



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250206
<http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250206>
China Journal of General Surgery, 2025, 34(8):1709-1717.

· 基础研究 ·

抑制 JAK/STAT 信号通路对肝癌细胞生物学行为的调控及机制

王鹏¹, 李守川¹, 张旭², 汝文娟³

(青岛大学附属青岛市海慈医院 1. 普外三科 2. 手术室 3. 普外二科, 山东 青岛 266000)

摘要

背景与目的: 肝细胞癌 (HCC) 是常见的恶性肿瘤之一, 发病率和病死率均居高不下。Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路在调控细胞增殖、凋亡及免疫应答中发挥重要作用, 其持续激活与肝癌的发生发展密切相关。本研究旨在探讨 JAK2 抑制剂 AG490 与 STAT3 通路相关抑制剂雷帕霉素 (RPM) 对肝癌细胞生物学行为的影响及其分子机制。

方法: 采用人肝癌细胞系 HepG2, 分为空白对照组、AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组。通过 MTT 法、划痕实验和流式细胞术分别检测细胞的增殖、迁移和凋亡; 利用 ELISA 和 qRT-PCR 检测 Bax、Bcl-2、caspase-3、survivin 和 c-Myc 的蛋白及 mRNA 表达; Western blot 检测 JAK2、STAT3 及其磷酸化水平。

结果: 与对照组比较, AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组的肝癌细胞的增殖和迁移能力均被明显抑制, 细胞凋亡明显增加, 其中 AG490+RPM 组作用最为明显 (均 $P<0.05$)。各抑制剂处理组均表现为 Bax 和 caspase-3 表达升高, Bcl-2、survivin 和 c-Myc 表达下降, 且 AG490+RPM 组变化幅度最大 (均 $P<0.05$)。同时, p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 比值在各抑制剂处理组均明显降低, 以 AG490+RPM 组最低 (均 $P<0.05$)。

结论: 靶向 JAK/STAT 通路的抑制剂能够显著抑制肝癌细胞的增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡, 其机制可能与下调 p-JAK2 和 p-STAT3 水平、调控相关凋亡和增殖基因表达有关。AG490 与 RPM 联合应用显示出更强的抗肿瘤作用, 提示多靶点联合阻断 JAK/STAT 通路有望成为肝癌治疗的新策略。

关键词

癌, 肝细胞; Janus 激酶抑制剂; 西罗莫司; 细胞增殖; 细胞凋亡; 分子靶向治疗

中图分类号: R735.7

Regulation of JAK/STAT pathway inhibition on the biological behavior of hepatocellular carcinoma cells and the mechanism

WANG Peng¹, LI Shouchuan¹, ZHANG Xu², RU Wenjuan³

(1. The Third Department of General Surgery 2. Operating Room 3. the Second Department of General Surgery, Qingdao Haici Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China)

Abstract

Background and Aims: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies, with high incidence and mortality. The JAK/STAT signaling pathway plays a crucial role in regulating cell proliferation, apoptosis, and immune responses, and its persistent activation is closely associated

收稿日期: 2025-04-14; 修订日期: 2025-08-12。

作者简介: 王鹏, 青岛大学附属青岛市海慈医院主治医师, 主要从事肝胆胰脾方面的研究。

通信作者: 李守川, Email: 8210160000@163.com

with the development of HCC. This study aimed to investigate the effects of the JAK2 inhibitor AG490 and the STAT3-related inhibitor rapamycin (RPM) on the biological behaviors of HCC cells and their underlying molecular mechanisms.

Methods: Human hepatoma HepG2 cells were divided into four groups: blank control, AG490, RPM, and AG490+RPM. Cell proliferation, migration, and apoptosis were assessed by MTT assay, scratch test, and flow cytometry, respectively. ELISA and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of Bax, Bcl-2, caspase-3, survivin, and c-Myc. A Western blot analysis was performed to examine the expression and phosphorylation levels of JAK2 and STAT3.

Results: Compared with the blank control group, the AG490, RPM, and AG490+RPM groups showed significantly decreased cell proliferation and migration abilities, as well as increased apoptosis, with the most pronounced effects observed in the AG490+RPM group (all $P<0.05$). Inhibitor-treated groups showed elevated expression of Bax and caspase-3, decreased expression of Bcl-2, survivin, and c-Myc, with the most significant changes in the AG490+RPM group (all $P<0.05$). In addition, the ratios of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were significantly reduced in all treated groups, with the lowest levels in the AG490+RPM group (all $P<0.05$).

Conclusion: Inhibitors targeting the JAK/STAT pathway significantly suppress proliferation and migration, and induce apoptosis in HCC cells, possibly by downregulating p-JAK2 and p-STAT3, as well as modulating genes related to apoptosis and proliferation. The combined use of AG490 and RPM exhibits superior antitumor effects, suggesting that multi-target blockade of the JAK/STAT pathway may represent a promising therapeutic strategy for HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Janus Kinase Inhibitors; Sirolimus; Cell proliferation; Apoptosis; Molecular Targeted Therapy

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率均居高不下, 对人类健康构成严重威胁^[1-2]。肝癌起病隐匿, 早期症状不典型, 多数患者确诊时已属中晚期, 丧失了手术切除的最佳时机。对于中晚期肝癌, 尽管已有放化疗、靶向治疗和免疫治疗等多种手段, 但由于肿瘤异质性强、易产生耐药性, 患者的总体预后仍不理想^[3]。因此, 深入探索肝癌的发生发展机制, 寻找新的有效治疗靶点, 对于改善患者预后至关重要。

近年来, 肿瘤微环境在肝癌进展中的作用备受关注。肿瘤细胞并非孤立存在, 而是与周围的免疫细胞、基质细胞、血管以及多种细胞因子等共同构成一个复杂的生态系统^[4-6]。在这个微环境中, 肿瘤细胞通过多种机制, 如上调程序性死亡配体 1 (PD-L1) 等免疫检查点分子的表达、分泌转化生长因子 β (TGF- β) 和白细胞介素 10 (IL-10) 等免疫抑制因子, 来抑制 T 细胞等免疫细胞的杀伤

功能, 从而实现免疫逃逸^[7-9]。因此, 靶向调控肿瘤微环境、逆转免疫抑制状态已成为肝癌治疗的新方向。

Janus 激酶/信号转导与转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路是细胞因子信号转导的关键枢纽, 在调控细胞增殖、分化、凋亡及免疫应答中扮演核心角色^[10-12]。该通路的经典激活模式为: 细胞因子与受体结合, 激活 JAK 激酶, 进而磷酸化 STAT 蛋白; 磷酸化的 STAT 蛋白 (p-STAT) 形成二聚体并入核, 作为转录因子调控下游靶基因的表达。在肝癌中, JAK/STAT 通路特别是 STAT3 的持续性异常激活, 已被证实是驱动肿瘤细胞恶性生物学行为的关键因素, 它能促进细胞周期进程、抑制细胞凋亡, 并与肿瘤的侵袭和转移密切相关^[13-14]。更重要的是, 持续激活的 JAK/STAT 通路是连接肿瘤细胞内信号与肿瘤免疫微环境的关键桥梁。研究表明, 激活的 STAT3 能够上调 PD-L1 的表达, 帮助肿瘤细胞抵抗 T 细胞的攻击^[15-17], 同时促进血管

内皮生长因子(VEGF)等促血管生成因子的分泌,为肿瘤生长提供养分。因此,抑制JAK/STAT通路不仅可能直接杀伤肿瘤细胞,还可能重塑肿瘤免疫微环境,增强机体的抗肿瘤免疫力,具有一定的治疗潜力。

AG490是一种经典的JAK2酪氨酸激酶抑制剂^[18-19],而雷帕霉素(rapamycin, RPM)则作为mTOR抑制剂,在多种肿瘤研究中被广泛应用^[20-21],并且越来越多的证据表明mTOR信号通路与JAK/STAT通路之间存在复杂的串扰,抑制mTOR也能间接影响STAT3的活性^[22-23]。然而,目前尚不清楚联合使用JAK2特异性抑制剂AG490与STAT3通路相关抑制剂RPM是否能在肝癌细胞中产生更强的抗肿瘤效果。基于此,本研究旨在通过联合应用AG490和RPM,探讨双重阻断JAK/STAT信号通路对肝癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响,并阐明其潜在的分子调控机制,为开发更有效的肝癌靶向治疗策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

细胞与试剂:人肝癌HepG2细胞(货号:CL-0103)购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。培养液为含10%胎牛血清(Gibco,货号:10099141)、1%青-链霉素(Solarbio,货号:P1400)的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)高糖培养基(Gibco,货号:11965092)。JAK2抑制剂AG490(MCE,货号:HY-12003)、STAT3抑制剂RPM(MCE,货号:HY-10219)。DMEM培养基(江苏齐氏生物科技有限公司);PBS溶液(上海源叶生物科技有限公司);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(BD Biosciences,货号:556547);B淋巴细胞瘤2基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱天冬酶3(caspase-3)ELISA试剂盒(上海广锐生物科技有限公司,货号:GR1022、GR1023、GR1025)。TRIzol试剂(Invitrogen,货号:15596026);逆转录试剂盒和SYBR Green qPCR Mix(Takara,货号:RR047A、RR820A)。RIPA裂解液(Solarbio,货号:R0010)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Fisher,货号:23225)。JAK2(Abcam, ab108596, 1:1 000稀释)、STAT3(Abcam, ab68153, 1:1 000稀释)、p-JAK2(CST, #3776,

1:1 000稀释)、p-STAT3(CST, #9145, 1:1 000稀释)及GAPDH(Abcam, ab181602, 1:5 000稀释)一抗。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(Abcam, ab205718, 1:5 000稀释)。

仪器:CKx41型号倒置相差显微镜(日本Olympus公司);iMark型号全波长酶标仪(美国BIO-RAD公司);Micro17型号微量离心机(美国Thermo公司);9700型号荧光定量PCR仪器(美国ABI公司);CytoFLEX流式细胞仪(美国Beckman公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与处理 显微镜观察HepG2细胞,确保其无其他微生物污染,使用PBS冲洗3次,并用胰酶消化,脱落细胞,并加入少量DMEM培养基,终止胰酶的消化,收集细胞后离心去除上清液,调整细胞数量为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,再加入细胞冻存液(0.1 mL DMSO和1 mL胎牛血清),混匀后转移至冻存管,并行梯度预冷,将冻存管最终保存在 -80°C 冻存管中。细胞复苏:将冻存管从 -80°C 中取出来,快速放置在 37°C 水浴箱中,在超净工作台中酒精消毒,并转移至离心管中,加入适量的DMEM培养基离心,离心后去除上清液,加入适量的DMEM培养基,混匀后转移至新培养瓶培育。细胞培养:在5% CO_2 和 37°C 培养箱中,次日更换培养基,待细胞长至80%以上,滴加适量胰蛋白酶,1:3细胞传代,获得实验所用的对数生长期细胞。取对数生长期HepG2细胞,分为4组:(1)空白对照组(用含等浓度PBS的DMEM培养液处理);(2)AG490组(用含 $50 \mu\text{mol/L}$ AG490的DMEM培养液处理);(3)RPM组(用含 20 nmol/L RPM的DMEM培养液处理);(4)AG490+RPM组(用含 $50 \mu\text{mol/L}$ AG490和 20 nmol/L RPM的DMEM培养液处理)。空白对照组作为基础对照,AG490组用于评价JAK2抑制的作用,RPM组用于评价STAT3通路阻断的作用,AG490+RPM组用于探讨双重抑制是否具有协同效应,从而比较不同抑制方式对HepG2细胞生物学行为的差异影响。所有实验均独立重复3次。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖 收集对数期细胞,以 $6 \times 10^3/\text{孔}$ 接种于96孔板,贴壁后按分组处理48 h。每孔加入MTT溶液(5 mg/mL) $20 \mu\text{L}$,使其终浓度为 0.5 mg/mL ,继续培养4 h。吸去培养液,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,摇床震荡10 min。在492 nm波长下

测定吸光度(OD)值,计算抑制率,公式为(空白对照吸光度-试验组吸光度)/(空白对照吸光度-空白孔吸光度)×100%。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁徙能力 将 $5 \times 10^6/\text{mL}$ HepG2 细胞放置6孔板中,待细胞生长至80%后,按照不同实验分组培育,48 h后,使用0.2 mL吸头垂直于细胞,进行划痕,每孔的痕迹大小为 $20 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,并设置多个复孔,使用PBS缓冲液冲洗划痕区域,冲洗3遍,尽可能去掉刮落细胞,并吸取适量DMEM培养液,倒置显微镜先拍照观察0 h位置,放置在5% CO_2 和37 ℃培养箱中,48 h后再用倒置显微镜拍照48 h位置,细胞的愈合率计算公式为 $(1-48 \text{ h 面积}/0 \text{ h 面积}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集对数期生长细胞,接种在6孔板,调整密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,按照不同实验分组加入培养液,培养24 h后,离心后收集细胞,使用PBS缓冲液洗涤,去除上清液,再加入结合缓冲液悬浮细胞,取出 1×10^5 个细胞,分别加入5 μL PI/PE 和 Annexin V/FITC 溶液,避光振荡15 min,使用流式细胞仪测定各组细胞凋亡情况。

1.2.5 ELISA 法检测细胞 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 收集对数生长期细胞,接种在24孔板,各组设置6个复孔,每孔 1×10^5 个,按照不同实验分组加入培养液,培养24 h后,离心收集细胞,重悬后使用PBS缓冲液洗涤,离心弃去上清液,沉淀后加入裂解液持续30 min,每隔5 min振荡1次,最后离心15 min,取上清液-20 ℃保存,ELISA法测定各组细胞 Bax、Bcl-2 和 caspase-3。

1.2.6 qRT-PCR 法测定细胞 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达 收集对数生长期细胞,在6 cm培养皿中,培养细胞贴壁后,密度 5×10^7 个/皿,各组设置3个复孔,按照不同实验分组加入培养液,培养24 h后提取各组细胞总RNA,使用TRIzol试剂提取RNA,鉴定纯度在1.8~2.0之间,方可认为RNA提取合格。PCR仪测定 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA, Bax 上游引物:5'-GCT ACA GGG TTT CAT CCA GGG T-3',下游引物:5'-TGT TGT CCA GTT GCC ATC GC-3'; Bcl-2 上游引物:5'-CGG GAG ATC GTG ATG AAG TAC-3',下游引物:5'-CTC AGG CTG GAA GGA GAA GA-3'; survivin 上游引物:5'-CAC CGC ATC TCT ACA TTC AA-3',下游引物:5'-CAC TTT CTT CGC AGT TTC CT-3'; c-Myc 上游引物:5'-ATC ACA

GCC CTC ACT CAC-3',下游引物:5'-ACA GAT TCC ACA AGG TGC-3'; GAPDH 上游引物:5'-CAA GGA GTA AGA AAC CCT GGA-3',下游引物:5'-CCC TGT TGT TAT GGG GTC TGG-3'。PCR反应步骤:预变性95 ℃ 1 min;变性95 ℃ 10 s;退火60 ℃ 20 s;延伸72 ℃ 15 s,循环40次,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达。

1.2.7 Western blot 法测定细胞 JAK2、STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达 收集对数生长期细胞,接种在6孔板中,各组设置3个复孔,按照不同实验分组加入培养液,培养24 h后,离心收集细胞,使用PBS缓冲液冲洗3次,加入RIPA裂解液,冰浴30 min,离心后取上清液,BCA法测定蛋白浓度,变性后放置-70 ℃保存。蛋白样品在进行凝胶电泳、转膜后,使用5%脱脂奶粉封闭1 h,加入TBST溶液冲洗,加入 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 和 GAPDH 一抗(1:1 000),孵育过夜(4 ℃),TBST溶液系膜,然后加入二抗,比例为1:4 000,室温下孵育1 h,最后用TBST溶液洗涤,采用超敏增强化学发光显像技术,将平板推入凝胶扫描成像系统。根据光强度确定曝光时间。完成成像后,导出并保存图片。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0进行统计分析。所有计量资料经 Shapiro-Wilk 检验验证其符合正态分布,并经 Levene 检验验证符合方差齐性。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制剂对肝癌细胞增殖的影响

MTT实验结果显示,48 h时,与空白对照组比较,AG490组、RPM组和AG490+RPM组的 OD_{492} 值明显降低(均 $P < 0.05$);与AG490组和RPM组比较,AG490+RPM组细胞的 OD_{492} 值明显降低(均 $P < 0.05$);AG490组细胞的 OD_{492} 值明显低于RPM组(均 $P < 0.05$)(图1)。

2.2 抑制剂对肝癌细胞迁徙能力的影响

划痕实验结果显示,与空白对照组比较,AG490组、RPM组和AG490+RPM组的愈合率均明显降低(均 $P < 0.05$);与AG490组和RPM组比较,

AG490+RPM 组细胞的愈合率明显降低 (均 $P<0.05$); AG490 组细胞愈合率明显低于 RPM 组 (均 $P<0.05$) (图 2)。

2.3 抑制剂对肝癌细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,与空白对照组比较,AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组的凋亡率均明显升高 (均 $P<0.05$);与 AG490 组和 RPM 组比较,AG490+RPM 组细胞的凋亡率均明显升高 (均 $P<0.05$);AG490 组细胞凋亡率明显高于 RPM 组 ($P<0.05$) (图 3)。

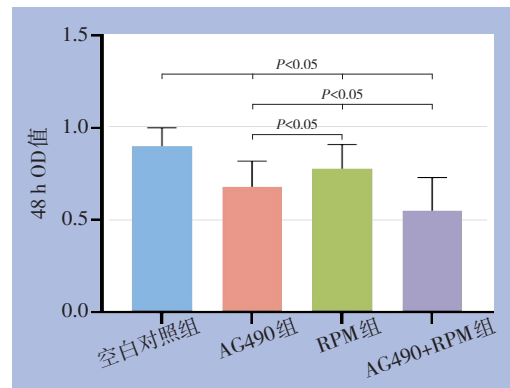


图1 各组细胞增殖情况比较

Figure 1 Comparison of cell proliferation among groups

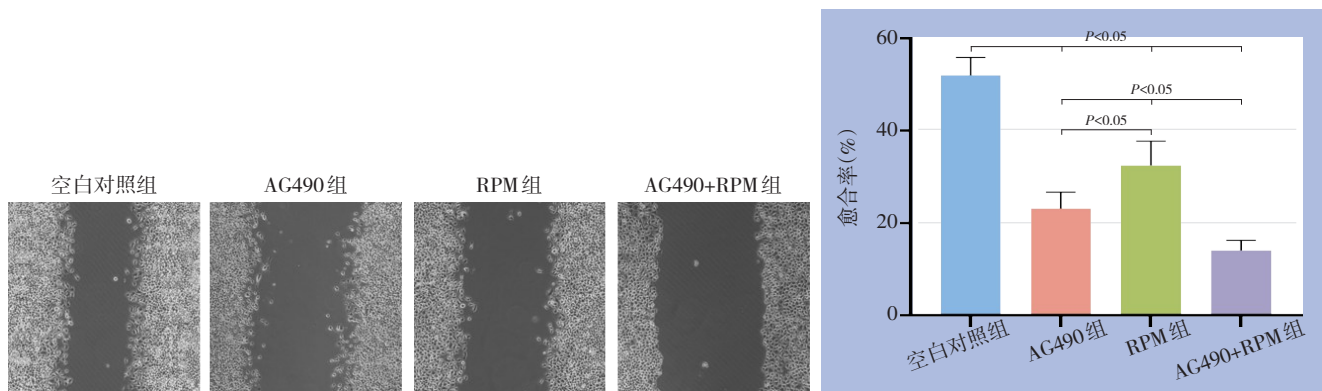


图2 各组划痕实验结果

Figure 2 Scratch wound healing assay results of each group

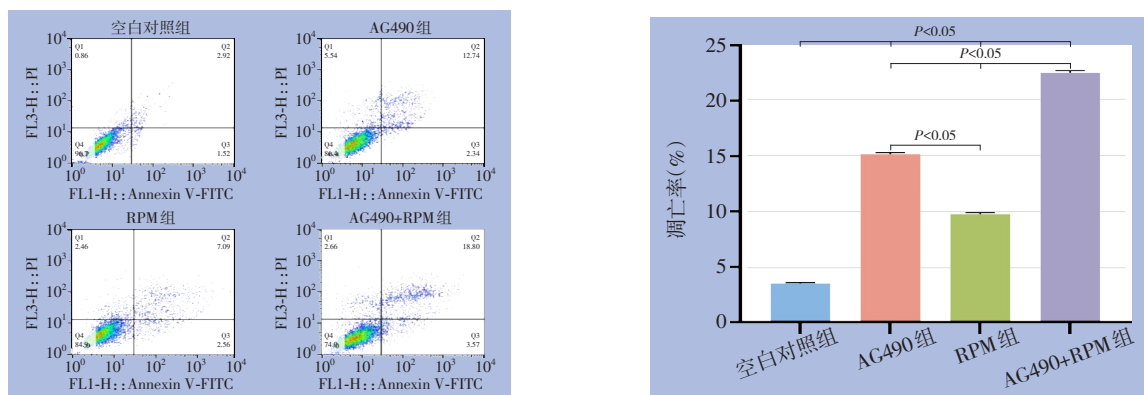


图3 各组细胞凋亡检测情况

Figure 3 Apoptosis analysis of cells in each group

2.4 抑制剂对凋亡相关蛋白表达的影响

ELISA 结果显示,与空白对照组比较,AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组 Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平均明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 (均 $P<0.05$);与 AG490 组和 RPM 组比较,AG490+

RPM 组细胞中 Bax 和 caspase-3 蛋白表达均明显升高, Bcl-2 蛋白表达均明显降低 (均 $P<0.05$);AG490 组细胞中 Bax 和 caspase-3 蛋白表达明显高于 RPM 组, Bcl-2 蛋白表达明显低于 RPM 组 (均 $P<0.05$) (表 1)。

表 1 各组细胞 Bax, Bcl-2, caspase-3 蛋白水平 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Protein levels of Bax, Bcl-2, and caspase-3 in each group (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	caspase-3
空白对照组	56.01±6.43	323.12±54.03	210.55±15.04
AG490 组	182.39±10.04 ¹⁾	223.41±29.05 ¹⁾	503.12±33.98 ¹⁾
RPM 组	150.65±9.91 ^{1),2)}	281.06±33.41 ^{1),2)}	463.49±28.74 ^{1),2)}
AG490+RPM 组	221.07±11.20 ^{1),2),3)}	171.00±30.21 ^{1),2),3)}	607.32±30.43 ^{1),2),3)}

注: 1) 与空白对照比较, $P<0.05$; 2) 与 AG490 组比较, $P<0.05$; 3) 与 RPM 组比较, $P<0.05$
Note: 1) $P<0.05$ vs. model group; 2) $P<0.05$ vs. AG490 group; 3) $P<0.05$ vs. RPM group

2.5 抑制剂对凋亡相关基因及下游靶基因 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与空白对照组比较, AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组的 Bax mRNA 表达均明显升高, Bcl-2、survivin 和 c-Myc mRNA 表达均明显降低 (均 $P<0.05$); 与 AG490 组和 RPM 组比

较, AG490+RPM 组细胞中 Bax mRNA 表达明显升高, Bcl-2、survivin 和 c-Myc mRNA 表达均明显降低 (均 $P<0.05$); AG490 组细胞中 Bax mRNA 表达明显高于 RPM 组, Bcl-2、survivin 和 c-Myc mRNA 表达明显低于 RPM 组 (均 $P<0.05$) (图 4)。

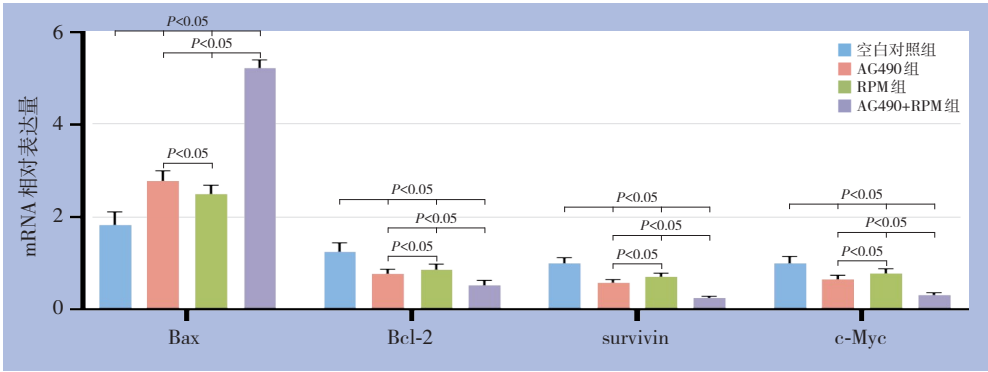


图 4 各组细胞相关基因 mRNA 相对表达量
Figure 4 Relative mRNA expression of related genes in each group

2.6 抑制剂对 JAK/STAT 通路蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与空白对照组比较, AG490 组、RPM 组和 AG490+RPM 组 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白比值均明显升高 (均 $P<0.05$); 与 AG490 组和 RPM 组比较, AG490+RPM 组 p-JAK2/

JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白比值均明显降低 (均 $P<0.05$); AG490 组细胞的 p-JAK2/JAK2 蛋白比值明显低于 RPM 组 (均 $P<0.05$), 而 AG490 组细胞的 p-STAT3/STAT3 蛋白比值明显高于 RPM 组 (均 $P<0.05$) (图 5)。

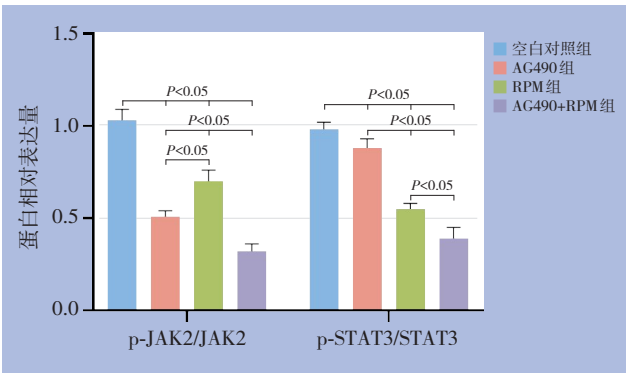
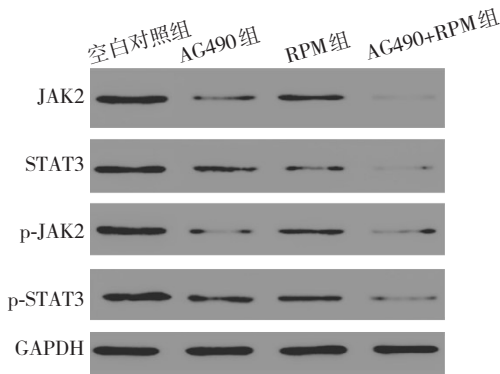


图 5 各组细胞 JAK2、STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达情况
Figure 5 Expression of JAK2, STAT3, p-JAK2, and p-STAT3 proteins in each group

3 讨 论

HCC的发生发展是一个多因素、多步骤的复杂过程,其中信号通路的异常激活扮演了关键角色。JAK/STAT信号通路作为细胞内重要的信号转导轴,其持续激活已被证实是多种恶性肿瘤,包括肝癌在内的共同特征^[24-25]。本研究通过体外实验证实,使用JAK2抑制剂AG490和STAT3通路相关抑制剂RPM均能有效抑制HepG2细胞的迁移与增殖,并显著诱导其凋亡。重要的是,两种抑制剂联合应用时,其抗肿瘤效果较单一用药更为显著,表现出协同增效的作用。这一结论表明,在上下游不同节点同时阻断JAK/STAT信号通路,可能是比单靶点干预更为有效的肝癌治疗策略。

本研究发现与领域内其他研究结果高度一致。例如,多种天然产物或小分子化合物,如雷公藤甲素、千金藤碱和黑豆皮中的花青素等,均被报道可以通过抑制JAK/STAT通路的活性来抑制肝癌细胞的生长并诱导其凋亡^[26-29]。这些研究与本实验结果印证了JAK/STAT通路作为肝癌治疗靶点的重要性和可行性。本研究结果显示,AG490和RPM处理后,肝癌细胞中p-JAK2和p-STAT3的蛋白水平均显著下降,证实了药物确实有效地阻断了该信号通路的活化。磷酸化是JAK和STAT蛋白活化的关键步骤,p-JAK2的减少直接导致其下游底物STAT3的磷酸化水平降低,从而抑制了整个信号通路的级联反应。

为进一步探究其分子机制,本研究检测了细胞凋亡及通路下游相关基因的表达。结果显示,抑制剂处理显著上调了促凋亡基因Bax的表达,同时下调了抗凋亡基因Bcl-2的表达,导致Bax/Bcl-2比值升高,从而激活了下游的执行人caspase-3,最终启动细胞凋亡程序。此外,本研究还观察到STAT3的两个关键下游靶基因survivin和c-Myc的mRNA表达显著下调。survivin是凋亡抑制蛋白家族成员,能直接抑制caspase活性;而c-Myc则是著名的原癌基因,在调控细胞周期和增殖中起核心作用。STAT3作为转录因子,能够直接启动survivin和c-Myc的转录^[30]。由此可见,JAK2/STAT3抑制剂的作用机制为:通过下调JAK2/STAT3磷酸化,调控c-Myc和survivin等下游基因的表达,并改变Bax/Bcl-2的平衡,最终有效抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡。

本研究还评估了联合用药的优势。本研究发现AG490与RPM的联合应用在各指标上均优于单一用药。其潜在原因可能在于:首先,从信号通路的垂直层面来看,同时抑制上游的激酶JAK2和下游的核心转录因子STAT3,能够更彻底、更全面地阻断信号流,避免了单一靶点抑制后可能出现的代偿性激活或旁路激活。其次,尽管本研究将RPM作为STAT3通路的抑制剂,但其作为mTOR抑制剂的经典功能也不容忽视。mTOR通路与JAK/STAT通路之间存在复杂的相互调控网络^[31-32]。因此,AG490和RPM的联合可能同时抑制了两个对肝癌细胞生存至关重要的核心通路,从而产生了协同抗肿瘤效应。这种联合策略不仅有望提高疗效,还可能通过降低单一药物的使用剂量来减轻潜在的毒副作用,为临床转化提供了新思路。

尽管本研究取得了一些有意义的发现,但仍存在一些局限性。首先,本研究仅限于体外细胞实验,所得结论尚未在动物模型中得到验证。此外,本研究使用了小分子抑制剂,其可能存在脱靶效应,未来需要采用siRNA或shRNA等基因敲低技术进行验证,以更精确地阐明JAK/STAT通路的作用。其次,本研究主要关注抑制剂对肿瘤细胞本身的直接影响,而未深入探讨其对肿瘤免疫微环境的调控作用,例如是否会影响肿瘤细胞PD-L1的表达以及与T细胞等免疫细胞的相互作用^[33],这也是JAK/STAT通路研究的热点方向。

综上所述,本研究证实了靶向JAK/STAT信号通路的抑制剂AG490和RPM能够有效抑制肝癌细胞的增殖和迁移,促进其凋亡,其机制与抑制JAK2/STAT3磷酸化活化并调控下游凋亡及增殖相关基因的表达密切相关。两种抑制剂的联合应用显示出更优的抗肿瘤活性,提示多靶点协同阻断JAK/STAT通路是肝癌治疗领域一个极具潜力的发展方向。

作者贡献声明:王鹏负责构思方法论初稿撰写;张旭负责调研,形式分析;汝文娟负责资金获取,仪器、资金提供;李守川负责监督指导,审阅与修改。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Tümen D, Heumann P, Gülow K, et al. Pathogenesis and current

- treatment strategies of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12):3202. doi:10.3390/biomedicines10123202.
- [2] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: new developments[J]. *Clin Liver Dis*, 2023, 27(1):85–102. doi:10.1016/j.cld.2022.08.004.
- [3] Xu B, Liang X, Liu W, et al. EPHX1 enhances drug resistance to regorafenib by activating the JAK/STAT signaling pathway in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Hereditas*, 2025, 162(1):148. doi: 10.1186/s41065-025-00517-1.
- [4] Wei CY, Zhu MX, Zhang PF, et al. PKC α /ZFP64/CSF1 axis resets the tumor microenvironment and fuels anti-PD1 resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(1):163–176. doi: 10.1016/j.jhep.2022.02.019.
- [5] Liu X, Zhang Y, Wang Z, et al. PRRC2A promotes hepatocellular carcinoma progression and associates with immune infiltration[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 1495–1511. doi: 10.2147/JHC.S337111.
- [6] Chen S, Cheng J, Zhong Y, et al. Liver-specific overexpression of Gab2 accelerates hepatocellular carcinoma progression by activating immunosuppression of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Oncogene*, 2022, 41(24):3316–3327. doi:10.1038/s41388-022-02298-7.
- [7] Li Q, Zhang L, You W, et al. PRDM1/BLIMP1 induces cancer immune evasion by modulating the USP22-SPI1-PD-L1 axis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):7677. doi:10.1038/s41467-022-35469-x.
- [8] Wang S, Wu QC, Chen TC, et al. Blocking CD47 promotes antitumor immunity through CD103⁺ dendritic cell-NK cell axis in murine hepatocellular carcinoma model[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(2):467–478. doi:10.1016/j.jhep.2022.03.011.
- [9] Ru J, Lu J, Ge J, et al. IRGM is a novel regulator of PD-L1 via promoting S6K1-mediated phosphorylation of YBX1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2024, 581:216495. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216495.
- [10] Song X, Ma J. SRRM1 promotes the proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating the JAK/STAT signaling pathway[J]. *Tissue Cell*, 2022, 79: 101954. doi: 10.1016/j.tice.2022.101954.
- [11] Mansur F, Arshad T, Liska V, et al. Interleukin-22 promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells via the phosphoinositide 3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(7):5957–5967. doi: 10.1007/s11033-023-08542-x.
- [12] Al-Rawashde FA, Al-Wajeih AS, Vishkaei MN, et al. Thymoquinone inhibits JAK/STAT and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in MV4-11 and K562 myeloid leukemia cells[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(9): 1123. doi: 10.3390/ph15091123.
- [13] Xiao Y, Li Y, Shi D, et al. MEX3C-mediated decay of SOCS3 mRNA promotes JAK2/STAT3 signaling to facilitate metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(22):4191–4205. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-1203.
- [14] Zhang L, Yang W, Yang J, et al. GPRC5A regulates proliferation and oxidative stress by inhibiting the STAT3/Socs3/c-MYC pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2023, 73(1):43–51. doi:10.3164/jcbs.22-125.
- [15] Guo H, Zhang C, Tang X, et al. HHLA2 activates the JAK/STAT signaling pathway by binding to TMIGD2 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Inflammation*, 2022, 45(4): 1585–1599. doi: 10.1007/s10753-022-01644-x.
- [16] Peng D, Yang W, Tang T, et al. PLA2G7 promotes immune evasion of bladder cancer through the JAK-STAT-PDL1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1):234. doi:10.1038/s41419-025-07593-1.
- [17] Pan Y, Shu G, Fu L, et al. EHBP1L1 drives immune evasion in renal cell carcinoma through binding and stabilizing JAK1[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(11):e2206792. doi:10.1002/advs.202206792.
- [18] Jiang C, Chen H, Kang Y, et al. Administration of AG490 decreases the senescence of umbilical cord-mesenchymal stem cells and promotes the cytotherapeutic effect in liver fibrosis[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1):273. doi:10.1038/s41420-023-01546-3.
- [19] Di Crosta M, Arena A, Benedetti R, et al. 5-AZA upregulates SOCS3 and PTPN6/SHP1, inhibiting STAT3 and potentiating the effects of AG490 against primary effusion lymphoma cells[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(3): 2468–2479. doi: 10.3390/cimb46030156.
- [20] Gao C, Wang SH, Shao WQ, et al. Rapamycin enhances the anti-tumor activity of cabozantinib in cMet inhibitor-resistant hepatocellular carcinoma[J]. *Front Med*, 2022, 16(3):467–482. doi: 10.1007/s11684-021-0869-y.
- [21] Kwon S, Ban K, Hong YK, et al. PROX1, a key mediator of the anti-proliferative effect of rapamycin on hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cells*, 2022, 11(3):446. doi:10.3390/cells11030446.
- [22] Yu J, Ling S, Hong J, et al. TP53/mTORC1-mediated bidirectional regulation of PD-L1 modulates immune evasion in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(11): e007479. doi: 10.1136/jitc-2023-007479.
- [23] Wang C, Ke S, Lin S, et al. NOP2/Sun RNA methyltransferase 4 regulates the mammalian target of rapamycin signaling pathway to promote hepatocellular carcinoma progression[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2024, 36(1):24–33. doi:10.5152/tjg.2024.23684.
- [24] Emaldi M, Rey-Iborra E, Marín Á, et al. Impact of B7-H3 expression on metastasis, immune exhaustion and JAK/STAT and

- PI3K/AKT pathways in clear cell renal cell carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2024, 13(1):2419686. doi:10.1080/2162402X.2024.2419686.
- [25] Yao T, Lv M, Ma S, et al. Ubiquitinated hepatitis D antigen-loaded microvesicles induce a potent specific cellular immune response to inhibit HDV replication in vivo[J]. Microbiol Spectr, 2021, 9(3): e0102421. doi:10.1128/Spectrum.01024-21.
- [26] Jung YY, Kim C, Shanmugam MK, et al. Leonurine ameliorates the STAT3 pathway through the upregulation of SHP-1 to retard the growth of hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Signal, 2024, 114: 111003. doi:10.1016/j.cellsig.2023.111003.
- [27] Li Y, Wang M, Bai J, et al. Anthocyanins in black soybean Coats promote apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by regulating the JAK2/STAT3 pathway[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(3):1070. doi: 10.3390/ijms26031070.
- [28] Wang GL, Zhu ZX, Sun ZG, et al. Mechanism of triptolide regulating proliferation and apoptosis of hepatoma cells by inhibiting JAK/STAT pathway[J]. Open Life Sci, 2025, 20(1): 20221018. doi:10.1515/biol-2022-1018.
- [29] Liang Y, Li J, Xu H, et al. Cepharanthine suppresses proliferation and metastasis and enhances apoptosis by regulating JAK2/Stat3 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023, 69(14):94-100. doi:10.14715/cmb/2023.69.14.15.
- [30] Attia YM, Tawfiq RA, Gibriel AA, et al. Activation of FXR modulates SOCS3/Jak2/STAT3 signaling axis in a NASH-dependent hepatocellular carcinoma animal model[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 186:114497. doi:10.1016/j.bcp.2021.114497.
- [31] Zhang H, Su X, Burley SK, et al. mTOR regulates aerobic glycolysis through NEAT1 and nuclear paraspeckle-mediated mechanism in hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2022, 12(7):3518-3533. doi:10.7150/thno.72581.
- [32] Liu F, Tian T, Zhang Z, et al. Long non-coding RNA SNHG6 couples cholesterol sensing with mTORC1 activation in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Metab, 2022, 4(8): 1022-1040. doi:10.1038/s42255-022-00616-7.
- [33] Bastaki S, Aravindhan S, Ahmadvour Saheb N, et al. Codelivery of STAT3 and PD-L1 siRNA by hyaluronate-TAT trimethyl/thiolated chitosan nanoparticles suppresses cancer progression in tumor-bearing mice[J]. Life Sci, 2021, 266: 118847. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118847.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:王鹏,李守川,张旭,等.抑制JAK/STAT信号通路对肝癌细胞生物学行为的调控及机制[J].中国普通外科杂志,2025,34(8):1709-1717. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250206

Cite this article as: Wang P, Li SC, Zhang X, et al. Regulation of JAK/STAT pathway inhibition on the biological behavior of hepatocellular carcinoma cells and the mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2025, 34(8): 1709-1717. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250206

本刊2026年各期重点内容安排

本刊2026年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第1期 肝脏外科临床与实验研究

第2期 胆道外科临床与实验研究

第3期 胰腺外科临床与实验研究

第4期 胃肠肿瘤、减重代谢外科基础与临床研究

第5期 乳腺、甲状腺外科临床与实验研究

第6期 血管外科临床与实验研究

第7期 肝脏肿瘤基础与临床研究

第8期 胆道肿瘤基础与临床研究

第9期 胰腺肿瘤基础与临床研究

第10期 疝与腹壁外科临床与基础研究

第11期 甲状腺肿瘤基础与临床研究

第12期 血管外科基础与临床研究

中国普通外科杂志编辑部