论著

文章编号:1000-5404(2010)18-1932-04

柴胡皂甙d对人肝癌细胞STAT3/COX-2信号通路的调节作用

朱占芳[1,2],和水祥[1],侯和磊[1],卢新兰[1],胡雅楠[1],陈静宏[3],王治沦[3] (710061 西安,西安交通大学:第一附属医院消化内科[1],医学院地方性骨病研究所[3];710049 西安,西安交通大学医院[2])

【摘要】 **目的** 观察柴胡皂甙d(saikosaponin-d,SSd)对人肝癌细胞STAT3、COX-2表达的影响,探讨其抗肿瘤作用可能的信号通路机制。**方法** 体外培养人肝癌SMMC-7721细胞,分别经IL-6、AG490和SSd作用后,免疫细胞化学及免疫印迹方法检测STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)以及COX-2蛋白表达的变化,并探讨其关系。**结果** 免疫细胞化学结果显示,IL-6诱导组人肝癌细胞p-STAT3和COX-2蛋白的表达较空白对照组显著升高,而加入AG490或SSd后p-STAT3、COX-2蛋白表达较IL-6诱导组明显减弱,SSd对STAT3蛋白表达则无明显影响;免疫印迹结果亦显示出类似变化:经IL-6作用,人肝癌细胞p-STAT3和COX-2的表达明显增强,AG490或SSd作用的人肝癌细胞p-STAT3表达呈现剂量依赖性下降,COX-2蛋白表达亦出现相应下调。**结论** p-STAT3参与了人肝癌细胞COX-2表达调节,SSd可能通过抑制STAT3磷酸化下调COX-2的表达而发挥抗肿瘤作用。

【关键词】 肝肿瘤;肿瘤细胞,培养的;柴胡皂甙;环氧化酶-2;STAT3转录因子
【中图法分类号】 R282.71;R730.23;R735.7 【文献标志码】 A

Role of saikosaponin-d on STAT3/COX-2 signal transduction pathway in hepatocellular carcinoma cells

Zhu Zhanfang[1,2], He Shuixiang[1], Hou Helei[1], Lu Xinlan[1], Hu Yanan[1], Chen Jinghong[3], Wang Zhilun[3] ([1]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, [3]Institute of Endemic Bone Disease, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shannxi Province, 710061; [2]Hospitial of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi Province, 710049, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of saikosaponin-d (SSd) on the expressions of STAT3 and COX-2 in hepatocellular carcinoma cells, and explore the underlying signal pathway mechanism of its anti-tumor effect. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of SSd on the proliferation of cultured human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. Then the cells were divided into control, IL-6 group, AG490 group and SSd group, which were treated respectively with IL-6 25 ng/ml, IL-6 25 ng/ml + AG490 50 μmol/L, and IL-6 25 ng/ml + SSd 5 μg/ml. The protein expressions of STAT3, p-STAT3 and COX-2 were measured by immunocytochemical technique as well as Western blotting. Their relationship was further analyzed. **Results** MTT assay showed SSd had obvious inhibitory effect on the proliferation of SMMC-7721 cells, especially at a dose of 10 μg/ml for 48 h. Immunocytochemical results showed that both p-STAT3 and COX-2 were obviously increased in SMMC-7721 cells after exposure to IL-6 compared with blank group. Compared with IL-6 group, the protein level of COX-2 was decreased by AG490 or SSd, so was the expression of p-STAT3. While, the expression of STAT3 had no difference among these groups. Western blotting further confirmed the above results. SMMC-7721 cells had obviously enhanced expressions of p-STAT3 and COX-2 after IL-6 treatment, and AG490 or SSd decreased p-STAT3 expression in a dose-dependent manner. The expression of COX-2 was decreased. **Conclusion** p-STAT3 is involved the regulation of COX-2 in SMMC-7721 cells. SSd may down-regulate the expression of COX-2 through inhibiting STAT3 phosphorylation and thus exert its anti-tumor effect.

【**Key words**】 liver neoplasma; tumor cells, cultured; saikosaponin; cyclooxygenase-2; STAT3 transcription factor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30771895). Corresponding author: He Shuixiang, Tel: 86-29-85323920, E-mail: hesx123@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30771895)
【通信作者】 和水祥,电话:(029)85323920,E-mail:hesx123@126.com

原发性肝癌是恶性程度最高的肿瘤之一,深入研究其发病机制,探寻有效的治疗靶点是目前研究热点之一。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)是花生四烯酸代谢中的重要限速酶,它在包括肝癌在内的多种肿瘤组织中高度表达,被认为是参与肿瘤发生的重要因素[1]。柴胡皂甙 d(saikosaponin-d, SSd)是从传统中药柴胡中分离、提取出来的药理活性最强的成分之一,大量研究显示它可以抑制肿瘤的发生、发展,但机制尚不明确。我们前期的研究[2]显示 SSd 可明显下调肝癌细胞 COX-2 的表达,抑制 PGE_2 的生成,进而抑制肝癌细胞的增殖,然而 SSd 抑制 COX-2 表达的具体分子调控机制尚不清楚。近来有研究[3]提示信号传导子与激活子 3(STAT3)可能参与了 COX-2 蛋白的表达调控。本实验拟通过研究 STAT3 在 COX-2 表达调节过程中的作用,探索 SSd 发挥抗癌作用的机制,为开发应用 SSd 防治肝癌等消化系统肿瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由西安交通大学医学院第一附属医院临床分子生物中心陈葳主任惠赠。IL-6 购自美国 Peprotech 公司;AG490 及 MTT 均购自美国 Sigma 公司;SSd 购自江西本草天工有限公司;免疫细胞化学使用的一抗兔抗人多克隆抗体 STAT3、COX2 及 S-P 免疫细胞化学试剂盒购自北京博奥森公司;DAB 底物显色试剂盒、RIPA 细胞裂解液购自北京天根公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂为 Roche 公司产品;免疫印迹使用的一抗兔抗人多克隆抗体 STAT3、HRP 标记羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司;免疫印迹、免疫细胞化学使用的一抗兔抗人单克隆抗体 Tyr705 Phospho-Stat3 及免疫印迹使用的兔抗人单克隆抗体 COX-2 均购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞增殖检测 人肝癌 SMMC-7721 细胞接种于含 10%(体积分数)新生牛血清(血清 56 ℃,30 min 灭活),青霉素和链霉素各为 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液中,置 37 ℃、5%(体积分数)CO_2 培养箱中常规培养,以本组报道过的常规 MTT 法检测细胞增殖[4]。

1.2.2 免疫细胞化学法检测 STAT3、p-STAT3 及 COX2 蛋白的定位及表达 将对数生长期的细胞采用随机数字表法进行分组,每组均设 6 个复孔。空白对照组、IL-6(25 ng/ml)诱导组、AG490 干预组(IL-6 25 ng/ml + AG490 50 μmol/L)、SSd 组(IL-6 25 ng/ml + SSd 5 μg/ml)检测 p-STAT3、COX2 蛋白的定位及表达。空白对照组、SSd 组检测 STAT3 蛋白的定位及表达。24 h 后收集细胞爬片,4% 多聚甲醛固定,-20 ℃保存。按照博奥森公司的染色试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色(S-P法)。一抗为 STAT3 (稀释度为 1∶600)、p-STAT3 (稀释度为 1∶50),COX-2(稀释度为 1∶400)。结果判断标准参考文献[4]。

1.2.3 免疫印迹检测 STAT3、p-STAT3、COX2 蛋白的表达 将对数生长期细胞采用随机数字表法进行分组:空白对照组、IL-6(25 ng/ml)诱导组、IL-6(25 ng/ml) + AG490 (10、50、100 μmol/L)组、IL-6(25 ng/ml)组 + SSd(2.5、5.0、10.0 μg/ml)组。细胞蛋白的提取:将培养皿置冰上,4 ℃预冷 PBS 漂洗,刮下细胞吸入 EP 管中,离心,弃上清后添加 RIPA 裂解液,4 ℃冰上裂解1 h,14 000 × g 离心力 4 ℃离心 20 min,取上清。Bradford 法测定蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白上样,经 5% 浓缩胶,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,PVDF 膜半干转法 15 V 转印 30 min,5% 脱脂奶粉封闭 60 min,5% BSA-TBST 稀释一抗 STAT3(1∶200)、p-STAT3(1∶1 000)、COX-2(1∶500),4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(工作浓度1∶20 000)孵育 60 min。TBST 洗膜后,ECL 增强发光,感光胶片、显影、定影。β-actin 蛋白为内参照,图像扫描,分析结果。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,计数资料应用 Fisher 确切概率法分析。

2 结果

2.1 SSd 对肝癌细胞生长增殖的影响

SSd 对肝癌细胞的增殖有明显的抑制作用,且随 SSd 作用终浓度和时间的变化而变化,在一定范围内呈明显的剂量和时间依赖性,其中以 10 μg/ml SSd 作用 48 h 的抑制率最高,可达 75%(图 1)。

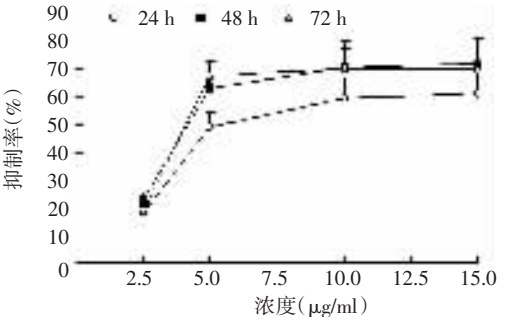
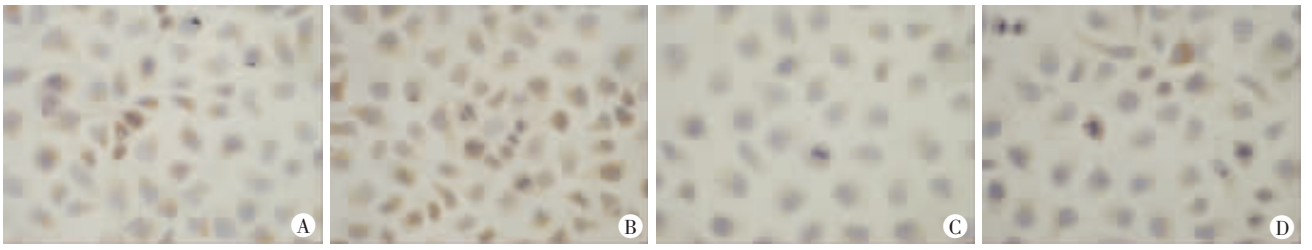


图 1 SSd 对肝癌细胞生长增殖的抑制作用

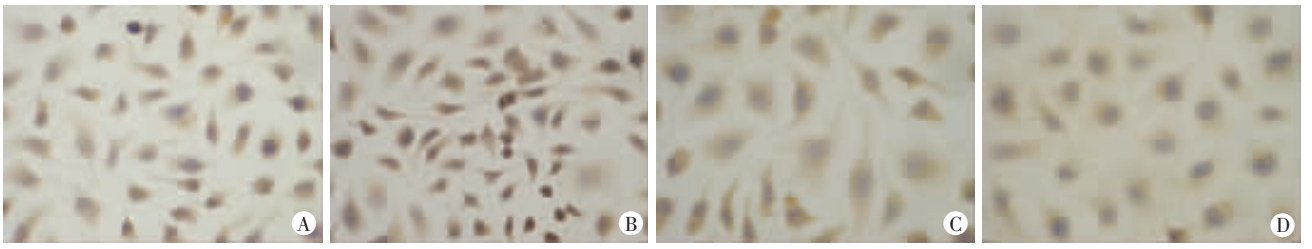
2.2 免疫细胞化学检测 SMMC-7721 细胞各分组中 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 的表达

p-STAT3 仅在细胞核中表达,COX-2 定位于胞质及核膜周围,STAT3 主要在细胞质中表达,阳性染色均呈棕黄色颗粒(图 2~4)。在空白对照组中有少量 p-STAT3 表达(图 2A),经 IL-6 诱导,p-STAT3 表达增强后,COX-2 蛋白的表达也呈现明显的升高趋势(图 2B、3B),且与空白对照组相比具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。当 AG490 抑制 p-STAT3 表达后,COX-2 的表达同样出现下调(图 2C、3C),且同 IL-6 诱导组相比具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。SSd 具有抑制 p-STAT3 和 COX-2 蛋白的表达的作用(图 2D、3D),同 IL-6 诱导组相比差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1),但 SSd 对 STAT3 蛋白表达的影响同空白对照组相比无明显差异($P>0.05$,图 4,表 2)。



A：空白对照组；B：IL-6 诱导组；C：IL-6 + AG490 组；D：IL-6 + SSd 组

图2 免疫细胞化学法观察各组 SMMC-7721 细胞 p-STAT3 的表达 （S-P ×200）



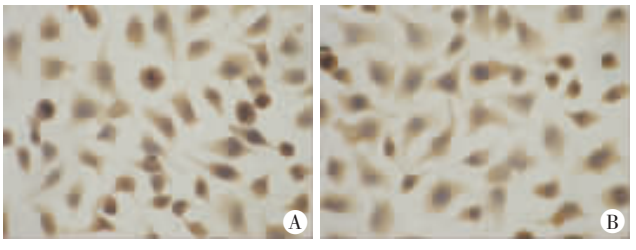
A：空白对照组；B：IL-6 诱导组；C：IL-6 + AG490 组；D：IL-6 + SSd 组

图3 免疫细胞化学法观察各组 SMMC-7721 细胞 COX-2 的表达 （S-P ×200）

表1 不同处理组 SMMC-7721 细胞 p-STAT3 和 COX-2 的表达

组别	p-STAT3					COX-2				
	−	+	++	+++	高表达率(%)	−	+	++	+++	高表达率(%)
空白对照组	2	7	4	2	40.00[a]	1	9	3	2	33.33[a]
IL-6 诱导组	0	1	6	8	93.33	0	2	6	7	86.67
AG490 组	3	9	2	1	20.00[a]	4	7	3	1	26.67[a]
SSd 组	1	6	6	2	53.33[a]	2	6	5	2	46.67[a]

a：$P<0.05$，与 IL-6 诱导组比较

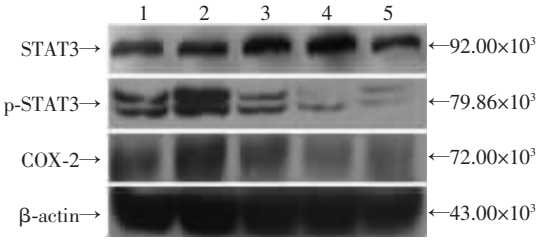


A：空白对照组；B：IL-6 诱导组

图4 免疫细胞化学法观察各组 SMMC-7721 细胞 STAT3 的表达 （S-P ×200）

2.3 免疫印迹检测各组 SMMC-7721 细胞中 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 的表达

p-STAT3 与 COX-2 在空白对照组中就有表达，经 IL-6 作用后，p-STAT3 和 COX-2 的表达较空白对照组相比明显增强，AG490 和 SSd 均呈剂量依赖性抑制了 p-STAT3 和 COX-2 的表达，而 SSd 不影响 STAT3 蛋白的表达（图5、6，表3、4）。

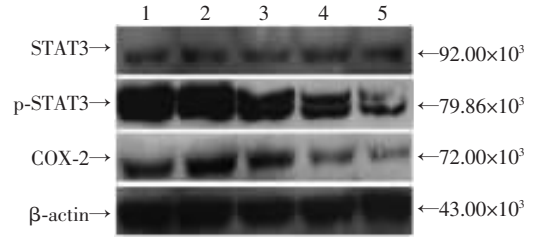


1：空白对照组；2：IL-6 诱导组；3：IL-6 + AG490 组（10 μmol/L）；4：IL-6 + AG490 组（50 μmol/L）；5：IL-6 + AG490 组（100 μmol/L）

图5 不同浓度 AG490 作用后 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 蛋白表达变化

表2 不同处理组 SMMC-7721 细胞 STAT3 的表达情况

组别	−	+	++	+++	高表达率(%)
空白对照组	0	9	5	1	40.00
SSd 组	0	8	4	3	46.67



1：空白对照组；2：IL-6 诱导组；3：IL-6 + SSd 组（2.5 μg/ml）；4：IL-6 + SSd 组（5.0 μg/ml）；5：IL-6 + SSd 组（10.0 μg/ml）

图6 不同浓度 SSd 作用后 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 蛋白表达变化

表3 不同浓度 AG490 作用后 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 蛋白的相对表达量（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	STAT3	p-STAT3	COX-2
空白对照组	0.69 ± 0.12	0.82 ± 0.18	0.88 ± 0.24
IL-6 诱导组	0.63 ± 0.08	1.69 ± 0.41[a]	1.63 ± 0.32[a]
IL-6 + AG490 组（10 μmol/L）	0.74 ± 0.11	0.77 ± 0.18[b]	1.25 ± 0.37[ab]
IL-6 + AG490 组（50 μmol/L）	0.65 ± 0.10	0.45 ± 0.07[ab]	0.97 ± 0.21[b]
IL-6 + AG490 组（100 μmol/L）	0.75 ± 0.14	0.31 ± 0.10[ab]	0.74 ± 0.19[b]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 IL-6 诱导组比较

表 4 不同浓度 SSd 作用后 STAT3、p-STAT3 及 COX-2 蛋白的相对表达量（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	STAT3	p-STAT3	COX-2
空白对照组	0.65 ± 0.14	0.82 ± 0.23	0.88 ± 0.26
IL-6 诱导组	0.69 ± 0.16	1.70 ± 0.39[a]	1.72 ± 0.28[a]
IL-6 + AG490 组（10 μmol/L）	0.64 ± 0.18	1.31 ± 0.32[ab]	1.32 ± 0.41[ab]
IL-6 + AG490 组（50 μmol/L）	0.68 ± 0.13	0.72 ± 0.19[b]	1.20 ± 0.31[b]
IL-6 + AG490 组（100 μmol/L）	0.62 ± 0.18	0.50 ± 0.19[b]	1.07 ± 0.11[b]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 IL-6 诱导组比较

3 讨论

COX-2 在多种肿瘤组织中如肺腺癌、乳腺癌、食管癌等表达明显高于正常组织，而流行病学提示长期服用 NSAIDs 的患者发生肿瘤的危险性大大降低，因此有人认为 COX-2 是肿瘤发生的关键因素[5,6]。近年研究[7]报道，COX-2 在绝大多数的肝细胞癌组织内呈过表达。虽然 COX-2 过表达在肿瘤发生中的作用仍不明确，但可能与其导致 PGs 的合成增多诱导的 bcl-2 蛋白的表达增高以及下调 p53 的下游靶基因，使细胞增殖与凋亡失衡等有关。STAT3 信号传导通路与细胞的增殖、分化及凋亡密切相关，STAT3 过度激活后可诱导多种基因如凋亡抑制基因、细胞周期调控基因及血管生成相关基因的高表达，从而导致细胞异常增殖和恶性转化，目前被定义为癌基因[8]。有研究[9]显示 STAT3 的活性形式（p- STAT3）不仅在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织，而且与 COX-2 表达成正相关。近来发现，COX-2 基因的 5′端存在一些潜在的转录调控序列，如 TATA box、C/EBP 序列、NF-IL6 模序等[10,11]，与此同时 Yamaoka 等[12]证实在大鼠、小鼠以及人类的 COX-2 基因启动子内含有一种 GAS 序列，而该序列为 Stats 结合区域，提示 STAT3 可能参与 COX-2 的上游转录调节过程。本实验结果显示，用 JAK2 抑制剂 AG490 阻断 JAK2 介导的 STAT3 磷酸化后，肝癌细胞中 COX-2 蛋白表达含量明显下调，而加入 IL-6 诱导磷酸化 STAT3 生成增加后 COX-2 蛋白表达含量也相应发生上调，进一步证实 STAT3 可能通过磷酸化和去磷酸化的形式参与了肝癌细胞 COX-2 表达的调节。

SSd 是从传统中药柴胡中分离、提取出来的药理活性最强的成分之一，通常认为具有解热、镇痛和抗炎等药理作用，近年研究[13]表明：SSd 可通过抑制肝肿瘤细胞的增殖、诱导细胞的凋亡、抑制肿瘤血管的生成等几个方面达到抗肝肿瘤的作用。我们前期实验发现 SSd 可明显降低二乙基亚硝胺（DEN）诱发肝癌大鼠的死亡率以及肝癌结节的数量，同时应用 SSd 对体外培养的人肝癌细胞研究显示 SSd 可以抑制肿瘤细胞 SMMC-7721 增殖，同时 COX-2 蛋白表达发生明显下调，前列腺素 E_2（PGE_2）生成也明显下降[2,14]。本实验在既往研究的基础上进一步探索发现，SSd 可明显抑制 STAT3 的磷酸化水平，而对 STAT3 蛋白表达水平没有影响，提示抑制 STAT3 的磷酸化进而导致 COX-2 表达下调可能是 SSd 抗癌作用的机制之一，这为开发应用 SSd 防治肝癌等消化系统肿瘤提供了理论依据。但 SSd 是否还可通过其他的信号途径发挥抗癌作用有待进一步的研究。

参考文献：

[1] 侯振江，张宗英. 环氧化酶-2 在肝癌研究中的进展[J]. 国际检验医学杂志，2006，27(4)：371－372，375.
[2] 和水祥，罗金燕，赵刚，等. 柴胡皂甙 d 对肝癌 SMMC-7721 细胞环氧合酶-2 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2006，14(9)：712－714.
[3] 张辉，王彬，张有成，等. 信号传导子和激活子 3 通路与结直肠癌中环氧化酶 2 表达的相关性研究[J]. 中华医学杂志，2005，85(41)：2899－2904.
[4] 翟学敏，和水祥，任牡丹，等. 丹参酮ⅡA 对人肝癌 SMMC-7721 细胞 EGF 及其受体表达的影响[J]. 浙江大学学报：医学版，2009，38(2)：163－169.
[5] 李国平，杨恬. 环氧合酶-2 与肿瘤发生[J]. 生理科学进展，2003，34(1)：83－85.
[6] 熊兵红，程勇. 环氧合酶-2 与大肠癌研究进展[J]. 消化外科，2005，4(6)：451－456.
[7] 韩少良，唐槐静，林东昕，等. 肝细胞癌组织内 COX-2 表达的临床意义[J]. 中华肝胆外科杂志，2002，8(5)：307－308.
[8] 吴民华，陈小毅. STAT3 表达与肿瘤关系的研究进展[J]. 广东医学院学报，2007，25(5)：567－570.
[9] Feng D Y, Zheng H, Tan Y, *et al*. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(1)：33－36.
[10] Wei X, Zhang X, Flick L M, *et al*. Titanium particles stimulate COX-2 expression in synovial fibroblasts through an oxidative stress-induced, calpain-dependent, NF-kappaB pathway[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(2)：C310－C320.
[11] Woo K J, Kwon T K. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(13)：1776－1783.
[12] Yamaoka K, Otsuka T, Niiro H, *et al*. Activation of STAT5 by lipopolysaccharide through granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in human monocytes[J]. J Immunol, 1998, 160(2)：838－845.
[13] 王艳丽，和水祥，罗金燕. 柴胡皂苷抗肿瘤机制研究进展[J]. 中西医结合学报，2006，4(1)：98－100.
[14] 程延安，王宝峰，马红兵，等. 柴胡皂甙-d 对 DEN 致大鼠实验性肝癌形成的影响[J]. 现代肿瘤医学，2009，17(3)：406－410.

（收稿 2010-04-23 修回 2010-07-02）
（编辑 汪勤俭）