

EGFR 通过 IL-6/STAT3 信号通路对肺癌细胞增殖及凋亡的影响^{*}

韩瑛¹ 胡玉林² 曹慧秋² 李晓杰² 陈志军²

(1. 湘南学院基础医学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市第一人民医院病理诊断中心, 湖南 郴州 423000)

【摘要】 目的 探究表皮生长因子受体(EGFR)对肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制。**方法** 以人正常支气管上皮细胞 16HBE 及肺癌细胞 A549、H1299、MSTO-211H 为研究对象, qRT-PCR、western blot 分别检测细胞中 EGFR mRNA、蛋白水平。将 MSTO-211H 细胞分为 NG 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-EGFR 组、pcDNA3.1-EGFR+anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组; qRT-PCR 检测 EGFR mRNA 水平; CCK-8 法及平板克隆实验、Hoechst33342 染色法及流式细胞仪分别检测细胞增殖、凋亡情况; western blot 检测 EGFR、细胞周期素 D1(CyclinD1)、凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)及白介素-6/Janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导子与转录激活子 3(IL-6/JAK/STAT)通路相关蛋白表达。**结果** 与 16HBE 细胞比较, A549、H1299、MSTO-211H 中 EGFR mRNA 及蛋白表达水平显著升高, 且 MSTO-211H 细胞中 EGFR mRNA 及蛋白表达水平最低, 因此选择 MSTO-211H 细胞进行后续实验; 与 NG 组、pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞凋亡活动明显减弱, 且细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著降低($P<0.05$), 克隆形成率、EGFR、CyclinD1、Bcl-2、IL-6、p-JAK/JAK、p-STAT/STAT 蛋白表达显著升高($P<0.05$); 与 pcDNA3.1-EGFR 组比较, pcDNA3.1-EGFR+anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组 MSTO-211H 细胞凋亡活动明显增强, 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高($P<0.05$), 克隆形成率、CyclinD1、Bcl-2、IL-6、p-JAK/JAK、p-STAT/STAT 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 过表达 EGFR 可促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡, 可能是通过促进 IL-6/JAK/STAT 信号通路活化实现的。

【关键词】 表皮生长因子受体; 肺癌; 白介素-6/信号转导子与转录激活子 3 通路; 细胞增殖; 凋亡

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 007

The effects of EGFR on lung cancer cell proliferation and apoptosis through IL-6/STAT3 signaling pathway

HAN Ying¹, HU Yulin², CAO Huiqiu², LI Xiaojie², CHEN Zhijun²

(1. School of Basic Medicine, Xiangnan University, Chenzhou 423000, Hunan, China;

2. Pathology Diagnosis Center, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou 423000, Hunan, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) on the proliferation, apoptosis of lung cancer cells and related mechanisms. **Methods** Taking human normal bronchial epithelial cells 16HBE and lung cancer cells A549, H1299, MSTO-211H as the research objects, qRT-PCR and western blot were used to detect the levels of EGFR mRNA and protein in cells, respectively. MSTO-211H cells was divided into NG group, pcDNA3.1 group, pcDNA3.1-EGFR group, pcDNA3.1-EGFR+anti-IL-6 group, pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 group. qRT-PCR was used to detect EGFR mRNA level; CCK-8 method and plate cloning experiment, Hoechst33342 staining method and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis respectively. Western blotting was used to detect the changes of expression of EGFR, cell cycle protein D1 (CyclinD1), apoptosis-related protein B-cell lymphocyte-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (IL-6/JAK/STAT)

基金项目: 湘南学院 2018 年校级课题(2018XJ67)

通信作者: 陈志军, E-mail: 410623945@qq.com

引用本文: 韩瑛, 胡玉林, 曹慧秋, 等. EGFR 通过 IL-6/STAT3 信号通路对肺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(9): 1281-1287.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 007

pathway related proteins. **Results** Compared with 16HBE cells, EGFR mRNA and protein expression levels in A549, H1299, and MSTO-211H were significantly increased, and EGFR mRNA and protein expression levels in MSTO-211H cells were the lowest. Therefore, MSTO-211H cells were selected for subsequent experiments; compared with the NG group and the pcDNA3.1 group, the apoptotic activity of MSTO-211H cells in the pcDNA3.1-EGFR group was significantly weakened, the cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate, EGFR and Bax protein expression were significantly reduced ($P < 0.05$), the clone formation rate, CyclinD1, Bcl-2, IL-6, p-JAK/JAK, and p-STAT/STAT protein expression were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the pcDNA3.1-EGFR group, the apoptotic of MSTO-211H cells in the pcDNA3.1-EGFR+anti-IL-6 group and pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 group was significantly enhanced, the cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate, and Bax protein expression were significantly increased ($P < 0.05$), the clone formation rate, CyclinD1, Bcl-2, IL-6, p-JAK/JAK, and p-STAT/STAT protein expression were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of EGFR can promote the proliferation of MSTO-211H cells and inhibit cell apoptosis, which may be achieved by promoting the activation of IL-6/JAK/STAT signaling pathway.

【Key words】 Epidermal growth factor receptor; Lung cancer; Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 pathway; Cell proliferation; Apoptosis

肺癌是患病率及病死率较高的恶性肿瘤之一,尽管目前临床采用手术及放化疗、靶向治疗等方式治疗,但患者 5 年生存率仍不足 15%^[1-3]。因此,进一步探索肺癌发病相关机制及有效治疗靶点对于提高其治疗效果具有重要意义。表皮生长因子受体(Eidermal growth factor receptor, EGFR)是一种跨膜受体酪氨酸激酶,其异常表达与肺癌发生发展有关^[4]。抑制 EGFR 表达可显著抑制非小细胞肺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。白介素-6(Interleukin-6, IL-6)是一种炎症因子,与其可溶性 IL-6 受体结合可引发 Janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导子与转录激活子(Janus protein tyrosine kinase/Signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路活化进而参与肿瘤进展^[5-6]。张曼泽等^[7]研究显示,IL-6 可通过调节 JAK/STAT3 信号通路促进肺腺癌细胞增殖、侵袭及迁移。然而关于 EGFR 对肺癌细胞增殖、凋亡的影响是否与调控 IL-6/STAT3 通路有关报道鲜少,因此,本研究主要探究 EGFR 对肺癌细胞增殖、凋亡的影响以及其作用机制,旨在为肺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人正常支气管上皮细胞 16HBE 及肺癌细胞 A549、H1299、MSTO-211H 购自北京百欧博伟生物技术有限公司。RPMI-1640 培养基(CDLG-3719)购自武汉纯度生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒(CA1210-500T)、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(HUDY03)购自上海碧云天公司; Hoechst33258 荧光染料(B8040)购自北京索莱宝科技有限公司; LipofectamineTM 2000 转染试剂盒(L2000-015)购自杭州沃森生物技术有限公司; EGFR 过表达质粒载体 pcDNA3.1-EGFR 及不含 EGFR 的对照质粒 pcDNA3.1 由上海吉玛生物科技有限公司

设计合成; IL-6 中和抗体 anti-IL-6(T9911)购自 TargetMol(中国)有限公司; BCA 试剂盒(批号 2763DB)、蛋白提取试剂盒(BC3710-100T)购自上海吉至生化科技有限公司; 兔抗 EGFR(K009458P)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)(AF0931)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(FNab00839)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, Bax)(2774)、IL-6(FNab04282)、JAK(ET1705-84)、p-JAK(130-10568-200)、STAT3(FNab08298)、p-STAT3(RT1490)、 β -actin(ATA40114)、山羊抗兔 HRP(SE12-0.1)二抗均购自北京索莱宝科技有限公司。CO₂ 培养箱(型号 CCL-050A-8)购自日本 Esco 公司; Elx800 酶标仪(型号 HSG9832)购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取 16HBE、A549、H1299、MSTO-211H 细胞解冻、复苏,于含 10% 灭活胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)+RPMI-1640 培养液、37℃、5% CO₂、95% O₂ 培养箱中培养,换液/2 d,传代培养,进行后续实验。

1.2.2 细胞分组及处理 取对数生长期的 MSTO-211H 细胞接种于 48 孔板(1.5×10^5 个/孔)。依据 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒说明书,先将脂质体 LipofectamineTM 2000 分别与质粒载体 pcDNA3.1-EGFR、pcDNA3.1 以 8 μ L:4 μ g 比例在 250 μ L Opti-MEM 中稀释,后分别混匀后加入培养液中,对细胞进行转染,分别为 pcDNA3.1 组(阴性对照组)、pcDNA3.1-EGFR 组(过表达 EGFR 组);同时设置未转染细胞的 NG 组(空白对照组),以及转染 pcDNA3.1-EGFR 后,分别加入 IL-6 中和抗体 anti-IL-6(0.5 μ g/mL)及 STAT3 特异性抑制剂 JSI-124(10 μ mol/L)^[8] 的培养液培养细胞,并命名为 pcDNA3.1-EGFR +

anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组。继续培养细胞 48 h,倒置荧光显微镜下观察细胞荧光强度,每组设置 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 EGFR mRNA 表达水平 按照试剂盒说明书提取各组 MSTO-211H 细胞中总 RNA 并测定浓度及纯度;以 RNA 为模板行逆转录反应,所得 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应。体系 20 μ L;UltraSYBR mixture(10 μ L)、模板 cDNA(2.0 μ L)、上下游引物(各 2.0 μ L)、去离子纯化水(4.0 μ L);条件(40 个循环):93 $^{\circ}$ C 30 s、93 $^{\circ}$ C 5 s、65 $^{\circ}$ C 30 s。引物序列见表 1,由赫澎(上海)生物科技有限公司设计并合成,以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 EGFR mRNA 含量。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
EGFR	AAGGTGAAGGTCGGA GTCAAC	GGGGTCATTGATGGCA ACAATA
β actin	ATTGGAACGATACAG AGAAGATT	GGAACGCTTCACGAAT TTG

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖情况 取各组培养 48 h 的 MSTO-211H 细胞经胰酶消化,接种至 48 孔板(1.5×10^5 个/孔),严格按照 CCK-8 试剂盒说明书分别于培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂,继续培养 2 h,检测 450 nm 处各孔细胞光密度(Optic density,OD)值,重复 3 次,取平均值。

1.2.5 平板克隆实验检测各组细胞克隆形成率 取各组培养 48 h 后的 MSTO-211H 细胞,消化并接种于 6 孔板(500 个细胞/孔),每组 6 个复孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95%O₂ 条件下培养 15 d,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,0.25%结晶紫染色 30 min;弃掉染液,晾干,拍照并计算克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆形成数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 Hoechst333258 染色法检测各组细胞凋亡形态学变化 取各组培养 48 h 的 MSTO-211H 细胞,消化并接种于 48 孔板(1.5×10^5 个/孔),继续培养 24 h,加入 4%多聚甲醛(pH=7.5),37 $^{\circ}$ C 固定 30 min,PBS 冲洗、晾干,加入 Hoechst333258 染液(5 mg/mL),染色 30 min,PBS 冲洗、封片,荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.7 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 取各组培养 48 h 的 MSTO-211H 细胞接种于 48 孔板(1.5×10^5 个/孔),参照 Annexin-V FITC/PI 试剂盒说明书,以 5 μ L PI+5 μ L Annexin V-FITC 双染试剂 4 $^{\circ}$ C 避光

进行染色 30 min,稀释;用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组设 6 个复孔,重复 3 次。

1.2.8 免疫印迹法检测 EGFR、增殖、凋亡及 IL-6/STAT 3 信号通路相关蛋白表达情况 取各组培养 48 h 的 MSTO-211H 细胞,以 RIPA 裂解并提取总蛋白,检测浓度及纯度,行 12%SDS-PAGE 电泳,转膜,放入脱脂奶粉(5%)溶液室温封闭 2 h,分别加入一抗 EGFR、增殖相关蛋白(PCNA)、凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax)、IL-6/STAT3 通路相关蛋白(IL-6、JAK、p-JAK、STAT3、p-STAT3)、内参 β -actin,均为 1:500 的稀释比,4 $^{\circ}$ C 过夜,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:1000),室温孵育 1 h,显影、定影,半定量分析各蛋白含量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR mRNA 及蛋白在肺癌细胞中的表达比较

16HBE、A549、H1299、MSTO-211H 细胞中 EGFR mRNA 相对表达量分别为: 1.00 ± 0.11 、 2.16 ± 0.14 、 1.85 ± 0.13 、 1.39 ± 0.14 ,EGFR 蛋白相对表达量分别为: 0.23 ± 0.02 、 0.95 ± 0.06 、 0.72 ± 0.05 、 0.54 ± 0.03 。与人正常支气管上皮细胞 16HBE 比较,人肺癌细胞 A549、H1299、MSTO-211H 中 EGFR mRNA 及蛋白表达水平显著升高,且 MSTO-211H 细胞中 EGFR mRNA 及蛋白表达水平最低,因此,选择 MSTO-211H 细胞进行后续实验,见图 1。

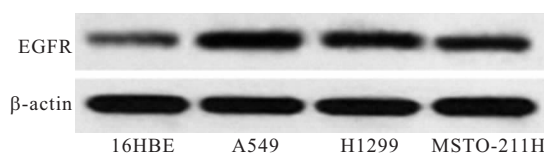


图 1 western blot 检测细胞中 EGFR 蛋白表达

Figure 1 Western blot detection of EGFR protein expression in cells

2.2 细胞株转染效果 倒置荧光显微镜下观察 pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-EGFR 组细胞转染效果,镜下均可见较强绿色荧光,NG 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-EGFR 组中 EGFR mRNA 相对表达量分别为: 1.00 ± 0.16 、 0.99 ± 0.15 、 1.56 ± 0.23 ,EGFR 蛋白相对表达量分别为: 0.52 ± 0.04 、 0.55 ± 0.03 、 1.12 ± 0.17 ,pcDNA3.1-EGFR 组 EGFR mRNA 及蛋白相对表达水平显著高于 NG 组与 pcDNA3.1 组($P < 0.05$),见图 2、3。

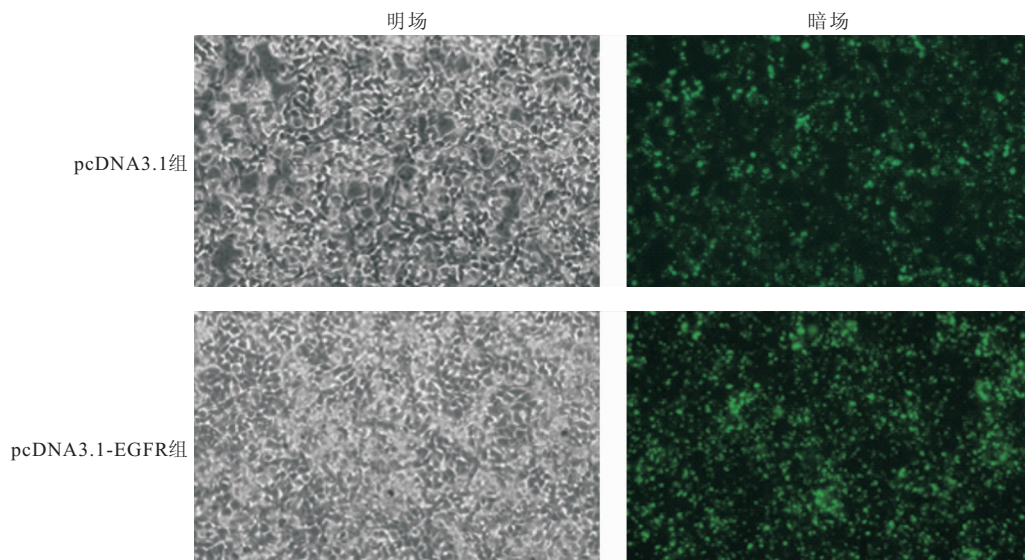


图 2 细胞转染效果(100×)

Figure 2 Cell transfection effect

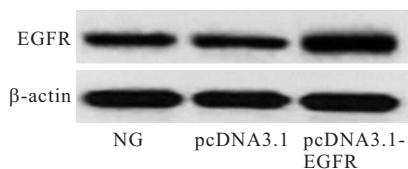


图 3 western blot 检测各组细胞中 EGFR 蛋白表达

Figure 3 Western blot detection of EGFR protein expression in each group of cells

2.3 各组 MSTO-211H 细胞增殖情况比较 与 NG 组(0.54 ± 0.07)、pcDNA3.1 组(0.56 ± 0.05)比较, pcDNA3.1-EGFR 组(0.89 ± 0.04)MSTO-211H 细胞 OD_{450} 值显著升高($P < 0.05$);与 pcDNA3.1-EGFR 组

(0.89 ± 0.04) 比较, pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组(0.65 ± 0.06)、pcDNA3.1-EGFR + JSI-124 组(0.67 ± 0.04) MSTO-211H 细胞 OD_{450} 值显著降低($P < 0.05$)。

2.4 各组 MSTO-211H 细胞平板克隆结果比较 与 NG 组(27.35 ± 4.10)、pcDNA3.1 组(26.67 ± 4.01)比较, pcDNA3.1-EGFR 组(76.27 ± 11.45) MSTO-211H 细胞克隆形成率显著升高($P < 0.05$);与 pcDNA3.1-EGFR 组(76.27 ± 11.45)比较, pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组(50.57 ± 7.59)、pcDNA3.1-EGFR + JSI-124 组(48.65 ± 6.04)MSTO-211H 细胞增殖抑制率显著降低($P < 0.05$)。见图 4。

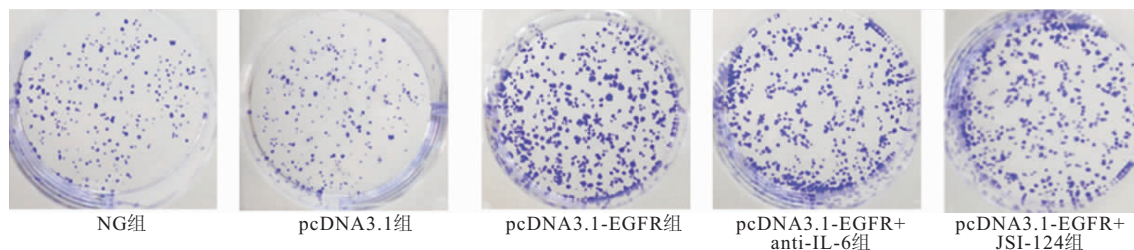


图 4 各组 MSTO-211H 细胞平板克隆结果比较

Figure 4 Comparison of plate cloning results of MSTO-211H cells in each group

2.5 各组 MSTO-211H 细胞形态学变化 Hoechst 33342 染色显示, NG 组、pcDNA3.1 组 MSTO-211H 细胞核皱缩破裂, 胞核或胞质内有浓缩致密蓝色荧光, 呈细胞凋亡形态; pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞细胞数增多, 染色呈浅色荧光, 亮蓝色细胞核减少, 凋亡活动减弱; 与 pcDNA3.1-EGFR 组比较, pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR + JSI-124 组 MSTO-211H 细胞凋亡活动增强。见图 5。

2.6 各组 MSTO-211H 细胞凋亡情况比较 与 NG 组(38.91 ± 5.38)、pcDNA3.1 组(39.12 ± 5.26)比较, pcDNA3.1-EGFR 组(12.05 ± 1.80) MSTO-211H 细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);与 pcDNA3.1-EGFR 组(12.05 ± 1.80)比较, pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组(22.36 ± 3.36)、pcDNA3.1-EGFR + JSI-124 组(21.14 ± 3.04) MSTO-211H 细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。见图 6。

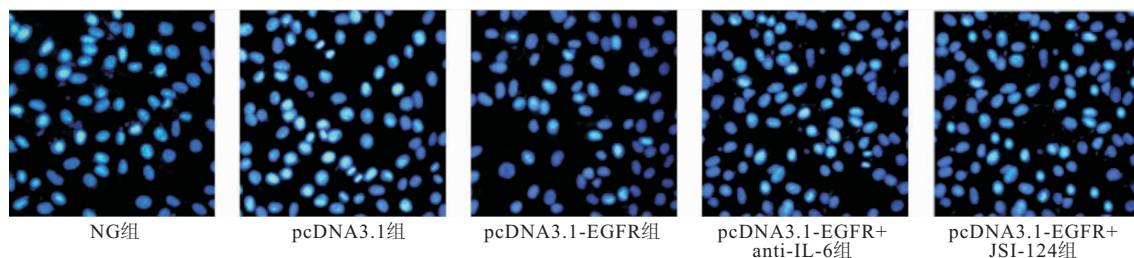


图 5 各组 MSTO-211H 细胞形态学变化(200×)

Figure 5 The morphological changes of MSTO-211H cells in each group

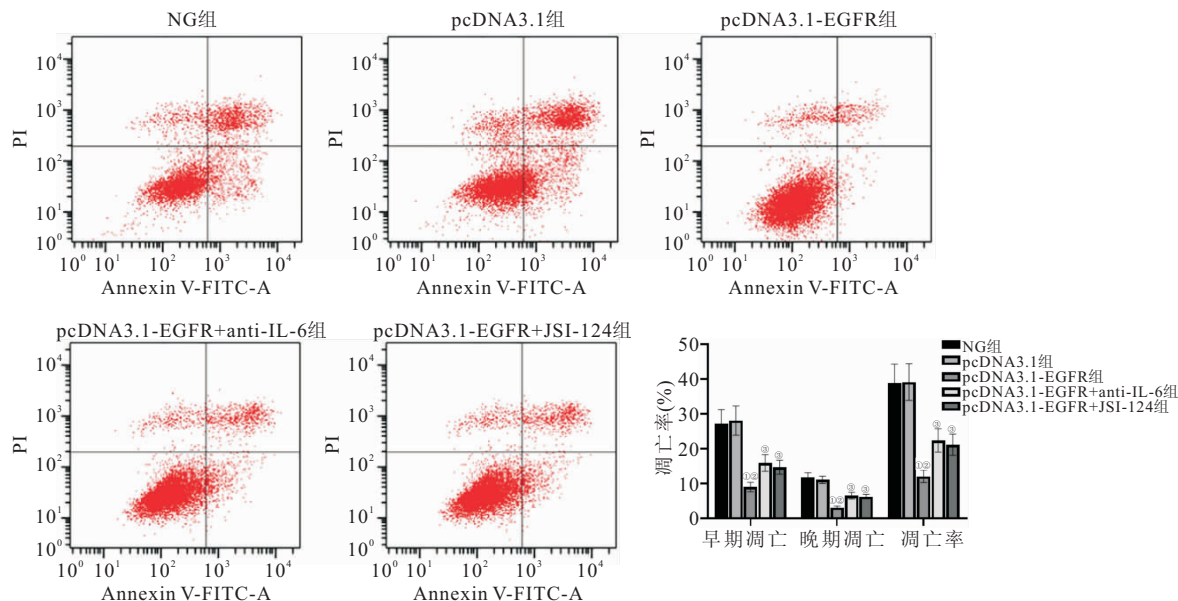


图 6 各组 MSTO-211H 细胞凋亡情况比较

Figure 6 Comparison of MSTO-211H cell apoptosis in each group

注:与 NG 组比较,① $P<0.05$;与 pcDNA3.1 组比较,② $P<0.05$;与 pcDNA3.1-EGFR 组比较,③ $P<0.05$

2.7 各组 MSTO-211H 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较 NG 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-EGFR 组、pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组中 CyclinD1 蛋白相对表达量分别为: 0.51 ± 0.08 、 0.52 ± 0.07 、 1.28 ± 0.18 、 0.86 ± 0.13 、 0.88 ± 0.12 ; Bax 蛋白相对表达量分别为: 1.09 ± 0.16 、 1.10 ± 0.15 、 0.45 ± 0.02 、 0.71 ± 0.11 、 0.72 ± 0.13 ; Bcl-2 蛋白相对表达量分别为: 0.60 ± 0.09 、 0.62 ± 0.09 、 1.33 ± 0.20 、 0.95 ± 0.15 、 0.94 ± 0.11 。与 NG 组、pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞 CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达显著升高($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著降低($P<0.05$); 与 pcDNA3.1-EGFR 组比较, pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组 MSTO-211H 细胞 CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达显著降低($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。见图 7。

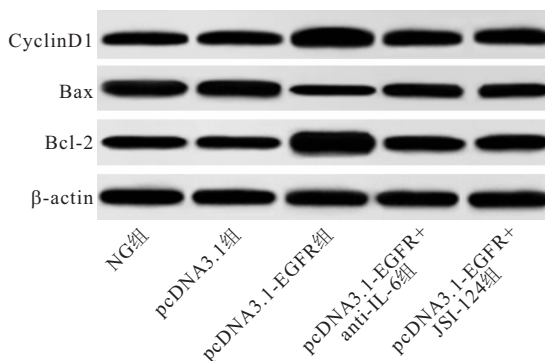


图 7 各组细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较

Figure 7 Comparison of cell proliferation and apoptosis-related protein expression in each group

2.8 各组 MSTO-211H 细胞 IL-6/STAT3 通路相关蛋白表达比较 NG 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-EGFR 组、pcDNA3.1-EGFR + anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组中 IL-6 蛋白相对表达量分别为: 0.47 ± 0.07 、 0.46 ± 0.06 、 1.31 ± 0.19 、 0.92 ± 0.13 、

0.89±0.11; p-JAK 蛋白相对表达量分别为: 0.53±0.08、0.55±0.09、1.36±0.20、0.97±0.14、0.94±0.12; p-STAT3 蛋白相对表达量分别为: 0.68±0.11、0.70±0.11、1.25±0.19、0.87±0.13、0.88±0.12。与 NG 组、pcDNA3.1 组比较, pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞 IL-6、p-JAK/JAK、p-STAT3/STAT3 显著升高($P<0.05$); 与 pcDNA3.1-EGFR 组比较, pcDNA3.1-EGFR+anti-IL-6 组、pcDNA3.1-EGFR+JSI-124 组 MSTO-211H 细胞 IL-6、p-JAK/JAK、p-STAT3/STAT3 显著降低($P<0.05$)。见图 8。



图 8 各组 MSTO-211H 细胞 IL-6/STAT3 通路相关蛋白表达比较

Figure 8 Comparison of IL-6/STAT3 pathway related protein expression in MSTO-211H cells in each group

3 讨论

肺癌的发病率及病死率于众多恶性肿瘤中均居首位^[9-10],其发病早期症状不典型,大多患者于中晚期才得以确诊。随着医疗水平的不断提高,肺癌诊疗方法也得到有效提升,主要包括手术辅以放疗或联合治疗等,但是此类积极治疗措施并未获得较理想疗效,患者 5 年生存率仍只有 15% 左右^[11-12]。因此深入研究肺癌发生发展相关机制,寻找新型生物学靶标提高肺癌治疗效果依然是当务之急。

EGFR 是位于染色体 7p13.2-q22 区的表皮生长因子受体家族成员之一,能够将细胞外信号传递至细胞内,促使癌细胞增殖,参与乳腺癌、肺癌等肿瘤进展^[13-15]。张超等^[16]研究显示,过表达 EGFR 可促进肺癌细胞增殖及转移。肿瘤的发生发展是癌细胞增殖及凋亡失衡的结果,其中 CyclinD1 通过结合周期蛋白依赖性激酶(CDK)蛋白,促进细胞周期 G1 向 S 期正向转换,进而促进细胞增殖^[17]; Bcl-2、Bax 是人体最主要细胞凋亡相关基因,分别发挥抑凋亡、促凋亡作用^[18]。Hoechst33342 可透过细胞膜,与 DNA 结合而

发出蓝色荧光,用以检测细胞凋亡^[19]。本研究成功转染 MSTO-211H 细胞后,结果显示,与 NG 组、pcDNA3.1 组比较,pcDNA3.1-EGFR 组细胞凋亡活动明显减弱,且 pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著降低,克隆形成率、CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达显著升高。与过往研究结果一致,说明过表达 EGFR 可能促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡。

IL-6 是黏膜固有层分泌的一种炎症细胞因子,可与细胞膜上的可溶性受体 sIL-6R 结合形成复合物,与胞浆可溶性的 JAK 相结合并使 JAK 发生磷酸化反应被活化,活化的 JAK 可与 STAT3 特异性相结合且使 STAT3 发生磷酸化反应生成 p-STAT3, p-STAT3 可作用于细胞核内特异性 DNA,调节基因转录,诱导肿瘤细胞增殖转移等^[20-21]。Yang 等^[22]研究显示,过表达 miR-206 可通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路活化减弱 EGFR 阳性突变的肺癌细胞对吉非替尼的耐药性。王金耀等^[23]研究显示,酪氨酸激酶抑制剂诱导的 IL-6/STAT3 通路激活降低了 EGFR 突变的非小细胞肺癌对艾克替尼的敏感性。包克勇等^[24]研究发现,下调 KLF12 表达通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路抑制宫颈癌细胞增殖、促进凋亡。Fan 等^[25]研究表明,ZIPK 激活 IL-6/STAT3 信号通路可促进胃癌细胞增殖与侵袭。本研究结果显示,与 NG 组、pcDNA3.1 组比较,pcDNA3.1-EGFR 组 MSTO-211H 细胞 IL-6、p-JAK/JAK、p-STAT3/STAT3 蛋白表达显著升高。说明过表达 EGFR 促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡可能与促进 IL-6/STAT3 信号通路活化有关。当在过表达 EGFR 基础上抑制 IL-6 表达或者加入 STAT3 特异性抑制剂 JSI-124 后,过表达 EGFR 促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡能力减弱。更加说明过表达 EGFR 可能通过促进 IL-6/STAT3 信号通路活化促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡。

4 结论

过表达 EGFR 促进 MSTO-211H 细胞增殖并抑制细胞凋亡,可能是通过促进 IL-6/STAT3 信号通路活化实现的。该过程涉及的通路较多,有待后续进一步深入探究。

【参考文献】

- [1] HOPKINS J M, EVANS H J. Cigarette smoke-induced DNA damage and lung cancer risks[J]. Nature, 2020, 283(5745): 388-390.
- [2] WAKABAYASHI Y, MASUDA T, NAKASHIMA T, et al. Clinical significance of BIM-deletion polymorphism on chemora-

- diotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(15):e21536-e21536.
- [3] MU Y, YANG K, HAO X, *et al.* Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of 65 Patients With BRAF-Mutated Non-small Cell Lung Cancer [J]. Front Oncol, 2020, 10 (83): 603-611.
 - [4] 朱东全. 吉非替尼靶向联合 GP 化疗方案治疗晚期 EGFR 阳性非小细胞肺癌的效果[J]. 临床医学, 2021, 41(8): 82-84.
 - [5] ZHANG L J, NIS Z, ZHOU X L, *et al.* Hemorrhagic Shock Sensitized the Diaphragm to Ventilator-Induced Dysfunction through the Activation of IL-6/JAK/STAT Signaling-Mediated Autophagy in Rats [J]. Mediat Inflamm, 2019, 14 (201): 3738409-3738420.
 - [6] 李馥延, 霍达, 栾诗佳, 等. IL-6/JAK2/STAT3 信号通路在肿瘤中的作用[J]. 生命的化学, 2021, 41(3): 535-540.
 - [7] 张曼泽, 李峰生, 王思念, 等. IL-6 通过 JAK2/STAT3 信号通路促进 CD133-肺腺癌细胞 (A549) 获得干性特征[J]. 军事医学, 2018, 42(9): 42-47.
 - [8] 王健, 徐杰, 安雪青, 等. 雌激素活化 GPER 介导的 IL-6/STAT3 通路促进乳腺癌细胞 SKBR-3 增殖作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(4): 340-343.
 - [9] 王卓, 张玉宇, 张兰广, 等. 非小细胞肺癌脑转移的治疗进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 232-236.
 - [10] 王熙娟. 半枝莲汤辅助联合优质护理在老年非小细胞肺癌中效果[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(17): 3042-3044.
 - [11] 郭兰伟, 王慧娟. Durvalumab 治疗放疗后不可切除的局部晚期非小细胞肺癌的 III 期试验—PACIFIC 研究解读[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(3): 80-87.
 - [12] 张文静, 马君, 许弘邦. miR-92b 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(3): 399-402.
 - [13] PALLEIRO M C R, PEREZ A, MARECO K, *et al.* P2.09 Access and Outcomes of TKI EGFR in Lung Cancer Treatment from UYan Population[J]. J T O, 2019, 14(11): S1188-S1193.
 - [14] PERALDO-NEIA C, CAVALLONI G, FENOCCHIO E, *et al.* Prognostic and predictive role of EGFR pathway alterations in biliary cancer patients treated with chemotherapy and anti-EGFR [J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191593-e0191599.
 - [15] YUAN Y, ZHAO J. TGF- β transactivates EGFR and facilitates breast cancer migration and invasion through canonical Smad3 and ERK/Sp1 signaling pathways[J]. Mol Oncol, 2018, 87(96): 1-10.
 - [16] 张超, 曲晓翰. Hck 基因通过 EGFR 通路对肺腺癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. 中国继续医学教育, 2020, 12(5): 162-166.
 - [17] 孙建海, 马燕凌, 魏武杰, 等. FCRL5 蛋白对肝癌细胞增殖与侵袭迁移能力的作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(14): 3057-3062.
 - [18] 毛筱涵, 靳雅倩, 丰天宇, 等. 人参皂苷 Rg3 抑制人骨肉瘤 143B 细胞的增殖、迁移和侵袭并促进其凋亡[J]. 肿瘤, 2020, 326(4): 7-18.
 - [19] 衣同辉, 吴艳敏, 刘睿, 等. 人参皂苷 Rg3 联合肿瘤抑素 19 肽对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响及机制[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(7): 48-55.
 - [20] WANG J, HU W, DU X, *et al.* Fingolimod inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in sacral chordoma by inactivating IL-6/STAT3 signaling [J]. Bioscience Rep, 2020, 40(2): 1-8.
 - [21] MAO Q, LIANG X L, WU Y F, *et al.* ILK promotes survival and self-renewal of hypoxic MSCs via the activation of lncTCF7-Wnt pathway induced by IL-6/STAT3 signaling[J]. Gene Ther. 2019, 26(5): 165-176.
 - [22] YANG Y, WANG W, CHANG H, *et al.* Reciprocal regulation of miR-206 and IL-6/STAT3 pathway mediates IL6-induced gefitinib resistance in EGFR-mutant lung cancer cells[J]. J Cell Mol Med. 2019, 23(11): 7331-7341.
 - [23] WANG J, WANG Y, ZHENG C, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor-induced IL-6/STAT3 activation decreases sensitivity of EGFR-mutant non-small cell lung cancer to icotinib[J]. Cell Biol Int. 2018, 42(10): 1292-1299.
 - [24] 包克勇, 陶晓玉, 张雪, 等. KLF12 在宫颈癌中的表达及其调控 IL-6/STAT3 通路影响宫颈癌细胞增殖和凋亡的机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 1979-1983.
 - [25] FAN H, OU Q, SU Q, *et al.* ZIPK activates the IL-6/STAT3 signaling pathway and promotes cisplatin resistance in gastric cancer cells[J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(9): 2655-2667.

(收稿日期: 2021-08-14; 修回日期: 2022-02-16; 编辑: 张翰林)