

引用本文:蒋可心,李宁,张旭.钙激活的氯离子通道A4通过抑制JAK激酶2/信号转导及转录激活蛋白3信号通路对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J].安徽医药,2021,25(3):474-478. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.010.



◇ 药学研究 ◇

钙激活的氯离子通道A4通过抑制JAK激酶2/信号转导及转录激活蛋白3信号通路对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

蒋可心¹, 李宁², 张旭¹

作者单位:¹中国医科大学肿瘤医院(辽宁省肿瘤医院)消化淋巴放疗科,辽宁 沈阳 110042;

²沈阳市二四五医院消化肿瘤科,辽宁 沈阳 110042

通信作者:张旭,男,副主任医师,研究方向为消化道肿瘤,Email:pfjvh42@163.com

摘要: **目的** 探讨钙激活的氯离子通道A4(CLCA4)对食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及JAK激酶2/信号转导及转录激活蛋白3(JAK2/STAT3)信号通路的影响。**方法** 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)与蛋白质印迹法(Western blotting)分别检测正常人食管鳞状上皮细胞与食管癌细胞中CLCA4的表达;将合成的CLCA4过表达载体及其对照分别转染至食管癌细胞Eca109,分别记作CLCA4过表达(pcDNA-CLCA4)组、CLCA4阴性对照(pcDNA-NC)组,并将未转染的细胞作为阴性对照(NC)组。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞增殖能力;细胞迁移实验(Transwell)检测细胞迁移及侵袭能力。JAK2/STAT3信号通路激活剂p-JAK2多肽对细胞增殖、迁移及侵袭的影响。Western blotting检测细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、依赖性激酶抑制因子(P21)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、JAK2、STAT3、磷酸化JAK激酶2(p-JAK2)、磷酸化信号转导及转录激活蛋白3(p-STAT3)的表达水平。**结果** 与Het-1A相比,人食管癌细胞KYSE170、Eca109、TE10中CLCA4 mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.05$);与pcDNA-NC组比较,pcDNA-CLCA4组细胞存活率显著降低[(52.16±11.41)%比(99.57±13.49)%, $P<0.05$],迁移细胞数[(56.47±10.03)%比(112.49±13.52)%]与侵袭细胞数[(63.43±9.87)%比(123.47±16.58)%]减少($P<0.05$),CyclinD1、MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3的表达水平降低($P<0.05$),P21的表达水平升高($P<0.05$);激活JAK2/STAT3信号通路可逆转CLCA4过表达对Eca109细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。**结论** CLCA4过表达可抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭,其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路活化有关。

关键词: 食管肿瘤; Janus 激酶2; STAT3 转录因子; 氯离子通道A4(CLCA4); JAK2/STAT3 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

Effect of CLCA4 on proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway

JIANG Kexin¹, LI Ning², ZHANG Xu¹

*Author Affiliation:*¹Department of Digestive and Lymphatic Radiotherapy, Cancer Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110042, China; ²Department of Digestive and Oncology, 245 Hospital of Shenyang, Shenyang, Liaoning 110042, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of calcium-activated chloride channel A4 (CLCA4) on the proliferation, migration, invasion and non-receptor tyrosine protein kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway of esophageal cancer cells. **Methods** qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of CLCA4 in normal human esophageal squamous cells and human esophageal cancer cells; the synthetic CLCA4 overexpression vector and its control were transfected into esophageal cancer cells (Eca109), denoted as CLCA4 overexpression (pcDNA-CLCA4) group, CLCA4 negative control (pcDNA-NC) group, and untransfected cells as negative control (NC) group. Thiazolan (MTT) detected cell proliferation ability; cell migration test (Transwell) detected cell migration and invasion ability. The effect of JAK2/STAT3 signaling pathway activator p-JAK2 polypeptide on cell proliferation, migration and invasion. Western blotting detected Cyclin D1 (CyclinD1), dependent kinase inhibitor (P21), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), non-receptor tyrosine protein kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylated tyrosine kinase 2 (p-JAK2), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3). **Results** Compared with Het-1A, the expression levels of CLCA4 mRNA and protein in human esophageal cancer cells KYSE170, Eca109 and TE10 were significantly lower ($P<0.05$). Compared with the pcDNA-NC group, the cell

viability of the pcDNA-CLCA4 group was significantly decreased [(52.16±11.41)% vs. (99.57±13.49)%], $P < 0.05$], and the number of migrated cells [(56.47±10.03)% vs. (112.49±13.52)%] and the number of invasive cells [(63.43±9.87)% vs. (123.47±16.58)%] were significantly decreased ($P < 0.05$), the expression levels of CyclinD1, MMP-2, MMP-9, p-JAK2, p-STAT3 were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of P21 was significantly increased ($P < 0.05$). Activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway reversed the inhibitory effect of CLCA4 overexpression on proliferation, migration and invasion of Eca109 cells. **Conclusion** Overexpression of CLCA4 can inhibit the proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells, and its mechanism may be related to the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway activation.

Key words: Esophageal neoplasms; Janus kinase 2; STAT3 transcription factor; CLCA4; JAK2/STAT3 signaling pathway; Proliferation; Migration; Invasion

食管癌是临床常见恶性肿瘤之一,其主要病理类型为食管鳞癌、食管腺癌,近年来,随着生活方式的改变,我国食管癌发病率逐年升高^[1-2]。由于食管癌早期发生迁移及侵袭导致病人术后生存率较低^[3]。钙激活的氯离子通道 A4 (Calcium-Activated Chloride Channel A4, CLCA4) 在头颈部鳞状细胞癌中呈低表达,其低表达量与病人预后不良有关^[4]。相关报道指出 CLCA4 在结直肠癌中呈低表达并可能发挥抑癌基因作用^[5]。但 CLCA4 在食管癌发生及转移过程中的调控机制尚未可知。JAK 激酶 2/信号转导及转录激活蛋白 3 (JAK2/STAT3) 信号通路可参与细胞增殖、凋亡、等生物学过程,肿瘤发生过程中该信号通路处于活化状态并可促进肿瘤发展进程^[6-7]。但 CLCA4 是否可通过调控 JAK2/STAT3 信号通路影响食管癌发生及转移过程尚未可知。本研究于 2019 年 1 月至 2019 年 8 月首先检测 CLCA4 在食管癌细胞系中的表达,选择表达最低的细胞系进行后续研究,探讨 CLCA4 过表达对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 正常人食管鳞状上皮细胞 Het-1A 与人食管癌细胞 KYSE170、Eca109、TE10 均购自美国 ATCC 细胞库。结晶紫均购自陕西碧云天生物; BCA 蛋白定量检测试剂盒、化学发光试剂 ECL、十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自美国 Pierce; pcDNA3.1 购自上海柯雷生物; JAK2/STAT3 信号通路激活剂磷酸化 JAK 激酶 2 (p-JAK2) 多肽购自上海吉尔; Lipofectamine2000 与 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen; 反转录试剂盒购自美国 Promega; 荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 ABI; Transwell 小室购自美国 Chemicon; Matrigel 基质胶购自美国 BD; 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 购自齐一生物科技(上海)有限公司; 兔抗人细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、依赖性激酶抑制因子 (P21) 抗体购自美国 Santa Cruz; 兔抗人基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 抗体购自厦门慧嘉生物科技有限公司; 兔抗人 JAK2、STAT3、p-JAK2、磷酸化信号转导及转录激活蛋白 3 (p-STAT3) 抗体购自美国

CST; 二抗购自北京中杉金桥生物。

1.2 方法

1.2.1 实验处理与分组 分别将 pcDNA-CLCA4、pcDNA-NC 转染至 Eca109 细胞, 分别记作 CLCA4 过表达 (pcDNA-CLCA4) 组、CLCA4 阴性对照 (pcDNA-NC) 组, 转染前 1 d 将培养液更换为 Opti-MEM 减血清培养基, 转染 6 h 后将培养液更换为含有 10% 胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基, 继续培养 48 h。将正常培养的 Eca109 细胞记作阴性对照 (NC) 组。后续实验分组: pcDNA-CLCA4 组、p-JAK2 多肽组 (含有 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 p-JAK2 多肽培养液培养 Eca109 细胞 48 h)、pcDNA-CLCA4+p-JAK2 多肽组 (pcDNA-CLCA4 转染至 Eca109 细胞 48 h 后, 用含有 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 p-JAK2 多肽培养液培养 Eca109 细胞 48 h)。

1.2.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测细胞中 CLCA4 mRNA 表达水平 收集各组细胞, 加入适量 Trizol, 室温静置 5 min, 依次加入氯仿与异丙醇, 提取细胞总 RNA。取 2 μg RNA 进行反转录, 按照试剂盒说明书配置反应体系, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 cDNA。RT-PCR 反应扩增体系为 20 μL , 按照试剂盒说明书配置反应体系, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 CLCA4 mRNA 相对表达量。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT 法) 检测细胞增殖 收集各组转染后食管癌 Eca109 细胞 (3×10^4 个/毫升) 接种于 96 孔板 (100 微升/孔), 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 放入振荡仪匀速振荡 10 min, 应用酶标仪检测各孔相对吸光度 (490 nm)。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭 迁移实验: 取各组 Eca109 细胞按照每孔 200 μL 的密度加入上室, 含有 10% 胎牛血清的培养液加入下室 (600 微升/孔), 24 h 后甲醛固定 20 min, PBS 洗涤, 0.1% 结晶紫染液染色 10 min, 显微镜下观察并计数。侵袭实验: 制备 Matrigel 基质胶稀释液加入上室 (40 微升/孔), 后续实验步骤同迁移实验。

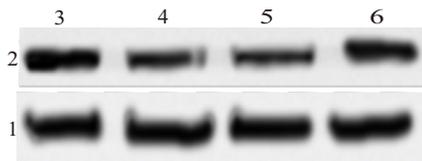
1.2.5 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 CLCA4、CyclinD1、P21、MMP-2、MMP-9、JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达 提取细胞总蛋白, 取

50 μg 蛋白上样量加入 1×SDS 缓冲溶液,沸水中煮 5 min(蛋白变性),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h,加入目的蛋白一抗稀释液,4℃孵育 24 h,加入相应二抗稀释液,室温孵育 1 h,等渗缓冲盐溶液(TBST)洗涤,加入 ECL 化学发光剂,显影,定影,应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLCA4 在正常人食管鳞状上皮细胞与人食管癌细胞中的表达 qRT-PCR 与 Western blotting 检测结果显示,相较于正常人食管鳞状上皮细胞 Het-1A,人食管癌细胞 KYSE170、Eca109、TE10 中 CLCA4 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低(*P* < 0.05),其中 CLCA4 在食管癌 Eca109 细胞中的表达水平与其他细胞系比较明显降低,因而选用食管癌 Eca109 细胞进行后续研究。见图 1、表 1。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—钙激活的氯离子通道 A4 (CLCA4);3—正常人食管鳞状上皮细胞 Het-1A;4—人食管癌 KYSE170 细胞株;5—人食管癌 Eca109 细胞株;6—人食管癌 TE10 细胞株。

图 1 CLCA4 蛋白免疫印迹图

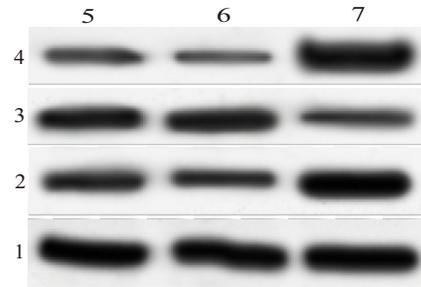
表 1 钙激活的氯离子通道 A4(CLCA4)在正常人食管鳞状上皮细胞 Het-1A 与人食管癌细胞 KYSE170、Eca109、TE10 中的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	CLCA4 mRNA	CLCA4 蛋白
Het-1A	9	1.01±0.15	0.85±0.10
KYSE170	9	0.65±0.13 ^①	0.52±0.08 ^①
Eca109	9	0.41±0.08 ^①	0.36±0.05 ^①
TE10	9	0.58±0.07 ^①	0.70±0.09 ^①
<i>F</i> 值		45.320	60.567
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:①与 Het-1A 相比,*P* < 0.05。

2.2 CLCA4 过表达对食管癌 Eca109 细胞增殖的影响 Western blotting 检测结果显示,pcDNA-CLCA4 组食管癌 Eca109 细胞中 CLCA4 蛋白相对表达量显著高于 pcDNA-NC 组(*P* < 0.05)。提示成功上调 CLCA4 的表达。MTT 检测结果显示,与 pcDNA-NC 组相比,pcDNA-CLCA4 组食管癌 Eca109 细胞存活率显著降低(*P* < 0.05),NC 组与 pcDNA-NC 组比较差

异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 2。与 pcDNA-NC 组比较,pcDNA-CLCA4 组食管癌 Eca109 细胞中 CyclinD1 蛋白相对表达量显著降低(*P* < 0.05),P21 蛋白相对表达量显著升高(*P* < 0.05)。见图 2、表 2。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—依赖性激酶抑制因子(P21);3—细胞周期蛋白 D1(CyclinD1);4—钙激活的氯离子通道 A4(CLCA4);5—NC 组;6—pcDNA-NC 组;7—pcDNA-CLCA4 组。

图 2 CLCA4 蛋白与细胞增殖相关蛋白免疫印迹图

表 2 CLCA4 过表达对食管癌 Eca109 细胞增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	CLCA4 蛋白	细胞存活率/%	CyclinD1 蛋白	P21 蛋白
NC 组	9	0.45±0.05	100.01±12.16	0.89±0.06	0.68±0.08
pcDNA-NC 组	9	0.47±0.08	99.57±13.49	0.87±0.09	0.66±0.04
pcDNA-CLCA4 组	9	1.05±0.11 ^①	52.16±11.41 ^①	0.36±0.03 ^①	1.03±0.11 ^①
<i>F</i> 值		149.314	44.386	193.357	58.164
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:CLCA4 为钙激活的氯离子通道 A4,CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1,P21 为依赖性激酶抑制因子。

①与 pcDNA-NC 组相比,*P* < 0.05。

2.3 CLCA4 过表达对食管癌 Eca109 细胞迁移及侵袭的影响 pcDNA-CLCA4 组迁移细胞数与侵袭细胞数均显著少于 pcDNA-NC 组(*P* < 0.05),MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量均低于 pcDNA-NC 组(*P* < 0.05),NC 组与 pcDNA-NC 组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3、图 3。

2.4 CLCA4 过表达对 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达影响 Western blotting 检测结果显示,pcDNA-CLCA4 组食管癌 Eca109 细胞中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白相对表达量均显著低于 pcDNA-NC 组(*P* < 0.05),而各组间 JAK2、STAT3 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见图 4、表 4。

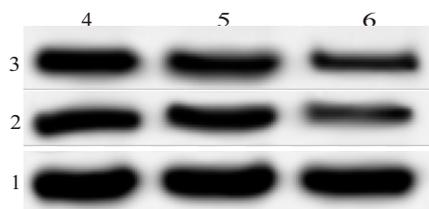
2.5 激活 JAK2/STAT3 信号通路可逆转 CLCA4 过表达对食管癌 Eca109 细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用 与 pcDNA-CLCA4+p-JAK2 多肽组比较,pcDNA-CLCA4 组细胞存活率显著降低(*P* < 0.05),迁移细胞数与侵袭细胞数减少(*P* < 0.05);与 pcDNA-CLCA4+p-JAK2 多肽组比较,p-JAK2 多肽组细胞存

表3 CLCA4过表达对食管癌Eca109细胞迁移及侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
NC组	9	116.35±12.34	128.34±13.59	0.97±0.13	0.86±0.12
pcDNA-NC组	9	112.49±13.52	123.47±16.58	0.95±0.11	0.83±0.15
pcDNA-CLCA4组	9	56.47±10.03 ^①	63.43±9.87 ^①	0.46±0.05 ^①	0.42±0.04 ^①
F值		69.605	63.354	71.514	42.382
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:CLCA4为钙激活的氯离子通道A4,MMP-2为基质金属蛋白酶2,MMP-9为基质金属蛋白酶9。

①与pcDNA-NC组相比, $P < 0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶9(MMP-9);3—基质金属蛋白酶2(MMP-2);4—NC组;5—pcDNA-NC组;6—pcDNA-CLCA4组。

图3 细胞迁移及侵袭相关蛋白免疫印迹图

注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—磷酸化信号转导及转录激活蛋白3(p-STAT3);3—信号转导及转录激活蛋白3(STAT3);4—磷酸化JAK激酶2(p-JAK2);5—JAK激酶2(JAK2);6—NC组;7—pcDNA-NC组;8—pcDNA-CLCA4组。

图4 JAK2/STAT3信号通路相关蛋白免疫印迹图**表4** CLCA4过表达对JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	JAK2	p-JAK2	STAT3	p-STAT3
NC组	9	0.85±0.13	0.89±0.11	0.79±0.10	0.76±0.09
pcDNA-NC组	9	0.87±0.15	0.86±0.18	0.72±0.11	0.74±0.10
pcDNA-CLCA4组	9	0.86±0.18	0.53±0.06 ^①	0.77±0.13	0.41±0.05 ^①
F值		0.038	22.397	0.900	50.636
P值		0.963	<0.001	0.420	<0.001

注:CLCA4为钙激活的氯离子通道A4,JAK2为JAK激酶2,p-JAK2为磷酸化JAK激酶2,STAT3为信号转导及转录激活蛋白3,p-STAT3为磷酸化信号转导及转录激活蛋白3。

①与pcDNA-NC组相比, $P < 0.05$ 。

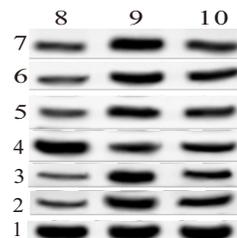
活率升高($P < 0.05$),迁移细胞数与侵袭细胞数增多($P < 0.05$),见表5。与pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组比较,pcDNA-CLCA4组食管癌Eca109细胞中p-JAK2、p-STAT3、CyclinD1、MMP-2、MMP-9蛋白相对表达量均降低($P < 0.05$),P21蛋白水平升高($P < 0.05$);与pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组比较,p-JAK2多肽组p-JAK2、p-STAT3、CyclinD1、MMP-2、MMP-9蛋白水平升高($P < 0.05$),P21蛋白水平降低($P < 0.05$)。见图5、表6。

表5 激活JAK2/STAT3信号通路可逆转CLCA4过表达对食管癌Eca109细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	细胞存活率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
pcDNA-CLCA4组	9	53.25±12.03 ^①	57.42±13.24 ^①	64.43±10.03 ^①
p-JAK2多肽组	9	96.16±16.38 ^①	98.47±15.28 ^①	96.45±12.15 ^①
pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组	9	80.58±10.86	75.26±13.08	80.14±11.71
F值		23.993	19.728	17.962
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:JAK2为JAK激酶2,STAT3为信号转导及转录激活蛋白3,CLCA4为钙激活的氯离子通道A4。

①与pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组比较, $P < 0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶9(MMP-9);3—基质金属蛋白酶2(MMP-2);4—依赖性激酶抑制因子(P21);5—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);6—磷酸化信号转导及转录激活蛋白3(p-STAT3);7—磷酸化JAK激酶2(p-JAK2);8—pcDNA-CLCA4组;9—p-JAK2多肽组;10—pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组。

图5 JAK2/STAT3信号通路相关蛋白与细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白免疫印迹图

3 讨论

目前临床治疗食管癌已取得一定进展,但病人预后仍然很差,探究其根本原因在于食管癌细胞迁移及侵袭能力增强^[8]。既往研究显示食管癌发生发展过程涉及多种miRNA、基因等,但关于其具体作用机制尚未阐明^[9-10]。因而本研究积极探寻新型基因为食管癌靶向治疗提供潜在靶点。

CLCA4在结直肠癌、肝细胞癌、乳腺癌等肿瘤中呈低表达并可抑制细胞侵袭及迁移^[11-13]。但CLCA4在食管癌中的表达尚未可知。本研究结果显示CLCA4在食管癌细胞系中的表达水平明显降低,

表6 JAK2/STAT3信号通路相关蛋白与细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达量/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-JAK2	p-STAT3	CyclinD1	P21	MMP-2	MMP-9
pcDNA-CLCA4组	9	0.54±0.05 ^①	0.42±0.02 ^①	0.35±0.04 ^①	1.02±0.10 ^①	0.44±0.06 ^①	0.43±0.02 ^①
p-JAK2多肽组	9	1.05±0.10 ^①	0.98±0.10 ^①	0.86±0.08 ^①	0.46±0.08 ^①	0.96±0.13 ^①	0.98±0.15 ^①
pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组	9	0.75±0.03	0.76±0.09	0.66±0.07	0.61±0.07	0.55±0.10	0.57±0.11
F值		132.381	116.173	138.209	106.521	66.482	63.026
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:JAK2为JAK激酶2,STAT3为信号转导及转录激活蛋白3,p-JAK2为磷酸化JAK激酶2,p-STAT3为磷酸化信号转导及转录激活蛋白3,CyclinD1为细胞周期蛋白D1,P21为依赖性激酶抑制因子,MMP-2为基质金属蛋白酶2,MMP-9为基质金属蛋白酶9,CLCA4为钙激活的氯离子通道A4。

①与pcDNA-CLCA4+p-JAK2多肽组比较,P<0.05。

CLCA4过表达后可明显抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭。研究表明CyclinD1可促进细胞周期由G1期进入S期,促进细胞增殖,而P21可抑制CyclinD1表达^[14]。MMP-2、MMP-9是基质金属蛋白酶类重要成员,可促进肿瘤细胞迁移及侵袭^[15]。本研究结果显示CLCA4过表达后可抑制食管癌细胞中CyclinD1、MMP-2、MMP-9的表达及促进P21的表达,提示CLCA4过表达可减弱食管癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

JAK2/STAT3信号通路激活可抑制肝癌细胞凋亡,抑制该信号通路后肝癌细胞凋亡能力显著增强^[16]。研究表明吴茱萸碱可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路激活从而发挥抗结肠癌作用^[17]。相关报道指出抑制JAK2/STAT3信号通路激活可减弱鼻咽癌细胞迁移及侵袭能力^[18]。本研究结果显示CLCA4过表达后食管癌细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平显著降低,用p-JAK2多肽激活JAK2/STAT3信号通路后,CLCA4过表达对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用明显减弱。

综上所述,CLCA4在食管癌细胞中呈低表达,CLCA4过表达后食管癌细胞增殖、迁移及侵袭能力降低,其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路有关,为食管癌靶向治疗提供新方向。但CLCA4对食管癌其他生物学特性及相关分子机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] 冉永刚,游颜杰,张晓辉,等. TSLC1基因对食管癌细胞EC109增殖与侵袭能力抑制的实验研究[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(6): 755-759.

[2] 刘飞,孟令娇,刘世娜,等. miR-92b通过调控EZH2基因的表达抑制食管癌细胞Eca109的增殖和侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(2): 118-124.

[3] TAKEUCHI M, TAKEUCHI H, KAWAKUBO H, et al. Perioperative risk calculator predicts long-term oncologic outcome for patients with esophageal carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(3): 837-843.

[4] 张永红,刘雅丽. CLCA4基因在头颈部鳞状细胞癌中的表达与其临床意义[J]. 中国当代医药, 2019, 26(14): 17-20.

[5] 王倩,袁莉莉,范文涛. 基于GEO和TCGA数据库分析促癌基因INHBA和抑癌基因CLCA4、CA4在结直肠癌中表达[J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(3): 279-282.

[6] 杨慧梅,刘忠,王岩. JAK/STAT信号通路抑制剂AG490对人大脑胶质瘤U87细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤, 2015, 35(12): 1296-1303.

[7] 卜秀梅,王文刚,李辉,等. 抑制食管癌STC-1基因表达对食管癌细胞凋亡、IL-1β和TNF-α表达及JAK2/STAT3信号的影响研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(2): 186-191.

[8] SHI F, SHANG L, PAN BQ, et al. Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin-1 expression via STAT5A[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153-6162.

[9] ZHANG HC, TANG KF. Clinical value of integrated-signature miRNAs in esophageal cancer[J]. Cancer Med, 2017, 6(8): 1893-1903.

[10] WANG Y, ZHAO H, ZHI W. SEMA4D under the posttranscriptional regulation of HuR and miR-4319 boosts cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(2): 122-129.

[11] CHEN H, LIU Y, JIANG CJ, et al. Calcium-activated chloride channel A4 (CLCA4) plays inhibitory roles in invasion and migration through suppressing epithelial-mesenchymal transition via PI3K/AKT signaling in colorectal cancer [J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1): 4176-4185.

[12] LIU Z, CHEN M, XIE LK, et al. CLCA4 inhibits cell proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition via PI3K/AKT signaling[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(10): 2570-2584.

[13] YU Y, WALIA V, ELBLE RC. Loss of CLCA4 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83943-e83954. DOI: 10.1371/journal.pone.0083943.

[14] 甘颖,李虹怡. 下调DPT基因通过调节CyclinD1抑制食道癌细胞的增殖[J]. 解剖科学进展, 2019, 25(2): 136-138.

[15] 曹燕飞,任睿,罗向晖,等. CNTN-1促进人食管癌EC9706细胞侵袭和迁移[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(9): 1286-1291.

[16] 郭佳培,郭彬,李雷雷,等. 青蒿素通过抑制JAK2/STAT3信号通路诱导肝癌细胞凋亡[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(2): 97-100.

[17] 赵绿翠,廖科,李科琼,等. 吴茱萸碱调控人结肠癌HCT-116细胞中JAK2/STAT3信号通路的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(10): 1394-1398.

[18] 胡兵,王鸿梅,初建设. 微小RNA-375对鼻咽癌细胞侵袭迁移及JAK2/STAT3信号通路的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(8): 678-682.

(收稿日期:2019-11-14,修回日期:2020-01-07)