文章编号:1000-5404(2014)01-0055-04

论著

# 舒尼替尼阻断STAT3通路抑制头颈鳞癌细胞PCI-13增殖

贾志宇[1],赵云转[1],屈鹏飞[1],张英怀[1],Lim Chweeming[2],Robert L Ferris[2] (050000 石家庄,河北医科大学第二医院口腔颌面外科[1];15213 宾夕法尼亚州,美国匹兹堡大学医学院耳鼻咽喉-头颈外科[2])

[摘要] **目的** 体外研究舒尼替尼对头颈鳞癌细胞系PCI-13增殖和凋亡的影响,并观察STAT1、STAT3在凋亡过程中的变化,探讨STAT3通路在舒尼替尼诱导肿瘤细胞凋亡中的作用。**方法** 体外培养PCI-13细胞,用不同浓度的舒尼替尼处理24、48、72 h后,应用MTT比色实验,倒置显微镜、Wright-Giemsa染色、流式细胞术检测和观察PCI-13的生长抑制率和凋亡情况。细胞经血清饥饿后,分别用0、1、2、4 μmol/L的舒尼替尼处理2、8、16和24 h,采用流式细胞术检测p-STAT1和3的表达,并设阴性和阳性对照组。**结果** 舒尼替尼可明显抑制PCI-13细胞的增殖,其最高抑制率可达92%,各浓度用药组不同处理时间之间生长抑制率有显著差异($P<0.05$),抑制率呈时间-浓度依赖性。同时舒尼替尼可诱导PCI-13细胞凋亡,凋亡率随处理时间延长和药物浓度增加而上升($P<0.05$)。舒尼替尼不影响p-STAT1的表达($P>0.05$),但是可以显著抑制p-STAT3的表达,这种抑制存在浓度依赖性($P<0.05$)。**结论** 舒尼替尼不但能够抑制PCI-13细胞增殖,诱导其凋亡,而且能够抑制PCI-13细胞中STAT3的磷酸化水平,减少其激活。提示舒尼替尼诱导PCI-13细胞凋亡可能由STAT/JAK途径介导。

[关键词] 舒尼替尼;头颈癌;增殖;凋亡;信号转导和转录激活因子3
[中图法分类号] R73-361;R739.91;R979.1 [文献标志码] A

# Sunitinib inhibits proliferation of head and neck cell line PCI-13 by blocking STAT3 signal pathway

Jia Zhiyu[1], Zhao Yunzhuan[1], Qu Pengfei[1], Zhang Yinghuai[1], Lim Chweeming[2], Robert L Ferris[2] ([1]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050000, China; [2]Department of Otolaryngology Division of Head and Neck Surgery, University of Pittsburgh Medical Center, 15213 PA, USA)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effect of sunitinib on the proliferation and expression of phosphorylating-signal transducer and activator of transcription1 and 3 (STAT1, STAT3) in the head and neck cancer cell line PCI-13 in order to determine the role of STAT3 pathway in the antitumor activity of sunitinib. **Methods** PCI-13 cells were treated with different concentrations of sunitinib (1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μmol/L) for 24, 48 and 72 h. Then MTT assay, inversion phase contrast microscopy, Wright-Giemsa staining and flow cytometry were used to calculate the growth inhibitory rate and to observe the apoptosis of PCI-13 cells. PCI-13 cells were respectively treated with 0, 1, 2 and 4 μmol/L sunitinib for 2, 8, 16 and 24 h after 48 hours' sera starving. Then phosphorylated-STAT1 and 3 were detected with flow cytometry. **Results** Sunitinib significantly inhibited the growth of PCI-13 cells in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$) and the highest inhibitory rate was 92%. Meanwhile, sunitinib also significantly induced apoptosis in PCI-13 cells, and the apoptotic rate was increased in a time- and dose-dependent manner($P<0.05$). Sunitinib had no effect on the expression of p-STAT1($P>0.05$), but significantly suppressed the expression of p-STAT3 in a dose-dependent manner($P<0.05$). **Conclusion** Sunitib not only inhibits the proliferation and induces the apoptosis of PCI-13 cells in a time- and dose-dependent manner, but also inhibits the phosphorylation and actitvity of STAT3, suggesting that sunitinib might induce apoptosis in PCI-13 cells by STAT/JAK pathway.

[**Key words**] sunitinib; head and neck cancer; proliferation; apoptosis; signal transducer and activator of transcription 3

Corresponding author: Zhang Yinghuai, E-mail:Zhyh787@163.com

[通信作者] 张英怀,E-mail:Zhyh787@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1411.013.html(2013-10-22)

舒尼替尼(Sunitinib)是一种口服的小分子多靶向酪氨酸激酶抑制剂,因其对血管形成有关的数种生长因子受体,包括血管上皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)1,2,3,血小板分化生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor,PDGFR)α,β和干细胞因子等有抑制作用[1],已经作为抗血管生成药物用于恶性肿瘤的临床治疗。近来随着临床研究的深入,发现舒尼替尼能够不依赖于抗血管生成作用,直接诱导多种恶性肿瘤细胞的凋亡[1-2]。信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription,STAT)3是STAT家族中最活跃的成员之一,可在包括头颈癌在内的多种恶性肿瘤中激活[3-5]。作为VEGFR、PDGFR、EGFR、Src等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道的汇聚的焦点[4],STAT3在头颈癌的发生、发展中起重要作用。但是,舒尼替尼能否诱导头颈癌细胞凋亡,STAT3是否在其中发挥作用,目前少见报道。本研究检测头颈鳞癌PCI-13细胞经舒尼替尼处理后的凋亡情况和STAT1、3的变化,以期了解舒尼替尼抑制头颈癌的机制,为舒尼替尼治疗头颈癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

头颈鳞癌细胞系PCI-13和舒尼替尼均由美国匹兹堡大学医学中心耳鼻喉科Robert L Ferris教授惠赠。舒尼替尼用二甲亚砜(DMSO)配置成40 mmol/L的储存液,储存于-20 ℃冰箱中,使用前用培养液稀释。DMEM、AIM-V培养液购自Gibco公司。Annexin-V-PI双染凋亡试剂盒、p-STAT1($Tyr^{701}$)、p-STAT3($Tyr^{705}$)抗体及其同型IgG(Isotype)购自DB公司。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT比色实验 取对数生长期细胞制成$5.0\times10^7$/L细胞悬液,接种于96孔板,每孔100 μL,培养24 h后,加入含舒尼替尼的培养液100 μL,使终浓度分别为1.25、2.5、5、10、20 μmol/L,设对照组和调零孔,每组5个复孔。继续培养24、48、72 h后,每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μL,再培养4 h后充分溶解结晶,置酶标仪上测各孔光密度值计算生长抑制率,抑制率=(1-用药组平均光密度值/对照组平均光密度值)×100%,按作图法求出不同处理时间的$IC_{50}$。

1.2.2 形态学观察 将$3\times10^5$细胞接种于60 mm培养皿中,贴壁后分别用含终浓度0、1、2、4 μmol/L舒尼替尼的培养液处理24、48、72 h,倒置显微镜观察细胞在不同培养时间的生长状况。$2\times10^5$细胞接种于预置盖玻片的6孔板中,爬片成功后加入含终浓度0、1、2、4 μmol/L舒尼替尼培养液,培养不同时间后,Wright-Giemsa染色,光镜观察。

1.2.3 细胞凋亡的检测 用浓度为1 μmol/L的舒尼替尼分别处理PCI-13细胞24、48、72 h。并且分别用0、1、2 μmol/L的舒尼替尼处理细胞24 h。获取细胞后,Annexin-V-FITC和PI双标记活细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 STAT1和STAT3磷酸化水平的检测 将$3\times10^5$细胞接种于60 mm培养皿中,细胞贴壁后,血清饥饿48 h。加入含舒尼替尼终浓度为1、2、4 μmol/L的AIM-V培养液,以培养液中加入终浓度0.1% DMSO作为阴性对照,继续培养2、8、16 h和24 h。以50 U/mL的干扰素-γ(interferon-γ,IFN-γ)处理15 min作为p-STAT1的阳性对照,以50 ng/mL的白介素-6(interleukin-6,IL-6)处理15 min作为p-STAT3的阳性对照。获取细胞后,经破壁,透明,固定,分别用p-STAT1、p-STAT3及Isotype染色,上机进行流式细胞检测。

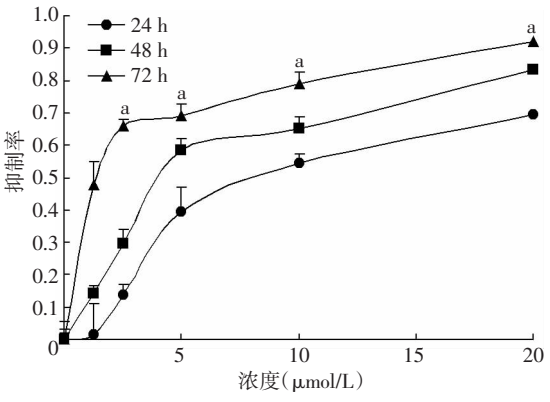
### 1.3 统计学处理

以上实验均重复3遍,使用SPSS 10.0统计学软件进行处理。生长抑制率采用双因素方差分析,凋亡率、p-STAT1、p-STAT3采用单因素方差分析。以$P<0.05$为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 舒尼替尼对PCI-13细胞增殖的影响

MTT显示舒尼替尼可明显抑制PCI-13细胞的增殖,其最高抑制率可达92%。24、48、72 h的$IC_{50}$分别是6.78、3.10、1.26 μmol/L(图1)。各浓度用药组不同处理时间之间生长抑制率有显著差异($P<0.05$)。抑制率呈时间-浓度依赖性。




a:$P<0.05$,与对照组(0 μmol/L)比较

**图1 MTT法检测不同浓度舒尼替尼处理PCI-13细胞增殖的影响**

### 2.2 舒尼替尼处理后PCI-13细胞形态学变化

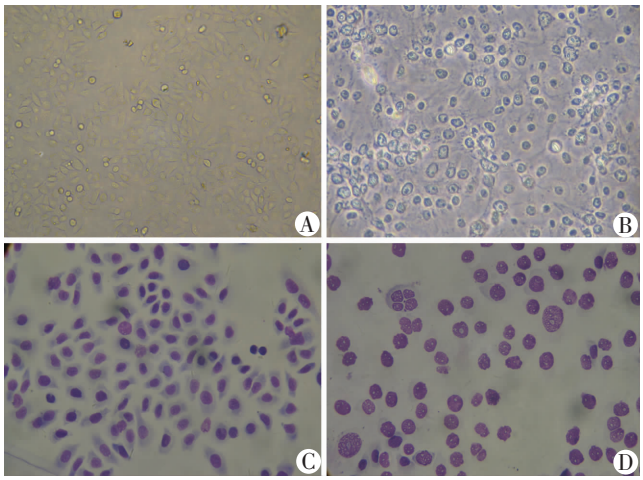
倒置显微镜下,对照组细胞贴壁生长,扁平多角形,胞质饱满,近中央处有圆形的细胞核,呈"铺路石"状生长,生长迅速(图2A);用药组细胞生长明显减慢,贴壁细胞由多角形变为圆形,体积变小,连接松解,且核颜色加深(图2B)。

Wright-Giemsa染色后,对照组细胞核质比高,呈多个核仁(图2C);用药组胞质浓缩,核质比降低,核仁减少或消失,出现染色质沿核膜内侧排列的核边集现象,可见核碎裂现象(图2D)。

### 2.3 舒尼替尼对PCI-13细胞凋亡的影响

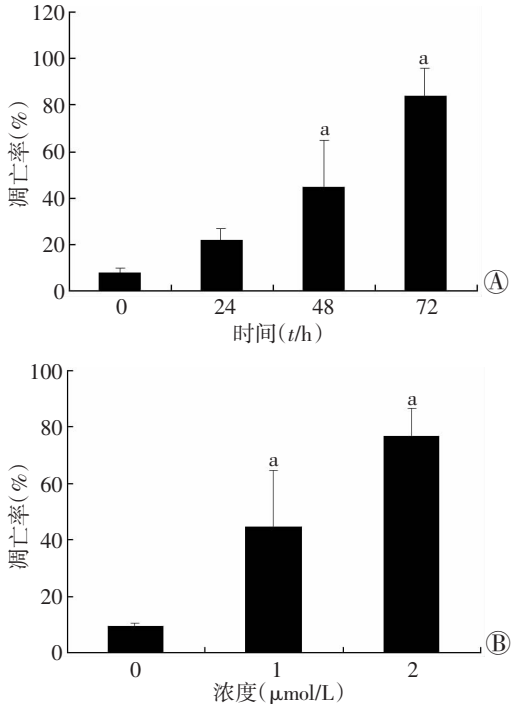
对照组细胞也有自发凋亡,但凋亡率很低;用药组细胞明

显凋亡，凋亡率随处理时间延长和药物浓度增加而上升，药物浓度达到 1 μmol/L 以及处理时间达到 48 h，细胞凋亡明显增加。经统计分析，各时间组和各浓度组之间有统计学差异（$P<0.05$，图 3）。




A：对照组（倒置显微镜）；B：1 μmol/L 舒尼替尼处理 24 h（倒置显微镜）；C：对照组（Wright-Giemsa）；D：1 μmol/L 舒尼替尼处理 24 h（Wright-Giemsa）

**图 2　舒尼替尼处理后 PCI-13 细胞形态学变化**　（×200）




A：1 μmol/L 舒尼替尼处理 24、48、72 h　a：$P<0.05$，与 0 h 比较；B：0、1、2 μmol/L 舒尼替尼处理 24 h　a：$P<0.05$，与 0 μmol/L 舒尼替尼比较

**图 3　舒尼替尼诱导 PCI-13 细胞凋亡情况**

### 2.4　舒尼替尼对 STAT1 和 STAT3 磷酸化水平的影响

经过 1、2、4 μmol/L 的舒尼替尼处理 2、8、16、24 h 后，各用药组中 p-STAT1 阳性细胞百分率与对照组相比，无明显变化（表 1）；而 p-STAT3 阳性细胞百分率与对照组相比明显降低，并且随着浓度增高，阳性细胞显著下降（$P<0.05$，表 2）。

**表 1　不同浓度舒尼替尼处理不同时间对 PCI-13 细胞 p-STAT1 表达的影响**（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

| 时间 | 0 μmol/L | 1 μmol/L | 2 μmol/L | 4 μmol/L |
|---|---|---|---|---|
| 2 h | 6.9±0.8 | 6.6±1.2 | 5.8±2.1 | 5.5±1.0 |
| 8 h | 6.8±0.8 | 6.4±0.6 | 6.0±1.2 | 5.8±0.8 |
| 16 h | 6.9±0.1 | 6.5±0.7 | 5.1±1.0 | 6.0±0.9 |
| 24 h | 7.5±1.1 | 6.8±0.8 | 6.3±0.4 | 5.6±1.0 |

**表 2　不同浓度舒尼替尼处理不同时间对 PCI-13 细胞 p-STAT3 表达的影响**（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

| 时间 | 0 μmol/L | 1 μmol/L | 2 μmol/L | 4 μmol/L |
|---|---|---|---|---|
| 2 h | 21.0±2.4 | 14.5±1.2[a] | 8.3±1.1[b] | 6.4±1.9[a] |
| 8 h | 19.7±3.7 | 14.2±1.3[a] | 10.1±1.0[a] | 7.1±1.8[a] |
| 16 h | 21.2±2.5 | 13.8±2.2[a] | 8.1±1.8[a] | 6.8±1.9[a] |
| 24 h | 22.1±2.9 | 14.7±3.0[a] | 10.1±1.2[a] | 7.1±2.0[a] |

a：$P<0.05$，与对照组（0 μmol/L）比较

## 3　讨论

舒尼替尼的抗肿瘤作用主要依赖于其强大的抗血管生成作用。体外实验显示，舒尼替尼能够抑制 VEGF 诱导的人类内皮细胞有丝分裂，阻止上皮细胞的迁移，抑制其形成毛细血管样脉管。体内实验中，舒尼替尼治疗可以减少肿瘤微血管密度，抑制新生血管形成，预防肿瘤转移[6-8]。但是，在接受舒尼替尼治疗的胃肠间质瘤患者切片中发现，肿瘤反应明显以细胞坏死为主，而不是肿瘤脉管系统的减少[9]，提示舒尼替尼可能还有其他潜在的作用机制。本研究显示，舒尼替尼可以抑制头颈癌细胞 PCI-13 的增殖，最高抑制率可达 92%，抑制率呈时间-浓度依赖性。形态学观察可见，经舒尼替尼作用后，PCI-13 细胞出现染色质沿核膜内侧排列、核边集及核碎裂等凋亡征象。在实验过程中，未见到大片脱壁、肿胀漂浮的死细胞，表明舒尼替尼抗肿瘤不是以细胞毒作用为主，而是诱导肿瘤细胞凋亡。流式细胞术也证明了这一点：经过 1 μmol/L 舒尼替尼处理，PCI-13 细胞凋亡率随处理时间延长而明显上升。处理 24 h 后，细胞凋亡率随药物浓度的升高而增高。本研究数据证实舒尼替尼能够不依赖于抗血管生成作用，直接诱导 PCI-13 细胞的凋亡。但是，有必要进一步在细胞和分子水平了解舒尼替尼诱导头颈癌细胞凋亡的作用机制，以寻找新的治

疗的靶点。

由于舒尼替尼能够抑制多种生长因子,我们猜测舒尼替尼可能通过抑制 VEGFR 和 PDGFR 下游的 STAT3 信号通路,从而诱导头颈癌细胞凋亡。STAT 蛋白家族包括 7 个成员,分别由不同的基因编码,它们是 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT6 和非常接近的 STAT5A 和 STAT5B[10]。其中 STAT3 是其家族中最活跃的成员之一,是 VEGFR、IL-6/JAK、Scr 等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道的汇聚的焦点。STAT3 无论在恶变的初期还是癌症过程中,均能选择性的诱导和保护促进癌症形成的炎症微环境。其在肿瘤中的作用包括:抑制肿瘤凋亡,促进肿瘤细胞增殖,促进血管形成和转移[11]。STAT3 在 Tyr705 端的磷酸化导致其激活,从而行使其功能。在正常细胞中,STAT3 的激活是一个瞬时过程,持续数分钟到数小时。而在癌细胞中,生长因子失调,STAT3 则出现持续激活[12]。在头颈癌中,STAT3 的激活是鳞状细胞癌发生的早期事件,并在头颈癌的发生、发展中起重要作用[4-5,12]。理论上如果能够拮抗 STAT3 信号通路就可以引发其编码的相关基因"级联式"组合阻断,从而抑制肿瘤的增殖。本实验结果显示,舒尼替尼可以下调 PCI-13 中 STAT3 的磷酸化水平,从而减弱 STAT3 的上述促肿瘤生长作用。激活的 STAT3 可通过调节其下游的 Bax 和 $Bcl_{XL}$ 蛋白来抑制肿瘤凋亡[5],舒尼替尼能否通过抑制 STAT3 调节 Bcl-2 家族蛋白的表达,从而引起头颈癌细胞凋亡,值得进一步研究。

另外,STAT1 在癌症中的作用尚不明确,除了潜在的肿瘤抑制作用,还有调节凋亡的作用。STAT1 能够与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)受体复合物结合,抑制核因子 κB,并能够通过蛋白-蛋白反应与 P53 结合[13]。STAT1 的过表达可提高头颈癌的化疗敏感[14],而 STAT1 缺乏细胞可以抵抗 TNF-α 诱导的凋亡。STAT1 抑制肿瘤的作用可能只限于肿瘤发生阶段,而不是进展阶段[12]。本研究结果显示,舒尼替尼处理并未增加 STAT1 的磷酸化,提示其抗肿瘤作用可能不是通过 STAT1 调节的。

**参考文献:**

[1] Xin H, Zhang G, Herrmann A, *et al*. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2506-2513.

[2] Yang F, Jove V, Xin H, *et al*. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(1): 35-45.

[3] Leibowitz M S, Andrade-Filho P A, Ferrone S, *et al*. Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes[J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(4): 525-535.

[4] Grandis J R, Drenning S D, Chakraborty A, *et al*. 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.

[5] Kijima T, Niwa H, Steinman R A, *et al*. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth *in vivo*[J]. Cell Growth Differ, 2002, 13(8): 355-362.

[6] Faivre S, Demetri G, Sargent W, *et al*. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(9): 734-745.

[7] Chow L Q, Eckhardt S G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(7): 884-896.

[8] Mendel D B, Laird A D, Xin X, *et al*. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 327-337.

[9] Seandel M, Shia J, Linkov I, *et al*. The activity of sunitinib against gastrointestinal stromal tumor seems to be distinct from its antiangiogenic effects[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6203-6204.

[10] Zhong Z, Wen Z, Darnell J E Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6[J]. Science, 1994, 264(5115): 95-98.

[11] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(1): 41-51.

[12] Nagpal J K, Mishra R, Das B R. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis[J]. Cancer, 2002, 94(9): 2393-2400.

[13] Lui V W, Boehm A L, Koppikar P, *et al*. Antiproliferative mechanisms of a transcription factor decoy targeting signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: the role of STAT1[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(5): 1435-1443.

[14] Xi S, Dyer K F, Kimak M, *et al*. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(3): 181-189.

(**收稿**:2013-06-21;**修回**:2013-09-18)

(编辑 张 维)