

STAT3 抑制剂 Stattic 对肝癌细胞 Bel-7402 生长、迁移、侵袭和放射敏感性的影响

朱丽华 徐刚 龚爱华 王燕 薛辉 张丽 吴朝阳

【摘要】 目的 观察信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抑制剂 Stattic (Y705) 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长、迁移、侵袭和放射敏感性的影响。方法 将人肝癌细胞系 Bel-7402 分为 4 组, 空白对照组、Stattic 组、单纯照射组和 Stattic 联合照射组 (联合组)。CCK8 检测细胞的生长和增殖; 划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验分别检测各组细胞的迁移能力和侵袭能力; 克隆形成实验观察 Stattic 对 Bel-7402 细胞放射敏感性的影响; Western blot 检测各组 STAT3、p-STAT3、Bax、Bel-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平。结果 Stattic 明显抑制人肝癌 Bel-7402 细胞的生长, 并表现出剂量-效应关系, Stattic 作用于细胞 48 h 后的 IC_{50} 为 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 。 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 Stattic 与 8 Gy 射线照射联用, 两者在细胞增殖抑制率上, 表现出协同作用, 抑制率下降了 $(15.00 \pm 1.87)\%$ ($F = 63.30, P < 0.05$)。划痕愈合实验显示联合组细胞的迁移能力明显降低, Transwell 侵袭实验显示联合组滤膜细胞数明显减少。克隆形成实验显示, 联合组与单纯照射组相比, 克隆形成能力下降, SF_2 、 D_0 、 D_q 均下降, ($t = 4.20, 6.92, 9.32, P < 0.05$)。Stattic 在 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时放射增敏比 (SER_{SF_2}) 为 1.22。Western blot 结果显示与单纯照射组相比, 联合组的 p-STAT3、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低 ($t = 5.32, 6.02, 13.26, P < 0.05$)。Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高 ($t = -7.82, -14.09, P < 0.05$)。Bel-2 蛋白的表达下降 ($t = 18.43, P < 0.05$)。结论 Stattic 通过抑制肝癌细胞 Bel-7402 的 p-STAT3 激活, 一方面诱导凋亡增加肿瘤细胞的放射敏感性; 另一方面降低了金属基质蛋白酶的上升, 从而降低了肿瘤细胞迁移和侵袭能力。

【关键词】 Stattic; 放射敏感性; 肝癌细胞; 细胞侵袭; 细胞凋亡

The effects of Stattic, a STAT3 inhibitor, on the growth, migration and radiosensitivity of liver cancer cells Bel-7402 Zhu Lihua*, Xu Gang, Gong Aihua, Wang Yan, Xue Hui, Zhang Li, Wu Chaoyang. *Department of Radiation Oncology, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang 212002, China

Corresponding author: Wu Chaoyang, Email: wuchaoyang9@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects and preliminary mechanism of Stattic (Y705), an inhibitor of the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), on the growth, migration, invasion and radiosensitization of hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402. **Methods** Bel-7402 cells were divided to four groups: blank control group, Stattic treatment group, radiation group, and Stattic combined with radiation group. The cell growth and proliferation were detected by using CCK8 kit. The influence of Stattic on radiation sensitivity of Bel-7402 cells was determined by clone formation assay. The cell migration and invasion ability were tested by scratch migration assay and transwell assay, respectively. The protein expressions of STAT3, p-STAT3, Bax, Bel-2, Caspase-3, Cleaved Caspase-3, MMP-2 and MMP-9 were quantified by Western blotting assay. **Results** Stattic significantly inhibited the growth of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells with a dose-dependent manner. The IC_{50} of Stattic after 48 h treatment was $2.5 \mu\text{mol/L}$. When $1.0 \mu\text{mol/L}$ Stattic was combined with 8 Gy X-rays, there was a synergistic effect in inhibition of cell proliferation with a inhibition rate of $(15.00 \pm 1.87)\%$ ($F = 63.30, P < 0.05$). Scratch migration assay and transwell invasion assay showed that the migration and invasion

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.06.003

基金项目: 国家自然科学基金(81372718)

作者单位: 212002 镇江, 江苏省镇江市第一人民医院肿瘤科(朱丽华、徐刚、王燕、薛辉、吴朝阳); 江苏大学医学院细胞生物学实验室(龚爱华、张丽)

通信作者: 吴朝阳, Email: wuchaoyang9@163.com

abilities of the combination group were significantly reduced. In addition, compared with the radiation group, the SF_2 , D_0 and D_q values obtained from survival curve were decreased ($t = 4.20, 6.92, 9.32, P < 0.05$), the protein expressions of p-STAT3, MMP-2, MMP-9 were reduced ($t = 5.32, 6.02, 13.26, P < 0.05$), the protein expressions of Bax and Cleaved Caspase-3 were increased in the combination group ($t = -7.82, -14.09, P < 0.05$), meanwhile the protein expressions of Bcl-2 was decreased ($t = 18.43, P < 0.05$). When the concentration of Stattic was $0.5 \mu\text{mol/L}$, the radiation sensitization ratio at 2 Gy (SER_{SF_2}) was 1.22. **Conclusions** By inhibiting the activation of the p-STAT3 in Bel-7402 cells, stattic could induce cell apoptosis and increase the radiosensitivity, down regulate MMP-2 and MMP-9 and thereby reduce the invasion and migration of tumor cells.

【Key words】 Stattic; Radiosensitivity; Hepatocellular carcinoma cell; Cell invasion; Cell apoptosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种临床常见的恶性肿瘤, 临床数据表明放射治疗改善肝癌患者 3 年生存率最高可达 30%^[1], 提示放射治疗有望成为肝癌治疗的有效手段。但肝脏的放射耐受性差, 有效的肝癌放射治疗的增敏剂将改善肝癌治疗现状。

信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, 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。STAT3 的过度激活能够上调部分与肿瘤细胞增殖、存活和侵袭相关的基因, 参与包括肝癌在内的多种肿瘤的发生和发展^[2]。目前研究表明, 阻断 STAT3 的持续激活可以明显降低肿瘤细胞的存活、增殖、侵袭能力^[3,4]。Stattic 是 STAT3 的特异性抑制剂, 通过阻止 STAT3 的 SH2 结构域 Tyr⁷⁰⁵ 磷酸化, 从而抑制 STAT3 二聚体化和核内转移。本研究以高表达 p-STAT3 的肝癌细胞系 Bel-7402 为研究对象, 探讨 Stattic 对肝癌细胞生长、迁移、侵袭和放射增敏作用及潜在机制。

材料与方法

1. 细胞及主要试剂: 肝癌细胞系 Bel-7402 由江苏大学医学院分子生物学实验室传代保存。DMEM 高糖培养基 (含 L-谷氨酰胺和丙酮酸钠)、胎牛血清、0.25% 胰酶、磷酸盐缓冲液 (PBS) 购于美国 Hyclone 公司, 青霉素/链霉素溶液 ($10\ 000\ \text{U/ml}$ 青霉素, $10\ 000\ \mu\text{g/ml}$ 链霉素, 溶于 0.85% NaCl) 购于美国 Thermo 公司。STAT3 抑制剂 (Stattic)、二甲基亚砷 (DMSO) 购于美国 Sigma 公司。活细胞计数试剂盒 (CCK8 cell counting kit) 购于南京 Vazyme 公司。Transwell 小室购于美国 Corning 公司, Matrigel 胶购于美国 BD 公司。蛋白 Marker 购于美国 Thermo 公司, STAT3、p-STAT3、Caspase-3、MMP-2、MMP-9、肌动蛋白抗体购于美国 Cell Signaling 公司。

2. 细胞培养: Bel-7402 培养于含 10% 的胎牛血清、 $100\ \text{U/L}$ 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中。细胞置于 5% CO_2 、 37°C 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司) 内培养, 每 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

3. 药物配制及照射方法: 将 25 mg 的 STAT3 特异性抑制剂 Stattic 溶于 2 ml 的 DMSO 中, 配成 $6 \times 10^4\ \mu\text{mol/L}$ 浓度的母液储存在 -20°C 冰箱中, 每次使用时用 DMEM 培养基稀释至目标浓度。使用 ONCOR 直线加速器 (德国 Siemens 公司), 应用 6 MV X 射线进行不同剂量照射, 剂量率为 $300\ \text{cGy/min}$, 源皮距 100 cm, 照射野为 $20\ \text{cm} \times 20\ \text{cm}$, 照射时机架角转至 180° , 细胞培养皿下垫 2.0 cm 厚的剂量补偿板, 在 CT (美国 GE 公司) 下定位, 并用 Pinnacle 3 计算机治疗计划系统 (荷兰 Philips 公司) 对剂量进行调整。

4. CCK8 法检测细胞增殖: 将对数生长期的细胞用胰酶消化传代, 显微镜下细胞计数, 调整细胞密度约 $3 \times 10^4/\text{ml}$, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔。细胞种板 24 h 后, 每孔更换不同浓度 Stattic ($0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32\ \mu\text{mol/L}$) 的含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基; 对照组加入等量 5% 培养基 $100\ \mu\text{l}$, 分别继续培养 48 h 后弃去原培养基, 每孔内加入 $100\ \mu\text{l}$ DMEM 培养基和 $10\ \mu\text{l}$ 的 CCK8 试剂, 将 96 孔板置于细胞培养箱内培养 1 h, 在 450 nm 波长处用酶标仪 (美国 BD 公司) 测定各孔吸光度 (A) 值。各药物浓度重复 3 次, 计算细胞存活率。根据细胞增殖抑制率和药物浓度, 细胞存活率 (%) = (加药组 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照组 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。利用 GraphPad Prism 5 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50}), 并用 20% 的 IC_{50} 作为后续放射增敏实验浓度。实验重复 3 次。

5. CCK8 实验检测 Stattic 联合 X 射线照射对 Bel-7402 细胞的增殖抑制作用: 实验分为空白对照

组(仅更换 5% 血清培养基), Stattic 组(1 $\mu\text{mol/L}$), 单纯照射组(8 Gy) 和 Stattic 联合照射组(联合组, 照射 8 Gy 前 4 h 加入 Stattic 1 $\mu\text{mol/L}$)。以上各组细胞在照射 72 h 后进行 CCK8 实验。每个剂量点设置 3 个复孔, 计算各组细胞存活率。

6. 克隆形成实验: 取对数生长期细胞, 1 000 r/min 消化离心 5 min, 离心半径 12 cm, 制成 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 单细胞悬液, 将不同细胞数种于 6 孔板中, 分为单纯照射组和联合组。种板后 24 h, 单照射组更换 5% 血清培养基, 联合组更换含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Stattic 的 5% 血清培养基, 两组共同在细胞培养箱中孵育 4 h 后分别接受 0、2、4、6、8 Gy 的 6 MV 的 X 射线照射, 继续培养 14 d, -20°C 冰甲醇固定 10 min, 0.05% 结晶紫在室温下染色 30 min 后双蒸水洗涤 3 次, 空气干燥。倒置显微镜下进行细胞计数, ≥ 50 个细胞集落作为 1 个克隆。实验重复 3 次, 计算克隆形成率 ($PE, \%$) = (克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$, 存活分数 ($CF, \%$) = 照射各剂量点 $PE/0$ Gy PE 。按多靶单击模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 使用 Graphpad 5 软件拟合细胞存活曲线, 得出 k 和 N 值, 计算单纯照射组和联合组的 SF_2 、 D_0 和 D_q 值, 并计算放射增敏比 (SER)。

7. 细胞划痕实验: 参照周菊英等^[5]的方法, 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 以 $2 \times 10^6/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中, 分为空白对照组、Stattic 组、单纯照射组和联合组, 待细胞覆盖孔 90% 密度时, 在细胞表面划 1 条直线, 用无菌 PBS 漂洗 2 次去除划下的悬浮细胞, Stattic 组和联合组每孔加入含 2% 血清的培养基配成的浓度达 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Stattic, 空白对照组和单纯照射组加入含 2% 血清的培养基, 换液后 4 h 单纯照射组和联合组给予 4 Gy 剂量照射, 而后置于培养箱继续培养 0、24、48 h 后, 倒置显微镜 100 倍镜下观察细胞迁移情况。

8. Transwell 侵袭实验: 参照闫洪亮等^[6]方法, 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 以 $2 \times 10^6/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中, 分为空白对照组, Stattic 组、单纯照射组和联合组, 设 0 和 4 Gy 2 个剂量点, 设 0 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 两个药物浓度, 处理 48 h 后收集各组细胞, 在 Transwell 小室上室加入用 DMEM 培养基稀释后的 Matrigel 基质胶(1 mg/ml) 60 μl , 置于细胞培养箱孵育 4 h。上室内加入 5×10^5 个细胞, 稀释于 100 μl 不含血清的培养基中, 下室加入 650 μl 含 10% 血清的培养液, 置于培养箱中培养 18 h, 取出

膜, 用棉签拭净基质胶及上室面细胞, 甲醛固定, 0.05% 结晶紫染色后, 倒置显微镜 100 倍镜下观察穿透膜的细胞数, 随机选择 4 个不同视野在 400 倍下计数, 计算平均数。

9. Western blot 分析蛋白表达变化: 分为空白对照组、Stattic 组、单纯照射组和联合组。照射后 48 h 提取蛋白, 裂解细胞时加入 $2 \times$ loading 蛋白上样缓冲液, 95°C 加热 5 min, 用 10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离样品, 湿转法转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 STAT3 (1:1 000)、p-STAT3 (1:2 000)、Caspase-3 (1:1 000)、MMP-2 (1:1 000)、MMP-9 (1:1 000) 和 β -肌动蛋白 (1:5 000) 抗体, 4°C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光检测显影, 在凝胶成像系统上拍照并分析。

10. 统计学处理: 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, IC_{50} 的 CCK8 数据应用单因素方差分析, 4 组之间比较的 CCK8 数据应用双因素方差的协因分析, Transwell 数据及细胞存活分数进行配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Stattic 对 Bel-7402 细胞增殖抑制的影响: CCK8 结果表明不同浓度的 Stattic 对 Bel-7402 细胞的增殖有不同程度的抑制作用, 并且其增殖抑制作用随 Stattic 浓度的增加而增强, 各浓度组总体上比较, 差异有统计学意义 ($F = 1 861.74, P < 0.05$)。与空白对照组比较, Bel-7402 细胞 1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ Stattic 组细胞生存率降低, 差异均有统计学意义 ($t = 6.82、8.23、65.38、48.17、105.54、69.51, P < 0.05$), 而 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Stattic 组细胞生存率差异均无统计学意义。为排除 Stattic 本身对细胞生长的抑制作用, 选用 1 $\mu\text{mol/L}$ 进行联合组 CCK8 实验^[7]。根据浓度和细胞存活率利用 Graphpad Prism 5.0 软件计算 Stattic 作用 48 h 的 IC_{50} 为 (2.54 ± 0.20) $\mu\text{mol/L}$ 。

2. Stattic 联合 X 射线照射对 Bel-7402 细胞增殖抑制的影响: 在 Bel-7402 中, 8 Gy X 射线照射组细胞存活率为 $59\% \pm 1\%$, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Stattic 组细胞存活率为 $91\% \pm 2\%$, 联合组细胞存活率为 $48\% \pm 2\%$, 与空白对照组相比, 单纯照射组(8 Gy) 和 Stattic 组(1 $\mu\text{mol/L}$) 差异有统计学意义 ($F =$

2 401.45、282.83, $P < 0.05$), 且 X 射线照射和 Static 存在协同作用 ($F = 63.30, P < 0.05$)。

3. Static 联合照射对 Bel-7402 细胞迁移的抑制作用: 采用划痕实验观察低细胞毒性剂量 ($1 \mu\text{mol/L}$) Static 及低剂量照射 (4 Gy) 对 Bel-7402 细胞的迁移影响, 发现 Static 组划痕宽度有所变窄, 而单纯照射组细胞划痕宽度小于空白对照组, 接近愈合; 而 Static 联合照射组划痕宽度最大, 超过 Static 组, 见图 1。提示低剂量照射在划痕 48 h 后细胞的迁移能力反而有所提升, 单用 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Static, 即可抑制肝癌细胞 Bel-7402 的迁移能力, 但联合组与 Static 组相比, 迁移能力抑制更为明显。

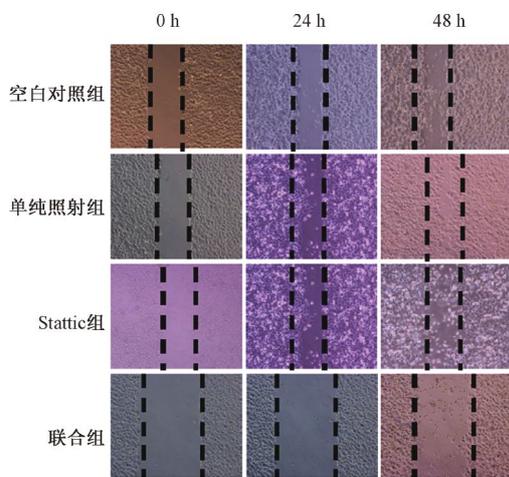


图 1 Bel-7402 细胞的迁移变化 $\times 100$

4. Static 联合照射对 Bel-7402 细胞侵袭的抑制作用: 4 组之间 Bel-7402 细胞侵袭能力在倒置显微镜 100 倍镜下如图 2 所示, $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Static 及 4 Gy 的 X 射线照射对 Bel-7402 细胞的侵袭能力均有影响, 发现 Static 组细胞侵袭能力减弱, 而单纯照射组细胞侵袭能力超过空白对照组; 而 Static 联合照射组细胞侵袭能力最弱, 超过 Static 组, 提示 4 Gy 照射后细胞的侵袭能力反而有所提升, 单用 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Static 即可抑制肝癌细胞 Bel-7402 的侵袭能力, 但联合组与 Static 组相比, 侵袭能力抑制更为明显。倒置显微镜观察各处理组细胞透膜细胞数, 与空白对照组相比, 单纯照射组透膜细胞数增多 ($t = -4.80, P < 0.05$), Static 组透膜细胞数降低 ($t = 8.72, P < 0.05$), 联合组与单纯照射组比较, 透膜细胞数降低, 差异有统计学意义 ($t = -14.06, P < 0.05$)。

5. Static 对 Bel-7402 细胞放射敏感性的影响: 0 Gy 的 PE 为 $(74 \pm 7)\%$, 适合克隆形成实验。为扣

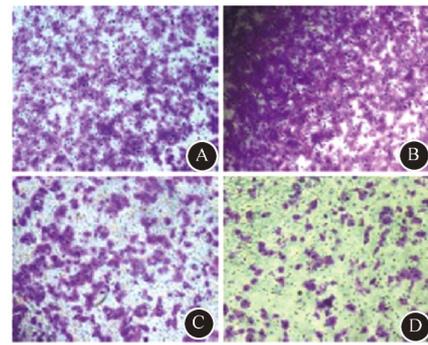


图 2 各处理组 Bel-7402 细胞的侵袭情况 结晶紫染色 $\times 100$
A. 空白对照组; B. 单纯照射组; C. Static 组; D. 联合组

除 Static 本身对实验结果的影响, 本实验以联合组 0 Gy 的 SF 为基准, 对联合组的 SF 进行校正, 从而得到 Static 的放射增敏作用的相关生物学参数^[8]。根据克隆形成实验的结果, 拟合生存曲线见图 3, 所得放射生物学参数见表 1, 相应的放射增敏比 SER_{D_0} 为 1.65, SER_{D_q} 为 1.08, SER_{SF_2} 为 1.22, 说明 Static 对 Bel-7402 细胞有放射增敏作用。

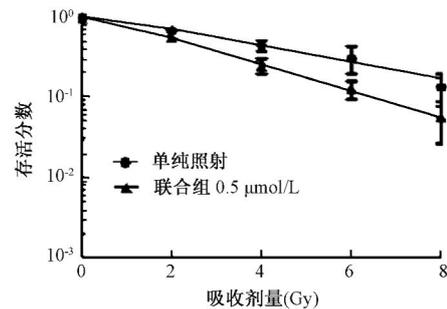


图 3 Static 对 Bel-7402 剂量生存曲线的影响

表 1 Bel-7402 细胞单纯照射组和联合组的放射生物学参数

组别	样本数	K	N	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	SF_2
单纯照射组	3	0.33	1.69	3.14	1.48	0.68
联合组	3	0.42	1.49	2.52	0.73	0.56

6. Static 联合照射对 Bel-7402 细胞中 STAT3, p-STAT3、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响: 如图 3 所示, 与空白对照组相比, 4 Gy 照射可提高 p-STAT3 及 MMP-2, MMP-9 蛋白的表达水平 ($t = -4.03$ 、 -5.12 、 $-6.86, P < 0.05$), 给予 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 Static 可使蛋白表达不同程度降低。而 X 射线联合 Static 可显著降低 p-STAT3、MMP-2 及 MMP-9 蛋白的表达水平, 其表达明显低于单纯照射组 ($t = 5.32$ 、 6.02 、 $13.26, P < 0.05$)。各组 Bel-7402 细胞的 STAT3 蛋白表达水平无明显差异。

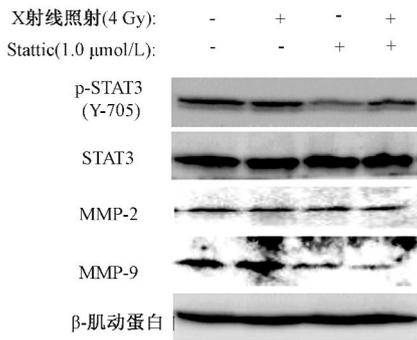


图 4 Stattic 联合 X 射线照射对 Bel-7402 细胞中侵袭相关蛋白的影响

7. Stattic 联合照射对 Bel-7402 细胞中 STAT3, p-STAT3 及凋亡相关蛋白表达水平的影响:如图 5 所示,接近 IC_{50} 剂量的 Stattic 2.5 μmol/L 和 8 Gy 的 X 射线照射对 Bel-7402 细胞中的 STAT3 蛋白表达影响不明显。X 射线照射可上调 p-STAT3 蛋白表达,同时 Stattic 可显著下调 p-STAT3 蛋白 ($t = -9.95, 12.35, P < 0.05$),联合组 p-STAT3 蛋白表达较单照射组相比有所降低 ($t = 5.34, P < 0.05$)。与空白对照组相比,单纯照射组和 Stattic 组均可增加 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白的表达,下调 Bel-2 蛋白表达 ($t = -20.32, -16.78, 4.13, P < 0.05$),但与单纯照射组相比,联合组 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达上升 ($t = -7.82, -14.09, P < 0.05$),Bel-2 蛋白表达下降 ($t = 18.43, P < 0.05$)。各组 Bel-7402 细胞的 β-肌动蛋白表达水平无明显差异。

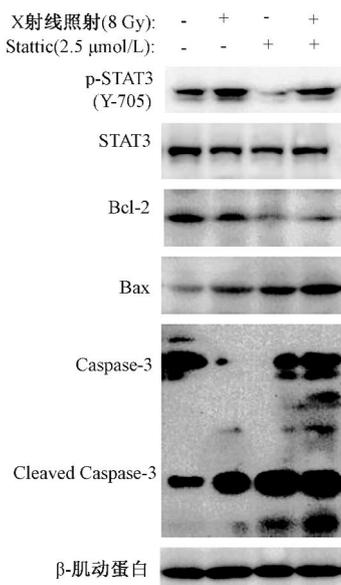


图 5 Stattic 联合 X 射线照射对 Bel-7402 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响

讨 论

在人体正常细胞和组织中,STAT3 可以短暂激活和失活,调控正常的生理功能,但是在许多恶性肿瘤中 STAT3 却是持续激活的^[9]。这种持续激活的 STAT3 可以诱导相关基因的活化,促进肿瘤细胞的增殖和抑制凋亡,从而促进肿瘤发生。在肝脏中,Calvisi 等^[10]发现,在肝癌组织中 STAT3 蛋白的磷酸化表达比癌旁组织和正常肝脏组织明显升高。He 等^[11]第 1 次分离出最终导致肝细胞癌的祖细胞,发现由于它们可以自分泌 IL-6,激活 IL-6/STAT3 信号通路,导致最终发展成为肝癌细胞,这一研究表明 STAT3 在肝癌的发生发展中占有重要地位。本研究首次在肝癌细胞中应用 STAT3 抑制剂 Stattic,发现 Stattic 降低了肝癌 Bel-7402 细胞中 p-STAT3 表达水平,并通过 CCK8 实验证明了 Stattic 可以抑制肝癌细胞的生长。其机制可能与 Stattic 诱导凋亡有关,Pan 等^[12]在鼻咽癌的研究中发现 Stattic 能够上调 Cleaved Caspase-3 的水平,并抑制增殖蛋白 CyclinD1 蛋白的表达。而本研究在肝癌细胞中应用 Stattic 同样上调了凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 的水平,同时还发现,Stattic 可以下调抗凋亡蛋白 Bel-2 水平,上调促凋亡蛋白 Bax 水平。所以,Stattic 可能通过抑制 STAT3 的磷酸化激活,上调 CyclinD1、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达,下调 Bel-2 蛋白表达,从而减少增殖和增强凋亡,最终抑制了肝癌细胞的生长。

异常激活的 STAT3 信号不仅能够通过抑制凋亡和诱导细胞增殖促进肿瘤的产生和增殖,还能够促进肿瘤的血管形成、侵袭和转移^[9]。Cheng 等^[13]发现在乳腺癌细胞中激活的 STAT3 蛋白可以连接到 Twist 启动子上,从而诱导 Twist 转录和过表达。同时,Zhao 等^[14]发现在肝癌细胞中 Twist 通过激活 MMP-2、MMP-9 促进肿瘤的侵袭。本研究中,发现 4 Gy 照射组侵袭能力增强,而且随着照射 p-STAT3 的活化及 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达也随之升高,尤其是 MMP-9 蛋白表达上调明显,这与 Cheng 等^[15]发现辐射能够促进肝癌细胞中 MMP-9 表达从而促进肝癌的侵袭结果一致。Cheng 等^[13]应用 STAT3-shRNA 抑制了 STAT3 的表达,降低了乳腺癌细胞的迁移和侵袭。在本研究中,不仅首次发现 Stattic 可以降低肝癌 Bel-7402 的迁移和侵袭,而且发现 Stattic 可以降低放疗后增加的侵袭。这可能与 Stattic 能够有效抑制放

疗后激活的 STAT3, 阻止 Twist 的转录, 从而下调 MMP-2 和 MMP-9 表达相关。

最新研究表明, 在恶性肿瘤中 STAT3 通路还能够介导放疗抵抗。Gao 等^[16]发现 X 射线可以激活肺腺癌 A549 细胞中的 STAT3, 并且呈现出时间和剂量的依赖性。本研究中, 发现 X 射线照射同样可以上调肝癌细胞中 p-STAT3 的蛋白表达, Stattic 能够下调照射后激活的 p-STAT3 蛋白表达。同时, 通过剂量存活曲线和放射敏感性相关参数分析发现, 与单纯照射组细胞相比, 应用 Stattic 后细胞的存活曲线下移明显, 在小剂量时, 肩区变小, 随着剂量增加存活曲线下降趋势更加明显, D_0 、 D_q 和 SF_2 值均降低, 这代表 STAT3 抑制后可以抑制细胞照射后的亚致死性损伤修复, 说明 Stattic 增加了肝癌细胞的放射敏感性。本研究结果显示, Stattic 能够降低 STAT3 引起的照射抵抗。但是其下游机制仍不明确。

凋亡相关 Bcl-2 家族蛋白和 Caspase-3 蛋白不仅与恶性肿瘤的发生发展密切相关, 而且参与了放疗诱导的细胞凋亡^[17]。本研究中发现 Stattic 和放射治疗分别能诱导凋亡蛋白的改变, 与单纯照射组和单独用药组相比, 联合组凋亡蛋白的改变更加显著, 说明 Stattic 有可能是通过诱导凋亡增加而实现放疗增敏的。在其他研究中亦有类似报道, 如 Pan 等^[12]和 Adachi 等^[18]研究发现, 与单纯照射组相比, Stattic 联合照射组分别明显增加了鼻咽癌细胞和头颈部鳞癌的凋亡。因此, 诱导细胞凋亡增加可能是 Stattic 增强细胞放射敏感的机制之一。

综上所述, 本实验研究了 Stattic 对肝癌细胞生长的抑制及联合放射治疗对肝癌细胞迁移和侵袭的影响, 并对其放射增敏机制进行了初步探索, 希望能够为肝癌放射增敏的应用提供实验依据和理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ren ZG, Zhao JD, Gu K, et al. Three-dimensional conformal radiation therapy and intensity-modulated radiation therapy combined with transcatheter arterial chemoembolization for locally advanced hepatocellular carcinoma: an irradiation dose escalation study [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79 (2): 496-502.
- [2] Gao B, Wang H, Lafdil F, et al. STAT proteins-key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver [J]. J Hepatol, 2012, 57 (2): 430-441.
- [3] Frank DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation [J]. Cancer Lett, 2007, 51 (2): 199-210.
- [4] Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4 (2): 97-105.
- [5] 周菊英, 徐晓婷, 李晓庆, 等. 塞来昔布对人肺腺癌细胞株 A549 的放射增敏效应及细胞迁移力的影响 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2010, 30 (5): 564-567.
- [6] 闫洪亮, 吴维光, 王箏, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 对人宫颈癌 SiHa 细胞迁移和侵袭的影响 [J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 21 (2): 191-193.
- [7] 张兰兰, 彭苹, 吴炳义. 阿司匹林对人胶质母细胞瘤 U87 细胞系放射敏感性的影响 [J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10 (11): 1110-1114.
- [8] 姚建新, 姚志峰, 刘永彪. 西妥昔单抗对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞放射敏感性影响的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20 (12): 898-903.
- [9] Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845 (2): 136-154.
- [10] Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC [J]. Gastroenterology, 2006, 130 (4): 1117-1128.
- [11] He G, Dhar D, Nakagawa H, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling [J]. Cell, 2013, 155 (2): 384-396.
- [12] Pan Y, Zhou F, Zhang R, et al. Stat3 inhibitor Stattic exhibits potent antitumor activity and induces chemo- and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e54565.
- [13] Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, et al. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (21): 14665-14673.
- [14] Zhao XL, Sun T, Che N, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma metastasis through matrix metalloproteinase activation by epithelial-mesenchymal transition regulator twist1 [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15 (3): 691-700.
- [15] Cheng JC, Chou CH, Kuo ML, et al. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway [J]. Oncogene, 2006, 25 (53): 7009-7018.
- [16] Gao L, Li FS, Chen XH, et al. Radiation induces phosphorylation of STAT3 in a dose- and time-dependent manner [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (15): 6161-6164.
- [17] 王凤玮, 梁克, 沈瑜, 等. 凋亡与放射治疗 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 1997, 6 (3): 192-194.
- [18] Adachi M, Cui C, Dodge CT, et al. Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol, 2012, 48 (12): 1220-1226.

(收稿日期: 2014-12-24)