

# 没食子乙醇提取物对结肠癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路的调控作用研究<sup>△</sup>

阿丽亚·依拉木<sup>1\*</sup>, 阿布都艾则孜·艾尔肯<sup>1</sup>, 闫波<sup>2</sup>, 艾尔菲丁·阿尼娃尔<sup>1</sup>, 木巴拉克·伊明江<sup>1#</sup>(1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)03-0326-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.03.12



**摘要** 目的 基于蛋白酪氨酸激酶2(JAK2)/信号传导及转录活化因子3(STAT3)信号通路研究没食子乙醇提取物对结肠癌细胞 HCT-116、Caco-2 增殖、迁移的调控机制。方法 采用 CCK-8 法检测 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 没食子乙醇提取物作用 12、24、48、72 h 后对 HCT-116、Caco-2 细胞增殖的影响。以 0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子乙醇提取物作用于 HCT-116、Caco-2 细胞 24 h 后, 采用划痕实验测定细胞的迁移情况, 采用荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平, 采用酶联免疫吸附法检测细胞上清液中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平, 采用 Western blot 法检测细胞中 JAK2、STAT3 磷酸化水平和 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达水平。结果 与空白对照比较, 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 没食子乙醇提取物作用 12、24、48、72 h 后均可显著抑制细胞增殖( $P < 0.05$ )。0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子乙醇提取物作用 24 h 后, 2 种细胞的划痕愈合率和细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 以及细胞中 JAK2、STAT3 磷酸化水平和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ); 细胞内 ROS 水平、Bax 蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ )。结论 没食子乙醇提取物可抑制结肠癌细胞 HCT-116、Caco-2 的增殖和迁移, 其机制可能与增加细胞内 ROS 的积累, 下调肿瘤微环境中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达和 JAK2/STAT3 信号通路中 JAK2、STAT3 的磷酸化水平, 进而下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 Bax 蛋白表达有关。

**关键词** 没食子乙醇提取物; 结肠癌细胞; 炎症因子; 活性氧; 蛋白酪氨酸激酶 2/信号传导及转录活化因子 3 信号通路

## Study on regulation of ethanol extract of Turkish Galls on JAK2/STAT3 signaling pathway in colorectal cancer cells

Aliya · Elham<sup>1</sup>, Abdulaziz · Arken<sup>1</sup>, YAN Bo<sup>2</sup>, Arfidin · Anwar<sup>1</sup>, Mubarak · Iminjan<sup>1</sup> (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the regulatory mechanism of ethanol extract of Turkish Galls on proliferation and migration of colorectal cancer cells HCT-116 and Caco-2 based on janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **METHODS** CCK-8 method was used to detect the effects of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/mL ethanol extract of Turkish Galls on the proliferation of HCT-116 and Caco-2 cells after treated for 12, 24, 48 and 72 h. After treated with 0.1, 0.3, 0.5 mg/mL ethanol extract of Turkish Galls for 24 h, the migrations of HCT-116 and Caco-2 cells were detected by scratch test; the level of reactive oxygen species (ROS) was detected by fluorescent probe method. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in cell supernatant were detected by ELISA. The phosphorylations of JAK2 and STAT3 as well as the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated protein X (Bax) were detected by Western blot assay. **RESULTS** Compared with blank control, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/mL ethanol extract of Turkish Galls could significantly inhibit cell proliferation after treated for 12, 24, 48, 72 h ( $P < 0.05$ ). After treated with 0.1, 0.3 and 0.5 mg/mL ethanol extract of Turkish Galls for 24 h, the scratch healing rate of 2 kinds of cells, the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the cell supernatant, the phosphorylation of JAK2 and STAT3 as well as the expression of Bcl-2 protein were all significantly decreased ( $P < 0.05$ ); the level of ROS and protein expression of Bax were increased significantly ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** The ethanol extract of Turkish Galls can inhibit the proliferation and migration of HCT-116 and Caco-2 cells. The mechanism may be related with down-regulation of protein expression of Bcl-2 and up-regulation of protein expression of Bax by increasing the accumulation of intracellular ROS, down-regulating the expressions of inflammatory factors IL-6 and TNF- $\alpha$  and the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in JAK2/STAT3 signaling pathway.

<sup>△</sup> 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (No.2021D01C259)

\* 硕士研究生。研究方向: 天然药物抗肿瘤作用机制。电话: 0991-2110360。E-mail: 965175578@qq.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 天然药物抗肿瘤作用机制。电话: 0991-2110360。E-mail: 896612093@qq.com

**KEYWORDS** ethanol extract of Turkish Galls; colorectal cancer cell; inflammatory factor; reactive oxygen species; janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway

结肠癌是消化系统最常见的、具有较高发病率和病死率的恶性肿瘤之一,其发病是多基因、多因素参与的复杂过程<sup>[1]</sup>。相关数据显示,在2020年,结肠癌的发病率已高居世界第4位,每年约有115万人被诊断为结肠癌<sup>[2]</sup>。手术切除、辅助化疗是临床治疗结肠癌的主要手段,但在治疗过程中其复发率和转移率较高,总体预后不理想<sup>[3]</sup>。中药治疗结肠癌在改善患者术后状态、降低毒副作用、提高化疗效率等方面具有一定优势,因此,安全又经济的天然药物成为了抗肿瘤药物研究的热点<sup>[4-6]</sup>。

没食子为瘿蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctoriae* Oliv.的幼虫寄生于壳斗科栎属植物没食子树 *Quercus infectoria* Oliv.幼枝上产生的虫瘿,在民间具有悠久的临床应用历史,常用于治疗盗汗咳嗽、咯血便血、口疮齿痛等<sup>[7]</sup>。没食子中多酚类化学成分的含量为50%~70%、没食子酸的含量为2%~4%,另外还有类黄酮、三烯类、挥发油类、皂苷类、生物碱类、萘醌类、多糖类、鞣花酸及树脂等成分<sup>[7]</sup>。据报道,没食子能够通过减少细胞炎症因子的分泌而减轻炎症损伤,并通过清除自由基增强组织的抗氧化活性,改善促炎因子与抗炎因子之间的失衡,修复损伤部位<sup>[8]</sup>。研究证实,没食子能够通过抑制Janus激酶(janus kinase, JAK)/信号传导及转录活化因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)途径治疗炎症性肠病<sup>[9]</sup>。JAK/STAT信号通路参与了肿瘤细胞中多种生物变异过程的调控,该通路的过度激活与结肠癌的发生发展有密切联系<sup>[10]</sup>。

在前期研究中,本课题组采用丙酮、乙醇、甲醇和水4种溶剂对没食子药材进行提取,得到了成分组成相同但含量不同的4种提取物,并通过体外药效学实验证实了没食子乙醇提取物对人结肠癌细胞HCT-116、Caco-2的增殖抑制作用最强。因此,本研究以没食子乙醇提取物(后文简称为“没食子醇提物”)为研究对象,检测其对HCT-116、Caco-2细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累, JAK2/STAT3信号通路上游炎症因子白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和通路相关蛋白JAK2、磷酸化JAK2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)的表达,以及通路下游B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)表达的影响,为没食子治疗结肠癌的机制研究和临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括Multiskan GO型全长酶标仪、Forma371型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),H17502型高速离心机(湖南湘仪科学仪器有限公司),HHS-11-1型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司),MAX-A6003型电子天平(深圳无量衡器有限公司),SX-500型高压灭菌锅(北京天美科学

仪器有限公司),TS2型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司),PP-1150 Power B型蛋白电泳仪和转膜仪(北京凯元信瑞仪器有限公司),FluorChem E Alpha型化学发光凝胶成像系统(美国Protein Simple公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对照品(纯度99.0%)、RIPA高效裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号1209KG022、R0010、PC0020、PE0020);高糖DMEM细胞培养基、进口澳洲胎牛血清、100 $\times$ 青霉素/链霉素双抗混合液、胰蛋白酶-EDTA、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、谷氨酰胺(以色列BI公司,批号分别为2043176、04-002-1C、03-031-5B/C、03-050-1BCS、2038149、03-42-3BC);CCK-8试剂盒、活性氧荧光探针(DCFH-DA)试剂盒(美国Sigma公司,批号分别为7010000、BL714A);IL-6酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL14113、JL10208);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳快速制备试剂盒(北京博泰斯生物技术有限公司,批号WB2101)、脱脂奶粉(德国BioFroxx公司,批号1172GR100)、预染蛋白Marker(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号26616);兔源Bcl-2、Bax、JAK2、p-JAK2、STAT-3、p-STAT-3单克隆抗体(美国CST公司,批号分别为4223T、2772T、3230T、3771S、4904T、9145T);兔源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体、山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为BS-0061R、BS-40295G-HRP)。

### 1.3 药材

没食子药材于2016年购自广州市,由新疆医科大学药学院天然药物化学与生药学教研室帕丽达教授鉴定为真品,标本保存于新疆医科大学协同创新中心实验室药剂组,标本号为20160305。

### 1.4 细胞

人结肠癌细胞株HCT-116和Caco-2均购买于武汉普诺赛生物科技有限公司,批号分别为201201D11、201228D50,收到后常规传至第3代备用。

## 2 方法

### 2.1 没食子醇提物的制备

采用文献[11]报道的提取方法,取没食子干燥果实适量,粉碎成80目细粉;取50 g细粉,加入8倍量(以mL/g计)无水乙醇加热回流提取3次、每次0.5 h;合并3次提取液,减压浓缩(50 $^{\circ}$ C)并干燥成浸膏(浸膏得率为77.96%),即得没食子醇提物[其中多酚类成分的总含量为(447.59 $\pm$ 2.64) mg/g,没食子酸的含量为(71.18 $\pm$ 0.41) mg/g],使用时用PBS溶解并稀释成相应质量浓度的工作液。

## 2.2 细胞培养

将细胞接种在含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素双抗的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>无菌培养箱中常规培养,每隔1~2d换液1次。待细胞生长至皿面积的70%左右时,用胰酶消化传代(其中HCT-116细胞消化1min,Caco-2细胞消化5min)。待细胞贴壁后,再进行相关实验。

## 2.3 细胞增殖活性检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长的HCT-116、Caco-2细胞,胰酶消化后计数,分别以每孔2000个细胞均匀接种在96孔板中。常规培养24h待细胞贴壁后,吸弃培养液。将细胞分为空白对照组(不加任何药物处理培养的细胞)、5-FU组[阳性对照,预实验得5-FU干预2种细胞24h时的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)≈0.05mg/mL,因此本研究中将其质量浓度设为0.05mg/mL]和不同质量浓度(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL,质量浓度根据前期预实验设置)的没食子醇提取物组,每组平行设置4个复孔;并另设空白调零孔(不加细胞、只加培养液)。分别在培养12、24、48、72h时,根据说明书每孔加入适量用培养液稀释过的CCK-8溶液,将细胞置于培养箱中静置2h后,用酶标仪在450nm波长下测定各孔的吸光度(A),并计算细胞的增殖抑制率:增殖抑制率(%)=[1-(给药组A-空白调零孔A)/(空白对照组A-空白调零孔A)]×100%;并采用SPSS 26.0软件计算没食子醇提取物作用不同时间后对细胞的IC<sub>50</sub>。实验重复3次。

## 2.4 细胞迁移情况检测

采用划痕实验进行考察。取对数生长期的HCT-116、Caco-2细胞,分别以每孔5×10<sup>5</sup>个接种于6孔板中,常规培养至细胞铺满孔板底部,采用无菌枪头在皿底划出等宽的直线划痕,并采用无菌PBS清洗3次。将细胞分为空白对照组、5-FU组(0.05mg/mL)和不同质量浓度(0.1、0.3、0.5mg/mL)的没食子醇提取物组,每组平行设置3个复孔。分别在培养0h及常规培养24h时,在显微镜下观察并采集图片,用Image J V1.8.0软件分析划痕面积并计算划痕愈合率:划痕愈合率(%)=(0h时划痕面积-培养24h时划痕面积)/0h时划痕面积×100%。实验重复3次。

## 2.5 细胞内ROS水平检测

采用DCFH-DA法进行检测。取对数生长期的HCT-116、Caco-2细胞,分别按“2.4”项下方法培养和分组(本实验中阳性对照药物选用试剂盒自带试剂Rosup,按照说明书将质量浓度设为0.05mg/mL),每组平行设置3个复孔。常规培养24h后,吸弃上清液,用PBS冲洗细胞3次,然后加入20μmol/L DCFH-DA,在37℃条件下培养30min;PBS洗涤细胞3次后,在荧光显微镜下观察细胞中的荧光情况并采集图片,用Image J V 1.8.0软件分析每组细胞荧光强度百分比(所采集视野内荧光强度在整个视野中所占的百分比),以此表示细胞内的

ROS水平(荧光强度百分比越高,表示细胞中ROS水平越高)。实验重复3次。

## 2.6 细胞上清液中IL-6、TNF-α水平检测

采用ELISA法进行检测。取对数生长期的HCT-116、Caco-2细胞,按“2.4”项下方法培养和分组,每组平行设置3个复孔。常规培养24h后收集各组细胞上清液,按ELISA试剂盒说明书方法操作,测定其中IL-6、TNF-α水平。实验重复3次。

## 2.7 细胞中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Bcl-2、Bax蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的HCT-116、Caco-2细胞,分别按“2.4”项下方法培养和分组。常规培养24h后,用PBS洗涤细胞,然后使用含1%蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取细胞中的总蛋白。采用BCA法测定总蛋白的浓度后,将蛋白进行高温变性。将30μg变性蛋白进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶电压80V、浓缩胶电压120V,电泳时间90min),然后转移到聚偏二氯乙烯膜上(电流300mA;转膜时间根据蛋白分子量决定,一般1kDa转膜1min);用5%脱脂奶粉封闭1.5h,加入内参蛋白β-actin和各目的蛋白一抗(β-actin稀释比例为1:6000,目的蛋白稀释比例均为1:1000),4℃孵育过夜;TBST洗膜3次、每次10min,加入二抗(稀释比例为1:8000),室温静置1h;TBST洗膜3次、每次10min,涂抹ECL发光液并观察蛋白质条带,在凝胶成像系统中显影,然后使用Image J V1.8.0软件分析条带灰度值。分别以p-JAK2与JAK2、p-STAT3与STAT3蛋白条带灰度值的比值表示JAK2、STAT3蛋白磷酸化水平,以Bcl-2、Bax蛋白条带与β-actin蛋白条带灰度值的比值表示Bcl-2、Bax蛋白表达水平。实验重复3次。

## 2.8 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行数据分析,使用Graph Pad Prism 7软件作图。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验(方差齐性)或Dunnett's T3检验(方差不齐性)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 没食子醇提取物对细胞增殖的影响

培养12、24、48、72h后,与空白对照组比较,5-FU组和0.05~0.5mg/mL没食子醇提取物组HCT-116、Caco-2细胞的增殖抑制率均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且没食子醇提取物的作用具有一定浓度和时间依赖趋势。没食子醇提取物处理HCT-116细胞12、24、48、72h后的IC<sub>50</sub>分别为0.313、0.131、0.107、0.100mg/mL,处理Caco-2细胞12、24、48、72h后的IC<sub>50</sub>分别为1.093、0.404、0.246、0.134mg/mL。各组细胞的增殖抑制率测定结果见表1。

表1 各组细胞的增殖抑制率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=4, \%$ )

细胞	组别	12 h	24 h	48 h	72 h
HCT-116	空白对照组	0	0	0	0
	0.05 mg/mL 没食子醇提取物组	11.56 ± 3.87 <sup>a</sup>	29.10 ± 2.83 <sup>a</sup>	34.68 ± 6.26 <sup>a</sup>	35.93 ± 2.80 <sup>a</sup>
	0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	25.37 ± 3.85 <sup>a</sup>	45.76 ± 1.60 <sup>a</sup>	46.41 ± 5.70 <sup>a</sup>	50.61 ± 1.76 <sup>a</sup>
	0.2 mg/mL 没食子醇提取物组	31.29 ± 2.07 <sup>a</sup>	49.40 ± 1.48 <sup>a</sup>	66.72 ± 3.45 <sup>a</sup>	63.16 ± 1.43 <sup>a</sup>
	0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	45.13 ± 3.26 <sup>a</sup>	68.36 ± 2.44 <sup>a</sup>	70.10 ± 2.73 <sup>a</sup>	72.49 ± 1.09 <sup>a</sup>
	0.4 mg/mL 没食子醇提取物组	49.67 ± 1.58 <sup>a</sup>	73.82 ± 1.53 <sup>a</sup>	74.71 ± 1.96 <sup>a</sup>	73.91 ± 3.09 <sup>a</sup>
	0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	51.29 ± 4.00 <sup>a</sup>	75.44 ± 2.53 <sup>a</sup>	76.44 ± 3.52 <sup>a</sup>	76.55 ± 1.88 <sup>a</sup>
5-FU组	37.14 ± 1.21 <sup>a</sup>	50.74 ± 0.88 <sup>a</sup>	67.49 ± 0.89 <sup>a</sup>	81.55 ± 1.39 <sup>a</sup>	
Caco-2	空白对照组	0	0	0	0
	0.05 mg/mL 没食子醇提取物组	12.47 ± 3.53 <sup>a</sup>	11.83 ± 1.57 <sup>a</sup>	22.76 ± 1.52 <sup>a</sup>	38.13 ± 3.80 <sup>a</sup>
	0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	15.40 ± 1.91 <sup>a</sup>	25.23 ± 3.96 <sup>a</sup>	31.79 ± 2.39 <sup>a</sup>	41.42 ± 5.49 <sup>a</sup>
	0.2 mg/mL 没食子醇提取物组	19.45 ± 0.92 <sup>a</sup>	29.70 ± 3.45 <sup>a</sup>	43.07 ± 1.23 <sup>a</sup>	45.61 ± 3.31 <sup>a</sup>
	0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	23.84 ± 1.57 <sup>a</sup>	44.70 ± 2.14 <sup>a</sup>	55.56 ± 1.72 <sup>a</sup>	65.03 ± 4.68 <sup>a</sup>
	0.4 mg/mL 没食子醇提取物组	34.49 ± 1.32 <sup>a</sup>	49.52 ± 1.94 <sup>a</sup>	59.21 ± 1.55 <sup>a</sup>	68.52 ± 4.08 <sup>a</sup>
	0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	38.93 ± 3.70 <sup>a</sup>	55.59 ± 1.68 <sup>a</sup>	65.14 ± 2.17 <sup>a</sup>	78.80 ± 1.14 <sup>a</sup>
5-FU组	20.20 ± 1.12 <sup>a</sup>	39.78 ± 1.27 <sup>a</sup>	61.46 ± 0.98 <sup>a</sup>	74.71 ± 1.28 <sup>a</sup>	

a: 与同时点空白对照组比较,  $P < 0.05$

### 3.2 没食子醇提取物对细胞迁移的影响

与空白对照组比较, 5-FU组和0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子醇提取物组2种细胞的划痕愈合率均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明细胞迁移受到了抑制, 且没食子醇提取物的作用具有一定浓度依赖趋势。各组细胞的划痕愈合率测定结果见表2。

表2 各组细胞的划痕愈合率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	HCT-116细胞	Caco-2细胞
空白对照组	100	100
0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	53.51 ± 2.12 <sup>a</sup>	73.87 ± 1.96 <sup>a</sup>
0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	33.02 ± 1.47 <sup>a</sup>	52.28 ± 1.99 <sup>a</sup>
0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	23.52 ± 2.90 <sup>a</sup>	35.15 ± 1.39 <sup>a</sup>
5-FU组	27.93 ± 1.95 <sup>a</sup>	36.48 ± 1.69 <sup>a</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$

### 3.3 没食子醇提取物对细胞内ROS水平的影响

与空白对照组比较, Rosup组和0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子醇提取物组2种细胞内ROS水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且没食子醇提取物的作用具有一定浓度依赖趋势。各组细胞中ROS的荧光检测图见图1, ROS荧光强度百分比测定结果见表3。

表3 各组细胞内ROS荧光强度百分比测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	HCT-116细胞	Caco-2细胞
空白对照组	3.51 ± 1.05	3.34 ± 0.84
0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	6.17 ± 0.82 <sup>a</sup>	5.64 ± 2.37 <sup>a</sup>
0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	38.46 ± 4.07 <sup>a</sup>	28.64 ± 2.98 <sup>a</sup>
0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	56.29 ± 2.14 <sup>a</sup>	64.83 ± 6.50 <sup>a</sup>
Rosup组	53.54 ± 3.09 <sup>a</sup>	63.54 ± 14.98 <sup>a</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$

### 3.4 没食子醇提取物对细胞上清液中IL-6、TNF- $\alpha$ 水平的影响

与空白对照组比较, 5-FU组和0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子醇提取物组2种细胞上清液中IL-6、TNF- $\alpha$ 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且没食子醇提取物的作用具有一定浓度依赖趋势。各组细胞上清液中IL-6、TNF- $\alpha$ 水平测定结果见表4。

表4 各组细胞上清液中IL-6、TNF- $\alpha$ 水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$ )

组别	HCT-116细胞		Caco-2细胞	
	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
空白对照组	12.96 ± 0.80	21.32 ± 1.42	15.59 ± 0.50	15.55 ± 0.57
0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	10.51 ± 0.49 <sup>a</sup>	18.19 ± 1.24 <sup>a</sup>	13.59 ± 0.50 <sup>a</sup>	13.55 ± 0.57 <sup>a</sup>
0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	9.38 ± 0.31 <sup>a</sup>	17.27 ± 1.33 <sup>a</sup>	12.46 ± 0.13 <sup>a</sup>	12.34 ± 0.40 <sup>a</sup>
0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	8.36 ± 0.22 <sup>a</sup>	15.61 ± 0.45 <sup>a</sup>	11.24 ± 0.14 <sup>a</sup>	10.67 ± 0.69 <sup>a</sup>
5-FU组	7.74 ± 0.30 <sup>a</sup>	14.81 ± 0.70 <sup>a</sup>	9.90 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.36 ± 0.17 <sup>a</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$

### 3.5 没食子醇提取物对细胞中JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

与空白对照组比较, 5-FU组和0.1、0.3、0.5 mg/mL 没食子醇提取物组2种细胞中JAK2、STAT3磷酸化水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bax蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且没食子醇提取物的作用具有一定浓度依赖趋势。各组细胞中JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、Bax、Bcl-2蛋白表达的电泳图见图2, JAK2、STAT3磷酸化水平和Bax、Bcl-2蛋白表达水平测定结果见表5。

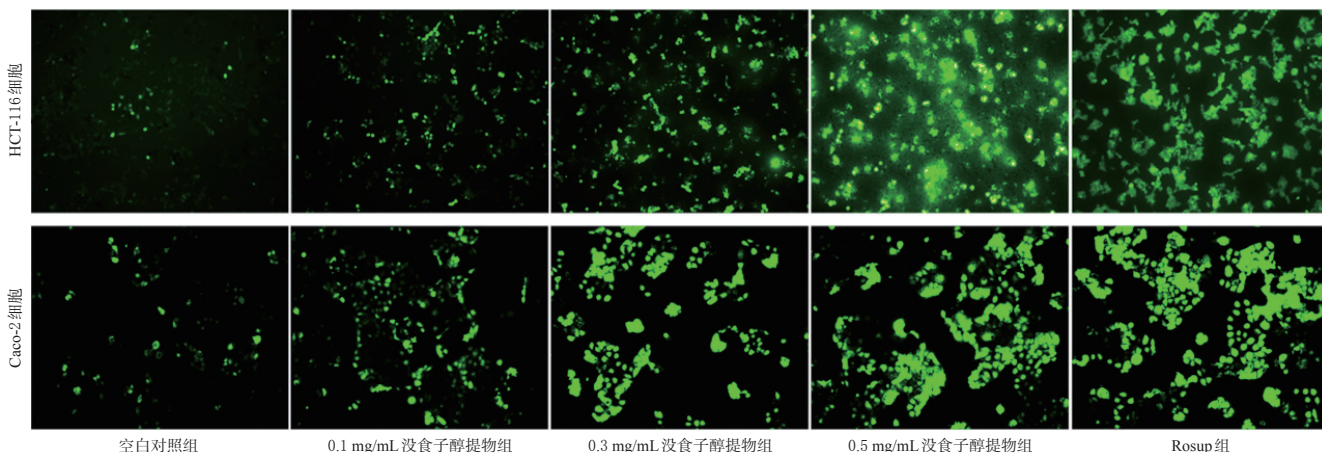


图1 各组细胞中ROS的荧光检测图( $\times 200$ )

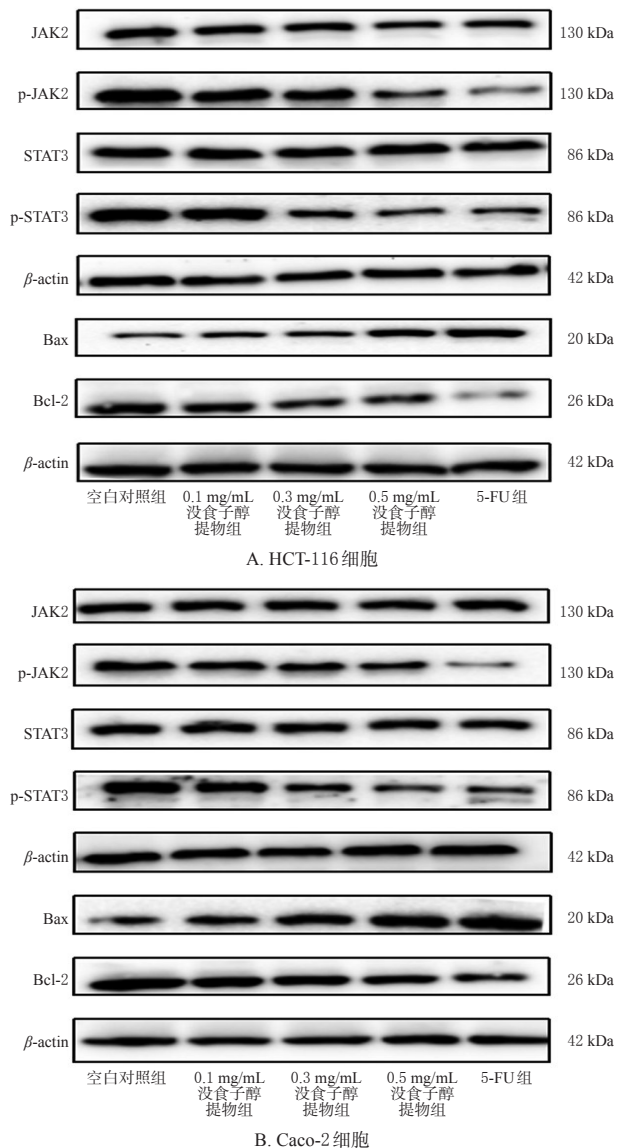


图2 各组细胞中 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的电泳图

表5 各组细胞中 JAK2、STAT3 磷酸化水平和 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

细胞	组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
HCT-116	空白对照组	0.99 ± 0.49	1.23 ± 0.17	0.59 ± 0.19	1.06 ± 0.12
	0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	0.88 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.10 <sup>a</sup>
	0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	0.72 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.17 <sup>a</sup>
	0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	0.59 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.18 <sup>a</sup>
	5-FU 组	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.14 <sup>a</sup>
Caco-2	空白对照组	1.19 ± 0.11	1.09 ± 0.14	0.48 ± 0.04	1.41 ± 0.31
	0.1 mg/mL 没食子醇提取物组	0.91 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.36 <sup>a</sup>
	0.3 mg/mL 没食子醇提取物组	0.75 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.09 <sup>a</sup>
	0.5 mg/mL 没食子醇提取物组	0.54 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.09 <sup>a</sup>
	5-FU 组	0.51 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>a</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$

#### 4 讨论

5-FU 是抗嘧啶类化疗药物, 进入体内活化成脱氧核苷酸后, 通过与胸苷酸合成酶结合并抑制此酶的活性, 导致脱氧胸苷酶缺乏和 DNA 复制障碍, 尤其对消化道

肿瘤效果明显<sup>[12]</sup>。以 5-FU 为主的 mFOLFOX6 方案为目前公认治疗结肠癌的一线用药方案, 因此本研究选择 5-FU 作为阳性对照药, 同时选择结肠癌细胞中具有代表性的 HCT-116 细胞(恶性程度较高)和 Caco-2 细胞(恶性程度较低)为研究对象, 在细胞水平上探讨没食子醇提取物对结肠癌细胞的抑制效果。

肿瘤细胞能够通过失控性增殖以及远处转移等方式侵犯周围组织和器官, 引起器官破坏和正常细胞功能损害, 使机体功能失调, 从而威胁生命。抑制肿瘤细胞的增殖和迁移是控制癌症进展的重要途径<sup>[13-14]</sup>。因此, 本研究首先检测没食子醇提取物对结肠癌细胞增殖和迁移的抑制情况, 发现随着没食子醇提取物质量浓度的增加, 细胞增殖抑制率呈升高趋势, 迁移率呈降低趋势, 故本研究初步判断没食子醇提取物能够有效抑制结肠癌的发展。

炎症微环境是导致癌症发生与进展的另一个重要因素。肿瘤细胞生存的内环境中存在大量的炎症因子, 其中具有代表性的包括 IL-6、TNF- $\alpha$  等, 其对肿瘤细胞的生长和转移起到正向调控作用, 并诱导肿瘤血管及淋巴管的生成, 从而促进癌症的进展<sup>[15]</sup>。本研究中, 在没食子醇提取物作用之后细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平显著降低, 说明其改变了结肠癌细胞赖以生存的炎症环境, 可使癌细胞的代谢减慢。

JAK2/STAT3 信号通路被认为是“炎-癌转变”机制当中的一条重要信号轴, 该通路中的 JAK2 和 STAT3 蛋白在肿瘤发生过程中起到重要调控作用<sup>[16-19]</sup>。本研究结果显示, 经没食子醇提取物干预后, 在细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低的同时, 细胞中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 比值也显著降低, 即 JAK2、STAT3 蛋白的磷酸化水平显著降低, 导致进入细胞核内调控下游基因转录的 p-STAT3 减少, 随之引起细胞中促凋亡蛋白 Bax 水平升高、抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平下降。以上在分子水平上发生的改变也证实了 JAK2/STAT3 信号通路可由其上游的炎症因子激活。因此, 抑制炎症因子的表达能够使 JAK2/STAT3 信号通路受到抑制, 同时会影响调控肿瘤细胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白的正常表达, 进而促进肿瘤细胞凋亡<sup>[20-21]</sup>。

ROS 是在内质网、线粒体和过氧化物酶体等细胞器内发生的各种生化反应中自然产生的高活性化学物质, 高浓度的 ROS 会通过内源性和外源性途径对肿瘤细胞产生毒性并促使细胞凋亡<sup>[22]</sup>。许多促氧化类化疗药物的作用原理就是将 ROS 水平提高到可以促使肿瘤细胞死亡的程度, 即通过过度激活 ROS 引起肿瘤内产生氧化应激和凋亡<sup>[23]</sup>。也有文献证实, ROS 的过度活化可通过多种信号通路间接抑制 STAT3 的表达<sup>[24-26]</sup>。本研究中, 没食子醇提取物能够增加结肠癌细胞内 ROS 的表达, 且该作用具有浓度依赖趋势, 说明通过过度氧化应激杀

死肿瘤细胞也是没食子醇提物的抗癌机制之一。

综上所述,没食子醇提物能够增加结肠癌细胞中 ROS 的积累,降低炎症微环境中 IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,同时降低 JAK2/STAT3 信号通路中 JAK2、STAT3 蛋白的磷酸化水平,进而下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 Bax 蛋白表达,最后达到抑制结肠癌的效果。本研究结果为阐明没食子抗结肠癌的作用机制提供了实验基础,但仍需后续进行更加深入的机制研究。

### 参考文献

[1] ESLAMI M, YOUSEFI B, KOKHAEI P, et al. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17127-17143.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[3] PIAWAH S, VENOOK A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: a review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer*, 2019, 125(23): 4139-4147.

[4] 闫珺, 石婷婷, 刘松江. 刘松江教授治疗结肠癌经验浅谈[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(3): 486-488.

[5] KOSTIC A D, CHUN E, MEYERSON M, et al. Microbes and inflammation in colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(3): 150-157.

[6] WANG D, DUBOIS R N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 781-788.

[7] ELHAM A, ARKEN M, KALIMANJAN G, et al. A review of the phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological evaluation of *Quercus Infectoria* galls[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113592.

[8] NIMRI L F, MEQDAM M M, ALKOFI A. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants[J]. *Pharm Biol*, 1999, 37(3): 196-201.

[9] 美热古丽·依米提. 基于 IL-6/JAK/STAT3 信号通路研究没食子提取物抗溃疡性结肠炎的作用机制[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.

[10] 孔令豪, 潘传芳, 沈克平. JAK/STAT 信号通路与大肠癌及中医药调控[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(4): 785-788.

[11] ZIN N N I N M, MOHAMAD M N, ROSLAN K, et al. *In vitro* antimalarial and toxicological activities of *Quercus infectoria* (Olivier) gall extracts[J]. *Malays J Med Sci*, 2020, 27(4): 36-50.

[12] 徐月, 李沅洋, 齐新, 等. 5-氟尿嘧啶心脏毒性的研究进展与中药防治[J]. *天津中医药*, 2021, 38(5): 671-675.

[13] 毕启瑞, 李运, 高敏, 等. 抗肿瘤中药研究进展[J]. *中肿*

瘤学杂志, 2021, 3(4): 1-11.

[14] 魏秋红, 刘晓月, 王盼, 等. 抗肿瘤药物的分类和药理学研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(18): 3707-3711, 3716.

[15] 李萍, 刘馨, 刘洪璐, 等. 癌相关性炎症因子 IL-6 在肿瘤微环境中的作用研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(19): 3174-3177.

[16] 郭芳. 葱醌类衍生物 C10 通过 Jak/Stat3 信号通路对结肠癌细胞增殖的影响[D]. 太原: 山西大学, 2020.

[17] BROMBERG J F, WRZESZCZYNSKA M H, DEVGAN G, et al. Stat3 as an oncogene[J]. *Cell*, 1999, 98(3): 295-303.

[18] LING X Y, ARLINGHAUS R B. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2532-2536.

[19] O'SHEA J J, SCHWARTZ D M, VILLARINO A V, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 311-328.

[20] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248.

[21] O'SHEA J J, PLENGE R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 542-550.

[22] LIANG Q, XIAO Y Y, LIU K H, et al. Cr(VI)-induced autophagy protects L-02 hepatocytes from apoptosis through the ROS-AKT-mTOR pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(4): 1863-1878.

[23] ZHANG C T, HUANG C C, YANG P P, et al. Eldecaltol induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells by accumulating ROS to suppress the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109841.

[24] ZHU S S, ZHOU J, SUN X Y, et al. ROS accumulation contributes to abamectin-induced apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway in TM3 Leydig cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(8): e22505.

[25] ZHANG Z H, LI M Y, WANG Z, et al. Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153172.

[26] XU G Y, TANG X J. Troxerutin (TXN) potentiated 5-fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF- $\kappa$ B and Bcl-2 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 95-107.

(收稿日期: 2021-10-08 修回日期: 2021-12-21)

(编辑: 林 静)