

DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2019.01.003

AXL 对乳头状甲状腺癌 STAT3 信号通路活化的促进作用^{*}

刘 弘^{1,2} 吕晨曦³ 张 晗³ 张国安³ 王业全³ 崔 文^{3△}(¹ 济南大学-山东省医学科学院医学与生命科学学院 济南 250062; ² 山东省医学科学院 济南 250022;³ 济宁医学院法医学与医学检验学院 济宁 272067)

摘 要 目的 探讨 AXL 对乳头状甲状腺癌(papillary thyroid cancer, PTC) STAT3 表达的影响。方法 采用基因集富集分析的方法(gene set enrichment analysis, GSEA)对 PTC 转录组数据库中的 572 个 PTC 样本 AXL 的表达进行比较研究,分析 AXL 对 PTC STAT3 表达的影响。HEK293T 细胞随机分为空白对照组、空载体组和 pcDNA-AXL 组(AXL 组),Western blot 检测各组 p-STAT3 的表达;用不同浓度的 AXL 配体 GAS6 处理 BCPAP 细胞系,Western blot 检测细胞 p-STAT3 和核内 STAT3 的表达。结果 GSEA 分析发现 AXL 高表达的 PTC 其 STAT3 信号通路活化程度更高(normalized enrichment score, NES) = 1.47, $P < 0.05$ 。HEK293T 细胞转染 AXL 后,AXL 高表达导致 p-STAT3 活性增高($P < 0.05$)。AXL 配体 GAS6 处理 BCPAP 细胞系后,p-STAT3 活性显著增高($P < 0.05$),STAT3 核转位增加($P < 0.01$)。结论 AXL 可促进 PTC STAT3 信号通路的活化。

关键词 AXL; 乳头状甲状腺癌; STAT3

中图分类号:R73.3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)02-010-05

AXL enhances STAT3 activation in papillary thyroid cancer

LIU Hong^{1,2} LV Chenxi³ ZHANG Han³ ZHANG Guoan³ WANG Yequan³ CUI Wen^{3△}(¹School of Medicine and Life sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences,Jinan 250062, China; ²Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, China;³Institute of Forensic Medicine and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective Signal transducer and activator of transcription (STAT3) signaling is hyperactivated in papillary thyroid cancer (PTC) but the mechanism of which is not fully understood. AXL is upregulated in PTC which activates several signaling pathways. The objective of this article is to investigate whether AXL activates STAT3 signaling pathway. **Methods** The AXL of 572 PTC samples of the transcriptomes of PTC was analyzed by gene set enrichment analysis (GSEA) to assess the effect of AXL on activation of STAT3 signaling pathway. HEK293T cells were transfected by AXL plasmid and p-STAT3 level was determined by Western blot. PTC cell line BCPAP was treated with GAS6 and p-STAT3 and nuclear STAT3 were determined by Western blot. **Results** GSEA analysis found STAT3 activation was higher in AXL-high PTCs (Normalized enrichment score (NES) = 1.47, $P < 0.05$). HEK293T cells transfected with AXL displayed higher level of p-STAT3 ($P < 0.05$). Furthermore, treatment of PTC cell line BCPAP with GAS6, the ligand of AXL, led to increased p-STAT3 ($P < 0.05$) and more STAT3 nuclear translocation ($P < 0.05$). **Conclusion** AXL increased STAT3 activation in PTC.

Keywords: AXL; Papillary thyroid cancer; STAT3 signaling pathway

* [基金项目] 济宁医学院教师科研扶持基金项目 (JY2017KJ040, JYFC2018KJ010); 济宁市科技局新旧动能转化项目 (2017SMNS001, 2018SMNS001); 大学生创新训练计划项目 (CX2016034, CX2016028, CX201610443028)

△ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmdd@163.com

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤,在全球范围内其发病率呈快速上升趋势^[1-3]。乳头状癌甲状腺(papillary thyroid cancer,PTC)是其最常见的病理类型^[4]。PTC 虽预后良好,但仍有一部分患者术后易复发或转移,造成死亡。

AXL 是 TAM 家族受体酪氨酸激酶的一员。AXL 被其配体 GAS6 激活,引起下游信号通路激活^[5]。AXL 在许多癌症包括乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌的病理生理中发挥重要作用,能增强癌细胞的存活、血管生成、转移和耐药性^[6-9]。AXL 在 PTC 中高表达,在正常甲状腺细胞中不表达。

STAT3 信号通路在恶性肿瘤中起重要作用^[10],高活化的 STAT3 信号通路通过转位入核内促进肿瘤细胞生长、存活和转移。STAT3 在 PTC 中活性增强^[11-12],但其在 PTC 中高活化的机制并未明了。本文通过大数据分析及对 PTC 细胞系的研究,探讨 AXL 对 STAT3 信号通路的促进作用,为更好地认识 AXL/STAT3 在 PTC 中的作用提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳头状甲状腺癌细胞系 BCPAP 和 TPC-4 购于欧洲细胞库;HEK293T 细胞购于中国科学院细胞库;DMEM 培养基、Lipofectamine 3000 购于 Thermo Fisher 公司;胎牛血清(FBS)购于杭州四季青公司;pcDNA-AXL 表达质粒购于 addgene 公司;AXL 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体购于北京中衫金桥公司;GAS6 购于 R & D 公司;RIPA 购于康为世纪公司;Phosphostop 购于 Roche 公司;proteinase inhibitor 购于 Sigma 公司;Histone H3 抗体、核蛋白提取试剂盒购于碧云天公司。

1.2 细胞培养

细胞培养使用含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,将培养瓶放于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。在倒置显微镜下观察细胞融合至 80% 时,1:2 传代。GAS6 的处理方法为细胞铺板后过夜,然后换成 0.5% FBS 的培养基培养 16h,加入相应浓度的 GAS6 处理相应的时间后提蛋白。

1.3 基因集富集分析(GSEA)

GSEA 是一种计算方法,可以显示具有统计意义的两生物状态之间的一致差异^[13-14]。为确定 AXL 与 STAT3 状态的关系,在数据库(<http://cancergenome.nih.gov/>)中下载 PTC 表达数据^[15],然后手动检查 AXL 的表达,确定各样本 AXL 的表达值,然后计算平均值。共有 572 个 PTC 样本纳入分析,根据 AXL 的表达高低将所有样本分为 AXL 高表达 PTC (AXL 表达值高于平均值的样本)和低表达 PTC (AXL 表达值低于平均值样本)。GSEA 程序的所有参数都设置为默认值。错误发现率(false discovery rate,FDR)值 <0.25 被认为是明显的富集(GSEA 用户指南,<http://software.broadinstitute.org/gsea/doc/gseauserguideframe.html>)。

1.4 HEK293T 细胞转染

HEK293T 细胞铺板于 6 孔板中过夜,分为空白对照组、空载体组及转染 1.5μg pcDNA-AXL 质粒组(AXL 组)。将质粒与 lipofectamine 3000、P3000 混合,室温静置 12min 后加入 6 孔板中。6h 后将培养基换成新的 10% FBS 的培养基。转染后 48h 提蛋白进行检测。实验重复 3 次。

1.5 Western blot

细胞经处理后,弃去培养皿中培养液经 PBS 冲洗后提取各组细胞。加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 混合液。用细胞刮子将细胞刮下,吸去培养皿中裂解液置于冰上孵育 30min。4℃,12000r/min,离心 10min。吸出上清,蛋白定量。10% 或 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿转法进行蛋白转印。5% 的脱脂奶粉室温封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,室温下用 TBST 在摇床上洗 3 次,每次 5min。二抗孵育 1h,TBST 洗 3 次。滴加 ECL 发光液,使用 ChemiDoc MP 成像分析仪进行曝光。总蛋白提取以 GAPDH 作为内参,核蛋白以 Histone H3 作为内参。采用仪器自带的灰度分析软件分析,计算目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值即为目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 核蛋白提取

GAS6 处理 BCPAP 细胞 1.5h 后,使用核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白。具体步骤为细胞先用冷的 PBS 轻轻冲洗后加入浆蛋白提取试剂 A,冰

上孵育 10min ,移入 EP 管中。加入浆蛋白提取试剂试剂 B。震荡 15s ,冰上孵育 10min ,14000g 离心 5min ,上清即为浆蛋白 ,而沉淀为核蛋白。核蛋白中加入冷的 PBS 震荡后离心用以洗去残留的浆蛋白 ,重复 1 次。离心后弃去上清 ,加入核蛋白提取试剂 ,超声 10s ,超 3 次。冰上孵育 10min。14000g 离心 10min。取上清为核蛋白。实验重复 3 次。

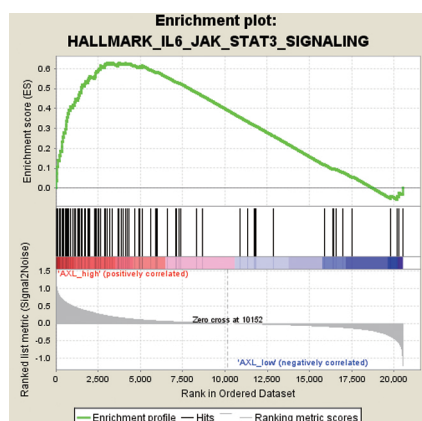
1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析 ,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用单因素方差分析 ,两两比较采用 LSD-*t* 检验 ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AXL 高表达对 PTC STAT3 信号通路的影响

GSEA 结果表明 AXL 高表达的样本其 IL6-STAT3 信号通路高活化(图 1) (normalized enrichment score ,NES) = 1.47 $P = 0.046$)。



注:在 PTC 中高表达 AXL 的 PTC 样本 IL6-STAT3 信号通路高活化。每条黑色的竖线代表 gene set 中的一个基因。从红色到蓝色的渐变线代表基因与 AXL 表达的正相关(红色) (pearson correlation) 或者负相关(蓝色)。NES,normalized enrichment score ,归一化的富集得分;NOM ,nominal ,名义 p 值^[16]

图 1 AXL 高表达对 PTC 样本 STAT3 信号通路的影响

2.2 AXL 高表达对 HEK293T 细胞 STAT3 的影响

为进一步验证 AXL 和 STAT3 的关系 ,我们将 AXL 质粒转染进 HEK293T 细胞。48h 后提蛋白 ,Western blot 显示转染 AXL 的 HEK293T 细胞高表达 AXL ,同时 p-STAT3 也高表达($P < 0.05$) ,提示 STAT3 信号通路活化增高(图 2 表 1)。

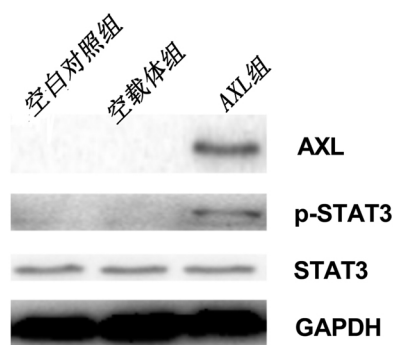


图 2 HEK293T 细胞各组 STAT3 蛋白表达情况

表 1 各组细胞中 AXL 及 p-STAT3 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AXL 相对表达量	p-STAT3 相对表达量
空白对照组	6	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.11
空载体组	6	1.06 $\pm$ 0.09*	1.13 $\pm$ 0.35*
AXL 组	6	2.30 $\pm$ 0.20* #	2.56 $\pm$ 0.11* #
<i>F</i> 值		59.88	46.25
<i>P</i>		0.0001	0.0002

注:与空白对照组相比 ,* $P < 0.05$;与空载体组相比 # $P < 0.05$

2.3 GAS6 处理对 BCPAP 细胞系 STAT3 磷酸化和核内 STAT3 表达的影响

GAS6 是 AXL 的配体。BCPAP 和 TPC-1 细胞系均表达 AXL(图 3)。我们选择 AXL 表达更高的 BCPAP 细胞继续研究。细胞铺板过夜后 ,0.5% FBS 处理 16 h 后 ,用不同浓度的 GAS6 处理细胞后 ,结果显示 p-STAT3 表达增多($P < 0.05$) (图 4 ,表 2)。提示 GAS6 能够激活 STAT3 信号通路。STAT3 激活后会转移入核 ,所以我们检测了 400 ng/ml 的 GAS6 处理 BCPAP 的 STAT3 在核内的表达情况。如图 5 所示 ,处理后的 STAT3 在核内表达增多(GAS6 0ng/ml 组核内 STAT3 相对表达量为 1.00 $\pm$ 0.36 ,400ng/ml 组核内 STAT3 相对表达量为 2.40 $\pm$ 0.26 $P = 0.006$) ,进一步提示 AXL 可促进 STAT3 信号通路的活化。

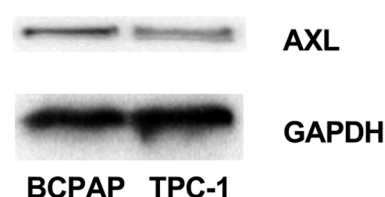


图 3 PTC 细胞系 BCPAP 及 TPC-1 中 AXL 的表达

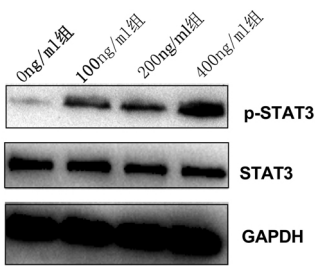
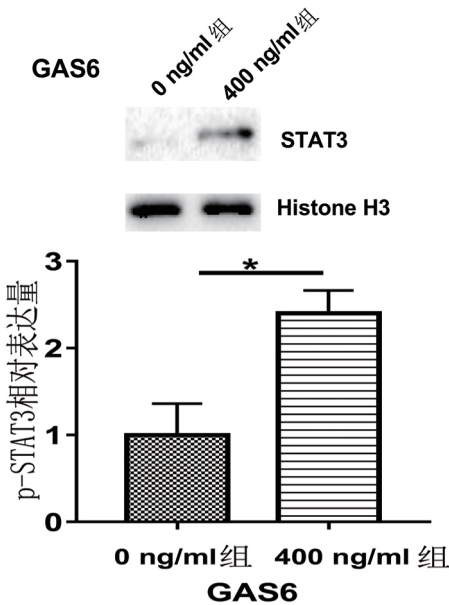


图 4 GAS6 处理 BCPAP 细胞后各组 p-STAT3 和 SAT3 的表达

表 2 不同浓度 GAS6 处理细胞中 p-STAT3 和 SAT3 相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-STAT3 相对表达量
0ng/ml 组	6	1.00 $\pm$ 0.26
100ng/ml 组	6	1.93 $\pm$ 0.42 [#]
200ng/ml 组	6	2.54 $\pm$ 0.08 [*]
400ng/ml 组	6	3.97 $\pm$ 0.71 [*]
F 值		24.70
P		0.001

注: 与 0 μ g/ml 组相比 [#] $P > 0.05$, ^{*} $P < 0.05$ 。



注: 与 0ng/ml 组相比 , ^{*} $P < 0.05$

图 5 GAS6 处理 BCPAP 细胞后核蛋白中 STAT3 的表达

3 讨论

AXL 在多种肿瘤中高表达 ,包括 PTC^[17-19]。本文也显示在 PTC 细胞系中 AXL 高表达(图 3) 。AXL 可激活多条肿瘤相关的信号通路比如 PI3K、EKR 等 ,促进肿瘤生长、侵袭转移、耐药和上皮间质转化^[20-23]。因此 ,AXL 是肿瘤治疗的潜在靶

点^[24-25]。AXL 的特异性抑制剂 R428 已经进入 I 期和 II 期临床(<https://clinicaltrials.gov/>) 。

STAT3 信号通路在恶性肿瘤中起重要作用^[10] ,多个证据显示 STAT3 在肿瘤发生发展及维持中起重要作用 ,确认 STAT3 是个重要的抗肿瘤靶点。癌基因 v-src 导致的细胞转化需要激活的 STAT3。结构性活化的 STAT3 能使永生化的成纤维细胞和正常上皮细胞转化。大多数肿瘤表现出 STAT3 的持续性激活同时表现出 STAT3 调控基因的表达。在多种肿瘤中 STAT3 的高表达与不良预后有关。STAT3 调控的基因能够阻断凋亡 ,促进增殖和存活 ,促进血管生成和转移 ,抑制肿瘤免疫反应。阻断 STAT3 信号通路会导致肿瘤生长抑制及凋亡。

目前 ,促进 STAT3 激活的上游信号并未阐明清楚。在 PTC 中已有多个肿瘤相关蛋白可促进 STAT3 高表达和/或高活化 ,比如 HGF/c-met^[11]。但 AXL 能否激活 STAT3 信号通路并不确定^[20]。为了确认两者的关系 ,我们首先利用 ATGC 的 PTC 组织的转录组数据库进行了分析。GSEA 显示 AXL 高表达的 PTC 其 STAT3 信号通路高活化 ,为两者的密切关系提供了初步的证据。进一步地 ,高表达 AXL 的 HEK293 细胞其 p-STAT3 表达更高。在甲状腺癌细胞系 BCPAP 中 ,GAS6 可以激活 STAT3 并且使核内 STAT3 增多 ,提示其转录活性增强。

综上所述 ,本文表明 GAS6/AXL 能够激活 STAT3 信号通路 ,这个信号通路可能是 AXL 促进肿瘤进展的机制之一。

参考文献:

[1] Nix P ,Nicolaidis A ,Coatesworth AP. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer [J]. Int J Clin Pract 2005 ,59(11) : 1340-1344. DOI: 10.1111/j. 1368-5031. 2005. 00671. x.

[2] 代丽丽 ,张国安 ,崔文. BRAF^{V600E} 和 TERT 启动子突变与甲状腺乳头状癌的关系 [J]. 济宁医学院学报 , 2018 ,41(4) : 290-293. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000. 9760. 2018. 04. 016.

[3] Chen W ,Zheng R ,Baade PD ,et al. Cancer statistics in China 2015 [J]. CA Cancer J Clin 2016 ,66(2) : 115-132. DOI: 10. 3322/caac. 21338.

- [4] Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer* ,2005 ,12 (2) : 245-262. DOI: 10. 1677/erc. 1. 0978.
- [5] Hafizi S ,Dahlback B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev* ,2006 ,17 (4) : 295-304. DOI: 10. 1016/j. cytogfr. 2006. 04. 004.
- [6] Pacciez JD ,Vogelsang M ,Parker MI ,et al. The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: biological functions and therapeutic implications [J]. *Int J Cancer* ,2014 ,134 (5) : 1024-1033. DOI: 10. 1002/ijc. 28246.
- [7] Graham DK ,Deryckere D ,Davies KD ,et al. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer [J]. *Nat Rev Cancer* ,2014 ,14 (12) : 769-85. DOI: 10. 1038/nrc3847.
- [8] Qu X ,Liu G ,Zhong X ,et al. Role of AXL expression in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett* ,2016 ,12 (6) : 5085-5091. DOI: 10. 3892/ol. 2016. 5356.
- [9] Zhang Z ,Lee JC ,Lin L ,et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer [J]. *Nat Genet* ,2012 ,44 (8) : 852-860. DOI: 10. 1038/ng. 2330.
- [10] Yu H ,Lee H ,Herrmann A ,et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer* ,2014 ,14 (11) : 736-746. DOI: 10. 1038/nrc3818.
- [11] Trovato M ,Grosso M ,Vitarelli E ,et al. Distinctive expression of STAT3 in papillary thyroid carcinomas and a subset of follicular adenomas [J]. *Histol Histopathol* ,2003 ,18 (2) : 393-399. DOI: 10. 14670/HH-18. 393.
- [12] 王翥 ,罗大虎 ,刘雪梅. 甲状腺乳头状癌组织中 STAT3 和核因子 κ B 水平增加 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* ,2016 ,32 (10) : 1386-1389.
- [13] Subramanian A ,Tamayo P ,Mootha VK ,et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2005 ,102 (43) : 15545-15550. DOI: 10. 1073/pnas. 0506580102.
- [14] Zhang G ,Kong X ,Wang M ,et al. AXL is a marker for epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett* ,2018 ,15 (2) : 1900-1906. DOI: 10. 3892/ol. 2017. 7443.
- [15] Agrawal N ,Akbari R ,Aksoy BA ,et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma [J]. *Cell* ,2014 ,159 (3) : 676-690. DOI: 10. 1016/j. cell. 2014. 09. 050.
- [16] 冯春琼 ,邹亚光 ,周其赵 ,等. GSEA 在全基因组表达谱芯片数据分析中的应用 [J]. *现代生物医学进展* ,2009 ,9 (13) : 2553-2557.
- [17] Avilla E ,Guarino V ,Visciano C ,et al. Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer [J]. *Cancer Res* ,2011 ,71 (5) : 1792-1804. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-10-2186.
- [18] Tanaka K ,Nagayama Y ,Nakano T ,et al. Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid [J]. *Endocrinology* ,1998 ,139 (3) : 852-858. DOI: 10. 1210/endo. 139. 3. 5791.
- [19] Isildak SM ,Tutuncu NB ,Altundag O. Tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer: may Axl/Gas6 pathway be a hidden target [J]. *UHOD-ULUSLARARASI HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ DERGİSİ* ,2013 ,23 (3) : 207-212.
- [20] Zhang G ,Wang M ,Zhao H ,et al. Function of Axl receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett* ,2018 ,15 (3) : 2726-2734. DOI: 10. 3892/ol. 2017. 7694.
- [21] Gay CM ,Balaji K ,Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy [J]. *Br J Cancer* ,2017 ,116 : 415. DOI: 10. 1038/bjc. 2016. 428.
- [22] Antony J ,Huang RY. AXL-driven EMT state as a targetable conduit in cancer [J]. *Cancer Res* ,2017 ,77 (14) : 3725-3732. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-17-0392.
- [23] Scaltriti M ,Elkabets M ,Baselga J. Molecular pathways: AXL ,a membrane receptor mediator of resistance to therapy [J]. *Clin Cancer Res* ,2016 ,22 (6) : 1313-7. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-15-1458.
- [24] Bivona T ,Okimoto R. AXL receptor tyrosine kinase as a therapeutic target in NSCLC [J]. *Lung Cancer: Targets and Therapy* ,2015 ,6 : 27-34. DOI: 10. 2147/LC.TT. S60438.
- [25] Wu X ,Liu X ,Koul S ,et al. AXL kinase as a novel target for cancer therapy [J]. *Oncotarget* ,2014 ,5 (20) : 9546-9563. DOI: 10. 18632/oncotarget. 2542.

(收稿日期 2018-11-09)

(本文编辑:石俊强)