

## 研究论文

## Janus激酶3通过影响钙池操纵性钙通道促进乳腺癌细胞的迁移

刘夏<sup>1,2</sup>, 魏婷<sup>1,2</sup>, 高招娣<sup>1,2</sup>, 赵修梁<sup>1,2</sup>, 吴慧晴<sup>1,2</sup>, 严静<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>济宁医学院基础医学院生理学教研室, 济宁 272067; <sup>2</sup>新乡医学院基础医学院生理学与神经生物学教研室, 新乡 453003

**摘要:** 本研旨在探讨Janus激酶3 (JAK3)对乳腺癌细胞迁移能力的影响以及其作用机制。利用siRNA (siJAK3)沉默乳腺癌MCF-7细胞JAK3的表达, 用划痕实验检测细胞迁移能力, 用荧光钙成像技术检测钙池操纵性钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)活性, 用Western blot和RT-PCR检测钙池操纵性钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)过程中的重要分子Orai1和STIM1表达水平。结果显示, SOCC抑制剂2-APB对MCF-7细胞的迁移能力有抑制作用。siJAK3转染可显著抑制MCF-7细胞的迁移能力, 降低SOCC活性, 下调Orai1和STIM1的mRNA和蛋白表达水平。在JAK3沉默细胞中过表达Orai1或STIM1, 可使MCF-7细胞迁移力恢复。上述结果提示, JAK3通过影响SOCC促进乳腺癌细胞的迁移。

**关键词:**  $\text{Ca}^{2+}$ ; 钙池操纵性钙内流; Orai1; Janus激酶3

**中图分类号:** R332; R363.2; R329.2

## Janus kinase 3 facilitates the migration of breast cancer cells by store-operated calcium channel

LIU Xia<sup>1,2</sup>, WEI Ting<sup>1,2</sup>, GAO Zhao-Di<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiu-Liang<sup>1,2</sup>, WU Hui-Qing<sup>1,2</sup>, YAN Jing<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>Department of Physiology, Institute of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China; <sup>2</sup>Department of Physiology, Institute of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** The present study was aimed to investigate the effect of Janus kinase 3 (JAK3) on the migration of breast cancer cells and the underlying mechanism. The expression of JAK3 in breast cancer MCF-7 cells was silenced by siRNA (siJAK3). The migration ability of MCF-7 cells was detected by scratch test. The activity of store-operated calcium channel (SOCC) was detected by fluorescence calcium imaging. The expression levels of Orai1 and STIM1, key molecules in the process of store-operated calcium entry (SOCE) were detected by Western blot and RT-PCR. The results showed that 2-APB, an inhibitor of SOCC, could inhibit the migration ability of MCF-7 cells. siJAK3 transfection significantly inhibited the migration ability of MCF-7 cells, decreased the activity of SOCC, and down-regulated mRNA and protein expression levels of Orai1 and STIM1. Over-expression of Orai1 or STIM1 in JAK3-silenced cells restored their migration ability. These results suggest that JAK3 facilitates the migration of breast cancer cells by SOCC.

**Key words:**  $\text{Ca}^{2+}$ ; store-operated calcium entry; Orai1; Janus kinase 3

乳腺癌是一种发生于乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤, 发病率位居女性肿瘤第一位, 全球发病率一直呈现上升趋势<sup>[1]</sup>。我国的乳腺癌发病率虽低于西方国家, 但是也在不断增加<sup>[2]</sup>。乳腺癌治愈后易复发,

病因也不完全清楚, 了解乳腺癌的发生、发展机制, 从而针对性地对乳腺癌进行治疗, 是攻克乳腺癌的关键。

Janus 激酶 3 (Janus kinase 3, JAK3) 是 Janus 激酶

Received 2019-02-06 Accepted 2019-07-01

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31801172) and Young Talents Project of Henan Province, China (No. 2019HYTP031).

\*Corresponding author. Tel: +86-537-2610652; E-mail: yanjing102@mail.jnmc.edu.cn

家族的一员,属于受体酪氨酸激酶,该家族包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。JAK/signal transducers and activators of transcription (STAT) 是一条非常重要的信号通路,许多细胞因子[例如干扰素(interferon, IFN)和白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)等]和生长因子[例如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)等]都通过该信号转导通路诱导细胞的增殖、分化和凋亡<sup>[3]</sup>。JAK3 在肿瘤中高表达,其表达水平与肾细胞癌<sup>[4]</sup>、肾移植急性排斥反应<sup>[5]</sup>和淋巴瘤<sup>[6]</sup>发生密切相关,另外, JAK-STAT 信号通路异常活化可引起血液系统肿瘤<sup>[7]</sup>、肺癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌等<sup>[9]</sup>发生。Cotralla 等<sup>[10]</sup>研究显示, STAT5 在大多数乳腺癌病例中表达并进行酪氨酸磷酸化和核转位;而在前列腺癌患者中, STAT5 表达水平也明显升高<sup>[11]</sup>; Kurosawa 等<sup>[12]</sup>研究显示, STAT1 磷酸化程度与乳腺癌恶化和致死率呈正相关。Yan 等研究显示, JAK3 缺失可导致乳腺癌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 降低,但并未进一步观察 JAK3 对肿瘤细胞增殖的作用<sup>[13]</sup>。

细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  参与调节多种细胞功能,包括细胞增殖、迁移、兴奋、胞吐和死亡<sup>[14-16]</sup>。调节  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的机制包括  $\text{Ca}^{2+}$  内流、 $\text{Ca}^{2+}$  外排、 $\text{Ca}^{2+}$  库的储存和释放。这些机制协同合作,保持细胞内钙稳态,维持细胞的正常功能。在非兴奋性细胞包括肿瘤细胞中,  $\text{Ca}^{2+}$  内流主要依赖于钙池操纵性钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)。当内质网内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降到一定程度时,位于内质网膜上的 STIM (stromal interaction molecule) 移动至与细胞膜蛋白 Orai 接近的位置,活化 Orai 通道引起  $\text{Ca}^{2+}$  内流,启动钙池操纵性钙内流(store-operated calcium entry, SOCE),从而补充钙库。在人和脊椎动物体内, STIM 存在 STIM1 和 STIM2 两种同系物, Orai 存在 Orai1、Orai2 和 Orai3 三种异构体<sup>[17]</sup>。其中, Orai1 和 STIM1 复合体是 SOCC 的主要形式<sup>[18]</sup>。Orai1 的表达水平与结肠癌和乳腺癌的预后密切相关<sup>[13, 19-23]</sup>。Huang 等<sup>[21]</sup>研究显示,下调 STIM1 表达可抑制缺氧驱动的肝癌发生。在人胶质母细胞瘤细胞系 U251 和宫颈癌细胞中,敲减 STIM1 基因可通过抑制细胞增殖周期转换影响 DNA 复制和蛋白质合成,从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[13, 22, 24]</sup>。下调 STIM1 表达可抑制肝癌细胞<sup>[25]</sup>、宫颈癌细胞和胰腺癌细胞的生长<sup>[12]</sup>。肿瘤细胞的高侵袭力和转移力是肿瘤细胞的恶性化

表型,也是肿瘤研究的靶点之一,受细胞自身状态和微环境的影响。Orai1 和 STIM1 介导的 SOCC 能通过调控  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,从而促进肌肉瘤细胞<sup>[26]</sup>和结肠癌细胞<sup>[27]</sup>的迁移。本研究组前期的研究显示, JAK3 的缺失导致乳腺癌细胞内 SOCC 活性降低<sup>[13]</sup>,但 JAK3 是否通过 Orai1 影响 SOCC 以及 JAK3 对乳腺癌迁移的作用目前尚不清楚。本研究旨在探讨 JAK3 对乳腺癌细胞增殖的影响以及其作用机制,以人乳腺癌细胞系(MCF-7)迁移力为研究指标,观察 JAK3 被沉默后 SOCC 活性及其组分蛋白 Orai1 和 STIM1 蛋白表达的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养和试剂** 人乳腺癌细胞株 MCF-7 (购自中国科学院细胞库),复苏后接种于 MEM 培养基(Gibco 公司,含 10% 牛血清), 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。SOCC 抑制剂 2-APB 购自英国 Tocris 公司。

**1.2 基因沉默** 用含 25 nmol/L siRNA 的 DharmaFECT<sup>®</sup> 转染试剂(Thermo Scientific Dharmacon RNA Technology 公司,美国)孵育细胞 24 h。siRNAs 分别为 siJAK3 (siRNAs targeting JAK3)、siOrai1 (siRNAs targeting Orai1)、siSTIM1 (siRNAs targeting STIM1) 和阴性对照 siRNA (siNEG, non-targeting), 购买自美国 Dharmacon RNA 科技有限公司。使用各 siRNA 处理的细胞分别为 siJAK3 组、siOrai1 组、siSTIM1 组和 siNEG 组。转染后第二天检测干扰效率。

**1.3 基因过表达** 腺病毒包装载体构建:将鉴定过的 clontech-Orai1/STIM1 质粒(Clontech, 美国)酶切后,琼脂糖凝胶电泳分离纯化后回收含有目的基因的片段,使用 T4 连接酶连接至人工合成的腺病毒载体(Clontech 公司,美国),转化后扩增,采用有限稀释法挑选阳性单克隆、摇菌、抽提质粒、酶切鉴定。将构建成功的质粒经酶切线性化后,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(ThermoFisher 公司,美国)转染 HEK293A 细胞(Clontech 公司,美国)包装,扩增纯化并提取病毒基因组酶切鉴定。按照 Clontech 公司腺病毒纯化试剂盒(Clontech 公司,美国)的操作步骤,在 siJAK3 组细胞内分别加入重组腺病毒 Ad-Orai1/STIM1 以及对照 Ad-GFP (绿色荧光蛋白)(苏州赛业生物),孵育 4 h 后补充培养基,继续感染 40 h。检测转染效率达 80% 后用于实验。将这些 siJAK3 转染的细胞分为 Orai1 过表达(OE-

Orai1) 组、STIM1 过表达 (OE-STIM1) 组和阴性对照 (NC) 组。

**1.4 划痕实验** 准备细胞悬液, 调整细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL, 在划痕插件 (ibidi, 德国) 中每孔加入 70  $\mu$ L 细胞悬液, 倒置显微镜下记录各组细胞 0、24 h 的划痕距离差以及面积差。

**1.5 钙成像技术** 采用 Fura-2/AM (1  $\mu$ mol/L, Invitrogen 公司) 为  $\text{Ca}^{2+}$  的光指示剂。MCF-7 细胞与 Fura-2/AM 在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min 后在倒置荧光显微镜下 (Axiovert 100, 蔡司) 进行  $\text{Ca}^{2+}$  浓度测定。激发光波长为 340 或 380 nm, 在 505 nm 处进行荧光采集数据后用数据处理软件 Metafluor (MD 公司, 美国) 进行分析。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  以 340/380 nm 荧光强度比值表示。SOCE 的测定: 运行 Metafluor 软件进行实时监测, 首先以零  $\text{Ca}^{2+}$  溶液 (mmol/L: NaCl 125, KCl 5,  $\text{MgSO}_4$  1.2, HEPES 32.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,  $\text{CaCl}_2$  0, EGTA 0.5, 葡萄糖 5, pH 7.4) 灌注细胞, 稳定后加入 thapsigargin (1  $\mu$ mol/L) 检测钙池释放  $\text{Ca}^{2+}$ , 然后灌注细胞外液 (mmol/L: NaCl 125, KCl 5,  $\text{MgSO}_4$  1.2, HEPES 32.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,  $\text{CaCl}_2$  2, 葡萄糖 5, pH 7.4), 检测钙池清空后细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  的流入, 持续记录 10 min。

**1.6 Western blot** 以细胞裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 测定蛋白浓度。以 50 g 蛋白上样, 用 10% SDS-PAGE 胶垂直电泳分离电泳。电泳结束后, 将蛋白转至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 用含抗 Orai1 抗体 (1:1 000, Abcam) 抗体、抗 STIM1 抗体 (1:1 000, Abcam)、抗 JAK3 抗体 (1:1 000, Abcam) 和抗 GAPDH 抗体 (1:1 000, Abcam) 孵育过夜, TBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶标记的抗体 (1:2 000, 碧云天) 室温孵育 2 h, 再用 TBS 清洗 3 次, ECL 发光剂 (碧云天) 孵育 1 min, 在暗室中曝光和显影。所用内参为 GAPDH, 条带灰度分析使用 Quantity One 软件系统。

**1.7 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-PCR)** siRNA 转染 24 h 后, 利用 TRIzol 裂解液 (碧云天) 提取细胞 RNA, 通过检测 OD260 和 OD280 计算 RNA 浓度和纯度, 用琼脂糖凝胶电泳检测完整性。按照反转录试剂盒 (碧云天) 的实验步骤在 PCR 扩增仪 (LightCycle 480II, Roche) 上进行反转录反应, 反应条件如下: 50  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min。取反应液进行实时荧光定量 PCR, 按照 SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒 (TAKARA 公司, 日本) 实验步骤进行荧光定量 PCR 操作。引

物由上海生工设计并合成。各引物序列为: *thp* 上游引物: 5'-ACTCCTGCCACACCAGCC-3'; 下游引物: 5'-GGTCAAGTTTACAGCCAAGATTCA-3', 产物长度 218 bp; *jak3* 上游引物: 5'-GTGTGTGCTGCTATGCCTAC-3'; 下游引物: 5'-TGCTCAGACCAGTCCTCAAG-3', 产物长度 156 bp; *Orai1* 上游引物: 5'-CGTCCACAACCTCAACTCC-3'; 下游引物: 5'-AACTGTCGGTCCGCTCTTAT-3', 产物长度 241 bp; *stim1* 上游引物: 5'-CTTGGCCTGGGATCTCAGAG-3'; 下游引物: 5'-TCAGCCATTGCCTTCTTGCC-3', 产物长度 286 bp。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 包含 10  $\mu$ L SYBR Premix、cDNA 模板 2  $\mu$ L, 上下游引物各 0.6  $\mu$ L 及 DEPC 水 6.8  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 共 40 个循环, 检测 *Orai1*、*stim1*、*jak3* 和 *thp* mRNA 表达水平。*thp* mRNA 表达水平作为内参。

**1.8 细胞增殖实验** 调整细胞悬液浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 待细胞生长至 80% 融合后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 (碧云天) 10  $\mu$ L, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h, 弃上清液, PBS 清洗后加入 DMSO 100  $\mu$ L, 摇床震荡 10 min, 于酶标仪 492 nm 处检测吸光度 OD 值。细胞活性 =  $(\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) / \text{OD}_{\text{空白孔}}$ 。

**1.9 统计分析** 数据用 mean  $\pm$  SD 表示。统计学分析采用 SPSS 17.0 软件。两样本平均值比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  时认为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 siRNA 的基因沉默效果

RT-PCR 结果显示, 与 siNEG 组 ( $0.35 \pm 0.03$ ) 相比, siJAK3 组 *jak3* mRNA 表达水平 ( $0.11 \pm 0.02$ ) 显著下降, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与 siNEG 组 ( $0.42 \pm 0.13$ ) 相比, siOrai1 组 *Orai1* mRNA 表达水平 ( $0.14 \pm 0.12$ ) 显著下降, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与 siNEG 组 ( $0.52 \pm 0.06$ ) 组相比, siSTIM1 组 *stim1* mRNA 表达水平 ( $0.16 \pm 0.23$ ) 显著下降, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明沉默效果较好, 达到后续实验要求。

### 2.2 SOCC 通道抑制剂对 MCF-7 迁移的作用

为了筛选出最佳作用浓度, 我们用不同浓度的

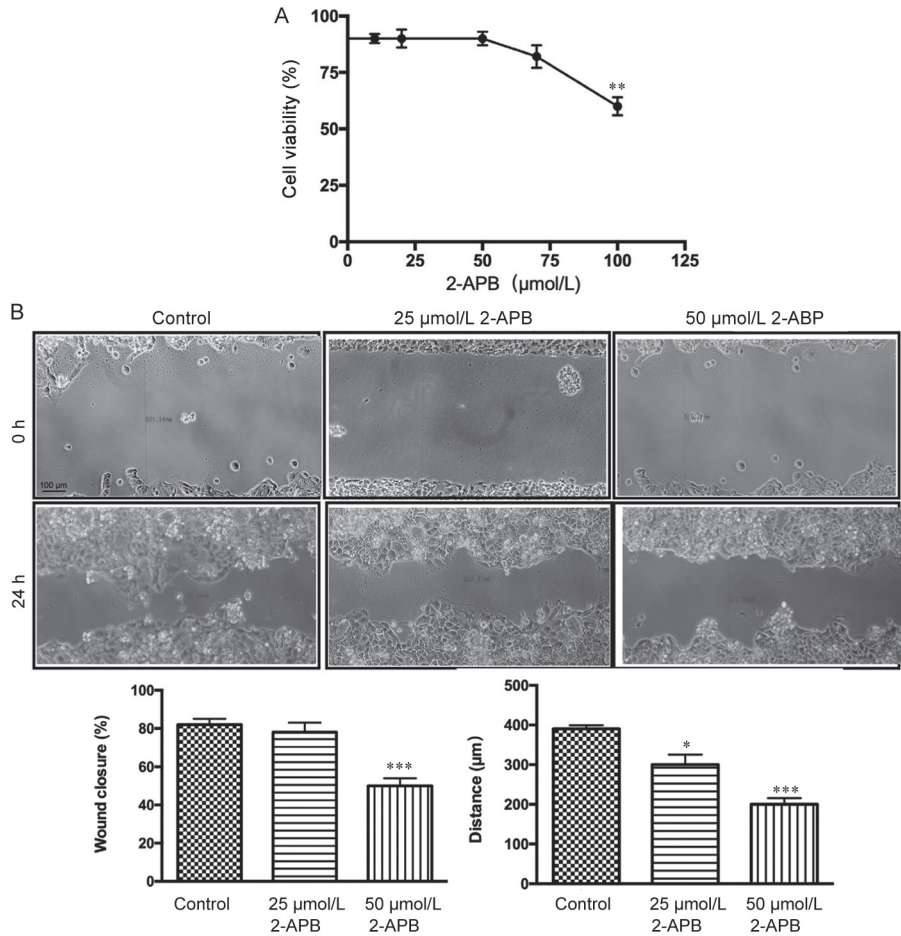


图 1. 2-APB抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖和迁移

Fig. 1. Effect of 2-APB on the proliferation and migration capacity of MCF-7 cells. *A*: Results of MTT assay. *B*: Scratch test results. Scale bar, 100 μm. Means ± SEM,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (0 μmol/L 2-APB).

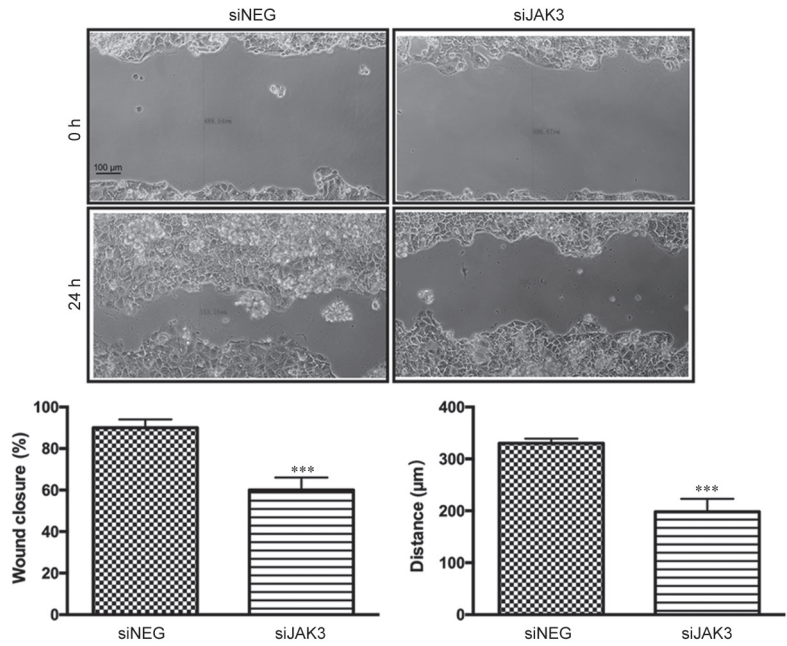


图 2. JAK3缺失使MCF-7细胞的迁移力降低

Fig. 2. JAK3 deficiency decreased the migration of MCF-7 cells. Scale bar, 100 μm. Means ± SEM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs siNEG.

2-APB (10, 25, 50, 75 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 来处理细胞 24 h。MTT 结果显示, 与对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$  2-APB) 相比, 100  $\mu\text{mol/L}$  2-APB 处理的细胞活性显著下降, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ , 图 1A)。

划痕实验结果显示, 与对照组相比, 25 和 50  $\mu\text{mol/L}$  2-APB 处理的细胞迁移距离显著增大, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ , 图 1B); 25  $\mu\text{mol/L}$  2-APB 处理的细胞迁移面积没有显著变化, 而 50  $\mu\text{mol/L}$  2-APB 处理的细胞迁移面积显著增大, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ , 图 1B)。该结果表明, 抑制 SOCC 活性能够抑制 MCF-7 细胞的迁移能力。

### 2.3 JAK3 缺失使 MCF-7 迁移力降低

划痕实验结果显示, 与 siNEG 组相比, siJAK3 组细胞的迁移距离显著下降, 迁移面积明显变小, 差异具有显著性 (均  $P < 0.001$ ) (图 2)。该结果表明 JAK3 缺失抑制了 MCF-7 细胞的迁移力。

### 2.4 JAK3 缺失抑制 SOCC 活性

Thapsigargin 能抑制肌浆网钙转运 ATP 酶 (sarcoplasmic reticulum calcium-transporting ATPases, SERCA) 活性, 阻止细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  进入内质网, 从而促进内质网钙池内  $\text{Ca}^{2+}$  的排空, 最终导致细胞膜上 SOCC 开放,  $\text{Ca}^{2+}$  内流进入细胞。钙成像结果显示, 与

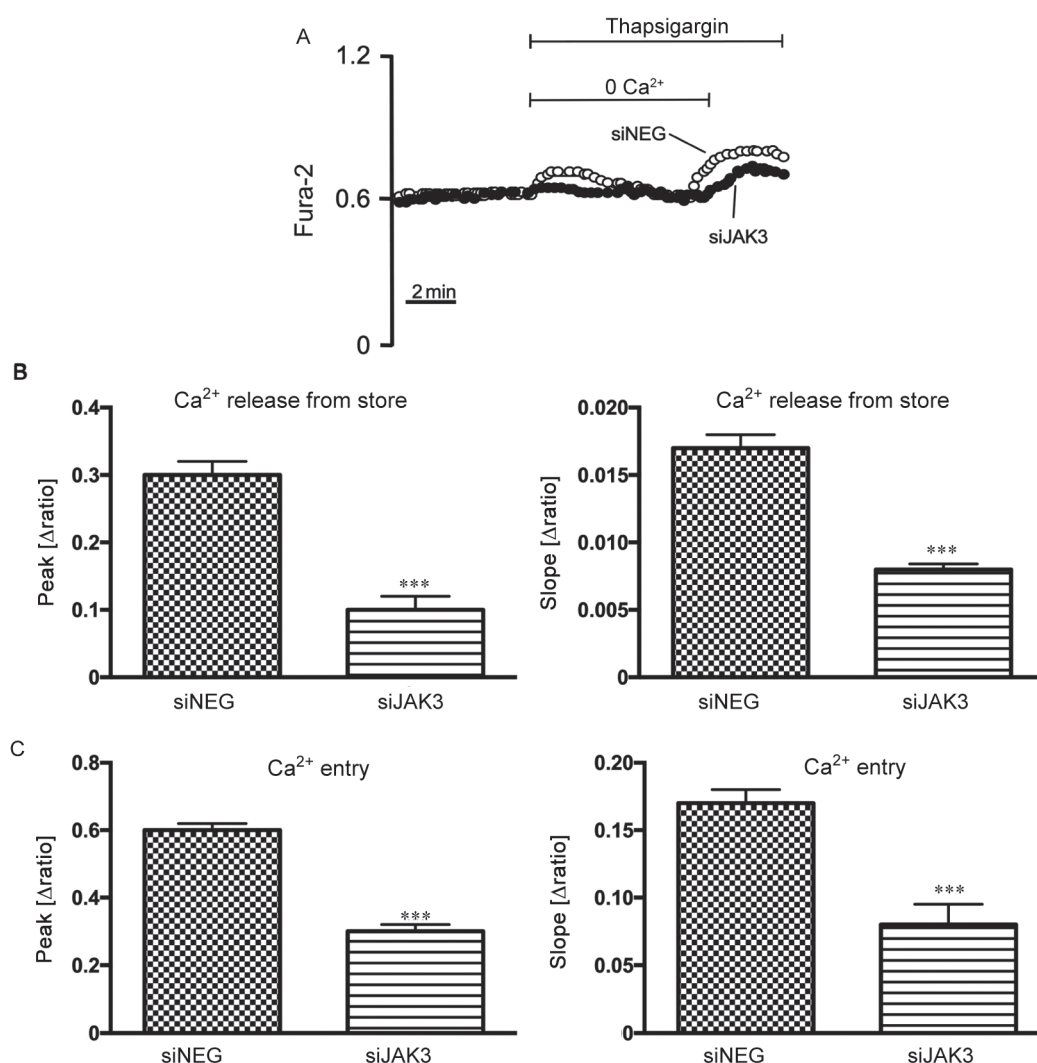


图 3. JAK3 缺失抑制钙池操纵性钙通道 (SOCC) 通道活性

Fig. 3. JAK3 deficiency inhibited store-operated calcium channel (SOCC) activity. A: Representative traces of fura-2 fluorescence ratio before and after extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  removal and addition of thapsigargin (1  $\mu\text{mol/L}$ ), as well as re-addition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in siNEG and siJAK3 MCF-7 cells. B: Slope and peak increase of fura-2 fluorescence ratio following addition of thapsigargin (1  $\mu\text{mol/L}$ ). C: Slope and peak increase of fura-2 fluorescence ratio following re-addition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  reflecting store-operated calcium entry. Means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs siNEG.

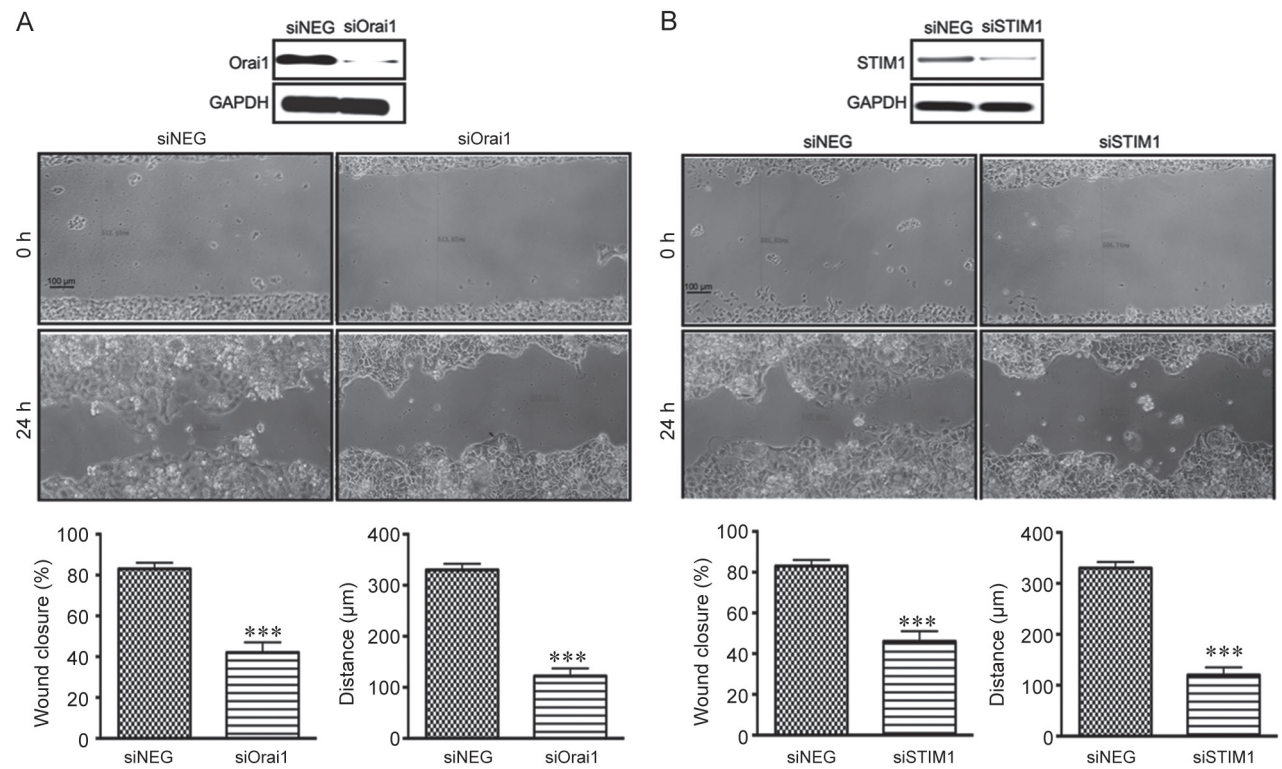


图 4. Orai1和STIM1缺失使MCF-7细胞迁移力降低

Fig. 4. Orai1 (A) and STIM1 (B) deficiency decreased the migration of MCF-7 cells. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . Means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs siNEG.

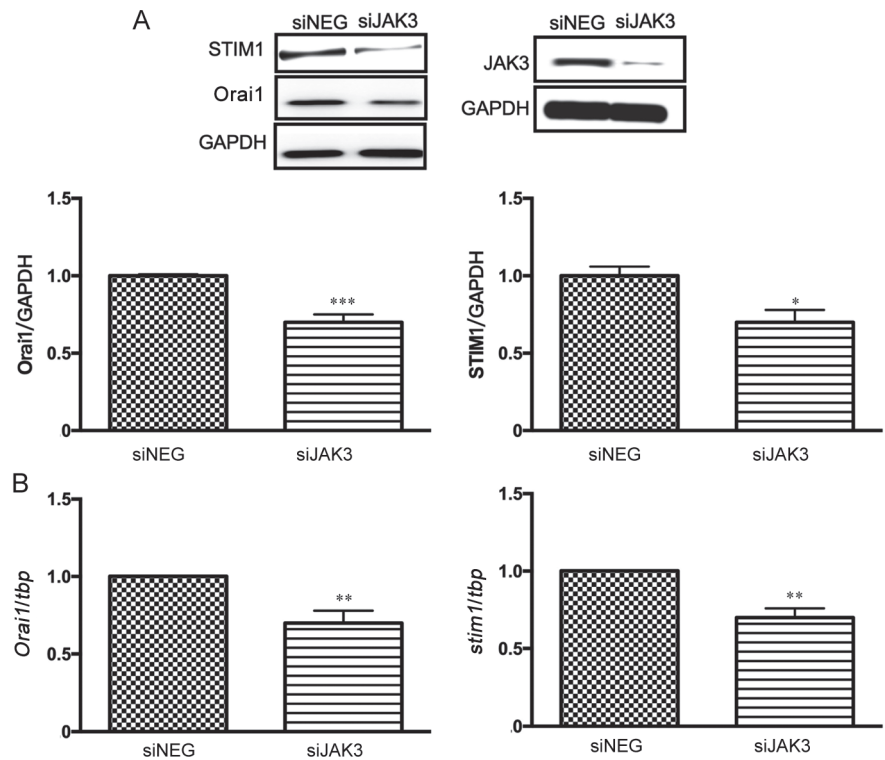


图 5. JAK3缺失抑制Orai1和STIM1表达

Fig. 5. JAK3 deficiency repressed the expression of Orai1 and STIM1 in MCF-7 cells.. A: Western blot results. B: RT-PCR results. Means  $\pm$  SEM.  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs siNEG.

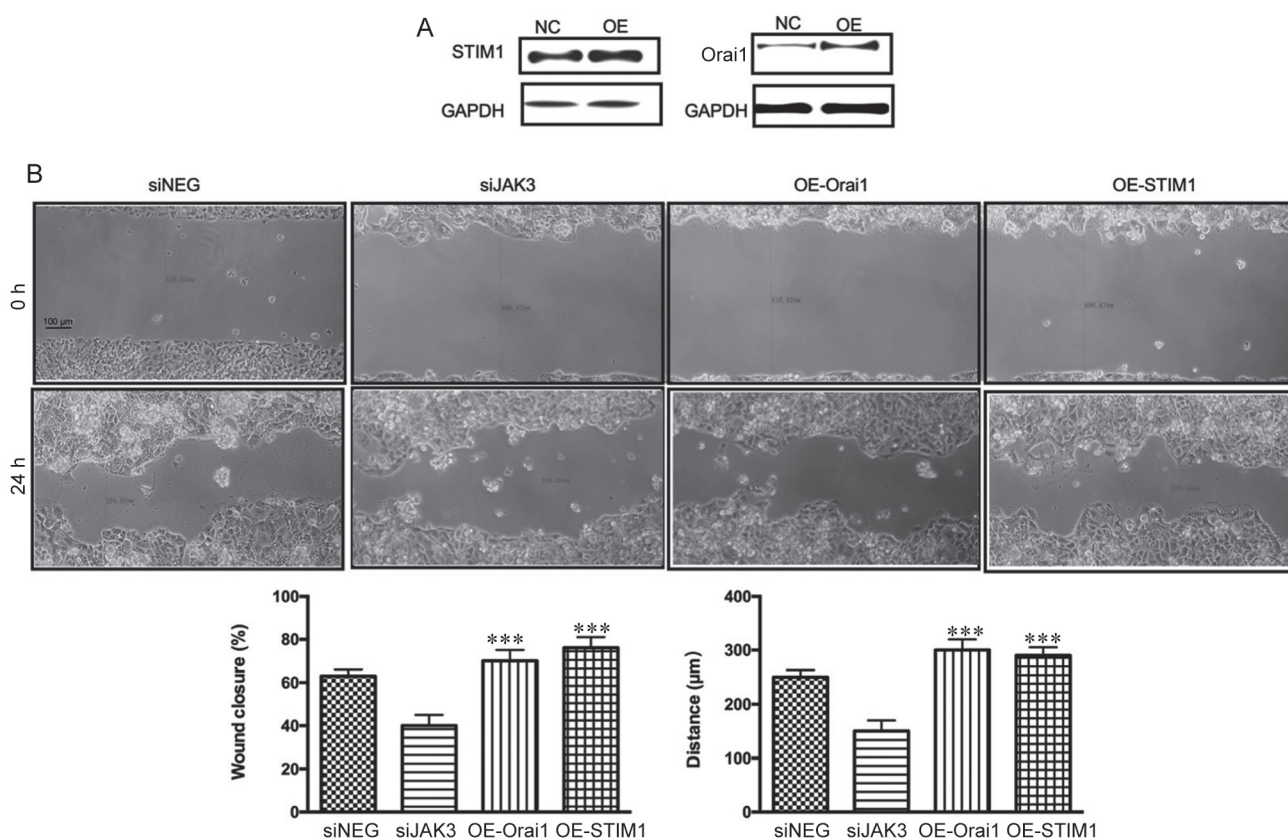


图 6. Orai1和STIM1过表达使siJAK3细胞迁移力上升

Fig. 6. Over-expression of Orai1 or STIM1 reversed the inhibitory effect of JAK3 deficiency on the migration capacity in MCF-7 cells. A: Identification of Orai1 or STIM1 over-expression with Western blot. B: Scratch test results. Scale bar, 100 μm. Means ± SEM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs siJAK3.

siNEG 组相比, siJAK3 组由于钙池的排空而导致的  $[Ca^{2+}]_i$  升高幅值和速度都明显下降, 差异具有显著性 (图 3A、B); 由于钙池排空而激活的 Orai 通道开放, 大量  $Ca^{2+}$  内流, 与 siNEG 组相比, siJAK3 组  $Ca^{2+}$  内流的幅值和速度亦明显下降 (图 3A、C)。该结果表明, JAK3 缺失显著地降低了 SOCC 活性。

## 2.5 Orai1和STIM1缺失明显抑制MCF-7迁移

划痕实验显示, 与 siNEG 组相比, siOrai1 组迁移距离下降, 迁移面积减小, 差异具有显著性 (均  $P < 0.001$ ) (图 4A)。与 siNEG 组相比, siSTIM1 组迁移距离下降, 迁移面积减小, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ) (图 4B)。该结果表明 Orai1 或 STIM1 缺失明显抑制 MCF-7 细胞迁移能力。

## 2.6 JAK3缺失使Orai1、STIM1表达量下降

Western blot 结果显示, 与 siNEG 组相比, siJAK3 组细胞 Orai1 ( $P < 0.001$ )、STIM1 ( $P < 0.05$ ) 蛋白表达量明显下调 (图 5A)。RT-PCR 结果也显示, 与 siNEG 组相比, siJAK3 组细胞内 Orai1 和 STIM1

mRNA 表达水平明显下调, 差异具有显著性 (均  $P < 0.01$ ) (图 5B)。该结果表明, JAK3 缺失抑制了 Orai1 和 STIM1 的表达。

## 2.7 JAK3缺失导致的迁移力下降与Orai1和STIM1相关

划痕实验结果显示, 与 siJAK3 组相比, OE-Orai1 组细胞迁移距离明显增加, 迁移面积也明显变大, 差异具有显著性 (均  $P < 0.001$ , 图 6B)。与 siJAK3 组相比, OE-STIM1 组细胞迁移距离明显增加, 迁移面积也明显变大, 差异具有显著性 (均  $P < 0.001$ , 图 6B)。该结果表明, 过表达 Orai1 或 STIM1 均可逆转 JAK3 缺失导致的迁移力下降。

## 3 讨论

本研究结果显示, SOCC 抑制剂 2-APB 能显著抑制人乳腺癌细胞系 MCF-7 的迁移。多项研究表明  $[Ca^{2+}]_i$  降低可抑制肿瘤细胞的侵袭 [13, 21, 22, 24, 26, 27]; 而  $[Ca^{2+}]_i$  升高时,  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白复合体与轻链钙

调蛋白结合蛋白 (light-chain caldesmon, l-CaD) 结合<sup>[28-30]</sup>, l-CaD 从肌动蛋白上解离下来, 有利于肌动蛋白和肌球蛋白结合, 促进细胞骨架的调整, 有利于细胞迁移<sup>[31]</sup>。也就是说, 2-APB 通过抑制 SOCC 导致 MCF-7  $[Ca^{2+}]_i$  降低, 从而影响迁移力。我们进一步分别沉默了 MCF-7 细胞 Orai1 和 STIM1, 发现 Orai1 或 STIM1 的缺失明显妨碍了 MCF-7 的迁移, 从而确认了 SOCC 组分蛋白和乳腺癌细胞迁移的相关性。

本研究结果显示, 利用基因沉默技术沉默 JAK3 后, 显著地抑制了细胞的迁移能力。JAK3 的缺失导致乳腺癌  $[Ca^{2+}]_i$  降低<sup>[32, 33]</sup>, 且 JAK3 的活化与肺癌发生密切相关<sup>[34, 35]</sup>, 提示 JAK3 可能通过提高  $[Ca^{2+}]_i$  促进癌细胞生长。此外, JAK3 的下游因子 STAT 蛋白被活化后, 许多基因的表达得到上调, 例如热休克蛋白 70 和核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 等<sup>[3]</sup>。值得注意的是, NF- $\kappa$ B 能促进 Orai1/STIM1 的表达<sup>[36]</sup>, 因而我们推测 STAT 激活后通过上调 NF- $\kappa$ B 导致 Orai1/STIM1 表达增加。JAK3 的缺失显著下调了 Orai1/STIM1 mRNA 和蛋白表达水平, 导致 SOCC 活性降低, 其机制很可能是 JAK3 沉默导致 STAT 活化降低, 影响了 STAT 入核, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 从而下调 SOCC 通道组分蛋白的表达。

为了进一步确认 JAK3 是否通过 Orai1 和 STIM1 影响乳腺癌细胞迁移, 我们构建了 Orai1 或 STIM1 过表达细胞株, 发现 Orai1 或 STIM1 过表达可使 siJAK 细胞迁移力恢复, 表明 JAK3 缺失导致的迁移力降低可被过表达 Orai1 或 STIM1 而逆转。

综上所述, 本研究结果表明 JAK3 通过影响 SOCC 从而调控 MCF-7 细胞的迁移, 参与了乳腺癌的发展。本研究结果还有待于在乳腺癌动物模型或临床上进行检验。

### 参考文献

- Chen Q, Li S, Wang M, Liu L, Chen G. Health-related quality of life among women breast cancer patients in eastern China. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 1452635.
- Li YL, Qin YC, Tang LY, Liao YH, Zhang W, Xie XM, Liu Q, Lin Y, Ren ZF. Patient and care delays of breast cancer in China. *Cancer Res Treat* 2018; 51: 1098-1106.
- Yan J, Hosseinzadeh Z, Zhang B, Froeschl M, Schulze-Osthoff K, Stournaras C, Lang F. Decrease of store-operated  $Ca^{2+}$  entry and increase of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange by pharmacological JAK2 inhibition. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38(2): 683-695.
- Magkou C, Giannopoulou I, Theohari I, Fytou A, Rafailidis P, Nomikos A, Papadimitriou C, Nakopoulou L. Prognostic significance of phosphorylated STAT-1 expression in premenopausal and postmenopausal patients with invasive breast cancer. *Histopathology* 2012; 60(7): 1125-1132.
- Wang G, Qian P, Xu Z, Zhang J, Wang Y, Cheng S, Cai W, Qian G, Wang C, Decoster MA. Regulatory effects of the JAK3/STAT1 pathway on the release of secreted phospholipase  $A_2$ -IIA in microvascular endothelial cells of the injured brain. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 170.
- Degryse S, Bornschein S, de Bock CE, Leroy E, Vanden Bempt M, Demeyer S, Jacobs K, Geerdens E, Gielen O, Soulier J, Harrison CJ, Constantinescu SN, Cools J. Mutant JAK3 signaling is increased by loss of wild-type JAK3 or by acquisition of secondary JAK3 mutations in T-ALL. *Blood* 2018; 131(4): 421-425.
- Waldmann TA. JAK/STAT pathway directed therapy of T-cell leukemia/lymphoma: Inspired by functional and structural genomics. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 451: 66-70.
- Deng Y, Li Y. Linderacalactone inhibits human lung cancer growth by modulating the expression of apoptosis-related proteins, G2/M cell cycle arrest and inhibition of JAK/STAT signalling pathway. *J BUON* 2019; 24(2): 566-571.
- Borges S, Moudilou E, Vouyovitch C, Chiesa J, Lobie P, Mertani H, Raccurt M. Involvement of a JAK/STAT pathway inhibitor: cytokine inducible SH2 containing protein in breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 617: 321-329.
- Cotarla I, Ren S, Zhang Y, Gehan E, Singh B, Furth PA. Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers. *Int J Cancer* 2004; 108(5): 665-671.
- Thoma C. Prostate cancer: Radiosensitized by STAT5 blockade. *Nat Rev Urol* 2018; 15(4): 203.
- Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T, Shirota T, Itabe H, Kamijo R. Expression of nephronectin is inhibited by oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. *FEBS Open Bio* 2015; 5: 303-307.
- Yan J, Schmid E, Hosseinzadeh Z, Honisch S, Shumilina E, Fuchs J, Lang F. Impact of Janus kinase 3 on cellular  $Ca^{2+}$  release, store operated  $Ca^{2+}$  entry and  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger activity in dendritic cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36(6): 2287-2298.
- Magi S, Castaldo P, Macri ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, Gratteri S, Amoroso S, Lariccia V. Intracellular calcium dysregulation: implications for Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6701324.
- Yan J, Almilaji A, Schmid E, Elvira B, Shimshek DR, van der Putten H, Wagner CA, Shumilina E, Lang F. Leucine-rich

- repeat kinase 2-sensitive  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger activity in dendritic cells. *FASEB J* 2015; 29(5): 1701–1710.
- 16 Burgoyne RD. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(3): 182–193.
  - 17 Kwon J, An H, Sa M, Won J, Shin JI, Lee CJ. Orai1 and Orai3 in combination with Stim1 mediate the majority of store-operated calcium entry in astrocytes. *Exp Neurobiol* 2017; 26(1): 42–54.
  - 18 Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 2006; 443(7108): 230–233.
  - 19 Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, Morelli A, Falzoni S, Girolomoni G, Idzko M, Dichmann S, Norgauer J, Di Virgilio F. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J* 2000; 14(15): 2466–2476.
  - 20 Maurya R, Bhattacharya P, Ismail N, Dagur PK, Joshi AB, Razdan K, McCoy JP, Ascher J, Dey R, Nakhasi HL. Differential role of leptin as an immunomodulator in controlling visceral leishmaniasis in normal and leptin-deficient mice. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95(1): 109–119.
  - 21 Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC,  $\text{I}_{\text{crac}}$  and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; 8(9): 1003–1010.
  - 22 Li Y, Guo B, Xie Q, Ye D, Zhang D, Zhu Y, Chen H, Zhu B. STIM1 mediates hypoxia-driven hepatocarcinogenesis via interaction with HIF-1. *Cell Rep* 2015; 12(3): 388–395.
  - 23 Vashisht A, Trebak M, Motiani RK. STIM and Orai proteins as novel targets for cancer therapy. A review in the theme: cell and molecular processes in cancer metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(7): C457–C469.
  - 24 Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, Shuba Y. Remodelling of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1638): 20130097.
  - 25 Picard C, McCarl CA, Papolos A, Khalil S, Lüthy K, Hivroz C, LeDeist F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A, Feske S. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 2009; 360(19): 1971–1980.
  - 26 Schmid E, Stagno MJ, Yan J, Stournaras C, Lang F, Fuchs J, Seitz G. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 477(1): 129–136.
  - 27 Gui L, Wang Z, Han J, Ma H, Li Z. High expression of Orai1 enhances cell proliferation and is associated with poor prognosis in human colorectal cancer. *Clin Lab* 2016; 62(9): 1689–1698.
  - 28 Gerthoffer WT, Pohl J. Caldesmon and calponin phosphorylation in regulation of smooth muscle contraction. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72(11): 1410–1414.
  - 29 Wang CL. Caldesmon and smooth-muscle regulation. *Cell Biochem Biophys* 2001; 35(3): 275–288.
  - 30 Kohler CN. The actin-binding protein caldesmon is in spleen and lymph nodes predominately expressed by smooth-muscle cells, reticular cells, and follicular dendritic cells. *J Histochem Cytochem* 2010; 58(2): 183–193.
  - 31 Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 2009; 326(5957): 1208–1212.
  - 32 Yan J, Zhang B, Hosseinzadeh Z, Lang F. Down-regulation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in MCF-7 breast cancer cells by pharmacological JAK3 inhibition. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38(4): 1643–1651.
  - 33 Ye Q, Kantonen S, Gomez-Cambronero J. Serum deprivation confers the MDA-MB-231 breast cancer line with an EGFR/JAK3/PLD2 system that maximizes cancer cell invasion. *J Mol Biol* 2013; 425(4): 755–766.
  - 34 Yoo W, Jung HY, Lim S, Sung JS, Park KH, Ryu JS, Shin SW, Kim JS, Seo JH, Kim YH. An association study of polymorphisms in JAK3 gene with lung cancer in the Korean population. *Cancer Res Treat* 2011; 43(2): 108–116.
  - 35 Li SD, Ma M, Li H, Waluszko A, Sidorenko T, Schadt EE, Zhang DY, Chen R, Ye F. Cancer gene profiling in non-small cell lung cancers reveals activating mutations in JAK2 and JAK3 with therapeutic implications. *Genome Med* 2017; 9(1): 89.
  - 36 Lang F, Eylestein A, Shumilina E. Regulation of Orai1/STIM1 by the kinases SGK1 and AMPK. *Cell Calcium* 2012; 52(5): 347–354.