

STAT3 小分子化合物 LLL-HS-1 抑制人肺癌 A549 细胞增殖的研究

侯新垓¹, 刘 长¹, 阮祥信¹, 李永蓉², 徐 姗², 宋丹丹², 李媛媛²,
聂艳丽³

(1. 三峡大学第三临床学院, 葛洲坝中心医院, 湖北 宜昌 443000; 2. 华中师范大学化学学院, 湖北 武汉 430079; 3. 湖北省肿瘤医院, 湖北 武汉 430079)

摘 要: [目的] 探讨信号转导与转录因子 3(STAT3) 在肺癌细胞中的表达, 并观察以其为靶点的化合物 LLL-HS-1 腹腔给药对肿瘤的抑制作用。[方法] 皮下接种 A549 细胞成瘤 1 周后, 15 只小鼠随机 3 组, 以低剂量(10mg/kg)和高剂量(20mg/kg)LLL-HS-1 腹腔给药, 对照组接受安慰剂。采用 Western blot 检测肺癌 A549 细胞蛋白中 STAT3 的表达及其磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 状态。最终以肿瘤体积大小为衡量药效学的指标。[结果] 体外研究发现, 化合物 LLL-HS-1 可以抑制 STAT3 酪氨酸残基 705 磷酸化, 而且具有靶点特异性。持续 3 周给药, 发现高和低剂量组对肿瘤的增长有明显的抑制效果, 平均肿瘤体积分别为 $(336.8 \pm 60.5) \text{mm}^3$, $(487.2 \pm 78.6) \text{mm}^3$, 明显小于对照组 $(1989.5 \pm 214.3) \text{mm}^3$ ($F=33.8, P=0.0001$; $F=17.4, P=0.005$)。对照组瘤重明显高于高和低剂量组, 各组间比较, $F=9.2, P=0.02$ 。[结论] 化合物 LLL-HS-1 对肺癌细胞有明显抑制作用, 可能通过下调 STAT3 的磷酸化, 诱导肿瘤细胞凋亡来实现。

关键词: 信号转导与转录因子 3; 裸鼠; 肺肿瘤; LLL-HS-1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)07-0565-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.07.B008

Study on the Inhibition of Small Molecule Compound of STAT3 LLL-HS-1 on Proliferation of Human Lung Cancer Cells A549

HOU Xin-gai, LIU Chang, RUAN Xiang-xin, et al.

(The Third Clinical College of Three Gorges University, the Central Hospital of Gezhou Dam, Yichang 443000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of the signal transduction and transcription factor 3 (STAT3) in lung cancer cells, and to study the inhibition of LLL-HS-1 intraperitoneal administration targeting on STAT3 on proliferation of tumor. [Methods] After one week of subcutaneous inoculation of A549 cells in mice, 15 mice were randomly divided into three groups: low-dose group (10mg/kg), high-dose group (20mg/kg), and control group (placebo). Protein expression of STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) state were detected by Western blot method. Tumor volume was analyzed as final pharmacodynamic indicator. [Results] The study in vitro indicated that LLL-HS-1 inhibited phosphorylation of STAT3 tyrosine residue 705 with a target-specificity. After three weeks administration, LLL-HS-1 significantly inhibited tumor growth. Average volumes in high- and low-dose groups were significantly less than those in the control group [$(336.8 \pm 84.5) \text{mm}^3$ and $(487.2 \pm 96.1) \text{mm}^3$ vs $(1989.5 \pm 234.3) \text{mm}^3$ ($F=33.8, P=0.0001$; $F=17.4, P=0.005$)]. Tumor's weight in control group was significantly higher than that in high- and low-dose group ($F=9.2, P=0.02$). [Conclusion] LLL-HS-1 might significantly inhibit lung adenocarcinoma cells, which is possibly through down-regulation of STAT3 phosphorylation, and inducement of apoptosis in cancer cells.

Subject words: signal transduction and transcription factor 3; nude mice; lung neoplasms; LLL-HS-1

晚期肺癌患者的 5 年生存率低于 5%, 针对

EGFR 基因突变或 ALK 融合基因的小分子药物, 使肺癌的治疗效果得到了前所未有的提高, 客观缓解率可以达到 55%~90%^[1]。最新的阻断免疫检查点抗体的治疗, 也可取得明显疗效, 但只有约 20% 的反

基金项目: 武汉市重点攻关计划(201161038347)

通讯作者: 聂艳丽, 主治医师, 硕士; 湖北省肿瘤医院内科, 湖北省武汉市卓刀泉南路 16 号(430079); E-mail: nyl0118@163.com

收稿日期: 2015-07-13; **修回日期:** 2016-04-05

应率。因此,对于无法从靶向和免疫治疗中获益的晚期肺癌患者或耐药的患者,最终只能通过传统的化疗控制病情,不良反应大,且疗效有限。

信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3), 是促进细胞因子和生长因子转录的一种翻译分子^[2,3]。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 单体二聚化^[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中明显上调。JAK2/STAT3 的持续激活不仅诱导癌症的形成, 也会导致癌细胞抵抗凋亡^[4-9]。此外, JAK2/STAT3 持续激活也会损害免疫系统导致免疫耐受, 使癌细胞逃避免疫监控。因此, 抑制 JAK2/STAT3 的磷酸化是癌症治疗的可能靶点。

我们前期的研究发现, 化合物 LLL-HS-1 可以有选择地抑制 STAT3 酪氨酸 705 (pY705) 单体的二聚化, 明显抑制多发骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌细胞的生长^[10-12]。但 LLL-HS-1 对胰腺癌的作用尚不清楚, 因此我们对此化合物在体外和体内对胰腺癌的抑制效果进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株: 人肺癌 A549 细胞株 (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) 2006-0009), 共 25 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)。

主要试剂: 1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、HTScan (R) JAK2 激酶检测试剂盒 (No7752), LLL-HS-1 由俄亥俄州立大学 Tom Li 教授惠赠。

注射药物配制: 高剂量和低剂量给药组的溶剂为 10% DMSO, 18% Cremaphor EL 和 72% 的 5% 葡萄糖水注射液。给药组高剂量 (20mg/kg) 浓度为 4mg/ml;

低剂量组 (10mg/kg) 浓度为 2mg/ml; 对照组给安慰剂 (溶剂)。

1.2 方法

1.2.1 人肺癌细胞体外实验

在 37℃, 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养肺癌 A549 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 100 μl, 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 LLL-HS-1 (1mg/L, 2mg/L, 5mg/L 和 10mg/L), 设置 4 个复孔。72h 后加入配制好的 0.4% 台盼蓝染料, 5~10min 后在显微镜下观察细胞生长情况。

1.2.2 检测肺癌细胞蛋白中 STAT3 的表达

在冰水浴上裂解离心细胞之后, 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 GAPDH 条带的积分密度比值来表示 STAT3 及其磷酸化程度。

1.2.3 人肺癌细胞接种

复苏的肺癌细胞株 A549 大量培养, 取对数生长期的肺癌细胞, 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。

1.2.4 给药对 A549 肺癌小鼠瘤重的影响

成瘤 1 周后, 选取 15 只成瘤裸鼠随机分为 3 组给药治疗, 分别为低剂量组 (10mg/kg)、高剂量组 (20mg/kg)、对照组 (安慰剂, LLL-HS-1 溶剂)。每天上午同一时间给药治疗, 腹腔注射, 7d/周, 共 3 周, 每 2d 裸鼠称重, 每天测量肿瘤的最长径 (a) 和最短径 (b), 最终衡量疗效的指标为肿瘤的体积, 肿瘤体积 = (π/6) ab²。

1.3 统计学处理

连续变量以平均值 ± 标准差表示, 采用 χ² 检验和精确概率法。所有 P 值均为双侧, P < 0.05 视为有统计学意义。均数的比较采用 t 检验或 ANOVA。数据处理采用 SPSS13.0 统计软件。

2 结果

2.1 体外 LLL-HS-1 对肺癌细胞中的 STAT3 和 p-STAT3 表达的影响

用针对 STAT3 总蛋白和第 705 位酪氨酸 p-STAT3 抗体检测肺癌细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白质。Western blot 分析结果表明:在该肺癌细胞系存在持续的 STAT3 激活。体外 LLL-HS-1 对 STAT3 酪氨酸残基 705 磷酸化存在明显抑制作用,但对 Src 和 ERK1/2 的磷酸化无明显影响,提示 LLL-HS-1 对 STAT3 具有特异性(Figure 1)。

2.2 体外 LLL-HS-1 对细胞增殖的抑制

在倒置荧光显微镜下观察,细胞损伤或死亡时,台盼蓝可穿透变性的细胞膜,与解体的 DNA 结合,使细胞显示蓝色。而活细胞能阻止染料进入细胞内。通过对比加药组和未加药组,明显可见给药组的活细胞数少,死细胞数较多,说明了在细胞水平,LLL-HS-1 可以抑制 A549 细胞增殖(Figure 2)。

2.3 移植瘤裸鼠生长情况及肿瘤体积的变化情况

将肺癌细胞悬液接种裸鼠左后肢 3 天,可见接种部位出现米粒大小的瘤块,10d 左右肿瘤直径可达 5mm 左右,1 周左右,裸鼠会出现少食情况。随机分组后,进行给药治疗,各组小鼠体重和瘤重无明显差异(Table 1)。高剂量组肿瘤增长速度缓慢,低剂量组肿瘤增长速度居中,对照组肿瘤明显增大(Table 2)。而裸鼠右后肢未见肿瘤出现。

3 讨论

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。

目前 STAT3 的显性负突变,反义 STAT3 寡核苷酸,以及诱骗寡核苷酸等方法^[13]已用于抑制 JAK/STAT 通路。然而其具有一定局限性。另一种策略是通过抑制剂结合到 SH2 结构域而阻止 STAT3 二聚化。肽基础的 STAT3 二聚抑制剂已经报道^[14],但这种多肽抑

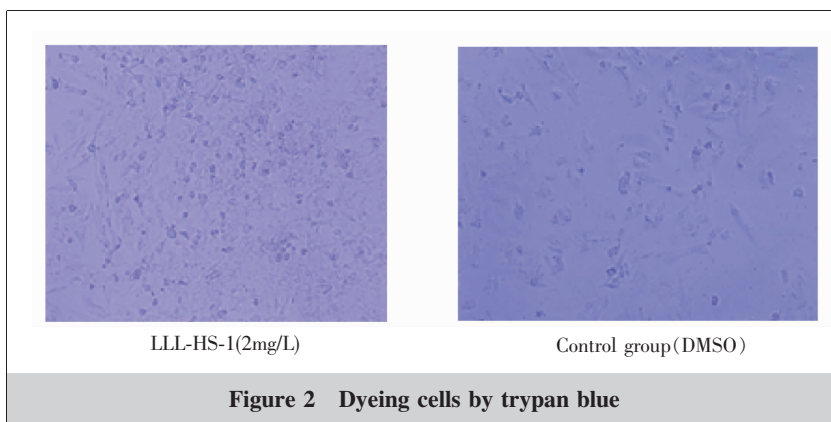
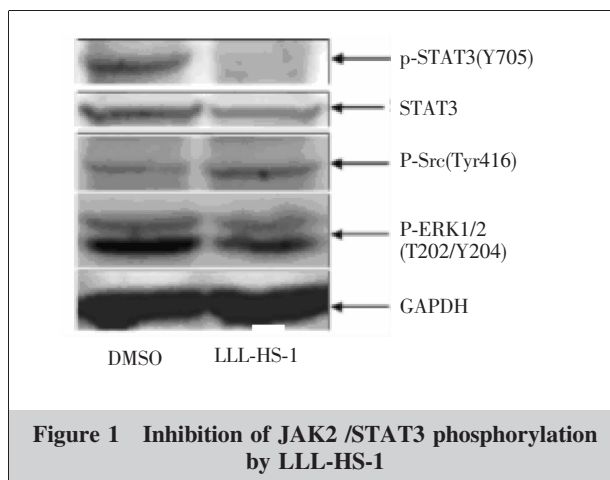


Table 1 The weights of inoculated nude mice with lung cancer cells and their tumors

Groups	Weight (g)		Weight of tumor (g)▲	Inhibition rate (%)
	Beginning*	End△		
Control	19.9±1.1	21.2±1.5	1.1±0.6	-
Low-dose	20.5±1.1	22.1±1.4	0.5±0.3	50.4
High-dose	20.1±1.0	21.7±1.6	0.4±0.2	56.8

Note: Comparison of 3 groups, *: $F=1.0$, $P=0.6$; △: $F=1.1$, $P=0.6$; ▲: $F=9.2$, $P=0.02$.

Table 2 The tumor volumes of inoculated nude mice with lung cancer cell

Groups	Volume of tumor(mm ³)			
	Before treatment	7d	14d	21d
Control	256.3±46.3*	422.5±78.8	911.6±119.2	1989.5±214.3△▲
Low-dose	248.2±39.5	366.4±53.4	397.4±62.1	487.2±78.6°
High-dose	242.1±41.4	260.4±43.7	305.4±53.5	336.8±60.5•

Note: Comparison among 3 groups, *: $F=1.3$, $P=0.5$; △: $F=26.9$, $P=0.004$; ▲: vs low-dose group, $F=17.4$, $P=0.005$; °: vs high-dose group, $F=2.1$, $P=0.3$; •: vs high-dose group, $F=33.8$, $P=0.0001$.

制剂在体内的稳定性和细胞渗透性差。最近,也已报道一些新型 JAK2 抑制剂,如 TG101348^[15]。因此,利用结构为基础的计算机高通量虚拟筛选的设计发现了一种化合物 LLL-HS-1,可以选择地抑制已磷酸化的 STAT3 酪氨酸 705 (pY705)单体的二聚化,直接以 JAK2/STAT3 通路为靶点。

本实验的体外研究发现,化合物 LLL-HS-1 对肺癌组织中 STAT3 表达及磷酸化有明显抑制的作用,药效学分析表明,2mg/L 的 LLL-HS-1 对 STAT3 的磷酸化有显著的抑制作用,而且具有靶点特异性。随着作用的时间不同以及药物浓度的不同,LLL-HS-1 对肿瘤的增长表现出来的抑制效果也不相同。而在体内动物实验研究中,药物浓度对肿瘤的抑制效果之间存在一定的依赖作用,浓度越高,对肿瘤的抑制效果越明显。因此,化合物 LLL-HS-1 处理 A549 细胞的最佳药物浓度及作用时间可以作进一步的研究。

本研究提示以 STAT3 为治疗靶点,设计更有效的癌症治疗新方法有一定可行性,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373: 1627-1639.
- [2] Horvath CM, Darnell JE. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(2): 233-239.
- [3] Lin L, Hutzen B, Li PK, et al. A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(1): 39-50.
- [4] 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.
- [5] Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, et al. Tweak, requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(7): 1385-1392.
- [6] Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription [J]. *Curr Opin Oncol*, 1999, 11(6): 490-496.
- [7] Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, J, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells [J]. *Immunity*, 1999, 10(1): 105-115.
- [8] Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery [J]. *Oncogene*, 2000, 19(56): 6613-6626.
- [9] Zuo M, Li C, Lin J, et al. LLL12, a novel small inhibitor targeting STAT3 for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 10940-10949.
- [10] Lin L, Benson DM Jr, DeAngelis S, et al. A small molecule, LLL12 inhibits constitutive STAT3 and IL-6-induced STAT3 signaling and exhibits potent growth suppressive activity in human multiple myeloma cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 30(6): 1459-1469.
- [11] Ball S, Li C, Li PK, et al. The small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in medulloblastoma and glioblastoma cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18820.
- [12] Onimoe GI, Liu A, Lin L, et al. Small molecules, LLL12 and FLN132, inhibit STAT3 and exhibit potent growth suppressive activity in osteosarcoma cells and tumor growth in mice [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3): 916-926.
- [13] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 4138-4143.
- [14] Turkson J, Kim JS, Zhang S, et al. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3): 261-269.
- [15] Wernig G, Kharas MG, Okabe R, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4): 311-320.