

# 抑制信号转导与转录激活因子3对人前列腺癌细胞DU145生长的作用研究\*

张启芳, 禹文峰, 官志忠

(贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 研究抑制信号转导与转录激活因子3(STAT3)表达对人前列腺癌细胞DU145生长的影响。方法: 用慢病毒 pFLU-EGFP STAT3 shRNA(shRNA)质粒转染人前列腺癌细胞DU145构建抑制STAT3表达的稳定细胞株作为shRNA组, 转染空载体作为空白对照(mock)组, 采用荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)和免疫印迹(Western blot)方法检测STAT3的mRNA和蛋白的表达水平, 用结晶紫染色法检测抑制STAT3表达对细胞生长的影响; 用Matrigel细胞侵袭实验检测抑制STAT3表达对DU145细胞迁移侵袭能力的影响。结果: 与mock组相比, shRNA组STAT3 mRNA和蛋白表达水平显著下降, 约为mock组的15%和20%, shRNA组DU145细胞的生长数目明显减少, 仅为空白对照组的41.8%; shRNA组DU145细胞对基底膜的侵袭能力降低, 抑制率为mock组52.9%。结论: 抑制STAT3表达可降低前列腺癌细胞生长和迁移能力。

**[关键词]** 信号转导与转录激活因子3; 前列腺癌细胞; 细胞生长; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R737.25; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)11-1150-04

## The Effect of Abrogating STAT3 on Human Prostate Cancer Cell Growth

ZHANG Qifang, YU Wenfeng, GUAN Zhizhong

(Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of STAT3 silencing on growth and invasion of human prostate cancer cells. **Methods:** Lentiviruses expressing STAT3-specific shRNA were used to infect human prostate cancer DU145 cells to generate a stable cell line as shRNA group, non-specific shRNA as mock group. STAT3 expression was assessed by qPCR at transcriptional level and Western blot at protein level. The effect of STAT3 inhibition on cell growth was determined by crystal violet staining. Matrigel invasion assay was used to evaluate the effect of STAT3 inhibition on cell invasion. **Results:** Compared to mock group, STAT3 expression were silenced about 15% at transcriptional level and 20% at protein level. Cell growth was significantly delayed in shRNA group, about 41.8% of mock control. STAT3 silencing significantly impaired cell invasion ability and invaded cells were about 52.9% of mock group. **Conclusions:** Inhibiting STAT3 expression hinders growth and invasion of human prostate cancer cells.

**[Key words]** signal transducer and activator of transcription; prostate cancer cells; cell growth; cell invasion

男性癌症死亡病例中, 前列腺癌位居第2, 雄激素剥夺疗法最初能有效治疗部分前列腺癌患者,

但大多数患者2~3年后复发, 最终发展为势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer,

\* [基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 81560482); 贵州省“2011 协同创新中心” 资助项目 [黔教合协同创新中心 (2014)06]; 贵州省科技厅重大专项 [黔科合计 Z 字 (2012)4010]; 贵州省科技厅计划项目 [黔科合 LG 字 (2012)009]  
网络出版时间: 2015-10-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151013.1147.008.html>

CRPC)。对于 CRPC 患者,尚无有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 家族细胞因子、生长因子、G 偶联蛋白受体和 Toll-样受体等信号通路的交汇点<sup>[2]</sup>。许多人类恶性肿瘤中均出现持续性激活的 STAT3 蛋白<sup>[3-5]</sup>,诱导细胞增殖和抑制抗肿瘤免疫反应等,导致肿瘤发生<sup>[2]</sup>;STAT3 蛋白在大约 50% 的原位前列腺癌细胞和前列腺癌细胞株呈持续性激活<sup>[6]</sup>。激活或高表达的 STAT3 蛋白促进前列腺癌细胞抗凋亡、转移和抗肿瘤药物的耐药性<sup>[4-9]</sup>。至今为止,研发出抑制 STAT3 的小分子药物毒性太大。RNA 干扰技术的出现提供了抑制 STAT3 基因表达的方法。课题组前期研究用 STAT3 siRNA 可抑制肿瘤细胞凋亡,对正常细胞毒性小<sup>[10]</sup>。本研究使用表达 STAT3 基因的发卡 RNA (shRNA) 慢性病毒感染人前列腺癌细胞 DU145,探讨抑制 STAT3 表达对人前列腺癌细胞 DU145 的生长和侵袭转移能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

人前列腺癌 DU145 细胞购自美国 ATCC 公司,10% 胎牛血清购自 Sigma 公司,DMEM 培养液购自 Gibco 公司,Antibiotic-Antimycotic 购自 Gibco 公司,RNeasy Plus kit 购自 Qiagen 公司,cDNA 合成试剂盒 (iScript) 购自 Bio-Rad 公司,兔抗 STAT3 (sc-8019)、羊抗  $\beta$ -actin (sc-1616)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (ZB-2301) 及兔抗羊二抗 (ZB-2306) 购自美国 Santa Cruz 公司,Lipoectamine 2000 购自美国 Invitrogen,聚凝胺购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及处理** 人前列腺癌 DU145 细胞在含 10% 胎牛血清、Antibiotic-Antimycotic 的 DMEM 培养液,5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。

**1.2.2 稳定转染 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 细胞株的构建** 采用 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 质粒,转染前 18 ~ 20 h,将 293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液传代,待细胞长至 70% ~ 80% 时换无抗生素 DMEM 培养液,按空白载体或目的质粒进行三包装系统与脂质体转染,室温静置 20 min,加入 293T 细胞,培养 48 h 收集上清,2 000 r/min 离心 15 min,收上清,即为表达 STAT3 shRNA

慢病毒悬浮液,加培养基按 1:1 比例稀释 STAT3 shRNA 慢病毒悬浮液,加入聚凝胺至终浓度为 8  $\mu$ g/mL 后。室温静置 15 min,缓慢加入目的细胞 DU145,5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱 18 h,更换培养液,继续培养 60 h,收集细胞,用流式细胞仪分选出荧光 GFP 阳性细胞作为 shRNA 组。采用转染空载体作为空白对照 (mock) 组,方法同上。

**1.2.3 STAT3 mRNA 表达水平** 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 方法,采用 RNeasy 试剂提取细胞总 RNA,按 iScript 反转录试剂盒说明书合成 cDNA,用 qPCR 检测 STAT3 mRNA 表达水平。用 ProbeFinder Version 2.45 (Roche) 软件设计探针-引物,探针购自 Universal Probe Library (UPL),人 STAT3 上游引物序列为 5'-CTGCCTAGATCG-GCTAGAAAAC-3',下游引物序列为 5'-CCCTTTG-TAGGAACTTTTTGC-3',内参照 TATA-box binding protein (TBP) 采用 Roche's Reference Assays。qPCR 反应条件为 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s (40 个循环)。采集待测基因和内参照 TBP 的荧光信号值,计算  $\Delta\Delta C_t$  及相对含量 (RQ), $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

**1.2.4 STAT3 蛋白表达水平** Western Blot 方法,收集细胞,提取总蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转移到 PVDF 膜上,常规一抗和二抗孵育后,ECL 超敏免疫印迹检测试剂 (Amersham 公司) 检测蛋白表达,用 Image J 软件分析图像强度。

**1.2.5 结晶紫染色** 细胞生长 48 h,收集细胞,100% 甲醇固定 5 ~ 10 min,0.1% 结晶紫染色细胞 15 ~ 20 min (以上步骤均用三蒸水温和地漂洗细胞 3 次) 及室温自然烘干。显微镜照相,计数细胞数目。取 10 个照片视野细胞取平均作为每个样品的细胞数。

**1.2.6 Matrigel 细胞侵袭实验** 使用 BD Bio-Coat™ Matrigel™ Invasion Chambers (354480) 培养系统,按说明书进行操作。用迪夫快速染色液 (Diff-Quik kit) 染色,显微镜照相,计数侵袭细胞。取 10 个照片区域细胞取平均即为每个样品的侵袭细胞数。

### 1.3 统计学分析

采用 Graphpadprism 6.0 自带统计分析软件处理数据,每组实验重复 3 次,数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组差异采用采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计意义。

## 2 结果

### 2.1 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 对 STAT3 表达的影响

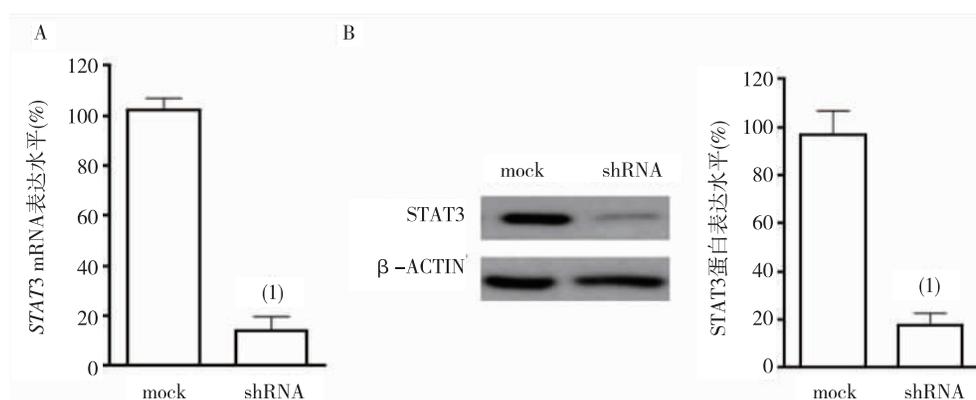
与 mock 组相比,shRNA 组 STAT3 mRNA 和蛋白水平显著下降,约为 mock 组的 15% 和 20% (图 1),说明表达载体 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 可以有效干扰 DU145 细胞中 *STAT3* 的转录和翻译。

### 2.2 抑制 STAT3 后 DU145 细胞的数目

与 mock 组相比,shRNA 组 DU145 细胞的数目明显减少,仅为 mock 组的 41.8% (图 2)。说明 pFLU-EGFP-Puromycin STAT3 shRNA 干扰 *STAT3* 的基因表达可以有效抑制 DU145 细胞生长。

### 2.3 抑制 STAT3 后 DU145 细胞基底膜的迁移侵袭能力

Matrigel Invasion 培养系统结果显示,shRNA 组 DU145 细胞对基底膜的侵袭能力低于 mock 组,抑制率为 mock 组 52.9% (图 3),说明抑制 *STAT3* 表达能影响 DU145 细胞的迁移侵袭能力。



(<sup>1</sup>) 与 mock 组比较,  $P < 0.05$ ; A 为 *STAT3* mRNA, B 为 *STAT3* 蛋白

图 1 *STAT3* mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 pFLU-sh *STAT3* silenced *STAT3* expression

## 3 讨论

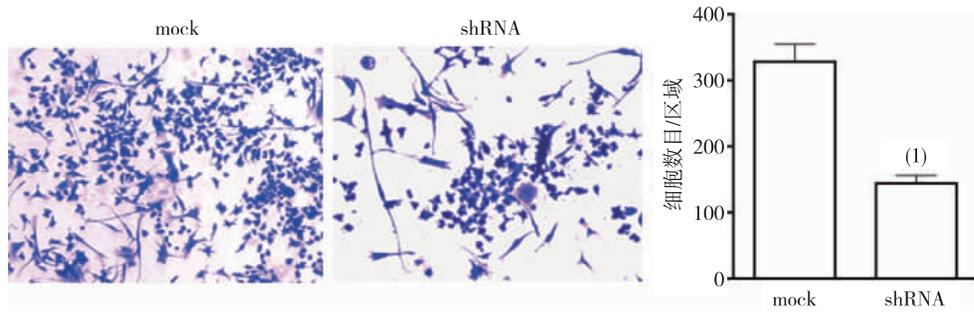
前列腺癌患者多数复发后发展为 CRPC,难以治愈,死亡率高<sup>[1]</sup>。多西他赛是 CRPC 患者第一线抗癌药物,但患者迅速出现耐药。对于如何有效抑制 CRPC 细胞生长是目前亟待解决的问题。本研究以人前列腺癌细胞 DU145 为研究对象,用 *STAT3* 基因特异的 shRNA 抑制 DU145 细胞的 *STAT3* 表达后对 DU145 细胞的生长和浸润能力的影响。

有研究表明持续性激活的 *STAT3* 蛋白促进前列腺癌起始细胞和前列腺癌分化细胞的生长。DU145 细胞表达肿瘤干细胞标记乙醛脱氢酶 (ALDH),并且 ALDH 阳性的 DU145 细胞表达高水平的磷酸化 *STAT3* 蛋白。用 *STAT3* 抑制剂肉盘菌内酯 (galiellalactone) 处理 DU145 细胞后,能抑制 ALDH 阳性细胞生长<sup>[11]</sup>。用小白菊内酯抑制 *STAT3* 转录活性,可阻止多种前列腺癌细胞株分离出的肿瘤起始细胞在体内生长<sup>[12]</sup>。笔者的前期研究发现

*STAT3* 活化能促进前列腺癌细胞的肿瘤繁殖潜力<sup>[7]</sup>,有研究发现抑制 *STAT3* 基因后,细胞生长速度显著下降。此外,*STAT3* 活性促进前列腺癌细胞转移,抑制其活性则降低前列腺癌细胞的迁移能力<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示与空白对照组相比,shRNA 组 *STAT3* mRNA 和蛋白水平显著下降,约为空白对照组的 15% 和 20%,shRNA 组 DU145 细胞的数目明显减少,仅为空白对照组的 41.8%;shRNA 组 DU145 细胞对基底膜的侵袭能力降低,抑制率为空白对照组 52.9%,说明表达载体 pFLU-EGFP *STAT3* shRNA 可以有效干扰 DU145 细胞中 *STAT3* 的转录和翻译,能有效抑制 DU145 细胞生长,削弱了 DU145 细胞的侵袭迁移能力。下一步将检测 *STAT3* 基因特异的 shRNA 是否能增强多西他赛对 CRPC 抗癌效果。

## 4 参考文献

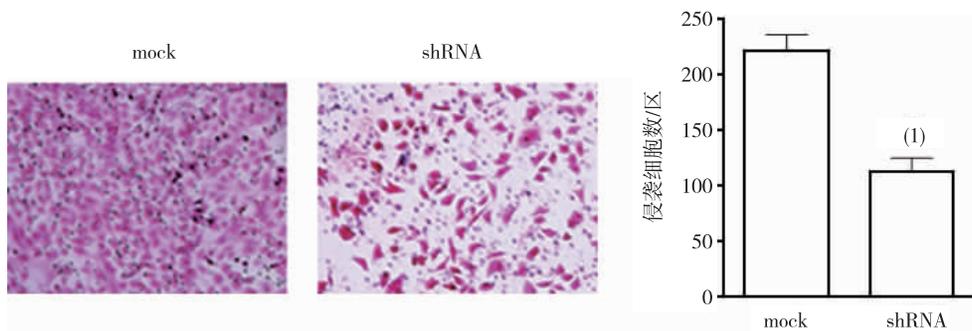
- [1] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2014(4):252-271.



<sup>(1)</sup>与 mock 组比较,  $P < 0.05$

图 2 DU145 细胞的数目

Fig. 2 The cell growth was inhibited by STAT3 downregulation



<sup>(1)</sup>与 mock 组比较,  $P < 0.05$

图 3 DU145 细胞的运动侵袭能力

Fig. 3 Blocking STAT3 ability inhibited cell invasion

- [2] Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer; new and unexpected biological functions[J]. Nat Rev Cancer, 2014 (11):736-746.
- [3] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res, 2002(8):945-954.
- [4] McCann GA, Naidu S, Rath KS, et al. Targeting constitutively-activated STAT3 in hypoxic ovarian cancer, using a novel STAT3 inhibitor[J]. Oncoscience, 2014(1):216-228.
- [5] Shi L, Wang S, Zangari M, et al. Over-expression of CKS1B activates both MEK/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways and promotes myeloma cell drug-resistance [J]. Oncotarget, 2010(1):22-33.
- [6] Mora LB, Buettner R, Seigne J, 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(22):6659-6666.
- [7] Moreira D, Zhang Q, Hossain DM, et al. TLR9 signaling through NF- $\kappa$ B/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells [J]. Oncotarget, 2015(19):17302-17313.
- [8] Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, et al. Transcription factor Stat3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells *in vivo*, whereas Stat5b has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth[J]. Am J Pathol, 2010(4):1959-1972.
- [9] Liu C, Lou W, Armstrong C, et al. Niclosamide suppresses cell migration and invasion in enzalutamide resistant prostate cancer cells via Stat3-AR axis inhibition [J]. Prostate, 2015 (13):1341-1353.
- [10] Zhang Q, Hossain DM, Nechaev S, et al. TLR9 mediated siRNA delivery for targeting of normal and malignant human hematopoietic cells *in vivo* [J]. Blood, 2013(8):1304-1315.
- [11] Hellsten R, Johansson M, Dahlman A, et al. Galiellactone is a novel therapeutic candidate against hormone-refractory prostate cancer expressing activated STAT3 [J]. Prostate, 2008(3):269-280.
- [12] Kawasaki BT, Hurt EM, Kalathur M, et al. Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach [J]. Prostate, 2009(8):827-837.

(2015-09-02 收稿, 2015-09-30 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌