

# 放疗联合抑制 *STAT3* 表达对恶性 B 细胞免疫原性分子表达的影响\*

张启芳<sup>1</sup>, 禹文峰<sup>1</sup>, 吴昌学<sup>1</sup>, 官志忠<sup>1</sup>, 柏 华<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 第三附属医院 医学实验中心, 贵州 都匀 558000)

**[摘要]** 目的: 研究放疗联合抑制信号转导与转录激活因子 3 (*STAT3*) 表达对恶性 B 细胞免疫原性的影响。方法: 在 BALB/c 小鼠大腿皮下接种小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤表达 GFP 的 A20 细胞形成肿瘤, 在肿瘤内注射 *STAT3* 基因特异的 shRNA 质粒并进行放疗; 采用荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 和免疫印迹法 (Western blot) 方法分别检测肿瘤组织中 *STAT3* mRNA 和蛋白表达水平; 细胞膜蛋白分子染色法检测恶性 B 细胞表面分子 MHCII、CD40 和 CD80 的表达, 用流式细胞仪收集细胞染色数据。结果: 放疗联合抑制 *STAT3* 表达能显著降低 *STAT3* mRNA 和蛋白表达水平, 与单纯放疗比较, 放疗联合抑制 *STAT3* 表达治疗显著增加 A20 细胞表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 放疗联合抑制 *STAT3* 表达能增强决定恶性 B 细胞免疫原性的分子表达。

**[关键词]** 信号转导与转录激活因子 3; 放射疗法; 淋巴瘤, B 细胞; 聚合酶链式反应; 免疫印迹; 流式细胞术  
**[中图分类号]** R730.5; R733.4; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)11-1158-04

## The Effect of Combination of Radiotherapy with Abrogating *STAT3* Activity on the Maturation of Malignant B-cell Lymphoma Cells

ZHANG Qifang<sup>1</sup>, YU Wenfeng<sup>1</sup>, WU Changxue<sup>1</sup>, GUAN Zhizhong<sup>1</sup>, BAI Hua<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Medical Experimental Center, Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Duyun 558000, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To examine the effect of combination of radiotherapy with *STAT3* inhibition on the immunogenicity of malignant B-cell Lymphoma Cells. **Methods:** Murine A20 B cell lymphoma cells were subcutaneously injected the thighs of BALB/c mice to form tumors. Tumors were given intra-tumor injection of *STAT3* shRNA plasmid and local radiotherapy. *STAT3* expression in tumors was determined by qPCR at mRNA levels and by Western blot at protein levels. The expression of MHCII, CD40 and CD80 were determined by extracellular staining and subsequent data collected by flow cytometry. **Results:** *STAT3* expressions were remarkably silenced in tumors. Compared to radiotherapy alone, radiotherapy combined with *STAT3* silencing significantly upregulated the expression of MHCII, CD40 and CD80 on A20 cells. **Conclusions:** Radiotherapy plus *STAT3* silencing increases the expression of molecules that decide the immunogenicity of malignant B cell lymphoma.

**[Key words]** signal transducer and activator of transcription 3; radiotherapy; lymphoma, B cell; polymerase chain reaction; western blot; flow cytometry

\* [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 Z 字 (2012)4010]; 贵州省科技厅科技计划项目 [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.20151013.1145.006.html>

套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)是 B 细胞非霍奇金淋巴瘤恶性肿瘤的一个独特亚型,约占淋巴瘤的 5% ~ 10%。目前治疗淋巴瘤多采用化疗联合妥昔单抗克隆抗体方案,其次为造血干细胞移植<sup>[1-3]</sup>。这些治疗虽然可以缓解患者的病情,但多数无法治愈,最终会复发<sup>[4-5]</sup>。临床急需探寻一种新的治疗方案以提高患者的整体生存率。有研究发现把耐受性抗原呈递细胞转换为能够触发有效的 T 细胞、反应炎性抗原呈递细胞及增强恶性 B 细胞的免疫原性,起到抵抗淋巴瘤的作用<sup>[6-8]</sup>。满足上述要求的治疗策略可能不仅能成功消灭 B 细胞肿瘤,还可能给机体提供更长久的免疫力,避免肿瘤复发。本研究在 BALB/c 小鼠大腿皮下接种小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞形成肿瘤,利用放疗大量杀死肿瘤细胞,利用免疫原性细胞,诱导机体发生免疫反应,同时抑制信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)表达,探讨放疗联合抑制 STAT3 表达对恶性 B 细胞的免疫原性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞购自美国 ATCC 公司, STAT3 探针购自 Universal Probe Library(UPL),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)、兔抗羊二抗(ZB-2306)购自美国 Santa Cruz 公司,荧光标记抗体主要组织相容性复合体(MHC)II、CD40、CD80 购自美国 eBiosciences,胎牛血清、1x Antibiotic-Antimycotic、1640 培养液购自 Gibco 公司,RNeasy Plus kit 购自 Qiagen 公司,cDNA 合成试剂盒(iScript)购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及处理** 把实验前期表达荧光 GFP 的阳性的 A20 细胞(A20. GFP)放于含 10% 胎牛血清和 1 × Antibiotic-Antimycotic 的 RPMI 1640 培养液,5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。

**1.2.2 小鼠带瘤实验** 在 100  $\mu$ L 1 × PBS 中制备含 5 × 10<sup>6</sup> 的 A20. GFP 细胞悬浮,并接种于 BALB 小鼠大腿皮下。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<sup>3</sup> 时,随机分为 3 组,每组 6 只,分

别为 PBS 组、放疗 + 空质粒组(RT + empty)、放疗 + shRNA(RT + shRNA)组,放疗前瘤内注射 STAT3 基因特异 shRNA 质粒 1 次,肿瘤处放疗 10 Gy,放疗当天和第 2 天按小鼠体质量 0.50 mg/(kg · 次)瘤内注射质粒。放疗第 3 天收取肿瘤,切成小块,一部分制备细胞用于染色,一部分用于提取总 RNA 和蛋白,立即用液氮冻存备用。

**1.2.3 肿瘤细胞悬浮液制备** 用手术刀除去肿瘤周边组织,切碎新鲜肿瘤组织,加入 collagenase-IV/DNase I 处理,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱 30 min,加入细胞培养液 RPMI,2 000 r/min 离心 10 min,用 RPMI 洗细胞一次,计数细胞。

**1.2.4 STAT3 mRNA 表达水平** 采用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'-CTGCCCTAGATCG-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), $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

**1.2.5 STAT3 蛋白表达水平** 采用 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。

**1.2.6 细胞膜蛋白染色** 收集细胞,染色缓冲液漂洗细胞 1 次,小鼠 CD16/32 抗体和小鼠血清封闭细胞膜 Fc $\gamma$  II/III 受体,冰上孵育 10 min,2 000 r/min 离心 10 min,加入染色缓冲液稀释的荧光标记抗体,冰上避光孵育 30 min。用染色缓冲液漂洗两次,重悬细胞,用流式细胞仪收集数据,GFP 阳性的细胞为肿瘤细胞,用 Flowjo 软件(treestar)分析数据。

### 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。多组单变量实验间比较采用单因

素方差分析(One-way ANOVA)。P < 0.05 为差异有统计意义。

## 2 结果

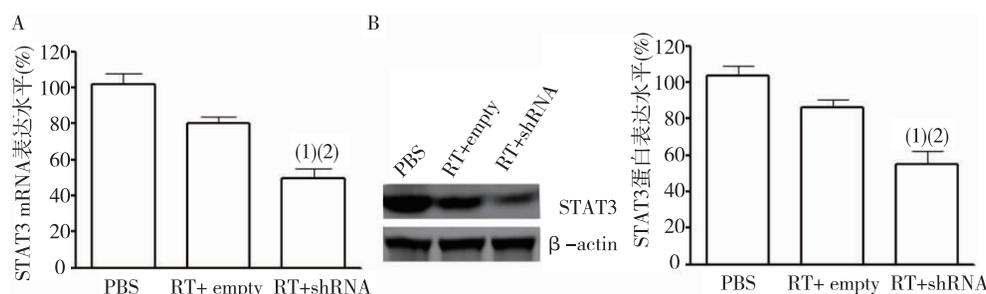
### 2.1 恶性 B 细胞中 STAT3 mRNA 和蛋白表达水平

与 PBS 组和 RT + empty 组比较, RT + shRNA 组 STAT3 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义(P < 0.05),分别被抑制了 50% ~ 60% 和 50%,说明放疗联合 STAT3 基因特异的

shRNA 可以有效地抑制恶性 B 细胞中 STAT3 的表达。见图 1。

### 2.2 恶性 B 细胞表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平

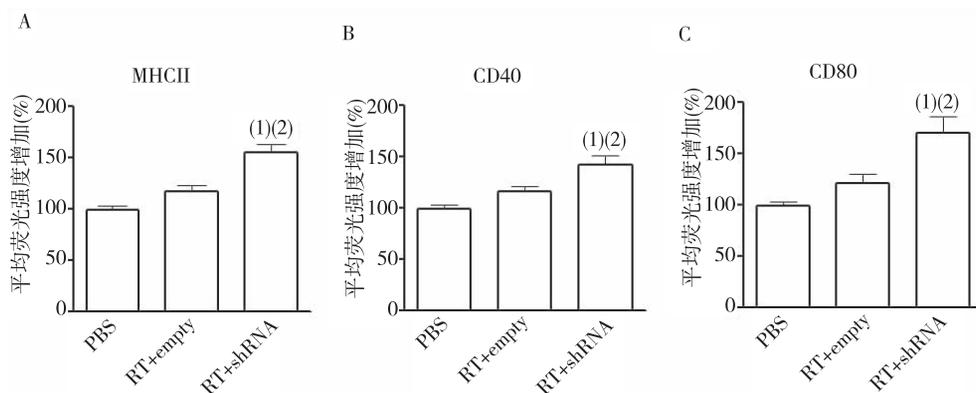
与 PBS 组和 RT + empty 组比较, RT + shRNA 组 MHCII、CD40 及 CD80 平均荧光强度均显著增加,差异有统计学意义(P < 0.05),分别增加了 46%、40% 和 60%,说明放疗联合 STAT3 基因特异的 shRNA 可以有效增加恶性 B 细胞表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平。见图 2。



<sup>(1)</sup>与 PBS 组比较, P < 0.05; <sup>(2)</sup>与 RT + empty 组比较, P < 0.05

图 1 恶性 B 细胞中 STAT3 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 Radiotherapy combined with STAT3 shRNA silenced STAT3 expression



<sup>(1)</sup>与 PBS 组比较, P < 0.05; <sup>(2)</sup>与 RT + empty 组比较, P < 0.05

图 2 恶性 B 细胞表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平

Fig. 2 Radiotherapy combined with STAT3 shRNA upregulated the expressions of MHCII, CD40 and CD80

## 3 讨论

MCL 是所有 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中预后较差的肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。尽管 MCL 患者对化疗加单克隆抗体的一线治疗初始反应良好,但几乎所有的 MCL 患者最终都会复发,并对进一步的治疗反应越来越差<sup>[1-4]</sup>。增强恶性 B 细胞的免疫原性可产生有效的抗淋巴瘤免疫反应<sup>[8]</sup>。本研究在 BALB/

c 小鼠大腿皮下接种小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞形成肿瘤,利用放疗大量杀死肿瘤细胞和产生免疫原性细胞,诱导机体发生免疫反应,同时抑制 STAT3 表达,观察恶性 B 细胞中表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平,结果发现放疗联合抑制 STAT3 表达有效地上调了 MHCII、CD40 和 CD80 在恶性 B 细胞的表达,增强了恶性 B 细胞免疫原性。

放疗方法能大量杀死肿瘤细胞,引起免疫原性

细胞死亡 (Immunogenic Cell Death, ICD), 能诱发机体发生适应性免疫反应, 消除远端病灶<sup>[9-10]</sup>。因此, 触发 ICD 可成为 B 细胞非霍奇金淋巴瘤新的治疗方案。但是, 放疗诱导死亡的细胞也同时释放线粒体 DNA、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 等因子激活 *STAT3* 蛋白表达, 促进肿瘤生长, 引起肿瘤复发<sup>[11]</sup>。因此, 本研究为了规避放疗诱导的死亡细胞激活 *STAT3* 蛋白表达, 选用特异性 shRNA 抑制 *STAT3* 表达并联合放疗治疗恶性 B 细胞淋巴瘤, 结果显示, 放疗联合抑制 *STAT3* 表达能显著降低 *STAT3* mRNA 和蛋白表达水平, 与单纯放疗比较, 放疗联合抑制 *STAT3* 表达治疗显著增加 A20 细胞表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 说明联合治疗增强了恶性 B 细胞的免疫原性的分子表达。笔者所在研究团队还发现用抑制 *STAT3* 表达联合一次大剂量放疗能彻底治愈小鼠 B 细胞非霍奇金淋巴瘤, 3 月后没有肿瘤复发; 在这些小鼠上又移植了同样的小鼠 B 细胞非霍奇金淋巴瘤, 没有一只小鼠长肿瘤<sup>[12]</sup>。均说明放疗联合抑制 *STAT3* 表达能消除 MCL 小鼠残留的恶性细胞, 避免肿瘤复发, 持久增加患者机体持续的免疫潜能。

综上, 联合放疗与抑制 *STAT3* 基因表达增强了恶性 B 细胞的 MHCII、CD40 和 CD80 的表达, 增强了恶性 B 细胞的免疫原性, 促进恶性 B 细胞成熟。

#### 4 参考文献

- [1] Chen Y, Wang M, Romaguera J. Current regimens and novel agents for mantle cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2014(1):3-18.
- [2] Dreyling M, Amador V, Callana M, et al. Update on the molecular pathogenesis and targeted approaches of mantle cell lymphoma (MCL) - summary of the 12 annual conference of the EUROPEAN MCL NETWORK [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014(4):1-26.
- [3] Foran JM, Cunningham D, Coiffier B, et al. Treatment of mantle-cell lymphoma with rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20 antibody): analysis of factors associated with response [J]. *Ann Oncol*, 2000 (Suppl 1):117-121.
- [4] Williams ME, Dreyling MH, Kahl BS, et al. Mantle cell lymphoma: report of the 2009 mantle cell lymphoma consortium workshop [J]. *Leuk Lymphoma*, 2010(3):390-398.
- [5] Dietrich S, Boumendil A, Finel H, et al. Outcome and prognostic factors in patients with mantle-cell lymphoma relapsing after autologous stem-cell transplantation: a retrospective study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) [J]. *Ann Oncol*, 2014(5):1053-1058.
- [6] Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, et al. Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression [J]. *Blood*, 2001(4):1070-1077.
- [7] Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007(25):267-296.
- [8] Cheng F, Wang H, Horna P, et al. Stat3 inhibition augments the immunogenicity of B-cell lymphoma cells, leading to effective antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2012(17):4440-4448.
- [9] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death in radiation therapy [J]. *OncoImmunology*, 2013(10):26536.
- [10] Vacchelli E, Vitale I, Tartour E, et al. Trial watch: anticancer radioimmunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013(9):25595.
- [11] Gao C, Kozłowska A, Nechaev S, et al. TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2012(17):4440-4448.
- [12] 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.

(2015-09-02 收稿, 2015-09-25 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周凌