

# PTPN2通过激活JAK/STAT信号通路促进肿瘤微环境中的胃癌细胞转移

宝音升博尔<sup>1</sup>, 张宁<sup>2</sup>, 何继凯<sup>3</sup>, 贾立周<sup>2\*</sup>

(1. 巴彦淖尔市医院 胃肠外科, 内蒙古 巴彦淖尔 015000;  
2. 巴彦淖尔市医院 中心实验室, 内蒙古 巴彦淖尔 015000;  
3. 右江民族医学院 研究生院, 广西 百色 533000)

**【摘要】目的** 分析检测PTPN2在肿瘤微环境中的胃癌细胞转移作用, 并对其相关分子机制进行研究。**方法** 为了探讨PTPN2在胃癌转移中的作用, 本研究通过免疫组化双染法评估胃癌组织中PTPN2和FSP-1的共表达水平, 分析其与患者临床信息的关系; 胃癌细胞系中敲减PTPN2的表达水平检测胃癌细胞增殖、迁移等能力的变化情况。**结果** 低PTPN2和高FSP-1表达与较低的胃癌生存期相关。胃癌细胞中敲减PTPN2后, 可与CAFs协同诱导IFN- $\gamma$ 和IL-2释放, 从而促进胃癌细胞的迁移功能。此外, 通过Western Blot和qRT-PCR进一步检测到JAK/STAT信号通路参与PTPN2与CAFs调节迁移的机制。**结论** 本研究为PTPN2在胃癌肿瘤微环境中的调控作用提供了新的思路。此外, 免疫组化双染法也为我们研究肿瘤微环境提供了一个独特的视角。

**【关键词】** PTPN2; CAFs; 胃癌; 肿瘤微环境; 双染

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)04-0343-07

## PTPN2 PROMOTES GASTRIC CANCER METASTASIS IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT BY ACTIVATING THE JAK/STAT SIGNALING PATHWAY

BAO Yinshengboer<sup>1</sup>, ZHANG Ning<sup>2</sup>, HE Jikai<sup>3</sup>, JIA Lizhou<sup>2\*</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Bayannur Hospital, Bayannur 015000, China; 2. Central Laboratory, Bayannur Hospital, Bayannur 015000, China; 3. Graduate School, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, China)

**【Abstract】Objective** This study was to examine in the tumor microenvironment the metastasis effect of PTPN2 in gastric cancer cells, and to study its related molecular mechanism. **Methods** To explore the role of PTPN2 in gastric cancer metastasis, this study evaluated the co-expression levels of PTPN2 and FSP-1 in gastric cancer tissues by double-staining, and analyzed their relationship with the clinical information of patients. The expression level of PTPN2 knocked down in gastric cancer cell lines was used to detect the proliferation and migration of gastric cancer cells. **Results** The results showed that low PTPN2 and high FSP-1 expression were associated with poor gastric cancer survival. PTPN2 depletion in gastric cancer cells can co-induce the release of IFN- $\gamma$  and IL-2 with CAFs, thus promoting the migration of gastric cancer cells. In addition, Western Blot and qRT-PCR were used to further detect the mechanism of JAK/STAT signaling pathway involved in the regulation of migration between PTPN2 and CAFs. **Conclusions** This study shed novel lights on the impact of PTPN2 and FSP-1 mediated migration of gastric cancer cells through JAK/STAT signaling pathway. In addition, immunohistochemical double staining provides a unique perspective for us to study the tumor microenvironment.

**【Keywords】** PTPN2; CAFs; Gastric cancer; Tumor microenvironment; Double dyeing

收稿日期: 2023-04-01; 修回日期: 2023-06-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060438); 内蒙古自治区科技计划项目(2022YFSH0018); 内蒙古医科大学联合项目(YKD2021LH101); 内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202202404)

第一作者: 宝音升博尔(1982—), 男, 本科, 副主任医师。研究方向: 消化系统肿瘤。E-mail: bynesyby@163.com

\*通信作者: 贾立周, 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 肿瘤分子病理学。E-mail: nmgilz@163.com

胃癌发病例数和死亡例数均占全球胃癌发病和死亡例数的一半左右。2015年我国约有49.8万人死于胃癌,其高发原因可能与我国的饮食结构、不健康的生活饮食习惯、慢性幽门螺旋杆菌感染有关<sup>[1]</sup>。因为胃癌早期症状隐匿,超过80%的患者被诊断时已是晚期,错过了最佳的治疗时期,导致晚期胃癌5年生存率不足20%,而早期胃癌的5年生存率高达90%,所以胃癌的预防和早期诊断非常重要。尽管生物靶向药物治疗效果极佳,但因为肿瘤的个体异质性和复杂的肿瘤微环境,导致生物靶向药物的适用范围非常受限,所以更多行之有效的肿瘤治疗靶点的发现及靶向药物研制就显得尤为重要和紧迫<sup>[2,3]</sup>。

蛋白质酪氨酸磷酸酶非受体2型(protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2, PTPN2)是一种非受体蛋白酪氨酸磷酸酶,在肿瘤发生中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。PTPN2最初克隆自T细胞的cDNA文库,因此又称T细胞磷酸酶(又名T细胞蛋白酪氨酸磷酸酶, t-cell protein tyrosine phosphatase, TCPTP),它位于18号染色体上<sup>[6]</sup>。随后的研究表明<sup>[7]</sup>,PTPN2在许多其他细胞类型中也有表达。该基因编码的蛋白质通过不同的剪接具有不同的异构体,其中45 kD的异构体位于细胞核中,48 kD的异构体位于内质网中。PTPN2的亚细胞定位并不是一成不变的,定位上的差异是由PTPN2的C端非催化区域的氨基酸序列引起的。在一定的刺激条件下,蛋白质在细胞核和细胞质之间也有穿梭过程。在血液和实体恶性肿瘤中进行了多次缺失和过表达研究后,PTPN2被报道为肿瘤抑制因子<sup>[7]</sup>。

纤维蛋白特异性蛋白1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP-1),又称S100钙结合蛋白A4(S100 calcium binding protein A4, S100A4),分子量为10 kD,是间质成纤维细胞的重要生物标志物<sup>[8]</sup>。FSP-1在多种肿瘤组织中呈现高表达,肿瘤细胞的生长和侵袭能力与FSP-1蛋白的表达水平有关<sup>[8]</sup>。FSP-1作为钙结合蛋白,可与细胞骨架蛋白结合,改善癌细胞的运动,促进肿瘤间质微血管平滑肌的迁移,参与了肿瘤细胞异常生长。因此,FSP-1是与细胞分化、肿瘤发生、转移相关的因子,有助于判断患者预后<sup>[9]</sup>。肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAFs)是肿瘤微环境中重要的宿主细胞。研究认为,对CAFs相关分子标记物和作用的探索将为抗肿瘤的临床治疗提供新的思路。

为了探讨PTPN2在胃癌转移中的作用,我们利

用免疫组化双染法评估了1292例胃组织标本中PTPN2的表达水平,分析了其与FSP-1表达、患者临床信息和总生存期的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本和患者的临床信息

本实验收集了2010年至2017年在巴彦淖尔市医院接受活检或手术患者的胃组织标本1292例(包括胃炎组织样本172例,胃癌组织样本615例,癌旁组织样本351例,胃癌转移样本154例)。所有组织经过10%福尔马林固定,包埋在石蜡中,保存于巴彦淖尔市医院病理科。患者的相关临床资料包括年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结转移情况、远处转移情况、肿瘤TNM分期,分化情况、CEA水平和CA199水平。所有患者在手术前没有经过放疗、化疗或免疫等治疗。总生存期是指从初次确诊到死亡的时间。每张病理切片均由病理医师进行判定并选择一个有代表性的区域并进行标记,最后构建组织芯片(tissue microarray, TMA)。巴彦淖尔市医院伦理委员会批准了该研究方案。所有患者均签署了知情同意书。

### 1.2 方法

TMA和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色。使用组织芯片系统构建TMA,每个蜡块在标记出的部位取直径2 mm的组织。组织阵列列为7×10。抗PTPN2抗体(BS6716, Bioworld)、抗S100A4抗体(CLO239, ThermoFisher)两种标记的IHC染色。制备石蜡切片,60℃烘烤1.5 h。第一抗体PTPN2采用AP Red显色,第二抗体S100A4采用DAB显色,切片梯度乙醇脱水二甲苯,中性胶密封固体。

IHC评分。IHC染色结果由两名病理医生在双盲情况下评估。根据染色强度对样本组织中的细胞染色进行评分,分别为0分(阴性)、1分(弱阳性)、2分(中阳性)、3分(强阳性)。最终染色评分=[3×强染色百分比+2×中度染色百分比+1×弱染色百分比]×100。最终染色评分范围从0(无染色)到300(100%细胞染色强阳性)。根据胃癌患者临床病理信息,使用X-tile软件评估分界点。研究将PTPN2和FSP-1分为“低或无”和“高”。

细胞培养和试剂。人胃癌细胞系MKN45和AGS购自南京凯基生物技术公司,人原代胃癌成纤维细胞购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。MKN45和AGS使用RPMI1640、10% FBS(Gibco)培

养,人原代胃癌成纤维细胞使用原代成纤维细胞基础培养基、1%原代成纤维细胞培养添加剂、10%FBS(上海赛百慷)培养。人原代胃癌成纤维细胞经鉴定,纤维连接蛋白(Fibronectin)和波形蛋白(Vimentin)免疫荧光染色为阳性。使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)转染表达质粒。广州复能公司合成了靶向PTPN2基因的慢病毒敲减质粒。

增殖和迁移实验。为研究PTPN2对胃癌细胞系增殖的影响,在96孔板中接种 $3\sim 5 \times 10^3$ 个细胞。不同的质粒转染24 h,采用BrdUrd增殖实验检测细胞的增殖能力。为研究PTPN2对胃癌系迁移的影响,将 $3 \times 10^4$ 个细胞置于24孔板中培养24 h,转染质粒后48 h后,苏木精染色并拍照。

Real-time PCR和Western Blot。细胞RNA由TRIzol试剂提取,并采用PrimeScript™ RT试剂反转录至cDNA。ABI 7500HT序列检测系统上进行检测分析。所有实验重复3次。本研究使用的引物如下:人GAPDH正向,5'-GAAGGTGAAGGTCG-GAGTC-3'和反向,5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3';人PTPN2forward,5'-GCAGTGAGAGCATTC-TACGGA-3'和反向,5'-TGACACAAACCCCATCT-TAGTGA-3'。裂解细胞蛋白,在8%~10%的SDS-PAGE中分离并转移到PVDF膜上,加相应的一抗4℃孵育过夜,HRP二抗孵育1 h。

PTPN2抗体(1:1000,CST),p-JAK1抗体(1:1000,CST),p-JAK2(1:1000,CST),p-JAK3(1:1000,CST),p-STAT4(1:1000,CST),p-STAT6(1:1000,CST),vimentin(1:1000,Affinity),GAPDH(1:1000,santa cruz)5'-TGACACAAACCCCATCT-TAGTGA-3'。

统计分析。所有数据采用SPSS 23.0软件进行统计分析。采用Pearson  $\chi^2$ 检验比较胃癌组织标本中PTPN2和FSP-1的表达水平与临床病理参数的关系。采用Kaplan-Meier法和Log-rank法对胃癌患者进行预后分析。采用单变量和多变量Cox比例风险回归模型分析独立预后因素。采用独立配对t检验比较两组均值。检验水准为 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PPTN2低表达和FSP-1高表达与胃癌患者低生存率相关

利用免疫组化双染色法检测了1292例胃组织

样本中PTPN2和FSP-1蛋白的表达,其中胃炎样本172例,胃癌样本615例,癌旁样本351例,胃癌转移样本154例。PTPN2蛋白的表达主要集中在胃癌细胞的细胞质中(见图1)。本研究根据胃癌患者的总体生存期确定分界值。对于PTPN2分界值定为:评分在0~140间为PTPN2蛋白低表达或无表达,评分在141~300间为PTPN2蛋白高表达;FSP-1分界值定为:评分在0~130间为FSP-1蛋白低表达或无表达,131~300为FSP-1蛋白高表达。在胃炎组织、癌组织、癌旁组织和转移灶组织中均检测到PTPN2和FSP-1高表达(P+F+)、PTPN2高表达和FSP-1低表达(P+F-)、PTPN2低表达和FSP-1高表达(P-F+)、PTPN2低表达和FSP-1低表达(P-F-)。胃癌组织中P-F+表达量为30.2%(186/615),癌旁组织为23.4%(82/351),胃炎组织为20.3%(35/172)。有趣的是,在胃癌转移组织中P-F+表达更为多见37.0%(57/154)( $\chi^2=44.399, P < 0.05$ )(见图2A)。

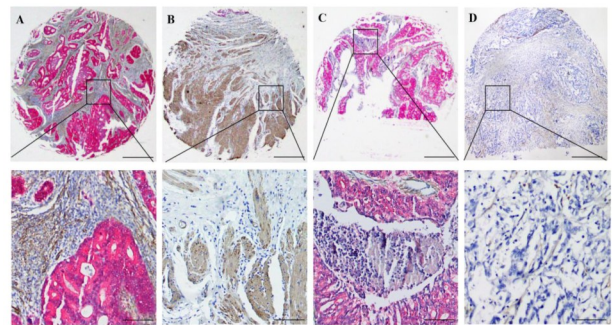


图1 胃组织芯片中PTPN2和FSP-1表达情况  
Fig.1 PTPN2 and FSP-1 expression in gastric tissue chips

(A)胃腺癌中PTPN2+FSP-1+表达;(B)胃腺癌中PTPN2-FSP-1+表达;(C)胃腺癌中PTPN2+FSP-1-表达;(D)胃腺癌中PTPN2-FSP-1-表达。

(A) Expression of PTPN2+FSP-1+ in gastric adenocarcinoma; (B) Expression of PTPN2-FSP-1+ in gastric adenocarcinoma; (C) Expression of PTPN2+FSP-1- in gastric adenocarcinoma; (D) Expression of PTPN2-FSP-1- in gastric adenocarcinoma.

为了评估胃癌中PTPN2和FSP-1表达与临床病理特征的关系,本实验利用免疫组化双染法分析,结果显示P-F+表达与肿瘤远处转移( $\chi^2=13.314, P < 0.05$ )、TNM分期( $\chi^2=17.639, P < 0.05$ )、CEA水平( $\chi^2=22.151, P < 0.05$ )和CA199水平( $\chi^2=38.161, P < 0.05$ )显著相关,而与性别、年龄、分化、肿瘤大小、淋巴结转移等无明显相关性(见表1)。

评估PTPN2/FSP-1表达之间的关系和胃癌患者的总体生存期间的关联。本研究利用Kaplan-Meier生存曲线分析结果表明,P-F+的表达与胃癌患者较

表1 胃癌中PTPN2和FSP-1表达与临床病理特征的相关性  
Tab.1 Correlation between PTPN2 and FSP-1 expression and clinicopathological features in gastric cancer

因素	n	PTPN2				$\chi^2$	P
		FSP-1	+	-	-		
总	769						
性别						5.498	0.139
男	556		152(27.3)	115(20.7)	189(34.0)		
女	213		68(31.9)	47(22.1)	54(25.4)	4.975	0.174
年龄							
<60	246		70(28.5)	41(16.7)	83(33.7)		
≥60	523		150(28.7)	121(23.1)	160(30.6)		
肿瘤大小						10.389	0.5822
Tis	28		8(28.6)	5(17.9)	6(21.4)		
T <sub>1</sub>	74		20(27.0)	15(20.3)	24(32.4)		
T <sub>2</sub>	124		34(27.4)	21(16.9)	44(35.5)		
T <sub>3</sub>	482		144(29.9)	102(21.2)	150(31.1)		
T <sub>4</sub>	61		14(23.0)	19(31.1)	19(31.1)		
淋巴结转移						7.849	0.549
N <sub>1</sub>	288		79(27.4)	64(22.2)	84(29.2)		
N <sub>2</sub>	230		66(28.7)	40(17.4)	82(35.7)		
N <sub>3</sub>	139		42(30.2)	35(25.2)	38(27.3)		
N <sub>4</sub>	112		39(34.8)	23(20.5)	39(34.8)		
远处转移						13.314	0.004*
M1	549		162(29.5)	115(20.9)	186(33.9)		
M2	220		58(26.4)	47(21.4)	57(25.9)		
TNM分期						17.639	0.04*
0	79		20(25.3)	25(31.6)	15(19.0)		
I	350		103(29.4)	65(18.6)	126(36.0)		
II-III	221		69(31.2)	47(21.3)	62(28.1)		
IV	119		28(23.5)	25(21.0)	40(33.6)		
分化						2.989	0.81
好	187		56(29.9)	37(19.8)	61(32.7)		
中	289		87(30.0)	60(20.8)	93(32.2)		
差	293		77(26.2)	65(22.2)	89(30.4)		
CEA, ng/mL						22.151	0.001*
<5	303		98(32.3)	53(17.5)	102(33.7)		
≥5	391		106(27.1)	84(21.5)	129(33.0)		
未知	75		16(21.3)	25(33.3)	12(16.0)		
CA199, ng/mL						38.161	<0.001
<37	234		67(28.6)	45(19.2)	87(37.2)		
≥37	284		87(30.6)	47(16.5)	107(37.7)		
未知	251		66(26.3)	70(27.9)	49(19.5)		

短的总体生存期有关(Chi-Square=19.05,  $P < 0.05$ ) (见图2B)。此外,单变量和多变量分析的结果表明,P-F+蛋白表达和远处转移明显与不良预后相关(见表2)。

### 2.2 CAFs参与PTPN2调控胃癌细胞的迁移功能

本研究通过体外实验检测PTPN2的生物学功能。通过CCLE(Broad Institute Cancer cell Line En-

cyclopedia)数据库分析胃癌细胞系中PTPN2的表达水,根据分析结果,本研究选择了两株PTPN2表达较高的胃癌细胞系AGS和MKN45进行后续实验。在AGS和MKN45细胞系上敲减PTPN2表达(分别命名为shRNA-PTPN2-1,-2,-3),在mRNA水平检测shRNA-PTPN2的效率,结果显示,1号敲减序列的效率最高(见图3A)。BrdU增殖实验表明,shR-

表2 PTPN2/FSP-1 表达之间的关系和胃癌患者的总体生存期间的关联  
Tab.2 Association between PTPN2/FSP-1 expression and overall survival in gastric cancer patients

	单因素分析			多因素分析		
	HR	p-value	95%CI	HR	p-value	95%CI
PTPN2 和 d FSP-1 表达						
P+F+ versus P+F- versus P-F+ versus P-F-	1.397	<0.001*	1.207-1.616	1.391	<0.001*	1.196-1.618
性别						
男 versus 女	1.086	0.644	0.765-1.543	—	—	—
年龄						
< 60 versus ≥60	1.078	0.665	0.766-1.518	—	—	—
肿瘤大小						
Tis versus T1 versus T2 versus T3 versus T4	0.968	0.715	0.812-1.153	—	—	—
淋巴结转移						
有 versus 无	1.103	0.603	0.4904-1.627	—	—	—
远处转移						
有 versus 无	1.375	0.002*	1.122-1.684	1.371	0.010*	1.112-1.602
TNM分期						
0 versus I versus II + III versus IV	1.278	0.034*	1.024-1.435	1.003	0.188	0.928-1.980
分化						
好 versus 中 versus 差	0.823	0.061	0.672-1.009			
CEA, ng/mL						
<5 versus ≥5 versus 未知	1.243	0.085	0.97-1.593			
CA199, ng/mL						
<37 versus ≥37 versus 未知	1.375	0.002*	1.122-1.684	1.212	0.09	0.971-1.513

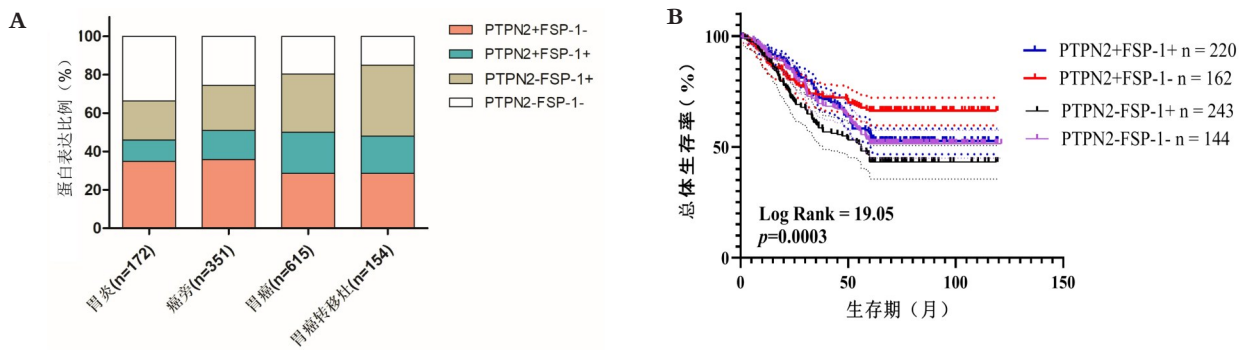


图2 胃组织样本中PTPN2和FSP-1蛋白的表达及生存曲线  
Fig.2 Expression and survival curves of PTPN2 and FSP-1 proteins in gastric tissue samples

(A)PTPN2和FSP-1蛋白在胃癌组织中的表达;(B)PTPN2+FSP-1+表达胃癌患者的生存曲线(蓝色曲线);PTPN2+FSP-1-表达胃癌患者的生存曲线(红色曲线);PTPN2-FSP-1+表达的胃癌患者(黑色曲线);PTPN2-FSP-1-表达的胃癌患者(紫色曲线)。

(A) Expression of PTPN2 and FSP-1 proteins in gastric cancer tissues; (B) Survival curve of patients with PTPN2+FSP-1+ expression (blue curve); Survival curve of patients with PTPN2+FSP-1- expression (red curve); Survival curve of patients with PTPN2-FSP-1+ expression (black curve); Survival curve of patients with PTPN2-FSP-1- (purple curve).

NA-PTPN2并没有影响细胞的生长功能,细胞克隆能力并未受到显著影响(见图3B-D);因此,我们推测胃癌中复杂的肿瘤微环境也参与了PTPN2的调控功能。研究表明<sup>[10]</sup>, CAFs可通过分泌细胞因子、炎症因子和血管生成因子与癌细胞进行广泛的相互作用,从而在肿瘤细胞的增殖、转移和血管生成中发挥重要作用。本研究的免疫组化结果也显示PTPN2低表达、FSP-1高表达与胃癌细胞转移等

胃癌患者的不良预后有关。因此,我们构建了胃癌细胞和CAF的共培养体系,进行Transwell迁移实验:下层小室加入CAF(人原代胃癌成纤维细胞),上层小室分别加入AGS shNC、AGS shRNA-PTPN2、MKN45 shNC和MKN45 shRNA-PTPN2细胞。结果发现,添加CAF共培养的胃癌细胞中,与对照组相比,shRNA-PTPN2组的胃癌细胞组迁移数量明显增加,而未加CAF的胃癌细胞组,两组间没有显著差

异(图3D1-2)。为了研究CAF是否参与了胃癌细胞中PTPN2的功能,本研究进一步采用ELISA检测上清液中IFN- $\gamma$ 和IL-2的水平。结果表明,添加CAF共培养的胃癌细胞中,shRNA-PTPN2组的IFN- $\gamma$ 和IL-2水平均高于对照组(见图3E-F)。

### 2.3 PTPN2通过激活JAK/STAT信号通路促进肿瘤微环境中的胃癌细胞转移

为了探讨PTPN2对肿瘤微环境中胃癌细胞的调控机制,本研究还利用STRING数据库分析了PTPN2与FSP-1之间的相互作用。结果表明,PTPN2的高表达可能通过激活JAK-STAT信号通路的活性,并与FSP-1的功能互作,从而诱导EMT现象。我们检测了共培养体系中,胃癌细胞敲减PTPN2后JAK-STAT信号通路以及EMT标志物的蛋白和mRNA表达水平。Western Blot结果显示,经shRNA-PTPN2转染后,胃癌细胞中磷酸化JAK-STAT的表达明显增加,vimentin的表达也明显增加,mRNA水平与蛋白表达水平基本一致(见图3G)。这些结果表明JAK/STAT信号通路在胃癌肿瘤微环境中PTPN2调控肿瘤细胞迁移的作用中起关键作用。

### 3 讨论

酪氨酸磷酸化是调节信号转导的重要机制,在一系列生理过程中起着关键作用。这些由酪氨酸磷酸化调控的过程包括细胞增殖、分化和细胞死亡等<sup>[11]</sup>。本研究旨在探讨蛋白酪氨酸磷酸酶PTPN2与胃癌转移的关系。利用免疫组化双染色法检测了1292例胃组织样本(其中包含74例淋巴结转移组织)中PTPN2和FSP-1蛋白的表达,发现PTPN2-FSP-1+在胃癌转移灶中的阳性表达率(37.0%,57/154)明显高于胃癌组织(30.2%,186/615)、癌旁组织(23.4%,82/351)和胃炎组织(20.3%,35/172)。这些发现与之前的研究发现一致,即酪氨酸磷酸化参与协调相邻细胞的相互作用,如在免疫调控方面,能够介导可溶性因子与细胞或细胞-细胞间的相互作用<sup>[12]</sup>。免疫组化双染色法检测P-F+表达与肿瘤远处转移、TNM分期、CEA水平和CA199水平显著相关。Kaplan-Meier生存曲线结果显示,T-F+表达组与胃癌患者较短的总体生存期有关,单变量和多变量分析结果进一步证实了上述观点。

本研究发现PTPN2基因敲除后对胃癌细胞株的增殖和迁移能力没有影响。因此,我们建立了胃癌细胞株与CAF共培养的细胞模型。发现TAF对

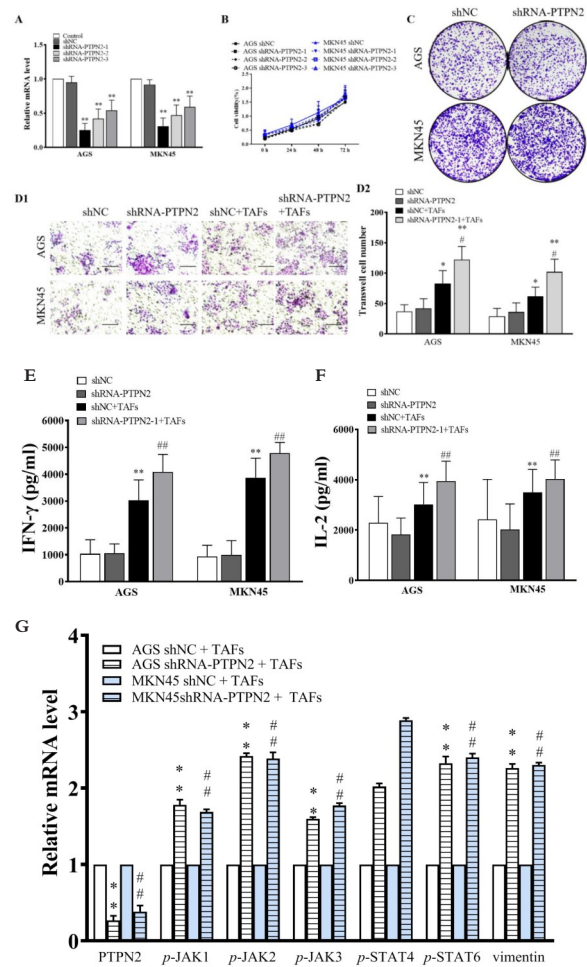


图3 PTPN2在胃癌细胞系中的功能

Fig.3 Function of PTPN2 in gastric cancer cell lines

(A) qRT-PCR检测胃癌细胞系上敲减了PTPN2后的mRNA表达水平;(B)增殖实验检测敲减PTPN2后胃癌细胞系的增殖能力的变化情况;(C)敲减PTPN2对胃癌细胞系克隆增殖能力的影响;(D)敲减PTPN2对胃癌细胞系迁移能力的影响,添加CAF检测敲减PTPN2后对胃癌细胞迁移能力的影响,D2为D1的统计图;(E)ELISA检测胃癌细胞系中共培养液上清IFN- $\gamma$ 的水平;(F)ELISA检测胃癌细胞系中共培养液上清IL-2的水平;(G)PTPN2激活胃癌细胞JAK/STAT信号通路;与对照组比较,平均 $\pm$ SD,\*\* $P < 0.001$ 。

(A) qRT-PCR was used to detect the mRNA level of gastric cancer cells after PTPN2 knockdown; (B) Proliferation assay was used to detect the changes in the proliferation of gastric cancer cells after PTPN2 knockout; (C) The effect of PTPN2 knockdown on the clonal proliferation of gastric cancer cells; (D) The effect of PTPN2 knockout on the migration ability of gastric cancer cells, and the influence of CAFs and PTPN2 knockout on the migration ability of gastric cancer cells, D2 is the statistical graph of D1; (E) The level of the IFN- $\gamma$  in culture medium of gastric cancer cells was detected by ELISA; (F) ELISA was used to detect the level of IL-2 in the culture medium of gastric cancer cells. (G) PTPN2 activates JAK/STAT signaling pathway in gastric cancer cells. Compared with control group, mean  $\pm$  SD, \*\* $P < 0.001$ .

PTPN2在胃癌细胞中的迁移作用有影响。哈佛医学院 WNicholas Haining 和 Arlene HSharp 在 2019 年发表在《自然免疫学》上的一项新研究发现,PTPN2 可以调节耗尽的 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群的产生,并控制肿瘤免疫<sup>[6]</sup>。同时,多项研究也证实了 PTPN2 在癌细胞中的表达<sup>[13]</sup>。因此,我们推测 PTPN2 对肿瘤的作用一定与肿瘤细胞和免疫细胞之间的相互作用有关。在我们的研究中,我们首次关注了 PTPN2 在 TME 的关系功能。实验结果证实了我们的假设,PTPN2 在胃癌 TME 中能发挥调控肿瘤细胞转移的重要作用。进一步通过 ELISA 方法检测共培养上清液成分,发现 PTPN2 和 CAFs 通过增加 IFN- $\gamma$  和 IL-2 的水平促进胃癌细胞的迁移能力。

PTPN2 底物有多种,包括 IR、CSF-1 受体、EGFR、SFKs、JAK1、JAK3、STAT1、STAT5、STAT6 等<sup>[14-16]</sup>。在 T 细胞急性淋巴细胞白血病中发现 PTPN2 失活<sup>[17]</sup>。PTPN2 失活导致 JAK-STAT 信号增加,进而影响肿瘤的恶性程度<sup>[18, 19]</sup>。在某些乳腺癌中,PTPN2 的表达降低,PTPN2 再移植后可抑制乳腺癌细胞的生长,这可能是通过抑制 SFK 激酶和 STAT3 的酸化所致<sup>[7, 20]</sup>。数据库分析结果表明,PTPN2 的低表达可能通过 JAK-STAT 信号通路与 FSP-1 相互诱导 EMT 现象。因此,本研究通过 Western-Blot 和 qRT-PCR 方法对数据库分析结果进行验证,实验结果发现 JAK/STAT 信号通路在 PTPN2-FSP-1 介导的胃癌细胞迁移中起关键作用。

综上所述,本研究提示低 PTPN2 和高 FSP-1 表达与胃癌患者较低的生存率相关;PTPN2 通过激活 JAK/STAT 信号通路促进肿瘤微环境中的胃癌细胞转移。此外,本研究中采用的免疫组化双染法也为我们研究肿瘤微环境提供了一个独特的视角。

#### 参考文献

- [1]周春娥,栾梅,侯盘长.结直肠癌肿瘤差异表达基因在胃癌中的表达及功能分析[J].内蒙古医科大学学报,2022,44(6): 620-623+629
- [2]杨之洵,郑荣寿,张思维,等.胃癌领域中国胃癌发病趋势及预测[M].北京:中国协和医科大学出版社,2019:169-174
- [3]潘思远,房静远.胃癌靶向治疗的研究进展[J].中华内科杂志,2020(2):148-152
- [4]Yang HJ, Yu G, Wang Y, et al. Inflammatory response or oxidative stress induces upregulation of PTPN2 and thus promotes the progression of laryngocarcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020,24(8): 4314-4319
- [5]Zhang Y, Ding H, Wang X, et al. Modulation of STAT3 phosphorylation by PTPN2 inhibits naive pluripotency of embryonic stem cells[J]. FEBS Lett, 2018,592(13): 2227-2237

- [6]LaFleur MW, Thao HN, Matthew AC, et al. PTPN2 regulates the generation of exhausted CD8<sup>(+)</sup> T cell subpopulations and restrains tumor immunity[J]. Nat Immunol, 2019, 20(10): 1335-1347
- [7]Veenstra C, Elin K, Sanam MM, et al. The effects of PTPN2 loss on cell signalling and clinical outcome in relation to breast cancer subtype[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(7): 1845-1856
- [8]Zhang W, Shinji O, Beatrix S, et al. S100a4 is secreted by alternatively activated alveolar macrophages and promotes activation of lung fibroblasts in pulmonary fibrosis[J]. Front Immunol, 2018,9: 1216
- [9]刘臻,孟茨,王慧君,等. S100A4 与 p53 在活细胞内相互作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020,27(6): 431-437
- [10]Zhou P, Xiao N, Wang J, et al. SMC1A recruits tumor-associated-fibroblasts (TAFs) and promotes colorectal cancer metastasis[J]. Cancer Lett, 2017,385: 39-45
- [11]Spalinger MR, Roberto M, Larissa H, et al. PTPN2 regulates inflammasome activation and controls onset of intestinal inflammation and colon cancer[J]. Cell Rep, 2018, 22(7): 1835-1848
- [12]Lee H, Mihwa K, Minwoo B, et al. Targeted disruption of TC-PTP in the proliferative compartment augments STAT3 and AKT signaling and skin tumor development[J]. Sci Rep, 2017,7: 45077
- [13]Dodd GT, Robert LY, Jens CB, et al. TCPTP regulates insulin signaling in agRP neurons to coordinate glucose metabolism with feeding[J]. Diabetes, 2018,67(7):1246-1257
- [14]Mattila E, Teijo P, Jonna N, et al. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP[J]. Nat Cell Biol, 2005,7(1): 78-85
- [15]Morales LD, Anna KA, Serena O, et al. The role of T-cell protein tyrosine phosphatase in epithelial carcinogenesis[J]. Mol Carcinog, 2019,58(9): 1640-1647
- [16]Shields BJ, Florian W, Esteban NG, et al. TCPTP regulates SFK and STAT3 signaling and is lost in triple-negative breast cancers[J]. Mol Cell Biol, 2013,33(3): 557-570
- [17]Alcantara M, Mathieu S, Ludovic L, et al. Clinical and biological features of PTPN2-deleted adult and pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood Adv, 2019,3(13):1981-1988
- [18]Pike KA and Michel LT. TC-PTP and PTP1B: regulating JAK-STAT signaling, controlling lymphoid malignancies[J]. Cytokine, 2016,82: 52-57
- [19]Mei Q, Liu C, Zhang XL, et al. Associations between PTPN2 gene polymorphisms and psoriasis in Northeastern China[J]. Gene, 2019,681: 73-79
- [20]Karlsson E, Cynthia V, Jon G, et al. PTPN2 deficiency along with activation of nuclear Akt predict endocrine resistance in breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019,145(3): 599-607