

柚皮素抑制 JAK2/STAT3 通路对食管癌细胞
增殖和凋亡的研究Research of naringenin on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer cells
by suppressing the JAK2/STAT3 pathway牛朝霞^{1a}, 杨丽娜^{1b}, 张瑾钰^{1a},
陈 洁^{1a}(1. 河南医学高等专科学校, a. 基础医学部;
b. 医学技术系, 河南 郑州 451191)NIU Zhao - xia^{1a}, YANG Li - na^{1b},
ZHANG Jin - yu^{1a}, CHEN Jie^{1a}(1. a. Department of Basic Medicine;
b. Department of Medical Technology,
Henan Medical College, Zhengzhou
451191, Henan Province, China)基金项目: 河南省科技厅科技攻关基金资助项目
(262102310137)作者简介: 牛朝霞(1979 -), 女, 副教授, 主要从事
病理生理学方面的教学与科研工作通信作者: 陈洁, 教授, 博士生导师
MP: 13633801260
E - mail: qhoq87@163.com

摘要:目的 探究柚皮素抑制非受体型酪氨酸激酶 2/信号转导与转录激活因子 3 (JAK2/STAT3) 通路对食管癌细胞增殖和凋亡作用及其机制。方法 用细胞计数试剂盒 - 8 (CCK - 8) 筛选不同剂量柚皮素对 KYSE150 细胞活力的影响以选择柚皮素浓度。将 KYSE150 细胞依次分为对照组 (常规培养)、低剂量实验组 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素)、高剂量实验组 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素)、JAK2/STAT3 通路抑制剂组 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490)、JAK2/STAT3 通路激活剂组 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 香豆霉素 A1)。用 5 - 溴 - 2' - 脱氧尿苷 (BrdU) 染色法检测细胞 BrdU 阳性细胞率, 用克隆形成实验法检测细胞克隆形成数量, 用逆转录实时荧光定量聚合酶链反应 (RT - qPCR) 法检测增殖和凋亡相关基因表达, 用流式细胞仪法检测细胞凋亡率, 用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 2' - 脱氧尿苷 - 5' - 三磷酸缺口末端标记 (TUNEL) 染色法检测细胞 TUNEL 阳性率, 用蛋白质印迹法检测 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达, 用免疫组化法检测柚皮素对 KYSE150 细胞裸鼠异种移植瘤 Ki - 67 核抗原 (Ki67) 和肿瘤组织生长的影响。

结果 柚皮素对 KYSE150 细胞活力半数抑制浓度接近 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对照组、低剂量实验组、高剂量实验组、JAK2/STAT3 通路抑制剂组和 JAK2/STAT3 通路激活剂组 KYSE150 细胞 BrdU 阳性率分别为 (58.64 $\pm$ 5.23)%、(46.23 $\pm$ 4.05)%、(21.05 $\pm$ 3.04)%、(23.62 $\pm$ 3.15)% 和 (35.98 $\pm$ 3.21)%; 克隆形成数分别为 (102.36 $\pm$ 10.25)、(78.64 $\pm$ 7.21)、(50.05 $\pm$ 4.32)、(52.39 $\pm$ 5.03) 和 (61.55 $\pm$ 5.12) 个; 细胞周期蛋白 B1 (CyclinB1) 信使核糖核酸 (mRNA) 相对表达水平分别为 1.02 $\pm$ 0.11、0.74 $\pm$ 0.05、0.45 $\pm$ 0.04、0.48 $\pm$ 0.05 和 0.62 $\pm$ 0.06; 细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) mRNA 相对表达水平分别为 1.03 $\pm$ 0.07、0.62 $\pm$ 0.05、0.27 $\pm$ 0.03、0.30 $\pm$ 0.04 和 0.51 $\pm$ 0.04; 凋亡率分别为 (4.15 $\pm$ 0.42)%、(15.62 $\pm$ 1.02)%、(29.65 $\pm$ 2.03)%、(27.84 $\pm$ 1.98)% 和 (19.66 $\pm$ 1.20)%; TUNEL 阳性率分别为 (8.65 $\pm$ 0.82)%、(20.64 $\pm$ 2.03)%、(37.68 $\pm$ 3.05)%、(35.62 $\pm$ 2.16)% 和 (28.14 $\pm$ 2.01)%; B 细胞淋巴瘤 - 特大型蛋白 (Bcl - xl) mRNA 相对表达水平分别为 1.02 $\pm$ 0.07、0.72 $\pm$ 0.06、0.41 $\pm$ 0.04、0.44 $\pm$ 0.05 和 0.59 $\pm$ 0.05; B 细胞淋巴瘤 - 2 蛋白 (Bcl - 2) mRNA 相对表达水平分别为 1.01 $\pm$ 0.05、0.59 $\pm$ 0.04、0.36 $\pm$ 0.03、0.39 $\pm$ 0.04 和 0.50 $\pm$ 0.03。低剂量实验组、高剂量实验组以及 JAK2/STAT3 通路抑制剂组与对照组相比, 高剂量实验组以及 JAK2/STAT3 通路抑制剂组与低剂量实验组相比, JAK2/STAT3 通路激活剂组与高剂量实验组相比, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。在裸鼠实验中, 动物对照组、动物低剂量实验组和动物高剂量实验组肿瘤体积分别为 (1 287.65 $\pm$ 98.54)、(821.22 $\pm$ 71.65) 和 (425.39 $\pm$ 37.69) mm^3 ; 肿瘤质量分别为 (1.85 $\pm$ 0.12)、(1.20 $\pm$ 0.09) 和 (0.73 $\pm$ 0.05) g; 肿瘤组织中 Ki67 阳性率分别为 (69.52 $\pm$ 5.36)%、(44.35 $\pm$ 3.12)% 和 (20.06 $\pm$ 2.85)%。动物低、高剂量实验组的上述指标与动物对照组相比, 动物高剂量实验组的上述指标与动物低剂量实验组相比, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论 柚皮素通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 显著抑制食管癌 KYSE150 细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词:柚皮素;食管癌;非受体型酪氨酸激酶 2/信号转导与转录激活因子 3 通路;细胞增殖;凋亡

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.09.013

中图分类号:R965.1 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2026)09-1277-07

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of naringenin inhibiting the non-receptor tyrosine kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer cells. **Methods** The effects of different doses of naringenin on KYSE150 cell viability was screened using cell counting kit-8 (CCK-8), and naringenin concentration was selected. KYSE150 cells were sequentially divided into control group (conventional culture), low-dose experimental group ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin), high-dose experimental group ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin), JAK2/STAT3 pathway inhibitor group ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490) and JAK2/STAT3 pathway activator group ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin and $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ coumermycin A1). The 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) positive cell rate was detected using the BrdU staining method, the number of cell clones formed was detected using the clone formation assay, the expression of proliferation and apoptosis related genes was detected using reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), the apoptosis rate was detected using flow cytometry, the terminal deoxynucleotide transferase mediated 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate notch end labeling (TUNEL) positive rate was detected using the TUNEL staining method, the expression of JAK2/STAT3 pathway related proteins was detected using Western blot, and the effect of naringenin on the growth of KYSE150 xenograft tumors Ki-67 nuclear antigen (Ki67) and tumor tissues growth in nude mice was detected using immunohistochemistry. **Results** The half maximal inhibitory concentration of naringenin on KYSE150 cell viability is close to $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The BrdU positivity rates of KYSE150 cells in control group, low-dose experimental group, high-dose experimental group, JAK2/STAT3 pathway inhibitor group and JAK2/STAT3 pathway activator group were $(58.64 \pm 5.23)\%$, $(46.23 \pm 4.05)\%$, $(21.05 \pm 3.04)\%$, $(23.62 \pm 3.15)\%$ and $(35.98 \pm 3.21)\%$, respectively; the clone formation numbers were (102.36 ± 10.25) , (78.64 ± 7.21) , (50.05 ± 4.32) , (52.39 ± 5.03) and (61.55 ± 5.12) cells, respectively; the relative expression levels of *CyclinB1* messenger ribonucleic acid (mRNA) were 1.02 ± 0.11 , 0.74 ± 0.05 , 0.45 ± 0.04 , 0.48 ± 0.05 and 0.62 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of cyclin dependent kinase 1 (*CDK1*) mRNA were 1.03 ± 0.07 , 0.62 ± 0.05 , 0.27 ± 0.03 , 0.30 ± 0.04 and 0.51 ± 0.04 , respectively; the apoptosis rates were $(4.15 \pm 0.42)\%$, $(15.62 \pm 1.02)\%$, $(29.65 \pm 2.03)\%$, $(27.84 \pm 1.98)\%$ and $(19.66 \pm 1.20)\%$, respectively; the positive rates of TUNEL were $(8.65 \pm 0.82)\%$, $(20.64 \pm 2.03)\%$, $(37.68 \pm 3.05)\%$, $(35.62 \pm 2.16)\%$ and $(28.14 \pm 2.01)\%$, respectively; the relative expression levels of *Bcl-xl* mRNA were 1.02 ± 0.07 , 0.72 ± 0.06 , 0.41 ± 0.04 , 0.44 ± 0.05 and 0.59 ± 0.05 , respectively; the relative expression levels of *Bcl-2* mRNA were 1.01 ± 0.05 , 0.59 ± 0.04 , 0.36 ± 0.03 , 0.39 ± 0.04 and 0.50 ± 0.03 , respectively. Compared control group with low-dose experimental group, high-dose experimental group and JAK2/STAT3 pathway inhibitor group, compared low-dose experimental group with high-dose experimental group and JAK2/STAT3 pathway inhibitor group, compared high-dose experimental group with JAK2/STAT3 pathway activator group, the above indicators all showed statistically significant differences (all $P < 0.05$). In nude mouse experiments, the tumor volumes of animal control group, animal low-dose experimental group and animal high-dose experimental group were $(1\ 287.65 \pm 98.54)$, (821.22 ± 71.65) and $(425.39 \pm 37.69) \text{ mm}^3$, respectively; the tumor masses were (1.85 ± 0.12) , (1.20 ± 0.09) and $(0.73 \pm 0.05) \text{ g}$, respectively; the Ki67 positivity rates in tumor tissues were $(69.52 \pm 5.36)\%$, $(44.35 \pm 3.12)\%$ and $(20.06 \pm 2.85)\%$, respectively. The above indicators of the animal low and high-dose experimental groups were statistically significantly different from those of animal control group, and the above indicators of the animal high-dose experimental group were statistically significantly different from those of animal low-dose experimental group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Naringenin clearly inhibits the proliferation and promotes apoptosis of esophageal cancer KYSE150 cells by suppressing the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: naringenin; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway; esophageal cancer; cell proliferation; apoptosis

食管癌是原发食管粘膜上皮恶性肿瘤,据2022年统计,食管癌占有所有新发癌症病例的2.6%和癌症死亡人数的4.6%,并且男性发病率和死亡率显著高于女性^[1-2]。目前,食管癌总体预后仍不理想,探寻高效、低毒的新型策略迫在眉睫。已知,柚皮素为一种天然黄烷酮衍生物,可以通过诱导癌细胞凋亡、抑制增殖、调控线粒体功能等途径发挥抗癌作用^[3]。但柚皮素在食管癌治疗中的具体作用仍需进一步研究。据报道,非受体酪氨酸激酶2/信号转导与转录激活因子3(Janus kinase 2 / signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号通路在细胞增殖、分化及免疫调节等过程中发挥作用^[4]。在食管癌中, JAK2/STAT3 信号通路的激活促进癌细胞增殖、抑制细胞凋亡^[5]。基于此,本研究旨在探究柚皮素通过调控 JAK2/STAT3 通路对食管癌细胞行为的影响,为食管癌的临床治疗提供新的突破。

材料与方法

1 材料

细胞 人食管癌 KYSE150 细胞株及人正常食管上皮 HET-1A 细胞株,均购自美国典型培养物保藏中心。

动物 裸鼠(BALB/c-nu),鼠龄9~10周,体重18~22 g,河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供。动物许可证号:SCXK(豫)2020-0005。本实验经河南斯克贝斯生物科技股份有限公司动物伦理委员会批准(伦理批号:2024-538)。

试剂 柚皮素,规格:每瓶5 mg,纯度:99.28%,批号:HY-N0100、香豆霉素 A1(JAK2/STAT3 通路激活剂),规格:每瓶5 mg,纯度:99.86%,批号:HY-N7452、AG490(JAK2/STAT3 通路抑制剂),规格:每瓶5 mg,纯度:99.86%,批号:HY-12000,均由美国 MCE 公司生产;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)、流式细胞凋亡检测、末端脱氧核苷酸转移酶介导的2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling, TUNEL)染色以及 Ki-67 核抗原(Ki-67 nuclear antigen, Ki67)免疫组化试剂盒,均由上海雅吉科技公司生产;5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, Brdu)染色液,北京索莱宝试剂公司生产;Brdu、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、 β -actin 抗体及 Alexa Fluor 488 和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)

标记的二抗,均由上海艾博科技公司生产。

仪器 Feyond-MF200 酶标仪,浙江杭州奥盛仪器公司产品;VersaXRM 615 显微镜,德国蔡司光学公司产品;ABI Q3 PCR 仪,美国 ABI 公司产品;CytoFLEX 流式细胞仪,美国贝克曼库尔特产品;E-Gel Imager 凝胶成像系统,美国 Invitrogen 科技公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[3]

KYSE150 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素混合溶液的 RPMI-1640 完全培养基;HET-1A 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素混合溶液的 HET-1A 专用完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中常规培养 24 h。

2.2 CCK-8 法检查不同剂量柚皮素对 KYSE150 细胞活力的影响^[6]

将处于对数增殖期的 KYSE150 和 HET-1A 分别以每孔 1×10^4 个接种到 96 孔板上,培养至细胞贴壁后,分别进行处理,实验组添加不同浓度柚皮素(5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基,对照组加入等体积不含柚皮素的培养基。空白组为仅加入等体积但不含细胞的培养基。所有组均培养 48 h。培养结束后,每孔添加 CCK-8 溶液孵育 2 h。用酶标仪检测各孔细胞在 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD),计算细胞活力。

2.3 细胞分组及处理方法^[7-8]

将 KYSE150 以每孔 1×10^5 个接种到 6 孔板上,培养 24 h 后进行分组。对照组常规培养;低剂量实验组加入 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素;高剂量实验组加入 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素;JAK2/STAT3 通路抑制剂组加入 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490;JAK2/STAT3 通路激活剂组加入 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 香豆霉素 A1。各组均处理 48 h 后进行后续实验。

2.4 Brdu 染色法检测各组 KYSE150 细胞 Brdu 阳性细胞率^[9]

将处理后的各组 KYSE150 细胞以每孔 1×10^4 个接种到 24 孔板上,培养 24 h 后添加 Brdu 染色液,4 h 后经过试剂盒中固定液和通透液体固定通透后,添加 Brdu 抗体冰上孵育 45 min,添加 Alexa Fluor 488 标记的免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)二抗孵育 20 min。添加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色后,在荧光显微镜下观察并对 Brdu 阳性细胞率进行计数。

2.5 克隆形成实验法检测各组 KYSE150 细胞克隆形成数量^[10]

将处理后的各组 KYSE150 细胞以每孔 500 个接

种到6孔板上,常规培养14 d后,用多聚甲醛固定,用结晶紫染色后,在显微镜下对克隆数超过50个细胞的数量进行统计。

2.6 RT-qPCR法检测各组 KYSE150 细胞中增殖和凋亡相关基因表达^[11]

收集处理的各组 KYSE150 细胞,提取总 RNA,反转录 cDNA 后。按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,获取 Ct 值。以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算细胞周期蛋白 B1 (G2/mitotic-specific cyclin-B1, *CyclinB1*) mRNA、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, *CDK1*) mRNA、B 细胞淋巴瘤-特大型蛋白 (B-cell lymphoma-extra large, *Bcl-xl*) mRNA、B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma 2, *Bcl-2*) mRNA 相对表达水平。引物序列如下: *CyclinB1* 上游 5'-CAGTCAGACCAAAATAC-CTACTGGGT-3',下游 5'-ACACCAACCAGCTGCAG-CATCTTCTT-3'; *CDK1* 上游 5'-CTGATTTTGGCCTT-GCCAGAG-3',下游 5'-AGCTGACCCAG-CAATACTT-3'; *Bcl-xl* 上游 5'-ACTTACCTGAAT-GACCACCTAGAGCC-3',下游 5'-GAAGAGTGAGC-CCAGCAGAACC-3'; *Bcl-2* 上游 5'-TTGTGGCCT-TCTTTGAGTTCGGTG-3',下游 5'-GGTGCCGGT-TCAGGT ACTCAGTCA-3'; β -actin 上游 5'-TCCT-GTGGCATCCACGAAACT-3',下游 5'-GAAGCATTT-GCGGTGGACGAT-3'。

2.7 流式细胞仪法检测各组 KYSE150 细胞凋亡率^[6]

收集处理后的各组 KYSE150 细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 个,加入异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白和碘化丙啶染色液避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测 KYSE150 细胞凋亡率。

2.8 TUNEL 染色法评估各组 KYSE150 细胞 TUNEL 阳性率^[6]

收集处理后的各组 KYSE150 细胞,经过固定、通透后添加 TUNEL 染色液进行染色后,用 DAPI 复染,用荧光显微镜观察并计数,计算 TUNEL 阳性细胞率。

2.9 蛋白质印迹法评估各组 KYSE150 细胞中 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达^[11]

裂解后收集各组蛋白,将蛋白经过变性、电泳转移、封闭后添加一抗 (p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、 β -actin) 处理 14 h,补充二抗培养 2 h。显影后用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 KYSE150 细胞裸鼠异种移植^[10]

收集处理后的各组 KYSE150 细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 个,将细胞悬浮液 0.2 mL 接种于

裸鼠右侧背部皮下组织,待肿瘤体积长至约 100 mm^3 时,将裸鼠随机分为 3 组,每组 8 只:动物对照组 (腹腔注射等量生理盐水)、动物低剂量实验组 (腹腔注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 柚皮素)、动物高剂量实验组 (腹腔注射 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 柚皮素),每周注射 2 次,连续注射 4 周。处理完成后分离肿瘤组织,测量肿瘤组织体积并称质量。选取部分组织经多聚甲醛固定后,石蜡包埋,切片,用免疫组化法检测 Ki67 表达,计算 Ki67 阳性率。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较使用 LSD 检验。

结 果

1 不同剂量柚皮素对 KYSE150 细胞活力的影响

与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素比较,柚皮素 $\geq 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着剂量增加,细胞活力均显著降低 (均 $P < 0.05$),其半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 $40.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,柚皮素浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, KYSE150 细胞活力接近 IC₅₀;在 HET-1A 细胞活力检测中,与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素比较, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柚皮素显著抑制 HET-1A 细胞活力 ($P < 0.05$),提示柚皮素对正常细胞有毒性作用。后续选择 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柚皮素作为后续实验浓度,见表 1。

2 柚皮素对 KYSE150 细胞增殖的影响

与对照组比较,低剂量实验组、高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的 KYSE150 细胞 Brdu 阳性率、克隆形成数、*CyclinB1* 及 *CDK1* mRNA 相对表达水平均显著下降 (均 $P < 0.05$);与低剂量实验组比较,高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的

表 1 不同剂量柚皮素对 KYSE150 细胞和 HET-1A 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of different doses of naringenin on the viability of KYSE150 and HET-1A cells ($\bar{x} \pm s$)

Naringenin dose ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>n</i>	KYSE150 cell viability (%)	HET-1A cell viability (%)
0	8	94.56 ± 3.54	95.63 ± 5.12
5	8	89.62 ± 7.12	94.36 ± 5.02
10	8	$80.06 \pm 6.58^*$	93.24 ± 3.05
20	8	$69.62 \pm 6.54^*$	91.12 ± 3.28
40	8	$52.34 \pm 5.05^*$	88.63 ± 6.20
80	8	$31.25 \pm 3.06^*$	$82.16 \pm 7.02^*$

Compared with the $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, * $P < 0.05$.

KYSE150 细胞 Brdu 阳性率、克隆形成数、*CyclinB1* 及 *CDK1* mRNA 相对表达水平均显著下降 (均 $P < 0.05$); 与高剂量实验组比较, JAK2/STAT3 通路激活剂组的 KYSE150 细胞 Brdu 阳性率、克隆形成数、*CyclinB1* 及 *CDK1* mRNA 相对表达水平均显著上调 (均 $P < 0.05$), JAK2/STAT3 通路抑制剂组的上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 2。

3 柚皮素对 KYSE150 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 低剂量实验组、高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的 KYSE150 细胞凋亡率

和 TUNEL 阳性率均显著升高, *Bcl - xl* 和 *Bcl - 2* mRNA 相对表达水平均显著下降 (均 $P < 0.05$); 与低剂量实验组比较, 高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的 KYSE150 细胞凋亡率和 TUNEL 阳性率均显著升高, *Bcl - xl* 和 *Bcl - 2* mRNA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与高剂量实验组比较, JAK2/STAT3 通路激活剂组的 KYSE150 细胞凋亡率和 TUNEL 阳性率均显著下降, *Bcl - xl* 和 *Bcl - 2* mRNA 相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.05$), JAK2/STAT3 通路抑制剂组的上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 3 和图 1。

表 2 KYSE150 细胞 5 - 溴 - 2' - 脱氧尿苷 (Brdu) 阳性细胞率、克隆形成数、细胞周期蛋白 B1 (*CyclinB1*) 及细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (*CDK1*) mRNA 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of 5 - bromo - 2' - deoxyuridine (Brdu) - positive cell rate, clone formation number and the relative expression levels of G2/mitotic - specific cyclin - B1 (*CyclinB1*) and cyclin - dependent kinase 1 (*CDK1*) mRNA in KYSE150 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Brdu - positive cell rate (%)	Clone formation number	<i>CyclinB1</i> mRNA	<i>CDK1</i> mRNA
Control	8	58.64 ± 5.23	102.36 ± 10.25	1.02 ± 0.11	1.03 ± 0.07
Experimental - L	8	46.23 ± 4.05 *	78.64 ± 7.21 *	0.74 ± 0.05 *	0.62 ± 0.05 *
Experimental - H	8	21.05 ± 3.04 *#	50.05 ± 4.32 *#	0.45 ± 0.04 *#	0.27 ± 0.03 *#
JAK2/STAT3 pathway inhibitor	8	23.62 ± 3.15 *#	52.39 ± 5.03 *#	0.48 ± 0.05 *#	0.30 ± 0.04 *#
JAK2/STAT3 pathway activator	8	35.98 ± 3.21 Δ	61.55 ± 5.12 Δ	0.62 ± 0.06 Δ	0.51 ± 0.04 Δ

Control group: Routine culture; Experimental - L: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin; Experimental - H: 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin; JAK2/STAT3 pathway inhibitor: 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG490; JAK2/STAT3 pathway activator: 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ naringenin and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ coumermycin A1; Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - H group, $\Delta P < 0.05$.

表 3 KYSE150 细胞凋亡率、末端脱氧核苷酸转移酶介导的 2' - 脱氧尿苷 - 5' - 三磷酸缺口末端标记 (TUNEL) 阳性率、B 细胞淋巴瘤 - 特大型蛋白 (*Bcl - xl*) 及 B 细胞淋巴瘤 - 2 蛋白 (*Bcl - 2*) mRNA 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of apoptosis rate, terminal deoxynucleotidyl transferase 2' - deoxyuridine 5' - triphosphate nick - end labeling (TUNEL) - positive rate and the relative expression levels of B - cell lymphoma - extra large (*Bcl - xl*), B - cell lymphoma 2 (*Bcl - 2*) mRNA in KYSE150 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Apoptosis rate (%)	TUNEL - positive rate (%)	<i>Bcl - xl</i> mRNA	<i>Bcl - 2</i> mRNA
Control	8	4.15 ± 0.42	8.65 ± 0.82	1.02 ± 0.07	1.01 ± 0.05
Experimental - L	8	15.62 ± 1.02 *	20.64 ± 2.03 *	0.72 ± 0.06 *	0.59 ± 0.04 *
Experimental - H	8	29.65 ± 2.03 *#	37.68 ± 3.05 *#	0.41 ± 0.04 *#	0.36 ± 0.03 *#
JAK2/STAT3 pathway inhibitor	8	27.84 ± 1.98 *#	35.62 ± 2.16 *#	0.44 ± 0.05 *#	0.39 ± 0.04 *#
JAK2/STAT3 pathway activator	8	19.66 ± 1.20 Δ	28.14 ± 2.01 Δ	0.59 ± 0.05 Δ	0.50 ± 0.03 Δ

Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - H group, $\Delta P < 0.05$.

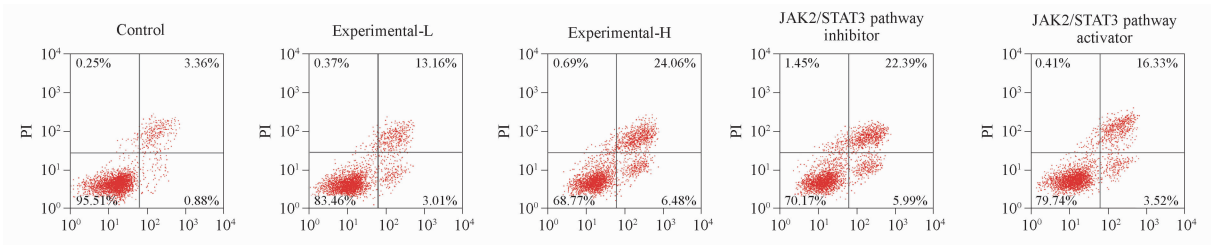


图 1 流式细胞仪检测各组 KYSE150 细胞凋亡率

Figure 1 Detection of KYSE150 cell apoptosis rate in each group by flow cytometry

4 柚皮素对 KYSE150 细胞中 JAK2/STAT3 通路相关指标的影响

与对照组比较,低剂量实验组、高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$);与低剂量实验组比较,高剂量实验组和 JAK2/STAT3 通路抑制剂组的 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组比较,JAK2/STAT3 通路激活剂组的 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$),JAK2/STAT3 通路抑制剂组的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 和表 4。

5 柚皮素对 KYSE150 异种移植肿瘤生长的影响

与动物对照组比较,动物低剂量实验组和动物高剂量实验组的 KYSE150 异种移植肿瘤组织质量、体积以及 Ki67 阳性率均显著下降(均 $P < 0.05$);与动物低剂量实验组比较,动物高剂量实验组的

KYSE150 异种移植肿瘤组织质量、体积以及 Ki67 阳性率均显著下降(均 $P < 0.05$),见表 5。

表 5 KYSE150 异种移植肿瘤生长指标的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of growth indicators of KYSE150 xenograft tumors($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Tumor volume (mm ³)	Tumor mass(g)	Ki67 positive rate(%)
Animal Control	8	1 287.65 ± 98.54	1.85 ± 0.12	69.52 ± 5.36
Animal experimental - L	8	821.22 ± 71.65 *	1.20 ± 0.09 *	44.35 ± 3.12 *
Animal experimental - H	8	425.39 ± 37.69 [#]	0.73 ± 0.05 [#]	20.06 ± 2.85 [#]

Compared with animal control group, * $P < 0.05$; Compared with animal experimental - L group, [#] $P < 0.05$.

讨 论

食管癌是全球范围内常见的恶性肿瘤,严重威胁人类健康^[1-2]。当前食管癌的治疗方式仅适用于早期患者,且术后易复发;放疗和化疗在缓解病痛的同时亦存在耐药性^[12]。因此,寻找新的治疗靶点和药物对于改善食管癌患者的预后尤为重要。本研究选择 KYSE150 细胞,因其具有典型的食管癌细胞特性,能够很好的模拟食管癌的发生发展过程,有助于深入研究药物的作用机制。

柚皮素是一种天然黄酮类化合物,在抗肿瘤方面表现出显著效果。研究发现,在肝癌、结直肠癌以及非小细胞肺癌中,柚皮素可以通过调节细胞增殖和凋亡相关蛋白表达发挥抗癌作用^[3,13-14]。在本研究中,CCK-8 筛选出柚皮素对 KYSE150 细胞有影响的最低浓度($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)以及接近半数抑制浓度($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作为后续研究的低、高浓度。进一步行为学研究发现,低、高剂量的柚皮素处理可下调 Brdu 阳性率和克隆形成数,提示柚皮素可以抑制 KYSE150 细胞增殖能力。从分子水平上看,Cyclinb1 和 CDK1 mRNA 是细胞增殖的重要指标,2 者结合共同推动细胞从分裂间期到分裂期^[15]。CyclinB1 和 CDK1 mRNA 相对表达水平下调提示细胞增殖受到抑制。同时,Bcl-xl 和 Bcl-2 mRNA 作为抗凋亡基因,主要通过调控线粒体通透性来发挥抗凋亡作用,2 者表达直接影响细胞对凋亡信号的抵抗能力,在凋亡调控网络中占据核心地位^[16],其表达降低以及细胞凋亡率和 TUNEL 阳性率升高,表明柚皮素可以有效促进 KYSE150 细胞凋亡。这与以往研究中柚皮素在其他癌症中的作用相似,进一步证实了柚皮素的抗肿瘤活性^[3,14]。

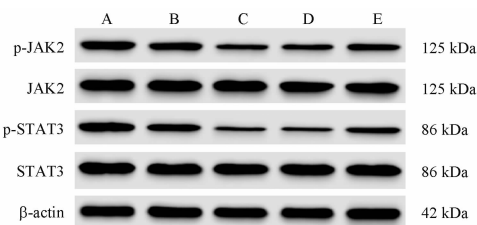


图 2 蛋白质印迹法检测各组 KYSE150 细胞中磷酸化非受体型酪氨酸激酶 2(p-JAK2)、JAK2、磷酸化信号转导与转录激活因子 3(p-STAT3)和 STAT3 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of phosphorylated Janus kinase 2 (p-JAK2), JAK2, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) and STAT3 in KYSE150 cells of each group detected by Western blot

A:Control group; B: Experimental - L group; C: Experimental - H group; D: JAK2/STAT3 pathway inhibitor group; E: JAK2/STAT3 pathway activator group.

表 4 KYSE150 细胞中 JAK2/STAT3 通路相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparis of the relative expression levels of JAK2/STAT3 pathway - related protein in KYSE150 cells($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
Control	8	0.87 ± 0.06	0.85 ± 0.05
Experimental - L	8	0.60 ± 0.05 *	0.52 ± 0.05 *
Experimental - H	8	0.36 ± 0.04 [#]	0.20 ± 0.03 [#]
JAK2/STAT3 pathway inhibitor	8	0.39 ± 0.03 [#]	0.22 ± 0.02 [#]
JAK2/STAT3 pathway activator	8	0.52 ± 0.05 [△]	0.41 ± 0.03 [△]

Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental - H group, [△] $P < 0.05$.

据报道,JAK2/STAT3 通路是一种重要的细胞内信号级联通路,对免疫反应、细胞行为等诸多生理功能至关重要。当细胞受到外界刺激后,JAK2 被激活进而磷酸化 STAT3,调控关键基因的转录,促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[17-18]。YANG 等^[19]研究表明,JAK2/STAT3 信号通路在食管癌中通过调控 PLK1 表达驱动肿瘤细胞存活与增殖,而 DEH 通过抑制该通路诱导细胞凋亡和周期阻滞发挥抗癌作用。HAN 等^[20]研究显示,JAK2/STAT3 信号通路在食管癌中通过促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡和介导化疗耐药驱动疾病进展,而帕克替尼靶向抑制该通路增强卡铂疗效。本研究中发现,低、高剂量柚皮素处理以及 AG490 后 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 比值均下调,表明柚皮素发挥抗癌的作用依赖 JAK2/STAT3 通路的抑制。为了进一步探究柚皮素的作用机制,在高剂量柚皮素处理的同时添加 JAK2/STAT3 通路激活剂香豆霉素 A1 进行干预,结果显示,香豆霉素 A1 可以部分逆转柚皮素对 KYSE150 细胞增殖、凋亡以及 JAK2/STAT3 通路的影响。这充分证明了柚皮素是通过抑制 JAK2/STAT3 通路,来实现对食管癌 KYSE150 细胞增殖的抑制和凋亡的促进。

本研究提示,柚皮素通过抑制 JAK2/STAT3 通路显著抑制食管癌 KYSE150 细胞增殖并促进其凋亡。

参考文献:

- [1] FILHO A M, LAVERSANNE M, FERLAY J, *et al.* The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide[J]. *Int J Cancer*, 2025, 156(7):1336—1346.
- [2] ZHU H, MA X, YE T, *et al.* Esophageal cancer in China: Practice and research in the new era[J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(9):1741—1751.
- [3] WANG D, ZHOU Y, HUA L, *et al.* The role of the natural compound naringenin in AMPK - mitochondria modulation and colorectal cancer inhibition[J]. *Phytomedicine*, 2024, 131(20):155786—155797.
- [4] JIANG H, PANG J, LI T, *et al.* PD - 1 regulates the anti - tumor immune function of macrophages through JAK2 - STAT3 signaling pathway in colorectal cancer tumor microenvironment[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1):502—518.
- [5] LIU J, QIU L, CHEN J, *et al.* Lycorine hydrochloride suppresses the proliferation and invasion of esophageal cancer by targeting TRIM22 and inhibiting the JAK2/STAT3 and erk pathways[J]. *Cancers (Basel)*, 2025, 17(5):718—729.
- [6] XU C, HUANG X, HUANG Y, *et al.* Naringenin induces apoptosis of gastric carcinoma cells *via* blocking the PI3K/AKT pathway and activating pro - death autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5):772—784.
- [7] WAN M, YU H, ZHAI H. Suppression of JAK2/STAT3 pathway by notoginsenoside R1 reduces epithelial - mesenchymal transition in non - small cell lung cancer[J]. *Mol Biotechnol*, 2025, 67(4):1526—1538.
- [8] LUO X, YE Z, XU C, *et al.* Corosolic acid enhances oxidative stress - induced apoptosis and senescence in pancreatic cancer cells by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1):176—195.
- [9] HUANG W, BI B, HUANG Q, *et al.* SIRT3 activates CD36 transcription by recruiting FOXM1 and activates PARP to augment cisplatin resistance in non - small cell lung cancer[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2026, 74(4):518—533.
- [10] KANG Y, GE N, YUAN X, *et al.* FBXL18 increases cell proliferation and reduces cell radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Strahlenther Onkol*, 2025, 201(10):992—1000.
- [11] CHEN H, XUE S, CAO S, *et al.* *Hsa_circRNA_0101125* promotes proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma *via* miR - 143 - 3p/ZNF148 Axis[J]. *FASEB J*, 2025, 39(19):71031—71045.
- [12] AN J, AN S, CHOI M, *et al.* Natural products for esophageal cancer therapy: From traditional medicine to modern drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21):13558—13579.
- [13] CHANG T M, CHI M C, CHIANG Y C, *et al.* Promotion of ROS - mediated apoptosis, G2/M arrest, and autophagy by naringenin in non - small cell lung cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(3):1093—1109.
- [14] LI Y Z, DENG J, ZHANG X D, *et al.* Naringenin enhances the efficacy of ferroptosis inducers by attenuating aerobic glycolysis by activating the AMPK - PGC1 α signalling axis in liver cancer[J/OL]. *Heliyon*, 2024, 10(11):e32288. 2024 - 05 - 31 [2026 - 01 - 05]. [https://europepmc.org/article/MED/38912485#free - full - text](https://europepmc.org/article/MED/38912485#free-full-text).
- [15] HETMANSKI J H R, JONES M J, HARTSHORN M, *et al.* Differential roles of cyclin - CDK1 complexes in cell migration and invasion[J]. *J Cell Sci*, 2025, 138(13):jcs263697.
- [16] GÜLER A, YARDIMCI B K, ÖZEK N Ş. Human anti - apoptotic Bcl - 2 and Bcl - xL proteins protect yeast cells from aging induced oxidative stress[J]. *Biochimie*, 2025, 229(21):69—83.
- [17] HUANG B, LANG X, LI X. The role of IL - 6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers[J]. *Front Oncol*, 2022, 12(21):1023177—1023196.
- [18] LONG L, FEI X, CHEN L, *et al.* Potential therapeutic targets of the JAK2/STAT3 signaling pathway in triple - negative breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2024, 14(21):1381251—1381269.
- [19] YANG G, SHENG B, LI R, *et al.* Dehydrocostus lactone induces apoptosis and cell cycle arrest through regulation of JAK2/STAT3/PLK1 signaling pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(9):1742—1752.
- [20] HAN L, SUN Y, YANG K, *et al.* Inhibition of JAK2/STAT3 by pacritinib synergizes with chemotherapy in esophageal carcinoma [J]. *Toxicol In Vitro*, 2025, 106(21):106056—106066.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2026 - 01 - 07)