

栀子苷调节JAK2/STAT3/SOCS1信号通路 对骨肉瘤细胞恶性进展的影响

李海霞¹ 苗存良^{1*} 安志辉¹ 刘国峰¹ 杨东海²

(¹邯郸市中心医院骨六科, 邯郸 056000; ²华北医疗集团峰峰总医院, 邯郸 056000)

摘要 该文旨在探究栀子苷(geniposide, GEN)调节酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号转导与转录活化因子3(STAT3)/细胞因子信号转导抑制因子1(SOCS1)信号通路对骨肉瘤细胞恶性进展的影响。用浓度为2.5~40 mg/mL的GEN处理人骨肉瘤细胞(U2OS), 采用CCK-8法检测细胞活性, 筛选出最佳药物浓度; 将U2OS细胞分为对照组(Control组), 栀子苷低、中、高浓度组(GEN-L组、GEN-M组、GEN-H组), 栀子苷高浓度+STAT3激活剂组(GEN-H+colivelin组); 细胞增殖情况用平板克隆法检测; 细胞凋亡情况用流式细胞仪检测; 细胞迁移情况用划痕实验检测; 细胞侵袭情况用Transwell实验检测; Western blot检测细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、细胞核增殖抗原标记物(Ki67)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、JAK2、STAT3、SOCS1蛋白表达水平; 裸鼠移植瘤实验检测GEN对骨肉瘤移植瘤生长的影响。选择5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL的GEN进行后续研究。与Control组比较, GEN-L、GEN-M、GEN-H组集落形成数、细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量及Ki67、Cyclin D1、MMP-9、MMP-2、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3表达水平呈浓度依赖性降低, SOCS1蛋白表达水平、细胞凋亡率及Caspase-3、Bax表达水平呈浓度依赖性升高($P<0.05$); 与GEN-H组相比, GEN-H+colivelin组集落形成数、划痕愈合率、细胞侵袭数量及Ki67、Cyclin D1、MMP-9、MMP-2、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3表达水平显著升高, SOCS1蛋白表达水平、细胞凋亡率及Caspase-3、Bax表达水平显著降低($P<0.05$)。移植瘤实验显示, GEN组移植瘤比Control组生长缓慢, 移植瘤体积、质量均减小, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3表达水平降低, SOCS1水平升高($P<0.05$)。GEN可通过调节JAK2/STAT3/SOCS1信号通路抑制骨肉瘤细胞恶性进展。

关键词 骨肉瘤; 栀子苷; JAK2/STAT3/SOCS1; 恶性进展

Effect of Geniposide on Malignant Progression of Osteosarcoma Cells by Regulating the JAK2/STAT3/SOCS1 Signaling Pathway

LI Haixia¹, MIAO Cunliang^{1*}, AN Zhihui¹, LIU Guofeng¹, YANG Donghai²

(¹Department of Bone Six, Handan Central Hospital, Handan 056000, China;

²Fengfeng General Hospital, Huabei Medical Group, Handan 056000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of GEN (geniposide) on the malignant progression of osteosarcoma cells by regulating the JAK2 (janus kinase 2)/STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)/SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) signaling pathway. Human osteosarcoma cells (U2OS) were treated with GEN at a concentration of 2.5–40 mg/mL, and cell activity was detected using the CCK-8 method to screen for the optimal drug concentration; U2OS cells were grouped into Control group, low, medium, and high concentration geniposide groups (GEN-

收稿日期: 2024-03-20

接受日期: 2024-05-10

*通信作者。Tel: 13754402061, E-mail: w40pnj@163.com

Received: March 20, 2024

Received: May 10, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-13754402061, E-mail: w40pnj@163.com

L group, GEN-M group, GEN-H group), and high concentration geniposide+STAT3 activator group (GEN-H+colivelin group); cell proliferation was detected using colony formation assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry; cell migration was detected using wound healing assay; cell invasion was detected using Transwell invasion assay; Western blot was applied to detect the expression of Cyclin D1, Ki67, Bax, Caspase-3, MMP-9, MMP-2, JAK2, STAT3, and SOCS1 proteins; nude mouse transplantation tumor experiment was applied to detect the effect of GEN on the growth of osteosarcoma transplantation tumors. 5 mg/mL, 10 mg/mL, and 20 mg/mL GEN were selected for the subsequent study. Compared with the Control group, the number of colony formation, scratch healing rate, number of cell invasion, and expression levels of Ki67, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 decreased in a concentration dependent manner in the GEN-L, GEN-M, and GEN-H groups, the expression of SOCS1 protein, cell apoptosis rate, and expression levels of Caspase-3 and Bax increased, in a concentration dependent manner ($P<0.05$); compared with the GEN-H group, the number of colony formation, scratch healing rate, number of cell invasion, and expression levels of Ki67, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 obviously increased in the GEN-H+colivelin group, the expression of SOCS1 protein, cell apoptosis rate, and expression levels of Caspase-3 and Bax obviously reduced ($P<0.05$). The transplantation experiment showed that the GEN group had slower growth of transplanted tumors compared to the Control group, the volume and mass of the transplanted tumor decreased, the expression levels of p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 reduced, SOCS1 level increased ($P<0.05$). GEN can inhibit the malignant progression of osteosarcoma cells by regulating the JAK2/STAT3/SOCS1 signaling pathway.

Keywords osteosarcoma; geniposide; JAK2/STAT3/SOCS1; malignant progression

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种起源于间充质组织的恶性肿瘤,是最常见的原发性恶性骨肉瘤,占全球原发性恶性骨肿瘤病例的20%^[1]。OS具有双峰年龄分布,发病率最高的是儿童和青少年,其次是60岁以上老年人。OS主要发生在长骨(包括股骨、胫骨、肱骨),靠近骨干骺端的生长板,较少见于颅骨、颌骨和骨盆^[2]。目前OS的治疗方法包括全身化疗和广泛手术切除,然而患者手术过程可能会促进肿瘤转移,化疗药物会有严重的副作用,因此寻找OS新的治疗药物和方法至关重要^[3]。中医治疗可作为癌症治疗的辅助治疗,对人体无明显副作用。栀子苷(geniposide, GEN)已被公认为人类癌症的抗肿瘤试剂,在胃癌(gastric carcinoma, GC)中,栀子苷治疗对胃癌细胞有抑制作用^[4]。但栀子苷对OS细胞恶性进展的影响尚不清楚。有研究发现,可通过抑制酪氨酸蛋白激酶2(janus kinase 2, JAK2)/信号转导与转录活化因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路抑制肺腺癌细胞的增殖和转移^[5]。研究证明,细胞因子信号转导抑制因子1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)表达水平在OS组织和细胞中下调^[6],但栀子苷能否通过调控JAK2/STAT3/SOCS1信号通路影响OS细胞恶性进展仍未可知。因此,本研究主要探讨栀子苷对OS细

胞恶性进展的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞(U2OS)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

GEN(货号:SG8100,纯度 $\geq 98\%$)购于北京索莱宝科技有限公司;STAT3激活剂colivelin(货号:C426452-1mL)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;兔抗Cyclin D1(货号:ab134175)、Ki67(货号:ab16667)、Caspase-3(货号:ab32150)、Bax(货号:ab182733)、MMP-2(货号:ab92536)、MMP-9(货号:ab76003)、JAK2(货号:ab108596)、p-JAK2(货号:ab32101)、STAT3(货号:ab68153)、p-STAT3(货号:ab267373)、SOCS1(货号:ab280886)抗体购于英国Abcam公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒(货号:E-CK-A211)购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 U2OS细胞培养 将冻存的骨肉瘤U2OS细胞于37 °C融化,加入含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基,放置于37 °C、5% CO₂的孵育箱中培养。

1.3.2 细胞处理及分组 将对数生长期的U2OS细胞,以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于96孔板中,使用浓度为2.5、5、10、20、40 mg/mL的GEN处理24 h, CCK-8法检测细胞生存率,绘制U2OS细胞生长曲线,计算GEN对U2OS细胞的半数抑制浓度 IC_{50} ,筛选栀子苷最佳药物浓度。

将U2OS细胞接种于6孔板,并将其分为Control组,栀子苷低、中、高浓度组(GEN-L组、GEN-M组、GEN-H组),栀子苷高浓度+STAT3激活剂组(GEN-H+colivelin组),其中GEN低、中、高浓度分别使用5、10、20 mg/mL的GEN处理U2OS细胞24 h, GEN-H+colivelin组使用20 mg/mL的GEN和0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的colivelin^[7]共同处理U2OS细胞24 h。

1.3.3 平板克隆检测U2OS细胞增殖情况 将各组处理的U2OS细胞接种于6孔板,每3天更换1次新鲜的培养液,连续培养14天后,弃培养液,室温加入4%多聚甲醛固定15 min, 0.5%结晶紫对细胞进行染色30 min,清水漂洗15 min,孔板倒扣晾干,显微镜下拍照,用ImageJ软件计数。

1.3.4 细胞凋亡实验 用0.25%的胰酶在37 °C下将U2OS细胞进行消化2 min, PBS洗涤2次,每次1 min, 800 r/min离心5 min,完成后弃上清,调整细胞浓度约为 5×10^5 个/mL,加入标记液悬浮细胞,然后加入Annexin V-FITC和PI染液,4 °C黑暗条件下孵育30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,根据流式图计算细胞凋亡率。

1.3.5 划痕实验检测U2OS细胞迁移情况 将细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL,接种于6孔板中。用200 μL 无菌移液器枪头垂直于单层细胞划痕,每孔加入500 μL 0.1%胎牛血清培养基。由于骨肉瘤U2OS细胞具有迁移能力,继续培养划痕会逐步融合,在细胞划痕干预24 h后在显微镜下观察,用Image Pro Plus软件计算划痕愈合率(%)=[(0 h时划痕宽度-24 h时划痕宽度)/0 h时划痕宽度] $\times 100\%$ 。

1.3.6 U2OS细胞侵袭实验 将基质胶涂在Transwell小室内,将U2OS细胞用无FBS的DMEM培养液重悬,将细胞浓度调整约为 5×10^5 个/mL,接种至Transwell上室,下室加入10% FBS培养液,持续培养24 h,用甲醛室温固定20 min,结晶紫染色15 min。在显微镜下,每组随机选取5个视野统计细胞侵袭数。

1.3.7 Western blot检测蛋白表达情况 收集各组U2OS细胞,加入裂解液提取总蛋白,BCA法检测蛋白含量,进行SDS-PAGE凝胶电泳、转膜,室温下用

脱脂牛奶封闭1 h,加入Ki67、Cyclin D1、Caspase-3、Bax、MMP-2、MMP-9、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、SOCS1一抗(1:500),于4 °C条件下孵育过夜,洗膜,加入HRP标记的二抗(1:1 000)于室温条件下孵育,ECL显色,用ImageJ软件检测蛋白条带。

1.3.8 裸鼠移植瘤模型建立 6周龄BALB/C裸鼠购于山东艾莱克生物科技有限公司[许可证号:SCXK(鲁)2022-0007],饲养7天,待U2OS细胞生长至对数期调整浓度至 5×10^7 个/mL,每只裸鼠皮下注射0.2 mL U2OS细胞悬液。当肿瘤体积约为3 mm \times 3 mm \times 3 mm时,将裸鼠分为GEN组和对照组,每组6只。GEN组隔天腹腔注射GEN(100 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)^[8];对照组注射与GEN组等量的生理盐水,每7天测量1次肿瘤体积,35天后,处死裸鼠,对肿瘤进行称重,检测JAK2/STAT3/SOCS1通路相关蛋白表达情况。本研究经河北中医学院动物实验中心伦理委员会审核通过(批号:2022-0175)。

1.4 统计学方法

用SPSS 25.0进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示,用单因素方差分析进行多组间比较,用SNK-*q*检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEN抑制U2OS细胞的增殖

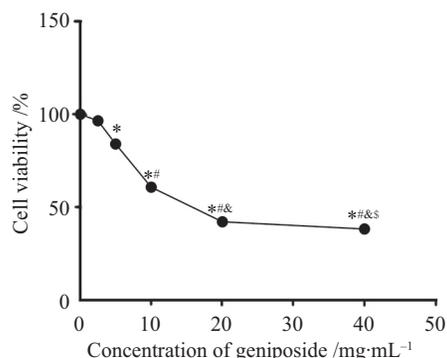
随着GEN浓度增加,U2OS细胞存活率逐渐受到抑制。GEN浓度较低时,对细胞存活率的抑制作用尚不明显。GEN浓度在5~20 mg/mL时,U2OS细胞存活率受到强烈抑制($P < 0.05$), IC_{50} 值为18.76 mg/mL。GEN浓度在20 mg/mL以上时,U2OS细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。因此选择5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL GEN进行后续研究(图1和表1)。

2.2 GEN抑制Ki67和Cyclin D1的表达

与Control组比较,GEN-L、GEN-M、GEN-H组集落形成数以及Ki67、Cyclin D1蛋白表达水平呈浓度依赖性降低,GEN对U2OS细胞增殖进行抑制,并且抑制增殖蛋白Ki67、Cyclin D1的表达($P < 0.05$);与GEN-H组相比,GEN-H+colivelin组集落形成数以及Ki67、Cyclin D1表达水平明显升高($P < 0.05$)(图2和表2)。

2.3 GEN诱导U2OS细胞凋亡并抑制Bax、Caspase-3蛋白表达

与Control组比较,GEN-L、GEN-M、GEN-H组细胞凋亡率以及Caspase-3、Bax表达水平呈浓度



$P < 0.05$, 与Control组比较; $^{\#}P < 0.05$, 与5 mg/mL GEN组比较; $^{\&}P < 0.05$, 与10 mg/mL GEN组比较; $^{\$}P < 0.05$, 与20 mg/mL GEN组比较。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; $^{\#}P < 0.05$ compared with 5 mg/mL GEN group; $^{\&}P < 0.05$ compared with 10 mg/mL GEN group; $^{\$}P < 0.05$ compared with 20 mg/mL GEN group.

图1 不同浓度的GEN对U2OS细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of GEN on the proliferation of U2OS cells

表1 GEN对U2OS细胞存活率的影响

Table 1 Effects of GEN on the viability of U2OS cells

组别 Group	细胞活性/% Cell viability /%
Control group	100.00±0.00
2.5 mg/mL GEN	96.03±10.35
5 mg/mL GEN	84.16±9.02*
10 mg/mL GEN	60.33±7.54*#
20 mg/mL GEN	42.84±4.69*#&
40 mg/mL GEN	38.26±4.87*#&S
<i>F</i>	89.459
<i>P</i>	<0.001

* $P < 0.05$, 与Control组比较; $^{\#}P < 0.05$, 与5 mg/mL GEN组比较; $^{\&}P < 0.05$, 与10 mg/mL GEN组比较; $^{\$}P < 0.05$, 与20 mg/mL GEN组比较。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; $^{\#}P < 0.05$ compared with 5 mg/mL GEN group; $^{\&}P < 0.05$ compared with 10 mg/mL GEN group; $^{\$}P < 0.05$ compared with 20 mg/mL GEN group.

依赖性升高,说明GEN促进U2OS细胞凋亡,并且促进凋亡蛋白Caspase-3、Bax表达($P < 0.05$);与GEN-H组相比,GEN-H+colivelin组细胞凋亡率以及Caspase-3、Bax表达水平明显降低($P < 0.05$)(图3和表3)。

2.4 GEN抑制U2OS细胞迁移与侵袭并抑制MMP-2、MMP-9蛋白表达

与Control组比较,GEN-L、GEN-M、GEN-H组U2OS细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量呈浓度依赖性降低,MMP-2、MMP-9表达下调,说明GEN抑制U2OS细胞迁移、侵袭,同时抑制迁移、侵袭相关蛋白MMP-2、MMP-9表达($P < 0.05$);与GEN-H组比较,GEN-H+colivelin组U2OS细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量升高,MMP-2、MMP-9表达上调($P < 0.05$)(图4)。

2.5 GEN抑制JAK2/STAT3/SOCS1信号通路相关蛋白表达

与Control组比较,GEN-L、GEN-M、GEN-H组

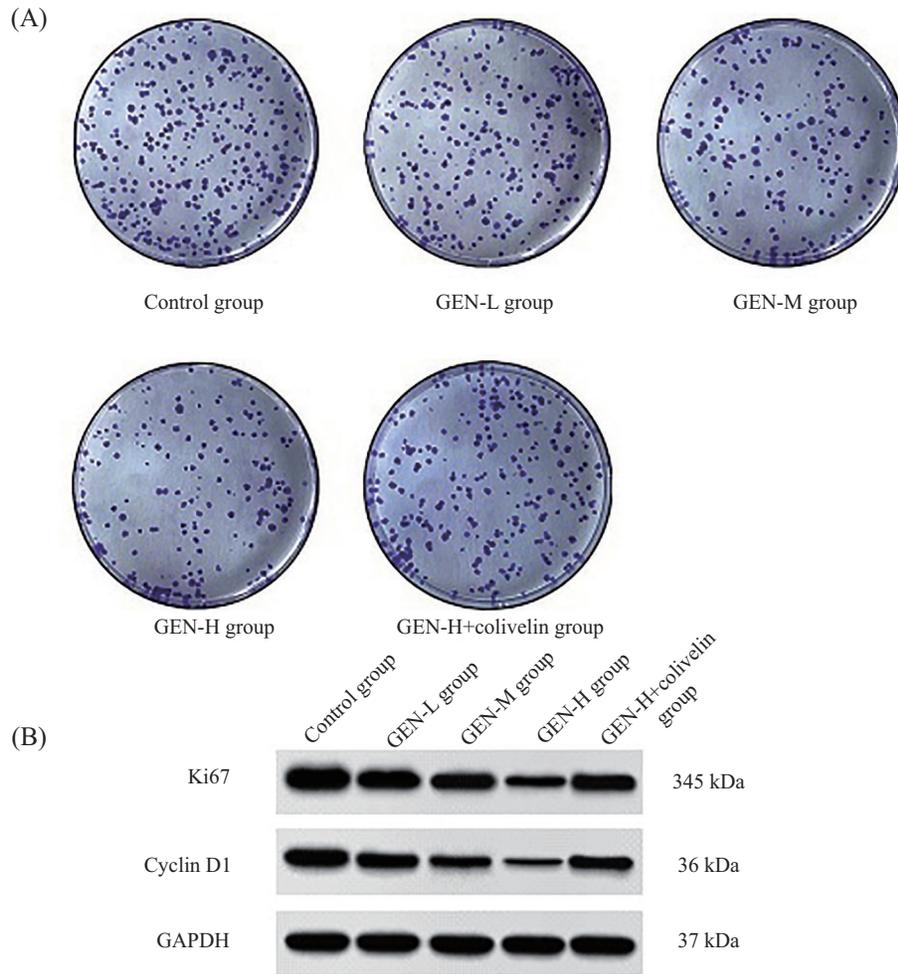
JAK2、STAT3的磷酸化水平下调,SOCS1蛋白表达水平呈浓度依赖性升高,说明GEN抑制JAK2、STAT3的磷酸化,促进SOCS1表达($P < 0.05$);与GEN-H组比较,GEN-H+colivelin组JAK2、STAT3的磷酸化水平上调,SOCS1蛋白表达水平降低($P < 0.05$)(图5)。

2.6 GEN抑制裸鼠移植瘤生长

与Control组相比,GEN组小鼠移植瘤生长较缓慢,移植瘤质量、体积显著减小,JAK2和STAT3的磷酸化水平下调,SOCS1蛋白表达水平升高,说明GEN抑制移植瘤生长,抑制JAK2、STAT3的磷酸化,促进SOCS1蛋白表达($P < 0.05$)(图6、图7、图8和表4)。

3 讨论

骨肉瘤在原发性骨肿瘤的发病率和死亡率方面均排名第一^[9]。骨肉瘤是一种异源性疾病,其特征是基因组高度不稳定、广泛的遗传畸变和多种信号



A: U2OS细胞增殖情况; B: Ki67、Cyclin D1蛋白表达情况。

A: the proliferation of U2OS cells; B: the expression of Ki67 and Cyclin D1 protein.

图2 各组U2OS细胞增殖以及增殖相关蛋白表达情况

Fig.2 Proliferation of U2OS cells in each group and expression of proliferation-related proteins

表2 GEN对U2OS细胞增殖及增殖相关蛋白的影响

Table 2 Effects of GEN on proliferation and proliferation-related proteins of U2OS cells

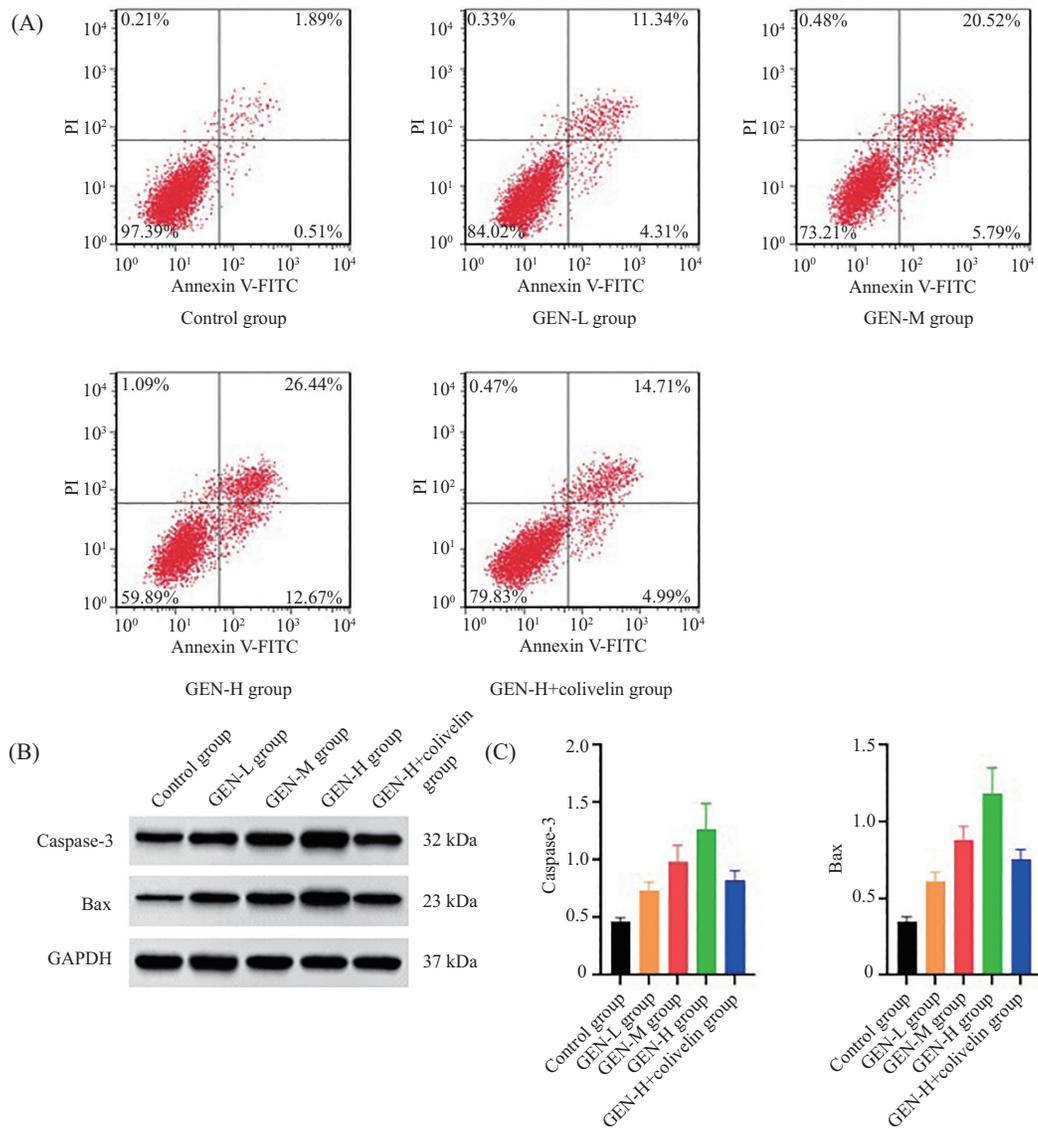
组别 Group	克隆形成数 Number of colony formation	Ki67	Cyclin D1
Control group	150.65±15.37	1.28±0.26	1.06±0.18
GEN-L group	115.87±12.44*	1.01±0.13*	0.78±0.07*
GEN-M group	88.92±9.15*#	0.75±0.08*#	0.52±0.05*#
GEN-H group	64.58±6.79*#&	0.44±0.04*#&	0.24±0.02*#&
GEN-H+colivelin group	107.15±11.27 [§]	0.88±0.08 [§]	0.65±0.06 [§]
F	47.444	28.960	63.356
P	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与GEN-L组比较; & $P<0.05$, 与GEN-M组比较; $^{\S}P<0.05$, 与GEN-H组比较。

* $P<0.05$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with GEN-L group; & $P<0.05$ compared with GEN-M group; $^{\S}P<0.05$ compared with GEN-H group.

通路紊乱。由于骨肉瘤微转移扩散, 仅靠根治性手术很少能治愈。尽管目前有多种化疗选择, 但耐药性对大多数患者来说是一个重大问题^[10]。对于复发

性和一些原发性骨肉瘤病例, 由于化疗耐药和疾病进展迅速, 化疗效果较差^[11]。因此, 寻找新的治疗药物十分重要。



A: U2OS细胞凋亡情况; B: Western blot检测Bax、Caspase-3蛋白表达情况; C: Bax、Caspase-3蛋白表达水平比较。
 A: the apoptosis of U2OS cells; B: Bax and Caspase-3 expression detected by Western blot; C: comparison of Bax and Caspase-3 protein expression levels.

图3 各组U2OS细胞的凋亡率以及Bax、Caspase-3蛋白表达情况(Caspase为剪切体)

Fig.3 The apoptosis rate of U2OS cells and the expression of Bax and Caspase-3 proteins in each group (Caspase was the spliceosome)

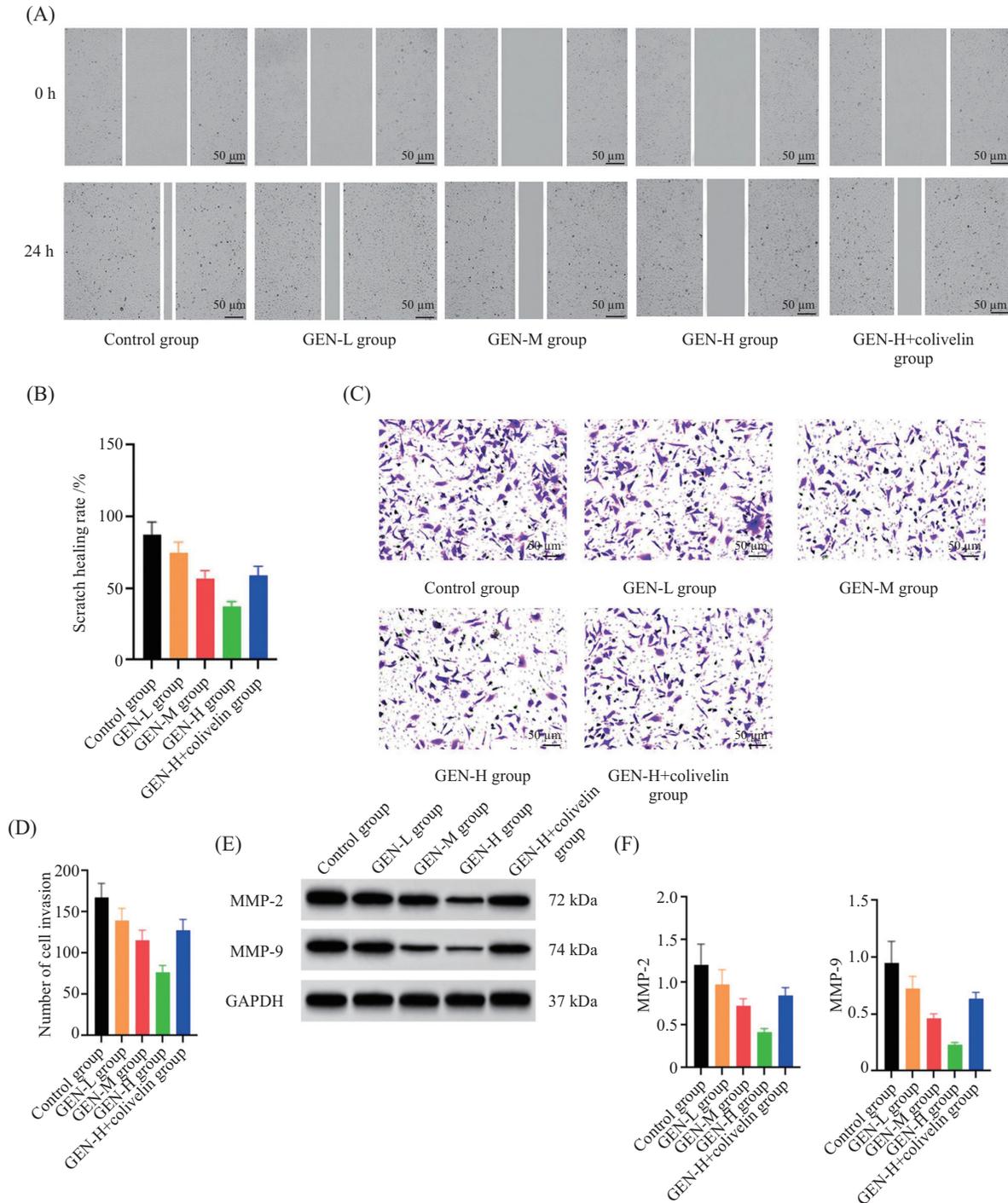
表3 GEN对U2OS细胞凋亡率的影响

Table 3 Effect of GEN on U2OS cell apoptosis rate

组别 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control group	2.41±0.36
GEN-L group	15.74±1.81*
GEN-M group	25.21±2.83**
GEN-H group	37.56±4.14***
GEN-H+colivelin group	20.34±2.19 [§]
F	149.066
P	<0.001

*P<0.05, 与Control组比较; #P<0.05, 与GEN-L组比较; &P<0.05, 与GEN-M组比较; §P<0.05, 与GEN-H组比较。

*P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with GEN-L group; &P<0.05 compared with GEN-M group; §P<0.05 compared with GEN-H group.



A、B: U2OS细胞迁移情况; C、D: U2OS细胞侵袭情况; E、F: MMP-2、MMP-9蛋白表达水平。

A,B: the migration of U2OS cells; C,D: the invasion of U2OS cells; E,F: the expression levels of MMP-2 and MMP-9 proteins.

图4 各组U2OS细胞迁移、侵袭以及相关蛋白表达

Fig.4 Migration, invasion and related protein expression of U2OS cells in each group

GEN是一种水溶性环烯醚萜葡萄糖苷, 主要来源于开花植物茜草科(茜草科)的果实, 是一种传统中药, 栀子苷的各种生物活性和药理作用包括抗炎、神经保护、抗氧化、抗癌、抗糖尿病和保肝作用^[12]。LÜ等^[13]研究发现, GEN可以抑制人乳

腺癌细胞(MCF-7)的增殖并促进细胞凋亡, 具有时间和浓度依赖性的抗癌作用。BAI等^[14]研究报道, GEN通过AMPK和JNK信号通路抑制人口腔鳞癌细胞的增殖和迁移。ZHANG等^[15]研究证明, GEN对TLR4/MyD88活化的直接抑制作用有助于抑制肝细

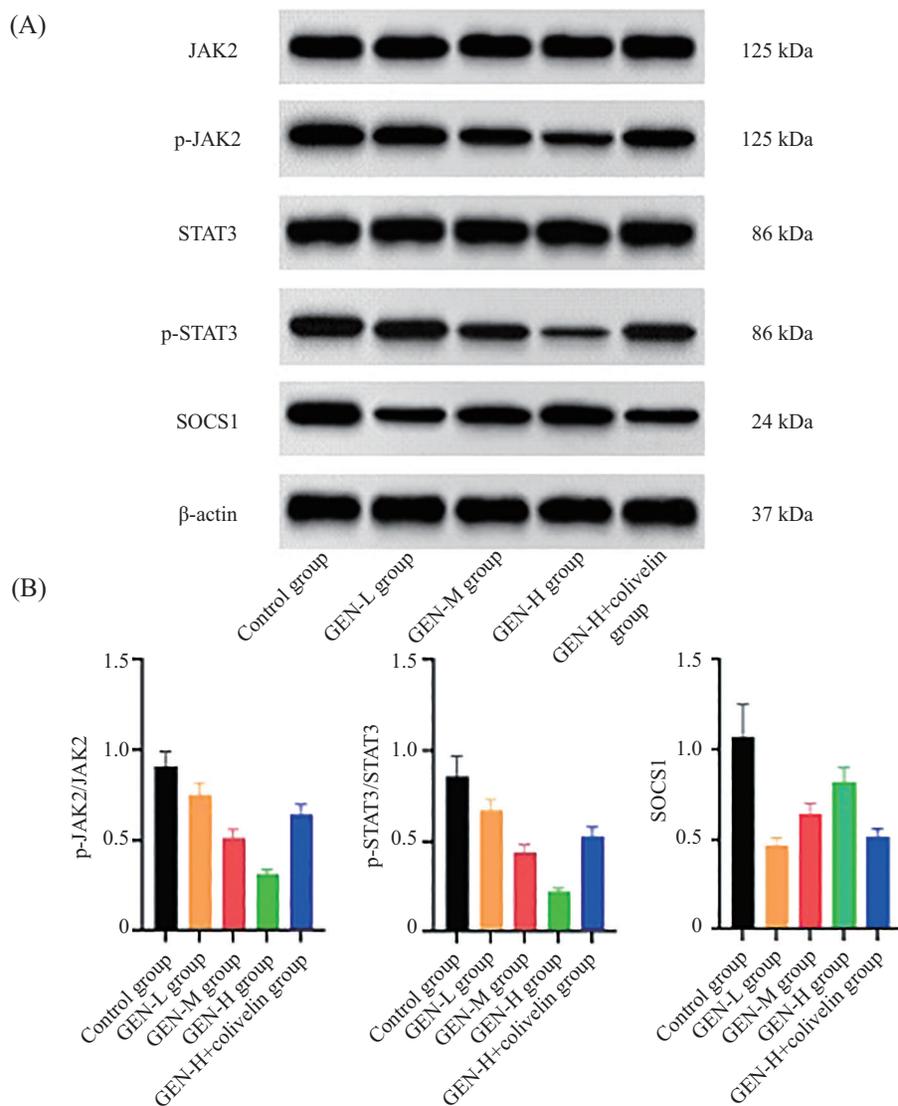


图5 Western blot检测JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS1蛋白表达

Fig.5 The expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 and SOCS1 proteins was detected by Western blot



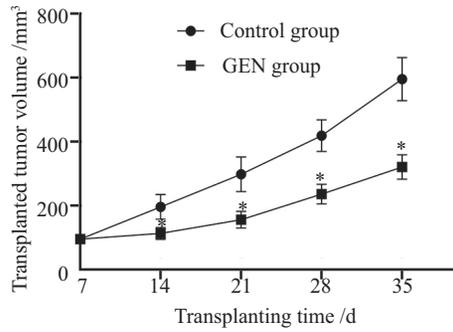
图6 两组裸鼠移植瘤体图

Fig.6 Two groups of nude mice transplanted tumor body figure

胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 血管生成和肺转移中 STAT3/Sp1 依赖性 VEGF 的过表达。研究显示, GEN 可诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体功能障碍, 抑制癌细胞增殖、侵袭, 促进焦亡^[16]。本研究用 5~20 mg/mL 的栀子苷处理 U2OS 细胞, 发现 U2OS 细胞存活率明显下降, 说明栀子苷可抑制 U2OS 细胞增殖。选用不同浓度的栀子苷处理 U2OS 细胞, 发现 Ki67、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达下调,

同时 U2OS 细胞集落形成数、细胞愈合率及细胞侵袭数量降低; 栀子苷能提高 U2OS 细胞凋亡率, 促进 Caspase-3、Bax 蛋白表达, 提示栀子苷可抑制 OS 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进 OS 细胞凋亡, 说明栀子苷在 OS 中发挥抗癌作用。但栀子苷在 OS 中的抗癌机制尚不清楚。

STAT3/JAK2/SOCS1 通路对细胞增殖、转化十分重要, 受到生长因子和细胞因子刺激后, JAK 激活



*P<0.05, 与Control组比较。

*P<0.05 compared with the Control group.

图7 GEN对移植瘤体积的影响

Fig.7 Effect of GEN on the volume of transplanted tumor

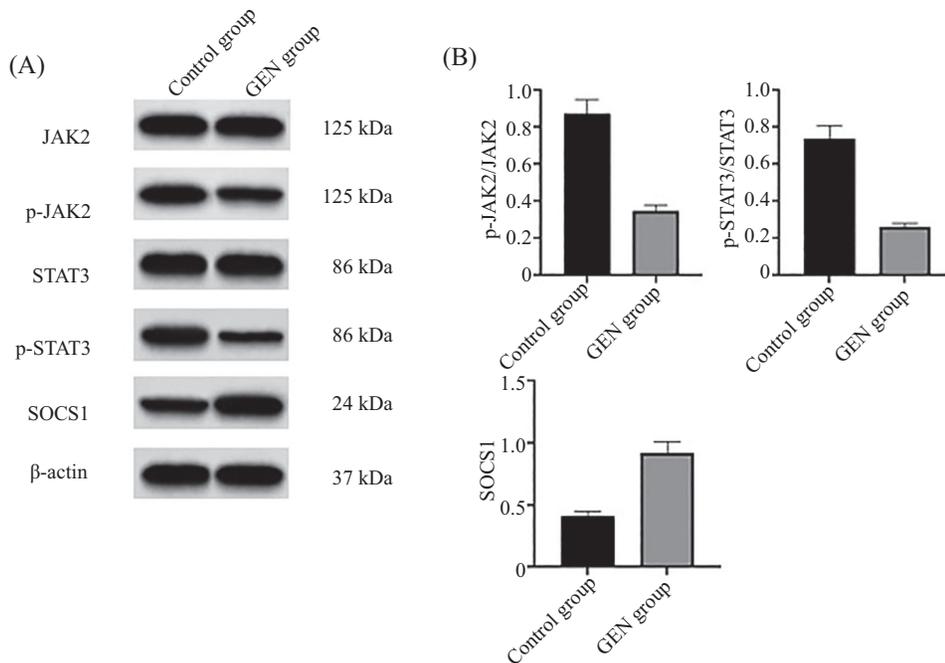


图8 各组移植瘤JAK2、STAT3、SOCS1蛋白水平表达

Fig.8 The expression of JAK2, STAT3 and SOCS1 proteins in transplanted tumors of each group

表4 GEN对裸鼠移植瘤的影响

Table 4 Effect of GEN on transplanted tumor in nude mice

组别 Group	移植瘤质量/g Quality of transplanted tumor /g	移植瘤体积/mm ³ Transplanted tumor volume /mm ³
Control group	0.58±0.05	596.39±45.64
GEN group	0.37±0.04	331.74±35.38
<i>t</i>	8.033	11.226
<i>P</i>	<0.001	<0.001

STAT3, STAT3进入细胞核进行转录调控,参与细胞生长、凋亡^[17]。SOCS1是SOCS家族的成员,它在调节免疫系统和炎症级联反应方面起着至关重要的作用^[18]。目前国内外关于STAT3/JAK2/SOCS1通路在OS中的相关研究较少,其作用机制尚未十分明确。

GONG等^[6]研究发现, KIAA0087通过海绵化 miR-411-3p增强了SOCS1表达,使JAK2/STAT3通路失活,抑制了OS细胞的生长、迁移、侵袭、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和激活,并促进了OS细胞凋亡。研究证实,乌贝尼梅(UBE)

与培美曲塞(PEM)联合治疗可以通过上调SOCS1表达来抑制JAK2-STAT3信号通路,从而阻碍肺腺癌的进展^[19]。本研究显示,GEN可下调p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达,上调SOCS1表达,表明GEN通过调控STAT3/JAK2/SOCS1信号通路抑制U2OS细胞增殖、迁移、侵袭,促进U2OS细胞凋亡。为验证这一结果,本研究对GEN处理的U2OS细胞又进行了colivelin处理,分析发现,colivelin能够逆转GEN对U2OS细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的抑制作用,说明GEN可以通过激活SOCS1抑制STAT3/JAK2信号通路进而抑制U2OS细胞的增殖、迁移、侵袭。移植瘤实验结果显示,GEN组OS移植瘤生长速度、质量、体积明显下降,同时p-STAT3、p-JAK2蛋白表达下调,SOCS1水平升高。这证实了GEN可通过调控STAT3/JAK2/SOCS1信号通路抑制OS细胞生长。

综上,本研究证明了GEN通过调节STAT3/JAK2/SOCS1信号通路从而抑制OS细胞恶性进展。然而,GEN调控STAT3/JAK2/SOCS1信号通路的具体机制还需进一步结合动物实验深入研究。

参考文献 (References)

[1] ZHAO X, WU Q, GONG X, et al. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches [J]. *Biomed Eng Online*, 2021, 20(1): 24.

[2] CORRE I, VERRECCHIA F, CRENN V, et al. The osteosarcoma microenvironment: a complex but targetable ecosystem [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 976.

[3] JAFARI F, JAVDANSIRAT S, SANAAIE S, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review of management and treatment strategies [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, 49(1): 151654.

[4] 张奇昌. 西红花酸对胃癌细胞SGC7901药效及机制研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.

[5] 文礼, 李春姝, 李娇, 等. 干扰NETO2通过调控JAK2/STAT3信号通路抑制肺腺癌细胞增殖和转移能力[J]. *国际检验医学杂志*(WEN L, LI C S, LI J, et al. Interfering with NETO2 inhibits the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*), 2023, 44(14): 1762-7.

[6] GONNG H, TAO Y, XIAO S, et al. LncRNA KIAA0087 suppresses the progression of osteosarcoma by mediating the SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(4): 831-43.

[7] 李毅, 张恒, 赵维彪. 槲皮素阻滞JAK2/STAT3信号通路对骨肉瘤细胞迁移、侵袭和EMT的抑制作用研究[J]. *激光生物学报*(LI Y, ZHANG H, ZHAO W B. The inhibitory effect of quercetin on migration, invasion and EMT of chondrosarcoma cells

by blocking JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Journal of Laser Biology*), 2023, 32(3): 240-6.

[8] KIMURA Y, SUMIYOSHI M, TANIGUCHI M. Geniposide prevents tumor growth by inhibiting colonic interleukin-1 β and monocyte chemoattractant protein-1 via down-regulated expression of cyclooxygenase-2 and thymocyte selection-associated high mobility box proteins TOX/TOX2 in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118(1): 110077.

[9] TAN R, ZHAO C, LU Y, et al. Clinical significance and effect of PRR 11 up-regulation on the malignancy of osteosarcoma [J]. *Pol J Pathol*, 2022, 73(3): 264-76.

[10] LILIENTHAL I, HEROLD N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: a review of current and future strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6885.

[11] LI S, ZHANG H, LIU J, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(9): 6785-97.

[12] QIN T, HASNAT M, WANG Z, et al. Geniposide alleviated bile acid-associated NLRP3 inflammasome activation by regulating SIRT1/FXR signaling in bile duct ligation-induced liver fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118(1): 154971.

[13] LÜ K, ZHU J, ZHENG S, et al. Evaluation of inhibitory effects of geniposide on a tumor model of human breast cancer based on 3D printed Cs/Gel hybrid scaffold [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 119(1): 111509.

[14] BAI G, CHEN B, XIAO X, et al. Geniposide inhibits cell proliferation and migration in human oral squamous carcinoma cells via AMPK and JNK signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(6): 706.

[15] ZHANG C, WANG N, TAN H Y, et al. Direct inhibition of the TLR4/MyD88 pathway by geniposide suppresses HIF-1 α -independent VEGF expression and angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(14): 3240-57.

[16] 时延龙, 周鹏, 王雪凯, 等. 槲子苷通过AMPK/SIRT1/NF- κ B通路调节乳腺癌细胞增殖、焦亡和侵袭[J]. *广西医科大学学报*(SHI Y L, ZHOU P, WANG X K, et al. Geniposide regulates the proliferation, pyroptosis and invasion of breast cancer cells through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway [J]. *GuangXi Medical University*), 2022, 39(11): 1700-5.

[17] 魏小敏, 王丽丽, 刘海霞, 等. 丹参素通过STAT3/JAK2/SOCS1信号通路在妊娠期糖尿病干预中的作用机制研究[J]. *陕西医学杂志*(WEI X M, WANG L L, LIU H X, et al. Study on the mechanism of Danshensu in the intervention of gestational diabetes mellitus through STAT3/JAK2/SOCS1 signaling pathway [J]. *ShanXi Medical Journal*), 2023, 52(5): 508-12.

[18] ZU D, DONG Q, CHEN S, et al. miRNA-331-3p Affects the proliferation, metastasis, and invasion of osteosarcoma through SOCS1/JAK2/STAT3 [J]. *J Oncol*, 2022, 2022(1): 6459029.

[19] CHEN Q, WU B, GE P, et al. Ubenimex combined with pemetrexed upregulates SOCS1 to inhibit lung adenocarcinoma progression via the JAK2-STAT3 signaling pathway [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022(1): 5614939.