

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00150

· 论 著 ·

前列腺癌细胞系中 STAT3 活性与顺铂敏感性之间的关系

韩 慧,李春燕,刘 希,储 黎,许 青*

同济大学附属第十人民医院肿瘤及放射治疗科,上海 200072

[摘要] **目的** 研究前列腺癌细胞系中 STAT3 活性与顺铂敏感性之间的关系。**方法** 通过免疫细胞化学和蛋白质印迹法(Western blotting)检测 3 种常见前列腺癌细胞系 LNCaP、PC3、DU145 基础 STAT3 的活性;选取激素非依赖性细胞系 PC3、DU145,分别加入 2 ng/ml、20 ng/ml、200 ng/ml、2 μ g/ml、20 μ g/ml 顺铂检测细胞增殖抑制情况,蛋白质印迹法检测低浓度顺铂作用 DU145 后 STAT3 的活性变化。**结果** 激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC3、DU145 中 STAT3 的活性较激素依赖性细胞系 LNCaP 中的高,且 STAT3 活性较低的 PC3 细胞较 DU145 细胞对顺铂更敏感,低浓度顺铂长时间作用 DU145 后可引起 STAT3 活性上调。**结论** STAT3 可能参与调节前列腺癌细胞对顺铂的敏感性。

[关键词] STAT3 转录因子;顺铂;前列腺肿瘤**[中图分类号]** R 737.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0150-05

Relationship of STAT3 activity with chemosensitivity to cisplatin in prostate cancer cell lines

HAN Hui, LI Chun-yan, LIU Xi, CHU Li, XU Qing*

Department of Oncology and Radio Therapy, The Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between STAT3 activity and sensitivity to cisplatin in prostate cancer cell lines. **Methods** STAT3 activity was examined by immunocytochemistry and Western blotting analysis in three prostate cancer cell lines; LNCaP, PC3 and DU145. Androgen-independent cell lines PC3 and DU145 were selected to examine the inhibitory effect of various concentrations of cisplatin (2 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml, 2 μ g/ml and 20 μ g/ml). STAT3 activity of DU145 cell line was re-examined by Western blotting analysis after treatment with low concentration of cisplatin. **Results** The STAT3 activity of androgen-independent cell lines PC3 and DU145 was higher than that of androgen-dependent cell line LNCaP. The sensitivity of DU145 cells to cisplatin was lower than that of PC3 cells with lower STAT3 activity. Treatment with low concentration of cisplatin for a long period caused STAT3 activation in DU145. **Conclusion** Our results suggest that STAT3 may play a role in regulating the sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin.

[Key words] STAT3; cisplatin; prostatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):150-154]

前列腺癌是美国及欧洲发达国家老年男性最常见的恶性肿瘤之一,以往在我国肿瘤谱中属于小病种而未受到足够重视。随着我国经济建设的发展和人民生活水平的提高,社会老龄化、人口城市化、膳食结构西方化的变化趋势明显,加之检测技术的不断完善,近年来,我国前列腺癌发病率呈明显上升趋势。以上海市为例,前列腺癌的发病由 20 世纪 50 年代的 0.2/10 万人增至 2000 年的 7.7/10 万人,现跃居男性泌尿生殖系肿瘤的首位^[1]。而且,由于目前对激素治疗复发耐药的前列腺癌尚缺乏有效治疗手段,临床常用的放化疗效果十分有限。多项研究表明,信号转导和转录激活子 3(signal transducers

and activators of transcription 3, STAT3)在包括前列腺癌在内的一系列实体肿瘤和血液系统肿瘤中都有持续的表达^[2-5]。

顺铂(cisplatin, DDP)是临床常用的化疗药物之一,价格便宜,抗癌谱广。既往研究表明,一系列以铂类为基础的化合物,如 PtCl₄、CPA1、CPA7,显示出特异的 STAT3 抑制作用^[6]。而且,另有研究提示,铂类较其他多种抗肿瘤药能更有效地抑制 NF- κ B 的活性^[7],鉴于 STAT3 与 NF- κ B 信号通路之间的交互作用,提示 DDP 可能影响 STAT3 转导途径。本研究通过检测 STAT3 活性不同的前列腺癌细胞系对 DDP 敏感性的差异,以及 DDP 对前列腺癌细

[收稿日期] 2011-07-31**[接受日期]** 2011-11-24**[基金项目]** 国家自然科学基金(30872591)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30872591)。**[作者简介]** 韩 慧,硕士生。E-mail: hanhui0910@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-66313384, E-mail: xuqingmd@yahoo.com.cn

胞 STAT3 活性的影响,探讨 STAT3 在 DDP 敏感性影响中可能起到的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株 前列腺癌细胞系 LNCaP、PC3、DU145 购自上海中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂 改良型 RPMI 1640 培养液购自 Hyclone 公司、0.25% 胰蛋白酶加 EDTA 购自 Gibco 公司、DMSO 购自吉诺生物医药技术有限公司,兔抗人 STAT3、p-STAT3 单克隆抗体购自 Epitomics 公司,注射用 DDP 购自齐鲁制药有限公司。

1.3 细胞培养 LNCaP、PC3、DU145 细胞所用培养液均为含有 10% BSA 的 RPMI 1640 (内含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml),培养于 37℃、5% CO₂ 及湿度 95% 的培养箱中,单层传代培养,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.4 免疫细胞化学 LNCaP、PC3、DU145 这 3 种细胞系按 2×10^4 /ml 的细胞密度将细胞接种于盖玻片上,待 4 h 后细胞贴壁每孔加培养液 1 ml,培养过夜,4% 冷多聚甲醛固定,兔抗人 STAT3、p-STAT3 单克隆抗体工作浓度 1:100。DAB 染色,光镜下观察细胞胞质或胞核内出现棕褐色颗粒为阳性。

1.5 细胞蛋白质印迹(Western blotting)检测 各种细胞用 RIPA 提取总蛋白,取同等量蛋白上样以 5% 的浓缩胶、8% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,电转蛋白至 PVDF 膜,5% BSA 37℃ 封闭 1 h,与 1:500 兔抗人 STAT3、p-STAT3 一抗 4% 孵育过

夜,PBST 洗膜 3 次后与辣根过氧化物酶标记的 1:1 500 羊抗兔二抗室温孵育 1 h。ECL 孵育 30 s,暗室曝光并洗片。

1.6 细胞增殖实验 PC3、DU145 细胞铺 96 孔板,每孔加入 1×10^4 个细胞,分别加入终浓度为 2 ng/ml、20 ng/ml、200 ng/ml、2 μ g/ml、20 μ g/ml 的 DDP 培养液,以空白培养液为对照,分别培养 24、48、72 h,加入 5 mg/ml MTT 20 ml,37℃ 培养 4 h,弃去培养液,加入 150 μ l DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的光密度(D)值,计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=[(1-实验组 D 值)/对照 D 值]×100%。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 分析软件,实验结果用成组设计 *t* 检验、方差分析进行统计学分析,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 LNCaP、PC3、DU145 前列腺癌细胞系 STAT3 活性比较 在光镜(×200)下观察到 3 种前列腺癌细胞系(LNCaP、PC3、DU145)经免疫细胞化学染色后,均表达 STAT3 和 p-STAT3, p-STAT3 表达主要集中于胞核内(图 1)。Western blotting 结果显示:3 种前列腺癌细胞系 STAT3 表达差异不大,且进一步对条带进行标准化计算曲线下面积比较也显示 STAT3 表达差异不明显;但 p-STAT3 表达差异明显,DU145 表达最强,PC3 表达次之,LNCaP 表达最弱(图 2)。

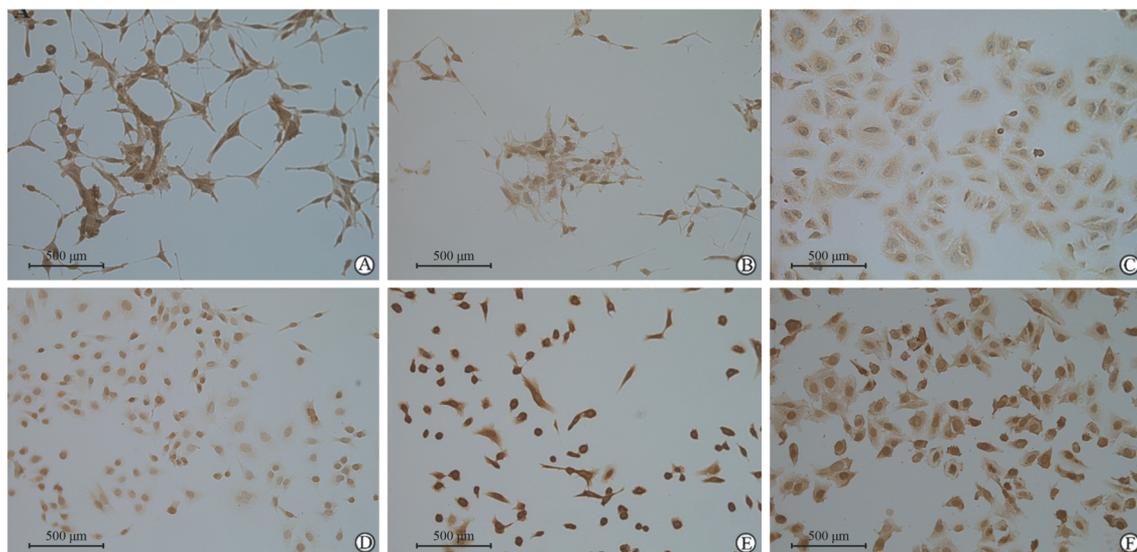


图 1 3 种前列腺癌细胞系 STAT3、p-STAT3 免疫细胞化学表达

Fig 1 Expression of STAT3 and p-STAT3 in three prostate cancer cell lines by immunocytochemical staining

A: Expression of STAT3 in LNCaP cells; B: Expression of p-STAT3 in LNCaP cells; C: Expression of STAT3 in PC3 cells; D: Expression of p-STAT3 in PC3 cells; E: Expression of STAT3 in DU145 cells; F: Expression of p-STAT3 in DU145 cells

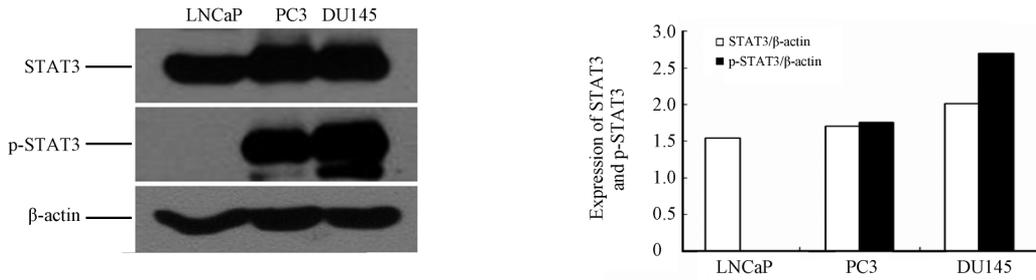


图 2 3种前列腺癌细胞系 STAT3、p-STAT3 表达的 Western blotting 检测结果

Fig 2 Expression of STAT3 and p-STAT3 in three prostate cancer cell lines by Western blotting analysis

2.2 DDP 对 PC3、DU145 细胞增殖影响的比较 DDP在超过一定浓度时,可杀灭及抑制前列腺癌细胞 DU145、PC3 增殖,细胞增殖抑制率在一定浓度范围内随 DDP 浓度增大而升高,相同浓度

DDP 对前列腺癌细胞增殖抑制率依赖于作用时间;当 DDP 浓度小于 200 ng/ml,作用 3 d,几乎均未观察到对细胞增殖的明显抑制;当 DDP 浓度较高时,对 PC3 的增殖抑制作用较 DU145 明显(图 3)。

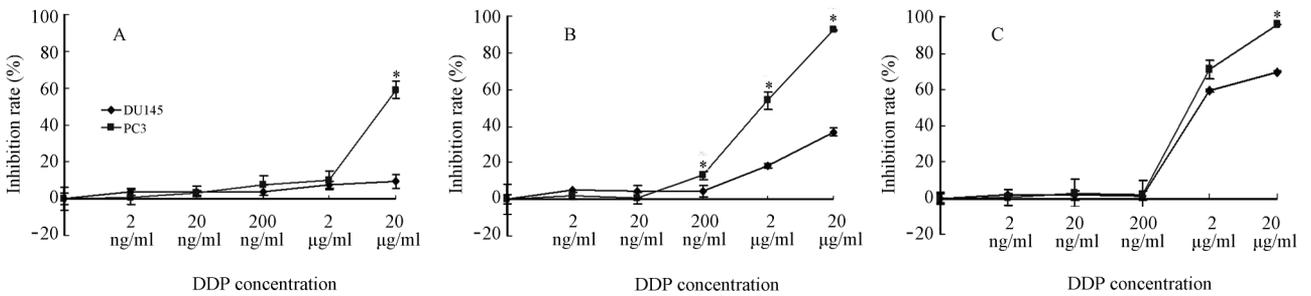


图 3 DDP 对两种前列腺癌细胞增殖抑制情况的比较

Fig 3 Inhibitory effects of cisplatin on DU145 and PC3 cell proliferation

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h. * P<0.05 vs PC3 cells under the same concentration; n=3, $\bar{x} \pm s$

2.3 低剂量 DDP 长期作用 DU145 细胞引起 STAT3 活性的改变 选择 3 d 内无明显细胞毒性作用的浓度(20 ng/ml)DDP 作用 DU145 细胞,持续检测 STAT3、p-STAT3 蛋白表达,发现 p-STAT3

的表达逐渐降低,在 1 h 时降到最低点,后出现反弹,作用 7 d 观察到 p-STAT3 一直在较高水平(较基础值更高),具体见图 4。

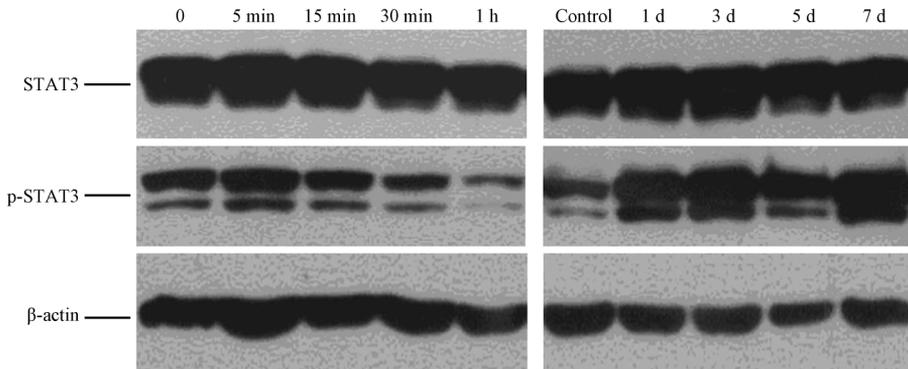


图 4 20 ng/ml DDP 作用 DU145 细胞 STAT3、p-STAT3 随时间的变化

Fig 4 Expression of STAT3 and p-STAT3 in DU145 cells treated with 20 ng/ml DDP

3 讨论

作为 JAK-STAT 信号途径中的一个环节, STAT 家族系一组介导细胞信号转导的胞质转录因子。STAT 特异性信号的持续表达, 尤其是 STAT3, 可通过影响肿瘤细胞凋亡^[8]、肿瘤细胞血管形成^[9]、肿瘤免疫逃逸^[10]等机制促进肿瘤的生长。

LNCaP、PC3 及 DU145 是基础研究常用的 3 种前列腺癌细胞系。LNCaP 细胞系是 1977 年从一名白人前列腺癌患者锁骨上淋巴结转移灶中分离所得, 其表达高亲和性的特异性雄激素受体, 为激素依赖性前列腺癌细胞系。LNCaP 细胞系生长相对缓慢, 倍增时间约 60 h。PC3 和 DU145 为经典前列腺癌细胞系。PC3 细胞系来源于前列腺癌骨转移灶, 高度转移潜能; DU145 细胞系来源于前列腺癌脑转移灶, 中度转移潜能^[11]。两者均为激素非依赖性前列腺癌细胞系, 缺乏雄激素受体的表达。一些研究者发现 PC3 细胞缺乏 STAT3 的表达^[12-13], 而另一些研究者发现该 3 种前列腺癌细胞系都显示 STAT3 组成性激活, 但激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 的 STAT3 活性水平大大低于其他两种激素非依赖性细胞系^[5], 与本研究结果一致。这提示 STAT3 可能诱导前列腺癌向激素非依赖性阶段演进, 并且在激素非依赖性前列腺癌中对肿瘤细胞的生长起重要促进作用。研究发现, IL-6 诱导的 STAT3 激活可使 LNCaP 细胞对抗雄激素剥夺引起的凋亡^[14]。

DDP 是中心以二价铂同 2 个氯原子和 2 个氨分子结合的重金属络合物, 属细胞周期非特异性药物, 具有细胞毒性, 可抑制癌细胞的 DNA 复制过程, 并损伤其细胞膜上结构, 有较强的广谱抗癌作用, 而且价格便宜。但由于前列腺癌细胞对 DDP 敏感性不高, 因此 DDP 尚未被列为前列腺癌的一线治疗药物^[15]。本研究参考其他文献报道的 DDP 体外实验的有效浓度^[7,16], 选择较大范围浓度(2 ng/ml、20 ng/ml、200 ng/ml、2 μg/ml、20 μg/ml)检测 DDP 对前列腺癌细胞的影响。结果发现 p-STAT3 表达较低的 PC3 较 DU145 对 DDP 更敏感, 而且进一步对 DU145 细胞的研究发现, 在细胞生长无明显抑制的浓度下(20 ng/ml), STAT3 的活性经过短暂的抑

制后, 被长久持续上调, 提示 STAT3 的激活可能参与 DDP 敏感性调节。目前, 对 DDP 的耐药机制已有一定程度的认识, 包括肿瘤内血流减少、细胞外环境影响、药物摄入减少而外排增加、DNA 修复、错配减少、细胞因子的异常表达等^[17]。

相关研究发现, STAT3 显性负性突变可使细胞对同样作用于细胞 DNA 的紫外线和丝裂霉素重获敏感^[18]。这些证据表明, STAT3 可能是在 DDP 耐药中起关键作用的分子之一。在多种其他肿瘤中, 高表达 STAT3 或 STAT3 的持续性激活与 DDP 耐药有关, 包括头颈部肿瘤^[19]、卵巢癌^[20]、非小细胞肺癌^[21]等。由于 STAT3 下游作用于细胞周期的因子 Bcl-xL、mcl-1、cyclinD₁/D₂ 和 c-myc 等可对抗 DDP 引起的细胞凋亡, 因此 STAT3 的激活可削弱 DDP 的抗肿瘤作用, 从而表现出 DDP 不敏感。反之, 抑制 STAT3 的药物可增加肿瘤细胞对于 DDP 的敏感性^[22]。目前对于激素非依赖性前列腺癌尚缺乏有效治疗手段, 抑制 STAT3 在前列腺癌细胞中的表达可能增加其对 DDP 的敏感性, 为前列腺癌的治疗提供新思路, 有待进一步实验证实。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 2000 年上海市恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤, 2003, 23: 532.
- [2] Snyder M, Huang X Y, Zhang J J. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) directly regulates cytokine-induced fascin expression and is required for breast cancer cell migration[J]. J Biol Chem, 2011, 286: 38886-38893.
- [3] Zhao S H, Zhao F, Zheng J Y, Gao L F, Zhao X J, Cui M H. Knockdown of stat3 expression by RNAi inhibits *in vitro* growth of human ovarian cancer[J]. Radiol Oncol, 2011, 45: 196-203.
- [4] Redell M S, Ruiz M J, Alonzo T A, Gerbing R B, Tweardy D J. Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor[J]. Blood, 2011, 117: 5701-5709.
- [5] Mora L B, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines; Direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2002, 62: 6659-6666.
- [6] Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways[J].

- Oncogene, 2005, 24: 5552-5560.
- [7] Shen Y, Wang J, Yang T, Li Y, Jiang W, Guan Z, et al. Platinum sensitize human epithelial tumor cells to lymphotoxin alpha by inhibiting NF kappa B-dependent transcription [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7: 1407-1414.
- [8] Bromberg J, Darnell J E Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function [J]. Oncogene, 2000, 19: 2468-2473.
- [9] Darnell J E Jr. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway [J]. J Interferon Cytokine Res, 1998, 18: 549-554.
- [10] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity [J]. Nat Med, 2005, 11: 1314-1321.
- [11] Pulukuri S M, Gondi C S, Lakka S S, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 36529-36540.
- [12] Abdulghani J, Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, et al. Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer [J]. Am J Pathol, 2008, 172: 1717-1728.
- [13] Yuan Z L, Guan Y J, Chatterjee D, Chin Y E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue [J]. Science, 2005, 307: 269-273.
- [14] Lee S O, Lou W, Johnson C S, Trump D L, Gao A C. Interleukin-6 protects LNCaP cells from apoptosis induced by androgen deprivation through the Stat3 pathway [J]. Prostate, 2004, 60: 178-186.
- [15] Li Q Q, Wang G, Reed E, Huang L, Cuff C F. Evaluation of Cisplatin in combination with beta-elemene as a regimen for prostate cancer chemotherapy [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010, 107: 868-876.
- [16] Shen F Z, Wang J, Liang J, Mu K, Hou J Y, Wang Y T. Low-dose metronomic chemotherapy with cisplatin: can it suppress angiogenesis in H22 hepatocarcinoma cells? [J]. Int J Exp Pathol, 2010, 91: 10-16.
- [17] Stewart D J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin [J]. Crit Rev Oncol Hemat, 2007, 63: 12-31.
- [18] Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2002, 62: 3351-3355.
- [19] Gu F, Ma Y, Zhang Z, Zhao J, Kobayashi H, Zhang L, et al. Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2010, 23: 671-676.
- [20] Selvendiran K, Bratasz A, Kuppusamy M L, Tazi M F, Rivera B K, Kuppusamy P. Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Int J Cancer, 2009, 125: 2198-2204.
- [21] Ikuta K, Takemura K, Kihara M, Nishimura M, Ueda N, Naito S, et al. Overexpression of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 mRNA in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2005, 13: 217-222.
- [22] Liu T, Peng H, Zhang M, Deng Y, Wu Z. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 641: 15-22.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群

《外科及断层影像应用解剖学(第2版)》已出版

该书由张传森、党瑞山主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0320-2,16开,定价78.00元。

外科应用解剖学是外科各专业研究生必须掌握的基础课程。虽然外科各专业有其共性,但各专业研究生受学时限制,只能以掌握与本专业有关的内容为主。为便于外科各专业研究生学习,该书分为显微外科,四肢脊柱外科,胸部外科,腹、盆部外科,头颈部外科和断层影像应用解剖学6篇,各篇内容均保持各自的相对独立性。研究生可以重点学习相关的选定篇章,其余各部分作为学习的参考资料。该书篇下设章,每章均分为学习重点、结构概要、解剖操作指导和应用解剖学等几个部分。应用解剖学是教材的重点,包括相应专业的常见创伤、疾病和术式的应用解剖学基础和临床解剖学,即从专业着眼,在局部解剖学的基础上更深入一步,使之更贴近临床。该书既可作为研究生的课程教材,亦可供临床医师参考。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.cn>