

枸杞皂苷通过调控 Suv39H1/JAK2/STAT3 通路对鼻咽癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

胡鹏刚, 张昌明 (空军军医大学第一附属医院西京医院耳鼻咽喉头颈外科, 西安 710032)

摘要: **目的** 探究枸杞皂苷介导 Suv39H1/JAK2/STAT3 通路对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。**方法** 将人鼻咽癌 CNE-2 细胞株分为枸杞皂苷干预组 (5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷) 及对照组, 采用 CCK-8 检测不同浓度枸杞皂苷作用 0, 24, 48 和 72 h 时 CNE-2 细胞增殖率, Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测枸杞皂苷干预 48 h 后 CNE-2 细胞凋亡率, Transwell 小室实验检测 CNE-2 细胞侵袭能力, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 与蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分别检测组蛋白甲基化酶 Suv39H1 的表达水平; 采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 Suv39H1 在鼻咽癌组织和癌旁组织, 以及鼻咽癌细胞系 (HONE1, C666-1, CNE-1 和 CNE-2) 和人鼻咽癌上皮细胞 (NP69) 中的表达差异; 构建 Suv39H1 过表达载体 (pcDNA-Suv39H1) 以及针对 Suv39H1 的小干扰 RNA (Suv39H1 siRNA), 分别转染于 CNE-2 细胞, 检测细胞增殖、侵袭和凋亡; 将 pcDNA-Suv39H1 载体转染于 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预的细胞中, 分别检测细胞增殖、侵袭和凋亡。Western blot 检测 JAK2/STAT3 通路相关蛋白 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达。**结果** 与对照组相比, 枸杞皂苷干预鼻咽癌 CNE-2 细胞呈剂量依赖性降低细胞增殖 ($F=12.030$, $P=0.0025$) 和侵袭 ($F=4.807$, $P=0.0315$), 增加细胞凋亡率 ($F=5.232$, $P=0.0261$), 抑制 Suv39H1 蛋白表达 ($F=14.64$, $P=0.0013$); 与正常组织和 NP69 细胞相比, 鼻咽癌组织和 HONE1, C666-1, CNE-1, CNE-2 细胞中 Suv39H1 表达水平显著升高 ($P<0.01$); 转染 pcDNA-Suv39H1 组细胞增殖、侵袭率增强、凋亡率降低; 转染 Suv39H1 siRNA 组细胞增殖、侵袭率降低, 凋亡率升高, 差异与对照组相比具有统计学意义 ($P<0.01$); 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预组相比, 转染 pcDNA-Suv39H1 组细胞增殖、侵袭率增加、凋亡率降低, p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 枸杞皂苷通过下调 Suv39H1/JAK2/STAT3 通路抑制鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖、侵袭, 促进凋亡。

关键词: 枸杞皂苷; 鼻咽癌; Suv39H1; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号: R739.63; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 06-027-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2021.06.006

Lycium Barbarum Baily Saponins Affect Proliferation, Invasion and Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating the Suv39H1/JAK2/STAT3 Pathway

HU Peng-gang, ZHANG Chang-ming

(Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Xijing Hospital, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To explore the effect of lycium barbarum saponins mediated Suv39H1/JAK2/STAT3 pathway on proliferation, invasion and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-2 cells. **Methods** Human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell lines were divided into lycium barbarum saponin treated groups (5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$) and control group, and the proliferation rate of CNE-2 cells treated with different concentrations of lycium barbarum saponins at 0, 24, 48, 72 h was assessed by CCK-8 assay, followed by flow cytometry with annexin V-FITC/PI staining for 48 h after the apoptosis rate of CNE-2 cells, the invasion ability of CNE-2 cells was detected by Transwell chamber assay, and the expression levels of histone methylase Suv39H1 were determined by real-time PCR and Western blot, respectively. Differential expression of Suv39H1 was assessed in NPC tissues and adjacent noncancerous tissues, as well as in NPC cell lines (hone1, c666-1, CNE-1, and CNE-2) and human NPC epithelial cells (NP69), respectively. Suv39h1 overexpression constructs (pcDNA-Suv39h1) as well as small interfering RNA (Suv39h1 siRNA) against suv39h1 were transfected into CNE-2 cells and assessed for proliferation, invasion and apoptosis. pcDNA-Suv39h1 vector was transfected into cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ of lycium barbarum saponins to determine the proliferation, invasion and apoptosis abilities, respectively. The expression of JAK2/STAT3 pathway related

作者简介: 胡鹏刚 (1980-), 男, 本科, 主治医师, 主要研究方向: 分泌性中耳炎, E-mail: hupenggang123@126.com。

通讯作者: 张昌明 (1970-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 分泌性中耳炎。

proteins p-JAK2 and p-STAT3 was detected by Western blot assay. **Results** Compared with the control group, lycium barbarum intervention in NPC CNE-2 cells decreased cell proliferation ($F=12.030$, $P<0.0025$), invasion ($F=4.807$, $P=0.0315$) and Suv39h1 protein level, and increased the apoptosis ratio in dose dependent manner ($F=5.232$, $P=0.0261$). Suv39h1 expression level was significantly higher in NPC tissues and HONE1, C666-1, CNE-1, and CNE-2 cells compared with normal tissues and NP69 cells ($P<0.01$). CNE-2 cells transfected with pcDNA-Suv39h1 showed enhanced proliferation and invasion, and decreased apoptotic rate, while cells transfected with Suv39h1 siRNA displayed decreased proliferation and invasion and increased apoptotic rate, compared with control group ($P<0.01$). Compared with the 50 $\mu\text{mol/L}$ lycium barbarum saponins intervention group, the pcDNA-Suv39h1-transfected group showed increased cell proliferation and invasion rates, decreased apoptotic rates and increased protein expression of p-JAK2 and p-STAT3 ($P<0.01$). **Conclusion** Lycium barbarum saponins inhibit NPC CNE-2 cell proliferation, invasion, and promote apoptosis by downregulating the suv39h1/JAK2/STAT3 pathway.

Keywords: lycium barbarum saponins; nasopharyngeal carcinoma; Suv39H1; the JAK2/STAT3 pathway

鼻咽癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,目前的治疗方法尚未明显改善鼻咽癌患者的生存率^[1-2]。据报道组蛋白甲基化酶 Suv39H1 作为癌基因与肿瘤转移密切相关^[3-4]。有研究发现中药皂苷通过下调促癌基因表达促进鼻咽癌 CNE-2 细胞的自噬和凋亡^[5]。此外,研究发现在从用植物黄酮处理的癌细胞分离的组蛋白中注意到降低的组蛋白甲基转移酶 EZH2 表达和 H3K27 的三甲基化^[6]。黄芩苷通过下调 Suv39H1 的表达和 H3K9 甲基化水平起到抗肿瘤的作用^[7]。枸杞皂苷,又名短葶山麦冬皂苷 C,其富含皂苷和黄酮等有效成分,通过抑制血管生成,肿瘤增殖、黏附和侵袭,表现出抗肿瘤转移的作用^[8]。因此,推测枸杞皂苷可能通过调节 Suv39H1 的表达抑制鼻咽癌发展。本研究通过枸杞皂苷干预鼻咽癌 CNE-2 细胞观察细胞增殖、凋亡、侵袭以及 Suv39H1 蛋白表达的变化,旨在为鼻咽癌治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 研究时间为 2019 年 8 月~2020 年 9 月,人鼻咽癌细胞系(HONE1, C666-1, CNE-1 和 CNE-2)和人鼻咽上皮细胞(NP69)购自中国医学科学院基础医学研究所,在温度为 37℃, 5% (v/v) CO₂, 湿润的细胞培养箱中孵育。从得到组织病理学证实的 15 例患者(男性,年龄 32.46 ± 9.77 岁)收集鼻咽癌组织和邻近组织样品。所有患者均未接受放疗或化疗,没有其他疾病和肿瘤。所有鼻咽癌患者均签署了知情同意书。本研究经西安交通大学医学部伦理委员会批准。动物实验程序严格按照机构动物护理和使用委员会批准的方案进行。

1.2 仪器与试剂 枸杞皂苷(西安康诺化工有限公司); RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;青霉素-链霉素、0.25g/dl 胰蛋白酶/EDTA 消化液(美国 Sigma 公司);转染试剂 Lipofectamine[®]3000 购自美国 Sigma 公司; JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 及 Suv39H1 等一抗及相应二抗(美国 Santa Cruz 公司); RT-qPCR 试剂盒 RNA 提取试剂盒, RT 反转录试剂盒, 蛋白提取试剂

盒,引物合成由上海生工合成; Lipofectamine[®]3000 转染试剂购自美国 Thermo 公司; CCK-8 试剂盒, Annexin V-FITC 检测试剂盒, Transwell 小室(美国 Millipore 公司);高通量实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(Roche 公司,瑞士), Western blot 系统(北京六一仪器厂 DYY-7C),台式低温高速离心机(日本 KUBOTA 公司),细胞培养箱(上海力申科学仪器公司),流式细胞仪(美国 Beckman 公司),凝胶成像分析仪(广州瑞丰实验设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组:将鼻咽癌细胞 CNE-2 复苏后,置于含 10ml/dl 胎牛血清和 1g/dl 青链霉素(100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)的 RPMI-1640 培养液于 37℃, 5% (v/v) CO₂ 恒温箱中培养。当细胞汇合至 70% 时,用不同浓度枸杞皂苷(0, 2.5, 5, 10, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$)分别处理细胞 24 h 检测细胞活力,筛选合适浓度;使用 5, 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的枸杞皂苷分别干预细胞,在 0, 24, 48 和 72 h 时检测细胞增殖,48 h 后检测细胞凋亡率和侵袭率;将 pcDNA-Suv39H1 和 Suv39H1 siRNA 分别转染于细胞内,检测细胞增殖、凋亡和侵袭;转染 pcDNA-Suv39H1 载体于细胞中,24 h 后使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预细胞,48 h 后检测细胞增殖、凋亡和侵袭。

1.3.2 细胞转染:Suv39H1 过表达载体(pcDNA-Suv39H1)和针对 Suv39H1 的 siRNA(Suv39H1 siRNA)均获自上海生工公司(中国上海)。转染前,使用 1g/dl 胰蛋白酶处理消化细胞。在血液计数室中计数后,将细胞接种到六孔培养板上 24 h,然后以 40%~60% 汇合率转染。所有转染均使用 Lipofectamine[®]3000 根据制造商的说明进行。转染后 48 h,收获细胞并进行下一步分析。

1.3.3 实时荧光定量-PCR:检测组蛋白甲基转移酶 Suv39H1 的 mRNA 水平,按照 TRIZOL 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,并用紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。随后,使用

Takara 反转录试剂盒反转录各组检测基因, 并使用 SYBR Green PCR Master Mix 扩增反转录后的产物, 以 β -actin 作为内参基因。Suv39H1 上游引物: 5'-GGTGGTGGGGAAGAAGCTGG-3'; 下游引物: 5'-TCCCACCTCTCCACGAAGTT-3'。 β -actin 上游引物: 5'-TACAACCTCCTTGCAGCTCC-3'; 下游引物: 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'。采用 Applied Biosystems 7900HT qPCR 系统按照以下参数进行 qPCR: 95℃预变性 2 min, 94℃变性 15 s, 55℃退火 25 s, 在 72℃延伸 15 s, 进行 35 个循环。PCR 产物经 1g/dl 琼脂糖凝胶电泳检测, 依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各样本 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测法: 检测 Suv39H1 和 JAK2/STAT3 通路蛋白 JAK2, p-JAK2, STAT3 和 p-STAT3 的表达。将各组细胞按照每孔 1×10^5 的密度接种于 6 孔板, 24 h 后采用蛋白质定量 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白定量, 各取 30 μ l 样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再将蛋白转移至膜上, 5g/dl 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 I 抗, 4℃孵育过夜。加入 II 抗 (1:1 000, ab150077) 37℃ 孵育 45 min, 用 ECL 液显影, 使用化学发光试剂盒在化学发光系统检测, 随后结果采用 Image-Pro Plus 6 软件 (Media Cybernetics) 分析, 以待测蛋白与内参照 GAPDH 的灰度值比值作为蛋白的相对表达量。

1.3.5 CCK-8 实验检测细胞活力: 将各组细胞按照每孔 1×10^5 的密度接种于 96 孔板中, 用含 10ml/dl 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成单细胞悬液, 置于 37℃、5% (v/v) CO_2 的条件下培养。每组设 5 个复孔, 加入 20 μ l CCK-8 溶液。培养 24 h, 于酶标仪 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。取 5 孔 A 值的平均数, 按照下列公式计算细胞相对活力: 细胞相

对活力 (%) = 处理组 A / 对照组 $A \times 100\%$ 。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡: 根据制造商说明使用双染凋亡试剂盒 Annexin-V FITC/PI 处理细胞, 于 1 h 内, 在流式细胞仪上使用 Beckman CXP 软件检测细胞凋亡情况。

1.3.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力: 在 Transwell 上室加入 300 μ l 预温的无血清 RPMI-1640 培养液, 使用无血清培养液将待测细胞制成浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的单细胞悬液, 取细胞悬液 100~200 μ l 加入 Transwell 上室中, 并于下室中加入 500 μ l 含 10ml/dl 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37℃ 环境下培养细胞 12~24 h, 使用 0.5g/dl 的结晶紫对上室底部细胞进行染色, 用棉签除去上室内侧细胞, 显微镜下观察细胞形态并统计细胞数量。

1.4 统计学分析 数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 ANOVA 方差分析、Dunnett- t 法比较总体和总体中两样本均数之间的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察枸杞皂苷对鼻咽癌 CNE-2 细胞生物学行为的影响 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预组比较, 不同浓度枸杞皂苷干预剂量依赖性降低 CNE-2 细胞活力 ($P < 0.01$), 见表 1。与对照组比较, 5, 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预组 CNE-2 细胞增殖力呈剂量依赖性显著降低, ANOVA 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。与对照组相比, 5, 10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预组 CNE-2 细胞凋亡率呈剂量依赖性增加至 (15.70 ± 1.18)% ($F=5.232$, $P=0.0261$), 细胞侵袭数剂量依赖性减少至 (32.66 ± 2.51)% ($F=4.807$, $P=0.0315$), ANOVA 比较差异均具有统计学意义, 见图 1。

表 1 不同浓度枸杞皂苷干预后 CNE-2 细胞活力 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

指标	不同浓度枸杞皂苷 ($\mu\text{mol/L}$)						F	P
	0	5	10	50	100	200		
细胞活力 %	100.00	83.03 ± 6.34	75.92 ± 5.88	68.20 ± 6.03	46.22 ± 4.19	27.08 ± 2.21	91.7	0.00

表 2 不同浓度枸杞皂苷干预 CNE-2 细胞后的细胞增殖力比较 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

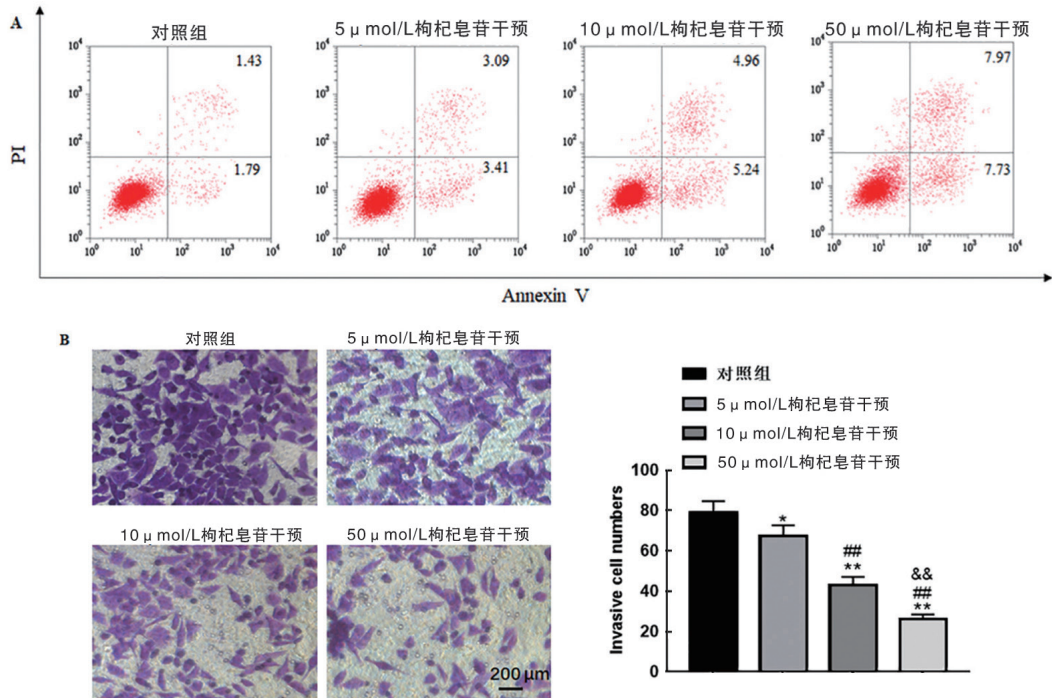
时间 (h)	对照组	不同浓度枸杞皂苷 ($\mu\text{mol/L}$) 干预组			F	P
		5	10	50		
0	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.035	0.9905
24	0.51 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.33 ± 0.03	4.090	0.0493
48	0.79 ± 0.06	0.68 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.51 ± 0.04	7.100	0.0121
72	1.22 ± 0.08	1.01 ± 0.06	0.82 ± 0.07	0.63 ± 0.08	12.030	0.0025

2.2 不同剂量枸杞皂苷对鼻咽癌 CNE-2 细胞中 Suv39H1 表达的影响 见图 2。与对照组相比, 枸

杞皂苷干预组 CNE-2 细胞中 Suv39H1 的 mRNA ($F=25.75$, $P=0.0002$) 和蛋白 ($F=14.64$, $P=0.0013$)

表达均随着枸杞皂苷浓度增加而减少, ANOVA 比

较差异具有统计学意义。



A: 流式细胞仪检测枸杞皂苷对鼻咽癌细胞 CNE-2 凋亡的影响; B: Transwell 检测枸杞皂苷对鼻咽癌细胞 CNE-2 侵袭能力的影响 (×200 倍)。与对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 5 μmol/L 枸杞皂苷干预组比较 *** $P<0.01$; 与 10 μmol/L 枸杞皂苷干预组比较 && $P<0.01$ 。

图1 枸杞皂苷对鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡和侵袭的影响

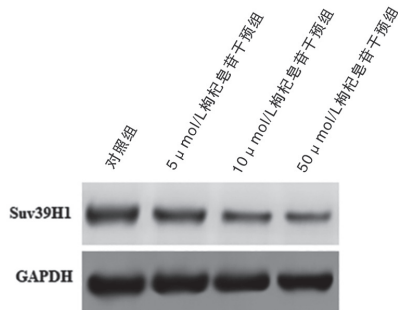
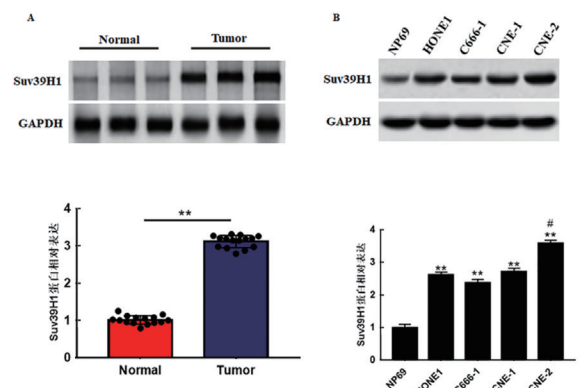


图2 Western blot 检测 CNE-2 细胞中 Suv39H1 蛋白表达

2.3 组蛋白甲基化酶 Suv39H1 在鼻咽癌中高表达 本实验通过 Western blot 测定 15 对鼻咽癌患者肿瘤组织和相邻非肿瘤组织中 Suv39H1 的表达水平。结果显示, 与正常组织 (normal) 相比, Suv39H1 在鼻咽癌组织中高表达, unpaired- t 检验比较差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 3A。与正常鼻咽上皮细胞 (NP69) 相比, Suv39H1 在鼻咽癌细胞系 (HONE1, C666-1, CNE-1 和 CNE-2) 中高表达, Dunnett- t 检验, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 3B。

2.4 组蛋白甲基化酶 Suv39H1 对 CNE-2 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 见表 3。本实验测得转染 pcDNA-Suv39H1 过表达效率为 pcDNA-3.1 组的 3.16 ± 0.22 倍, 转染 Suv39H1 siRNA 干扰效

率为 NC siRNA 组的 0.33 ± 0.06 倍 (Dunnett- t 检验, $P<0.01$)。与 pcDNA-3.1 组比较, pcDNA-Suv39H1 组 CNE-2 细胞增殖力以及细胞侵袭数 (图 4B) 明显增加, 细胞凋亡率显著降低 (图 4A), Dunnett- t 检验比较差异具有统计学意义; 与对照组及 NC siRNA 组比较, Suv39H1 siRNA 组 CNE-2 细胞在 450 nm 处吸光度值以及细胞侵袭数 (图 4B) 显著降低, 细胞凋亡率明显增加 (图 4A), Dunnett- t 检验比较差异具有统计学意义。



A: Western blot 检测鼻咽癌不同细胞系中 Suv39H1 蛋白表达水平; B: Western blot 检测鼻咽癌组织和癌旁组织中 Suv39H1 蛋白表达水平。与 NP69 比较 ** $P<0.01$; 与 HONE1, C666-1 和 CNE-1 比较 # $P<0.05$ 。

图3 组蛋白甲基化酶 Suv39H1 在鼻咽癌细胞和组织中的表达

表3 转染 pcDNA-Suv39H1 和 Suv39H1 siRNA 后 CNE-2 细胞增殖力比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	对照组	pcDNA-3.1	pcDNA-Suv39H1	NC siRNA	Suv39H1 siRNA	<i>F</i>	<i>P</i>
0	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.175	0.911
24	0.53 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.55 ± 0.03	0.36 ± 0.04	9.333	0.002
48	0.76 ± 0.05	0.74 ± 0.06	1.14 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.53 ± 0.04	24.38	0.000
72	1.23 ± 0.09	1.27 ± 0.07	2.09 ± 0.11	1.19 ± 0.06	0.66 ± 0.07	39.10	0.000

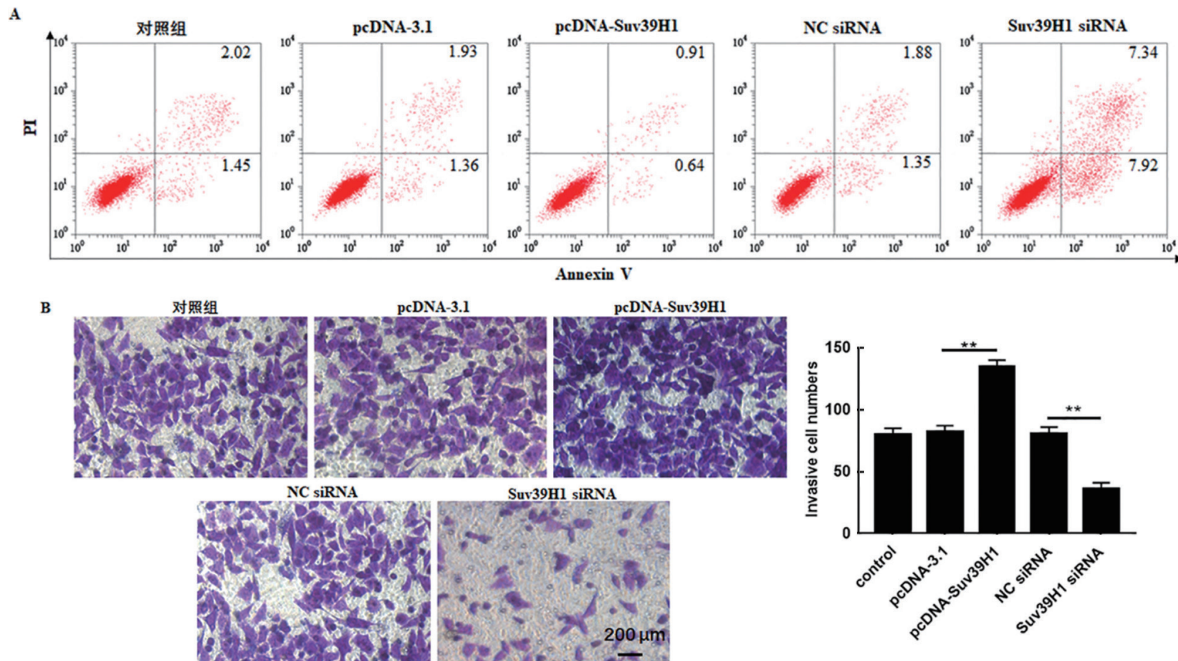
A: 流式细胞仪检测鼻咽癌 CNE-2 细胞的细胞凋亡率; B: Transwell 检测鼻咽癌 CNE-2 细胞侵袭能力 ($\times 200$ 倍); ** $P < 0.01$ 。

图4 转染 pcDNA-Suv39H1 和 Suv39H1 siRNA 对 CNE-2 细胞侵袭和凋亡的影响

2.5 枸杞皂苷干预通过 Suv39H1 对 CNE-2 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 见表4。与 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预 + pcDNA-3.1 组相比, 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预 + pcDNA-Suv39H1 组 CNE-2 细胞吸光度显著降低 (Dunnett-*t* 检验, $P < 0.01$)。与 50 $\mu\text{mol/L}$

枸杞皂苷干预 + pcDNA-3.1 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预 + pcDNA-Suv39H1 组 CNE-2 细胞凋亡率明显降低, 细胞侵袭数显著增加, Dunnett-*t* 检验差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图5。

表4 枸杞皂苷干预转染 pcDNA-Suv39H1 的 CNE-2 细胞增殖力比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	对照组	50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预组	50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预 + pcDNA-3.1	50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷干预 + pcDNA-Suv39H1	<i>F</i>	<i>P</i>
0	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.073	0.973
24	0.53 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.52 ± 0.04	19.7	0.000
48	0.71 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.57 ± 0.06	0.71 ± 0.05	18.72	0.000
72	1.28 ± 0.11	0.61 ± 0.07	0.66 ± 0.09	1.18 ± 0.10	53.63	0.000

2.6 枸杞皂苷干预对 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达的影响 见图6。与对照组相比, 枸杞皂苷干预组 JAK2/STAT3 通路蛋白 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达均被显著抑制, Dunnett-*t* 检验差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与枸杞皂苷干预 + pcDNA-3.1 组相比, 枸杞皂苷干预 + pcDNA-Suv39H1 组 p-JAK2

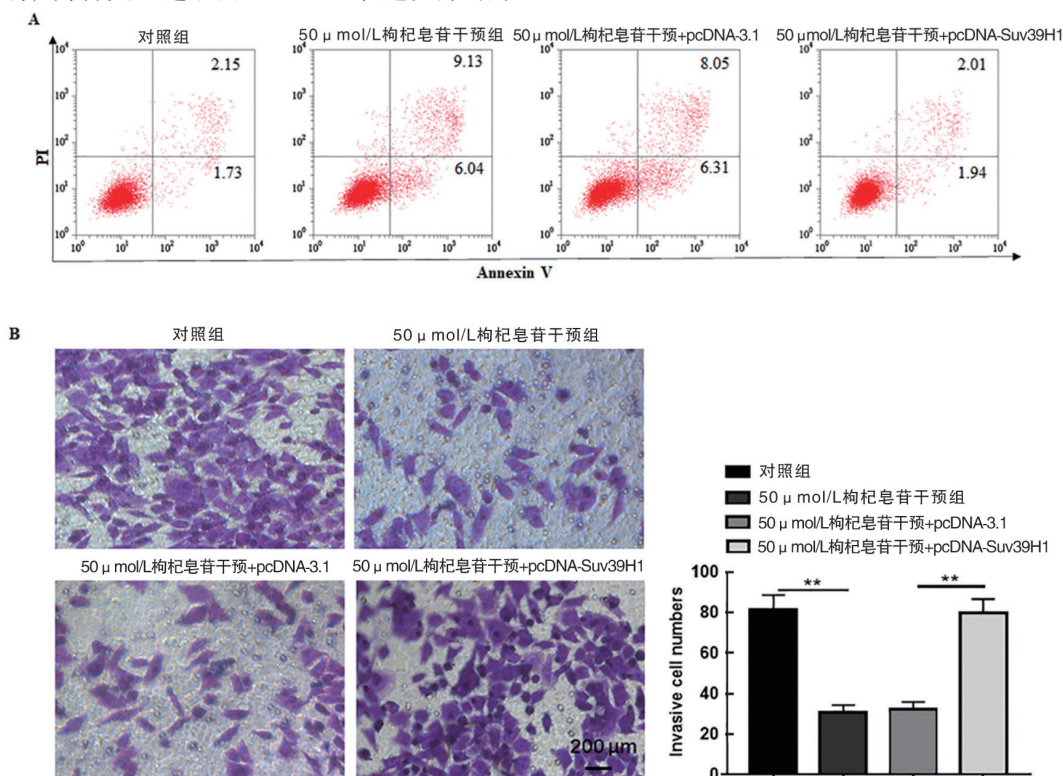
和 p-STAT3 的蛋白表达明显增强, Dunnett-*t* 检验比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

鼻咽癌是遗传因素、病毒感染和环境因素共同作用的结果, 放疗是主要治疗手段, 但 30% 以上的晚期鼻咽癌患者仍治疗失败^[9]。所以致力于开发

治疗鼻咽癌更有效更安全的药物是十分必要的。本研究探讨了枸杞皂苷对鼻咽癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,并探究通过下调 Suv39H1 表达发挥对肿

瘤细胞增殖和侵袭的抑制作用,进而改善鼻咽癌治疗进展。



A: 流式细胞仪检测鼻咽癌 CNE-2 细胞的细胞凋亡率; B: Transwell 检测鼻咽癌 CNE-2 细胞侵袭能力 ($\times 200$ 倍)。** $P < 0.01$ 。

图 5 枸杞皂苷通过下调 Suv39H1 抑制鼻咽癌细胞的增殖和侵袭并促进细胞凋亡

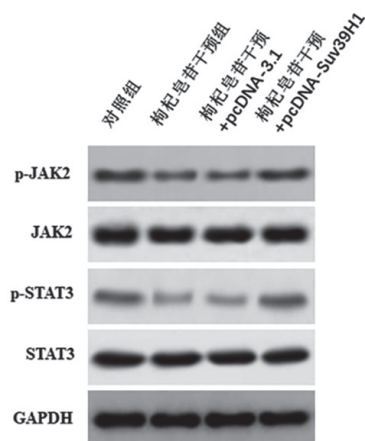


图 6 枸杞皂苷干预细胞后 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达

传统中药的开发已成为新药研发的途径之一,许多中药及其活性成分可诱导肿瘤细胞发生凋亡。WANG 等^[10]研究表明人参皂苷 Rg3 可能通过调节 MMP-2, MMP-9 和 EMT 相关基因的表达抑制鼻咽癌细胞的迁移和侵袭。枸杞皂苷作为癌症治疗的热点药物具有抑制肿瘤增殖抗肿瘤转移的作用。HE 等^[11]报道枸杞皂苷通过调节脂肪细胞与乳腺癌细胞之间的相互作用抑制乳腺癌转移。此外,1, 5, 10, 30 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 枸杞皂苷以非肌肉肌球蛋白白

IIA (NMIIA) 作为靶标,通过剂量依赖性下调其表达预防肺癌转移^[12]。本研究表明枸杞皂苷干预对鼻咽癌 CNE-2 细胞有明显的增殖抑制作用,呈剂量依赖性(5, 10, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$)抑制 CNE-2 细胞增殖和侵袭,促进细胞凋亡。

越来越多的研究表明,基因突变及表观遗传学改变是肿瘤发病的重要机制。其中,组蛋白修饰的异常可使表观遗传学调控失衡,导致疾病的发生发展^[13]。表观遗传的改变是可逆的,这就为疾病的治疗提供了靶点。组蛋白 H3K9 特异性甲基化酶 Suv39H1 可催化组蛋白 H3K9 三甲基化,参与异染色质形成,是表观遗传学及染色体研究领域的重要发现^[14]。目前认为 Suv39H1 不仅与染色体的分离和稳定性有关,也能影响肿瘤抑制蛋白 Rb,导致肿瘤发生^[15]。RODRIGUES 等^[16]研究表明 Suv39H1 和 H3K9me3 水平升高的患者,宫颈癌复发率明显增高。Suv39H1 在前列腺癌中表达升高,并促进前列腺癌细胞的迁移^[17]。本研究表明枸杞皂苷能够通过下调 Suv39H1 表达抑制鼻咽癌细胞的增殖和侵袭。提示 Suv39H1 在鼻咽癌的发生过程中可能起到了促进的作用。

JAKs 家族 JAK 是一类重要的酪氨酸激酶,下

游信号是 STAT, 是信号转导和转录激活因子, 也是一类具有信号转导功能和转录活化功能的细胞脂蛋白^[18]。研究显示, 多种人类肿瘤中有该家族成员的异常激活, 尤其是 STAT1, STAT3 和 STAT5^[19]。其中 STAT3 可通过自身活化的增强以及下游基因表达的变化来抑制凋亡, 促进细胞增殖, 参与肿瘤的发生发展^[20]。据报道当 JAK2/STAT3 途径持续激活, 可导致鼻咽癌细胞异常增殖和恶性转化, 可能与鼻咽癌发生发展的机制相关联^[21]。此外, 有研究报道在骨髓增殖性肿瘤中上调 Suv39H1 的表达, JAK2 的表达显著增加^[4]。黄芪甲苷通过 JAK2/STAT3 途径被证明是气道慢性炎症性肺病和血管生成的重要调节剂^[22]。本研究表明, 当枸杞皂苷干预鼻咽癌 CNE-2 细胞后, JAK2/STAT3 通路蛋白的表达水平显著降低, 而 Suv39H1 过表达能够逆转该结果。

综上所述, 本研究表明枸杞皂苷能够抑制 Suv39H1 表达和 JAK2/STAT3 信号通路以缓解体外鼻咽癌细胞的增殖和侵袭, 有望成为治疗鼻咽癌新的靶向药物。本研究还未对组蛋白甲基化酶 Suv39H1 催化组蛋白 H3K9 三甲基化的下游靶基因做深入研究, 接下来将以表观遗传学组蛋白修饰作为后续研究重点。

参考文献:

- [1] 彭玉凤, 张杨南, 黄常洪, 等. 鼻咽癌患者血清同型半胱氨酸水平与临床病理特征的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 115-118.
PENG Yufeng, ZHANG Yangnan, HUANG Changhong, et al. Correlation analysis between serum homocysteine level of nasopharyngeal carcinoma patients and clinical pathological features [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 115-118.
- [2] 张玲, 刘杰, 王臣玉, 等. EB 病毒 Rta 优势表位抗原的克隆表达及在应用 ELISA 诊断鼻咽癌中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 1-4, 12.
ZHANG Ling, LIU Jie, WANG Chenyu, et al. Cloning and expression of dominant epitope antigen of Epstein-Barr virus Rta protein and its application in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by ELISA [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 1-4, 12.
- [3] LU Chunwan, KLEMENT J D, YANG Dafeng, et al. SUV39H1 regulates human colon carcinoma apoptosis and cell cycle to promote tumor growth [J]. Cancer Letters, 2020, 476: 87-96.
- [4] SHARMA M, BHAVANI C, SURESH S B, et al. Gene expression profiling of CD34(+) cells from patients with myeloproliferative neoplasms [J]. Oncology Letters, 2021, 21(3): 204.
- [5] TAN Guixiang, WANG Xinning, TANG Yunyun, et al. PP-22 promotes autophagy and apoptosis in the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 by inducing endoplasmic reticulum stress, downregulating STAT3 signaling, and modulating the MAPK pathway [J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(3): 2618-2630.
- [6] KANWAL R, DATT M, LIU Xiaoqi, et al. Dietary flavones as dual inhibitors of DNA methyltransferases and histone methyltransferases [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162956.
- [7] LAI Weiwei, JIA Jiantao, YAN Bin, et al. Baicalin hydrate inhibits cancer progression in nasopharyngeal carcinoma by affecting genome instability and splicing [J]. Oncotarget, 2018, 9(1): 901-914.
- [8] KHAN G J, RIZWAN M, ABBAS M, et al. Pharmacological effects and potential therapeutic targets of DT-13 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 255-263.
- [9] CAMPION N J, ALLY M, JANK B J, et al. The molecular march of primary and recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncogene, 2021, 40(10): 1757-1774.
- [10] WANG Dingkun, WU Cheng, LIU Dongbo, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells and suppresses epithelial mesenchymal transition [J]. BioMed Research International, 2019, 2019(4): 8407683.
- [11] HE Jinyong, WEI Xiaohui, LI Sijing, et al. DT-13 suppresses breast cancer metastasis by modulating PLOD2 in the adipocytes microenvironment [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2019, 59: 152778.
- [12] WEI Xiaohui, LIN Sensen, LIU Yang, et al. DT-13 attenuates human lung cancer metastasis via regulating NMIIA activity under hypoxia condition [J]. Oncology Reports, 2016, 36(2): 991-999.
- [13] ZHANG Yanjun, SUN Zhongxing, JIA Junqi, et al. Overview of histone modification [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2021, 1283: 1-16.
- [14] HEALTON S E, PINTO H D, MISHRA L N, et al. H1 linker histones silence repetitive elements by promoting both histone H3K9 methylation and chromatin compaction [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(25): 14251-14258.
- [15] ZHANG Li, TIAN Sijuan, ZHAO Minyi, et al. SUV39H1-DNMT3A-mediated epigenetic regulation of Tim-3 and galectin-9 in the cervical cancer [J]. Cancer Cell International, 2020, 20(1): 457-465.
- [16] RODRIGUES C, PATTABIRAMAN C, VIJAYKUMAR A, et al. A SUV39H1-low chromatin state characterises and promotes migratory properties of cervical cancer cells [J]. Experimental Cell Research, 2019, 378(2): 206-216.
- [17] YAN Wenbo, GUO Yuqi, XU Fangxi, et al. Identification of differentially methylated regions associated with a knockout of SUV39H1 in prostate cancer cells [J]. Genes, 2020, 11(10): 1188.
- [18] 刘洁, 徐冰雁, 胡晶, 等. 鼻咽癌转移相关的信号通路 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2019, 27(3): 237-240.