

溴苯基姜黄素对胆管癌细胞凋亡、迁移和侵袭的影响及机制研究^Δ

赵冀安^{1*}, 马艳荣², 聂文佳³, 董梁³, 刘文聪⁴, 谷敬锋^{1#}(1.河北医科大学第一医院普通外科, 石家庄 050013; 2.河北医科大学第一医院急诊科, 石家庄 050013; 3.河北医科大学第一医院医务处, 石家庄 050013; 4.河北医科大学第一医院超声科, 石家庄 050013)

中图分类号 R735.8;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)04-0467-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.13

摘要 目的:研究溴苯基姜黄素(GL63)对人胆管癌RBE细胞凋亡、迁移和侵袭的影响,并基于Janus激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路探讨其作用机制。方法:采用MTT法检测不同浓度GL63[0(空白对照,下同)、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L]作用48 h对RBE细胞增殖的影响,并计算其半数抑制浓度(IC₅₀);采用结晶紫染色法检测不同浓度GL63(0、5、10、20 μmol/L)作用48 h对细胞集落形成的影响;分别采用流式细胞术、Hoechst 33342染色法、细胞划痕实验、Transwell小室侵袭实验检测不同浓度GL63(0、5、10、20 μmol/L)作用24 h对细胞周期分布、凋亡情况以及细胞迁移和侵袭能力的影响;采用Western blotting法检测不同浓度GL63(0、5、10、20 μmol/L)作用24 h对细胞中JAK2/STAT3信号通路肿瘤相关蛋白表达的影响。结果:不同浓度GL63组(1.25~40 μmol/L)RBE细胞的增殖抑制率均较空白对照组显著升高($P<0.01$),并呈剂量依赖趋势;其IC₅₀为(8.46±1.30) μmol/L。与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 μmol/L)RBE细胞的集落形成抑制率均显著降低($P<0.01$);G₀/G₁期细胞占比均显著升高,S期细胞占比均显著降低($P<0.01$);细胞凋亡率均显著升高($P<0.01$),且细胞核呈浓染致密的固缩形态并可见凋亡小体;细胞迁移愈合率均显著降低($P<0.01$),穿过基底膜的侵袭细胞数均显著减少($P<0.01$);细胞中磷酸化JAK2、磷酸化STAT3、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、前体胱天蛋白酶9(Pro-caspase-9)、Pro-caspase-3蛋白表达水平均显著降低,Bcl-2相关x蛋白(Bax)、细胞色素C、裂解Caspase-9(Cleaved-caspase-9)、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$)。结论:GL63能通过抑制JAK2/STAT3信号通路来实现对人胆管癌RBE细胞增殖、迁移和侵袭的抑制并诱导其发生凋亡。

关键词 溴苯基姜黄素;胆管癌;RBE细胞;Janus激酶2/信号转导及转录激活因子3信号通路;迁移;侵袭;凋亡

Study on the Effect and Its Mechanism of Bromophenylcurcumin on Apoptosis, Migration and Invasion of Cholangiocarcinoma Cells

ZHAO Ji'an¹, MA Yanrong², NIE Wenjia³, DONG Liang³, LIU Wencong⁴, GU Jingfeng¹(1. Dept. of General Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050013, China; 2. Dept. of Emergency, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050013, China; 3. Dept. of Medical Service, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050013, China; 4. Dept. of Ultrasonography, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of bromophenylcurcumin(GL63) on the apoptosis, migration and invasion of human cholangiocarcinoma RBE cells, and to investigate its mechanism based on JAK/STAT signaling pathway. METHODS: MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of GL63 [0(blank control, similarly hereinafter), 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 μmol/L] on the proliferation of RBE cells after 48 h treatment; the IC₅₀ was calculated. The effects of different concentrations of GL63 (0, 5, 10, 20 μmol/L) on colony formation were detected by crystal violet staining after 48 h treatment. Flow cytometry, Hoechst 33342 staining, cell scratch test and Transwell chamber invasion test were used to detect the effects of different concentrations of GL63 (0, 5, 10, 20 μmol/L) on cell cycle distribution, apoptosis, migration and invasion ability after 24 h treatment. Western blotting assay was adopted to detect the effects of different concentration of GL63 (0, 5, 10, 20 μmol/L) on the expression of JAK2/STAT3 signal pathway associated proteins. RESULTS: The proliferation inhibition rates of RBE cells in different concentrations of GL63 groups (1.25-40 μmol/L) were significantly increased, compared with blank control group ($P<0.01$), and showed a dose-dependent trend, with IC₅₀ of (8.46±1.30) μmol/L. Compared with blank control group, inhibition rates of RBE cell colony formation were significantly decreased in different concentrations (5, 10, 20 μmol/L) of GL63 groups ($P<0.01$). The percentage of RBE

Δ 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No.20190485)

* 副主任医师,博士。研究方向:肝病基础与临床。电话:0311-85917439。E-mail:zhaoji-an-88@163.com

通信作者:副主任医师,硕士生导师,硕士。研究方向:大肠癌基础。电话:0311-85917092。E-mail:530309776@qq.com

cells at G₀/G₁ phase increased significantly, while that at S phase decreased significantly ($P < 0.01$). The apoptotic rate increased significantly ($P < 0.01$), and the nucleus showed dense pyknosis and apoptotic bodies. The rate of cell migration and healing was significantly decreased ($P < 0.01$), and the number of invasive cells through basement membrane was significantly decreased ($P < 0.01$). The protein expression of p-JAK2, p-STAT3, Bcl-2, MMP-2, MMP-9, Pro-caspase-9 and Pro-caspase-3 were down-regulated significantly while the expression of Bax, Cyt-c, Cleaved-caspase-9 and Cleaved-caspase-3 were up-regulated significantly ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: GL63 may inhibit the proliferation, migration and invasion of RBE cells and promote its apoptosis by inhibiting JAK2/STAT3 signal pathway.

KEYWORDS Bromophenylcurcumin; Cholangiocarcinoma; RBE cell; JAK2/STAT3 signal pathway; Migration; Invasion; Apoptosis

胆管癌是一种来源于胆管上皮细胞的高度侵袭性恶性肿瘤,其发病率和病死率均呈上升趋势^[1]。胆管癌的恶性程度高、发病隐匿、诊治困难,虽然外科根治性切除术为目前临床治疗胆管癌的首选,但患者术后预后较差^[2],所以寻找抑制胆管癌细胞增殖、侵袭的有效药物,是目前临床亟待解决的主要问题。姜黄素是从姜科植物中提取的一种植物多酚类物质,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种生物学活性,但是临床研究显示由于其生理条件下的不稳定性,使得该成分的生物活性和药动学行为均不理想,从而造成其在抗癌治疗方面的应用受限^[3-4]。本研究选用了一种新的姜黄素衍生物——溴苯基姜黄素(GL63)为对象。与姜黄素相比,GL63的水溶性和稳定性大为提高,并具有较高的细胞通透性,体现出较高的生物利用度和较强的药理活性^[5]。研究发现,Janus激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路与胆管癌的发生密切相关^[6]。因此,本课题组通过体外研究观察GL63作用于人胆管癌细胞后对细胞凋亡、迁移和侵袭行为的影响,同时通过JAK2/STAT3信号通路肿瘤相关蛋白探索其可能机制,以期为胆管癌的治疗提供新的思路与药物选择。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究涉及的主要仪器包括:NU-400-400E型超净工作台(美国ShelLab公司),FORM 361型细胞培养箱(美国Thermo Electronic公司),TGL16型高速离心机(长沙英泰仪器有限公司),TC20型细胞计数仪、xMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司),AE31型倒置相差显微镜及照相系统(德国Motic公司),CKX31型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),D2060R型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),HH-2型数显恒温水浴锅(常州亿通分析仪器制造有限公司),DYCZ-24DN型垂直电泳仪(北京市六一仪器厂),BOX XR型凝胶成像分析系统(英国Syngene公司),FA1004型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 主要药品和试剂

姜黄素原料药(批号78246,纯度99.5%)、RPMI 1640培养基均购自美国Sigma公司;GL63原料药(纯度>99.5%)由河北科技大学化学与制药工程学院刘守

信教授合成并鉴定;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人JAK2、磷酸化JAK2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关x蛋白(Bax)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、细胞色素C(Cyt-c)、前体胱天蛋白酶9(Pro-caspase-9)、裂解Caspase-9(Cleaved-caspase-9)、Pro-caspase-3、Cleaved-caspase-3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(批号分别为ab39636、ab195055、ab137803、ab131103、ab59348、ab53154、ab97779、ab38898、ab90529、ab69541、ab2324、ab90437、ab49822、ab37168)和MTT试剂均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号sc-2025)购自美国Santa Cruz公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;基质胶购自美国BD公司;细胞总蛋白质抽提试剂、蛋白定量试剂盒、结晶紫试剂均购自北京索莱宝科技有限公司;ECL发光检测试剂盒购自美国Millipore公司;Hoechst 33342蓝色荧光染料购自美国BioVision公司;0.25%胰酶购自武汉尚恩生物技术有限公司;其余试剂为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 细胞

人胆管癌RBE细胞株来自中国科学院北京细胞生物研究所。

2 方法

2.1 GL63对RBE细胞增殖的影响考察

采用MTT法进行检测。取RBE细胞,以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(以下简称“完全培养基”)于5% CO₂、37℃(以下培养条件相同)的培养箱中培养。当培养瓶底部贴壁细胞达90%以上时,用0.25%胰酶消化后进行传代。将对数生长期细胞用培养基调整为 1×10^5 个/mL,按100 μL/孔接种于96孔板中,置于培养箱中继续培养12 h待细胞贴壁后,弃去培养基。将细胞分组并分别加入含有不同浓度GL63[终浓度均为0(空白对照,下同)、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L;剂量根据文献[3-5]及本课题组前期预试验结果设置]的RPMI 1640培养基(含0.1%二甲亚砜),每组设3个复孔。培养48 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,避光继续培养4 h。培养完毕后,用酶标仪于450 nm波长下检

测各孔的光密度(OD)值并计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率=(空白对照组 OD 值-给药组 OD 值)/空白对照组 OD 值 \times 100%;采用 SPSS 13.0 软件根据药物浓度和细胞增殖抑制率计算 GL63 的半数抑制浓度(IC₅₀)。试验重复 3 次。

2.2 GL63 对 RBE 细胞集落形成的影响考察

采用结晶紫法进行检测。将对数生长期 RBE 细胞以 0.25% 胰酶消化后,以 500 个/孔接种于 6 孔板中,培养待其贴壁后,弃去培养基。将细胞分组并分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L,剂量根据“2.1”项 MTT 法试验和本课题组前期预试验结果设置,下同)的完全培养基继续培养 48 h 后取出,持续替换新鲜的完全培养基培养 14 d 使细胞形成集落。培养结束后,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4)洗涤,并用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min,再以 1% 结晶紫试液染色。在倒置相差显微镜下观察细胞增殖形成的集落,对其进行计数并计算集落形成抑制率:集落形成抑制率(%)=给药组集落均数/空白对照组集落均数 \times 100%。试验重复 3 次。

2.3 GL63 对 RBE 细胞周期分布和凋亡的影响考察

采用流式细胞术对细胞周期分布和凋亡情况进行检测。将对数生长期 RBE 细胞以 0.25% 胰酶消化后,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后,弃去培养基。将细胞分组并分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L)的完全培养基,继续培养 24 h,然后收集、洗涤细胞。在细胞中先后加入 Annexin V-FITC、PI 试剂各 5 μ L,混匀,于室温下避光反应 15 min 后,用流式细胞仪进行细胞周期和细胞凋亡检测。试验重复 3 次。

另采用 Hoechst 33342 染色法对细胞凋亡情况进行检测。将对数生长期 RBE 细胞以 0.25% 胰酶消化后,按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,盖上盖玻片培养 24 h 使细胞贴壁后,弃去培养基。将细胞分组并分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L)的完全培养基,继续培养 48 h。吸弃上清液,用 PBS 清洗 2 次后,每孔加入固定液固定 10 min;以 PBS 漂洗 3 次后,滴加 Hoechst 33342 蓝色荧光染料 100 μ L,室温放置 10 min;用 PBS 清洗 3 次再晾干后,以 340 nm 波长的紫外光激发,在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 GL63 对 RBE 细胞迁移的影响考察

采用划痕实验进行检测。将对数生长期 RBE 细胞以 0.25% 胰酶消化后,按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 待其融合至 90%,采用尖端粗细相同的无菌枪头垂直划线;用 PBS 清洗除去悬浮的细胞后,将余下细胞分组并分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L)的完全培养基,继续培养 24 h。然后,于倒置相差显微镜下观察划痕距离,每个样品随机选取 5 个视野,分别测量并计算初始划痕时和加药培养完毕后的划痕距离的差值(即细胞迁移距离)并取平均值。计算细胞迁移愈合率:迁移愈合率=细胞迁移距离平均值/初始划痕距离

均值 \times 100%。实验重复 3 次。

2.5 GL63 对 RBE 细胞侵袭的影响考察

采用 Transwell 小室侵袭实验进行检测。将对数生长期 RBE 细胞以 0.25% 胰酶消化后,按 1.5×10^5 个/mL 接种于 Transwell 小室上室(铺有基质胶,加入菌液体积为 0.5 mL),下室加入等体积完全培养基,然后上下室均分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L)的完全培养基,继续培养 24 h。培养结束后,用棉签擦去上室漂浮的细胞,再用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min,再浸入结晶紫试液中染色 20 min,在倒置相差显微镜(100 倍)下随机选取 5 个视野进行拍照并对细胞进行计数,取平均值。实验重复 3 次。

2.6 GL63 对 RBE 细胞中 JAK2/STAT3 信号通路肿瘤相关蛋白表达的影响考察

采用 Western blotting 法进行检测。将对数生长期 RBE 细胞按照“2.3”项下方法消化、接种、培养,分别加入含不同浓度 GL63(0、5、10、20 μ mol/L)的完全培养基,继续培养 24 h;弃去培养液,加入蛋白裂解液冰浴裂解 25 min 后,收集细胞裂解液,于 4 $^{\circ}$ C 下以 15 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。上清液经蛋白上样缓冲液稀释后,于 100 $^{\circ}$ C 下变性 5 min。取变性后的蛋白适量,进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转移至 PVDF 膜上;用 5% 脱脂牛奶封闭后,加入 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9、Cyt-c、Pro-caspase-9、Cleaved-caspase-9、Pro-caspase-3、Cleaved-caspase-3 和 GAPDH 一抗(稀释度均为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;以 TBST 缓冲液洗膜,加入二抗(稀释度为 1:500),室温下孵育 2 h;以 TBST 缓冲液洗膜经 ECL 化学发光试剂处理后,使用凝胶成像分析系统采集图像。采用 Image J 5.0 软件分析相应目标蛋白条带与内参 GAPDH 条带的灰度值之比,用来表示目标蛋白的表达水平。试验重复 3 次。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

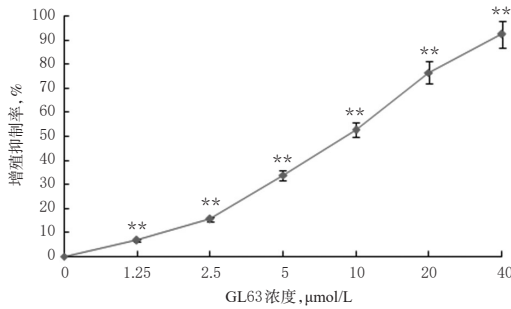
3.1 GL63 对 RBE 细胞增殖的影响

结果显示,与空白对照组比较,经不同浓度 GL63(1.25、2.5、5、10、20、40 μ mol/L)作用 48 h 后,细胞的增殖抑制率均显著升高($P<0.01$),分别为(6.58 \pm 1.21)%、(15.28 \pm 1.64)%、(33.66 \pm 1.92)%、(52.53 \pm 2.16)%、(76.25 \pm 2.63)%、(92.28 \pm 3.67)%,且这一抑制作用有随着药物浓度升高而逐渐升高的趋势,详见图 1。经计算,GL63 对 RBE 细胞的 IC₅₀ 为(8.46 \pm 1.30) μ mol/L。

3.2 GL63 对 RBE 细胞集落形成的影响

结果显示,与空白对照组比较,不同浓度 GL63 组

(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)细胞的集落密度均有所减少,其集落抑制率分别为(64.88 \pm 3.45)%、(34.70 \pm 2.57)%、(15.10 \pm 1.78)%,较空白对照组(100%)均显著降低($P < 0.01$),且有随着药物浓度升高而逐渐降低的趋势,详见图2。

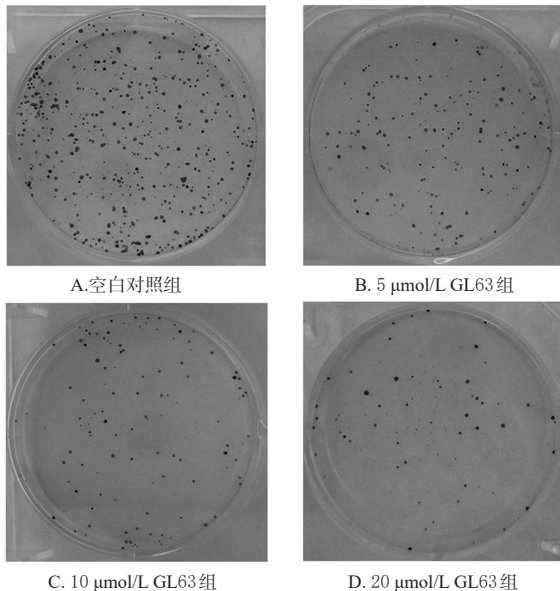


注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$

图1 不同浓度GL63对RBE细胞增殖抑制率的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of GL63 on inhibition rate of RBE cell proliferation



A. 空白对照组

B. 5 $\mu\text{mol/L}$ GL63组

C. 10 $\mu\text{mol/L}$ GL63组

D. 20 $\mu\text{mol/L}$ GL63组

图2 不同浓度GL63对RBE细胞集落形成的影响

Fig 2 Effects of different concentrations of GL63 on colony formation of RBE cells

3.3 GL63对RBE细胞周期的影响

结果显示,与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)G₀/G₁期细胞占比均显著升高,S期细胞占比均显著降低($P < 0.01$),且均有随着药物浓度升高而升高/降低更明显的趋势,详见图3、表1。

3.4 GL63对RBE细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$),且有随着药物浓度升高而升高的趋势,详见图4、表1。

Hoechst 33342染色法结果显示,空白对照组细胞核

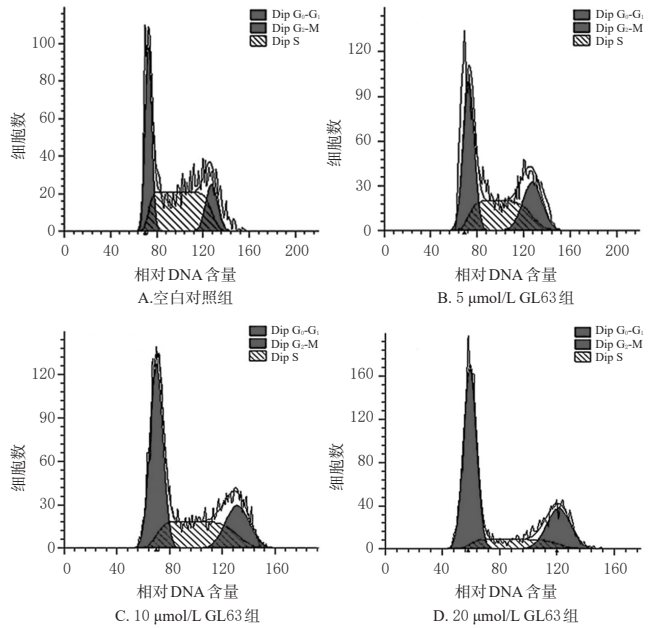


图3 不同浓度GL63对RBE细胞周期分布影响的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometries of the effects of different concentrations of GL63 on the distribution of RBE cell cycle

表1 不同浓度GL63对RBE细胞周期分布和凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Effects of different concentrations of GL63 on cell cycle distribution and apoptosis rate of RBE cells($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	细胞周期占比			凋亡率	
	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期	流式细胞术法	Hoechst 33342染色法
空白对照组	34.58 \pm 1.09	44.51 \pm 1.17	20.91 \pm 0.71	1.32 \pm 0.30	3.35 \pm 0.94
5 $\mu\text{mol/L}$ GL63组	40.79 \pm 1.35**	36.19 \pm 1.42**	23.02 \pm 1.53	9.20 \pm 0.70**	15.22 \pm 2.56**
10 $\mu\text{mol/L}$ GL63组	51.26 \pm 0.45**	26.45 \pm 1.05**	22.29 \pm 1.27	28.42 \pm 4.40**	34.37 \pm 4.87**
20 $\mu\text{mol/L}$ GL63组	68.69 \pm 0.85**	14.36 \pm 0.60**	16.95 \pm 0.79	64.55 \pm 6.60**	61.74 \pm 6.60**

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$

呈现弥散均匀的低强度蓝色荧光,细胞核完整且染色均匀。不同浓度GL63组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)均可见致密浓染的凋亡细胞,表现为核染色质的固缩浓集、破裂、蓝色荧光强度增大且不均匀的典型凋亡现象,并可见凋亡小体;其凋亡率均较空白对照组显著升高($P < 0.01$),且有随着药物浓度升高而升高的趋势,详见图5、表1。

3.5 GL63对RBE细胞迁移和侵袭能力的影响

划痕实验结果显示,与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)细胞的横向迁移距离均有缩短,迁移愈合率显著降低($P < 0.01$),且有随着药物浓度升高而降低的趋势,详见图6、表2。Transwell小室侵袭实验结果显示,与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)穿过基底膜的侵袭细胞数均显著减少($P < 0.01$),且有随着药物浓度升高而减少的趋势,详见图7、表2。

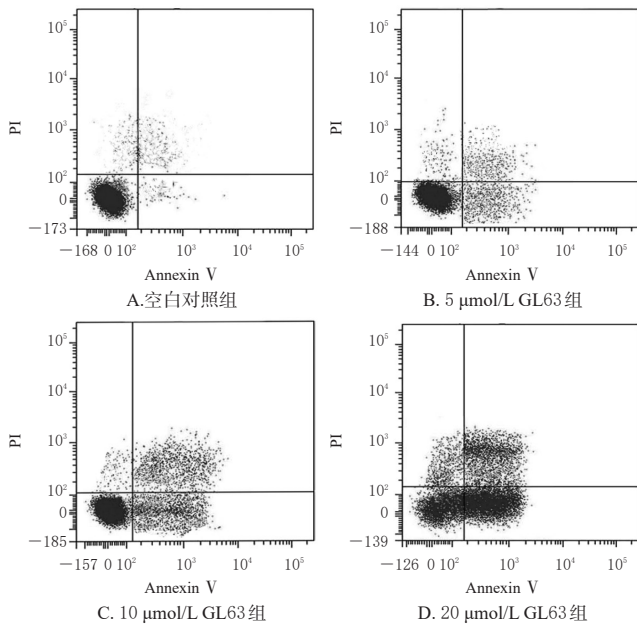


图4 不同浓度GL63对RBE细胞凋亡影响的流式细胞图

Fig 4 Flow cytometries of the effects of different concentrations of GL63 on the apoptosis of RBE cells

3.6 GL63对RBE细胞中JAK2/STAT3信号通路肿瘤相关蛋白表达的影响

结果显示,与空白对照组比较,不同浓度GL63组(5、10、20 μmol/L)细胞中p-JAK2、p-STAT3、Bcl-2、MMP-2、MMP-9、Pro-caspase-9、Pro-caspase-3蛋白表达水平均显著降低,Bax、Cyt-c、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$),且均有随着药物浓度升高而降低/升高的趋势;JAK2、STAT3蛋白表达水平在各组之间差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图8、图9、表3、表4。

4 讨论

据研究报道,姜黄素在体外可阻滞胆管细胞系的细胞周期,发挥细胞毒性作用,可抗细胞增殖并诱导其凋

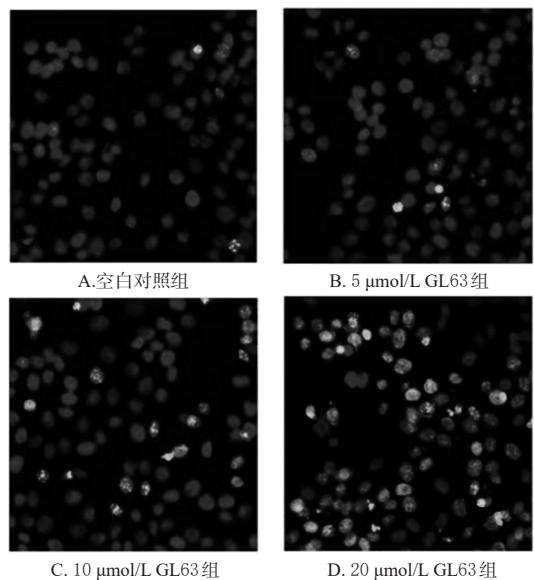


图5 不同浓度GL63对RBE细胞凋亡影响的荧光染色显微图(Hoechst 33342染色,×200)

Fig 5 Fluorescence staining micrographs of the effects of different concentrations of GL63 on the apoptosis of RBE cells (Hoechst 33342 staining, ×200)

亡^[7]。但由于其结构不稳定使应用受限,因此有研究者通过删除其结构中活性β-二酮部分,设计并合成了姜黄素的单羰基类似物GL63,即(1E,4E)-1,5-双(2-溴苯基)戊-1,4-二烯-3-酮^[8]。研究表明,GL63不仅在体外具有较强的稳定性和抗肿瘤活性,而且在体内也表现出比姜黄素更理想的药动学行为^[9]。还有研究表明,GL63对人肝癌HepG2细胞和人鼻咽癌CNE2细胞的毒性作用是基于内质网应激途径而诱导的细胞周期停滞;而且GL63和姜黄素均未诱导正常肝细胞凋亡,这表明GL63没有明显的毒性,与姜黄素类似^[10-11]。本研究表明,GL63抑制人胆管癌RBE细胞增殖和集落形成的能力有随着药物浓度升高而增强的趋势;GL63抑制RBE细胞增殖的IC₅₀为(8.46 ± 1.30) μmol/L,与姜黄素IC₅₀

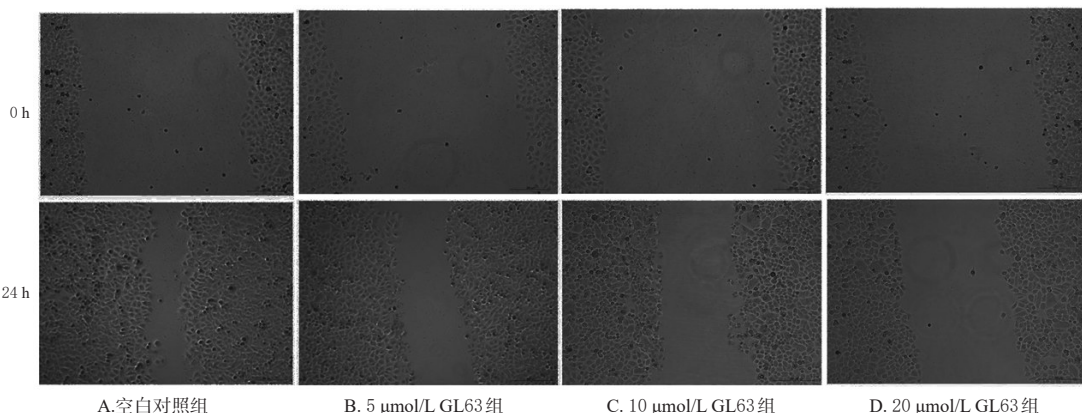


图6 不同浓度GL63对RBE细胞迁移影响的显微图(划痕实验,×200)

Fig 6 Micrographs of the effects of different concentrations of GL63 on the migration of RBE cells (scratch test, ×200)

表2 不同浓度GL63对RBE细胞迁移愈合率和侵袭细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of different concentrations of GL63 on migration and healing rate of RBE cells and number of invasive cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	迁移愈合率, %	侵袭细胞数, 个
空白对照组	76.30 ± 6.43	1 666 ± 127
5 μmol/L GL63组	47.38 ± 4.91**	937 ± 91**
10 μmol/L GL63组	32.44 ± 3.40**	605 ± 63**
20 μmol/L GL63组	20.36 ± 2.43**	317 ± 28**

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$

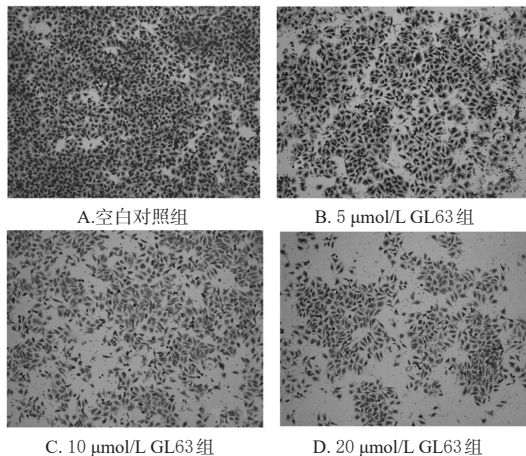


图7 不同浓度GL63对RBE细胞侵袭影响的显微图(Transwell小室侵袭实验, ×100)

Fig 7 Micrographs of the effects of different concentrations of GL63 on the invasion of RBE cells (Transwell chamber invasion test, ×100)

(21.5 μmol/L)^[4]相比明显降低。这些结果表明,姜黄素衍生化合物GL63有望被开发为有效、安全的新型抗肿瘤药物。

细胞周期停滞和形态变化是肿瘤细胞增殖受到抑制的主要特征^[22]。本研究发现,与空白对照组比较,随着GL63作用浓度的升高,RBE细胞在G₀/G₁期的占比显著升高,S期占比显著降低;细胞核染色质表现为固缩浓集、破裂、蓝色荧光强度增强且不均匀的典型凋亡现象;细胞凋亡率也显著升高。这也进一步证实了GL63可抑制RBE细胞的增殖。

JAK2/STAT3信号通路的激活与肿瘤的发生发展过程紧密相关,其能促进肿瘤细胞增殖、抑制其凋亡,可调节涉及各种生理功能的靶蛋白的表达,包括抗凋亡蛋白(Bcl-x1、Bcl-2)、促凋亡蛋白(Bax)和线粒体凋亡途径相关蛋白(Cyt-c、Caspase-3、Caspase-9)^[13]。重要的是,激活的JAK2/STAT3信号通路已被广泛验证为治疗人类肿瘤的新型分子靶标^[4]。本研究基于JAK2/STAT3信号通路肿瘤相关蛋白考察了GL63对人胆管癌RBE细胞的抑制作用,并证实GL63可有效抑制JAK2和STAT3蛋白的活化(即磷酸化),从而抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡;同

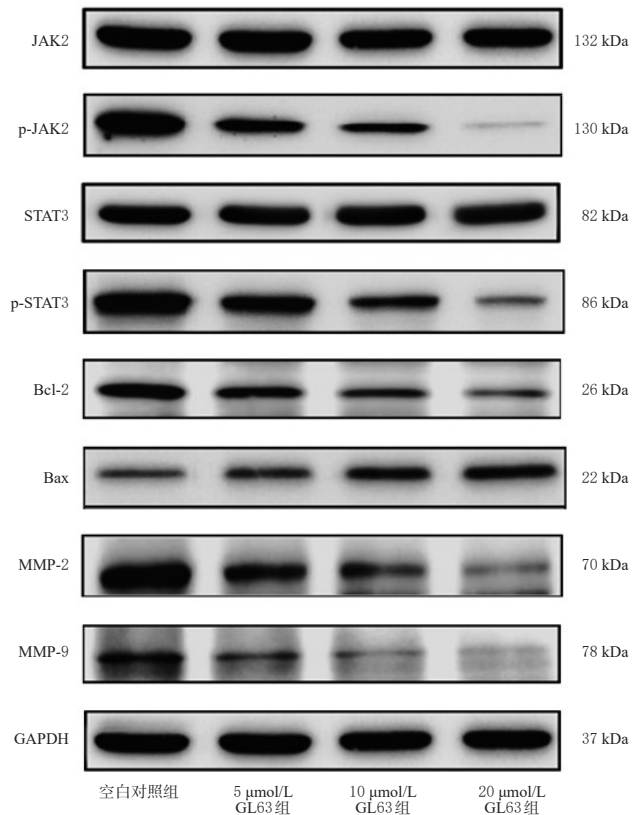


图8 不同浓度GL63对RBE细胞中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9蛋白表达影响的电泳图

Fig 8 Electrophoretogram of the effects of different concentrations of GL63 on the protein expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, Bcl-2, Bax, MMP-2 and MMP-9 in RBE cells

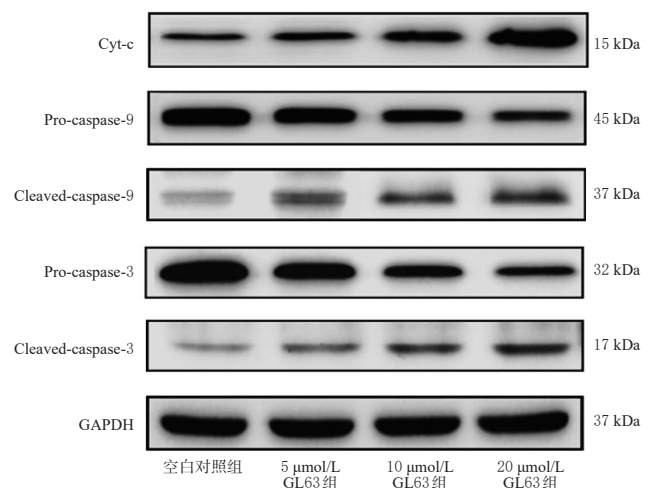


图9 不同浓度GL63对RBE细胞中Cyt-c、Pro-caspase-9、Cleaved-caspase-9、Pro-caspase-3、Cleaved-caspase-3蛋白表达影响的电泳图

Fig 9 Electrophoretogram of the effects of different concentrations of GL63 on the protein expression of Cyt-c, Pro-caspase-9, Cleaved-caspase-9, Pro-caspase-3 and Cleaved-caspase-3 in RBE cells

表3 不同浓度 GL63 对 RBE 细胞中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of different concentrations of GL63 on the protein expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, Bcl-2, Bax, MMP-2 and MMP-9 in RBE cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	JAK2/GAPDH	p-JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH	p-STAT3/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
空白对照组	1.09±0.02	1.24±0.19	0.90±0.01	1.21±0.25	0.64±0.04	0.21±0.05	1.22±0.28	0.50±0.08
5 μmol/L GL63组	1.09±0.01	0.65±0.17**	0.90±0.01	0.84±0.26**	0.46±0.08**	0.34±0.05**	0.64±0.17**	0.23±0.05**
10 μmol/L GL63组	1.09±0.01	0.45±0.14**	0.90±0.02	0.48±0.24**	0.35±0.09**	0.45±0.04**	0.49±0.08**	0.19±0.02**
20 μmol/L GL63组	1.09±0.01	0.08±0.04**	0.91±0.01	0.17±0.03**	0.18±0.03**	0.52±0.05**	0.25±0.02**	0.17±0.01**

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$

表4 不同浓度 GL63 对 RBE 细胞中 Cyt-c、Pro-caspase-9、Cleaved-caspase-9、Pro-caspase-3、Cleaved-caspase-3 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of different concentrations of GL63 on the protein expression of Cyt-c, Pro-caspase-9, Cleaved-caspase-9, Pro-caspase-3 and Cleaved-caspase-3 in RBE cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Cyt-c/GAPDH	Pro-caspase-9/GAPDH	Cleaved-caspase-9/GAPDH	Pro-caspase-3/GAPDH	Cleaved-caspase-3/GAPDH
空白对照组	0.26±0.07	0.93±0.07	0.19±0.04	1.10±0.26	0.11±0.03
5 μmol/L GL63组	0.35±0.05**	0.74±0.07**	0.29±0.04**	0.80±0.08**	0.23±0.04**
10 μmol/L GL63组	0.44±0.06**	0.56±0.06**	0.38±0.06**	0.51±0.09**	0.28±0.06**
20 μmol/L GL63组	0.82±0.07**	0.37±0.07**	0.45±0.06**	0.41±0.06**	0.41±0.03**

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$

时认为, GL63 对 RBE 细胞的增殖具有抑制作用, 其机制可能是通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来介导的。

肿瘤患者预后较差的重要原因是肿瘤细胞发生侵袭和远处转移, 所以降低胆管癌细胞的迁移、侵袭能力是预防其转移的有效手段。MMP 被公认为是能够在肿瘤细胞侵袭过程中破坏组织屏障细胞外基质的蛋白内切酶^[15]。MMP-2 和 MMP-9 表达水平的升高提示肿瘤细胞侵袭能力增强^[16], 因此抑制 MMP 蛋白的表达被认为是预防癌症转移的早期靶点^[17-18]。本研究通过划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验发现, GL63 可以有效地抑制 RBE 细胞迁移和侵袭。与空白对照组比较, 经不同浓度 GL63 处理后, RBE 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平均显著降低, 且有随着药物浓度升高而降低的趋势。这提示 GL63 可能通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达从而抑制 RBE 细胞的迁移和侵袭。

已有研究表明, 不同药物对 JAK2/STAT3 信号通路的调节可通过内源性线粒体途径诱导细胞凋亡^[19]。Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡研究中最重要癌基因之一, 在线粒体介导的内源性凋亡通路中起着重要的作用, 其包括抑制凋亡蛋白 Bcl-2 和诱导凋亡蛋白 Bax 两大类^[20-21]。内源性线粒体途径是在 Bcl-2 蛋白家族的调节下在线粒体水平上启动的^[22]。当外源刺激激活线粒体中的 Bcl-2 和 Bax 时, 线粒体的膜通透性将发生变化^[23]; 随后, 线粒体中的 Cyt-c 大量释放到细胞质中, 进

而促使 Caspase-9 和 Caspase-3 激活而转化为活性状态 (Cleaved-caspases), 最终导致细胞凋亡^[24]。线粒体通过激活细胞死亡起始因子 Caspase-9 介导凋亡信号转导, 激活的 Caspase-9 激活切割执行者 Caspase-3, 然后活化的 Caspase-3 会裂解聚二磷酸腺苷核糖聚合酶, 进而导致细胞凋亡^[25]。本研究显示, GL63 处理可以降低 RBE 细胞中 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平, 诱导 Bcl-2 蛋白表达下调和 Bax 蛋白表达上调; 同时, GL63 能升高 Cyt-c 表达水平, 使 Pro-caspase-9 和 Pro-caspase-3 蛋白表达下调、Cleaved-caspase-9 和 Cleaved-caspase-3 蛋白表达上调, 提示 Caspase-9 和 Caspase-3 被激活。这也证明, GL63 可同时通过线粒体介导的内源性途径来诱导 RBE 细胞发生凋亡。

综上所述, GL63 能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来实现对人胆管癌 RBE 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制并诱导其发生凋亡; 其具备成为有效治疗或预防胆管癌的药物潜能。

参考文献

- [1] CARPINO G, CARDINALE V, RENZI A, et al. Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis[J]. J Hepatol, 2015, 63(5): 1220-1228.
- [2] NAKAGOHRI T, ASANO T, KINOSHITA H, et al. Aggressive surgical resection for hilar-invasive and peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. World J Surg, 2003, 27(3): 89-93.
- [3] ANAND P, KUNNUMAKKARA AB, NEWMAN RA, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises[J]. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807-818.
- [4] QIU CY, HU Y, WU K, et al. Synthesis and biological evaluation of allylated mono-carbonyl analogues of curcumin (MACs) as anti-cancer agents for cholangiocarcinoma[J]. Bio Med Lett, 2016, 26(24): 5971-5976.
- [5] LIANG G, SHAO L, WANG Y, et al. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(6): 2623-2631.
- [6] SMIRNOVA OV, OSTROUKHOVA TY, BOGORAD RL. JAK/STAT pathway in carcinogenesis: is it relevant to

- cholangiocarcinoma progression? [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 28, 13(48):6478-6491.
- [7] PRAKOBWONG S, GUPTA SC, KIM JH, et al. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(9):1372-1380.
- [8] XIAO J, TAN Y, PAN Y, et al. A new cyclooxygenase-2 inhibitor, (1E, 4E)-1, 5-bis(2-bromophenyl)penta-1, 4-dien-3-one (GL63) suppresses cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells: coupled mRNA stabilization and posttranscriptional inhibition[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(7):1170-1175.
- [9] WENG Q, FU L, CHEN G, et al. Design, synthesis, and anticancer evaluation of long-chain alkoxyated mono-carbonyl analogues of curcumin[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 103(4):44-55.
- [10] XIAO J, CHU Y, HU K, et al. Synthesis and biological analysis of a new curcumin analogue for enhanced anti-tumor activity in HepG2 cells[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(5):1435-1441.
- [11] PAN Y, XIAO J, LIANG G, et al. A new curcumin analogue exhibits enhanced antitumor activity in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1):239-245.
- [12] LEE DS, LEE MK, KIM JH. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(12):5039-5044.
- [13] LIU Y, WANG L, WU Y, et al. Pterostilbene exerts antitumor activity against human osteosarcoma cells by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2013, 304(5):120-131.
- [14] WUNG BS, HSU MC, WU CC, et al. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells; effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation[J]. *Life Sci*, 2005, 78(4):389-397.
- [15] LIU QH, WANG Y, YONG HM, et al. XRCC1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis through suppressing MMP-2 and MMP-9[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65):109382-109392.
- [16] LU H, CAO X, ZHANG H, et al. Imbalance between MMP-2, 9 and TIMP-1 promote the invasion and metastasis of renal cell carcinoma via SKP2 signaling pathways[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10):9807-9813.
- [17] GURUVAYOORAPPAN C, KUTTAN G. Amentoflavone inhibits experimental tumor metastasis through a regulatory mechanism involving MMP-2, MMP-9, prolyl hydroxylase, lysyl oxidase, VEGF, ERK-1, ERK-2, STAT-1, NM23 and cytokines in lung tissues of C57BL/6 mice[J]. *Immunopharmacol*, 2008, 30(4):711-727.
- [18] MIYAKE H, NISHIKAWA M, TEI H, et al. Significance of circulating matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio as a predictor of disease progression in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib[J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(5):584-588.
- [19] DU W, HONG J, WANG YC, et al. Inhibition of JAK2/STAT3 signalling induces colorectal cancer cell apoptosis via mitochondrial pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8):1878-1888.
- [20] EDLICH F. Bcl-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1):26-34.
- [21] ZHOU L, CAI X, HAN X, et al. CDK1 switches mitotic arrest to apoptosis by phosphorylating Bcl-2/Bax family proteins during treatment with microtubule interfering agents[J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(6):737-746.
- [22] JEAN CM, RICHARD JY. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1):92-101.
- [23] WANG YQ, LIU C, SHAN ZF, et al. Expressions and effects of G250, Bax and Bcl-2 in rats with renal clear cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(14):4488-4492.
- [24] SCORRANO L, ASHIYA M, BUTTLE K, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome C during apoptosis[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(1):55-67.
- [25] WÜRSTLE ML, LAUSSMANN MA, REHM M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 18(11):1213-1220.

(收稿日期:2020-07-30 修回日期:2021-01-10)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅