

STAT3 特异性抑制剂 STA-21 对乳腺癌 MCF-7B 细胞增殖及凋亡的影响

白璐¹, 朱静¹, 田杰², 崔向荣¹, 张春敏¹, 尹耐靖¹

(重庆医科大学附属儿童医院 1. 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室; 2. 心血管内科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨信号传导与转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 特异性抑制剂 STA-21 对乳腺癌 MCF-7B 细胞增殖及凋亡的影响。**方法:**空白组为单独培养 MCF-7B 细胞, 实验组采用不同浓度 STA-21 作用于乳腺癌 MCF-7B 细胞后, 用 MTT 法观察 STA-21 对 MCF-7B 细胞生长抑制的作用; 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡; Western blot 检测 MCF-7B 细胞 P-STAT3、STAT3、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、Bcl-xl 蛋白的表达。**结果:**MCF-7B 细胞经各浓度 STA-21 (10、30、50 $\mu\text{mol/L}$) 作用后, 其细胞增殖的抑制率及细胞凋亡率较空白组明显增加 ($P=0.000$); 流式细胞仪检测发现 STA-21 可导致 MCF-7B 细胞阻滞于 G1 期; Western blot 结果显示与空白组相比, STA-21 可降低 MCF-7B 细胞 P-STAT3、CyclinD1、Bcl-xl 蛋白的表达 ($P=0.000$), 但对 STAT3 蛋白的表达基本无影响 ($P=0.367$)。**结论:**STA-21 可在一定程度上抑制 MCF-7B 细胞的增殖及促进凋亡, 其作用机制可能与抑制 STAT3 活性有关。

【关键词】MCF-7B 细胞; 信号传导与转录活化因子 3; STA-21; 抑制

【中国图书分类法分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-28

作者简介:白璐, Email: bluebmw85912@sina.com,

研究方向: 骨髓间充质干细胞瘤样转化的规避与机制研究。

通信作者:朱静, Email: zhujing310@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号: 31140035); 重庆市

自然科学基金资助项目 (编号: cstc2011jjA10060)。

[5] 赵海燕, 胡洁, 王雅娟, 等. Tiam1 和 SNAI1 在结直肠癌 EMT 中的意义[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(6): 654-657.

Zhao H Y, Hu J, Wang Y J, et al. Significance of Tiam1 and SNAI1 in EMT of human colorectal carcinoma[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2011, 38(6): 654-657.

[6] Theys J, Jutten B, Habets R, et al. E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells[J]. Radiother Oncol, 2011, 99(3): 392-397.

[7] Ivaska J. Vimentin: central hub in EMT induction?[J]. Small GTPases, 2011, 2(1): 51-53.

[8] Maragkakis M, Reczko M, Simossis V A, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(Web server issue): W273-276.

[9] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Database issue): D137-141.

[10] Lagana A, Forte S, Giudice A, et al. miRo: a miRNA knowledge base[J]. Database (Oxford), 2009, 2009: 8.

[11] Hu Z, Hung J H, Wang Y, et al. VisANT 3.5: multi-scale network visualization, analysis and inference based on the gene ontology[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(Web Server Issue): W115-121.

[12] Kelder T, van Iersel M P, Hanspers K, et al. WikiPathways: build-

ing research communities on biological pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(Database issue): D1301-1307.

[13] Xu K, Rajagopal S, Klebba I, et al. The role of fibroblast Tiam1 in tumor cell invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2010, 29(50): 6533-6542.

[14] Hu J, Wang Y D, Li Y F, et al. Correlation between T lymphoma invasion and metastasis 1 expression and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal carcinomas[J]. Journal of Southern Medical University, 2009, 29(2): 232-235.

[15] Liu D Z, Wang Y S, Ji A G. The role of TGF-beta in the EMT of tumor cells[J]. Progress in Physiological Sciences, 2011, 42(6): 463-466.

[16] Zhu M L, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells[J]. FASEB J, 2010, 24(3): 769-777.

[17] Li C W, Xia W, Huo L, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1290-1300.

[18] Mulholland D J, Kobayashi N, Ruscetti M, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1878-1889.

(责任编辑: 冉明会)

Effects of specific inhibitor of STAT3:STA-21 on the proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7B cells

BAI Lu¹, ZHU Jing¹, TIAN Jie², CUI Xiangrong¹, ZHANG Chunmin¹, YIN Naijing¹

(1. Key Laboratory of Child Development and Disorders Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education; 2. Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of STA-21, a specific inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) on the proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7B cells. **Methods:** MTT assay was applied to observe the inhibition of STA-21 on growth of MCF-7B cells after MCF-7B cells being treated with different concentrations of STA-21. Apoptosis and cell cycle of MCF-7B cells were examined by flow cytometry (FCM). Expressions of P-STAT3, STAT3, CyclinD1 and Bcl-xl protein in MCF-7B cells were detected by Western blot. **Results:** After cells being exposed to different concentrations (10, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$) of STA-21, inhibitory rate and apoptotic rate were increased markedly ($P=0.000$). It was showed by FCM assay that STA-21 could inhibit the MCF-7B cells at G1 phase. Meanwhile, STA-21 could reduce the expressions of P-STAT3, CyclinD1 and Bcl-xl protein ($P=0.000$), but STA-21 exerted no effect on STAT3 protein ($P=0.367$). **Conclusions:** Our study demonstrates that STA-21 can inhibit proliferation and promote apoptosis of MCF-7B, mechanism of which may be related with the inhibition of STAT3 activity.

[Key words] MCF-7B cells; signal transducers and activators of transcription 3; STA-21; inhibition

乳腺癌是一种严重威胁妇女身心健康及危害其生命的恶性肿瘤,发病率占女性恶性肿瘤的 25%~30%,并呈上升趋势^[1-2]。信号传导与转录活化因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 是一种在许多肿瘤发生过程中都必须激活的信号通道蛋白。STAT3 和 P-STAT3 在人类多种恶性肿瘤如乳腺癌、小细胞肺癌、结肠癌等均有明显表达^[3-5],其表达强度与肿瘤的生长、转移及预后等有关。所以目前有很多将 STAT3 作为靶点来研发治疗肿瘤的新方法。

本研究以乳腺癌细胞系 MCF-7B 作为研究对象,应用 STAT3 特异性抑制剂 STA-21 处理乳腺癌 MCF-7B 细胞,观察处理后 MCF-7B 细胞增殖及凋亡能力的改变,初步探索 STAT3 信号通路对 MCF-7B 细胞增殖及凋亡能力的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

人乳腺癌细胞系 MCF-7B 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。STA-21 购自 SANTA CRUZ 公司,用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, sigma-aldrich 公司) 溶解,灭菌,实验前以 DMEM/F12 培养液稀释成不同浓度, DMSO 终浓度小于 0.1%。MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、磷酸化蛋白提取试剂盒 (凯基生物),小鼠抗人 STAT3 单克隆抗体 (Abcam),小鼠抗人 P-STAT3 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology),兔抗人 CyclinD1、Bcl-xl

单克隆抗体 (EPITOMICS)。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7B 培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养, 2~3 d 传代 1 次。

1.3 实验分组

实验分 5 组。空白组:单独培养的 MCF-7B 细胞;对照组:加含 0.1% DMSO 于培养基中的 MCF-7B 细胞;实验组:同空白组外,根据向培养基内加入 STA-21 浓度不同分为 10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 3 个亚组。

1.4 MTT 检测细胞增殖情况

取对数生长细胞,胰酶消化,按 1×10^5 个/ml 浓度接种于 96 孔板内,每孔 100 μl ,培养 24 h 后,弃去培养基。按实验分组给药,每个浓度设 5 个复孔。继续培养 24 h,每孔加 50 μl $1 \times \text{MTT}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,再吸出上清液,每孔加 150 μl DMSO,用平板振荡器摇匀 10 min。酶标仪在 550 nm 波长处检测每孔的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞增殖抑制率 = (空白组 A 值 - 实验组 A 值) / 空白组 A 值 $\times 100\%$ 。

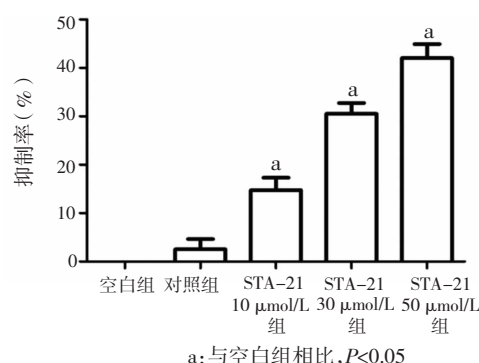


图 1 STA-21 对 MCF-7B 细胞增殖抑制率

Fig.1 Inhibition rate of STA-21 on MCF-7B cells

1.5 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡

药物作用 24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞 2 次(2 000 r/min 离心 5 min),用结合缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。取 195 μ l 细胞悬液于流式管中,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI),混匀,室温避光 10 min,加入 200 μ l 结合缓冲液,流式细胞仪 FACS Calibur(Becton Dickinson)检测各组细胞凋亡率。

1.6 FCM 检测细胞周期

STA-21 作用 MCF-7B 细胞 24 h 后,用胰酶消化并收集 1×10^6 个细胞用于细胞周期检测, PBS 清洗 2 遍(1 000 r/min 离心 10 min),弃上清,用 300 μ l PBS 重悬细胞后加入含 700 μ l 无水乙醇的试管内固定,4 $^{\circ}$ C 过夜, RNase 消化, PI 染色 30 min,应用 FACS Calibur(Becton Dickinson)流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测各组 MCF-7B 细胞 P-STAT3、STAT3、CyclinD1 及 Bcl-xl 蛋白的表达

采用常规方法提取各组 MCF-7B 细胞磷酸化蛋白,紫外分光光度法定量。用 40 μ g 蛋白进行 Western blot,先进行 SDS-PAGE 电泳,半干转移法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(P-STAT3、STAT3、CyclinD1、Bcl-xl、 β -actin)孵育过夜,吐温+Tris-盐酸缓冲盐溶液(tris-buffered saline and tween 20, TBST)液洗膜 3 次,每次 5 min,辣根过氧化物酶标记 IgG 抗体(稀释度为 1:1 000)室温孵育 1 h, TBST 液洗膜 3 次,每次 5 min,采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescent, ECL)检测系统检测。用 Quantity One 软件分析各条带灰度值,数值以相应蛋白条带的灰度值与 β -actin 蛋白条带的灰度值比值表示。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件处理实验结果。实验结果以均

数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-t 法。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STA-21 对 MCF-7B 细胞增殖的影响

MCF-7B 细胞经 10、30、50 μ mol/L STA-21 作用后细胞增殖抑制率分别为 $(14.73 \pm 2.59)\%$ 、 $(30.54 \pm 2.18)\%$ 、 $(42.04 \pm 2.87)\%$,与空白组比较及组间比较差异均有统计学意义($P=0.000$);对照组 MCF-7B 细胞增殖抑制率为 $(2.54 \pm 2.1)\%$,与空白组接近($P=0.188$)(图 1)。提示 STA-21 可抑制 MCF-7B 细胞的增殖并呈浓度依赖性。

2.2 FCM 检测细胞凋亡

结果显示空白组 MCF-7B 细胞的凋亡率为 $(2.36 \pm 0.22)\%$,对照组 MCF-7B 细胞的凋亡率为 $(3.21 \pm 0.31)\%$,二者差异无统计学意义($P=0.499$);实验组 MCF-7B 细胞经各浓度 STA-21 作用 24 h 后,细胞凋亡率明显增加,10、30、50 μ mol/L 组凋亡率分别为 $(9.40 \pm 1.38)\%$ 、 $(14.92 \pm 1.17)\%$ 、 $(47.25 \pm 2.75)\%$,与空白组比较及组间比较差异具有统计学意义($P=0.000$, $P=0.001$)(图 2),提示 STA-21 可促进 MCF-7B 细胞凋亡并呈浓度依赖性。

2.3 STA-21 对 MCF-7B 细胞细胞周期的影响

细胞周期分析结果显示,随着 STA-21 作用浓度的增加, MCF-7B 细胞 G1 期比例逐渐增高,10、30、50 μ mol/L STA-21 组细胞 G1 期比例分别为 $(71.45 \pm 3.4)\%$ 、 $(76.57 \pm 3.65)\%$ 、 $(79.25 \pm 3.75)\%$ (表 1),较空白组明显增高($P=0.026$)。表明 STA-21 可引起 MCF-7B 细胞周期阻滞于 G1 期,从而导致细胞增殖能力下降。

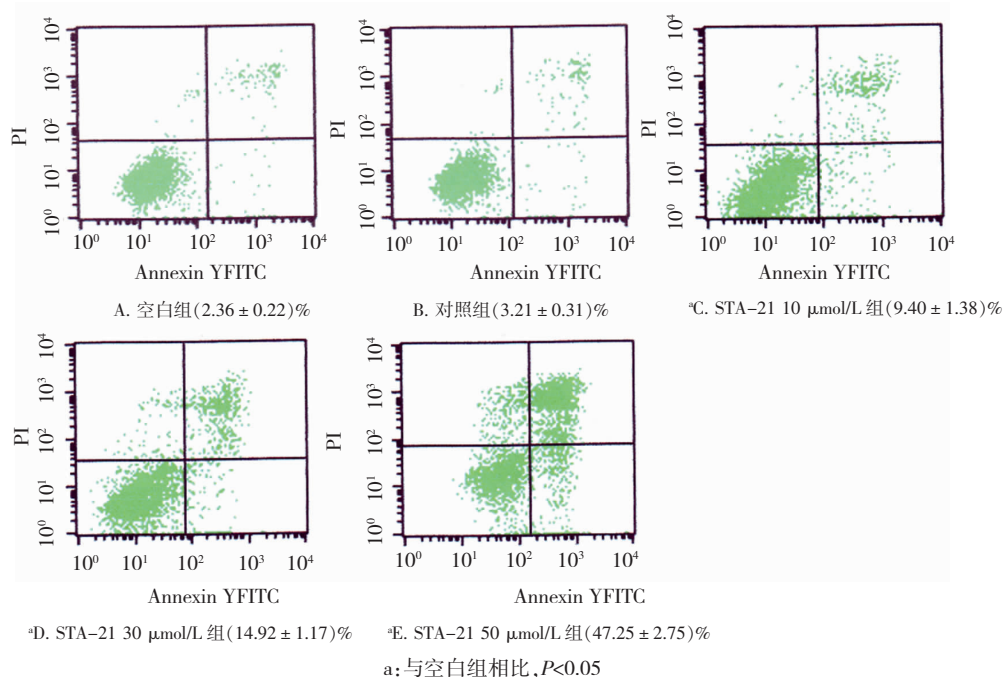


图 2 FCM 检测 STA-21 处理后各组 MCF-7B 细胞的凋亡情况

Fig.2 Apoptosis rate of MCF-7B cells after STA-21 treatment detected by FCM

表 1 MCF-7B 细胞经 STA-21 处理后细胞周期时相分布
(%, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab.1 Analysis of the cell cycle distribution in MCF-7B cells
after STA-21 treatment (%, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分组	G1 期	S 期	G2 期
空白组	64.53 $\pm$ 2.69	27.35 $\pm$ 4.20	8.12 $\pm$ 2.03
对照组	66.42 $\pm$ 2.45	19.80 $\pm$ 5.32	14.50 $\pm$ 3.72
STA-21 10 μ mol/L 组	71.45 $\pm$ 3.40 ^a	18.62 $\pm$ 3.84	9.93 $\pm$ 0.44
STA-21 30 μ mol/L 组	76.57 $\pm$ 3.65 ^a	17.72 $\pm$ 2.34	5.71 $\pm$ 1.32
STA-21 50 μ mol/L 组	79.25 $\pm$ 3.75 ^a	12.19 $\pm$ 4.13	8.56 $\pm$ 0.82

注:a,与空白组比较, $P < 0.05$

2.4 Western blot 检测 P-STAT3、STAT3、CyclinD1、Bcl-xl 蛋白表达

MCF-7B 细胞经 10、30、50 μ mol/L STA-21 处理 24 h 后,用 Western blot 检测表明,与空白组相比 STA-21 可明显抑制 MCF-7B 细胞 P-STAT3 蛋白的表达($P=0.000$),下调 CyclinD1、Bcl-xl 蛋白表达,差异有统计学意义($P=0.000$)且随着 STA-21 浓度增加上述蛋白表达量减少;对照组 CyclinD1、Bcl-xl 蛋白表达量与空白组接近($P=0.208$);5 组细胞 STAT3 蛋白表达量近似($P=0.367$)(图 3)。

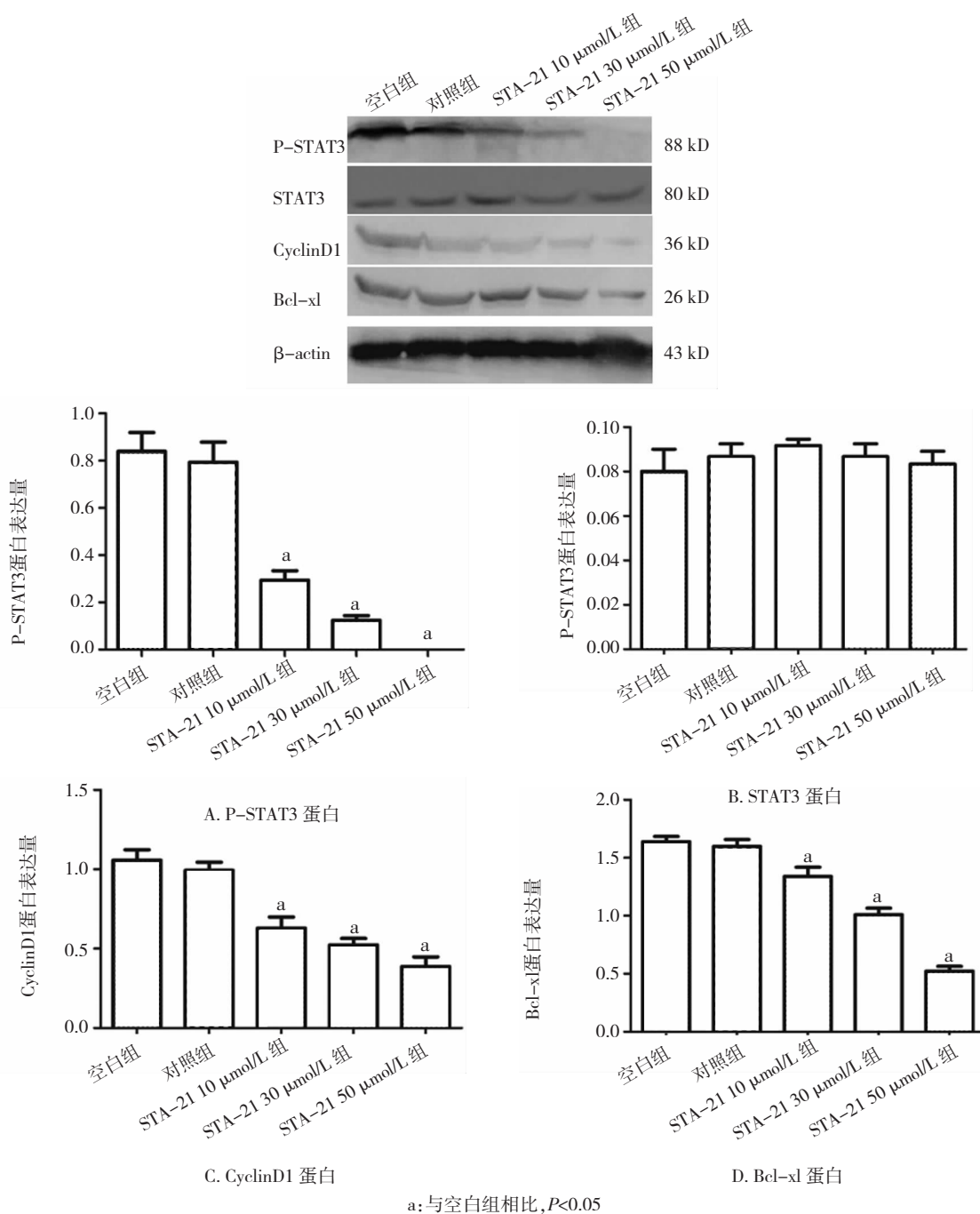


图 3 各组 P-STAT3、STAT3、CyclinD1、Bcl-xl 蛋白表达量

Fig.3 Expressions of P-STAT3, STAT3, CyclinD1 and Bcl-xl protein in each group

3 讨 论

众所周知,细胞周期和细胞凋亡是肿瘤发生的两个重要生物学事件,任何一种调控因子的异常改变均可导致细胞增生异常,凋亡减少,最终诱发肿瘤。目前认为乳腺癌的发生是一个细胞生长增殖失控的过程,涉及到一系列信号转导分子活性的改变^[6]。STAT3 是一种存在于细胞质与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白,是 STATs 7 个家族成员之一。它在未被激活状态下存在于细胞质内,当其激活后发生磷酸化入核介导下游基因 CyclinD1、Bcl-xl 等^[7]的激活。正常信号转导中 STAT3 的激活快速而短暂。STAT3 持续性激活与细胞的恶性转化进程密切相关^[7]。STAT3 还是表皮因子生长受体、白介素 6/两面神激酶、肉瘤基因等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道的汇聚焦点,在多种肿瘤细胞和组织中都有激活。现已将 STAT3 定义为癌基因^[8]。

细胞周期有两个关键限制点:G1/S 期和 G2/M 期,正调控因子可促进细胞通过限制点,而负调控因子可抑制细胞通过限制点,细胞周期正是正负调控因子有序而严格控制的过程,其中 CyclinD1 是作用于 G1 期的重要的细胞周期蛋白,可以促进 G1/S 期转换进而加速细胞周期进程。CyclinD1 的异常表达与多种肿瘤的发生、发展相关^[9]。细胞凋亡是一种基因控制的细胞自主性死亡过程,是维持内环境稳定的重要机制之一。细胞凋亡功能的抑制将导致肿瘤的发生及免疫功能的异常。Bcl-2 家族成员是细胞凋亡的重要调控者,其中成员 Bcl-2 及 Bcl-xl 等,可抑制肿瘤细胞凋亡;而成员 Bax 和 Bid 等,则促进肿瘤细胞凋亡。因此细胞周期蛋白 CyclinD1 及抗凋亡基因 Bcl-xl 作为调控细胞周期及凋亡的两个关键因素,在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。

STA-21 是一种新合成的小分子化合物,通过与 STAT3 SH2 结构域结合以抑制 STAT3 二聚化形成及其与 DNA 结合活性,进而影响其对下游基因的转录^[10]。现已发现 STA-21 对膀胱癌、骨肉瘤、横纹肌肉瘤等有抑制作用^[11-13]。本研究通过 MTT 法检测细胞增殖表明 STA-21 具有抑制 MCF-7B 细胞过度增殖的效应,并具有浓度依赖性;FCM 检测细胞凋亡也证实了随着 STA-21 浓度的增加, MCF-7B 细胞凋亡率增加;细胞周期分析结果显示,与空白组相比,实验组 MCF-7B 细胞出现细胞周期阻滞于 G1 期,推测这可能与 CyclinD1 表达下调有关。本研究还发现 STA-21 能明显抑制 P-STAT3 蛋白表达,但对总 STAT3 蛋白表达基本无影响。同 P-STAT3 蛋白一样, STAT3 下游基因 CyclinD1 及 Bcl-xl 蛋白表达水

平也随着 STA-21 浓度的增加而递减。上述研究结果提示实验组 MCF-7B 细胞出现细胞增殖受抑、凋亡及细胞周期阻滞的原因可能正是由于 P-STAT3 蛋白表达的下调,使得 STAT3 下游 CyclinD1、Bcl-xl 等蛋白表达减少引起。表明 STAT3 基因在人乳腺癌细胞中起着重要的作用。

综上所述,STAT3 特异性抑制剂 STA-21 可在一定程度上干预人乳腺癌 MCF-7B 细胞增殖及促进凋亡,其中 STAT3 信号通路起着重要作用,这为乳腺癌的基因治疗提供了借鉴。

参 考 文 献

- [1] 徐兵河.乳腺癌临床研究的进展与未来[J].中华肿瘤杂志,2007,29(12):881-883.
- [2] Xu B H.Advances and perspective in clinical research on breast cancer[J].Chin J Oncol,2007,29(12):881-883.
- [3] Plonka J,Latocha M.Photodynamic therapy in the treatment of breast cancer[J].Pol Merkur Lekarski,2012,33(195):173-175.
- [4] Behera R,Kumar V,Lohite K,et al.Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells[J].Carcinogenesis,2010,31(2):192-200.
- [5] Zhao X,Sun X,Li X L.Expression and clinical significance of STAT3,P-STAT3 and VEGF-C in small cell lung cancer[J].Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(6):2873-2877.
- [6] Lin L,Liu A,Peng Z,et al.STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells[J].Cancer Res,2011,71(23):7226-7237.
- [7] Yu H,Jove R.The STATs of cancer-new molecular targets come of age[J].Nat Rev Cancer,2004,4(2):97-105.
- [8] Buettner R,Mora L B,Jove R.Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J].Clin Cancer Res,2002,8(4):945-954.
- [9] Bromberg J F,Wrzyszczynska M H,Devgan G,et al.Stat3 as an oncogene[J].Cell,1999,98(3):295-303.
- [10] Li Z,Wang C,Prendergast G C,et al.Cyclin D1 functions in cell migration[J].Cell Cycle,2006,5(21):2440-2442.
- [11] Song H,Wang R,Wang S,et al.A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits stat3 function in breast cancer cells[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2005,102(13):4700-4705.
- [12] Bhasin D,Cisek K,Pandharkar T,et al.Design,synthesis,and studies of small molecule STAT3 inhibitors[J].Bioorg Med Chem Lett,2008,18(1):391-395.
- [13] Chen C L,Cen L,Kohout J,et al.Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival[J].Mol Cancer,2008,7:78.
- [14] Chen C L,Loy A,Cen L,et al.Signal transducer and activator of transcriptions is involved in cell growth and survival of human rhabdomyosarcoma and osteosarcoma cells[J].BMC Cancer,2007,7:111.

(责任编辑:关蕴良)