论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1960-04

Janus 激酶抑制剂 AG490 对人肝癌 SMMC-7721 细胞侵袭转移的影响

刘 波,王洪林,宋立文 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 研究 Janus 激酶抑制剂 AG490 对人肝癌 SMMC-7721 细胞侵袭转移能力的影响,探讨 JAK2/STAT3 信号通路在肝癌侵袭调控中的作用。**方法** 实验分为对照组、实验组(5、10 μmol/L AG490 处理的 SMMC-7721 细胞)。采用 Transwell 小室检测肝癌细胞的侵袭能力,RT-PCR 检测 MMP-2 mRNA 和 VEGF mRNA 表达的变化,Western blot 检测 STAT3、MMP-2、VEGF 蛋白的表达和活化。**结果** AG490 处理人肝癌细胞 48 h 后,对照组透膜细胞数为(74.6±6.3)/视野,5 μmol/L AG490 组透膜细胞数为(58.2±7.2)/视野,10 μmol/L 组透膜细胞数为(38.2±5.7)/视野,实验组与对照组相比,细胞侵袭人工基底膜的能力显著降低($P<0.05$);与对照组相比,RT-PCR 显示实验组 MMP-2 mRNA 和 VEGF mRNA 表达降低($P<0.05$),Western blot 显示实验组 p-STAT3 的活化降低,MMP-2 及 VEGF 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 阻断 STAT3 蛋白的激活,能够降低 MMP-2 及 VEGF 基因蛋白的表达,抑制肝癌细胞在体外的侵袭能力。

[关键词] 肝癌;AG490;侵袭;转移;JAK2/STAT3 信号通路

[中图法分类号] R977.6;R735.7;R966 [文献标志码] A

Effect of Janus kinase inhibitor AG490 on invasion and metastasis of human liver cancer SMMC-7721 cells

Liu Bo, Wang Honglin, Song Liwen (Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of Janus kinase (JAK) inhibitor AG490 on the invasion and metastasis of human liver cancer SMMC-7721 cells and the role of JAK-STAT3 signaling pathway in regulation of liver cancer invasion. **Methods** SMMC-7721 cells were divided into control group, 5 μmol/L AG490 treatment group and 10 μmol/L AG490 treatment group. Invasion and metastasis of liver cancer SMMC-7721 cells were detected with transwell chamber. Expression of MMP-2 mRNA and VEGF mRNA in liver cancer SMMC-7721 cells was detected by RT-PCR. Expression and activation of STAT3, MMP-2 and VEGF proteins in liver cancer SMMC-7721 cells was detected by Western blotting. **Results** The number of membrane-permeating SMMC-7721 cells was 74.6±6.3, 58.2±7.2, and 38.2±5.7 in control group, 5 μmol/L AG490 treatment group, and 10 μmol/L AG490 treatment group, respectively, 48 h after AG490 treatment. The ability of SMMC-7721 cells to invade the artificial basement membrane was significantly lower in two AG490 treatment groups than in control group ($P<0.05$). RT-PCR showed that the expression level of MMP-2 mRNA and VEGF mRNA was significantly lower in two AG490 treatment groups than in control group ($P<0.05$). Western blotting showed that the activation level of STAT3 protein and the expression level of MMP-2 and VEGF were lower in two AG490 treatment groups than in control group ($P<0.05$). **Conclusion** AG490 can down-regulate the expression of MMP-2 and VEGF by blocking the activation of STAT3, thus inhibiting the invasion of liver cancer SMMC-7721 cells *in vitro*.

[**Key words**] liver cancer; AG490; tumor invasion; tumor metastasis; JAK/STAT3 signaling pathway

Corresponding author: Wang Honglin, Tel: 86-23-89107534, E-mail: whlcqykd@163.com

肝癌的转移复发是导致临床肝癌低生存率的重要原因之一。JAK2/STAT3 信号通路在细胞的侵袭转移过程中具有重要的意义,已证实与多种肿瘤的转移有关[1-4]。AG490 是一种结构类似于酪氨酸的人工合成的脂类衍生物,为 JAK2 的特异性抑制剂。本研究使用 JAK2 抑制剂 AG490 作用肝癌 SMMC-7721 细胞后,观察其对 SMMC-7721 细胞转移侵袭能力的影响,探讨

[通信作者] 王洪林,电话:(023)89107534,E-mail: whlcqykd@163.com

JAK2/STAT3 信号通路在肝癌侵袭转移调控中的作用和可能的机制，为肝癌的治疗寻找新的策略和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞购自中科院上海细胞所，AG490 购自 Cayman 公司，RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司，Transwell 小室购自德国 Greiner 公司，STAT3 单抗、p-STAT3 单抗、MMP-2 单抗、VEGF 单抗购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 SMMC-7721 细胞接种于 50 ml 培养瓶，培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640，置培养瓶于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱中培养。细胞贴壁生长满 80% 传代，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞。实验分为对照组、实验组（5、10 μmol/L AG490 处理的 SMMC-7721 细胞）。

1.2.2 MTT 法检测 AG490 对 SMMC-7721 细胞生长的影响及侵袭实验药物浓度选择 常规培养 SMMC-7721 细胞进入对数期后，配制成 5×10^4/ml 的细胞悬液，取 3 块 96 孔板，每孔加入 200 μl 细胞悬液，实验组分别加入终浓度为 5、10、25、50、100 μmol/L 的 AG490 培养液，各组溶液中 DMSO 体积分数不超过 0.1%；对照组加入 PBS 溶液，每组设 5 个复孔，置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱内分别培养 24、48、72 h 后，分别加入 MTT 20 μl（5 mg/ml）继续培养 4 h 后，吸净孔内液体加入 DMSO 150 μl，酶标仪测定光密度值[D (570)]。

1.2.3 细胞侵袭试验 按照细胞侵袭测定试剂盒操作说明，将 Matrigel 按照 40 μl/孔均匀铺在 Transwell 小室滤膜上，置小室于 24 孔板孔内，将对照组和实验组 SMMC-7721 细胞（AG490 处理 48 h）调整成 1×10^5/ml 的细胞悬液，分别取 0.4 ml 细胞悬液加入成胶的 Transwell 小室上室内，下室加入 0.6 ml 培养液。置 24 孔板于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的细胞培养箱内孵育 24 h。取出 Transwell 小室，用棉签擦去滤膜上室面未穿膜细胞，滤膜下室面细胞用 95% 乙醇固定，常规 HE 染色。400 倍高倍镜下任取 5 个不重叠视野观察计算穿膜细胞数目。

1.2.4 RT-PCR 检测 对照组和实验组细胞处理 48 h 后，按照 TaKaRa RNAiso 提取试剂盒分别提取各组总 RNA，提取样本经紫外分光光度计测定 D(570) 值为 1.8～2.0。逆转录反应按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明操作，分别检测各实验组和对照组肝癌细胞 MMP-2、VEGF 基因的表达。PCR 引物用 Primer Premier5.0 软件设计，由上海生工合成。MMP-2 序列上游：5′-ATGCCTTTGCTCGTGCCTTCC-3′，下游：5′-ACTCCTGATGCTG-GCGCTGTT-5′，产物长度为 556 bp；VEGF 序列上游：5′-CCAG-GAAAGACTGATACAGAACG-3′，下游：5′-CTCCCAACTCAAGTC-CACAGC-3′，产物长度为 453 bp；GAPDH 序列上游：5′-AGAAG-GCTGGGGCTCATTTG-3′，下游：5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′，产物长度为 258 bp。PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s（MMP-2 57 ℃，VEGF 54 ℃，GAPDH 59 ℃）退火 30 s，72 ℃ 1 min，扩增 30 个循环；72 ℃ 5 min。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳，电泳液为 2% TAE。Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果采用 Quantity One 软件进行灰度值分析，实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 对照组和实验组细胞处理 48 h 后，加入适量 RIPA 细胞裂解液冰浴裂解细胞。BCA 法进行蛋白定量后取等量蛋白（50 μg）进行 SDS-PAGE 电泳分离，聚丙烯酰胺凝胶积层胶浓度为 5%，电泳电压为 60 V，分离胶浓度为 10%，电泳电压为 100 V。电泳至溴酚蓝到达分离胶的底部结束电泳，转膜至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉 37 ℃ 摇床内封闭 1.5 h 后，加入一抗 STAT3、p-STAT3、MMP-2、VEGF（抗体稀释度为 1∶500）及 GAPDH（抗体稀释度为 1∶1 000），4 ℃ 过夜，复温洗膜 3×10 min。加入二抗 HRP 标记的山羊抗兔 Ig G（抗体稀释度为 1∶1 000），37 ℃ 孵育 1 h，洗膜 3×10 min。用 ECL 发光试剂盒（美国 Amersham）检测杂交信号，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果采用 Quantity One 软件进行灰度值分析，实验重复 3 次。

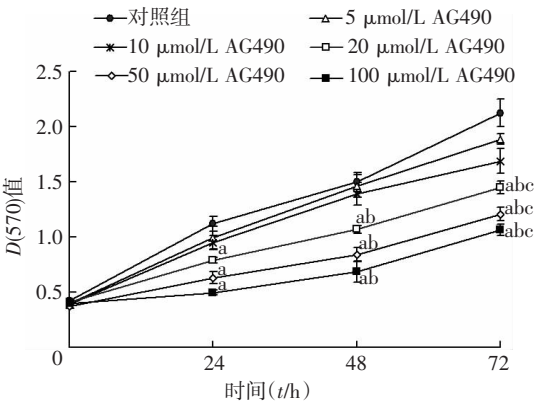
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Dunnett-t 检验多重比较。

2 结果

2.1 AG490 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用

MTT 结果显示，AG490 对 SMMC-7721 细胞具有抑制生长的作用，且随 AG490 的浓度增大抑制作用增强，随作用时间增加，抑制率增大。具有量效-时效关系。5、10 μmol/L AG490 处理 24、48 h 对细胞生长的抑制作用与对照组相比差异无显著性（$P>0.05$）。故选择 5、10 μmol/L 的 AG490 作为各实验的终浓度。见图 1。

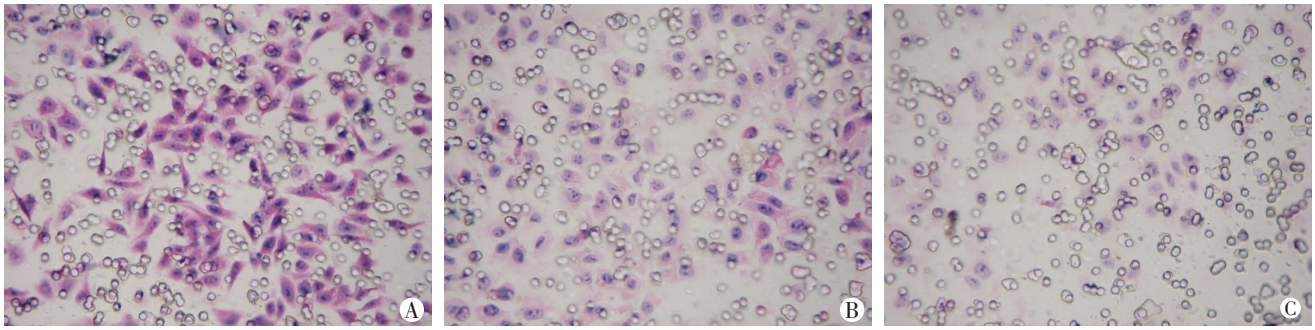


a：$P<0.05$，与同时间点对照组相比；b：$P<0.05$，与同浓度 24 h 相比；c：$P<0.05$，与同浓度 48 h 相比

图 1 各浓度 AG490 对肝癌 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用

2.2 AG490 对 SMMC-7721 细胞的侵袭能力的影响

细胞侵袭实验显示，AG490 处理 SMMC-7721 细胞后，对照组透膜细胞数为（74.6±6.3）/视野，5 μmol/L AG490 组透膜细胞数为（58.2±7.2）/视野，10 μmol/L 组透膜细胞数为（38.2±5.7）/视野，5、10 μmol/L AG490 均能使细胞穿过 Matrigel基质胶的数目减少，侵袭能力明显低于对照组（$P<0.05$，图 2）。

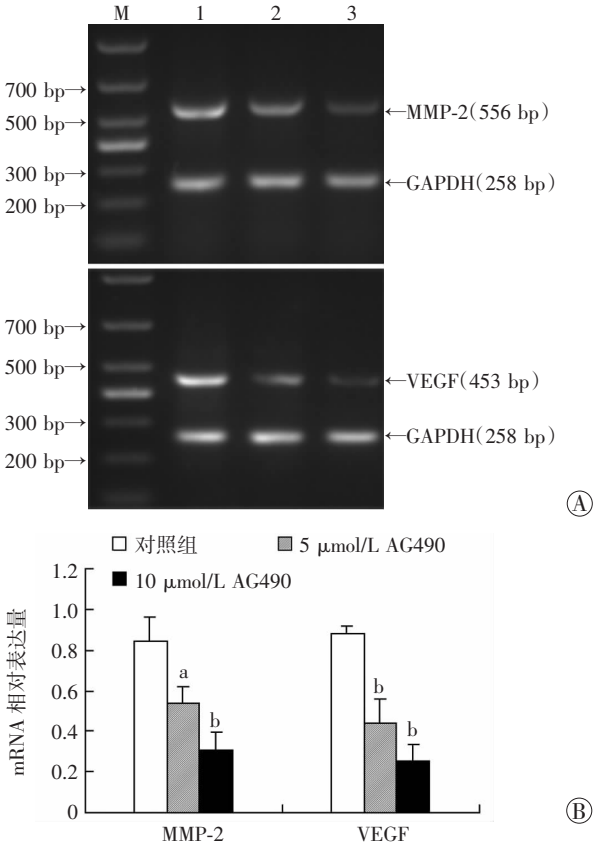


A:对照组;B:5 μmol/L AG490 组;C:10 μmol/L AG490 组

图2　各组 SMMC-7721 细胞穿过 Matrigel 基质胶的表现　(HE ×200)

2.3　AG490 对 SMMC-7721 细胞的 MMP-2 及 VEGF 的 mRNA 表达的影响

与对照组相比,AG490 作用于细胞后,MMP-2 mRNA 与 VEGF mRNA 表达均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),10 μmol/L 组更明显($P<0.01$,图3)。

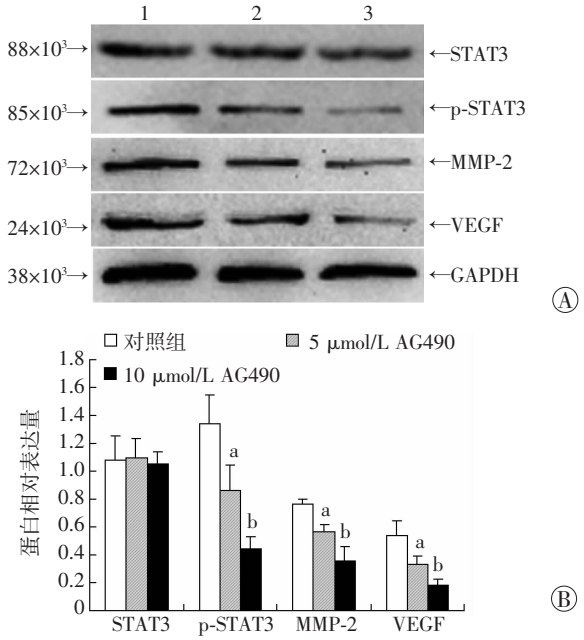


A: RT-PCR 检测　M:DNA 标准(DL1000);1:对照组;2:5 μmol/L AG490 组;3:10 μmol/L AG490 组;B:定量分析　a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较

图3　各组 SMMC-7721 细胞 MMP-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达

2.4　AG490 对 SMMC-7721 细胞 STAT3、p-STAT3、MMP-2 及 VEGF 蛋白表达的影响

AG490 处理 SMMC-7721 细胞后,与对照组相比,STAT3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 p-STAT3、MMP-2 及 VEGF 蛋白表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$),10 μmol/L 组差异更显著($P<0.01$)。见图4。



A: Western blot 检测　1:对照组;2:5 μmol/L AG490 组;3:10 μmol/L AG490 组; B:定量分析　a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较

图4　各组 SMMC-7721 细胞 STAT3、p-STAT3、MMP-2、VEGF 蛋白的表达

3　讨论

JAK/STAT 信号通路是一条重要的细胞外到细胞核内的信号转导途径,已证实在多种肿瘤细胞中处于过度活化状态。有报道 STAT3 的过度活化与结肠癌[1]、乳腺癌[2]、皮肤鳞癌[3]等多种肿瘤的侵袭转移密切相关。肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移以及肿瘤血管生成等过程都受 JAK/STAT 信号转导通路的调节[5]。在肝癌组织中亦发现了表达增强的 STAT3 蛋白,并发现与肝癌的病理分级和临床分期呈正相关[6]。在 JAK2/STAT3 信号通路中,细胞外信号与细胞膜上细胞因子受体结合后导致受体形成二聚体,使得与细胞膜上细胞因子受体相偶联的 JAK 蛋白相互聚集而活化,活化的 JAK 蛋白可以进一步激活细胞质中的 STAT 分子,活化的 STAT 分子则可形成二聚体进入细

胞核与靶基因的特异性序列结合而启动转录[7]。STAT蛋白作为细胞内重要的转录因子之一,其在肝癌侵袭中的作用机制尚不十分明确。

AG490阻断JAK/STAT途径作用机制是通过和受体酪氨酸激酶竞争结合位置抑制JAK2的磷酸化,从而有效阻断STAT3活化。Xiong等[8]使用AG490阻断结肠癌细胞JAK2/STAT3信号通路,能够抑制结肠癌细胞的生长和侵袭。徐建华等[9]研究表明AG490能够降低结肠癌E-cad的表达,抑制癌细胞的迁移侵袭。本研究中应用AG490处理肝癌细胞SMMC-7721后,细胞的增殖水平明显下降,且随作用浓度的增强和作用时间的增加,细胞增殖抑制情况更加明显。同时RT-PCR及Western blot结果显示AG490处理肝癌细胞后,p-STAT3蛋白的表达水平下降,表明AG490能够阻断STAT3蛋白的活化。

细胞外基质(ECM)是肿瘤细胞在转移侵袭中重要的屏障。本实验采用的Matrigel基质胶含有Ⅳ型胶原蛋白和层粘连蛋白等大部分细胞外基质成分,铺于Transwell小室膜上能够模拟天然基底膜结构。MMPs是降解ECM的重要蛋白酶,尤其以MMP-2分布最广,研究表明原发性肝癌存在高表达的MMP-2[10]。将肿瘤细胞接种于小室滤膜上层,肿瘤细胞可以分泌MMPs降解Matrigel基质胶,通过滤膜小孔到达下层,下层细胞的数目与MMPs的分泌量正相关。Xie等[11]研究发现STAT3蛋白在活化后能够上调MMP-2的表达。在本实验中,通过Transwell小室侵袭模型显示,AG490能够抑制肝癌细胞的穿膜运动作用,RT-PCR及Western blot结果显示细胞MMP-2 mRNA及蛋白表达降低,表明AG490可能通过抑制STAT3蛋白的激活下调MMP-2的表达而降低肿瘤的侵袭能力,与Senft等[12]的报道相似。

肝癌通常为血管丰富的实体肿瘤。血管生成在肿瘤的生长、转移和浸润中发挥重要的作用,VEGF作为最重要的促血管生成因子,能够刺激血管内皮细胞的增殖促进血管通透性,还可间接增加MMPs的分泌而促进肿瘤的浸润转移[13]。Qiu等[14]在胰腺癌细胞中通过RNAi沉默STAT3基因后,能够使细胞内VEGF表达下降而降低胰腺癌细胞的转移和侵袭力。本研究发现,应用AG490处理肝癌细胞后,VEGF mRNA和蛋白表达水平下降,表明阻断STAT3蛋白的活化可以降低VEGF的表达。

综上所述,本实验证实AG490在体外作用于肝癌SMMC-7721细胞后能够抑制肝癌细胞的增殖,明显降低肝癌细胞的侵袭能力。Western blot检测示p-STAT3蛋白表达降低,而STAT3蛋白降低不明显,同时MMP-2及VEGF的基因及蛋白表达水平下降,说明AG490可能通过阻断STAT3的活化,降低与肝癌转移侵袭相关的MMP-2、VEGF的mRNA和蛋白的表达,从而抑制肿瘤的侵袭转移。推测JAK2/STAT3信号通路在肝癌细胞增殖与转移中起重要的作用。通过阻断JAK2/STAT3信号通路传导的治疗策略可能为临床肝癌的治疗提供新的药物和治疗靶点。

参考文献:

[1] Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, *et al*. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(8): 833-838.

[2] Burke W M, Jin X, Lin H J, *et al*. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells[J]. Oncogene, 2001, 20(55): 7925-7934.

[3] Suiqing C, Min Z, Lirong C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Dermatol, 2005, 32(5): 354-360.

[4] 步明强, 徐伟, 吕正华, 等. 下咽鳞癌Ets-1、磷酸化STAT3的表达及其与侵袭转移的关系[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2008, 22(6): 497-500.

[5] Haura E B, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005, 2(6): 315-324.

[6] 张斌, 钟德玠, 王群伟, 等. JAK/STAT信号通路与肝细胞性肝癌的肿瘤进展和预后的相关性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(4): 368-370, 373.

[7] Levy D E, Darnell J E Jr. STATs: transcriptional control and biological impact[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651-662.

[8] Xiong H, Zhang Z G, Tian X Q, *et al*. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells[J]. Neoplasia, 2008, 10(3): 287-297.

[9] 徐建华, 张超, 唐波, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 638-641.

[10] Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues[J]. Oncol Rep, 2005, 13(6): 1043-1048.

[11] Xie T X, Wei D, Liu M, *et al*. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3550-3560.

[12] Senft C, Priester M, Polacin M, *et al*. Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells[J]. J Neurooncol, 2010, 101(3): 393-403.

[13] Zucker S, Mirza H, Conner C E, *et al*. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation[J]. Int J Cancer, 1998, 75(5): 780-786.

[14] Qiu Z, Huang C, Sun J, *et al*. RNA interference-mediated signal transducers and activators of transcription 3 gene silencing inhibits invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 1099-1106.

(**收稿**:2011-04-10;**修回**:2011-05-23)

(编辑 邓强庭)