

STAT3 抑制剂 WP1066 对乏氧人脑胶质瘤细胞 U251 放射敏感性的影响

袁小鹏 曾楚楚 邢丽华 赵晓骏 顾成 俞家华 刘芬菊

(苏州大学医学部放射医学与防护学院 苏州 215123)

摘要 采用 CoCl_2 处理 U251 细胞模拟细胞乏氧, 用甲基四唑蓝(MTT)法检测 U251 细胞活力的改变; RT-PCR 和 Western blot 检测 HIF-1 α 在 U251 细胞中的 mRNA 和蛋白水平的表达; 克隆形成法检测 X 射线照射下不同处理组的克隆形成率。结果表明, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理及 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 与 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WP1066 联合处理 U251 细胞 24 h 无明显细胞毒性作用($p>0.05$); CoCl_2 诱导 HIF-1 α 的 mRNA 及蛋白表达水平上调, WP1066 抑制 HIF-1 α 在蛋白水平的表达; 与空白对照组相比, CoCl_2 组的克隆形成能力明显上调($p<0.05$), CoCl_2 与 WP1066 联合处理组克隆形成能力明显下降($p<0.05$)。WP1066 可增加乏氧 U251 细胞放射敏感性, 其机制可能是通过抑制 STAT3 通路降低 HIF-1 α 的表达而发挥放射增敏作用。

关键词 氯化钴, WP1066, HIF-1 α , STAT3, 脑胶质瘤细胞, 放射敏感性

中图分类号 R811.5, R739.41, R730.5

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 其生长方式呈浸润性, 手术难以完全切除干净, 易发生病灶残留, 从而引起术后复发, 影响患者预后。目前, 放疗是脑胶质瘤术后最重要的治疗手段, 但是, 脑胶质瘤放射敏感性存在很大差异, 放疗疗效并不理想, 主要以术后联合放化疗为主^[1-2]。肿瘤在不断生长侵袭的过程之中常处于乏氧状态。目前大量实验表明肿瘤中微环境的变化, 尤其是肿瘤组织的乏氧状态是导致肿瘤异形性增加、易发生浸润和远处转移, 及对放、化疗不敏感的一个重要原因。乏氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是调节肿瘤细胞乏氧反应的主要转录因子。已有的研究表明 HIF-1 α 可以通过调节肿瘤细胞凋亡、代谢、增殖和肿瘤血管生成等途径影响肿瘤细胞放射敏感性^[3-5]。放射敏感性的影响因素及其机制研究以及增敏剂的研究开发已成为放射肿瘤学的研究热点之一。

信号转导和转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是信号转导和转录激活因子家族的重要成员之一, 介导多种细胞

因子和生长因子信号向细胞核转导, 影响靶基因的转录。大量研究已证明 STAT3 的持续激活、表达水平升高与许多恶性肿瘤的发生、发展、预后相关, 抑制 STAT3 通路可以控制肿瘤发展、提高疗效^[6-7]。因此, STAT3 作为一个潜在的治疗靶点受到了广泛的关注^[8-9]。

WP1066 是一种新颖的且具有细胞渗透性的 STAT3 抑制剂 AG 490 的衍生物, 能够通过抑制 STAT3 的磷酸化来阻断 STAT3 信号通路。与 AG 490 相比, WP1066 还可以抑制 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 磷酸化, 还下调 JAK2 蛋白的表达, 从而阻止下游 STAT3 和 PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K) 通路的激活, 从而影响肿瘤的发生、发展以及预后。在体内外实验研究表明, WP1066 能够抑制脑胶质瘤细胞的增殖、促进细胞凋亡的发生^[10-11]。乏氧是引起肿瘤细胞辐射抵抗的重要原因, 本研究采用 CoCl_2 处理人脑胶质瘤 U251 细胞模拟肿瘤细胞乏氧状态, 探讨 STAT3 抑制剂 WP1066 对其放射敏感性的影响及可能的作用机制。

基金资助: 国家自然科学基金(31270897、81271682)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)和 2012 年苏州大学大学生创新性实验计划项目(2012xj068)资助

第一作者: 袁小鹏, 男, 1987 年 8 月出生, 2011 年毕业于苏州大学医学部放射医学专业, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读硕士研究生, E-mail: xiaopeng198708@aliyun.com

通讯作者: 刘芬菊, 硕士, 教授, E-mail: fangsh@suda.edu.cn; 俞家华, 博士, 副教授, E-mail: alfredyu2006@hotmail.com

收稿日期: 初稿 2013-09-29, 修回 2013-11-20

1 材料与方法

1.1 材料

人脑胶质瘤 U251 细胞由本实验室留存; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich 公司)用高温灭菌单蒸水配成浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 室温避光保存; WP1066(Selleck Chemicals 公司), 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配成浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, -20°C 冰箱保存; DMEM 培养基与胎牛血清购自 Hyclone 公司; RNAiso 和 RNA 逆转录试剂盒购自 Takara 公司; HIF-1 α 、 β -actin 引物由上海生工合成; 兔抗人 HIF-1 α 抗体、鼠抗人 actin 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; MTT、PCR kit、二抗、超敏 ECL 化学发光试剂盒、结晶紫购自碧云天公司; DMSO 为国产分析纯。

1.2 细胞培养

用含 10%胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养, 每 2–3 d 传代 1 次。

1.3 细胞照射

细胞辐照由苏州大学放射医学与防护学院提供的剂量率为 $1.165 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 的 X 线机(美国 RADSOURCE 公司 RS2000PRO 型)照射。

1.4 细胞的生长抑制

取指数生长期的细胞用 0.25%胰酶消化, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 配成 10^5 mL^{-1} 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板, 细胞悬液 $100 \mu\text{L}$, 每孔再加入 $100 \mu\text{L}$ DMEM 完全培养基, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h, 分别给予 CoCl_2 , 浓度分别为 0、50、100、150 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 24 h 后加入 MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h 后吸出培养液, 加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO 振荡溶解 10 min, 酶联免疫检测仪于波长 570/630 nm 处测吸光度 A 值。给予细胞 CoCl_2 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 WP1066 0、0.25、0.5、1 和 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 24 h, 采用相同方法测定吸光度值。

1.5 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 CoCl_2 对 HIF-1 α mRNA 水平的影响

取指数生长期细胞, 制备 10^5 mL^{-1} 细胞悬液接种于 6 孔板, 24 h 后给予分别为 0、50、100 和

$200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理, 24 h 后按 RNAiso 说明书提取总 RNA, 取 500 ng 总 RNA 按照 RT-PCR 试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模板进行 PCR。PCR 条件为: 94°C 预变 3 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 循环数 30。引物序列: HIF-1 α for: 5'-CTTCTGGATGCTGGTGATTG-3', rev: 5'-ACGTGAATGTGGCCTGTG-3', 产物大小 389 bp。内参基因采用 β -actin, for: 5'-AAATCGTGCGTGACATTAA-3', rev: 5'-CTCCTCATACTCCTGCTFG-3', 产物大小 474bp。PCR 产物以 1.5%琼脂糖胶电泳, 紫外图像分析仪摄像。

1.6 克隆形成实验

取指数生长期的细胞, 用 0.25%的胰酶消化, 配制细胞悬液, 在 0、2、4、6 和 8 Gy 组分别接种 1000 个/孔、2000 个/孔、2000 个/孔、5000 个/孔、10000 个/孔于 60 mm 培养皿内, 每个剂量点设 3 个平行样本, 待细胞贴壁 24 h 后予 CoCl_2 、WP1066 及同时处理, 24 h 后换液分别予 0、2、4、6 和 8 Gy X 射线剂量照射。置于 37°C 、含 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养 12–14 d。用 PBS 清洗培养皿两遍, 用甲醇固定 15 min, 用 1%的结晶紫乙醇溶液染色 30 min, 自来水充分冲洗后晾干。计数大于 50 个细胞的集落数, 绘制存活曲线并计算相关参数。结果分析: 细胞存活分数(Survival fraction, f_s , %)按下式计算: $f_s = (S_x / S_0) \times 100\%$ 式中, S_x 为受照细胞克隆形成率, S_0 为对照细胞克隆形成率。细胞克隆形成率 = 克隆形成数 / 接种细胞数。采取“多靶单击”模型, 用 Sigmaplot 10.0 拟合细胞存活曲线, 并计算 D_0 、 D_q 和 SF2 值。

1.7 Western blot 法检测 HIF-1 α 表达

取指数生长期的细胞, 用 0.25%的胰酶消化, 配制 10^5 mL^{-1} 细胞悬液, 接种于 60 mm 培养皿内, 贴壁 24 h 后分别予 CoCl_2 、WP1066、X 射线和 CoCl_2 + X 射线处理细胞(图 5), WP1066 按不同浓度处理细胞(图 6), Control、WP1066、 CoCl_2 、 CoCl_2 + WP1066 (0.25 、 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞, 24 h 后用单去污剂裂解法提取总蛋白, 总蛋白用 Bradford 定量后, 每个样品取 $30 \mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 通过半干式转移电泳槽将凝胶中的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上, 转膜结束后, 将 PVDF 膜在

5%脱脂奶粉-TBST 中室温下封闭 2 h, 用 HIF-1 α 单克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜, 二抗室温孵育 1 h, 洗膜, 化学发光仪进行图像采集。

1.8 统计学处理

实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 使用 SAS 软件进行统计分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoCl_2 处理 U251 细胞模拟乏氧状态

不同浓度的 CoCl_2 处理 U251 细胞 24 h 后, 用 MTT 法测定细胞活力, 结果表明在 0–200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内 CoCl_2 对 U251 的细胞活力抑制作用没有统计学差异 (见图 1)。之后采用 RT-PCR 法观察 HIF-1 α 在 mRNA 水平表达的变化, 结果提示 CoCl_2 处理对 U251 细胞的 HIF-1 α 的 mRNA 有明显的诱导作用, 并且在 0–100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有剂量依赖作用, 随 CoCl_2 浓度继续增大, HIF-1 α 表达上调不明显 (见图 2), 结合 MTT 的实验结果, 选择 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 作为诱导细胞乏氧的作用浓度。

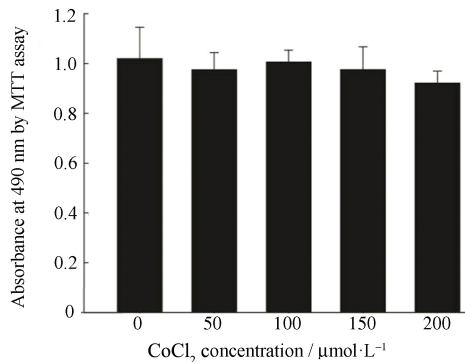


图 1 MTT 检测 CoCl_2 处理 U251 细胞的细胞活力
Fig.1 Viability of U251 cells inhibited by CoCl_2

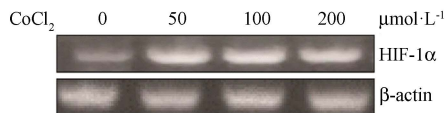


图 2 RT-PCR 检测不同浓度 CoCl_2 处理条件下 U251 细胞内的 HIF-1 α 的表达

Fig.2 Expression of HIF-1 α in U251 cells treated with different concentrations of CoCl_2

2.2 WP1066 处理对乏氧 U251 细胞活力的抑制作用

在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CoCl_2 模拟乏氧环境下, 分别予 0、0.25、0.5、1、2 和 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 WP1066

处理 U251 细胞 24 h, 实验结果表明: WP1066 浓度大于 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对乏氧 U251 细胞活力抑制作用明显 (见图 3), 因此在后续的实验中选用小于 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 WP1066 浓度来研究对 U251 细胞放射敏感性的影响, 以防止 WP1066 本身产生的细胞毒性作用。

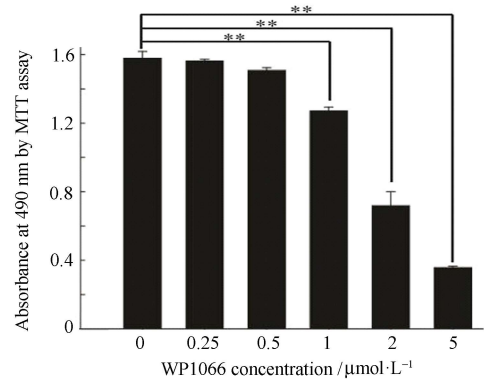


图 3 MTT 检测 CoCl_2 联合不同浓度 WP1066 处理条件下 U251 的细胞活力 (**与对照组相比, $p < 0.01$, $n = 3$)

Fig.3 Viability of U251 cells treated by CoCl_2 together with different concentrations of WP1066 (**compared with control group, $p < 0.01$, $n = 3$)

2.3 WP1066 处理对乏氧 U251 细胞克隆形成能力的影响

用克隆形成实验检测 U251 细胞克隆形成能力的影响, 设空白对照组、0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WP1066 组、 CoCl_2 组、 CoCl_2 + 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WP1066 组和 CoCl_2 + 0.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WP1066 组, 各组分别予 X 射线 0、2、4、6 和 8 Gy 剂量照射。使用“多靶单击模型”拟合细胞存活曲线, 得出的 D_0 、 D_q 值 (见表 1、2)。以 D_0 、 D_q 值和 2 Gy 的存活分数 (SF2) 为标准计算放射增敏比。实验结果显示: 单纯 CoCl_2 处理组较空白对照组克隆形成能力上调, D_0 、 D_q 和 SF2 均高于对照组 ($p < 0.05$) (见图 4 及表 1)。单纯 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WP1066 组与对照组相比, 克隆形成能力无明显差异 ($p > 0.05$), D_0 、 D_q 和 SF2 无明显变化; 而单纯 WP1066 组及 0.25、0.50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WP1066 + CoCl_2 联合处理组较 CoCl_2 单纯处理组克隆形成能力下调 ($p < 0.05$), D_0 、 D_q 和 SF2 均较 CoCl_2 组降低, 提示 CoCl_2 可降低 U251 细胞的放射敏感性, 而 WP1066 可逆转 CoCl_2 模拟乏氧条件下的 U251 细胞的放射抗性 (见图 4)。与对照组相比, CoCl_2 增加 U251 细胞克隆形成能力, 单纯 WP1066 组克隆形成能力无明显差异; 与 CoCl_2 组比, WP1066 可降低 CoCl_2 模拟乏氧环境下的 U251 细胞克隆形成能力。 CoCl_2

组($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理 24 h)、单纯 WP1066 组 ($0.50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 24 h)、 CoCl_2 +WP1066 组 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 与 0.25 、 $0.50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WP1066 处理 24 h)。

表 1 CoCl_2 , WP1066 对 U251 细胞放射敏感性的影响
Table 1 Effects of CoCl_2 and WP1066 on radiosensitivity of U251 cell

分组 Group	D_0 / Gy	D_q / Gy	SF2 / %	SER $_{D_0}$	SER $_{D_q}$	SER $_{\text{SF2}}$
对照 Control	2.62	0.20	0.52	—	—	—
WP1066	2.51	0.25	0.53	1.04	1.25	0.98
CoCl_2	4.21	0.58	0.67	0.67	0.34	0.77

表 2 WP1066 对 CoCl_2 模拟乏氧条件下 U251 细胞放射敏感性的影响
Table 2 Effects of WP1066 on radiosensitivity of U251 cell under hypoxia conditions

分组 Group	D_0 / Gy	D_q / Gy	SF2 / %	SER $_{D_0}$	SER $_{D_q}$	SER $_{\text{SF2}}$
CoCl_2	4.21	0.58	0.67	—	—	—
CoCl_2 + $0.25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WP1066	3.05	0.65	0.60	1.38	1.12	1.13
CoCl_2 + $0.50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WP1066	1.91	1.08	0.53	2.21	1.87	1.26

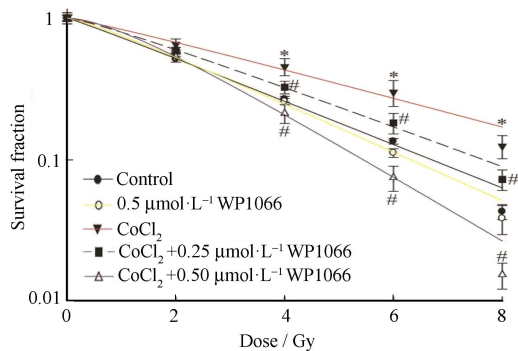


图 4 U251 细胞在不同剂量 X 射线下的克隆形成能力
Fig.4 Clonogenic survival fraction of U251 cells at different doses of X-rays (* $p<0.05$, compared with control group, # $p<0.05$, compared with CoCl_2 group, $n=3$)

2.4 WP1066 处理对常氧 U251 细胞内磷酸化 STAT3(p-STAT3)和 STAT3 蛋白水平的影响

用 western blot 方法检测 STAT3 抑制剂 WP1066 对常氧状态下 U251 细胞内的 p-STAT3、STAT3 蛋白水平的影响。结果显示, WP1066 对 p-STAT3 蛋白有明显的抑制作用, 并在 $0-0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内剂量依赖作用, 随 WP1066 剂量变大, p-STAT3 蛋白被抑制的越明显 (见图 5)。

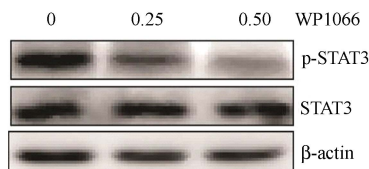


图 5 不同浓度 WP1066 条件下 U251 细胞的 p-STAT3、STAT3 的蛋白表达

Fig.5 Expression of p-STAT3, STAT3 protein in U251 cells treated by different concentrations of WP1066

2.5 U251 细胞中 HIF-1α 蛋白水平的变化

CoCl_2 能够模拟细胞缺氧的状态, 从而引起细胞放射敏感性的下降, 而 WP1066 处理能够逆转这种效应, 细胞内 HIF-1α 蛋白水平的改变可能起到关键的作用。Western blot 结果显示: 与空白对照组相比, 单独 WP1066 组, 无明显差异, CoCl_2 处理组及 CoCl_2 联合照射组 U251 细胞内 HIF-1α 蛋白表达水平明显上调 (见图 6); 而 CoCl_2 联合 WP1066 $0.25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $0.50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组与 CoCl_2 单纯处理组相比, HIF-1α 的表达水平明显下降, 并且这种抑制效果与 WP1066 的浓度呈剂量依赖 (见图 7)。

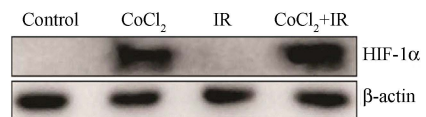


图 6 U251 细胞内的 HIF-1α 蛋白表达(control 组、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 组、照射组和 CoCl_2 联合照射组)
Fig.6 Expression of HIF-1α protein in U251 cells treated by CoCl_2 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), IR (irradiation, 4 Gy), CoCl_2 and IR

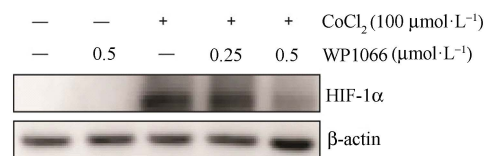


图 7 乏氧条件不同浓度 WP1066 处理 U251 细胞内的 HIF-1α 蛋白表达

Fig.7 Expression of HIF-1α protein in U251 cells treated by different concentrations of WP1066 under hypoxia conditions

3 讨论

脑胶质瘤等多种实体肿瘤常供血不足, 乏氧细

胞比例高。肿瘤乏氧的微环境是肿瘤治疗效果差、易产生放化疗耐受性的重要原因。HIF-1 α 是在乏氧条件下激活的一种核转录因子,是肿瘤乏氧微环境中的一个至关重要的调节因子。本研究发现 CoCl₂ 处理使脑胶质瘤 U251 细胞 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白水平表达显著增加,引起放射敏感性下降。乏氧、放射治疗可以引起 HIF-1 α 的高表达,引起放射敏感性的下降,通过 siRNA、micro-RNA 抑制 HIF-1 α 的表达可以提高肿瘤细胞的放射敏感性^{[7-8][12]}。

STAT3 是信号转导和转录激活因子(STATs)的重要成员,分布广泛,在多种人类实体肿瘤中成高水平的激活状态,与肿瘤细胞抗凋亡、增殖和血管生成密切相关^[6-7]。STAT3 的表达可以调控参与多种异常的肿瘤信号途径:如细胞周期控制基因 c-fos、c-myc、cyclin D1 的表达,抗凋亡基因 Bcl-xl、Bcl-2 的表达等,从而诱导肿瘤细胞增殖、阻断细胞凋亡^[8-9]。WP1066 为 STAT3 抑制剂,许多研究表明 WP1066 可通过降低 STAT3 磷酸化水平而发挥抗肿瘤的作用^[13-14]。STAT3 的激活与放化疗的抵抗有关,通过其转录因子 NF- κ B、HIF-1 α 及过氧化物增殖体激活 γ 受体行使效应^[15]。因此,通过抑制 p-STAT3 有可能为治疗肿瘤提供一个新的方法,本研究结果表明 WP1066 作用于乏氧脑胶质瘤细胞后,其辐射抗性明显下降,提示 WP1066 可以在体外增强乏氧脑胶质瘤细胞的放射敏感性。Ferrajoli 等^[16]在体外实验模型中证明 WP1066 能增强急性骨髓性白血病细胞的化疗敏感性,WP1066 可以抑制 JAK2 蛋白降解,阻断 STAT3/PI3K 途径,促进 caspase 凋亡通路的激活。在体内实验模型中,WP1066 对小鼠胰腺癌、肾癌、脑胶质瘤以及黑色素瘤都显示出明显抑制肿瘤的生长^[11, 13-14, 17]。

本实验数据表明,WP1066 可以降低 CoCl₂ 所诱导脑胶质瘤 U251 细胞 HIF-1 α 的表达,并对 WP1066 有剂量依赖作用,同时细胞的活力没有受到明显的影响。WP1066 逆转乏氧胶质瘤细胞的辐射抗性可能与其抑制 HIF-1 α 的表达有关。STAT3 和 HIF-1 α 在许多肿瘤中表达上调。大量研究证明,STAT3 在生长信号导致的 HIF-1 α 表达中是必须的。Xu 等在研究中发现,STAT3 能够调节 Akt 的表达,从而上调生长因子诱导的 HIF-1 α 的高表达。实验研究中以小分子抑制剂作用于 STAT3 实现了阻断 HIF-1 α 的表达^[13,18]。Jung 等进一步阐明了,STAT3 可以通过与 HIF-1 α 的 C 末端结构的竞争性结合作

用,从而改变 HIF-1 α 的结构域,切断其与 VHL 肿瘤抑制蛋白(von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL)的结合而抑制 pVHL 介导的泛素-蛋白酶解作用,导致 HIF-1 α 累积,证实了 STAT3 可以增强 HIF-1 α 的功能^[19]。另有体内、外实验研究表明,通过抑制 STAT3 的表达,从而降低 HIF-1 α 的表达,抑制头颈鳞状细胞癌以及裸鼠体内头颈鳞状细胞癌的生长,增强其放射敏感性^[20-21]。

增强乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性是提高肿瘤放疗疗效的重要途径,体外数据表明抑制 STAT3 通路有可能成为逆转乏氧脑胶质瘤细胞辐射抗性的有效方法,并与降低乏氧重要的信号分子 HIF-1 α 的表达有关。在体内环境中 STAT3 通路的抑制剂能否发挥辐射增敏作用还需进一步的实验研究。

参考文献

- 1 Nieder C, Mehta M P, Jalali R. Combined radio- and chemotherapy of brain tumours in adult patients [J]. *Clinical Oncology*, 2009, **21**(7): 515-24.
- 2 Westphal M, Ylä-Herttuala S, Martin J, *et al*. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *The Lancet Oncology*, 2013, **14**(9): 823-833.
- 3 Moeller B J, Dewhirst M W. HIF-1 and tumour radio-sensitivity [J]. *British Journal of Cancer*, 2006, **95**(1): 1-5.
- 4 Rohwer N, Zasada C, Kempa S, *et al*. The growing complexity of HIF-1 α 's role in tumorigenesis: DNA repair and beyond [J]. *Oncogene*, 2013, **32**(31): 3569- 3576.
- 5 Haar CP, Hebbar P, Wallace G C 4th, *et al*. Drug resistance in glioblastoma: a mini review [J]. *Neurochemical Research*, 2012, **37**(6): 1192-200.
- 6 Bu X, Zhao C, Wang W, *et al*. GRIM-19 inhibits the STAT3 signaling pathway and sensitizes gastric cancer cells to radiation [J]. *Gene*, 2013, **512**(2): 198-205.
- 7 Sen M, Thomas S M, Kim S, *et al*. First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy [J]. *Cancer Discovery*, 2012, **2**(8): 694-705.
- 8 Weerasinghe P, Garcia G E, Zhu Q, *et al*. Inhibition of Stat3 activation and tumor growth suppression of non-small cell lung cancer by G-quartet oligonucleotides [J]. *International Journal of Oncology*, 2007, **31**(1): 129- 136.
- 9 Groner B, Lucks P, Borghouts C. The function of Stat3 in

- tumor cells and their microenvironment [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2008, **19**(4): 341-350.
- 10 Hussain S F, Kong L Y, Jordan J, *et al.* A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients [J]. *Cancer research*, 2007, **67**(20): 9630- 9636.
- 11 Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, *et al.* A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo [J]. *Oncogene*, 2007, **26**(17): 2435-44.
- 12 Yang W, Sun T, Cao J, *et al.* Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro [J]. *Experimental Cell Research*, 2012, **318**(8): 944-954.
- 13 Horiguchi A, Asano T, Kuroda K, *et al.* STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for renal cell carcinoma [J]. *British Journal of Cancer*, 2010, **102**(11): 1592-1599.
- 14 Hatiboglu M A, Kong L Y, Wei J, *et al.* The tumor microenvironment expression of p-STAT3 influences the efficacy of cyclophosphamide with WP1066 in murine melanoma models [J]. *International Journal of Oncology*, 2012, **131**(1): 8-17.
- 15 Aggarwal B B, Kunnumakkara A B, Harikumar K B, *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship [J]? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, **1171**: 59-76.
- 16 Ferrajoli A, Faderl S, Van Q, *et al.* WP1066 disrupts Janus kinase-2 and induces caspase-dependent apoptosis in acute myelogenous leukemia cells [J]. *Cancer Research*, 2007, **67**(23): 11291-11299.
- 17 Rahaman S O, Harbor P C, Chernova O, *et al.* Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells [J]. *Oncogene*, 2002, **21**(55): 8404-8413.
- 18 Xu Q, Briggs J, Park S, *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2005, **24**(36): 5552-5560.
- 19 Jung J E, Kim H S, Lee C S, *et al.* STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2008, **40**(5): 479-485.
- 20 Adachi M, Cui C, Dodge C T, *et al.* Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncology*, 2012, **48**(12): 1220-1226.
- 21 Pan Y, Zhou F, Zhang R, *et al.* Stat3 inhibitor Stattic exhibits potent antitumor activity and induces chemo- and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e54565.

Effects of WP1066 on radiosensitivity of U251 glioma cells under hypoxia conditions

YUAN Xiaopeng ZENG Chuchu XING Lihua ZHAO Xiaojun GU Cheng YU Jiahua LIU Fenju

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the effects of WP1066, an STAT3 inhibitor, on the radiosensitivity of hypoxic U251 human glioma cells induced by cobalt chloride (CoCl₂), the viability of U251 cells inhibited by CoCl₂ and WP1066 was examined by MTT assay. The mRNA and protein levels of HIF-1α were accessed by RT-PCR and western blot, respectively. The radiosensitivity of U251 cells was detected by clonogenic assay. The data showed that the treatment by 100 μmol·L⁻¹ CoCl₂ and 0.5 μmol·L⁻¹ WP1066 for 24 h had no cytotoxic effects on U251 cells (*p*>0.05). CoCl₂ increased the expression of HIF-1α and clonogenic ability of U251 cells exposed to different doses of X-rays (*p*<0.05). Combined treatment by CoCl₂ together with WP1066 suppressed the expression of HIF-1α, thus decreased the clonogenic survival fractions of U251 cells. The study reveals that WP1066 could enhance the radiosensitivity of U251 glioma cells under hypoxia conditions. The mechanism might be related to the downregulation of HIF-1α expression.

KEYWORDS CoCl₂, WP1066, HIF-1α, STAT3, Glioma cells, Radiosensitivity

CLC R811.5, R739.41, R730.5