

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.06.001

❖ 基础研究 ❖

SHP-2 调控 STAT3-PI3K-AKT 信号通路对 CNE-1 细胞生物学行为的影响及其相关机制

林琳, 钟烁

(唐山市开滦总医院耳鼻喉科, 河北 唐山 063000)

【摘要】目的: 探究 SHP-2 如何调控 STAT3-PI3K-AKT 信号通路对 CNE-1 细胞中的活化状态及其对肿瘤生物学行为的影响, 并进一步探讨其相关分子机制。**方法:** 采用 Western blot 检测 CNE-1 细胞中 SHP-2、STAT3、PI3K 的表达水平。设 CNE-1 组为空白组; 将空白慢病毒转染至 CNE-1 细胞后作为 NC-SHP-2 组; 将 si-SHP-2 病毒转染到 CNE-1 细胞后作为 si-SHP-2 组, 检测并比较各组 SHP-2、STAT3、p-STAT3、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的表达水平; 平板克隆检测细胞增殖活性; CCK-8 检测各组细胞活性; 细胞划痕检测各组细胞迁移; Transwell 检测各组细胞侵袭; 流式细胞术检测各组细胞凋亡; Western blot 检测凋亡相关蛋白 (Bax、Caspase-3 和 Bcl-2) 的表达水平。**结果:** SHP-2、STAT3、PI3K 在 CNE-1 细胞中均为高表达。与 NC-SHP-2 组比较, si-SHP-2 组细胞中的 p-STAT3、p-PI3K 和 p-AKT 表达显著下调 ($P < 0.05$), 细胞相对数量、增殖速率、迁移和侵袭速率均显著降低 ($P < 0.05$), 而细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。与 NC-SHP-2 组比较, si-SHP-2 组细胞 Bax 和 Caspase-3 的表达水平升高; Bcl-2 表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论:** SHP-2 在 CNE-1 细胞中高表达, SHP-2 与 STAT3-PI3K-AKT 通路的激活密切相关, 沉默 CNE-1 细胞中 SHP-2 的表达能有效降低鼻咽癌的发展。

【关键词】 鼻咽癌; SHP-2; STAT3-PI3K-AKT

【中图分类号】 R739.6 **【文献标志码】** A

Effects of SHP-2 regulation of STAT3-PI3K-AKT signaling pathway on biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells and its related mechanisms

LIN Lin, ZHONG Shuo

(Department of Otolaryngology, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To explore how SHP-2 affects the activation state of STAT3-PI3K-AKT signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma (CNE-1) cells and its influence on tumor biological behavior, and further explore the related molecular mechanisms. **Methods:** The expression levels of SHP-2, STAT3 and PI3K in CNE-1 cells were detected by Western blot. Set CNE-1 group as blank group, transfecting blank lentivirus into CNE-1 cells as NC-SHP-2 group. The si-SHP-2 virus was added to the CNE-1 cells for the si-SHP-2 group. The expression levels of SHP-2, STAT3, p-STAT3, PI3K, p-PI3K, AKT and p-AKT were detected and compared between the groups. Cell proliferation was detected by plate cloning. CCK-8 was used to detect cell activity. Cell migration was detected by cell scratches. Transwell was used to detect cell invasion. Flow cytometry was used to detect apoptosis. The expression of apoptosis-related proteins (Bax, Caspase-3 and Bcl-2) was detected by Western blot. **Results:** SHP-2, STAT3 and PI3K were highly expressed in CNE-1 cells ($P < 0.05$). Compared with the NC-SHP-2 group, the expression of P-STAT3, P-PI3K and P-Akt in si-SHP-2 group was down-regulated ($P < 0.05$), the relative cell number, proliferation rate, migration rate and invasion rate were decreased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). Compared with the NC-SHP-2 group, si-SHP-2 the expression of Bax and Caspase-3 in si-SHP-2 group increased, and the expression of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** SHP-2 is highly expressed in CNE-1 cells. SHP-2 is closely related to the activation of the STAT3-PI3K-AKT pathway. Silencing the expression of SHP-2 in CNE-1 cells can effectively reduce the development of nasopharyngeal carcinoma.

【Key words】 Nasopharyngeal carcinoma; SHP-2; STAT3-PI3K-AKT

鼻咽癌是东南亚 (尤其是中国南部) 的一种地方性癌症, 发病率可高达每年 20/100 000 人。在东南亚有头颈癌中, 鼻咽癌具有远处转移的高倾向。目前, 单独放疗 (RT) 和同步放化疗 (CCRT) 是鼻咽癌的主

基金项目: 河北省医学科学研究项目 (20240379)

作者简介: 林琳 (1983 -), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: linlinn0401@163.com

要治疗方法,但预后极差^[1]。因此,需寻找有助于生存预后的有效标志物,并将其作为治疗靶点。

含有 Src 同源区 2 (SH2) 的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP-2),由 ptpn11 基因编码,是一种非受体磷酸酪氨酸磷酸酶。SHP-2 确定为相应血小板衍生生长因子的主要磷酸化位点,其可被一些细胞因子和生长因子激活。Ptpn11 是第一个发现的编码酪氨酸磷酸酶的原癌基因,Ptpn11 相关的磷酸酶活性与细胞内信号活性的调节有关^[2]。研究^[3-5]表明,SHP-2 与多种癌症的进展有极大的相关性。SHP-2 可发生多种基因突变,部分位点的突变会导致肿瘤发生^[3],SHP-2 受生长因子、细胞因子和整合素受体的调控,参与细胞存活、增殖和迁移等过程^[4]。最近的蛋白质组学研究^[5]表明,SHP-2 影响多个底物,导致复杂的调节作用,包括正调控和负调控作用,并能保护磷酸化肽免受其他磷酸酶去磷酸化的作用。

SHP-2 可增强 JAK/STAT3 信号转导,还参与 PI3K 通路的激活和持续信号转导^[6]。STAT3-PI3K-AKT 信号通路已被证明在肿瘤发生的调节过程中发挥重要作用。在各类癌症类型(包括胃癌、神经胶质瘤和食管癌)中,STAT3 转录因子被激活以转位至细胞核,并通过激活下游癌基因如 Bax 和 Bcl-2 的转录来抑制细胞凋亡^[7]。PI3K/AKT 信号通路也参与多种细胞功能的调控。一旦激活,AKT 会磷酸化多种底物,从而促进细胞周期进程并抑制细胞凋亡^[8]。然而,SHP-2 在鼻咽癌中的作用尚未见报道。因此,本研究拟探讨 SHP-2 如何调控 STAT3-PI3K-AKT 信号通路对 CNE-1 细胞中的活化状态及其对肿瘤生物学行为的影响,并进一步探讨相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 鼻咽癌细胞(CNE-1)和人正常鼻咽细胞(NP69)均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂 胎牛血清、DMEM/F12 培养基、链霉素、青蒿素均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。吉姆沙染液购自 Biolegend 公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白试剂盒均购自武汉卡诺斯公司。SHP-2、STAT3、p-STAT3、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GAPDH 均购自广州柏赛柯公司;Annexin V/FITC 和 PI 细胞凋亡试剂盒均购自上海圣尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 所有细胞均用 DMEM/F12 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉

素溶液)在含有 5% CO₂ 的 37 °C 加湿培养箱中培养。将 si-SHP-2 病毒转染至 CNE-1 细胞中进行分组。CNE-1 组为空白组;NC-SHP-2 作为阴性对照组;si-SHP-2 组作为转染组。

1.2.2 平板克隆 待各组细胞在 6 孔板中的汇合度达到 80% 时,1 200 r/min 离心 5 min;重悬细胞沉淀,进行细胞计数,调整细胞浓度为 1.0×10^5 /mL,每组设置 3 个重复培养皿;取 200 μ L 细胞悬液接种平皿,补加细胞培养液至 6 mL;呈十字形晃动,使细胞分散均匀,放入 37 °C、5% CO₂ 孵化箱常规培养 2 周,弃去培养基;PBS 洗 3 次;每平皿加入 5 mL 甲醇固定 15 min,弃去固定液,每平皿加入吉姆沙染液染色 20 min,自来水冲洗,空气干燥;对每平皿拍照,存档,使用 Image J 软件进行细胞计数。

1.2.3 CCK-8 将各组细胞以 1×10^5 /mL 接种于 24 孔板上,向培养的细胞中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,处理 4 h。在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 下培养 48 h。酶标仪测量各孔在 450 nm 波长处的 OD 值。

1.2.4 细胞划痕实验 将各组细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔板上。在含 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 孵育 24 h。在细胞密度达到 70% 后,使用 200 μ L 无菌移液管进行划痕实验,将划痕尖端尽可能垂直于细胞进行划痕实验,确保各组划痕宽度基本相同。用 PBS 洗涤细胞两次,然后在 5% CO₂ 无血清培养基中孵育 24 h。分别在 0 h 和 24 h 拍照,测量愈合宽度。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 将各组细胞在无血清培养基中重悬,调整细胞浓度为 2×10^5 /mL。在 Transwell 的上室加入 100 μ L 的细胞悬液,在下室加入 600 μ L 的含血清的培养基 48 h。用棉签去除膜上表面未迁移的细胞,将膜下表面的细胞用多聚甲醛固定。清洗后,用结晶紫染色。洗涤和干燥后,在倒置显微镜下计数细胞。侵袭实验:用无血清培养基以 1:8 的比例稀释基质胶,包裹在转孔底部的膜上表面,在 37 °C 的培养箱中孵育 4 h,将基质胶聚合成凝胶供以后使用。剩下的过程与迁移实验相同。

1.2.6 流式细胞术 采用 Annexin V 和 PI 双染色法检测细胞凋亡情况。转染 24 h 后,收集细胞,1 000 \times g 离心 5 min。弃上清,加入预冷 PBS 1 mL,重悬细胞再离心,弃上清(此步骤重复 2 次)。再用去离子水按 1:3 稀释结合缓冲液,用 250 μ L 的溶液重悬细胞。调整细胞浓度至 1×10^6 /mL,将 100 μ L 的细胞悬液移入 5 mL 流式管中。然后,加入 An-

nexin V/FITC 溶液 5 mL 和 PI 溶液 10 mL。混合均匀后,在室温下无光孵育 15 min。最终的分析采用流式细胞仪进行。

1.2.7 Western blot CNE-1 细胞经 RIPA 裂解,并通过 BCA 蛋白试剂盒检测蛋白浓度,在 SDS-PAGE 上分离了等量的蛋白质样本,并被转移到 PVDF 膜上。随后,在 4 °C 下用一抗孵育过夜,次日洗膜后室温二抗孵育 30 min,加入 ECL 显色液,曝光,采用 ImageJ 软件分析灰度值。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad prism Software9.0 软件进行统计学分析。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 CNE-1 细胞中 SHP-2、STAT3、PI3K 表达情况

与 NP69 细胞相比,SH P-2、STAT3、PI3K 在 CNE-1 细胞中均为高表达($P < 0.05$)。见图 1。

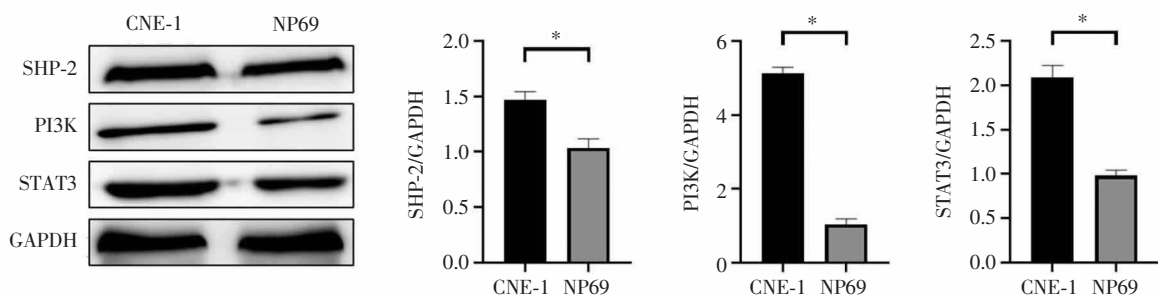


图 1 CNE-1 细胞中 SHP-2、STAT3、PI3K 的表达

* $P < 0.05$,与 NP69 细胞比较。

2.2 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞中 STAT3、PI3K、AKT 表达的影响

与 NC-SHP-2 组相比,si-SHP-2 组 STAT3、PI3K

和 AKT 的总蛋白表达量无统计学差异($P > 0.05$);但 p-STAT3、p-PI3K 和 p-AKT 均显著下调($P < 0.05$)。见图 2。

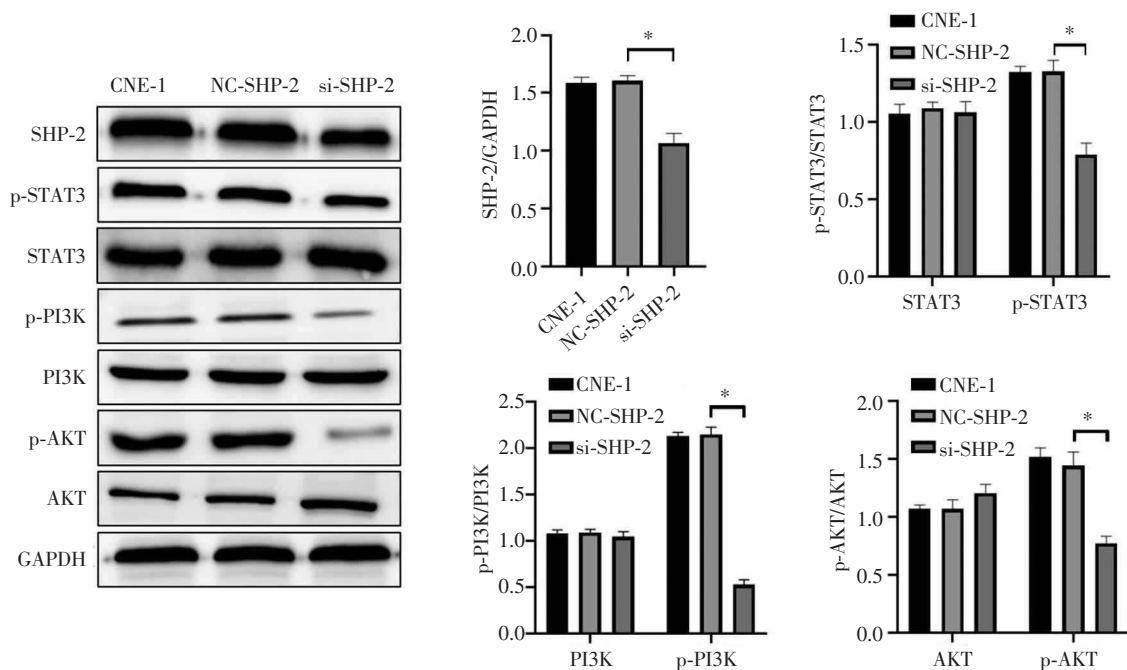


图 2 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞中 STAT3、PI3K、AKT 表达的影响

* $P < 0.05$,与 si-SHP-2 组比较。

2.3 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞增殖的影响

沉默 SHP-2 后,细胞相对数量、细胞的增殖速率均显著低于阴性对照组($P < 0.05$)。见图 3。

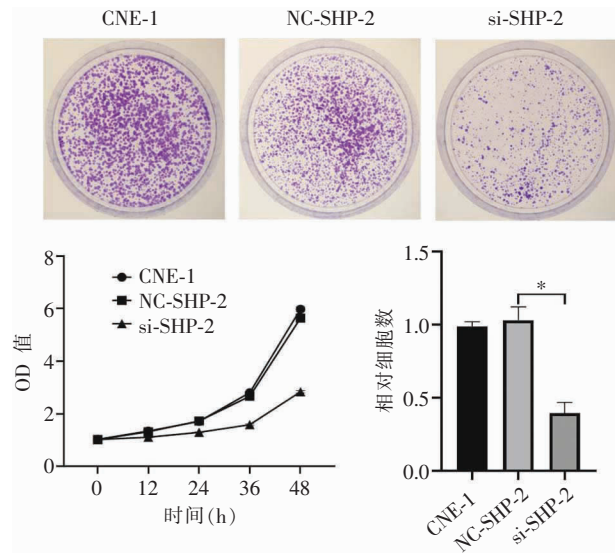


图 3 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞增殖的影响
* $P < 0.05$,与 si-SHP-2 组比较。

2.4 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞迁移和侵袭的影响

与 NC-SHP-2 组相比,si-SHP-2 组的迁移和侵袭速率均显著降低($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞凋亡的影响

与 NC-SHP-2 组相比,si-SHP-2 组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。此外,沉默 SHP-2 上调了 Bax 和 Caspase-3 的表达水平,并下调了 Bcl-2 的表达水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

鼻咽癌是一种起源于鼻咽上皮的上皮癌。鼻咽癌可细分为三种组织学亚型,即角化性鳞状细胞癌、非角化(分化或未分化)癌和基底样癌^[9]。鼻咽癌被认为是由 EB 病毒(EBV)感染、遗传学和环境因素(如饮酒和吸烟)相互作用引起^[10]。虽然单独放疗可以治愈大约 90% 的早期疾病患者,但由于鼻咽癌的隐匿性和侵袭性,大于 70% 的鼻咽癌患者在首次诊断时患有局部晚期或转移性疾病^[11]。综合放化疗后,20~30% 的晚期鼻咽癌患者因复发和/或转移(R/M)而致无法治愈^[12]。因此,寻找能有效治疗鼻咽癌的靶点是必要的。本研究发现在 CNE-1 细胞中 SHP-2、STAT3 和 PI3K 的表达量均显著高于正常鼻咽细胞。

SHP-2 是受体酪氨酸激酶(RTK)信号传导的阳性效应子,SHP-2 可以通过抑制 RTK 的磷酸化来促进 Src 的磷酸化。Src 激酶家族(SFKs)是最大的非受体蛋白激酶家族,SFKs 家族有 Blk、Fgr、Fyn、Hck、Lck、Lyn、Src、Yes 和 Yrk。Src、Fyn 和 Yes 在大多数组织中表达,而其他成员则在特定的细胞系中选择性表达^[13]。SFKs 是由各种膜受体引发的信号级联通路的重要组成部分。SFKs 是许多细胞活动所必需的,包括增殖、分化、运动和粘附。SHP-2 受生长因子、细胞因子和整合素受体的调控,参与细胞存活、增殖和迁移等细胞过程。SHP-2 在调节生长因子、

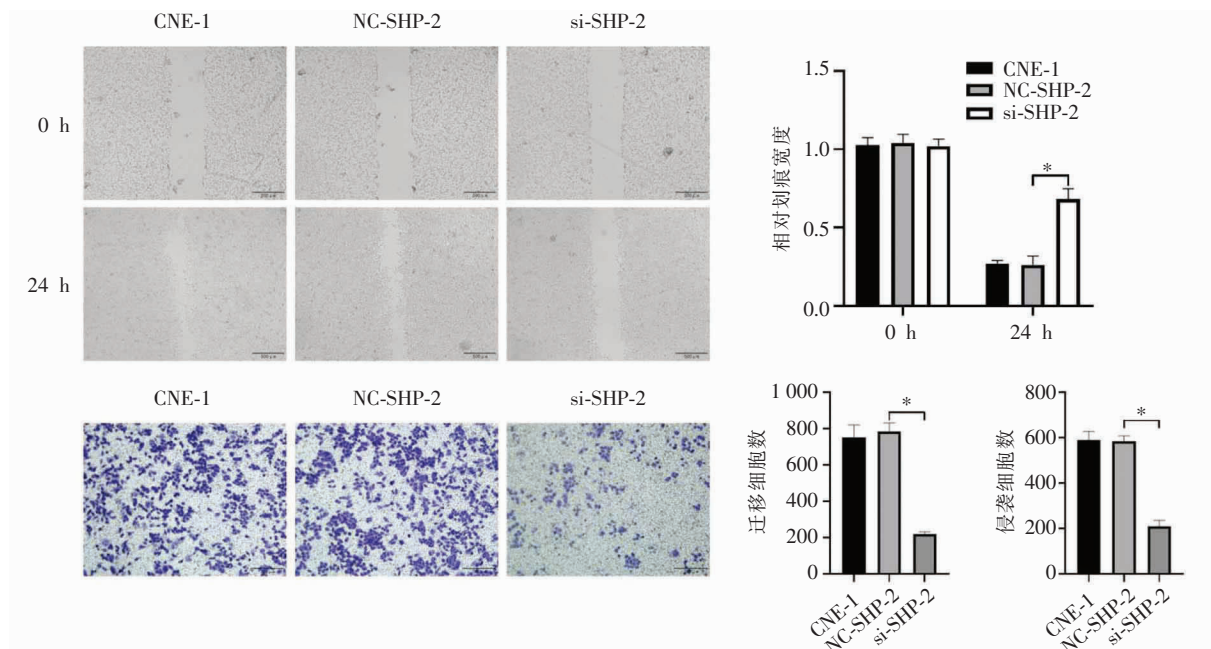


图 4 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞迁移和侵袭的影响
* $P < 0.05$,与 si-SHP-2 组比较。

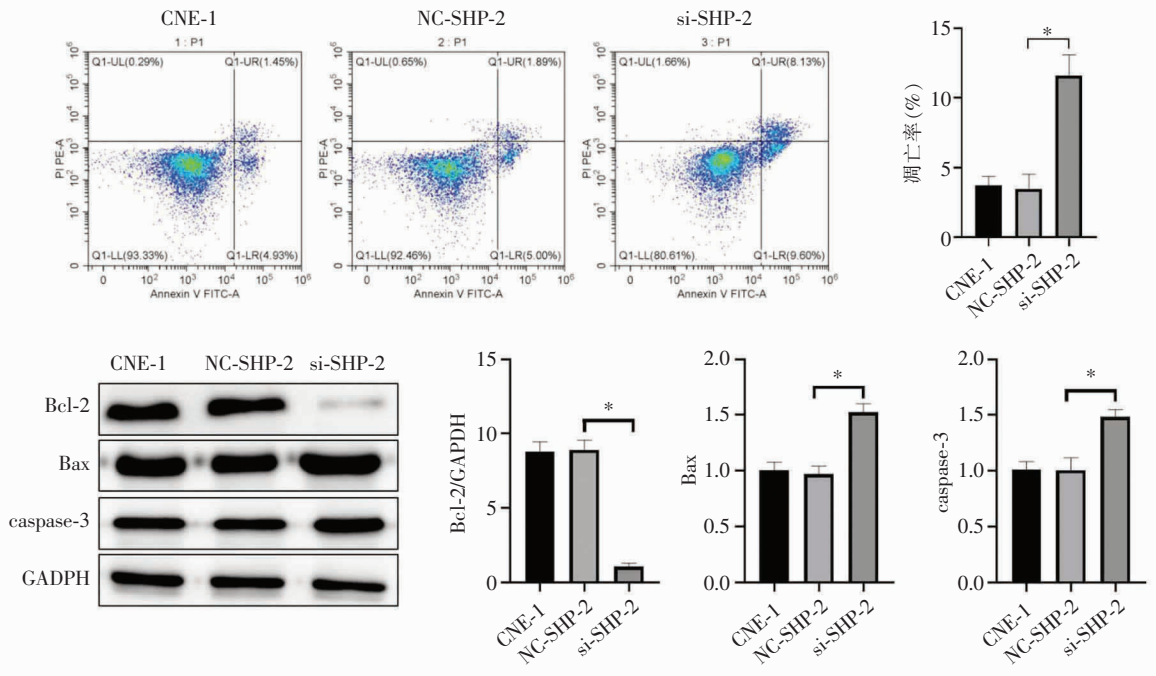


图5 SHP-2 沉默对 CNE-1 细胞凋亡的影响

* $P < 0.05$, 与 si-SHP-2 组比较。

激素、细胞因子和细胞粘附分子中至关重要。它是控制发育过程和造血功能的信号转导途径的关键组成部分^[14]。在本研究中,沉默 SHP-2 的表达可以显著抑制 CNE-1 细胞的增殖。此外,SH-2 也分布到线粒体嵴间隙/膜间隙。线粒体是高度动态的细胞器,在细胞中发挥多种作用,包括能量产生、中间代谢、凋亡和维持细胞质钙稳态。线粒体功能障碍与一系列广泛的人类疾病有关。线粒体中新型 SHP-2 底物的鉴定不仅揭示了 SHP-2 调节线粒体功能和线粒体依赖性细胞活动的分子机制,还将揭示该磷酸酶的疾病突变如何通过改变与这些底物的功能相互作用来改变线粒体代谢和细胞功能。此外,已知 SHP-2 可影响细胞迁移和侵袭性,这是癌症转移的关键步骤。高亚楠^[15]的研究发现抑制 SHP-2 的表达能有效抑制肺癌细胞的增殖和侵袭,并且引起细胞周期阻滞和细胞凋亡。本研究发现沉默 SHP-2 后,CNE-1 细胞的迁移和侵袭的能力均降低,且细胞凋亡增加。

越来越多的证据^[16-18]表明 SHP-2 的活性与细胞转化和癌症发展有关,它参与调节许多癌症相关信号通路。SH-2 调节致癌性 RTK 下游的信号转导,在胃癌、间变性大细胞淋巴瘤和乳腺癌中高度激活,并介导 EGFR 和 KRAS 驱动的癌症的致癌信号^[16-17]。SH-2 还可调节转录因子 YAP/TAZ 的活性,揭示磷酸酶在细胞核中的独特作用,SH-2 和

YAP 的核共定位与非小细胞肺癌患者生存率低相关^[18],这提示 SHP-2/YAP 轴的促癌功能。本研究发现沉默 SHP-2 抑制了 CNE-1 细胞中 STAT3-PI3K-AKT 通路的激活。STAT3-PI3K-AKT 通路与癌细胞的增殖和迁移密切相关。除此以外,SH-2 还可能通过发生突变^[19]、影响癌症微环境(如肿瘤相关巨噬细胞)^[20]等多种方式影响癌症的发展。

综上,SH-2 在 CNE-1 细胞中高表达。SH-2 与 STAT3-PI3K-AKT 通路的激活密切相关。沉默 SH-2 的表达能有效降低 CNE-1 细胞的发展。

参考文献

- [1] 李刚,高天生,黎骋,等. CCT 亚基 γ 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. 川北医学院学报,2021,36(11):1415-1419.
- [2] Feng GS, Hui CC, Pawson T. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases [J]. Science, 1993, 259(5101):1607-1611.
- [3] Chan G, Kalaitzidis D, Neel BG. The tyrosine phosphatase Shp2 (PT-PN1) in cancer [J]. Cancer Metastasis Reviews, 2008, 27(2): 179-192.
- [4] 石鑫,张敬坡,陈虎,等. WNK2 通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路延缓肝细胞癌的增殖和侵袭[J]. 中国实验动物学杂志,2024,32(2):210-218.
- [5] Zhu P, Wu X, Zhang RY, et al. An integrated proteomic strategy to identify SHP2 substrates [J]. Journal of Proteome Research, 2022, 21(10):2515-2525.

(下转第 736 页)