

AG490 对人胃癌裸鼠移植瘤中瘦素、 JAK2/STAT3 信号通路的影响^①

王宇,王澍,葛斌,舒清峰,唐乾利^②,黄衍强,黄许森

(右江民族医学院,广西 百色 533000 E-mail:740304936@qq.com)

摘要:目的 探讨在 AG490 干预下,瘦素(leptin)和 JAK2/STAT3 信号通路对人胃癌裸鼠移植瘤生长的影响,以及与其基因表达水平之间的关系。**方法** 建立人胃癌 SGC-7901 细胞 BALB/c-nu 雄性裸鼠移植瘤模型,将裸鼠随机平均分为 4 组,A 组为空白对照组,B 组腹腔注射 AG490,C 组腹腔注射 AG490 和碧生源牌减肥茶灌胃,D 组腹腔注射 5-FU。记录各组裸鼠肿瘤重量,计算肿瘤生长抑制率,RT-PCR 检测肿瘤中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平。**结果** AG490、5-FU 可抑制人胃癌移植瘤的生长,同时均可降低 leptin 表达水平;AG490 可同时降低 JAK2、STAT3 mRNA 的表达水平,而 5-FU 不能降低 JAK2、STAT3 mRNA 的表达;碧生源牌减肥茶对瘤重和 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 表达水平无影响。**结论** AG490 可能通过阻断 JAK2/STAT3 信号通路降低 leptin 的表达,进一步抑制胃癌细胞增殖。leptin 的调控除了 JAK2/STAT3 信号通路外可能还存在其他途径。

关键词: AG490;瘦素;JAK2/STAT3 信号通路;人胃癌裸鼠移植瘤

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0555-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.001

Effects of AG490 on leptin and JAK2/STAT3 signal pathway in transplanted tumor of nude mice with human gastric cancer

Wang Yu, Wang Shu, Ge Bin, Shu Qingfeng, Tang Qianli, Huang Yanqiang, Huang Xusen

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

E-mail: 740304936@qq.com)

Abstract: **Objective** To explore the effects of leptin and JAK2/STAT3 signal pathway on the growth of transplanted tumor of nude mice with human gastric cancer by intervening with AG490 and its relationship with the expression of genes. **Methods** The models of transplanted tumor of male BALB/c-nu nude mice with human gastric cancer SGC-7901 cells were established, and then the nude model mice were randomly divided into 4 groups equally. Group A was allocated to the blank control group, and group B was administered by intraperitoneal injection of AG490, and the mice of group C were given with intraperitoneal injection of AG490 combined with intragastric administration of Besunyen Slimming Tea, mice of group D were given 5-FU. The tumor weight of nude mice in each group was recorded, and the inhibiting rates of transplanted tumor growth were calculated. The expressions of leptin, JAK2 and STAT3 mRNA were detected by RT-PCR technique.

Results AG490 and 5-FU inhibited the transplanted tumor growth of nude mice with human gastric cancer, and both could lower the expression of leptin. And AG490 lowered both the expressions of JAK2 and STAT3

① 基金项目:2015 年广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2015220);2014 年国家自然科学基金项目(31460023)

② 通信作者,E-mail:htmgx@163.com

mRNA at the same time, but 5-FU didn't. Besunyen Slimming Tea had no effects on tumor weight, leptin, JAK2 and STAT3 mRNA. **Conclusion** AG490 may lower the expression of the leptin gene by inhibiting JAK2/STAT3 signal pathway for further inhibiting gastric cancer cells proliferation; meanwhile, there may be other pathway to adjust the expression of leptin except JAK2/STAT3 signal pathway.

Key words: AG490; leptin; JAK2/STAT3 signal pathway; transplanted tumor of nude mice with human gastric cancer

胃癌的发生与发展是一个多因素共同作用的复杂过程,包括 JAK2/STAT3 在内的细胞信号通路在胃癌的发生发展中起着重要作用。最先的研究发现瘦素(leptin)在体内的表达与肥胖等代谢疾病相关,随后研究发现与肿瘤的发生发展密切相关,但在胃癌的发生发展过程中其机制尚未完全清楚。本研究从 JAK2/STAT3 信号通路探讨 leptin 在胃癌中的表达,旨在为临床上胃癌的诊断及可能的靶向治疗提供一定的理论依据及研究新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 选用健康、SPF 级 BALB/c-nu 雄性裸鼠 40 只,4 周龄左右,体重 14~17 g,购自广西医科大学动物中心,许可证号:SCXK 桂 2014-0002。动物饲养于右江民族医学院实验动物中心,正常饲养,适应性喂养 1 周后进行造模实验。

1.1.2 药品与试剂 人胃癌 SGC-7901 细胞株(中国科学院上海研究所提供),AG490(购自美国 MedChemExpress 公司,CAS:133550-30-8),碧生源牌减肥茶(批准文号:国食健字 G20040371),5-Fluorouracil(即 5-FU,购自美国 MedChemExpress 公司,CAS:51-21-8)。TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒等均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要仪器 Heal Force 90 细胞培养箱,江苏华宇 SW-CJ-2F 医用净化工作台,LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪。

1.2 实验方法

1.2.1 胃癌 SGC-7901 细胞培养及细胞接种 人胃癌 SGC-7901 细胞株由中国科学院上海研究所提供,在右江民族医学院科研中心传代培养。使用 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、含 5% 二氧化碳培养箱中培养,取对数生长期的 SGC-7901 细胞,以胰蛋白酶-EDTA 消化后配置成浓度约为 1×10^7 /ml 单细胞悬液,消毒

后用 1 ml 注射器于裸鼠左前上肢腋下处皮下接种 0.2 ml/只,接种后定期观察,扪查皮下移植瘤的形成时间及生长情况,同时观察小鼠一般活动及营养状态等改变,以裸鼠出现直径 > 5 mm 的皮下结节作为成瘤标志。约 7 d 裸鼠全部成瘤,接种成功率为 100%。

1.2.2 动物分组及给药方法 待胃癌裸鼠皮下移植瘤模型成功建立后,将 40 只裸鼠采用随机数字表法分为 A、B、C、D 四组,每组 10 只。A 组为空白对照组,予等量生理盐水腹腔注射;B 组给予 8 mg/kg AG490 腹腔注射^[1];C 组给予 8 mg/kg AG490 腹腔注射,同时动物每日予碧生源牌减肥茶灌胃干预,药物剂量根据小鼠与标准成人体重等效剂量换算^[2],小鼠的药物等效剂量约为体重 60 kg 成人的 12.33 倍,据此推算造模期间 C 组动物每天的碧生源牌减肥茶灌胃剂量为 2.055 g/kg(即成人用量的 12.33 倍,以蒸馏水配置成溶液后予以灌胃)。D 组给予 50 mg/kg 5-FU 腹腔注射^[3]。其中,AG490 和 5-FU 的每次注射量均为 0.2 ml,每 3 天注射 1 次,共注射 4 次。停药次日处死裸鼠。

1.2.3 RT-PCR 检测肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 的表达水平 每个移植瘤组织切取约 100 μ g,使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取每个标本的总 RNA。然后使用 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒先去除 RNA 中的 DNA,将 RNA 逆转录制备成 cDNA。其中 leptin 基因、JAK2 基因、STAT3 基因及内参 GAPDH 基因的扩增引物由大连宝生物公司设计并合成(引物序列见表 1)。以 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 为染料,在 LightCycler[®] 96 仪器上进行荧光定量 PCR 检测,扩增条件为:预变性 95 °C 30 s,1 个循环;PCR 反应 95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环;熔解 95 °C 5 s,60 °C 60 s,95 °C 1 s。以 GAPDH 为内参,测定肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 的相对表达量。

表1 RT-PCR引物序列

引物名称	引物序列
leptin-F	5'-CACCAGGATCAATGACATTTTCCACA-3'
leptin-R	5'-AGCCAGGAATGAAGTCCAAAAC-3'
JAK2-F	5'-TTGAAGACCGGGATCCTACACA-3'
JAK2-R	5'-AGGGTCATACCGGCACATCTC-3'
STAT3-F	5'-GCAGCTGACTACACTGGCAGAGA-3'
STAT3-R	5'-ATTGTCCAGCCAGACCCAGAA-3'
GAPDH-F	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
GAPDH-R	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

1.3 检测指标 ①肿瘤重量的测量:实验动物处死后,完整剥取肿瘤,用电子天平称重(W)并记录。②抑瘤率的计算: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%。③检测肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 的表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸鼠肿瘤重量及抑瘤率的比较 四组裸鼠肿瘤重量总体差异有统计学意义($F = 3.042, P = 0.041$)。与 A 组相比,B、C、D 组裸鼠肿瘤重量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B 组抑瘤百分率最大,见表 2。

表2 各组裸鼠肿瘤重量及抑瘤率

组别	动物数	肿瘤重量($\bar{x} \pm s, g$)	抑瘤率(%)
A 组	10	1.459±0.557	0.00
B 组	10	1.007±0.294 ^a	30.98
C 组	10	1.035±0.250 ^a	29.06
D 组	10	1.061±0.375 ^a	27.28

注:与 A 组比较,a: $P < 0.05$

2.2 各组肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 的表达

2.2.1 RT-PCR 反应曲线分析 对各组肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 水平进行 RT-PCR 测定,分别得到 leptin、JAK2、STAT3 和内参 GAPDH 基因的扩增曲线和为熔解曲线。leptin、JAK2、STAT3 及内参 GAPDH 基因的扩增曲线均平行性良好,熔解曲线均呈现为单峰,未见异常双峰,说明扩增的产物为特异性的有效产物。

2.2.2 RT-PCR 相对定量结果分析 测定不同组织的 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 水平,以对照组为校

正对象,采用与内参基因 GAPDH mRNA 对比的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计,根据 Ct 值计算基因的相对表达量。四组裸鼠的肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 的表达水平总体差异均有统计学意义($P < 0.001$)。与 A 组 leptin 表达水平比较,B、C、D 组 leptin 表达水平明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),B 组与 C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 A 组 JAK2 表达水平比较,B、C 组 JAK2 表达水平明显下降,D 组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),B 组与 C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 A 组 STAT3 mRNA 表达水平比较,B、C 组 STAT3 mRNA 表达水平明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.001$),B 组与 C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表3 各组裸鼠肿瘤组织中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 的表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	leptin	JAK2	STAT3
A 组	10	1.082±0.194	0.939±0.110	0.971±0.101
B 组	10	0.419±0.379 ^a	0.620±0.071 ^a	0.635±0.033 ^a
C 组	10	0.418±0.122 ^a	0.648±0.147 ^a	0.643±0.163 ^a
D 组	10	0.562±0.220 ^b	1.068±0.171 ^b	0.996±0.114
F		16.272	28.546	31.206
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,a: $P < 0.001$,b: $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,位居消化道肿瘤的第一位,发病率在世界范围内排名第四,我国排名第二,其死亡率全球高居第二^[4]。leptin 是 1994 年由 Zhang 等^[5]首先在先天肥胖型小鼠中发现的一种蛋白质。进一步的研究发现,leptin 在体内存在广泛的生物学效应,其中它与恶性肿瘤的关系成为研究方向之一。在体内,leptin 不能独立发挥其相关生物学作用,需要与瘦素受体(leptin receptor, LEPR 或 ObR)相协调,有研究揭示 LEPR 与表皮生长因子受体结构类似,提示 leptin 可能起到类似生长因子的作用^[6]。而进一步的研究^[7]发现 leptin 与血管内皮生长因子(VEGF)存在显著的正相关性,提示 leptin 可能通过上调 VEGF 的表达,协同 VEGF 促进血管的生成,增加血管的通透性,从而更利于肿瘤的浸润和转移。

近年研究发现 JAK2/STAT3 信号通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶性转化,参与了人类恶性肿瘤的发生及发展^[8]。JAK2 为 JAK 家族中的四个亚

型之一,而 JAK 家族是一类非受体酪氨酸激酶家族,其底物为信号转导和转录激活蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)。STAT3 是 STAT 家族中一个潜在的细胞浆转录因子,STAT3 一旦到达受体,在羧基端第 705 位的酪氨酸磷酸化位点(Y705)被 JAK2 磷酸化形成 p-STAT3,通过 SH2 区的作用使 STAT3 形成同型或异型二聚体,并转移定位到细胞核,与特定基因启动子区域的 DNA 元件或其他的转录因子或附属的蛋白相互作用,从而调节基因表达。而 leptin 可直接作用于血管内皮细胞上的 LEPR,使其磷酸化而激活信号 STAT3,促进血管内皮细胞增殖,从而使新生血管形成^[9]。

AG490 是一种特异性的 JAK2/STAT3 信号通路阻滞剂,其结构类似于酪氨酸,可同酪氨酸激酶受体发生竞争性结合,从而抑制 JAK2 的磷酸化,进而抑制 JAK2 的底物 STAT3 的磷酸化,最终产生阻滞 JAK2/STAT3 信号通路的效果。5-FU 为临床上胃癌治疗中应用最广的化疗药物之一,该药物通过在体内转化为 5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸(5-F-2-dU),后者可抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,阻断脱氧尿嘧啶核苷酸转变为脱氧胸腺嘧啶核苷酸,从而抑制 DNA 的生物合成。本次实验所使用的碧生源牌减肥茶,为保健食品,通过 B 组与 C 组实验结果比较可知,在本次实验中该物质对肿瘤的重量以及肿瘤中 leptin、JAK2、STAT3 mRNA 的表达均未产生影响。

综上所述,在本次实验中,与对照组相比,实验组裸鼠的肿瘤重量均较小,并且肿瘤中 leptin 在 mRNA 水平的表达量均较低,据此可以推测 leptin 的过表达现象与胃癌的发生发展有关,降低 leptin 的表达可以抑制裸鼠胃癌移植瘤的生长增殖。此外,使用 AG490 与 5-FU 均可以降低 leptin 的表达。其中,AG490 作为一种 JAK2/STAT3 信号通路特异性阻滞剂,其通过阻断 JAK2/STAT3 信号通路,减少 JAK2 和 STAT3 的表达,从而降低 leptin 的表达,最终达到抑制胃癌的效果,其作用机制可能与 leptin 信号调节通路的关键是 STAT3 被 LEPR 相关的蛋白激酶磷酸化后激活^[10]有关。同时,5-FU 同样可以起到降低 leptin 表达,但未降低 JAK2 和 STAT3 的表达,说明其未影

响 JAK2/STAT3 信号通路,可能通过其他途径抑制 leptin 的表达,从而实现抑制胃癌的作用,进而可以推测 leptin 的调控除了 JAK2/STAT3 信号通路,还存在其他机制。

参考文献:

- [1] 马戎,鲁琰,王海琳,等. AG490 对人宫颈癌裸鼠移植瘤 STAT3 信号转导通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2011,27(9):1329-1330.
- [2] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [3] 范立侨,李勇,李巧霞,等. 塞来昔布联合氟尿嘧啶对 MFC 细胞 615 小鼠原位移植瘤 COX-2、Fas 表达的影响及意义[J]. 肿瘤学杂志,2015, 21(5):355-359.
- [4] Chung HW, Lim JB. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2014,20(7):1667-1680.
- [5] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature,1994,372(6505):425-432.
- [6] Attoub S, Noe V, Pirola L, et al. leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways[J]. FASEB J,2000,14(14):2329-2338.
- [7] 柯楠,李继昌. 瘦素、瘦素受体和血管内皮生长因子在胃癌中的表达及其在浸润和转移中的作用[J]. 临床荟萃, 2006,21(4):234-237.
- [8] You W, Tang Q, Zhang C, et al. IL-26 promotes the proliferation and survival of human gastric cancer cells by regulating the balance of STAT1 and STAT3 activation [J]. PLoS One,2013, 8(5):e63588.
- [9] 耿一婷,仇金荣,王蓉,等. 胃癌组织中表皮生长因子受体 2 和瘦素的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志,2011,33(10):764-769.
- [10] Knobelspies H, Zeidler J, Hekerman P, et al. Mechanism of attenuation of leptin signaling under chronic ligand stimulation[J]. BMC Biochem, 2010,11:2. doi: 10.1186/1471-2091-11-2.

收稿日期:2016-10-14;修回日期:2016-12-15