

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research尼达尼布通过 SHP-1 介导 STAT3 信号通路
诱导肝癌细胞凋亡及自噬研究

Study of nintedanib induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells by mediating the STAT 3 signaling pathway through SHP-1

刘振华¹, 胡永强², 廖斐¹,
赵健¹(1. 濮阳医学高等专科学校 临床医学学院 河南
濮阳 457000; 2. 濮阳市人民医院 肿瘤放疗科
河南 濮阳 457000)LIU Zhen-hua¹, HU Yong-qiang²,
LIAO Fei¹, ZHAO Jian¹(1. School of Clinical Medicine, Puyang
Medical College, Puyang 457000, Henan
Province, China; 2. Oncology
Radiotherapy Department, Puyang City
People's Hospital, Puyang 457000,
Henan Province, China)

作者简介: 刘振华(1987-), 男, 本科, 讲师, 主
要负责临床医学方向的工作和研究
通信作者: 胡永强, 主任医师, 硕士研究生导师
MP: 13629865278
E-mail: Ppx2583@163.com

摘要:目的 探究尼达尼布对肝癌细胞凋亡及自噬的影响,并探究非受体蛋白酪氨酸磷酸酶 1(SHP-1)及信号转导和转录激活因子 3(STAT3)在其中的作用。
方法 将 Hep3B 细胞分为 Hep3B 组(正常培养)、nintedanib 组($10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼达尼布处理 48 h)、nintedanib + si-NC 组(基于 nintedanib 组,先转染 si-NC 后再进行尼达尼布处理)、nintedanib + si-SHP-1 组(基于 nintedanib 组,先转染 si-SHP-1 后再进行尼达尼布处理)。用逆转录实时荧光定量聚合酶链反应法检测 SHP-1 信使核糖核酸(mRNA)水平;用蛋白质印迹法检测细胞 SHP-1、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、凋亡抑制因子 1(IAP-1)、凋亡相关存活蛋白(Survivin)、苯氯素 1(Beclin-1)、磷酸化 Beclin-1(p-Beclin-1)、STAT3、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、Janus 激酶 2(JAK2)和磷酸化 JAK2(p-JAK2)水平;用噻唑蓝实验法检测不同浓度尼达尼布处理后人肝癌细胞 Hep3B 的细胞活力;用免疫荧光法检测细胞中 SHP-1 和微管相关蛋白轻链 3(LC3)相对表达水平;用原位末端转移酶标记技术法检测各组 Hep3B 细胞的凋亡情况。**结果** THLE-2、PLC5、HuH7、Hep3B 和 SK-Hep1 各组细胞中 SHP-1 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.45 ± 0.08 、 0.58 ± 0.09 、 0.29 ± 0.04 和 0.34 ± 0.06 , SHP-1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 0.71 ± 0.09 、 0.83 ± 0.12 、 0.56 ± 0.07 和 0.79 ± 0.08 , PLC5、HuH7、Hep3B 和 SK-Hep1 组与 THLE-2 组相比, SHP-1 mRNA 及蛋白相对表达水平在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。0、1、5、10、15 和 $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼达尼布处理后,人肝癌细胞 Hep3B 的细胞活力分别为 $(100.00 \pm 2.39)\%$ 、 $(92.17 \pm 16.85)\%$ 、 $(84.63 \pm 15.21)\%$ 、 $(59.02 \pm 10.74)\%$ 、 $(36.98 \pm 7.53)\%$ 和 $(29.34 \pm 5.67)\%$, 除 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组外,其余各浓度尼达尼布处理组与 $0\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, Hep3B 细胞活力在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Hep3B 组、nintedanib 组、nintedanib + si-NC 组和 nintedanib + si-SHP-1 组细胞中 SHP-1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 3.06 ± 0.57 、 2.84 ± 0.52 和 1.58 ± 0.26 , SHP-1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 3.07 ± 0.54 、 3.48 ± 0.63 和 1.32 ± 0.19 , 细胞的凋亡率分别为 $(19.34 \pm 3.16)\%$ 、 $(62.85 \pm 10.93)\%$ 、 $(67.49 \pm 11.78)\%$ 和 $(24.72 \pm 4.29)\%$, Bcl-2 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.56 ± 0.07 、 0.63 ± 0.08 和 0.84 ± 0.10 , IAP-1 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.38 ± 0.06 、 0.44 ± 0.07 和 0.71 ± 0.12 , Survivin 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.62 ± 0.09 、 0.56 ± 0.08 和 0.83 ± 0.11 , p-Beclin-1/Beclin-1 的水平分别为 1.00 ± 0.18 、 2.37 ± 0.41 、 2.25 ± 0.39 和 1.48 ± 0.26 , LC3 水平分别为 1.00 ± 0.21 、 3.74 ± 0.69 、 3.15 ± 0.60 和 1.52 ± 0.28 , p-STAT3/STAT3 水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.43 ± 0.05 、 0.49 ± 0.08 和 0.88 ± 0.10 , p-JAK2/JAK2 水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.54 ± 0.07 、 0.48 ± 0.07 和 0.79 ± 0.13 , nintedanib 组与 Hep3B 组相比、nintedanib + si-SHP-1 组与 nintedanib + si-NC 组相比,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 尼达尼布可以诱导肝癌细胞凋亡及自噬,这可能是通过 SHP-1 介导 STAT3 信号通路实现的。

关键词: 尼达尼布; 肝癌; 凋亡; 自噬; 非受体蛋白酪氨酸磷酸酶 1

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.19.013

中图分类号: R979.1 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)19-2774-07

Abstract: Objective To investigate the effects of nintedanib on apoptosis and autophagy of hepatocellular carcinoma cells, and to explore the role of non-receptor type protein tyrosine phosphatase 1 (SHP-1) and signal transducer and activator of transcription3 (STAT3). **Methods** Hep3B cells were divided into Hep3B group (normal culture), nintedanib group (treated with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nintedanib for 48 h), nintedanib + si-NC group (based on the nintedanib group, transfected with si-NC before nintedanib treatment), and nintedanib + si-SHP-1 group (based on the nintedanib group, transfected with si-SHP-1 before nintedanib treatment). Reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect *SHP-1* messenger RNA (mRNA) levels. Western blot was used to detect the protein levels of SHP-1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), inhibitor of apoptosis protein-1 (IAP-1), Survivin, Beclin-1, phosphorylated Beclin-1 (p-Beclin-1), STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3), Janus kinase 2 (JAK2) and phosphorylated JAK2 (p-JAK2) in cells. Methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to detect the cell viability of human liver cancer cells Hep3B after treatment with different concentrations of nintedanib. Immunofluorescence was used to detect the relative expression levels of SHP-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in cells. TdT mediated dUTP nick end labeling assay was used to detect the apoptosis of Hep3B cells in each group. **Results** The relative expression levels of *SHP-1* mRNA in THLE-2, PLC5, HuH7, Hep3B and SK-Hep1 cells were 1.00 ± 0.16 , 0.45 ± 0.08 , 0.58 ± 0.09 , 0.29 ± 0.04 and 0.34 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of SHP-1 protein were 1.00 ± 0.13 , 0.71 ± 0.09 , 0.83 ± 0.12 , 0.56 ± 0.07 and 0.79 ± 0.08 , respectively. Compared with the THLE-2 group, the differences in the relative expression levels of *SHP-1* mRNA and protein in PLC5, HuH7, Hep3B, and SK-Hep1 groups were statistically significant (all $P < 0.05$). The cell viability of human liver cancer cells Hep3B treated with 0, 1, 5, 10, 15 and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nintedanib were $(100.00 \pm 2.39)\%$, $(92.17 \pm 16.85)\%$, $(84.63 \pm 15.21)\%$, $(59.02 \pm 10.74)\%$, $(36.98 \pm 7.53)\%$ and $(29.34 \pm 5.67)\%$, respectively. Except for $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, the differences in Hep3B cell viability between other nintedanib treatment groups and $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group were statistically significant (all $P < 0.05$). The relative expression levels of *SHP-1* mRNA in Hep3B group, nintedanib group, nintedanib + si-NC group, and nintedanib + si-SHP-1 group cells were 1.00 ± 0.19 , 3.06 ± 0.57 , 2.84 ± 0.52 and 1.58 ± 0.26 , respectively; the relative expression levels of SHP-1 protein were 1.00 ± 0.16 , 3.07 ± 0.54 , 3.48 ± 0.63 and 1.32 ± 0.19 , respectively; the apoptosis rates were $(19.34 \pm 3.16)\%$, $(62.85 \pm 10.93)\%$, $(67.49 \pm 11.78)\%$ and $(24.72 \pm 4.29)\%$, respectively; the relative expression levels of Bcl-2 were 1.00 ± 0.12 , 0.56 ± 0.07 , 0.63 ± 0.08 and 0.84 ± 0.10 , respectively; the relative expression levels of IAP-1 were 1.00 ± 0.15 , 0.38 ± 0.06 , 0.44 ± 0.07 and 0.71 ± 0.12 , respectively; the relative expression levels of Survivin were 1.00 ± 0.14 , 0.62 ± 0.09 , 0.56 ± 0.08 and 0.83 ± 0.11 , respectively; the levels of p-Beclin-1/Beclin-1 were 1.00 ± 0.18 , 2.37 ± 0.41 , 2.25 ± 0.39 and 1.48 ± 0.26 , respectively; the levels of LC3 were 1.00 ± 0.21 , 3.74 ± 0.69 , 3.15 ± 0.60 and 1.52 ± 0.28 , respectively; the levels of p-STAT3/STAT3 were 1.00 ± 0.11 , 0.43 ± 0.05 , 0.49 ± 0.08 and 0.88 ± 0.10 , respectively; the levels of p-JAK2/JAK2 were 1.00 ± 0.15 , 0.54 ± 0.07 , 0.48 ± 0.07 and 0.79 ± 0.13 , respectively. There were statistically significant differences in the above indicators between nintedanib group and Hep3B group, and between nintedanib + si-shp-1 group and nintedanib + Si NC group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Nintedanib can induce apoptosis and autophagy of hepatocellular carcinoma cells, which may be realized through SHP-1 mediated STAT3 signaling pathway.

Key words: nintedanib; hepatocellular carcinoma; apoptosis; autophagy; non-receptor type protein tyrosine phosphatase 1

肝癌属于消化道恶性肿瘤,早期无明显特征,多数患者确诊时已为中晚期,复发率高、易发生转移,患者5年生存率较低^[1]。尼达尼布是三重酪氨酸激酶抑制剂,可抑制血管生成和组织纤维化,用于治疗特发性肺纤维化,且体外抑制多种肿瘤细胞上皮间充质转化,双胍类修饰的白蛋白纳米颗粒负载尼达尼布显示出调节肝癌细胞肿瘤微环境和抗肝癌作用^[2],但其具体机制还需进一步研究。非受体蛋白酪氨酸磷酸酶1(non-receptor type protein tyrosine phosphatase 1, SHP-1)负调控 Janus 激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)通路,活化的 STAT3,参与肿瘤细胞增殖、转移等活动^[3]。研究表明,荔枝核总黄酮可通过激活 SHP-1 阻断 JAK/STAT3 信号通路来抑制人肝癌细胞增殖,促进其凋亡,并减弱上皮间质转化^[4]。本研究利用人肝癌细胞系探究尼达尼布对肝癌细胞凋亡与自噬的影响,并探究 SHP-1 和 STAT3 相关的作用机制。

材料与方法

1 材料

细胞 人肝癌细胞系 PLC5、Hep3B、HuH7 和 SK-Hep1,人正常肝细胞 THLE-2,均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

药品与试剂 乙磺酸尼达尼布软胶囊,规格:每粒 150 mg,批号:20221010,批准文号:国药准字 HJ20170355,德国 Catalent Germany Eberbach GmbH 生产;含非必需氨基酸的最低必需培养基(minimum essential medium, MEM)、Dulbecco's 改良培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、THLE-2 细胞专用培养基,均由武汉普诺赛生命科技有限公司生产;Lipofectamine3000 转染试剂盒,由美国赛默飞世尔科技公司生产;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)细胞增殖及毒性检测试剂盒、原位末端转移酶标记(TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒,均由翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产;兔抗 SHP-1、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、凋亡抑制因子1(inhibitor of apoptosis protein-1, IAP-1)、凋亡相关存活蛋白(Survivin)、苜氯素 1(Beclin-1)、磷酸化 Beclin-1(phosphorylated beclin-1, p-Beclin-1)、STAT3、磷酸化 STAT3(phosphorylated STAT3, p-STAT3)、JAK2、磷酸化 JAK2(phosphorylated JAK2, p-JAK2)、微管相关蛋白轻链 3(microtubule-

associated protein1light chain3, LC3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体、辣根过氧化酶山羊抗兔抗体、Alexa Fluor488 山羊抗兔抗体和 Alexa Fluor647 山羊抗兔抗体,均由英国 Abcam 公司生产;引物、SHP-1 干扰序列及阴性对照,由上海生工生物工程股份有限公司提供。

仪器 Herocell 180 二氧化碳培养箱,上海润度生物科技有限公司产品;Varioskan LUX 酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司产品;BZ-X 荧光显微镜,日本基恩士有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]

PLC5、Hep3B 和 SK-Hep1 细胞用含非必需氨基酸的 MEM 培养基, HuH7 细胞用 DMEM 培养基, THLE-2 细胞用 THLE-2 细胞专用培养基,所有培养基均添加 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素-链霉素溶液),以提供细胞生长所需的营养并防止污染。细胞培养条件为 37℃、5% CO₂,置于恒温培养箱培养。培养过程中按细胞说明书对细胞进行常规换液与传代培养,待细胞进入对数生长期,通过胰酶消化法收集细胞,经离心、重悬后,取适量细胞用于后续实验,确保实验所用细胞状态均一旦活性良好。

2.2 细胞分组与给药方法^[5]

取对数生长期 Hep3B 细胞接种于 24 孔板,使用含非必需氨基酸的 MEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养,待细胞生长汇合度在 70% 左右时,根据 Lipofectamine3000 试剂盒说明书进行转染,将 SHP-1 干扰序列(si-SHP-1:5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUtt-3')及阴性对照(si-NC:5'-CGCAGUACAAGUUCAUCUAtt-3')分别转染至 Hep3B 细胞,转染前,将 Lipofectamine3000 试剂与相应序列轻柔混合,室温孵育以形成转染复合物,随后加入至细胞孔中。转染 4~6 h 后,更换新鲜培养基,为后续实验做准备。实验共 5 组,THLE-2 组:THLE-2 正常培养不做任何处理;Hep3B 组:Hep3B 正常培养不做任何处理;nintedanib 组:10 μmol·L⁻¹ 尼达尼布处理 48 h 的 Hep3B 细胞;nintedanib + si-NC 组:基于 nintedanib 组, Hep3B 细胞先转染 si-NC 后再进行尼达尼布处理;nintedanib + si-SHP-1 组:基于 nintedanib 组, Hep3B 细胞先转染 si-SHP-1 后再进行尼达尼布处理。

2.3 逆转录实时荧光定量聚合酶链反应法检测 SHP-1 信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)水平^[5]

细胞按“2.2”分组处理,处理结束后收集各组细

胞,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,将细胞裂解液与 TRIzol 充分混合,按试剂说明书进行氯仿抽提、异丙醇沉淀等步骤,并检测 RNA 浓度和纯度,获取纯净 RNA。按照逆转录试剂盒说明书对总 RNA 进行逆转录合成互补 DNA,以互补 DNA 为模板,用实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒进行实时荧光定量扩增,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SHP-1 mRNA 相对表达水平。引物序列 SHP-1 上游引物:5'-GGCTTCTGGGAGGAGTTTGAG-3',下游引物:5'-CGGAGTTTGTATTTCGTTGCTG-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶上游引物:5'-AATGGACAACGTCGCTGGAC-3',下游引物:5'-CCCTCCAGGGATCTGTTTG-3'。

2.4 蛋白质印迹法检测细胞相应蛋白水平^[5]

细胞按“2.2”分组处理,处理结束后收取各组细胞,加入预冷的细胞裂解缓冲液,将各组细胞进行裂解提取蛋白质,并通过二喹啉甲酸法测定总蛋白浓度。取等量蛋白样品加入上样缓冲液,煮沸变性 5 min。取变性后的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后转膜至聚偏二氟乙烯膜上,使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,以阻断非特异性结合。加入兔抗 SHP-1、Beclin-2、IAP-1、Survivin、Beclin-1、p-Beclin-1、STAT3、p-STAT3、JAK2 和 p-JAK2 抗体(1:1 000 稀释),4℃ 孵育过夜,次日,洗膜后加入辣根过氧化物酶山羊抗兔抗体(1:3 000 稀释),室温孵育 2 h。再次洗膜后,用增强化学发光法显影,采集图像,用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

2.5 MTT 实验法检测不同浓度尼达尼布处理后人肝癌细胞 Hep3B 的细胞活力^[5]

取对数生长期的 Hep3B 细胞,用含 10% 胎牛血清的培养液配置单细胞悬液,调整细胞密度,以每孔 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μL ,37℃、5% CO_2 培养至细胞贴壁。随后,用不同浓度(0、1、5、10、15、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的尼达尼布处理 48 h,准备 MTT 试剂工作液与终止液,向处理后的细胞中每孔加入 MTT 试剂 10 μL ,在水平摇床上低速混匀,放入 37℃ 培养箱继续培养 4 h,去除旧培养液,每孔加入终止液 100 μL ,充分混匀后,在 37℃ 培养箱孵育 4 h,充分溶解结晶。孵育结束后,使用酶标仪测定各孔 570 nm 波长处的光密度,据此计算细胞活力。

2.6 免疫荧光法检测细胞中 SHP-1 和 LC3 相对表达水平^[5]

按“2.2”分组给药后,加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞爬片,漂洗 3 次。加入 0.1% 曲拉通 X-100 室

温通透 10 min,漂洗后用 5% 山羊血清室温封闭 1 h。加入兔抗 SHP-1 抗体(1:250 稀释)孵育过夜,次日,漂洗 3 次后,加入 Alexa Fluor488 山羊抗兔抗体(1:1 000)室温避光孵育 1 h,漂洗后使用含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶的抗荧光淬灭封片液封片,在荧光显微镜下观察并采集图像,用 ImageJ 软件分析荧光强度。检测 LC3 使用的一抗为兔抗 LC3 抗体(1:200),二抗为 Alexa Fluor647 山羊抗兔抗体(1:1 000),其余步骤相同。

2.7 TUNEL 法检测各组 Hep3B 细胞的凋亡情况^[6]

按“2.2”分组给药,各组细胞给药处理结束后,加入 4% 多聚甲醛 4℃ 固定细胞爬片 25 min,漂洗。按照 TUNEL 检测试剂盒说明进行操作:加入 0.2% 曲拉通 X-100 室温孵育 5 min,漂洗,每孔加入缓冲液 100 μL 室温孵育 30 min,提前配置 TUNEL 反应混合液,加入反应混合液 50 μL ,37℃ 避光孵育 1 h。漂洗 3 次,在含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶的染色缸室温避光染色 5 min。漂洗后,使用抗荧光淬灭封片液封片。在荧光显微镜下观察并采集图像,TUNEL 阳性细胞显示绿色荧光,4',6-二脒基-2-苯基吡啶标记细胞核显示蓝色荧光。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 SHP-1 在人肝癌细胞系中的相对表达水平

THLE-2、PLC5、HuH7、Hep3B 和 SK-Hep1 各组细胞中 SHP-1 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.45 ± 0.08 、 0.58 ± 0.09 、 0.29 ± 0.04 和 0.34 ± 0.06 ,SHP-1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 0.71 ± 0.09 、 0.83 ± 0.12 、 0.56 ± 0.07 和 0.79 ± 0.08 ,人肝癌细胞系 PLC5、HuH7、Hep3B 和 SK-Hep1 各组细胞中 SHP-1 mRNA 及蛋白相对表达水平与 THLE-2 组相比均显著降低(均 $P < 0.05$)。其中,人肝癌细胞 Hep3B 中 SHP-1 mRNA 和蛋白相对表达水平下降得最为显著,因此后续实验均用 Hep3B 细胞进行。

2 尼达尼布对人肝癌细胞活力的影响

0、1、5、10、15、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼达尼布处理后,人肝癌细胞 Hep3B 的细胞活力分别为 $(100.00 \pm 2.39)\%$ 、 $(92.17 \pm 16.85)\%$ 、 $(84.63 \pm 15.21)\%$ 、 $(59.02 \pm 10.74)\%$ 、 $(36.98 \pm 7.53)\%$ 和 $(29.34 \pm 5.67)\%$,除 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

外,其余各浓度尼达尼布处理组的 Hep3B 细胞活力与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比均显著降低(均 $P < 0.05$)。计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})值为 $11.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因此后续实验均选取 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物浓度。

3 尼达尼布对 SHP-1 在人肝癌细胞 Hep3B 中表达的影响

Hep3B 组、nintedanib 组、nintedanib + si - NC 组和 nintedanib + si - SHP - 1 组细胞中 SHP - 1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 3.06 ± 0.57 、 2.84 ± 0.52 和 1.58 ± 0.26 ,SHP - 1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 3.07 ± 0.54 、 3.48 ± 0.63 和 1.32 ± 0.19 ,nintedanib 组细胞中 SHP - 1 mRNA 相对表达水平与 Hep3B 组相比显著升高($P < 0.05$);nintedanib + si - NC 组细胞中 SHP - 1 mRNA 相对表达水平与 nintedanib 组相比,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$);nintedanib + si - SHP - 1 组细胞中 SHP - 1 mRNA 相对表达水平与 nintedanib + si - NC 组相比显著下降($P < 0.05$)。

4 尼达尼布通过 SHP-1 对人肝癌细胞 Hep3B 凋亡的影响

Hep3B 组、nintedanib 组、nintedanib + si - NC 组和 nintedanib + si - SHP - 1 组细胞的凋亡率分别为 $(19.34 \pm 3.16)\%$ 、 $(62.85 \pm 10.93)\%$ 、 $(67.49 \pm 11.78)\%$ 和 $(24.72 \pm 4.29)\%$,Bcl - 2 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.56 ± 0.07 、 0.63 ± 0.08 和 0.84 ± 0.10 ,IAP - 1 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.38 ± 0.06 、 0.44 ± 0.07 和 0.71 ± 0.12 ,Survivin 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.62 ± 0.09 、 0.56 ± 0.08 和 0.83 ± 0.11 ,nintedanib 组与 Hep3B 组相比、nintedanib + si - SHP - 1 组与 nintedanib + si - NC 组相比,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),nintedanib + si - NC 组与 nintedanib 组相比,上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 1。

5 尼达尼布通过 SHP-1 对人肝癌细胞 Hep3B 自噬的影响

在 Hep3B 组、nintedanib 组、nintedanib + si - NC 组和 nintedanib + si - SHP - 1 组细胞中,p - Beclin - 1/Beclin - 1 的水平分别为 1.00 ± 0.18 、 2.37 ± 0.41 、 2.25 ± 0.39 和 1.48 ± 0.26 ,自噬相关蛋白 LC3 的水平分别为 1.00 ± 0.21 、 3.74 ± 0.69 、 3.15 ± 0.60 和 1.52 ± 0.28 ,nintedanib 组与 Hep3B 组相比、nintedanib + si - SHP - 1 组与 nintedanib + si - NC 组相比,上述

指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),nintedanib + si - NC 组与 nintedanib 组相比,上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 2。

6 尼达尼布通过 SHP-1 对人肝癌细胞中 STAT3 信号通路的影响

Hep3B 组、nintedanib 组、nintedanib + si - NC 组和 nintedanib + si - SHP - 1 组细胞中 p - STAT3/STAT3 水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.43 ± 0.05 、 0.49 ± 0.08 和 0.88 ± 0.10 ,p - JAK2/JAK2 水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.54 ± 0.07 、 0.48 ± 0.07 和 0.79 ± 0.13 ,nintedanib 组与 Hep3B 组相比、nintedanib + si - SHP - 1 组与

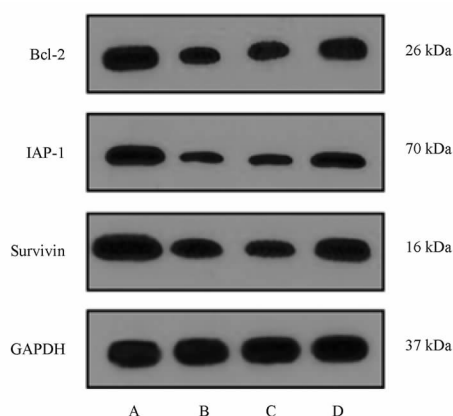


图 1 蛋白质印迹法检测各组 Hep3B 细胞中抗凋亡蛋白相对表达水平

Figure 1 The relative expression levels of anti - apoptotic protein in Hep3B cells of each group detected by Western blot

A; Hep3B group; B; Nintedanib group; C; Nintedanib + si - NC group; D; Nintedanib + si - SHP - 1 group; Bcl - 2; B - cell lymphoma - 2; IAP - 1; Inhibitor of apoptosis protein - 1.

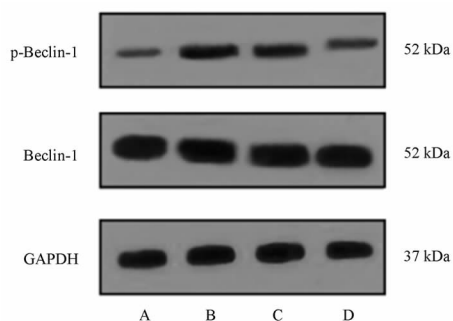


图 2 蛋白质印迹法检测各组 Hep3B 细胞中自噬相关蛋白 Beclin - 1 的相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of autophagy related protein Beclin - 1 in Hep3B cells of each group detected by Western blot

p - Beclin - 1; Phosphorylated Beclin - 1.

nintedanib + si - NC 组相比,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),nintedanib + si - NC 组与 nintedanib 组相比,上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 3。

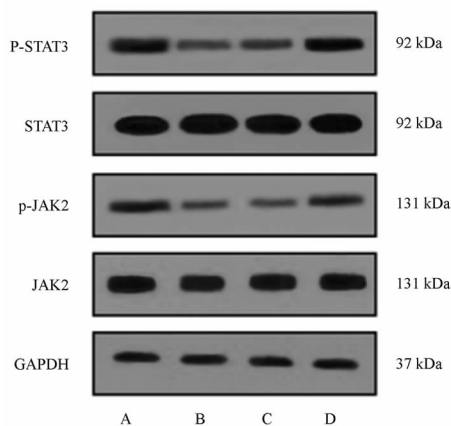


图 3 蛋白质印迹法检测各组 Hep3B 细胞中信号转导和转录激活因子 3(STAT3)信号通路相关蛋白的表达水平

Figure 3 The relative expression levels of signal transducer and activator of transcription3 (STAT3) signaling pathway related protein in Hep3B cells of each group detected by Western blot p - STAT3; Phosphorylated STAT3; JAK2; Janus kinase2; p - JAK2; Phosphorylated JAK2.

讨 论

肝癌发病率及死亡率均较高,早期患者可选用手术切除,但存在并发症风险,晚期患者已不适用于手术治疗,通常使用经动脉化疗栓塞术或口服索拉非尼,但受化疗毒性及耐药性制约,预后较差。因此,寻找新的治疗方式改善患者预后具有重要意义。尼达尼布具有抗纤维化特性,用于治疗特发性肺纤维化和进行性纤维化间质性肺疾病。近年来,尼达尼布在多种实体瘤中表现出显著的抗肿瘤活性。例如,YAMANAKA等^[7]研究发现,尼达尼布可抑制肝内胆管癌组织的癌症相关成纤维细胞的活化,消除癌症相关成纤维细胞诱导增强的肝内胆管癌细胞增殖与侵袭,降低癌症相关成纤维细胞分泌促癌细胞因子,发挥抗肝内胆管癌作用。FALCOMATÀ 等^[8]研究发现,尼达尼布与曲美替尼协同治疗间充质胰腺癌,可诱导细胞周期停滞和细胞死亡,重塑免疫微环境,促进 T 细胞肿瘤内浸润,增强化疗敏感性。在本研究中,尼达尼布可降低 Hep3B 细胞活力,诱导细胞凋亡,增强细胞自噬,展示出抗肝癌作用,与前人研究结论一

致^[7-8]。SHP - 1 可调控多种信号通路,在肝癌中发挥重要作用。管福琴等^[9]研究发现,海蓬子皂苷甲可通过激活 SHP - 1/SHP - 2,下调 STAT3/STAT5 诱导人肝癌细胞凋亡,此外,SHP - 1 还参与索拉非尼诱导的肝细胞癌铁死亡^[10]。本研究中 SHP - 1 在肝癌细胞系中下调,与前人研究结果一致^[9-10],尼达尼布处理可上调 SHP - 1 表达,这提示 SHP - 1 可能介导尼达尼布对肝癌细胞的抑制。

多项研究证实,诱导肝细胞凋亡有利于肝癌治疗^[11-12]。如陈琳等^[11]研究指出,健脾益气方是预防和治疗肝癌的基础方,具有改善炎症微环境,实现诱导人肝癌细胞 Huh - 7 细胞凋亡的作用;白术被用于治疗肝癌,疗效较好,在李红霞等^[12]研究发现,白术精油可诱导肝癌细胞 HepG2 和 MHCC97 - H 凋亡,抑制其增殖。本研究发现,尼达尼布处理可升高 Hep3B 凋亡率,降低 Bcl - 2、IAP - 1 和 Survivin 水平,说明其抗肝癌作用可能与诱导肝癌细胞凋亡有关。且下调 SHP - 1 会减弱尼达尼布对细胞凋亡的促进作用,这说明尼达尼布对 Hep3B 凋亡的调控可能与 SHP - 1 有关。自噬是细胞在外界压力条件下维持细胞稳态的重要方式,与恶性肿瘤进展有关。王财东等^[13]研究发现,复方苦参注射液可促进肝癌细胞自噬从而抑制荷瘤小鼠肿瘤生长。另有研究表明,抑制肝癌细胞自噬可提高肝癌细胞的放疗敏感性^[14]。本研究显示,尼达尼布可显著升高 p - Beclin - 1/Beclin - 1 和 LC3 水平,说明其抗肝癌作用可能与诱导肝癌细胞自噬有关,这与前述抗肝癌作用机制相似^[13-14]。同时,下调 SHP - 1 会减弱尼达尼布对细胞自噬的促进作用,这说明尼达尼布对 Hep3B 自噬的调控也可能与 SHP - 1 有关。STAT3 的异常激活与肿瘤的恶性生物学行为有关,靶向 STAT3 可减轻癌症进展。本研究发现,尼达尼布可能通过抑制 STAT3 通路发挥抗肝癌作用。在既往研究中也支持抑制 STAT3 通路可抑制肿瘤的恶性生物学行为^[15-16]。有文献报道,白藜芦醇可抑制 JAK2/STAT3 通路,抑制人脑胶质瘤细胞的增殖、侵袭、迁移与黏附能力^[15];健脾益气方可通过调控 STAT3 通路干预肝癌肿瘤微环境,抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭,促进细胞凋亡^[16]。且下调 SHP - 1 表达可减弱其抑制作用,这说明尼达尼布通过调控 SHP - 1 来抑制 STAT3 通路激活。

本研究提示:尼达尼布可降低人肝癌细胞 Hep3B 的细胞活力,诱导癌细胞凋亡,增强癌细胞自噬,展示出抗肝癌作用,这可能与尼达尼布上调 SHP - 1 表达来抑制 STAT3 通路有关。

参考文献:

- [1] 骆文龙,尹怡,李姗,等. 中医药通过调节糖代谢治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 世界中医药,2024,19(12):1840—1845.
- [2] XU Y, LIU Y, HE T, *et al.* Biguanides decorated albumin nanoparticles loading nintedanib for synergic enhanced hepatocellular carcinoma therapy [J/OL]. *Colloids Surf B Biointerfaces*,2021,207:e112020. 2021-08-04 [2024-12-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34403984/>.
- [3] LIM S, LEE K W, KIM J Y, *et al.* Consideration of SHP-1 as a molecular target for tumor therapy[J]. *Int J Mol Sci*,2023,25(1):331.
- [4] 黎敏航,马晓聪,唐燕,等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨荔枝核总黄酮对 HepG2 增殖、迁移与侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(22):85—92.
- [5] YAO J, WANG J, XU Y, *et al.* CDK9 inhibition blocks the initiation of PINK1-PRKN-mediated mitophagy by regulating the SIRT1-FOXO3-BNIP3 axis and enhances the therapeutic effects involving mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma [J]. *Autophagy*,2022,18(18):1879—1897.
- [6] 张洁. 番茄碱通过 AMPK/COX-2 通路调控食管癌细胞凋亡的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(16):2348—2352.
- [7] YAMANAKA T, HARIMOTO N, YOKOBORI T, *et al.* Nintedanib inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma aggressiveness via suppression of cytokines extracted from activated cancer-associated fibroblasts[J]. *Br J Cancer*,2020,122(7):986—994.
- [8] FALCOMATÀ C, BÄRTHEL S, WIDHOLZ S A, *et al.* Selective multi-kinase inhibition sensitizes mesenchymal pancreatic cancer to immune checkpoint blockade by remodeling the tumor microenvironment[J]. *Nat Cancer*,2022,3(3):318—336.
- [9] 管福琴,单宇,陈雨,等. 海蓬子皂苷甲调控 SHP/STAT 信号通路抗肝癌的研究[J]. 中国药理学通报,2021,37(2):192—195.
- [10] HUANG C Y, CHEN L J, CHEN G, *et al.* SHP-1/STAT3-signaling-axis-regulated coupling between BECN1 and SLC7A11 contributes to sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(19):11092.
- [11] 陈琳,蒋锐沅,欧少甫,等. 健脾益气方对炎症微环境下人肝癌 Huh-7 细胞的增殖、侵袭及凋亡作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2023,25(11):3704—3714.
- [12] 李红霞,叶泽婷,聂裕桐,等. 白术精油对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中成药,2024,46(7):2365—2370.
- [13] 王财东,苟涛,陈玉,等. 复方苦参注射液通过调节小鼠肝癌 H22 细胞自噬抑制肿瘤生长的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2024,51(7):173—177,222.
- [14] 何媛,钱俊超. GS 抑制剂调节自噬影响肝癌细胞放疗敏感性[J]. 生物学杂志,2023,40(5):6—10.
- [15] 王勇,吴运桥,邓任强,等. 白藜芦醇通过 JAK2/STAT3 信号通路对脑胶质瘤细胞增殖、黏附、迁移、侵袭及上皮间质转化的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2024,37(11):1327—1333.
- [16] 洪静,王超,孙姗姗,等. 基于 UHPLC-MS/MS、分子对接及细胞实验探讨健脾益气方对肝癌 PD-L1 和 PD-1 表达的影响[J]. 中成药,2024,46(6):2011—2017.

(收稿日期 2025-05-12)

· 科学文摘 ·

脆弱拟杆菌衍生的琥珀酸通过抑制肝脏 AMPD2 促进尿酸的降解:深入了解植物基小檗碱如何改善高尿酸血症

引自:LIBIN PAN, *et al.* *Bacteroides fragilis*-derived succinic acid promotes the degradation of uric acid by inhibiting hepatic AMPD2: Insight into how plant-based berberine ameliorates hyperuricemia [J]. *Acta Pharm Sin B*,2025,15(10):5244—5260.

中国医学科学院药物研究所王琰与蒋建东团队阐述了小檗碱通过促进肠道拟杆菌产生琥珀酸靶向抑制肝脏单磷酸腺苷脱氨酶 2 改善高尿酸血症的机理。研究首先证明了小檗碱可以有效治疗急性和慢性高尿酸血症,并发现小檗碱调节了拟杆菌属肠道菌丰度的增加和梭菌属肠道菌丰度的减少。研究者通过结合微生物基因组学和代谢组学的分析结果,发现了拟杆菌的代谢产物——琥珀酸显著降低了血尿酸水平,其机制主要为琥珀酸通过抑制肝脏单磷酸腺苷脱氨酶 2 下调了尿酸合成的上游通路,从而显著减少下游次黄嘌呤、黄嘌呤和尿酸的生成。通过研究还发现了小檗碱对肾脏有保护作用并改善了尿酸性肾病。本研究发现了小檗碱具有调节核酸代谢的能力,提示其可能具有治疗高尿酸血症的药效。