

莪术醇对乳腺癌细胞增殖凋亡及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

马春兰, 张宝亮, 张常虹

(青海省第五人民医院, 青海 西宁 810007)

摘要: [目的] 探讨莪术醇对乳腺癌细胞增殖凋亡及 JAK2/STAT3 信号通路的影响。[方法] 以不同浓度 (0、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$) 莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞, MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖抑制率, 流式细胞术观察细胞周期凋亡分布, Hoechst33258 染色法观察细胞凋亡形态学变化, 逆转录聚合酶链反应法检测细胞酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号转导子和转录激活因子 3 (STAT3) 信使核糖核酸相对表达量, 蛋白印迹法检测细胞磷酸化 JAK2 (P-JAK2)、磷酸化 STAT3 (P-STAT3) 蛋白相对表达量。[结果] 莪术醇对 MCF-7 细胞增殖具有明显抑制作用, 且抑制率随药物作用时间及作用浓度的增加而上升。随着莪术醇作用浓度的增加, 细胞凋亡率也有所上升 [(4.27% $\pm$ 0.82%)、(4.54% $\pm$ 1.21%)、(19.32% $\pm$ 1.87%)、(29.58% $\pm$ 2.92%)、(33.74% $\pm$ 3.91%)、(42.94% $\pm$ 2.81%)]。细胞周期结果显示, 莪术醇可将细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 从而抑制细胞增殖。Western blot 结果显示, 莪术醇可抑制 JAK2、STAT3 磷酸化的表达, 而 RT-PCR 结果显示, 莪术醇作用细胞后, JAK2、STAT3 mRNA 表达受到明显抑制。[结论] 莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 G0/G1 期, 从而抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能是通过 JAK2/STAT3 信号通路来实现。

关键词: 莪术醇; 乳腺癌; JAK2/STAT3; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0616-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B010

Effect of Curcuminol on JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Breast Cancer Cells

MA Chun-lan, ZHANG Bao-liang, ZHANG Chang-hong

(Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810007, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of curcuminol on JAK2/STAT3 signaling pathway in breast cancer cells. [Methods] Breast cancer MCF-7 cells were treated with different concentrations of curcuminol (0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). The proliferation inhibition rate of MCF-7 cells was detected by MTT assay. Cell apoptosis was observed by flow cytometry. Hoechst33258 staining method was used to observe the morphological changes of cell apoptosis. The relative expression of JAK2 and STAT3 mRNA was detected by RT-PCR. The relative expression of P-JAK2 and P-STAT3 protein was detected by Western blot. [Results] The curcuminol had a significant inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells, and the inhibition rate increased with the time and concentration of the drug. As the concentration of curcuminol increased, the apoptosis rate also increased [(4.27% $\pm$ 0.82%), (4.54% $\pm$ 1.21%), (19.32% $\pm$ 1.87%), (29.58% $\pm$ 2.92%), (33.74% $\pm$ 3.91%), (42.94% $\pm$ 2.81%)]. Cytometry showed that curcuminol arrested the cell cycle in G0/G1 phase, thereby inhibiting cell proliferation. Western blot showed that curcuminol inhibited the expression of JAK2 and STAT3 phosphorylation, and RT-PCR showed that JAK2 and STAT3 mRNA expression was significantly inhibited after cells were treatment with curcuminol. [Conclusion] Curcuminol acts on G0/G1 phase of breast cancer MCF-7 cells, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis, in which JAK2/STAT3 signaling pathway may be involved.

Subject words: curcuminol; breast cancer; JAK2/STAT3; apoptosis; cell proliferation

莪术醇是从中药材莪术中分离出的一种倍萜类

化合物, 已有研究表明, 莪术醇对多种肿瘤均具有一定作用^[1]。AK 酪氨酸蛋白激酶-信号传导和转录激活因子 (Janus kinase- signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 是细胞因子信号传导的

通信作者: 马春兰, 副主任药师, 本科; 青海省第五人民医院药剂科, 青海省西宁市城东区南山东路 166 号 (810007); E-mail: 1649663641@qq.com

收稿日期: 2019-09-10; **修回日期:** 2019-11-08

重要途径,而 JAK2/STAT3 作为 JAK-STAT 通路中的一个重要信号轴,其在机体生长发育中发挥着重要作用^[2-3]。JAK2/STAT3 信号通路在许多实体肿瘤的发展中起到关键作用。本研究通过探讨莪术醇对乳腺癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响,旨在为临床治疗乳腺癌提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器

细胞株:人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中国科学院上海生命科学研究。

主要试剂:莪术醇(上海泽瑞制药有限公司);DMEM、胎牛血清、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶、青霉素、链霉素(美国 Sigma 公司);MTT 试剂盒、Hoechst 33258、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);Trizol(Invitrogen 公司);TakaRa 两步法 RT-PCR 试剂盒、SYBR RT-PCR 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司);兔抗磷酸化 JAK2 (P-JAK2)、兔抗磷酸化 STAT3 (P-STAT3)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、兔抗 GAPDH(武汉博士德生物工程有限公司);ECL 高效化学发光试剂盒(美国 Genview 公司)。JAK2 上游引物序列:5'-AGCCTATCGGCATGGAATATCT-3', JAK2 下游引物序列:5'-TAACACTGCCATCCCAAGACA-3', STAT3 上游引物序列:5'-ATCACGCCTTCTACAGACTGC-3', STAT3 下游引物序列:5'-CATCCTGGAGATTCTCTACCACT-3', 内参 β -actin 上游引物序列:5'-GAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3', 内参 β -actin 下游引物序列:5'-CGATGCCGTCTCGATGGGG-3'。

主要仪器:光学显微镜(Nikon YS100,日本奥林巴斯公司);Real-time PCR 仪(MX3000P,美国 Gene 公司);LabCycler PCR (德国 Sensoquest 公司);Bio Rad 450 酶标仪(美国 Bio Rad 公司);FACS 流式细胞仪(美国 BD 公司);JY-SCZ2 型 SDS-PAGE 蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);徕卡 TCS SP5 激光共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司)。

1.2 实验方法

细胞培养:于六孔板中培养 MCF-7 细胞,培养基为含 10%胎牛血清完全培养基(每 100ml 培养基

含 10ml 胎牛血清、0.2g 链霉素、0.2g 青霉素),培养条件为 37℃,5%CO₂,细胞单层贴壁培养,待细胞长满至 80%时进行传代培养。

MTT 法细胞增殖实验:取对数生长期 MCF-7 细胞,以 2.5×10^5 /ml 浓度接种于 96 孔板中,每孔 199 μ l,共 6 组。培养 24h 后,4 组加入不同浓度的莪术醇药物,药物作用浓度为 12.5、25、50、100 μ g/ml,同时设置正常对照组(不加入莪术醇)和溶剂对照组(加入 1 μ l DMSO)。处理 24、48、72h 后进行 MTT 实验,于酶联免疫检测仪 490nm 处检测各孔的吸光度(OD)值。细胞增殖抑制率=1-(加药组 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照 OD 值-调零孔 OD 值)×100%。

Hoechst33258 染色法:取对数生长期 MCF-7 细胞,以 1×10^6 /ml 浓度接种于 6 孔板,组别设置同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后涂片于载玻片上,Hoechst33258 染色 5min,PBS 洗涤,封片,于共聚焦显微镜下观察(激发波长 350nm,发射波长 460nm)。

细胞凋亡实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后,用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色,流式细胞仪检测荧光强度。

细胞周期实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后加入 4%多聚甲醛,于 4℃下固定过夜,次日离心,去上清液,根据周期试剂盒说明书进行操作并上机检测。

Western blot 实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,提取总蛋白并测定浓度。根据 Western blot 试剂盒说明书进行电泳、转膜、封闭,采用 1:300 比例稀释后的兔抗 (P-JAK2、P-STAT3 和 GAPDH)孵育过夜。次日 TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗,孵育 2h 后进行成像,并采用 Image J 软件进行灰度值分析。根据内参标准计算目标条带相对值,判断蛋白相对表达量。

RT-PCR 实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞。采用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并根据反转录试剂盒进行反转录反应,根据 SYBR RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。反应体系为:95℃ 预变性 30s,95℃ 5s,60℃ 30s,循环 35 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来测定各组 JAK2、STAT3 和 GAPDH 基因相对表达量,内参 GAPDH,每个样本重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 计量数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间各指标的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较, 若方差齐采用 LSD-*t* 检验, 若方差不齐采用 Dunnett-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 莪术醇对 MCF-7 细胞增殖的影响

同一时间点, 正常对照组与 DMSO 溶剂对照组细胞增殖抑制率比较无统计学差异 ($P>0.05$)。随着莪术醇浓度增加, MCF-7 细胞增殖抑制率也有所上升 (Table 1)。

2.2 莪术醇对 MCF-7 细胞形态的影响

正常对照组和 DMSO 溶剂对照组细胞核呈淡蓝色且荧光亮度均匀。莪术醇处理组中, 随着处理浓度增加, 细胞数量明显减少, 并出现凋亡细胞形态, 如荧光色深, 呈亮蓝色, 细胞间界模糊等 (Figure 1)。

2.3 莪术醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响

正常对照组和 DMSO 组凋亡率为 (4.27% $\pm$ 0.82%), (4.54% $\pm$ 1.21%), 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而莪术醇 12.5、25、50、100 μ g/ml 处理组凋亡率分别为 (19.32% $\pm$ 1.87%), (29.58% $\pm$ 2.92%), (33.74% $\pm$ 3.91%), (42.94% $\pm$ 2.81%), 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率也有所增加 ($F=121.388$, $P<0.001$) (Figure 2)。

2.4 莪术醇对 MCF-7 细胞周期的影响

DMSO 溶剂对照组与正常对照组比较, 各个周期比例无统计学差异 ($P>0.05$), 而莪术醇处理组 G₀/G₁ 期比例增加, 而 S 期及 G₂/M 期比例有所下降, 并表现出一定的浓度依赖性 (Table 2)。

2.5 莪术醇对 MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达的影响

DMSO 溶剂对照组与正

常对照组比较, MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白相对表达量无统计学差异 ($P>0.05$); 而莪术醇处理组 MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白相对表达量有所下降, 且药物浓度越高, 蛋白相对表达量越低 (Table 3, Figure 3)。

Table 1 Proliferation inhibition rate of MCF-7 under different concentrations of curcumin ($\bar{x}\pm s$, %)

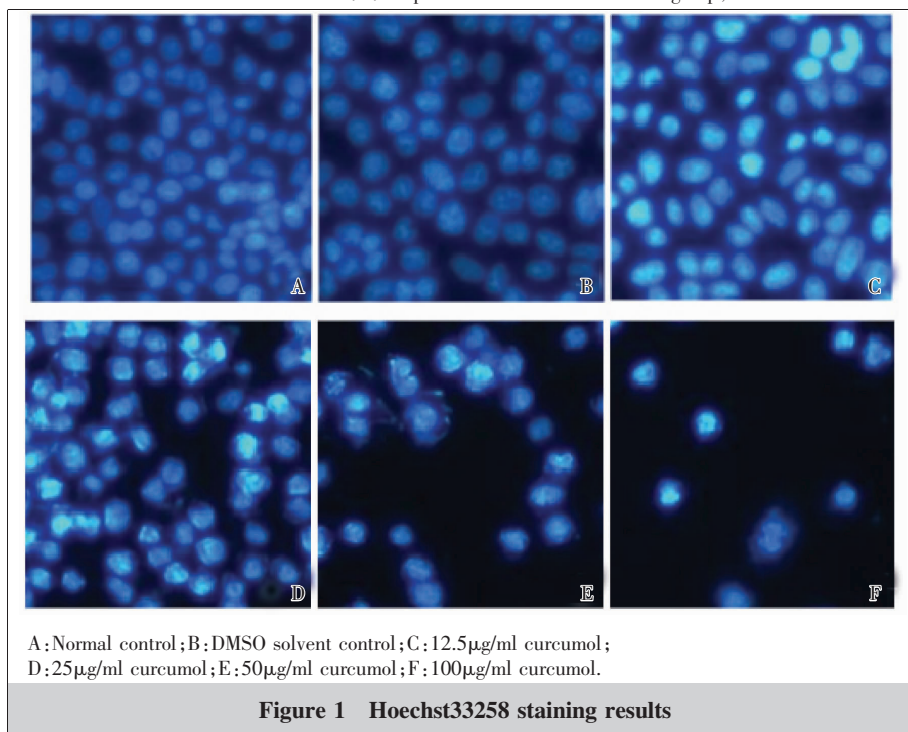
Group	24h	48h	72h
Normal control	0.03 $\pm$ 0.14	0.02 $\pm$ 0.27	0.02 $\pm$ 0.18
DMSO solvent control	0.04 $\pm$ 0.21	0.03 $\pm$ 0.19	0.02 $\pm$ 0.14
12.5 μ g/ml curcumin	3.71 $\pm$ 1.24*	5.78 $\pm$ 2.93*	6.64 $\pm$ 2.16*
25 μ g/ml curcumin	13.98 $\pm$ 2.45*	17.34 $\pm$ 2.78*	21.92 $\pm$ 2.13*
50 μ g/ml curcumin	28.96 $\pm$ 3.37*	34.74 $\pm$ 3.92*	51.12 $\pm$ 4.22*
100 μ g/ml curcumin	38.71 $\pm$ 6.62*	47.63 $\pm$ 5.28*	68.55 $\pm$ 5.49*
<i>F</i>	76.259	117.841	262.619
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

Table 2 Effect of curcumin on cell cycle of MCF-7 ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Normal control	57.24 $\pm$ 0.21	38.49 $\pm$ 0.22	4.27 $\pm$ 0.31
DMSO solvent control	56.98 $\pm$ 0.34	38.13 $\pm$ 0.29	4.89 $\pm$ 0.44
12.5 μ g/ml curcumin	65.21 $\pm$ 0.42*	33.26 $\pm$ 0.50*	1.53 $\pm$ 0.22*
25 μ g/ml curcumin	67.98 $\pm$ 0.49*	30.84 $\pm$ 0.25*	1.18 $\pm$ 0.13*
50 μ g/ml curcumin	73.47 $\pm$ 0.17*	25.43 $\pm$ 0.25*	1.10 $\pm$ 0.16*
100 μ g/ml curcumin	78.45 $\pm$ 0.22*	20.56 $\pm$ 0.17*	0.99 $\pm$ 0.23*
<i>F</i>	2047.057	1691.307	129.452
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$



2.6 莪术醇对 MCF-7 细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达的影响

DMSO 溶剂对照组与正常对照组比较, MCF-7

细胞 JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量无统计学差异 ($P>0.05$); 莪术醇处理组 MCF-7 细胞 JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量有所下降, 且药物浓度越高, mRNA 相对表达量越低 (Table 4)。

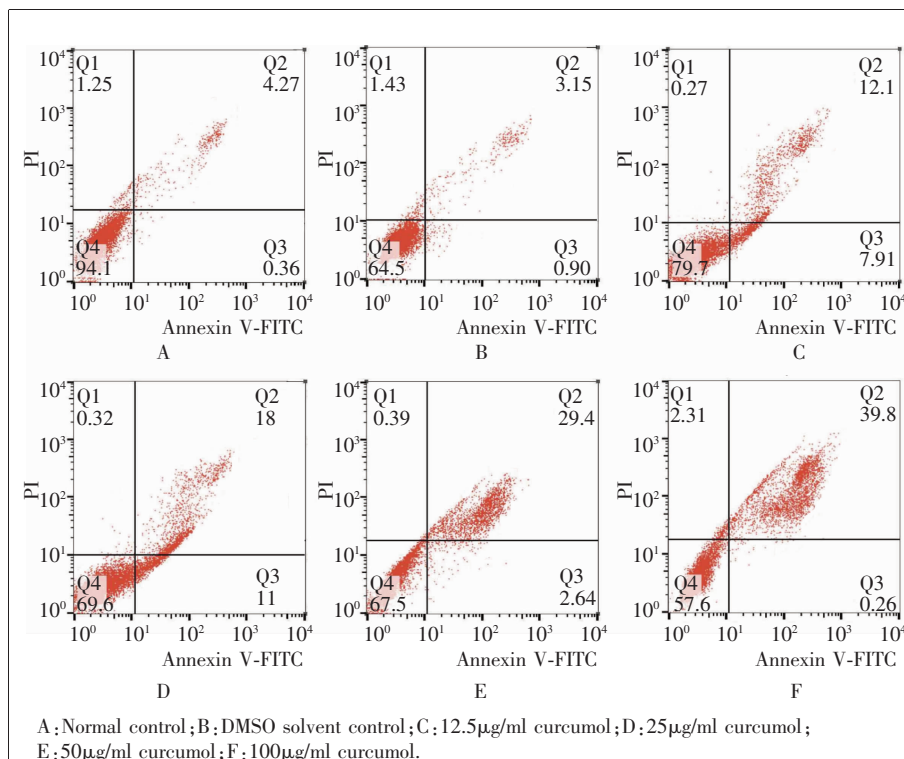


Figure 2 Result of apoptosis of curcuminol on MCF-7 cell cycle

Table 3 Effect of curcuminol on expression of P-JAK2 and P-STAT3 proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	p-JAK2	p-STAT3
Normal control	0.82±0.12	0.78±0.16
DMSO solvent control	0.79±0.16	0.73±0.21
12.5μg/ml curcuminol	0.51±0.09*	0.49±0.12*
25μg/ml curcuminol	0.32±0.11*	0.33±0.10*
50μg/ml curcuminol	0.21±0.07*	0.24±0.08*
100μg/ml curcuminol	0.08±0.03*	0.18±0.11*
F	25.492	10.227
P	<0.001	0.0005

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

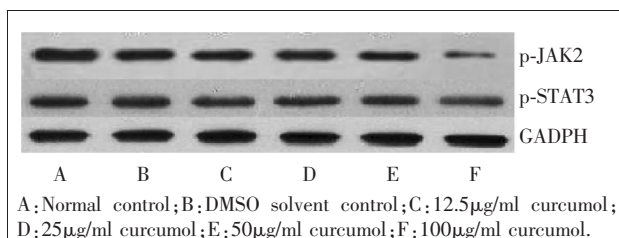


Figure 3 Expression of P-JAK2 and P-STAT3 protein in MCF-7 cell by Western blot

3 讨论

近年来已有大量文献报道一些中草药的活性成分可通过抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡来达到治疗肿瘤的目的^[4-5]。莪术醇是一类从中药植物莪术中提取的活性成分, 临床研究发现, 其对多种实体肿瘤均具有抑制增殖的作用, 如肺癌、胃癌、卵巢癌等^[6-7]。研究表明, 莪术醇可直接杀伤肿瘤细胞, 同时其还可通过提高机体免疫功能、抑制新血管生成以及核酸代谢, 并诱导细胞凋亡从而达到抗肿瘤作用^[8]。本研究结果发现莪术醇可

呈药物依赖性抑制 MCF-7 细胞的增殖, 并促进其凋亡。研究进一步通过细胞周期实验检测, 结果显示, 莪术醇可能是通过将 MCF-7 细胞阻滞在 G0/G1 期, 从而发挥其抑制作用。

JAK 家族是一类非受体酪氨酸激酶家族, 主要包括 4 个成员: JAK1、JAK2、JAK3 以及 TYK4。STAT 是 JAK 的下游信号, 具有信号转导功能和转录活化功能^[9]。JAK/STAT 信号通路正常活化途径为: 由细胞因子组成的配体通过与靶细胞上的受体相结合从

Table 4 Effect of curcuminol on expression of JAK2 and STAT3 mRNA in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	JAK2	STAT3
Normal control	2.51±0.24	1.87±0.35
DMSO solvent control	2.56±0.31	1.85±0.29
12.5μg/ml curcuminol	2.21±0.24*	1.58±0.18*
25μg/ml curcuminol	1.83±0.17*	1.17±0.24*
50μg/ml curcuminol	1.26±0.21*	0.82±0.12*
100μg/ml curcuminol	0.87±0.17*	0.35±0.09*
F	27.298	20.886
P	<0.01	<0.01

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

而形成多聚体,并在胞浆内形成 JAKs 结合位点, JAKs 通过与其相结合进而磷酸化并活化,进而促进带有酪氨酸的蛋白磷酸化,并产生激酶活化的级联反应,将活化的信号传导给 STATs,诱导 STATs 磷酸化,并进一步将活化信号转移到细胞核内,从而与目的 DNA 启动子上的特异性反应元件相结合,诱导目的基因的表达及转录,最终促进蛋白质合成,启动细胞内的信号转导^[10-11]。研究表明, JAK/STAT 信号通路持续活化可能是肿瘤细胞异常增殖的机制之一^[11],而 JAK2/STAT3 作为 JAK-STAT 通路中的一个重要信号轴,已有研究证实, JAK2/STAT 通路参与多种肿瘤细胞的增殖与凋亡^[12]。研究发现, JAK2/STAT3 参与乳腺癌的发生发展,而 STAT3 活化与非受体酪氨酸的活化存在密切联系, JAK2 参与调节 STAT3 的活化^[13]。本研究通过 Western blot 法及 RT-PCR 探讨了莪术醇对 MCF-7 细胞 JAK2/STAT3 通路的影响,莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后,可抑制 STAT3 表达及磷酸化,最终抑制 MCF-7 细胞的 JAK2/STAT3 信号轴,从而达到抗肿瘤的作用。

综上所述,莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 G0/G1 期,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能是通过 JAK2/STAT2 信号通路来实现。但关于莪术醇是否通过其他通路或多通路结合来达到抑制乳腺癌细胞的增殖,以及这些通路与 JAK2/STAT3 通路的相关性目前尚不清楚,仍需后续研究加以探讨。

参考文献:

- [1] Wang H, Wang Y, Jiang X, et al. The molecular mechanism of curcumin on inducing cell growth arrest and apoptosis in Jurkat cells, a model of CD4 + T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 375-382.
- [2] Xie YL, Tao WH, Yang TX, et al. Anticancer effect of curcumin B on MKN-45 cells via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2709-2715.
- [3] Li W, Saud SM, Young MR, et al. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1-2): 63-73.
- [4] Wang H, Chen X, Li T, et al. Amyrinsol diterpene isolated from a traditional herbal medicine, LANGDU reverses multidrug resistance in breast cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(12): 1-5.
- [5] Chen XX, Lam KH, Chen QX, et al. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 110(12): 49-61.
- [6] Wang J, Li XM, Bai Z, et al. Curcumin induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt /GSK3 β /cyclin D1 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210(1): 1-9.
- [7] Zang SL, Tang QL, Dong FR, et al. Curcumin inhibits the proliferation of gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via downregulation of IDH1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3583-3591.
- [8] Tang QL, Guo JQ, Wang QY, et al. Curcumin induces apoptosis in SPC-A-1 human lung adenocarcinoma cells and displays anti-neoplastic effects in tumor bearing mice[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2307-2312.
- [9] Xu L, Lao Y, Zhao Y, et al. Screening active compounds from garcinia species native to china reveals novel compounds targeting the STAT /JAK signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2015; 910453.
- [10] Springuel L, Renauld JC, Knoop L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications[J]. *Haematologica*, 2015, 100(10): 1240-1253.
- [11] Rodriguez-Barrueco R, Yu J, Saucedo-Cuevas LP, et al. Inhibition of the autocrine IL6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(5): 1631-1648.
- [12] Su D, Gao YQ, Dai WB, et al. Helicteric acid, oleanic acid, and betulinic acid, three triterpenes from helicteres angustifolia L, inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells via suppressing NF- κ B and STAT3 signaling[J]. *Evi Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 5180707.
- [13] Liu X, Xiao Q, Bai X, et al. Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2760-2768.