

安五脂素通过拮抗JAK1/STAT3通路的激活抑制胃癌细胞恶性生物学行为

刘馨悦^{1,4}, 张可妮², 乔通³, 尹林², 张龙涛³, 程歆柯^{1,4}, 王奔^{1,4}, 曹锦麟^{1,4}, 耿志军^{1,4}, 赵皓¹

蚌埠医科大学第一附属医院¹中心实验室,²检验科, 安徽蚌埠 233000; 蚌埠医科大学³检验医学院免疫学教研室,⁴炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室, 安徽蚌埠 233004

摘要:目的 明确安五脂素(ANW)对胃癌细胞恶性生物学行为的调控作用,并探讨其潜在分子机制。方法 采用CCK-8法、EdU染色及克隆形成实验评估ANW对人胃癌细胞系HGC-27和SGC-7901活力与增殖能力的影响;构建裸鼠移植瘤模型,结合Ki-67免疫组化染色验证ANW对胃癌细胞体内增殖的作用。通过流式细胞术检测细胞周期分布,Western blotting检测周期相关蛋白(Cyclin D1、CDK2、P53)表达;采用Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡率,TUNEL法标记凋亡细胞,Western blotting检测凋亡相关蛋白(Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax)表达。利用Transwell检测细胞迁移与侵袭能力,Western blotting检测基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)表达。通过qPCR和Western blotting检测上皮-间质转化(EMT)标志分子(Vimentin、E-cadherin、Snail、Slug)的mRNA及蛋白表达水平;Western blotting分析JAK1/STAT3信号通路关键蛋白(p-JAK1、JAK1、p-STAT3、STAT3)的磷酸化水平,联合RO8191通路激活及JAK1 siRNA敲低实验,验证JAK1/STAT3通路是ANW抗肿瘤作用的关键介导通路。结果 ANW以浓度依赖方式显著抑制HGC-27和SGC-7901增殖及克隆形成能力($P<0.05$),并诱导细胞周期阻滞于G1期,伴随Cyclin D1、CDK2蛋白表达下调及P53蛋白表达降低($P<0.05$)。体内实验进一步证实,ANW可抑制裸鼠移植瘤生长,降低瘤体组织中Ki-67阳性表达率($P<0.05$)。ANW可显著促进胃癌细胞凋亡,表现为凋亡率升高,抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调,促凋亡蛋白Cleaved Caspase-3及Bax表达上调($P<0.05$)。此外,ANW能显著抑制胃癌细胞迁移与侵袭能力,同时下调MMP-2、MMP-9蛋白表达($P<0.05$);并可抑制EMT进程,具体表现为间质标志物Vimentin及转录因子Snail、Slug表达降低,上皮标志物E-cadherin表达升高($P<0.05$)。分子机制层面,ANW可显著抑制JAK1及STAT3的磷酸化水平($P<0.05$);JAK1/STAT3激活剂RO8191可逆转ANW对胃癌细胞恶性行为的抑制作用,siRNA沉默JAK1既可模拟ANW的抗肿瘤效应,又能与之协同;ANW在裸鼠移植瘤中抑制EMT,而RO8191则削弱其体内抑瘤作用。结论 安五脂素可通过抑制JAK1/STAT3信号通路的活化,进而阻滞细胞周期进程、促进细胞凋亡、抑制EMT及MMPs介导的侵袭转移能力,最终发挥抗胃癌作用。本研究为ANW作为胃癌潜在治疗药物的开发提供了实验依据。

关键词:胃癌;安五脂素;恶性行为;上皮间质转化;JAK1/STAT3通路

Anwulignan inhibits malignant phenotypes of gastric cancer cells by antagonizing activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway

LIU Xinyue^{1,4}, ZHANG Keni², QIAO Tong³, YIN Lin², ZHANG Longtao³, CHENG Xinke^{1,4}, WANG Ben^{1,4}, CAO Jinlin^{1,4}, GENG Zhijun^{1,4}, ZHAO Hao¹

¹Central Laboratory, ²Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233003, China; ³Department of Immunology, School of Laboratory Medicine, Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China; ⁴Anhui Provincial Key Laboratory of Basic and Translational Research of Inflammation-related Diseases, Bengbu 233003, China

Abstract: Methods To evaluate the inhibitory effect of anwulignan (ANW) on malignant biological behaviors of gastric cancer cells and explore its underlying molecular mechanism. **Methods** The inhibitory effect of ANW on viability and proliferation of gastric cancer HGC-27 and SGC-7901 cells were evaluated using CCK-8 assay, EdU staining and colony formation assay. In a nude mouse model bearing gastric cancer xenografts, the effect of ANW on tumor cell proliferation was examined using immunohistochemistry for Ki-67. The changes in cell cycle, apoptosis, migration, invasion, and expressions of MMPs and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers following ANW treatment were detected using flow cytometry, TUNEL staining, Western blotting, Transwell assay, and qPCR. The role of the JAK1/STAT3 signaling pathway in mediating the anti-tumor activity of ANW was validated by detecting JAK1/STAT3 phosphorylation, pathway activation and siRNA-mediated JAK1 knockdown experiments. **Results** In HGC-27 and SGC-7901 cells, ANW dose-dependently suppressed cell proliferation and colony formation, induced G1 cell cycle arrest, and downregulated the expressions of cyclin D1/CDK2 and P53. ANW treatment significantly inhibited tumor growth and decreased Ki-67 positivity in the mouse xenografts. ANW effectively promoted cell apoptosis, suppressed Bcl-2 expression, upregulated cleaved caspase-3 and Bax expressions, inhibited migration and invasion, lowered MMP-2/MMP-9 expressions, and blocked EMT progression in gastric cancer cells. Mechanistically, ANW significantly inhibited JAK1/STAT3 phosphorylation, while the JAK1/STAT3 activator RO8191 reversed the anti-tumor

effect of ANW; JAK1 knockdown mimicked and enhanced the inhibitory effect of ANW on gastric cancer cells. ANW significantly inhibited EMT in the mouse xenografts, and this effect was attenuated by RO8191 treatment. **Conclusion** ANW inhibits malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibiting the activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway, thereby

收稿日期:2025-12-20

基金项目:安徽省高校优秀青年基金项目(2022AH030138);安徽省高等学校自然科研基金项目(KJ2020A0563)

作者简介:刘馨悦,在读本科生,E-mail: lxy13865038871@163.com

通信作者:赵皓,硕士,助理研究员,E-mail: 13955221252@163.com

inducing cell cycle arrest, promoting apoptosis, and suppressing EMT and MMP-mediated invasion and migration, suggesting the potential of ANW as a therapeutic agent for gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; anwuligan; malignant behavior; epithelial-mesenchymal transition; JAK1/STAT3 signaling pathway

胃癌作为全球高发恶性肿瘤,其治疗困境仍是临床与基础研究的核心难题;尽管手术、放疗、化疗构成主流治疗体系,但早期患者术后复发率高,中晚期患者放化疗易出现毒性反应与耐药性,导致整体治疗效果受限,五年生存率仅约35%^[1-3]。因此,开发基于天然活性成分的高效低毒辅助治疗药物,已成为突破胃癌治疗瓶颈的关键方向。安五脂素(ANW)作为五味子来源的木脂素类化合物,具备天然小分子药物多靶点、低毒性的优势,已被证实对肝癌、肺癌等恶性肿瘤具有增殖抑制与凋亡诱导作用^[4-6],然而其在胃癌中的生物学功能及分子机制尚未见报道,这一研究空白限制了其在胃癌治疗领域的潜在应用。与此同时,上皮间质转化(EMT)是胃癌侵袭转移的核心调控过程,而 JAK/STAT3 信号通路不仅参与胃癌细胞恶性增殖,更与 EMT 转化直接相关^[7,8],成为胃癌治疗的重要潜在靶点,但目前尚未发现安五脂素与该通路的关联研究。

基于上述研究现状与空白,本研究聚焦以下核心问题:明确安五脂素对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响;揭示安五脂素是否通过调控 EMT 过程发挥作用;阐明 JAK1/STAT3 信号通路在安五脂素调控胃癌细胞生物学行为中的分子机制。研究结果有望为胃癌靶向治疗药物开发提供新的实验依据与候选分子。

1 材料和方法

1.1 实验主要试剂与耗材

安五脂素(ANW;上海源叶生物科技有限公司);激动剂 RO8191 (MCE);Lipofectamine 2000 转染试剂、anti-Cleaved Caspase-3(Invitrogen);CCK-8 试剂(北京索莱宝生物科技有限公司);胎牛血清(FBS, Gibco);RPMI 1640 培养基(Thermo Fisher Scientific);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(Servicebio);BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白试剂盒(碧云天);anti-Cyclin D1、anti-CDK2、anti-P53、anti-MMP9、anti-MMP2、anti-Bcl2、anti-E-cadherin 和 anti-JAK1 (Proteintech);anti-Bax、anti-Snail+Slug、anti-p-JAK1、anti-p-STAT3、anti-STAT3、anti-β-actin、anti-Ki-67 抗体(Abcam);anti-Vimentin(CST);辣根酶标记山羊抗兔/鼠 IgG(H+L)(ZSGB-BIO);Transwell 小室和基质胶(Corning);酶标山羊抗兔 IgG 聚合物和 DAB (ZSGB-BIO);cDNA 合成试剂盒 PCR 反应试剂盒(TaKaRa);Vimentin 和 CDH1 特异性引物(上海生工公司)。

1.2 实验动物及细胞

BALB/c 裸鼠(体质量 20~25 g, 6~8 周龄,江苏集萃药康生物科技有限公司);人胃癌细胞系 HGC-27、SGC-7901 和 AGS(国家生物医学实验细胞资源库)。

1.3 细胞培养与干预

1.3.1 ANW 干预 HGC-27、SGC-7901 和 AGS 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。采用不同浓度 ANW 处理细胞 24 h: HGC-27 细胞设 0、1、2、4、8、16、32、64 μmol/L; SGC-7901 细胞设 0、5、10、20、40、80、160、320 μmol/L,以观察其对细胞活性的作用。

1.3.2 RO8191 回救实验 胃癌 HGC-27、SGC-7901 细胞经 10 μmol/L JAK1/STAT3 激动剂 RO8191^[9]预处理 30 min 后,分别加入 32、40 μmol/L ANW 继续培养 24 h;收集细胞用于蛋白提取及 Western blotting 检测,同时采用结晶紫染色观测细胞迁移和侵袭,探究通路活化能否逆转 ANW 的体外抗肿瘤效应。

1.3.3 JAK1 siRNA 沉默干预实验 采用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 JAK1 特异性 siRNA(5'-CCAUCACU GUUGAUGACAA-3')^[10]转染至 HGC-27 和 SGC-7901 胃癌细胞中,分别采用 32 μmol/L 和 40 μmol/L 的 ANW 干预细胞并持续培养 24 h。后续收集细胞提取总蛋白和结晶紫染色观测细胞恶性表型变化,探究 JAK1 沉默对 ANW 体外抗肿瘤作用的调控效应。

1.4 裸鼠背部成瘤与分组

BALB/c 裸鼠饲养于屏障环境,温度 22±2 °C,相对湿度(50±10)%,12 h 明暗循环,自由摄食灭菌标准饲料及无菌饮用水。取对数生长期 AGS 细胞,以每只 100 μL (含 1×10⁷ 细胞)接种于裸鼠背部皮下。接种 1 周后,将 12 只小鼠随机分为 4 组($n=3$):对照组(0 μmol/L ANW)及 ANW 处理组(40、80、160 μmol/L)。同时设置阴性对照、ANW(80 μmol/L)单药、RO8191(30 mg/kg)单药及 ANW+RO8191 联合回救组,通过通路激活回救验证体内调控机制。采用瘤内多点注射给药,注射 50 μL/次,10 μL/点,1 次/2 d,连续干预 2 周后处死动物,剥离瘤组织并称重、测量体积。每例瘤组织均分两份,一份经 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋,用于组织学分析;另一份于 -80 °C 冻存,用于蛋白提取。本研究通过蚌埠医科大学动物伦理委员会审查(伦理批号:伦动科批字[2021]第 269 号)。

1.5 细胞增殖与毒性检测

CCK-8 实验:将 1×10³/孔的胃癌细胞接种于 96 孔

板, ANW 处理结束后每孔加 CCK-8 试剂 10 μ L, 孵育 2 h 后测定吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。

EdU 实验: 6 孔板细胞数达 $(5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5)$ /孔后, 依据 BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒步骤对细胞进行 EdU 标记及固定、洗涤和通透; 荧光显微镜镜下拍照检测细胞增殖率。

克隆形成实验: 将 600/孔的胃癌细胞接种于 6 孔板中, 1 次/2 d 更换含有 ANW 和 10% FBS 的培养基, 培养 2 周后, 经 4% 多聚甲醛固定和 0.2% 结晶紫染色, 采集图片并计算细胞克隆数。

1.6 细胞凋亡与周期检测

依据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书的操作步骤, 依次对细胞进行消化、清洗、染色和流式细胞仪检测。

1.7 免疫印迹实验

细胞和移植瘤经含有蛋白酶和磷酸化蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白。蛋白经定量、变性、SDS-PAGE 电泳和转移至 PVDF 膜上, 膜再经封闭、一抗[anti-Cyclin D1 (1: 5000)、anti-CDK2 (1: 2000)、anti-P53 (1: 5000)、anti-MMP9 (1: 1000)、anti-MMP2 (1: 1000)、anti-Cleaved Caspase-3 (1: 1000)、anti-Bax (1: 1000)、anti-Bcl2 (1: 1000)、anti-Vimentin (1: 1000)、anti-E-cadherin (1: 1000)、anti-Snail+Slug (1: 1000)、anti-p-JAK1 (1: 1000)、anti-JAK1 (1: 1000)、anti-p-STAT3 (1: 2000)、anti-STAT3 (1: 500) 和 anti- β -actin (1: 1000)]和二抗[辣根酶标记山羊抗兔/鼠 IgG (H+L), 1: 3000]孵育。最后, 经 ECL 发光液显色和多功能凝胶成像系统

采集图片。

1.8 细胞迁移与侵袭实验

在 Transwell 小室 (孔径 8.0 μ m) 中加入 200 μ L 含有 4×10^4 胃癌细胞的无血清培养基, 同时在下室加入 1 mL 含 10% FBS 的培养基。经过 12 h 培养后, 分别加入不同浓度的 ANW 进行处理, 继续培养 12 h。随后取出 Transwell 小室, 用 4% 多聚甲醛固定, 并进行结晶紫染色, 最后采集图像。细胞侵袭实验需在 Transwell 小室上层铺一层基质胶, 其余步骤同迁移实验。

1.9 免疫组织化学实验

从移植瘤组织蜡块中制备 4 μ m 厚度的切片, 依次完成烤片、脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断以及封闭处理后, 将切片分别与 anti-Ki-67 抗体 (1: 500 稀释) 和酶标山羊抗兔 IgG 聚合物进行孵育, 随后采用 DAB 进行显色, 最后采集图像并统计 Ki-67 阳性细胞的比例。

1.10 TUNEL 染色

取移植瘤组织蜡块切片, 先进行脱蜡处理, 随后按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书的要求, 依次完成破膜、Proteinase K 处理、TdT 孵育缓冲液染色以及 DAPI 染核等步骤, 最后在荧光显微镜下获取图像。

1.11 RT-qPCR 实验

将细胞和移植瘤经含 Trizol 裂解液提取总 RNA。NanoDrop™ One/OneC 微量紫外-可见光分光光度计测定 RNA 浓度, 随后按照 cDNA 合成试剂盒和 PCR 反应试剂盒说明书的要求, 依次将提取的 RNA 逆转录为 cDNA, 加入 Vimentin 和 CDH1 特异性引物, 进行 PCR 反应, 最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量 (表 1)。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Vimentin	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
CDH1	GATAGAGAACGCATTGCCACATA	ACCTTCCATGACAGACCCCTTAA
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT	CTGGAAGATGGTGATGGGATT

1.12 统计学分析

本研究采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间计量资料的差异比较采用独立样本 t 检验。所有实验操作均独立重复 ≥ 3 次以确保结果可靠性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ANW 抑制胃癌细胞增殖

ANW 以浓度依赖性抑制胃癌细胞 (HGC-27 和 SGC-7901) 的增殖 ($P < 0.05$, 图 1A、B)。细胞克隆实验

结果显示, 在 HGC-27 细胞中, 32、64 μ mol/L ANW 处理组的克隆数低于对照组 ($P < 0.05$, 图 1C、D); 而在 SGC-7901 细胞中, 40、80 μ mol/L ANW 处理组的克隆数也减少 ($P < 0.05$, 图 1E、H)。EdU 实验结果进一步表明, 相较于对照组, HGC-27 细胞在 32、64 μ mol/L ANW 处理下 EdU 阳性细胞率降低 ($P < 0.05$, 图 1F、I); 同样, SGC-7901 细胞在 40、80 μ mol/L ANW 处理下 EdU 阳性细胞率也下降 ($P < 0.05$, 图 1G、J)。

2.2 ANW 抑制裸鼠移植瘤的生长

AGS 细胞裸鼠背部移植瘤实验结果显示, 与对照组相比, 40、80、160 μ mol/L 的 ANW 处理组的移植瘤质

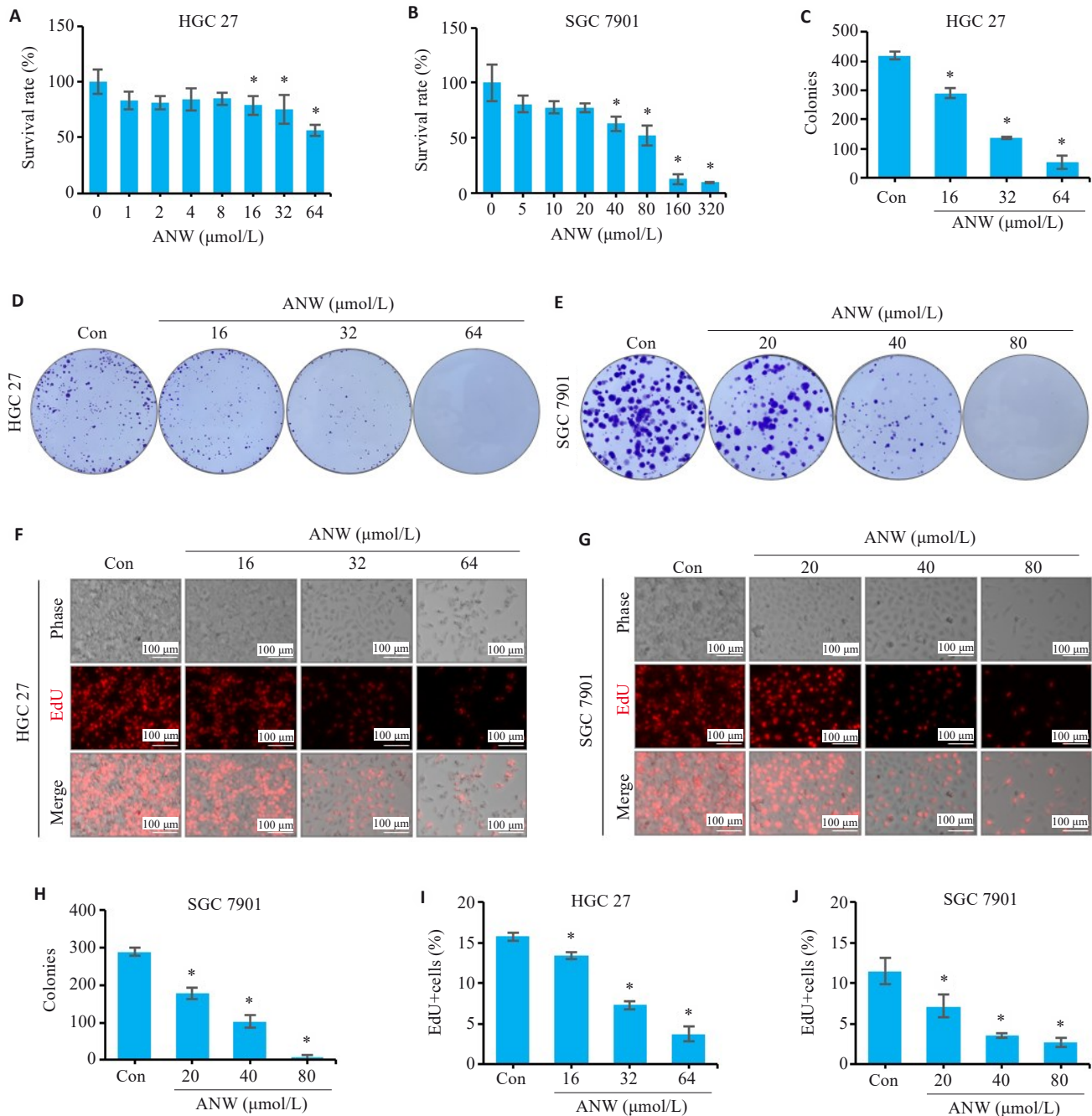


图1 ANW对胃癌细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of ANW on proliferation of gastric cancer cells *in vitro*. **A, B**: Cell viability detected by CCK-8 assay. **C-E, H**: Colony formation assay. **F, G, I, J**: EdU assay for evaluating cell proliferation. * $P < 0.05$ vs Control (0 μmol/L). ANW: Anwulignan; Con: Control; EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine.

量和体积都明显减少($P < 0.05$,图2A~C)。免疫组化结果显示,ANW处理组瘤组织中Ki-67阳性细胞比例降低($P < 0.05$,图2D)。

2.3 ANW诱导胃癌细胞G1期细胞周期停滞

流式细胞术结果显示,HGC-27细胞的16、32、64 μmol/L组和SGC-7901细胞的20、40、80 μmol/L组经ANW处理后,G1期细胞比例升高($P < 0.05$,图3A~D);Western blotting结果显示,体外细胞实验和体内动物实验发现ANW处理可下调细胞周期相关蛋白(Cyclin D1、CDK2、P53)表达($P < 0.05$,图3E~J)。

2.4 ANW促进胃癌细胞凋亡

流式细胞术结果显示,ANW处理可增加胃癌细胞凋亡率($P < 0.05$,图4A~D)。Western blotting结果显示,ANW能够上调胃癌细胞中Cleaved Caspase-3和Bax的表达,并下调Bcl2的表达水平($P < 0.05$,图5A~D);并且,这一调控趋势在裸鼠移植瘤中得到一致的验证($P < 0.05$,图5E、F)。TUNEL染色进一步证实,ANW处理组移植瘤中凋亡细胞数量增多($P < 0.05$,图5G~H)。

2.5 ANW抑制胃癌细胞迁移和侵袭

Transwell迁移和侵袭实验显示,在HGC-27细

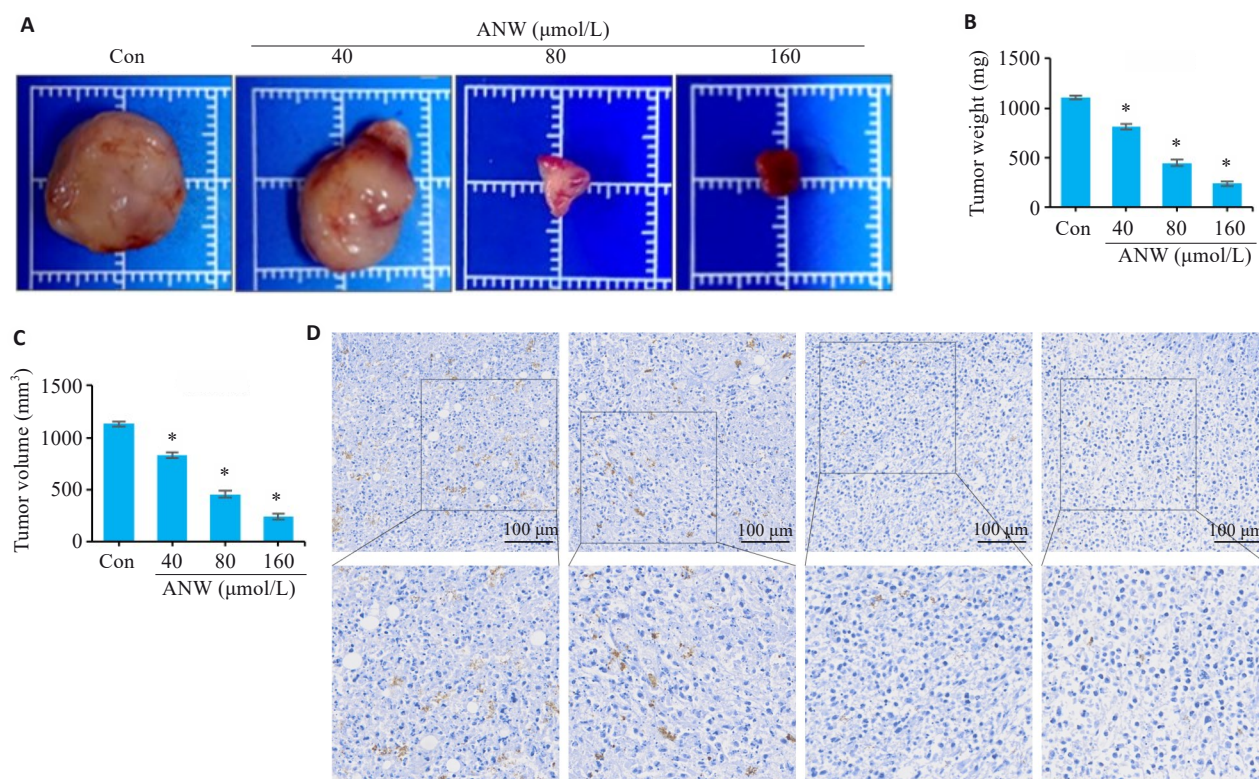


图2 ANW对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of ANW on xenograft tumor growth in nude mice. A-C: Tumor volume and weight. D: Representative images and quantitative analysis of Ki-67 staining. * $P<0.05$ vs Control (0 μmol/L).

胞中, 32、64 μmol/L 的 ANW 能降低细胞的迁移和侵袭数量 ($P<0.05$, 图 6A、C); 在 SGC-7901 细胞中, 40、80 μmol/L 的 ANW 同样表现出抑制效果 ($P<0.05$, 图 6B、E)。划痕实验进一步表明, 64 μmol/L 的 ANW 干预后 HGC-27 细胞的愈合能力, 以及 80 μmol/L 的 ANW 干预后 SGC-7901 细胞的愈合能力, 均低于对照组 ($P<0.05$, 图 6D、F、G、H)。Western blotting 结果显示, 迁移与侵袭相关蛋白 (MMP2 和 MMP9) 在两种细胞的体外实验中均被 ANW 抑制 ($P<0.05$, HGC-27: 图 7A; SGC-7901: 图 7B), 该抑制趋势在体内实验中也得到一致验证 ($P<0.05$, 图 7C)。

2.6 激活 JAK1/STAT3 通路可逆转 ANW 介导的胃癌细胞恶性表型及 EMT 抑制

Transwell 迁移与侵袭实验, 以及相关蛋白检测结果表明, RO8191 部分逆转了 ANW 对胃癌细胞迁移、侵袭能力的抑制效果 ($P<0.05$, 图 8)。Western blotting 结果还表明 RO8191 抑制了 ANW 的促胃癌细胞的凋亡作用, 以及恢复 EMT 相关蛋白的异常表达 ($P<0.05$, 图 9)。

2.7 ANW 抑制胃癌细胞的上皮间质转化 (EMT)

Western blotting 结果表明, ANW 处理可上调上皮标志物 E-cadherin 的表达, 并下调间质标志物 Vimentin 及转录因子 Snail/Slug 的表达 ($P<0.05$, 图 10A~C); RT-qPCR 结果进一步显示, ANW 处理在转录水平上调上皮标志基因 CDH1 的 mRNA 表达, 同时下调间质标志

基因 Vimentin 的 mRNA 表达 ($P<0.05$, 图 10D)。

2.8 ANW 可抑制 JAK1/STAT3 通路的激活

Western blotting 分析显示, ANW 处理可抑制 JAK1 和 STAT3 的磷酸化水平 ($P<0.05$, 图 11A、B); 相对于对照组, 在 ANW 干预后移植瘤中的 p-JAK1 和 p-STAT3 的水平降低 ($P<0.05$, 图 11C)。

2.9 沉默 JAK1 通路可模拟并协同增强 ANW 对胃癌细胞恶性表型及 EMT 的抑制作用

Transwell 迁移与侵袭实验及 Western blotting 实验显示, 在 HGC-27 和 SGC-7901 胃癌细胞中, 特异性沉默 JAK1 可显著抑制细胞迁移、侵袭及 EMT 进程, 能够模拟 ANW 的抗肿瘤生物学效应; 且沉默 JAK1/STAT3 通路联合 ANW 联合干预可进一步强化该抑制效果, 二者发挥协同调控作用 ($P<0.05$, 图 12, 图 13)。

2.10 裸鼠体内验证 JAK1/STAT3 通路介导 ANW 抑制胃癌生长与 EMT 的机制

裸鼠移植瘤体内干预实验结果显示, ANW 可抑制胃癌移植瘤的体积与体质量增长, 发挥明显的体内抑瘤作用; 而采用 RO8191 激活 JAK1/STAT3 通路后, 可有效逆转 ANW 对裸鼠移植瘤生长的抑制效应。与此同时, 体内蛋白检测结果证实, 激活 JAK1/STAT3 通路同样可拮抗 ANW 对胃癌组织 EMT 进程的抑制作用。上述体内实验结果差异均具有统计学意义 ($P<0.05$, 图 14A~D)。

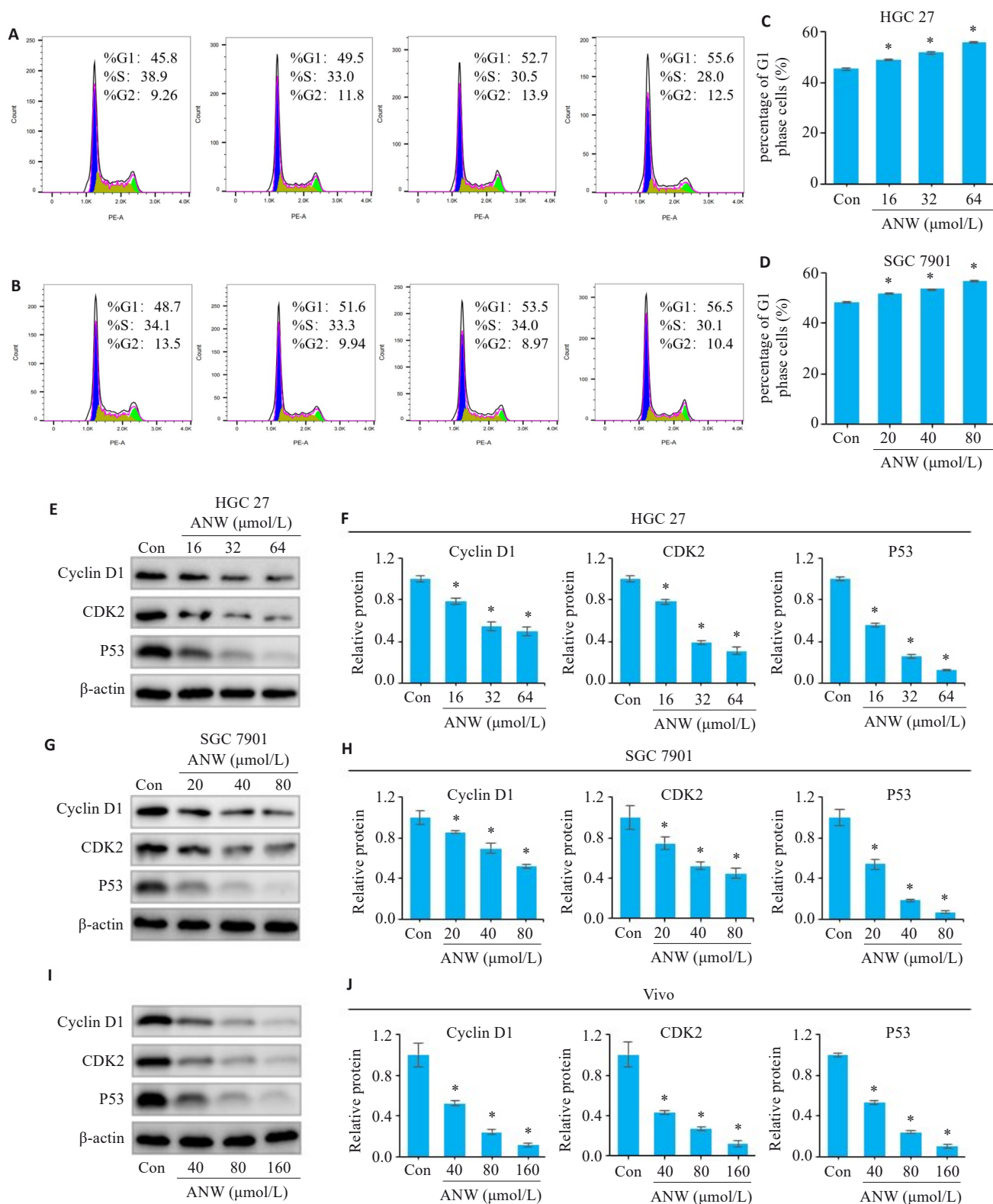


图3 ANW对胃癌细胞周期的影响

Fig.3 Effect of ANW on cell cycle in gastric cancer cells'. **A-D**: Flow cytometric analysis of cell cycle distribution. **E-H**: Western blotting analysis of cyclin D1, CDK2, and P53 protein expression in gastric cancer cell lines HGC 27 and SGC 7901. **I, J**: Western blotting analysis of cyclin D1, CDK2, and P53 protein expression in mouse xenografts. * $P < 0.05$ vs Control (0 μmol/L). Cyclin-D1: G1/S-specific cyclin-D1; CDK2: Cyclin-dependent kinase 2; P53: Tumor protein p53; β-actin: Beta actin.

3 讨论

胃癌是全球范围内发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤之一。目前临床治疗方案效果常因耐药性和不良

反应而受限。因此,开发高效低毒的新型药物具有重要临床意义。本研究以ANW为研究对象,从体内外实验系统评价了其胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用,

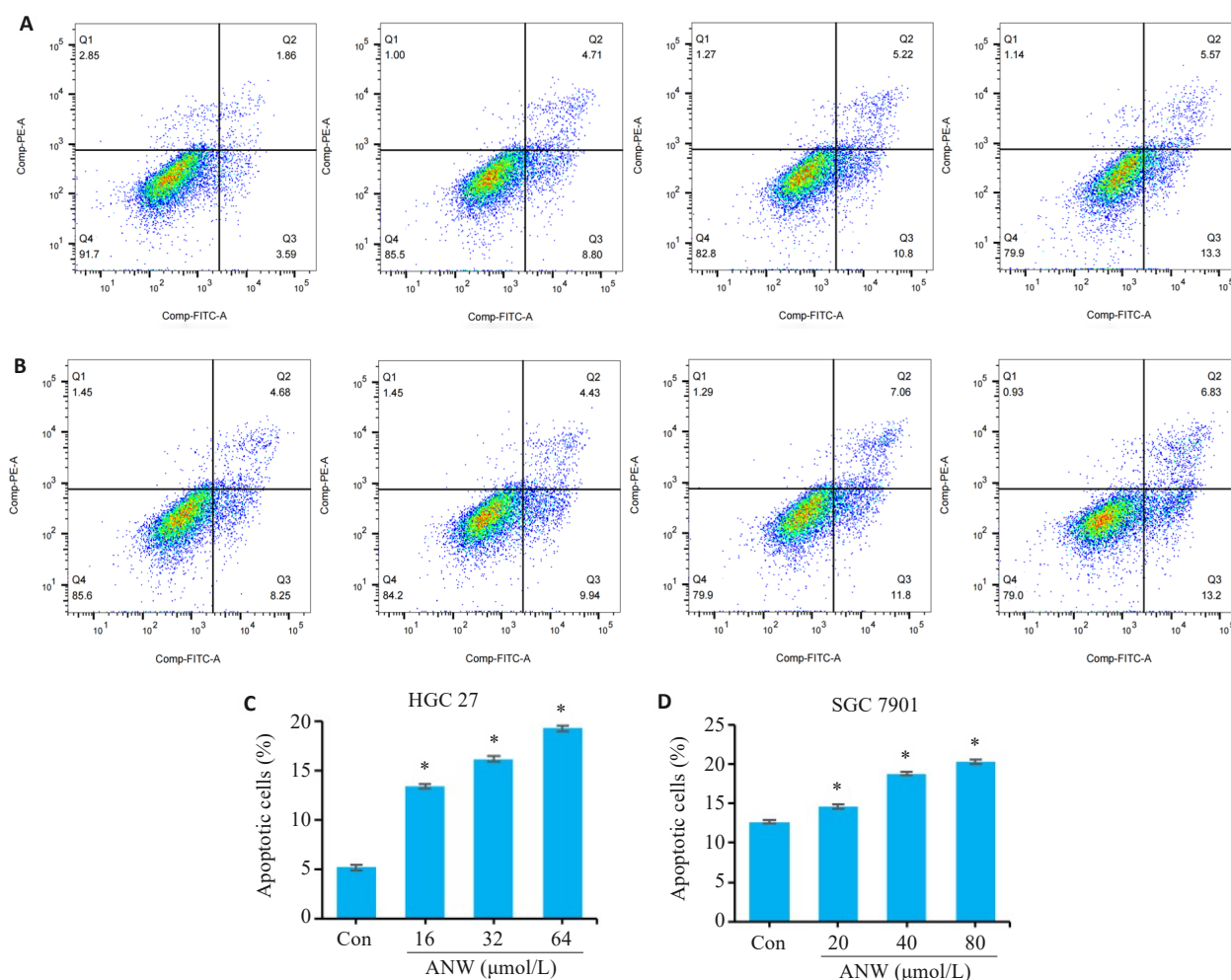


图4 流式细胞术分析 ANW 对胃癌细胞凋亡的影响

Fig.4 Flow cytometric analysis of the effects of ANW on apoptosis in gastric cancer cells. A-D: Cell apoptosis rates detected by flow cytometry. * $P < 0.05$ vs Control (0 μmol/L).

并探讨了其通过 JAK1/STAT3 信号通路调控上皮-间质转化(EMT)的潜在机制。

进展期胃癌易发生转移,是患者预后不良的主要原因^[11]。尽管新的治疗药物、化疗联合免疫治疗等应用增加,但在实际治疗过程中仍不可避免地出现各种不良反应,甚至危及患者生命^[12]。因此,亟需开发更为安全有效的药物以满足胃癌治疗需求。受到青蒿素抗疟疾治疗的巨大鼓舞下,天然植物提取物因其具有广泛的抗炎、抗癌和细胞保护等作用受到学术界广泛关注,更重要的是,这些天然植物提取物还具有分子量小且安全无毒副作用等药理特性^[13]。在本研究中,从肉豆蔻中分离得到的生物活性木脂素 ANW 以浓度依赖性的方式显著降低了 SGC-7901 和 HGC-27 的细胞活力,这与报道关于 ANW 抑制非小细胞肺癌生长等研究中发挥抗癌作用的研究结果一致^[4],说明肉豆蔻提取物有用于治疗恶性肿瘤的潜力。通过研究已证实 ANW 可体内抑制胃癌的发展,其处理可显著抑制胃癌细胞增殖使其停留在细胞 G0/G1 期,以及裸鼠移植瘤生长,与黄芩 Geogi

提取物汉黄芩素在胃癌方面的研究相似^[14]。同时,本研究通过流式细胞术、免疫印迹以及 Tunel 染色从体内、体外两方面证实 ANW 具有诱导胃癌细胞凋亡的作用,该结果与红毛七提取物(CRME)、木犀草素和丁香酚等中药提取物对癌细胞凋亡的调控功能类似^[15-17]。以上结果均表明,ANW 可对胃癌细胞产生细胞毒性,具有抗癌治疗的潜在应用价值。癌细胞转移作为肿瘤化疗耐药性与患者死亡率攀升的核心诱因,在胃癌这一高侵袭性恶性肿瘤中表现尤为突出——其早期转移倾向与高复发风险共同构成了预后不良的主要驱动因素^[18]。有研究证实肉豆蔻另外一种提取物脱氢二异丁香酚(DEH)能抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭^[19]。本研究证实,ANW 处理胃癌细胞 24 h 能显著抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。基质金属蛋白酶(MMP)在血管生成、肿瘤侵袭和转移等多种生理和病理过程中发挥重要作用^[20]。本研究通过体内外实验证实,ANW 降低了胃癌细胞和裸鼠移植瘤中 MMP2 和 MMP9 的表达,提示 ANW 能通过抑制胃癌细胞的转移发挥抗胃癌作用,这与 Gomisin A

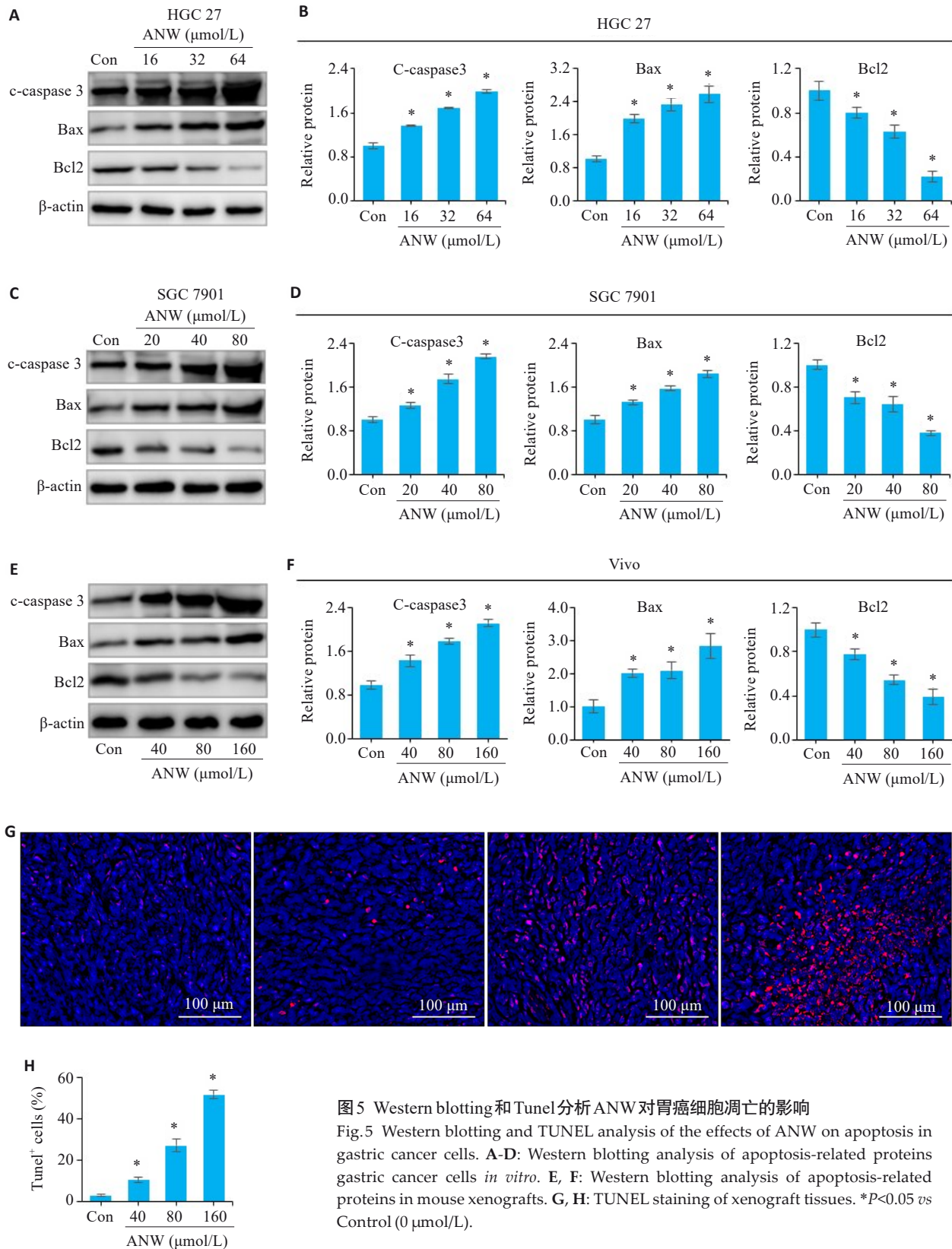


图5 Western blotting和TUNEL分析ANW对胃癌细胞凋亡的影响

Fig.5 Western blotting and TUNEL analysis of the effects of ANW on apoptosis in gastric cancer cells *in vitro*. E, F: Western blotting analysis of apoptosis-related proteins in mouse xenografts. G, H: TUNEL staining of xenograft tissues. * $P < 0.05$ vs Control (0 $\mu\text{mol/L}$).

降低MMP2和MMP9的表达活性降低结直肠癌细胞的转移能力作用类似^[21]。EMT在以上过程中起关键作用,它增强肿瘤细胞的迁移与侵袭能力,促进远处播散^[7, 22]。因此,靶向EMT过程已成为胃癌治疗的重要策略之一^[23, 24]。同时,结果显示胃癌细胞和裸鼠移植瘤中

ANW作用后E-cadherin表达上升,Vimentin和Snail/Slug表达显著下降,这与清胰化积方(QYHJ)抑制胰腺癌EMT和解毒三根汤(JSD)对结直肠癌EMT的作用相似^[25, 26]。

大量研究证据指出,在肿瘤转移这一多通路协同参

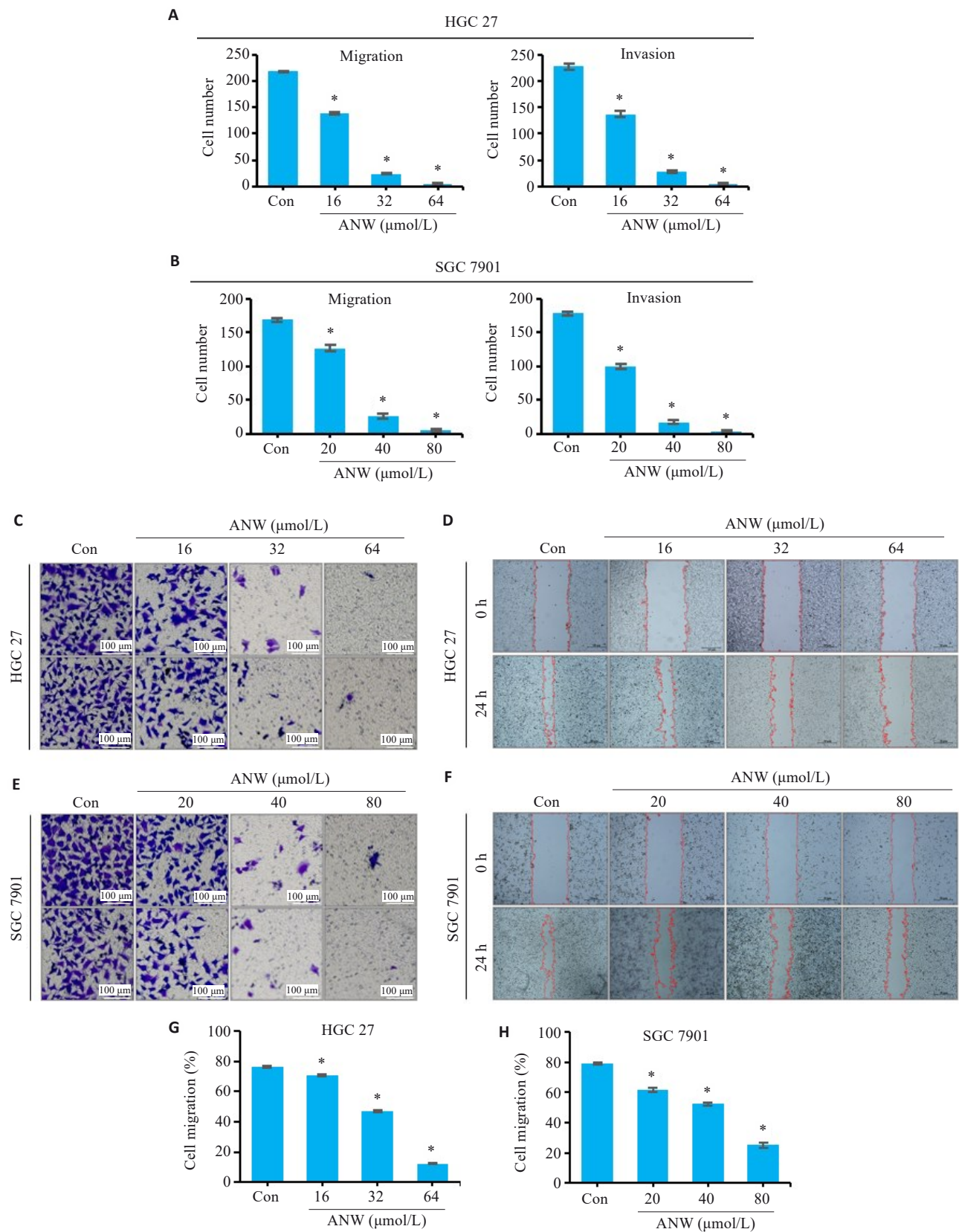


图6 Transwell和划痕实验分析ANW对胃癌细胞迁移和侵袭的影响
Fig. 6 Transwell and wound healing assays of migration and invasion in ANW-treated gastric cancer cells. A-C, E: Transwell migration and invasion assay. D, F, G, H: Wound healing assay. * $P < 0.05$ vs Control (0 $\mu\text{mol/L}$).

与的复杂过程中,JAK1/STAT3信号通路的异常活化广泛存在,并深度参与调控癌细胞的侵袭、转移能力,增殖活性以及EMT^[27-29]。JAK1/STAT3信号通路经典激活

剂RO8191可逆转其抑制状态^[9],同时干扰素小RNA可选择性沉默JAK1,抑制JAK1/STAT3信号通路的激活^[10]。已知ANW和同类天然提取物木脂素的抗癌机

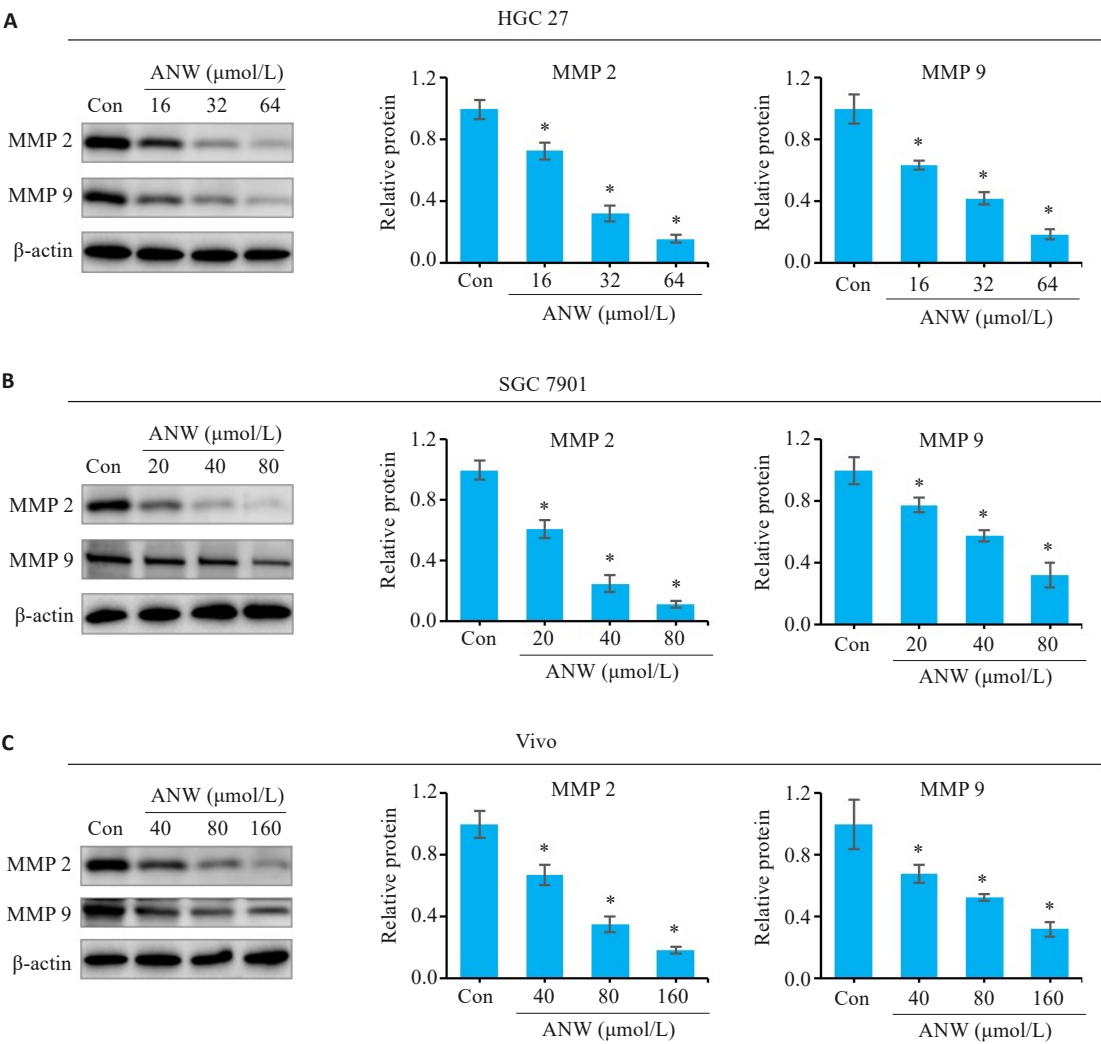


图7 Western blotting分析ANW对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

Fig.7 Western blotting for evaluating the effects of ANW on migration and invasion in gastric cancer cells. **A**, **B**: Western blotting and quantification of MMP2 and MMP9 expressions in gastric cancer cells in vitro. **C**: Western blotting and quantification of MMP2 and MMP9 expressions in mouse xenografts. **P*<0.05 vs Control (0 μmol/L). MMP2: Matrix Metalloproteinase 2; MMP9: Matrix Metalloproteinase 9.

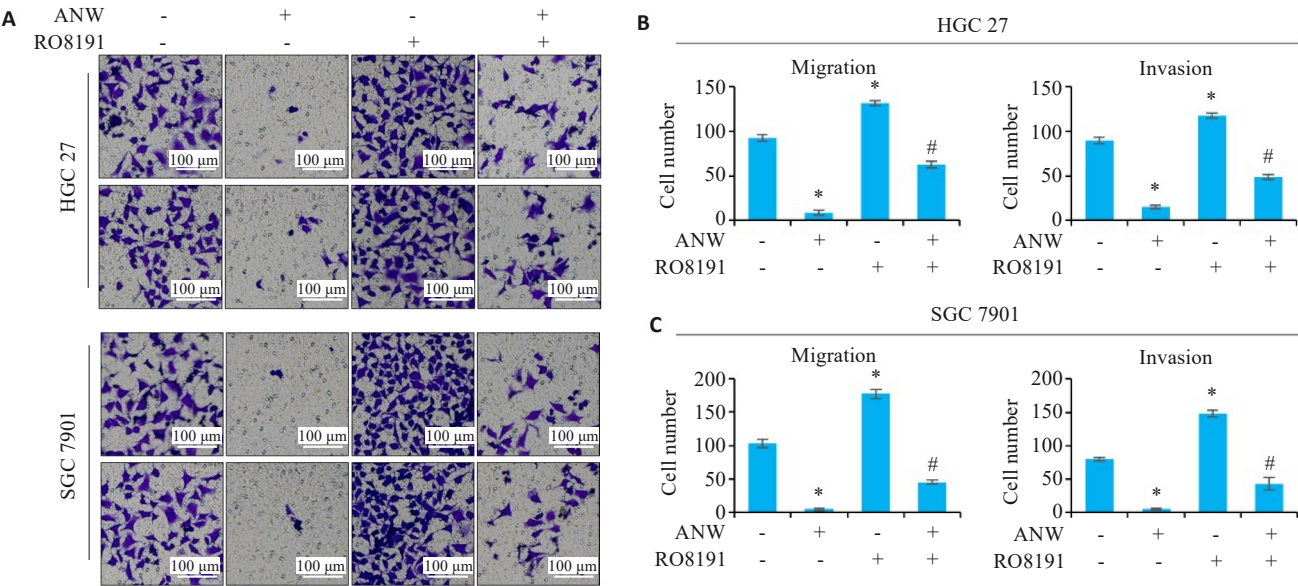


图8 Transwell分析RO8191对ANW抑制胃癌细胞恶性表型及EMT的影响

Fig.8 Transwell analysis of the effects of RO8191 on the inhibitory action of ANW on malignant phenotype and EMT in gastric cancer cells. **A-C**: Transwell migration and invasion assay. **P*<0.05 vs Control; #*P*<0.05 vs ANW.

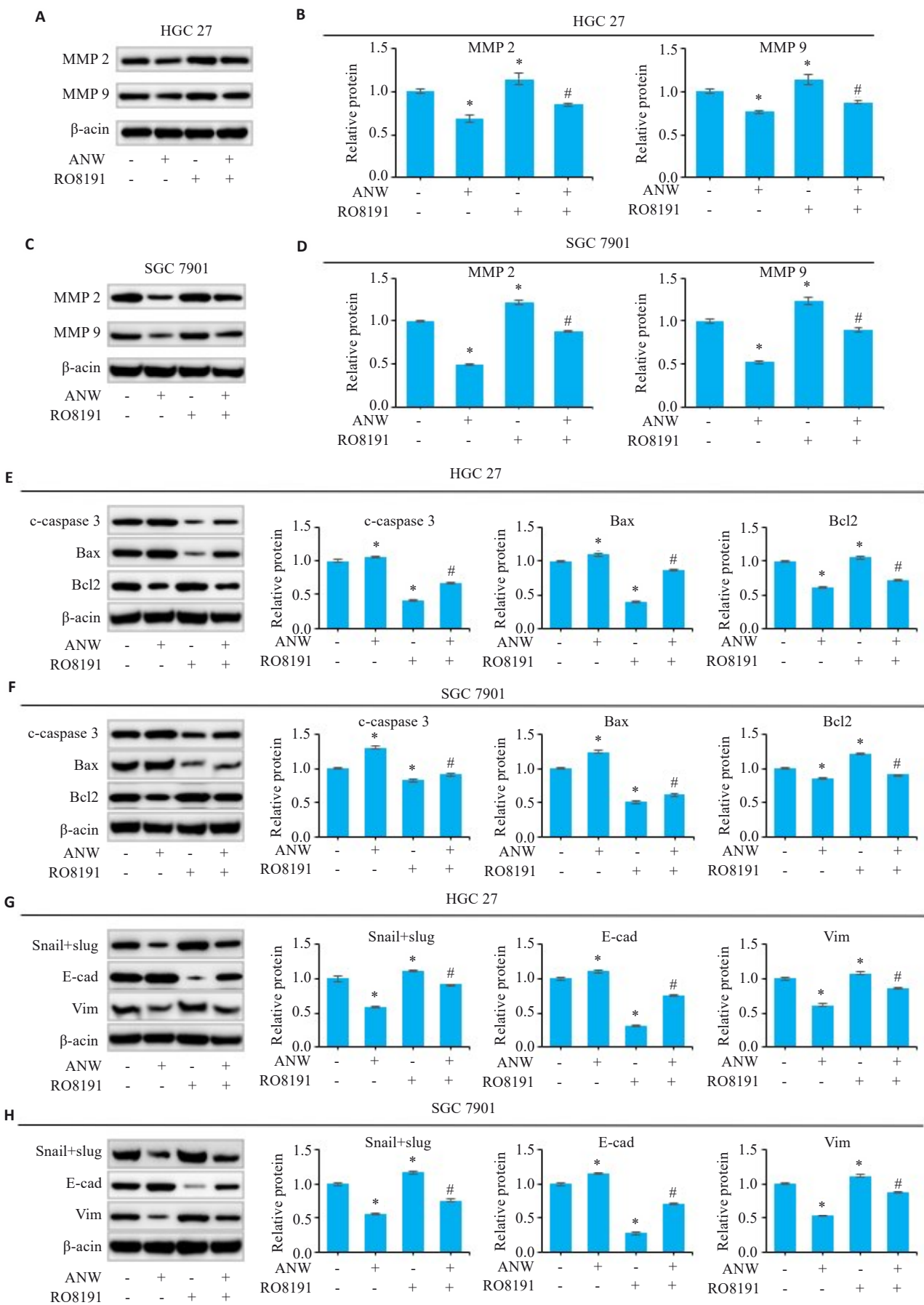


图9 Western blotting分析RO8191对ANW抑制胃癌细胞恶性表型及EMT的影响

Fig.9 Western blotting analysis of the effects of RO8191 on the inhibitory action of ANW on malignant phenotype and EMT in gastric cancer cells. **A-H**: The expression of proteins related to migration, invasion, apoptosis, and EMT. * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs ANW.

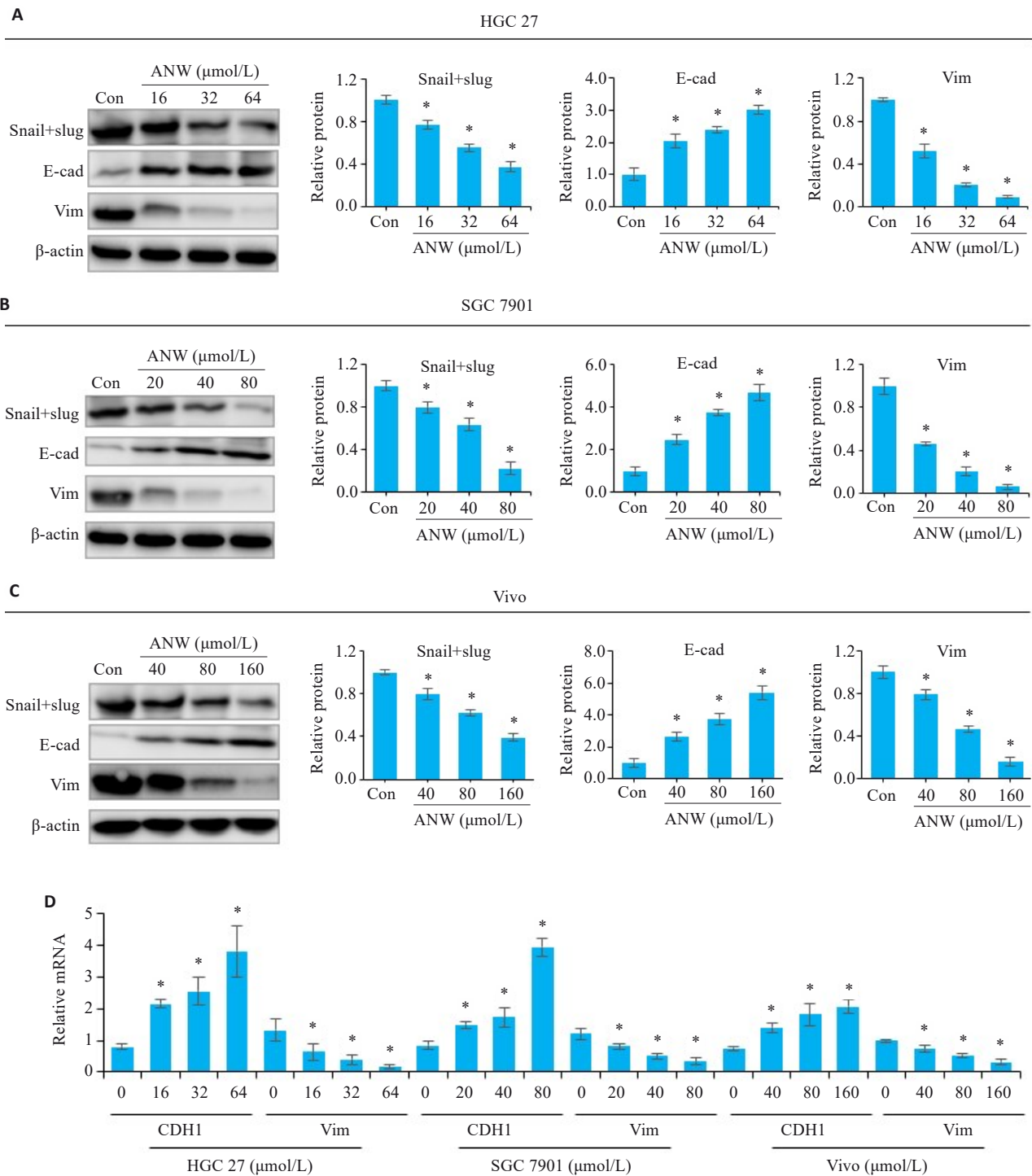


图10 ANW对胃癌细胞上皮间质转化的影响

Fig.10 Effect of ANW on epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells. **A-C**: Western blotting of EMT-related proteins *in vitro* and *in vivo*. **D**: RT-qPCR analysis of EMT-related gene expression. * $P < 0.05$ vs Control (0 $\mu\text{mol/L}$). Snail+slug: Snail family zinc finger transcription factors; E-cad: Epithelial cadherin; Vim: Vimentin; CDH1: Cadherin 1.

制与本研究结论吻合,均指向该通路的关键调控作用^[30,31]。这确证了以JAK1/STAT3为靶点的天然单体疗法是抗癌药物开发的有效途径。

本研究表明ANW抑制胃癌细胞(SGC-7901、HGC-27)增殖、迁移、侵袭、EMT并诱导凋亡,其抗肿瘤效应与抑制JAK1/STAT3通路相关,JAK1/STAT3激活剂RO8191逆转ANW对胃癌细胞恶性行为的抑制,

JAK1沉默可模拟并协同ANW的抗肿瘤效应。裸鼠移植瘤模型中,ANW抑制EMT,通路激活则削弱其体内抑瘤作用;且该通路参与调控癌细胞周期、抑制血管生成及EMT^[29,30,32,33]。研究存在以下局限性:尽管阐明了ANW通过抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及诱导凋亡发挥抗肿瘤效应,但ANW的多效性生物学特性提示可能存在其他未被充分评估的作用途径;同时,研究聚焦于

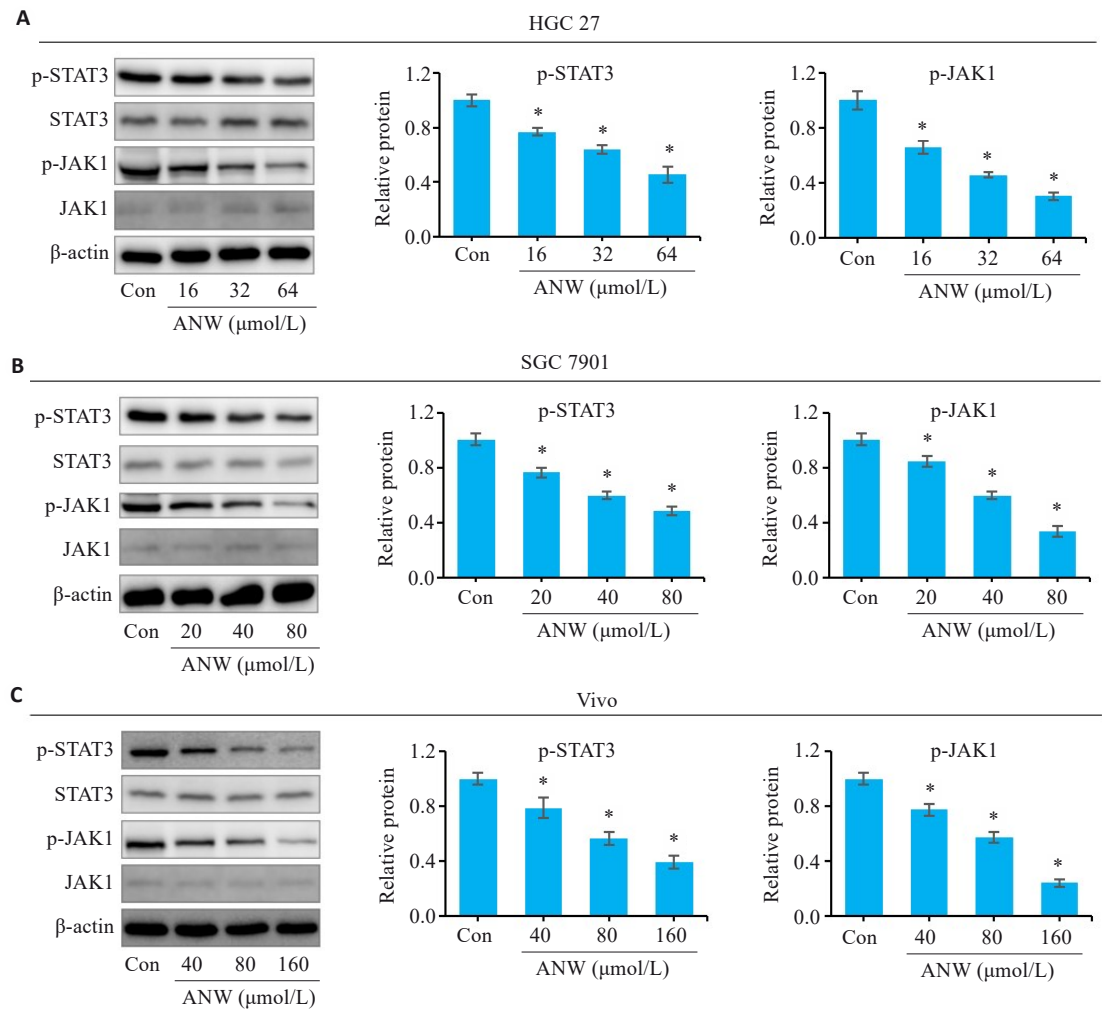


图 11 ANW对JAK1/STAT3信号通路的影响

Fig.11 Effect of ANW on the JAK1/STAT3 signaling pathway. **A, B:** Western blotting of p-JAK1, JAK1, p-STAT3, and STAT3 *in vitro*. **C:** Western blotting analysis of pathway proteins *in vivo*. * $P<0.05$ vs Control (0 $\mu\text{mol/L}$). p-STAT3: Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; p-JAK1: Phosphorylated Janus kinase 1; JAK1: Janus kinase 1.

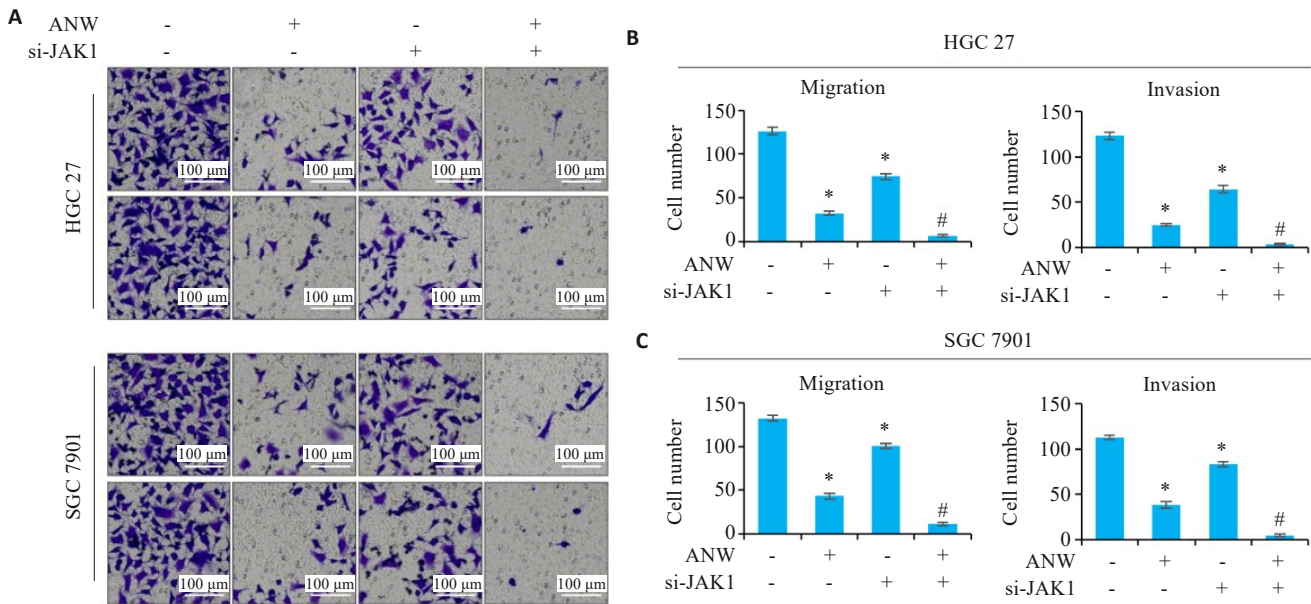


图 12 Transwell分析沉默JAK1/STAT3通路对ANW抑制胃癌细胞恶性表型及EMT的影响

Fig. 12 Transwell analysis of the effects of JAK1/STAT3 pathway silencing on the inhibitory action of ANW on malignant phenotype and EMT in gastric cancer cells. **A-C:** Transwell migration and invasion assay. * $P<0.05$ vs Control; # $P<0.05$ vs ANW.

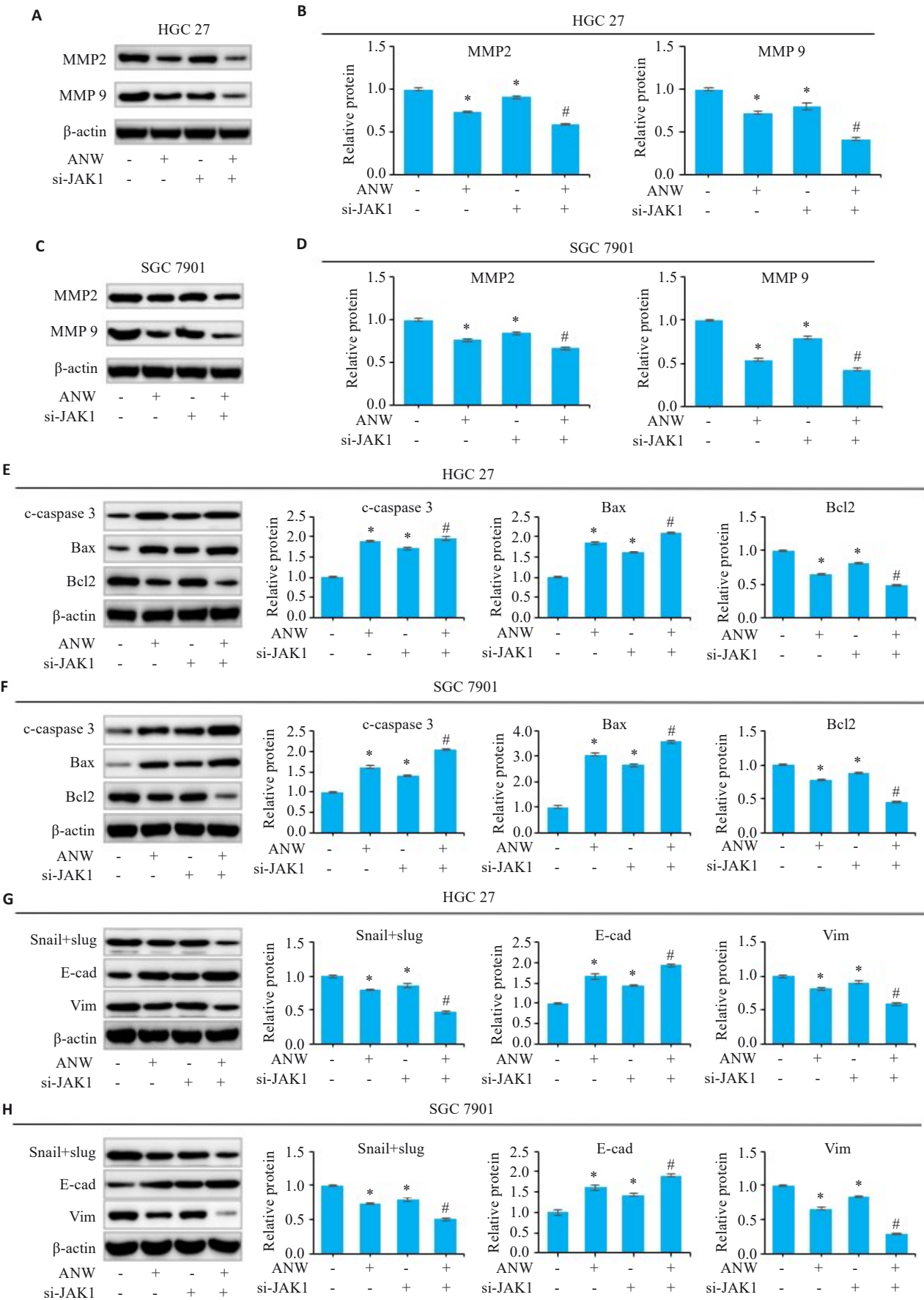


图 13 WB分析沉默JAK1/STAT3通路对ANW抑制胃癌细胞恶性表型及EMT的影响

Fig. 13 Western blotting of the effects of JAK1/STAT3 pathway silencing on the inhibitory action of ANW on malignant phenotype and EMT in gastric cancer cells. A-H: Expression of proteins related to migration, invasion, apoptosis, and EMT. * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs ANW.

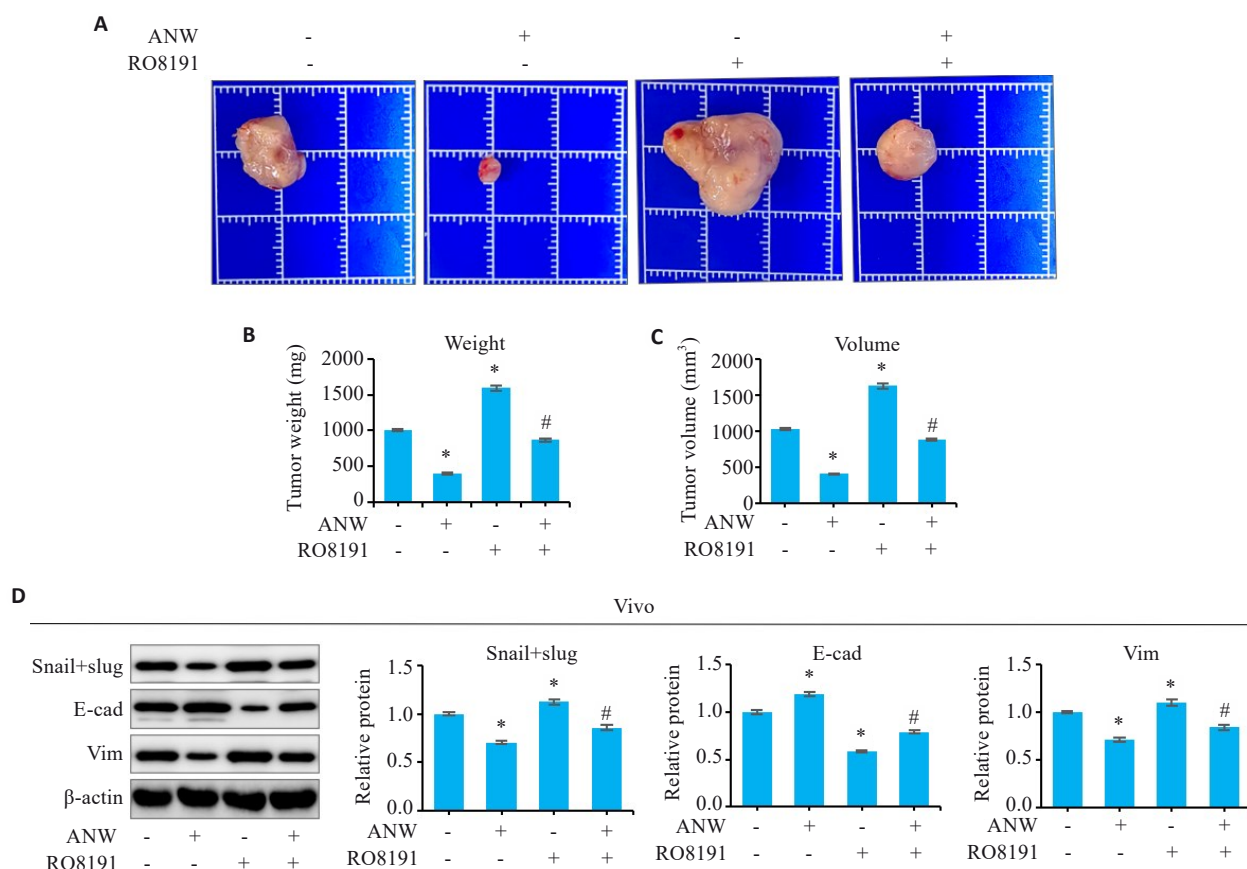


图 14 裸鼠体内通路机制验证

Fig.14 Validation of pathway mechanism in nude mice. A-C: Tumor volume and weight. D: Expression of proteins related to EMT. * $P < 0.05$ vs Control; # $P < 0.05$ vs ANW.

JAK1/STAT3 信号轴,尚不能排除 ANW 通过其他信号通路调控细胞行为的可能性。尽管如此,核心结论明确:ANW 显著抑制 SGC-7901 和 HGC-27 的细胞周期进程、促进细胞凋亡、抑制 EMT 及 MMPs 介导的侵袭迁移能力,展现出作为胃癌治疗候选药物的潜力。其抗肿瘤分子机制至少部分源于对 JAK1/STAT3 信号通路的抑制。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Liu JH, Yuan QH, Guo H, et al. Deciphering drug resistance in gastric cancer: Potential mechanisms and future perspectives[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 173: 116310.
- [2] Yang WJ, Zhao HP, Yu Y, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(16): 2452-68.
- [3] Marin JJG, Al-Abdulla R, Lozano E, et al. Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer[J]. Anti Cancer Agents Med Chem, 2016, 16(3): 318-34.
- [4] Niu HK, Wang DX, Wen TT, et al. Anwuligan inhibits the progression of non-small cell lung cancer via let-7c-3p/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. Cancer Med, 2023, 12(5): 5908-25.
- [5] Zhou Y, Men LH, Sun YX, et al. Pharmacodynamic effects and

molecular mechanisms of lignans from *Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.), a current review[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 892: 173796.

- [6] Li ZM, Zhao LJ, Xia YS, et al. Schisandrin B attenuates hepatic stellate cell activation and promotes apoptosis to protect against liver fibrosis[J]. Molecules, 2021, 26(22): 6882.
- [7] Peng Z. Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5403.
- [8] Wu XY, Tao P, Zhou Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20741-50.
- [9] Wang S, Sun ZM, Wang C, et al. The JAK1/STAT3 pathway mediates the effects of SERPINH1 on glioma EMT[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 157: 114731.
- [10] Fu L, Wei LW, Zhao MD, et al. Investigation of JAKs/STAT-3 in lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial cells[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 186(1): 75-85.
- [11] Chen ZD, Zhang PF, Xi HQ, et al. Recent advances in the diagnosis, staging, treatment, and prognosis of advanced gastric cancer: a literature review[J]. Front Med, 2021, 8: 744839.
- [12] 郭元吉,周建霞,林燕.晚期胃癌化疗及免疫治疗药物的研究进展[J].新疆中医药, 2025, 43(2): 174-7.
- [13] 乔永志,刘江.中草药对胃癌防御与治疗的研究概述[C]//中国药学会医院药专业委员会.第七届中国药学会医院肿瘤药大会论文集, 2018: 262-3.

- [14] Song Y, Zhao H, Yu RZ, et al. Wogonin suppresses proliferation, invasion and migration in gastric cancer cells *via* targeting the JAK-STAT3 pathway[J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 30803.
- [15] Cui MH, Yao GY, Zhang YY, et al. The molecular mechanisms of *C. Aulophyllum robustum* Maxim extract inhibition by regulating FAK/PI3K signaling pathway in gastric cancer HGC-27 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337: 118867.
- [16] Yang ZZ, Liu HT, Song YS, et al. Luteolin enhances drug chemosensitivity by downregulating the FAK/PI3K/AKT pathway in paclitaxel-resistant esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(3). DOI:10.3892/ijmm.2024.5401.
- [17] Pisano M, Pagnan G, Loi M, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6(1): 8.
- [18] Li GZ, Doherty GM, Wang JP. Surgical management of gastric cancer: a review[J]. *JAMA Surg*, 2022, 157(5): 446.
- [19] Yi FY, Chen NZ, Zhao MY, et al. Dehydrodiisoeugenol targets NOD2 exerting dual effects against colitis and colorectal cancer: a double-edged sword[J]. *Mol Med*, 2025, 31(1): 221.
- [20] Sokolova O, Naumann M. Matrix metalloproteinases in *Helicobacter pylori* - associated gastritis and gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1883.
- [21] Kee JY, Han YH, Mun JG, et al. Gomisin a suppresses colorectal lung metastasis by inducing AMPK/p38-mediated apoptosis and decreasing metastatic abilities of colorectal cancer cells[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 986.
- [22] Kölbl A, Jeschke U, Andergassen U. The significance of epithelial-to-mesenchymal transition for circulating tumor cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1308.
- [23] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [24] Kozak J, Forma A, Czezelewski M, et al. Inhibition or reversal of the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer: pharmacological approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 277.
- [25] Zhang J, Wang P, Ouyang HQ, et al. Targeting cancer-related inflammation: Chinese herbal medicine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70334.
- [26] Shan FY, Sun LT, Zhang LY, et al. Inhibition to epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential in colorectal cancer cell by combination of traditional Chinese medicine formulation Jiedu sangen decoction and PD-L1 inhibitor[J]. *Integr Cancer Ther*, 2020, 19: 1534735420972486.
- [27] Cheng H, Shao YJ, Zhang A, et al. Interleukin-7 enhances recruitment of MDSCs by regulating MCP-1 *via* JAK1/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 16869.
- [28] Tan X, Ma XF, Dai YF, et al. A large-scale transcriptional analysis reveals herb-derived ginsenoside F₂ suppressing hepatocellular carcinoma *via* inhibiting STAT3[J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155031.
- [29] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial - mesenchymal transition[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 217.
- [30] Xie XM, Wang XY, Shi XD, et al. Anwulignan is a novel JAK1 inhibitor that suppresses non-small cell lung cancer growth[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2645-54.
- [31] Wang CY, Qin F, Wang CG, et al. Novel lignans from *Zanthoxylum nitidum* and antiproliferation activity of sesaminone in osimertinib-resistant non-small cell lung cancer cells[J]. *Bioorg Chem*, 2023, 134: 106445.
- [32] Wu LR, Qian CC, Zhang WQ, et al. Ginkgetin suppresses ovarian cancer growth through inhibition of JAK2/STAT3 and MAPKs signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154846.
- [33] Ahmed EA. The potential therapeutic role of beta-caryophyllene as a chemosensitizer and an inhibitor of angiogenesis in cancer[J]. *Molecules*, 2025, 30(8): 1751.

(编辑:经 媛)