抑制 *STAT3* 表达增强多西他赛对人前列腺癌细胞的抗肿瘤作用*

张启芳，吴昌学，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*）的表达增强多西他赛对人前列腺癌细胞 DU145 的抗肿瘤作用的影响。**方法**：用慢病毒 pFLU-EGFP shSTAT3 质粒转染人前列腺癌细胞 DU145、构建抑制 STAT3 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 Western blot 方法检测两组人前列腺癌细胞 DU145 上 STAT3 和 Bcl－2 蛋白表达，用 Annexin V /PI 染色法测定经过多西他赛处理的已抑制 *STAT3* 表达的 DU145 细胞的细胞凋亡；成瘤实验检测采用 *STAT3* 抑制与多西他赛（DOX）联合分别注射接种于雄性免疫缺陷小鼠（NSG）的 DU145 肿瘤和腹腔，观察接种 22 d 时的小鼠体质量和肿瘤体积。**结果**：pFLU-EGFP STAT3 shRNA 载体在沉默 *STAT3* 基因表达后，人前列腺癌细胞 DU145 中抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达下调，显著降低 STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达水平；抑制 *STAT3* 表达后 DU145 细胞对多西他赛敏感性显著增加，凋亡细胞显著增多，对多西他赛的敏感性提高了 4 倍；小鼠成瘤实验表明，接种 Dox + shRNA 小鼠体质量和肿瘤体积明显下降，抑瘤率增加约 80%。**结论**：抑制前列腺癌 DU145 细胞中 *STAT3* 表达能增强多西他赛抗癌的敏感性，*STAT3* 抑制与多西他赛联合注射接种可增强多西他赛对人前列腺癌的抗癌效果。

［关键词］抑制信号转导与转录激活因子 3；前列腺癌细胞；多西他赛；细胞凋亡；敏感性
［中图分类号］R737.25；R34－33 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2015）11-1154-04

Effect of Blocking *STAT3* Augments on Resistance of Human Prostate Cancer Cells to Docetaxel

ZHANG Qifang, WU Changxue, GUAN Zhizhong
(*Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the effect of STAT3 silencing on the sensitivity of human prostate cancer cells to docetaxel treatment. **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 and Bcl-2 expression were detected by Western blot. Apoptosis induced by docetaxel was assessed by Annexin V/PI Staining. To determine the effect of STAT3 inhibition on anti-tumor effect of docetaxol *in vivo*, STAT3 shRNA plasmid and doectaxol were injected into subcutaneous DU145 tumors and perifeneals of NSG immunodeficient male mice, respecti-vely. Tumor weights and tumor volumes were examined at 22 d after implantation. **Results**: STAT3 expression was significantly silenced. STAT3 silencing resulted in the downregulation of its downstream target, an anti-apoptotic gene Bcl-2. The apoptotic cell death induced by docetaxel was significantly augmented by STAT3 inhibition and apoptotic cells had 4-fold increase compared mock group. Tumor formation assay showed that the tumor weight and tumor volumes in DOX + shRNA group

*［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”［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］
**通信作者 E-mail：842031616@qq.com
网络出版时间：2015－10－13 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151013.1248.022.html

were remarkably decreased when compared to mock + DOX group. The tumor inhibition was about 80% in DOX + shRNA group. **Conclusions**: STAT3 silencing enhances the sensitivity of Du145 cells to docetaxel and antitumor effect of docetaxel.

[**Key words**] signal transducer and activator of transcription 3; prostate cancer cells; docetaxel; apoptosis; sensitivity

雄激素剥夺疗法最初能有效治疗对雄激素有反应的前列腺癌患者,但大多 2 ~ 3 年后癌症复发,并发展成为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer,CRPC)。目前尚无 CRPC 的有效治疗方法,多西他赛是第一线 CRPC 的抗癌药,仅约 48% 患者对多西他赛治疗有效果,但会迅速出现耐药性[1-3]。信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)蛋白在许多小鼠和人肿瘤细胞呈持续性激活状态,持续性激活的 STAT3 蛋白能刺激癌细胞增殖、抗凋亡、侵袭迁移及免疫抑制等[4-7]。激活或高表达的 STAT3 蛋白促进前列腺癌细胞抗凋亡、转移和耐药性[3,8-12],本课题前期研究发现,用 *STAT3* 基因特异的 shRNA 抑制 *STAT3* 表达后,可阻碍 CRPC 细胞生长和侵袭迁移力,*STAT3* 靶基因 *Bcl-2* 是一种原癌基因,它具有抑制凋亡的作用,可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡。本研究以人前列腺癌细胞 DU145 和雄性免疫缺陷小鼠(NOD-SCID IL-2receptor gamma null mice,NSG)为模型,观察抑制 *STAT3* 的表达对人前列腺癌细胞 DU145 的多西他赛的耐药性的影响。

1　材料与方法

1.1　药物与试剂

多西他赛(Docetaxel)购自 Sigma 公司,人前列腺癌 DU145 细胞购自美国 ATCC ,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 β-actin (sc-1616)、Bcl-2(Santa Cruz)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(ZB-2301)、兔抗羊二抗(ZB-2306)购自美国 Santa Cruz 公司, ECL 超敏免疫印迹检测试剂购自 Amersham 公司),Annexin V/PI 双染色法凋亡试剂盒(88 - 8007)购自美国 eBiosciences,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、1 × Antibiotic-Antimycotic 的 DMEM 培养液,5% CO_2 的 37 ℃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-Puromycin 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 μg/mL后。室温静置15 min,缓慢加入目的细胞 DU145,5% CO_2、37 ℃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组(mock),方法同上。

1.2.3　STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达水平　蛋白印迹(Western Blot)法检测,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检测蛋白表达,用 Image J 软件分析图像强度。

1.2.4　细胞凋亡实验　用多西他赛处理 shRNA 组和 Mock 组细胞,终浓度为 1.0 nmol/L,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育 48 h,收集细胞用 Annexin V/PI 双染色法凋亡试剂盒(88 - 8007)检测细胞凋亡,以 Mock 组作为空白对照,按使用说明书操作。样品准备好后上流式细胞仪测试,数据用 FlowJo V6 软件分析。

1.2.5　体内抗肿瘤实验　在 100 μL 1 × PBS 中制备含中 5×10^6 的 DU145 细胞悬浮,并接种于雄性 NSG 小鼠腹部皮下。根据公式 $V = L \times W^2/2$ 计算肿瘤体积(V 为体积,L 为瘤体的长,W 为宽);待瘤块长至约150 mm^3时,将 NSG 鼠随机分为 3 组,每组 6 只,分别为 Mock 组、多西他赛(Dox) + Mock 组

及 Dox + shRNA 组，Mock 组瘤内注射空载体，Dox + Mock 组瘤内注射空载体，2 d 注射 1 次，0.50 mg/(kg·次)，Dox + shRNA 瘤内注射 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 载体，后两组于接种后第 10 天、14 天和 18 天腹腔注射 DOX，剂量为 1 mg/(kg·次)；第 22 天，称取 NSG 小鼠体质量，处死小鼠，分别测量瘤体的 L、W 计算肿瘤 V。

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 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示；两组差异采用 t 检验，多组单变量实验间的差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，不同组肿瘤体积差异采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达

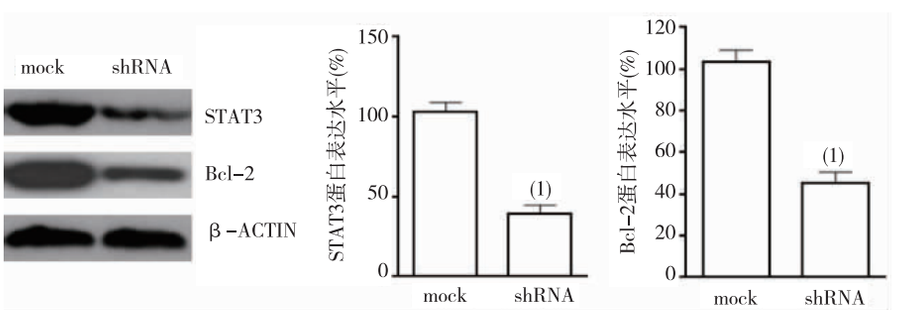
结果显示 shRNA 组 STAT3 蛋白表达水平约为 Mock 组的 40%，被抑制约 60%；Bcl-2 蛋白水平约为 Mock 组的 40%，被下调了 60%，见图 1；说明 pFLU-EGFP-Puromycin STAT3 shRNA 载体可以通过抑制 DU145 细胞中 *STAT3* 的表达，下调 STAT3 的抗凋亡靶基因 Bcl-2 的蛋白水平。

2.2 转染后 DU145 细胞对多西他赛的敏感性

与 Mock 组和 Mock + Dox 组相比，Dox + shRNA 的 DU145 细胞凋亡率显著增高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；抑制 STAT3 表达的 DU145 细胞对多西他赛的敏感性提高了 4 倍。见图 2。

2.3 抑制 STAT3 增强了多西他赛抗肿瘤效果

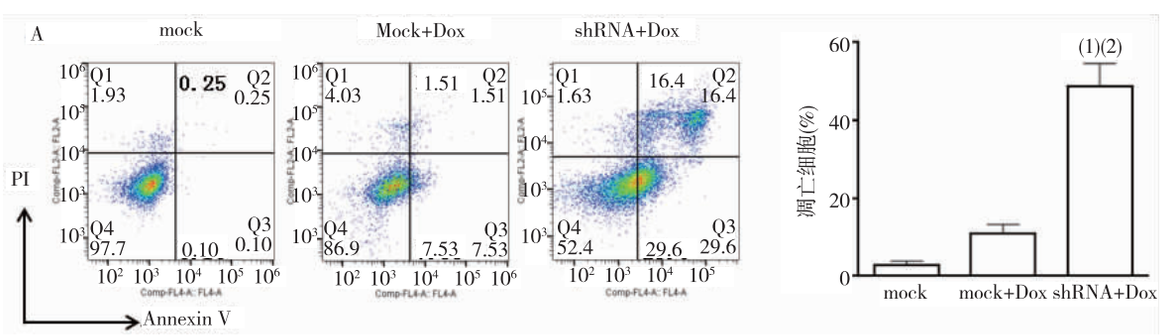
接种第 22 天，与 Mock 组和 Mock + Dox 组相比，Dox + shRNA 肿瘤质量明显下降，差异有统计学意义($P < 0.05$)；Mock 组平均的瘤体积为 1 689.5 mm^3，Mock + Dox 平均瘤体积为 902.1 mm^3，而 shRNA + Dox 的平均瘤体积为 109.6 mm^3，对肿瘤生长的抑制率达到了近 80%，见图 3。说明抑制 STAT3 增强了多西他赛抗肿瘤效果。



(1) 与 mock 组比较，$P < 0.05$

图 1　STAT3 和 Bcl-2 蛋白表达水平

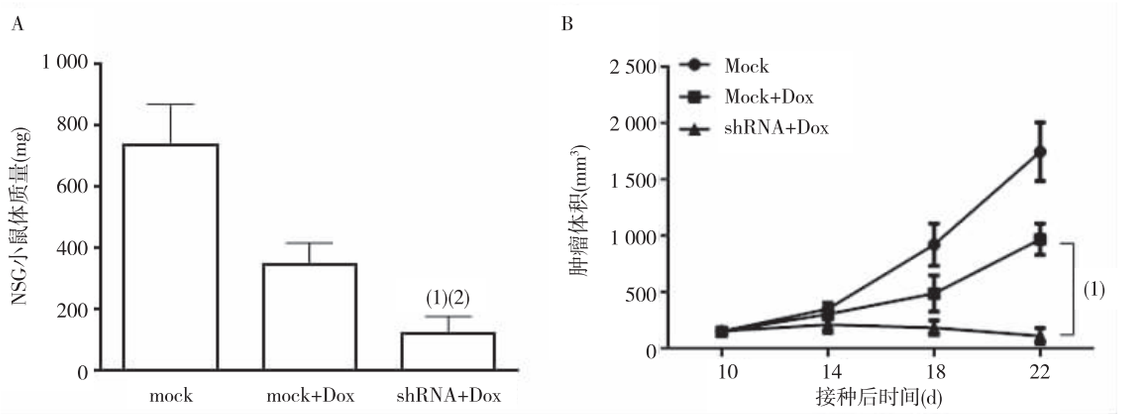
Fig. 1　Protein expression levels of STAT3 and Bcl-2



(1) 与 mock 比较，$P < 0.05$；(2) 与 mock + Dox 比较，$P < 0.05$

图 2　转染后 DU145 细胞对多西他赛的敏感性

Fig. 2　STAT3 silencing enhances the sensitivity of DU145 cells to Docetaxol



(1) 与 mock 组比较，$P<0.05$；(2) 与 mock + Dox 比较，$P<0.05$

图 3　抑制 STAT3 表达增强了多西他赛抗肿瘤效果

Fig. 3　STAT3 inhibition augments antitumor efficacy of Docetaxol

3　讨论

多西他赛是治疗去势抵抗前列腺癌（CRPC）病人的第一线治疗药物，但这些病人迅速出现多西他赛耐药，临床急需寻求有效的解决方法。

STAT3 活化可激活转录下游抗凋亡基因的表达，抑制细胞凋亡；抑制 STAT3 活性可以促进前列腺癌细胞凋亡[13]。肿瘤干细胞标记乙醛脱氢酶（ALDH）阳性的 DU145 细胞表达高水平的磷酸化 STAT3 蛋白。有研究发现用 STAT3 抑制剂处理 DU145 细胞后，可减少 ALDH 阳性细胞数，诱导 DU145 ALDH 阳性细胞的凋亡[14]。用小白菊内酯抑制 STAT3 转录活性，可诱导从多种前列腺癌细胞株分离出的肿瘤起始细胞凋亡，并阻止他们在体内生长[15]。DU145 细胞比多数前列腺癌细胞如 LnCap 细胞对多西他赛耐药，本研究发现，Dox + shRNA 的 DU145 细胞凋亡率显著高于 Mock 组和 Mock + Dox 组（$P<0.05$），抑制 STAT3 表达的 DU145 细胞对多西他赛的敏感性提高了 4 倍，说明 STAT3 活性可能是 DU145 细胞对多西他赛耐药的主要原因之一。本研究抑制 *STAT3* 基因表达后，下调抗凋亡靶基因基因 Bcl-2 的表达，增强了 DU145 细胞对多西他赛的敏感性，凋亡细胞显著增多，提示联合抑制 STAT3 蛋白表达和多西他赛可能可增强多西他赛的抗肿瘤效果。本研究体内抗肿瘤实验结果显示在接种后第 22 天，肿瘤质量明显下降，多西他赛对肿瘤生长的抑制率达到了近 80%。提示抑制 *STAT3* 表达能显著增强多西他赛对人前列腺癌的抗癌效果，说明联合治疗具有较好的协同作用。

综上所述，多西他赛联合 pFLU-EGFP STAT3 shRNA 载体接种表现出很好的协同抗瘤效果，加之 RNA 干扰技术副作用小，表明 RNA 干扰技术在抗肿瘤治疗方面很有前景。但针对转移性癌症，如何靶向输送 RNA 干扰片段到目的组织和细胞还需进一步的研究。

4　参考文献

[1] Galsky MD, Vogelzang NJ. Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. Ann Oncol, 2010(11): 2135 - 2144.

[2] Tannock IF, deWit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2004(15):1502 - 1512.

[3] Armstrong CM, Gao AC. Drug resistance in castration resistant prostate cancer: resistance mechanisms and emerging treatment strategies [J]. Am J Clin Exp Urol, 2015 (2): 64 - 76.

[4] Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, et al. Stat3 mediates myeloid cell dependent tumor angiogenesis in mice [J]. J Clin Invest, 2008(10): 3367 - 3377.

[5] Devarajan E, Huang S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases [J]. Curr Mol Med, 2009(5):626 - 633.

[6] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. Nature Rev Cancer, 2009(9):798 - 809.

[7] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. Nature Rev. Immunol, 2007(1): 41 - 51.

（下转第 1169 页）

BR,在体和离体实验表明,GAS 对 CCK-BR 阳性的胃癌细胞株具有刺激生长的作用,停用 GAS 后这种促增殖作用消失,而应用 CCK-BR 拮抗剂能抑制细胞的增殖,说明这种增殖作用是通过 CCK-BR 而发挥作用的[10]。还有很多学者研究发现胃癌患者胃癌组织中 CCK-BR 的含量明显高于对照正常组织, CCK-BR 广泛参与胃癌发生发展[11-12]。但本研究结果发现慢性胃炎、肠上皮化生、非典型性增生组 *CCK-BR* 表达均高于胃癌组,分别为胃癌组的 1.62、3.66、1.33 倍。分析发现 *CCK-BR* 表达并未随着胃癌病程的发展逐渐降低,未见一致性,但与 *GAS* 的表达却有一定的一致性。因此认为 *CCK-BR* 表达与胃癌的关系是可能是通过介导胃泌素促进肿瘤细胞的生长刺激作用而实现,与 *CCK-BR* 受体本身的表达量相关性不大。

4　参考文献

[1] Wu AW, Ji JF, Yang H, et al. Long-term outcome of a large series of gastric cancer patients in China[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2010(3):167-175.

[2] 曾怡, 周建奖, 谢渊, 等. 沉默胃泌素基因抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014(9): 905-911.

[3] 刘骏, 谢渊, 赵艳, 等. 胃泌素促进胃癌细胞的迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2013(4): 730-733、738.

[4] Jin YP, Lawrence von K, Rolando H. Prevention Strategies for Gastric Cancer: A Global Perspective[J]. Endoscopic Screening and Surveillance for Gastrointestinal Cancer, 2014(47):478-489.

[5] 王春云, 郑侃侃, 谢文彪. 胃泌素及其受体与胃癌关系的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2014 (7): 490-493.

[6] 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素生长抑素蛋白表达及其意义[J]. 中华消化杂志, 2001(21): 393-394.

[7] 王丽, 周丽雅. 胃泌素在胃炎与胃癌中表达的差异及意义[J]. 中国微创外科杂志, 2011(11): 435-436.

[8] 刘锦涛, 杨建荣, 叶平, 等. 胃窦部 G 细胞与消化性溃疡和胃癌关系的探讨[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2003(4):403.

[9] Winslow JL, Trainer TD, Colletti RB. Collagenous gastritis: a long-term follow-up with the development of endocrine cell hyperplasia, intestinal metaplasia, and epithelial changes indeterminate for dysplasia[J]. Am J Clin Pathol, 2001(5):753-758.

[10] 李孟军, 黄广建, 乐竹琴, 等. 胃癌及邻近黏膜表达胃泌素受体的差异及其意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2001(1):50-54.

[11] 黄亚娜, 唐世孝. 胃泌素与胃癌关系的研究进展[J]. 西南军医, 2012(5):757-760.

[12] Rai R, Chandra V, Tewari M, et al. Cholecystokinin and gastrin receptors targeting in gastrointestinal cancer[J]. Surg Oncol, 2012(4):281-292.

(2015-09-01 收稿,2015-09-28 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘　华

(上接第 1157 页)

[8] Moreira D, Zhang Q, Hossain DM, et al. TLR9 signaling through NF-κB/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells[J]. Oncotarget, 2015(19):17302-17313.

[9] 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.

[10] 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.

[11] Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, et al. Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity[J]. Clin Cancer Res, 2006(18):5578-5586.

[12] Codoy-Servat J, Marin-Aguilera M, Visa L, et al. Nuclear factor-kappa B and interleukin-6 related doctaxel resistance in castration-resistant prostate cancer[J]. Prostate, 2013(5): 512-521.

[13] Zhang D, He D, Xue Y, et al. PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway[J]. Cancer Res, 2011 (6):2193-2202.

[14] Hellsten R, Johansson M, Dahlman A, et al. Galiellalactone is a novel therapeutic candidate against hormone-refractory prostate cancer expressing activated STAT3[J]. Prostate, 2008(3):269-280.

[15] 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):69:827-837.

(2015-09-02 收稿,2015-09-29 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周　凌