

粒细胞集落刺激因子及其受体通过 JAK2/STAT3 信号通路促进食管鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化

侯文静¹, 崔渊博¹, 孙晓燕¹, 刘嘉¹, 吕朋举¹, 王进武², 曹巍¹

(1. 郑州大学附属郑州中心医院转化医学中心, 河南 郑州 450007; 2. 林州市肿瘤医院, 河南 林州 456550)

摘要: [目的] 探讨粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)及 G-CSF 受体(G-CSF receptor, G-CSFR)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)细胞增殖、迁移和上皮间质转化中的作用。[方法] 48 例 ESCC 组织来自 2019 年 1—9 月在林州市肿瘤医院行食管癌根治术的患者。采用 qRT-PCR 检测 ESCC 组织及细胞系(KYSE70、KYSE150、KYSE450 和 Het-1A)中 G-CSFR mRNA 的表达, 流式细胞术检测 ESCC 细胞系中 G-CSFR 阳性细胞百分率。CCK-8 法、划痕实验、Transwell 实验和流式细胞术分别检测 rhG-CSF 对 KYSE450 和 KYSE150 细胞增殖、迁移和 JAK2/STAT3 信号通路相关分子的影响。Western Blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达。[结果] G-CSFR mRNA 在 ESCC 组织和细胞系中的表达水平均显著高于正常食管上皮组织和正常食管上皮细胞系(P 均 <0.05)。G-CSFR 阳性细胞率在 ESCC 细胞系中显著高于正常食管上皮细胞系(P 均 <0.01)。G-CSFR mRNA 的高表达与 ESCC 患者的 TNM 分期相关($\chi^2=5.421$, $P=0.020$)。KYSE150 和 KYSE450 细胞经不同浓度 rhG-CSF 处理后, 与对照组相比, 增殖活性显著增加(P 均 <0.01), 而在加入 JAK2/STAT3 抑制剂 AG490 后, 增殖活性显著减弱(P 均 <0.01)。与对照组相比, G-CSF(20 ng/mL)组 KYSE150 和 KYSE450 细胞划痕愈合率和迁移细胞数明显增加(P 均 <0.01), p-JAK2 和 p-STAT3 水平显著增加(P 均 <0.01), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著增加, E-cadherin 蛋白表达显著下降(P 均 <0.05)。而在加入 AG490 阻断 JAK2/STAT3 通路后, KYSE150 和 KYSE450 细胞 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著下降, E-cadherin 蛋白表达显著增加(P 均 <0.05)。[结论] G-CSFR 在 ESCC 中高表达, G-CSF/G-CSFR 通过激活 JAK2/STAT3 信号通路促进 ESCC 细胞的增殖、迁移和上皮间质转化。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 增殖; 迁移; 上皮间质转化; 粒细胞集落刺激因子; 粒细胞集落刺激因子受体

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2024)02-0091-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2024.02.B002

G-CSF/G-CSFR Promotes Proliferation, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells through JAK2/STAT3 Signaling Pathway

HOU Wenjing¹, CUI Yuanbo¹, SUN Xiaoyan¹, LIU Jia¹, LYU Pengju¹, WANG Jinwu², CAO Wei¹

(1. Translational Medical Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China; 2. Linzhou Cancer Hospital, Linzhou 456550, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of granulocyte colony-stimulating factor/granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF/G-CSFR) on proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. [Methods] ESCC tissue samples were collected from 48 ESCC patients who underwent surgical treatment in Linzhou Cancer Hospital from January to September 2019. The G-CSFR mRNA expression in ESCC tissues and ESCC cell lines KYSE450 and KYSE150 and normal esophageal epithelial cell line Het-1A were determined by qRT-PCR, and the percentage of G-CSFR positive cells was measured by flow cytometry. The effects of rhG-CSF on the proliferation, migration, and protein phosphorylation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in KYSE450 and KYSE150 cells were investigated by CCK-8, scratch assay, Transwell assay, and flow cytometry, respectively. Western blot was used to detect E-cadherin, N-cadherin and Vimentin protein expression levels. [Results] G-CSFR mRNA expression level was upregulated in ESCC tissues and cell lines compared with normal esophageal epithelial tissues and cell line (all $P<0.05$). The percentage of G-CSFR positive cells was significantly increased in ESCC cell lines compared with normal esophageal cell line (all $P<0.01$). High expression level of G-CSFR mRNA was correlated with TNM stage in ESCC patients ($\chi^2=5.421$, $P=0.020$). The proliferation of KYSE450 and KYSE150 cells treated with rhG-CSF was significantly increased (all $P<0.01$) compared with control. Whereas adding JAK2/STAT3 blocker AG490, the cell proliferation was significantly decreased (both $P<0.01$). After KYSE450 and KYSE150 cells being treated with rhG-CSF(20 ng/mL), the migration ability and p-JAK2 and p-STAT3 levels were significantly increased (all $P<0.01$), N-cadherin and Vimentin protein levels were significantly increased (all $P<0.05$), and E-cadherin protein level was decreased ($P<0.05$). In contrast, upon adding AG490 to block the JAK2/STAT3 signaling pathway, N-cadherin and Vimentin protein were downregulated and E-cadherin protein was upregulated (all $P<0.05$). [Conclusion] G-CSFR is highly expressed in ESCC. G-CSF/G-CSFR promotes proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of ESCC cells by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Subject words: esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transition; granulocyte colony-stimulating factor; granulocyte colony-stimulating factor receptor

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(20A320029); 河南省科技攻关项目(232102310226, 232102310175)

通信作者: 曹巍, E-mail: caoweiyu@hotmail.com

收稿日期: 2023-10-23; **修回日期:** 2023-12-22

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是一种常见的恶性肿瘤,占我国食管癌患者的 86%^[1]。由于其发病较隐匿,总体预后不佳,早期发现对于改善患者预后非常关键。探讨 ESCC 发生和转移的分子调控机制,有助于制定 ESCC 的治疗策略。粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)是一种促炎性细胞因子,与粒细胞集落刺激因子受体(granulocyte colony-stimulating factor receptor, G-CSFR)结合后,可刺激中性粒细胞的增殖和分化^[2]。以往研究显示 G-CSFR 主要表达于单核细胞、造血干细胞、成纤维细胞等的表面^[3-4],近年来研究表明,其在实体肿瘤如结肠癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌中也有表达^[5-8],且与肿瘤的增殖、迁移及患者的不良预后相关。然而, G-CSFR 在 ESCC 中的表达情况及其是否在 ESCC 发生及进展中发挥作用,尚不清楚。本研究探讨 G-CSF/G-CSFR 促进 ESCC 细胞增殖、迁移和上皮间质转化的具体机制,期待为 ESCC 的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 组织标本和细胞

48 例手术切除的 ESCC 组织及对应正常食管上皮黏膜组织(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm, 且经病理证实未见癌细胞)来自于 2019 年 1—9 月在林州市肿瘤医院接受食管癌根治术的 ESCC 患者,所有标本由两名病理医生明确诊断。标本采集后立即置于无 RNA 酶的冻存管中,液氮保存。患者术前均未接受放疗或化疗,均签署知情同意书。本研究方案经郑州大学附属郑州中心医院伦理委员会批准(批准号:202008)。

人 ESCC 细胞株 KYSE70、KYSE150、KYSE450 和正常食管细胞株 Het-1A 由郑州大学生命科学学院惠赠。所有细胞加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.1.2 患者一般资料

48 例 ESCC 患者中,男性 34 例(70.8%),女性 14 例(29.2%); ≥ 60 岁 33 例(68.8%), < 60 岁 15 例(31.2%);肿瘤位于食管上段 10 例(20.8%),食管中下段 38 例(79.2%);组织学分级低分化 14 例(29.2%),中分化 34 例(70.8%);淋巴结转移阴性 17 例

(35.4%),阳性 31 例(64.6%);TNM 分期 I ~ II 期 23 例(47.9%), III 期 25 例(52.1%)。

1.1.3 主要试剂

胎牛血清、RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒购自美国 Thermo 公司。SYBR Green 荧光定量 PCR master mix 试剂盒购自德国 DBI 公司。CCK-8 试剂购自北仁化学科技(北京)公司。Transwell 小室购自美国康宁公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。重组人 G-CSF(recombinant human G-CSF, rhG-CSF)购自近岸蛋白质科技公司, PE 标记的 G-CSFR 抗体、PE 标记的 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 抗体、FITC 标记的磷酸化 JAK2 (phosphates JAK2, p-JAK2)(phospho Y1007+Y1008) 抗体、PE 标记的信号转导与转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体和 FITC 标记的磷酸化 STAT3 (phosphates STAT3, p-STAT3)(Tyr705) 抗体购自美国 Abcam 公司。AG490 购自碧云天科技公司。E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 和 GAPDH 一抗,以及 HRP 二抗均购自美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 检测 G-CSFR mRNA 表达水平

使用 Trizol 试剂进行组织和细胞 RNA 提取,应用超微量核酸蛋白分析仪检测浓度,使用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,使用 SYBR Green 荧光定量 PCR master mix 试剂盒进行 qRT-PCR 检测,以 GAPDH 为内参对照基因。G-CSFR 的正向引物序列为 5'-CCTGGAGCTGAGAACTACCG-3', 反向引物序列为 5'-TCCCCGCTGAGTTATAGG-3'; GAPDH 基因的正向引物序列为 5'-CCGGGAACTGTGGCGTGATGG-3', 反向引物序列为 5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT-3'。以正常食管组织为对照,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ESCC 组织中 G-CSFR 的相对表达水平。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值(ESCC 组织)/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值(对应正常食管组织) > 1 判定为 G-CSFR mRNA 高表达, < 1 判定为低表达。以 Het-1A 为对照,计算 ESCC 细胞系中 G-CSFR mRNA 的相对表达水平。

1.2.2 流式细胞术检测 ESCC 细胞 G-CSFR 阳性细胞率

使用对数生长期的细胞,加入 PE 标记的 G-CSFR 抗体,室温避光孵育 30 min, 1 800 r/min 离心 5 min,

弃上清,PBS 轻柔洗涤 2 次,用 200 μ L PBS 溶液重悬细胞,在流式细胞仪上机分析。根据同型对照设门,以平均荧光强度为指标,以 Het-1A 为对照,分析各组细胞 G-CSFR 阳性细胞率。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

将细胞按 5 000 个/孔的浓度接种于 96 孔板。根据文献方法^[5],将细胞分为对照组、5、10、20、50 ng/mL rhG-CSF 组及 G-CSF+AG490 组。除对照组外,其他各组分别加入 5、10、20、50 ng/mL rhG-CSF, G-CSF + AG490 (JAK2/STAT3 抑制剂) 组加入 20 ng/mL rhG-CSF 和 10 μ mol/L AG490 处理,每组设 5 个复孔。按照 CCK-8 试剂盒说明书进行检测,实验重复 3 次。

1.2.4 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移

细胞经 rhG-CSF (20 ng/mL) 培养 48 h 后(G-CSF 处理组),用无血清培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 2×10^4 个/孔,以未经 rhG-CSF 处理的细胞作为对照组。划痕实验:细胞培养至 100% 融合后,人工制造伤口,去除未贴壁细胞,换用新鲜培养基,在显微镜下拍摄 0、24 h 的细胞图像,计算划痕愈合率。Transwell 实验:上室加入上述两组单细胞悬液,下室加入 600 μ L 含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 48 h,用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,显微镜下观察并拍照。计算结晶紫染色细胞数即为迁移细胞数。

1.2.5 流式细胞术检测 JAK2、STAT3 及 p-JAK2、p-STAT3 阳性细胞率

将细胞用无血清 RPMI-1640 培养液预培养 2 h 后,加入 rhG-CSF(20 ng/mL)分别作用 0、15、30、45、60 min,收集各时间点的细胞,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 0.5% Triton 溶液透化过夜,分别加入荧光标记的 JAK2、p-JAK2 抗体和 STAT3、p-STAT3 抗体进行染色,避光孵育 30 min。在流式细胞仪上机分析,根据同型对照设门,以平均荧光强度为指标,分析 JAK2、STAT3 及 p-JAK2、p-STAT3 阳性细胞率。

1.2.6 Western Blot 检测上皮间质转化相关蛋白表达

将细胞分为 3 组:对照组(未加入 rhG-CSF)、G-CSF 组(加入 20 ng/mL rhG-CSF)及 G-CSF+AG490 组(加入 20 ng/mL rhG-CSF 及 10 μ mol/L AG490)。各组细胞培养 48 h 后,收集细胞,提取总蛋白,测定蛋白浓度。将等量蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂牛奶在室温封闭 2 h,然后

加入 E-Cadherin (1:2 000)、N-Cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:2 000)一抗溶液,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗溶液(1:5 000),室温孵育 1 h。采用 Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂(上海雅酶生物)进行显像,利用 Image 软件对各组蛋白条带的灰度值进行定量分析,目的蛋白的相对表达水平等于目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值比值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。以 3 次重复实验的数据表示实验结果。使用 Levene 法进行正态性检验,符合正态分布的资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;肿瘤组织中 G-CSFR 的相对表达水平与 ESCC 患者临床病理特征的关系分析采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 G-CSFR mRNA 在 ESCC 组织和细胞中的表达

GEPIA 数据库分析显示,G-CSFR mRNA 在食管癌组织中的表达高于正常食管上皮组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)(Figure 1)。

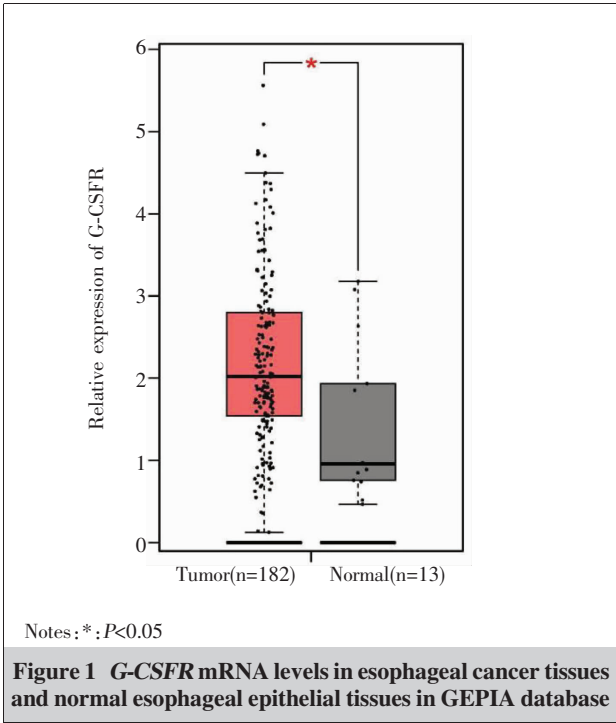
本研究 48 例 ESCC 组织的 qRT-PCR 结果显示,G-CSFR mRNA 在 ESCC 组织中的表达水平高于对应正常食管上皮黏膜组织 (2.89 ± 2.80 vs 1.91 ± 1.77 , $t = 2.049$, $P < 0.05$)。G-CSFR mRNA 在 ESCC 细胞系 KYSE70 (2.56 ± 0.35)、KYSE150 (2.89 ± 0.23) 和 KYSE450 (7.04 ± 0.65) 中的表达显著高于正常食管上皮细胞系 Het-1A (1.07 ± 0.07) ($t = 7.127$ 、 12.873 、 15.795 , P 均 < 0.01)。

2.2 ESCC 细胞中 G-CSFR 阳性细胞百分率

KYSE70、KYSE150 和 KYSE450 细胞中 G-CSFR 阳性细胞率分别为: $24.83\% \pm 3.90\%$ 、 $32.48\% \pm 2.84\%$ 和 $85.59\% \pm 9.68\%$,与 Het-1A 细胞($8.57\% \pm 0.59\%$)相比均显著增加($t = 7.135$ 、 14.291 、 13.753 , P 均 < 0.01)。选取阳性细胞率高的 KYSE450 和 KYSE150 两种细胞进行后续实验。

2.3 G-CSFR mRNA 表达水平与 ESCC 患者临床病理特征的关系

G-CSFR mRNA 高表达与 ESCC 患者的 TNM 分期相关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤部位、组织学分级和淋巴结转移均无关(P 均 > 0.05)(Table 1)。



2.4 G-CSF 对 ESCC 细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示,随着 G-CSF 浓度增加,KYSE450 和 KYSE150 细胞的增殖活性增加。当 G-CSF 浓度为 20 ng/mL 时,增殖活性最大。第 4 天时,在 KYSE450 细胞中,与对照组相比,5、10、20 和 50 ng/mL G-CSF 处理组细胞增殖活性显著增加,差异均有统

计学意义 ($t=14.450$ 、 8.022 、 20.115 和 8.903 , P 均 <0.01)。G-CSF+AG490 组与 20 ng/mL G-CSF 组相比,增殖活性显著减弱($t=6.717$, $P<0.01$)。在 KYSE150 细胞中,与对照组相比,5、10、20 和 50 ng/mL G-CSF 处理组细胞增殖活性也显著增加,差异均有统计学意义 ($t=4.136$ 、 9.604 、 12.260 和 11.346 , P 均 <0.01)。G-CSF+AG490 组与 20 ng/mL G-CSF 组相比,增殖活性显著减弱($t=6.399$, $P<0.01$)(Figure 2)。

2.5 G-CSF 对 ESCC 细胞迁移的影响

G-CSF 处理组 KYSE450、KYSE150 细胞的划痕愈合率明显增加,与对照组相比,差异有统计学意义 ($t=6.035$ 、 4.276 , P 均 <0.01)。G-CSF 处理组 KYSE450、KYSE150 细胞迁移细胞数明显增加,与对照组相比,差异有统计学意义($t=4.523$ 、 3.255 , P 均 <0.01)(Figure 3)。

2.6 G-CSF 对 ESCC 细胞 JAK2 和 STAT3 磷酸化的影响

在 G-CSF (20 ng/mL) 作用后,KYSE450、KYSE150 细胞中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平显著增加,在 30 min 时达到峰值,之后迅速下降至基线水平。在 G-CSF (20 ng/mL) 作用 15 min 时,KYSE450 和 KYSE150 细胞 p-JAK2 阳性细胞百分率(%)与 0 时比较,差异显著($t=8.677$ 、 8.045 , P 均 <0.01);p-STAT3 阳性细胞百分率与 0 时比较,差异显著 ($t=4.990$ 、

12.866 , P 均 <0.01)。在 30 min 时,KYSE450 和 KYSE150 细胞 p-JAK2 阳性细胞率与 0 时比较,差异显著 ($t=9.772$ 、 6.659 , P 均 <0.01);p-STAT3 阳性细胞率与 0 时比较,差异显著($t=12.511$ 、 12.951 , P 均 <0.01)(Table 2)。两种细胞中,总 JAK2 和总 STAT3 表达水平无明显变化。

2.7 G-CSF 对 ESCC 细胞上皮间质转化的影响

在 KYSE450 细胞中,G-CSF 组 E-cadherin 蛋白表达水平较对照组显著下降 ($t=4.528$, $P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平较对照组显著升高 ($t=6.080$ 、 4.981 , P 均 <0.05)。G-CSF+AG490 组 E-cadherin 蛋白表达水平较 G-CSF 组

Table 1 Relationship between G-CSFR mRNA level and characteristics of ESCC patients

Characteristic	N	G-CSFR mRNA level		χ^2	P
		High (n=31)	Low(n=17)		
Age (years old)					
< 60	15	9	6	0.200	0.654
≥ 60	33	22	11		
Gender					
Male	34	24	10	-	0.201
Famale	14	7	7		
Tumor location					
Upper esophagus	10	6	4	-	0.727
Middle-lower esophagus	38	25	13		
Histological grade					
Poorly differentiation	14	10	4	-	0.741
Moderately-well differentiation	34	21	13		
Lymph node metastasis					
No	17	12	5	0.415	0.519
Yes	31	19	12		
TNM stage					
I ~ II	23	11	12	5.421	0.020
III	25	20	5		

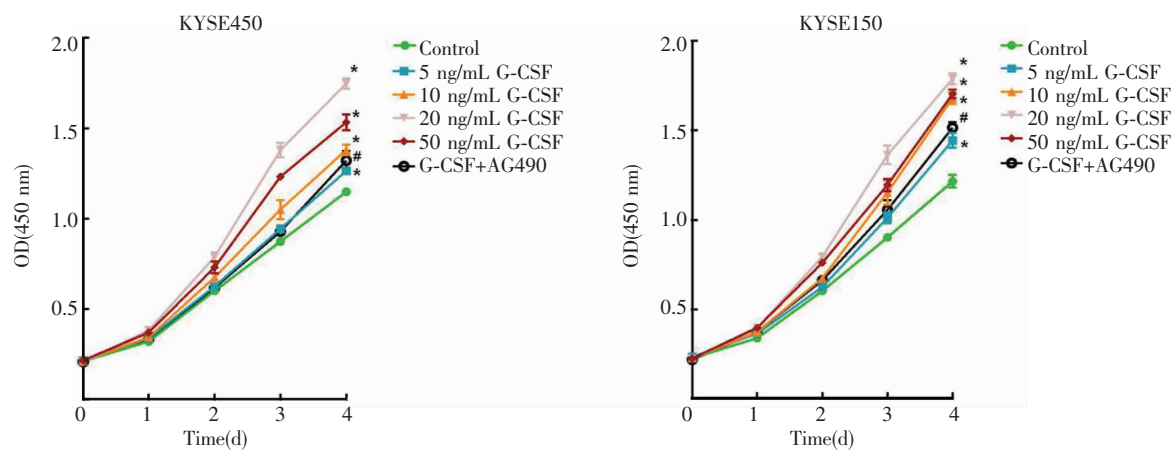


Figure 2 Effects of G-CSF on proliferation of KYSE450 and KYSE150 cells

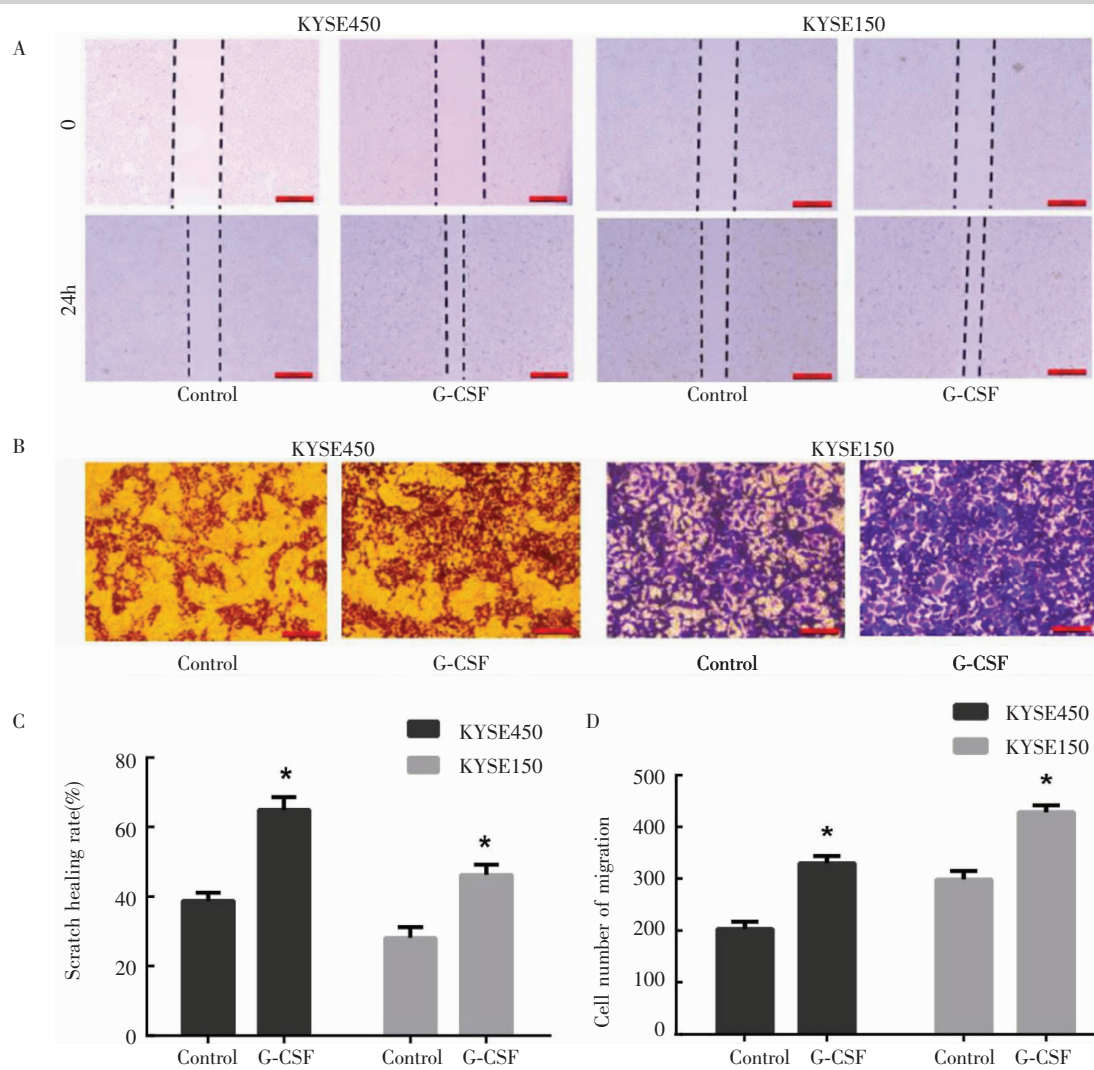


Figure 3 Effects of G-CSF on migration ability of KYSE450 and KYSE150 cells were determined by scratch healing and Transwell assay

显著升高($t=11.154, P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平较 G-CSF 组显著下降($t=3.558、4.195, P$ 均 <0.05)。在 KYSE150 细胞中,G-CSF 组 E-cadherin 蛋白较对照组也显著下降($t=3.764, P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白较对照组显著升高($t=4.219、6.356, P$ 均 <0.05)。G-CSF+AG490 组 E-cadherin 蛋白较 G-CSF 组显著升高($t=8.344, P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白较 G-CSF 组显著下降($t=4.142、5.162, P$ 均 <0.05) (Figure 4, Table 3)。说明 G-CSF 促进了KYSE450 和 KYSE150 细胞的上皮间质转化, 加入 JAK2/STAT3 特异性抑制剂 AG490 可逆转该进程。

3 讨 论

ESCC 是我国特异高发的恶性肿瘤,由于早期症状隐匿,多数患者就诊时已进展至中晚期,相对生存率较低。寻找有效的早期诊断标志物和治疗策略对于改善患者预后至关重要。G-CSF 是一种促炎性细胞因子,临床主要用其基因重组产品 rhG-CSF 治疗放疗引起的严重中性粒细胞减少^[9]。G-CSFR 是 G-CSF 的细胞表面受体,近年来研究发现其在肿瘤细胞中也有表达。G-CSF 与 G-CSFR 结合后,主要激活 3 条信号通路:JAK/STAT、PI3K/AKT 及 MAPK/ERK^[10],进而促进肿瘤细胞的增殖、迁移或与患者的不良预后相关^[5-6,11];并通过影响肿瘤微环境中的免疫细胞而表现出促癌活性^[12-13]。

既往研究显示,G-CSFR 在胃癌和结肠癌组织及细胞中高表达,G-CSF/CSFR 可促进胃癌、结肠癌细胞的增殖与迁移^[5-6],也可增加卵巢癌细胞的迁移能力^[11]。本研究发现,G-CSFR mRNA 表达水平在 ESCC 组织和 ESCC 细胞系中均显著增加,且与患者的 TNM 分期相关。细胞实验结果显示,G-CSF/G-

Table 2 The percentage of p-JAK2 and p-STAT3 positive cells in G-CSF-treating KYSE450 and KYSE150 cells($\bar{x}\pm s$)

G-CSF treating time(min)	p-JAK2 (%)		p-STAT3 (%)	
	KYSE450	KYSE150	KYSE450	KYSE150
0	9.22±0.46	7.39±0.99	8.51±0.88	5.58±0.53
15	24.77±3.07*	15.36±1.40*	15.85±2.39*	12.66±0.79*
30	51.25±7.44*	39.65±8.33*	43.85±4.81*	34.91±3.89*
45	10.97±2.59	8.26±0.79	8.65±0.36	8.80±1.89
60	9.34±0.78	7.64±1.00	8.13±0.79	6.05±0.28

Note: *: Compared with 0, $P<0.01$

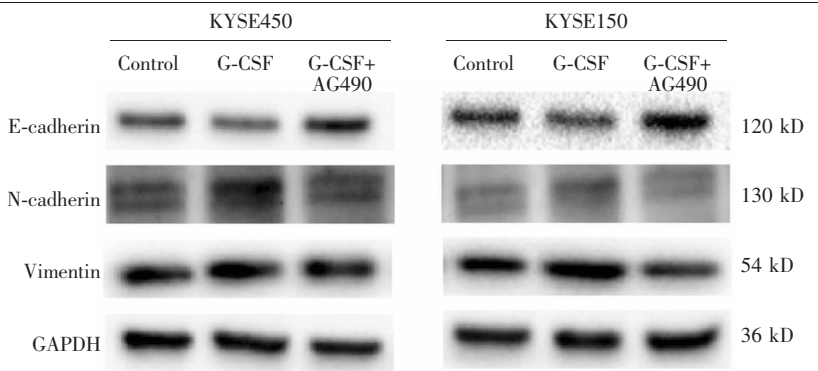


Figure 4 Effects of G-CSF on proteins related to epithelial-mesenchymal transition by Western blot

Table 3 The protein levels of E-cadherin,N-cadherin and Vimentin in KYSE450 and KYSE150 cells of each group($\bar{x}\pm s$)

Group	Control	G-CSF	G-CSF+AG490
KYSE450			
E-cadherin	0.54±0.05	0.37±0.04*	0.85±0.06#
N-cadherin	0.46±0.09	0.88±0.07*	0.69±0.05#
Vimentin	0.91±0.09	1.26±0.08*	0.98±0.08#
KYSE150			
E-cadherin	0.72±0.09	0.48±0.06*	1.05±0.10#
N-cadherin	0.38±0.07	0.59±0.04*	0.41±0.06#
Vimentin	0.83±0.11	1.44±0.12*	0.99±0.09#

Notes: *: Compared with control group, $P<0.05$. #: Compared with G-CSF group, $P<0.05$

CSFR 可促进 ESCC 细胞系 KYSE450 和 KYSE150 细胞的增殖和迁移。这些结果提示 G-CSFR 可能在 ESCC 的发生及进展中发挥促进作用。然而,G-CSF/G-CSFR 在 ESCC 中具体通过何种机制发挥作用需要进一步探讨。关于 G-CSF/G-CSFR 激活的信号通路,报道最多的是 JAK2/STAT3 通路^[11,14-15]。STAT3 是一种重要的转录因子,研究表明其在 ESCC 组织中呈高表达^[16],且与 ESCC 的临床分期和淋巴结转移明显相关^[17]。JAK2 是 STAT3 的经典上游之一,活化的 JAK2 能使 STAT3 二聚化为 p-STAT3 入核,进而激活相应基因的转录和表达,引起肿瘤细胞异常

增殖和恶性转化。本研究发现,G-CSF/G-CSFR 可上调 ESCC 细胞系 KYSE450 和 KYSE150 中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平,而在加入特异性抑制剂 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,KYSE450 和 KYSE150 细胞的增殖活性明显减弱,说明 G-CSF/G-CSFR 通过激活 JAK2/STAT3 信号通路,促进 ESCC 细胞的增殖。

食管癌的转移是影响患者预后的重要因素,上皮间质转化在肿瘤的转移中发挥重要作用。上皮标志物 E-cadherin 蛋白的下调及间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白的异常上调是上皮间质转化的重要标志^[18]。本研究结果显示,G-CSF/G-CSFR 上调了 ESCC 细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,下调了 E-cadherin 蛋白表达,而在加入特异性抑制剂 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,则逆转了上皮间质转化进程。进一步证明 JAK2/STAT3 是 G-CSF/G-CSFR 在 ESCC 细胞系中发挥效应的关键信号通路,G-CSF/G-CSFR 通过激活 ESCC 细胞中 JAK2/STAT3 信号通路,上调 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,下调 E-cadherin 蛋白表达,促进上皮间质转化进程,进而增加细胞的迁移能力。

综上所述,本研究发现 G-CSFR 在 ESCC 中高表达,G-CSF/G-CSFR 通过激活 JAK2/STAT3 信号通路促进 ESCC 细胞增殖、迁移和上皮间质转化。该结果为制定新的 ESCC 治疗策略提供了一定参考。关于 G-CSF/G-CSFR 激活 JAK2/STAT3 通路的分子调控机制,尚有待进一步研究。

致谢: 特别感谢林州市肿瘤医院病理科为本研究提供食管癌组织及对应正常食管上皮黏膜组织。

参考文献:

- [1] CHEN R,ZHENG R S,ZHANG S W,et al. Patterns and trends in esophageal cancer incidence and mortality in China: an analysis based on cancer registry data [J]. JNCC,2023,14:23.
- [2] CETEAN S,CAINAP C,CONSTANTIN A M,et al. The importance of the granulocyte-colony stimulating factor in oncology[J]. Clujul Med,2015,88(4):468-472.
- [3] TOUW I P,VAN DE GEIJN G J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development,leukemia and related blood cell disorders[J]. Front Biosci,2007,12:800-815.
- [4] WRIGHT C R,WARD A C,RUSSELL A P. Granulocyte colony-stimulating factor and its potential application for skeletal muscle repair and regeneration [J]. Mediators Inflamm,2017,2017:7517350.
- [5] MORRIS K T,KHAN H,AHMAD A,et al. G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration[J]. Br J Cancer,2014,110:1211-1220.
- [6] FAN Z S,LI Y,ZHAO Q,et al. Highly expressed granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor receptor(G-CSFR) in human gastric cancer leads to poor survival[J]. Med Sci Monit,2018,24:1701-1711.
- [7] SAVARESE T M,MITCHELL K,MCQUAIN C,et al. Coexpression of granulocyte colony stimulating factor and its receptor in primary ovarian carcinomas[J]. Cancer Lett,2001,162(1):105-115.
- [8] CHAKRABORTY A,GUHA S. Granulocyte colony-stimulating factor/granulocyte colony-stimulating factor receptor biological axis promotes survival and growth of bladder cancer cells[J]. Urology,2007,69(6):121-125.
- [9] WANG Y,CHEN L,LIU F,et al. Efficacy and tolerability of granulocyte colony-stimulating factors in cancer patients after chemotherapy: a systematic review and Bayesian network meta-analysis[J]. Sci Rep,2019,9(1):15374.
- [10] KARAGIANNIDIS I,SALATAJ E,SAID ABU EGAL E,et al. G-CSF in tumors: aggressiveness,tumor microenvironment and immune cell regulation[J]. Cytokine,2021,142:155479.
- [11] KUMAR J,FRASER F W,RILEY C,et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signalling via Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian cancer[J]. Br J Cancer,2014,110 (1):133-145.
- [12] KARAGIANNIDIS I,JERMAN S J,JACENIK D,et al. G-CSF and G-CSFR modulate CD4 and CD8 T cell responses to promote colon tumor growth and are potential therapeutic targets[J]. Front Immunol,2020,11:1885-1897.
- [13] KARAGIANNIDIS I,DE SANTANA VAN VILET E,SAID ABU EGAL E,et al. G-CSF and G-CSFR induce a pro-tumorigenic macrophage phenotype to promote colon and pancreas tumor growth[J]. Cancers,2020,12(10):2868-2882.
- [14] MARINO V J,ROGUIN L P. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates JAK/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line [J]. J Cell Biochem,2008,103(5):1512-1523.
- [15] CUI Y H,SUH Y,LEE H J,et al. Radiation promotes invasiveness of non-small-cell lung cancer cells through

granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Oncogene*,2015, 34 (42):5372-5382.

[16] 山周琦玥,周益臣,朱欣欣,等. 选择性自噬接头蛋白、微管相关蛋白轻链 3 和信号转导与转录激活因子 3 在食管鳞癌中的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2022,39(4):729-732.

SHAN Z Q Y,ZHOU Y C,ZHU X X,et al. Expression of sequestosome-1,microtubule-associated protein light chain 3 and signal transduction and activators of transcription factor 3 in esophageal squamous cell carcinoma and their clinical significance [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*,2022,39(4):729-732.

[17] 王琰,陈豫民,李娇娇. 信号转导及转录激活因子 3 和血管内皮生长因子在食管鳞状细胞癌组织的表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*,2016,33(3):788-790.

WANG Y,CHEN Y M,LI J J. Expression and clinical significance of signal transducer and activators of transs-cription 3 and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*,2016,33(3):788-790.

[18] JØRGENSEN C L T,FORSARE C,BENDAHL P O,et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers and phenotypes during breast cancer progression [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2020,181(2):369-381.

《肿瘤学杂志》对图和表的要求

1 图的基本要求

(1)论文中的图是对正文文字进行说明、补充,因此主题要明确,用于强调事物的性状或参数变化的总体趋势,不要与正文的文字内容重复,图的性质应与资料性质匹配。

(2)一个完整的图应该具有图题、标目、标值、图形、图注等。

(3)图应该有“自明性”,即只看图、图题、图文或图例,不阅读正文就可以理解图意。图中的缩略语应有注释,且图中的量、单位、符号、缩略语等应与正文一致。

(4)正文中提及图的内容时应标注图序号。图随文排,一般排在相应正文段落之后,即先见文字后见图。

(5)组织病理学图片应注明染色方法和放大倍数。

(6)应保护受试者的隐私。图中涉及受试者的个人信息应当隐去;人体照片只显示必要部位;颜面或全身照片,若不需要显示眼或者阴部的则需加以遮挡。

(7)引用的图应注明来源,宜获得著作权人的书面许可。

(8)编排时,要注意图的大小和图中文字、版面的整体协调性。

(9)引用我国的地图,应维护国家的统一、主权和领土完整,维护民族尊严和民族团结,体现我国的外交政策和立场,保障国家安全和利益。地图插图应符合

《地图管理条例》相关规定。须在国家测绘地理信息局等权威机构提供的最新标准底图上绘制;凡涉及国界线及省、地、县级行政区域线,必须认真核对,保证准确无误;不能泄露保密信息;保证重要地理要素及名称等齐全。

(10)需提供中、英文图各一份。

2 表的基本要求

(1)表应有“自明性”,即在不阅读正文的情况下也能理解表的内容。正文中论述表中内容时应注明表序号。正文中所有表依次按顺序编码,先见文字后见表。

(2)按照统计学制表原则设计,力求结构简洁,采用三线表,即顶线、底线、栏目线。

(3)表的纵横标目间为主谓关系,主语在表的左侧,谓语在表的右侧。

(4)表中的量、单位、符号、缩略语必须与正文一致,缩略语应在表下注释。

(5)表内数据要求同一指标小数点后有效位数一致,且与正文中保持一致。

(6)各栏参数的单位相同,可写在表题之后的括号内;参数单位不同,写在各栏标目词之后的括号内。

(7)表中不设“备注”,需要释义的可在表中相关处注释符号,如 a、b、c 等,然后在表下注释。

(8)需提供中、英文表各一份。