

STAT3 靶点抑制剂 Bt354 抗前列腺癌作用及其分子机制研究

王雨辰, 陈越, 季鸣, 薛妮娜, 陈晓光*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/
创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 在某些肿瘤组织中, 信号传导与活化转录因子 3 (STAT3) 信号通路处于异常激活状态。在这种情况下, 抑制 STAT3 信号通路被认为是一种潜在的肿瘤治疗方法。在体外, STAT3 靶点抑制剂 Bt354 可以抑制癌细胞的增殖; 在体内, Bt354 还抑制了 DU145 异种移植小鼠的肿瘤生长, 而不影响体重。在 Bt354 给药组中, 10、20 和 40 mg·kg⁻¹ 组的瘤重抑制率分别为 58.8%、62.7% 和 73.5%。另外, Bt354 给药组均可见 DU145 移植瘤组织中 Ki 67 阳性细胞的数量显著降低。这些研究结果表明, Bt354 可能是一种对 STAT3 激活的前列腺癌细胞有效的抗癌剂。此外, Bt354 抑制了 STAT3 的核转位, 从而诱导了 DU145 细胞的生长抑制和凋亡。动物实验中对动物的处理均遵循中国医学科学院药物研究所动物实验中心标准操作规程。

关键词: Bt354; 前列腺癌; 信号传导与活化转录因子 3; 凋亡; 抑制剂

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)10-1851-07

The antitumor activity of STAT3 target inhibitor Bt354 and molecular mechanism of anti-prostate cancer

WANG Yu-chen, CHEN Yue, JI Ming, XUE Ni-na, CHEN Xiao-guang*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was found in an abnormal constitutively active status in certain cancer tissues, and under these circumstances the interruption of STAT3 signaling pathway was proposed with the potential anti-cancer efficacy. In this study, our previous reported STAT3 inhibitor Bt354 can inhibit tumor growth in DU145 xenograft mice without affecting body weight. In groups treated with Bt354, the inhibition rate of tumor weight was 58.8%, 62.7% and 73.5% in 10, 20, 40 mg·kg⁻¹ group, respectively. Particularly, the number of Ki 67 positive cells in the tumor sections was significantly decreased in Bt354 groups. Furthermore, Bt354 inhibited the nuclear translocation of STAT3 and consequently induced cell growth inhibition, apoptosis in DU145 cells. These findings suggest that Bt354 may be a potent anticancer agent for STAT3 activated prostate cancer cells. Procedures for animal study were performed with approval of the Animal Care and Use Committee of the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College.

Key words: Bt354; prostate cancer; signal transducer and activator of transcription 3; apoptosis; inhibitor

收稿日期: 2019-08-22; 修回日期: 2019-09-02.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2017-12M-1-010).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0668

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一。在美国, 前列腺癌的发病率已经超过肺癌, 成为危害男性健康的第一位肿瘤^[1]。对于前列腺癌的治疗, 传统的治疗方案是去势治疗, 去势治疗也称为雄激素剥夺治疗, 通过阻断

雄激素和雄激素受体结合来抑制肿瘤的生长。但由于经过中位时间约为18~30个月缓解后,绝大多数患者会逐渐对激素产生非依赖性,进而发展为去势抵抗前列腺癌,目前临床上仍急需用于治疗前列腺癌的药物^[2,3]。信号传导与活化转录因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、白介素6/蛋白酪氨酸激酶(IL-6/Janus kinase, Jak)、Src等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道的交汇点,在多种肿瘤细胞和组织中都被激活,如乳腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、脑瘤、非小细胞肺癌和各种白血病等^[4],目前被认为是潜在的预防、治疗肿瘤的重要靶点^[5]。目前,对STAT3介导前列腺癌发生发展的具体作用机制尚不明确,但在前列腺癌细胞中发现有持续活化的STAT3蛋白存在^[6]。已有文献报道,前列腺癌细胞中持续活化的STAT3蛋白与细胞因子IL-6、白介素11(IL-11)的信号转导有关,并发现这一过程通过EGFR及Jak家族介导^[7,8]。

在非激素依赖性的前列腺癌中,IL-6/Jak2/STAT3信号传导通路的激活与肿瘤细胞的生长、增殖和浸润密切相关。文献报道,在应用免疫组化SP法检测29例正常前列腺组织和38例前列腺癌组织STAT3蛋白表达情况,结果显示:分化程度较低、非激素依赖型前列腺癌的STAT3表达水平较分化程度较高、对激素治疗敏感的前列腺癌明显偏高。并且随着分化程度的降低,STAT3的表达呈逐渐增强趋势^[9]。在非激素依赖性的前列腺癌细胞系PC-3、DU145中,p-STAT3表达量明显高于激素依赖性的前列腺癌细胞系LNCaP。在PC-3、DU145中,p-STAT3表达量较低的PC-3对顺铂的敏感性高于DU145,所以STAT3在非激素依赖性的前列腺癌中可能发挥着重要作用,且与顺铂的耐药机制有关^[10]。

Bt354是本课题组在北京协和医学院药物研究所样品库1566个化合物中筛选所得到的一个具有较强活性的STAT3通路小分子抑制剂。为了全面地研究Bt354对肿瘤的生长抑制作用,本课题组^[11]已发表的文章选取了多株肿瘤细胞,采用Western blot方法检测了这些肿瘤细胞中STAT3的表达丰度。结果提示,DU145细胞的STAT3表达丰度较高,MDA-MB-436细胞的表达稍低,而PC3细胞中几乎没有STAT3的蛋白表达,该结果与文献^[11]报道PC3是一株STAT3缺失的细胞一致。DU145细胞是从前列腺癌脑转移肿瘤中分离出来的,分化程度低,为雄激素非依赖的前列腺癌细胞,具有强大的转移潜能,缺乏内源性的雄激素受体的表达^[12]。本文主要进行了Bt354的体外、体内抗前列腺

癌药效学评价,并深入研究其抗肿瘤作用的分子机制,为将Bt354开发为口服治疗前列腺癌的新型靶向药物提供了基础数据支持。

材料与方法

细胞与动物 人前列腺癌细胞DU145购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,由本实验室传代并保种。所有细胞置于37℃、5%CO₂的孵箱中培养,根据细胞生长状态进行传代。Balb/c裸鼠购自北京斯贝福实验动物技术有限公司。

药物和试剂 Bt354由本所药物化学研究室许恒教授课题组提供,HPLC测定纯度≥98%,多西他赛购自深圳万乐药业有限公司,Napabucasin(BBI608)购自Selleck公司。MTT粉末购自Sigma-Aldrich公司。EdU细胞增殖检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。TUNEL试剂盒(11684795910)购自罗氏公司。

MTT检测 将对数生长期的DU145细胞用胰酶消化后配制成浓度为每毫升 2×10^4 个的细胞液,96孔板每孔接种100 μL(2000个细胞)。次日每孔加入不同浓度Bt354及溶剂对照的新鲜培养基100 μL(DMSO终浓度<0.2%),每组设3个平行孔,于37℃继续培养48 h后,弃上清,每孔加50 μg·mL⁻¹ MTT溶液,37℃孵育4 h后弃上清,加入DMSO振荡混匀后,用酶标仪在570 nm波长下测定其光吸收值^[13]。

EdU染色荧光显微镜观察实验 使用培养液1000:1稀释EdU溶液,在每孔加入100 μL的50 μmol·L⁻¹ EdU的培养液孵育2 h后,PBS清洗细胞后使用4%多聚甲醛室温固定30 min,弃去固定液。在每孔加入50 μL的2 mg·mL⁻¹甘氨酸,脱色摇床孵育5 min后弃去溶液。再在每孔加入100 μL PBS,清洗5 min后弃去PBS。在每孔加入100 μL 1×Apollo[®]染色反应液,避光室温、脱色摇床孵育30 min后,弃染色液。再加入100 μL渗透剂脱色摇床清洗2次,每次10 min,弃渗透剂。用去离子水按100:1的比例稀释试剂盒中F试剂,制备适量1×Hoechst33342反应液,每孔加入100 μL该反应液,避光室温、脱色摇床孵育30 min进行DNA染色后,弃染色反应液;每孔每次加入100 μL PBS清洗2次,最后每孔加入500 μL PBS保存。经显微镜拍照后,采用IPP(Ipwin32)软件对阳性细胞进行统计。

小鼠皮下移植瘤模型的建立 在无菌条件下,收集对数生长期的人前列腺癌细胞DU145,用灭菌生理盐水调整细胞密度至每毫升 5×10^7 个,取0.2 mL接种于裸鼠腋窝皮下,待肿瘤生长至直径1 cm大小,无菌条件下取出,切成1 mm×1 mm大小的瘤块,均匀接种于裸鼠腋窝皮下^[14]。当肿瘤体积接近200~400 mm³,分组给

药并称量, 每组6只^[11]。随机分组为溶剂对照组 (Ctrl组)、docetaxol (10 mg·kg⁻¹, ip)、napabucasin (20 mg·kg⁻¹, ip)、Bt354 (10 mg·kg⁻¹, po)、Bt354 (20 mg·kg⁻¹, po)、Bt354 (40 mg·kg⁻¹, po)。给药频率为每3天1次。每周称量体重2次, 并用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽度, 按照公式 $V=a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积, 其中 a 为肿瘤的长度, b 为肿瘤的宽度。采用颈椎脱臼法将裸鼠处死, 然后取出肿瘤组织块并称量, 最后计算肿瘤抑制率, 并将肿瘤组织一部分浸泡于4%多聚甲醛固定, 另一部分-80℃冻存。

免疫组化 石蜡切片脱蜡水化; 3% H₂O₂ 室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 枸橼酸盐缓冲液微波热修复; 5%正常山羊血清封闭, 室温孵育10 min; 滴加适当比例稀释的一抗工作液, 37℃孵育1 h或4℃过夜; 滴加适当比例稀释的二抗, 37℃孵育30 min; 显色剂3,3-氮二氨基联苯胺盐 (3,3-*N*-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) 显色; 封片。每组样品染色时均同批进行空白对照。在光学显微镜下按单盲法观察全部切片, 每张切片随机选取10个高倍视野照相。免疫组化切片采用IPP5.1图像分析系统进行图像分析, 所有切片均采用同一放大倍数^[11]。

外周血中白细胞数目检测 给药周期结束后, 在裸鼠处死前, 取眼眶血20 μL, 加入到血细胞稀释液 (2 mL) 中, 采用日本光电Nihon Kohden血细胞分析仪进行白细胞数量检测。

细胞迁移实验 将细胞置于37℃、5% CO₂ 的孵箱培养18 h后, 取出Transwell小室, 弃去孔中培养液, 用无钙的PBS洗2遍, 甲醇固定30 min, 将小室适当风干。0.1%结晶紫染色20 min, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 用PBS洗3遍。400倍显微镜下随机3个视野观察细胞, 计数。

TUNEL法细胞凋亡检测 冷冻保存的组织切片在4%多聚甲醛中固定20 min, PBS洗涤, 用新制备的细胞通透液 (0.1% Triton X-100溶于0.1%柠檬酸钠) 在冰上渗透2 min。再次用PBS洗涤, 将载玻片覆上TUNEL反应混合物 (100 μL), 37℃下孵育1 h。最后, 在PBS中洗涤细胞, 用盖玻片将含DAPI的ProLong® Gold液态封固剂固定在载玻片上 (P36931, Invitrogen)。细胞用荧光显微镜 (AX70, Olympus) 成像。组织学照片的放大倍数为20倍。

细胞免疫荧光实验 将对数生长期的DU145细胞经消化后制成单细胞悬液, 加入1 mL细胞悬液 (2×10⁴个细胞)于Confocal小皿, 次日, 加入Bt354或溶剂对照培养12 h后, 弃去细胞培养基, 用预冷PBS洗涤2次, 加入4%多聚甲醛室温固定20 min, PBS洗涤3次,

每次5 min, 用含0.3% Triton X-100的PBS溶液室温静置20 min, 进行细胞透化。PBS洗涤3次, 加入5%的BSA室温孵育1 h, 弃上清, 分别加入1% BSA的PBS稀释的兔抗STAT3 (1:100稀释) 单克隆抗体, 4℃过夜孵育。次日, 弃去一抗, 用PBS洗涤3次, 每次5 min, 加入用含1% BSA的PBS稀释的驴抗兔的荧光二抗Alex a Flour 647 (1:100稀释) 室温避光孵育1 h, 其中阴性对照组只加相应的荧光二抗。孵育结束后, 用PBS避光清洗3次, 每次5 min, 最后将上清吸干, 滴加含1 μg·mL⁻¹ DAPI的抗荧光猝灭封片剂进行封片, 并于奥林巴斯 (FV1000 MPE, 德国) 激光共聚焦显微镜 (60倍油镜) 进行细胞观察及拍照, 并采用FV10-ASW软件对图像进行处理。

统计学分析 使用GraphPad Prism进行数据统计和计算。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 裸鼠实验两组间比较采用one-way ANOVA。

结果

1 Bt354对肿瘤细胞的增殖抑制作用

经MTT检测, Bt354作用于DU145细胞48 h后, IC₅₀值为0.3±0.02 μmol·L⁻¹。在MTT实验结果的基础上, 通过EdU染色并使用荧光显微镜观察, 确认化合物Bt354 (图1A) 作用24 h对DU145细胞增殖的影响。Bt354减少EdU染色呈阳性的DU145细胞数, 统计结果有显著性差异。这一结果确认了Bt354对Jak2-STAT3信号通路过度激活的前列腺癌细胞具有较强的增殖抑制作用 (图1B、C)。

2 Bt354对DU145裸鼠异位移植瘤抗肿瘤活性研究

经过体外实验可知Bt354对DU145细胞具有较强的增殖抑制作用。接下来, 通过建立DU145细胞皮下移植瘤模型, 判断Bt354在小鼠体内的抗肿瘤效果。用箭头表示给药时间 (图2A), 第25天终止实验。实验期间docetaxol组出现3只动物死亡, napabucasin组出现2只动物死亡。结果显示, docetaxol组瘤体积相对肿瘤增殖率 (T/C) 为18.1%, 瘤重抑制率为77.4%。Napabucasin组瘤体积T/C为58.9%, 瘤重抑制率为57.8%。Bt354口服给药组, 10、20和40 mg·kg⁻¹组瘤体积T/C分别为45.2%、41.3%和30.0%, 瘤重抑制率分别为58.8%、62.7%和73.5%。终止实验时, 检测外周血细胞含量发现, Bt354对外周血细胞含量无明显影响 (图2、表1)。

3 Bt354对荷瘤裸鼠瘤组织增殖状态的影响

采用免疫组化染色, 验证Bt354对裸鼠DU145异位移植瘤的抗肿瘤作用。染色结果显示, 在给予10、20和40 mg·kg⁻¹的Bt354组内, 均可见DU145移植瘤

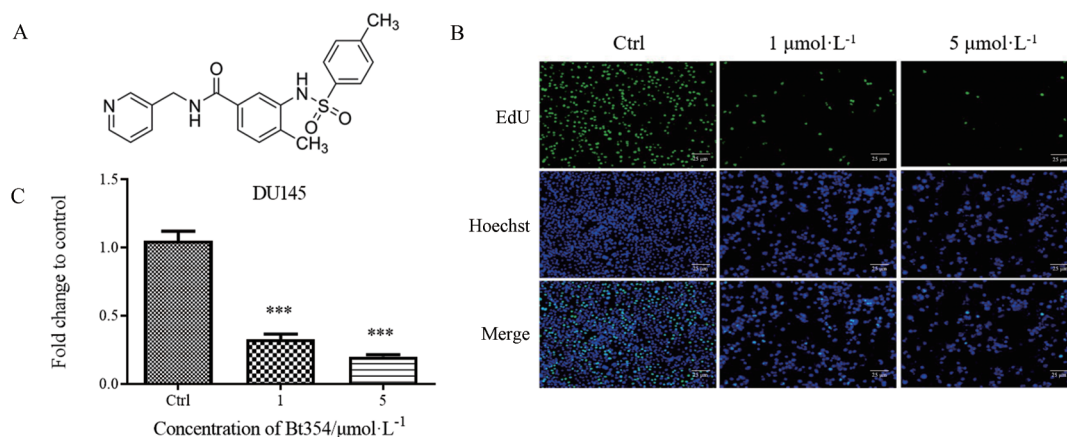


Figure 1 Bt354 inhibited the proliferation of DU145 cancer cells. A: Chemical structure of Bt354; B: Anti-proliferative effects of Bt354 in DU145 evaluated by using immunofluorescence staining with EdU; C: Change in the number of EdU-labeled DU145 cells. The results are representative of three independent experiments. *** $P < 0.001$ vs Ctrl group

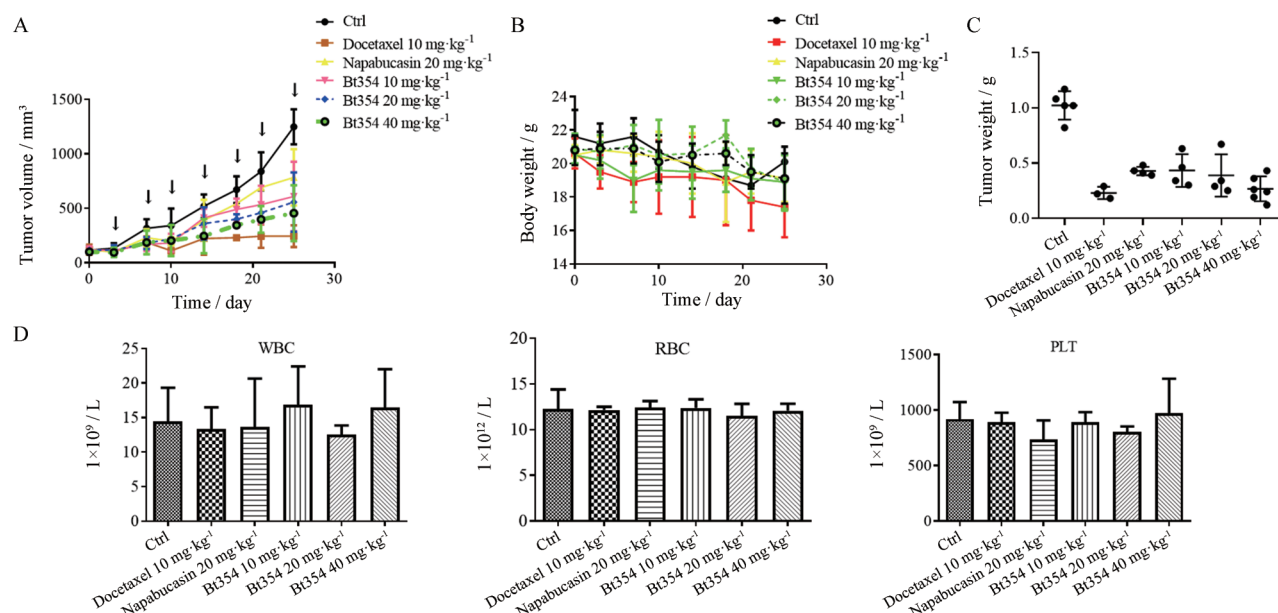


Figure 2 Antitumor activity of Bt354 in DU145 xenograft mice model. A, B: Change of tumor volume and body weight; C: Tumor weight of the stripped tumors of DU145 xenograft mice; D: White blood cell (WBC), red blood cell (RBC) and blood platelet (PLT) count of mice treated with docetaxel and different doses of Bt354. $n = 7, \bar{x} \pm s$

Table 1 Antitumor activity of Bt354 in DU145 xenograft mice model. One-way ANOVA, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group. TGI: Tumor growth inhibition; T/C: Mean tumor volume of treated group/mean tumor volume of vehicle group. $n = 7, \bar{x} \pm s$

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Number of animals	Body weight/g		Tumor volume/mm ³		T/C /%	Tumor weigh/g	TGI /%
			Begin	End	Begin	End			
Control	-		21.6 ± 1.6	20.1 ± 0.9	116.8 ± 37.0	1 349.8 ± 161.3	NA	1.02 ± 0.13	NA
Docetaxel ip	10	4	20.6 ± 0.9	17.4 ± 1.8	120.8 ± 46.8	244.7 ± 99.8	18.1***	0.23 ± 0.16	77.4***
Napabucasin ip	20	5	20.5 ± 0.6	19.1 ± 1.4	118.2 ± 20.9	784.1 ± 259.0	58.9***	0.43 ± 0.05	57.8***
Bt354 po	10	7	20.5 ± 0.5	18.9 ± 1.6	119.8 ± 33.0	609.7 ± 207.4	45.2***	0.42 ± 0.15	58.8***
	20	7	20.9 ± 0.9	18.9 ± 1.7	117.1 ± 29.6	557.9 ± 173.8	41.3***	0.38 ± 0.15	62.7***
	40	7	20.8 ± 0.9	19.1 ± 1.5	117.1 ± 16.3	405.8 ± 156.5	30.0***	0.27 ± 0.09	73.5***

组织中 Ki 67 阳性细胞的数量显著降低。提示 Bt354 能够有效抑制 DU145 细胞裸鼠异位移植瘤模型中肿瘤组织增殖的作用 (图 3)。

4 Bt354 对荷瘤裸鼠瘤组织凋亡状态影响

使用 TUNEL 法检测细胞凋亡, 结果显示: docetaxel 给药组可见 DU145 肿瘤组织出现细胞凋亡, Bt354 口

服给药组可见随着给药剂量增加,肿瘤组织出现的细胞凋亡现象增多,提示 Bt354 诱导凋亡能力随着给药剂量的增加而加强。以上结果提示, Bt354 在体内能诱导 DU145 肿瘤组织的凋亡(图4)。

5 Bt354 对肿瘤细胞迁移行为的影响

采用细胞划痕实验与 Transwell 实验进一步验证 Bt354 在体外对前列腺癌迁移能力的影响(图5)。在细胞划痕实验中,在 0.5、1 和 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 刺激 24 h 后, DU145 细胞向划痕区域的生长受到明显抑制。由此证明, Bt354 能够在体外抑制 DU145 细胞的迁移能力。

为进一步确认 Bt354 对 DU145 迁移能力的影响,

本研究进行了 Transwell 实验。结果显示,在 Bt354 加入 Transwell 小室上孔中 24 h 后,能够明显抑制 DU145 细胞穿过基底膜的能力,并且这种抑制效果呈明显的剂量依赖性。在 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,此抑制效果即达到 35.3%,具有显著性差异。这一结果也再次确认了 Bt354 在体外影响 DU145 细胞的迁移能力。

6 Bt354 对 STAT3 入核的影响

1 和 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 分别作用于 DU145 细胞 24 h 后,用免疫荧光法进行检测。结果如图6所示,在对照组细胞中, STAT3 呈胞浆和胞核散在分布,且胞核中浓度高于胞浆中的 STAT3 浓度。经 Bt354 处理后,

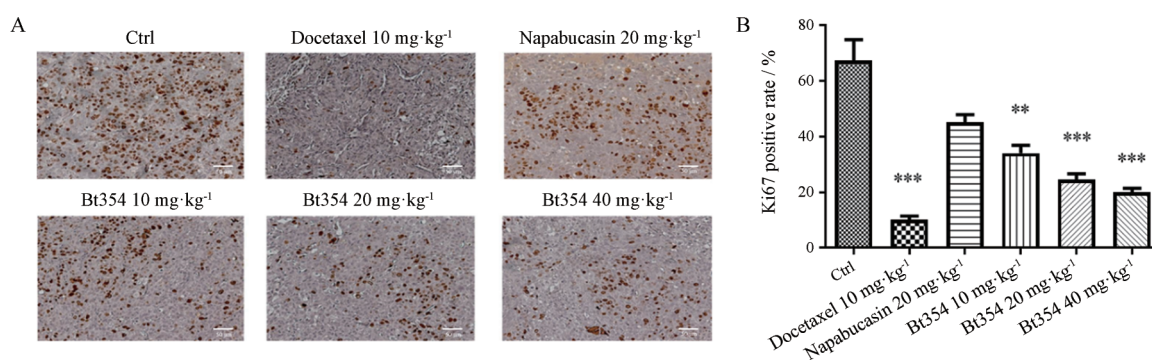


Figure 3 The number of Ki 67 positive cells in the tumor sections. A: Sections of individual tumors from 6 groups immunohistochemically stained with Ki 67 to evaluate cell proliferation ($\times 200$); B: Change in the number of Ki 67 positive cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group

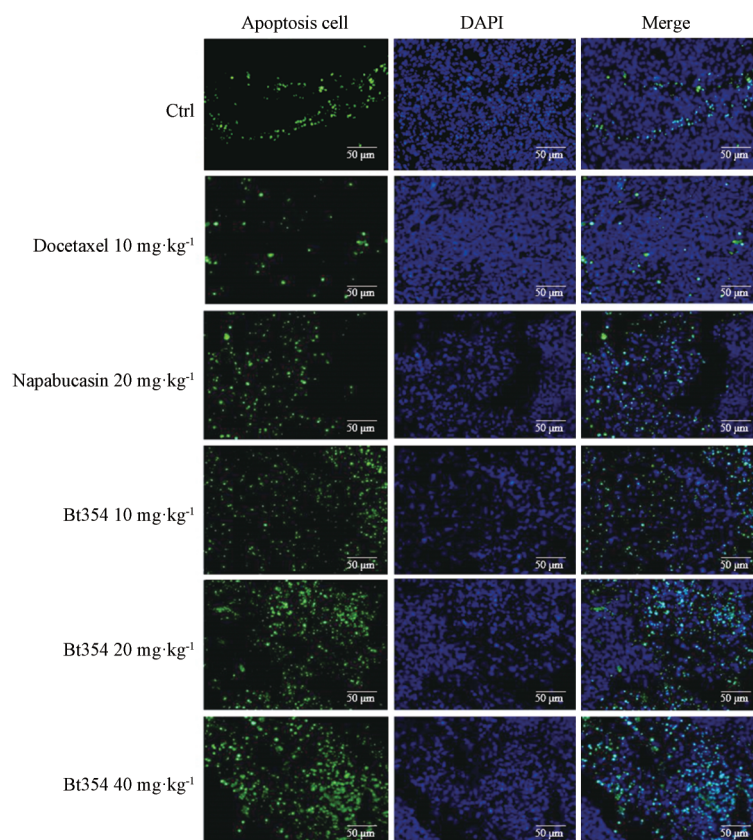


Figure 4 Tumor sections from DU145 cells to detect apoptosis in tumor tissue. Scale length is 50 μm

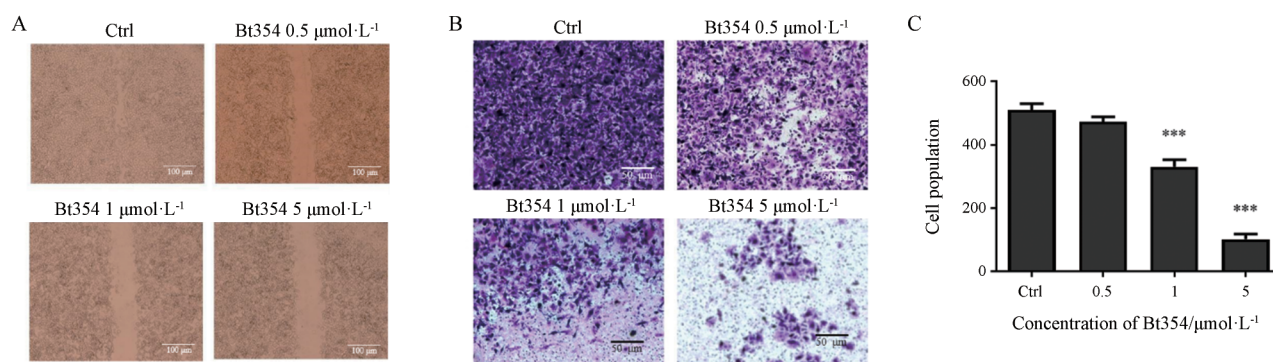


Figure 5 Effect of Bt354 on the invasion and metastasis of tumor cells. A: DU145 cells treated with different concentrations of Bt354 were detected by wound healing assay; B: DU145 cells treated with different concentrations of Bt354 were detected by cell migration assay; C: Change in the population of DU145 cells. *** $P < 0.001$ vs Ctrl group

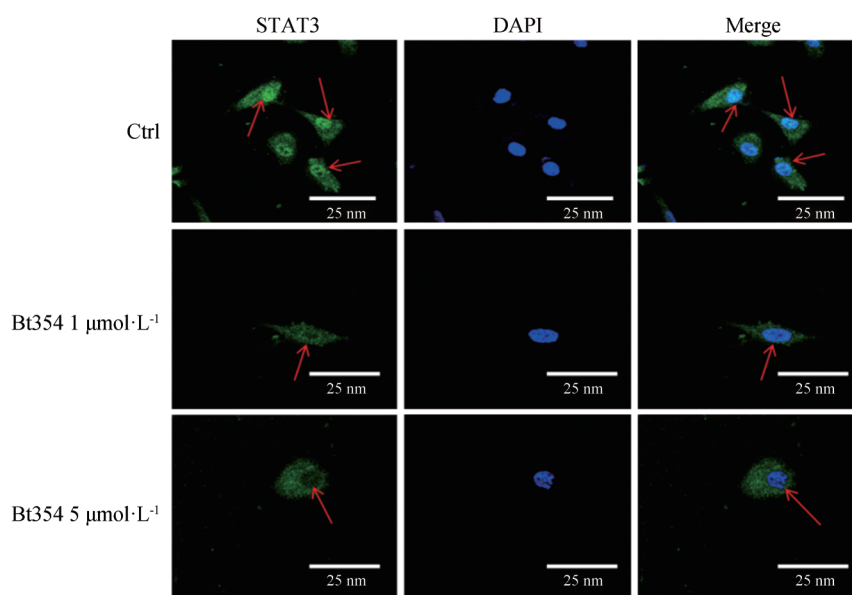


Figure 6 Bt354 inhibited the nuclear translocation of STAT3 in DU145 cells

DU145 细胞中 STAT3 在细胞核中的分布明显降低, 在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 作用下, 降低作用较 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 更强 (图6)。以上结果提示, Bt354 能有效地抑制肿瘤细胞中 STAT3 转移到细胞核中。

讨论

在正常细胞中, STAT3 被短暂激活, 在人类肿瘤细胞中则与之相反, STAT3 呈持续活化状态。针对这一现象, STAT3 被认为是一个很有前景的肿瘤药物靶点。目前已经发现了多个小分子的 STAT3 抑制剂, 但尚未有针对 STAT3 靶点的药物获批^[15]。

之前本实验室已经报道 Bt354 在乳腺癌上的抗肿瘤作用及作用机制, 本文首次阐明 Bt354 对前列腺癌的抗肿瘤作用及作用机制。通过 EdU 细胞增殖实验发现, Bt354 剂量依赖性地降低了 EdU 阳性染色的

DU145 细胞, 确认了 Bt354 对 STAT3 过度活化的前列腺癌细胞具有较强的增殖抑制作用。接下来针对 STAT3 高表达的 DU145 细胞株进行了裸鼠异体皮下移植瘤动物模型的建立, 考察 Bt354 的体内抗肿瘤活性。结果显示, 在终止实验时: docetaxol 组瘤体积 T/C 为 18.1%, 瘤重抑制率为 77.4%, napabucasin 组瘤体积 T/C 为 58.9%, 瘤重抑制率为 57.8%。而 Bt354 口服给药低、中、高剂量组体积 T/C 分别为 45.2%、41.3% 和 30.0%, 体重均有轻微下降。另外, Bt354 对外周血总白细胞 (WBC)、总红细胞 (RBC) 和血小板 (PLT) 水平无明显影响, 提示没有明显血液毒性。通过免疫组化检测 DU145 移植瘤组织中的 Ki 67 阳性细胞数量, 及检测 DU145 移植瘤组织中的细胞凋亡状态。给予了 Bt354 的裸鼠 DU145 移植瘤组织中 Ki 67 阳性细胞的数量显著降低且细胞凋亡现象增多。结果提示: Bt354

能够减少体内 DU145 裸鼠异位移植瘤模型中肿瘤细胞的增殖, 诱导体内 DU145 裸鼠异位移植瘤模型中肿瘤组织的凋亡。

STAT3 参与肿瘤细胞的增殖、生存、侵袭转移、血管生成、免疫逃逸等功能^[16,17]。细胞划痕和 Transwell 实验结果显示, Bt354 能有效抑制 DU145 细胞的侵袭迁移能力。在体外细胞划痕与 Transwell 实验中, 24 h 即出现抑制侵袭转移作用。在凋亡检测中, 给予 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 刺激 48 h 后呈现出明显的诱导凋亡的作用。前期的机制研究发现, 在乳腺癌细胞中, Bt354 能有效抑制 STAT3 与目标 DNA 的结合, 导致下游靶基因 (Bcl-2、Mcl-1、Survivin 等) 表达下调; 同时, Bt354 能够导致乳腺癌细胞 STAT3 入核减少^[11]。在本研究中, 经细胞免疫荧光检测发现相似结果: 在 Bt354 刺激的 DU145 细胞中 STAT3 在细胞核中的分布明显降低, 其中 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 的降低作用较 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Bt354 更强。

综上所述, 本研究主要针对本课题组成功筛选到的小分子 STAT3 抑制剂 Bt354 进行研究, 之前未见他人对其 STAT3 抑制活性的报道。药效学研究结果表明: Bt354 对前列腺癌 DU145 具有良好的体内体外抗肿瘤活性。进一步分子作用机制研究表明, Bt354 通过影响 STAT3 入核, 从而进一步影响其与 DNA 的结合, 最终达到抑制前列腺癌细胞生长的作用。故以 Bt354 为母体化合物, 有望进一步开发出治疗非激素依赖性的前列腺癌的安全有效药物。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69: 7-34.
- [2] Wang YE, Wu JF. Advances in treatment of castration-resistant prostate cancer [J]. Chin Med J Metall Indus (中国冶金工业医学杂志), 2018, 35: 144-145.
- [3] Lassi K, Dawson NA. Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010 [J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22: 263-267.
- [4] Xiong H, Zhang ZG, Tian XQ, et al. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells [J]. Neoplasia, 2008, 10: 287-297.
- [5] Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, et al. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1091: 151-169.
- [6] Dauer DJ, Ferraro B, Song L, et al. STAT3 regulates genes common to both wound healing and cancer [J]. Oncogene, 2005, 24: 3397-3408.
- [7] Song Y, Qian L, Song S, et al. FRA-1 and STAT3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 137-143.
- [8] Kesanakurti D, Chetty C, Rajasekhar Maddirela D, et al. Essential role of cooperative NF- κ B and STAT3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma [J]. Oncogene, 2013, 32: 5144-5155.
- [9] Xie TX, Wei D, Liu M, et al. STAT3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis [J]. Oncogene, 2004, 23: 3550-3560.
- [10] Han H, Li CY, Liu X, et al. Relationship of STAT3 activity with chemosensitivity to cisplatin in prostate cancer cell lines [J]. Acad J Sec Mil Med Uni (第二军医大学学报), 2012, 33: 150-154.
- [11] Chen Y, Ji M, Zhang S, et al. Bt354 as a new STAT3 signaling pathway inhibitor against triple negative breast cancer [J]. J Drug Target, 2018, 26: 920-930.
- [12] Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, et al. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145) [J]. Int J Cancer, 2010, 21: 274-281.
- [13] Ji M, Yao HP, Zhou J, et al. Antitumor activity of a novel PARP1/2 inhibitor YHP-743 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 938-943.
- [14] Tang K, Yang HZ, Li Y, et al. Anti-tumor activity and mechanism of T03 *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 861-868.
- [15] Costantino L, Barlocco D. STAT3 as a target for cancer drug discovery [J]. Curr Med Chem, 2008, 15: 834-843.
- [16] Levy DE, Lee CK. What does STAT3 do? [J]. J Clin Invest, 2002, 109: 1143-1148.
- [17] Chen Y, Ji M, Chen XG. Research progress of relationship between STAT3 and tumor [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1351-1358.