二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚类化合物3m抗皮肤鳞状细胞癌的作用及机制Δ

唐姗姗[1*]，荣冬芸[1]，王　叶[1]，苏羽岫[1]，汪　涛[1]，龙　秋[1]，曹　煜[2,3#]（1.贵州医科大学临床医学院，贵阳 550004；2.贵州医科大学附属医院皮肤科，贵阳　550001；3.贵州医科大学大健康产业技术发展研究中心，贵阳 550025）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）09-1086-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.09.12

摘　要　目的　探究二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚类化合物3m抗皮肤鳞状细胞癌的作用及机制。**方法**　以人皮肤鳞状细胞癌A431、Colo-16细胞为研究对象，采用CCK-8法检测不同浓度（5、10、20、40、80 μmol/L）3m作用24、48、72 h后对A431、Colo-16细胞增殖的影响，并计算培养48 h时的半数抑制浓度（IC_{50}）。将A431、Colo-16细胞分别分为对照组和3m低、高浓度组（15、30 μmol/L），加入相应药物或培养基培养48 h后，采用倒置显微镜观察细胞形态变化，检测细胞克隆形成率、迁移率、侵袭数、细胞周期分布和凋亡率，检测细胞中Janus激酶2/信号转导及转录激活因子3（JAK2/STAT3）信号通路相关蛋白[JAK2、STAT3、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）]磷酸化或表达水平及其mRNA的表达水平。**结果**　不同浓度3m作用24、48、72 h后均能显著抑制A431、Colo-16细胞增殖（$P<0.01$），48 h时的IC_{50}分别为20.36、23.72 μmol/L。作用48 h后，与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞排列稀疏、连接松散；克隆形成率、迁移率、侵袭数，细胞中JAK2、STAT3、Bcl-2 mRNA表达水平，JAK2、STAT3蛋白磷酸化水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低/减少（$P<0.01$）；细胞周期G2期占比、凋亡率、Bax蛋白和mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$）；上述作用均呈剂量依赖性。**结论**　3m可呈剂量依赖性地抑制皮肤鳞状细胞癌A431、Colo-16细胞的增殖、克隆形成、迁移、侵袭能力，其作用机制与抑制JAK2/STAT3信号通路活性，诱导细胞凋亡有关。

关键词　皮肤鳞状细胞癌；二氢色原酮；多环吡咯螺环氧化吲哚；增殖；凋亡；迁移；侵袭

Anti-cutaneous squamous cell carcinoma effect and mechanism of dihydrochromone-spliced polycyclic pyrrole-spiroepoxidole compound 3m

TANG Shanshan[1], RONG Dongyun[1], WANG Ye[1], SU Yushen[1], WANG Tao[1], LONG Qiu[1], CAO Yu[2, 3]（1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Dermatology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China; 3. Research Center for Technological Development of Comprehensive Health Industry, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effect and mechanism of dihydrochromone-spliced polycyclic pyrrole-spiroepoxidole compound 3m on cutaneous squamous cell carcinoma. **METHODS** Using human cutaneous squamous cell carcinoma A431 and Colo-16 cells as research subjects, CCK-8 assay was used to detect the effects of different concentrations of 3m (5, 10, 20, 40, 80 μmol/L) on the proliferation of A431 and Colo-16 cells after 24, 48 and 72 hours; the median inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated at 48 h of treatment. A431 and Colo-16 cells were divided into control group, 3m low-concentration and high-concentration groups (15, 30 μmol/L). After treated with relevant drugs or culture medium for 48 h, the morphological changes of cells in each group were observed by inverted microscope. Clone formation rate, migration rate and number of cell invasions, cell cycle distribution and apoptosis rate were detected. The phosphorylation, or expression of Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway related proteins [JAK2, STAT3, B-cell lymphocyte-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax)], and their mRNA expression in cells were detected. **RESULTS** 3m could significantly inhibit the proliferation of A431 and Colo-16 cells after treated for 24, 48, 72 h ($P<0.01$), and IC_{50} of them were 20.36, 23.72 μmol/L, respectively. After 48 hours of treatment, compared with control group, A431 and Colo-16 cells arranged sparsely and loosely connected in 3m low-concentration and high-concentration groups. The clone formation rate, migration rate, number of cell invasions, mRNA expressions of JAK2, STAT3 and Bcl-2, the phosphorylation of JAK2 and STAT3, protein expression of Bcl-2 were significantly decreased/

Δ **基金项目** 贵州省2020年特色林业产业研发项目（No.GZMC-ZD20202091）

＊ **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药现代化抗皮肤肿瘤。E-mail：1627316427@qq.com

通信作者 教授，博士生导师。研究方向：中药现代化抗皮肤鳞癌的机制及药物筛选。电话：0851-86770846。E-mail：2692327139@qq.com

weakened ($P<0.01$). Proportion of cell cycle in G2 phase, apoptosis rate, protein and mRNA expression of Bax were increased significantly ($P<0.01$); and all the above effects were in dose-dependent manner. **CONCLUSIONS** 3m can inhibit the proliferation, clone formation, migration and invasion abilities of cutaneous squamous cell carcinoma A431 and Colo-16 cells in a dose-dependent manner, the mechanism of which may be associated with inhibiting the activity of JAK2/STAT3 signaling pathway, and inducing cell apoptosis.

KEYWORDS cutaneous squamous cell carcinoma; dihydrochromone; polycyclic pyrrole-spiroepoxidole; proliferation; apoptosis; migration; invasion

皮肤鳞状细胞癌（cutaneous squamous cell carcinoma，cSCC）的发病率仅次于基底细胞癌，且随着人们生活环境的变化其发病率持续上升[1-2]。尽管cSCC属于惰性肿瘤，但如果病情未得到控制其仍然可以局部浸润并远处转移，此类患者的10年生存率低于20%[3-5]。手术是cSCC最常用的治疗方式，但对于局部晚期及转移性cSCC来说，患者仍面临术后高复发率和高病死率的问题，其他药物治疗方式也存在疗效差、副作用大等局限[6]。因此，寻找治疗cSCC的新型药物具有重要意义。

天然产物因其毒性低、分子量小、抗肿瘤活性强等被广泛应用于临床肿瘤防治[7]。二氢色原酮普遍存在于灰叶素、杜英碱等天然产物中，吡咯螺环氧化吲哚普遍存在于钩藤碱C、鸭脚木碱等天然产物中，两者均具有明显的抗肿瘤、抗病毒、抗氧化自由基等活性[8-9]。3m是由含C—F键官能团的二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚构成的化合物（结构式见图1），其对人白血病细胞、前列腺癌细胞具有较好的抑制作用[10]，但其是否具有抗cSCC作用笔者查阅文献尚未见报道。基于此，本研究以人cSCC的A431、Colo-16细胞为研究对象，并基于Janus激酶2/信号转导及转录激活因子3（Janus kinase 2/signal transduction and activator of transcription 3，JAK2/STAT3）信号通路初步探讨3m抗cSCC的作用及机制，以期为cSCC的药物治疗提供参考。

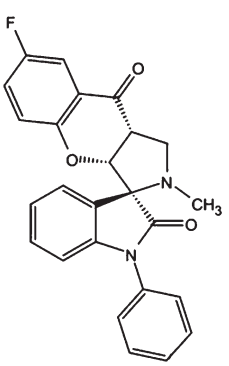


图1　3m的化学结构式

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器有MCO-18AIC型电动恒温CO_2培养箱（日本Sanyo公司）、IX51型倒置显微镜（日本Olympus公司），SYNERGY-H4型多功能酶标仪（美国Biotech公司），Step one plus型实时荧光定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司），FACS VERSE型流式细胞仪（美国BD公司），DYCP-31DN型蛋白电泳仪、DYCZ-40D型蛋白转膜仪（北京六一仪器有限公司）等。

1.2　主要药品与试剂

3m（批号20190821）购自上海美迪西生物医药股份有限公司；5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）、细胞培养级二甲基亚砜（DMSO）、蛋白酶抑制剂、高效RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒（批号分别为1209G024、401P32、20210616、20210719、20210703）均购自北京索莱宝科技有限公司；胎牛血清（批号1742862）购自以色列BI公司；DMEM高糖培养基、青链霉素（批号分别为8122265、2321148）均购自美国Gibco公司；CCK-8检测试剂（批号JU739）购自日本同仁化学研究所；Matrigel基质胶（批号0323001）购自美国BD公司；细胞周期检测试剂盒、Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒、ECL发光液（批号分别为MA0334、Jan-18G、MA0186-1）均购自大连博格林生物科技有限公司；兔源JAK2、STAT3、磷酸化JAK2（p-JAK2）、磷酸化STAT3（p-STAT3）、B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）、β-actin单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为2212188、M03023207、M12212997、1252412、4071637、4121556、0094497、08A121）均购自沈阳万类生物科技有限公司；Trizol试剂盒、逆转录PCR（RT-PCR）试剂盒（批号分别为9108、RR037A）均购自宝日医生物技术（北京）有限公司。

1.3　细胞

人cSCC的A431、Colo-16细胞购自上海富衡生物科技有限公司。

2　方法

2.1　细胞培养

采用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖培养基于37 ℃、5%CO_2的恒温细胞培养箱中常规培养A431、Colo-16细胞。每2天更换1次细胞培养液。

2.2　A431、Colo-16细胞增殖活力的检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的A431、Colo-16细胞制成6×10^4个/mL的单细胞混悬液，以100 μL/孔接种于96孔板中，培养24 h贴壁后，分为对照组（含0.1%DMSO培养基）、5-FU不同浓度组（5、10、20、

40、80 μmol/L，浓度根据前期预实验结果设置）、3m不同浓度组（5、10、20、40、80 μmol/L，浓度根据前期预实验结果设置），另设置空白组（无细胞和药物，仅含培养基），每组设3个复孔。继续培养24、48、72 h后每孔加入CCK-8试剂10 μL，孵育2 h后采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔光密度值（optical density，OD），计算细胞增殖活力，细胞增殖活力（%）=[1-（对照组OD-给药组OD）/（对照组OD-空白组OD）]×100%；然后计算48 h时5-FU和3m对2种细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）。实验重复3次。

2.3 A431、Colo-16细胞的形态观察

取对数生长期的A431、Colo-16细胞接种于6孔板中，培养至细胞密度为70%左右，弃培养基，然后分别分为3m低、高浓度组（15、30 μmol/L，浓度根据“2.2”项下结果设置）和对照组（含0.1%DMSO培养基），每组设3个复孔；加入相应药物或培养基培养48 h后，采用倒置显微镜观察各组细胞的形态并拍照。实验重复3次。

2.4 A431、Colo-16细胞克隆形成率的检测

取对数生长期的A431、Colo-16细胞接种于6孔板中，培养至细胞密度为70%左右，按“2.3”项下方法分组与给药，每组设3个复孔；培养48 h后，用胰酶消化细胞，然后以1 400个/孔接种于6孔板中继续培养；隔4 d换1次培养基，培养14 d后用甲醛固定，结晶紫染色，进行克隆计数，并计算细胞克隆形成率，细胞克隆形成率（%）=克隆数/接种数×100%。实验重复3次。

2.5 A431、Colo-16细胞迁移率的检测

采用划痕实验进行检测。取对数生长期的A431、Colo-16细胞制成单细胞悬液后接种于6孔板中，当细胞单层融合后，吸弃培养基；采用灭菌枪头划痕，以磷酸盐缓冲液（PBS）轻轻冲洗划痕后残留的细胞及碎片，然后按“2.3”项下方法分组与给药（各组均含5%胎牛血清），每组设3个复孔；于0、48 h时采用倒置显微镜观察和拍照，计算细胞迁移率，细胞迁移率（%）=（0 h划痕面积-48 h划痕面积）/0 h划痕面积×100%。实验重复3次。

2.6 A431、Colo-16细胞侵袭数的检测

采用Transwell实验进行检测。将饥饿24 h的A431、Colo-16细胞用胰酶消化后，离心保留沉淀，然后按“2.3”项下方法分组与给药（各组均不含血清），每组设3个平行。重悬各组细胞稀释制成2.5×10^5个/mL的单细胞混悬液，取200 μL接种于已凝固的含1%基质胶（以DMEM高糖培养基配制）的Transwell小室上室，下室加入700 μL含20%胎牛血清的DMEM高糖培养基，培养48 h；取出小室，以甲醛固定后进行结晶紫染色，擦拭上室内层细胞。每个小室随机选取5个视野在倒置显微镜下拍照，并计算细胞侵袭数，细胞侵袭数=5个视野细胞总数/5。实验重复3次。

2.7 A431、Colo-16细胞周期分布及凋亡率的检测

采用流式细胞术进行检测。取对数生长期的A431、Colo-16细胞接种于6孔板中，培养24 h后，按“2.3”项下方法分组与给药，每组设3个复孔，干预处理48 h；用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化细胞，制成5×10^5个/mL的单细胞悬液后，用预冷PBS洗涤2次；加入预冷75%乙醇，于4 ℃隔夜固定，以1 500 r/min离心5 min，弃上清液；用预冷PBS洗涤1次，加入500 μL染色工作液[含25 μL碘化吡啶（pyridine iodide，PI）、10 μL核糖核酸酶A]，避光温浴30 min，采用流式细胞仪检测2种细胞的周期分布。另同上述方法分组、给药、干预、制成单细胞悬液后，加入500 μL染色缓冲液，再加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和5 μL PI，避光染色30 min，采用流式细胞仪检测2种细胞的凋亡情况。实验均重复3次。

2.8 A431、Colo-16细胞中JAK2/STAT3信号通路相关基因mRNA表达的检测

采用RT-PCR法检测。取对数生长期的A431、Colo-16细胞接种于6孔板中，培养至细胞密度为70%左右，按“2.3”项下方法分组与给药，每组设3个复孔；培养48 h后收集细胞，提取总RNA，检测浓度及纯度后，根据RT-PCR试剂盒说明方法操作，以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA的表达水平。实验重复3次。本研究PCR引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计合成，引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
JAK2	上游：5′-GTCCACCAGCGGAATTTAT-3′	127
	下游：5′-ATCTCATCTGGGCATCCAT-3′	
STAT3	上游：5′-GCGTCCATCCTGTGGTA-3′	139
	下游：5′-TCAGTCCTCGCTTGGTG-3′	
Bcl-2	上游：5′-TTCATCGTCCCCTCTCC-3′	150
	下游：5′-TCAGTCCGGTATTCGCA-3′	
Bax	上游：5′-ATGGGCTGGACATTGGAC-3′	106
	下游：5′-GGGACATCAGTCGCTTCAG-3′	
β-actin	上游：5′-CCTGGCACCCAGCACAAT-3′	144
	下游：5′-GGGCCGGACTCGTCATAC-3′	

2.9 A431、Colo-16细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的A431、Colo-16细胞接种于6孔板中，培养至细胞密度为70%左右，按“2.3”项下方法分组与给药，每组设3个复孔；处理48 h后用PBS清洗，加入蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂等进行裂解，离心收集蛋白样品，经BCA法定量后，加入缓冲液煮沸变性蛋白。将蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，转膜，以5%脱脂奶粉封闭2 h；加入相应一抗（JAK2、STAT3、p-JAK2、Bax、Bcl-2的稀释比例均为1∶500，p-STAT3、β-actin的稀释比例均为1∶1 000）2 h，TBST洗膜30 min；加入相应二抗（稀释比例为1∶3 000）孵育1 h，TBST洗膜30 min；采用ECL发光液显影，采用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以p-JAK2与JAK2、p-STAT3与STAT3的比值表示蛋白磷酸化水平，以Bax、Bcl-2与β-actin的比值表示蛋白表达水平。

2.10 统计学分析

采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析。计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组数据间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 3m对A431、Colo-16细胞增殖的影响

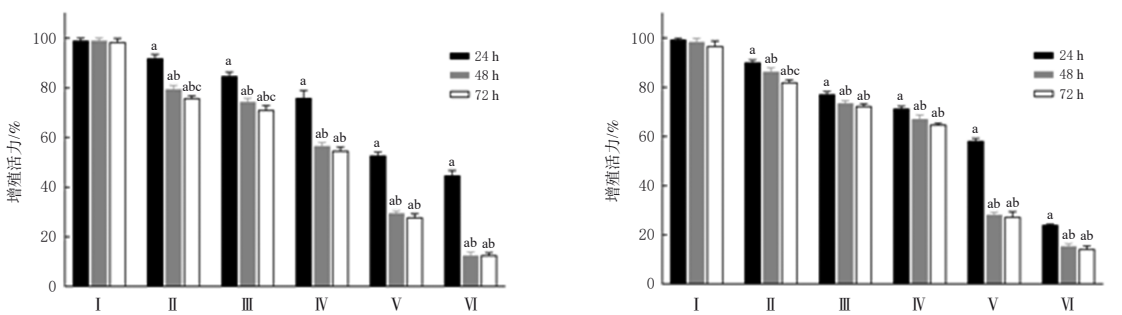
不同浓度3m作用24、48、72 h后均能显著抑制A431、Colo-16细胞增殖（$P<0.01$），且相同作用时间下，随着药物剂量的增加，2种细胞的增殖活力均逐渐下降，且呈剂量依赖趋势；相同药物浓度下，作用48、72 h后，2种细胞的增殖活力均显著低于作用24 h时（$P<0.01$）；与作用48 h时比较，作用72 h后，3m在5、10 μmol/L（Colo-16细胞除外）浓度下，可显著抑制2种细胞的增殖活力（$P<0.05$）。进一步模拟量效关系曲线，得出3m、5-FU作用于A431细胞48 h的IC_{50}分别为20.36、53.98 μmol/L，作用于Colo-16细胞48 h的IC_{50}分别为23.72、64.71 μmol/L。故后续实验将细胞培养时间设置为48 h，3m的低浓度设置为15 μmol/L、高浓度设置为30 μmol/L。结果见图2。

3.2 3m对A431、Colo-16细胞形态的影响

对照组细胞形态正常，3m低、高浓度组细胞排列稀疏、连接松散，悬浮细胞增多，贴壁细胞无完整细胞质。结果见图3。

3.3 3m对A431、Colo-16细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞的克隆形成率均显著降低（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见图4、表2。



A. 3m对A431细胞的增殖抑制作用　　B. 3m对Colo-16细胞的增殖抑制作用

Ⅰ：对照组；Ⅱ：3m 5 μmol/L组；Ⅲ：3m 10 μmol/L组；Ⅳ：3m 20 μmol/L组；Ⅴ：3m 40 μmol/L组；Ⅵ：3m 80 μmol/L组；a：与相同作用时间下对照组比较，$P<0.01$；b：与同组24 h时比较，$P<0.01$；c：与同组48 h时比较，$P<0.05$

图2 3m对A431、Colo-16细胞增殖活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

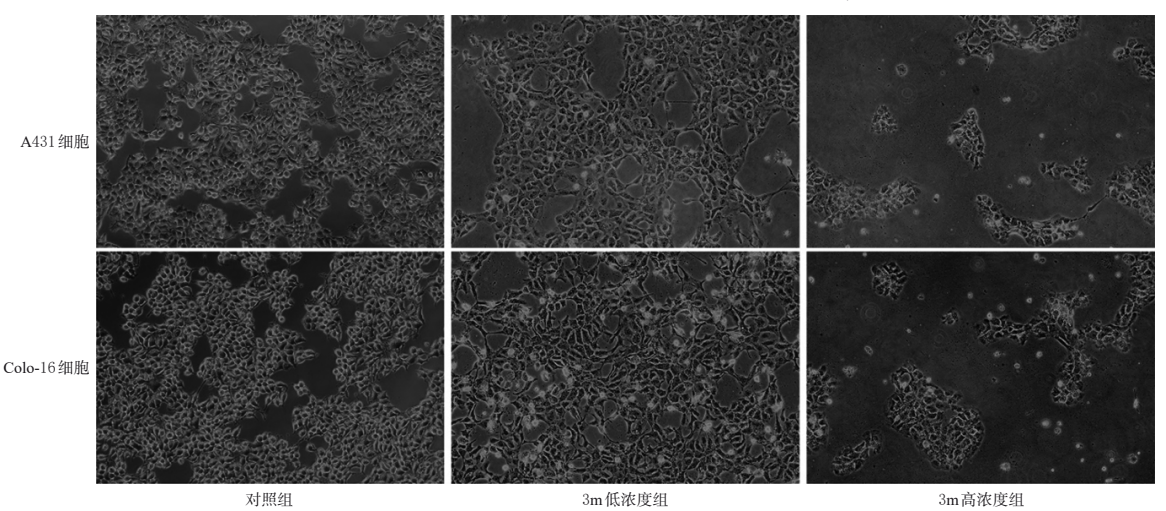
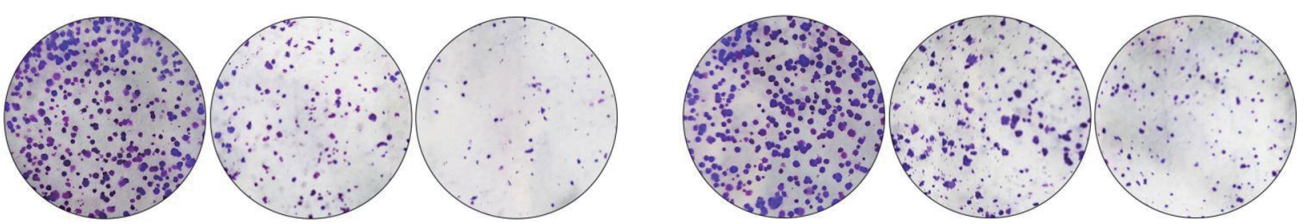


图3 各组细胞形态的显微图（×100）



A. A431细胞　　B. Colo-16细胞

图4 3m对A431、Colo-16细胞克隆形成能力的影响

表2　2种细胞克隆形成率、迁移率、侵袭数的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	A431细胞			Colo-16细胞		
	克隆形成率/%	迁移率/%	侵袭数/个	克隆形成率/%	迁移率/%	侵袭数/个
对照组	64.71±2.03	63.05±2.12	988±17	63.48±1.35	55.68±1.25	1 013±18
3m低浓度组	32.38±1.53[a]	42.02±1.55[a]	684±13[a]	41.95±2.08[a]	35.39±1.16[a]	561±25[a]
3m高浓度组	17.38±1.23[ab]	16.43±1.08[ab]	243±10[ab]	24.24±2.12[ab]	25.37±1.11[ab]	239±19[ab]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与3m低浓度组比较，$P<0.01$

3.4　3m对A431、Colo-16细胞迁移能力的影响

与对照组比较，作用48 h后，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞的迁移率均显著降低（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见表2、图5。

3.5　3m对A431、Colo-16细胞侵袭能力的影响

与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞的侵袭数均显著减少（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见表2、图6。

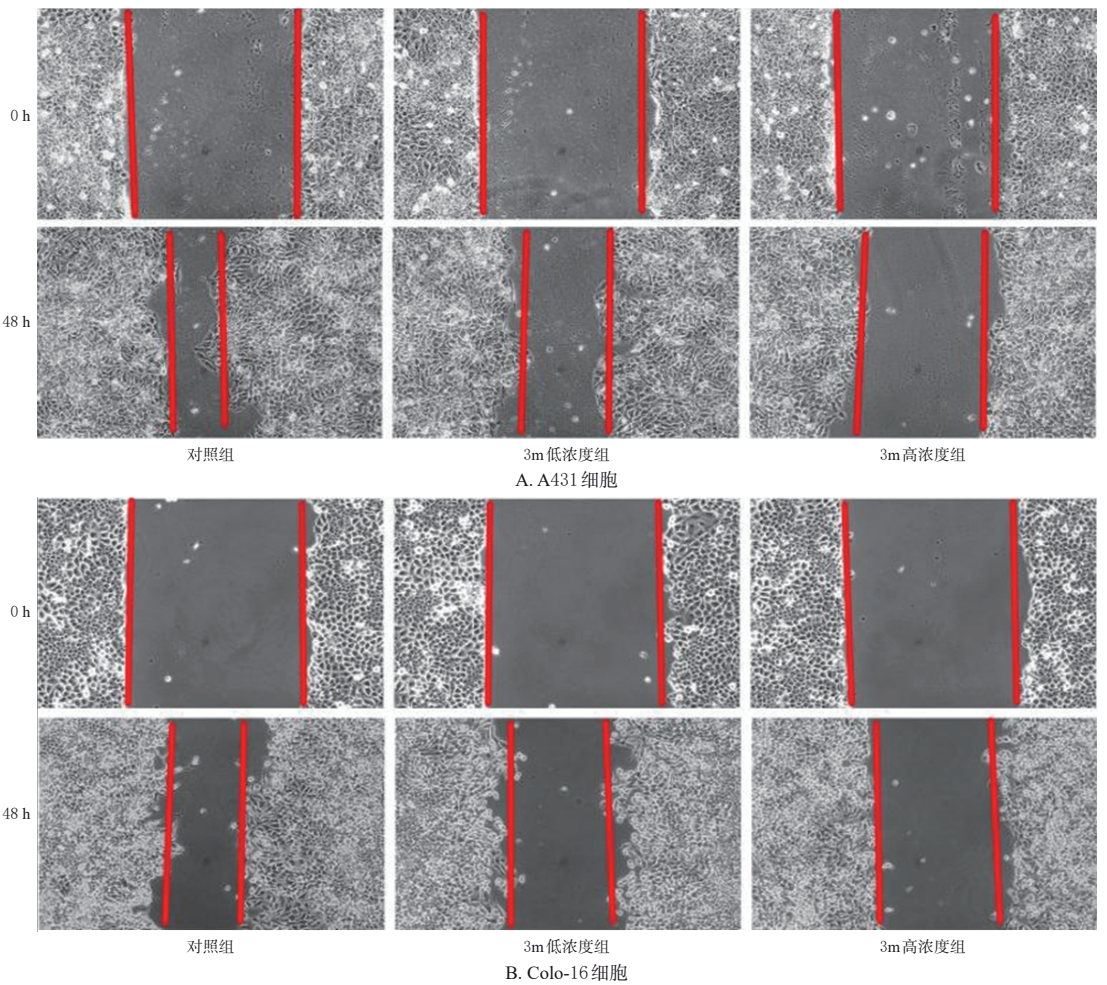


图5　3m对A431、Colo-16细胞迁移能力的影响（×100）

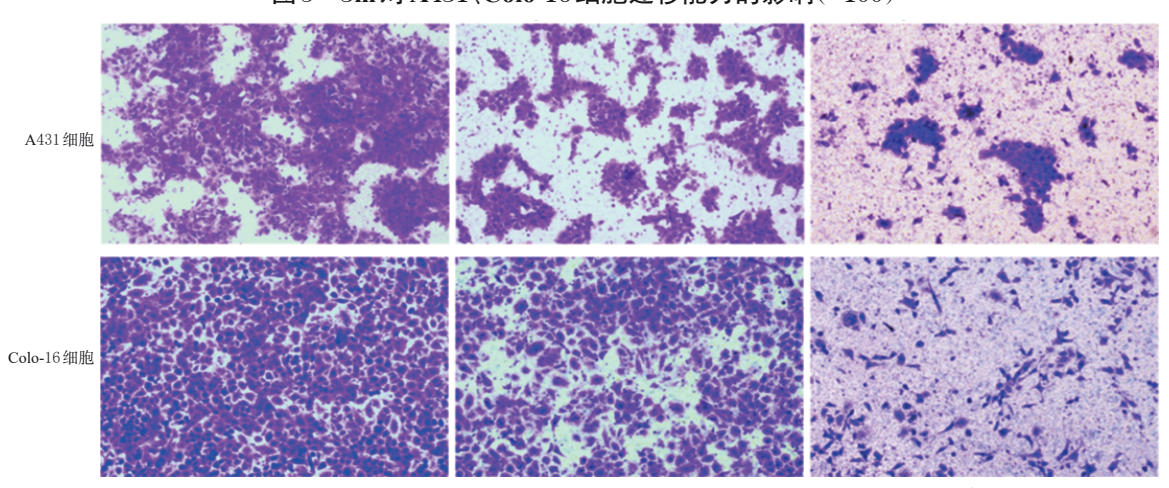


图6　3m对A431、Colo-16细胞侵袭能力的影响（×100）

3.6 3m对A431、Colo-16细胞周期分布及凋亡率的影响

与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞G2期占比、凋亡率均显著升高（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见表3。

表3 2种细胞周期分布和凋亡率的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	A431细胞				Colo-16细胞			
	G1期占比	S期占比	G2期占比	凋亡率	G1期占比	S期占比	G2期占比	凋亡率
对照组	57.97±0.77	31.7±0.57	9.89±0.53	6.52±1.25	52.53±0.89	34.77±1.10	12.21±0.46	6.71±1.05
3m低浓度组	49.31±1.06	32.56±1.66	17.72±0.79[a]	40.64±1.15[a]	48.12±0.85	33.81±0.65	17.35±0.71[a]	39.34±1.19[a]
3m高浓度组	42.43±1.05	33.87±0.67	23.19±0.91[ab]	62.51±2.10[ab]	42.14±0.53	33.82±0.75	23.80±0.69[ab]	60.77±1.34[ab]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与3m低浓度组比较，$P<0.01$

3.7 3m对A431、Colo-16细胞中JAK2/STAT3信号通路相关基因mRNA表达的影响

与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞中JAK2、STAT3、Bcl-2 mRNA表达水平均显著降低，Bax mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见表4。

表4 2种细胞中JAK2/STAT3信号通路相关基因mRNA表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	A431细胞				Colo-16细胞			
	JAK2 mRNA	STAT3 mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	JAK2 mRNA	STAT3 mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
对照组	0.99±0.02	0.98±0.02	1.01±0.01	0.98±0.02	1.01±0.03	1.01±0.03	1.02±0.01	0.99±0.02
3m低浓度组	0.66±0.04[a]	0.74±0.03[a]	0.62±0.05[a]	1.95±0.08[a]	0.64±0.02[a]	0.79±0.03[a]	0.58±0.02[a]	1.79±0.05[a]
3m高浓度组	0.35±0.03[ab]	0.51±0.04[ab]	0.29±0.04[ab]	2.62±0.06[ab]	0.44±0.04[ab]	0.49±0.02[ab]	0.35±0.02[ab]	2.68±0.06[ab]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与3m低浓度组比较，$P<0.01$

3.8 3m对A431、Colo-16细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，3m低、高浓度组A431、Colo-16细胞中JAK2、STAT3蛋白磷酸化水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$），Bax蛋白表达水平均升高（$P<0.01$），且呈剂量依赖性。结果见图7、表5。

4 讨论

cSCC约占所有非黑色素瘤皮肤癌的20%，是一类起源于皮肤表皮或附属角质形成细胞的恶性肿瘤，其常用的手术治疗及放化疗手段，不仅存在不良反应多的缺点，还易在治疗后复发和转移。因此，研究治疗cSCC的新型药物尤为重要[11]。二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚类化合物3m由2种抗肿瘤活性较强的天然产物合成，具有强抗肿瘤活性，可抑制多种肿瘤细胞的增殖[12]。本研究发现，3m可呈剂量依赖性地抑制A431、Colo-16细胞增殖，且在作用48 h时，其抑制作用强于临床常用但副作用大的5-FU。同时，3m可使A431、Colo-16细胞排列稀疏、连接松散、细胞质泄漏。

肿瘤细胞具备浸润生长和远处转移的特点，虽然cSCC转移率低于5%，但一旦发生此类情况即为晚期cSCC，患者生存率明显降低[1]。据估计，因cSCC导致死亡的人数多于恶性程度高的黑色素瘤[13]。本研究结果显示，3m可呈剂量依赖性地降低A431、Colo-16细胞克隆形成、迁移和侵袭的能力。

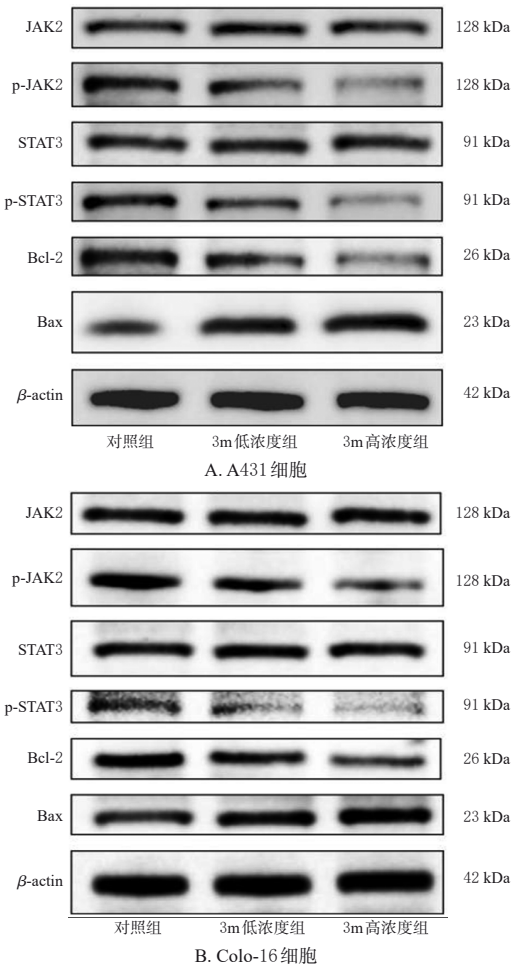


图7 3m对A431、Colo-16细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达影响的电泳图

表5 2种细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白磷酸化水平和表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	A431细胞				Colo-16细胞			
	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
对照组	0.99±0.03	1.01±0.05	1.01±0.02	1.02±0.02	0.99±0.02	1.03±0.01	1.02±0.03	1.02±0.02
3m低浓度组	0.57±0.02[a]	0.58±0.04[a]	0.64±0.08[a]	1.74±0.11[a]	0.68±0.03[a]	0.60±0.02[a]	0.85±0.03[ab]	1.38±0.01[a]
3m高浓度组	0.39±0.09[ab]	0.34±0.04[ab]	0.44±0.05[ab]	2.36±0.16[ab]	0.49±0.02[ab]	0.39±0.04[ab]	0.51±0.05[ab]	1.56±0.05[ab]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与3m低浓度组比较，$P<0.01$

细胞周期被人为划分为合成间期和分裂期，其中合成间期又分为DNA合成前期（G1期）、DNA合成期（S期）、DNA合成后期（G2期），细胞周期受阻则会抑制细胞增殖[14]。凋亡为细胞程序性死亡的一种类型，主要作用是保证细胞形成和细胞死亡之间的平衡，因此，检测细胞凋亡也是研究抗肿瘤药物活性的重要手段[15—16]。本研究结果显示，3m可呈剂量依赖性地将A431、Colo-16细胞阻滞于G2期，并促进其凋亡。

JAK2/STAT3信号通路可参与细胞增殖、分化、凋亡和免疫调节等多种关键生物学过程，进化过程中高度保

守，当其发生基因突变和异常表达时，则会导致炎症、免疫缺陷和肿瘤等多种疾病[17-19]。当细胞因子在细胞表面与其受体结合，致使JAK2激酶C端的酪氨酸残基磷酸化，进而招募STAT3致其磷酸化，从而形成的磷酸二聚体可迅速进入细胞核，调控下游相关基因表达或与其他转录激活因子相互作用调控下游基因表达[17]。已有相关文献证实，JAK2/STAT3信号通路可调控下游基因*Bcl-2*、*Bax*的表达，后两者属于*Bcl-2*基因家族，与肿瘤细胞凋亡密切相关；Bcl-2为抗凋亡蛋白，Bax为促凋亡蛋白，两者相互作用共同调控细胞凋亡[20-22]。本研究结果显示，经3m干预后，A431、Colo-16细胞中JAK2、STAT3、Bcl-2 mRNA表达水平，JAK2、STAT3蛋白磷酸化水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著下调，Bax mRNA和蛋白表达水平均显著上调。这提示3m可通过JAK2/STAT3信号通路调控下游*Bcl-2*基因家族诱导细胞凋亡。

综上所述，二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚类化合物3m可呈剂量依赖性地抑制cSCC的A431、Colo-16细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭能力，其作用机制与抑制JAK2/STAT3信号通路活性，诱导细胞凋亡有关。

参考文献

[1] CORCHADO-COBOS R, GARCÍA-SANCHA N, GONZÁLEZ-SARMIENTO R, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma: from biology to therapy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2956.

[2] FIRNHABER J M. Basal cell and cutaneous squamous cell carcinomas: diagnosis and treatment[J]. Am Fam Physician, 2020, 102(6): 339-346.

[3] FARBERG A S, FITZGERALD A L, IBRAHIM S F, et al. Current methods and caveats to risk factor assessment in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC): a narrative review[J]. Dermatol Ther (Heidelb), 2022, 12(2): 267-284.

[4] STRATIGOS A J, GARBE C, DESSINIOTI C, et al. European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: part 1. epidemiology, diagnostics and prevention[J]. Eur J Cancer, 2020, 128: 60-82.

[5] DROLL S, BAO X M. Oh, the mutations you'll acquire! A systematic overview of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2021, 55(S2): 89-119.

[6] CLAVEAU J, ARCHAMBAULT J, ERNST D S, et al. Multidisciplinary management of locally advanced and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Curr Oncol, 2020, 27(4): e399-e407.

[7] 董维维，王先恒，宋继庭，等. 基于天然产物的抗肿瘤缀合物的研究进展[J]. 化学研究与应用，2022，34(3)：460-467.

[8] 刘婷婷，岳静，陈爽，等. 新型二氢色原酮拼接多环吡咯螺环氧化吲哚类化合物的无催化剂合成及其抗白血病活性[J]. 合成化学，2019，27(6)：451-455.

[9] 吴相欢，吴丹，王关炼，等. 新型双螺环吡咯酮氧化吲哚并二氢色原酮类化合物的合成[J]. 合成化学，2020，28(6)：537-542.

[10] CHEN S, JING Y, LIU X L, et al. One-pot multicomponent construction of chromanone-fused pyrrolidinyl spirooxindole collections through a decarboxylative 1,3-dipolar [3 + 2]cycloaddition reaction[J]. Synth Commun, 2019, 49(18): 2425-2435.

[11] GREEN A C, OLSEN C M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review[J]. Br J Dermatol, 2017, 177(2): 373-381.

[12] 徐圣文. 二氢色原酮并环戊烷螺环化合物的不对称合成及其抗肿瘤活性研究[D]. 贵阳：贵州大学，2020.

[13] OGATA D, TSUCHIDA T. Systemic immunotherapy for advanced cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Curr Treat Options Oncol, 2019, 20(4): 30.

[14] LEAL-ESTEBAN L C, FAJAS L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(5): 165715.

[15] OBENG E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals: a review[J]. Revista Brasleira De Biol, 2021, 81(4): 1133-1143.

[16] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-oh my! the many ways a cell can Die[J]. J Mol Biol, 2022, 434(4): 167378.

[17] BANERJEE S, BIEHL A, GADINA M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects[J]. Drugs, 2017, 77(5): 521-546.

[18] XIN P, XU X Y, DENG C J, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106210.

[19] MENGIE AYELE T, TILAHUN MUCHE Z, BEHAILE TEKLEMARIAM A, et al. Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in the tumorigenesis, chemotherapy resistance, and treatment of solid tumors: a systemic review[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 1349-1364.

[20] TANG C, ZHAO C C, YI H, et al. Traditional Tibetan medicine in cancer therapy by targeting apoptosis pathways[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 976.

[21] BALACHANDRAN C, ARUN Y, SANGEETHA B, et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of 2-acetylbenzylamine isolated from *Adhatoda vasica* L. leaves[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 796-806.

[22] HAFEZI S, RAHMANI M. Targeting Bcl-2 in cancer: advances, challenges, and perspectives[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(6): 1292.

（收稿日期：2022-09-29　修回日期：2023-03-29）

（编辑：唐晓莲）