

# 熊果苷调控TLR4的表达影响多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226增殖、细胞周期和凋亡的实验研究

陶健<sup>1</sup> 王铃<sup>1</sup> 张李玉<sup>1</sup> 顾喆赟<sup>1</sup> 周晓丹<sup>1</sup> 张冬梅<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南通大学第二附属医院血液内科, 南通 226001; <sup>2</sup>南通大学第二附属医院临床研究中心, 南通 226001)

**摘要** 该次实验的目的是研究熊果苷是否通过调控Toll样受体4(TLR4)/JAK2/信号转导与转录因子3(STAT3)信号通路的激活从而影响多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226增殖、细胞周期和凋亡。将RPMI-8226细胞分为对照NC组, 低、中、高剂量组(50、100和200 μg/mL熊果苷), si-NC组(转染si-NC), si-TLR4组(转染si-TLR4), pcDNA-NC+高剂量组(转染pcDNA-NC和200 μg/mL熊果苷), pcDNA-TLR4+高剂量组(转染pcDNA-TLR4和200 μg/mL熊果苷)。采用噻唑蓝溴化四唑(MTT)法检测细胞增殖。流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡变化情况。Western blot检测细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved-caspase-3)、TLR4、p-JAK2、p-STAT3蛋白的表达情况。qRT-PCR检测TLR4 mRNA表达水平。与NC组比较, 50、100和200 μg/mL熊果苷逐渐降低RPMI-8226细胞的CyclinD1蛋白表达水平、增殖活性、S期细胞比例、TLR4 mRNA和TLR4蛋白表达水平, 并逐渐提高G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平和凋亡率(均P<0.05), 且熊果苷的作用效果随剂量的增加呈现增强趋势; 并且200 μg/mL熊果苷降低RPMI-8226细胞的p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平(P<0.05)。si-TLR4组RPMI-8226细胞的CyclinD1蛋白表达水平、增殖活性、S期细胞比例比si-NC组低, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例、Cleaved-caspase-3蛋白表达水平和凋亡率比si-NC组高(P<0.05)。pcDNA-TLR4可以逆转熊果苷对多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226增殖、细胞周期、凋亡和p-JAK2、p-STAT3蛋白表达的影响。综上, 熊果苷通过下调TLR4/JAK2/STAT3信号通路水平, 抑制多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226增殖、阻滞细胞周期和促进细胞凋亡。

**关键词** 多发性骨髓瘤; 熊果苷; TLR4; JAK2/STAT3信号通路; 增殖; 周期; 凋亡

## Experimental Study of Arbutin Regulating the Expression of TLR4 and Affecting the Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis of Multiple Myeloma Cells RPMI-8226

TAO Jian<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>1</sup>, ZHANG Liyu<sup>1</sup>, GU Zheyun<sup>1</sup>, ZHOU Xiaodan<sup>1</sup>, ZHANG Dongmei<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

<sup>2</sup>Clinical Research Center, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

**Abstract** The study aimed to investigate whether arbutin regulated the activation of TLR4 (Toll-like receptor 4)/JAK2/STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) signaling pathway to affect the proliferation, cell cycle and apoptosis of multiple myeloma cells RPMI-8226. RPMI-8226 cells were divided into

收稿日期: 2023-02-23 接受日期: 2023-04-17

江苏省自然科学基金(批准号: BK20211108)、2022年度南通市卫生健康委科研项目(批准号: QN2022019)和江苏省医学重点学科(实验室)建设单位(批准号: JSDW202249)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13813714576, E-mail: zdm@ntu.edu.cn

Received: February 23, 2023 Accepted: April 17, 2023

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK20211108), 2022 Nantong Municipal Health Commission Scientific Research Project (Grant No.QN2022019), and Jiangsu Provincial Medical Key Discipline (Laboratory) Cultivation Unit (Grant No.JSDW202249)

\*Corresponding author. Tel: +86-13813714576, E-mail: zdm@ntu.edu.cn

control group (NC group), low-, medium- and high- dose groups (50, 100 and 200  $\mu\text{g/mL}$  arbutin), si-NC group (transfected with si-NC), si-TLR4 group (transfected with si-TLR4), pcDNA-NC+high-dose group (transfected with pcDNA-NC and 200  $\mu\text{g/mL}$  arbutin), pcDNA-TLR4+high-dose group (transfected with pcDNA-TLR4 and 200  $\mu\text{g/mL}$  arbutin). The thiazole blue tetrazolium bromide (MTT) method was used to monitor cell proliferation. Flow cytometry was implemented to assay cell cycle and apoptosis. The protein expression levels of CyclinD1, Cleaved-caspase-3, TLR4, p-JAK2, and p-STAT3 were detected by Western blot. The qRT-PCR was used to measure *TLR4* mRNA expression. Compared with the NC group, arbutin treatment dose-dependently decreased CyclinD1 and TLR4 expression, cell proliferation, and the cell proportion in S phase but increased the cell proportion in  $G_0/G_1$  phase, Cleaved-caspase-3 expression and apoptotic rate in RPMI-8226 cells ( $P < 0.05$ ). Moreover, 200  $\mu\text{g/mL}$  arbutin reduced the protein expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 in RPMI-8226 cells ( $P < 0.05$ ). The CyclinD1 protein expression level, proliferation activity, and S-phase cell ratio of RPMI-8226 cells in the si-TLR4 group were lower than those in the si-NC group, and the  $G_0/G_1$  phase cell ratio, Cleaved-caspase-3 protein expression level and apoptosis rate were higher than those in the si-NC group (all  $P < 0.05$ ). pcDNA-TLR4 could reverse the effects of arbutin on the proliferation, cell cycle, apoptosis and protein expression of p-JAK2 and p-STAT3 in RPMI-8226 cells. Above all, arbutin inhibits the proliferation, arrests the cell cycle and promotes apoptosis of multiple myeloma cells RPMI-8226 by blocking the activation of TLR4/JAK2/STAT3 signaling pathways.

**Keywords** multiple myeloma; arbutin; TLR4; JAK2/STAT3 signaling pathway; proliferation; cell cycle; apoptosis

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种遗传复杂的浆细胞肿瘤, 约占所有血液系统恶性肿瘤的 10%<sup>[1]</sup>。多发性骨髓瘤特征是骨髓浆细胞发生恶性克隆增生, 导致单克隆免疫球蛋白异常增多, 肾功能不全, 高钙血症和骨溶解性病变<sup>[2]</sup>。临床表现为广泛的溶骨病变及贫血、感染、肾功能损害等, 严重影响患者生存质量<sup>[3]</sup>。MM 好发于老年人, 目前, 由于我国人口老龄化的加剧, 多发性骨髓瘤发病人数持续增加。化疗、自体/异体干细胞移植和靶向药物治疗是目前治疗多发性骨髓瘤患者的有效方法, 且可在一定程度上提高患者生存质量, 延长患者生存时间<sup>[4]</sup>。在过去十年中, 随着新型药物的引入, 多发性骨髓瘤患者的治疗效果得到了显著改善。然而, 该疾病被认为是无法治愈的, 并且在临床表现、病程和存活率方面表现出相当大的异质性<sup>[5]</sup>。为了改善多发性骨髓瘤患者不良结果, 开发新型治疗策略是十分必要的。从熊果叶中提取的熊果苷 (对羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷) 是一种天然产物。熊果苷因其对黑色素生成途径中酪氨酸羟基化的强烈抑制作用而被广泛用作化妆品皮肤美白剂<sup>[6]</sup>。除了其防腐、抗菌、抗炎、抗氧化和利尿特性外, 体外研究还证明了其具有抗肿瘤活性<sup>[7-8]</sup>, 许多先前的研究揭示了熊果苷的抗癌活性。例如, EB-ADOLLAHI 等<sup>[9]</sup>指出, 熊果苷作为一种抗氧化剂, 可通

过诱导细胞凋亡在前列腺淋巴结癌细胞中发挥抗增殖活性。熊果苷通过上调 p53 促进 caspase-3 的活化, 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。研究表明, 熊果苷通过诱导细胞凋亡, 抑制炎症标志物和 P13/Akt/mTOR 级联反应对大鼠 C6 神经胶质瘤细胞发挥抗癌活性<sup>[10]</sup>。此外, 在 B16 鼠黑色素瘤细胞中, 熊果苷可降低细胞活力, 促进细胞凋亡, 导致  $G_1$  细胞周期停滞并诱导线粒体破坏。以上研究表明, 熊果苷可抑制多种肿瘤进展<sup>[11]</sup>。但熊果苷在多发性骨髓瘤中的研究尚不多见。研究表明, Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的激活可促进多发性骨髓瘤细胞生长和存活<sup>[12]</sup>。本研究针对熊果苷是否通过调控 TLR4 的表达影响多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖、细胞周期和凋亡进行探讨, 评价熊果苷的抗癌作用及其潜在机制, 以拓宽对熊果苷生物学作用的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

多发性骨髓瘤细胞 NCI-H929、MM1.S 和 RPMI-8226 购自上海雅吉生物科技有限公司。熊果苷 (含量  $\geq 99\%$ ) 购自上海麦克林生化科技有限公司。si-NC、si-TLR4、pcDNA-NC、pcDNA-TLR4 购自上海吉玛制药技术有限公司。噻唑蓝溴化四唑

(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、细胞周期和凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。细胞周期蛋白D1(CyclinD1)抗体、Cleaved-caspase-3抗体、TLR4抗体、p-JAK2抗体、磷酸化信号转导与转录因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)(p-STAT3)抗体均购自Abcam公司。PrimeScript第一链cDNA合成试剂盒购自日本TaKaRa公司。pcDNA-NC和pcDNA-TLR4购自Santa Cruz公司。

## 1.2 细胞培养与处理

NCI-H929、MM1.S和RPMI-8226细胞在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,维持在37℃和5%CO<sub>2</sub>环境中培养。实验分为NC组、剂量(低、中、高)组、si-NC组、si-TLR4组、pcDNA-NC+高剂量组、pcDNA-TLR4+高剂量组。其中NC组RPMI-8226细胞未进行任何处理,低、中、高剂量组RPMI-8226细胞分别以50、100和200 μg/mL熊果苷处理细胞48 h。使用Invitrogen制造的Lipofectamine 2000转染试剂分别将si-NC、si-TLR4、pcDNA-NC、pcDNA-TLR4转染至si-NC组、si-TLR4组、pcDNA-NC+高剂量组、pcDNA-TLR4+高剂量组的RPMI-8226细胞中。转染序列(5'→3')如下: si-NC序列为(sense UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT, anti-sense ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT), si-TLR4序列为(sense GCA AUU UGA CCA UUG AAG ATT, anti-sense UCU UCA AUG GUC AAA UUG CTT), 转染8~10 h后,将转染液替换为完全培养液或200 μg/mL熊果苷的完全培养液,于37℃继续孵育48 h。

## 1.3 MTT法检测细胞增殖

在RPMI-8226细胞暴露于熊果苷或进行转染处理孵育48 h(37℃)后,将5 mg/mL MTT添加到每个孔,与细胞孵育4 h(37℃)。之后,吸出培养基,将甲瓚沉淀溶解在150 μL二甲基亚砷中。采用酶标仪在波长490 nm处测量溶液的吸光度(D)值。

## 1.4 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡变化情况

通过使用细胞周期检测试剂盒检测细胞周期进展情况,简言之,根据细胞周期检测试剂盒说明书,在RPMI-8226细胞暴露于熊果苷或进行转染处理并孵育48 h(37℃)后,收集细胞(1×10<sup>6</sup>个/mL),加入70%冷乙醇于4℃固定过夜,随后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)/RNase A染色液(二者体积比9:1) 500 μL,避光孵育30 min,进行FACSCalibur流

式细胞仪分析。

通过使用细胞凋亡试剂盒检测细胞凋亡情况,根据细胞凋亡试剂盒说明书,在RPMI-8226细胞暴露于熊果苷或进行转染处理并孵育48 h(37℃)后,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI并轻轻混合,在室温条件下避光孵育15 min。进行FACSCalibur流式细胞仪分析。

## 1.5 Western blot检测CyclinD1、Cleaved-caspase-3、TLR4、p-JAK2、p-STAT3蛋白的表达情况

RPMI-8226细胞暴露于熊果苷或进行转染处理并孵育48 h后,用450 μL冰RIPA裂解缓冲液在4℃下孵育30~60 min进行裂解。将50 μg总蛋白质与加载缓冲液混合、变性并在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上分离,然后印迹到聚偏二氟乙烯膜上。膜用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,与特异性一抗CyclinD1(1:1 000)、Cleaved-caspase-3(1:1 000)、TLR4(1:1 000)或β-肌动蛋白(β-actin)(1:1 000) 4℃孵育10 h。将膜与相应的过氧化物酶偶联的二级山羊抗兔IgG(1:8 000稀释)室温孵育1 h。使用ECL检测蛋白信号,凝胶成像系统对所得蛋白印迹进行光密度分析。同法测量NC组、高剂量组、pcDNA-NC+高剂量组、pcDNA-TLR4+高剂量组的p-JAK2、p-STAT3蛋白表达情况,p-JAK2、p-STAT3稀释度为1:1 000。

## 1.6 qRT-PCR检测TLR4 mRNA表达情况

使用Trizol试剂提取RNA,PrimeScript第一链cDNA合成试剂盒从RNA合成cDNA。根据制造商的说明,使用SYBR Green技术在LightCycler 1.5系统对cDNA进行qRT-PCR处理,2<sup>-ΔΔCt</sup>方法分析数据。引物如下(序列:5'→3') TLR4-F: CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA, TLR4-R: TCC CAC TCC AGG TAA GTG TT。内参基因β-actin-F: CCC TGG CAC CCA GCA C, R: GCC GAT CCA CAC GGA GTA C。

## 1.7 统计学分析

数据通过SPSS 22.0软件进行分析,并以平均值±标准偏差表示。通过独立样本t检验进行两组间差异分析,单因素方差分析进行不同组间差异分析,SNK-q检验进行组间多重差异分析。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度熊果苷对RPMI-8226细胞增殖、细胞周期的影响

与NC组比较,100 μg/mL的熊果苷使RPMI-

8226细胞的增殖活性降低得最为明显,因此,后续选择RPMI-8226细胞进行进一步的功能和机制研究。与NC组比较,50、100和200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷逐渐降低RPMI-8226细胞的增殖活性、CyclinD1的蛋白表达水平,并逐渐提高G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例,降低S期细胞比例(均 $P<0.05$ ),而50、100和200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷对G<sub>2</sub>期细胞比例无显著影响( $P=0.999$ ),且熊果苷的作用效果随剂量的增加呈现增强趋势(图1)。

## 2.2 熊果苷对RPMI-8226细胞凋亡的影响

与NC组比较,50、100和200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷逐渐增加RPMI-8226细胞的Cleaved-caspase-3蛋白表达水平和凋亡率(均 $P<0.05$ ),且随熊果苷剂量的增加,其对Cleaved-caspase-3蛋白表达和细胞凋亡的抑制作用呈现增强趋势(图2)。

## 2.3 熊果苷对TLR4表达的影响

与NC组比较,50、100和200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果苷逐渐减少RPMI-8226细胞的TLR4 mRNA和TLR4蛋白

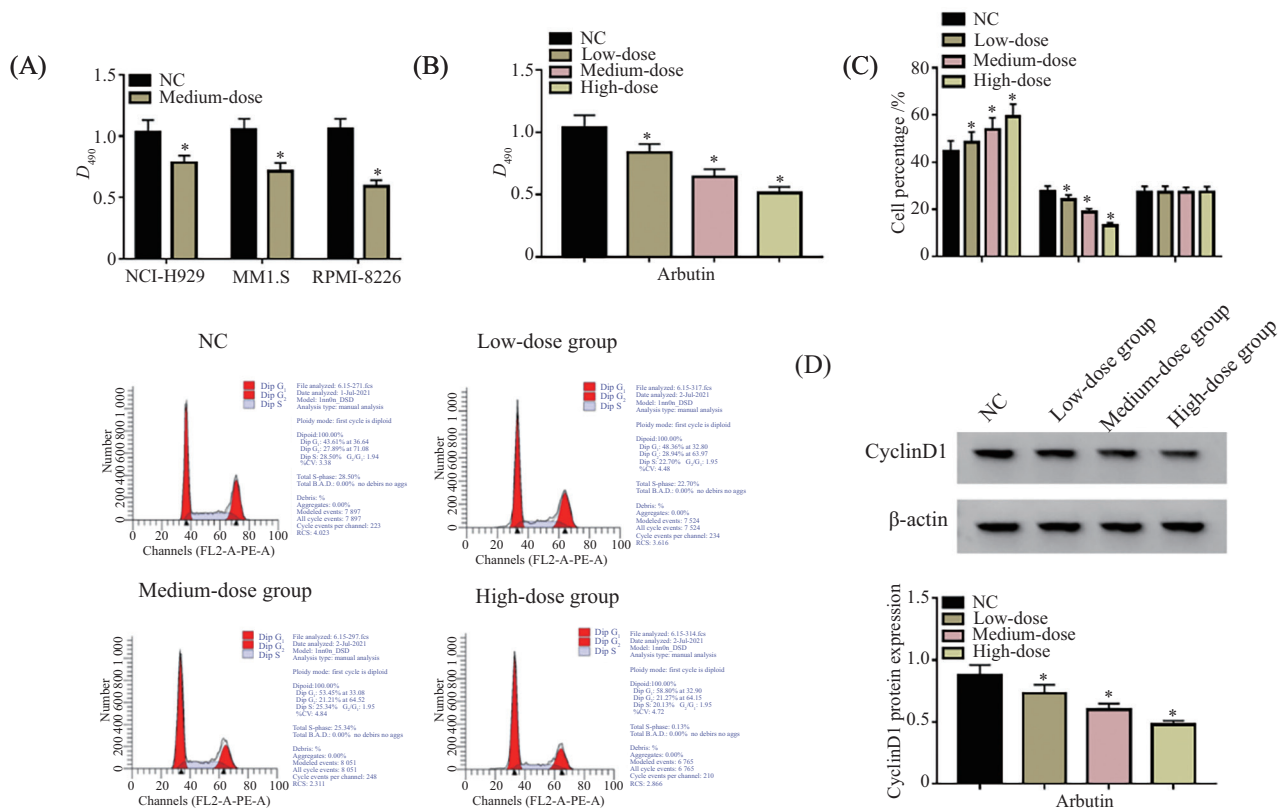
表达水平(均 $P<0.05$ ),且随熊果苷剂量的增加,其对TLR4 mRNA和TLR4蛋白表达的抑制作用呈现增强趋势(图3)。

## 2.4 si-TLR4对多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226增殖、细胞周期以及凋亡的影响

si-TLR4组RPMI-8226细胞的TLR4、CyclinD1蛋白表达水平、增殖活性比si-NC组降低,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例比si-NC组升高,S期细胞比例比si-NC组降低,Cleaved-caspase-3蛋白表达水平和凋亡率比si-NC组升高( $P<0.05$ )(图4)。

## 2.5 pcDNA-TLR4可以逆转熊果苷对多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226增殖、细胞周期和凋亡的影响

pcDNA-TLR4+高剂量组RPMI-8226细胞的TLR4、CyclinD1蛋白表达水平、增殖活性高于pcDNA-NC+高剂量组,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例低于pcDNA-NC+高剂量组,S期细胞比例高于pcDNA-NC+高剂量组,Cleaved-caspase-3蛋白表达水平和凋亡率低于pcDNA-NC+高剂量组(均 $P<0.05$ )。而pcDNA-

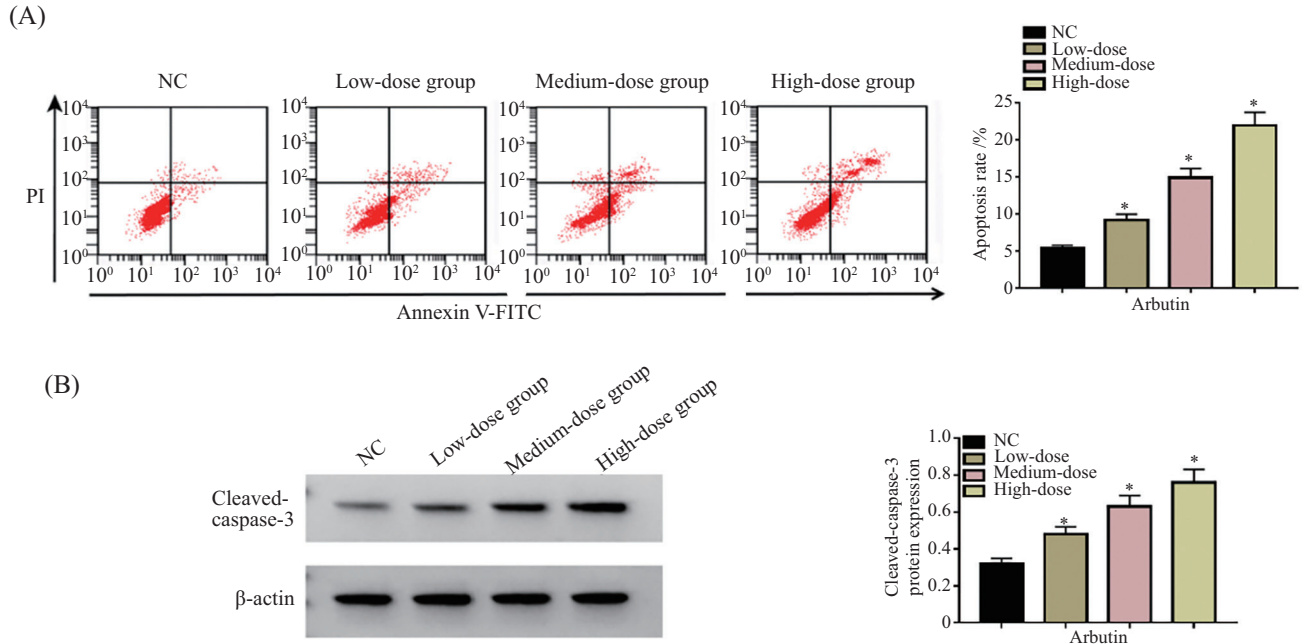


A、B: MTT法检测细胞增殖; C: 流式细胞仪检测细胞周期变化; D: Western blot检测CyclinD1蛋白的表达情况。\* $P<0.05$ ,与NC组比较。

A,B: cell proliferation was detected by MTT assay; C: cell cycle was detected by flow cytometry; D: the expression of CyclinD1 protein was detected by Western blot. \* $P<0.05$  compared with NC group.

图1 不同浓度熊果苷对RPMI-8226细胞增殖、周期及相关蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of arbutin at different concentrations on the cell proliferation, cell cycle and related protein expression of RPMI-8226 cells

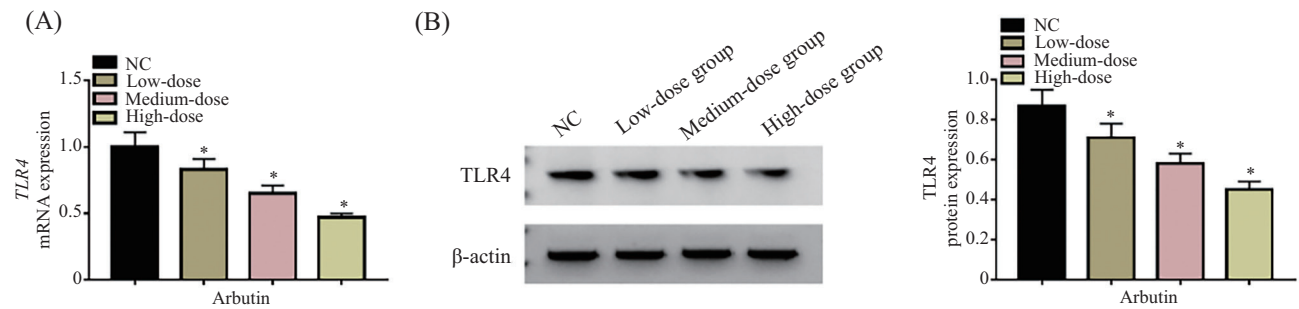


A: 流式细胞仪检测细胞凋亡; B: Western blot检测Cleaved-caspase-3蛋白的表达。\* $P < 0.05$ , 与NC组比较。

A: cell apoptosis was detected by flow cytometry; B: Cleaved-caspase-3 protein expression was detected by Western blot. \* $P < 0.05$  compared with NC group.

图2 熊果苷对RPMI-8226细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of arbutin on apoptosis and related protein expression in RPMI-8226 cells



A: qRT-PCR检测TLR4 mRNA的表达; B: Western blot检测TLR4蛋白的表达。\* $P < 0.05$ , 与NC组比较。

A: qRT-PCR for TLR4 mRNA expression; B: the expression of TLR4 protein was detected by Western blot. \* $P < 0.05$  compared with NC group.

图3 熊果苷对TLR4表达的影响

Fig.3 The effects of arbutin on TLR4 expression

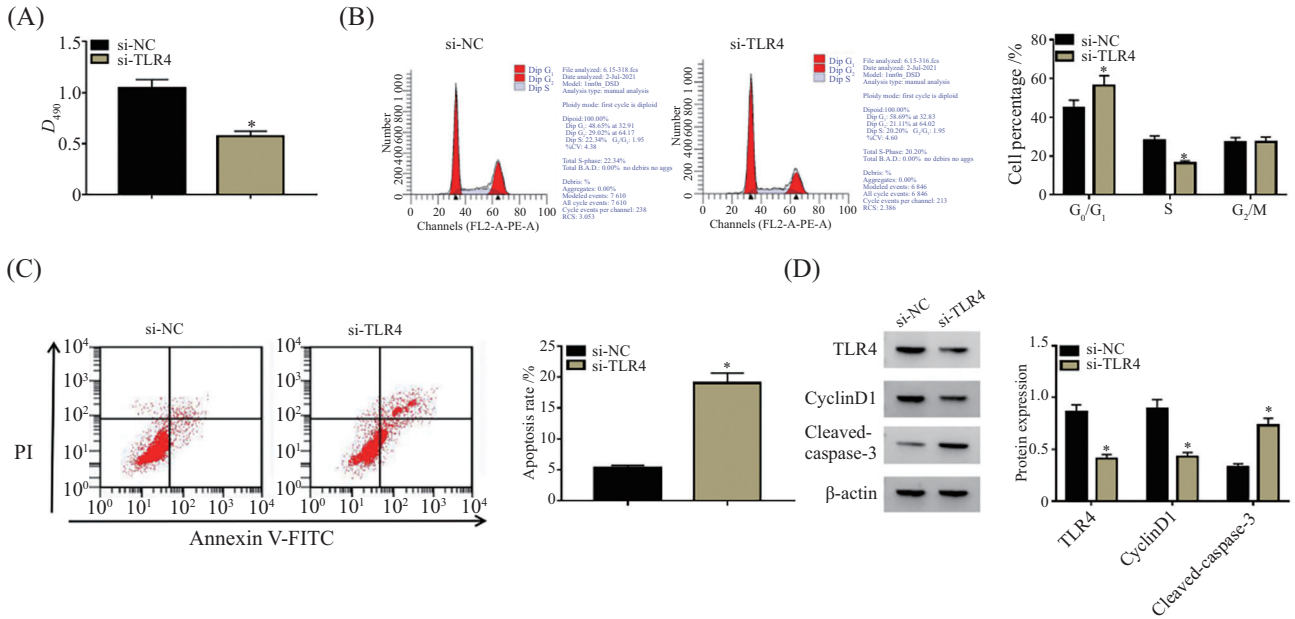
TLR4+高剂量熊果苷对G<sub>2</sub>期细胞比例无显著影响( $P = 0.941$ )(图5)。

## 2.6 JAK2/STAT3信号通路对熊果苷作用的影响

高剂量组和pcDNA-NC+高剂量组RPMI-8226细胞的p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平均低于NC组, pcDNA-TLR4+高剂量组RPMI-8226细胞的p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平高于高剂量组(均 $P < 0.05$ ), 但高剂量组和pcDNA-NC+高剂量组中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平无显著变化。此外, 我们使用JAK2/STAT3通路激动剂(SC-39100)逆转了熊果苷对细胞增殖的影响(图6)。

## 3 讨论

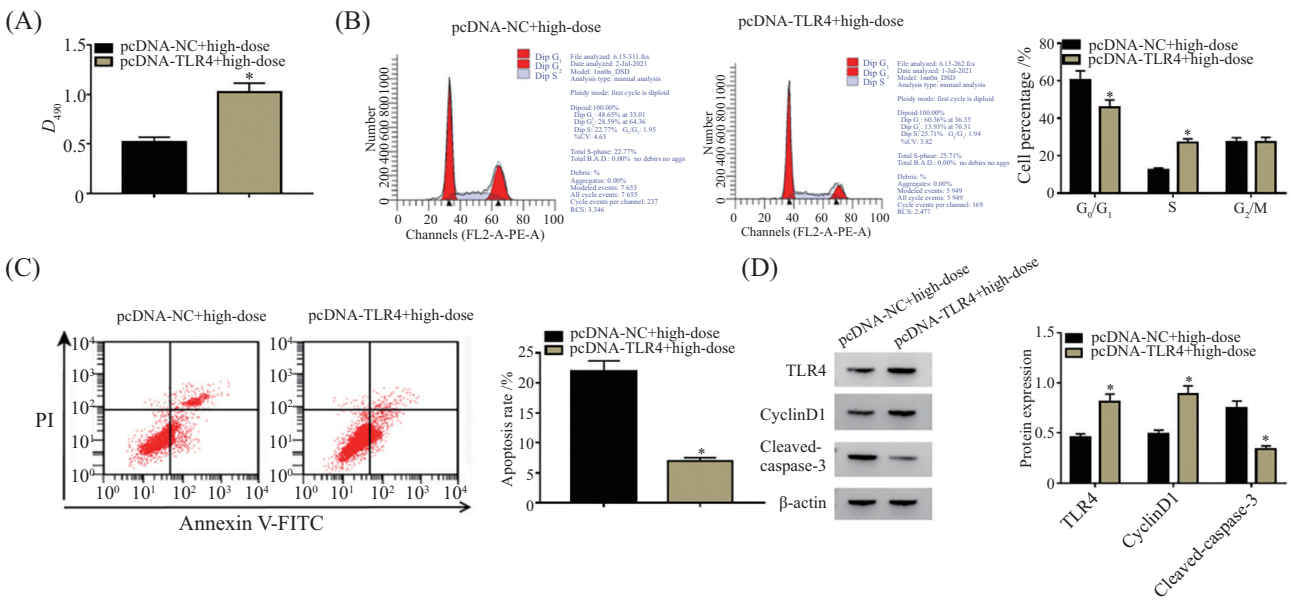
本实验对熊果苷在多发性骨髓瘤细胞中的作用进行了详细研究。正如MTT法所揭示的, 50、100和200 μg/mL熊果苷逐渐降低RPMI-8226细胞的增殖活性, 且这种抑制作用随熊果苷剂量的增加而逐渐增强, 表明熊果苷对多发性骨髓瘤细胞增殖具有抑制作用。流式细胞仪分析表明, 熊果苷明显降低S期细胞比例、提高G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例和凋亡率, 且随熊果苷剂量的增加, 其对细胞周期的阻滞和对凋亡的促进作用愈发显著。此外, Western blot分析结果显示, 50、100和200 μg/mL熊果苷下调增殖蛋白



A: MTT法检测细胞增殖; B: 流式细胞仪检测细胞周期; C: 流式细胞仪检测细胞凋亡; D: Western blot检测TLR4、CyclinD1和Cleaved-caspase-3蛋白的表达。\**P*<0.05, 与si-NC组比较。

A: cell proliferation was detected by MTT assay; B: cell cycle was detected by flow cytometry; C: cell apoptosis was detected by flow cytometry; D: expression of TLR4, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 were detected by Western blot. \**P*<0.05 compared with si-NC group.

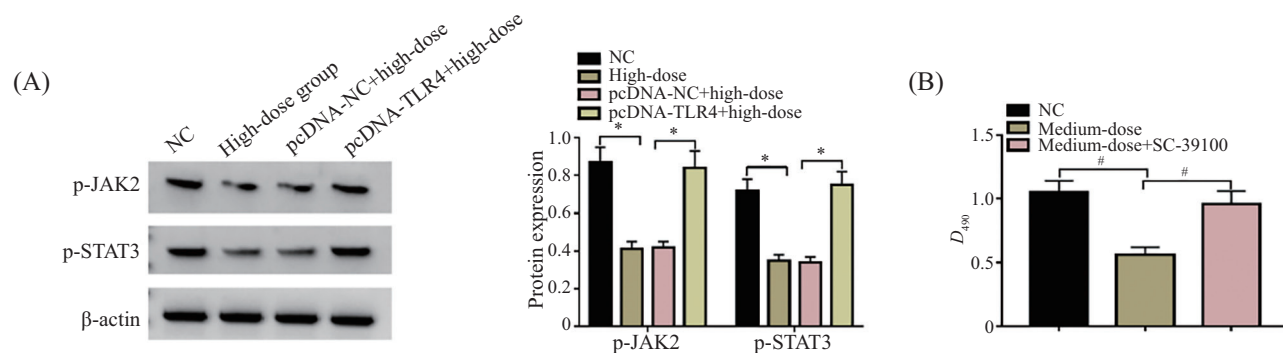
**图4 si-TLR4对多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226细胞增殖、周期、凋亡以及相关蛋白表达的影响**  
**Fig.4 Effects of si-TLR4 on cell proliferation, cell cycle, apoptosis and expression of related proteins in multiple myeloma cell RPMI-8226**



A: MTT法检测细胞增殖; B: 流式细胞仪检测细胞周期; C: 流式细胞仪检测细胞凋亡; D: Western blot检测TLR4、CyclinD1和Cleaved-caspase-3蛋白的表达。\**P*<0.05, 与pcDNA-NC+高剂量组比较。

A: cell proliferation was detected by MTT assay; B: flow cytometry was used to detect cell cycle; C: cell apoptosis was detected by flow cytometry; D: expression of TLR4, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 were detected by Western blot. \**P*<0.05 compared with pcDNA-NC+high-dose group.

**图5 pcDNA-TLR4可以逆转熊果苷对多发性骨髓瘤细胞RPMI-8226细胞增殖、周期、凋亡以及相关蛋白表达的影响**  
**Fig.5 pcDNA-TLR4 reversed the effects of arbutin on the cell proliferation, cell cycle, apoptosis and related protein expression of multiple myeloma cell RPMI-8226**



A: Western blot检测蛋白的表达; B: MTT法检测细胞增殖。\* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ 。

A: protein expressions were detected by Western blot; B: cell proliferation was detected by MTT assay. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ 。

图6 JAK2/STAT3信号通路对熊果苷作用的影响

Fig.6 The effects of JAK2/STAT3 pathway on arbutin functions

CyclinD1、上调凋亡蛋白 Cleaved-caspase-3 的表达水平,进一步提示熊果苷可抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。这些结果证实熊果苷可通过抑制 RPMI-8226 细胞增殖、阻滞细胞周期和加速细胞凋亡,对多发性骨髓瘤细胞的生长产生抑制作用。

对熊果苷抗癌机制的调查结果表明,50、100和200  $\mu\text{g/mL}$ 熊果苷明显降低 *TLR4* mRNA和TLR4蛋白表达水平,提示TLR4可能涉及熊果苷抑制多发性骨髓瘤细胞生长的功能。既往研究表明,TLR4在多发性骨髓瘤细胞中高度表达,TLR4激活增强多发性骨髓瘤细胞的活力并发挥抗凋亡作用,促进多发性骨髓瘤的肿瘤微环境转化<sup>[9,13]</sup>。TLR4通路中的某些多态性与骨髓瘤患者的不良预后相关<sup>[14]</sup>。本项研究发现 si-TLR4可减弱多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226增殖活性,阻滞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞周期,增加细胞凋亡水平,并上调 Cleaved-caspase-3和下调 CyclinD1的表达水平。这些结果与前人报道相近,证实TLR4是多发性骨髓瘤发生发展中重要的调节因子,具有成为改善多发性骨髓瘤患者预后新靶标的潜力。STAT3是STAT转录因子家族的成员,也是JAK/STAT信号通路的关键分子<sup>[15]</sup>。在许多人类恶性肿瘤,包括多发性骨髓瘤中观察到JAK2/STAT3的持续激活<sup>[16-17]</sup>。阻断JAK2/STAT3通路有助于抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖<sup>[18]</sup>。此外,熊果苷通过JAK2/STAT3信号通路显著逆转了结肠炎中p-JAK2的高表达,改善了小鼠结肠炎<sup>[19]</sup>。本研究观察到200  $\mu\text{g/mL}$ 熊果苷降低RPMI-8226细胞的p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平,而这种作用被pcDNA-TLR4所逆转。进一步地,我们通过使用JAK2/STAT3通路激动剂(SC-39100)发现,SC-39100可逆转熊果苷对

细胞增殖的抑制作用。此外,pcDNA-TLR4还可以逆转熊果苷对多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226增殖、细胞周期、凋亡的影响,表明熊果苷抑制多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226增殖、阻滞细胞周期和诱导凋亡的作用部分是通过下调TLR4抑制JAK2/STAT3信号通路活性来实现的。

总之,本研究表明,50、100和200  $\mu\text{g/mL}$ 熊果苷通过下调TLR4进而抑制JAK2/STAT3信号通路表达,来抑制多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8226的增殖、阻滞细胞周期和诱导凋亡。未来熊果苷有望作为多发性骨髓瘤的一种新型治疗药物。

## 参考文献 (References)

- [1] RAJKUMAR S V. Multiple myeloma: every year a new standard [J]? *Hematol Oncol*, 2019, 37(Suppl 1): 62-5.
- [2] WU Z, ZHANG Y, YANG Z, et al. Elevation of miR-302b prevents multiple myeloma cell growth and bone destruction by blocking DKK1 secretion [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 187.
- [3] KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma [J]. *Blood*, 2008, 111(6): 2962-72.
- [4] LU J, LU J, CHEN W, et al. Clinical features and treatment outcome in newly diagnosed Chinese patients with multiple myeloma: results of a multicenter analysis [J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4(8): e239.
- [5] CASTANEDA O, BAZ R. Multiple myeloma genomics-a concise review [J]. *Acta Med Acad*, 2019, 48(1): 57-67.
- [6] BOO Y C. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(7): 1129-50.
- [7] ZHOU H, ZHAO J, LI A, et al. Chemical and biocatalytic routes to arbutin [J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3303-11.
- [8] SAFARI H, ZABIHI E, POURAMIR M, et al. Decrease of intracellular ROS by arbutin is associated with apoptosis induction and downregulation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in LNCaP; prostate cancer [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(9): e13360.

- [9] EBADOLLAHI S H, POURAMIR M, ZABIHI E, et al. The effect of arbutin on the expression of tumor suppressor P53, BAX/BCL-2 ratio and oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide in fibroblast and lncap cell lines [J]. *Cell J*, 2021, 22(4): 532-41.
- [10] HAZMAN Ö, SARIOVA A, BOZKURT M F, et al. The anticarcinogen activity of  $\beta$ -arbutin on MCF-7 cells: stimulation of apoptosis through estrogen receptor- $\alpha$  signal pathway, inflammation and genotoxicity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(1): 349-60.
- [11] YANG Z, SHI H, CHINNATHAMBI A, et al. Arbutin exerts anticancer activity against rat C6 glioma cells by inducing apoptosis and inhibiting the inflammatory markers and P13/Akt/mTOR cascade [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(9): e22857.
- [12] BAGRATUNI T, SKLIROU A D, KASTRITIS E, et al. Toll-like receptor 4 activation promotes multiple myeloma cell growth and survival via suppression of the endoplasmic reticulum stress factor chop [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3245-56.
- [13] GIALLONGO C, TIBULLO D, CAMIOLO G, et al. TLR4 signaling drives mesenchymal stromal cells commitment to promote tumor microenvironment transformation in multiple myeloma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 704-17.
- [14] BAGRATUNI T, TERPOS E, ELEUTHERAKIS-PAPAIAKO-VOU E, et al. TLR4/TIRAP polymorphisms are associated with progression and survival of patients with symptomatic myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2016, 172(1): 44-7.
- [15] LI X, JIANG W, DONG S, et al. STAT3 inhibitors: a novel insight for anticancer therapy of pancreatic cancer [J]. *Biomolecules*. 2022, 12(10): 1450.
- [16] AKHTAR S, ACHKAR I W, SIVEEN K S, et al. Sanguinarine induces apoptosis pathway in multiple myeloma cell lines via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 285-99.
- [17] XU L, YAO Y, LU T, et al. miR-451a targeting IL-6R activates JAK2/STAT3 pathway, thus regulates proliferation and apoptosis of multiple myeloma cells [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2022, 22(2): 251-60.
- [18] WU D, ZHANG W, CHEN Y, et al. Platycodin D inhibits proliferation, migration and induces chemosensitization through inactivation of the NF- $\kappa$ B and JAK2/STAT3 pathways in multiple myeloma cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(12): 1194-200.
- [19] WANG L, FENG Y, WANG J, et al. Arbutin ameliorates murine colitis by inhibiting JAK2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 683818.