

醉茄素 A 通过 JAK/STAT 通路对人肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 凋亡的影响

张 阳¹, 赵柯心², 张 磊³

1. 漯河市中心医院 消化内科, 河南 漯河 462000
2. 漯河市中心医院 全科医学科, 河南 漯河 462000
3. 漯河市中心医院 肿瘤科, 河南 漯河 462000

摘要: 目的 研究醉茄素 A 通过 Janus 激酶 (JAK) /信号转导与转录激活子 (STAT) 通路对人肝癌耐药细胞 HepG2/阿霉素 (ADM) 凋亡的影响, 并探讨 JAK/STAT 通路在其中可能的作用机制。方法 体外培养 HepG2/ADM 细胞, 分为对照组、醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。CCK-8 法检测细胞增殖情况; Hoechst33342 染色法观察细胞形态学变化; Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡情况; Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、cleaved caspase-3 以及 JAK/STAT 通路中磷酸化 JAK2 (p-JAK2)、STAT3 (p-STAT3) 蛋白表达情况。结果 醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞增殖受到明显抑制, 并呈时间和剂量相关性 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞部分细胞核发生碎片化、固缩, 荧光强度增大, 细胞凋亡指数及凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。结论 醉茄素 A 可促进人肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 凋亡, 其机制可能与抑制 JAK/STAT 通路活化, 下调抑凋亡蛋白表达及上调促凋亡蛋白表达有关。

关键词: 醉茄素 A; 肝癌; 细胞凋亡; Janus 激酶; 信号转导与转录激活子

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2020)04 - 0641 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.04.008

Effect of withaferin A on apoptosis of HepG2/ADM cells through JAK/STAT pathway

ZHANG Yang¹, ZHAO Ke-xin², ZHANG Lei³

1. Department of Gastroenterology, Luohe Central Hospital, Luohe 462000, China
2. Department of General Medicine, Luohe Central Hospital, Luohe 462000, China
3. Department of Oncology, Luohe Central Hospital, Luohe 462000, China

Abstract: Objective To study the effect of withaferin A on apoptosis of HepG2/ADM cells through Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway, and to explore the possible mechanism of JAK/STAT pathway. **Methods** HepG2/ADM cells were cultured *in vitro* and divided into control group, withaferin A 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups. CCK-8 method was used to detect cell proliferation; Hoechst33342 staining was used to observe the morphological changes; Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect apoptosis; and Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis related protein b-lymphoma-2 (Bcl-2), cleared caspase-3, and phosphorylated JAK2, STAT3 in JAK/STAT pathway. **Results** The proliferation of HepG2/ADM cells in the withaferin A 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups was significantly inhibited in a time and dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, some nucleus of HepG2/ADM cells in the withaferin A 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups had fragmentation and pyknosis, and the fluorescence intensity increased. Compared with the control group, apoptosis index and apoptosis rate in the withaferin A 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups increased significantly ($P < 0.05$), and the expression level of cleaved caspase-3 was significantly increased ($P < 0.05$), but the expressions of Bcl-2, p-JAK2, and p-STAT3 proteins decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Withaferin A can promote the apoptosis of drug-resistant human hepatoma cells HepG2/ADM cells, and its mechanism may be related to the inhibition of JAK/STAT pathway activation, down-regulation of apoptotic protein expression and up-regulation of apoptotic protein expression.

Key words: withaferin A; liver cancer; apoptosis; Janus kinase; signal transducer and activator of transcription

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 河南省自然科学基金科技攻关项目 (172102310011)

作者简介: 张 阳, 研究方向为消化道疾病诊治。E-mail: zy_8392@163.com

肝癌是一种常见的肝脏恶性肿瘤，治愈率低，复发率高，化学耐药性高，并且近年发病率、死亡率逐年升高^[1-2]。目前临床上利用化疗方式治疗肝癌虽具有一定的疗效，但容易产生耐药性，并未能显著改善患者生存率，因此如何逆转肝癌细胞耐药性是目前治疗肝癌的重要途径^[3]。研究发现许多中药可通过抑制肝癌细胞增殖、诱导其凋亡、逆转耐药性等作用控制和杀灭肝癌细胞^[4]。醉茄素 A 是一种从茄科植物醉茄 *Withania somnifera* (L.) Dunal 中提取的活性成分，具有抗炎、抗微生物感染、抗血管生成、免疫调节等作用，并对乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞生长具有抗增殖、抗侵袭、抗转移和促凋亡作用^[5-6]。研究表明由 Janus 激酶 (JAK) 和信号转导与转录激活子 (STAT) 介导的 JAK/STAT 通路是细胞因子信号传导的下游通路，广泛参与细胞的发育、分化、增殖、凋亡和炎症反应等过程，并在各种实体瘤、淋巴瘤及炎症性疾病中发挥重要作用^[7-8]。此外，中药可通过干预 JAK/STAT 通路调控肿瘤细胞的增殖与凋亡^[9]。本研究通过体外培养人肝癌耐药细胞 HepG2/ADM，观察醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞增殖、凋亡的影响以及 JAK/STAT 通路在其中可能的作用机制，从而为其临床应用提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM 购自广州吉妮欧生物科技有限公司；醉茄素 A (质量分数 ≥ 99%)、二甲基亚砜 (DMSO)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (货号 APOAF-20TST) 购自美国 Sigma 公司；RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司；胰酶溶液购自上海碧云天生物研究所；Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (货号 E606335) 购自上海生工生物工程有限公司；鼠抗人磷酸化 JAK2 (p-JAK2) (批号 sc-390539)、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) (批号 sc-8059)、GAPDH 抗体 (批号 sc-365062) 购自美国 Santa Cruz 公司；鼠抗人 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) (批号 ab201566)、兔抗人 cleaved caspase-3 (批号 ab49822)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或兔 IgG 抗体 (批号 ab205719、ab205718) 购自 abcam 公司；电子荧光显微镜购自日本 Olympus 公司；FACS Calibur™ 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司；酶标仪、蛋白凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养

取出 -80 °C 冻存的人肝癌耐药细胞株 HepG2/ADM，直接于 30 °C 水浴中使细胞快速解冻，离心后加入 RPMI-1640 培养基，洗涤 3 次后，于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养，当细胞生长至 80%~90% 时，用 0.25% 胰蛋白酶消化传代，稳定培养后用于后续实验。

1.3 细胞分组与药物处理

将处于对数生长期的 HepG2/ADM 细胞，用 RPMI-1640 培养液稀释成 1×10^4 个/mL 的细胞悬液，接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，将细胞分为对照组和醉茄素 A 低、中、高剂量组。药物处理时，对照组和醉茄素 A 低、中、高剂量组分别加入醉茄素 A，使终浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0 μmol/L。醉茄素 A 的使用浓度参照相关文献^[10-11]及前期预实验结果。

1.4 CCK-8 法检测 HepG2/ADM 细胞的增殖情况

各组细胞经药物处理后放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内，每组设置 6 个重复孔，同时设定仅添加培养液的空白孔，分别培养 24、48、72 h，培养结束后，加入 CCK-8 试剂继续培养 4 h，弃去上层培养液，加入 DMSO，避光常温孵育 20 min，于酶标仪波长 570 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值，计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.5 Hoechst33342 染色法检测 HepG2/ADM 细胞的形态学变化

各组细胞经药物处理后于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h，接种于 24 孔板中，过夜孵育更换新鲜培养液继续培养 24 h，弃去上层培养液，PBS 洗涤 2 次，加入 10% 甲醛溶液固定 1 h，PBS 洗涤 2 次后加入 Hoechst33342 染液，室温染色 20 min，冲洗后于荧光显微镜下观察细胞形态，随机选取 5 个高倍视野并计算凋亡指数。

$$\text{凋亡指数} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$$

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡情况

各组细胞经药物处理后于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 48 h 后，加入 0.25% 胰蛋白酶进行消化，收集细胞并经预冷 PBS 洗涤后，用结合缓冲液调整细胞密度为 1×10^6 个/mL，接着加入 10 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 混匀，4 °C 避光孵育 20 min，最后上样，在流式细胞仪中观察各组细胞的凋亡情况。

1.7 Western blotting 法检测 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2、cleaved caspase-3、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达

将处于对数生长期的各组细胞接种于培养瓶中，于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱继续培养 48 h 后，弃去培养液，PBS 洗涤 2 次后，刮下细胞，细胞中加入适量 RIPA 蛋白裂解液于冰上裂解 30 min，经离心后收集上清液，并参照蛋白提取试剂盒说明提取各组细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，然后将蛋白样品和上样缓冲液混合，并加入 SDS-PAGE 凝胶上样孔中进行电泳，电泳结束后将凝胶转移到 PVDF 膜上，转膜完成后于 5% 脱脂奶粉溶液中室温封闭 2 h，接着分别加入一抗（Bcl-2、cleaved caspase-3、p-JAK2、p-STAT3、GAPDH 抗体）4 °C 过夜，再分别加入辣根过氧化物酶山羊抗兔或鼠 IgG 作为二抗，室温孵育 2 h，洗膜后 ECL 显色，最后于凝胶成像仪中拍照，结果经 Image LabTM 软件进行灰度分析。

1.8 统计学分析

本研究数据分析均采用 SPSS 22.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方

差分析，进一步两两比较采用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响

随着药物处理时间延长，醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞增殖抑制率逐渐升高，呈时间相关性 ($P < 0.05$)。在同一时间点，与对照相比，醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞增殖抑制率明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，且随着药物浓度增加，细胞增殖抑制率逐渐增大，呈剂量相关性 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞形态学及凋亡指数的影响

Hoechst33342 染色结果显示，对照组 HepG2/ADM 细胞核完整，显示为较弱的均匀蓝色荧光；醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞核致密浓染，部分细胞核发生碎片化、固缩，荧光强度增大。与对照组相比，醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞凋亡指数明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，并随药物处理浓度增加，细胞凋亡指数逐渐增大，呈剂量相关性 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

表 1 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of withaferin A on HepG2/ADM cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
醉茄素 A	2.5	7.63 ± 0.62 [▲]	10.62 ± 0.85 ^{*▲}	13.79 ± 1.03 ^{**▲}
	5.0	12.21 ± 0.84 ^{▲△}	15.34 ± 0.97 ^{*▲△}	24.13 ± 1.62 ^{**▲△}
	10.0	19.74 ± 1.65 ^{▲△&}	26.45 ± 2.36 ^{*▲△&}	31.62 ± 3.29 ^{**▲△&}

与同组 24 h 比较: * $P < 0.05$; 与同组 48 h 比较: # $P < 0.05$; 与同时点对照组比较: ▲ $P < 0.05$; 与同时点醉茄素 A 2.5 μmol·L⁻¹ 组比较: △ $P < 0.05$; 与同时点醉茄素 A 5.0 μmol·L⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 24 h between the same group; # $P < 0.05$ vs 48 h between the same group; ▲ $P < 0.05$ vs control group at the same time; △ $P < 0.05$ vs withaferin A 2.5 μmol·L⁻¹ group at the same time; & $P < 0.05$ vs withaferin A 5.0 μmol·L⁻¹ group at the same time

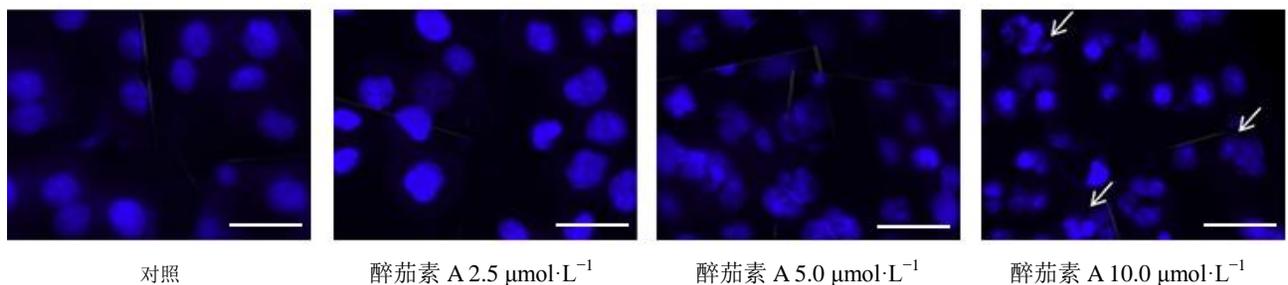


图 1 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞形态学的影响 (50 μm)
Fig. 1 Effect of withaferin A on morphology of HepG2/ADM cells (50 μm)

2.3 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响

与对照组相比,醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞凋亡率明显升高,差异有统计

学意义 ($P < 0.05$),并随药物处理浓度增加,细胞凋亡率逐渐增大,呈剂量相关性 ($P < 0.05$)。见表 3、图 2。

表 2 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of withaferin A on apoptosis index of HepG2/ADM cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	细胞凋亡指数/%
对照	—	2.52 ± 0.46
醉茄素 A	2.5	4.86 ± 0.71 [▲]
	5.0	9.95 ± 1.24 ^{▲△}
	10.0	14.37 ± 1.45 ^{▲△&}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与醉茄素 A 2.5 μmol·L⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$;
与醉茄素 A 5.0 μmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$
[▲] $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs withaferin A 2.5 μmol·L⁻¹
group; [&] $P < 0.05$ vs withaferin A 5.0 μmol·L⁻¹ group

表 3 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of withaferin A on apoptosis rate of HepG2/ADM cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	凋亡率/%
对照	—	5.32 ± 1.15
醉茄素 A	2.5	17.65 ± 1.42 [▲]
	5.0	24.92 ± 1.63 ^{▲△}
	10.0	35.85 ± 2.46 ^{▲△&}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与醉茄素 A 2.5 μmol·L⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$;
与醉茄素 A 5.0 μmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$
[▲] $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs withaferin A 2.5 μmol·L⁻¹
group; [&] $P < 0.05$ vs withaferin A 5.0 μmol·L⁻¹ group

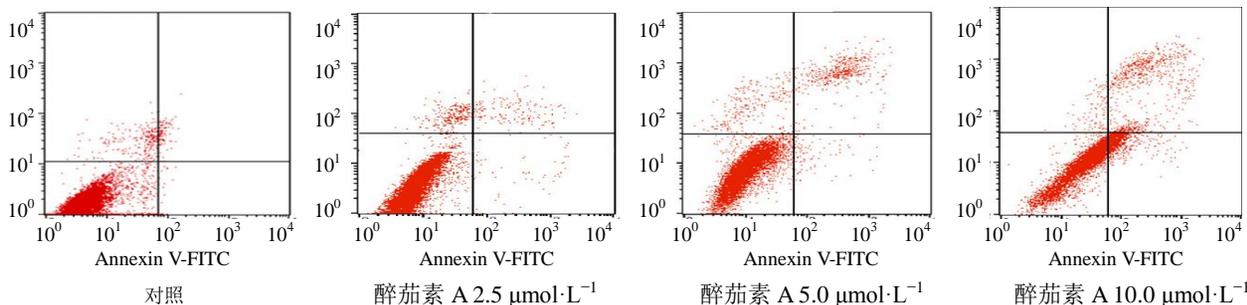


图 2 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effect of withaferin A on apoptosis rate of HepG2/ADM cells

2.4 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2、cleaved caspase-3 蛋白的影响

与对照组相比,醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显升高,都呈剂量相关性 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 4。

表 4 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2、cleaved caspase-3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of withaferin A on Bcl-2 and cleared caspase-3 protein in HepG2/ADM cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	Bcl-2	cleaved caspase-3
对照	—	0.81 ± 0.13	0.32 ± 0.09
醉茄素 A	2.5	0.64 ± 0.12 [▲]	0.41 ± 0.12
	5.0	0.48 ± 0.11 ^{▲△}	0.56 ± 0.09 ^{▲△}
	10.0	0.31 ± 0.08 ^{▲△&}	0.69 ± 0.10 ^{▲△&}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与醉茄素 A 2.5 μmol·L⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$;
与醉茄素 A 5.0 μmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$
[▲] $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs withaferin A 2.5 μmol·L⁻¹
group; [&] $P < 0.05$ vs withaferin A 5.0 μmol·L⁻¹ group

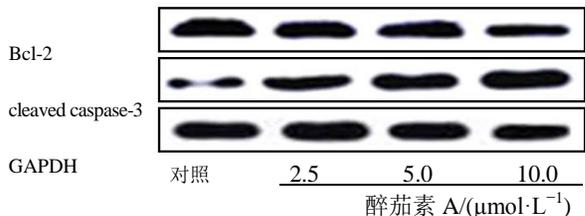


图 3 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2、cleaved caspase-3 蛋白的影响

Fig. 3 Effect of withaferin A on Bcl-2 and cleared caspase-3 protein in HepG2/ADM cells

2.5 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白的影响

与对照组相比,醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水

平明显降低, 呈剂量相关性, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4 和表 5。

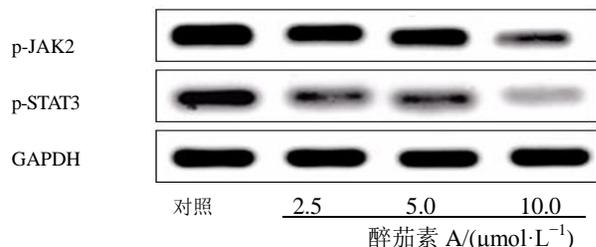


图 4 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白的影响

Fig. 4 Effect of WFA on p-jak2 and p-STAT3 protein in HepG2/ADM cells

表 5 醉茄素 A 对 HepG2/ADM 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of WFA on p-jak2 and p-STAT3 protein of HepG2/ADM cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	p-JAK2	p-STAT3
对照	—	1.18 ± 0.12	1.02 ± 0.13
醉茄素 A	2.5	1.02 ± 0.10 [▲]	0.81 ± 0.11 [▲]
	5.0	0.78 ± 0.09 ^{▲△}	0.67 ± 0.08 ^{▲△}
	10.0	0.59 ± 0.11 ^{▲△&}	0.38 ± 0.07 ^{▲△&}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与醉茄素 A 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [△] $P < 0.05$;
与醉茄素 A 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [&] $P < 0.05$

[▲] $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs withaferin A 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [&] $P < 0.05$ vs withaferin A 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group

3 讨论

肝癌作为一种高发的、致命的恶性肿瘤, 严重威胁人类健康, 并带来巨大经济损失, 而且其病因及确切分子机制尚不完全清楚。肿瘤多药耐药性 (MDR) 是指肿瘤细胞对一种药物产生耐药性时, 对其他结构不同、作用靶点不同的药物也产生耐药性。而肿瘤 MDR 细胞作为恶性肿瘤组织中一类特殊的肿瘤细胞, 其存在是导致肿瘤化疗失败的主要原因, 也是恶性肿瘤复发、转移等的重要因素, 严重制约癌症患者的化疗效果和预后, 因此寻找新的治疗策略逆转肝癌的多药耐药性具有重要意义^[12-13]。中药因具有多靶点、副作用小等优点, 从中药中寻找安全、有效的耐药逆转剂已成为当今研究热点。研究表明醉茄素 A 作为一种高度氧化的甾体内酯, 对多种癌症具有抗癌活性^[5-6], 但对肿瘤多药耐药细胞的作用研究少见报道。因此, 本研究通过观察醉茄素 A 对人肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 的增殖、凋

亡以及 JAK/STAT 通路的影响, 初步探讨醉茄素 A 治疗肝癌以及抗肿瘤多药耐药细胞的作用机制。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是一种不同于细胞坏死的细胞自主生理性死亡, 对于维持机体的正常发育和自身稳定性具有十分重要意义, 其失衡可引发病理性损伤, 并与许多疾病尤其肿瘤的发生发展过程密切相关, 同时在放疗、化疗等肿瘤治疗中发挥关键作用。Xia 等^[14]研究发现醉茄素 A 可通过 ROS 依赖的线粒体功能障碍诱导人肠癌细胞凋亡。Hahm 等^[15]研究发现醉茄素 A 能够抑制人乳腺癌细胞增殖并诱导其凋亡。本研究发现, 与对照组相比, 醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞部分细胞核出现碎片化、固缩, 荧光强度增大, 细胞增殖抑制率、凋亡指数和凋亡率显著升高, 均呈剂量相关性, 提示醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组能够显著抑制 HepG2/ADM 细胞增殖, 并诱导其凋亡。

研究表明细胞凋亡是细胞内发生的一系列有序受控的连锁反应, 其发生涉及多种调节因子的激活、表达, 其中凋亡诱导因子和凋亡抑制因子占据重要作用^[16]。Bcl-2 家族包括抑制凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL 以及促凋亡蛋白 Bax 等多种与细胞凋亡密切相关的蛋白成员。一般情况下, 细胞线粒体中 Bcl-2、Bcl-XL 防止细胞色素 C 释放从而抑制细胞凋亡, 并能与 Bax 结合形成二聚体拮抗 Bax 蛋白的促凋亡作用; 当细胞启动凋亡程序时, 细胞浆中 Bax 蛋白帮助线粒体内细胞色素 C 释放出来, 激活下游 caspase-3, 促进细胞凋亡发生^[17]。Caspase 家族是包括 caspase-3、caspase-9 等多种促使细胞凋亡的蛋白酶, 在细胞凋亡机制网络中处于核心地位。其中, caspase-3 是最为关键的细胞凋亡执行者, 在肿瘤等疾病的发生发展过程中发挥重要作用, 而 cleaved caspase-3 作为 caspase-3 活化过程中经剪切产生的活性片段, 其表达水平可反映 caspase-3 活性和细胞凋亡情况^[18]。Cai 等^[19]研究发现醉茄素 A 可通过下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达, 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡。另有研究发现人参皂苷 Rh₂ 能够有效逆转 HepG2/ADM 细胞多药耐药性的作用机制可能与介导 Bax/Bcl-2 信号通路有关^[20]。本研究发现, 与对照组相比, 醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2/ADM 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低、cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著升高, 并呈剂量相关性, 提示醉茄素 A 可通过下调抑凋亡蛋白表达、上

调促凋亡蛋白表达,促进 HepG2/ADM 细胞发生凋亡。

研究表明 JAK/STAT 通路与肿瘤的发生发展密切相关,并可能为治疗癌症的靶点^[8, 19]。为进一步探讨醉茄素 A 治疗肝癌以及抗肿瘤多药耐药细胞的作用机制,本研究观察了 JAK/STAT 通路在其中的作用。JAK/STAT 通路作为一个经典的肿瘤信号转导途径,活化的 JAK 通过酪氨酸磷酸化后激活 STAT 磷酸化,从而使信号从细胞外传递到细胞内,同时导致抗肿瘤凋亡因子表达失调,引发肿瘤^[7, 8]。张新科等^[21]研究发现丙泊酚联合卡铂抑制乳腺癌细胞增殖并诱导其凋亡的机制可能与抑制 JAK/STAT 活性,上调凋亡蛋白表达有关。Choi 等^[22]研究发现醉茄素 A 可通过阻止 STAT3 转录活性抑制结肠癌细胞生长。本研究发现,与对照组相比,醉茄素 A 2.5、5.0、10.0 μmol/L 组 HepG2/ADM 细胞 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著降低,并呈剂量相关性,提示醉茄素 A 可能通过抑制 JAK2、STAT3 磷酸化表达,阻碍 JAK/STAT 通路活化,进而诱导 HepG2/ADM 细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

综上所述,醉茄素 A 可能通过抑制 JAK2、STAT3 磷酸化表达阻断 JAK/STAT 通路信号转导,下调抑凋亡蛋白表达,上调促凋亡蛋白表达,从而诱导 HepG2/ADM 细胞其凋亡,发挥抗肿瘤作用。

参考文献

[1] Nio K, Yamashita T, Kaneko S. The evolving concept of liver cancer stem cells [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 4-15.

[2] Wong M C, Jiang J Y, Goggins W B, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: a global profile [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45846-45854.

[3] Briz O, Perez M J, Marin J G. Further understanding of mechanisms involved in liver cancer chemoresistance [J]. *Hepatoma Res*, 2017, 3(1): 22-26.

[4] 贺 珊, 廖长秀. 中药治疗肝癌机制的研究进展 [J]. *中成药*, 2017, 39(1): 155-160.

[5] 王 番, 宋 颖, 贾艳艳, 等. 醉茄素 A 药理活性研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(14): 1714-1718.

[6] Thilip C, Mehaboob V M, Varutharaju K, et al. Elicitation of withaferin-A in hairy root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using natural polysaccharides [J]. *Biologia*, 2019, 74(8): 961-968.

[7] 杨 昕, 唐 哲, 张 鹏. JAK/STAT 信号通路在肺癌中的研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(1): 45-51.

[8] Mullen M, Gonzalez-Perez R R. Leptin-induced JAK/STAT signaling and cancer growth [J]. *Vaccines*, 2016, 4(3): 26-42.

[9] 高玉桥, 苏 丹, 张汉辉. 中药干预 JAK/STAT 信号通路的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(9): 2236-2240.

[10] 李 旭, 王 敏, 田 锐, 等. 醉茄素 A 诱导人胆囊癌 GBC-SD 细胞凋亡及其可能的机制 [J]. *肿瘤*, 2013, 33(6): 502-508.

[11] 蔡 勇, 王季颖. 醉茄素 A 对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、凋亡及 P13K/Akt 信号通路的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(2): 107-111.

[12] Thakur P S, Khan A M, Talegaonkar S, et al. Hurdles in selection process of nanodelivery systems for multidrug-resistant cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(10): 2073-2106.

[13] 赵亚新, 刘洁凡, 江明华, 等. 芹菜素抗乳腺癌多药耐药 MCF-7/ADR 细胞作用的研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(8): 648-654.

[14] Xia S, Miao Y, Liu S. Withaferin A induces apoptosis by ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2363-2369.

[15] Hahm E R, Lee J, Singh S V. Role of mitogen-activated protein kinases and Mcl-1 in apoptosis induction by withaferin A in human breast cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(11): 907-916.

[16] 闪海霞, 范崇桂, 霍丽亚, 等. 细胞因子诱导杀伤细胞分泌因子影响人肝癌干细胞的凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(14): 2033-2039.

[17] Opferman J T. Attacking cancer's achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members [J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2661-2675.

[18] 李永宁, 肖晶晶, 赵建勇. Caspase-3 及 Cleaved-Caspase-3 在氟中毒大鼠肝脏中表达 [J]. *贵州医药*, 2016, 40(3): 239-240.

[19] Cai Y, Sheng ZY, Chen Y, et al. Effect of Withaferin A on A549 cellular proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(4): 1711-1714.

[20] 吴艳林, 刘润田. 人参皂苷 Rh2 对人肝癌细胞 HepG2/ADM 耐药逆转作用及其机制研究 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(5): 476-480.

[21] 张新科, 司小萌, 张 朔. 丙泊酚联合卡铂对乳腺癌细胞凋亡及 JAK/STAT 通路的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(9): 21-26.

[22] Choi B Y, Kim B W. Withaferin-A inhibits colon cancer cell growth by blocking STAT3 transcriptional activity [J]. *J Cancer Prev*, 2015, 20(3): 185-192.