

隐丹参酮通过靶向 LASP1 调控 JAK/STAT 信号通路对胆管癌细胞恶性进展的抑制作用

于洲波¹, 杨 婧², 王 锐^{1*}

1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 探讨隐丹参酮通过靶向 LASP1 调控 Janus 激酶-信号转导及转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路对胆管癌细胞恶性进展的抑制作用及其分子机制。**方法** 以人胆管癌 HCCC-9810、RBE 细胞及正常人肝内胆管上皮细胞 HIBEpic 为研究对象。采用细胞计数试剂盒-8 法检测隐丹参酮对细胞活力的影响并计算半数抑制浓度 (IC₅₀)；通过平板克隆形成实验评估细胞增殖能力；Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭；采用流式细胞术结合碘化丙啶 (PI) 染色分析细胞周期分布；膜联蛋白 V (Annexin V) -异硫氰酸荧光素 (FITC) /PI 双染法及 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡；使用 siRNA 转染技术沉默 LASP1 表达，并通过 RT-qPCR 和 Western blotting 分别检测 LASP1 的 mRNA 及蛋白表达水平。运用 Western blotting 检测细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、剪切型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9、B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 以及 JAK/STAT 信号通路关键蛋白 Janus 激酶 2 (JAK2)、磷酸化 JAK2 (p-JAK2)、信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 的表达；利用 JAK2 激活剂 broussonin E (BE) 进行回复实验验证通路作用。**结果** 在生物学功能方面，隐丹参酮以时间和剂量相关性方式降低了细胞活力 (HCCC-9810 和 RBE 细胞的 IC₅₀ 值分别为 16.88、19.73 μmol/L)，并有效抑制了细胞的克隆形成、迁移和侵袭能力 ($P < 0.05$ 、 0.01)；细胞周期分析结果显示，隐丹参酮可将胆管癌细胞周期阻滞于 G₂/M 期，并下调 G₂/M 期检查点蛋白 CDK1 和 Cyclin B1 的表达 ($P < 0.01$)；凋亡分析结果显示，隐丹参酮能诱导细胞凋亡，表现为凋亡形态学改变、凋亡率升高，并上调 cleaved Caspase-3/9 和 Bax 表达，下调 Bcl-2 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)；在机制层面，隐丹参酮能够抑制 JAK/STAT 信号通路的激活，表现为 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平降低而不影响其总蛋白表达，且此效应可被 JAK2 激活剂 BE 部分逆转 ($P < 0.05$)。分子机制探索发现，LASP1 在胆管癌细胞中呈低表达状态，而隐丹参酮可显著上调其表达 ($P < 0.01$)；功能回复实验表明，沉默 LASP1 可部分拮抗隐丹参酮对细胞增殖的抑制和凋亡的诱导作用 ($P < 0.01$)。**结论** 隐丹参酮可能通过上调 LASP1 表达，进而抑制 JAK/STAT 信号通路的激活，从而诱导胆管癌细胞发生周期阻滞和凋亡，最终发挥其增殖、迁移和侵袭的抗肿瘤作用。

关键词: 隐丹参酮；胆管癌；JAK/STAT 信号通路；细胞周期蛋白 B1；细胞周期蛋白依赖性激酶 1；B 细胞淋巴瘤-2 蛋白；半胱氨酸蛋白酶-3；Janus 激酶 2；信号转导与转录激活因子 3

中图分类号: R285; R286.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2026)02 - 0273 - 011

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.02.003

Inhibition of cryptotanshinone on malignant progression of cholangiocarcinoma cells by targeting LASP1 to regulate JAK/STAT signaling pathway

YU Zhoubo¹, YANG Jing², WANG Rui¹

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Basic Medical College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition and underlying molecular mechanism of Cryptotanshinone on the malignant progression of cholangiocarcinoma cells by targeting LASP1 to regulate Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling pathway. **Methods** Human cholangiocarcinoma HCCC-9810 and RBE cells and normal human intrahepatic

收稿日期: 2025-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603418, 82074271); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”科研项目 (2020YQ05)

作者简介: 于洲波, 研究方向是新药及新剂型研究。E-mail: 3237752875@qq.com

*通信作者: 王 锐, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向是新药及新剂型研究。E-mail: wrdx@sina.com

bile duct epithelial cell line HIBepic were used as the study subjects. The effect of cryptotanshinone on cell viability was assessed by the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. Cell proliferation ability was evaluated by the colony formation assay. Cell migration and invasion were detected by the Transwell assay. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry combined with propidium iodide (PI) staining. Cell apoptosis was detected by Annexin V- fluorescein isothiocyanate (FITC)/PI double staining and Hoechst 33342 staining. The expression of LASP1 was silenced using siRNA transfection technology, and its mRNA and protein expression levels were measured by RT-qPCR and Western blotting, respectively. The expression changes of key proteins were analyzed by Western blotting, including Cyclin B1, cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), as well as key proteins of the JAK/STAT signaling pathway: Janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated JAK2 (p-JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and phosphorylated STAT3 (p-STAT3). A rescue experiment was performed using the JAK2 activator broussonin E (BE) to validate the role of the pathway. **Results** In terms of biological functions, cell viability was reduced by cryptotanshinone in a time- and dose-dependent manner (the IC_{50} values for HCCC-9810 and RBE cells were approximately 16.88 and 19.73 $\mu\text{mol/L}$, respectively), and the colony formation, migration, and invasion capabilities of the cells were effectively inhibited ($P < 0.05$, 0.01). Cell cycle analysis showed that cryptotanshinone induced G₂/M phase arrest in cholangiocarcinoma cells and downregulated the expression of the G₂/M checkpoint proteins CDK1 and Cyclin B1 ($P < 0.01$). Apoptosis analysis revealed that cryptotanshinone induced cell apoptosis, manifested as morphological changes of apoptosis, increased apoptosis rate, upregulated expression of cleaved Caspase-3/9 and Bax, and downregulated expression of Bcl-2 ($P < 0.05$, 0.01). At the mechanistic level, the activation of the JAK/STAT signaling pathway was inhibited by cryptotanshinone, as evidenced by decreased protein levels of p-JAK2 and p-STAT3 without affecting their total protein expression. This effect was partially reversed by the JAK2 activator BE ($P < 0.05$). Molecular mechanism exploration found that LASP1 was expressed at a low level in cholangiocarcinoma cells, while its expression was significantly upregulated by cryptotanshinone ($P < 0.01$). Functional rescue experiments indicated that the inhibitory effect of cryptotanshinone on cell proliferation and its pro-apoptotic effect were partially antagonized by silencing LASP1 ($P < 0.01$). **Conclusion** Cryptotanshinone may suppresses the activation of the JAK/STAT signaling pathway by upregulating LASP1 expression, thereby inducing cell cycle arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells, ultimately exerting its anti-tumor effects by inhibiting proliferation, migration, and invasion.

Key words: cryptotanshinone; cholangiocarcinoma; JAK/STAT signaling pathway; Cyclin B1; CDK1; Bcl-2; Caspase-3; JAK2; STAT3

胆管癌是一种起源于胆管上皮细胞的高度异质性胆道恶性肿瘤，中位生存期不足 2 年^[1]。当前全球范围内胆管癌发病率呈上升趋势，占原发性肝胆恶性肿瘤的 15%~20%^[2]。由于早期症状隐匿、侵袭性强且易发生转移，多数患者确诊时已属晚期，失去了手术根治的机会^[3]。即使接受手术切除，术后复发率和转移率依然居高不下，5 年生存率仅为 5%~10%^[4]。目前，以吉西他滨联合顺铂为主的全身化疗是晚期胆管癌的标准治疗方案，但疗效有限且易产生耐药性^[5]。因此，深入探究胆管癌发生发展的分子机制，寻找新的有效治疗靶点和低毒高效的药物，成为临床和基础研究的迫切需求。

近年来，中药及其活性成分在肿瘤防治中的价值日益受到重视。传统活血化瘀中药丹参的脂溶性活性成分隐丹参酮展现出广泛的抗肿瘤活性^[6]。研究表明，隐丹参酮能通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制侵袭转移及血管生成等途径，在卵巢癌、乳癌、皮肤癌和肝癌等恶性肿瘤中表现出抗肿瘤活性^[7-9]。

然而，隐丹参酮对胆管癌作用的具体分子靶点与信号通路的调控机制，尚未被系统阐明。深入揭示隐丹参酮抗胆管癌的作用机制，对于开发基于天然产物的新型抗胆管癌药物具有重要意义。Janus 激酶信号转导及转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路是调控细胞增殖、分化、凋亡以及免疫应答的核心通路之一^[10]。活化的 JAK 磷酸化 STAT 蛋白，使其形成二聚体转入细胞核，进而调控一系列与肿瘤恶性表型相关基因的转录，驱动肿瘤细胞的恶性生物学行为以及对化疗的抵抗^[11]。因此，靶向抑制 JAK/STAT 通路已成为抗肿瘤药物研发的重要策略。然而 JAK/STAT 通路的上游调控因子及其在胆管癌中的具体作用机制仍需进一步探索。本研究旨在从细胞水平探究隐丹参酮对胆管癌恶性生物学行为的作用，并进一步探讨 JAK/STAT 信号通路是否参与介导隐丹参酮对胆管癌细胞功能的影响，从而为隐丹参酮作为一种潜在的天然抗胆管癌新药的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胆管癌 HCCC-9810、RBE 细胞与人正常肝内胆管上皮细胞 HIBEpic 均购自上海钰博生物科技有限公司。隐丹参酮(质量分数>98%,货号 B21586)购自上海源叶生物科技有限公司;靶向 LASP1 的 siRNA (si-LASP1) 和阴性对照 siRNA (si-NC) 均由苏州吉玛基因股份有限公司设计合成; JAK2 激活剂 broussonin E (BE, 货号 HY-N2963) 购自美国 MCE 公司; RPMI-1640 培养基(批号 C11875500BT) 购自美国 Gibco 公司; 细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1) 抗体(批号 ab32053)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 抗体(批号 ab32094)、剪切型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 抗体(批号 ab32042)、B 淋巴瘤细胞-2 (Bcl-2) 抗体(批号 ab32503)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体(批号 ab53154) 均购自英国 Abcam 公司; 剪切型半胱氨酸蛋白酶-9 (cleaved Caspase-9) 抗体(批号 9509)、JAK2 抗体(批号 3230)、磷酸化 JAK2 (p-JAK2) 抗体(批号 3776)、信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 抗体(批号 9139)、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 抗体(批号 9145)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体(批号 4970)、山羊抗兔 IgG 二抗(批号 7074) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养与处理

HCCC-9810、RBE 细胞采用 RPMI-1640 培养基培养, HIBEpic 细胞在 D-缬氨酸改良型 MEM 培养基中培养, 培养基中补充 1%青霉素-链霉素、10%胎牛血清, 并置于恒温湿润培养箱中培养。实验开始前, 将隐丹参酮溶于 DMSO 中配制成 50 mmol/L 的储存液, 并于 -20 °C 保存。后续所有体外实验中, 均使用培养基进一步稀释至相应浓度。实验设置如下分组: 对照组和隐丹参酮组(依据细胞计数试剂盒-8 实验结果, 选定 20 μ mol/L 进行后续机制研究); 在通路验证实验中, 增设隐丹参酮(20 μ mol/L) + JAK2 激活剂 BE (5 μ mol/L) 组; 在功能恢复实验中, 增设 si-NC、si-LASP1 及 si-LASP1+隐丹参酮(20 μ mol/L) 组。对照组细胞仅使用等量溶剂处理。最终 DMSO 浓度不超过 0.5%, 且经检测对细胞生长与死亡均无影响。

1.3 细胞活力检测

将 HCCC-9810、RBE 细胞接种至 96 孔板中, 待贴壁后开始用梯度浓度(0、10、20、30、40、50 μ mol/L)

隐丹参酮处理 24、48、72 h 后, 依据细胞计数试剂盒-8 说明书进行操作, 并通过测定吸光度(A)值以评估细胞活力。取 5 个平行样本的平均值, 细胞活力按以下公式计算。浓度 0 μ mol/L 为对照组。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{处理}} / A_{\text{对照}}$$

1.4 集落形成检测

将对数生长期的 HCCC-9810 与 RBE 细胞以每孔 700 个的细胞密度接种于 6 孔板。待细胞贴壁后, 用隐丹参酮(20 μ mol/L) 处理 48 h, 弃去含隐丹参酮的培养基, 更换为完全培养基继续培养 14 d 以形成克隆, 形成的克隆用 4%多聚甲醛固定, 0.1%结晶紫染色并计数。

1.5 细胞迁移与侵袭检测

Transwell 小室预先包被 Matrigel 基质胶(迁移实验无需包被)。将隐丹参酮(20 μ mol/L) 处理 24 h 后的 HCCC-9810 与 RBE 细胞制备成 2×10^5 个细胞/mL 的无血清细胞悬液。取 200 μ L 加入上室, 下室用含 20%胎牛血清的培养基培养 24 h。随后移除滤膜上表面细胞, 对穿透滤膜并黏附于下表面的细胞进行 0.1%结晶紫染色。显微镜下选择 5 个随机视野拍照, 并进行细胞定量分析。

1.6 细胞周期检测

收集隐丹参酮(20 μ mol/L) 处理 24 h 后的 HCCC-9810 和 RBE 细胞并洗涤, 用预冷 70%乙醇在 4 °C 固定过夜。固定后细胞经洗涤并重悬于冷磷酸盐缓冲液(PBS), 随后用染色缓冲液[含 1 mg/mL 碘化丙啶(PI) 和 10 mg/mL RNase A 的 PBS] 在 37 °C 避光条件下孵育 30 min。通过流式细胞仪检测, 并使用 ModFit 3.0 软件分析细胞周期分布。

1.7 细胞凋亡检测

收集隐丹参酮(20 μ mol/L) 处理 24 h 后的 HCCC-9810 和 RBE 细胞, 加入含 5 μ L 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC) 和 10 μ L PI 的结合缓冲液避光孵育 10~20 min 后, 使用流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司) 采集数据, 并通过 Flow Jo 软件进行分析。

1.8 形态学凋亡检测

用隐丹参酮(20 μ mol/L) 处理 HCCC-9810 和 RBE 细胞 48 h 后, 用 4%多聚甲醛固定细胞, 并以 1 μ g/mL Hoechst 33342 避光染色 15 min, 通过荧光显微镜观察染色细胞核形态学变化并采集图像。

1.9 细胞转染

为沉默 HCCC-9810 和 RBE 细胞中 LASP1 的

表达, 按照说明使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 si-LASP1 或 si-NC 转染至细胞中。转染 48 h 后, 将细胞用隐丹参酮 (20 μmol/L) 处理 24 h 或不予处理, 并收集用于后续实验。si-LASP1 序列: 5'-UATUCGCTTCGUUGACGCUAA-3'; si-NC 序列: 5'-AAGGTGAAGTGTCTGGATAAG-3'。

1.10 RNA 提取与 RT-qPCR 检测

细胞总 RNA 以 TRIzol 试剂提取, 经纯化后用逆转录试剂盒合成 cDNA。随后取等量 cDNA 模板, 加入 SYBR Green PCR 预混液及对应基因特异性引物, 置于荧光定量 PCR 仪进行扩增。循环参数设定为: 60 °C 30 s 预延伸, 继以 95 °C、3 s 变性, 共运行 40 个循环。所用引物序列详见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'~3')
LASP1	正向 AGGGAGTTGTGCCCATTTTG
	反向 AGCAGATGCCCATGCTTTCT
GAPDH	正向 GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	反向 GAAGATGGTGATGGGATTTTC

1.11 Western blotting 检测

所有细胞经 PBS 清洗后, 按照体积比 100 : 10 : 1 配制 RIPA 裂解缓冲液、磷酸酶抑制剂与苯甲基磺酰氟混合液裂解以提取总蛋白。蛋白样品经电泳分离、转膜、封闭后, 将膜与稀释比例为 1 : 1 000 的 Cyclin B1、CDK1、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bcl-2、Bax、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 及 β-actin (1 : 5 000) 抗体于 4 °C 孵育过

夜, 随后将膜与 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000) 孵育 1 h, 通过凝胶成像系统显示蛋白条带。

1.12 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析与作图。数据来源于至少 3 次独立实验, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 LSD-*t* 检验, 多组间差异通过单因素方差分析结合 Bonferroni 法进行事后多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 隐丹参酮对胆管癌细胞活力的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 隐丹参酮能以时间和剂量相关方式显著抑制 HCCC-9810 和 RBE 细胞的增殖活性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 2 种细胞对隐丹参酮的敏感性不同: HCCC-9810 细胞较 RBE 细胞更为敏感。HCCC-9810、RBE 细胞在 48 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 16.88、19.73 μmol/L。基于 IC₅₀ 结果, 并考虑到后续实验需在产生显著效应的同时维持足够的细胞活性以进行多参数检测, 本研究选择 20 μmol/L 作为后续验证隐丹参酮功能实的统一作用浓度。

2.2 隐丹参酮对胆管癌细胞增殖的影响

经隐丹参酮处理后, HCCC-9810、RBE 细胞克隆数减少 ($P < 0.05$), 提示隐丹参酮可能对 HCCC-9810、RBE 细胞增殖产生显著抑制作用, 见图 2。

2.3 隐丹参酮对胆管癌细胞迁移与侵袭的影响

与对照组相比, 隐丹参酮处理能够显著降低 HCCC-9810、RBE 细胞的迁移与侵袭 ($P < 0.05$), 提示隐丹参酮对胆管癌细胞的迁移与侵袭过程具有显著抑制作用, 见图 3。

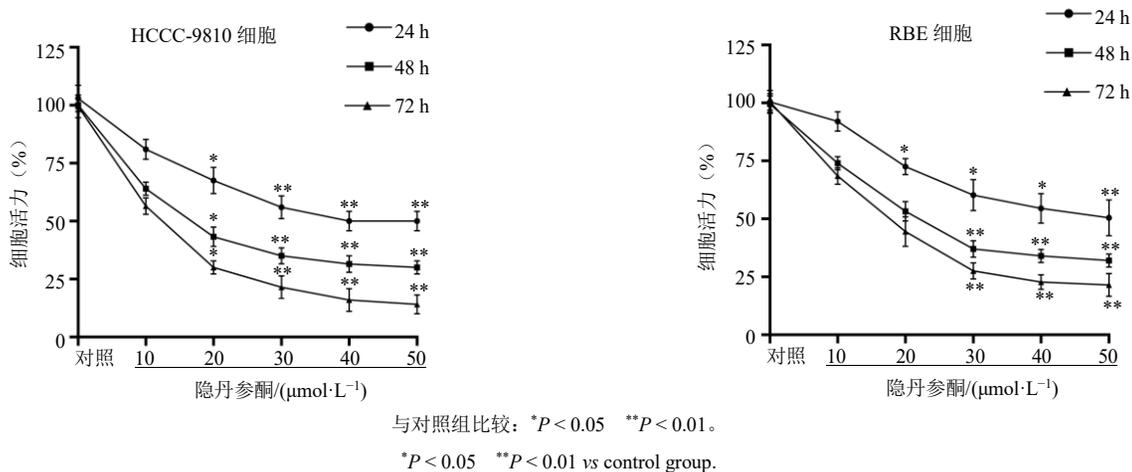


图 1 隐丹参酮对胆管癌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effects of cryptotanshinone on cholangiocarcinoma cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

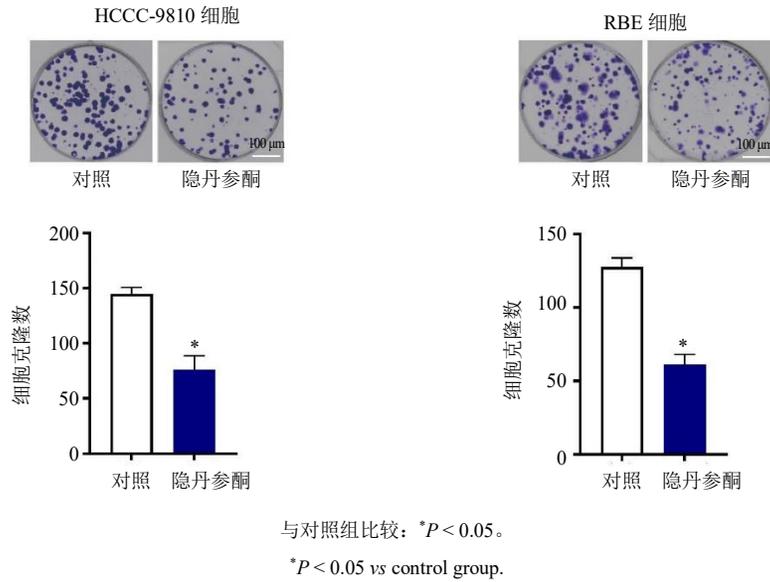


图 2 隐丹参酮对胆管癌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of cryptotanshinone on cholangiocarcinoma cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

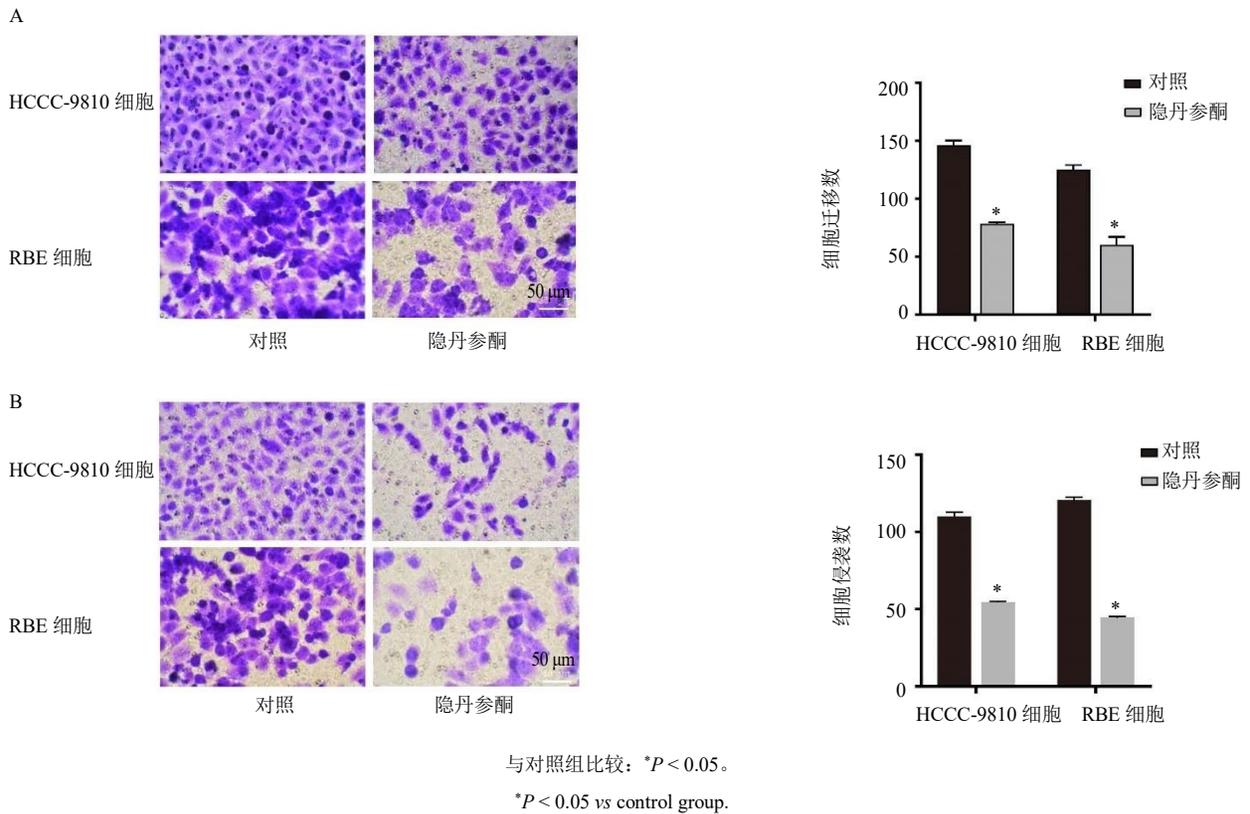


图 3 隐丹参酮对胆管癌细胞迁移 (A) 与侵袭 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of cryptotanshinone on cholangiocarcinoma cell migration (A) and invasion (B) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.4 隐丹参酮对胆管癌细胞周期的影响

隐丹参酮在 HCCC-9810、RBE 细胞中均能降低 S 期和 G₂/M 期的细胞比例 ($P < 0.01$), 见图 4A。同时, Western blotting 结果显示, 隐丹参酮处理能

够显著降低胆管癌细胞中 G₂/M 期检验点蛋白 CDK1 和 CyclinB1 表达水平 ($P < 0.01$), 见图 4B。以上结果提示, 隐丹参酮可能通过将胆管癌细胞阻滞于 G₂/M 期来调控细胞周期, 从而抑制细胞生长。

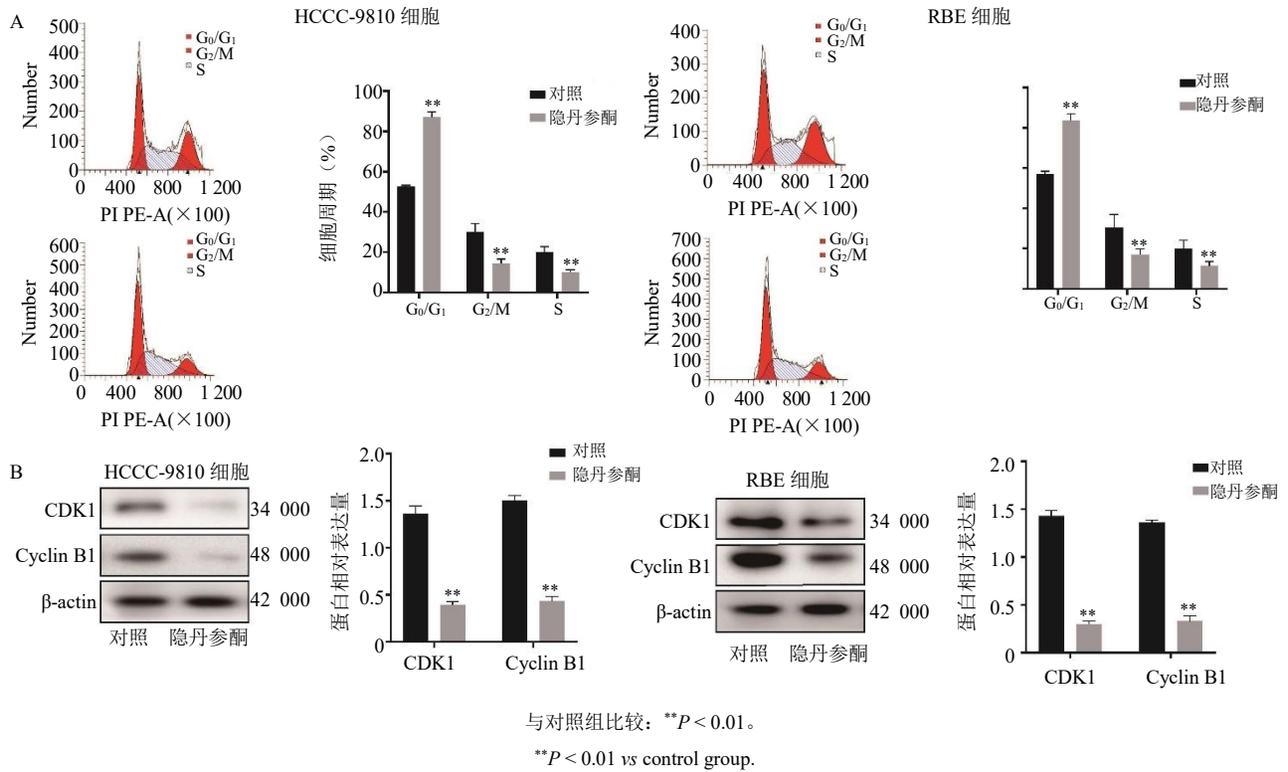


图 4 隐丹参酮对胆管癌细胞周期分布 (A) 和 G₂/M 期检查点蛋白表达水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 4 Effects of cryptotanshinone on cholangiocarcinoma cell cycle distribution (A) and expression levels of G₂/M checkpoint proteins (B) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.5 隐丹参酮对胆管癌细胞凋亡的影响

隐丹参酮处理的 HCCC-9810、RBE 细胞出现细胞收缩、变圆及蓝色荧光强度增强等明显的凋亡特征，见图 5A、5C。

流式细胞术结果表明，与对照组相比，隐丹参酮处理后细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)，见图 5B、D。

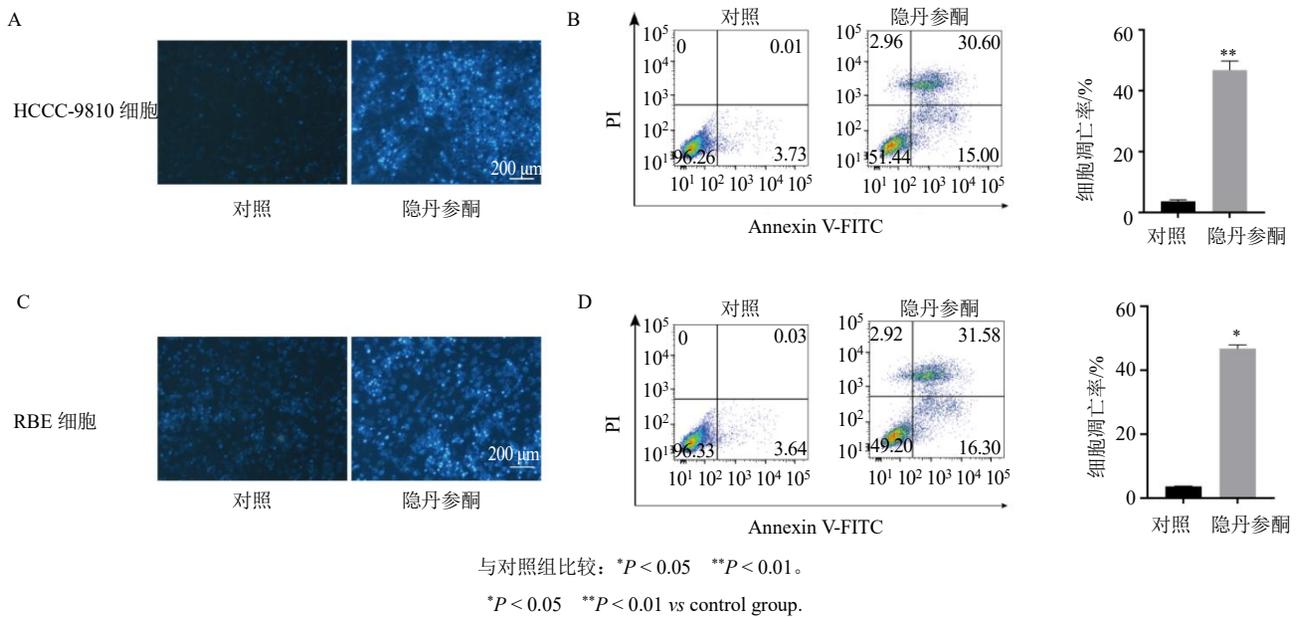


图 5 Hoechst 33342 染色观察隐丹参酮对胆管癌细胞凋亡形态学变化的影响 (A, C) 和流式细胞术检测隐丹参酮对胆管癌细胞凋亡率的影响 (B, D) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effects of cryptotanshinone on morphological changes of apoptotic cholangiocarcinoma cells by Hoechst 33342 staining (A, C) and effects of cryptotanshinone on apoptosis rate of cholangiocarcinoma cells detected by flow cytometry (B, D) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.6 隐丹参酮对胆管癌细胞凋亡相关蛋白的影响

经隐丹参酮干预后, cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 和 Bax 的表达均有所增加, 而 Bcl-2 的表达则相应减少 ($P < 0.05$), 见图 6。表明隐丹参酮可通过调控凋亡相关蛋白诱导胆管癌细胞凋亡。

2.7 隐丹参酮对胆管癌细胞 JAK/STAT 信号通路的影响

与对照组相比, 隐丹参酮干预并未显著改变 JAK2 及 STAT3 的总蛋白表达量; 但与对照组相比, 隐丹参酮组 p-JAK2、p-STAT3 水平均出现统计学意义上的显著降低 ($P < 0.05$)。当同时加入 JAK2 激活剂 BE 后, 隐丹参酮所引起的 p-JAK2 与 p-STAT3 表达下降被部分逆转 ($P < 0.05$), 表明隐丹参酮可通过拮抗 JAK2/STAT3 信号通路对胆管癌产生积极治疗作用, 见图 7。

2.8 隐丹参酮通过靶向 LASP1 抑制 JAK/STAT 信号通路对胆管癌细胞的影响

与 HIBEpic 细胞相比, HCCC-9810、RBE 细胞中 LASP1 的 mRNA 和蛋白水平均显著下调 ($P < 0.01$)。见图 8A。此外, 与对照组相比, 隐丹参酮组能显著上调 LASP1 蛋白表达 ($P < 0.01$), 见图 8B。同时, 与 si-NC 组相比, si-LASP1 组能明显降低 LASP1 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 见图 8C。与 si-NC 组相比, si-LASP1 组显著促进 HCC-9810 细胞活力并抑制凋亡 ($P < 0.01$); 而隐丹参酮能明显减弱 si-LASP1 诱导的细胞活力增加并抑制细胞凋亡 ($P < 0.01$)。对照组与 si-NC 组间的细胞凋亡差异无统计学意义, 见图 8D、E。以上结果表明, 隐丹参酮可能通过上调 LASP1 抑制 JAK/STAT 信号通路的激活, 从而在体外抑制胆管癌细胞的增殖并诱导凋亡。

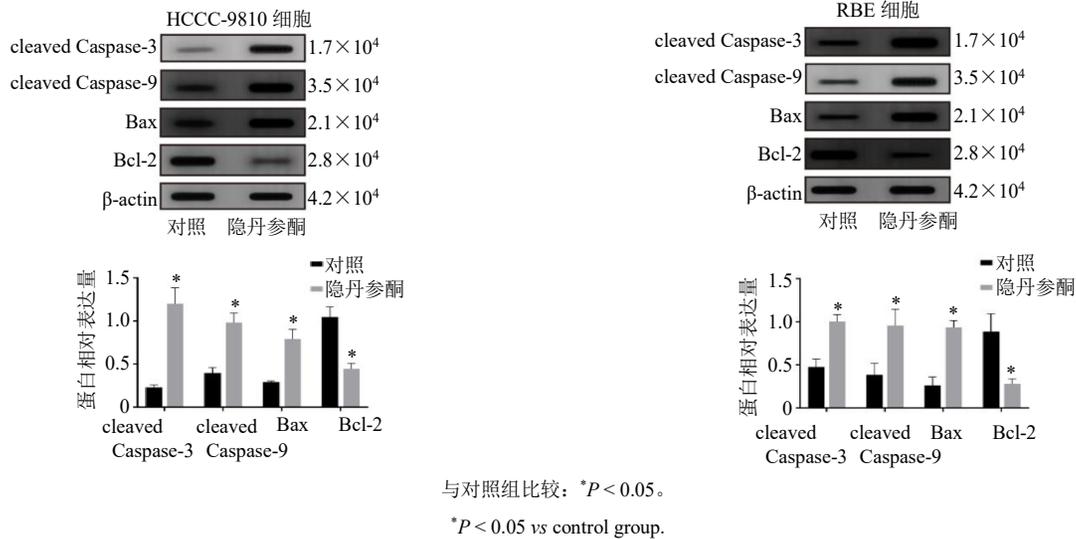


图 6 隐丹参酮对胆管癌细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effects of cryptotanshinone on apoptosis-related proteins in cholangiocarcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

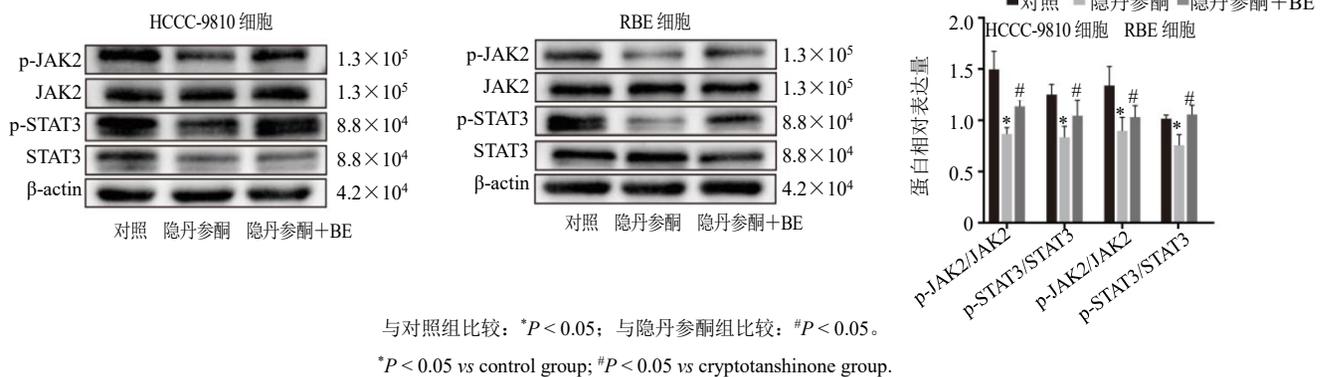
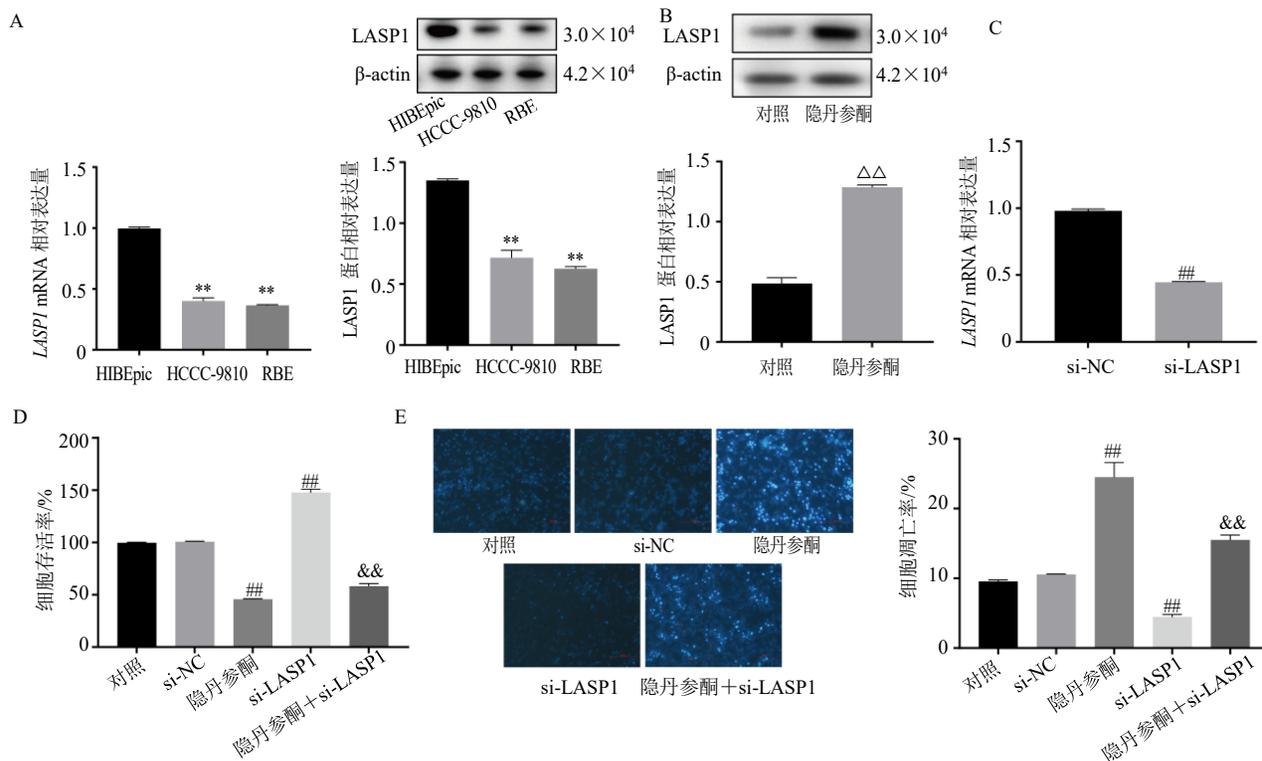


图 7 隐丹参酮对胆管癌细胞 JAK/STAT 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effects of cryptotanshinone on JAK/STAT signaling pathway in cholangiocarcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-LASP1 在胆管癌细胞中的表达, B-隐丹参酮处理后 HCCC-9810 细胞中 LASP1 表达, C-用 si-LASP1/si-NC 转染 HCCC-9810 细胞后 LASP1 mRNA 水平, D-多重药物干预对 HCCC-9810 细胞活力的影响, E-多重药物干预对 HCCC-9810 细胞凋亡的影响; 与 HIBEpic 组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 si-NC 组比较: $\#\# P < 0.01$; 与 si-LASP1 组比较: $\&\& P < 0.01$ 。

A-expression of LASP1 in cholangiocarcinoma cells, B-expression of LASP1 in HCCC-9810 cells after cryptotanshinone treatment, C-LASP1 mRNA levels in HCCC-9810 cells after transfection with si-LASP1/si-NC, D-effects of combined drug interventions on HCCC-9810 cell viability, E-effects of combined drug interventions on HCCC-9810 cell apoptosis; ** $P < 0.01$ vs HIBEpic group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $\#\# P < 0.01$ vs si-NC group; $\&\& P < 0.01$ vs si-LASP1 group.

图 8 隐丹参酮对 HCCC-9810 细胞 LASP1 蛋白和 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effects of cryptotanshinone on the protein and mRNA levels of LASP1 in HCCC-9810 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

隐丹参酮是一种提取自丹参根部的细胞渗透性二萜醌类化合物, 其二萜醌母核结构可与肿瘤细胞 DNA 结合, 提升细胞内自由基水平, 进而抑制肿瘤 DNA 合成, 最终阻碍肿瘤细胞增殖^[12]。已有研究证实, 隐丹参酮对多种人类癌症具有抗增殖及促凋亡活性, 但其对胆管癌细胞的具体抑制作用及相关机制尚不明确^[13]。为此, 本研究首次系统探讨了隐丹参酮对胆管癌细胞系的抗癌活性及其潜在机制, 并选用具有相似组织来源和培养特性的人肝内胆管癌细胞系进行验证。实验结果表明, 隐丹参酮可显著抑制胆管癌细胞生长 CCK-8 实验检测显示, 隐丹参酮以时间及剂量相关方式抑制 HCCC-9810 与 RBE 细胞活力, 其细胞毒性程度随浓度与孵育时间增加而增强。克隆形成实验进一步验证了隐丹参酮对细胞增殖的持续抑制。此外, 通过 Annexin V-FITC/PI 双染、Hoechst 33342 染色观察细胞形态特征以及细

胞周期分析证实, 隐丹参酮诱导的细胞死亡主要经由凋亡途径发生。上述结果一致表明, 隐丹参酮在体外对胆管癌具有显著且强烈的抗肿瘤作用。为探究隐丹参酮抑制细胞存活的机制, 本研究进行了药物处理下的细胞周期分布实验。细胞周期分析数据表明, 隐丹参酮处理导致 HCCC-9810 和 RBE 细胞在 G₂/M 期比例显著降低, 并伴随 S 期细胞比例的相应下降; Western blotting 检测进一步表明, 隐丹参酮能够下调 G₂/M 期关键检查点蛋白 CDK1 及 Cyclin B1 的表达水平, 这与流式细胞周期分析结果相符。Cyclin B1 在 G₂ 期积累并与 CDK1 结合形成复合物, 是驱动细胞进入 M 期的关键调节因子^[14]。本研究观察到 Cyclin B1 与 CDK1 表达下调, 进一步支持了隐丹参酮诱导 G₂/M 期阻滞的结论。上述结果提示, 隐丹参酮可通过下调 G₂/M 期相关蛋白的表达, 诱导胆管癌细胞发生 G₂/M 期阻滞, 进而抑制其增殖活性, 其具体上游信号通路及更精细的

分子靶点仍有待进一步探索。

细胞周期阻滞后,细胞可通过修复机制恢复稳态,或启动凋亡程序以维持组织完整性^[15]。凋亡过程主要经由死亡受体介导的外源性途径以及线粒体-凋亡小体触发的内源性途径两条通路执行,这两条通路的核心调控因子包括 Bcl-2 家族中的促凋亡与抗凋亡蛋白,以及一系列 Caspase 蛋白酶^[16]。无论外源性或内源性途径,最终均汇聚于 Caspase 激活。其中,启动型 Caspase 可进一步活化关键的执行型 Caspase-3,活化的 Caspase-3 能够切割多种细胞内底物,引发典型的凋亡形态学变化和 DNA 片段化,最终导致细胞凋亡^[17]。此外,定位于线粒体膜的 Bcl-2 家族蛋白可通过调节线粒体膜通透性,促进细胞色素 C 等凋亡因子的释放,进而激活下游 Caspase 级联反应,推动凋亡进程^[18]。本研究中,经隐丹参酮干预后 HCCC-9810、RBE 细胞中 Bcl-2/Bax 显著下调,同时伴随 Caspase-3 活性片段与 Caspase-9 的同步激活,提示线粒体依赖性凋亡通路在该化合物诱导的细胞死亡过程中发挥核心作用。

LASP1 是 LIM 蛋白家族的成员,最初通过人类乳腺癌组织的 cDNA 文库被发现^[19]。既往研究表明, LASP1 在所有正常组织中均有表达,并参与一系列细胞过程^[20]。1 项研究证实, LASP1 的过表达可加速 G₂/M 期转换,从而促进肿瘤发生^[21]。本研究发现与 HIBEpic 细胞相比, HCCC-9810 与 RBE 细胞中 LASP1 表达显著下调,这与多数报道中 LASP1 在宫颈癌、肝细胞癌和甲状腺癌等实体瘤中高表达并促进进展的模式有所不同^[22-24]。这种差异可能揭示了 LASP1 功能的肿瘤类型依赖性。越来越多的证据表明,同一分子在不同细胞背景或肿瘤微环境中扮演截然相反的角色^[25]。在本研究模型中,沉默 LASP1 可促进 HCCC-9810 细胞活力并抑制其凋亡。同时,隐丹参酮能够显著提高 LASP1 表达水平,并能明显减弱 si-LASP1 诱导的 HCCC-9810 细胞活力改变和凋亡抑制效应。这一结果提示,在胆管癌中, LASP1 可能具有不同于经典认知的独特功能,其具体机制值得在更广泛的临床样本和体内模型中进一步验证。其次需要指出的是,本研究使用一条 siRNA 进行 LASP1 功能回复实验。尽管其高效沉默效果已通过 RT-qPCR 证实,且表型与药物作用相反从而支持了 LASP1 的核心介导作用。但未来研究中使用多条独立 siRNA 或构建稳定敲低细胞系进行验证,将能更严格地排除脱靶效应,进一步

巩固本研究的结论。

JAK/STAT 信号通路的活化已被证实与细胞增殖、转移及血管生成呈正相关^[26]。此外, JAK2/STAT3 信号可通过上调 Bcl-2 和 Bcl-xL 等抗凋亡蛋白的表达直接参与细胞增殖与存活调控^[27]。因此,靶向 JAK/STAT 信号可能是针对包括胆管癌在内的人类癌症的潜在治疗策略。基于 JAK/STAT 信号在胆管癌中的重要作用,已有多种靶向该通路的抗癌药物被鉴定,其中部分已在实验条件下得到深入研究^[28-29]。本研究结果显示,隐丹参酮能够显著降低 p-JAK2、p-STAT3 的表达水平,且与 si-NC 相比,沉默 LASP1 显著增加了 HCCC-9810 细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达。综上,本研究认为隐丹参酮在胆管癌细胞中的抗癌活性可能部分通过上调 LASP1 抑制 JAK/STAT 信号通路的活化来介导。

隐丹参酮在传统医学中常用于治疗心血管疾病和肝炎。研究表明,隐丹参酮不影响非癌细胞的存活,且体内研究也未见其产生系统性毒性^[30]。因此,隐丹参酮可作为一种具有前景的抗癌药物。胆管癌是一种恶性程度高、预后差且缺乏有效治疗手段的肿瘤。此外,胆管癌细胞的高耐药性往往降低化疗药物的疗效。研究显示,胆管癌的化疗耐药可能与 JAK/STAT 信号通路有关,靶向抑制该通路可提高对化疗药物的敏感性^[31]。另有研究指出,隐丹参酮能够逆转乳腺癌和肺癌细胞的化疗耐药^[32-33]。鉴于本研究发现隐丹参酮能够通过抑制 JAK/STAT 信号通路,在体外有效且特异性地抑制胆管癌细胞的生长、侵袭及迁移过程并诱导其凋亡,其有望成为靶向 JAK/STAT 信号通路的潜在治疗药物。然而,部分可能治疗胆管癌的药物已被报道存在一定不良反应,如胃肠道反应和器官毒性^[34]。尽管本研究结果表明隐丹参酮可能具有抑制胆管癌进展的作用,但其潜在副作用仍需在未来研究中进一步探究。

综上所述,隐丹参酮可通过上调 LASP1 表达抑制 JAK/STAT 信号通路激活,从而诱导胆管癌细胞发生 G₂/M 期阻滞和线粒体途径凋亡,最终抑制其增殖、迁移与侵袭。研究结果有望为隐丹参酮作为靶向 LASP1/JAK/STAT 信号通路的潜在胆管癌治疗药物提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王云超,杨旭,杨晓波,等. 基于生物学行为的晚期胆

- 管癌靶向免疫治疗进展 [J]. 中国癌症防治杂志, 2021, 13(5): 469-476.
- [2] Wu J, Sheng J Y, Qin H J, *et al.* The application progress of patient-derived tumor xenograft models after cholangiocarcinoma surgeries [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 628636.
- [3] 陈小彬, 吴嘉艺, 黄理铭, 等. 肝内胆管细胞癌中 has_circ_0089153 的表达及其生物学功能 [J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(2): 199-207.
- [4] Moris D, Palta M, Kim C, *et al.* Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(2): 198-222.
- [5] Vignone A, Biancaniello F, Casadio M, *et al.* Emerging therapies for advanced cholangiocarcinoma: An updated literature review [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(21): 4901.
- [6] Lu Z H, Zhu G F, Feng X F, *et al.* Exploring the therapeutic potency of cryptotanshinone in cervical cancer: A multi-omics and network pharmacology approach [J]. *Front Genet*, 2024, 15: 1435132.
- [7] Luo Y, Song L, Wang X Y, *et al.* Uncovering the mechanisms of cryptotanshinone as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1264.
- [8] Park K H, Joo S H, Seo J H, *et al.* Licochalcone H induces cell cycle arrest and apoptosis in human skin cancer cells by modulating JAK2/STAT3 signaling [J]. *Biomol Ther*, 2022, 30(1): 72-79.
- [9] 陈家鑫, 蒋诗情, 陈芯媛, 等. 基于转录组测序技术探讨隐丹参酮对 A2780/DDP 顺铂耐药细胞的影响及潜在机制 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 546-557.
- [10] 余姿漫, 赵炳佳, 杨丹. JAK-STAT 信号通路与糖尿病并发症的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(10): 1590-1593.
- [11] Xue C, Yao Q F, Gu X Y, *et al.* Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: Autoimmune disorders and cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 204.
- [12] Li H Y, Gao C D, Liu C, *et al.* A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111332.
- [13] Liu X, Gao Y H, Yang F, *et al.* A review of cryptotanshinone and its nanoformulation in cancer therapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2025, 25(16): 1188-1197.
- [14] Song X H, Li N, Yang C J, *et al.* *Heliothis virescens* ascovirus 3h blocks the cell cycle of *Spodoptera exigua* fat body cells at G₂/M phase by downregulating cyclin B(1) and cyclin-dependent kinase 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(3): 1936-1947.
- [15] Pollak N, Lindner A, Imig D, *et al.* Cell cycle progression and transmitotic apoptosis resistance promote escape from extrinsic apoptosis [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(24): jcs258966.
- [16] Shi C X, Cao P, Wang Y K, *et al.* PANoptosis: A cell death characterized by pyroptosis, apoptosis, and necroptosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 1523-1532.
- [17] Nano M, Montell D J. Apoptotic signaling: Beyond cell death [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2024, 156: 22-34.
- [18] Hanson S, Dharan A, Jinsha P V, *et al.* Paraptosis: A unique cell death mode for targeting cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1159409.
- [19] Tomasetto C, Moog-Lutz C, Régnier C H, *et al.* Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains [J]. *FEBS Lett*, 1995, 373(3): 245-249.
- [20] Butt E, Howard C M, Raman D. *LASP1* in cellular signaling and gene expression: More than just a cytoskeletal regulator [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3817.
- [21] Chen Q, Wu K, Qin X, *et al.* *LASP1* promotes proliferation, metastasis, invasion in head and neck squamous cell carcinoma and through direct interaction with HSPA1A [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(2): 1626-1639.
- [22] Liu Y D, Geng X L. Long non-coding RNA (lncRNA) *CYTOR* promotes hepatocellular carcinoma proliferation by targeting the microRNA-125a-5p/*LASP1* axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 3666-3679.
- [23] Patterson M R, Meijers A S, Ryder E L, *et al.* E7-mediated repression of miR-203 promotes *LASP1*-dependent proliferation in HPV-positive cervical cancer [J]. *Oncogene*, 2024, 43(28): 2184-2198.
- [24] Zhang Y E, Liang Y N, Wu Y, *et al.* *CircTIAM1* overexpression promotes the progression of papillary thyroid cancer by regulating the miR-338-3p/*LASP1* axis [J]. *Oncol Res*, 2024, 32(11): 1747-1763.
- [25] McAndrews K M, Chen Y, Darpolor J K, *et al.* Identification of functional heterogeneity of carcinoma-associated fibroblasts with distinct IL6-mediated therapy resistance in pancreatic cancer [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(6): 1580-1597.
- [26] Hu X Y, Li J, Fu M R, *et al.* The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 402.
- [27] Duan Z D, Zheng L Y, Jia Q Y, *et al.* Effect of scutellarin on BV-2 microglial-mediated apoptosis in PC12 cells via JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 13430.

- [28] Lin L L, Chen Q. Yadanziolide a inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via JAK-STAT pathway: A preclinical study [J]. *Biology*, 2024, 13(7): 528.
- [29] Li Y Y, Wang M M, Bai J J, *et al.* Anthocyanins in black soybean coats promote apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by regulating the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1070.
- [30] Tung M C, Chang G M, Dai W C, *et al.* Cryptotanshinone suppresses the STAT3/BCL-2 pathway to provoke human bladder urothelial carcinoma cell death [J]. *Environ Toxicol*, 2025, 40(4): 624-635.
- [31] Ellis H, Braconi C, Valle J W, *et al.* Cholangiocarcinoma targeted therapies: Mechanisms of action and resistance [J]. *Am J Pathol*, 2025, 195(3): 437-452.
- [32] Cao L, Hong W P, Cai P H, *et al.* Cryptotanshinone strengthens the effect of gefitinib against non-small cell lung cancer through inhibiting transketolase [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 890: 173647.
- [33] Ni W T, Fan H, Zheng X Q, *et al.* Cryptotanshinone inhibits ER α -dependent and-independent BCRP oligomer formation to reverse multidrug resistance in breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 624811.
- [34] Speckart J, Rasmusen V, Talib Z, *et al.* Emerging therapies in management of cholangiocarcinoma [J]. *Cancers*, 2024, 16(3): 613.

【责任编辑 金玉洁】