

基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨白头翁皂苷 A 对 Burkitt 淋巴瘤细胞增殖和凋亡的影响

刘宁¹, 白洁¹, 于慧², 陈晓丽², 孔祥图², 倪海雯^{2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023;
2. 江苏省中医院(南京中医药大学附属医院), 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨白头翁皂苷 A 对人伯基特淋巴瘤(BL)细胞 Raji 细胞增殖、凋亡及相关通路蛋白表达的影响。方法:以人 BL 细胞 Raji 细胞为研究对象,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞增殖情况,并计算出 24、48、72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 19.77、18.31、16.70 μmol·L⁻¹。后续相关实验根据白头翁皂苷 A 作用 Raji 细胞 72 h IC₅₀,选用白头翁皂苷 A 8、16、32 μmol·L⁻¹开展实验。用 0、8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 作用于 Raji 细胞 24、48、72 h, CCK-8 法检测细胞生长曲线吸光度 A。检测经 0、8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 处理 Raji 细胞 24 h 后 Raji 细胞中胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、Caspase-9 的酶原活性。流式细胞仪检测不同浓度白头翁皂苷 A 作用 Raji 细胞 24 h 后细胞凋亡率及细胞周期。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 0、8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 作用 Raji 细胞 24 h, Raji 细胞中 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved PARP)、活化的 Caspase-3(cleaved Caspase-3)凋亡蛋白表达情况,检测非受体酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)、信号转导及转录激活因子 3(STAT3)、磷酸化(p)-JAK2、p-STAT3 通路蛋白表达情况。结果:与空白组比较,8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 组细胞增殖受到抑制,8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 酶原显著活化(P<0.01),细胞凋亡明显增加(P<0.05, P<0.01),细胞于有丝分裂准备期(G₂)期阻滞明显增加(P<0.05, P<0.01)。与空白组比较,8、16、32 μmol·L⁻¹白头翁皂苷 A 组 Raji 细胞中 Bcl-2 蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01), Bax、cleaved PARP、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著增加(P<0.01), JAK2、STAT3 蛋白表达未见明显改变, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01)。结论:白头翁皂苷 A 可以抑制人 BL 细胞 Raji 细胞的增殖并促进其凋亡,其作用机制可能与白头翁皂苷 A 调控 JAK2/STAT3 信号通路有关。

[关键词] 白头翁皂苷 A; Burkitt 淋巴瘤; Raji 细胞; 增殖; 凋亡; 非受体酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导及转录激活因子 3(JAK2/STAT3)信号通路

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)20-0071-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221225

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220415.1538.004.html>

[网络出版日期] 2022-04-18 7:41

Effect of Pulsatilla Saponin A on Proliferation and Apoptosis of Burkitt Lymphoma Cells Based on JAK2/STAT3 Signaling Pathway

LIU Ning¹, BAI Jie¹, YU Hui², CHEN Xiaoli², KONG Xiangtu², NI Haiwen^{2*}

(1. The First School of Clinical Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine (Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of pulsatilla saponin A (PSA) on proliferation and

[收稿日期] 2021-12-27

[基金项目] 国家中医药管理局第四批全国中医优秀人才研修项目(国中医药办人教函[2017]24号);江苏省中医药管理局课题(YB2017014);江苏省卫生健康委重点项目(ZD 2021040)

[第一作者] 刘宁, 硕士, 从事中医内科学研究, E-mail: 1371385096@qq.com

[通信作者] *倪海雯, 博士, 主任中医师, 从事中西医结合血液肿瘤研究, E-mail: fsyy00654@njucm.edu.cn

apoptosis of human Burkitt lymphoma (BL) cell line Raji cells and expression of related pathway proteins. **Method:** With Raji cells as the research object, the cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 24 h, 48 h and 72 h were calculated to be 19.77, 18.31, 16.70 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. In subsequent related experiments, 0, 8, 16, 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA were selected according to the IC_{50} value of Raji cells treated with PAS for 72 h. After 0, 8, 16, 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA acted on Raji cells for 24, 48, 72 h, the optical density values of cell growth curve were detected by CCK-8 method. The zymogen activities of cysteine aspartate-specific protease (Caspase)-3, Caspase-8 and Caspase-9 in Raji cells treated with 0, 8, 16 and 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA for 24 h were measured by Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 colorimetric assay kit. The apoptosis rate and cell cycle of Raji cells treated with different concentrations of PSA after 24 h were detected by flow cytometry. The expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (cleaved PARP), cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved Caspase-3) apoptosis related protein and Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylated-JAK2 (p-JAK2), and phosphorylated-STAT3 (p-STAT3) pathway proteins in Raji cells after 24 h of treatment with 0, 8, 16 and 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA were tested by Western blot. **Result:** Compared with control group, decreased cell survival rate, inhibited cell proliferation, activated zymogens of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 ($P<0.01$), increased apoptosis ($P<0.05$, $P<0.01$), and enhanced cell cycle arrest in Gap phase 2 (G_2) were observed in 8, 16 and 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with control group, cells treated with 8, 16 and 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSA had lower expression of Bcl-2, p-JAK2, p-STAT3 proteins ($P<0.05$, $P<0.01$), and higher expression of Bax, cleaved PARP and cleaved Caspase-3 protein ($P<0.01$), while no significant change was found in the expression of JAK2 and STAT3 proteins. **Conclusion:** PSA could inhibit proliferation and induce apoptosis of Raji cells, and its potential mechanism might be related to the regulation of JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] pulsatilla saponin A; Burkitt lymphoma; Raji cells; proliferation; apoptosis; janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway

淋巴瘤是起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,其中伯基特淋巴瘤(BL)是一种高度侵袭的非霍奇金B细胞淋巴瘤(B-NHL)^[1],好发于儿童及年轻人,在发展中国家,BL约占儿童B-NHL的80%^[2],成人患者的疗效及治疗耐受性均低于儿童,尤其在免疫缺陷的群体^[3]。本病临床特征为常累及颌面部及腹部、中枢神经系统等结外器官,且肿瘤负荷高、肿瘤细胞溶解综合征风险高,其分子学特征是存在癌基因(*myc*)的易位,治疗主要以高剂量化疗联合抗CD20单抗、中枢预防为基本框架,提高了该病的完全缓解率及总生存^[4]。尽管如此,高强度化疗相关的不良反应,高危复发难治患者治疗选择有限是目前BL面临的主要困境。中药具有减毒增效、提高化疗耐受性等方面的优势。在中药制剂中寻找新的有效治疗靶点,以期降低高强度化疗的不良反应,增加治疗效果具有重要的理论和实际意义。

本研究团队长期从事中西整合淋巴瘤及骨髓瘤的治疗,以国医大师周仲瑛癌毒病机为指导,病证结合贯穿淋巴瘤治疗的全过程,复法合方、标本

兼治,擅用经方治疗淋巴瘤并发症,本课题组在临床治疗中发现,包括Burkitt淋巴瘤在内的侵袭性B细胞淋巴瘤患者腹泻、腹痛、舌质红、苔黄腻等表现较为多见,以经方白头翁汤化裁收效甚著,能够显著改善患者肠道症状、提高治疗耐受性、改善生活质量(相关临床观察研究整理投稿中)。白头翁汤出自《伤寒论·辨厥阴病脉证并治》,广泛应用于治疗以腹痛、腹泻、便血等表现的肠道疾病。本中心刘史佳教授团队研究发现白头翁汤治疗溃疡性结肠炎(UC)与调节肠道菌群、调控白细胞介素-6(IL-6)/信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)信号通路有关^[5]。采用网络药理学对白头翁汤治疗UC核心靶标密切相关的信号通路进行研究,发现主要有Toll样受体(TLR)、核转录因子- κB (NF- κB)、核苷酸寡聚化结构域(NOD)样受体(NLR)、细胞因子-细胞因子受体、肿瘤坏死因子(TNF)等。研究发现白头翁汤治疗UC的信号通路主要与细胞的增殖和凋亡有关,具体涉及到IL-6/STAT3,表皮生长因子受体(EGFR),肿瘤抑制蛋白(p53),磷脂酰肌醇3-

激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)等信号通路^[6-7]。该类信号通路是目前B细胞淋巴瘤发生发展的关键通路密切相关。白头翁又称野丈人,为白头翁汤君药,《神农本草经》中记载白头翁主温疟狂易寒热,瘕瘕积聚,瘕气等。其中“瘕瘕积聚”在现代医学中,属于肿瘤学的范畴,近年来大量研究表明白头翁具有多途径抗肿瘤的作用,对于其抗肿瘤有效成分的筛选及机制研究逐渐深入。白头翁皂苷A为白头翁药材中的有效活性成分之一,具有抗肿瘤^[8-10]、提高免疫、抗病原微生物、治疗内毒素血症等功能。其在血液系统疾病如多发性骨髓瘤^[11]、白血病^[12]方面也有研究报道,但在淋巴瘤领域尚鲜有报道。近年来,随着对淋巴瘤分子机制认识逐渐深入,单克隆抗体、抗体偶联药物、靶向免疫检查点、肿瘤微环境、分子信号通路、表观遗传学调控药物、细胞免疫治疗、组成了目前高危复发淋巴瘤的总体治疗策略^[13]。酪氨酸蛋白激酶/信号传导及转录激活蛋白(JAK/STAT)信号通路也是淋巴瘤尤其是复发难治患者的治疗靶点之一^[14]。JAK2/STAT3是JAK/STAT信号通路的重要亚型之一,可在多种肿瘤中表现异常高活化,抑制抗肿瘤免疫反应^[15]。细胞因子通过与受体的胞外结构域结合,导致JAK蛋白的磷酸化,驱动JAK的激活、成为重要的致癌通路之一^[16]。因此,本研究通过白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞增殖、凋亡、细胞周期及JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响,旨在探索白头翁皂苷A对于Raji细胞是否具有体外抗肿瘤活性及可能的机制。

1 材料

1.1 细胞 人BL细胞Raji细胞,由江苏省中医院血液科朱学军老师赠送,本研究均采用传代20代以内的细胞进行实验。

1.2 药物 白头翁皂苷A(上海源叶生物科技有限公司,货号B20058-20mg,HPLC \geq 98%)。

1.3 试剂 RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为8120384、2152441P);二甲基亚砜(DMSO,南京良纬生物科技有限公司,货号D4540),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、RIPA裂解液、5 \times SDS-PAGE变性蛋白上样缓冲液、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙锭(PI)细胞凋亡检测试剂盒、胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活性试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司,货号分别为E1CK-000208、E1WP106、E1WP303、BA11100、BA30100、

BA31100、BA32100),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号P10010),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、活化的(cleaved)Caspase-3、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved PARP)抗体(美国CST公司,货号分别为4695、8690、4370、4511),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(EnoGene公司,货号E1C604),二抗兔抗及小鼠抗(美国CST公司,货号分别为7074、7076),JAK2抑制剂(Selleck公司,货号NSC42834)。

1.4 仪器 HERAcell 150i型CO₂培养箱(美国Thermo公司),DMi1型倒置显微镜(德国Leica公司),infinite 200 pro型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司),PowerPac Basic型基础电泳仪,Mini-PROTEAN Tetra型电泳槽(美国Bio-Rad公司),Tanon 5200 Multi型全自动化学发光/荧光图像分析系统(南京麦高德生物科技有限公司),Gallios型流式细胞分析仪(美国Beckman公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人BL细胞Raji细胞用RPMI 1640完全培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)、置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 白头翁皂苷A制备 白头翁皂苷A 50 mg溶于DMSO 1 mL中,配置母药浓度为66 578 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,予0.22 μm 一次性针头式滤器过滤,-20 $^{\circ}$ C保存,待后续实验使用。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖 取对数生长期的人BL细胞Raji细胞,接种于96孔板中,终密度调整至 1.5×10^5 个/mL。前期预实验表明,白头翁皂苷A在15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对Raji细胞的增殖抑制率约为50%,故本实验中加入含白头翁皂苷A浓度为3.7、7.5、15、30、60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全培养基,设不加药的空白组。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度条件下分别培养24、48、72 h,加入CCK-8溶液10 μL ,继续培养2 h,用酶标仪在450 nm波长下测吸光度A。计算细胞抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞增殖抑制率=(A_{空白组}-A_{加药组})/A_{空白组} \times 100%。

2.4 CCK-8法检测细胞生长曲线 取对数生长期的人BL细胞Raji细胞,接种于96孔板中,终密度调整至 1.5×10^5 个/mL。加入含白头翁皂苷A浓度为8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全培养基,设不加药的空白组。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度条件下分别培养24、48、72 h,加入CCK-8溶液10 μL ,继续培养2 h,

用酶标仪在450 nm波长下测定细胞生长曲线。

2.5 试剂盒检测 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 酶原活化 收集经8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A处理24 h的人BL细胞Raji细胞, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径140 mm, 下同), 吸弃上清, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 收集细胞, 吸弃上清, 加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解30 min, 其间涡旋振荡, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 吸取上清备用。取出适量的底物和2 \times 反应液, 置于冰上, 加入底物后混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。发现颜色变化明显时立即测定Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活化状态。用酶标仪在405 nm测定其A。通过计算 $A_{\text{诱导剂}}/A_{\text{阴性对照}}$ 倍数确定凋亡诱导剂组Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活化程度。

2.6 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡 细胞加药及收集同2.5项, 加入1 \times Annexin V Binding Solution, 制备1 $\times 10^6$ 个/mL细胞悬液, 取500 μL 加入Annexin V-FITC 5 μL , PI溶液5 μL , 室温避光15 min, 用流式细胞仪定量检测各组细胞凋亡情况。

2.7 流式细胞术检测细胞周期 细胞加药及收集同2.5项, 加入预冷PBS 1 mL, 吹打混匀, 后移至离心管内, 沉淀细胞, 吸弃上清, 分散细胞, 加入预冷70%乙醇1 mL, 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定24 h。1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 弃去上清, PBS洗涤, 每管样品中加入PI染色液0.5 μL , 避光、室温孵育30 min, 24 h内完成流式细胞仪检测各组细胞周期。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 收集经0、8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A、6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JAK2抑制剂组处理24 h的人BL细胞Raji细胞, 加入适量RIPA裂解液, 在冰水浴中放置30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液。BCA蛋白定量试剂盒蛋白定量后, 取适宜体积, 按1:5比例加入上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴变性10 min。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白, 转膜后加入一抗(1:1 000)孵育过夜, 加入二抗(1:5 000)孵育2 h, 显影。采用ImageJ软件分析处理, 测定各组蛋白条带的灰度值, 以目的条带和GAPDH条带的比值作为相对蛋白表达水平。

2.9 统计学分析 上述每组实验均至少重复3次, 采用GraphPad Prism 8.0统计软件对所得数据进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组样本间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞增殖的影响 与空白组比较, 白头翁皂苷A对Raji细胞生长具有明显的抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$), 且呈浓度依赖性和时间依赖性, 白头翁皂苷A对Raji细胞在24、48、72 h的 IC_{50} 分别为19.77、18.31、16.70 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 见表1。后续实验根据白头翁皂苷A作用Raji细胞72 h IC_{50} , 选用8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A。

表1 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of pulsatilla saponin A on proliferation inhibition rate of human Burkitt lymphoma Raji cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 增殖抑制率/% | | |
|---------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| 白头翁皂苷A组 | 3.7 | 16.06 \pm 3.55 ¹⁾ | 17.26 \pm 5.56 ¹⁾ | 17.38 \pm 5.35 ¹⁾ |
| | 7.5 | 27.67 \pm 1.38 ²⁾ | 29.87 \pm 5.17 ¹⁾ | 30.38 \pm 8.49 ¹⁾ |
| | 15.0 | 48.64 \pm 9.84 ¹⁾ | 50.73 \pm 5.37 ¹⁾ | 55.77 \pm 4.45 ²⁾ |
| | 30.0 | 59.68 \pm 5.45 ¹⁾ | 60.95 \pm 8.03 ¹⁾ | 62.68 \pm 8.55 ¹⁾ |
| | 60.0 | 70.98 \pm 6.20 ¹⁾ | 71.74 \pm 7.32 ¹⁾ | 72.24 \pm 3.54 ²⁾ |
| | 120.0 | 82.05 \pm 4.71 ¹⁾ | 82.71 \pm 5.62 ¹⁾ | 83.53 \pm 5.30 ¹⁾ |

注: 设空白组细胞增殖抑制率为0; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2)$ $P < 0.01$ (表2-表7同)

3.2 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞生长曲线的影响 与空白组比较, 8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A处理的人BL细胞Raji细胞生长曲线A显著下降($P < 0.01$)。见表2。

表2 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞生长曲线的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of pulsatilla saponin A on growth curve of human Burkitt lymphoma Raji cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 细胞生长曲线A | | |
|---------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白组 | | 1.03 \pm 0.04 | 1.18 \pm 0.04 | 1.89 \pm 0.34 |
| 白头翁皂苷A组 | 8.0 | 0.94 \pm 0.02 ²⁾ | 0.86 \pm 0.03 ²⁾ | 0.80 \pm 0.02 ²⁾ |
| | 16.0 | 0.74 \pm 0.01 ²⁾ | 0.70 \pm 0.01 ²⁾ | 0.68 \pm 0.01 ²⁾ |
| | 32.0 | 0.62 \pm 0.01 ²⁾ | 0.58 \pm 0.01 ²⁾ | 0.57 \pm 0.01 ²⁾ |

3.3 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活化的影响 与空白组比较, 8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A组作用于Raji细胞24 h后的Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活性均显著升高($P < 0.01$)。见表3。

表3 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9酶原活化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of pulsatilla saponin A on activation of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 in human Burkitt lymphoma Raji cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Caspase-3 | Caspase-8 | Caspase-9 |
|---------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 0.56±0.14 | 0.61±0.15 | 0.67±0.20 |
| 白头翁皂苷A组 | 8.0 | 2.29±0.48 ²⁾ | 2.45±0.49 ²⁾ | 2.85±0.72 ²⁾ |
| | 16.0 | 3.73±0.66 ²⁾ | 3.92±0.48 ²⁾ | 4.59±0.82 ²⁾ |
| | 32.0 | 5.74±0.49 ²⁾ | 5.26±0.55 ²⁾ | 5.33±0.84 ²⁾ |

3.4 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI双染法检测结果显示,与空白组比较,浓度为8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A组作用于人BL细胞Raji细胞24 h早期凋亡、晚期凋亡、总凋亡率均明显升高 ($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

3.5 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞周期的影响 与空白组比较,8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷A组作用于人BL细胞Raji细胞24 h后G₁期、S期下降 ($P<0.05, P<0.01$), G₂期升高 ($P<0.05, P<0.01$), Raji细胞G₂期阻滞呈浓度依赖性。见表5。

3.6 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞中凋亡蛋白表达的影响 与空白组比较,8、16、32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

表4 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of pulsatilla saponin A on apoptosis rate of human Burkitt lymphoma cell Raji cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 早期凋亡率 | 晚期凋亡率 | 总凋亡率 |
|---------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 1.78±2.12 | 1.65±0.44 | 3.43±1.28 |
| 白头翁皂苷A组 | 8.0 | 9.06±3.45 ¹⁾ | 8.15±0.37 ²⁾ | 17.21±1.91 ¹⁾ |
| | 16.0 | 9.62±2.67 ¹⁾ | 18.02±1.57 ¹⁾ | 27.64±2.12 ¹⁾ |
| | 32.0 | 10.11±0.43 ²⁾ | 22.72±0.44 ²⁾ | 32.83±0.44 ²⁾ |

表5 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of pulsatilla saponin A on cell cycle of human Burkitt lymphoma Raji cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | G ₁ | S | G ₂ |
|---------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 35.63±1.87 | 56.01±2.11 | 7.84±0.96 |
| 白头翁皂苷A组 | 8.0 | 33.61±0.64 ¹⁾ | 49.29±0.87 ¹⁾ | 17.42±0.97 ¹⁾ |
| | 16.0 | 32.53±1.11 ²⁾ | 46.10±1.14 ²⁾ | 19.39±1.56 ²⁾ |
| | 32.0 | 30.81±1.92 ²⁾ | 40.77±1.21 ²⁾ | 26.28±2.10 ²⁾ |

白头翁皂苷A组Raji细胞中的细胞抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平下降 ($P<0.05, P<0.01$), 促凋亡蛋白Bax、cleaved PARP、cleaved Caspase-3蛋白表达水平显著增加 ($P<0.01$)。见表6、图1。

表6 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞Bcl-2、Bax、cleaved PARP、cleaved Caspase-3蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of pulsatilla saponin A on Bcl-2, Bax, cleaved PARP and cleaved Caspase-3 protein expressions of human Burkitt lymphoma cell Raji cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Bcl-2/GAPDH | Bax/GAPDH | cleaved PARP/GAPDH | cleaved Caspase-3/GAPDH |
|---------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 1.04±0.07 | 1.07±0.21 | 1.15±0.17 | 0.95±0.08 |
| 白头翁皂苷A组 | 32.0 | 0.20±0.06 ²⁾ | 2.46±0.22 ²⁾ | 4.20±0.24 ²⁾ | 1.83±0.09 ²⁾ |
| | 16.0 | 0.63±0.05 ²⁾ | 2.00±0.15 ²⁾ | 3.67±0.24 ²⁾ | 1.49±0.11 ²⁾ |
| | 8.0 | 0.87±0.04 ¹⁾ | 1.63±0.14 ²⁾ | 3.33±0.27 ²⁾ | 1.30±0.01 ²⁾ |

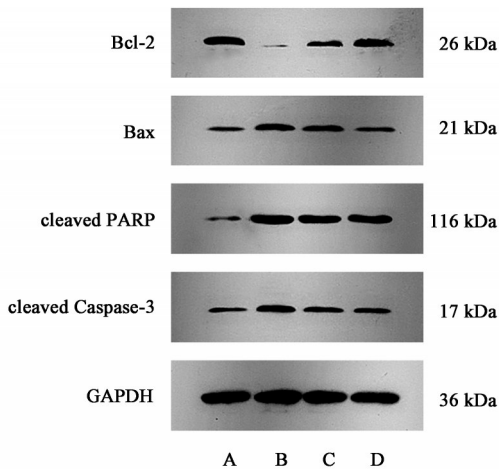
3.7 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞相关通路蛋白表达的影响 与空白组比较,白头翁皂苷A组

(32、16、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平下降 ($P<0.05, P<0.01$)。见表7、图2。

表7 白头翁皂苷A对人BL细胞Raji细胞JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of pulsatilla saponin A on JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 protein expressions of human Burkitt lymphoma cell Raji cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

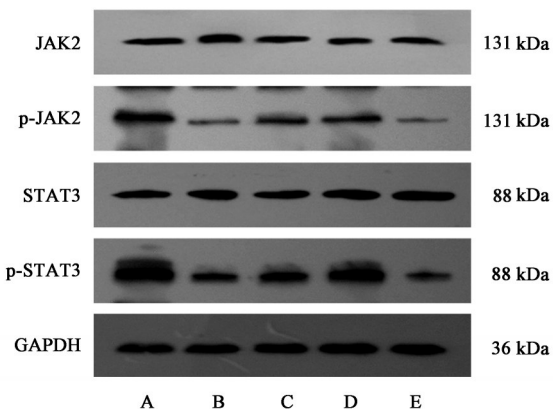
| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | JAK2/GAPDH | p-JAK2/GAPDH | STAT3/GAPDH | p-STAT3/GAPDH |
|----------|---------------------------------------|------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| 空白组 | | 1.08±0.08 | 1.05±0.07 | 1.05±0.07 | 1.07±0.07 |
| 白头翁皂苷A组 | 32.0 | 1.07±0.08 | 0.32±0.05 ²⁾ | 0.90±0.10 | 0.34±0.06 ²⁾ |
| | 16.0 | 1.16±0.07 | 0.55±0.09 ²⁾ | 0.94±0.05 | 0.51±0.06 ²⁾ |
| | 8.0 | 1.04±0.06 | 0.82±0.08 ¹⁾ | 1.13±0.06 | 0.69±0.12 ²⁾ |
| JAK2抑制剂组 | 6 | 1.05±0.25 | 0.11±0.06 ²⁾ | 1.03±0.03 | 0.20±0.05 ²⁾ |



注: A. 空白组; B-D. 白头翁皂苷 A 组 (32、16、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图1 各组细胞 Bcl-2、Bax、cleaved PARP、cleaved Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Bcl-2, Bax, cleaved PARP and cleaved Caspase-3 protein expressions in each group



注: A. 空白组; B-D. 白头翁皂苷 A 组 (32、16、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); E. JAK2 抑制剂组

图2 各组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 protein expressions in each group

4 讨论

在天然药物中开发高效低毒的新型靶向药物,以期降低高强度化疗的不良反应,增强治疗效果,为目前中药开发的热点^[17],结合经方应用的临床经验及基础研究的成果,筛选有效活性成分能够更好地挖掘高效新型靶点药物,白头翁皂苷 A 是具有潜力的抗肿瘤活性物质,如白头翁皂苷 A 可以通过调控 Bcl-2 等凋亡相关蛋白的表达促进多发性骨髓瘤细胞凋亡,通过提高并协同 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导肿瘤细胞凋亡^[18],通过对肿瘤细胞脱氧核糖核酸 (DNA) 损伤、引发 G₂ 期阻滞从而诱导细胞凋亡^[19],以实现抗肿瘤作用。

JAK 家族有 4 个成员,即 JAK1、JAK2、JAK3 和

酪氨酸激酶 2 (Tyk2), STAT 家族有 7 个成员,即 STAT1~STAT7。JAK 的 N 端结构域与受体相结合, C 端为激酶结构域。每种激酶成员与特异的细胞因子受体结合引起受体分子的二聚化, STAT 被 JAK 磷酸化后发生二聚化后,穿过核膜进入核内调节相关基因的表达,这条信号通路称为 JAK/STAT 途径^[20]。研究证实,在所有的 STAT 相关蛋白中, STAT3 在肿瘤中最常被激活。导致恶性肿瘤细胞中 STAT3 异常激活最常见的机制是细胞因子信号失调^[21],且已在多种实体和血液系统恶性肿瘤中被发现,如结肠癌、肺癌、前列腺癌^[22-24]。JAK2/STAT3 是目前治疗包括 BL 在内的高危复发难治淋巴瘤的潜在靶点之一。

本研究结果显示,白头翁皂苷 A 能够呈浓度-时间相关性的抑制 Raji 细胞的增殖,促进 Raji 细胞内 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的酶原活化,同时还能够显著下调 Raji 细胞内 Bcl-2 凋亡蛋白, JAK2、STAT3 蛋白磷酸化的表达水平,明显上调 Bax、cleaved PARP、cleaved Caspase-3 蛋白表达。细胞凋亡与周期实验结果显示,白头翁皂苷 A 可以促使 Raji 细胞凋亡,对 Raji 细胞 G₂ 期产生阻滞,进一步表明白头翁皂苷 A 抑制细胞增殖作用机制可能是通过抑制细胞内 JAK2、STAT3 信号通路中 JAK2、STAT3 磷酸化蛋白的活化,阻断了信号通路的传导,进而发挥诱导细胞凋亡的作用,初步阐明了白头翁皂苷 A 对 BL 细胞 Raji 细胞抗肿瘤的作用机制。

综上所述,本实验证实了白头翁皂苷 A 可以通过调控 JAK2/STAT3 信号通路对人 BL 细胞 Raji 细胞的增殖及凋亡发挥作用,为进一步挖掘白头翁及白头翁皂苷 A 用于 BL 的临床治疗提供了实验基础及新的思路。有利于临床进一步推广应用并验证其抗炎基础上的抗肿瘤双重作用。为经方指导疑难疾病临床治疗提供理论基础,更好发挥减毒增效的优势,提高患者生存质量,节约医疗成本。但本研究尚有一些不足之处,对于白头翁皂苷 A 在人 BL 细胞 Raji 细胞中凋亡与增殖的影响、调控 JAK2/STAT3 信号通路的研究还停留在体外实验阶段,在动物体内是否有效、与目前治疗药物是否具有协同作用、对于肿瘤免疫微环境的影响等进一步的深入研究及相关实验尚在进行中。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] STEFAN M, HANG Y, WANG R X, et al. Targeting

- Burkitt lymphoma with a tumor cell-specific heptamethine carbocyanine-cisplatin conjugate [J]. *Cancer*, 2019, 125(13):2222-2232.
- [2] EGAN G, GOLDMAN S, ALEXANDER S. Mature B-NHL in children, adolescents and young adults: Current therapeutic approach and emerging treatment strategies [J]. *Br J Haematol*, 2019, 185(6): 1071-1085.
- [3] DUMLEAVY K, LITTLE RF, WAYNE AS, et al. Good outcome of AIDS-related Burkitt lymphoma (BL) and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with abbreviated cycles of EPOCH-rituximab [J]. *Infectious Agents and Cancer*, 2009, 30(6): 1333-1343.
- [4] HOELZER D, WALEWSKI J, DOHNER H, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: Report of a large prospective multicenter trial [J]. *Blood*, 2014, 124(26):3870-3879.
- [5] CHEN X Q, LV X Y, LIU S J. Baitouweng decoction alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating intestinal microbiota and the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, S0378-8741(20)33241-33244.
- [6] 李鹏帆, 罗月, 顾思臻, 等. 基于网络药理学探讨白头翁汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28(7):527-532.
- [7] 缪志伟, 徐艳, 宁丽琴, 等. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎分子机制的网络药理学分析及初步验证 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(8):1808-1815.
- [8] YE W C, ZHANG Q W, HSIAO W W, et al. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(2):183-186.
- [9] HONG S W, JUNG K H, LEE H S, et al. SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(11):1929-1937.
- [10] SON M K, JUNG K H, HONG S W, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the Akt/mTOR signalling pathway [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1):26-33.
- [11] 周盈盈. 白头翁皂苷 A 诱导多发性骨髓瘤凋亡及分化的初步研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [12] 王彤. 白头翁皂苷 A 诱导急性髓系白血病细胞分化及其作用机制的初步研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [13] MADDOCKS K. Novel targets in aggressive lymphoma [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2020, 2020(1):101-106.
- [14] REILLEY M J, MCCOON P, COOK C, et al. STAT3 antisense oligonucleotide AZD9150 in a subset of patients with heavily pretreated lymphoma: Results of a phase 1b trial [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1):119.
- [15] BROOKS A J, PUTOCZKI T. JAK-STAT signalling pathway in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7): 1971.
- [16] BROOKS A J, WATERS M J. The growth hormone receptor: Mechanism of activation and clinical implications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010, 6(9): 515-525.
- [17] 白坤恬, 孙延庆, 董莉, 等. 秦巴晒菇提取物 FA-2-b- β 对伯基特淋巴瘤 Raji 细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, doi: 1004-5503(2020)10-1134-05.
- [18] XU L, CHENG G, LU Y, et al. An active molecule from *Pulsatilla chinensis*, *Pulsatilla* saponin A, induces apoptosis and inhibits tumor growth of human colon cancer cells without or with 5-FU [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):3799-3802.
- [19] 邹晓静, 郝燕燕, 白薇, 等. 白头翁皂苷 A 通过调控 miR-24-3p/RNF2 的表达影响乳腺癌细胞增殖及放射敏感性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(5): 865-870.
- [20] WARREN J, LEONARD. Role of Jak kinases and STATs in cytoline signal transduction [J]. *Inter J Hematol*, 2001, 73(3): 271-277.
- [21] YU H, PARDOLL D, JOVE R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11):798-809.
- [22] 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.
- [23] 黄智超, 李国峰, 郎一帆, 等. 中药诱导肺癌细胞凋亡机制的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23):226-236.
- [24] 王雨辰, 陈越, 季鸣. STAT3 靶点抑制剂 Bt354 抗前列腺癌作用及其分子机制研究 [J]. *药学学报*, 2019, 54(10):1851.

[责任编辑 张丰丰]