论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1862-04

JAK2/STAT3通路在肝癌细胞侵袭及血管生成拟态中的作用

庞林宾[1],王洪林[1],王晔飞[1],李洪涛[1],宋立文[1],刘 波[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科[1];611700 四川 郫县,四川省郫县人民医院普外科[2])

[摘要] **目的** 探讨JAK2/STAT3通路在肝癌细胞QGY-7701侵袭及血管生成拟态中的作用。**方法** JAK2抑制剂AG490(5、10 μmol/L)处理肝癌细胞48 h,Transwell小室、体外成管实验分别检测各组细胞的体外侵袭能力和成管能力,RT-PCR检测Twist1及MMP-2 mRNA表达差异,Western blot检测STAT3、p-STAT3、Twist1和MMP-2蛋白表达差异。**结果** 与对照组相比,Transwell小室穿膜细胞数减少,形成管道结构数目减少,Twist1及MMP-2 mRNA表达减少,Twist1、MMP-2和p-STAT3蛋白表达减少,差异均有统计学意义($P<0.05$),STAT3蛋白表达无差异($P>0.05$)。**结论** AG490能有效抑制肝癌细胞侵袭及成管的能力,JAK2/STAT3通路在肝癌细胞侵袭及血管生成拟态中起促进作用。

[关键词] 肝癌;AG490;侵袭;血管生成拟态
[中图法分类号] R73-37;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Role JAK2/STAT3 signaling pathway in invasion and vascular mimicry of liver cancer cells

Pang Linbin[1], Wang Honglin[1], Wang Yefei[1], Li Hongtao[1], Song Liwen[1], Liu Bo[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, 400016; [2]Department of General Surgery, Pixian People's Hospital, Pixian, Sichuan Province, 611700, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of JAK2/STAT3 signaling pathway in invasion and vascular mimicry of liver cancer cell line QGY-7701. **Methods** After QGY-7701 cells were treated with 5 and 10 μmol/L AG490 (the inhibitor of JAK2) for 48 h, the invasion and tube formation of tumor cells were tested with Transwell chamber test and vascular mimicry experiment. RT-PCR was used to measure the expression of Twist1 and MMP-2, and Western blot assay was employed to determine the expression of p-STAT3, STAT3, Twist1 and MMP-2. **Results** Compared to control group, there were less tumor cells permeating membrane and less formed tubes after AG490 treatment. RT-PCR showed that the expression of Twist1 and MMP-2 at mRNA level were decreased. Western blotting indicated that the expression of p-STAT3, Twist1, MMP-2 at protein levels were also decreased ($P<0.05$), while that of STAT3 protein had no difference among each group ($P>0.05$). **Conclusion** AG490 significantly inhibits invasion and vascular mimicry of liver cancer cells *in vitro*, and JAK2/STAT3 signaling pathway promotes above processes.

[**Key words**] liver cancer; AG490; invasion; vascular mimicry

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

血管生成拟态是近年来兴起的影响肿瘤转移的学说,逐渐成为研究热点。JAK2/STAT3通路已被证实与多种肿瘤的侵袭转移有关[1-3],但是与血管生成拟态的关系少见相关报道。本研究使用JAK2特异抑制剂AG490作用于肝癌细胞株QGY-7701,观察其对各组细胞侵袭及形成血管生成拟态能力的影响,探讨JAK2/STAT3信号通路在肝癌血管生成拟态及复发转移中所起的作用及可能的分子机制,为肝癌的治疗寻找新的途径和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

QGY-7701细胞株购自中科院上海细胞所,AG490购自Cayman公司,Transwell小室、Matrigel基质胶购自BD公司,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,STAT3、p-STAT3、Twist1及MMP-2单抗购自Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 复苏QGY-7701细胞,接种于

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

50 ml 培养瓶,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640,将培养瓶置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱内培养。细胞贴壁生长,长满 80% 时传代,0.25% 胰蛋白酶消化。实验分为对照组、实验组(5、10 μmol/L AG490 分别处理 48 h)[1]。

1.2.2 体外侵袭实验 将 Matrigel 基质胶用 RPMI1640 1∶3 稀释后,以 40 μl 均匀铺在 Transwell 小室的上室面。消化细胞后以每孔 2×10^5/0.4 ml 接种到小室内,下室加入 0.6 ml RPMI 1640 培养基,置于 37 ℃培养箱内培养 30 h。用棉签擦掉上室面未穿过的细胞和 Matrigel 基质胶,4% 多聚甲醛固定 30 min,吉姆萨染色 15 min,干燥后中性树胶封片,显微镜下照相,任意取 10 个不重叠视野,计算穿过膜的细胞数目,实验重复 3 遍。

1.2.3 体外成管实验[4] 将 Matriel 基质胶用 RPMI1640 1∶3稀释后以 50 μl/孔铺到 96 孔板底,紫外灯下照 2 h,然后置于 37 ℃细胞培养箱内孵育 1 h 备用。取用各组细胞,以 1×10^4/孔接种到 96 孔板内,每组设 8 个复孔,3 d 后照相,任取 10 个不重叠视野计算成管数。

1.2.4 逆转录 PCR(RT-PCR)检测各组细胞对照组与实验组 Twist1、MMP-2 mRNA 表达差异 按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行操作。Twist1 序列上游 5′-ATGTCCGCGTCCCACTAG-3′,下游 5′-GATGCCTTTCCTTTCAGTG-3′,扩增长度 415 bp,退火温度 56 ℃;MMP-2 上游 5′-TTGCTGCCACAAGAACTG-3′,下游 5′-TTGAAAGACTGGGAGAAG-3′,扩增长度 576 bp,退火温度 58 ℃;GAPDH 上游 5′-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3′,下游 5′-AAAGGTGGAGGAGTGGGT-3′,扩增长度 309 bp,退火温度 56 ℃。Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像,Quantity One 软件分析灰度值,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞对照组与实验组 STAT3、p-STAT3、Twist1 和 MMP-2 蛋白表达差异 药物处理 48 h 后,检测各组细胞 STAT3、p-STAT3、Twist1 和 MMP-2 蛋白表达差异,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像,Quantity One 软件进行灰度值分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

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

2 结果

2.1 AG490 对肝癌细胞体外侵袭能力的影响

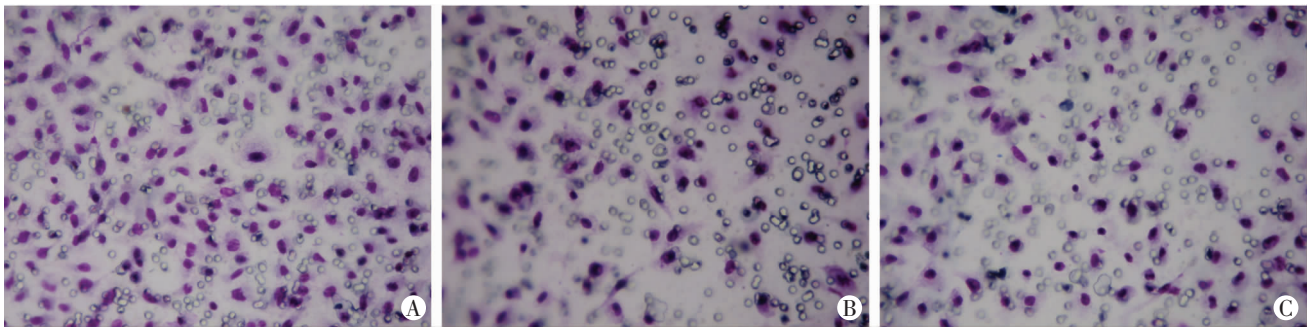
各组细胞穿膜数,对照组为(204.0±6.58),5 μmol/L 组为(116.7±5.01),10 μmol/L 组为(67.8±3.36),实验组与对照组相比穿膜数减少,差异有统计学意义($P<0.05$),如图 1。

2.2 AG490 对肝癌细胞体外成血管拟态的抑制作用

各组细胞成管数目,对照组为(12.6±2.22),5 μmol/L 组为(6.8±1.62),10 μmol/L 组为(1.5±1.08),实验组与对照组相比,成管数目减少,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

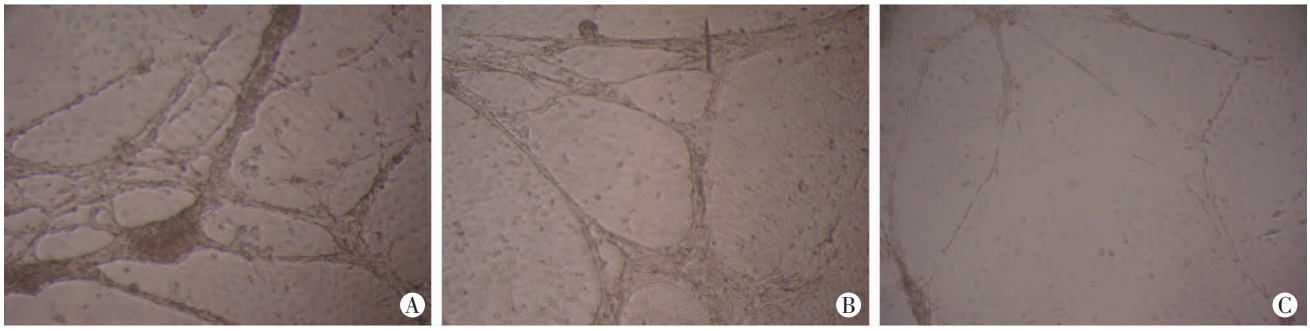
2.3 各组细胞 Twist1 和 MMP-2 mRNA 的表达差异

Twist1 表达量(Twist1/GAPDH)对照组为(0.36±0.04),5 μmol/L组为(0.29±0.03),10 μmol/L 组为(0.16±0.02);MMP-2 表达量(MMP-2/GAPDH)对照组为(1.43±0.04),5 μmol/L组为(1.19±0.01),10 μmol/L 组为(0.85±0.01)。与对照组相比,各组细胞 Twist1、MMP-2 mRNA 表达减少,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



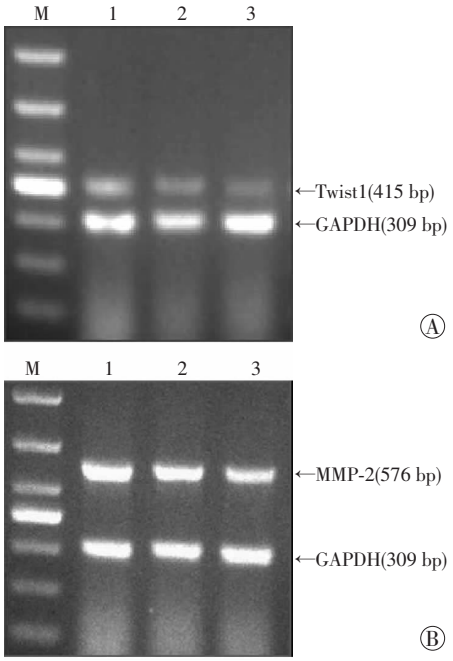
A:对照组;B:5 μmol/L 实验组;C:10 μmol/L 实验组

图 1 AG490 对肝癌细胞侵袭能力的影响(吉姆萨染色 ×200)



A:对照组;B:5 μmol/L 实验组;C:10 μmol/L 实验组

图 2 AG490 对肝癌细胞血管生成拟态的影响(×200)



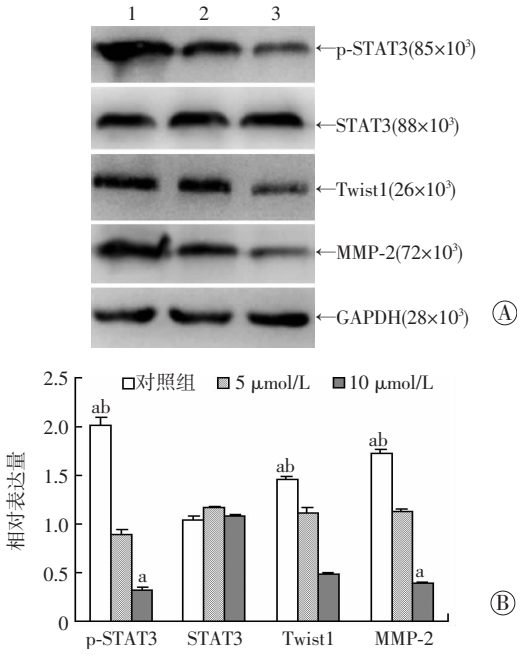
A:Twist1, B: MMP-2

M:标准;1:对照组;2: 5 μmol/L 实验组;3:10 μmol/L 实验组

图3 RT-PCR 检测 AG490 处理前后 Twist1、MMP-2 表达差异

2.4 各组细胞 STAT3、p-STAT3、Twist1、MMP-2 蛋白表达的差异

不同浓度的 AG490 处理 48 h 后,各蛋白表达情况见图 4A。与对照组相比,p-STAT3、Twist1、MMP-2 蛋白的相对表达量减少,差异有统计学意义($P<0.05$);STAT3 表达量无差异($P>0.05$),见图 4B。



A:Western blot 检测各蛋白表达 1:对照组;2: 5 μmol/L 实验组;3:10 μmol/L 实验组;B:各蛋白相对表达量;a: $P<0.05$,与 5 μmol/L 实验组比较;b: $P<0.01$,与 10 μmol/L 实验组比较

图4 AG490 处理前后各蛋白在肝癌细胞中的表达

3 讨论

JAK/STAT3 通路的过度活化与乳腺癌、结肠癌、神经胶质瘤和皮肤鳞癌等[3-4]多种肿瘤的侵袭转移关系密切。另据研究[5]报道 JAK/STAT 通路能够调节细胞的增殖、凋亡、侵袭转移和血管生成。在肝癌组织中,已经发现 STAT 的过度表达,且与肝癌的病理分级和临床分期呈正相关[6]。在 JAK/STAT 信号通路中,细胞外信号与细胞膜上的细胞因子受体结合后导致受体形成二聚体,使得胞浆内 JAK 激活,激活的 JAK 与细胞膜上的细胞因子受体相偶联,使受体上的酪氨酸残基磷酸化,而受体上酪氨酸残基的磷酸化位点就成为 STAT 蛋白中 SH2 结构域的识别位点,于是 STAT 与受体结合,并在 JAK 的催化下发生磷酸化。磷酸化 STAT 与受体亲和力降低,与受体分离,并形成二聚体的活性形式转移到核内,结合到 DNA 的特定反应元件上诱导相应基因(如 VEGF、MMPs 等)的表达,促进多种蛋白质(如 VEGF、MMPs 等)合成。

AG490 是 JAK2 的特异性抑制剂,本实验 Western blot 结果显示 p-STAT3 水平明显下降,而 STAT3 蛋白表达无差异,说明 AG490 不影响 STAT3 的基因转录。Xiong 等[7]使用 AG490 阻断了结肠癌 JAK2/STAT3 通路,抑制了结肠癌细胞的生长和侵袭。徐建华等[8]通过研究发现 AG490 能通过降低结肠癌 E-cad 的表达从而抑制癌细胞的侵袭迁移。本研究发现,Transwell 小室侵袭实验 AG490 能有效抑制肝癌细胞穿膜数目,与刘波[1]的研究结论一致,说明 AG490 能有效抑制肝癌细胞体外侵袭转移能力。

血管拟态最先由 Maniotis[9]发现,传统的血管生成学说[10-11]认为,肿瘤细胞分泌某些细胞因子(如 VEGF、MMPs、Twist、VE-cadherin 等)趋化体内的内皮细胞,形成类似管状的结构。而血管拟态学说则认为,在血管形成早期,首先由肿瘤细胞自身形成管腔样结构,然后募集体内的内皮细胞逐步替代肿瘤细胞,由肿瘤细胞和血管内皮细胞共同组成“马赛克”样的血管结构[12]。本研究发现,AG490 使肝癌细胞形成管道系统的能力减弱,拟态相关因子 Twist1、MMP-2 的 mRNA 及蛋白表达减少,表明对血管拟态有抑制作用,并且是通过 JAK2/STAT3 通路起作用的。

相关报道已经提示,血管拟态存在于肾透明细胞癌、胆囊癌、肝癌等[13-14]多种肿瘤中并影响患者的预后及生存期。Shirakawa 等[15]通过研究发现,临床疗效差的患者与疗效好的患者相比,其病理标本中大多可见血管拟态,因此推断血管拟态是这些患者疗效差的原因所在,寻找针对抑制血管拟态的有效药物

(AG490)可能为临床治疗肝脏肿瘤带来新的转机。

参考文献:

[1] 刘波, 王洪林, 宋立文. Janus 激酶抑制剂 AG490 对人肝癌 SMMC-7721 细胞侵袭转移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(18): 1960-1963.
[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] 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.
[4] Shih Y P, Liao Y C, Lin Y, *et al*. DLC1 negatively regulates angiogenesis in a paracrine fashion [J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8270-7275.
[5] 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.
[6] 袁晟光, 苏如葵, 廖维甲, 等. STAT3、MMP-2 在肝细胞癌中的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(12): 2142-2144.
[7] 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.
[8] 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.
[9] Maniotis A J, Folberg R, Hess A, *et al*. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry [J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 739-752.
[10] Zhang L Z, Mei J, Qian Z K, *et al*. The role of VE-cadherin in osteosarcoma cells [J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(1): 111-117.
[11] Sun T, Zhao N, Zhao X L, *et al*. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry [J]. Hepatology, 2010, 51(2): 545-556.
[12] Chang Y S, di-Tomaso E , McDonald D M, *et al*. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(26): 14608-14613.
[13] Vartanian A A, Stepanova E V, Gutorov S L, *et al*. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in clear cell renal cell carcinoma[J]. Can J Urol, 2009, 16(4): 4726-4732.
[14] 赵秀兰, 杜静, 张诗武, 等. 肝细胞肝癌中血管生成拟态的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(1): 41-44.
[15] Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, *et al*. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer[J]. Int J Cancer, 2002, 99(6): 821-828.

(**收稿**:2012-03-17;**修回**:2012-04-30)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)18-1865-01

个案与短篇

膝关节置换术后肾上腺危象1例

石 勇[1],林建浩[2] (430015 武汉,湖北省新华医院外二科[1];100044 北京,北京大学人民医院骨关节科[2])

[**关键词**] 类风湿性关节炎;肾上腺皮质激素;肾上腺危象
[**中图法分类号**] R684.3 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,女性,73岁,全身多处关节肿胀疼痛、双膝疼痛7年。以双膝类风湿性关节炎(全身多关节病变),高血压病入院,有长期口服强的松、降压药病史以及胆囊炎病史,半年前已停用激素,仍口服降压药。入院时血压140/85 mmHg。入院后在全麻下行双膝关节置换,手术前后给予激素保护治疗(手术当天在术前静脉予氢化可的松75 mg,术后100 mg,次日50 mg)。术后伤口干燥、无红肿,食欲差,第7天出现恶心,次日晚6时出现恶心、呕吐、上腹疼痛不适,嗜睡、昏迷。查体:体温35.6 ℃,血压78/46 mmHg,脉搏细数,心率101次/min,口唇及皮肤干燥、弹性差,四肢冰凉,腹软,右中腹轻度压痛,无反跳痛,双膝伤口干燥无红肿,实验室检查:血钾3.37 mmol/L,血钠129 mmol/L,血氯80 mmol/L,CO_2 CP 23.4 mmol/L,血BUN 7.49 mmol/L,Cr116.1 mmol/L,血糖4.77 mmol/L。血常规:WBC 19.9×10^9/L,中性粒细胞0.907,Hb 96 g/L,PLT 240×10^9/L。血生化:ALT 25.2 U/L,AST 9.7 U/L,ALB 23.5 g/L,尿常规PRO(-),BLD(-),血沉32 mm/h。粪常规OB阴性、镜检脓球(0-1)。心电图示:窦性心动过速。12 h尿量200 ml。感染科、风湿科、普外科会诊意见:急性胆囊炎,感染性休克,急性肾功能不全。经输液、抗感染、支持治疗,病情无缓解,血压一直持续80/50 mmHg,加用多巴胺维持血压最高在100/70 mmHg,增加多巴胺用量,血压升高不明显,次日尿量逐渐增多。胸部CT未见明显异常,腹部B超、CT见胆囊无肿大,腹腔少量积液,观察1 d后在全麻下行剖腹探查,仅见横结肠轻度粘连,术后加强胃肠营养、静脉营养,抗感染、支持治疗,患者仍全身乏力,停用多巴胺,血压维持在110/75 mmHg,腹部伤口愈合后出院。经电话随访,患者回家后自行口服强的松15 mg/d,乏力、全身疼痛不适缓解,血压也恢复至术前水平,逐渐下床行走。这时才考虑诊断为肾上腺危象。

2 讨论

长期服用较大剂量糖皮质激素的患者可能存在下丘脑-垂体-肾上腺轴抑制,导致自身分泌糖皮质激素能力下降,加之手术及麻醉本身使患者处于应激状态,对糖皮质激素的需求增加,

(下转1880页)

[**通信作者**] 石 勇,E-mail:407602346@qq.com