

JAK2/STAT3 通路在 HBV 相关肝细胞癌中 表达及机制研究

裴金仙, 陈天狮, 任巧晶, 王晋江

(山西省人民医院感染性疾病科, 山西 太原 030012)

摘要:目的 探讨 JAK2/STAT3 通路在 HBV 相关肝细胞癌中的表达及机制研究。方法 选取 2019 年 2 月-2021 年 4 月山西省人民医院诊治的 HBV 相关肝细胞癌患者和非 HBV 相关肝细胞癌患者各 15 例。采用 Western blot 法检测癌组织及癌旁组织 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白的表达, 进一步检测稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞株 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白的表达。结果 HBV-HCC 组和 HCC 组癌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); HBV-HCC 组较 HCC 组癌组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达升高, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 p-JAK2、p-STAT3 均上调, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$); HBV-HCC 组较 HCC 组及正常对照组 JAK2、STAT3 磷酸化水平均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); HepG2-HBx 组中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均高于 HepG2-vector 对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); HepG2-HBx 组较 HepG2-vector 组 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 HBV 相关肝细胞癌患者 HBx 蛋白可能通过异常激活 JAK2/STAT3 信号通路而参与肿瘤的发生发展。

关键词: HBV; 肝细胞癌; JAK2; STAT3; HBx

中图分类号: R735.7; R512.6+2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.24.012

文章编号: 1006-1959(2022)24-0059-04

The Expression and Mechanism of JAK2/STAT3 Pathway in HBV-related Hepatocellular Carcinoma

PEI Jin-xian, CHEN Tian-shi, REN Qiao-jing, WANG Jin-jiang

(Department of Infectious Diseases, Shanxi Province People's Hospital, Taiyuan 030012, Shanxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and mechanism of JAK2/STAT3 pathway in HBV-related hepatocellular carcinoma. **Methods** From February 2019 to April 2021, 15 patients with HBV-related hepatocellular carcinoma and 15 patients with non-HBV-related hepatocellular carcinoma were selected from Shanxi Provincial People's Hospital. The expression of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 protein in cancer tissues and adjacent tissues was detected by Western blot. The expression of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 protein in HepG2 cell line stably expressing HBx was further detected. **Results** The expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 proteins in cancer tissues of HBV-HCC group and HCC group were higher than those in adjacent tissues, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression of JAK2 and STAT3 protein in HBV-HCC group was higher than that in HCC group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$), while p-JAK2 and p-STAT3 were up-regulated, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 in HBV-HCC group were significantly higher than those in HCC group and normal control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The protein expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in HepG2-HBx group were higher than those in HepG2-vector control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 in HepG2-HBx group were significantly higher than those in HepG2-vector group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** HBx protein may be involved in the occurrence and development of HBV-related hepatocellular carcinoma by abnormally activating JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: HBV; Hepatocellular carcinoma; JAK2; STAT3; HBx

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 是目前我国第 4 位常见恶性肿瘤, 在肿瘤致死病因中排第 2 位, 严重威胁着我国人民的生命和健康。在我国, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是引起 HCC 最为重要的因素。因此, 研究 HBV 相关肝细胞癌的发病机制具有非常重要的意义。本课题组前期研究发现^[1], LINC01152 在 HBV 相关肝细胞癌中高表达,

与此同时, 发现 LINC01152 与 HBV 相关肝细胞癌患者癌组织和血清 IL-23 表达呈正相关, 其潜在机制是激活了 JAK/STAT 信号通路。本研究旨在通过分析 HBV 相关肝细胞癌患者 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白的表达, 并进一步研究其与 HBx 的关系, 探讨 JAK2/STAT3 信号通路在 HBV 相关肝细胞癌发生发展中的作用, 旨在为进一步探索 HBV 相关肝细胞癌的发病机制和治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 2 月-2021 年 4 月山西省人民医院诊治的 HBV 相关肝细胞癌患者和非 HBV 相关肝细胞癌患者为研究对象, 其中经病理诊断明确为 HBV 相关肝细胞癌组织 15 例、非 HBV 相关肝细胞癌组织 15 例。所选病例手术切除前都证实未发现肝外远处转移和未获得其它治疗措施。术中

基金项目: 山西省卫生健康委员会基金资助项目 (编号: 2020031)

作者简介: 裴金仙 (1984.8-), 女, 山西平遥人, 硕士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎及肝癌的发病机制研究

通讯作者: 陈天狮 (1973.8-), 男, 山西运城人, 硕士, 主任医师, 主要从事病毒性肝炎及肝癌的发病机制研究

同时取距癌块边缘 2 cm 相应的癌旁组织做为正常对照组。所有组织均为手术切除后获取的新鲜标本。本研究经山西省人民医院伦理委员会批准,患者知情同意,并签署知情同意书。

1.2 试剂 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Sigma 公司。

1.3 Western blot 检测组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达 HBV 相关肝细胞癌组为实验组 (HBV-HCC 组),非 HBV 相关肝细胞癌组为对照组 (HCC 组),癌旁组织为正常对照组。取新鲜冻存组织 0.05 g,将组织碾压磨碎,加入蛋白裂解液 0.5 ml,30 min 后于 4 ℃ 15000 r/min 离心 15 min,收集上清液。取 50 μg 上清液蛋白上样,10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离,将凝胶内蛋白质转移到硝酸纤维膜上,5%脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h,根据 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白分子量大小裁膜,并分别加入 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 β-actin 抗体,4 ℃孵育过夜,洗膜液洗涤 3 次,再分别加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜液洗涤 3 次。免疫荧光成像仪检测蛋白的表达。

1.4 Western blot 检测 HepG2 细胞株 JAK2、p-JAK2、

STAT3、p-STAT3 的表达 稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞株为本实验室保存。稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞株为实验组,表达空载体的 HepG2 细胞株为对照组。取对数生长期的 HepG2 细胞,胰酶消化,收集细胞。取 HepG2-HBx 实验组和 HepG2-vector 对照组细胞各 10^5 个,采用 PBS 洗涤 2 次,裂解细胞,提取总蛋白,10%SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后封闭 1 h,4 ℃一抗孵育过夜,室温二抗孵育 1 h,洗膜后检测蛋白的表达。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 相关肝细胞癌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达 在 HBV-HCC 组和 HCC 组癌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均高于癌旁组织,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$);HBV-HCC 组较 HCC 组癌组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达升高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 p-JAK2、p-STAT3 均上调,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1、图 2。

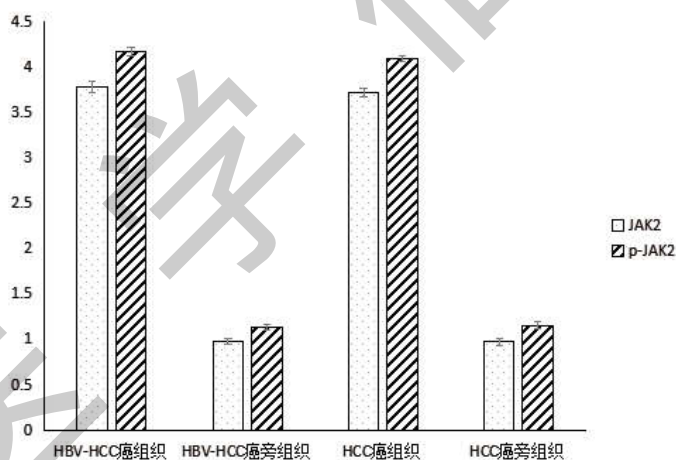


图1 JAK2、p-JAK2在HBV相关肝细胞癌组织中的表达

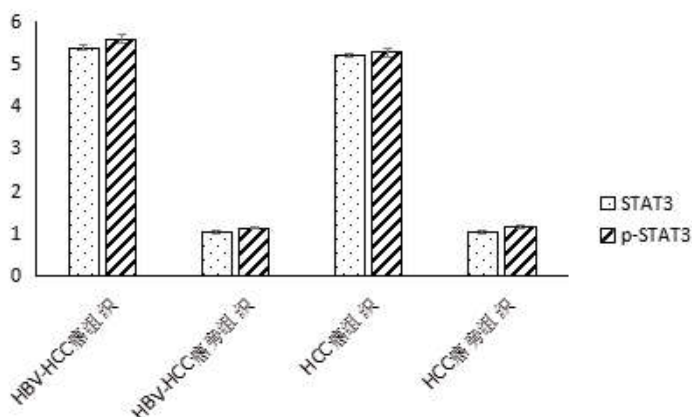


图2 STAT3、p-STAT3在HBV相关肝细胞癌组织中的表达

2.2 HBV 相关肝细胞癌组织中 JAK2、STAT3 磷酸化水平比较 用 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 表示 JAK2、STAT3 磷酸化水平, 结果发现, HBV-HCC 组较 HCC 组及正常对照组 JAK2、STAT3 磷酸化水平平均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 HBV 相关肝细胞癌与非 HBV 相关肝细胞癌组织 JAK2、STAT3 磷酸化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
HBV-HCC 组	1.12 \pm 0.13	1.05 \pm 0.03
HCC 组	1.04 \pm 0.10	0.98 \pm 0.03
正常对照组	0.98 \pm 0.08	0.92 \pm 0.05

2.3 稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞株 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达 在 HepG2-HBx 组中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均高于 HepG2-vector 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3; 稳定表达 HBx 的 HepG2 细胞株中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平较对照组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

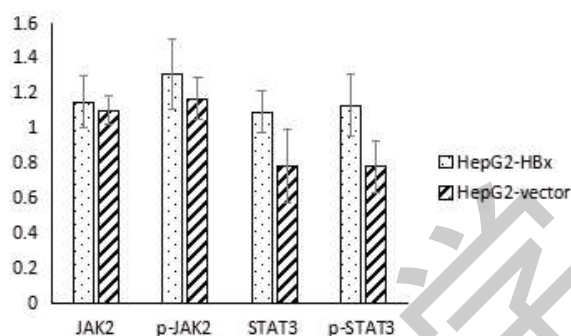


图 3 HepG2 细胞株 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达

表 2 HepG2 细胞株 JAK2、STAT3 磷酸化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
HepG2-HBx 组	1.14 \pm 0.14	1.01 \pm 0.12
HepG2-vector 组	1.02 \pm 0.15	0.99 \pm 0.13

3 讨论

HBV 感染是我国常见的传染病之一。慢性 HBV 持续感染是肝细胞癌发生的主要原因。但对于 HBV 相关肝细胞癌的发病机制, 目前仍在持续研究中。大量研究发现^[2-4], 乙型肝炎病毒 X (hepatitis B virus X, HBx) 蛋白是 HBV 病毒复制所必需的高度保守的多功能蛋白, 具有多种生物活性。HBx 蛋白是 HBV 发挥作用的核心蛋白, 其在 HBV 相关肝细胞癌的发生和发展中发挥着重要的作用。HBx 蛋白作为一个具有广泛作用的反式作用因子, 可通过干扰宿主细胞基因转录、细胞信号转导, 降低细胞循环周期, 在细胞增殖转化及凋亡中发挥作用。HBx 蛋白作为一

种关键的多功能调节蛋白, 通过控制细胞和病毒启动子和增强子、通过蛋白质-蛋白质相互作用来驱动 HBV 复制, 并干扰驱动病毒相关肝细胞癌发生的多种细胞信号转导通路, 参与肝癌的发生、发展、侵袭和转移^[5-7]。HBx 蛋白还可通过影响 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和 miRNA 失调等一系列方式干扰宿主细胞的表现遗传机制, 调节与肝细胞癌相关的宿主基因的表达^[8,9]。本课题组先前的研究通过动物实验和细胞实验均证实^[1], HBx 蛋白还可通过上调 LINC01152 来促进肝癌细胞增殖。目前, HBx 蛋白通过调控宿主肝细胞内蛋白编码基因的表达而使得 HBV 相关肝细胞癌发生及发展已得到广泛证实^[10,11]。

酪氨酸蛋白激酶/信号转导和转录激活因子 (Janus kinase/signal transduction and activation of transcription, JAK2/STAT3) 信号通路是机体内一个重要的信号转导通路。该信号通路主要参与调控细胞增殖、分化与凋亡, 在胚胎发育、器官再生、炎症与免疫等生物过程中发挥一定的作用。JAK/STAT 信号通路异常激活, 可导致下游靶基因失调, 这些靶基因通过控制细胞增殖、血管生成、免疫监视、肿瘤侵袭和转移等, 可促进恶性肿瘤的形成和转移。JAK/STAT 通路可被多种细胞因子和生长因子激活, 如白细胞介素、干扰素和 EGF 家族成员, 它们与各自的跨膜受体结合, JAK 在配体诱导的受体构象变化时被磷酸化激活, 而后将 STAT 磷酸化激活形成二聚体, 然后转移到细胞核。随后, 磷酸化的 STAT 识别并结合特定的启动子序列, 以激活其目标基因的转录^[12]。JAK2 是一种非受体酪氨酸激酶, 可诱导细胞质信号级联反应。JAK2 一旦磷酸化被激活, 它将激活下游转录因子 STAT3。STAT3 作为一种转录因子, 在正常细胞中, 其通过磷酸化将转录信号从细胞膜上的细胞因子和生长因子受体传递到细胞核内^[13]。过度活化的 STAT3 可诱导多种基因的表达, 降低干扰素、炎性细胞因子和趋化因子等免疫刺激因子的表达, 从而直接促进肿瘤生长和转移, 被普遍认为是促进肝癌发展的真正基因。STAT3 参与细胞生存与增殖, 抑制凋亡蛋白的表达, 促进肿瘤血管的形成, 调节肿瘤免疫微环境, 逃避机体免疫监视, 确保肿瘤细胞生长, 并参与肿瘤转移, 是肝癌发生和进展的关键因子^[12]。也有动物研究认为^[14], JAK2 是肝脏炎症进展所需的关键因素, JAK2 通过调节关键炎症途径在肝癌发生发展中发挥着不可或缺的作用。研究表明^[15], JAK2/STAT3 信号通路在肝癌等多种癌症中被异常激活, 在诱导异常细胞增殖、抗凋亡、迁移、侵袭和血管生成中发挥关键作用, 参与调控肿瘤生长和转移。

本研究对15例HBV相关肝细胞癌患者和非HBV相关肝细胞癌患者癌组织,以及癌旁组织JAK2和STAT3蛋白及其磷酸化活化蛋白检测发现,在HBV-HCC组和HCC组癌组织中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平平均高于癌旁组织,且HBV-HCC组较HCC组癌组织中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达水平升高。用p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3表示JAK2、STAT3磷酸化水平,结果发现,HBV-HCC组较HCC组及正常对照组JAK2、STAT3磷酸化水平均升高。这些结果表明,JAK2/STAT3信号通路异常活化与HBV相关肝细胞异常增殖有关,推测该信号通路可能参与HBV相关肝细胞癌的发生和发展。为了进一步探讨JAK2/STAT3信号通路在HBV相关肝细胞癌发生发展中的作用机制,本研究检测了稳定表达HBx的HepG2细胞株JAK2和STAT3蛋白以及磷酸化水平,结果发现,高表达HBx的肝癌细胞株中JAK2和STAT3磷酸化水平升高。本课题组先前的研究也发现^[1],HBx通过LINC01152介导肝细胞癌患者IL-23的表达,上调STAT3蛋白水平,激活STAT3磷酸化,从而调控细胞增殖。Zheng Y等^[16]研究发现,HBx蛋白能够促进SH2结构域蛋白D5与转酮酶结合,刺激STAT3磷酸化,进而活化STAT3及其下游分子。活化的STAT3是HBV在宿主中大量复制的调控因子,由此形成正反馈通路,这是慢性HBV诱发肝细胞癌发生的重要原因^[17]。综上所述,HBV相关肝细胞癌患者HBV可能通过HBx异常激活JAK2/STAT3信号通路而参与肝细胞癌的发生发展。

HBV相关肝细胞癌发病因素繁多,发病机制复杂,JAK2/STAT3信号通路在癌细胞的增殖、侵袭和转移、抗凋亡和免疫逃逸中发挥着重要的作用。抑制JAK2/STAT3信号通路异常激活,进而抑制肿瘤免疫微环境,改变肿瘤细胞代谢,为HBV相关肝细胞癌提供一种潜在的免疫疗法。JAK2/STAT3信号通路作为一个潜在的HBV相关肝细胞癌治疗靶点,深入了解其功能、调控因素及其在肝细胞癌中的作用机制,对于进一步认识HBV相关肝细胞癌及其精准治疗具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1]Chen T,Pei J,Wang J,et al.HBx-related long non-coding RNA 01152 promotes cell proliferation and survival by IL-23 in hepatocellular carcinoma [J].Biomed Pharmacother,2019,115:108877.
- [2]Yen CJ,Yang ST,Chen RY,et al.Hepatitis B virus X protein (HBx) enhances centrosomal P4.1-associated protein (CPAP) expression to promote hepatocarcinogenesis [J].J Biomed Sci,2019,26(1):44.

- [3]Yang MH,Chen M,Mo HH,et al.Utilizing Experimental Mouse Model to Identify Effectors of Hepatocellular Carcinoma Induced by HBx Antigen[J].Cancers (Basel),2020,12(2):409.
- [4]Slagle BL,Bouchard MJ.Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications [J].Curr Opin Virol,2018,30:32-38.
- [5]Sivasudhan E,Blake N,Lu Z,et al.Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review [J].Cells,2022,11(4):741.
- [6]Huang FY,Wong DK,Mak LY,et al.Hepatitis B virus X protein promotes hepatocarcinogenesis via the activation of HMGA2/STC2 signaling to counteract oxidative stress-induced cell death[J].Carcinogenesis,2022,43(7):671-681.
- [7]Lee AR,Park YK,Dezhbord M,et al.Interaction between the Hepatitis B Virus and Cellular FLIP Variants in Viral Replication and the Innate Immune System[J].Viruses,2022,14(2):373.
- [8]Sartorius K,An P,Winkler C,et al.The Epigenetic Modulation of Cancer and Immune Pathways in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma:The Influence of HBx and miRNA Dysregulation[J].Front Immunol,2021,12:661204.
- [9]Zeisel MB,Guerrieri F,Levrero M.Host Epigenetic Alterations and Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma[J].J Clin Med,2021,10(8):1715.
- [10]Zheng C,Liu M,Ge Y,et al.HBx increases chromatin accessibility and ETV4 expression to regulate dishevelled-2 and promote HCC progression[J].Cell Death Dis,2022,13(2):116.
- [11]Sartorius K,Swadling L,An P,et al.The Multiple Roles of Hepatitis B Virus X Protein (HBx) Dysregulated MicroRNA in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma (HBV-HCC) and Immune Pathways[J].Viruses,2020,12(7):746.
- [12]Hin Tang JJ,Hao Thng DK,Lim JJ,et al.JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma[J].Hepat Oncol,2020,7(1):HEP18.
- [13]Lee H,Jeong AJ,Ye SK.Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy[J].BMB Rep,2019,52(7):415-423.
- [14]Shi SY,Luk CT,Schroer SA,et al.Janus Kinase 2 (JAK2) Dissociates Hepatosteatosis from Hepatocellular Carcinoma in Mice[J].J Biol Chem,2017,292(9):3789-3799.
- [15]Kim H,Kim D,Choi SA,et al.KDM3A histone demethylase functions as an essential factor for activation of JAK2-STAT3 signaling pathway [J].Proc Natl Acad Sci U S A,2018,115(46):11766-11771.
- [16]Zheng Y,Ming P,Zhu C,et al.Hepatitis B virus X protein-induced SH2 domain-containing 5 (SH2D5) expression promotes hepatoma cell growth via an SH2D5-transketolase interaction[J].J Biol Chem,2019,294(13):4815-4827.
- [17]Liu Y,Feng J,Sun M,et al.Long non-coding RNA HULC activates HBV by modulating HBx/STAT3/miR-539/APOBEC3B signaling in HBV-related hepatocellular carcinoma [J].Cancer Lett,2019,454:158-170.

收稿日期:2022-03-28;修回日期:2022-04-15

编辑/肖婷婷