

# 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨荔枝核总黄酮对 HepG2 增殖、迁移与侵袭的影响

黎敏航<sup>1,2</sup>, 马晓聪<sup>1</sup>, 唐燕<sup>1,2</sup>, 梁瀚云<sup>1,2</sup>, 罗伟生<sup>1\*</sup>, 黄旭平<sup>3</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001;

2. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 南宁 530001;

3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的:观察荔枝核总黄酮(TFL)对人肝癌细胞 HepG2 株增殖、凋亡、迁移与侵袭的影响。方法:噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度 TFL 及顺铂对 HepG2 细胞增殖的影响;TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测低、中、高质量浓度 TFL(70、140、210 mg·L<sup>-1</sup>)及顺铂(60 mg·L<sup>-1</sup>)对 HepG2 细胞凋亡的影响,并选择 TFL 最优浓度进行后续实验。将细胞分为空白组、TFL 组(140 mg·L<sup>-1</sup>)、TFL+XL019 组(140 mg·L<sup>-1</sup>+0.5 μmol·L<sup>-1</sup>)、TFL+TPI-1 组(140 mg·L<sup>-1</sup>+1 μmol·L<sup>-1</sup>),进行细胞划痕实验和小室侵袭实验以验证 TFL 对 HepG2 迁移和侵袭的影响;使用细胞免疫荧光技术检测 TFL 对 HepG2 细胞上皮间充质转化(EMT)标记物表达的影响;使用蛋白免疫印迹法(Western blot)对 TFL 干预后细胞内的酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)/信号传导及转录激活因子 3(STAT3)信号通路上关键蛋白的表达情况进行检测。结果:MTT 比色法表明,与空白组比较,在 24、48 h 时,各质量浓度的 TFL 与顺铂均能显著抑制 HepG2 细胞增殖( $P<0.01$ ),24、48 h 时 TFL 对 HepG2 的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(136.7±2.40)、(106.8±1.11)mg·L<sup>-1</sup>,24、48 h 时顺铂对 HepG2 的 IC<sub>50</sub>分别为(58.48±2.04)、(5.15±0.56)mg·L<sup>-1</sup>。TUNEL 法发现各质量浓度 TFL 均可以诱导 HepG2 细胞凋亡,由此结果确定 TFL 140 mg·L<sup>-1</sup> 为最佳质量浓度。细胞划痕实验表明,与空白组比较,TFL 组、TFL+XL019 组、TFL+TPI-1 组均明显抑制 HepG2 细胞的迁移能力( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),与 TFL 组比较,TFL+XL019 组的抑制作用明显增强( $P<0.05$ ),TFL+TPI-1 组的抑制作用显著减弱( $P<0.01$ )。小室侵袭实验表明,与空白组比较,TFL 组、TFL+XL019 组、TFL+TPI-1 组干预都显著抑制了 HepG2 细胞的侵袭能力( $P<0.01$ ),与 TFL 组比较,TFL+XL019 组的抑制作用明显增强( $P<0.05$ ),TFL+TPI-1 组的抑制作用则显著减弱( $P<0.01$ )。荧光免疫结果表明,TFL 的干预上调 HepG2 细胞上皮-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达,同时下调波形蛋白(Vimentin)的表达,这种作用在 TFL+XL019 组中更强,在 TFL+TPI-1 组中则有所减弱;Western blot 结果表明,与空白组比较,TFL 组、TFL+XL019 组、TFL+TPI-1 组并未影响 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达水平,但是明显降低磷酸化(p)-JAK2 与 p-STAT3 表达水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),与 TFL 组比较,TFL+XL019 组中的 p-JAK2 与 p-STAT3 的表达水平显著降低( $P<0.01$ ),TFL+TPI-1 组中 p-JAK2 与 p-STAT3 的表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与空白组比较,TFL 组显著增加了含 sh2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶-1(SHP-1)表达水平( $P<0.01$ )。结论:TFL 可以抑制 HepG2 的增殖,促进其凋亡,还可以通过逆转 HepG2 细胞 EMT 的过程以减弱其迁移与侵袭的能力,这些作用可能与 TFL 激活 SHP-1 阻断 JAK/STAT3 信号通路相关。

**[关键词]** 荔枝核总黄酮; 酪氨酸蛋白激酶 2/信号传导及转录激活因子 3(JAK2/STAT3)信号通路; 侵袭; 迁移; HepG2; 细胞上皮间充质转化(EMT)

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0085-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221522

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220524.1957.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-05-25 11:04

## Effect of Total Flavone of Litchi Semen on Proliferation, Migration, and Invasion of HepG2 Cells Based on JAK2/STAT3 Signaling Pathway

LI Minhang<sup>1,2</sup>, MA Xiacong<sup>1</sup>, TANG Yan<sup>1,2</sup>, LIANG Jingyun<sup>1,2</sup>, LUO Weisheng<sup>1\*</sup>, HUANG Xuping<sup>3</sup>

**[收稿日期]** 2022-01-08

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82160834);广西一流学科建设项目(2019XK136)

**[第一作者]** 黎敏航,在读硕士,从事中西医结合基础研究,E-mail:412276802@qq.com

**[通信作者]** \*罗伟生,博士,教授,从事中西医结合治疗脾胃肝病研究,E-mail:4011188@qq.com

- (1. *Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;*
2. *Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China;*
3. *Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)*

**[Abstract] Objective:** To study the effect of total flavone of Litchi Semen (TFL) on proliferation, apoptosis, migration, and invasion of hepatoma cells HepG2. **Method:** Methyl thiazolyl tetrazolium colorimetric (MTT) assay was used to detect the effect of different-dose TFL and cisplatin on the proliferation of HepG2 cells. TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used to detect the effects of low, medium, and high-dose (70, 140, 210 mg·L<sup>-1</sup>) of TFL and cisplatin (60 mg·L<sup>-1</sup>) on the apoptosis of HepG2 cells, thus selecting the optimal dose of TFL for the follow-up experiment. HepG2 cells were divided into a blank group, a TFL group (140 mg·L<sup>-1</sup>), a TFL+XL019 group (140 mg·L<sup>-1</sup> TFL+0.5 μmol·L<sup>-1</sup> XL019), and a TFL+TPI-1 group (140 mg·L<sup>-1</sup> TFL+1 μmol·L<sup>-1</sup> TPI-1). The effect of TFL on migration and invasion of HepG2 cells were examined by wound healing test and Transwell invasion assay, and the effect of TFL on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker in HepG2 cells were examined by cell immunofluorescence assay. Western blot was used to detect the expression of key proteins in Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway after the intervention by TFL. **Result:** MTT assay showed that the proliferation of HepG2 cells was significantly inhibited by TFL and cisplatin at 24 and 48 h as compared with blank group ( $P<0.01$ ), and the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of TFL on HepG2 cells was (136.7±2.40) mg·L<sup>-1</sup> at 24 h and (106.8±1.11) mg·L<sup>-1</sup> at 48 h. The IC<sub>50</sub> of cisplatin on HepG2 cells was (58.48±2.04) mg·L<sup>-1</sup> at 24 h and (5.15±0.56) mg·L<sup>-1</sup> at 48 h. The results of TUNEL assay showed that TFL induced apoptosis of HepG2 cells. The optimal dose of TFL was 140 mg·L<sup>-1</sup>. The results of wound healing test showed that compared with the blank group, the TFL group, TFL+XL019 group, and the TFL+TPI-1 group significantly inhibited the migration of HepG2 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). As compared with the TFL group, the inhibitory effect of the TFL+XL019 Group was significantly increased ( $P<0.05$ ), while that of the TFL+TPI-1 group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The Transwell invasion assay showed that compared with the blank group, the TFL group, TFL+XL019 group, and the TFL+TPI-1 group significantly inhibited the invasion of HepG2 cells ( $P<0.01$ ). As compared with the TFL group, the inhibitory effect of the TFL+XL019 group was significantly increased ( $P<0.05$ ), while that of the TFL+TPI-1 group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The results of immunofluorescence showed the intervention of TFL up-regulated the expression of E-cadherin, and down-regulated the expression of Vimentin in HepG2 cells, which was stronger in the TFL+XL019 group and weaker in the TFL+TPI-1 group. The results of Western blot showed that compared with the blank group, the TFL group, TFL+XL019 group, and the TFL+TPI-1 group did not affect the expression of JAK2 or STAT3 protein, but significantly decreased the expression levels of phosphorylated (p)-JAK2 and p-STAT3 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). As compared with the TFL group, the expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 in the TFL+XL019 group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), while those in the TFL+TPI-1 group were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the blank group, the TFL group significantly increased the expression level of Src-homology domain 2 containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) with sh2 domain ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** TFL has the effects of inhibiting the proliferation, promoting apoptosis of HepG2 cells, and reversing the EMT process of HepG2 cells to reduce the migration and invasion, which are presumably related to the activation of SHP-1 by TFL to block JAK/STAT3 signaling pathway.

**[Keywords]** total flavone of Litchi Semen; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway; invasion; migration; HepG2; epithelial-mesenchymal transition(EMT)

原发性肝癌(PLC)指起源于肝细胞及肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,根据 GLOBOCAN 2020 的报告,2020年中国的肝癌发病人数及肝癌死亡人数分别为 410 038 人与 391 152 人,严重威胁人民的生命健康。在放、化疗不良反应大,靶向治疗昂贵的情况下,从现有中医中药资源中寻找肝癌治疗的分子靶点和靶向治疗药物具有重要现实意义。荔枝核为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* 的成熟种子,性甘温微苦,归肝、肾经,能行气散结,祛寒止痛,研究表明其粗提物具有抗肿瘤作用<sup>[1-2]</sup>,其主要活性成分是黄酮及皂苷等<sup>[3]</sup>。本课题组前期对荔枝核总黄酮(TFL)开展的研究表明其是治疗肝纤维化的有效药物<sup>[4-6]</sup>,能通过调控 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)促进肝星状细胞凋亡,并对肝星状细胞内的基质金属蛋白酶(MMPs)及金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)的表达进行调控,调节肝脏内细胞外基质(ECM)的生成与降解。研究表明 MMPs 是癌细胞分解 ECM 并进行远处转移的基础<sup>[7]</sup>,故 TFL 可能对肝癌细胞具有调控凋亡及抑制迁移、侵袭等作用。从中医观点看,由肝纤维化发展到肝癌,是由气滞为主进展为气滞血瘀,发为癥积的过程,荔枝核行气散结之功切合其气滞血瘀之病机,故为扩大 TFL 的临床应用范围,本研究拟观察 TFL 对人肝癌细胞株 HepG2 在增殖、迁移、侵袭等方面的影响,探讨 TFL 的抗肝癌作用,以期能为 TFL 治疗肝癌的研究提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** HepG2 细胞(中国科学院昆明细胞库,编号 KCB200507YJ),传至第 5 代。

**1.2 试剂** TFL 由广西中医药大学药学院提供,其原料荔枝核购于南宁市万药堂药物有限公司,经广西中医药大学药学教授韦松基鉴定为无患子科植物荔枝属荔枝 *Litchi chinensis* 的干燥成熟种子。提取 TFL 参照冯宇等<sup>[8]</sup>的方法,获得 TFL 质量分数为 50%。顺铂(美国 Sigma 公司,批号 MKCM2345),胎牛血清、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 10091-148、11965-092),噻唑蓝(MTT)试剂盒(北京索莱宝公司,批号 M8180),TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(北京碧云天公司,批号 C1086),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(博士德公司,批号 BA1054),Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(Proteintech 公司,批号 SA00009-1),FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗

(Biosharp 公司,批号 BL033A),E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、波形蛋白(Vimentin)抗体、非受体型酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)抗体、信号传导及转录激活因子 3(STAT3)抗体、磷酸化 JAK2(p-JAK2)抗体、磷酸化 STAT3(p-STAT3)抗体、含 sh2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶-1(SHP-1)抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 Ab270257、Ab92547、Ab108596、Ab68153、Ab195055、Ab76315、Ab32559、Ab8226),JAK 抑制剂 XL019、SHP-1 抑制剂 TPI-1(美国 MedChemExpress 公司,批号分别为 HY-13775、HY-100463),结晶紫染色液(索莱宝公司,批号 cat G1063),胶原包被 Transwell 侵袭小室(美国康宁公司,批号 Cat.354483)。

**1.3 仪器** HERAcell 150i 型三气培养箱, Multiskan FC 型酶标仪(美国赛默飞公司),AI6000 型超灵敏多功能成像仪(美国通用公司),IX71 型荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra 型电泳仪、PowerPac<sup>™</sup> 型通用电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司);SPJ-1000A 型 Pyxis 蛋白凝胶处理系统(南京思普金生物技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 荔枝核总黄酮药物准备** 称取荔枝核总黄酮粉末 20 mg,完全溶解于二甲基亚砜 125  $\mu$ L 和培养基 24 875  $\mu$ L,配成 TFL 质量浓度为 800  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的母液,用含 10% 胎牛血清的培养基稀释母液至所需浓度使用。

**2.2 细胞培养** HepG2 细胞常规培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

**2.3 MTT 比色法测定 TFL 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用** 取对数生长期 HepG2 细胞,调整密度为  $5\times 10^5$  个/mL,每孔接种 100  $\mu$ L,培养过夜后加入 TFL (80、120、160、200、240  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )或顺铂 ( $1\sim 128$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )200  $\mu$ L,继续培养 24、48 h。弃去液体后每孔加入 DMEM 180  $\mu$ L 及 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu$ L,避光培养 4 h,弃去液体后加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L,摇匀后酶标仪测定吸光度  $A$ 。计算细胞活力,根据各药物组细胞活力绘制量效曲线,分别计算 TFL 和顺铂不同干预时间对 HepG2 细胞的半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。细胞活力= $(A_{\text{用药物组}}-A_{\text{调零}})/(A_{\text{空白组}}-A_{\text{调零}})\times 100\%$ 。

**2.4 TUNEL 法检测 TFL 促进 HepG2 细胞凋亡** 基于 2.3 项下结果设空白组、顺铂组(顺铂 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、

TFL 低浓度组 ( $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TFL 中浓度组 ( $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TFL 高浓度组 ( $210 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )，各组细胞分别制作细胞爬片，给药干预 24、48 h，磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤，4% 多聚甲醛固定 30 min，加入含 0.3% Triton X-100 PBS，室温孵育 5 min，配制适量 TUNEL 检测液，充分混匀后在样品中加入  $50 \mu\text{L}$ ， $37^\circ\text{C}$  避光孵育 60 min，荧光显微镜下观察。

**2.5 细胞划痕法测定 TFL 减弱 HepG2 细胞的迁移作用** 细胞分组为空白组、TFL 组 ( $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TFL+XL019 组 ( $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、TFL+TPI-1 组 ( $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，取密度  $2\times 10^6$  个/mL 的 HepG2 细胞悬液，每孔 1 mL 接种于 6 孔板中，细胞长满后用  $100 \mu\text{L}$  枪头从培养皿中间划痕，冲净掉落细胞后，加入不同处理条件的培养基。在 0、24 h 时用倒置显微镜进行拍照记录。

**2.6 小室侵袭实验测定 TFL 减弱 HepG2 的侵袭作用** 分组及加药同 2.5 项，细胞经过饥饿处理后，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞离心后用培养基重悬，计数后分别向 Transwell 小室中加入细胞悬液  $100 \mu\text{L}$ ，细胞数量约为  $8\times 10^4$  个/孔，各组小室内分别加入不同药物  $100 \mu\text{L}$  进行干预，使小室中的药物终浓度与其分组浓度相等，向 24 孔板中各加入含血清培养基  $800 \mu\text{L}$ ，将装有 Transwell 小室的 24 孔板置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中继续培养 24 h，弃去培养基，小室浸泡于 4% 多聚甲醛中室温固定 30 min；PBS 洗涤，将其浸泡于 0.025% 结晶紫染色液中染色 20 min；用超纯水清洗 3 次，润湿棉签擦拭去 Transwell 小室中上室的细胞。在通风橱中晾干后，用倒置显微镜观察穿过 Transwell 小室的位于小室底部的细胞，并拍照记录。

**2.7 细胞免疫荧光检测细胞上皮间充质转化 (EMT) 的标记物的表达** 分组及加药同 2.5 项，细胞爬片后，4% 多聚甲醛室温固定 20 min，0.2% Triton X-100 完全覆盖细胞后透化 15~20 min，3% BSA 封闭 1 h，在爬片上滴加相应的稀释后一抗 ( $1:500$ )， $4^\circ\text{C}$  孵育过夜，PBS 清洗后滴加 3% BSA 抗体稀释液稀释的二抗，室温避光孵育 1 h，PBS 清洗爬片 3~5 次，4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色 5~10 min 后 PBS 溶液清洗细胞爬片 1~2 次，滴加防荧光猝灭剂，荧光显微镜拍照。

**2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 SHP-1、JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达** 分组及加药同 2.5 项，各组细胞在 6 孔板中经过不同的条件处理后，加入含蛋白酶抑制剂及蛋白磷酸酶抑制剂的裂解液  $300 \mu\text{L}$  在冰上裂解，15 min 后提取蛋白，使用

蛋白定量法 (BCA) 测定蛋白浓度。取适量样品原液与  $4\times$  上样缓冲液混合， $95^\circ\text{C}$  水浴 5 min 使蛋白充分变性，进行电泳，转膜，使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入一抗 ( $1:1000$ )， $4^\circ\text{C}$  孵育过夜，加入二抗 ( $1:5000$ )，孵育后显影，记录条带信息，使用 Image J 软件进行灰度值分析。目标蛋白相对表达量 = 目标蛋白灰度值 /  $\beta$ -actin 灰度值。

**2.9 统计学分析** 所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示，检验方法采用单因素 ANOVA 分析，方差不齐者采用秩和检验，以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 TFL 对 HepG2 细胞的增殖抑制的影响** 与空白组比较，在 24、48 h 时，各浓度 TFL 均能显著抑制 HepG2 细胞增殖 ( $P < 0.01$ )，作用时间相同时，随着 TFL 浓度的增加，对细胞的增殖抑制率增加，呈浓度和时间依赖性；24 h 时 TFL 对 HepG2 的  $\text{IC}_{50}$  为 ( $136.7 \pm 2.40$ )  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，48 h 时的  $\text{IC}_{50}$  为 ( $106.8 \pm 1.11$ )  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。顺铂  $0\sim 128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  干预细胞 24、48 h，与空白组比较， $4\sim 128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  顺铂显著抑制 HepG2 细胞增殖 ( $P < 0.01$ )。顺铂作用 24、48 h，对 HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 ( $58.48 \pm 2.04$ )、( $5.15 \pm 0.56$ )  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据细胞增殖实验结果选定顺铂组作用质量浓度  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ；TFL 组低、中、高质量浓度为 70、140、210  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 TFL 和顺铂干预 24、48 h 对 HepG2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

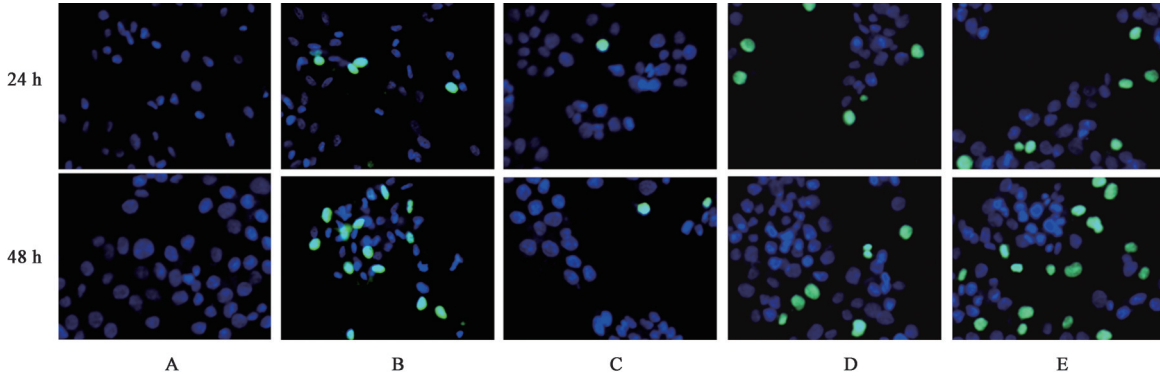
Table 1 Cell viability of HepG2 cells after 24 h or 48 h treatment by TFL or cisplatin ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	干预 24 h 细胞活力	干预 48 h 细胞活力
TFL 组	80	$75.98 \pm 1.78^{(1)}$	$70.68 \pm 1.48^{(1)}$
	120	$66.19 \pm 2.43^{(1)}$	$40.01 \pm 2.72^{(1)}$
	160	$37.49 \pm 1.84^{(1)}$	$21.72 \pm 0.89^{(1)}$
	200	$23.45 \pm 3.01^{(1)}$	$19.15 \pm 2.59^{(1)}$
	240	$12.92 \pm 2.87^{(1)}$	$15.79 \pm 1.74^{(1)}$
顺铂组	1	$100.61 \pm 3.83$	$85.69 \pm 7.86^{(1)}$
	2	$95.05 \pm 3.14$	$73.12 \pm 5.35^{(1)}$
	4	$87.07 \pm 3.99^{(1)}$	$52.62 \pm 1.46^{(1)}$
	8	$72.94 \pm 5.86^{(1)}$	$34.10 \pm 7.40^{(1)}$
	16	$68.33 \pm 7.48^{(1)}$	$24.47 \pm 3.27^{(1)}$
	32	$66.86 \pm 6.77^{(1)}$	$21.84 \pm 2.86^{(1)}$
	64	$51.51 \pm 2.13^{(1)}$	$14.81 \pm 8.15^{(1)}$
128	$32.91 \pm 5.19^{(1)}$	-	

注：设空白组 24、48 h 细胞活力为 100.00%；与空白组比较  $^{(1)} P < 0.01$

**3.2 TFL对HepG2细胞凋亡的影响** 与空白组比较, HepG2细胞经TFL处理24、48 h, 顺铂及TFL(70、140、210 mg·L<sup>-1</sup>)明显诱导了HepG2细胞的凋

亡, 48 h时作用更明显。根据细胞增殖及凋亡实验结果, 选择TFL(140 mg·L<sup>-1</sup>)作用24 h作为后续实验的干预方式。见图1。



注: A.空白组; B.顺铂组(60 mg·L<sup>-1</sup>); C~E.TFL组(70、140、210 mg·L<sup>-1</sup>)

图1 TFL对HepG2细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 1 Effort of TFL on apoptosis of HepG2 (TUNEL, ×400)

**3.3 TFL对HepG2细胞迁移、侵袭作用的影响** 与空白组比较, TFL组、TFL+XL019组、TFL+TPI-1组都明显抑制了HepG2细胞的迁移能力( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 与TFL组比较, TFL+XL019组的抑制作用明显增强( $P < 0.05$ ), TFL+TPI-1组的抑制作用显著减弱( $P < 0.01$ )。见表2、图2。

表2 TFL及各抑制剂干预24 h对HepG2细胞迁移的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

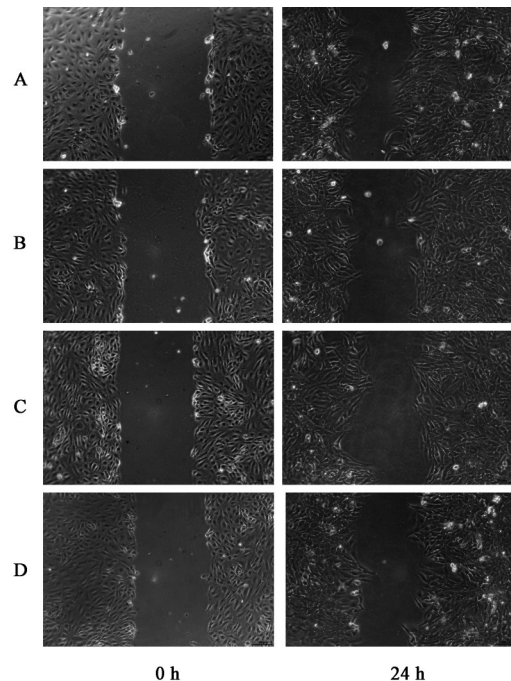
Table 2 Effect of TFL and all inhibitor on migration of HepG2 cells after 24 h treatment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	浓度	细胞迁移率/%
空白组		62.33±7.50
TFL组	140 mg·L <sup>-1</sup>	30.33±2.08 <sup>1)</sup>
TFL+XL019组	140 mg·L <sup>-1</sup> +0.5 μmol·L <sup>-1</sup>	21.34±3.05 <sup>2、3)</sup>
TFL+TPI-1组	140 mg·L <sup>-1</sup> +1 μmol·L <sup>-1</sup>	50.67±2.51 <sup>2、4)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与TFL组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表3同)

与空白组比较, TFL组、TFL+XL019组、TFL+TPI-1组都显著抑制了HepG2细胞的侵袭能力( $P < 0.01$ ), 而与TFL组比较, TFL+XL019组的抑制作用明显增强( $P < 0.05$ ), 而TFL+TPI-1组的抑制作用则显著减弱( $P < 0.01$ )。见图3、表3。

**3.4 TFL对HepG2细胞上皮间质转化的影响** 与空白组比较, TFL处理后, 代表上皮样标记物E-Cadherin的绿色荧光增多, 代表细胞间质样标记物Vimentin的红色荧光减少; TFL+XL019组的效果更加明显, 加入TPI-1后则能减弱这种作用, Merge结果中, 空白组与TFL+TPI-1组的细胞质中主要表



注: A.空白组; B.TFL组(140 mg·L<sup>-1</sup>); C.TFL+XL019组(140 mg·L<sup>-1</sup>+0.5 μmol·L<sup>-1</sup>); D.TFL+TPI-1组(140 mg·L<sup>-1</sup>+1 μmol·L<sup>-1</sup>)(图3-图5同)

图2 TFL及各抑制剂干预24 h对HepG2细胞迁移的影响(倒置显微镜, ×200)

Fig. 2 Effect of TFL and all inhibitor on migration of HepG2 cells after 24 h treatment (inverted microscope, ×200)

达Vimentin, TFL组与TFL+XL019组细胞质中主要表达E-cadherin。见图4。

**3.5 TFL对STAT-3信号通路的激活的影响** 与空白组比较, TFL组、TFL+XL019组、TFL+TPI-1组p-JAK2表达明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), p-STAT3表达显著降低( $P < 0.01$ ), TFL组SHP-1表达显著增加

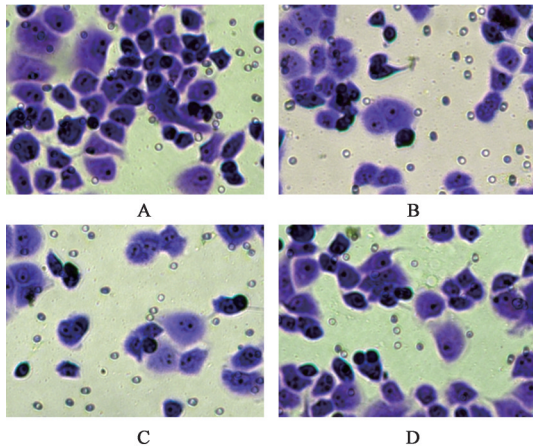


图3 TFL及各抑制剂干预24 h对HepG2细胞侵袭能力的影响(结晶紫, ×200)

Fig. 3 Effect of TFL and inhibitor on invasion of HepG2 cells after 24 h treatment (crystal violet, ×200)

表3 TFL及各抑制剂干预24 h对HepG2细胞侵袭能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of TFL and inhibitor on invasion of HepG2 cells after 24 h treatment ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	侵袭细胞数/个
空白组		100±9
TFL组	140 mg·L <sup>-1</sup>	43±4 <sup>2)</sup>
TFL+XL019组	140 mg·L <sup>-1</sup> +0.5 μmol·L <sup>-1</sup>	31±3 <sup>2,3)</sup>
TFL+TPI-1组	140 mg·L <sup>-1</sup> +1 μmol·L <sup>-1</sup>	78±7 <sup>2,4)</sup>

( $P<0.01$ ); 与TFL组比较, TFL+XL019组 p-JAK2与 p-STAT3 表达显著降低 ( $P<0.01$ ), TFL+TPI-1组 p-JAK2与 p-STAT3 表达水平显著升高 ( $P<0.01$ )。见表4、图5。

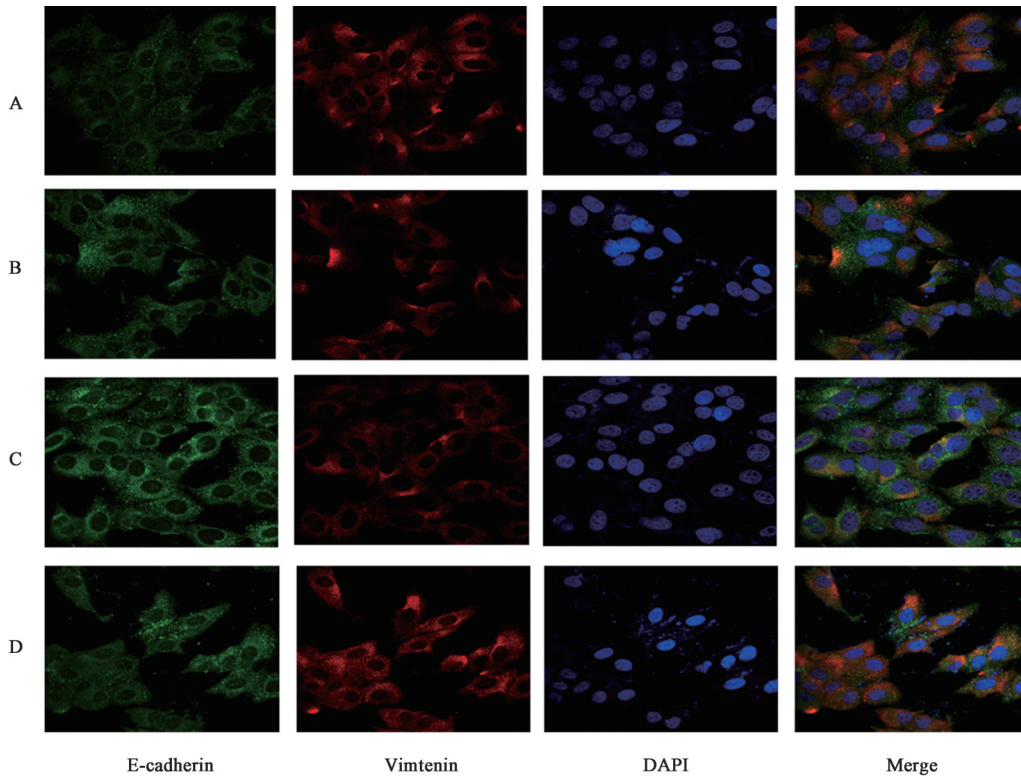


图4 TFL及各抑制剂对E-Cadherin和Vimentin表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of TFL and inhibitor on E-cadherin and Vimentin (immunofluorescence, ×400)

表4 TFL及各抑制剂对HepG2细胞JAK2/STAT3通路相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of TFL and inhibitor on JAK2/STAT3 signal pathway-associated protein in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	JAK2/β-actin	p-JAK2/β-actin	STAT3/β-actin	p-STAT3/β-actin	SHP-1/β-actin
空白组		1.02±0.03	1.00±0.04	1.00±0.73	0.97±0.04	1.00±0.05
TFL组	140 mg·L <sup>-1</sup>	0.98±0.40	0.50±0.05 <sup>2)</sup>	0.98±0.03	0.52±0.03 <sup>2)</sup>	2.01±0.06 <sup>2)</sup>
TFL+XL019组	140 mg·L <sup>-1</sup> +0.5 μmol·L <sup>-1</sup>	0.80±0.05	0.24±0.03 <sup>2,3)</sup>	0.78±0.03	0.28±0.03 <sup>2,3)</sup>	1.66±0.10 <sup>2,3)</sup>
TFL+TPI-1组	140 mg·L <sup>-1</sup> +1 μmol·L <sup>-1</sup>	0.94±0.09	0.82±0.06 <sup>1,3)</sup>	0.95±0.06	0.80±0.04 <sup>2,3)</sup>	1.16±0.09 <sup>1,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与TFL组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$

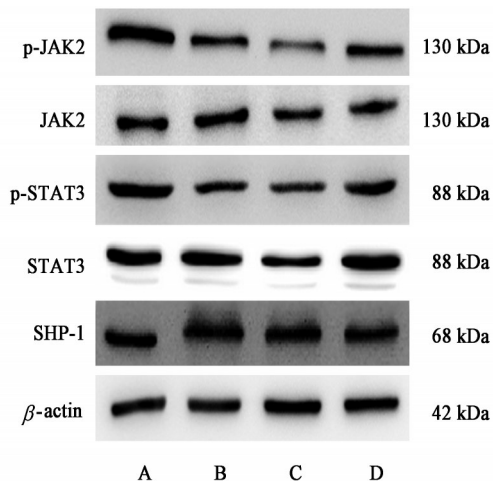


图5 各组 SHP-1、p-JAK2、JAK2、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of SHP-1, p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3 protein expression in all groups

#### 4 讨论

据 GLOBOCAN2020 报告,我国 2020 年肝癌死亡人数约占世界肝癌死亡人数的一半。肝癌可由多种肝病发展而来,起病隐匿,患者症状明显时疾病已接近中晚期,错失手术时机;药物治疗不良反应大,效率不高,所以寻找治疗肝癌的新药物具有重要的现实意义。故本研究通过使用 TFL 体外干预人肝癌 HepG2 细胞株,基于 JAK2/STAT3 信号通路抗癌作用可能的作用机制。

JAK2/STAT3 信号通路参与调节多种癌细胞的增殖和凋亡的过程<sup>[9]</sup>,许多研究表明其激活后能促进下游的细胞周期相关蛋白、细胞凋亡抑制因子(Survivin)、抗凋亡蛋白等表达上调,使得癌细胞能抵抗免疫细胞诱导的凋亡,STAT3 是肿瘤存活和生长的重要因子<sup>[10]</sup>。JAK2 激酶是一种细胞内的酪氨酸激酶,能直接磷酸化 STAT3,活化的 STAT3 发生同源二聚体化并转入核内与 DNA 结合,上调相关靶基因表达,参与肿瘤细胞增殖、转移等活动<sup>[11]</sup>。这使得 STAT3 成为抗肿瘤药物发挥作用的关键靶点,如 LIU 等<sup>[12]</sup>发现阿帕替尼抑制骨肉瘤细胞中 STAT3 磷酸化使其失活的同时,下调 STAT3 下游抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,并提高 Bax、活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved PARP)的表达量,促进癌细胞凋亡;BAI 等<sup>[13]</sup>合成出的小分子物质 SD-36 可以通过特异性结合降解 STAT3,还能抑制其磷酸化,促进癌细胞凋亡,从而在体内外发挥抑癌作用。本研究的 MTT 比色法结果显示 TFL 在较低的浓度时即对 HepG2 细胞的增殖起到抑制作用,TUNEL 结果表明

TFL 使得 HepG2 细胞发生凋亡,结合 Western blot 结果,TFL 干预显著降低了 STAT3 与 JAK2 的磷酸化水平,说明可能是细胞内 JAK2/STAT3 信号通路遭到抑制引起癌细胞的增殖抑制与凋亡,与上述研究结果相符,可认为 TFL 对 HepG2 细胞的作用可能是由 JAK2/STAT3 信号通路介导的。但本研究尚缺乏更进一步的证据说明 TFL 如何诱导 HepG2 细胞的凋亡。

肿瘤的转移能力是评估肿瘤恶性程度的一个重要指标,癌细胞通过 EMT 过程可向远处转移,在此过程中癌细胞间的紧密连接、粘连接、桥粒等结构丧失,细胞也失去与细胞外基质的极性,从而变成单个细胞,获得运动能力<sup>[14]</sup>,故 EMT 是肿瘤细胞发生迁移与侵袭的重要前提,此过程中癌细胞的上皮标志物如 E-cadherin 表达会减少而间充质标志物如 Vimentin 表达增加<sup>[15-16]</sup>,本研究表明 TFL 干预后,HepG2 细胞质中 E-cadherin 增加而 Vimentin 的表达减少,说明 TFL 逆转了 HepG2 细胞的 EMT 转化,而细胞划痕及小室侵袭实验的结果表明 TFL 干预后 HepG2 细胞的迁移与侵袭能力下降,说明 TFL 可以通过逆转 HepG2 细胞的 EMT 状态,从而抑制其恶性活动。有研究表明 p-STAT3 通过 Slug 蛋白介导癌细胞表面 E-cadherin 和 Vimentin 的调节从而促进 EMT,引起癌细胞的转移,这种过程广泛发生在各种癌细胞中<sup>[17-18]</sup>,SHEN 等<sup>[19]</sup>使用抑制剂对顺铂耐药性肺癌癌株的 JAK2/STAT3 信号通路进行干预后,显著抑制其 EMT 及远处转移。SHP-1 是含 sh2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶,其中 sh2 结构域是 JAK2 蛋白辅助 STAT 家族蛋白磷酸化时所必需的结构域,SHP-1 是对 JAK2/STAT3 信号通路的激活(磷酸化)进行负反馈调节的重要蛋白质,可以通过 sh2 结构域对 JAK2 激酶及 STAT3 蛋白去磷酸化<sup>[20]</sup>,这使得其成为治疗肿瘤的有效靶点,如首个被批准用于治疗肝癌的分子靶向药物索拉非尼即通过靶向 SHP-1 抑制 JAK2/STAT3 信号通路活化从而发挥抗癌作用<sup>[21]</sup>。本研究发现 TFL 的干预增加了 SHP-1 表达,同时降低了 JAK2、STAT3 磷酸化水平,在联合应用 JAK2 抑制剂后,这 2 个磷酸化蛋白的表达量进一步降低,TFL+TPI-1 组观察到这种作用被逆转,说明 TFL 是通过 SHP-1 参与了 JAK2/STAT3 信号通路的调控。结合小室侵袭实验结果,在加入 JAK 抑制剂后侵袭作用被进一步抑制;使用 TPI-1 阻断了 SHP-1 作用,癌细胞侵袭能力部分恢复。综上可以认为 TFL 能逆转 HepG2 细胞的 EMT 过程以减弱其迁移与侵袭能力,这与 TFL 上调 SHP-1,抑制细胞内

JAK2/STAT3 信号通路的激活有关。

TPI-1 是一种高效的 SHP-1 抑制剂,其作用的特点是特异性与 SHP-1 结合,从而增加 SHP-1 磷酸底物的含量<sup>[22]</sup>,在本研究中,TPI-1 与 p-JAK2、p-STAT3 竞争性结合 SHP-1,从而减弱了 SHP-1 对 JAK2/STAT3 信号通路的调控作用。从 TPI-1 发挥作用的机制上看,其并不会影响 SHP-1 的表达,但是本研究中 TPI-1 的加入抑制了 TFL 对 SHP-1 的促进作用,其中的原因还需要进一步探究。

综上所述,本研究表明 TFL 能通过调节 SHP-1 的表达,参与 JAK2/STAT3 信号通路的调控,起到抑制 HepG2 细胞增殖,促进其凋亡;逆转 EMT 过程以减弱其迁移与侵袭活动的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 张楠,周志昆,张凌云,等. 荔枝核与龙眼核水提取物的体外抗肿瘤活性的比较与评估[J]. 湖南中医杂志,2012,28(3):133-135.
- [2] 肖柳英,张丹,冯昭明,等. 荔枝核对小鼠抗肿瘤作用研究[J]. 中药材,2004,27(7):517-518.
- [3] 陈剑梅,郭洁文,徐峰. 荔枝核活性成分提取及药理作用的研究进展[J]. 今日药学,2011,21(11):710-712,720.
- [4] 罗伟生,靳雅玲,欧士钰,等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝细胞 Bcl-2/Bax 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(18):1602-1608.
- [5] 黄红,康毅,黄旭平,等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 Smad3、Smad4 及 TIMP-1 信号表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(2):176-186.
- [6] 欧士钰,罗伟生,靳雅玲,等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):209-213.
- [7] LV Y, ZHAO X, ZHU L, et al. Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis [J]. Theranostics, 2018, 8 (10) : 2830-2845.
- [8] 冯宇,刘雪梅,罗伟生,等. 大孔树脂纯化荔枝核总黄酮工艺研究[J]. 中草药,2019,50(9):2087-2093.
- [9] HU X, JIAO F, ZHANG L, et al. Dihydrotanshinone inhibits hepatocellular carcinoma by suppressing the JAK2/STAT3 pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, doi:10.3389/fphar.2021.654986.
- [10] LEE H, JEONG A J, YE S K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy[J]. BMB Rep, 2019,52(7):415-423.
- [11] HUYNH J, CHAND A, GOUGH D, et al.

Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map[J]. Nat Rev Cancer, 2019,19(2):82-96.

- [12] LIU K, REN T, HUANG Y, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2017,8(8):e3015.
- [13] BAI L, ZHOU H, XU R, et al. A potent and selective small-molecule degrader of STAT3 achieves complete tumor regression *in vivo* [J]. Cancer Cell, 2019, 36 (5):498-511.
- [14] YEUNG K T, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Mol Oncol,2017,11 (1):28-39.
- [15] FAN X, JIN S, LI Y, et al. Genetic and epigenetic regulation of E-cadherin signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2019,doi:10.2147/CMAR.S225606.
- [16] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. Cell Mol Life Sci,2011,68(18):3033-3046.
- [17] ROKAVEC M, ÖNER MG, LI H, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis [J]. J Clin Invest,2014,124(4):1853-67.
- [18] LIN W H, CHANG Y W, HONG M X, et al. STAT3 phosphorylation at Ser727 and Tyr705 differentially regulates the EMT-MET switch and cancer metastasis [J]. Oncogene,2021,40(4):791-805.
- [19] SHEN M, XU Z, XU W, et al. Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019,38(1):1-14.
- [20] HUANG T T, SU J C, LIU C Y, et al. Alteration of SHP-1/p-STAT3 signaling: A potential target for anticancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (6) : 1234.
- [21] TAI W T, SHIAU C W, CHEN P J, et al. Discovery of novel Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 agonists from sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2014, 59 (1):190-201.
- [22] KUNDU S, FAN K, CAO M, et al. Novel SHP-1 inhibitors tyrosine phosphatase inhibitor-1 and analogs with preclinical anti-tumor activities as tolerated oral agents [J]. J Immunol,2010,184(11):6529-6536.

[责任编辑 张丰丰]