论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0638-04

JAK2/STAT3通路在表皮生长因子诱导结肠癌细胞侵袭迁移中的作用

徐建华,张 超,唐 波,郝迎学,刘 涛,陈 军,崔 浩 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心)

[摘要] **目的** 探讨JAK2/STAT3通路在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导结肠癌细胞侵袭迁移中的作用。**方法** 以人结肠癌细胞株LoVo为研究对象,分为对照组、表皮生长因子处理组(EGF组)、表皮生长因子与JAK2激酶抑制剂AG490共处理组(EGF+AG490组)。采用免疫荧光和Western blot检测各组LoVo细胞E钙粘素蛋白、磷酸化STAT3表达水平;Transwell法检测细胞侵袭能力;细胞划痕实验检测细胞迁移能力。**结果** 细胞划痕实验对照组细胞划痕闭合约38%,EGF+AG490组细胞划痕闭合约40%,而EGF组闭合约80%。EGF组显著高于另2组($P<0.05$);体外侵袭实验显示对照组透膜细胞数为(21.24±2.65)/视野,EGF+AG490组为(23.19±3.50)/视野,EGF组为(55.08±2.14)/视野。EGF组显著高于另2组($P<0.05$);与EGF+AG490组结肠癌LoVo细胞相比,EGF组细胞P-STAT3表达增加72.4%,E-cadherin蛋白表达降低68.5%($P<0.05$);免疫荧光显示EGF组细胞E-cadherin向细胞质内移位。**结论** EGF可通过JAK2/STAT3通路调节E-cadherin在结肠癌LoVo细胞中的表达和定位,增强结肠癌细胞的侵袭迁移能力。

[关键词] 结肠癌;表皮生长因子;JAK2/STAT3通路;E钙粘素

[中图法分类号] R73-37; R730.23; R735.35 **[文献标志码]** A

Role of JAK2/STAT3 pathway in EGF-induced invasion and migration of human colon cancer cells

Xu Jianhua, Zhang Chao, Tang Bo, Hao Yingxue, Liu Tao, Chen Jun, Cui Hao (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of JAK2/STAT3 pathway in the invasion and migration of human colon cancer cells induced by epidermal growth factor (EGF). **Methods** The human colon cancer cell LoVo were divide into 3 groups, control group, EGF treatment group (10 ng/ml, EGF group), EGF and AG490 (an inhibitor of JAK2) treatment group (10 ng/ml and 50 μmol/L respectively, EGF+AG490 group). The migration of LoVo cells was measured with scratch assay, and invasion was measured by Transwell chamber. Expressions of P-STAT3 and E-cadherin proteins in the cells were detected by Western blot analysis and immunofluorescence staining. **Results** Compared with the control and EGF+AG490 group, EGF increased the wound healing [38% *vs* 40% *vs* 80%, $P<0.05$], enhanced the expression of P-STAT3 by 72.4%, and decreased the expression of E-cadherin by 68.5%. The invasion assay demonstrated the number of LoVo cells in EGF group was larger than those of EGF+AG490 and control group (55.08±2.14 *vs* 23.19±3.50 *vs* 21.24±2.65, $P<0.05$). In EGF group, E-cadherin was located in the cytoplasm. **Conclusion** EGF regulates the expression and location of E-cadherin in LoVo cells through JAK2/STAT3 pathway, and increases the migration and invasion of human colon cancer cells.

[Key words] colon cancer; epidermal growth factor; JAK2/STAT3; E-cadherin

Supported by the General Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MB243) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2005BB5291). Corresponding author: Zhang Chao, E-mail: zhangchao5642@163.com

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,发病率逐年上升。虽然在早期诊断、手术方法、化学治疗等方面取得了重大进步,但其5年生存率仍不足60%[1]。结

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB243);重庆市自然科学基金(CSTC2005BB5291)

[通信作者] 张 超,E-mail: zhangchao5642@163.com

肠癌细胞浸润转移是造成患者死亡的主要原因。在癌细胞侵袭转移初始阶段,细胞间的黏附降低,有利于癌细胞的浸润转移。E钙粘素(E-cadherin)在维持上皮细胞间黏附有重要作用,其表达减弱或缺失能促进癌细胞转移[2]。研究发现,表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)能协同STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)促进癌细胞侵袭转移[3]。JAK2/STAT3(Janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription 3)是多种信号通路的汇聚点,与肿瘤发生密切相关[4]。目前尚不明确EGF能否通过该通路调节结肠癌细胞侵袭转移。本研究采用EGF和JAK2激酶抑制剂AG490分别处理结肠癌LoVo细胞,检测结肠癌细胞迁移、侵袭力及P-STAT3、E-cadherin表达,探讨EGF促进结肠癌细胞侵袭迁移的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株LoVo购自中国科学院上海细胞库,EGF、AG490购自Sigma公司。兔抗E-cadherin多克隆抗体(H-108)、罗丹明标记山羊抗兔IgG、P-STAT3鼠多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗鼠IgG、兔抗β-actin购自北京中杉生物技术公司。LSM系统购自德国Zeiss,型号为510META。

1.2 方法

1.2.1 结肠癌细胞培养 人结肠癌细胞株LoVo复苏后在含10%小牛血清的DMEM培养基中生长,培养条件为37 ℃,5% CO_2。每1~2天换液1次,细胞生长良好,取对数生长细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 细胞分为对照组:细胞在常规培养基中培养,进入对数生长期后用于实验;EGF组:将EGF用DMEM培养液调整浓度至10 ng/ml,细胞进入对数生长期后加入处理24 h;EGF+AG490组:DMEM培养液中加入EGF和AG490,调整浓度分别为10 ng/ml、50 μmol/L[5],细胞进入对数生长期后用于实验。

1.2.3 侵袭实验 将Matrigel胶按40 μl/孔均匀的铺在Transwell Chamber膜上。取对数生长细胞消化离心后调整细胞密度为1×10^5/ml,分别取0.4 ml接种到成胶的Transwell Chamber,分成对照组、EGF组和EGF+AG490组,并将Transwell Chamber置于24孔板内,同时在Transwell小室下层加入20%小牛血清DMEM培养基,每孔0.6 ml,培养24 h后取出Transwell Chamber,用棉签头擦掉Matrigel,PBS液洗3次,95%乙醇固定。常规HE染色,揭下Transwell Chamber膜反贴在载玻片上。结果判定:250倍光镜下,计数每膜上下左右中5个随机不同视野的穿膜细胞数,取均值,每组平行设3个小室。实验重复3次。

1.2.4 细胞划痕实验 在6孔板中加入细胞悬液,贴壁形成单层细胞后,用消毒20 μl枪头均匀划4条横线,用PBS洗细胞3次,去除划下的细胞。分3组:对照组加入无血液培养基;EGF组加入含10 ng/ml EGF的无血清培养基;EGF+AG490组加入含10 ng/ml EGF+50 μmol/L AG490的无血清培养基。放入37 ℃、5% CO_2培养箱培养。在不同时间点显微镜下拍照,测量划痕闭合宽度。

1.2.5 细胞免疫荧光染色 结肠癌细胞在24孔板内爬片,按实验分组方法处理细胞24 h。用4%甲醛固定20 min,PBS冲洗,5%牛血清白蛋白封闭,0.1% Triton X-100透膜处理30 min。1∶200抗体4 ℃湿盒孵育,过夜。PBS冲洗3次,带荧光二抗孵育1 h,DAPI染色10 min,甘油封片,激光共聚焦下摄像。

1.2.6 Western blot检测细胞中P-STAT3、E-cadherin的表达 常规培养LoVo细胞,细胞进入对数生长期后,按实验分组方法处理结肠癌细胞24 h,分别收集各组细胞约5×10^6个,用RIPA细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。用Brodford法测定蛋白含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维膜。常规封闭、洗膜后与1∶1 000一抗4 ℃孵育过夜,洗膜后加入1∶1 000对应的二抗Ig 37 ℃孵育4 h。化学发光法显色,阳性条带以Gel pro 4.0版凝胶光密度分析软件进行分析,测其积分光密度值(IOD)。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SSPS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 AG490对LoVo细胞迁移能力的影响

采用细胞划痕实验检测各组细胞迁移性,细胞划痕后加入无血清培养基,能排除细胞增殖的影响。结果见图1。24 h后,观察到对照组细胞划痕闭合约38%,EGF+AG490组细胞划痕闭合约40%,而EGF组闭合约80%。EGF组显著高于另2组($P<0.05$)。表明EGF可促使结肠癌细胞迁移,而AG490可阻止细胞迁移。

2.2 结肠癌细胞体外侵袭能力的变化

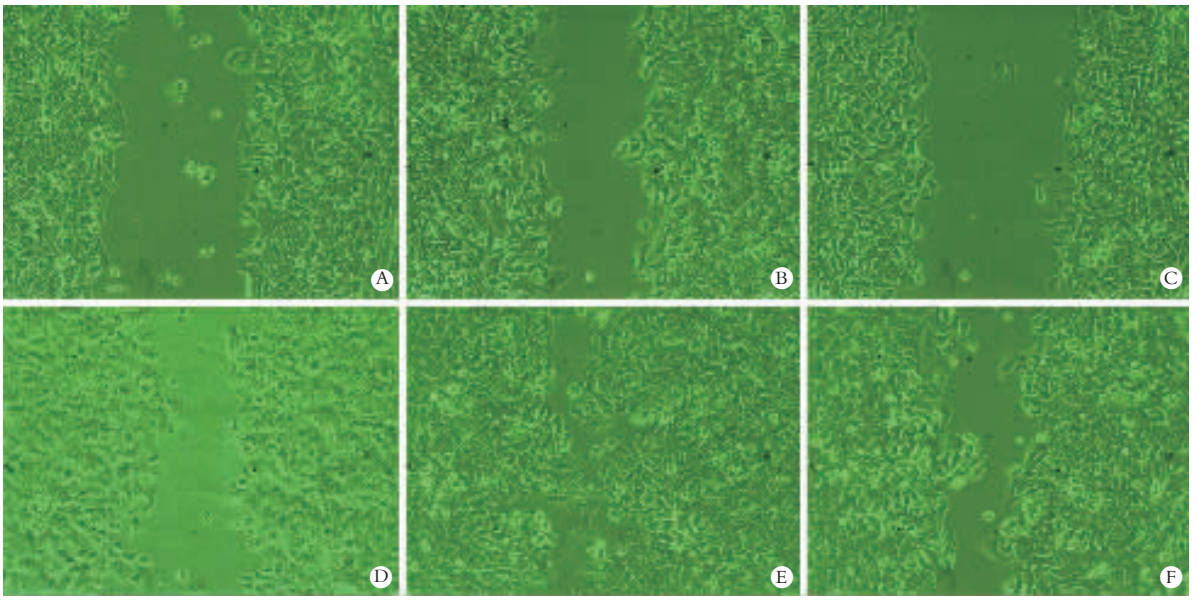
用EGF、EGF+AG490分别处理结肠癌细胞24 h后,采用Transwell小室检测结肠癌细胞体外侵袭能力的变化。结果见图2。对照组透膜细胞数为(21.24±2.65)/视野,EGF+AG490组为(23.19±3.50)/视野,EGF组为(55.08±2.14)/视野。EGF组显著高于另2组($P<0.05$)。说明加入AG490后,EGF促进结肠癌细胞侵袭的能力受到抑制。

2.3 细胞免疫荧光

EGF组的LoVo细胞形态呈多角形,形成伪足,E-cadherin蛋白定位分布于细胞质内;而对照组和EGF+AG490组细胞多呈类圆形,伪足少,E-cadherin多分布于细胞膜。具体见图3。

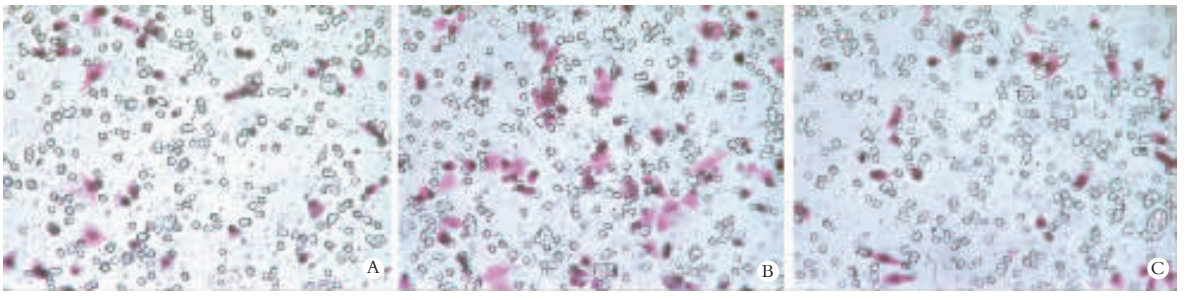
2.4 Western blot检测P-STAT3、E-cadherin表达

由图4可见,分组处理LoVo细胞24 h后,EGF组结肠癌细胞中P-STAT3表达量高于对照组,增加约72.4%($P<0.05$);EGF+AG490组和对照组无差异($P>0.05$)。与对照组结肠癌细胞相比,EGF组E-cadherin蛋白表达抑制率为68.5%($P<0.05$),而EGF+AG490组无统计学差异($P>0.05$)。证实AG490能阻止STAT3的活化,EGF可通过JAK2/STAT3信号通路降低结肠癌细胞中E-cadherin的表达,在结肠癌细胞的侵袭转移过程中起关键作用。



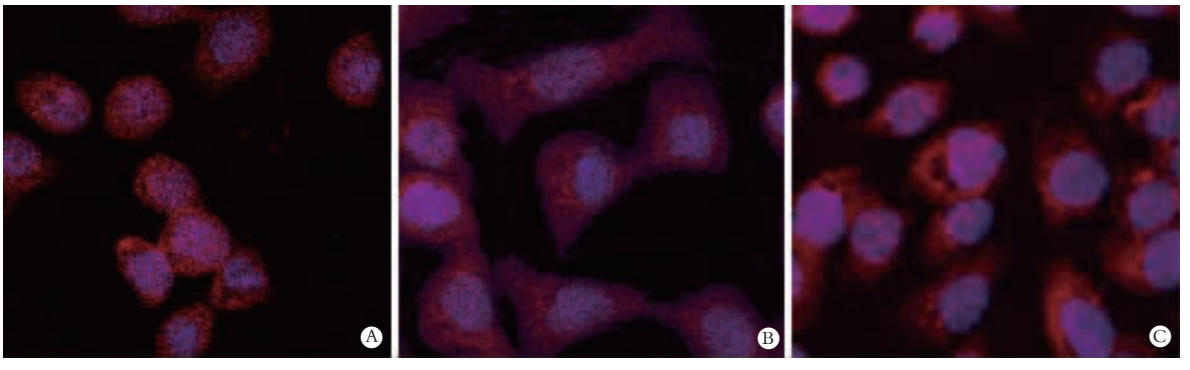
A、B、C：培养0 h；D、E、F：培养24 h；A、D：对照组；B、E：EGF组；C、F：EGF + AG490组

图1 AG490对LoVo细胞迁移能力的影响 （LM ×200）



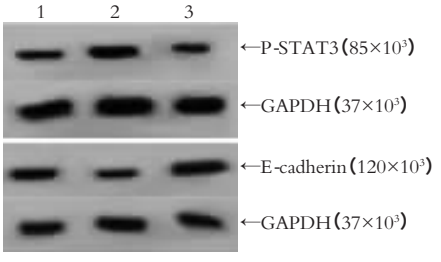
A：对照组；B：EGF组；C：EGF + AG490组

图2 结肠癌LoVo细胞体外侵袭力变化 （HE ×200）



A：对照组；B：EGF组；C：EGF + AG490组

图3 免疫荧光检测结肠癌LoVo细胞E-cadherin表达 （激光共聚焦 ×400）



1：对照组；2：EGF组；3：EGF + AG490组

图4 P-STAT3和E-cadherin在结肠癌细胞中的表达

3 讨论

侵袭和转移是癌细胞的一个重要特征，也是造成90%癌症患者死亡的原因[6]。结肠癌的侵袭、转移多是通过血管和淋巴管到达远处器官。首先癌细胞从原发灶中脱离，移动性增加，侵入周围组织，进入血管或淋巴管，到达远处器官后定植形成转移灶。在这一系列过程中，有各种炎性介质和生长因子的参与[7,8]。

其中,EGF是一种重要的促进因子,它与细胞膜配体结合后,形成磷酸化二聚体,活化细胞增殖和存活相关的通路,如PI3K/Akt、Stat、Src、MAPK[9]。但EGF能否通过JAK2/STAT3通路产生作用尚不清楚。

STAT3是STATs蛋白质家族中的一员,细胞外的多种生长因子和炎性介质可使其磷酸化为活化状态,组成性活化STAT3(P-STAT3)在许多肿瘤细胞系和大量人类肿瘤中发现。在结肠腺癌中,P-STAT3是肿瘤浸润程度和预后不良的一个重要相关因素[10]。在胰腺癌组织中,P-STAT3高表达,且与肿瘤分期和淋巴结转移密切相关。同时,高侵袭力的胰腺癌细胞株SW1990比低侵袭力细胞株CaPan-2具有更高的STAT3-DNA结合性和P-STAT3蛋白表达[11]。刘伟等[12]用诱饵寡核苷酸特异性抑制胃癌细胞STAT3的DNA结合活性后,发现人胃癌细胞生长受到抑制,降低荷瘤鼠的腹水产生量和死亡率,延长荷瘤鼠的生存期,表现出明显的胃癌抑制作用。以上研究说明,P-STAT3在肿瘤进程中有着重要作用。本实验中我们用AG490抑制JAK2活性,Western blot检测P-STAT3表达明显降低。证实JAK2能介导EGF活化STAT3。在细胞划痕实验和Transwell实验中,EGF组LoVo细胞侵袭迁移能力明显高于对照组和EGF + AG490组($P<0.05$)。由此可见,JAK2/STAT3通路在EGF诱导结肠癌细胞中起着重要作用。

EGF是通过何种下游分子来促进结肠癌细胞侵袭转移?我们用AG490阻断JAK2/STAT3信号信号通路后,检测E-cadherin表达下降,免疫荧光显示E-cadherin从细胞膜上向细胞质内移位。E-cadherin是一种细胞跨膜糖蛋白,邻近细胞的E-cadherin胞外区相互联接,胞内区通过β-catenin或γ-catenin与细胞骨架相连,维持和形成细胞间黏附连接[13]。在小鼠胚胎发育早期,敲除E-cadherin基因后可致胚胎死亡,癌进展过程中E-cadherin下调与肿瘤的恶性行为及不良预后相关。在动物实验中,过表达E-cadherin可降低肿瘤的侵袭力,阻止转移灶形成,说明E-cadherin在组织发育和肿瘤进展中均有重要作用[14]。推测E-cadherin表达和定位变化可能产生的作用有:①E-cadherin减少,使细胞间黏附性降低,有利于细胞从原发灶脱落及移动。②E-cadherin-β-catenin复合体解聚,细胞质内β-catenin向核内移行,使β-catenin在核内聚积,与TCF形成复合体。β-catenin-TCF复合体可促进肿瘤基因的转录。③E-cadherin胞吞入细胞质后,可能作为一种信号分子,调节其他肿瘤相关分子的表达。

本研究结果显示:表皮生长因子可通过JAK2/STAT3信号通路降低E-cadherin的表达,并促使其向细胞质内移位,从而增强结肠癌细胞的迁移侵袭能力;AG490可有效阻断JAK2/STAT3信号通路,抑制结肠癌细胞的迁移侵袭。但细胞的侵袭转移是一个复杂过程,细胞内各信号通路相互联系、相互作用。因此,还需进一步的动物和临床试验来发现结肠癌侵袭转移的机制及治疗方法。

参考文献:

[1] Labianca R, Beretta G, Gatta G, *et al*. Colon cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 51(2): 145-170.
[2] Sawada K, Mitra A K, Radjabi A R, *et al*. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis *via* alpha 5-integrin, which is a therapeutic target[J]. Cancer Res, 2008, 68(7): 2329-2339.
[3] Lo H W, Hsu S C, Xia W, *et al*. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells *via* up-regulation of TWIST gene expression[J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 9066-9076.
[4] Spano J P, Milano G, Rixe C, *et al*. JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: a new biological target with therapeutic implications[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(16): 2668-2670.
[5] Colomiere M, Findlay J, Ackland L, *et al*. Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of alpha6beta1 integrin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(5): 1034-1045.
[6] Leber M F, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 881-895.
[7] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895-904.
[8] 李竹林,朱明才,董蒲江. 结肠癌中VEGF-D和uPA的表达与侵袭转移的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2146-2149.
[9] Lockhart A C, Berlin J D. The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy[J]. Semin Oncol, 2005, 32(1): 52-60.
[10] Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, *et al*. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(6): 1445-1451.
[11] 黄陈, 裘正军, 胡宏惠, 等. P-STAT3与E-cadherin在胰腺癌中的表达及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(4): 381-386.
[12] 刘伟, 余佩武, 安杰, 等. STAT3诱饵寡核苷酸抑制人胃癌细胞裸鼠腹腔种植的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 599-602.
[13] Yamada S, Pokutta S, Drees F, *et al*. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex[J]. Cell, 2005, 123(5): 889-901.
[14] Baranwal S, Alahari S K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(1): 6-11.

(**收稿**:2009-10-21;**修回**:2009-12-29)
(编辑 王小宴)