

激酶抑制剂 WP1066 对前列腺基质细胞 JAK2 /STAT3 影响的研究*

李云祥^{1,2}, 李进铭³, 魏 强^{2△}, 张宗平¹, 伍 季¹, 王安果¹

1. 南充市中心医院(川北医学院第二临床学院)泌尿外科(南充 637000); 2. 四川大学华西医院 泌尿外科(成都 610041);
3. 川北医学院附属医院 泌尿外科(南充 637000)

【摘要】 目的 研究 JAK2 信号通路在前列腺基质细胞中的作用及激酶抑制剂 WP1066 对其表达的影响。**方法** 采用 Western blot 检测单纯良性前列腺增生(BPH)者($n=4$)和合并重度组织炎症 BPH 患者($n=4$)前列腺组织中的 JAK2 和 STAT3 的磷酸化程度来验证其所介导的信号通路的活化情况,并检测其抑制剂 WP1066 在前列腺基质细胞上抑制 JAK2 和 STAT3 由白介素-6(IL-6)带来的活化作用。**结果** 在 BPH 合并重度组织炎症的前列腺组织中,JAK2 的磷酸化水平(pJAK2)升高,使用 WP1066 处理细胞并不会降低 JAK2 或 STAT3 的表达。但在抑制剂 WP1066 所处理的细胞上,无论是 JAK2 还是 STAT3 都无法检测到磷酸化,表明 JAK2-STAT3 的信号通路被抑制。使用 IL-6 可增加 pJAK2 和 pSTAT3 的表达,此结果可被 WP1066 阻断。**结论** JAK/STAT 信号通路在 BPH 合并重度组织学炎症前列腺组织中呈现活化状态,激酶抑制剂 WP1066 可抑制 STAT3 的活化。

【关键词】 良性前列腺增生 激酶抑制剂 磷酸化 活化

Study of Kinase Inhibitor WP1066 on the STAT3/JAK2 of Prostate Stromal Cells LI Yun-xiang^{1,2}, LI Jin-ming³, WEI Qiang^{2△}, ZHANG Zong-ping¹, WU Ji¹, WANG An-guo¹. 1. Department of Urology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China; 2. Department of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Urology, Affiliated Hospital to North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

△ Corresponding author, E-mail: weiqiang765@126.com

【Abstract】 Objective To study the role of JAK2 signaling pathway in prostate stromal cells and the effect of inhibitor WP1066 on its expression. **Methods** The phosphorylation of JAK2 and STAT3 in prostate tissues of patients with benign prostatic hyperplasia (BHP) ($n=4$) and severe histological prostatitis (HP) plus BPH ($n=4$) was tested by using Western blot to verify the activation of their mediated signaling pathway. Kinase inhibitor WP1066 was added to prostate stromal cells to detect inhibition of the JAK2 and STAT3 activation launched by IL-6. **Results** JAK2 phosphorylation level (pJAK2) was significantly increased in the patients with severe HP plus BPH, and the expression of JAK2 or STAT3 was not decreased in WP1066 treatment cells. However, neither phosphorylation in JAK2 nor STAT3 was able to be detected in the cells treated with WP1066 or WP1066 + IL-6, indicating that the signaling pathway of JAK2-STAT3 was inhibited. **Conclusion** JAK/STAT signaling pathway is activated in patients with severe HP plus BPH, but could be inhibited by WP1066.

【Key words】 Benign prostatic hyperplasia Kinase inhibitor Phosphorylation Activation

良性前列腺增生(BPH)是以前列腺上皮细胞和前列腺基质细胞增生为特征^[1],在前列腺的过渡区形成大量离散性的结节并在病理学上表现为前列腺过渡区的组织细胞异常增生^[2]。近年来的研究发现前列腺组织学炎症在前列腺增生的发生过程中发挥重要作用。免疫细胞的功能是通过分泌相应的趋化因子和细胞因子作用于靶细胞来发挥作用。而在

此过程中,作为介导各种细胞因子的 JAK/STAT 信号通路是关键^[3]。尽管 JAK/STAT 信号通路最初是在研究干扰素的过程中被发现的,但是随后的研究发现 JAK/STAT 事实上在进化的过程中高度保真^[4],且发挥着很多关键的作用,比如介导其他细胞因子以及机体激素的作用^[5]。因此 STATs 蛋白被认为在炎症性的疾病中发挥重要的作用^[6]。WP1066 是 AG490 经改良后产生的新一代抑制剂。体内试验证明 WP1066 不仅对 STAT3 的活化产生抑制作用,还会对肿瘤细胞生长起到抑制作用^[7]。

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014SZ0218)和四川省卫生和计划生育委员会科研课题(No. 16PJ204)资助

△ 通信作者, E-mail: weiqiang765@126.com

我们怀疑浸润于合并组织性炎症的前列腺增生组织中的 Th17 通过 IL-17 刺激前列腺组织中 IL-6 和 IL-8 等炎性细胞因子的释放,而这些因子通过自分泌或旁分泌的作用激活前列腺基质细胞和上皮细胞的 JAK/STAT 信号通路并介导下游的基因表达来介导炎症反应^[8]。本研究通过检测 JAK2/STAT3 信号通路在前列腺基质细胞中的作用及抑制剂 WP1066 对其表达的影响,从而为临床上治疗 BPH 的药物研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集 8 例四川大学华西医院泌尿外科 2013 年 5 月至 2014 年 1 月因膀胱癌行根治性膀胱癌切除术患者前列腺移行区手术标本,患者年龄 55~71 (61.9±8.9)岁。所有前列腺标本均术后病理证实前列腺为 BPH,并排除前列腺癌、膀胱移行细胞癌前列腺组织浸润等病变。BPH 标本依据其术后病理学检查结果检查是否合并组织学前列腺炎(histological prostatitis,HP),合并 HP 者根据国际前列腺炎组织分类标准分度^[9]判断为重度 HP。所有研究对象均签署知情同意书。本组标本中单纯 BPH 4 例,4 例合并重度 HP。对组织学炎症行镜下观察,发现多为前列腺周边型炎症浸润。

1.2 细胞和抗体

细胞:前列腺基质细胞由四川大学华西医院泌尿外科实验室分离培养得到。

一抗和二抗:Rabbit Anti-JAK2 (phospho Y1007 + Y1008),购自美国 Abcam 公司;Rabbit Anti-JAK2 (C-10),Goat-Anti-phos STAT3-Y705, Rabbit Anti-STAT3 (C20),Rabbit Anti-Actin,均购自美国 Santa Cruz 公司;Human IL-6 购自美国 R&D 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 BPH 样本的采集 从单纯 BPH 组及合并重度 HP 组的前列腺增生组织的移行带取标本,一份送病理实验室行 HE 染色验证膀胱癌前列腺浸润的有无,一份无菌条件下去除无关组织后分离细胞备用。

1.3.2 原代前列腺基质细胞的培养 切取移行带标本后,4℃浸泡于含青、链霉素各 100 U/mL,两性霉素 1 μg/mL 的 PBS 溶液中清洗组织约 10 min,然后转移至 DMEM 完全培养基中。在无菌条件下,将组织再次进行修剪,去除血块及组织明显失活

后眼科剪反复修剪组织呈糊状后胰酶消化 15 min。将组织通过牙科探针分次少量转移至 T25 细胞培养瓶内。向瓶内注入 DMEM 培养基后放置在 37℃、体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱内。接种 3 d 后观察细胞贴壁情况,并首次换液,去除浮起的前列腺组织。每日相差显微镜下观察前列腺细胞的情况,每 3 日更换细胞培养基。

1.3.3 原代前列腺基质细胞传代 倒置显微镜下观察培养瓶内的原代前列腺基质细胞,细胞长满瓶底约 90%,或细胞培养液明显变黄超出缓冲范围时进行细胞的传代。37℃无菌 pH7.0 PBS 溶液 5 mL 漂洗细胞两次,去除残留的培养基及胎牛血清(FBS)。加入 1 mL 新鲜胰酶,置于相差显微镜下,持续观察细胞的变形情况。当贴壁细胞收缩为小圆形时,弃去胰酶。然后轻拍细胞培养瓶,让贴壁细胞脱离瓶壁。加入 3 mL 完全 DMEM 培养基,反复吹打均匀。将细胞悬液平均分入 3 个新细胞培养瓶中。以 1:3 进行细胞传代。为获取基质细胞继续使用 DMEM 培养基。在传代时,由于胰蛋白酶对上皮细胞的损伤较大,大量上皮细胞在传代过程中死亡。第 2 代时培养瓶内仅残留少量的上皮细胞。细胞在第 3 代时所培养细胞纯化为基质细胞^[10]。单纯 BPH 组和合并重度 HP 组各取前列腺基质细胞检测 JAK2 和 STAT3 磷酸化蛋白(pJAK2 和 pSTAT3)表达情况。

1.3.4 抑制剂 WP1066 处理细胞 取传代后的基质细胞悬液,将培养的细胞株分别接种在 100 mL 培养瓶中,用 RPMI-1640 培养基(含 10% FBS),37℃,体积分数 5%CO₂ 培养。以细胞密度 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 各 2 mL 接种 24 孔平底培养板的每孔,每孔 100 μL (2×10^4 /孔),接种孵育 72 h 后加相应刺激,其分设 4 组:IL-6 刺激组(加入 IL-6 刺激 30 min)、抑制剂 WP1066 组(加入 JAK2 的抑制剂 WP1066 处理 24 h)、WP1066+IL-6 刺激组(加入 IL-6 刺激 30 min 后再加入 WP1066 处理 24 h)、空白对照组(Blank,不加入任何刺激剂)。

1.3.5 Western blot 细胞样品使用 200 μL 1× Laemmli Sample Buffer 裂解,加入 100 U DNase 降解基因组 DNA 约 20 min。沸水中煮沸 10 min,蛋白充分变性后,置于冰上 5 min。将裂解的蛋白样品每个孔加样 35 μL 后进行电泳。将电泳结束后的凝胶进行转膜,放置于一抗中 2 h,0.5% TritonX100 TBS 洗膜液摇床上震荡冲洗 3 次,每次 5 min。然后二抗中 2 h,重复洗膜 3 次,置于 ECL

化学发光液中 1 min,ChemiDoc Image System 系统检测人 IL-6 刺激的前列腺基质细胞样本中 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达,内参蛋白为 Actin。

2 结果

2.1 JAK/STAT 信号通路在合并重度 HP 的 BPH 前列腺组织中状态

通过 Western blot 检测发现,在单纯 BPH 前列腺组织中,有 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达,但是 pJAK2 表达较弱, pSTAT3 表达极低甚至几乎检测不到。在 BPH 合并重度 HP 组中, pJAK2 和 pSTAT3 表达都有明显升高(图 1)。

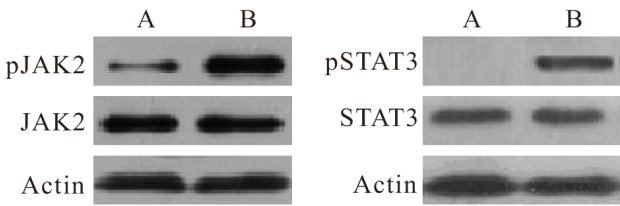


图 1 合并重度 HP 的 BPH 患者前列腺组织中的 JAK2 和 STAT3 磷酸化检测

Fig 1 Detection of JAK2 and STAT3 phosphorylation in severe HP with prostatic tissues of BPH patients

A: BPH; B: BPH with severe HP

2.2 JAK2 激酶抑制剂对合并重度 HP 的 BPH 前列腺基质细胞中 JAK2 和 STAT3 活化的影响

IL-6 刺激前列腺基质细胞,其 JAK2 和 STAT3 的磷酸化明显增加。Western blot 检测发现,使用 WP1066 处理细胞并不会降低 JAK2 或 STAT3 的表达。但是抑制剂 WP1066 所处理的细胞,无论是 JAK2 还是 STAT3 都无法检测到磷酸化,表明 JAK2-STAT3 的信号通路被抑制,进而无法激活下游的急性期蛋白的表达(图 2)。

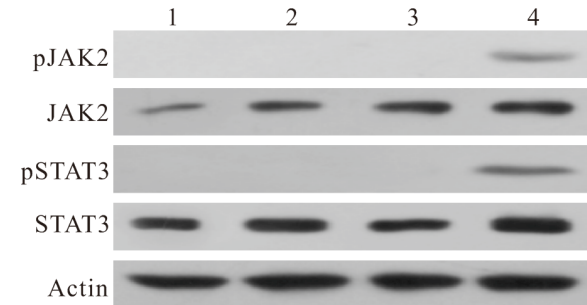


图 2 JAK2 抑制剂可同时抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化

Fig 2 JAK2 inhibitors simultaneously inhibit the phosphorylation of JAK2 and STAT3

1: WP1066; 2: WP1066+IL-6; 3: Blank; 4: IL-6

3 讨论

近年来的研究发现前列腺组织炎症在前列腺增生的发生过程中发挥重要作用^[9]。免疫细胞是通过分泌相应的趋化因子和细胞因子作用于靶细胞来发挥作用。在此过程中,作为介导各种细胞因子的 JAK/STAT 信号通路是其关键^[8]。本实验中,发现 BPH 标本中多数合并组织炎症,且已有研究表明,组织炎症与临床进展相关,推测在 BPH 的发病过程中,组织炎症起重要作用,Th17 细胞浸润于前列腺组织中释放效应细胞因子 IL-17,而被释放的 IL-17 则结合表达于靶细胞上的受体,进一步的刺激前列腺上皮细胞与基质细胞释放作为 IL-17 的下游细胞因子 IL-6 与 IL-8。而 IL-6 与 IL-8 则最终刺激 JAK2 以及 STAT3 的活化导致前列腺上皮细胞和基质细胞表达大量的急性期蛋白并引发炎症^[8]。因此,形成了一个 Th17-IL-17-IL-6/8-JAK2&STAT3 的信号轴来引发炎症。在这个信号轴中,JAK2 作为磷酸化 STAT3 的关键激酶,STAT3 作为诱导急性期蛋白表达的关键转录因子发挥最终的关键作用来引发炎症,暗示 JAK2 或 STAT3 很有可能作为一个未来 BPH 治疗的分子靶位点。

JAK/STAT 途径是近些年来发现的一条多种细胞因子共用的信号传导途径,其作用模式已基本明确,但对其作用环节中的调控及与其它细胞因子信号传导途径的联系仍有待深入研究^[11]。JAK 激酶是一个细胞内非受体酪氨酸激酶家族,是由介导细胞因子产生信号,且通过 JAK/STAT 信号通路传递下去。我们通过检测合并重度组织学炎症 BPH 患者前列腺组织中的 JAK2 和 STAT3 的磷酸化程度来验证其所介导的信号通路的活化情况。Western blot 结果发现,尽管在单纯的前列腺增生组织中,有一定程度的磷酸化,但 STAT3 的磷酸化(pSTAT3)极低至几乎检测不到。在重度 HP 组,JAK2 的磷酸化(pJAK2)有明显的升高,且 STAT3 的磷酸化(pSTAT3)升高更明显。

前面的研究发现 STAT3 及其上游的激酶 JAK2 可能是一个未来 BPH 治疗的靶位点。由于 JAK/STAT 信号通路在许多疾病中都能够发挥关键作用,可作为一个治疗的靶位点^[12],因此利用 JAK 激酶抑制剂来治疗相应疾病已经被广泛应用于临床。比如 JAK1 和 JAK2 的特异性抑制剂 Ruxolitinib 已经被用于临床上治疗一些由 Th17 所引发的自身免疫性疾病,如银屑病、骨髓纤维化、类

风湿性关节炎等^[13]。而在这些疾病中,如类风湿性关节炎,Th17 细胞及其所介导的炎症反应很有可能也是通过和 BPH 一样的信号轴来发挥作用且是引起疾病的关键。而本研究也发现,通过使用 JAK2 抑制剂 WP1066 处理细胞并不会降低 JAK2 或 STAT3 的表达,但能特异性的抑制 IL-6 所介导的 JAK2 和 STAT3 的磷酸化,表明 JAK2-STAT3 的信号通路被抑制,进而无法激活下游的急性期蛋白的表达。当然本实验主要研究了前列腺基质细胞,尚需探索前列腺腺泡细胞。再者传代细胞后其细胞因子微环境发生了变化,对实验结果也存在不利影响,尚需扩大样本进一步研究。

综上所述,JAK/STAT 信号通路在合并重度组织炎症 BPH 的前列腺组织中呈现活化状态,激酶抑制剂 WP1066 可抑制 STAT3 的活化,有望在临床上作为 BPH 治疗的应用,可能为未来临床治疗 BPH 指出了一条新的方向。

参 考 文 献

- [1] COLADO-VELÁZQUEZ J, MAILLOUX-SALINAS P, MEDINA-CONTRERAS J, *et al.* Effect of *Serenoa repens* on oxidative stress, inflammatory and growth factors in obese wistar rats with benign prostatic hyperplasia. *Phytother Res*, 2015,29(10):1525-1531.
- [2] HOLMSTRÖM F, SHIMIZU S, SHIMIZU T, *et al.* Protective effect of hydroxyfasudil, a Rho kinase inhibitor, on ventral prostatic hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Prostate*, 2015,75(15):1774-1782.
- [3] FU XT, DAI Z, SONG K, *et al.* Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int J Oncol*, 2015,46(2):587-596.
- [4] ZHOU J, YI L, OUYANG Q, *et al.* Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cell Signal*, 2014,26(12):2896-2902.
- [5] JORVIG JE, CHAKRABORTY A. Zerumbone inhibits growth of hormone refractory prostate cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 pathway and increases paclitaxel sensitivity. *Anticancer Drugs*, 2015,26(2):160-166.
- [6] CHO KH, CHOI MJ, JEONG KJ, *et al.* A ROS/STAT3/HIF-1 α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion. *Prostate*, 2014,4(5):528-536.
- [7] YUAN X, DU J, HUA S, *et al.* Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on humanglioma cells. *Exp Cell Res*, 2015,330(2):267-276.
- [8] LIU C, LOU W, ARMSTRONG C, *et al.* Niclosamide suppresses cell migration and invasion in enzalutamide resistant prostate cancer cells via Stat3-AR axis inhibition. *Prostate*, 2015,75(13):1341-1353.
- [9] PALMIERI C, LEAN FZ, AKTER SH, *et al.* A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: histopathological findings and classification. *Res Vet Sci*, 2014,97(3):568-573.
- [10] CORVIN S, BOSCH ST, EDER I, *et al.* Videoimaging of prostatic stromal-cell contraction: an in vitro model for studying drug effects. *Prostate*, 1998,37(4):1209-1214.
- [11] JUNG SN, SHIN DS, KIM HN, *et al.* Sugirol inhibits STAT3 activity via regulation of transketolase and ROS-mediated ERK activation in DU145 prostate carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2015,97(1):38-50.
- [12] HOSSAIN DM, PAL SK, MOREIRA D, *et al.* TLR9-Targeted STAT3 silencing abrogates immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells from prostate cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2015,21(16):3771-3782.
- [13] ELKS CM, ZHAO P, GRANT RW, *et al.* Loss of oncostatin M signaling in adipocytes induces insulin resistance and adipose tissue inflammation *in vivo*. *J Biol Chem*, 2016,291(33):17066-17076.

(2017-06-05 收稿, 2017-09-28 修回)

编辑 汤 洁