

# A G490 在膀胱癌中的抗癌效应及其机制

姚林方<sup>1</sup>, 叶章群<sup>2</sup>, 陈志强<sup>2</sup>, 刘冠琳<sup>2</sup>, 孔德波<sup>2</sup>, 杨为民<sup>2</sup>

The Mechanism of Anticancer Effects of Janus Kinase Inhibitor AG490 in Human Bladder Cancer

YAO Lin-fang<sup>1</sup>, YE Zhang-qun<sup>2</sup>, CHEN Zhi-qiang<sup>2</sup>, LIU Guan-lin<sup>2</sup>, KONG De-bo<sup>2</sup>, YANG Wei-min<sup>2</sup>

1. Department of Urology, Drum Tower Hospital, Affiliated to Medical college of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology

**Abstract:** **Objective** To investigate the anticancer effects of Janus Kinase-selective inhibitor AG490 in human bladder cancer. **Methods** The bladder cancer cell line BIU-87 was treated with AG490 in different doses. The cell vitality and proliferation were detected by Trypan Blue staining rejection, cell counting and MTT assay. Drug sensitivity of bladder cancer stem cells to AG490 was detected by clone formation counting assay. Fluorescence dyestuff Hoechst33258 and PI double-staining assay was used to investigate the cell apoptosis characteristics. Flow cytometry was applied to analyze the cell cycle and apoptosis. The expressions of phosphorylation-specific JAK2 (p-JAK2), STAT3, phosphorylation-specific STAT3 (p-STAT3), Cyclin D1 and bcl-xL were measured by western blot. **Results** AG490 could remarkably inhibit the proliferation of bladder cancer cells and the formation of the tumor stem cell clones, block the cell cycle, facilitate the apoptosis of bladder cancer cells, and result in less expression of p-JAK2, STAT3, p-STAT3, Cyclin D1 and bcl-xL. **Conclusion** AG490 showed strong abilities of inhibiting the proliferation of bladder cancer cells and inducing their apoptosis through blocking the STAT3 signaling pathway.

**Key words:** Bladder cancer; AG490; Signaling pathway; Anticancer effects

**摘要:** **目的** 观察 JAK2 激酶抑制剂 AG490 对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响,并探讨其抗癌机制。**方法** 应用不同剂量 AG490 处理膀胱癌细胞系 BIU-87,台盼蓝排斥试验检测细胞活力,噻唑蓝比色试验检测细胞增殖,克隆形成试验进一步检测膀胱癌细胞系干细胞对药物的敏感性,Hoechst33258/PI 荧光双染检测细胞凋亡特征,流式细胞仪检测细胞周期和凋亡,Western blot 检测 p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Cyclin D1、bcl-xL 蛋白表达水平;并建立膀胱癌荷瘤模型,观察 AG490 体内抗肿瘤作用。**结果** AG490 明显抑制膀胱癌细胞增殖和干细胞克隆形成,使细胞周期阻滞,促进膀胱癌细胞凋亡;并可使 p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Cyclin D1、bcl-xL 蛋白表达水平明显下降。裸鼠移植瘤在 AG490 的作用下明显缩小。**结论** AG490 通过阻断 STAT3 信号通路,抑制膀胱癌细胞的增殖,促进其凋亡。

**关键词:** 膀胱癌; AG490; 信号通路; 抗癌效应

**中图分类号:** R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)03-0195-04

## 0 引言

膀胱癌是我国泌尿系最常见的恶性肿瘤,发病率居泌尿系肿瘤首位,至今仍无特异的抗癌药物。信号转导和转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路是当前细胞因子研究领域的热点,该通路异常活化与细胞异常增殖和恶性转化密切相关。而 STAT3 信号通路的异常活化源于 JAK2 (Janus kinase 2) 激酶的

异常激活<sup>[1]</sup>。研究发现 JAK2 激酶抑制剂 AG490 可特异性阻断 STAT3 信号通路,抑制肿瘤细胞生长,在白血病治疗方面显示良好的抗肿瘤效应<sup>[2]</sup>。我们利用体外细胞培养技术和体内移植瘤模型,观察了 AG490 对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响,了解 AG490 在膀胱癌中的抗癌效应,并进一步探讨其抗癌机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

膀胱癌细胞系 BIU-87 (编号: GDC120) 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,用含 10% 胎牛血清 (天津 TBD 公司) 的完全 RPMI1640 培养液 (美国 GIBCO 公司),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

收稿日期: 2006-02-08; 修回日期: 2006-05-08

作者单位: 1. 210008 南京大学医学院附属鼓楼医院泌尿外科; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科

作者简介: 姚林方 (1976 -), 男, 博士, 住院医师, 主要从事泌尿系肿瘤和结石研究

-氟基-(3,4-羟基)N-苄苯乙酰胺(A G490)购自美国 Calbiochem 公司。胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、双苯并咪唑染料(Hoechst33258)和碘化丙啶(PI)均购自美国 SIGMA 公司。Annexin -FITC 凋亡检测试剂盒购自晶美生物工程有限公司。Western blot 采用一抗(美国 Santa Cruz 公司)和碱性磷酸酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。BALB/c 裸小鼠(nu/ nu)购自中科院上海实验动物中心,均为雄性,4~6 周龄,体重 18~22g。

## 1.2 方法

1.2.1 台盼蓝排斥试验 细胞经不同浓度(25、50、100 $\mu$ mol/L) A G490 处理 24、48 和 72h 后,制成单个细胞悬液( $10^6$ /ml),取 9 滴细胞悬液移入小试管中,加 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液混匀,在 3min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞数,活细胞率(%) = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数)  $\times$  100%

1.2.2 MTT 法 细胞接种于 96 孔板中,贴壁后无血清培养 24h,使细胞同步化。按上述方法处理细胞,分别培养 24、48 和 72h 后,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml) 20 $\mu$ l,继续孵育 4h,终止培养,吸尽孔内上清。每孔加入 150 $\mu$ l DMSO,振荡 10min,在酶联免疫检测仪上测定 570nm 波长处光吸收值(A 值)。细胞抑制率(%) = (1-实验组 A 值/对照组 A 值)  $\times$  100%。

1.2.3 克隆形成试验 制备单个细胞悬液,作梯度倍数稀释,按每皿 300 个细胞接种于培养皿中,细胞同步化和 A G490 处理同前,更换完全培养液继续培养 2 周后,用 PBS(0.01mol/L, pH 7.4) 浸洗 2 次,甲醇固定后,加适量姬姆萨染色,浸洗干燥,计数克隆数。50 个细胞以上的集落算一个克隆,克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数  $\times$  100%

1.2.4 Hoechst33258/PI 荧光双染 在 6 孔板中铺板爬片,细胞同步化和 A G490 处理同前,加入 Hoechst33258 (5 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 10min。继续加入 PI(50 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 20min。4% 多聚甲醛固定细胞 10min 后,置于荧光显微镜下观察细胞形态结构及胞核的变化,每张玻片随机选择 10 个视野并计数,区分出坏死、凋亡和活细胞(细胞核或细胞质内见浓染致密的颗粒状亮蓝色荧光者为凋亡细胞,细胞核着均匀的淡蓝色荧光者为活细胞,呈弥散均匀的红色荧光者为坏死细胞),并计算出凋亡率、坏死率及存活率。

1.2.5 细胞周期检测 细胞接种于 6 孔板,细胞处理同上,收集细胞,PBS 洗涤,70%冰乙醇固定,PI 染色,应用 FAC Sort 流式细胞仪(美国 Becton-

Dickson 公司)进行检测,数据用美国 BD 公司 Cell Quest 细胞周期分析软件进行储存及分析。

1.2.6 细胞凋亡检测 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用 250 $\mu$ l 结合缓冲液重悬细胞,使其浓度为  $1 \times 10^6$ /ml。取 100 $\mu$ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中,加入 5 $\mu$ l Annexin -FITC(终浓度 1mg/L)和 10 $\mu$ l PI 溶液(终浓度 2mg/L),混匀后于室温避光孵育 15min,再加入 400 $\mu$ l PBS,上流式细胞仪检测(美国 Becton-Dickson 公司)。

1.2.7 Western blot 法 参照美国 Santa Cruz 公司提供的方法提取蛋白。以 Bradford 法作蛋白定量后,取 50 $\mu$ g 蛋白经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(5% 积层胶,10% 分离胶)电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h 后,分别加入 1:1000 稀释的一抗 p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Cyclin D1、bcl-xL 后 4 过夜,加入碱性磷酸酶标记的二抗检测杂交蛋白。

1.2.8 体内移植瘤抑制试验 制备细胞悬液接种于裸鼠背部,每个部位注射 0.2ml(含  $5 \times 10^6$  个活细胞),当瘤块成形,直径达 0.5~1.0cm 时,即将动物随机分组,对照组腹腔注射生理盐水,实验组腹腔注射 A G490。A G490 每 5mg 用 1ml DMSO + 19ml ddH<sub>2</sub>O 充分溶解,每次腹腔注射 10mg/kg 体重。以上两组均隔日注射 1 次,4 天测肿瘤体积 1 次,用药 21 天颈椎脱位处死裸鼠,完整剥离瘤体,分别称量瘤重。计算瘤体积 = 长  $\times$  宽<sup>2</sup>  $\times$  0.5,单位 cm<sup>3</sup>,抑瘤率(%) = (1-用药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重)  $\times$  100%

1.3 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两样本均数的 *t* 检验,应用 SPSS11.5 统计软件包进行统计学分析。

## 2 结果

2.1 台盼蓝排斥试验和 MTT 实验结果见图 1、2。随着 A G490 药物浓度增大和作用时间的延长,BIU-87 细胞活力不断下降,A G490 对细胞的抑制率不断增加,细胞增殖明显受到抑制,而相应空白对照组变化不明显,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。作用 72h 后,不同浓度(25、50、100 $\mu$ mol/L)的 A G490 对 BIU-87 细胞的抑制率分别为 21.6%、48.4%、64.6%。

2.2 克隆形成试验进一步检测膀胱癌细胞系干细胞对药物的敏感性,见表 1。可见随着 A G490 药物浓度的不断增大,BIU-87 干细胞克隆数明显减少,克隆形成率从 20.7% 降至 5.9%。不同浓度(25、50、100 $\mu$ mol/L)的 A G490 对 BIU-87 细胞克隆形成的抑制率分别为 22.9%、56.1%、71.6%。

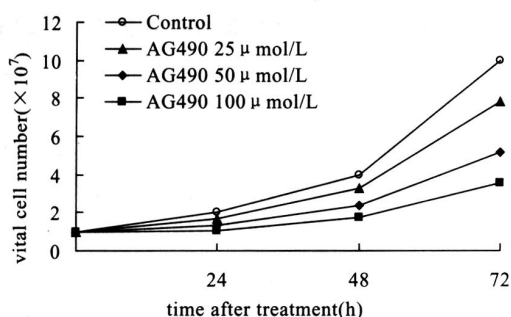


图 1 AG490 对 BIU-87 细胞活力的影响

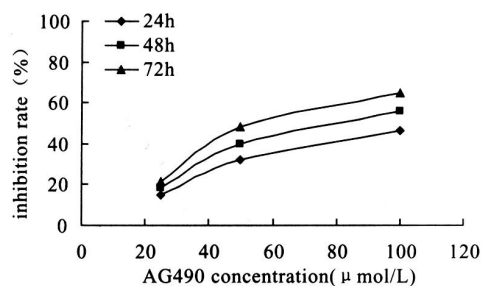


图 2 AG490 对 BIU-87 细胞增殖的影响

表 1 AG490 对 BIU-87 干细胞克隆形成的影响

Group	Clone number	Clone formation rate (%)
Control	62.0 ± 1.6	20.7 ± 0.5
AG490 25 μmol/L	47.8 ± 1.3 *	15.9 ± 0.4 *
AG490 50 μmol/L	27.2 ± 1.3 *	9.1 ± 0.4 *
AG490 100 μmol/L	17.6 ± 1.8 *	5.9 ± 0.6 *

与空白对照组比较, \* P < 0.01

2.3 Hoechst33258/PI 荧光双染可区分凋亡、坏死和存活细胞,随剂量增高凋亡细胞明显增加,100 μmol/L 的 AG490 作用 72h 后,细胞凋亡率可达 50% 以上,见表 2。

表 2 Hoechst33258/PI 荧光双染检测细胞凋亡

Group	Apoptosis rate (%)	Necrosis rate (%)	Survival rate (%)
Control	2.3 ± 1.4	1.7 ± 0.8	96.0 ± 1.1
AG490 25 μmol/L	16.5 ± 1.1 *	4.4 ± 0.8 *	79.1 ± 1.6 *
AG490 50 μmol/L	41.1 ± 1.1 *	6.8 ± 1.5 *	52.1 ± 2.5 *
AG490 100 μmol/L	53.6 ± 3.0 *	11.1 ± 1.5 *	35.3 ± 3.1 *

与空白对照组比较, \* P < 0.01

2.4 流式细胞周期分析,随 AG490 作用时间延长 G<sub>0</sub> ~ G<sub>1</sub> 期细胞比率明显增多,而 S 期细胞比率明显减少,100 μmol/L AG490 作用 72h 后,G<sub>1</sub> 期细胞比率由 60.26% 上升至 81.03%,而 S 期细胞比率由 25.18% 下降至 12.39%,表明细胞周期基本被阻滞于 G<sub>1</sub>/S 期,见表 3。

2.5 流式细胞凋亡检测发现 AG490 明显促进 BIU-87 细胞的早期凋亡,见表 4。100 μmol/L AG490 作用 72h 后,细胞早期凋亡率由 2.13% 增加至 48.25%,具有显著性差异 (P < 0.01)。

表 3 AG490 对膀胱癌细胞周期的影响

Time (h)	The proportion of different cell phases (%)		
	G <sub>0</sub> ~ G <sub>1</sub> phase	S phase	G <sub>2</sub> ~ M phase
0	60.26 ± 2.35	25.18 ± 1.52	14.56 ± 1.15
24	67.41 ± 2.72 *	21.76 ± 1.78 *	10.83 ± 1.31 *
48	75.67 ± 3.13 *	16.45 ± 1.45 *	7.88 ± 1.12 *
72	81.03 ± 2.06 *	12.39 ± 1.35 *	6.58 ± 1.26 *

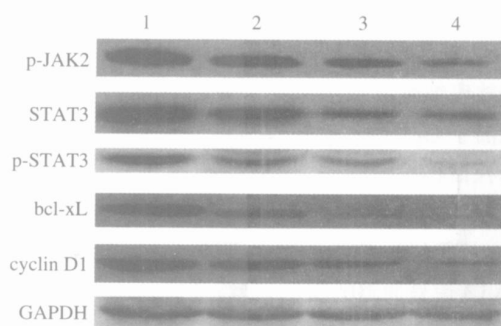
与空白对照组比较, \* P < 0.01

表 4 流式细胞分析检测细胞早期凋亡

Group	Cell early apoptosis rate (%)		
	24h	48h	72h
Control	1.51 ± 0.63	1.84 ± 0.66	2.13 ± 0.75
AG490 25 μmol/L	10.77 ± 1.31 *	13.75 ± 2.12 *	17.12 ± 1.45 *
AG490 50 μmol/L	24.52 ± 3.56 *	32.47 ± 3.81 *	39.58 ± 4.02 *
AG490 100 μmol/L	29.85 ± 4.13 *	40.33 ± 4.32 *	48.25 ± 4.27 *

与空白对照组比较, \* P < 0.01

2.6 不同浓度 (25、50、100 μmol/L) AG490 作用于 BIU-87 细胞 72h 后, JAK2 活化蛋白 p-JAK2 和 STAT3 蛋白及其活化蛋白 p-STAT3 等 STAT3 信号通路各成员蛋白表达与活性明显下降,靶基因 cyclin D1、bcl-xL 蛋白表达水平亦明显下降,见图 3。



1: Control; 2: AG490 25 μmol/L;

3: AG490 50 μmol/L; 4: AG490 100 μmol/L

图 3 AG490 对 STAT3 信号通路各成员蛋白表达的影响

2.7 膀胱癌细胞接种于裸鼠皮下 1 周后,可见背部成形的瘤块,移植成功率为 100%。AG490 组与阴性对照组比较,其肿瘤生长速度显著减慢,见图 4。用药 21 天后处死所有裸鼠,测抑瘤率为 74.49%。

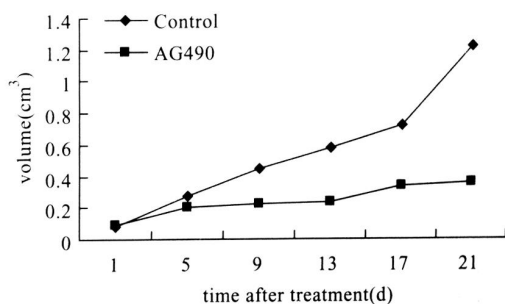


图 4 AG490 对裸鼠移植瘤体积的影响

### 3 讨论

STAT3 信号通路是调控细胞增殖、分化及凋亡的重要的细胞内信号通路。JAK2 作为上游激酶活化后募集胞浆中的 STAT3 单体,使无活性的 STAT3 分子酪氨酸磷酸化而形成有活性的二聚体,转移入细胞核,结合 DNA,导致特定靶基因的开启<sup>[3]</sup>。近年来研究发现,该通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶性转化,参与了人类恶性肿瘤的发生、发展和演进<sup>[4]</sup>。越来越多的肿瘤细胞系和人类癌组织表达异常活化的 STAT3 蛋白<sup>[5]</sup>。阻断该通路成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[6]</sup>。目前,已经发现 AG490 是该通路的特异性阻断剂。

AG490 即  $\alpha$ -氰基-(3,4-羟基)N-苄苯乙酰胺,是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈的脂类衍生物,分子式为  $C_{17}H_{14}N_2O_3$ ,分子量为 294.3,结构类似酪氨酸,可以和受体酪氨酸激酶竞争结合位点,是 JAK2 激酶抑制剂,可特异性阻断 STAT3 信号通路<sup>[7]</sup>。目前,AG490 作为抗肿瘤药物已用于临床治疗白血病,特别是对 JAK2 异常活化导致的前 B 急性淋巴细胞白血病具有很好的治疗作用,同时毒副作用很小<sup>[2]</sup>。

在本实验中,我们应用 AG490 作用于膀胱癌 BIU-87 细胞后,细胞增殖速度明显减慢,显著抑制了膀胱癌细胞系干细胞的克隆形成能力,细胞周期被阻滞于 G<sub>1</sub>/S 期,明显促进膀胱癌细胞凋亡,显著抑制裸鼠移植瘤生长,抑瘤率高达 74.49%;并可使 JAK2 活化蛋白 p-JAK2 和 STAT3 蛋白及其活化蛋白 p-STAT3 表达与活性明显下降,有效阻断了 STAT3 信号通路的激活,最终使靶基因——细胞周

期关键调控基因 cyclin D1 和凋亡抑制基因 Bcl-xL 的蛋白表达水平明显下降。由此可见,AG490 通过阻断 STAT3 信号通路,抑制细胞周期关键调控基因 cyclin D1 的表达,明显抑制膀胱癌细胞的增殖,阻断凋亡抑制基因 bcl-xL 的表达,促进膀胱癌细胞的凋亡,但其具体作用机制有待进一步研究。总之,AG490 通过阻断 STAT3 信号通路发挥抗癌作用,有望成为膀胱癌治疗的新型药物。

#### 参考文献:

- [1] Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines[J]. *Drug News Perspect*, 2005, 18(4): 243-249.
- [2] Miyamoto N, Sugita K, Goi K, et al. The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome[J]. *Leukemia*, 2001, 15(11): 1758-1768.
- [3] Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 651-662.
- [4] Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2502-2512.
- [5] Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 97-105.
- [6] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 945-954.
- [7] Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2001, 166(5): 3491-3498.

[编辑:周永红]