

# 双膦酸盐药物抑癌机制的初步研究

韦金英<sup>1</sup> 王 焱<sup>1</sup> 哈雪梅<sup>1</sup> 马 琳<sup>1</sup> 韩彩丽<sup>1\*</sup> 蒋 晔<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017;

<sup>2</sup> 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

**摘要** 研究发现双膦酸盐(Bisphosphonates, BPs)类药物能抑制多种癌细胞系的生长。实验选用双膦酸盐类药物伊班磷酸钠(ibandronate, IB)和CP(化学名称为[2-(6-氨基-嘌呤-9-基)-1-羟基-膦酰乙基]磷酸, 为河北医科大学药学院研制的新药)作用于体外培养的人胃癌细胞株SGC-7901, 用噻唑氮蓝(MTT)比色实验、流式细胞术、免疫细胞化学染色、Western blot等方法研究分析双膦酸盐类药物对体外培养的人胃癌细胞株细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响以及IL-6、p-STAT-3蛋白表达的影响。结果发现: BPs药物可抑制人胃癌细胞SGC-7901的增殖, CP的抑制作用强于IB。流式细胞术显示两种药物均可诱导SGC-7901细胞凋亡; BPs可以将细胞阻滞于S期, 且有明显的量效和时效关系, CP的阻滞作用效果强于IB。免疫细胞化学染色和Western blot结果显示随着BPs作用时间延长, IL-6、p-STAT-3蛋白表达量逐渐降低, CP组作用强于IB组。提示BPs药物抗肿瘤作用机制可通过影响IL-6使STAT-3蛋白活化受抑制, 以维护信号传导及转录活化因子的稳定, 进而影响肿瘤细胞的增殖、凋亡, 从而阻断肿瘤的发生。

**关键词** 双膦酸盐类药物; IL-6; p-STAT-3; 胃癌细胞株

胃癌是严重威胁人类健康的疾病。寻找药效好, 副作用低的治疗药物, 一直是胃癌研究的一个重要方面。IL-6(interleukin-6, IL-6)是迄今发现的功能最为广泛的细胞因子之一, 可以促进多种细胞的增殖和分化。IL-6的信号主要通过JAK-STAT途径与P21ras/MAPK/NF-IL6途径传导至核内。STATs(Signal transduction and activators of transcription, 信号传导与转录激活因子家族)是一类由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子。尤其是其家族中的STAT-3, 它广泛表达于不同类型的组织细胞中, 参与调节细胞的生长、恶性转化、凋亡等<sup>[1]</sup>。许多基础性研究表明STAT-3肿瘤信号传导通路在大量人类肿瘤中被激活, 参与肿瘤的发生、发展, 成为目前信号传导通路研究的热点<sup>[2]</sup>。

双膦酸盐类药物是近20年来发展起来的抗代谢性骨病的一类药物, 目前有关双膦酸盐类药物可抑制多种体外肿瘤细胞系生长的报道不少, 但大多集中在多发性骨肉瘤、乳腺癌和前列腺癌等方面, 与胃癌的关系以及与IL-6和STAT-3蛋白表达的关系报道甚少。为此, 我们用双膦酸盐类药物作用于人胃癌细胞株SGC-7901, 对比观察两种药物对胃癌细胞株SGC-7901增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响以及IL-6、p-STAT-3蛋白表达的影响, 初步探讨BPs的抗

肿瘤作用机制, 为指导临床用药治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

CP和IB均由河北医科大学药学院惠赠; RPMI-1640培养基购自Gibco公司; 牛血清白蛋白购自华美生物工程公司; p-STAT-3兔抗人多克隆抗体和IL-6鼠抗人多克隆抗体购自Biolegend公司;  $\beta$ -actin兔抗人多克隆抗体、辣根酶标记人抗兔IgG(H+L)、辣根酶标记兔抗人IgG(H+L)、SP免疫组化试剂盒、浓缩型DAB试剂盒、化学发光试剂盒(ECL)购自北京中山生物技术公司。

### 1.2 细胞及细胞培养

人胃癌SGC-7901细胞株(河北医科大学第四医院提供)置于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中常规传代培养, 细胞贴壁生长、多边形, 细胞核大、居中。

### 1.3 观察BPs对SGC-7901细胞株增殖的影响

收稿日期: 2010-05-06 接受日期: 2010-07-13

\* 通讯作者。Tel: 0311-86265724, E-mail: bljysh1@163.com; Tel: 0311-86265734, E-mail: jiangye@hebm.edu.cn

将处于对数生长期的 SGC-7901 细胞制成单细胞悬液, 按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔培养板上, 培养 12~24 h, 细胞完全贴壁后, 换液并分别加入终浓度为 15、30、60、120、240 mmol/L 的 CP, 另一板加入同样终浓度的 IB, 同时设  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶剂对照组 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  浓度为 0.16%) 及空白对照组, 每处理组设 6 个复孔, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 加入  $20 \mu\text{l}$  MTT 溶液 (5g/L, 用 0.01 mol/L 的 PBS 配制), 充分混匀后置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 4 h, 弃上清, 再加入  $150 \mu\text{l}$  DMSO 溶液, 充分混匀后检测 570 nm A 值, 并按下列公式计算细胞增殖抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) =  $(1 - \text{处理组 A 值} / \text{空白对照组 A 值}) \times 100$ 。并根据公式计算确定 72 h 的  $\text{IC}_{50}$ 。公式如下:  $\text{IC}_{50} = \lg^{-1} [X_m - I(\Sigma p - 0.5)]$ 。其中  $X_m$  = 最大剂量对数值,  $p$  = 细胞抑制率 (用小数表示),  $\Sigma p$  = 各组细胞抑制率总和,  $I$  = 相邻两组剂量比值的对数 (高剂量做分子)。

#### 1.4 流式细胞技术 (FCM) 检测 BPs 对 SGC-7901 细胞凋亡和细胞周期的影响

两种药物以  $\text{IC}_{50}$  浓度分别作用细胞 72 h, 分别收集约  $1 \times 10^6$  个细胞用 FCM 检测细胞凋亡。

选取两种药物低于  $\text{IC}_{50}$  的三个不同浓度, IB: 30  $\mu\text{mol/L}$ 、60  $\mu\text{mol/L}$ 、120  $\mu\text{mol/L}$ ; CP: 15  $\mu\text{mol/L}$ 、30  $\mu\text{mol/L}$ 、60  $\mu\text{mol/L}$  作用细胞 72 h; 同时应用药物  $\text{IC}_{50}$  浓度作用于细胞 24 h、48 h、72 h, 分别收集细胞检测细胞周期。

所收集细胞用 70% 冷乙醇固定过夜。取约  $1 \times 10^5/\text{ml}$  细胞, 加入碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI: 50 mg/L, Triton-X 100 1.0%) 在  $4^\circ\text{C}$  冰箱避光染色 30 min, 用美国 Beckman Coulter 公司 Epics-XL II 型流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期分布。应用 DNA 细胞周期分析软件, 计算出 DNA 组方图各时相分布的百分比, 以增殖指数 (PI) 表示细胞的增殖活性, 公式:  $\text{PI} = (\text{S 期} + \text{G}_2/\text{M 期}) / (\text{S 期} + \text{G}_2/\text{M 期} + \text{G}_0/\text{G}_1 \text{ 期}) \times 100\%$ 。

#### 1.5 免疫细胞化学检测 BPs 作用后细胞中 IL-6 和 p-STAT-3 蛋白的表达情况

将细胞接种到预先放置了消毒盖玻片的 6 孔板, 置  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育, 细胞爬片, 并用相应  $\text{IC}_{50}$  浓度的 BPs 刺激 72 h, 常规 SP 法, 将六孔板培养中的细胞用 PBS 洗涤后加冷丙酮固定, 山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗 (IL-6 和 p-STAT-3 均按 1:100 稀释), 湿盒内  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜, DAB 显色。光学显微镜观察

并摄片进行结果判定: 免疫细胞化学染色以细胞中出现棕黄色颗粒为阳性。阳性细胞计数方法: 高倍镜下 (400 倍) 每张组织切片计数 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 取阳性细胞数百分比的平均值。阳性细胞数占 11%~50% 时视作低表达, 占 51%~100% 为高表达。若切片中阳性细胞数  $\leq 10\%$  时则视为阴性。

#### 1.6 Western blot 检测 BPs 作用后 SGC-7901 细胞中 IL-6 和 p-STAT-3 蛋白的表达情况

培养瓶中接种细胞, 分别以两种药物的  $\text{IC}_{50}$  为终浓度干预 24 h、48 h、72 h, 收集细胞, 并设空白对照和溶剂对照组 (生理盐水和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶剂对照培养 72 h), 收集细胞。加蛋白裂解液  $4^\circ\text{C}$  放置 30 min, 离心, 取上清液, 提取细胞总蛋白。用考马斯亮蓝试剂盒定量蛋白。电泳时, 上样量为 100  $\mu\text{g}$ /孔, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶封闭 2 h, 一抗浓度 ( $\beta$ -actin 为 1:200, IL-6 和 p-STAT-3 为 1:500)  $4^\circ\text{C}$  过夜, 二抗 (1:2000)  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h, TBST 洗膜, ECL 试剂盒发光, X 光胶片曝光。结果扫描保存。用 Lab Works 4.5 凝胶成像软件 (美国) 行半定量分析, 以积分光密度 (IOD) 表示。结果用相对积分光密度 (IOD) 来表示 ( $\beta$ -actin 作为内参对照, 相对 IOD 值 = 指标的 IOD 值 /  $\beta$ -actin 的 IOD 值), 并与对照组的相对 IOD 值作比较。

#### 1.7 统计学方法

实验数据采用 SPSS12.0 统计软件进行相关统计学处理, 各项数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。组间组内比较采用单因素方差分析, 各项指标相关性比较采用 Pearson 相关分析。FCM 检测结果的时效关系采用 Spearman 等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 CP 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

实验结果显示 BPs 对 SGC-7901 细胞有生长抑制作用。当药物浓度为 15  $\mu\text{mol/L}$  时, 抑制作用不明显, 但随着药物浓度增加, 作用时间延长, 抑制作用逐渐增强。IB 的  $\text{IC}_{50}$  为 139  $\mu\text{mol/L}$ 、CP 的  $\text{IC}_{50}$  为 75  $\mu\text{mol/L}$ 。以药物最大浓度 240  $\mu\text{mol/L}$  作用 72 h, IB 细胞增殖抑制率为 51.08%, 而 CP 为 80.12%, 溶剂组与空白对照组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

### 2.2 IB、CP 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

在二倍体细胞 ( $\text{G}_0/\text{G}_1$ ) 峰前出现一个亚二倍体峰位判定为凋亡细胞峰。对亚二倍体峰进行定量分析, 可计算出细胞凋亡率。IB、CP 两种药物  $\text{IC}_{50}$  浓度

Table 1 The growth inhibition of BPs on SGC-7901 cell by MTT

Groups	24 h		48 h		72 h	
	A	IR%	A	IR%	A	IR%
CP( $\mu\text{mol/L}$ )						
15	0.842 $\pm$ 0.034	3.86%	0.748 $\pm$ 0.076	8.22%	0.709 $\pm$ 0.125	9.69%
30	0.739 $\pm$ 0.107	15.54%	0.593 $\pm$ 0.027	27.39%	0.551 $\pm$ 0.022	29.78%
60	0.702 $\pm$ 0.009	19.88%	0.501 $\pm$ 0.078	38.58%	0.459 $\pm$ 0.040	41.50%
120	0.543 $\pm$ 0.144	37.96%	0.407 $\pm$ 0.048	50.05%	0.333 $\pm$ 0.068	57.61%
240	0.514 $\pm$ 0.024	41.25%	0.304 $\pm$ 0.081	62.80%	0.156 $\pm$ 0.108	80.12%
IB( $\mu\text{mol/L}$ )						
15	0.850 $\pm$ 0.029	3.02%	0.789 $\pm$ 0.034	3.10%	0.750 $\pm$ 0.018	4.51%
30	0.795 $\pm$ 0.030	9.18%	0.732 $\pm$ 0.054	10.23%	0.696 $\pm$ 0.073	11.30%
60	0.742 $\pm$ 0.068	15.29%	0.640 $\pm$ 0.100	21.57%	0.605 $\pm$ 0.084	23.52%
120	0.619 $\pm$ 0.056	29.19%	0.560 $\pm$ 0.028	31.25%	0.484 $\pm$ 0.092	38.33%
240	0.613 $\pm$ 0.019	30.17%	0.479 $\pm$ 0.091	39.04%	0.385 $\pm$ 0.154	51.08%
Control	0.876 $\pm$ 0.074	0	0.815 $\pm$ 0.023	0	0.785 $\pm$ 0.104	0
Solvent	0.869 $\pm$ 0.123	0.84%	0.810 $\pm$ 0.094	0.62%	0.776 $\pm$ 0.106	1.14%

作用细胞 72 h, 结果显示 DNA 直方图二倍体峰前均可见凋亡峰, 对照组未见凋亡峰(图 1)。细胞凋亡率分别为(28.72%  $\pm$  1.34%)、(31.74%  $\pm$  1.23%)明显高于对照组(6.91%  $\pm$  1.95%)( $P < 0.05$ ), 两药物组之间比较无显著差异( $P > 0.05$ )。提示 BPs 可促进胃癌细胞株 SGC-7901 细胞凋亡。

### 2.3 IB、CP 对 SGC-7901 细胞周期的影响

选用三组不同浓度的 IB 和 CP 作用细胞 72 h, 结果显示 SGC-7901 细胞的细胞周期分布发生变化, 随药物浓度的增加, S 期细胞数逐渐增加,  $G_0/G_1$  期和  $G_2/M$  期细胞数相应减少, 两种药物组与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ )。

用两种药物以  $IC_{50}$  浓度分别作用细胞 24 h、48 h、72 h, 随作用时间延长,  $G_0/G_1$  期和  $G_2/M$  期细胞数逐渐减少, S 期细胞数逐渐增加明显, 与空白对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ ); 两药物组之间比较, CP 组对细胞周期的作用强于 IB 组( $P < 0.05$ )(表 2, 表 3)。

由此可见, IB、CP 可以将 SGC-7901 细胞阻滞 S 期, 且有明显的量效和时效关系。

### 2.4 BPs 对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞 IL-6 和 p-STAT-3 蛋白表达的影响

免疫细胞化学结果显示 IL-6 蛋白阳性信号主要位于 SGC-7901 细胞胞浆中, 极少数位于细胞核, p-STAT-3 蛋白阳性信号定位于胞核中, 呈棕黄色。空白对照组两种蛋白表达较强, 其中 p-STAT-3 蛋白阳性数为 65%, IL-6 蛋白阳性数为 97%。IB、CP 作用 SGC-7901 细胞 72 h, IL-6、p-STAT-3 蛋白表达与对照组比较均降低, 其中 IB 作用后 p-STAT-3 蛋白阳性数为 53%, IL-6 蛋白阳性数为 80%, CP 作用后 p-STAT-3 蛋白阳性数为 34%, IL-6 蛋白阳性数为 32%, CP 组作用强于 IB 组(图 2, 图 3)。Western blot 检测结果显示, 随着 BPs 作用时间延长 IL-6、p-STAT-3 蛋白表达量逐渐减少, 药物作用时间与表达量呈负相关( $r = -0.627$ ,  $r = -0.738$ ,  $P < 0.05$ )。CP 组药物作用强于

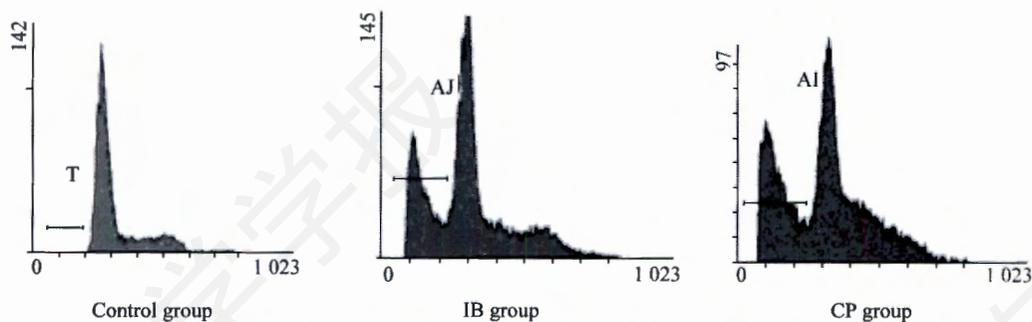


Fig.1 The apoptosis of SGC-7901 cells treated with BPs

**Table 2 Analysis of cell cycle and proliferation index on SGC-7901 cell treated with BPs of different concentration for 72h**

72 h	Groups	PI	S (%)	G <sub>2</sub> /M(%)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)
CP	control	36.62 ± 7.01	22.70 ± 6.83*	13.50 ± 2.46	63.20 ± 20.0
	solvent	38.12 ± 4.58	24.90 ± 6.89*	14.30 ± 2.50	60.80 ± 19.1
	15μmol/L	48.23 ± 0.97	31.02 ± 0.87 *	19.92 ± 0.56 <sup>#</sup>	46.03 ± 0.82*
	30μmol/L	48.97 ± 1.36	36.65 ± 2.81*	12.69 ± 0.52	52.4 ± 0.98*
IB	60μmol/L	57.42 ± 1.37	45.23 ± 1.93 <sup>#</sup>	14.56 ± 0.03 <sup>#</sup>	61.60 ± 1.61 <sup>#</sup>
	30μmol/L	42.67 ± 3.90	24.69 ± 1.74*	17.08 ± 0.12*	53.70 ± 1.60
	60μmol/L	46.40 ± 1.74	32.30 ± 1.78*	13.20 ± 0.40*	54.02 ± 1.70*
	120μmol/L	49.27 ± 1.04	37.59 ± 1.89*	13.68 ± 0.83*	50.78 ± 1.10*

\*Comparing with control group, *P*<0.05.

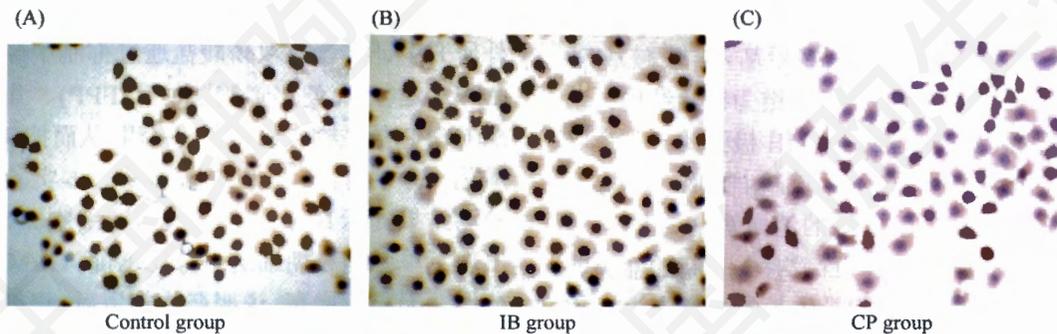
<sup>#</sup>CP group comparing with IB group, *P*<0.05.

**Table 3 Analysis of cell cycle and proliferation index on SGC-7901 cell treated with BPs for different time**

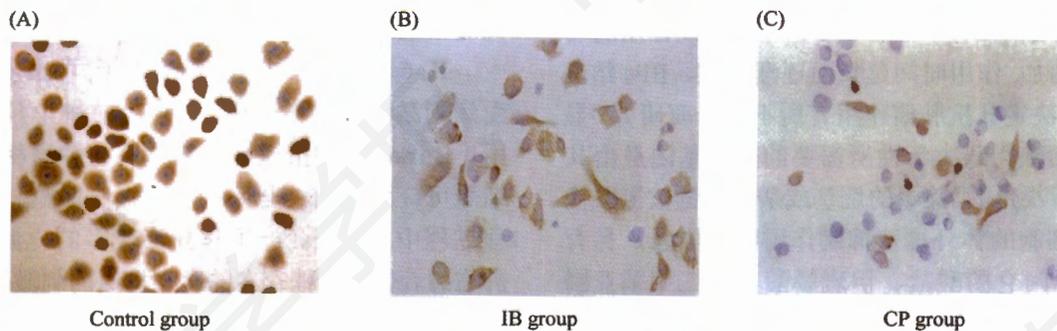
Groups	PI	S (%)	G <sub>2</sub> /M(%)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	
Control	35.51 ± 1.22	29.58 ± 0.57	7.13 ± 0.15	49.95 ± 1.10	
Solvent	34.86 ± 0.56	27.63 ± 0.48	8.56 ± 0.55	48.15 ± 0.60	
CP	24 h	41.53 ± 0.41	37.37 ± 0.66*	5.07 ± 0.26	57.56 ± 2.05
	48 h	60.57 ± 1.70	47.28 ± 1.10 <sup>#</sup>	11.05 ± 1.13	43.60 ± 1.53 <sup>#</sup>
	72 h	56.40 ± 1.36	58.28 ± 0.88 <sup>#</sup>	6.96 ± 0.12	42.80 ± 0.79
IB	24 h	47.51 ± 0.80	36.84 ± 0.32	14.43 ± 0.40	50.69 ± 1.36*
	48 h	53.71 ± 1.57	41.23 ± 0.86*	14.57 ± 0.10*	60.19 ± 2.31*
	72 h	57.04 ± 0.15	51.64 ± 1.31*	4.86 ± 0.09	43.97 ± 1.02

\*Comparing with control group, *P*<0.05.

<sup>#</sup>CP group comparing with IB group, *P*<0.05.



**Fig.2 p-STAT-3 expression of SGC-7901 cell treated with IB and CP for 72 h (SP 400×)**



**Fig.3 IL-6 expression of SGC-7901 cell treated with IB and CP for 72 h (SP 400×)**

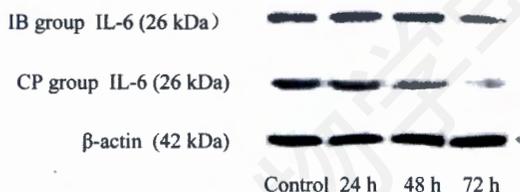


Fig.4 Western-blot analysis the expression of IL-6 protein for 24, 48 and 72 h

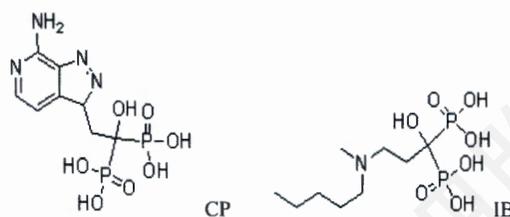


Fig.5 Western-blot analysis the expression of p-STAT-3 protein for 24, 48 and 72 h

IB组,两者与对照组比较,均有显著性差异( $P < 0.05$ )(图4,图5)。

### 3 讨论

双膦酸盐类药物是近20年来发展起来的抗代谢性骨病的一类药物,用于治疗多种因素引起的骨溶解性病变(骨质疏松症、变形性骨炎、恶性肿瘤骨转移)及所引起的高钙血症和骨痛症等。伊班膦酸钠(IB)化学名称为:1-羟基-3-(N-甲基-N-戊胺基)亚丙基双膦酸盐单钠盐-水合物,其侧链为链状结构。由于侧链长度达到最佳,进而赋予IB极强的抗骨质吸收能力。CP化学名称为[2-(6-氨基-嘌呤-9-基)-1-羟基-磷酰乙基]膦酸,其与IB的结构差异在于CP是侧链为更复杂的双膦酸盐。目前有关双膦酸盐类药物可抑制多种体外肿瘤细胞系生长的报道不少。本实验结果显示30  $\mu\text{mol/L}$  终浓度的BPs作用于SGC-7901细胞24 h就可抑制细胞增殖。当其终浓度达到240  $\mu\text{mol/L}$ ,作用72 h,IB和CP对SGC-7901细胞的抑制率分别达51.08%和80.12%,其抑制作用随着药物浓度增加,作用时间延长而逐渐增强。BPs结构上的差异,决定其抗肿瘤作用有所不同。有研究<sup>[3]</sup>显示双膦酸盐获得最大活性所需要的药效基团是由其侧链基团所决定的,其中的烷基或杂环侧链被氮取代后对肺癌细胞的体外增殖抑制作用明显增强。另有研究<sup>[4]</sup>显示阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、二甲基亚膦酸钠、因卡膦酸二钠对癌细胞体外增殖的抑制作用强度是由其侧链基团所决定的,侧链越为复杂的双膦



酸盐其抑制作用越强。本研究中所选用的CP在化学结构上较IB更为复杂,除含氮侧链基团外还增加了腺嘌呤,两者 $\text{IC}_{50}$ 值比较提示,CP的 $\text{IC}_{50}$ 值小于IB,说明CP对细胞的影响作用大于IB。

诱导凋亡是双膦酸盐类药物抑制肿瘤细胞系生长的重要机制,以往研究显示几乎所有的BPs药物均能在体外诱导多种肿瘤细胞凋亡,尤其是含氮的BPs作用更强。国外研究报道<sup>[5-8]</sup>证实了双膦酸盐类药物能诱导乳腺癌细胞系、前列腺癌细胞系、骨巨细胞瘤系等肿瘤细胞的凋亡。本实验采用流式细胞仪检测细胞群中的凋亡峰(亚二倍体峰),也显示BPs药物能诱导人胃癌细胞SGC-7901凋亡,其诱导凋亡的作用与药物浓度无相关性,而细胞增殖抑制率随药物浓度的增高而增高,即:高浓度药物作用后细胞抑制率增高,但不能提高细胞的凋亡率,与文献<sup>[9]</sup>报道相符。据此认为:双膦酸盐类药物除了诱导凋亡外还应有其它的作用机制促进细胞死亡。Swanson等<sup>[10]</sup>在体外研究中证实含氮双膦酸盐通过抑制甲羟戊酸途径(MVA途径)而使焦磷酸法尼酯(FPP)、焦磷酸香叶酯(GGPP)的生物合成及利用障碍,从而抑制蛋白异戊烯化,诱导凋亡,阻断细胞周期。本实验流式细胞检测结果提示BPs作用后,人胃癌细胞株SGC-7901出现了单独的S期细胞百分比增高, $G_2/M$ 期细胞百分比并无相应增高,说明药物作用后,癌细胞被大量阻滞在DNA合成的S期,不能进入分裂期( $G_2/M$ 期),细胞分裂增殖受阻。同时本实验结果也显示CP对细胞周期影响大于IB,抗肿瘤作用也强于IB。这与侧链基团决定BPs的抑瘤活性相符<sup>[3]</sup>。

IL-6是一种多功能的细胞因子,可由多种细胞在受到刺激时被诱导生成,在宿主防御中具有调控作用。Burke等<sup>[11]</sup>报道肿瘤细胞及与肿瘤相关的巨噬细胞可释放IL-6,提示肿瘤细胞在增殖、浸润或转移过程中,可能会产生和分泌较多的内源性IL-6。肿瘤患者体内持续存在的肿瘤抗原的刺激,使免疫细胞分泌IL-6增多以及肿瘤细胞的自分泌作用,都可能是引起机体免疫功能紊乱的重要原因。IL-6可以通

过其受体活化胞内的一系列信号蛋白分子从而实现 IL-6 反应基因的诱导表达。目前认为, IL-6 的信号主要通过 JAK-STAT 途径与 P21ras/MAPK/NF-IL6 途径传导至核内。在 JAK-STAT 途径中, IL-6 主要激活 STAT-3<sup>[12]</sup>; 而在 P21ras/MAPK/NF-IL6 途径中, IL-6 主要通过激活 NF-IL6 基因调控而起作用<sup>[13]</sup>。也有研究<sup>[14]</sup>显示 rhIL-6 (重组白介素 -6) 对 STAT-3 同样有持续性的诱导活化作用。STATs 是一类由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子, 是 JAK-STAT 途径中重要的底物, 在细胞因子信号传导中起重要作用。多项研究表明 STAT-3 过度激活将导致细胞的异常增殖和凋亡障碍, 促进肿瘤的发生和发展<sup>[15]</sup>。Yang 等<sup>[16]</sup>发现 IL-6/STAT-3 信号通路是调控肝细胞生长、分化和增殖的主要通路。IL-6 是较强的促有丝分裂原, 可识别并结合其受体复合物中的 gp130 亚单位活化 JAK2, 后者通过诱导 STAT-3 的酪氨酸残基磷酸化而激活 STAT-3, 并与 STAT-1 蛋白或另一个 STAT-3 蛋白的 SH2 功能区(600~700 位氨基酸之间) 识别并结合, 形成稳定的同源或异源二聚体, 暴露它的核定位区, 易位到核内, 结合到不同靶基因的启动子区而启动转录, 诱导基因表达, 调控细胞的活化、增殖、分化、凋亡抑制及恶性转化, 这就是 JAK 激酶介导 IL-6 信号传导的作用方式。本实验室前期对人胃癌组织标本检测中发现 IL-6、p-STAT-3 两种蛋白表达水平之间呈显著正相关关系, 在淋巴结转移或侵入浆膜的胃癌组织中, IL-6 的表达阳性率明显增高, p-STAT-3 蛋白表达在淋巴结转移或分化程度低的胃癌组织中阳性率明显增高。实验检测药物作用后细胞 IL-6、STAT-3 蛋白的定位和表达情况, 所采用的一抗为 p-STAT-3 多克隆抗体(Phospho2Tyr 7052Stat 3, p-STAT-3), 能与 p-STAT-3 酪氨酸 705 位点反应, 提示检测的是活化的 Stat-3。结果显示: 随着 BPs 作用时间的延长, IL-6、p-STAT-3 蛋白的表达逐渐降低, 药物作用时间与表达量呈负相关( $r=-0.627$ ,  $r=-0.738$ ,  $P<0.05$ ), 表明 BPs 以时间依赖抑制体外培养 SGC-7901 细胞 IL-6、p-STAT-3 蛋白的表达。BPs 可通过降低 IL-6 的表达, 使 STAT-3 蛋白活化受到抑制, p-STAT-3 蛋白表达减少, 使肿瘤细胞生长周期受阻, 增殖下降。

肿瘤的发生与发展是一个多因素作用、多基因参与的复杂生物学现象。本实验结果提示, BPs 促进人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡, 细胞周期受阻于 S 期, 降低 IL-6 和 p-STAT-3 蛋白的表达, 与文献<sup>[17]</sup>中报道

的 STAT-3 对细胞周期的调控作用相一致, 提示 BPs 可能通过影响 IL-6 和 p-STAT-3 以维护信号传导及转录活化因子的稳定, 影响细胞周期, 进而阻断肿瘤的发生发展。

实验用胃癌细胞株 SGC-7901 作为实验对象, 检测 BPs 对细胞作用后凋亡率及细胞周期的影响, 以及 IL-6 和 p-STAT-3 蛋白的表达变化, 初步认为 BPs 可以抑制 SGC-7901 生长, 可通过诱导细胞凋亡, 改变细胞周期来影响细胞的增殖。其抗肿瘤作用机制可能为通过调节 IL-6 使 STAT-3 蛋白活化受抑制, 影响 JAK/STAT 信号传导途径的活化, 抑制其促进增殖和抑制凋亡的作用, 进而达到抑制肿瘤的效果, 为肿瘤辅助治疗提供新思路。

### 参考文献(References)

- 1 Ma XT, Wang S, Ye YJ. Constitutive activation of STAT-3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10(11): 1569-73.
- 2 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights in-to the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2(6): 315-24.
- 3 张秀群, 盛瑞兰, 李建勇. 双膦酸盐在多发骨髓瘤治疗中的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展. *国外医学输血及血液分册* 2002; 25(3): 225-57.
- 4 Lin XF, Yu HX, Tan C, Chen B, Wang TS, Wang BC. Effects of bisphosphonates on proliferation of lung cancer cells *in vitro*. *Chin J Lung Cancer* 2005; 8(6): 510-3.
- 5 Norio K. Treatment of breast cancer with bone metastasis: bisphosphonate treatment current and future. *IJCO* 2008; 2(1): 18-23.
- 6 Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int* 2004; 94(1): 164-70.
- 7 郑小飞, 尹庆水, Shekhar MK, 黄华扬, 张余, 张涛. 双膦酸盐辅助治疗骨巨细胞瘤的临床研究. *临床肿瘤学杂志* 2009; 12(12): 1100-4.
- 8 Nakajima H, Magae J, Tsuruga M, Sakaguchi K, Fujiwara I, Mizuta M, *et al*. Induction of mitochondria-dependent apoptosis through the inhibition of mevalonate pathway in human breast cancer cells by YM529, a new third generation bisphosphonate. *Cancer Letters* 2007; 08(1): 89-96.
- 9 Kawashima H, Ogose A, Hotta T, Ito T, Endo N, Kawashima H, *et al*. Effect of incadronate on proliferation of mesenchymal tumor cells with or without activated Ras mutation. *Exp Clin Cancer Res* 2005; 24(4): 617-24.
- 10 Swanson KM, Hohl RJ. Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6(1): 15-37.
- 11 Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, *et al*. Inhibition of constitutively active STAT-3 suppresses growth

- of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20 (55): 7925-34.
- 12 Yu T, Fan Y, Ma L, Chen J, Wei S, Li ZG, *et al*. Research on the antitumor effect of plumbagin by inhibiting IL-6/STAT3 pathway in large. *Cell Lung Cancer* 2009; 12(6): 508-9.
- 13 张纪岩, 黎 燕, 沈倍奋. IL-6 在 U397 细胞中特异、持续激活 STAT-3. *细胞与分子免疫学杂志* 2001; 17(1): 16-9.
- 14 俞丽芬, 范 嵘, 孔 雷, 乔敏敏, 吴云林. IL-6 在人胃癌细胞株 AGS 中生物学效应及其信号传导途径. *上海第二医科大学学报* 2005; 6(25): 545-8.
- 15 Braun KM, Watt FM. Epidermal label-retaining cells, background and recent applications. *Investig Dermatol Syrup Proc* 2004; 9 (3): 196-201.
- 16 Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, *et al*. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005; 65(3): 939.
- 17 Lin XF, Yu HX, Tan C, Chen B, Wang TS, Wang BC. Effects of bisphosphonates on proliferation of lung cancer cells *in vitro*. *Chin J Lung Cancer* 2005; 8(6): 510-3.

## Bisphosphonates Preliminary Study of Tumor Suppressor Mechanism

Jin-Ying Wei<sup>1</sup>, Ye Wang<sup>1</sup>, Xue-Mei Ha<sup>1</sup>, Lin Ma<sup>1</sup>, Cai-Li Han<sup>1\*</sup>, Ye Jiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Pharmacy, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>2</sup>HeBei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** Recent studies showed that many cancer cell lines could be inhibited by BPs. We used the ibandronate (IB) and CP on the human gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901) to further explore the mechanism. The methods of MTT, cytometric analysis, immunocytochemical staining and Western blot were employed to evaluate the influence of BPs on the proliferation, apoptosis and cycle of tumor cells and the expression of IL-6, p-STAT-3 protein in human gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901). The result showed that SGC-7901 cell proliferation could be significantly inhibited by BPs, and the effect of CP was more significant than that of IB. FCM suggested that BPs stimulated apoptosis of SGC-7901 cells and inhibited cells on S phase, while S fraction cells increased in treated groups in a dose and time-dependent manner, the effect of CP was more significant than that of IB. The result of immunocytochemical staining and Western blot showed that the relative content of IL-6 protein and p-STAT-3 protein in BPs treated group was lower than that in the control group; the effect of CP was more significant than IB. The anti-tumor mechanism of BPs was protecting the stabilization of signal transducer and activator of transcription, then affecting the proliferation and apoptosis of cancer cells by down-regulate protein expression of IL-6 and p-STAT-3.

**Key words** gastric carcinoma; IL-6; p-STAT-3; bisphosphonates

Received: May 6, 2010 Accepted: July 13, 2010

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265724, E-mail: bljysh1@163.com; Tel: 86-311-86265734, E-mail: jiangye@hebm.edu.cn