消化系统疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000940

AG490通过JAK2/STAT3信号通路对肝癌细胞裸鼠移植瘤的抑制作用及机制

赵冀安[1],穆秀娥[2],董 梁[3],孙会凤[1],周小慧[1],朱俊青[1],李增宁[4]
(河北医科大学第一医院 1. 肝胆外科;2. 心外科;3. 医务处;4. 临床营养科,河北 050013)

【摘 要】**目的**:探讨 JAK2/STAT3 信号通路在 AG490 干预下对人肝细胞癌裸鼠移植瘤生长、凋亡的影响以及与相关基因表达之间的关系。**方法**:建立人肝癌细胞裸鼠移植瘤模型,将 BALB/C-nu 裸鼠随机平均分成 3 组,按照实验设计分为对照组(生理盐水)、低浓度 AG490 组(浓度 4 mg/kg 的 AG490)、高浓度 AG490 组(浓度为 8 mg/kg 的 AG490),而后按照实验设计分别给予生理盐水或 AG490 处理裸鼠。观察期间记录各组裸鼠体质量、瘤重、肿瘤体积、计算肿瘤生长抑制率;通过流式细胞法检测细胞周期变化和凋亡情况;蛋白质印迹法检测细胞中 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、MMP-2、Bcl-2、Bcl-xl 及 Bax 蛋白表达的变化;免疫组织化学检测移植瘤组织中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达。**结果**:实验组裸鼠瘤重、肿瘤体积均小于对照组,抑瘤率高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。流式细胞分析结果显示低浓度 AG490 组(73.98 ± 0.90)%、高浓度 AG490 组(81.39 ± 1.66)%的细胞周期 G0/G1 期较对照组(59.30 ± 1.13)%明显增加($P<0.05$),同样低浓度 AG490 组(33.32 ± 1.16)%和高浓度 AG490 组(52.22 ± 1.06)%的细胞凋亡率较对照组(1.50 ± 0.12)%明显增高($P<0.05$)。Western blot 结果显示低浓度 AG490 组(1.073 ± 0.028)、(0.955 ± 0.025)和高浓度 AG490 组(0.763 ± 0.023)、(0.751 ± 0.037)的 p-JAK2,p-STAT3 蛋白表达均较对照组(1.265 ± 0.012)、(1.477 ± 0.020)明显降低($P<0.05$)。同时下调通路下游蛋白 MMP-2,Bcl-2,Bcl-xl 和上调 Bax 表达水平。免疫组化结果显示 AG490 组移植瘤肿瘤组织 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达较对照组明显降低($P<0.05$)。**结论**:AG490 能够通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路促进人肝癌细胞的凋亡、抑制增殖和侵袭作用达到抑制裸鼠移植瘤的生长,提示 JAK2/STAT3 通路在肝细胞癌恶性演进过程中发挥了重要作用。

【关键词】JAK2/STAT3 信号通路;AG490;肝癌裸鼠移植瘤
【中图分类号】R737.33 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-12-06

作者介绍:赵冀安,Email:zhaoji-an-88@163.com,
研究方向:肿瘤基础与临床。
通信作者:李增宁,Email:lizengning@126.com。
基金项目:河北省医学科学研究重点课题资助项目(编号:20150634)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.0959.026.html
(2016-05-13)

[J]. World J Gastroenterol,2015,21(13):3777-3785.
[9] Zhang GL,Yao L,DU Y,et al. Expression of p38MAPK in the hippocampal CA1 region of rats with Abeta25-35-induced Alzheimer disease[J]. J South Med Univ,2008,28(7):1176-1179.
[10] Tsubaki M,Kato C,Isono A,et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha induces osteoclast formation by activation of the MEK/ERK/c-Fos pathway and inhibition of the p38MAPK/IRF-3/IFN-beta pathway[J]. J Cell Biochem,2010,111(6):1661-1672.
[11] Li Z,Meng D,Li G,et al. Celecoxib Combined with Diacerein Effectively Alleviates Osteoarthritis in Rats via Regulating JNK and p38MAPK Signaling Pathways[J]. Inflammation,2015,38(4):1563-1572.
[12] 苏 琳. 高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的比较[J]. 实验动物科学,2009,26(3):14-17,23.
[13] Ajmal MR,Yaccha M,Malik MA,et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) in patients of cardiovascular diseases and its association with hs-CRP and TNF-alpha[J]. Indian Heart J,2014,66(6):574-579.
[14] Tilg H,Moschen AR. Relevance of TNF-alpha gene polymorphisms in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2011,5(2):155-158.
[15] Xue Q,Wang X,Wang P,et al. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther,2015,12(1): 84-91.
[16] Zhang X,Li C,Li J,et al. Protective effects of protocatechuic acid on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice via p38MAPK and NF-κB signal pathways[J]. International Immunopharmacology,2015,26(1):229-236.
[17] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. Cell,2000,103(2):239-252.
[18] Bredeson S,Papaconstantinou J,Deford JH,et al. HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes[J]. PLoS One,2014,9(12):e113799.

(责任编辑:冉明会)

Inhibitory effects of AG490 on transplanted tumor of nude mice with live cancer through JAK2/STAT3 signal pathway and its mechanism

Zhao Ji'an, Mu Xiu'e, Dong Liang, Sun Huifeng, Zhou Xiaohui, Zhu Junqing, Li Zengning

(1. Department of Hepatobiliary Surgery; 2. Department of Cardiac Surgery; 3. Department of Medical Service; 4. Department of Clinical Nutrition, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of JAK/STAT signal pathway inhibitor AG490 on growth and apoptosis of transplanted tumor of nude mice with human liver cancer and its relationship with the expression of related genes. ***Methods***: The models of transplanted tumor of nude mice with human liver cancer were established. The model mice were randomly divided into 3 groups: control group (normal saline), low concentration AG490 group (4 mg/kg AG490), high concentration AG490 group (8 mg/kg AG490), then saline or AG490 was used to treat the nude mice with the requirements. The growth situations of transplanted tumor in different groups were observed during the treatment, including the body weight, the tumor weight and volume and the inhibiting rates of growth of transplanted tumor. Cell cycle distribution and cell apoptosis were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression levels of p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3, MMP-2, Bcl-2, Bcl-xl and Bax. The expressions of p-JAK2 and p-STAT3 were observed by immunohistochemistry. ***Results***: Significant differences in tumor weight, volumes, and tumor growth inhibition rates were found between the treatment groups and the control group ($P<0.05$). Flow cytometric analysis demonstrated the G0/G1 phase in cell cycle was increased in low concentration AG490 group (73.98 ± 0.90)% and high concentration AG490 group (81.39 ± 1.66)% than in control group (59.30 ± 1.13)%, so did cell apoptosis rate of low concentration AG490 group (33.32 ± 1.16)% and high concentration AG490 group (52.22 ± 1.06)% between control group (1.50 ± 0.12)%. Western blot demonstrated both low concentration AG490 group (1.073 ± 0.028) (0.955 ± 0.025) and high concentration AG490 group (0.763 ± 0.023) (0.751 ± 0.037) had lower level of p-JAK2 and p-STAT3 than control group (1.265 ± 0.012) (1.477 ± 0.020). It shown that the expression of MMP-2, Bcl-2 and Bcl-xl were down-regulated while the expression of Bax was up-regulated after being treated with AG490. Compared with those of control group, the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 in AG490 group were decreased by immunohistochemistry ($P<0.05$). ***Conclusion***: AG490 could promote apoptosis and inhibit the cell growth and invasion by blocking JAK/STAT signal pathway, thereby inhibiting the growth of transplanted tumor of nude mice. The results suggest that the expression of JAK2/STAT3 signal pathway may play an important role in the evolution of liver cancer.

【Key words】JAK2/STAT3 signal pathway; AG490; Transplanted tumor of nude mice with live cancer

肝癌作为一种恶性程度极高的肿瘤，极大的影响和威胁了人类的生命健康。目前普遍认为肝癌的发生发展是多基因突变演化进展的过程。JAK2/STAT3 信号途径是近年来备受关注的一条信号传导通路，在细胞增殖、凋亡、分化和免疫功能等多种生理过程中起重要作用。众多研究发现该通路异常活化可导致正常细胞出现异常增殖甚至恶变[1]。STAT3 作为 JAK2/STAT3 信号通路的重要组成部分，已经证实在人类主要的恶性肿瘤中基本都存在异常的高表达。STAT3 活化后与下游相关因子发生关联作用，参与调节肿瘤的增殖、凋亡、转移、血管生成、免疫应答等过程，使得 JAK2/STAT3 信号通路进而与其他信号通路互相关联成为网络系统，协同促进肿瘤的发生发展[2]。

JAK2/STAT3 信号通路的特异性信号转导阻滞剂 AG490，被认为可以影响肝癌细胞的多种生物学特性如抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡，降低肝癌细胞侵袭力等[3]，但关于 AG490 对肝癌细胞荷瘤裸鼠体内抑瘤作用的研究尚未见相关报道。本研究选用 BALB/C-nu 裸鼠 SMMC-7721 细胞皮下移植瘤制作荷瘤动物模型，通过给予实验组和对照组分别腹腔注射 AG490 及生理盐水的给药方式，研究 AG490 对裸鼠皮下移植瘤的影响，从而探讨 AG490 的体内抑瘤效应及 JAK2/STAT3 信号通路在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞由河北医科大学肿瘤研究所提供，BALB/C-nu 雌性裸鼠，5~6 周龄，体质量 16~20 g，购于北京协和大学实验动物研究所。AG490（CAT NO: T3434）购自美国 Sigma 生物公司，p-JAK2（CAT NO: sc-16566）、JAK2

(CAT NO:sc-278)、p-STAT3(CAT NO:sc-135649)、STAT3(CAT NO:sc-7179)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2,MMP-2)(CAT NO:sc-10736)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2) 抗体(CAT NO:sc-783)、Bcl-xl(CAT NO:sc-7195)及 Bax(CAT NO:sc-493)兔抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司，细胞凋亡检测试剂盒(CAT NO:LK-AP101-30-AVF)购自中国 Multisciences 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人肝细胞癌细胞接种 将 BALB/C-nu 裸鼠在 SPF 条件下饲养，收集 EDTA 消化的对数生长期的人肝癌 SMMC-7721 细胞，将其配制成浓度为 1×10^7 个/ml 的单细胞悬液，按照 0.3 ml/只接种到裸鼠皮下，接种后观察。待裸鼠皮下肿瘤直径增至 0.6 cm 时将裸鼠称重后弃去体积过大过小的裸鼠，按照每组 7 只随机分成 3 组。裸鼠分组及用药情况：(1)对照组：0.2 ml 生理盐水；(2)低浓度 AG490 组：0.2 ml 浓度为 4 mg/kg；(3)高浓度 AG490 组：0.2 ml 浓度为 8 mg/kg。每周给药两次，共 4 周。对于各组裸鼠的精神、饮食、活动等情况每日详细观察并且进行记录，用药后每隔 3 d 测量肿瘤长径(a)和短径(b)的测定，肿瘤体积计算公式为 $V=a\times b^2\times0.52$。四周后将各组裸鼠均处死，对裸鼠体质量和剥除的肿瘤称重测量，对肿瘤抑制率进行计算。抑瘤率=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。

1.2.2 荷瘤裸鼠肿瘤组织细胞周期和凋亡检测 制备荷瘤裸鼠肿瘤的单细胞悬液：将新鲜肿瘤组织切开剪碎并搓捻组织块，将混悬液过滤去除细胞团块，收集细胞悬液，使用 PBS 洗涤进行离心(800 r/min,2 min)后，用预冷的 70%乙醇固定并且 4 ℃过夜，备检。将离心后的细胞用 PBS 洗涤后悬浮，先后加入 5 μl 的 Annexin V 和 5 μl PI 混匀，4 ℃避光反应 30 min，然后使用流式细胞仪对细胞周期和细胞凋亡率进行检测。

1.2.3 Western blot 分析 取肿瘤组织加入蛋白质提取液裂解 30 min，在 4 ℃，12 000 r/min 离心 5 min，后将等量上清夜(蛋白质)与 SDS Loading Buffer 混合均匀，100 ℃沸水浴加热 5 min 使蛋白充分变性。取 1 μl 进行蛋白定量。用蛋白裂解液处理细胞，收集蛋白样品。将蛋白样品用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后，每孔加入 50 μg 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后，将蛋白转到 PVDF 膜上，转移膜用 1%BSA 封闭。随后加入 1:1 000 的兔抗人 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、MMP-2、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 和 β-actin 多克隆抗体，4 ℃冰箱过夜。次日用 TBST 洗 3 次后再分别加入 1:5 000 的标记的抗兔二抗，室温孵育 1 h，TBS 洗 3 次。而后经 ECL 化学发光检测并记录各目的条带与内参条带灰度值，目的条带/内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.2.4 病理组织学检查 将 10%甲醛固定的肿瘤组织制备成 4 μm 厚度石蜡切片。采用 HE 染色和 S-P 法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法)进行免疫组化染色。70 ℃烘烤切片，石蜡切片用不同梯度乙醇脱水，抗原修复液微波修复 2 min，依次滴加 30 ml/L H_2O_2 室温下灭活内源酶 10 min，PBS 漂洗 10 min，p-JAK2 和 p-STAT3 鼠抗人一抗(分别 1:100；1:150 稀释)，4 ℃保存过夜，再用 PBS 漂洗 3 次，滴加 5 μl 链霉素蛋白-过氧化氢酶溶液标记二抗，孵育 30 min后用 PBS 冲洗 3 次，DAB 显色。每次染色设同步阳性和阴性对照。

1.2.5 免疫组化染色评定标准 显微镜光镜下，由我院 2 名病理科医师在显微镜下对切片进行盲式阅片。p-JAK2 蛋白和 p-STAT3 蛋白阳性表达均定位于细胞质呈棕黄色或含棕黄色颗粒。根据细胞染色程度和所占比例进行判定：无着色记 0 分，轻度染色记 1 分，中度染色记 2 分，深度染色记 3 分；阳性细胞占计数细胞比例：染色比例低于 5%为 0 分，5%~25%为 1 分，26%~50%为 2 分，大于 50%为 3 分。2 项相加作为最后判断结果：两者分数之和最大值为 6，0~2 分判为阴性表达，大于 2 分判为阳性表达。

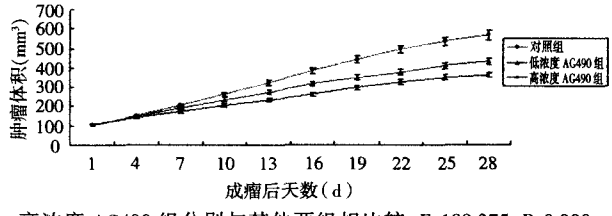
1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组样本均数的组间比较采用单因素方差分析，各组间的两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 AG490 对 SMMC-7721 细胞荷瘤裸鼠的抑瘤作用

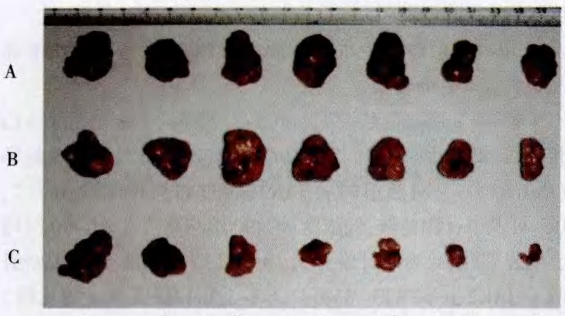
根据肿瘤体积的变化情况绘制出各组肿瘤生长曲线图(图 1)。从图中可以看出，对照组肿瘤不断增长，体积较实验组显著增大，实验组裸鼠肿瘤生长缓慢(图 2)。各组裸鼠在实验期间无一死亡。至第 28 天，所有裸鼠均统一颈椎脱臼处死，完整剥取肿瘤并称重，对肿瘤抑制率进行计算(表 1)。与对照组体质量相比较，低浓度 AG490 组与高浓度 AG490 组无显著性差异($P>0.05$)。与对照组肿瘤重量和体积相比较，低浓度 AG490 组与高浓度 AG490 组中均有明显变化，且有统计学意义($P<0.01$)。与低浓度 AG490 组的体质量、肿瘤重量、肿瘤体积相比较，高浓度 AG490 组 P 值分别为 0.877，0.024，$P=0.000$。低浓度 AG490 组和高浓度 AG490 组抑瘤率分别为(46.90±3.66)%和(60.74±1.96)%($P=0.000$)，说明 AG490对裸鼠SMMC-7721 移植瘤增长有明显的抑制作用。



高浓度 AG490 组分别与其他两组相比较，$F=189.375$，$P=0.000$；低浓度 AG490 组与对照组比较，$P=0.000$

图 1 药物对各组裸鼠移植瘤体积生长的影响

Fig.1 Effects of Saline and AG490 on volume of transplanted tumor of nude mice



A：对照组；B：低浓度 AG490 组(4 mg/kg)；C：高浓度 AG490 组(8 mg/kg)

图 2 AG490 对各组 SMMC-7721 细胞荷瘤裸鼠的抑瘤作用

Fig.2 Inhibitory effects of AG490 on transplanted tumor of nude mice with SMMC-7721 cells

2.2 AG490 对 SMMC-7721 细胞荷瘤裸鼠肿瘤细胞周期和凋亡的影响

流式细胞学分析结果显示，实验组的不同浓度 AG490 均可引起荷瘤裸鼠细胞周期 G0/G1 期阻滞。其中对照组 G0/G1 期百分比为(59.30 ± 1.13)%，浓度 4 mg/kg 和 8 mg/kg 的AG490 处理细胞 G1 期百分比分别为(73.98 ± 0.90)%和(81.39 ± 1.66)%。这提示 G0/G1 期细胞比例明显增高，与对照组相比有统计学差异(P<0.05)(图 3)。此外流式细胞仪检测结果显示对照组细胞凋亡率为(1.50 ± 0.12)%，而使用浓度 4 mg/kg 和 8 mg/kg 的 AG490 处理细胞凋亡率分别为(33.32 ± 1.16)%和(52.22 ± 1.06)%。可见不同浓度的 AG490 均可以使裸鼠移植瘤细胞的凋亡率明显升高，同对照组相比有统计学差异(P<0.05)(图 4)。同时发现随着 AG490 浓度的增高，对细胞周期 G0/G1 期阻滞和诱导细胞发生凋亡的作用愈强。

表 1 各组荷瘤裸鼠体质量、瘤重、瘤体积和抑瘤率的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of body weight, tumor weight and volume, inhibiting rate in transplanted tumor of nude mice in different groups($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量(n)	体质量(g)	瘤重(g)	瘤体积(mm^3)	抑瘤率(%)
对照组	7	25.09 ± 1.38	1.06 ± 0.14	567.8 ± 23.1	-
低浓度 AG490 组	7	25.04 ± 0.81[c]	0.57 ± 0.11[d]	433.4 ± 18.5[d]	46.90 ± 3.66[d]
高浓度 AG490 组	7	24.95 ± 0.71[a]	0.41 ± 0.06[b]	362.4 ± 12.4[b]	60.74 ± 1.96[b]

注：a，与其他 2 组比较，P=0.970；b：与其他 2 组比较，P=0.000；c：与高浓度 AG490 组比较，P=0.877；d：与高浓度 AG490 组比较，P<0.05

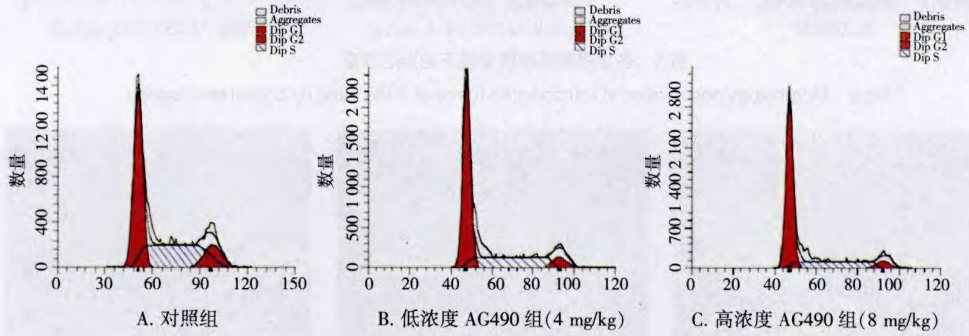


图 3 流式细胞学检测 AG490 对裸鼠移植瘤细胞周期的影响

Fig.3 Effects of AG490 on cell cycle distribution in transplanted tumor of nude mice by flow cytometry

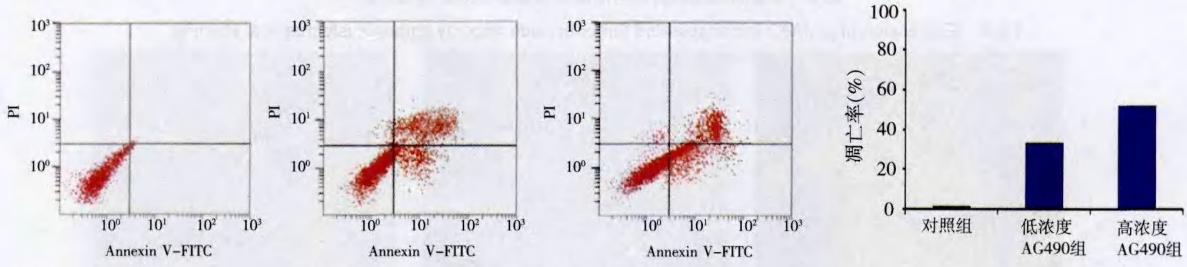


图 4 流式细胞学检测 AG490 对裸鼠移植瘤细胞凋亡率的影响

Fig.4 Effects of AG490 on cell apoptosis rates in transplanted tumor of nude mice by flow cytometry

2.3　AG490 对 SMMC-7721 细胞荷瘤裸鼠移植瘤苏木精-伊红染色的影响

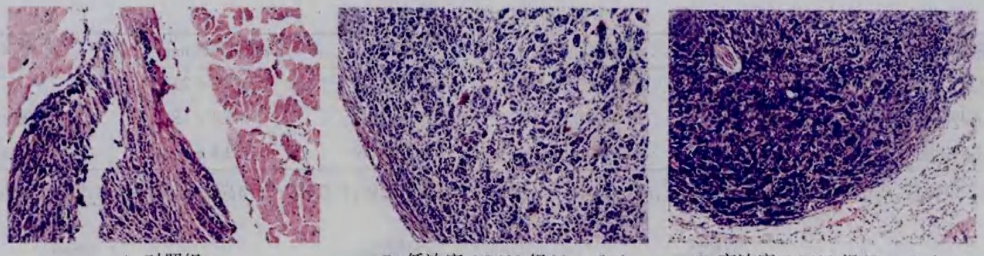
肉眼观察对照组肿瘤组织血供丰富，瘤体边缘界限模糊不清，周围皮下脂肪组织和肌肉组织受到肿瘤浸润。显微镜下可见肿瘤细胞呈巢、片状排列，肿瘤细胞体积大，细胞核大且深染，核仁明显，病理性核分裂相易见，肿瘤周围血管和淋巴管较丰富、局部区域的血管内可见瘤栓形成。而实验组肿瘤呈膨胀性生长，外有包膜形成，瘤体边缘与周围正常组织间界限清楚，无明显脂肪组织和肌肉组织浸润。显微镜下可见肿瘤细胞呈巢状、片状排列，肿瘤组织出现不同程度坏死，未发现明显淋巴管侵犯和血管内瘤栓形成(图 5)。

2.4　AG490 对 SMMC-7721 细胞荷瘤裸鼠移植瘤免疫组化的影响

p-JAK2 和 p-STAT3 阳性表达均位于肝癌细胞的细胞质，呈黄色或棕黄色颗粒状，染色较深(图 6、7)。对照组中大部分肿瘤细胞呈 p-JAK2 和 p-STAT3 阳性表达，而低浓度 AG490 组和高浓度 AG490 组阳性细胞显著少于对照组(均 $P<0.05$)。此外高浓度 AG490 组肿瘤细胞中阳性率低于低浓度 AG490 组。

2.5　AG490 对移植瘤组织中 JAK2/STAT3 信号通路及下游相关基因表达的影响

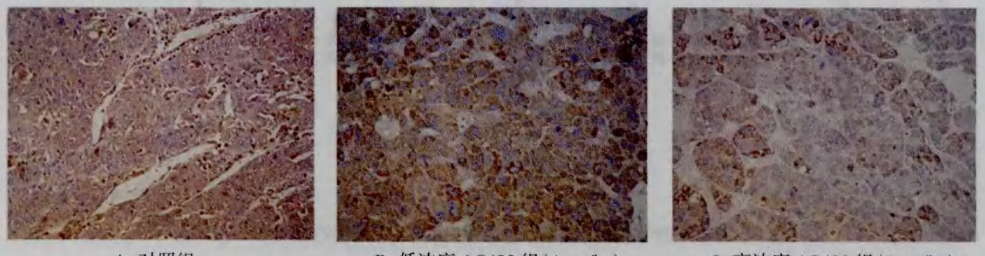
Western blot 检测结果显示，与对照组的 JAK-2 和STAT3 相比较，低浓度 AG490 组与高浓度 AG490 组无显著性差异($P>0.05$)。与对照组的 p-JAK2、p-STAT3、MMP-2、Bcl-2、Bcl-xl 及 Bax 相比较，低浓度 AG490 组与高浓度 AG490 组均有明显变化，且有统计学意义($P<0.01$)。与低浓度 AG490 组的 p-JAK2、p-STAT3、MMP-2、Bcl-2、Bcl-xl 及 Bax 相比较，高浓度 AG490 组均有明显变化，且差异有统计学意义($P<0.01$)。其结果表明：不同浓度的 AG490 组的移植瘤组织中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达和对照组无统计学差异($P>0.05$)，而 p-JAK2 和 p-STAT3 表达水平较对照组明显降低($P<0.05$)。与 p-JAK2 及 p-STAT3 的表达下调相一致的是 STAT3 下游靶蛋白(Bcl-2，Bcl-xl，MMP-2)都有不同程度的减弱，较对照组表达呈显著降低($P<0.05$)，而 Bax 蛋白表达水平较对照组呈显著增高($P<0.05$)，且呈浓度依赖性(图 8，表 2)。



A. 对照组　　B. 低浓度 AG490 组(4 mg/kg)　　C. 高浓度 AG490 组(8 mg/kg)

图 5　各组裸鼠移植瘤光镜下的形态观察

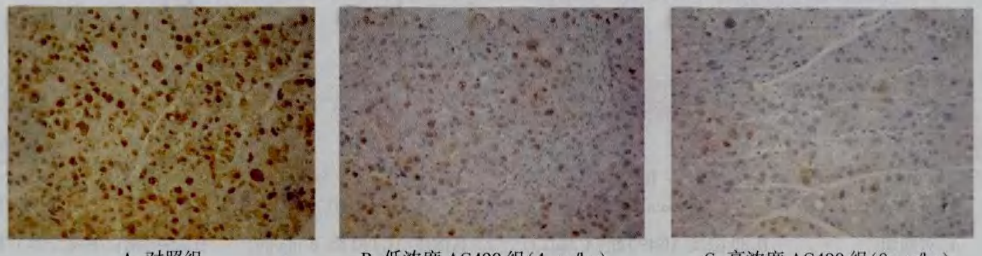
Fig.5　Morphology observation in transplanted tumor of nude mice by optical microscope



A. 对照组　　B. 低浓度 AG490 组(4 mg/kg)　　C. 高浓度 AG490 组(8 mg/kg)

图 6　免疫组化法检测各组裸鼠移植瘤 p-JAK2 蛋白表达

Fig.6　Expression of p-JAK2 in transplanted tumor of nude mice by immunohistochemical staining



A. 对照组　　B. 低浓度 AG490 组(4 mg/kg)　　C. 高浓度 AG490 组(8 mg/kg)

图 7　免疫组化法检测各组裸鼠移植瘤 p-STAT3 蛋白表达

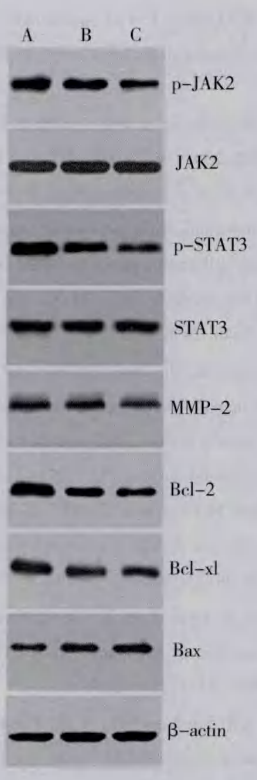
Fig.7　Expression of p-STAT3 in transplanted tumor of nude mice by immunohistochemical staining

表 2 各组 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、MMP-2、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 的相对表达量（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Relative expression of p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3, MMP-2, Bcl-2, Bcl-xl, Bax（$\bar{x} \pm s$）

组别	p-JAK2	JAK2	p-STAT3	STAT3	MMP-2	Bcl-2	Bcl-xl	Bax
对照组	1.265 ± 0.012	1.135 ± 0.033	1.477 ± 0.020	1.046 ± 0.036	1.034 ± 0.032	1.304 ± 0.029	1.195 ± 0.021	0.530 ± 0.029
低浓度组	1.073 ± 0.028[a]	1.141 ± 0.029	0.955 ± 0.025[a]	1.035 ± 0.028	0.768 ± 0.031[a]	0.786 ± 0.032[a]	0.858 ± 0.036[a]	0.678 ± 0.017[a]
高浓度组	0.763 ± 0.023[b]	1.125 ± 0.021	0.751 ± 0.037[b]	1.034 ± 0.016	0.715 ± 0.020[b]	0.719 ± 0.037[b]	0.757 ± 0.034[b]	0.701 ± 0.021[b]

注：相对密度是各组灰度与内参灰度的比值；a、b 与其余 2 组相比，$P<0.05$



A：对照组；B：低浓度 AG490 组（4 mg/kg）；
C：高浓度 AG490 组（8 mg/kg）

图 8 免疫印迹法检测各蛋白在肿瘤中的表达

Fig.8 Expression of various proteins in tumor by Western blot

3 讨 论

肝癌是一种恶性程度极高的肿瘤，目前普遍认为肝癌的发生发展是多基因突变、多步骤、多阶段的演进过程，现已发现有众多信号通路涉及其中[4]。随着人们对细胞信号通路的认识逐渐加深，该方面研究在肿瘤治疗方面日益受到关注。细胞信号通路在肝癌细胞传导中涉及多种信号转导途径，例如 JAK2/STAT3 信号通路能够迅速将信号由细胞外传递到细胞内，通过受体-酪氨酸激酶-信号传导和转录激活因子-靶基因的激活来实现，最终引发生物学效应。多项研究证实了多种肝癌细胞内均有 STAT3 的激活，JAK2/STAT3 信号通路的活化显著地促进了肝癌细胞增殖[5]。STAT3 通过信号传导途径参与了调节正常细胞的增殖、生存、凋亡、血管生成、免疫应答等过程。STAT3 通过对下游靶基因（抗凋亡因子 survivin、Bcl-xl、Bcl-2 及细胞增殖因子 cyclinD1，c-myc）表达的调控，从而促进肿瘤细胞生长和抑制凋亡的发生[6-8]。作为 JAK2/STAT3 信号通路特异性信号转导阻滞剂 AG490，其阻断途径作用机理是通过与受体酪氨酸激酶竞争结合位置以此抑制 JAK2 的磷酸化，从而进一步抑制 JAK2 的底物 STAT3 的磷酸化（磷酸化形式是酪氨酸蛋白激酶的活化形式），最终达到阻滞细胞信号传导作用。因此，越来越多的学者将作为 JAK2/STAT3 信号通路阻断剂的 AG490 用于恶性肿瘤的靶向治疗[9-10]。有研究表明应用 JAK2 激酶抑制剂 AG490 通过影响 STAT3 下游基因的表达从而抑制了肿瘤细胞的生长和转移[11-12]。

Kusaba 等[13]通过对多种肝癌细胞株体外药物干预发现 AG490 可以明显抑制肝癌细胞 STAT3 的磷酸化和激活。Lee 等[14]研究发现当使用 AG490 干预后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 p-STAT3 表达明显下降，同时发现细胞的粘附、侵袭和迁移力随之下降，这提示 AG490 对于抑制 STAT3 的活化和表达效果显著。Barton 等[15]对人前列腺癌细胞 DU145 的实验表明，AG490 可以通过提高促凋亡基因的表达来抑制癌细胞的增殖。梁斌等[16]实验通过使用 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后，抑制人胃癌细胞的增殖，而且抑制了侵袭因子 MMP-2 和MMP-9 的表达和上调了 MMP-2 和 MMP-9 抑制剂TIMP-1和 TIMP-2 的表达。马戎等[17]研究表明通过对人宫颈癌 Hela 细胞的裸鼠移植瘤模型应用 AG490，实验组瘤体积和瘤重量均较对照组显著减少。

本研究成功建立了人肝癌 BALB/C-nu 裸鼠动物模型，给予不同浓度的 AG490 进行干预，与对照组相比实验组的肿瘤生长均受到显著的抑制。实验期间实验组裸鼠生命体征平稳无死亡。治疗结束后发现实验组抑瘤率均较对照组明显下降，差异有统计学意义。实验组肿瘤重量和体积均小于对照组，而体质量变化差异无统计学意义。本实验显示肝癌裸鼠移植瘤对照组中的 STAT3 的活化形式 p-STAT3 呈高表达，但在 AG490 干预下，实验组的 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达显著下降，下游蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 和侵袭转移蛋白 MMP-2 表达也显著降低，结果说明在肝癌裸鼠移植瘤中，JAK2 抑制剂AG490 在裸鼠体内有效的抑制了 JAK2/STAT3 信号通路，通过诱导细胞凋亡、减少 STAT3 及其下游抗凋亡蛋白的表达来抑制肿瘤的增长。

综上所述，AG490 可以有效的抑制 JAK2/STAT3 信号通路的活化，通过阻断 STAT3 的激活和表达，显著下调肿瘤细胞抗凋亡相关重要基因的表达，从而达到抑制裸鼠移植瘤生长增殖和局部侵袭等恶性生物学行为的作用。这表明 AG490 可以在肝癌的治疗中发挥有效、安全的抗肿瘤作用，同时提示JAK2/STAT3 信号通路对于肝癌细胞增殖、凋亡和侵袭的重要影响，并且为治疗肝癌指引了一条新的思路。

参 考 文 献

[1] 陈晓萍，徐 飞. JAK-STAT3 信号通路研究进展[J]. 自然杂志，2002，25(3)：149-152.

[2] Wung BS，Hsu MC，Wu CC，et al. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells：effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation[J]. Life Sci，2005，78(4)：389-397.

[3] 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.

[4] Brivanlou AH，Darnell JE Jr. Signal transduction and the control of gene expression[J]. Science，2002，295(5556)：813-818.

[5] Mueller KM，Kornfeld JW，Friedbichler K，et al. Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice[J]. Hepatology，2011，54(4)：1398-1409.

[6] Haura EB，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.

[7] Hsieh FC，Cheng G，Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005，335(2)：292-299.

[8] Seita J，Asakawa M，Ooehara J，et al. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells[J]. Blood，2008，111(4)：1903-1912.

[9] 姚林方，叶章群，陈志强，等. AG490 在膀胱癌中的抗癌效应及其机制[J]. 肿瘤防治研究，2007，34(3)：195-198.

[10] Sriuranpong V，Park JI，Amomphmioltham P，et al. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT 3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autoerine/paraerine stmiulation of the interleukin6/gp130 cytokine system[J]. Cancer Res，2003，63(11)：2948-2956.

[11] Ogunwobi OO，Beales IL. The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JAK mitogen activated protein kinase，JAK2 and PI3 kinase/Akt[J]. International Journal of Colorectal Disease，2007，22(4)：401-409.

[12] Sekikawa A，Fllleui H，Fujii S，et al. REG lalpha protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells[J]. Carcinogenesis，2008，29(1)：76-83.

[13] Kusaba M，Nakao K，Goto T，et al. Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis[J]. Hepatol，2007，47(4)：546-555.

[14] Lee YK，Isham CR，Kaufman SH，et al. Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions，attenuates STAT3-directed transcription，and combines with the Jak kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy[J]. Mol Cancer Ther，2006，5(1)：138-148.

[15] Barton BE，Karras JG，Murphy TF，et al. Signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) activation in prostate cancer：Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines[J]. Mol Cancer Ther，2004，3(1)：11-20.

[16] 梁 斌，王 杉，叶颖江，等. JAK2 激酶抑制剂 AG490 对胃癌细胞侵袭的影响[J]. 中华普通外科杂，2004，19(10)：627-630.

[17] 马 戎，王海琳，叶云飞，等. AG490 单用或联合顺铂对宫颈癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 实用医学杂志，2009，25(2)：200-202.

（责任编辑：张辉洁）