

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.09.003

· 基础研究 ·

# JAK2-STAT3通路介导牙龈卟啉单胞菌促结肠癌Caco-2细胞增殖的研究

张若彤<sup>1</sup>, 刘晓晨<sup>2</sup>, 叶玮<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔预防科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海(200011); 2. 辽宁中医药大学附属第三医院消化内科, 辽宁 沈阳(110003)

**【摘要】** 目的 研究牙周致病菌—牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*)对人结肠癌Caco-2细胞增殖和炎症因子表达的影响, 及JAK2-STAT3通路是否参与*P.g*对Caco-2细胞增殖的调控, 为进一步探讨*P.g*与结肠癌之间的关系提供实验依据。方法 体外培养Caco-2细胞, 选择不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的*P.g*(0、1、10、25)刺激12、24、48 h, CCK8检测*P.g*对Caco-2细胞增殖的影响。设置刺激时间分别为12、24、48 h, MOI=0为对照组, MOI=1、10、25为实验组。qRT-PCR、Western blot检测各组白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、信号转导与转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、蛋白酪氨酸激酶2(janus kinase 2, JAK2)基因和蛋白/磷酸化蛋白表达情况。结果 *P.g*感染Caco-2细胞后, 与对照组(MOI=0)相比, MOI=1和MOI=10时, *P.g*在12、24、48 h时对Caco-2细胞有持续刺激作用。与对照组相比, *P.g*感染Caco-2细胞中促炎因子IL-6及相关增殖通路因子STAT3、JAK2 mRNA表达及IL-6、p-STAT3、p-JAK2蛋白表达增加, 且具有浓度和时间依赖性( $P < 0.05$ )。同时, *P.g*感染Caco-2细胞中抑炎因子IL-10的mRNA及蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。添加JAK2抑制剂AZ960后, *P.g*感染Caco-2细胞的增殖减弱, STAT3、JAK2 mRNA表达及p-STAT3、p-JAK2蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。结论 *P.g*可促进结肠癌细胞系Caco-2的增殖, 并且*P.g*作用于Caco-2细胞后可能通过JAK2-STAT3通路促进细胞增殖, 同时促进促炎因子IL-6、抑制抑炎因子IL-10的表达, 为细胞营造利于增殖的炎性环境, 这可能是*P.g*影响Caco-2细胞增殖的机制之一。

**【关键词】** 牙周炎; 牙龈卟啉单胞菌; 结肠癌细胞; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10; 蛋白酪氨酸激酶2; 信号转导与转录激活因子3

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)09-0625-09

**【引用著录格式】** 张若彤, 刘晓晨, 叶玮. JAK2-STAT3通路介导牙龈卟啉单胞菌促结肠癌Caco-2细胞增殖的研究[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(9): 625-633. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.09.003.

***Porphyromonas gingivalis* enhances the proliferation of colorectal cancer Caco-2 cells via the JAK2-STAT3 pathway** ZHANG Ruotong<sup>1</sup>, LIU Xiaochen<sup>2</sup>, YE Wei<sup>1</sup>. 1. Department of Preventive Dentistry, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology; Shanghai 200011, China; 2. Department of Gastroenterology, The Third Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110003, China

Corresponding author: YE Wei, Email: jyywei@163.com, Tel: 86-21-53315327

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of pathogenic bacterium-*Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) on the pro-



微信公众号

**【收稿日期】** 2023-01-08; **【修回日期】** 2023-02-28

**【基金项目】** 上海市科委港澳台科技合作项目(22410760200); 上海市口腔疾病临床医学研究中心(19MC1910600); 上海市临床重点专科项目(shslczdk01601); 上海市重中之重研究中心项目(2022ZZ01017)

**【作者简介】** 张若彤, 硕士研究生, Email: Ruotz@outlook.com

**【通信作者】** 叶玮, 副主任医师, 博士, Email: jyywei@163.com, Tel: 86-21-53315327

liferation and inflammatory factor expression of human colorectal cancer Caco-2 cells, to determine whether the Janus kinase 2-signal transducers and activators of transcription 3 (JAK2-STAT3) pathway is involved in the regulation of Caco-2 cell proliferation by *P.g* and to provide an experimental basis for further exploring the relationship between *P.g* and colorectal cancer. **Methods** Caco-2 cells were cultured *in vitro*, and *P.g* at different multiplicities of infection (MOIs) (0, 1, 10, 25) was selected to stimulate for 12, 24 and 48 h. The effect of *P.g* on the proliferation of Caco-2 cells was detected by CCK8. The stimulation time was set as 12, 24 and 48 h. MOI=0 was the control group, and MOI=1, 10 and 25 comprised the experimental group. qRT-PCR and Western blot were used to detect the changes in interleukin-6 (IL-6), interleukin-10(IL-10), JAK2 and STAT3 gene and protein (phosphorylated protein) levels in each group. **Results** After *P.g* infection of Caco-2 cells, *P.g* had a sustained stimulatory effect on the cells for 12, 24 and 48 h at MOI=1 and MOI=10 compared with the control group. Compared with that in the control group, the expression of pro-inflammatory factor IL-6 and related proliferative pathway protein JAK2 and STAT3 in Caco-2 cells with *P.g* infection increased in a concentration- and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Additionally, the expression of IL-10, an anti-inflammatory factor, in Caco-2 cells infected with *P.g* decreased ( $P < 0.05$ ). After the addition of the JAK2 inhibitor AZ960, the proliferation of Caco-2 cells infected with *P.g* decreased, and the mRNA expression of STAT3 and JAK2 and the protein expression of p-STAT3 and p-JAK2 decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *P.g* can promote the proliferation of the colorectal cancer cell line Caco-2, and the effect of *P.g* on Caco-2 cells may promote cell proliferation through the JAK2-STAT3 pathway while promoting the expression of the proinflammatory factor IL-6 and inhibiting the expression of the anti-inflammatory factor IL-10, creating an inflammatory environment conducive to cell proliferation, which may be the mechanism by which *P.g* affects the proliferation of Caco-2 cells.

**【Key words】** periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; colorectal cancer cells; interleukin-6; interleukin-10; janus kinase 2; signal transducers and activators of transcription 3

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(9): 625-633.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Shanghai Science and Technology Commission Hong Kong, Macao and Taiwan Science and Technology Cooperation Project (No. 22410760200); Shanghai Clinical Medical Research Center for Oral Diseases (No. 19MC1910600); Shanghai Key Clinical Specialties (No. shslczdk01601); Shanghai Research Center of Great Importance (No. 2022ZZ01017).

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*)是革兰氏阴性厌氧菌,是牙周病中研究最多、最重要的致病菌之一<sup>[1]</sup>。有研究表明,*P.g*可以从口腔转移到肠道,结肠黏膜的厌氧和高pH环境亦有利于*P.g*的黏附<sup>[2]</sup>。同时,*P.g*可分泌多种蛋白酶毒力因子破坏结肠表面的黏液层,从而直接接触肠上皮并可能引发多种肠道疾病如炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)<sup>[3]</sup>、结肠癌(colorectal cancer, CRC)<sup>[4]</sup>等。目前,已有越来越多研究证明*P.g*可以定植于结肠癌组织内,通过招募髓系免疫细胞,为结直肠癌细胞营造一个富集髓系细胞的促炎肿瘤微环境<sup>[4]</sup>,但*P.g*对肿瘤细胞本身的作用鲜有研究和报道。慢性炎症在促肿瘤生长的过程中发挥重要作用,虽然目前已经明确单独的细胞增殖不会引起恶性肿瘤的发生,但是在炎症因子、生长基质都非常丰富的环境下,DNA损伤促进剂存在的环境下持续的细胞增殖可能会提升肿瘤发生

的风险<sup>[5]</sup>。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。IL-10是一种广泛表达的抗炎因子,对肿瘤的生长有一定的抑制效果<sup>[6]</sup>。IL-6是一种常见且多变的炎症细胞因子,常在组织损伤或感染时分泌增加,它不仅在机体免疫和炎症反应中具有核心作用,而且还被认为是恶性肿瘤的关键生长因子<sup>[7]</sup>。信号转导与转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)是负责诱导细胞周期蛋白的关键信号分子之一<sup>[8]</sup>,过度激活STAT3可以直接通过肿瘤自主机制或间接通过调节肿瘤相关基质和免疫系统的抗肿瘤反应来促进肿瘤生长。STAT3可以通过多种通路被调节,蛋白酪氨酸激酶2(janus kinase 2, JAK2)-STAT3信号通路是目前发现的参与STAT3表达的最重要通路之一,JAK2-STAT3信号通路在许多类型的癌症中都表现出异常高活化<sup>[9]</sup>。本实

验采用梯度细菌感染复数(multiplicity of infection, MOI)的 *P.g* 对人结肠癌细胞(Caco-2)进行不同时间的刺激,观察Caco-2中促炎因子IL-6和抑炎因子IL-10的表达水平变化,并深入探讨增殖通路JAK2-STAT3在结肠癌细胞增殖中的作用及机制,为进一步探讨 *P.g* 与结肠癌之间的关系提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Caco-2 细胞系 SCSP-5027(中科院细胞库,中国); *P.gingivalis* ATCC33277(中科院细菌库,中国);CCK8 试剂盒(Biosharp公司,中国);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Scientific公司,美国);Trizol(Ambion公司,美国);Fast-KingcDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生物有限公司,中国);SuperRealPreMix Plus(SYBR Green)(北京天根生物有限公司,中国);兔抗人IL-6(Abmart公司,中国);IL-10(Abmart公司,中国);p-JAK2(Abmart公司,中国);p-STAT3(Abmart公司,中国);鼠抗 $\beta$ -actin(millipore公司,美国);10%胎牛血清(Gibco公司,美国);DMEM 高糖培养基(cytiva公司,美国);青霉素、链霉素(Gibco公司,美国);胰酶(Gibco公司,美国);BHI 培养基(Sigma公司,美国);氯化血红素(国药集团化学试剂有限公司,中国);无菌脱纤维羊血(Solarbio公司,中国);维生素K1(天津药业集团,中国);琼脂(Sigma公司,美国)。

### 1.2 细胞培养

从液氮容器中取出细胞冻存管,立即放入37℃水浴锅中,并不时摇动使其迅速融化。待冻存液完全融化,将细胞悬液转移至灭菌离心管中,常温离心,1 000 rpm 离心 5 min,弃去上清液,加入适量含 20%胎牛血清的高糖DMEM 培养液重悬细胞,并转移至细胞培养皿中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养。次日更换1次培养液,继续培养。待复苏后的细胞状态稳定并生长至70%~80%融合后传代培养。待细胞长至对数生长期时收集细胞,计数并调整细胞悬液浓度备用。

### 1.3 *P.g* ATCC33277 培养

将冻存细菌从-80℃冰箱取出,手心温度融化,接种于脑心浸液琼脂培养基上,培养基含5%脱纤维羊血、1%氯化血红素和0.1%维生素K1。晾干后放至厌氧盒,37℃厌氧培养3~5 d。3~5 d后传代至新的固体培养基。液体增菌时,离心管中加5~6 mL液体培养基。从固体培养基刮取适量菌

体入液体培养基,吹匀,拧紧离心管后再拧松半圈。放回厌氧盒,培养16~24 h备用。

### 1.4 细菌与细胞共培养模型构建

Caco-2 细胞长至70%~80%融合后,消化收集细胞,重悬于新鲜培养基后根据实验目的接种于不同规格细胞培养皿(1皿用于细胞计数,剩余用于实验)中。接种完成后,待细胞贴壁24 h后,消化计数,计算每皿总细胞数。*P.g* 液体增菌16~24 h后,吸取适量细菌悬液,5 000 rpm,离心10 min后,PBS洗涤1次,重悬于细胞完全培养基。设置刺激时间分别为12、24、48 h,MOI=0为对照组,MOI=1、10、25为实验组。使用紫外分光光度计在OD<sub>600</sub>测量细菌浓度,根据实验设置MOI数值稀释细菌至合适浓度并加入至准备好的细胞培养皿中。

### 1.5 CCK8法检测Caco-2增殖情况

Caco-2 细胞培养至70%~80%后,消化收集细胞,细胞计数并调整细胞浓度为5×10<sup>4</sup>个/mL,96孔板每孔加入100 μL调整后的细胞悬液。贴壁24 h后,消化3个孔进行计数并计算平均值,代表每孔实际细胞数。设置刺激时间分别为12、24、48 h,MOI=0为对照组,MOI=1、10、25为实验组。按照组别设定依次向各孔加入相应的细菌悬液,12、24、48 h后,更换含有1%抗生素的培养基孵育1 h后,再更换含有10 μL的CCK8试剂的完全培养基110 μL,37℃避光孵育1 h,酶标仪450 nm检测各孔吸光值,每个条件重复5个孔。对照组细胞数设置为100%,以实验组与对照组OD<sub>450</sub>平均值的比值百分数表示实验组相对对照组的细胞数量增殖百分比。

### 1.6 qRT-PCR检测*P.g*梯度感染Caco-2细胞后IL-6、IL-10、JAK2、STAT3 mRNA表达

从MOI梯度和刺激时间梯度两个维度进行检测,首先设置MOI=0为对照组,MOI=1、10、25,刺激时间为24 h为实验组,检测MOI梯度下相关蛋白表达变化情况;接着设置MOI=0为对照组,MOI=10、刺激时间为12、24、48 h为实验组,检测时间梯度下相关蛋白表达变化情况。检测*P.g*梯度感染Caco-2细胞后,不同时间炎症因子IL-6、IL-10、JAK2、STAT3 mRNA表达情况。采用TRIzol试剂提取细胞中总RNA,置于-80℃冰箱保存备用。根据反转录试剂盒说明书进行反转录,反应体系为10 μL,并将得到的cDNA保存于-20℃冰箱保存备用。引物序列见表1。按照试剂盒说明书进行操作,反应体系为20 μL。样品以 $\beta$ -actin为内参基

表1 PCR引物序列  
Table 1 PCR primer sequences

Gene	Primer sequences (5'-3')
IL-6	F: GACAGCCACTCACCTCTTCAGAAC R: TCGTATGATGGCTCTGAAAGAAGGC
IL-10	F: GGGTTGCCAAGCCTTGCTGAG R: CCTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCTC
JAK2	F: CCAAAGTGGGCAGAATTAGCAAACC R: TCGTATGATGGCTCTGAAAGAAGGC
STAT3	F: CACCAAGCGAGGACTGAGCATC R: AGCCAGACCCAGAAGGAGAAGC
$\beta$ -actin	F: CTCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTACCTTACCCTTCC

IL-6: interleukin-6. IL-10: interleukin-10. JAK2: janus kinase 2. STAT3: signal transducers and activators of transcription 3

因,设置主副孔,每个条件重复至少5次。反应条件为95℃ 3 min 预变性,95℃ 10 s 变性,57℃ 20 s 退火,72℃ 20 s 延伸,共45个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量分析法计算基因相对表达变化。

### 1.7 Western blot 检测 *P.g* 梯度感染 Caco-2 细胞后 IL-6、IL-10、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达

设置 MOI=0 为对照组, MOI=10、刺激时间为 12、24、48 h 为实验组,检测时间梯度下相关蛋白表达变化情况。将需要抽提蛋白的细胞取出,吸去培养液, PBS 洗涤 3 遍,尽量吸干 PBS。按照每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 Ripa 裂解液(裂解液中预先按照 1:1 000 的比例混匀蛋白酶抑制剂和磷酸化蛋白酶抑制剂) 100  $\mu$ L,冰上放置 15~20 min 充分裂解细胞。用细胞刮收集细胞于离心管中, 14 000 rpm 离心 40~45 min,取上清,用 BCA 试剂盒测定样品的蛋白浓度。稀释样品,按照每孔上样量为 30  $\mu$ L 蛋白分装样品并加入缓冲液 95℃ 10 min 处理样品使蛋白变性。将样品进行 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。分别加入稀释好的抗体: IL-6、IL-10、p-JAK2、p-STAT3 和  $\beta$ -actin, 4℃ 摇床孵育过夜(至少 18 h)。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。按照 1:3 000 稀释 HRP 标记的抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h 后, TBST 同前洗膜 4 次,每次 7 min。蛋白电泳条带显影,使用 Image J 软件对条带进行灰度值定量分析。以  $\beta$ -actin 条带做为内参,用目的条带与  $\beta$ -actin 条带的灰度值比例反映目的蛋白的表达水平。

### 1.8 检测 JAK2 抑制剂 AZ960 对 *P.g* 感染 Caco-2 细胞的影响

加入 JAK2 抑制剂 AZ960,检测感染 *P.g* Caco-2

细胞增殖情况,以及 JAK2、STAT3 mRNA, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达。CCK8 实验中,设置加入细菌(MOI=10,  $t = 12、24、48$  h)、不加 AZ960 为对照组,同时加入细菌(MOI=10,  $t = 12、24、48$  h)和 AZ960 为实验组,实验方法同 1.5。qRT-PCR 和 Western blot 中,设置不加细菌和 AZ960 为阴性对照组,加细菌(MOI=10,  $t = 24$  h)、不加 AZ960 为阳性对照组,同时加入细菌(MOI=10,  $t = 24$  h)和 AZ960 为实验组。实验方法同 1.6、1.7。

### 1.9 统计学处理

应用统计学软件 SPSS (version 23.0, IBM, USA) 进行统计学分析,采用 Graphpad Prism5 作图。对于计量资料数据采用独立样本  $t$  检验,方差不齐的数据采用近似  $t$  检验;多组比较采用方差分析; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *P.g* 对 Caco-2 细胞形态学影响

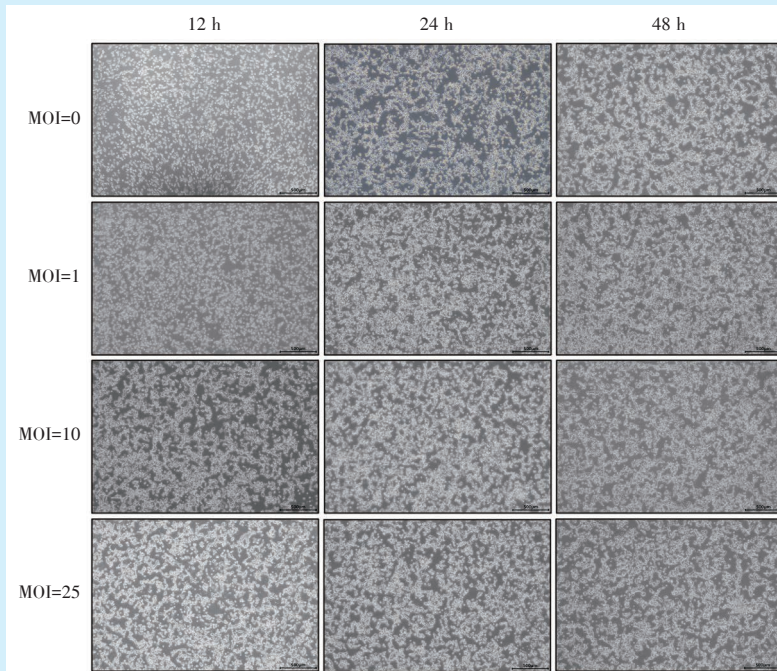
将常规培养的结肠癌 Caco-2 细胞置于倒置显微镜下观察细胞状态。MOI=0,培养时间为 12、24、48 h 时,细胞生长状态良好,多数细胞呈梭形分枝状。MOI=1、10 时,细胞状态良好,同时间段相较对照组贴壁细胞增多;MOI 增大至 25 时,随着刺激时间延长至 24 h 和 48 h,少量细胞有飘起现象,但整体细胞状态尚可(图 1)。综上,*P.g* 感染结肠癌 Caco-2 细胞的模型构建成功,细胞的良好生长状态为后续实验的稳定性建立基础。

### 2.2 CCK8 检测 *P.g* 对 Caco-2 增殖的影响

*P.g* 梯度感染 Caco-2 细胞的结果显示,当 MOI 为 1 和 10 时,作用时间 12 h、24 h 后,*P.g* 对 Caco-2 细胞表现出持续促进增殖的作用( $P < 0.05$ ),其中 MOI 为 10 时,*P.g* 对 Caco-2 细胞刺激作用最为明显;感染 48 h,*P.g* 对 Caco-2 细胞依然表现出持续促进增殖的作用,但增殖差异不显著( $P=0.176$ )。当 MOI 增大至为 25 时,*P.g* 对 Caco-2 细胞在 12 h 时表现为促进生长作用,随着刺激时间延长至 48 h, Caco-2 细胞增殖被抑制(图 2)。

### 2.3 *P.g* 感染 Caco-2 细胞后 IL-6 和 IL-10 表达

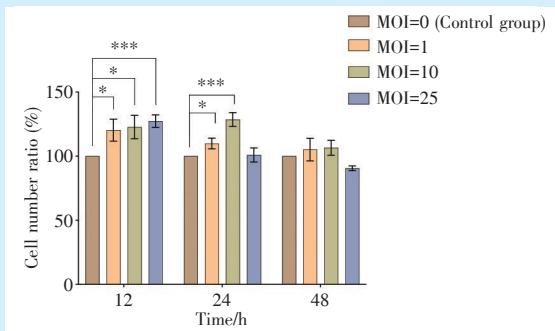
qRT-PCR 实验结果显示,当刺激时间为 24 h,与对照组(MOI=0)相比,随着 MOI 从 1 增加到 10 再到 25 时,IL-6 的 mRNA 水平先升高再降低,并在 MOI 为 10 时上升至最高( $P < 0.001$ );而 IL-10 的 mRNA 水平与 IL-6 相比则呈现相反趋势;当 MOI 为 25 时,IL-6 和 IL-10 的 mRNA 水平相较于对照组均



MOI: multiplicity of infection. *P.g*: *Porphyromonas gingivalis*

Figure 1 Morphological observation of Caco-2 colorectal cancer cells stimulated by *P.g* at different MOIs (x40)

图1 不同MOI牙龈卟啉单胞菌刺激下结肠癌Caco-2细胞形态观察(x40)



\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . MOI: multiplicity of infection. Cell number ratio:  $OD_{450} \text{ experimental group} / OD_{450} \text{ control group} \times 100\%$  (control group: set up to 100%). *P.g*: *Porphyromonas gingivalis*

Figure 2 Effect of *P.g* on the proliferation of Caco-2 cells by CCK8 assay

图2 *P.g*对Caco-2细胞增殖的影响

降低(图3a、3b)。

随后检测不同感染时间IL-6和IL-10表达变化,当MOI为10时,与对照组(MOI=0)相比,IL-6的mRNA水平在刺激时间为24h时达到最高( $P < 0.01$ );而IL-10的mRNA水平与IL-6呈现相反趋势,在刺激时间为24h时显著低于对照组(图3c、3d)( $P < 0.05$ )。

Western blot实验结果显示,当MOI为10时,与对照组(MOI=0)相比,IL-6的蛋白表达水平在刺激时间为24h时达到最高( $P < 0.05$ );而IL-10蛋白表达水平与IL-6呈现相反趋势,在刺激时间为24h时开始显著低于对照组( $P < 0.01$ )(图3e、3f)。

#### 2.4 *P.g*感染Caco-2细胞后JAK2、STAT3表达

qRT-PCR实验结果显示,刺激时间为24h时,与对照组(MOI=0)相比,随着MOI从1增加到10再到25,*P.g*刺激后的Caco-2细胞相比对照组JAK2

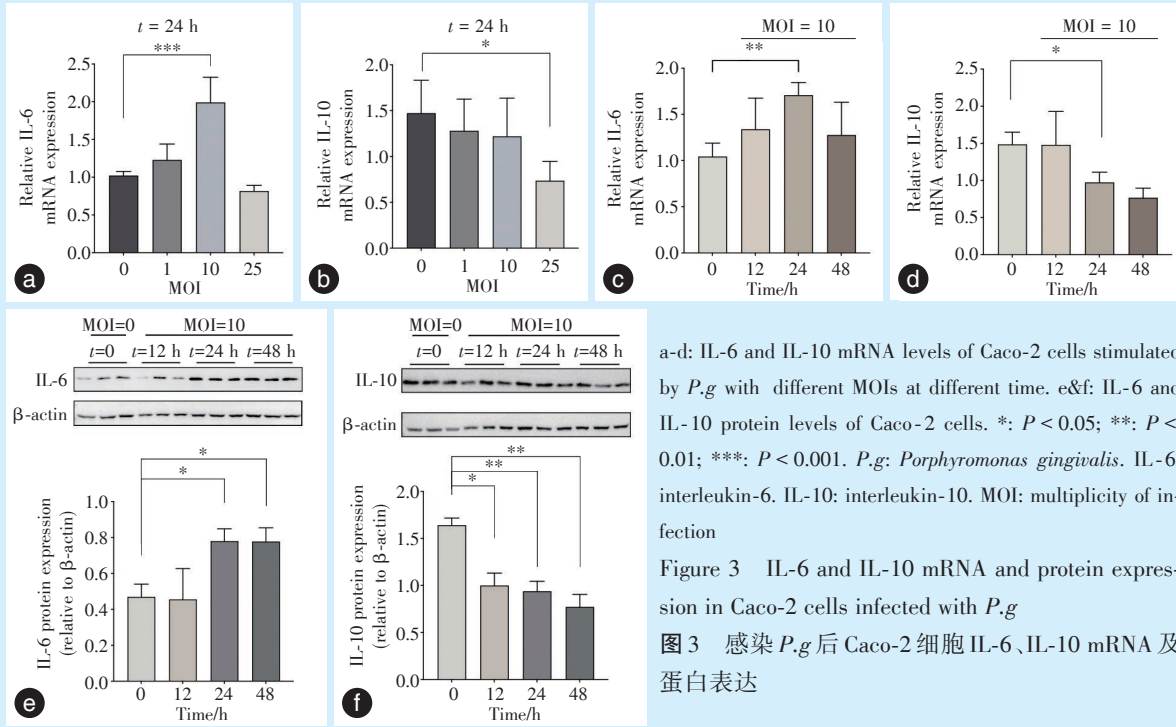
和STAT3的mRNA表达水平先增高后降低,并在MOI为10时达到最高( $P < 0.05$ );此后随着MOI的增大,*P.g*对细胞增殖呈现抑制状态,JAK2和STAT3 mRNA水平下降(图4a、4b)。

MOI为10的情况下,随着刺激时间的增加,JAK2和STAT3 mRNA水平在24h达到最高后下降,但水平仍然高于对照组(图4c、4d)。

Western blot实验结果显示,与对照组(MOI=0)相比,当MOI为10时,随着刺激时间的增加,Caco-2细胞p-JAK2、p-STAT3蛋白表达量逐渐增高,并在刺激时间为24h时达到最高;48h后p-JAK2、p-STAT3蛋白表达量开始降低,但仍高于对照组(图4e、4f)。

#### 2.5 JAK2抑制剂AZ960对*P.g*感染Caco-2细胞的影响

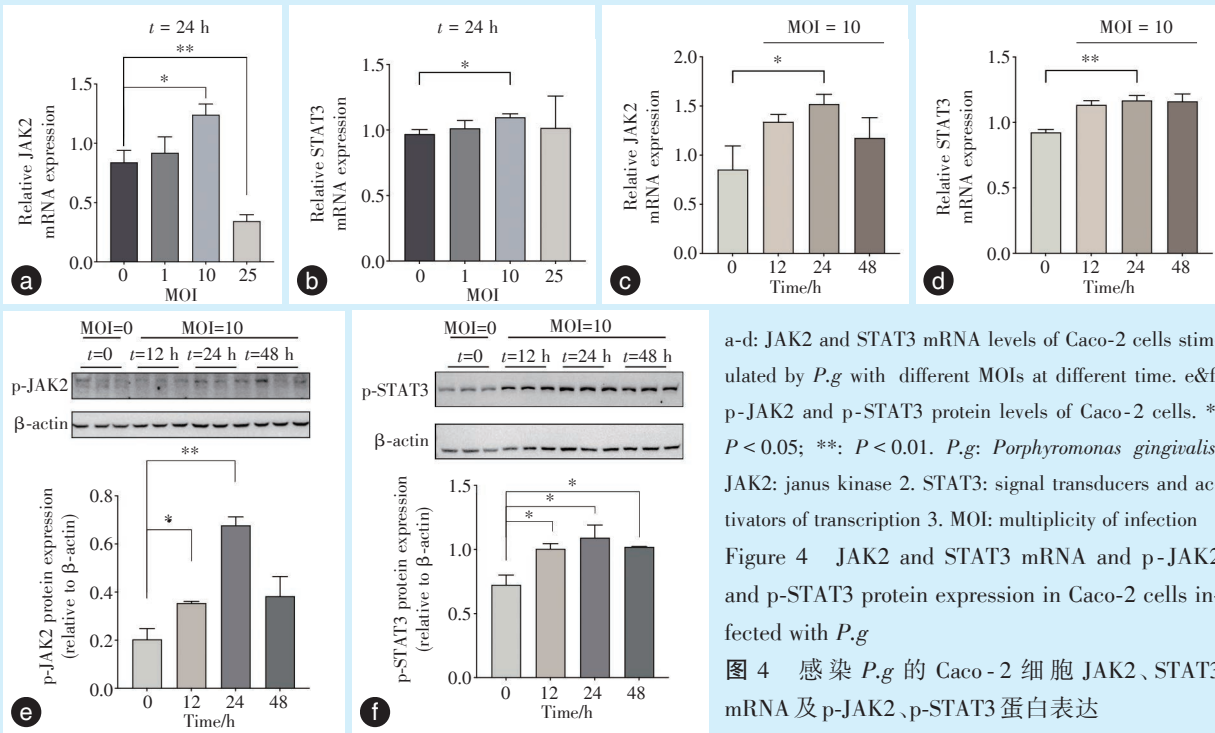
添加JAK2抑制剂AZ960后,MOI为10时,与未



a-d: IL-6 and IL-10 mRNA levels of Caco-2 cells stimulated by *P.g* with different MOIs at different time. e&f: IL-6 and IL-10 protein levels of Caco-2 cells. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . *P.g*: *Porphyromonas gingivalis*. IL-6: interleukin-6. IL-10: interleukin-10. MOI: multiplicity of infection

Figure 3 IL-6 and IL-10 mRNA and protein expression in Caco-2 cells infected with *P.g*

图3 感染 *P.g* 后 Caco-2 细胞 IL-6、IL-10 mRNA 及蛋白表达



a-d: JAK2 and STAT3 mRNA levels of Caco-2 cells stimulated by *P.g* with different MOIs at different time. e&f: p-JAK2 and p-STAT3 protein levels of Caco-2 cells. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . *P.g*: *Porphyromonas gingivalis*. JAK2: janus kinase 2. STAT3: signal transducers and activators of transcription 3. MOI: multiplicity of infection

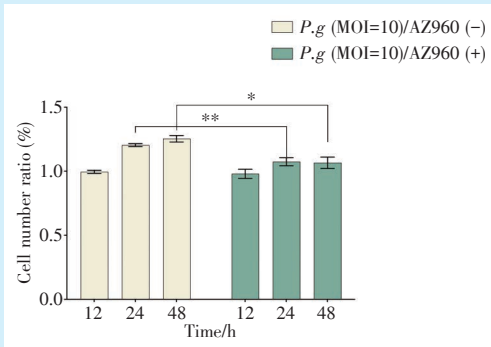
Figure 4 JAK2 and STAT3 mRNA and p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in Caco-2 cells infected with *P.g*

图4 感染 *P.g* 的 Caco-2 细胞 JAK2、STAT3 mRNA 及 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达

添加抑制剂时相比, *P.g* 对 Caco-2 细胞增殖促进作用减弱, 差异具有统计学意义 (图 5) (24 h,  $P < 0.01$ ; 48 h,  $P < 0.05$ )。

使用 JAK2 抑制剂 AZ960 后, MOI 为 10 时, *P.g* 处理 Caco-2 的细胞 24 h 后, STAT3 mRNA 和 p-STAT3

蛋白表达水平均显著低于未添加抑制剂的 *P.g* 处理组 (阳性对照组); JAK2 mRNA 和 p-JAK2 蛋白表达水平均显著低于未添加抑制剂的 *P.g* 处理组 (图 6)。



\*:  $P < 0.05$ . \*\*:  $P < 0.01$ . *P.g*: *Porphyromonas gingivalis*. JAK2: janus kinase 2. MOI: multiplicity of infection

Figure 5 Cell proliferation of Caco-2 cells infected with *P.g* after the addition of the JAK2 inhibitor AZ960

图5 添加JAK2抑制剂AZ960后*P.g*感染Caco-2细胞增殖情况

### 3 讨论

牙周病是多种系统性疾病的危险因素,然而,牙周病和消化道肿瘤的关系尚不明确,两者可能存在潜在的相关性。口腔微生物群是最复杂的人类微生物群之一,仅次于胃肠道的微生物群,含有与人体相关的26%的细菌种类<sup>[10]</sup>。此外,有临床试验结果表明,绝大多数口腔微生物物种可以从口腔传播到大肠<sup>[11]</sup>。口腔细菌与许多口腔疾病和口腔以外的系统性疾病密切相关。作为牙周病的主要病原体,*P.g*被证实与全身多种疾病关系密

切,如口腔鳞状细胞癌、食道鳞状细胞癌、类风湿性关节炎和心血管疾病<sup>[12-16]</sup>。同时有研究证明,*P.g*与结肠癌的发生发展也密切相关<sup>[17]</sup>。*P.g*被报道在结直肠癌患者的粪便样品及组织样本中的阳性率均高于正常组织,且*P.g*丰度高的患者相对于*P.g*丰度低的患者的总生存期和5年无复发生存期较短<sup>[4]</sup>。

目前已有研究表明,*P.g*对不同的细胞表现出不同的刺激特性,对牙龈上皮细胞、血管平滑肌细胞、牙周膜成纤维细胞等表现出促进增殖,但对于软骨细胞则促进其凋亡<sup>[18]</sup>。在本研究中,*P.g*可以持续促进结肠癌Caco-2细胞的增殖,这可能与*P.g*改变了Caco-2细胞内部增殖相关蛋白的表达有关。*P.g*具有多种毒力因子,包括荚膜多糖、脂多糖、菌毛、胶原酶、牙龈蛋白酶等<sup>[19]</sup>,当细菌数量过多、毒力过强或机体免疫力低下时,部分细菌可以通过粘附、入侵组织和细胞逃避免疫系统的清除,并通过影响周围细胞为自己营造适宜生存和繁殖的环境,其中就包括了通过调节细胞凋亡和增殖以及各种炎症因子的分泌<sup>[20]</sup>。

不良刺激造成的慢性炎症与细胞的恶性增殖行为密切相关,其中几种常见的炎症因子如IL-6、IL-10等,已经被证明在癌症的发生发展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。IL-6是促进肿瘤发生的重要自分泌生长因子<sup>[21]</sup>,组织损伤或感染都会增加肿瘤细胞IL-6的分泌。据报道,在结肠癌肿瘤组织和患者的血

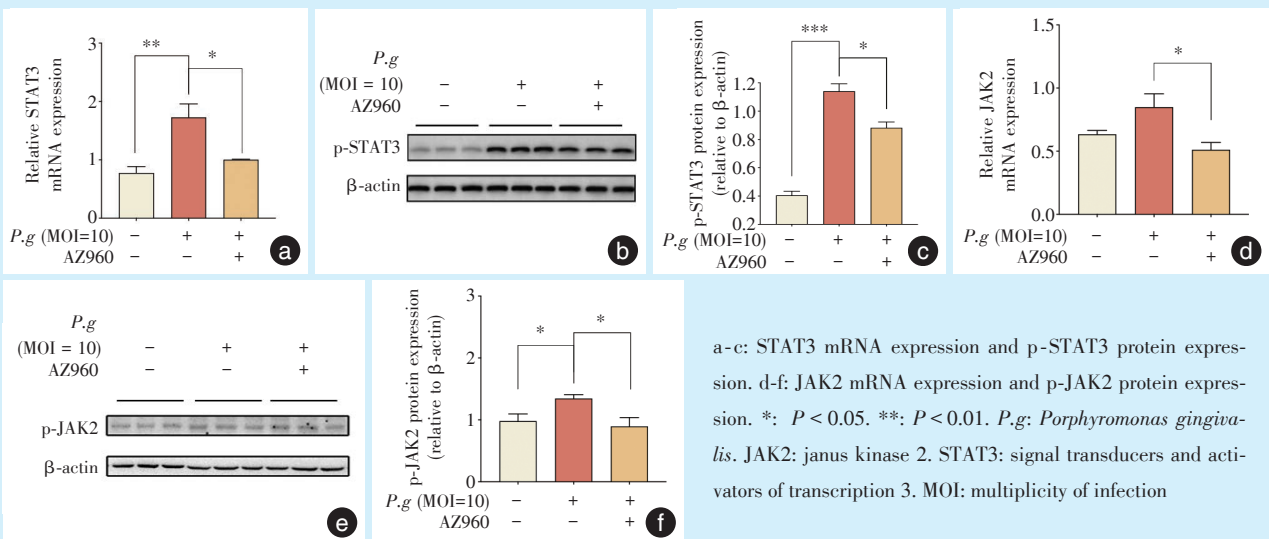


Figure 6 STAT3, JAK2 mRNA and p-STAT3, p-JAK2 protein expression in Caco-2 cells infected with *P.g* after the addition of the JAK2 inhibitor AZ960

图6 添加JAK2抑制剂AZ960,感染*P.g*的Caco-2细胞STAT3、JAK2 mRNA及p-STAT3和p-JAK2蛋白表达

清中,IL-6的表达都有所增加,IL-6的表达与肿瘤的分期、大小、转移和结肠癌患者的生存率密切相关<sup>[9]</sup>。IL-10是一种广泛表达的抗炎细胞因子,对肿瘤的发展有复杂的影响,有研究认为IL-10可以通过调节细胞凋亡以及抑制血管生成从而抑制肿瘤的进展<sup>[22]</sup>。IL-10的缺乏与炎症诱导的结直肠癌的发展有关。

STAT3与恶性肿瘤增殖密切相关,它控制了有关细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化的多种基因<sup>[23]</sup>,STAT3活性在包括结肠癌在内的各种肿瘤中显著升高<sup>[24]</sup>,结肠癌的恶性程度和增殖活性与STAT3的活性密切相关<sup>[25]</sup>。*P.g*可以通过STAT3基因调控多种肿瘤细胞和非肿瘤细胞的增殖和凋亡。Moffatt等<sup>[26]</sup>的研究表明,*P.g*能通过激活STAT3抑制牙龈上皮细胞的内在凋亡途径,从而有助于*P.g*在附着和侵入牙龈上皮细胞后的自身存活。Binder等<sup>[27]</sup>发现,持续放大的STAT3磷酸化信号是*P.g*促进口腔鳞状细胞癌的作用基础。JAK2激酶是激活STAT3重要的上游基因,JAK2的磷酸化被激活后,可以进一步磷酸化下游STAT3,进而调控多种核内基因的转录。研究表明JAK2-STAT3途径在结肠癌细胞的过度增殖和侵袭过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。炎性因子IL-6也是JAK2-STAT3信号传导的主要激活剂之一,同时STAT3促进IL-6基因表达的能力导致自分泌前馈循环,接着放大细胞因子的表达,从而促进肿瘤的生长、转移和耐药,与癌症的发展密切相关<sup>[6]</sup>。

本研究证明,与对照组相比,*P.g*可以显著上调Caco-2细胞中促炎因子IL-6的表达,同时抑制抑炎因子IL-10的表达,这表明*P.g*可以使Caco-2形成促炎的肿瘤微环境,从而促进Caco-2细胞增殖与发展。同时,相较于对照组,*P.g*可显著上调Caco-2细胞内JAK2、STAT3的mRNA和p-JAK2、p-STAT3蛋白表达。反向验证实验表明,在使用JAK2抑制剂AZ960处理Caco-2细胞后,其下游产物STAT3的mRNA和p-STAT3蛋白表达水平较对照组均受到明显抑制。且对Caco-2细胞添加JAK2抑制剂AZ960后,*P.g*对Caco-2细胞的增殖促进作用减弱。

综上,本研究推测*P.g*可以通过改变Caco-2细胞炎症因子的表达,为肿瘤细胞营造适宜增殖的炎性环境,并且可能通过激活JAK2-STAT3通路促进Caco-2细胞的增殖。本研究结果进一步为牙周病、

牙周细菌与结肠癌之间的联系提供依据,并为预防和治疗结肠癌的发展提供了新的思路。

**【Author contributions】** Zhang RT performed the experiments, analyzed the data, and wrote the article. Liu XC assisted in experiments performing. Ye W revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

#### 参考文献

- [1] Jia L, Han N, Du J, et al. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 262. doi: 10.3389/fcimb.2019.00262.
- [2] Singh H, Torralba MG, Moncera KJ, et al. Gastro-intestinal and oral microbiome signatures associated with healthy aging[J]. Geroscience, 2019, 41(6): 907-921. doi: 10.1007/s11357-019-00098-8.
- [3] Tsuzuno T, Takahashi N, Yamada-Hara M, et al. Ingestion of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates colitis via intestinal epithelial barrier disruption in mice[J]. J Periodontol Res, 2021, 56(2): 275-288. doi: 10.1111/jre.12816.
- [4] Wang X, Jia Y, Wen L, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes colorectal carcinoma by activating the hematopoietic *NLRP3* inflammasome[J]. Cancer Res, 2021, 81(10): 2745-2759. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3827.
- [5] Afify SM, Hassan G, Seno A, et al. Cancer-inducing niche: the force of chronic inflammation[J]. Br J Cancer, 2022, 127(2): 193-201. doi: 10.1038/s41416-022-01775-w.
- [6] Batchu RB, Gruzdyn OV, Kolli BK, et al. IL-10 signaling in the tumor microenvironment of ovarian cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1290: 51-65. doi: 10.1007/978-3-030-55617-4\_3.
- [7] Habanjar O, Bingula R, Decombat C, et al. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 4002. doi: 10.3390/ijms24044002.
- [8] Liu C, Yao Z, Wang J, et al. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/STAT3-CSN5-PD-L1 pathway[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(6): 1765-1781. doi: 10.1038/s41418-019-0460-0.
- [9] Brooks AJ, Putoczki T. JAK-STAT signalling pathway in cancer[J]. Cancers, 2020, 12(7): 1971. doi: 10.3390/cancers12071971.
- [10] HMP Working Group NIH, Peterson J, Garges S, et al. The NIH human microbiome project[J]. Genome Res, 2009, 19(12): 2317-2323. doi: 10.1101/gr.096651.109.
- [11] Schmidt TS, Hayward MR, Coelho LP, et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract[J]. eLife, 2019, 8: e42693. doi: 10.7554/eLife.42693.
- [12] Wen L, Mu W, Lu H, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes oral squamous cell carcinoma progression in an immune microenvironment[J]. J Dent Res, 2020, 99(6): 666-675. doi: 10.1177/0022034520909312.
- [13] Gao S, Li S, Ma Z, et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer[J]. Infect

- Agent Cancer, 2016, 11: 3. doi: 10.1186/s13027-016-0049-x.
- [14] Chen MF, Lu MS, Hsieh CC, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell Oncol, 2021, 44(2): 373-384. doi: 10.1007/s13402-020-00573-x.
- [15] Perricone C, Ceccarelli F, Saccucci M, et al. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2019, 31(5): 517-524. doi: 10.1097/BOR.0000000000000638.
- [16] Bohnstedt S, Cullinan MP, Ford PJ, et al. High antibody levels to *P. gingivalis* in cardiovascular disease[J]. J Dent Res, 2010, 89(9): 938-942. doi: 10.1177/0022034510370817.
- [17] Mu W, Jia Y, Chen X, et al. Intracellular *Porphyromonas gingivalis* promotes the proliferation of colorectal cancer cells via the MAPK/ERK signaling pathway[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 584798. doi: 10.3389/fcimb.2020.584798.
- [18] Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen[J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 333(1): 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x.
- [19] Shahoumi LA, Saleh MHA, Meghil MM. Virulence factors of the periodontal pathogens: tools to evade the host immune response and promote carcinogenesis[J]. Microorganisms, 2023, 11(1): 115. doi: 10.3390/microorganisms11010115.
- [20] Chen WA, Dou Y, Fletcher HM, et al. Local and systemic effects of *Porphyromonas gingivalis* infection[J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 470. doi: 10.3390/microorganisms11020470.
- [21] Wen Y, Zhu Y, Zhang C, et al. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1040163. doi: 10.3389/fphar.2022.1040163.
- [22] Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin - 10[J]. J Exp Med, 2020, 217(1): e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418.
- [23] Tolomeo M, Cascio A. The multifaced role of STAT3 in cancer and its implication for anticancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 603. doi: 10.3390/ijms22020603.
- [24] Lin Y, He Z, Ye J, et al. Progress in understanding the IL - 6/STAT3 pathway in colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 13023-13032. doi: 10.2147/OTT.S278013.
- [25] Heichler C, Scheibe K, Schmied A, et al. STAT3 activation through IL - 6/IL - 11 in cancer - associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis [J]. Gut, 2020, 69(7): 1269 - 1282. doi: 10.1136/gutjnl - 2019 - 319200.
- [26] Moffatt CE, Lamont RJ. *Porphyromonas gingivalis* induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells[J]. Infect Immun, 2011, 79(7): 2632-2637. doi: 10.1128/IAI.00082-11.
- [27] Binder Gallimidi A, Fischman S, Revach B, et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model[J]. Oncotarget, 2015, 6(26): 22613 - 22623. doi: 10.18632/oncotarget.4209.

(编辑 张琳,韩倩倩)



官网