

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221483

· 论著 ·

IL-6/JAK2/STAT3 对口腔鳞状细胞癌 生物学行为的影响

全向娟¹,周晓²,钟慧³,彭子文¹,单振锋²

(1. 中南大学湘雅三医院 口腔科,湖南 长沙 410013; 2. 湖南省肿瘤医院 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 头颈外科,湖南 长沙 410013; 3. 中南大学生命科学学院,湖南 长沙 410013)

摘要: **目的** 观察白细胞介素6抗体(IL-6)/蛋白酪氨酸激酶2抗体(JAK2)/信号传导和转录激活因子3抗体(STAT3)对口腔鳞状细胞癌(简称口腔鳞癌)细胞生物学行为的影响。**方法** 对口腔鳞癌细胞系进行慢病毒转染敲低 IL-6 基因,设立两组对照,一组为未干预组,另一组为空白载体组。通过 CCK8 实验和克隆形成实验检测 IL-6 对口腔鳞癌细胞增殖情况的影响,通过流式细胞术检测细胞周期变化,通过 Transwell 实验检测 IL-6 对口腔鳞癌细胞侵袭和迁移能力的影响。利用实时荧光定量 PCR 以及 Western blot 方法检测口腔鳞癌细胞中 IL-6 基因表达下调后其下游通路基因 *p-STAT3*、*p-JAK2* 与肿瘤血管新生有关的蛋白 VEGFA、细胞周期调控蛋白 Cyclin B1、细胞基质沉积相关蛋白 MMP2、细胞凋亡抑制蛋白 Survivin、上皮间质转化相关蛋白 Snail 和 E-Cadherin 的表达情况。**结果** 敲低 IL-6 的口腔鳞癌细胞与对照组细胞比较,增殖率受到明显抑制,差异具有统计学意义($F = 13.06, P = 0.006$);敲低 IL-6 的口腔鳞癌细胞中 G1 期细胞百分比下降,G2 期细胞百分比上升,差异具有统计学意义($F = 5.53, P < 0.05$);敲低 IL-6 的口腔鳞癌细胞与对照细胞比较,侵袭能力和迁移能力明显下降,差异具有统计学意义($F = 23.59/53.11, P < 0.01$);口腔鳞癌细胞 IL-6 表达下调后,JAK2、STAT3、VEGFA、Cyclin B1、MMP2、Snail 表达随之明显下降,而 E-Cadherin 表达显著增加,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** IL-6 基因敲低后可明显抑制口腔鳞癌细胞的生长与增殖能力,可能诱导细胞 G2 期阻滞;抑制 STAT3、JAK2、VEGFA、Cyclin B1、MMP2、Snail 和 Survivin 表达,促进 E-Cadherin 蛋白表达。

关键词: 口腔鳞状细胞癌;白细胞介素6;蛋白酪氨酸激酶2;信号传导和转录激活因子3;细胞增殖
中图分类号: R739.85

Influences of IL-6/JAK2/STAT3 on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma

TONG Xiangjuan¹, ZHOU Xiao², ZHONG Hui³, PENG Ziwen¹, SHAN Zhenfeng²

(1. Department of Stomatology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Head and Neck Surgery, Hunan Cancer Hospital/Affiliated Cancer Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410013, China; 3. School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of IL-6/JAK2/STAT3 on the biological behavior of oral squamous cancer cells. **Methods** The oral squamous cell carcinoma cell line was transfected with lentivirus, and the IL-6 gene was knocked down. Two control groups (no intervention group and blank vector group) were set up. The effect of IL-6 on the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells was detected by CCK8 experiment and clonal formation experiment, the cellular cycle change was detected by flow cytometry, and the influences of IL-6 on invasion and migration ability of oral squamous cell carcinoma cells were detected by Transwell experiment. Then real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect the expressions of the downstream channel gene *STAT3*, *JAK2*, protein VEGFA related to tumor angiogenesis, cell cycle regulatory protein Cyclin B1, cell matrix deposition-related protein MMP2, apoptosis

基金项目:湖南省自然科学基金(2019JJ40216)。
第一作者简介:全向娟,女,博士,主治医师。
通信作者:单振锋,Email:shanzf01@163.com

suppressor protein Survivin, and protein Snail and E-Cadherin related to epithelial-to-interstitial transformation in oral squamous cell carcinoma cells after downregulation of *IL-6* gene expression. **Results** Compared with the control group, the oral squamous cell carcinoma cells with knockout *IL-6* were significantly inhibited in proliferation rate, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The percentage of G1-phase cells in oral squamous cell carcinoma cells with knockout *IL-6* decreased significantly while that of G2-phase cells increased significantly, and the differences were statistically significant (both $P < 0.05$). The invasive ability and migration ability of oral squamous cell carcinoma cells with knockout *IL-6* decreased significantly compared with the control cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of STAT3, JAK2, VEGFA, Cyclin B1, MMP2, Snail and Survivin protein decreased significantly while E-Cadherin protein expression increased apparently in oral squamous cell carcinoma cells with knockout *IL-6* (all $P < 0.05$). **Conclusion** *IL-6*/JAK2/STAT3 signaling pathway can promote proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma; Interleukin-6; TAK2; P-signal transducer and activator of transcription 3; Cell proliferation

口腔鳞状细胞癌(简称口腔鳞癌)是一种不同程度的口腔鳞状分化的上皮侵袭性肿瘤,是头颈肿瘤的主要形式之一^[1]。有研究表明口腔鳞癌的发生发展与信号传导异常密切相关^[2-3]。近几年,对于白细胞介素6抗体(*IL-6*)/蛋白酪氨酸激酶2抗体(JAK2)/信号传导和转录激活因子3抗体(STAT3)信号激活促进口腔鳞癌发展潜在的分子机制的探讨受到了极大关注^[4-5],但其对口腔鳞癌细胞具体作用机制仍然不明晰。本研究旨在通过慢病毒转染的方式建立体外高效、稳定低表达*IL-6*口腔鳞癌细胞系体系,进而观察口腔鳞癌细胞中*IL-6*的变化与JAK2和STAT3联系,以及对口腔鳞癌细胞的恶性生物学行为的影响,为口腔鳞癌的发生机制提供相关分子学证据,也为下一步口腔鳞癌的临床基因靶向干预提供重要参考。

1 资料和方法

1.1 主要仪器和试剂

PowerPac Basic 垂直电泳仪(Bio-Rad,美国),180-100转膜仪(Bio-Rad,美国),FQD-96A实时荧光定量PCR仪(杭州博日科技股份有限公司),KOD-Plus-Neo高保真PCR酶购自Toyobo公司,胶回收试剂盒购自Generay公司,BamHI、EcoRI限制性内切酶、dNTP mix、T4 DNA连接酶、RNase inhibitor购自Fermentas公司,*IL-6*、STAT3、磷酸化信号传导和转录激活因子3抗体(p-STAT3),JAK2,磷酸化蛋白酪氨酸激酶2抗体(p-JAK),存活素抗体(Survivin),锌指转录因子抗体(Snail),细胞周期蛋白B1抗体(Cyclin B1),金属基质蛋白酶2(MMP2),钙黏附蛋白E抗体(E-Cadherin)均购自美国CST公司,

血管内皮生长因子A抗体(VEGFA)购自美国Abcam公司。 β -肌动蛋白抗体(β -actin)购自美国Sigma公司,人口腔鳞状细胞癌细胞株(SCC4)购自上海名劲生物科技有限公司,人口腔鳞状癌细胞株(Cal27)和人口腔角质细胞株(HOK)购自北纳创联生物科技有限公司,质粒pGMLV-SB3及相应的阴性对照质粒pGMLV-SB3-shNC购自上海吉满生物科技有限公司。

1.2 qPCR评价*IL-6*基因在各株细胞中的表达

使用含10%胎牛血清DMEM完全培养基分别培养Cal27、SCC4和HOK细胞,并置于CO₂细胞培养箱中37℃培养。Trizol提取各组细胞的总RNA,然后将各组细胞的总RNA逆转录成相应的cDNA,通过SYBR Green Master Mix进行qPCR检测各组细胞中*IL-6*基因和内参基因*GAPDH*的表达量见表1。

表1 *IL-6*及*GAPDH*引物序列

名称	引物序列5' to 3'
<i>IL-6</i> -f	CTTCGGTCCAGTTGCCTTCTC
<i>IL-6</i> -r	GCGGCTACATCTTTGGAATCTTC
<i>GAPDH</i> -f	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
<i>GAPDH</i> -r	ACCACCTGTGTGCTGTAGCCAA

1.3 *IL-6* shRNA表达质粒构建

利用shRNA设计软件设计4条针对人*IL-6*基因的shRNA靶点和1条阴性对照(NC)序列见表2。单链寡核苷酸片段退火形成双链DNA见表3,退火产物与经BamHI和EcoRI双酶切的pGMLV-SB3载体进行连接,4℃过夜。将连接产物转化至DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,37℃培养过夜。

表2 4条 IL-6 shRNA 靶点序列信息及阴性对照序列信息

名称	序列
NC	TTCTCCGAACGTGTCACCT
1	GCTTCCAATCTGGATTCAATG
2	GGAGTTTGAGGTATACCTAGA
3	GCTGCAGGACATGACAACTCA
4	GAGACTAGTGAGGAACAAGCC

表3 IL-6 基因特异性 shRNA 序列信息

名称	寡聚单链 DNA 序列 5' to 3'
shNC-f	GATCTGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAAC GTGACACGTTCCGAGAAATTTTTTC
shNC-r	AATTGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTC TTGAAACGTGACACGTTCCGAGAAACA
IL-6sh1-f	GATCCGCTTCCAATCTGGATTCAATGCTCGAGCA TTGAATCCAGATTGGAAGCTTTTTT
IL-6sh1-r	AATTAaaaaaagcttccaatctgatttcaatgctcgc agcattgaatccagattggaagccg
IL-6sh2-f	GATCCGGAGTTTGAGGTATACCTAGACTCGAGTCT AGGTATACCTCAAACCTCTTTTTT
IL-6sh2-r	AATTAaaaaaaggagtttgaggtatcacctagactcgc agtctaggtatcacctcaaactccc
IL-6sh3-f	GATCCGCTGCAGGACATGACAACCTCACTCGAGTG AGTTGTCATGCTCGAGCTTTTTT
IL-6sh3-r	AATTAaaaaaagctgacgacatgacaactcaactcgc agtgacttctcatgctcctgcagcc
IL-6sh4-f	GATCCGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCCTCGAGGG CTTGTTCTCACTACTCTCTTTTTT
IL-6sh4-r	AATTAaaaaaagagagtgtgaggaacaagccctcgc agggcttctcctcaactactctcgc

1.4 慢病毒感染口腔鳞癌细胞构建稳定株

具体分组如下:①Con组:未感染慢病毒的 Cal27 细胞和 SCC4 细胞;②NC组:感染 pGMLV-SB3-shNC 慢病毒的 Cal27 和 SCC4 细胞;③IL-6shRNA1(sh1)组:感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA1 慢病毒的 Cal27 细胞和 SCC4 细胞;④IL-6shRNA2(sh2)组:感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA2 慢病毒的 Cal27 细胞和 SCC4 细胞;⑤IL-6shRNA3(sh3)组:感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA3 慢病毒的 Cal27 细胞和 SCC4 细胞;⑥IL-6shRNA4(sh4):感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA4 慢病毒的 Cal27 细胞和 SCC4 细胞。在感染 16 h 后更换成培养基,CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养,48 h 后选择嘌呤霉素真核抗性筛选细胞,利用 qPCR 方法和 Western blot 方法检测 IL-6 基因敲低效果。

1.5 CCK8 实验

配置细胞悬液:取对数期生长期的 Cal27/SCC4 Con、Cal27/SCC4 NC、Cal27/SCC4 IL-6shRNA1/3,分别命名为 Con 组、shRNA NC 组、shRNA1/3 组。每

个细胞单块 96 孔板接种 3 个孔,接种 4 块板子,每孔接种 100 μL 细胞悬液,加入 10 μL CCK8 溶液,酶标仪检测 450 nm 波长吸光度值;剩下板子分别在培养 24、48、72 h 后进行同样操作。

1.6 克隆形成实验

每皿约 300 个细胞的密度接将细胞种于 6 孔板中。CO₂ 细胞培养箱中,37 °C 培养 2 周。结晶紫染色液染色 15 ~ 30 min。用流水清洗掉结晶紫染色液,将细胞培养板置于空气中干燥,用相机对培养皿进行拍照,计算各孔中的克隆数目。

1.7 流式细胞术检测

各组细胞并将其收集于无菌 EP 管中,加入 400 μL 100 μg/mL 的 PI 染液,在室温下避光染色约 30 min。用流式细胞仪进行荧光信号检测,激发波长设置为 488 nm。

1.8 Transwell 迁移和侵袭实验

在细胞小室的上室中加入 100 μL 细胞悬液(约含 5 × 10³ 个细胞),下室中 DMEM 完全培养基或加入 Matrigel 基质胶的培养基,培养 24 h。加入结晶紫染色液,室温下静置 15 min。用 PBS 清洗细胞 3 次,然后用棉签轻轻擦去小室滤膜上表面的细胞,置于空气中干燥,镜下选取 3 个视野计数,取平均值算出穿过的细胞数目。

1.9 qPCR 检测各组细胞中基因表达状况

提取细胞样本总 RNA,逆转录 cDNA,利用 qPCR 法检测各组细胞中 *E-Cadherin*、*Cyclin B1*、*MMP2*、*VEGFA*、*Snail* 和 *STAT3* 基因表达情况见表 4,以 *GAPDH* 基因作为内参。为了减少误差,所有检测样本均做 3 个平行复孔,qPCR 检测完成后,取 3 个平行复孔的平均值作为该样本的最终检测数值。

表4 各目的基因及 GAPDH 基因的 qPCR 检测引物序列

名称	引物序列 5' to 3'
<i>E-Cadherin-f</i>	CCAAGGAGGAGAAGGAGCAGAA
<i>E-Cadherin-r</i>	AGTGATTGGAGCCTCAGAAGGTT
<i>Cyclin B1-f</i>	GTCCGGAAGTCACTGGAAACAT
<i>Cyclin B1-r</i>	CAGCATCTTCTTGGGCACACA
<i>MMP2-f</i>	AACTACGATGATACCCGAAGTG
<i>MMP2-r</i>	CAGACGGAAGTCTTGTGTAGGT
<i>VEGFA-f</i>	GCACTGAAACTTTTCGTCCAAC
<i>VEGFA-r</i>	CCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
<i>Snail-f</i>	CAGATGAGGACAGTGGAAAGG
<i>Snail-r</i>	GAAGTAGAGGAGAAGGACGAAGGA
<i>STAT3-f</i>	GGTGCTGTGGGAAGAATCA
<i>STAT3-r</i>	CATCCTGAAAGGTGCTGCTCC
<i>GAPDH-f</i>	GTCTCCTGACTTCAACAGCG
<i>GAPDH-r</i>	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

1.10 蛋白质印迹法

蛋白样品上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内。先用 80 V 约 30 min 使溴酚蓝到达浓缩胶和分离胶分界线后,调电压至 120 V。电泳 1.5 ~ 2 h 后,终止电泳并进行转膜。封闭,一抗孵育,二抗孵育用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min。使用 Tanon4600 荧光图像分析系统显影。并用 imageJ 软件读取各条带的灰度值,进行定量分析。

1.11 统计学方法

SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,Shapiro-Wilk 检验数据正态分布,用单因素方差分析比较多组之间差异,应用 GraphPad Prism7.0 软件绘图,以

双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-6 shRNA 干扰载体的测序结果

合成 4 个 IL-6shRNA 与设计 4 个靶基因序列完全一致,证明退火后合成片段已完整插入了质粒中,而且没有单个碱基突变,表明成功构建了 4 个针对人 IL-6 基因的 shRNA 表达质粒,分别命名为 IL-6shRNA1, IL-6shRNA2, IL-6shRNA3, IL-6shRNA4, 见图 1。经过比对,重组克隆中插入片段序列与设计的 oligo 序列完全一致,因此载体构建成功。

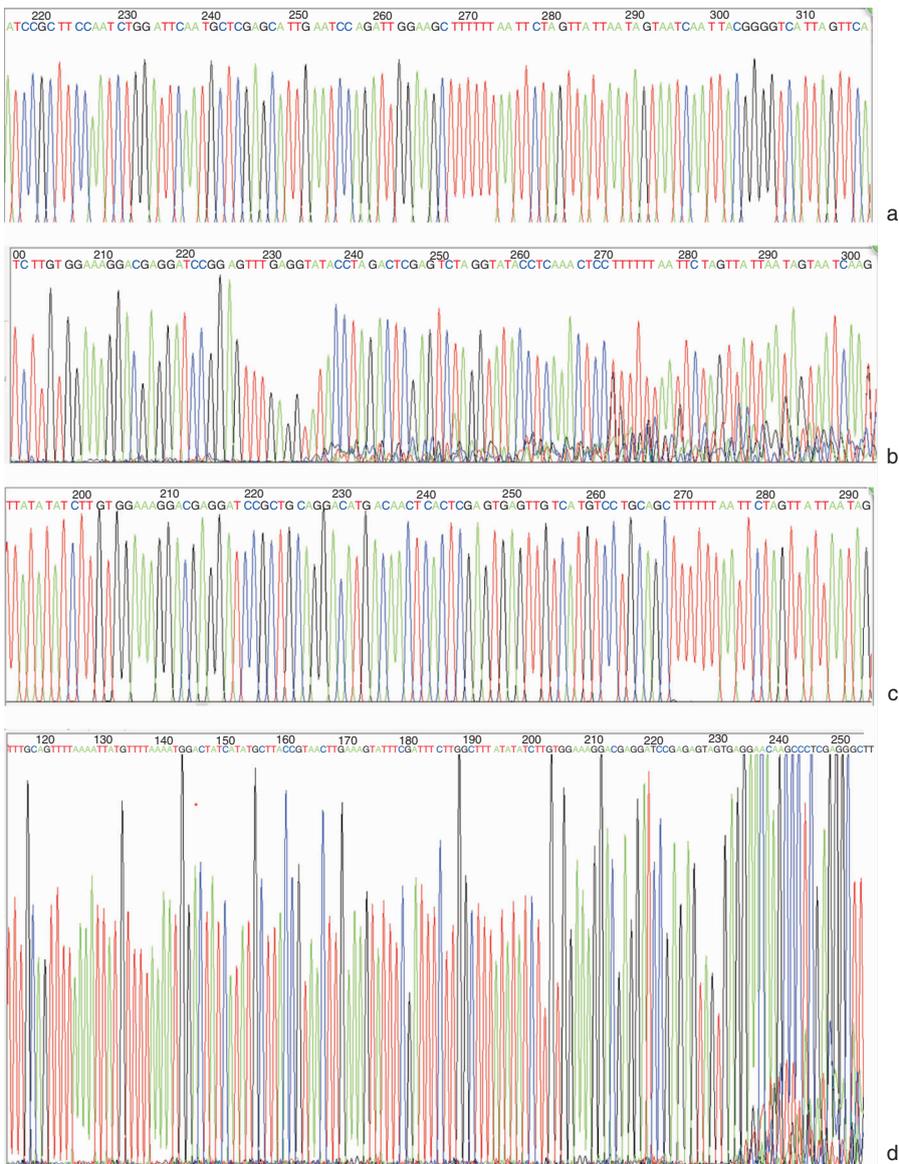


图 1 pGMLV-SB3-IL-6shRNA 质粒测序峰图(部分) a: IL-6shRNA1 质粒测序峰图; b: IL-6shRNA2 质粒测序峰图; c: IL-6shRNA3 质粒测序峰图; d: IL-6shRNA4 质粒测序峰图 注:通过 Chromas LIFE VerSion2.01 软件读出测序后的峰图,截取部分图。

2.2 IL-6 基因在各细胞株中的本底表达结果

对 Cal27、SCC4 进行 IL-6 基因表达的检测,与 HOK 细胞株相比,Cal27 细胞株和 SCC4 细胞株中的 IL-6 表达显著升高,差异具有统计学意义 ($F = 12.89, P = 0.012, P < 0.05$),其中 Cal27 细胞株中的 IL-6 表达量比对照 HOK 细胞组高出 4~5 倍,见图 2。

2.3 建立稳定的 IL-6 敲低的口腔鳞癌细胞株

将 IL-6shRNA1, IL-6shRNA2, IL-6shRNA3, IL-6shRNA4 质粒以及相应阴性对照质粒 pGMLV-SB3-shNC 分别转染至 Cal27 细胞和 SCC4 细胞中,得到稳定转染细胞后,收集各组细胞,对各质粒的沉默效果进行 qPCR, Western blot 验证。结果显示,在 Cal27 细胞中 4 个质粒均不同程度的干扰 IL-6 蛋白的表达,表明基因敲除的细胞模型构建成功,其中 IL-6shRNA1 质粒干扰结果较明显 ($F = 92.51, P = 0.000$),因此,选择 IL-6shRNA1 靶点进行后续的相关实验。在 SCC4 细胞中 4 个质粒均不同程度的干

扰 IL-6 蛋白的表达,表明基因敲除的细胞模型构建成功,其中 IL-6shRNA3 质粒干扰结果较明显 ($F = 116.70, P = 0.000$),因此,选择 IL-6shRNA3 靶点进行后续的相关实验,见图 3。

2.4 CKK8 和克隆形成实验结果

IL-6 基因表达下调后,口腔鳞癌细胞增殖能力在 72 h 受到了显著抑制,差异具有统计学意义 (Cal27 细胞系实验组与对照组比较,差异具有统计学意义 ($F = 13.09, P = 0.006$); SCC4 细胞系实验组与对照组比较,差异具有统计学意义 ($F = 333.97, P = 0.000$),见图 4。克隆形成实验结果亦显示,IL-6 基因表达下调后,实验组细胞克隆数对照组明显减少,Cal27Con、Cal27NC、Cal27 IL-6shRNA1 分别为 (119 ± 4)、(137 ± 7)、(91 ± 5) 个; SCC4 Con、SCC4 NC、SCC4 IL-6shRNA3 分别为 (154 ± 6)、(143 ± 5)、(115 ± 5) 个,两组比较差异具有统计学意义 (Cal27 各组: $F = 53.73, P = 0.0001$; SCC4 各组: $F = 42.31, P = 0.0003$),见图 5。

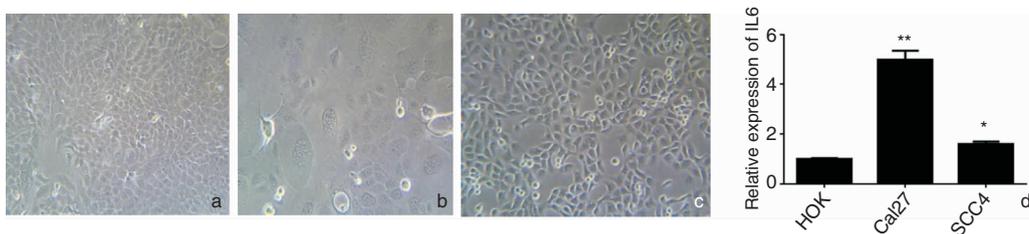


图 2 IL-6 基因在各细胞株中的本底表达结果 a: HOK 细胞; b: SCC4 细胞; c: Cal27 细胞; d: 3 组细胞中 IL-6 基因的表达注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. HOK。

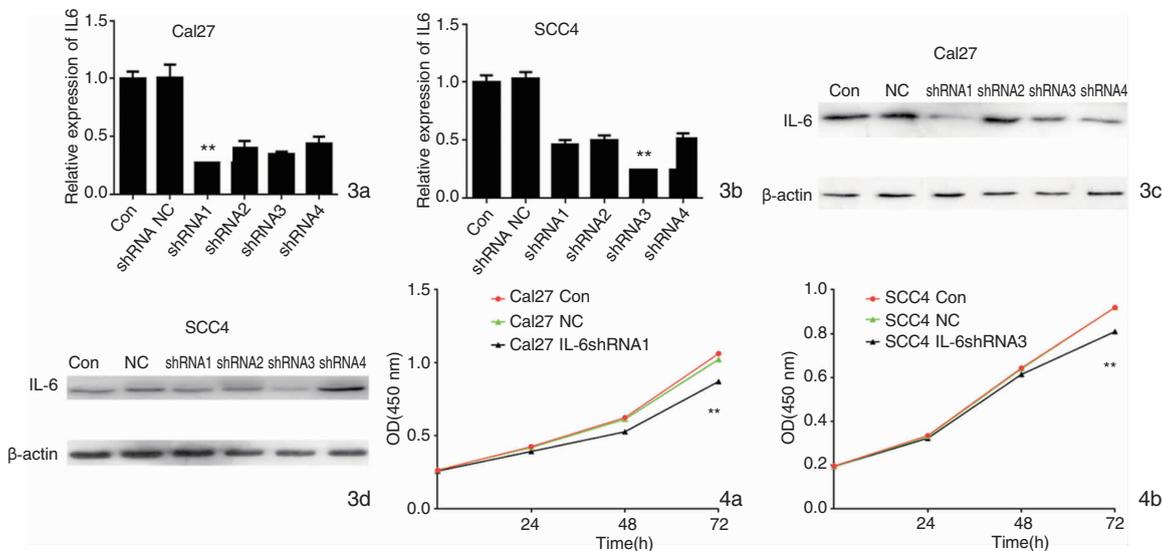


图 3 IL-6 敲低的稳定细胞株的构建与验证 3a: 质粒感染 Cal27 细胞的效果图; 3b: 质粒感染 SCC4 细胞的效果图; 3c: Western blot 法验证质粒感染 Cal27 细胞后 IL-6 蛋白的干扰效果; 3d: Western blot 法验证质粒感染 SCC4 细胞后 IL-6 蛋白的干扰效果 注: ** $P < 0.01$ vs. Con, NC。

图 4 Con 组、NC 组及 IL-6sh 组口腔鳞癌细胞增殖曲线 4a: Cal27 细胞系实验组与对照组的比较; 4b: SCC4 细胞系实验组与对照组的比较 注: ** $P < 0.01$ vs. NC, Con。

2.5 流式细胞学检测结果

与对照组细胞相比,感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA1 慢病毒的 Cal27 细胞中,G1 期和 S 期细胞所占比例无显著性差异,而 G2 期细胞所占比例上升的趋势。感染 pGMLV-SB3-IL-6shRNA3 慢病毒的 SCC4 细胞组中,SCC4 Con、SCC4 NC、SCC4 IL-

6shRNA3 的 G1 期细胞所占比例分别为 $(48.67 \pm 0.94)\%$ 、 $(46.40 \pm 1.11)\%$ 、 $(36.35 \pm 3.47)\%$,显著下降 ($F = 45.68, P = 0.000$),而 G2 期细胞所占比例分别为 $(15.40 \pm 2.66)\%$ 、 $(19.68 \pm 2.48)\%$ 、 $(23.73 \pm 3.87)\%$ 显著上升 ($F = 5.53, P = 0.044$),见图 6。

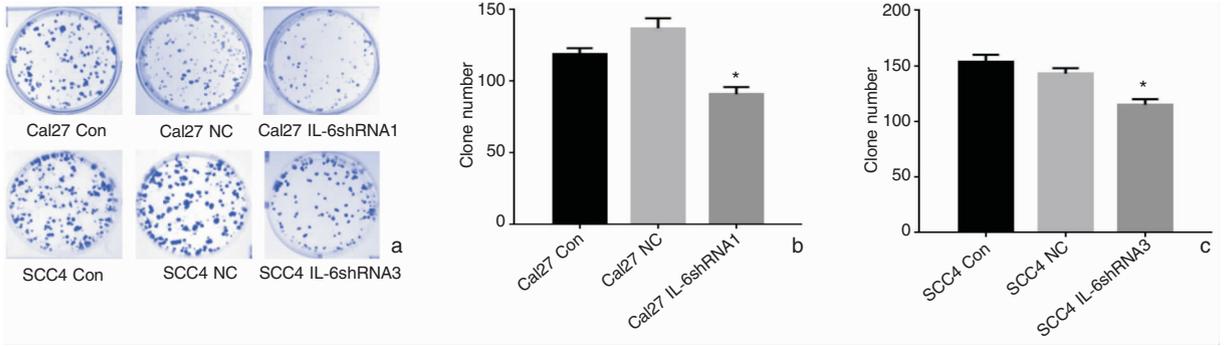


图 5 克隆形成实验检测 IL-6 敲低后口腔鳞癌细胞增殖能力的改变 a: 各组细胞的细胞克隆形成情况; b: Cal27 细胞系实验组与对照组的比较; c: SCC4 细胞系实验组与对照组的比较 注: ** $P < 0.01$ vs. NC, Con。

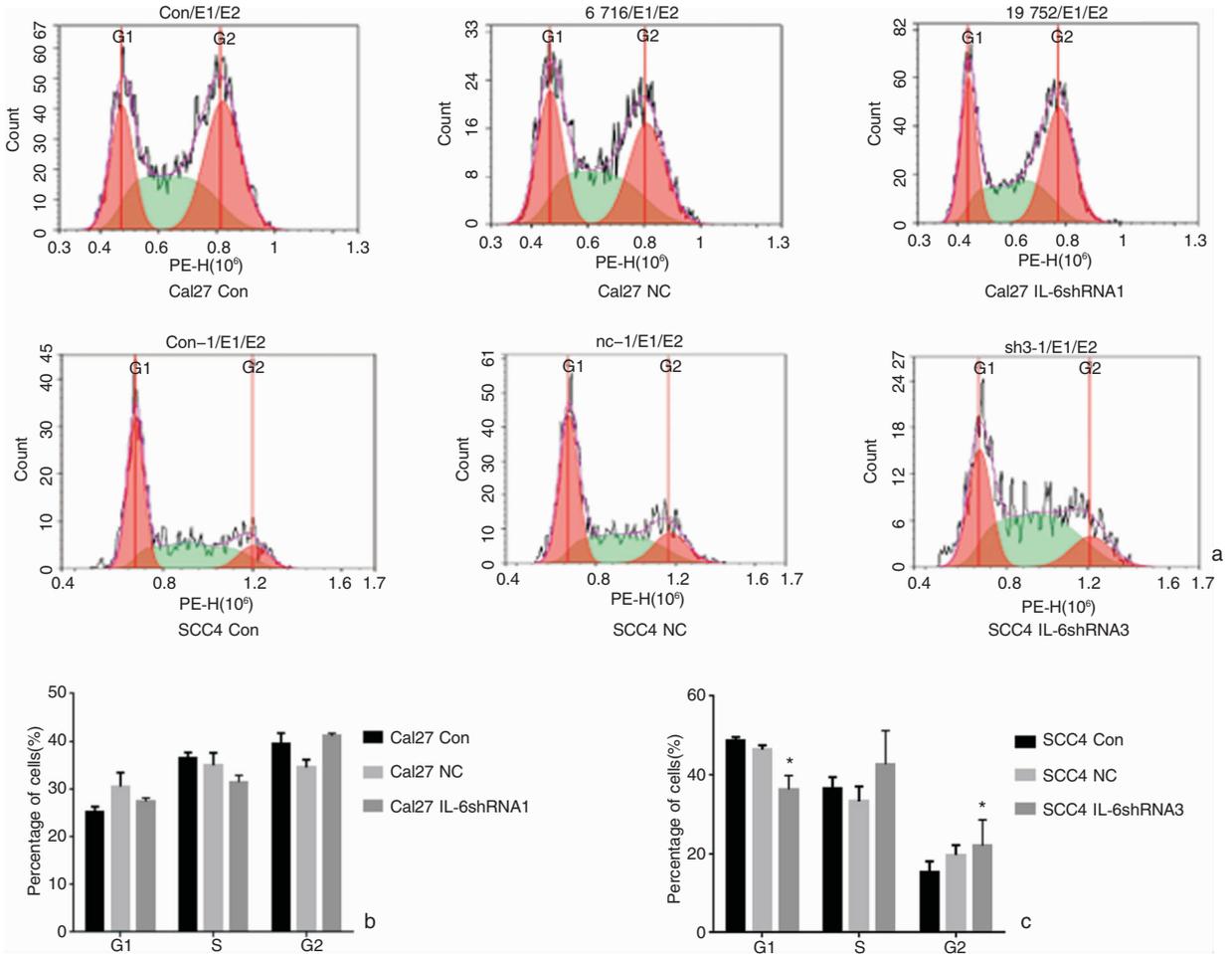


图 6 流式细胞术检测 IL-6 敲低后口腔鳞癌细胞周期情况 a: 各组细胞的细胞周期图; b: Cal27 细胞系实验组与对照组的比较; c: SCC4 细胞系实验组与对照组的比较 注: * $P < 0.05$ vs. NC, Con。

2.6 Transwell 实验结果

取对数生长期 Cal27/SCC4 Con、Cal27/SCC4 NC、Cal27/SCC4 IL-6shRNA1/3, 配置细胞悬液, 利用 Transwell 实验检测各组细胞迁移侵袭能力。结果显示, 在 48 h 内, Cal27Con、Cal27NC、Cal27 IL-6shRNA1 迁移侵袭的细胞数与 SCC4 Con、SCC4 NC、SCC4 IL-6shRNA3 迁移侵袭的细胞数比较, 敲低 IL-6 的口腔鳞癌细胞细胞侵迁移能力明显下降, 差异具有统计学意义 (Cal27 各组: $F = 23.59/53.11, P = 0.000/0.000$; SCC4 各组: $F = 73.39/38.73, P = 0.000/0.000$), 见图 7、8。

2.7 qPCR 和蛋白质印迹实验

由 qPCR 结果可知, 比较 Cal27/SCC4 Con、

Cal27/SCC4 NC、Cal27/SCC4 IL-6shRNA1/3, STAT3 ($F = 45.30/34.58, P = 0.000/0.001$)、VEGFA ($F = 28.18/43.41, P = 0.001/0.000$)、Cyclin B1 ($F = 18.11/5.41, P = 0.003/0.045$)、MMP2 ($F = 66.91/18.47, P = 0.000/0.030$)、Snail ($F = 1.91/10.88, P = 0.03/0.01$) 基因表达均随之明显下降, 而 *E-Cadherin* ($F = 176.92/97.17, P = 0.000/0.000$) 基因表达随之显著增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 显示 IL-6 蛋白表达下调后, p-JAK、p-STAT3、VEGFA、Cyclin B1、JAK2、Survivin、Snail 蛋白表达均随之明显下降, 而 E-Cadherin 蛋白表达随之增加, 见图 9。

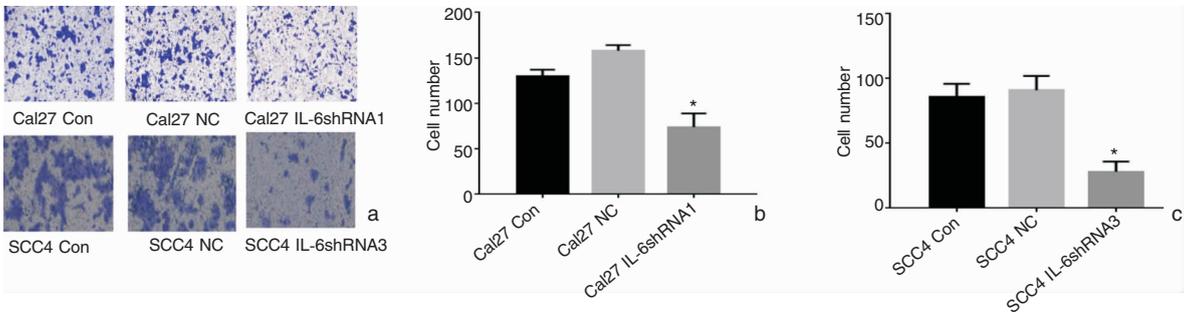


图 7 抑制 IL-6 基因表达对口腔鳞癌细胞侵袭能力的影响 a: 各组细胞的 Transwell 细胞侵袭实验图 (结晶紫 × 40); b: Cal27 细胞系实验组与对照组的比较; c: SCC4 细胞系实验组与对照组的比较 注: * $P < 0.01$ vs. Con, NC。

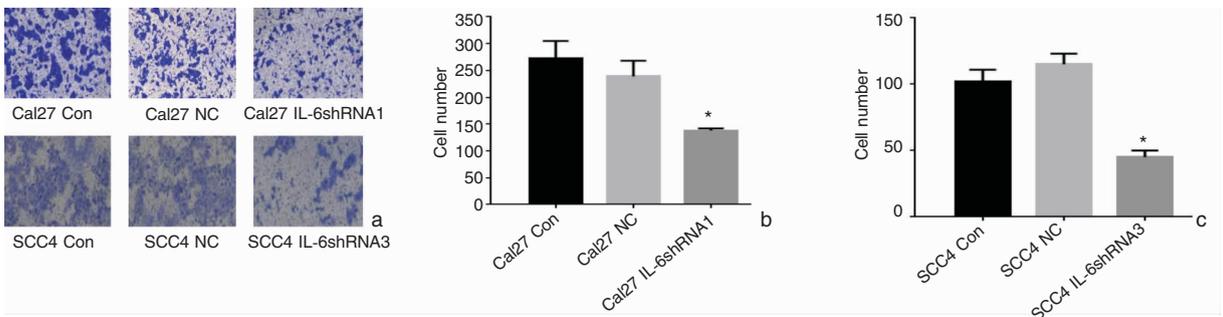


图 8 抑制 IL-6 基因表达对口腔鳞癌细胞迁移能力的影响 a: 各组细胞的 Transwell 细胞迁移实验图 (结晶紫 × 40); b: Cal27 细胞系实验组与对照组的比较; c: SCC4 细胞系实验组与对照组的比较 注: * $P < 0.01$ vs. Con, NC。

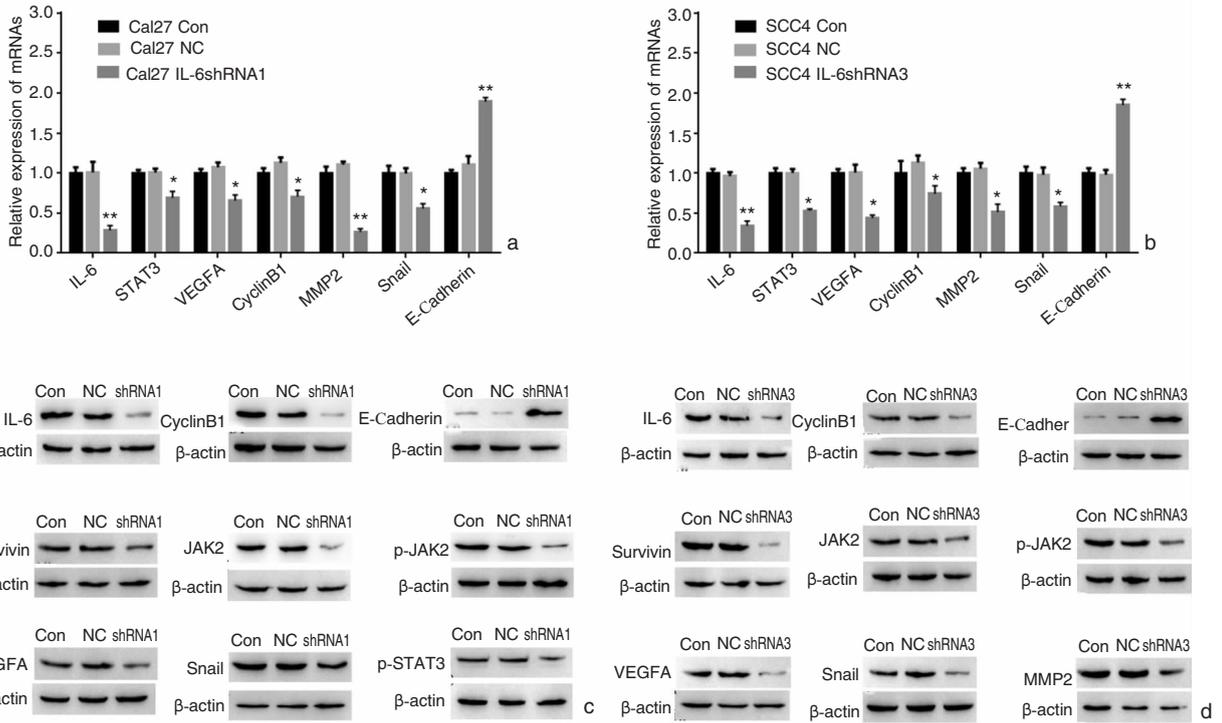


图 9 IL-6 敲低的口腔鳞癌细胞中各蛋白表达 a: qPCR 检测 Cal27 各组细胞中各基因表达状况; b: qPCR 检测 SCC4 各组细胞中各基因表达状况; c: Western blot 法检测 Cal27 各组各因子表达情况; d: Western blot 法检测 SCC4 各组各因子表达情况
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Con, NC.

3 讨论

本研究发现在口腔鳞癌中下调 *IL-6* 基因表达后,口腔鳞癌的细胞增殖、细胞侵袭及细胞迁移能力均受到了明显的抑制,细胞周期发生了 G2 期阻滞,表明 *IL-6* 基因的表达变化能够显著影响口腔鳞癌的各种细胞表型,这提示 *IL-6* 基因可能与口腔鳞癌的发生、发展密切相关,其可能在口腔鳞癌的发病过程中起着关键作用。

在确认 *IL-6* 基因表达变化能够影响口腔鳞癌各细胞表型后,本研究根据 *IL-6* 基因表达下调后口腔鳞癌细胞表型的变化情况,参考相关文献^[6-9],选取了 *STAT3*、*JAK2*、*VEGFA*、*Cyclin B1*、*MMP2*、*Snail*、*Survivin*、*E-Cadherin* 等基因作为待选的 *IL-6* 可能调控的下游通路基因作为研究对象。结果显示,在口腔鳞癌中,*IL-6* 基因表达下调后,*STAT3*、*JAK2*、*VEGFA*、*Cyclin B1*、*MMP2*、*Snail*、*Survivin* 基因表达均随之明显下降,而 *E-Cadherin* 基因表达随之显著增加,表明 *IL-6* 基因与这些下游通路基因之间存在着动态联系和密切相关性,*IL-6* 基因可能是通过调控这些基因的表达而影响口腔鳞癌的各种细胞表型。

有研究发现 *IL-6* 主要是靠激活 *JAK2* 和 *STAT3* 使其发生磷酸化而发挥作用。当 *JAK2* 和 *STAT3* 持续激活即 p-*JAK2* 和 p-*STAT3* 表达持续升高,则会造成下游相关的基因出现异常的高表达,从而促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡,促进细胞的侵袭和迁移等^[10-11]。例如 Prasad 等^[12]报道活化的 *STAT3* 可以通过调控 *Survivin*、*VEGF* 等基因而影响结肠癌细胞周期及促进肿瘤血管生成;Tsareva 等^[13]发现活化的 *STAT3* 和 *JAK2* 即 p-*JAK2*/p-*STAT3* 可以通过调控 *MMPs* 来增强结肠癌细胞侵袭能力;Colomiere 等^[14]报道活化的 *STAT3* 可以促进卵巢癌细胞 EMT 表型转化,从而影响卵巢癌细胞的侵袭和迁移;Sulkowska 等^[15]报道 p-*STAT3* 可以通过促进 Bcl-xL 蛋白表达、抑制 *E-Cadherin* 蛋白表达而增强乳腺癌细胞侵袭和转移能力。本课题研究结果显示,在人口腔鳞癌中,发现 p-*STAT3* 的表达与 *IL-6* 基因的表达存在动态联系,因此,结合文献资料可以推测,在 *IL-6* 调控口腔鳞癌细胞表型的过程中,活化的 *STAT3* 即 p-*STAT3* 是一个关键中继节点,*IL-6* 可能就是通过活化 *JAK2*,进而激活 *STAT3*,进而影响下游众多基因,从而影响口腔鳞癌的细胞增殖、侵袭以及迁移。

本研究发现在口腔鳞癌中下调 IL-6 基因表达后,细胞中 *VEGFA*、*Cyclin B1*、*Survivin* 基因表达亦随之明显下降。因此,根据前述的 *VEGFA* 基因和 *Cyclin B1* 基因的功能,以及口腔鳞癌中 IL-6 基因表达与 *VEGFA*、*Cyclin B1* 基因和 *Survivin* 表达的动态联系,推测 IL-6 基因可能是通过 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路调控 *Cyclin B1* 基因、*Survivin* 基因以及 *VEGFA* 基因的表达,进而影响口腔鳞癌细胞周期和细胞增殖。此外,MMP2 等可能也能够通过介导 E-cadherin 蛋白外域脱落而减弱 E-cadherin 的作用。本研究还发现在口腔鳞癌细胞中下调 IL-6 基因表达后,细胞中 *MMP2*、*Snail* 基因表达随之明显下降,而 *E-Cadherin* 基因表达随之显著增加,因此可以推断,IL-6 基因可能是通过 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路调控 *MMP2*、*Snail* 及 *E-Cadherin* 基因的表达,进而影响口腔鳞癌侵袭和迁移。

综上所述,本研究发现在口腔鳞癌中下调 IL-6 基因表达,可能诱导口腔鳞癌细胞周期发生 G2 期阻滞,并且显著抑制口腔鳞癌细胞的细胞增殖、细胞侵袭及细胞迁移能力。进而探讨 IL-6 基因影响口腔鳞癌细胞表型的具体作用机制,发现在口腔鳞癌细胞中,IL-6 可能主要是通过 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路发挥作用,其可能是通过活化 JAK2/STAT3,进而调控下游的 *VEGFA*、*Cyclin B1*、*MMP2*、*Snail*、*Survivin*、*E-cadherin* 等基因,从而影响口腔鳞癌的各种细胞表型。IL-6/JAK2/STAT3 信号通路可能与口腔鳞癌的发生、发展密切相关,其可能在口腔鳞癌的发病过程中起着关键作用,IL-6/JAK2/STAT3 信号通路具有作为口腔鳞癌基因治疗靶点的潜在价值,有必要进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Zini A, Czerninski R, Sgan H. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites [J]. *Oral Pathol Med*, 2010, 39(4): 299–305.
- [2] Valverd L, Pereira T, Dias R, et al. Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9233–9241.
- [3] Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Expression and influence of Notch signaling in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Sci*, 2016, 58(2): 283–294.
- [4] Shinagawa K, Yanamoto S, Naruse T, et al. Clinical roles of Interleukin-6 and STAT3 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2017, 23(2): 425–431.
- [5] Liu S, Liu D, Zeng X, et al. PA28 γ acts as a dual regulator of IL-6 and CCL2 and contributes to tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2018, 428(2): 192–200.
- [6] Lopes NM, Xavier FCA, Ortiz RC, et al. Subcellular localization and expression of E-cadherin and SNAIL are relevant since early stages of oral carcinogenesis [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(8): 1185–1191.
- [7] Bo C, Wu Q, Zhao H, et al. Thymosin α 1 suppresses migration and invasion of PD-L1 high-expressing non-small-cell lung cancer cells via inhibition of STAT3-MMP2 signaling [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 7255–7270.
- [8] Fang Y, Liang X, Jiang W, et al. Cyclin b1 suppresses colorectal cancer invasion and metastasis by regulating e-cadherin [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126875.
- [9] 李武杰,李勇强,张樊莘,等. Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(5): 537–543.
- [10] Garbers C, Rose-John S. Dissecting Interleukin-6 classic- and trans-signaling in inflammation and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1725: 127–140.
- [11] Wu X, Tao P, Zhou Q, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20741–20750.
- [12] Prasad S, Tyagi AK, Siddik ZH, et al. Curcumin-free turmeric exhibits activity against human HCT-116 colon tumor xenograft: comparison with curcumin and whole turmeric [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 12(8): 871.
- [13] Tsareva SA, Wagner S, Müller A, et al. Cell-cell contacts induce STAT3 activity in colon carcinoma cells through an autocrine stimulation loop [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(5): 857–863.
- [14] Colomiere M, Ward AC, Riley C, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(1): 134–144.
- [15] Sulkowska U, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, et al. Comparison of E-cadherin with STAT3 and apoptosis regulators: Bak and Bcl-xL in endometrioid adenocarcinomas of different ER-alpha immunoprofile [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(2): 171–174.

(收稿日期:2021-12-03)

本文引用格式:全向娟,周晓,钟慧,等. IL-6/JAK2/STAT3 对口腔鳞状细胞癌生物学行为的影响 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(1): 89–97. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007–1520. 202221483

Cite this article as: TONG Xiangjuan, ZHOU Xiao, ZHONG Hui, et al. Influences of IL-6/JAK2/STAT3 on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022, 28(1): 89–97. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007–1520. 202221483