

化痰解毒方含药血清通过JAK2/STAT3通路抑制人肺癌H1299细胞侵袭迁移

魏征^{1,2,3}, 徐立然¹, 徐江雁³, 张爱华², 李亚峰², 张俊萍^{2*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南省中医药研究院附属医院, 郑州 450004;
3. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨化痰解毒方含药血清(HJRMS)对人肺癌细胞(H1299细胞)的增殖、侵袭与迁移的影响及其机制。方法:通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测化痰解毒方含药血清对肺癌细胞增殖的抑制能力;利用划痕实验和Transwell小室法检测肺癌细胞的侵袭与迁移作用;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白酪氨酸激酶2(JAK2),信号传导及转录激活因子3(STAT3),磷酸化JAK2(p-JAK2)和磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测JAK2,STAT3 mRNA表达水平。结果:①与空白组比较,1%~16%化痰解毒方含药血清分别处理24,48 h,H1299细胞增殖能力受到显著抑制($P<0.01$),并呈一定的浓度依赖性。②H1299细胞在经化痰解毒方含药血清处理24 h,与空白组比较,4%,8%化痰解毒方含药血清组细胞划痕愈合能力受到抑制($P<0.05$, $P<0.01$)。③在侵袭实验和迁移实验中,与空白组比较,2%,4%,8%化痰解毒方含药血清肺癌细胞透膜数均明显减少($P<0.05$, $P<0.01$)。④Western blot显示,与空白组比较,4%,8%化痰解毒方含药血清组均对肺癌H1299细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白(JAK2,p-JAK2,STAT3,p-STAT3)表达具有抑制作用($P<0.05$, $P<0.01$)。⑤与空白组比较,使用8%化痰解毒方含药血清处理肺癌H1299细胞24 h,JAK2,STAT3 mRNA表达水平均下降($P<0.05$)。结论:化痰解毒方含药血清能够抑制肺癌H1299细胞的增殖、侵袭与迁移,其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路有关。

[关键词] 化痰解毒方含药血清;肺癌;侵袭;迁移

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0074-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202465

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201015.1131.004.html>

[网络出版日期] 2020-10-15 13:20

Inhibitory Study of Huayu Jiedu Prescription Medicated Serum on Invasion and Migration of Human Lung Cancer Cell Line H1299 by JAK2/STAT3 Pathway

WEI Zheng^{1,2,3}, XU Li-ran¹, XU Jiang-yan³, ZHANG Ai-hua², LI Ya-feng², ZHANG Jun-ping^{2*}

(1. *The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;*
2. *The Affiliated Hospital of Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China;*
3. *Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Huayu Jiedu prescription medicated serum(HJRMS) on the proliferation, invasion and migration of human lung cancer cells (H1299 cells) and its mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the inhibitory effect of HJRMS on the proliferation of lung cancer cells, the effect of HJRMS on the invasion and migration of H1299 cells were determined by Transwell assay and wound healing assay. The protein expressions of Janus kinase 2 (JAK2),

[收稿日期] 20200915(007)

[基金项目] 中国博士后基金项目(2018M642760,2019T120626);河南省博士后基金项目(2018-066);河南省中医药科学研究专项(2018ZYD14);河南省重点研发与推广专项(182102311160);河南省中医管理局拔尖人才项目(豫中医科教[2018]35号);河南省中医管理局青苗人才项目(豫中医科教[2018]16号)

[第一作者] 魏征,博士后,副主任医师,从事中西医结合肿瘤学临床与基础研究,E-mail:questwz@163.com

[通信作者] *张俊萍,硕士,副主任医师,从事中西医结合肿瘤学临床与基础研究,E-mail:zhangjunping888@163.com

signal transduction and activation transcription factor 3 (STAT3), phosphorylated JAK2 (p-JAK2) and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) were detected by Western blot, the mRNA expression levels of JAK2 and STAT3 were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** ① Compared with control group, the proliferation of H1299 cells was significantly inhibited after treatment with 1%~16%HJRMS serum for 24, 48 h, respectively ($P<0.01$), and showed a certain concentration dependence. ② After treatment with HJRMS for 24 h, the scratch healing ability of cells in the 4%, 8%HJRMS serum groups was inhibited ($P<0.05, P<0.01$). ③ Compared with control group, the membrane permeability of H1299 cells in invasion and migration experiments in 2%, 4%, 8%HJRMS serum groups was decreased significantly ($P<0.05, P<0.01$). ④ Western blot showed that compared with control group, 4%, 8%HJRMS serum groups inhibited the expression of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins (JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3) in lung cancer H1299 cells ($P<0.05, P<0.01$). ⑤ Compared with control group, the mRNA expression levels of JAK2 and STAT3 in lung cancer H1299 cells treated with 8%HJRMS for 24 h decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** The HJRMS can inhibit the proliferation, invasion and migration of lung cancer H1299 cells, and its mechanism may be related to the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Key words] Huayu Jiedu prescription medicated serum; lung cancer; invasion; migration

在全世界范围内,每年肺癌的发病率和死亡率居高不下,因此肺癌被认为是导致癌症相关死亡的首要因素^[1]。其中,小细胞肺癌占肺癌总发病人数的15%,而非小细胞肺癌占85%^[2]。通常情况下,早期诊断并及时进行手术切除的患者预后较好,5年生存率为70%^[3]。然而大多数肺癌患者确诊时已进入晚期,尽管近些年来肺癌的治疗策略取得一些进步,但晚期肺癌患者的生存率仍然很低^[4]。蛋白酪氨酸激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路被认为是参与细胞生长、凋亡、调节免疫和炎症反应的关键环节^[5-6],该通路的激活与肺癌的发生与进展密切相关。而化痰解毒方在多年的临床实践中都被认为具有良好的抗肿瘤疗效。有研究表明,化痰解毒方能够有效抑制胃癌等消化道肿瘤的侵袭转移^[7]。并且通过对晚期非小细胞肺癌的临床疗效观察发现,应用化痰解毒方的患者,其血小板减少、腹泻、恶心呕吐、神经毒性等发生率均小于化疗组,说明化痰解毒方辅助治疗非小细胞肺癌可以起到减毒增效的效果^[8]。然而,化痰解毒方能否通过JAK2/STAT3信号通路影响肺癌细胞的侵袭转移,目前尚不清楚。本实验研究在前期研究的基础之上提取化痰解毒方含药血清,在肺癌细胞中进一步探讨其对JAK2/STAT3通路的作用,为揭示中药复方抗肿瘤机制提供实验基础。

1 材料

1.1 药品 为了保证试验药效的一致性,药物来源使用配方颗粒剂(购自广东一方制药有限公司),确保指纹图谱的一致性。化痰解毒方临床用药配伍

为全蝎3g(批号6125422,相当于生药量9g),天龙3g(批号6117692,相当于生药量6g),三七粉3g(批号7050862,相当于生药量3g),半枝莲15g(批号5093142,相当于生药量15g),广木香6g(批号7025426,相当于生药量6g)。

1.2 动物 健康SPF级大耳白兔12只,雄性,体质量(3 000±50)g,购自河南省实验动物中心,合格证号SCXK(豫)2015-0004。动物实验经河南省中医药研究院伦理委员会批准,批号HNZYJY2018-0010。

1.3 试剂 RPMI 1640培养基,胎牛血清(美国Hyclone公司,批号分别为BC-M-017,SH30070.03);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒,胰蛋白酶,蛋白裂解液RIPA Lysis Buffer(中国碧云天公司,批号分别为HY-K0301,通用型100X, P0013B);matrigel基底膜胶(美国Corning公司,批号#354234);结晶紫(碧云天,批号C0121);trizol(美国Invitrogen公司,批号15596026);蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司,批号PD-500);聚偏氟乙烯硝酸纤维素(PVDF)转运膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010);逆转录试剂盒(日本Takara公司,批号RA0036);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(中国爱必梦公司,批号13485);JAK2抗体,磷酸化(p)-JAK2抗体,STAT3抗体,p-STAT3抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体,β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为#3230, #3771, #30835, #94994, #3900, #4970)。

1.4 仪器 SW-CJ-1型超净台(苏州净化设备有限公司); HERAcell 150i型二氧化碳细胞培养箱, Micro 17R型离心机(美国 Thermo 公司); iMark型酶标仪, minipro型蛋白电泳槽, 55BR型转膜仪, ChemiDoc型WB凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); #3422型 Transwell 培养板(美国 Corning 公司); Light96型 Real-time PCR 扩增仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 化瘀解毒方含药血清的制备 SPF级大耳白兔12只,随机分2组(化瘀解毒方组6只,生理盐水组6只)。实验前禁食12h,根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算大耳兔灌药剂量,化瘀解毒方药组按每天 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量口服灌胃;空白组给予相同剂量的生理盐水,每天1次,连续灌胃1周,于末次用药后1h,无菌条件下进行心脏采血,提取血清,在 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$,30min下补体灭活,血清混合制备完成后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[9]。

2.2 细胞培养 人肺癌细胞H1299购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,编号TCHu160,传至第3代。细胞在恒温培养箱中保持 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件,于含10%胎牛血清和1%青链霉素混合液的RPMI 1640培养基中培养。细胞隔天换液,以0.25%胰酶消化传代,3d传代1次。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖能力 取对数生长期的H1299肺癌细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2遍,胰酶消化后计数,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,每孔100 μL 接种于96孔板,同时设立肿瘤细胞空白组、药物处理组,每组5个复孔,分别加入含不同浓度(1%,2%,4%,8%,16%化瘀解毒方含药血清,不足16%血清部分用生理盐水组大鼠血清补足)化瘀解毒方含药血清的培养基,设空白组,在细胞培养箱中培养48h,每孔加入CCK-8试剂10 μL 再孵育3h。接着将培养板置于酶标仪中测定490nm处吸光度 A ,计算细胞存活率。细胞存活率= $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 划痕实验检测肺癌细胞的迁移能力 取经化瘀解毒方含药血清处理过的H1299细胞,PBS冲洗2遍,胰酶消化后计数,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,每孔2mL接种于6孔板,待细胞数量铺满板底后用无血清培养基RPMI 1640饥饿培养12h,用200 μL 枪头垂直于孔板作细胞划痕,尽量保持划痕宽度一致,用PBS清洗细胞3次,于48h后拍照,Image J分析划痕愈合率。

2.5 Transwell小室法检测细胞侵袭能力 取经化

瘀解毒方含药血清处理过的H1299细胞,胰酶消化后计数,用无血清培养基重悬细胞调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL,向预先用matrigel胶包被的Transwell上室中缓慢均匀滴入细胞 5×10^4 个/孔,下室加入含20%胎牛血清的完全培养基500 μL ,使得液面浸没上室下缘。培养24h,取出上室,用PBS小心清洗上室,并用棉签刮除matrigel胶,使用4%的多聚甲醛固定20min,用0.2%的结晶紫染色,显微镜下拍照,每孔随机选取5个视野,细胞计数,比较各组细胞侵袭能力。

2.6 Transwell小室法检测细胞迁移能力 取经化瘀解毒方含药血清处理过的H1299细胞,胰酶消化后计数,用无血清培养基调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL,向Transwell上室(未铺胶)中缓慢均匀滴入细胞 1×10^5 个/孔,下室加入含20%胎牛血清的适当体积完全培养基,使得液面浸没上室下缘。培养24h后,取出上室,用PBS小心清洗上室,使用4%的多聚甲醛固定20min后用0.2%结晶紫染色,显微镜下拍照,每孔随机选取5个视野,细胞计数,比较各组细胞迁移能力。

2.7 蛋白免疫印迹法检测 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达水平 取对数生长期的H1299细胞,经胰蛋白酶消化后接种于6孔板中,经不同剂量组的化瘀解毒方含药血清处理24h,PBS洗涤3次,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰上用RIPA裂解液提取各组总蛋白。用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定。进行蛋白变性,进行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,然后采用湿转法将蛋白转到硝酸纤维素膜上。转膜结束后将膜置于含有5%脱脂奶粉的Tris碱缓冲液(TBST)室温封闭2h,之后用TBST洗膜3次,每次10min。添加一抗(1:1000)于膜上后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第2天用TBST洗膜3次,每次10min,添加山羊抗兔二抗(1:2000)室温下孵育1.5h,TBST洗膜3次,每次10min,采用ECL法显色,洗片。实验选用 β -actin作为内参对照,用凝胶图像处理系统检测分析JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3蛋白条带。

2.8 Real-time PCR 检测 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平 首先接种人肺癌H1299细胞于6孔板中,在细胞培养箱 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育至细胞贴壁后(约24h)。分别设立空白组,化瘀解毒方含药血清低、中、高剂量组,继续孵育24h后用trizol提取总RNA。采用Takara反转录酶进行反转录。扩增条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$

30 s, 72 °C 30 s, 扩增40个循环;绘制溶解曲线。反应结果以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示其相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
JAK2	上游 5'-GCAACAGAGCCTATCGGCATGG-3'	92
	下游 5'-CCGCCACTGAGCAAAGAGGTAAG-3'	
STAT3	上游 5'-CACCAAGCGAGGACTGAGCATC-3'	150
	下游 5'-AGCCAGACCCAGAAGGAGAAGC-3'	
β -actin	上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	85
	下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	

2.9 统计学分析 采用SPSS 21.0统计软件分析,数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用取LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 化疗解毒方含药血清对H1299细胞增殖的影响 与空白组比较,化疗解毒方含药血清分别处理24, 48 h后,H1299细胞增殖情况受到显著抑制($P < 0.01$),并呈一定的浓度依赖性。根据化疗解毒方含药血清对H1299细胞增殖抑制的情况,为排除化疗解毒方含药血清毒性对结肠癌细胞侵袭迁移

实验的干扰,后续实验选用药物处理时长24 h进行研究,并确定体外实验将含2%, 4%, 8%化疗解毒方含药血清的培养基设为低、中、高剂量组,空白组(含8%无药血清),化疗解毒方低、中剂量组补充不含药血清6%, 4%。见表2。

表2 化疗解毒方含药血清对肺癌H1299细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

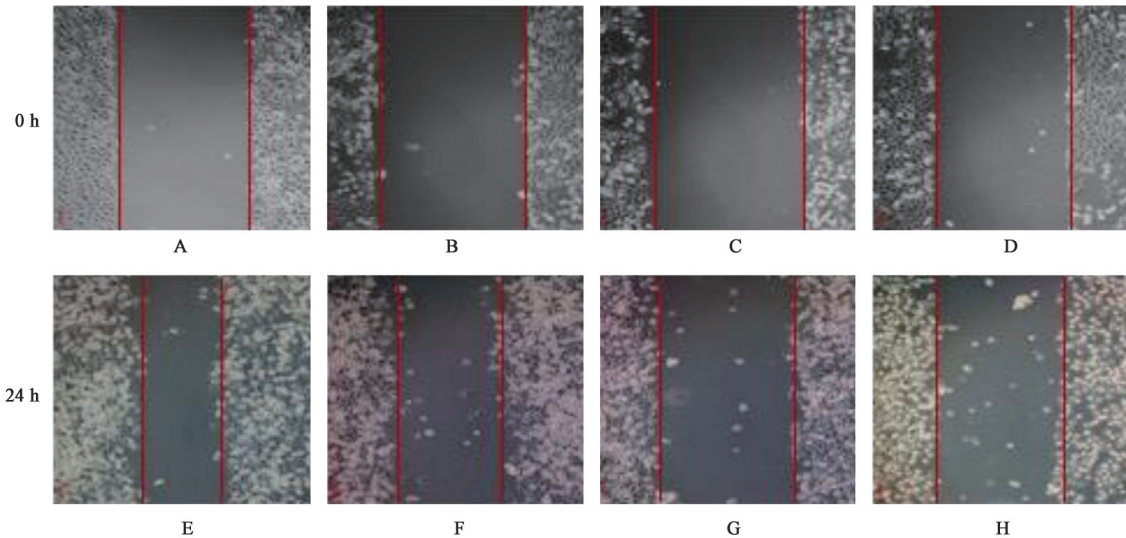
Table 2 Effect of HJRMS on cell survival rate of lung cancer H1299 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$) %

组别	含药血清/%	细胞存活率	
		24 h	48 h
空白		99.73±0.46	100.69±0.68
化疗解毒方含药血清	1	93.48±2.31 ²⁾	87.74±3.11 ²⁾
	2	88.04±2.49 ²⁾	72.63±2.45 ²⁾
	4	72.73±4.64 ²⁾	46.71±2.87 ²⁾
	8	38.52±3.27 ²⁾	33.57±3.40 ²⁾
	16	20.90±4.02 ²⁾	20.52±4.99 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3~6同)。

3.2 化疗解毒方含药血清对H1299细胞侵袭和迁移能力的影响

3.2.1 对肺癌H1299细胞迁移的影响 与空白组比较,化疗解毒方中、高剂量组的划痕愈合能力受到抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示化疗解毒方含药血清能够减弱细胞迁移运动能力。见图1,表3。



A, E. 空白组; B~D, F~H. 化疗解毒方含药血清低、中、高剂量组(图2同)

图1 化疗解毒方含药血清对肺癌H1299细胞迁移的影响(microscope, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of HJRMS on migration of lung cancer H1299 cells (microscope, $\times 400$)

3.2.2 对肺癌H1299细胞侵袭及迁移的影响 与空白组比较,化疗解毒方低、中、高剂量组H1299细

胞侵袭细胞数明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);肺癌细胞迁移细胞数均显著降低($P < 0.01$)。见表4,图2。

表 3 化痰解毒方含药血清对肺癌 H1299 细胞迁移的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of HJRMS on invasion and migration of lung cancer H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$) %

组别	含药血清/%	0 h	24 h
空白		99.00±1.00	72.33±2.52
化痰解毒方	2	98.00±2.00	70.00±2.00
	4	96.33±3.21	56.67±5.77 ¹⁾
	8	98.33±2.08	33.67±9.02 ²⁾

表 4 化痰解毒方含药血清对肺癌 H1299 细胞侵袭和迁移的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of HJRMS on invasion and migration of lung cancer H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$) 个

组别	含药血清/%	侵袭细胞	迁移细胞
空白		223.50±7.63	365.75±18.06
化痰解毒方	2	198.75±9.98 ¹⁾	317.25±8.26 ²⁾
	4	170.50±9.39 ²⁾	250.00±18.88 ²⁾
	8	139.75±11.90 ²⁾	198.50±9.60 ²⁾

3.3 化痰解毒方含药血清对 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达的影响 与空白组比较,化痰解毒方含药血清低、中、高剂量组 JAK2, STAT3

蛋白表达有明显降低($P<0.05$);化痰解毒方含药血清中、高剂量组 p-JAK2, p-STAT3 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见图 3,表 5。

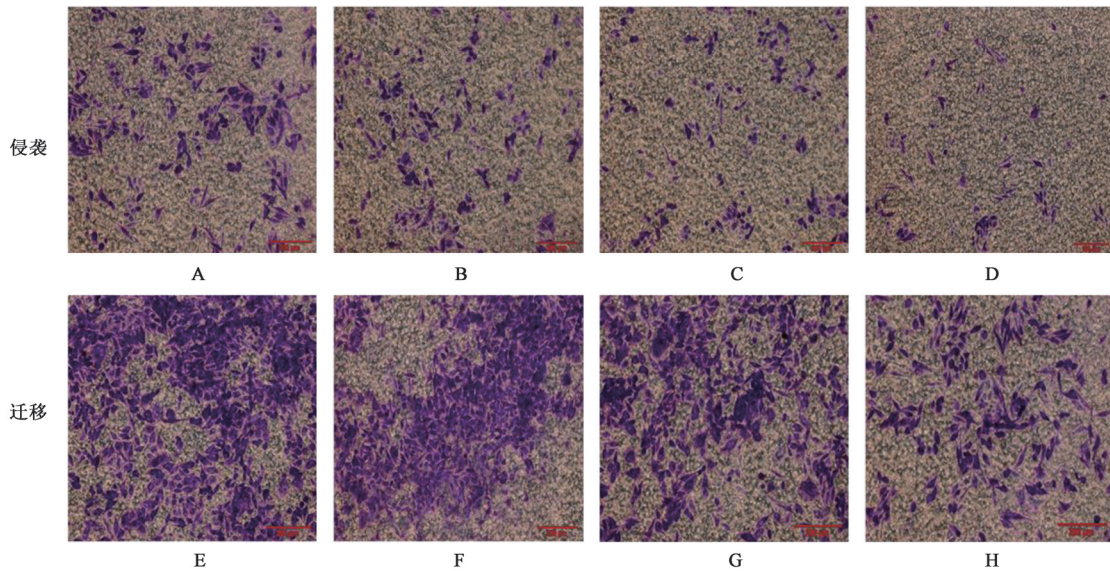
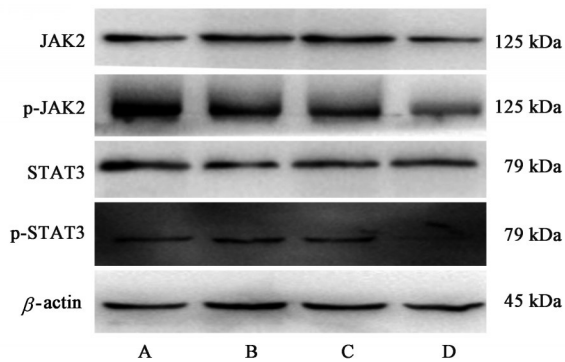


图 2 化痰解毒方含药血清对肺癌 H1299 细胞侵袭和迁移的影响 (microscope, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of HJRMS on invasion and migration of lung cancer H1299 cells (microscope, $\times 200$)



A. 空白组; B~D. 化痰解毒方含药血清低、中、高剂量组

图 3 各组肺癌 H1299 细胞 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoretic of protein expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in H1299 cells

3.4 化痰解毒方含药血清对 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,化痰解毒方含药

血清中、高剂量组 JAK2 mRNA 表达明显降低($P<0.05$);化痰解毒方含药血清高剂量组 STAT3 mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。见表 6。

4 讨论

中医辨证论治的基本原则是“治病必求于本”,因此针对病因进行治疗最能有效改善症状,拔除病根。肺癌以“痰毒”为基本病机^[10],据此,行活血化瘀、解毒攻毒为中晚期肺癌的重要治法^[11]。临床治疗症瘕痞块积证,常选用搜剔破瘀之力较强的虫类药物,以达到破瘀血、消积块的目的。化痰解毒方由全蝎、壁虎、三七、半枝莲、广木香 5 味药组成。其中全蝎、壁虎活血解毒为君;辅以三七活血化瘀、软坚散结;佐以半枝莲解毒抗癌,使以广木香理气和胃、疏畅气血。诸药合用,共奏活血解毒、软坚散结、扶正抗癌之功。

表 5 化癍解毒方含药血清对肺癌 H1299 细胞 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of HJRMS on protein expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	含药血清/%	JAK2/ β -actin	p-JAK2/ β -actin	STAT3/ β -actin	p-STAT3/ β -actin
空白		1.44 \pm 0.06	1.34 \pm 0.05	1.23 \pm 0.12	1.34 \pm 0.06
化癍解毒方	2	1.16 \pm 0.12 ¹⁾	1.22 \pm 0.08	0.85 \pm 0.08 ¹⁾	1.04 \pm 0.06 ²⁾
	4	1.26 \pm 0.03 ¹⁾	0.95 \pm 0.07 ²⁾	0.83 \pm 0.03 ¹⁾	0.97 \pm 0.07 ²⁾
	8	0.94 \pm 0.18 ¹⁾	0.82 \pm 0.05 ²⁾	0.95 \pm 0.05 ¹⁾	0.83 \pm 0.08 ²⁾

表 6 化癍解毒方含药血清对肺癌 H1299 细胞 JAK2, STAT3 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of HJRMS on mRNA expression levels of JAK2, STAT3 in H1299 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	含药血清/%	JAK2	STAT3
化癍解毒方	2	0.83 \pm 0.11	0.90 \pm 0.06
	4	0.88 \pm 0.05 ¹⁾	0.89 \pm 0.07
	8	0.85 \pm 0.07 ¹⁾	0.85 \pm 0.06 ¹⁾

注:设空白组 JAK2, STAT3 mRNA 相对表达为 1。

JAK2/STAT3 信号通路的激活参与了肺癌的发生发展,激活后的 JAK2 可以使 STAT3 的酪氨酸磷酸化,磷酸化的 STAT3 被转运到细胞核中,与特异性启动子结合,诱导靶基因 mRNA 的表达^[12]。STAT 是一组 DNA 结合蛋白^[13-14]。其中,STAT3 被认为是一种癌基因,STAT3 的激活与恶性肿瘤之间的关系十分密切^[15-16]。而阻断 JAK2/STAT3 信号通路可以提高肺癌细胞对顺铂的敏感性^[17]。

本研究结果显示,化癍解毒方含药血清能够呈剂量依赖性抑制 H1299 细胞的增殖。为了排除化癍解毒方含药血清的细胞毒作用,本课题组下面的实验选择化癍解毒方含药血清处理 H1299 细胞的时间为 24 h。本课题组进行了划痕实验和 Transwell 实验来观察化癍解毒方含药血清是否对 H1299 细胞的侵袭与迁移运动具有抑制作用。结果表明,化癍解毒方含药血清对 H1299 细胞的侵袭与迁移均具有明显的抑制作用,说明化癍解毒方含药血清能够抑制肺癌的侵袭转移。进一步,本课题组对化癍解毒方含药血清抑制肺癌 H1299 细胞的侵袭转移的机制进行探讨,通过对 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白的检测结果可以看出,化癍解毒方含药血清对 JAK2 和 STAT3 的总蛋白及 mRNA 水平的影响较小,而对 p-JAK2 和 p-STAT3 的蛋白表达水平的影响较大,说明化癍解毒方含药血清是通过影响 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平来抑制 H1299 细胞的侵袭与迁移的。

综上,本课题组通过对化癍解毒方含药血清的体外实验发现,化癍解毒方含药血清对肺癌 H1299

细胞的增殖、侵袭和迁移具有显著抑制作用,其中的机制可能与化癍解毒方含药血清抑制了 JAK2/STAT3 信号通路的磷酸化水平有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] CHEN Y M. Update of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer [J]. J Chin Med Assoc, 2013, 76 (5) : 249-257.

[2] BARESCHINO M A, SCETTINO C, ROSSI A, et al. Treatment of advanced non small cell lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2011, 3(2) : 122-133.

[3] KATES M, PEREZ X, GRIBETZ J, et al. Validation of a model to predict perioperative mortality from lung cancer resection in the elderly [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(5) : 390-395.

[4] YIU K C, JUERGENS R A, SWAMINATH, et al. Multidisciplinary influence on care of lung cancer patients at the time of diagnosis: a patient survey [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2016, 28(10) : 667.

[5] ZUNDLER S, NEURATH M F. Integrating immunologic signaling networks: the JAK/STAT pathway in colitis and colitis-associated cancer [J]. Vaccines (Basel), 2016, 4(1) : 5.

[6] MULLEN M, GONZALEZ-PEREZ R R. Leptin-induced JAK/STAT signaling and cancer growth [J]. Vaccines (Basel), 2016, 4(3) : 26.

[7] ZHENG W, JUNPING Z, AIHUA Z, et al. Antitumor effect of Huayu Jiedu formula on SGC-7901 cancer cell [J]. Bangladesh J Pharmacol, 2016, 2(14) : 118-117.

[8] 马淑芳,赵一,魏征,等. 化癍解毒方配合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床观察 [J]. 新中医, 2017, 49(3) : 109-111.

[9] 张俊萍,魏征. 化癍解毒方含药血清体外抑制 A549 肿瘤细胞作用及其机制 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(16) : 3990-3993.

[10] 程海波,王俊壹,李柳. 癌毒邪病机分类及其在肿瘤临床治疗中的应用 [J]. 中医杂志, 2019, 60(2) :

- 119-122.
- [11] 周计春,邢风举,颜新. 国医大师周仲瑛教授治疗癌毒五法及辨病应用经验[J]. 中华中医药杂志,2014,29(4):1112-1114.
- [12] QING Y, STARK G R. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma [J]. J Biol Chem,2004,279(40):41679-41685.
- [13] LI R, REZK A, MIYAZAKI Y, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy[J]. Sci Transl Med, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aab4176.
- [14] QIN J Z, ZHANG C L, KAMARASHEV J, et al. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells[J]. Blood, 2001, 98(9) : 2778-2783.
- [15] SARKAR M, KHARE V, GHOSH M K. The DEAD box protein p68: a novel coactivator of Stat3 in mediating oncogenesis[J]. Oncogene, 2017, 36(22) : 3080-3093.
- [16] LEVY DE, INGHIRAMI G. STAT3: a multifaceted oncogene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10151-10152.
- [17] WANG M, LIN T, WANG Y C, et al. CXCL12 suppresses cisplatin-induced apoptosis through activation of JAK2/STAT3 signaling in human non-small-cell lung cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2017,6(10):3215-3224.

[责任编辑 张丰丰]