

胃泌素通过 JAK2/STAT3 信号通路调控胃癌细胞上皮间质转化

罗振国¹, 朱国琴², 许海尘², 徐 伟^{2*}

(¹常州市第一人民医院干部一科, 江苏 常州 213003; ²南京医科大学第一附属医院老年消化科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察外源性 17 肽胃泌素 (gastrin-17, G-17) 对人胃癌 SGC-7901 细胞 E-钙黏素 (E-Cadherin) 及 N-钙黏素 (N-Cadherin) 表达的影响并对相关机制进行初步探究。方法: 体外培养胃癌 SGC-7901 细胞, 使用 G-17 与胃泌素受体 (cholecystokinin2 receptor, CCK2R) 特异性抑制剂 YM022 处理胃癌细胞 24 h 后, Western blot 检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达; 分别转染针对 CCK2R 的 siRNA 和过表达质粒, 观察 G-17 处理对 E-Cadherin 和 N-Cadherin 表达的影响; Western blot 检测 G-17/CCK2R 对 JAK2/STAT3 信号转导通路的活化情况; 在分别使用 JAK2 特异性抑制剂 AG490 抑制 JAK2/STAT3 信号转导通路的激活或降低 STAT3 表达后, 观察 G-17 对 E-Cadherin 和 N-Cadherin 表达的影响。结果: Western blot 显示外源性 G-17 处理能降低 SGC-7901 胃癌细胞 E-Cadherin 的表达并上调 N-Cadherin 的表达, 同时活化 JAK2/STAT3 信号转导通路, 且这种效应能够被 CCK2R 特异性抑制剂 YM022 或 siRNA 所阻断, 提示上述效应是由 CCK2R 所介导的。当使用 AG490 抑制 JAK2/STAT3 信号转导通路或下调 STAT3 表达后, G-17 诱导的 E-Cadherin 下调以及 N-Cadherin 上调效应会部分被逆转。结论: 外源性 G-17 可通过作用于胃癌 SGC-7901 细胞的 CCK2R, 进而激活 JAK2/STAT3 信号转导通路, 下调 E-Cadherin 蛋白表达, 上调 N-Cadherin 蛋白表达, 诱导胃癌 SGC-7901 细胞的上皮间质转化。

[关键词] 胃泌素; 胃癌; JAK2/STAT3 信号转导通路; 上皮间质转化

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1557-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20171204

Gastrin modulates procedure of epithelial to mesenchymal transition through JAK2/STAT3 pathway in human gastric cancer cells

Luo Zhenguo¹, Zhu Guoqin², Xu Haichen², Xu Wei^{2*}

(¹Department of Presbyiatrics, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213003; ²Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of exogenous gastrin-17 on the expression of E-Cadherin and N-Cadherin in human gastric cancer cell line SGC-7901, and discuss the related mechanisms. **Methods:** SGC-7901 cells were pre-treated with or without YM022 for 1 h and then incubated with G-17 for 30 min to detect the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway, for 24 h to detect the expression of E-Cadherin and N-Cadherin, respectively by western blot analysis. SGC-7901 cells were transfected with CCK2R-siRNA or full-length cDNA of human CCK2R (pCMV6-CCK2R), followed by G-17 treatment to detect the expression of p-STAT3, E-Cadherin and N-Cadherin. Cells were pre-treated with AG490 for 1 h or knockdown of STAT3 with siRNA, then incubated with G-17 for 24 h to evaluate the expression of E-Cadherin and N-Cadherin. **Results:** Western blot assay showed the exogenous G-17 significantly decreased the expression of E-Cadherin and increased the expression of N-Cadherin, meanwhile, activated the JAK2/STAT3 signaling pathway. Specific antagonist or siRNA against CCK2R partly blocked gastrin-induced activation of STAT3 and the expression of E-Cadherin and N-Cadherin, which suggested the effect of gastrin was CCK2R dependent. Specific inhibitor of JAK2/STAT3 signaling pathway AG490 and siRNA against STAT3 partly attenuated the effect of gastrin on the expression of E-Cadherin and N-Cadherin. **Conclusion:** Gastrin acting on the cholecystokinin2 receptor, down-regulates expression of E-Cadherin and up-regulates the expression of N-Cadherin, via activation of JAK2/STAT3 signaling pathway induced EMT in human gastric cancer cells.

[Key words] gastrin; gastric cancer; JAK2/STAT3 signaling pathway; epithelial to mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12):1557-1561]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151038)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xw2000mail@njmu.edu.cn

流行病学研究表明幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 感染是胃癌发病的重要因素之一^[1], Hp 感染可能参与了胃癌的浸润和转移^[2]。有研究发现, Hp 感染与胃癌细胞上皮间质转化的过程相关^[3], 但所涉及的分子调控机制尚未完全阐明。本研究前期发现, 胃泌素能通过 JAK2/STAT3 信号转导通路促进胃癌细胞增殖^[4], 最新研究也表明: 通用转录因子 3 (basic transcription factor 3, BTF3) 能通过调节 FOXM1 与 JAK2/STAT3 信号通路诱导胃癌细胞的上皮间质转化过程^[5]; 但胃泌素能否通过 JAK2/STAT3 信号转导通路调控胃癌细胞的上皮间质转化, 目前国内外尚无相关文献报道。本研究旨在通过观察胃泌素对胃癌细胞上皮间质转化关键蛋白 E-钙黏素 (E-Cadherin) 及 N-钙黏素 (N-Cadherin) 的影响, 并对其内在机制进行初步探究, 从而探讨胃泌素在胃癌侵袭转移中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901 购自于中国科学院上海细胞生物学研究所。新生牛血清、RPMI-1640 培养基、opti-MEM 培养基 (Gibco 公司, 美国); 17 肽胃泌素 (G-17, Sigma 公司, 美国)、胃泌素受体 (CCK2R) 抑制剂 YM022 (Tocris 公司, 英国)、JAK2 通道阻断剂 AG490 (Sigma 公司, 美国); Cocktail 蛋白酶抑制剂、SYBR Green Master mixture、X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent、X-tremeGene Hp DNA Transfection Reagent (Roche-applied-science 公司, 德国); 兔抗人 CCK2R 单克隆抗体 (Bioworld 公司, 美国)、兔抗人 p-STAT3、t-STAT3、E-Cadherin、N-Cadherin 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国); CCK2R-siRNA、STAT3-siRNA 及阴性对照序列 (negative control, NC) 由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成; CCK2R 的过表达质粒 CCK2R-pCMV6 及空载质粒 pCMV6 (Origene 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理

人胃癌 SGC-7901 细胞贴壁培养于含 10% 热灭活的新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 青、链霉素终浓度为 100 U/mL, 细胞培养于 37 °C 含 5% CO₂ 的饱和湿度的细胞培养箱中。取处于对数生长期、状态良好的胃癌细胞, 胰蛋白酶消化传代后, 接种于 60 mm 细胞培养皿, 继续培养 24 h, 更换无血清培养基, 根据实验目的分别使用浓度为 10

nmol/L 的特异性 CCK2R 拮抗剂 YM022 与浓度为 40 μmol/L 特异性 JAK2 信号通路抑制剂 AG490 预处理细胞 1 h, 再加入浓度为 10 nmol/L 的 G-17 继续培养 30 min, 检测 STAT3 的磷酸化水平、培养 24 h 检测 E-Cadherin 与 N-Cadherin 的表达水平, 以未加药组作为阴性对照, 以单纯使用胃泌素处理组作为阳性对照。

1.2.2 小 RNA 干扰

取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 37 °C 培养过夜, 待细胞融合度达到 50% 左右进行转染。在 100 μL opti-MEM 培养基中加入 5 μL siRNA 样品, 柔和混匀, 静置 3 min; 同时在 100 μL opti-MEM 培养基中加入 6 μL 转染试剂 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent, 柔和混匀, 静置 3 min。将制备好 siRNA 溶液加入制备好的转染试剂溶液中, 充分轻柔混合, 室温下放置 15~25 min, 以便形成 siRNA/脂质体混合物。取出待转染细胞, 吸弃原有培养基, 加入 1.8 mL 无血清、无双抗的培养基, 将 200 μL siRNA/脂质体混合物缓慢均匀加入含有细胞与培养基的细胞培养板中, 继续 37 °C 培养 24 h 后收集细胞, PCR 法检测 mRNA 水平的干扰效果, 48 h 后用 Western blot 法检测蛋白水平的干扰效果, 目的基因的干扰效果在前期工作中已验证。

1.2.3 过表达质粒的转染

取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 37 °C 培养过夜, 待细胞融合度达到 70%~80% 时进行转染。在 100 μL opti-MEM 培养基中加入 1 μg 质粒 DNA 样品, 柔和混匀, 静置 5 min; 同时在 100 μL opti-MEM 培养基中加入 3 μL 转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, 柔和混匀, 静置 5 min; 将制备好的质粒 DNA 溶液加入制备好的转染试剂溶液中, 充分轻柔混合, 室温下放置 20 min, 以便形成质粒 DNA/脂质体混合物。取出待转染细胞, 吸弃原有培养基, 加入 1.8 mL 无血清、无双抗的培养基, 将 200 μL 质粒 DNA/脂质体混合物缓慢均匀加入含有细胞与培养基的细胞培养板中继续培养。8 h 后更换含血清的新鲜培养基继续培养。转染后 24 h 用 PCR 法检测 mRNA 水平的过表达效果, 48 h 后用 Western blot 法检测蛋白水平的过表达效果, 过表达效果在我们前期工作中已验证。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验

收集细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤

3遍,加入含蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的细胞裂解液充分裂解。细胞裂解产物经 4℃、12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取样品蛋白按每孔 30 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,洗膜后一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 遍,洗脱未结合的一抗后辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 为二抗与膜孵育 2 h 后,用 ECL 发光试剂盒发光,X 胶片感光。应用扫描仪扫描蛋白印记胶片,使用灰度分析软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法

每组试验都独立重复 3 次。应用 SPSS 19.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析,所有数据分析结果均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各试验组和对照组的比较采用单因素方差分析(one-way ANO-

VA),各组之间两两比较使用 post-hoc analysis(LSD 法), $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃泌素作用于 CCK-2 受体诱导胃癌细胞上皮间质转化

胃泌素作用于胃癌 SGC-7901 细胞,显著降低 E-Cadherin 蛋白水平($P<0.01$)、升高 N-Cadherin 蛋白水平($P<0.01$);给予 CCK-2R 抑制剂 YM022 预处理胃癌细胞后,G-17 引起的 E-Cadherin 蛋白水平降低、N-Cadherin 水平升高的效应被部分逆转($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。干扰并下调 CCK2R 的表达后,E-Cadherin 蛋白表达水平升高、N-Cadherin 蛋白表达水平下降($P<0.01$);而转染并过表达 CCK2R 后则表现为相反效应($P<0.01$,图 1)。

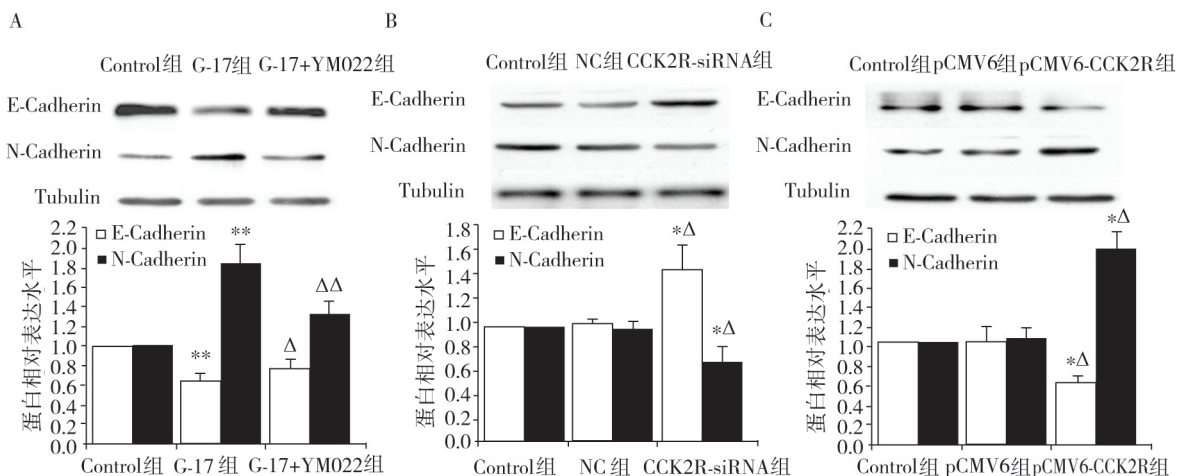


图 1 胃泌素对胃癌 SGC-7901 细胞 E-Cadherin 和 N-Cadherin 蛋白表达的影响
A: 胃癌细胞 SGC-7901 单独用 G-17 处理或使用 CCK2R 抑制剂 YM022 预处理 1h 后再以 G-17 处理 24 h 后,Western blot 检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达(与对照组比较,** $P<0.01$;与 G-17 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$);B: 干扰并下调 CCK2R 表达后,再以 G-17 处理细胞 24 h 后检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达(与对照组比较,* $P<0.01$;与 NC 组比较, $\Delta P<0.01$);C: 过表达并上调 CCK2R 表达后,再以 G-17 处理细胞,24 h 后检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达(与对照组比较,* $P<0.01$;与 pCMV6 组比较, $\Delta P<0.01$)。

Figure 1 CCK2R mediated the effect of gastrin on the expression of E-Cadherin and N-Cadherin

2.2 G-17 诱导胃癌 SGC-7901 细胞 JAK2/STAT3 信号通路磷酸化

胃泌素作用于胃癌 SGC-7901 细胞,能诱导 JAK2/STAT3 信号通路的磷酸化($P<0.01$),而 CCK2R 特异性抑制剂 YM022 对 G-17 诱导的 STAT3 磷酸化水平有下调作用($P<0.05$);干扰并下调 CCK2R 的表达后,STAT3 的磷酸化水平下降($P<0.01$);过表达并上调 CCK2R 的表达后,STAT3 的磷酸化水平上升($P<0.01$,图 2)。

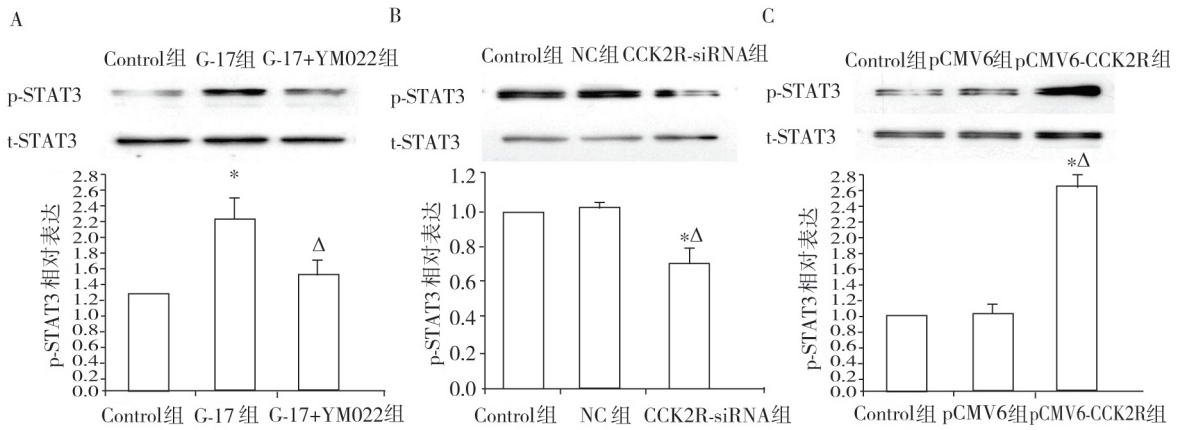
2.3 JAK2/STAT3 信号通路在 SGC-7901 细胞上皮间质转化中的作用

JAK2/STAT3 信号通路特异性抑制剂 AG490 能

抑制 G-17 诱导的胃癌 SGC-7901 细胞 E-Cadherin 蛋白水平的下降($P<0.05$)与 N-Cadherin 蛋白水平的升高($P<0.01$)。干扰并下调 STAT3 的表达水平后,E-Cadherin 蛋白的表达水平升高、N-Cadherin 蛋白表达水平降低($P<0.01$,图 3)。

3 讨论

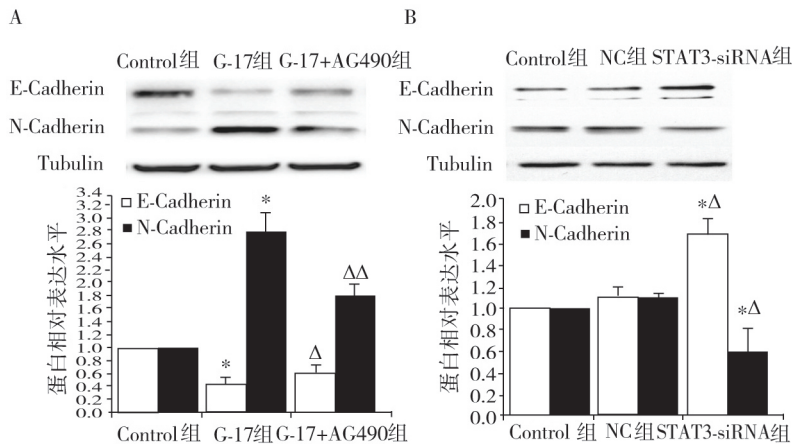
众所周知,侵袭和转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,也是导致肿瘤复发和影响预后的重要因素。本课题组前期研究发现,外源性胃泌素能诱导胃癌细胞增殖^[4]。有研究显示,胃泌素能促进胃癌细胞的迁移^[6],但具体机制不明。



A: 胃癌细胞 SGC-7901 单独用 G-17 处理或使用 CCK2R 抑制剂 YM022 预处理 1 h 后再以 G-17 处理 30 min 后, Western blot 检测 STAT3 的磷酸化水平(与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与 G-17 组比较, $\Delta P < 0.05$); B: 干扰并下调 CCK2R 表达后, 再以 G-17 处理细胞 30 min 后检测 STAT3 的磷酸化水平(与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与 NC 组比较, $\Delta P < 0.01$); C: 过表达并上调 CCK2R 表达后, 再以 G-17 处理细胞, 30 min 后检测 STAT3 的磷酸化水平(与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与 pCMV6 组比较, $\Delta P < 0.01$)。

图 2 胃泌素对胃癌 SGC-7901 细胞 JAK2/STAT3 信号通路的活化情况

Figure 2 Activation of JAK2/STAT3 signaling pathway in SGC-7901 treated with G-17



A: 胃癌细胞 SGC-7901 单独用 G-17 处理或使用 JAK2/STAT3 通路特异性抑制剂 AG490 预处理 1 h 后再以 G-17 处理 24 h 后, Western blot 检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达(与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与 G-17 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$); B: 干扰并下调 STAT3 表达后, 再以 G-17 处理细胞 24 h 后检测 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的表达(与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与 NC 组比较, $\Delta P < 0.01$)。

图 3 JAK2/STAT3 信号通路在 SGC-7901 细胞上皮间质转化中的作用

Figure 3 Effect of JAK2/STAT3 signaling pathway on EMT of SGC-7901

上皮间质转化现象普遍存在于胃癌、结肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤中, 并与淋巴结转移和预后不良密切相关。研究发现, 肿瘤微环境改变、细胞因子、生长因子刺激能引起转录因子 Snail、Slug、Twist 等转录调节异常, 诱导 E-Cadherin 表达下降, 同时上调 N-Cadherin 等表达, 最终导致上皮间质转化的发生^[7]。而 Hp 感染诱导胃癌细胞上皮间质转化的潜能使我们推测胃泌素可能参与了胃癌细胞上皮间质转化的过程。本研究发现, 外源性胃泌素能诱导胃癌 SGC-7901 细胞 E-Cadherin 表达下降, 同时上调 N-Cadherin 的表达。而阻断胃泌素与其受体 CCK2R 结合后, 上述效应被部分抵消。下调 CCK2R 的表达

后, E-Cadherin 蛋白表达水平升高、N-Cadherin 蛋白表达水平下降; 而转染并过表达 CCK2R 后则表现为相反的效应。上述结果提示, 胃泌素具有诱导胃癌细胞上皮间质转化的效应, 由此过程是由其受体 CCK2R 所介导。

JAK2/STAT3 信号转导通路广泛存在于包括细胞增殖与分化、蛋白合成、迁移和黏附等一系列细胞生物学行为中^[8], JAK2/STAT3 的持续活化与胃癌细胞的凋亡减少、新生血管增加、远处转移以及对化疗药物产生耐药相关^[9-10]。本研究发现, 胃泌素能激活 JAK2/STAT3 信号通路。使用 CCK2R 特异性抑制剂 YM022 预处理胃癌细胞后, 胃泌素上调 STAT3 磷酸

化水平的效应被部分阻断。下调 CCK2R 表达后,胃泌素诱导的 STAT3 磷酸化水平下降;反之,过表达 CCK2R 后,胃泌素诱导的 STAT3 磷酸化水平上升。上述结果提示,在胃癌细胞中,胃泌素可能通过与其受体 CCK2R 结合,进而激活 JAK2/STAT3 信号转导通路。

有研究指出,胃泌素能通过活化 JAK2 及 PI3K 调节 IEC-6 上皮细胞间黏附^[11]。但 JAK2/STAT3 信号转导通路是否参与了胃癌细胞的上皮间质转化过程的研究仍较少。有研究报道, Hp 感染所分泌的肿瘤坏死因子诱导蛋白能通过 IL6/STAT3 信号通路促进胃癌细胞的上皮间质转化过程^[12]。但胃泌素是否通过激活 JAK2/STAT3 信号转导通路诱导胃癌细胞上皮间质转化的过程尚未见报道。本研究发现:使用 JAK2/STAT3 信号转导通路特异性抑制剂 AG490 预处理胃癌细胞后,胃泌素下调 E-Cadherin 蛋白表达,上调 N-Cadherin 蛋白表达的效应被部分逆转。通过干扰并下调 STAT3 蛋白表达后,E-Cadherin 蛋白表达增加,N-Cadherin 蛋白表达下降。上述结果提示 JAK2/STAT3 信号转导通路参与了胃泌素诱导胃癌细胞上皮间质转化的过程。

综上所述,外源性胃泌素可能通过作用于 CCK2R,激活 JAK2/STAT3 信号转导通路,分别下调和上调 E-Cadherin 和 N-Cadherin 蛋白表达,诱导胃癌 SGC-7901 细胞的上皮间质转化,本研究可为进一步深入阐明胃癌侵袭和转移的机制提供参考。

[参考文献]

[1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015,65(2):87-108
[2] 李一鑫,李秀明,张楠,等. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生发展及预后的相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015,22(2):91-94,108
[3] Yin Y, Grabowska AM, Clarke PA, et al. Helicobacter pylori potentiates epithelial:mesenchymal transition in

gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7[J]. Gut,2010,59(8):1037-1045
[4] Xu W, Chen GS, Shao Y, et al. Gastrin acting on the cholecystokinin2 receptor induces cyclooxygenase-2 expression through JAK2/STAT3/PI3K/Akt pathway in human gastric cancer cells[J]. Cancer Lett,2013,332(1):11-18
[5] Zhang DZ, Chen BH, Zhang LF, et al. Basic Transcription 3 is required for proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition via regulation of FOXM1 and JAK2/STAT3 signaling in gastric cancer[J]. Oncol Res,2017, doi: 10.3727/096504017X14886494526344. [Epub ahead of print]
[6] Mishra P, Senthivayagam S, Rangasamy V, et al. Mixed lineage kinase-3/JNK1 axis promotes migration of human gastric cancer cells following gastrin stimulation[J]. Mol Endocrinol,2010,24(3):598-607
[7] Lindsey S, Langhans SA. Crosstalk of Oncogenic Signaling pathways during epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Oncol,2014,4:358
[8] Jang YN, Baik EJ. JAK-STAT pathway and myogenic differentiation[J]. JAKSTAT, 2013,2(2):e23282
[9] Deng J, Liang H, Zhang R, et al. STAT3 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer[J]. Tumour Biol,2013,34(5):2791-2800
[10] Huang S, Chen M, Shen Y, et al. Inhibition of activated Stat3 reverses drug resistance to chemotherapeutic agents in gastric cancer cells[J]. Cancer Lett,2012,315(2):198-205
[11] Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, et al. Involvement of JAK2 upstream of the PI 3-kinase in cell-cell adhesion regulation by gastrin[J]. Experimental Cell Research,2004,301(2): 128-138
[12] Chen G, Tang N, Wang C, et al. TNF-alpha-inducing protein of Helicobacter pylori induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer cells through activation of IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2017,484(2):311-317

[收稿日期] 2017-04-13



欢迎投稿 欢迎订阅