

STAT3磷酸化介导白血病细胞对多柔比星耐药的机制研究

贾祝霞^{1,3} 卢绪章¹ 蔡晓辉¹ 秦伟¹ 韩文敏¹ 肖溶¹ 周民² 徐卫³

¹南京医科大学附属常州第二人民医院血液科,常州 213000;²常州市第三人民医院 213000;³南京医科大学第一附属医院、江苏省人民医院血液科 210029

通信作者:徐卫,Email:xuwei10000@hotmail.com

基金项目:常州市科技局应用基础研究计划(CJ20160018);常州市高层次卫生人才培养工程(2016CZLJ027);江苏省自然科学基金(BK20160283)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.01.013

Mechanism of STAT3 phosphorylation mediated leukemia cells resistance to doxorubicin

Jia Zhuxia^{1,3}, Lu Xuzhang¹, Cai Xiaohui¹, Qin Wei¹, Han Wenmin¹, Xiao Rong¹, Zhou Min², Xu Wei³

¹Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou No.2 People's Hospital, Changzhou 213000, China; ²Changzhou No.3 People's Hospital, Changzhou 213000, China; ³Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Xu Wei, Email: xuwei10000@hotmail.com

白血病是常见的造血系统恶性肿瘤之一^[1],白血病细胞对化疗药物产生多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是临床上导致白血病治疗失败和白血病复发的主要原因^[2]。研究表明,STAT3磷酸化能通过多种途径介导肿瘤耐药^[3-7]。我们此前的研究结果显示,耐药白血病细胞(K562/AO2)STAT3磷酸化水平明显升高^[8],抑制STAT3磷酸化可以降低耐药白血病细胞P-gp蛋白的表达^[9]。本研究中,我们通过转染K562细胞建立耐药白血病细胞株K562/STAT3,阐明STAT3磷酸化介导白血病细胞发生耐药的可能机制。

材料与方 法

1. 细胞及主要试剂:K562细胞由苏州大学附属医院陈苏宁教授惠赠。抗STAT3抗体、抗磷酸化STAT3(Tyr705)抗体、抗GAPDH抗体购于美国Cell Signaling公司。抗P-gp抗体购于美国Abbotec公司。STAT3抑制剂(STAT3 inhibitor VII)购于德国Calbiochem公司。

2. K562/STAT3细胞株的构建和培养:取pcDNA3.1-STAT3质粒和空载体质粒(常州优博精准医疗有限公司产品),按照说明书转染K562细胞,筛选稳定高表达STAT3的细胞(K562/STAT3)进行实验。细胞用含有10%灭活胎牛血清(FBS)、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的PRMI1640培养液,置于5% CO₂、37℃培养箱内常规培养。

3. MTT法检测细胞增殖抑制率:调整细胞密度为5×10⁵/ml,接种于96孔板,每孔100 μl,分别加入不同浓度的多柔比星,抑制实验中加入2 μmol/L STAT3 inhibitor VII,培养48 h后每孔加入10 μl MTT标记液再培养4 h(培养条件37℃、5% CO₂),然后加入100 μl DMSO,用酶标仪测定

570 nm处吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

4. Western blot法检测STAT3磷酸化水平以及P-gp蛋白的表达水平:收集细胞加入裂解缓冲液(裂解缓冲液中提前加入蛋白酶抑制剂和磷酸化抑制剂),提取细胞内总蛋白,测定蛋白浓度。每个电泳孔内加入50 μg蛋白,用10% SDS-PAGE分离蛋白,聚偏氟乙烯膜(PVDF)转膜后,用55 g/L的脱脂奶粉溶液封闭。然后加入单克隆抗体4℃孵育过夜,充分洗脱后,加入二抗室温孵育2 h后,应用ECL化学发光显色,Image J灰度分析,以GAPDH作为内参。

5. 实时荧光定量PCR(RQ-PCR)法检测P-gp基因表达水平:用Isogen提取RNA,然后逆转录成cDNA,储存于-20℃冰箱待用。LightCycler PCR system分析P-gp基因表达水平。以GAPDH为内参,白血病细胞P-gp基因的表达水平用P-gp mRNA和GAPDH mRNA比值(P-gp/GAPDH)表示。P-gp:上游引物5'-ACAGAGGGGATGGTCAGTGT-3',下游引物5'-TCACGGCCATAGCGAATGTT-3'。管家基因GAPDH:上游引物5'-CTATTCGATGCCGTGTATGC-3',下游引物5'-GCCTGGTCCAGACTTCTTTC-3'。

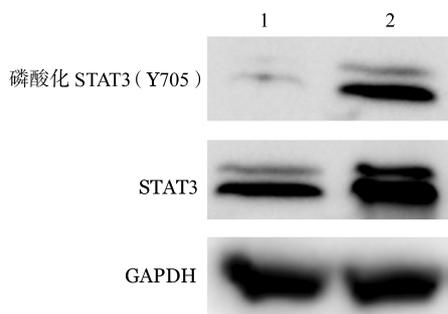
6. 白血病患者标本制备:2例复发难治急性髓系白血病(AML)患者标本均来自常州第二人民医院血液科住院患者(M₁和M₂各1例)。初诊和复发时抽取患者外周血5 ml(已获得本单位伦理委员会批准),用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),流式细胞术检测分离PBMC中白血病细胞均超过80%,分离的PBMC用细胞冻存液保存在液氮中备用。

7. 统计学处理:采用SPSS17.0统计学软件进行分析。实验数据用均数±标准差表示,两组间比较用t检验,P<0.05

为差异有统计学意义。

结 果

1. K562/-细胞和pcDNA3.1-STAT3转染后细胞(K562/STAT3细胞)内STAT3表达水平及对多柔比星敏感性的变化:Western blot法检测显示,K562/STAT3细胞内总STAT3和磷酸化STAT3表达水平均明显升高(图1)。用MTT法检测多柔比星对K562/STAT3细胞和K562/-细胞增殖的影响,结果显示多柔比星对K562/STAT3细胞的抑制作用明显减弱(图2)。



1:K562/-细胞;2:K562/STAT3细胞

图1 K562/-细胞和K562/STAT3细胞STAT3和磷酸化STAT3表达水平

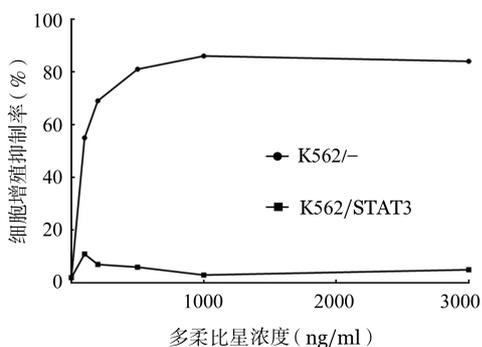
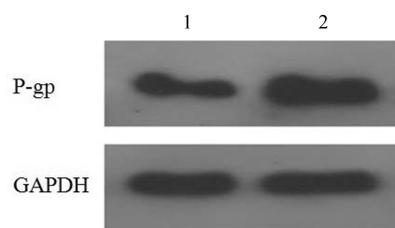


图2 K562/-细胞和K562/STAT3细胞对多柔比星的耐药性

2. K562/-细胞和K562/STAT3细胞P-gp基因及P-gp蛋白的表达水平:RQ-PCR检测结果显示,K562/STAT3细胞P-gp基因表达水平为(360.54±11.22)%,较K562/-细胞的(1.02±0.18)%明显升高($t=45.32, P=0.001$)。Western blot法检测显示,K562/STAT3细胞P-gp蛋白表达水平明显升高(图3),表明转染后细胞内STAT3的表达水平影响了P-gp基因和蛋白的表达。

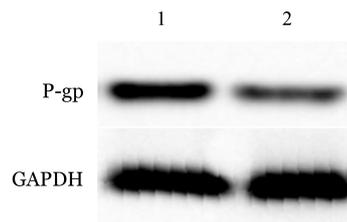
3. 抑制STAT3磷酸化对K562/STAT3细胞对于多柔比星敏感性的影响:用2 μmol/L的STAT3抑制剂处理K562/STAT3细胞,Western blot法检测发现K562/STAT3细胞的P-gp蛋白表达水平下降(图4);同时在多柔比星浓度为10 μg/ml的条件下,MTT法检测结果显示用STAT3抑制剂处理过的K562/STAT3细胞在多柔比星中的增殖能力明显下降[(65.67±6.03)%对(83.66±4.04)%, $t=4.296, P=0.013$],表明抑制STAT3的磷酸化可以降低P-gp蛋白的表达,从而增

加耐药细胞对多柔比星的敏感性。



1:K562/-细胞;2:K562/STAT3细胞

图3 K562/-细胞和K562/STAT3细胞内P-gp蛋白表达水平



1:未加STAT3抑制剂处理组;2:2 μmol/L STAT3抑制剂处理组

图4 STAT3抑制剂对K562/STAT3细胞P-gp蛋白表达水平的影响

4. 复发难治白血病患者STAT3磷酸化水平和P-gp基因表达:我们检测2例复发难治白血病患者初诊和复发时的外周血标本,Western blot法检测患者白血病细胞内STAT3的表达水平,结果显示白血病患者复发时细胞内磷酸化STAT3表达水平较初诊时明显升高(图5)。RQ-PCR检测结果显示白血病患者复发时细胞内P-gp基因表达水平较初诊时明显升高(例1:0.35±0.07对0.07±0.05, $t=5.638, P=0.005$;例2:0.36±0.05对0.13±0.03, $t=6.832, P=0.002$),表明复发难治患者的白血病细胞内STAT3磷酸化水平以及耐药基因的表达水平均升高。

讨 论

STAT3是信号传导与转录激活因子蛋白家族,已有多项研究表明激活的STAT3在肿瘤耐药中起重要作用^[4]。多项研究显示,与肿瘤药物敏感株相比,耐药肿瘤细胞株磷酸化STAT3的表达水平明显升高,抑制STAT3磷酸化,耐药肿瘤细胞株对化疗药物的敏感性明显增加^[3,5-7,10-11]。既往我们在研究中也发现耐药白血病细胞株K562/AO2细胞内STAT3磷酸化水平明显升高,加入STAT3抑制剂后K562/AO2细胞对多柔比星的敏感性明显上升^[8-9]。本研究通过转染K562细胞,获得稳定高表达磷酸化STAT3的K562/STAT3细胞株,发现它对多柔比星的敏感性明显下降,表明STAT3磷酸化可能诱导白血病细胞发生化疗耐药。

近年来有研究表明STAT3的活化可通过增加mdr1基因的表达介导乳腺癌细胞发生耐药^[12],降低STAT3磷酸化的水平可以降低耐药蛋白P-gp的表达水平,逆转肿瘤细胞的耐药性^[5,13-14]。其机制可能为在P-gp启动子区域中含有一个与STAT3结合的DNA序列,这个序列位于P-gp启动子中P-gp起始编码位点上游1 014 bp处,并具有较强的结合能力^[15]。

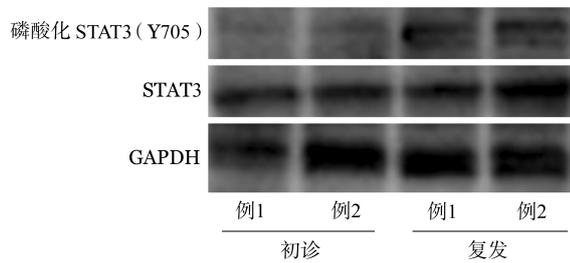


图5 两例白血病患者初发时和复发时白血病细胞STAT3和磷酸化STAT3的表达水平

P-gp是一种与耐药相关的高分子糖蛋白,由mdr1基因编码,可利用ATP水解释放的能量将化疗药物泵至细胞外,减弱药物的细胞毒作用,从而导致细胞对结构和作用机制不同的多种化疗药物产生耐药^[16-17]。本研究发现,K562/STAT3细胞P-gp基因和蛋白的表达明显升高($P=0.001$),用STAT3抑制剂干预后,K562/STAT3细胞对多柔比星的敏感性明显升高,同时其P-gp蛋白表达水平明显降低。因此可推断,STAT3磷酸化可能是通过诱导白血病细胞耐药蛋白P-gp的表达,从而产生化疗耐药;抑制STAT3磷酸化可以通过降低P-gp表达水平恢复耐药白血病细胞对化疗药物的敏感性。

我们进一步用白血病患者的白血病细胞验证STAT3磷酸化介导的化疗耐药,我们比较2例AML患者复发时和初诊时白血病细胞的STAT3磷酸化水平以及耐药蛋白P-gp的表达水平,结果显示,AML患者复发时白血病细胞STAT3磷酸化水平以及P-gp基因表达水平均明显升高($P<0.01$)。遗憾的是可获得的这两例患者的白血病细胞较少,未能进一步比较患者复发时和初诊时其对多柔比星的敏感程度。

本研究通过转染获得耐药K562/STAT3白血病细胞株,发现STAT3磷酸化水平与白血病耐药密切相关;抑制STAT3磷酸化下调P-gp基因和蛋白的表达,从而逆转白血病细胞化疗耐药。STAT3可能成为有效克服白血病细胞耐药潜在的新靶点,联合靶向STAT3抑制剂可能提高部分耐药白血病细胞对化疗药物的敏感性,为复发难治白血病患者提供可选择的治疗手段。

参考文献

[1] Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37 (6): 649- 658. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.04.002.

[2] Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, et al. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML [J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15 (1- 2):62- 69. DOI: 10.1016/j.drup.2012.02.001.

[3] Li R, Yanjiao G, Wubin H, et al. Secreted GRP78 activates EGFR- SRC- STAT3 signaling and confers the resistance to sorafenib in HCC cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (12):19354-19364. DOI: 10.18632/oncotarget.15223.

[4] Zhao C, Li H, Lin HJ, et al. Feedback Activation of STAT3 as a Cancer Drug-Resistance Mechanism [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(1):47-61. DOI: 10.1016/j.tips.2015.10.001.

[5] Seo HS, Ku JM, Lee HJ, et al. SH003 reverses drug resistance by blocking signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in breast cancer cells [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6). DOI: 10.1042/BSR20170125.

[6] Zeng R, Tang Y, Zhou H, et al. STAT3 mediates multidrug resistance of Burkitt lymphoma cells by promoting antioxidant feedback [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488 (1): 182-188. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.031.

[7] Gleixner KV, Schneeweiss M, Eisenwort G, et al. Combined targeting of STAT3 and STAT5: a novel approach to overcome drug resistance in chronic myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2017, 102(9):1519-1529. DOI: 10.3324/haematol.2016.163436.

[8] 贾祝霞,蔡晓辉,肖溶,等. NKG2D配体介导耐药白血病细胞K562/A02免疫逃逸的机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39 (3): 251- 254. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2018.03.018.

[9] Cai X, Lu X, Jia Z, et al. STAT3 contributes to NK cell recognition by modulating expression of NKG2D ligands in adriamycin-resistant K562/A02 cells [J]. *Int J Hematol*, 2015, 102 (5):536-543. DOI: 10.1007/s12185-015-1860-7.

[10] Li H, Lu H, Lv M, et al. Parthenolide facilitates apoptosis and reverses drug-resistance of human gastric carcinoma cells by inhibiting the STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (3):3572-3579. DOI: 10.3892/ol.2018.7739.

[11] Shi K, Fang Y, Gao S, et al. Inorganic kernel - Supported asymmetric hybrid vesicles for targeting delivery of STAT3-decoy oligonucleotides to overcome anti- HER2 therapeutic resistance of BT474R [J]. *J Control Release*, 2018, 279:53-68. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.04.023.

[12] Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, et al. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (25):17635-17651. DOI: 10.1074/jbc.M800109200.

[13] Jagadeeshan S, David D, Jisha S, et al. Solanum nigrum Unripe fruit fraction attenuates Adriamycin resistance by down-regulating multi-drug resistance protein (Mdr) - 1 through Jak-STAT pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):370. DOI: 10.1186/s12906-017-1872-3.

[14] Yun M, Lee D, Park MN, et al. Cinnamaldehyde derivative (CB-PIC) sensitizes chemo-resistant cancer cells to drug-induced apoptosis via suppression of MDR1 and its upstream STAT3 and AKT signalling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35 (5):1821-1830. DOI: 10.1159/000373993.

[15] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0020965.

[16] Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS, et al. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review [J]. *J Adv Res*, 2015, 6 (1):45-62. DOI: 10.1016/j.jare.2014.11.008.

[17] Qiu Q, Shi W, Li Z, et al. Exploration of 2-((Pyridin-4-ylmethyl) amino) nicotinamide Derivatives as Potent Reversal Agents against P- Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance [J]. *J Med Chem*, 2017, 60 (7):2930-2943. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01879.

(收稿日期:2019-07-19)

(本文编辑:王叶青)