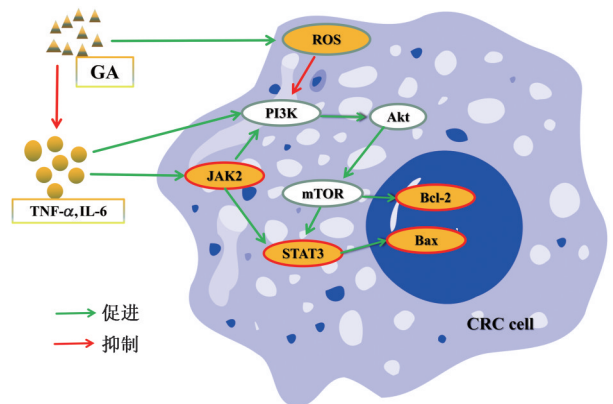


图4 GA调控JAK/STAT信号通路作用机制

Fig. 4 Schematic diagram of action mechanism of JAK/STAT signal pathway regulated by GA

为了进一步研究GA抑制结肠癌细胞活性的作用机制,同时也为了深入研究其与JAK/STAT信号通路的相关性,本研究检测了其上游信号分子IL-6,

TNF- α 的表达和细胞内ROS含量的变化,及JAK/STAT信号通路蛋白和下游Bax, Bcl-2蛋白的表达情况。结果显示,随GA浓度的增加,HCT-116和Caco-2细胞中JAK2, STAT3蛋白表达水平无明显变化, p-JAK2, p-STAT3, 下游的抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平呈现浓度依赖性的降低,而促凋亡蛋白Bax表达水平呈现浓度依赖性升高,进而诱导了细胞凋亡,抑制了细胞活性。此外,本研究初步判定GA在高浓度时对HCT-116和Caco-2细胞的抑制作用较5-FU强,其与5-FU联合应用是否能在具有协同作用前提下降低5-FU心脏损伤等不良反应^[39],还需进一步研究。

综上,GA能够降低HCT-116和Caco-2细胞中增加ROS的表达,同时降低肿瘤微环境中炎症因子IL-6, TNF- α 表达,进而下调p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, Bcl-2/Bax比例,干扰JAK-STAT信号通路的运转,从而达到抑制结肠癌的效果,这为今后的机制研究提供新的思路和理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ESLAMI M, YOUSEFI B, KOKHAEI P, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):17127-17143.
- [2] BRAY F, FERLAY J, JOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [3] PIAWAH S, VENOOK A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: a review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer*, 2019, 125(23):4139-4147.
- [4] 史海燕, 鄱艳丽. 没食子酸生物活性研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2020, 41(2):146-149.
- [5] 张庭秀. 没食子酸对非小细胞肺癌A549细胞增殖与凋亡的影响及机制研究[D]. 泸州:西南医科大学, 2018.
- [6] 孔令豪, 潘传芳, 沈克平. JAK/STAT信号通路与大肠癌及中医药调控[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(4):785-788.
- [7] 焦蕉, 唐麒, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方通过lncRNA HOTAIR/JAK2/STAT3信号通路抑制结肠癌细胞株

HCT116转移的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23):66-71.

- [8] LIN X, WANG G, LIU P, et al. Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6):638-640.
- [9] FORESTER S C, CHOY Y Y, WATERHOUSE A L, et al. The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals[J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(6):432-439.
- [10] AMIN M N, HUSSAIN M S, SARWAR M S, et al. How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(2):1213-1224.
- [11] SCHWIEBS A, HERRERO SAN JUAN M, SCHMIDT K G, et al. Cancer-induced inflammation and inflammation-induced cancer in colon: a role for S1P lyase[J]. *Oncogene*, 2019, 38(24):4788-4803.
- [12] KOSTIC A D, CHUN E, MEYERSON M, et al. Microbes and inflammation in colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(3):150-157.
- [13] WANG D, DUBOIS R N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6):781-788.
- [14] 张庭秀, 马李杰, 范贤明, 等. 没食子酸抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *西南军医*, 2017, 19(4):338-342.
- [15] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R, et al. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4):234-248.
- [16] 梁运特, 孙平良. 基于miRNA-146a/JAK/STAT/SOCS-3信号通路探讨安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠炎症免疫的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(3):30-38.
- [17] 于镞锐, 杨森, 钟洪波, 等. 藤黄酸通过抑制JAK-STAT通路对食管癌细胞KYSE450增殖和凋亡的影响[J]. *实用肿瘤杂志*, 2021, 36(3):228-233.
- [18] AARONSON D S, HORVATH C M. A road map for those who don't know JAK-STAT[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1653-1655.
- [19] MURRAY P J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration[J]. *J Immunol*, 2007, 178(5):2623-2629.
- [20] YU H, LEE H, HERRMANN A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected

- biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14 (11):736-746.
- [21] 郭芳. 蒽醌类衍生物 C10 通过 JAK/STAT3 信号通路对结肠癌细胞增殖的影响 [D]. 太原:山西大学, 2020.
- [22] BROMBERG J F, WRZESZCZYNSKA M H, DEVGAN G, et al. STAT3 as an oncogene [J]. *Cell*, 1999, 98(3):295-303.
- [23] LING X, ARLINGHAUS R B. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7):2532-2536.
- [24] 李萍,刘馨,刘洪璐,等. 癌相关性炎症因子 IL-6 在肿瘤微环境中的作用研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(19):3174-3177.
- [25] OSHEA J J, PLENGE R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease [J]. *Immunity*, 2012, 36(4):542-550.
- [26] OSHEA J J, SCHWARTZ D M, VILLARINO A V, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66(1):311-328.
- [27] LIU C, ZHANG Y, SHE X, et al. A cytoplasmic long noncoding RNA LINC00470 as a new AKT activator to mediate glioblastoma cell autophagy [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):77-83.
- [28] HUARTE M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):1253-1261.
- [29] XIONG H, ZHANG Z G, TIAN X Q, et al. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(3):287-297.
- [30] LIANG Q, XIAO Y, LIU K, et al. Cr(VI)-induced autophagy protects L-02 hepatocytes from apoptosis through the ROS-Akt-mTOR pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(4):1863-1878.
- [31] ZHANG C, HUANG C, YANG P, et al. Eldecalcitol induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells by accumulating ROS to suppress the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2021, 78(1):109841.
- [32] ZHU S, ZHOU J, SUN X, et al. ROS accumulation contributes to abamectin-induced apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway in TM3 Leydig cells [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(8):e22505.
- [33] YUE Z, GUAN X, CHAO R, et al. Diallyl disulfide induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(14):2665.
- [34] WANG X R, WANG Z G. Research progress of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and PI3K/mTOR dual inhibitor in gastric cancer [J]. *J Mil Surg Southwest Chin*, 2018, 20(3):375-379.
- [35] 柳荣,王燕,朱向东,等. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(4):16-23.
- [36] ZHANG Z H, LI M Y, WANG Z, et al. Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153172.
- [37] LOGUE J S, MORRISON D K. Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy [J]. *Gene Dev*, 2012, 26 (7):641-650.
- [38] VOGT P K, HART J R. PI3K and STAT3: a new alliance [J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(6):481-486.
- [39] 徐月,李沅洋,齐新,等. 5-氟尿嘧啶心脏毒性的研究进展与中药防治 [J]. *天津中医药*, 2021, 38(5): 671-675.

[责任编辑 张丰丰]