

STAT3 靶向抑制剂 LLL-HS-1 对人结肠癌 HT-29 细胞和动物模型的作用

STAT3 Targeted Inhibitor LLL-HS-1 on HT-29 Cells and Animal Model with Human Colon Cancer

HU Sheng, SONG Dan-dan, LI Yong-rong, et al.

胡 胜¹, 宋丹丹², 李永荣², LI Cheng-long³, LI Pui-kai³

(1.湖北省肿瘤医院,湖北 武汉 430079;2.华中师范大学化学学院,湖北 武汉 430079;

3.美国俄亥俄州立大学药学院药物化学和药理学系,俄亥俄州 哥伦布 43210)

摘要:[目的] JAK2/STAT3 信号是传递外膜表面信号至细胞核内的通路之一。利用结构为基础的计算机高通量虚拟筛选的设计、合成化合物 LLL-HS-1,观察化合物 LLL-HS-1 作用结肠癌 HT-29 细胞和动物模型的效果。[方法] 采用 Western Blot 检测结肠癌 HT-29 细胞系中 STAT3 蛋白表达及其磷酸化 STAT3 情况。人结肠癌 HT-29 细胞系接种到 BLBA/c 裸鼠左后肢上表皮,观察肿瘤生长情况,当肿瘤直径达 5mm 左右后随机分组(高剂量 LLL-HS-1 组,低剂量 LLL-HS-1 组,5-Fu 对照组和空白对照组),每组 8 只,持续 4 周腹腔给药。以肿瘤体积大小为衡量药效的指标。[结果] LLL-HS-1 对结肠癌 HT-29 细胞的 IC₅₀ 为 0.1 μ M,化合物 LLL-HS-1 可以抑制 STAT3 酪氨酸残基 705 磷酸化。LLL-HS-1 对肿瘤的生长具有抑制作用,以高剂量组尤为明显。[结论] STAT3 抑制化合物 LLL-HS-1 可以成为新型的结肠癌靶向治疗药。

关键词:信号转导与转录激活因子 3;LLL-HS-1;结肠癌;小鼠模型

中图分类号:R735.3⁵ **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2012)08-0611-04

信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是细胞因子和生长因子受体蛋白质的下游信号分子^[1]。细胞表面细胞因子和生长因子受体的上调可激活 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) 家族的蛋白激酶,导致 STAT3 酪氨酸 705 残基磷酸化,从而激活两个 STAT3 单体通过 SH2 结构蛋白二聚化^[2]。STAT3 二聚体后易位进入核内,诱导大量控制细胞增殖,抗凋亡,血管生成和其他细胞功能的基因转录^[3,4]。

JAK2/STAT3 信号是传递外膜表面信号至细胞核内的通路之一,控制细胞生长、分化、衰老和凋亡过程^[5]。研究发现,此通路在人类肿瘤如乳腺癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、皮肤癌、肾癌以及部分造血系统肿瘤,如慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、急性白血病和多发性骨髓瘤^[5] 中明显上调。因此, JAK2/STAT3 通路与肿瘤形成相关。

目前有几种方法已用于抑制 JAK/ STAT 通路,如 STAT3 的显性负突变、反义 STAT3 寡核苷酸以及诱骗寡核苷酸^[6]。然而,上述方法具有一定局限性,因为寡核苷酸稳定性差,转导效率不高,不能有效地进行临床试验。最近,利用结构为基础的计算机高通量虚拟筛选的设计,我们发现了一种化合物,命名为 LLL-HS-1,其可有选择地抑制 STAT3 的磷酸酪氨酸 705 (pY705) 单体的二聚化。本研究分析体外和体内 LLL-HS-1 抑制人结肠癌的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系:人结肠癌 HT-29 细胞系,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

实验动物:BLBA/c 雌性裸小鼠购自北京市维通利华实验动物有限公司[生产许可证号 SCXK(京)

收稿日期:2011-12-26

通讯作者:胡胜, E-mail: ehusmn@yahoo.com.cn

2006-0009],共40只,4~6周龄,体重18.0~22.0g,SPF条件下饲养(湖北省肿瘤医院动物实验室)。

化合物:LLL-HS-1由美国俄亥俄州立大学Pui-Kai (Tom) Li教授合成提供。

主要试剂:RPMI1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、HTScan® JAK2 激酶检测试剂盒(No:7752)。

注射药物配制:高剂量和低剂量给药组的溶剂为10%DMSO,12% Cremaphor EL和72%的5%葡萄糖注射液。高剂量(H=20mg/kg)给药组浓度为4mg/ml;低剂量给药组(L=10mg/kg)浓度为2mg/ml;对照组给安慰剂(溶剂)。

1.2 方法

1.2.1 检测LLL-HS-1结肠癌细胞的IC₅₀

在37℃,含5%CO₂的细胞培养箱中培养结肠癌HT-29细胞,胰酶消化对数期细胞,终止后收集,制成细胞悬液,细胞计数调整其浓度至(5~10)×10⁴个/ml。将细胞悬液制备好后,轻轻混匀,加入到96孔培养板中,每孔加入100μl,使得待测细胞的密度为3000/孔(边缘孔用无菌PBS填充)。将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养,至细胞单层铺满孔底(96孔平底板),加入浓度梯度的抑制剂LLL-HS-1,设置4个复孔LLL-HS-1处理72h后,MTS/PMS比色分析方法测定HT-29细胞活性,分析LLL-HS-1的IC₅₀。

1.2.2 检测结肠癌细胞蛋白中STAT3的表达

收集细胞在冰水浴上裂解离心,取上清液分装于1ml的离心管中并置于-80℃保存。蛋白定量后进行SDS-PAGE凝胶电泳。转膜后凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉封闭4℃过夜,用相关试剂盒处理后进行Western Blot分析。采用所测STAT3、p-STAT3条带与内参β-actin条带的积分密度比值来表示STAT3表达及其磷酸化程度。

1.2.3 人结肠癌细胞体内有效性研究

复苏的结肠癌HT-29进行大量培养,取对数期的结肠癌细胞,经细胞计数达到5×10⁷个/ml后接种于裸鼠的左后肢,每只接种0.15ml。

人结肠癌HT-29细胞每只裸鼠右侧前肢腋下皮下接种0.15ml,共40只。裸鼠饮用水及饲料均经无菌消毒处理,饲养环境为层流环境,12h昼夜交替。人结肠癌HT-29细胞接种后每日定时观察裸鼠饮食、精神状况以及肿瘤生长情况。接种7d左右可见肿瘤形成,成瘤率98%。裸鼠体形较前稍显瘦,

饮食、精神很好,行动较接种前稍显迟缓。接种2周后,待肿瘤生长至体积约100mm³时,随机抽取32只成瘤裸鼠分成4组,进行给药治疗。4组分别为低剂量(L=10mg/kg)、高剂量(H=20mg/kg)、5-Fu(30mg/kg)对照组和空白对照组。每日上午同一时间进行一次给药治疗(IP=腹腔注射,7d/周,共4周),每隔2d称重。每日测量肿瘤的最大径和最小径,最终的衡量疗效指标为肿瘤体积大小,肿瘤体积=(π/6) LW²,L=最大径,W=最小径。

注射用溶剂配制:6%二甲基亚砜,5%葡萄糖水(D5W)。每次注射量为200μl。添加5%葡萄糖水到Cremaphor EL-二甲基亚砜溶液调匀。使用结核菌素注射器注射200μl到小鼠腹腔。

1.2.4 人结肠癌细胞体内安全性研究

LLL-HS-1处理4周后,处死动物,取出肿瘤称重,检测血液中的白细胞和红细胞含量。

1.3 统计学处理

数据处理采用SPSS13.0统计软件(SPSS Inc, Chicago, IL)。分类变量以患者数量和百分比表示,采用χ²检验和精确概率法。连续变量以平均值±标准差表示,均数的比较采用t检验或ANOVA。风险因素OR值及95%的可信区间采用Logistic回归分析。P值均为双侧,P<0.05为有统计学差异。

2 结果

2.1 LLL-HS-1抑制癌细胞生长

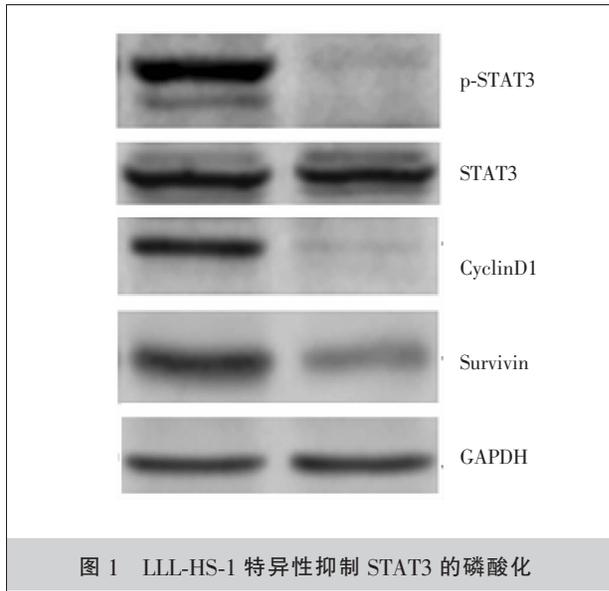
LLL-HS-1对结肠癌HT-29的IC₅₀值为0.1μM。用针对STAT3总蛋白和第705位酪氨酸p-STAT3抗体检测结肠癌细胞中蛋白质。Western Blot蛋白分析结果表明:在HT-29结肠癌细胞系存在持续的STAT3激活,图1证明了化合物LLL-HS-1对STAT3酪氨酸残基705磷酸化的抑制效果。

2.2 克隆形成实验

结肠癌细胞HT-29加入0.4%琼脂、10%FBS培养液,发现不同浓度(0.2~5μM)LLL-HS-1均可抑制克隆的形成。0.2μM、1μM和5μM LLL-HS-1抑制率分别为54%、89%和92%。

2.3 小鼠移植瘤的生长情况

小鼠移植瘤形成后,腹腔给予低剂量组(10mg/kg)和高剂量组(20mg/kg)LLL-HS-1,1次/d,以DM-SO为空白对照。肿瘤体积的增长曲线见图2,LLL-



HS-1 两个剂量组的肿瘤体积明显小于对照组 ($V_{\text{低剂量}}$ 与 $V_{\text{空白}}$ 、 $V_{5\text{-Fu}}$ 比较: $416.5 \pm 45.2 \text{mm}^3$ vs $1\ 014.9 \pm 135.8 \text{mm}^3$ vs $996.4 \pm 128.2 \text{mm}^3$, $F=2.6$, $P=0.021$; $V_{\text{高剂量}}$ 与 $V_{\text{空白}}$ 、 $V_{5\text{-Fu}}$ 比较 $292.7 \pm 33.1 \text{mm}^3$ vs $1\ 014.9 \pm 135.8 \text{mm}^3$ vs $996.4 \pm 128.2 \text{mm}^3$, $F=2.9$, $P=0.018$)。其中高剂量组肿瘤体积明显小于低剂量组 ($292.7 \pm 33.1 \text{mm}^3$ vs $416.5 \pm 45.2 \text{mm}^3$, $t=2.2$, $P=0.045$)。

2.4 药物治疗的安全性

LLL-HS-1 治疗组在 4 周的给药期间,小鼠的进食、饮水正常,无呕吐、腹泻;体重无明显下降,白细胞和红细胞无明显变化(表 1),提示此化合物的安全性好。

3 讨论

随着分子医学的发展,对肿瘤生成、发展过程中

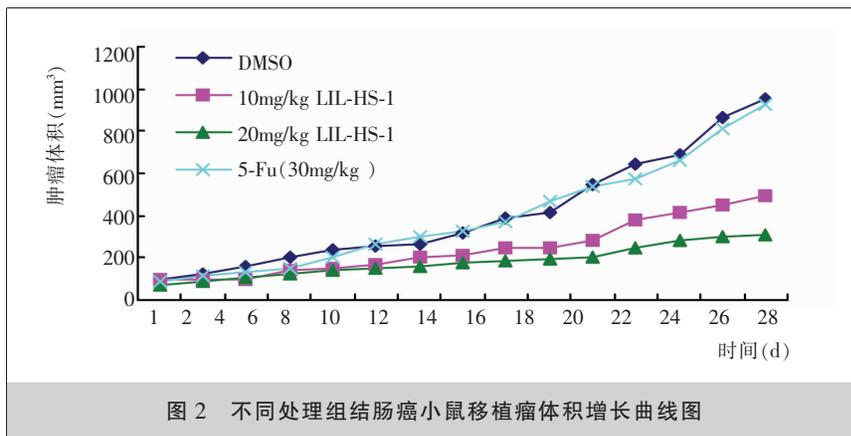


表 1 各组小鼠体重、白细胞和红细胞比较

组别	体重 (g)	白细胞 (10^9 cells/L)	红细胞 (10^{12} cells/L)
对照组	21.6±1.6	1.8±0.2	9.3±0.5
低剂量 LLL-HS-1	21.3±1.7	1.9±0.3	9.3±0.7
高剂量 LLL-HS-1	19.3±1.9	1.7±0.2	9.2±0.6
F 值	0.5	0.6	0.7
P 值	0.24	0.30	0.45

的受体、基因和信号转导中的分子活动事件有了深入了解。同时,组合化学技术(combinatorial chemistry)提供了成千上万个独特的分子,以筛选抑制剂^[7],促进了新型靶向药物的成功开发。

经有关研究发现,JAK2/STAT3 通路与肿瘤形成紧密相关,STAT3 激活后将诱导与细胞增殖、分化、生存、凋亡密切相关的关键基因的异常高表达,通过各种途径促进细胞增殖、恶性转化、血管形成、阻碍细胞凋亡,表现出致癌的作用。JAK 调节的磷酸化和 STAT3 的激活是多数人类肿瘤细胞系的一个普遍机制^[8]。

目前有几种方法已用于抑制 JAK/STAT 通路,最近,也已报道一些新型 JAK2 抑制剂,如 WP1066、SD-1008、SD-1029、TG101348 和 AZD1480^[9,10]。

本实验从抑制 JAK2/STAT3 通路的角度出发,发现新的 JAK2/STAT3 抑制化合物 LLL-HS-1 对结肠癌组织中 STAT3 表达及磷酸化有明显抑制作用。在结肠癌 HT-29 细胞,LLL-HS-1 抑制 STAT3 磷酸化的作用与 STAT3 的核移位和 STAT3 依赖肿瘤的生长呈现剂量依赖性关系。同样在裸鼠体内,LLL-HS-1 明显抑制肿瘤生长,同其他新型 STAT3 抑制剂 AZD1480 相似^[9]。

值得注意的是,除了肿瘤细胞,体内 JAK/STAT 信号还维持正常细胞的生存。但我们发现小鼠体重、白细胞和红细胞没有明显变化,提示 LLL-HS-1 抑制肿瘤生长,虽然部分阻断 STAT3 的活性,但不足以产生明显的靶外效应,原因可能是肿瘤细胞中存在高度 STAT3 磷酸化,诱导细胞因子激活,对 LLL-HS-1 反应更明显,而于正常细胞生存不明显依赖 STAT3 磷酸化。

综上, 我们的研究结果表明, LLL-HS-1 属于 JAK2/STAT3 通路特异性抑制剂, 显示高度的药物样特征, 有可能成为人类治疗结肠癌的药物, 值得进一步探索。

参考文献:

- [1] Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do?[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9):1143-1148.
- [2] Scuto A, Krejci P, Popplewell L, et al. The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival[J]. *Leukemia*, 2011, 25(3):538-550.
- [3] Steelman LS, Abrams SL, Whelan JE, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia[J]. *Leukemia*, 2008, 22(4):686-707.
- [4] Xin H, Herrmann A, Reckamp K, et al. Antiangiogenic and antimetastatic activity of JAK inhibitor AZD1480[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21):6601-6610.
- [5] Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (56): 6613-6626.
- [6] 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(4):945-954.
- [7] Lee H, Pal SK, Reckamp K, et al. STAT3: a target to enhance antitumor immune response [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 344:41-59.
- [8] Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma[J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1535-1542.
- [9] Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16 (6):487-497.
- [10] Coleman DR, Ren Z, Mandal PK, et al. Investigation of the binding determinants of phosphopeptides targeted to the SRC homology 2 domain of the signal transducer and activator of transcription 3. Development of a highaffinity peptide inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2005, 48(21):6661-6670.