

铁冬青酸对人肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

杨彩梅¹, 束军¹, 郑江霞¹, 沈继龙²

摘要 目的 观察铁冬青酸(RA)对人肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,并初步探讨其机制。方法 以人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞作为研究对象,分为细胞对照组、空白对照组、溶剂组和 20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 铁冬青酸实验组。使用 CCK-8 实验和划痕实验分别检测人肺腺癌细胞的增殖能力和水平迁移能力;用 Transwell 迁移实验和 Transwell 侵袭实验分别检测各组 A549 和 PC9 细胞的纵向迁移能力和侵袭能力;用 ELISA 检测各组细胞上清液中酪氨酸蛋白激酶 2 (JAK2) 和转录激活蛋白 3 (STAT3) 的蛋白表达量,用 RT-PCR 法检测各组细胞中 JAK2 和 STAT3 的 mRNA 表达水平。分析上述各指标的组间差异。结果 RA 作用于肺腺癌细胞后,与对照组相比,实验组人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞活力下降 ($P < 0.05$),肺腺癌细胞的迁移面积减少 ($P < 0.05$),穿过聚碳酸酯膜和基质胶的细胞数量均减少 ($P < 0.05$),细胞上清液中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$),JAK2 和 STAT3 的 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$),且上述指标的降低呈浓度依赖性,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);对照组与溶剂组人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞活力组间差异无统计学意义。结论 RA 在体外实验中对于人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞的增殖、迁移和侵袭能力具有抑制作用,且呈一定的浓度依赖性;其作用机制可能与细胞 JAK2/STAT3 通路的负向调控有关。

关键词 铁冬青酸;人肺腺癌细胞;增殖;迁移;侵袭;酪氨酸蛋白激酶 2;转录激活蛋白 3

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)11-1782-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.017

2020 年全球癌症统计显示,新发的肺癌病例数约 220 万,死亡病例数约 179 万^[1],较 2018 年的数据有增无减^[2]。铁冬青酸(Rotundic acid, RA)存在于铁冬青、毛冬青等植物的种子、树皮和树叶中,是一种天然的五环三萜化合物。研究表明,RA 具有

抗炎^[3]、降低低密度脂蛋白和胆固醇^[4]、改善肠道菌群^[5-6]等作用。Wang et al^[7] 研究表明 RA 可以诱导乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡;Roy et al^[8] 研究表明 RA 可以抑制肝癌 HepG2 细胞的迁移、侵袭并诱导其凋亡;Feng et al^[9] 研究表明 RA 可以抑制结直肠癌 Caco2 细胞的增殖,但是 RA 对人肺腺癌细胞的作用研究尚罕见报道。该研究主要观察 RA 对人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,初步探讨 RA 作为抗癌新药的潜能和可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人肺腺癌 A549、PC9 细胞购于广州赛业生物科技有限公司;RA (DST201201-037) 购于乐美天医药科技有限公司,20 mg/支,纯度 $\geq 99\%$;DMEM、RPMI-1640 培养基和胎牛血清购于赛默飞生物化学制品有限公司;胰酶细胞消化液购于新赛美生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;酪氨酸蛋白激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) 酶联免疫吸附检测 (ELISA) 试剂盒、转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) ELISA 试剂盒购于上海源桔生物科技中心;Transwell 小室购于美国康宁公司;移液器购于北京博仪恒业科技发展有限公司;酶标仪购于瑞士帝肯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人肺腺癌 A549、PC9 细胞分别置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含有 5% CO_2 的细胞培养箱中。用含有 10% 胎牛血清、1% 抗生素的 DMEM 培养基培养 A549 细胞;用含有 10% 胎牛血清、1% 抗生素的 RPMI-1640 培养基培养 PC9 细胞。肺腺癌细胞呈贴壁方式生长,视细胞生长状态进行换液、传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 药物配制及实验分组 使用 DMSO 作为溶剂,将 RA 溶于其中并配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的母液,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。实验分为细胞对照组 (无 RA、无 DMSO)、空白对照组 (仅含培养基) 和实验组 (分别含 20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ RA),CCK-8 实

2022-05-21 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2018A0204)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230011

² 病原生物学安徽省重点实验室,人畜共患病安徽高校省级重点实验室,合肥 230032

作者简介: 杨彩梅,女,硕士研究生;

束军,男,博士,硕士生导师,责任作者, E-mail: J. Shu@126.com

验增加溶剂组(含0.1% DMSO)。

1.2.3 CCK-8 法检测不同浓度 RA 对于 A549 和 PC9 细胞增殖能力的影响 取对数生长期的人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞,制备成合适密度的细胞悬液,取细胞悬液进行 96 孔板铺板,分为细胞对照组、溶剂对照组和实验组,每组设置 5 个复孔。向每组复孔中加入 100 μ l 细胞悬液,待细胞贴壁后,弃去培养基,向细胞对照组中加入 100 μ l 培养基,溶剂组加入含 0.1% DMSO 的培养基,实验组每孔各加入 100 μ l 不同浓度(20、40、60、80 μ mol/L)的 RA 溶液。培养 24 h 后向每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,放回细胞培养箱中孵育 1~4 h,调节酶标仪波长为 450 nm 进行吸光度(A)值检测。根据 A 值计算各组细胞活力,细胞活力 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (细胞对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.2.4 细胞划痕实验检测不同浓度 RA 对于 A549 和 PC9 细胞水平迁移能力的影响 在 6 孔板背面用马克笔均匀划 6 条互相平行的直线,确保每个孔中有 3 根直线通过。取对数生长期的人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞,制备成合适密度的细胞悬液,向每孔中加入 2 ml 细胞悬液。将 6 孔板放入培养箱中,在细胞汇合度达到 95% 时,用 200 μ l 枪头垂于横线划痕,用 PBS 清洗后在显微镜下拍照即为 0 h 划痕宽度。实验组分别加入 2 ml 不同浓度 RA 的无血清培养基,对照组加入 2 ml 无血清培养基。培养 24 h 后用 PBS 清洗 6 孔板并在同一位置拍照,即为 24 h 划痕宽度。用 ImageJ 软件分析细胞迁移面积,细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 迁移实验观察 RA 对 A549 和 PC9 细胞纵向迁移能力的影响 取对数生长期的人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞,用含不同浓度 RA 的无血清培养基调整为合适的细胞密度,每个浓度组取 200 μ l 加入到 Transwell 上室中,下室中加入 750 μ l 血清浓度为 20% 的培养基。放入培养箱中培养 24 h 后,用棉签擦去上室内的细胞及基质胶,下室用甲醛固定 30 min,再用结晶紫染色 20 min。在 200 倍显微镜下随机选取 5 个视野进行计数。实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 侵袭实验观察 RA 对 A549 和 PC9 细胞侵袭能力的影响 按 1:8 的比例稀释 Matrigel 基质胶,每个小室用 60 μ l 基质胶包被,放进培养箱过夜。其余步骤同 1.2.5 项。

1.2.7 ELISA 实验观察 RA 对 A549 和 PC9 细胞上

清液中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量的影响 用不同浓度 RA 培养基培养细胞 24 h,吸取上清液,根据 JAK2 和 STAT3 测定试剂盒说明书进行处理,调节酶标仪波长至 450 nm 检测 A 值,计算 JAK2、STAT3 蛋白表达量。实验重复 3 次。

1.2.8 RT-PCR 实验观察 RA 对 A549 和 PC9 细胞中 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平的影响 取对数生长期的人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞,调整为合适的细胞密度,进行 6 孔板铺板。用含不同浓度 RA 的培养基培养 24 h。用 TRIzol 提取细胞中的 RNA,将其逆转录成 cDNA。应用逆转录定量 PCR 仪及 SYBR Green 试剂盒进行 PCR 扩增。内参 GAPDH 的上游引物: 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游引物: 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'; JAK2 的上游引物: 5'-GCGTTGAGAAGACGGTGTG-3',下游引物: 5'-CTGTTGCCTGCTTCTGAAACC-3'; STAT3 的上游引物 5'-3': CAGTATAGCCGCTTCCTGCAA,下游引物: 5'-CACAATCCGGGCAATCTCC-3'。

1.3 统计学处理 拍摄照片后用 Image J 1.52 软件对细胞的迁移面积进行计算,对穿过聚碳酸酯膜细胞进行计数;用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,以判断各组间的差异是否有统计学意义;用 Graph pad Prism 8.0 软件整理实验数据并作图。计量资料用表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 对 A549 和 PC9 细胞增殖能力的影响

CCK-8 法检测结果显示,与细胞对照组相比,RA 浓度越高,A549 细胞和 PC9 细胞的细胞活力越低;表明 RA 抑制了各组 A549 和 PC9 细胞的增殖,而且 RA 的浓度越高,抑制作用越强。该实验结果还显示,溶剂对照组与细胞对照组之间的细胞活力差异无统计学意义,可以排除溶剂对细胞增殖的抑制作用。细胞对照组与 20 μ mol/L 实验组之间,20 μ mol/L 与 40 μ mol/L 实验组之间细胞活力差异无统计学意义,细胞对照组与其它实验组之间的细胞活力差异有统计学意义($F = 103.1$, $P < 0.05$)。在 PC9 细胞中,溶剂对照组与细胞对照组之间的细胞活力差异无统计学意义,细胞对照组与 20、40 μ mol/L 实验组之间的细胞活力差异无统计学意义,其它实验组与细胞对照组之间的细胞活力差异有统计学意义($F = 121.8$, $P < 0.05$)。见图 1。

2.2 RA 对 A549 和 PC9 细胞水平迁移能力的影响

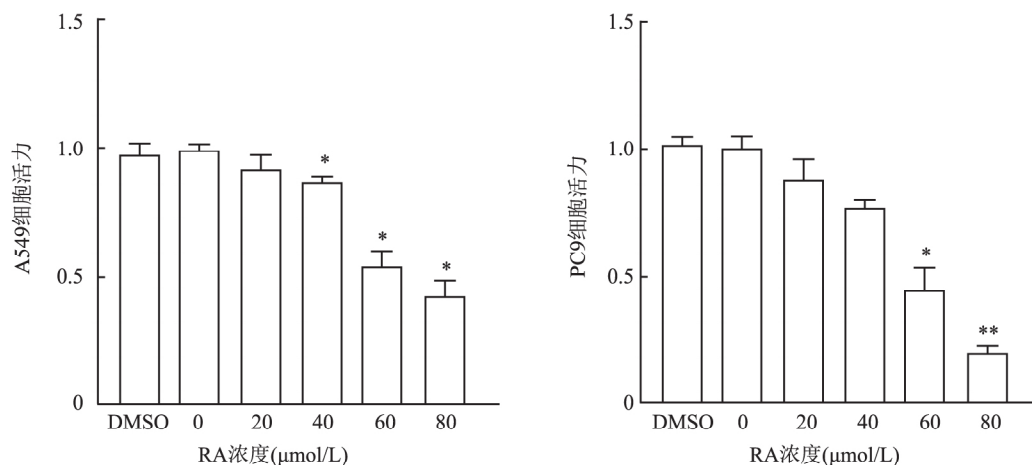


图1 RA对A549和PC9细胞增殖能力的影响

与0 μmol/L RA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

响 划痕实验结果显示,随着RA作用的时间增加,人肺腺癌A549细胞和PC9细胞的迁移面积也随之增加。其中细胞对照组向划痕的空白处迁移的面积最大,A549细胞对照组水平迁移率约为60%,PC9细胞对照组水平迁移率约为57%,各组RA作用浓度越高,A549和PC9细胞迁移的面积越小,浓度为80 μmol/L的实验组细胞基本未发生迁移,A549细胞80 μmol/L的水平迁移率仅约4%,PC9细胞80

μmol/L的水平迁移率约12%。综上提示,RA对A549和PC9细胞的水平迁移有一定的抑制作用。经统计学分析显示,各实验组与细胞对照组之间的划痕愈合率差异有统计学意义(A549: $F = 145.5$, $P < 0.05$; PC9: $F = 157.2$, $P < 0.05$)。见图2~4。

2.3 RA对于A549和PC9细胞纵向迁移能力的影响 通过对各组Transwell迁移实验的结果拍摄照片,并用Image软件对各组细胞进行计数,结果显

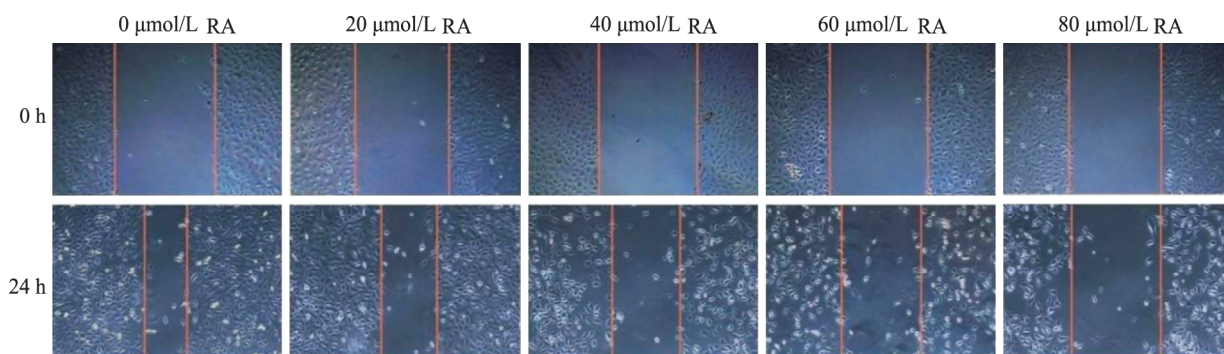


图2 不同浓度RA对于A549细胞水平迁移能力的影响 ×200

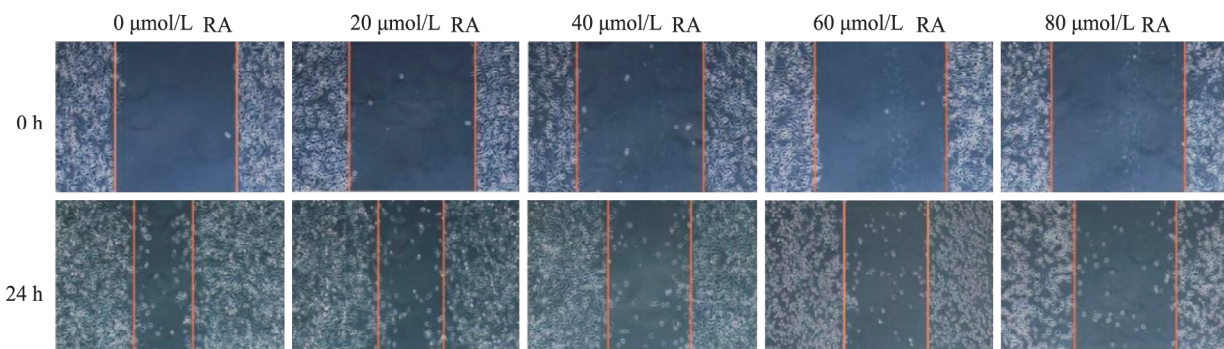


图3 不同浓度RA对于PC9细胞水平迁移能力的影响 ×200

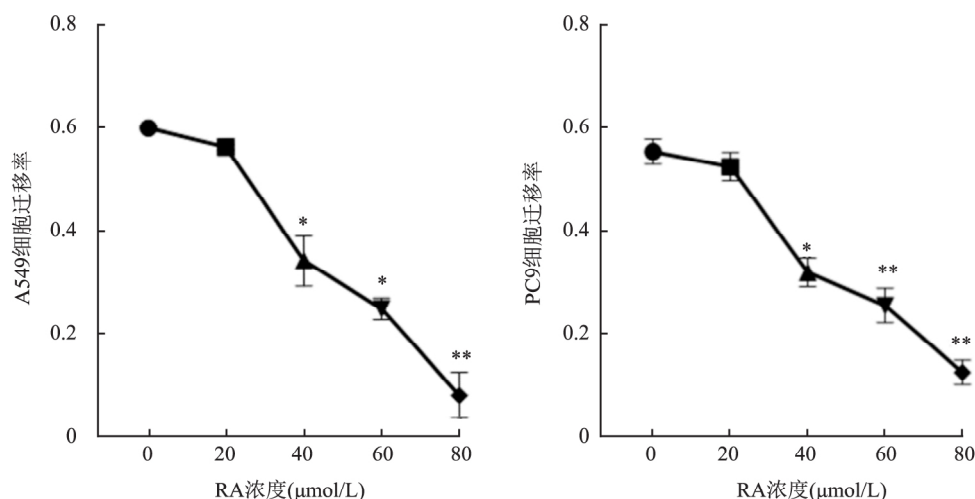


图4 不同浓度RA对于A549和PC9细胞水平迁移率的影响

与0 μmol/L RA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

示细胞对照组视野充满了细胞,而实验组RA浓度越高,穿过聚碳酸酯膜的细胞数量越少。经统计学分析,穿过聚碳酸酯膜的细胞数量在实验组与对照组之间的差异有统计学意义(A549: $F = 610.9$, $P < 0.05$; PC9: $F = 317.1$, $P < 0.05$),表明RA对

A549和PC9细胞的纵向迁移有一定的抑制作用。见图5、6。

2.4 RA对于A549和PC9细胞侵袭能力的影响

结果显示,RA浓度越高,穿过基质胶的细胞数量越少,表现为一定的浓度依赖性。通过对穿过基质

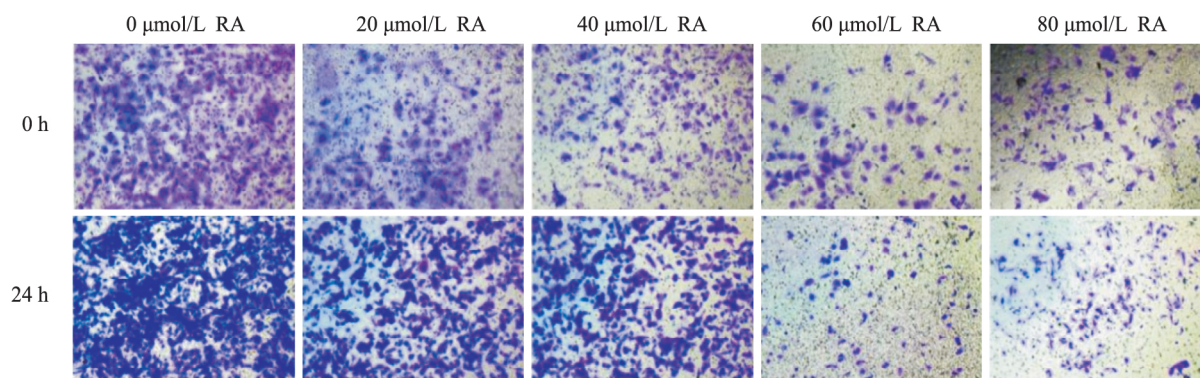


图5 不同浓度RA对A549和PC9细胞纵向迁移能力的影响 结晶紫染色 ×200

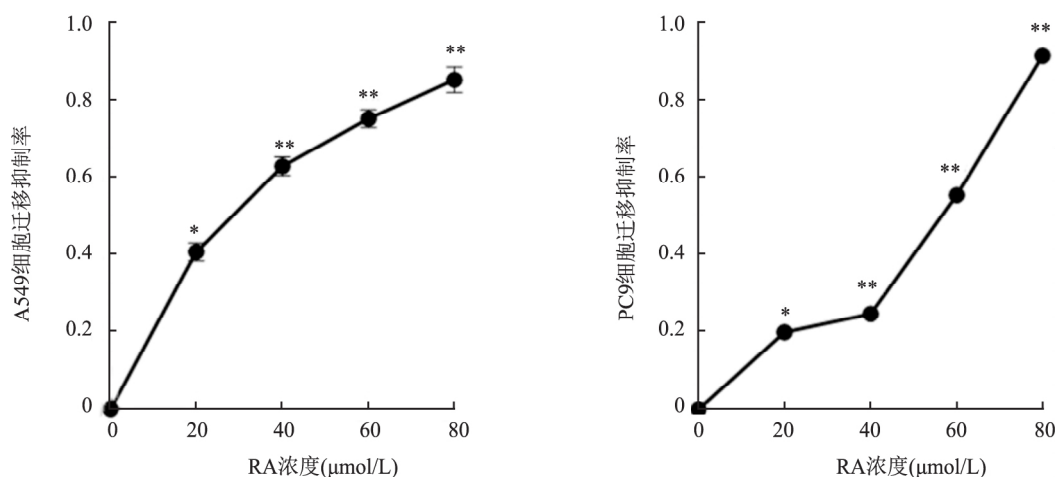


图6 不同浓度RA对A549和PC9细胞纵向迁移抑制率的影响

与0 μmol/L RA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胶的 A549 和 PC9 细胞进行计数与分析表明, 经过 RA 处理之后, 上述两种细胞的侵袭能力均被抑制, RA 浓度越高, 其对 A549 和 PC9 细胞侵袭能力的抑制作用越强。在 A549 细胞中, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间的穿过基质胶的细胞数量差异无统计学意义, 细胞对照组与 60 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间的穿过基质胶的细胞数量差异有统计学意义 ($F = 320.3$, $P < 0.05$)。在 PC9 细胞中, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间的穿过基质胶的细胞数量差异无统计学意义, 细胞对照组与其它实验组之间的穿过基质胶的细胞数量差异有统计学意义 ($F = 246.1$, $P < 0.05$)。见图 7、8。

2.5 RA 对 A549 和 PC9 细胞中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达的影响 研究结果显示, RA 浓度越高, 细胞上清液中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量越低, 呈现一定的浓度依赖性。在 A549 细胞的上清液中, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间的 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量差异无统计学意义, 细胞对照组

与其它实验组之间的 JAK2、STAT3 蛋白表达量有统计学意义 (JAK2: $F = 21.29$, $P < 0.05$; STAT3: $F = 22.16$, $P < 0.05$) ; 各 RA 浓度相邻的实验组之间 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量差异无统计学意义。在 PC9 细胞的上清液中, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 的实验组之间 JAK2 蛋白表达量差异无统计学意义, 细胞对照组与其它实验组之间的 JAK2 蛋白表达量差异具有统计学意义 (JAK2: $F = 22.73$, $P < 0.05$) ; 细胞对照组上清液中的 STAT3 蛋白表达量与实验组的差异具有统计学意义 (STAT3: $F = 21.08$, $P < 0.05$)。见表 1 和图 9、10。

2.6 RA 对 A549 和 PC9 细胞中 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平的影响 RT-PCR 实验结果显示, 作用于 A549 细胞的 RA 浓度越高, 表达的 JAK2 和 STAT3 mRNA 水平越低, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组、20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组与 40 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间 JAK2 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义, 细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组、60 $\mu\text{mol/L}$ 实验组与 80 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间 STAT3 mRNA 表达水平差

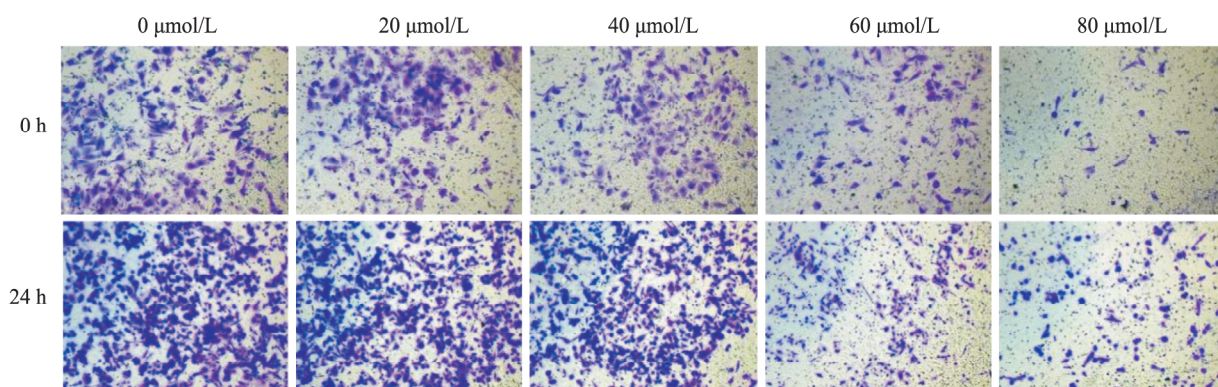


图 7 RA 对于 A549 和 PC9 细胞侵袭能力的影响 结晶紫染色 $\times 200$

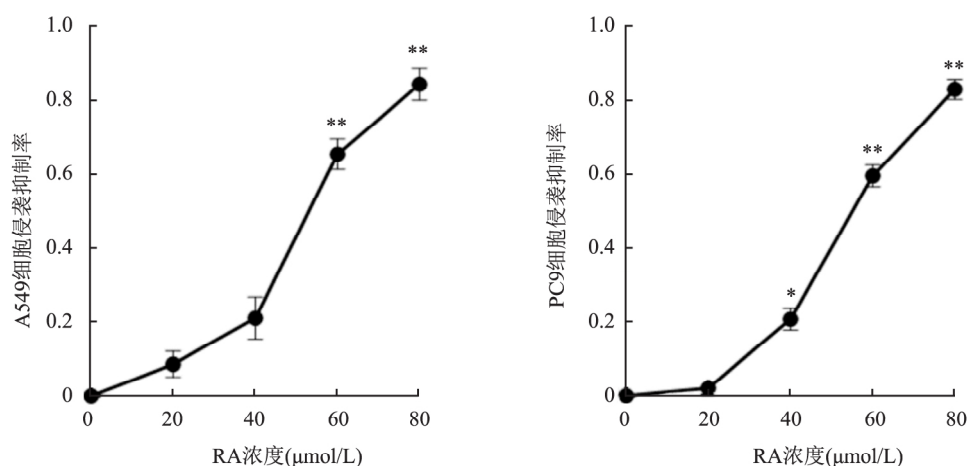


图 8 RA 对于 A549 和 PC9 细胞侵袭能力的影响

与 0 $\mu\text{mol/L}$ RA 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表1 不同浓度 RA 对人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞上清液中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达量的影响(ng/L $n=3$ $\bar{x} \pm s$)

检测项目	RA 浓度($\mu\text{mol/L}$)				
	0	20	40	60	80
A549 细胞 JAK2 表达量	13.88 $\pm$ 0.10	13.21 $\pm$ 0.10	13.04 $\pm$ 0.03*	13.00 $\pm$ 0.06*	12.92 $\pm$ 0.05*
A549 细胞 STAT3 表达量	13.93 $\pm$ 0.23	13.67 $\pm$ 0.04	13.42 $\pm$ 0.21*	13.06 $\pm$ 0.09*	12.89 $\pm$ 0.13*
PC9 细胞 JAK2 表达量	14.52 $\pm$ 0.15	14.14 $\pm$ 0.24	13.72 $\pm$ 0.08*	13.65 $\pm$ 0.10*	13.26 $\pm$ 0.24*
PC9 细胞 STAT3 表达量	12.71 $\pm$ 0.08	12.42 $\pm$ 0.13*	12.21 $\pm$ 0.11*	12.11 $\pm$ 0.10*	12.02 $\pm$ 0.10*

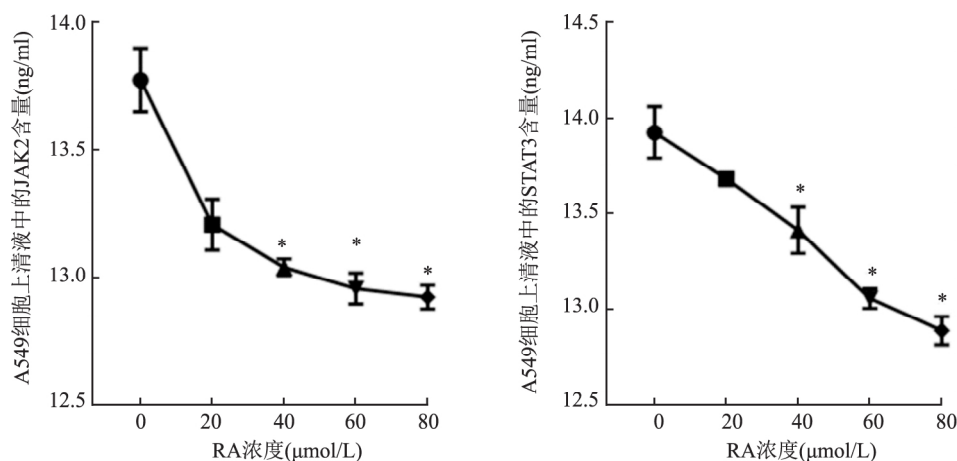
与 0 $\mu\text{mol/L}$ RA 组比较: * $P < 0.05$ 

图9 不同浓度 RA 对于 A549 细胞上清液中 JAK2 和 STAT3 含量的影响

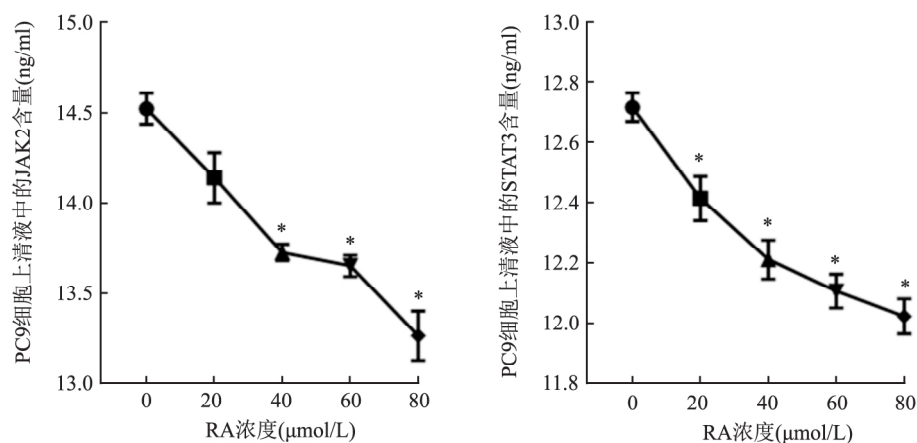
与 0 $\mu\text{mol/L}$ RA 组比较: * $P < 0.05$ 

图10 不同浓度 RA 对于 PC9 细胞上清液中 JAK2 和 STAT3 含量的影响

与 0 $\mu\text{mol/L}$ RA 组比较: * $P < 0.05$

异无统计学意义,其它各组之间 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平差异有统计学意义 (JAK2: $F = 40.44$, $P < 0.05$; STAT3: $F = 32.04$, $P < 0.05$)。在 PC9 细胞中,细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间 JAK2 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义,细胞对照组与 20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组、60 $\mu\text{mol/L}$ 实验组与 80 $\mu\text{mol/L}$ 实验组之间 STAT3 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义,除此之外各组之间的 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平差异有统计学意义

(JAK2: $F = 117.9$, $P < 0.05$; STAT3: $F = 129.0$, $P < 0.05$)。见图 11、12。

3 讨论

据文献^[10]报道,RA 可通过诱导细胞凋亡、诱导 p53 过表达、阻滞细胞周期、抑制 DNA 的合成及干扰相关信号转导通路等多种机制来抑制肿瘤细胞的生长并促进其凋亡。但是 RA 对人肺腺癌细胞作用的报道罕见。该研究结果表明 RA 对人肺腺癌

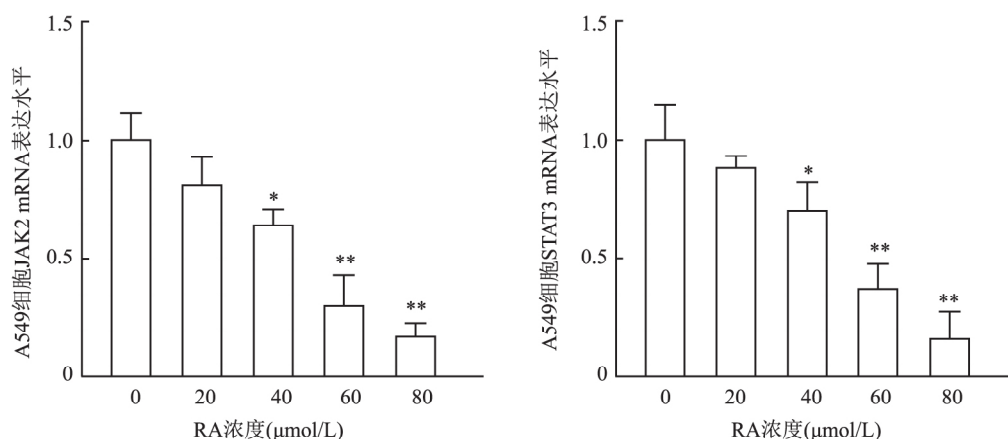


图 11 RA 对于 A549 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平的影响

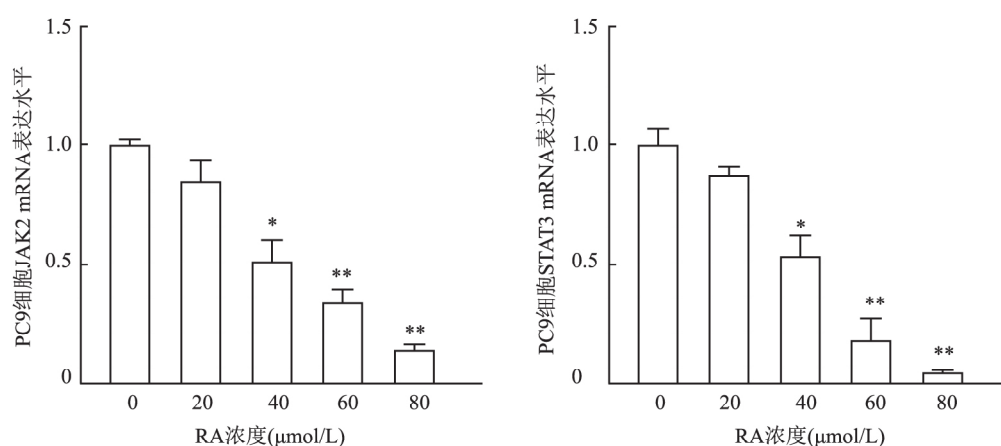
与 0 μmol/L RA 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图 12 RA 对于 PC9 细胞 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达水平的影响

与 0 μmol/L RA 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A549 细胞和 PC9 细胞的增殖、水平迁移、纵向迁移和侵袭的能力具有一定的抑制作用,而且随着 RA 作用浓度的增加,RA 对 A549 细胞和 PC9 细胞增殖、迁移、侵袭能力的抑制作用也越强,即具有一定的浓度依赖性。这一特点与 RA 对结直肠腺癌、乳腺癌、肝癌等肿瘤细胞的抑制作用相吻合。

免疫治疗给患者带来的生存益处很多,但是对免疫药物敏感而能够从中受益的人群有限,且肺癌细胞易对免疫药物产生耐药性,开发新的有效的抗肿瘤药物十分必要,中药提取物在肿瘤治疗方面的研究逐渐增多。研究^[11]显示苦参的活性成分槐果碱,具有抑制肿瘤增殖、迁移和诱导肿瘤细胞凋亡等功能。

生物体内包含了很多从细胞膜到细胞核的有效信号传导途径。但是其中的 JAK/STAT 通路是结构上最简单的范例之一,通过该通路可以实现跨膜受体到细胞核的直接通信。JAK 在上游细胞因子等的作用之下可以激活自身的磷酸化,也可以活化下游

的 STATs,STATs 继而直接结合细胞内的 DNA 并参与基因表达的调控。JAK2/STAT3 信号通路在各种癌症发生和发展阶段中起着至关重要的作用,并且活性 JAK2 和 STAT3 通常与更差的预后相关^[12]。本研究未用 Western blot 对 JAK2 和 STAT3 进行检测,进一步研究可考虑选用以检测 JAK2 和 STAT3 的磷酸化活性水平。

综上,RA 在体外实验中对于人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均具有抑制作用,且呈一定的浓度依赖性。其作用机制可能与细胞 JAK2/STAT3 通路的负向调控有关。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–49.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

- for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin ,2018 ,68 (6) : 394 – 424.
- [3] Li X X , Yuan R , Wang Q Q , et al. Rotundic acid reduces LPS-induced acute lung injury *in vitro* and *in vivo* through regulating TLR4 dimer [J]. Phytother Res ,2021 ,35(8) : 4485 – 98.
- [4] Hsu Y , Hung Y , Hu L , et al. Anti-diabetic effects of madecassic acid and rotundic acid [J]. Nutrients ,2015 ,7(12) : 10065 – 75.
- [5] Yan Z , Wu H , Yao H , et al. Rotundic acid protects against metabolic disturbance and improves gut microbiota in Type 2 diabetes rats [J]. Nutrients ,2019 ,12(1) : 67 – 83.
- [6] Liu H J , Cao S T , Wen B Y , et al. Rotundic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis *via* SREBP-1c/ SCD1 signaling pathway and modulating gut microbiota [J]. Int Immunopharmacol ,2021 ,99: 108065.
- [7] Wang Z F , Sun W Y , Yu D H , et al. Rotundic acid enhances the impact of radiological toxicity on MCF-7 cells through the ATM/ p53 pathway [J]. Int J Oncol ,2018 ,53(5) : 2269 – 77.
- [8] Roy G , Guan S , Liu H , et al. Rotundic acid induces DNA damage and cell death in hepatocellular carcinoma through AKT/ mTOR and MAPK pathways [J]. Front Oncol ,2019 ,9: 54550.
- [9] Feng Y , Liu X , Han Y , et al. Rotundic acid regulates the effects of Let-7f-5p on Caco2 cell proliferation [J]. Anticancer Agents Med Chem ,2021 ,21(7) : 902 – 9.
- [10] Nan M L , Wang X , Li H J , et al. Rotundic acid induces Cas3-MCF-7 cell apoptosis through the p53 pathway [J]. Oncol Lett ,2019 ,17(1) : 630 – 37.
- [11] 符丹丹 , 段丽娜 , 柏玉举 , 等. 槐果碱对肺癌 A549 细胞增殖凋亡的作用机制 [J]. 安徽医科大学学报 ,2021 ,56(7) : 1052 – 6.
- [12] Reisinger S N , Sideromenos S , Horvath O , et al. STAT3 in the dorsal raphe gates behavioural reactivity and regulates gene networks associated with psychopathology [J]. Mol Psychiatry ,2021 ,26(7) : 2886 – 99.

Effect of Rotundic acid on proliferation , migration and invasion of human lung adenocarcinoma cells

Yang Caimei¹ , Shu Jun¹ , Zheng Jiangxia¹ , Shen Jilong²

(¹Dept of Respiratory Medicine , The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230011;

²The Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Anhui Province the Key Laboratory of Zoonoses of High Institutions in Anhui , Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of Rotundic acid (RA) on proliferation , migration and invasion ability of human lung adenocarcinoma cells as well as its possible mechanisms. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 and PC9 cells were divided into control group , blank control group , solvent group and 20 , 40 , 60 , 80 $\mu\text{mol/L}$ RA groups. CCK-8 assay and scratch assay were used to detect the proliferation and horizontal migration of human lung adenocarcinoma cells. Transwell migration assay and Transwell invasion assay were used to detect the longitudinal migration and invasion ability of A549 and PC9 cells in each group. The protein expression levels of janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in the supernatants of A549 and PC9 cells were detected by ELISA. The mRNA expression levels of JAK2 and STAT3 were detected by RT-PCR. Statistical analysis was made on the differences among groups in each index. **Results** After RA treatment on human lung adenocarcinoma cells , compared with the control group , the proliferation activity of A549 and PC9 cells in the experimental groups decreased ($P < 0.05$) , the number of cells crossing polycarbonate membrane and matrix glue decreased ($P < 0.05$) , the expression of JAK2 and STAT3 proteins in cell supernatant decreased ($P < 0.05$) , and the mRNA expression of JAK2 and STAT3 decreased ($P < 0.05$) . The decrease of the above indices was concentration-dependent and had statistical significance ($P < 0.05$) . Compared with the control group , the proliferation activity of A549 and PC9 cells in the solvent group showed no significant difference. **Conclusion** RA may inhibit the proliferation , migration and invasion of human lung adenocarcinoma A549 and PC9 cells *in vitro* , possibly through the inhibition of JAK2/STAT3 pathway.

Key words Rotundic acid; human lung adenocarcinoma cells; proliferation; migration; invasion; janus kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3