

# STAT3 蛋白表达水平的高低 对慢性粒细胞白血病伊马替尼治疗敏感性的影响

秦宇 杨明珍

**摘要** 目的 升高或者降低信号转导因子与转录激活因子 3 (STAT3) 的表达, 分析其变化对于细胞的增殖分化以及敏感性有何意义。方法 构建重组质粒真核表达载体 siRNA-STAT3, 将重组表达质粒用脂质体 Lipofectamine 3000 转染人慢性粒细胞白血病 K562 细胞, 通过嘌呤霉素持续单克隆筛选, Western blot 法鉴定, 进而筛选出稳定低表达组(低表达对照组、低表达 1 组、低表达 2 组) 和高表达组(高表达对照组、高表达组) STAT3 细胞株。将正处于增殖周期的细胞经不同浓度的伊马替尼作用后, MTT 法检测细胞生长抑制率, 绘制细胞增殖曲线。同时检测转染后细胞株 BCR/ABL 融合基因相关蛋白的表达变化。结果 与低表达对照组相比, 低表达 STAT3(低表达 1 组、低表达 2 组) 的 K562 细胞组使用伊马替尼治疗有着较高的抑制率, 在不同浓度作用下, 其抑制率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。过表达 STAT3 后, 与高表达对照组相比, 在相同浓度梯度伊马替尼作用下, 其抑制率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。低表达对照组与高表达对照组中伊马替尼抑制率差异无统计学意义。伊马替尼治疗靶向基因 BCR/ABL 相关蛋白中的 P53、HAUSP 和 PTEN 蛋白表达趋势和 STAT3 基本一致。结论 低表达 STAT3 蛋白可加强 K562 细胞对伊马替尼的敏感性, 抑制 STAT3 蛋白有望提高伊马替尼对慢性粒细胞白血病的疗效。

**关键词** STAT3; 慢性粒细胞白血病; 伊马替尼; 敏感性

中图分类号 R 733.72

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1601-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.005

慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML) 是一种恶性血液系统疾病。目前一线治疗为酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI) 药物, 尽管 TKI 的问世对 CML 的治疗有着划时代的意义, 但仍有许多问题需要面对。其一, 部分患者对于伊马替尼之类的 TKI 药物不敏感; 其二, 部分患者治疗过程中存在基因突变, 均使得 TKI 针对 BCR/

ABL 融合基因的靶向治疗效果不佳。信号转导及转录活化因子(signal transduction and activators of transcription, STATs) 是一种存在于细胞质与酪氨酸磷酸化信号通道耦联的双功能蛋白。抑制 STAT3 基因表达可使细胞增殖受抑, 细胞周期阻滞, 细胞出现早期凋亡。因此, 该研究设想, 靶向 STAT3 途径可能是降低 CML 细胞增殖及伊马替尼治疗敏感性研究的关键。针对这个设想, 该研究应用质粒转染技术, 升高或者降低 CML K562 细胞 STAT3 蛋白表达, 观察转染后的分组细胞对伊马替尼敏感性的变化, 为提高 CML 的疗效探索新途径。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人 CML 细胞株购自上海细胞库; 1640 细胞培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; STAT3 质粒购自美国 Genecopoeia 公司; Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司; PTEN、HAUSP、P53 及 STAT3 第一抗体均购自美国 Cell signaling technology 公司; 伊马替尼购自美国 Sigma 公司。

**1.2 重组质粒的构建和转染** 细胞株 K562 生长的完全 RPMI-1640 培养液含 10% 胎牛血清、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素, 在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下温箱培养。转染前, 将  $2 \times 10^5$  个细胞接种到含有无双抗培养基的 6 孔板中培养, 待细胞进入增殖周期, 且融合度达到 80% ~ 90% 时准备进行转染操作。购买的重组质粒已通过基因测序符合序列测定, 不同的基因片段具有升高或者降低 STAT3 表达的功能, 按照实验设计分为低表达对照组、低表达 1 组、低表达 2 组、高表达对照组、高表达组, 其中低表达对照组作为低表达组的空白对照, 高表达对照组作为高表达组的空白对照, 低表达 1 组和低表达 2 组细胞为不同的 STAT3 基因片段调控, 均降低 STAT3 蛋白表达, 高表达组细胞升高 STAT3 蛋白表达。用 50  $\mu\text{l}$  Opti-MEM 稀释 0.8  $\mu\text{g}$  质粒 DNA, 轻轻吹吸 3 ~ 5 次混匀, 室温下静置 5 min, 轻轻颠倒混

2017-06-16 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2016A352)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

作者简介: 秦宇, 男, 住院医师, 硕士研究生;

杨明珍, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

yangmz89@163.com

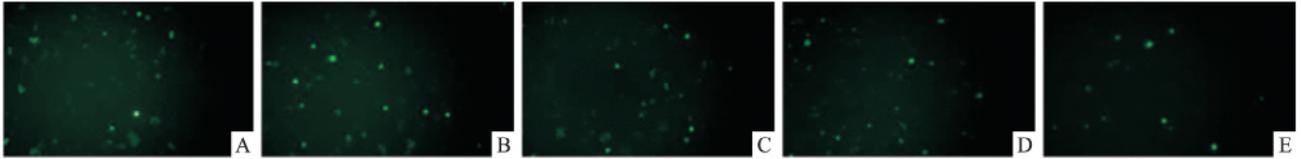


图1 转染 24 h 后绿色荧光蛋白表达 荧光染色 ×10  
A: 低表达对照组 ; B: 低表达 1 组 ; C: 低表达 2 组 ; D: 高表达对照组 ; E: 高表达组

匀转染试剂; 用 50 μl Opti-MEM 稀释 2.0 μl Lipofectamine 3000 轻轻吹吸 3 ~ 5 次混匀, 室温下静置 5 min, 混合转染试剂和质粒 DNA 稀释液, 轻轻吹吸 3 ~ 5 次混匀, 室温下静置 20 min 后按照 100 μl/孔加入孔板中进行细胞转染, 前后轻摇细胞板混合均匀, 将细胞板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h 左右, 进行换液, 换成含 10% 血清的普通培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中继续培养。72 h 后采用嘌呤霉素筛选。

**1.3 荧光显微镜下观察** 细胞转染瞬时转染 6 h 后较多 K562 细胞内有绿色荧光蛋白表达, 24 h 后 GFP 表达明显增强, 表明转染成功, 得到 siRNA-STAT3 细胞株。

**1.4 Western blot 法检测 STAT3 等蛋白表达** 收集细胞, 裂解细胞提取总蛋白, BCA 法蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 电泳后分离的蛋白电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶在室温条件下摇床封闭 2 h, PBST 漂洗 2 min 后加入稀释好的 STAT3 单克隆抗体 (1 : 1 000), 4 °C 过夜孵育, TBST 洗膜 3 次。再加入兔抗鼠 IgG (1 : 5 000), 室温下反应 2 h, TBST 洗膜, 化学发光底物 A、B 溶液等比例混合, 制成工作液显色, β-actin 为内参照, 分析条带。

**1.5 MTT 法检测药物敏感性** 吸取处于细胞增殖周期且生长状态良好的五组 K562 细胞, 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl, 每组细胞设 3 个复孔, 在培养箱中培养细胞, 向培养板中加入不同浓度的伊马替尼, 以未加伊马替尼孔作为对照。培养 6 h 后每孔加入 10 μl 的 CCK-8, 温育 2 h, 振荡混匀, 酶标仪测定 450 nm 吸光度值。计算肿瘤细胞抑制率, 细胞抑制率 (%) = (1 - 实验孔吸光度值 / 对照孔吸光度值) × 100%, 实验重复 3 次。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 多组均值的比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 荧光显微镜下观测结果** 构建带有绿色荧光

蛋白的重组质粒真核表达载体 siRNA-STAT3 转染 K562 细胞后 6 h 后在荧光显微镜下观察即有绿色荧光蛋白表达, 24 h 后表达更为明显 (图 1), 表明转染成功。

**2.2 STAT3 蛋白表达水平** 转染 72 h 后, 采用嘌呤霉素筛选细胞株, 形成稳定转染细胞株后其 STAT3 蛋白 Western blot 检测结果见图 2, 其中 1、2 为高表达组, 3、4、5 为低表达组, 观察蛋白表达条带, 验证转染成功。

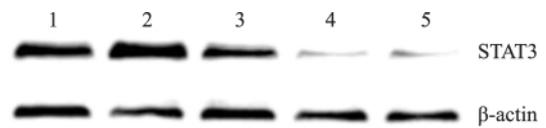


图2 转染细胞株 STAT3 蛋白表达水平  
1: 高表达对照组; 2: 高表达组; 3: 低表达对照组; 4: 低表达 1 组; 5: 低表达 2 组

**2.3 MTT 检测药物敏感性结果** 经不同浓度的伊马替尼药物作用 6 h 后, 高表达 STAT3 的 K562 细胞组使用伊马替尼治疗有着较低的抑制率, 在 0.10、0.25、0.50 和 1.00 μmol/L 作用下, 其抑制率达到了 (58.22 ± 1.27) %、(63.23 ± 2.32) %、(67.91 ± 1.00) % 和 (74.14 ± 0.76) %, 差异有统计学意义 (F = 26.641, P < 0.05)。敲低 STAT3 后, 与其空白对照相比, 在相同浓度梯度伊马替尼作用下, 其抑制率在两组平均上升到 (76.32 ± 1.84) %、(80.42 ± 1.90) %、(84.41 ± 2.61) % 和 (94.33 ± 0.19) %, 差异有统计学意义 (F = 19.227, P < 0.05)。两对照组中伊马替尼抑制率差异无统计学意义。见图 3。

**2.4 STAT3 蛋白对 BCR/ABL 相关蛋白表达的影响** Western blot 结果表明, siRNA-STAT3 转染 K562 细胞后, 与对照组相比, 伊马替尼治疗靶向基因酪氨酸激酶 BCR/ABL 相关蛋白表达中, P53、HAUSP 和 PTEN 蛋白表达趋势和 STAT3 基本一致, 见图 4。

**3 讨论**

在肿瘤细胞中 STAT3 呈现持续过度激活状态,

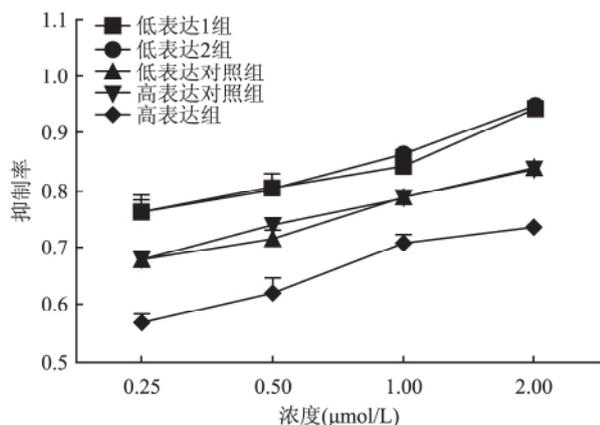


图3 MTT 检测伊马替尼敏感性

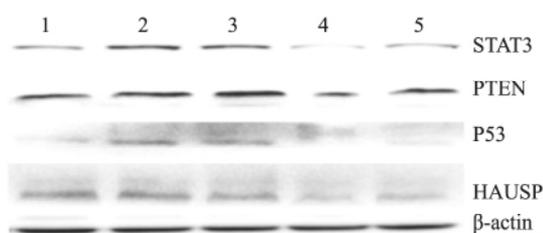


图4 STAT3 蛋白对 BCR/ABL 相关蛋白表达水平的影响

1: 高表达对照组; 2: 高表达组; 3: 低表达对照组; 4: 低表达 1 组; 5: 低表达 2 组

许多体内和体外实验已经证明了 STAT3 激活与发展与多种癌症的不良预后相关<sup>[1]</sup>。而与此相反, Liu et al<sup>[2]</sup> 利用氯硝柳胺抑制 STAT3 磷酸化和下游靶基因的表达, 逆转了前列腺癌细胞对恩杂鲁胺的耐药性。Huang et al<sup>[3]</sup> 发现抑制 STAT3 抑制剂能使对顺铂耐药的胃癌细胞凋亡。Zhao et al<sup>[4]</sup> 利用 STAT3 抑制剂抑制 STAT3 后, 结肠癌和肝癌细胞得到抑制。而王勇梅等<sup>[5]</sup> 研究显示, 调控 STAT3 基因与化疗结合, 提高了卵巢癌 SKOV3 细胞化疗的敏感性。以上结果表明, 阻断或干扰 STAT3 转导途径可能会抑制细胞的增殖和诱导, 从而达到治疗肿瘤的效果。鉴于相关研究的理论基础, 目前有多个针对 STAT3 的小分子抑制剂药物, 如 OPB-51602、STA-21 和 pyrimethamine 等已经进入临床试验阶段, 这些药物可能在鼻咽癌、肝细胞癌、多发性骨髓瘤以及非霍奇金淋巴瘤的治疗研究中取得突破性进展<sup>[6]</sup>。因此, 现针对 STAT3 靶分子的治疗已成为热点, 调控 STAT3 基因有望成为治疗 CML 的新靶点。本研究主要通过细胞转染技术, 调控细胞内特定 STAT3 蛋白的表达, 通过荧光显微镜下观察以及蛋白印迹结果均可验证转染成功, 达到调控蛋白的要求。

现伊马替尼作为 CML 的一线治疗方案, 已广泛应用于临床, 但临床耐药现象不可避免。研究<sup>[7]</sup> 显示 CML 患者对 TKIs 耐药比例在慢性期达 15% ~ 25%, 而在急变期, 比例则更高。STAT3 过表达与治疗 CML 药物的耐药性密切相关, 并且涉及不良预后<sup>[8]</sup>。STAT3 抑制剂可以改善化疗的结果<sup>[9]</sup>。STAT3 可以通过驱动增殖, 抗凋亡和 MDR 基因表达, 增加 CML 细胞存活来克服对 BCR/ABL 抑制的敏感性<sup>[10]</sup>。有研究<sup>[11]</sup> 显示, BP-5-087 作为一种有效的和选择性 STAT3 小分子抑制剂, 可以减少 STAT3 磷酸化, 并使对 TKI 耐药的 CML 细胞重新变得敏感。值得注意的是, 已有研究<sup>[12-14]</sup> 表明, 多种蛋白如 P53、HAUSP 和 PTEN 在 BCR/ABL 介导的 CML 的发生和发病机制中具有关键作用。本研究 Western blot 结果表明, 伊马替尼治疗靶向基因酪氨酸激酶 BCR/ABL 相关蛋白表达中, P53、HAUSP 和 PTEN 蛋白表达趋势和 STAT3 基本一致, 这说明 STAT3 在 CML 中发挥关键作用, 但 STAT3 与 P53、HAUSP 和 PTEN 这些蛋白之间是否存在交联关系需要在后续的研究中进一步探讨与验证。由此可见, 调控 STAT3 基因的表达可为 CML 的治疗提供新的方向。

为了提升抑制 CML 肿瘤细胞的效果, 本研究主要观察 CML 细胞在伊马替尼治疗下的敏感性, 通过 MTT 法检测了细胞在伊马替尼化疗的增殖性和细胞凋亡率, 本研究结果表明, 低表达 STAT3 的 K562 细胞组使用伊马替尼治疗有着较高的抑制率, 而过表达 STAT3 后, 跟其对照组相比, 其抑制率下降, 且均差异有统计学意义。而两对照组中伊马替尼抑制率差异无统计学意义, 进一步说明低表达 STAT3 与过表达 STAT3 对 CML 伊马替尼治疗敏感性的不同结果具有可比性。

综上所述, 本研究表明, 降低 STAT3 蛋白表达能提高 CML K562 细胞的伊马替尼化疗敏感性, 提高 STAT3 蛋白表达则使得伊马替尼化疗敏感性减低。此实验结果为 CML 的基因治疗与化疗结合提供了实验依据, 理解 STAT3 的转录活动可能是发现新一代治疗白血病的重要工具, 也为进一步提高 CML 的治愈率提供了一种新的途径。

#### 参考文献

- [1] Johnston P A, Grandis J R. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges[J]. Mol Interv 2011, 11(1): 18-26.
- [2] 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 ,75( 13) : 1341 - 53.
- [3] Huang S ,Chen M ,Shen Y ,et al. Inhibition of activated Stat3 reverses drug resistance to chemotherapeutic agents in gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett* 2012 ,315( 2) : 198 - 205.
- [4] Zhao C , Wang W , Yu W , et al. A novel small molecule STAT3 inhibitor , LY5 , inhibits cell viability , colony formation , and migration of colon and liver cancer cells [J]. *Oncotarget* , 2016 , 7( 11) : 12917 - 26.
- [5] 王勇梅 , 吴维光 , 葛红雨 , 等. 沉默 STAT3 基因对人卵巢癌化疗敏感性的影响 [J]. *中国癌症杂志* , 2010 , 20( 4) : 270 - 4.
- [6] Zhao C , Li H , Lin H J , et al. Feedback activation of STAT3 as a cancer drug-resistance mechanism [J]. *Trends Pharmacol Sci* , 2016 , 37( 1) : 47 - 61.
- [7] Parker W T , Ho M , Scott H S , et al. Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients with multiple low-level mutations , irrespective of their resistance profile [J]. *Blood* 2012 , 119( 10) : 2234 - 8.
- [8] Ma L D , Zhou M , Wen S H , et al. Effects of STAT3 silencing on fate of chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. *Leuk Lymphoma* , 2010 , 51( 7) : 1326 - 36.
- [9] Yang H , Yamazaki T , Pietrocola F , et al. STAT3 inhibition enhances the therapeutic efficacy of immunogenic chemotherapy by stimulating type I interferon production by cancer cells [J]. *Cancer Res* 2015 , 75( 18) : 3812 - 22.
- [10] Zhang X , Xiao W , Wang L , et al. Deactivation of signal transducer and activator of transcription 3 reverses chemotherapeutics resistance of leukemia cells *via* down-regulating P-gp [J]. *PLoS One* , 2011 , 6( 6) : e20965.
- [11] Eiring A M , Page B D , Kraft I L , et al. Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia* 2015 , 29( 3) : 586 - 97.
- [12] Woo S M , Choi Y K , Kim A J , et al. p53 causes butein-mediated apoptosis of chronic myeloid leukemia cells [J]. *Mol Med Rep* , 2016 , 13( 2) : 1091 - 6.
- [13] Morotti A , Panuzzo C , Crivellaro S , et al. HAUSP compartmentalization in chronic myeloid leukemia [J]. *Eur J Haematol* 2015 , 94( 4) : 318 - 21.
- [14] Panuzzo C , Crivellaro S , Carrà G , et al. BCR-ABL promotes PTEN downregulation in chronic myeloid leukemia [J]. *PLoS One* , 2014 , 9( 10) : e110682.

## Study on the sensitivity of STAT3 gene expression in the treatment of imatinib to chronic myeloid leukemia

Qin Yu , Yang Mingzhen

( Dept of Hematology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

**Abstract Objective** To observe the expression of signal transducer and activator of transcription ( STAT3 ) in chronic myeloid leukemia cells K562 and analyze the influence of these changes to the cell proliferation , differentiation and drug resistance. **Methods** We constructed recombinant eukaryotic expression vector siRNA-STAT3 , and transfected them into K562 cells with the help of lipofectamine 3000. Then stable monoclonal cells would be screened by puromycin and validated by Western blot. Inhibition rate of the cell growth to imatinib ( IM ) was determined by MTT method. Meanwhile , the related protein of BCR/ABL fusion protein was detected. **Results** Compared with the control group , low expression of STAT3 in the K562 cell group using IM treatment had a high inhibition rate , under different concentrations , the inhibition rate was statistically significant (  $P < 0.05$  ) . While in the high expression of STAT3 cells , at the same concentration gradient under the action of IM , and the differences between groups were also statistically significant (  $P < 0.05$  ) . However , there was no statistically significant difference of the inhibition rate in the two control groups. We also detected the similar expression levels of the related protein of BCR/ABL fusion protein , P53 , HAUSP and PTEN. **Conclusion** Low expression of the STAT3 protein enhances the sensitivity of K562 cells to IM , which may result in a further reduction in the subsequent resistance of the K562 cells to IM treatment by inhibiting the STAT3 protein.

**Key words** STAT3; chronic myeloid leukemia; imatinib; sensibility