

文章编号: 0258-5898 (2009) 10-1187-04

· 论 著 ·

## 三氧化二砷诱导骨髓瘤细胞 JAK/STAT3 通路抑制作用的研究

王鸣明, 邹丽芳, 窦红菊, 朱 琦, 任志宏, 胡钧培

(上海交通大学 医学院第九人民医院血液内科 上海血液学研究所, 上海 200011)

**摘 要:** **目的** 研究三氧化二砷( $As_2O_3$ )诱导人骨髓瘤细胞 U266、RPMI8226 细胞内 JAK/STAT3 信号转导通路抑制与细胞增殖之间存在的关系。**方法** 采用 MTT 法观察  $As_2O_3$  对骨髓瘤细胞作用的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ), 流式细胞技术检测  $As_2O_3$  作用前后细胞周期的改变情况, 甲基化特异性 PCR 法检测  $As_2O_3$  作用前后骨髓瘤细胞内 SOCS-1 基因甲基化状态的变化, Western blotting 法检测  $As_2O_3$  作用前后磷酸化 STAT3 蛋白的表达差异。**结果**  $As_2O_3$  作用 72 h 后, 骨髓瘤细胞 U266、RPMI8226 细胞内磷酸化 STAT3 蛋白表达水平明显降低, 同时伴随 SOCS-1 基因启动子区 CpG 岛甲基化程度明显减弱至消失, 细胞增殖发生  $G_0/G_1$  期阻滞, 上述三者变化均与  $As_2O_3$  浓度呈正相关( $r=0.85, P<0.05$ )。**结论**  $As_2O_3$  可诱导骨髓瘤细胞增殖受抑, 与  $As_2O_3$  诱导细胞内 JAK/STAT3 信号转导通路抑制存在一定关系, 且与细胞内 SOCS-1 基因甲基化状态改变相关。

**关键词:** 砷剂; 骨髓瘤; SOCS-1 基因; JAK/STAT3; 细胞周期

**中图分类号:** R733.3; R-33

**文献标志码:** A

## Arsenic trioxide induced JAK/STAT3 pathway inhibition in myeloma cell lines

WANG Ming-ming, ZOU Li-fang, DOU Hong-ju, ZHU Qi, REN Zhi-hong, HU Jun-pei

(Department of Hematology, The Ninth People's Hospital, Shanghai Institute of Hematology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the possible relationship between alteration of cell cycle and JAK/STAT3 signal transduction pathway inhibition induced by arsenic trioxide( $As_2O_3$ ) in myeloma cell lines U266 and RPMI8226 *in vitro*. **Methods** Multiple myeloma cell lines U266 and RPMI8226 were used as *in vitro* models. The influence of  $As_2O_3$  on myeloma cells were evaluated by MTT assay and flow cytometry. Meanwhile, methylation specific PCR and Western blotting were employed to detect the methylation status of gene SOCS-1 and protein expression level of P-STAT3 in these cells after  $As_2O_3$  treatment. **Results**  $As_2O_3$  significantly inhibited the growth of U266 and RPMI8226 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, cell cycle was arrested at  $G_0/G_1$  phase with inhibition of protein expression level of P-STAT3 and SOCS-1 gene demethylation after exposure to  $As_2O_3$  for 72 h( $r=0.85, P<0.05$ ). **Conclusion**  $As_2O_3$  could induce the alteration of cell cycle which might be related to JAK/STAT3 signal transduction pathway inhibition and SOCS-1 demethylation in myeloma cell lines. The study puts forward a new idea of  $As_2O_3$  treatment in multiple myeloma.

**Key words:** arsenic trioxide; myeloma; SOCS-1; JAK/STAT3; cell cycle

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是血液系统常见的恶性克隆性浆细胞疾病,近年来,三氧化二砷( $As_2O_3$ )在治疗难治性、复发性 MM 中成果喜人<sup>[1]</sup>。目前认为, $As_2O_3$ 的治疗作用与其诱导细胞凋亡、影响细胞信号转导相关<sup>[2]</sup>,具体治疗机制尚待进一步阐明。以骨髓瘤细胞株 U266、RPMI8226 作为体

外细胞模型研究  $As_2O_3$  作用前后,骨髓瘤细胞内蛋白酪氨酸激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导子及转录激活子-3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)通路的改变情况,初步探讨  $As_2O_3$  诱导的骨髓瘤细胞周期改变与 JAK/STAT3 通路抑制之间可能存在的关系。

基金项目:上海交通大学医学院基金课题(05XJ21023)(Shanghai Jiaotong University School of Medicine Foundation, 05XJ21023)。

作者简介:王鸣明(1981—),女,住院医师,硕士;电子邮箱:mingming.wang205198@gmail.com。

通讯作者:胡钧培,电子邮箱:hujunpei90@hotmail.com。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料和试剂**  $As_2O_3$  储存液(4℃保存,上海血液学研究所惠赠);5'-氮杂-脱氧胞苷酸(DAC)(Sigma-Aldrich);JAK2 抑制剂 AG490(Sigma-Aldrich);STAT3 和磷酸化-STAT3 (Tyr705)鼠单(Cell Signaling technology);进行甲基特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)检测的 SOCS-1 基因甲基化引物、基因非甲基化引物;人 B 细胞淋巴瘤细胞 Raji、人 T 细胞淋巴瘤细胞 Jurkat、人骨髓瘤细胞 U266、RPMI8226(上海血液学研究所惠赠);健康成人外周血单个核细胞(PBMCs)标本作为正常对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组:**以人骨髓瘤细胞 U266、RPMI8226 为多发性体外细胞模型,分为对照组( $As_2O_3$  0  $\mu\text{mol/L}$ )和  $As_2O_3$  给药组(0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[3]</sup>;DAC 给药组<sup>[4]</sup>作为去甲基化阳性对照;JAK2 抑制剂 AG490 给药组<sup>[4]</sup>作为细胞通路 JAK-STAT3 抑制的阳性对照。

**1.2.2 MTT 法检测  $As_2O_3$  作用的  $IC_{50}$** <sup>[3]</sup>:细胞以  $5 \times 10^5/\text{mL}$  起始浓度接种于 96 孔培养板内,与  $As_2O_3$  作用 72 h 后检测光密度值( $D_{492\text{ nm}}$ ),抑制率 = [(未处理组  $D_{492\text{ nm}}$  - 处理组  $D_{492\text{ nm}}$ )/未处理组  $D_{492\text{ nm}}$ ]  $\times$  100%,计算  $As_2O_3$  抑制率和  $IC_{50}$ 。

**1.2.3 流式细胞技术检测细胞周期:**细胞以  $5 \times 10^5/\text{mL}$  起始浓度与不同浓度的  $As_2O_3$  作用 72 h 后,按流式试剂盒要求收集各组细胞,于 FCM 上作细胞周期分析。

**1.2.4 SOCS-1 基因甲基化状态检测:**MSP 法检测上述各组细胞  $As_2O_3$  处理前后 SOCS-1 基因的甲基化状态。按要求抽提基因组 DNA(上海生工生物工程技术服务有限公司),行 DNA 重亚硫酸钠变性纯化(Qiagen)后行 MSP 反应,其中 SOCS-1 基因甲基化引物序列<sup>[5]</sup>:5'-TTCGCGTGTATTTTGTAGGTCGGTC-3'(上游);5'-CGACACAACCTCTACAACGACCG-3'(下游)。SOCS-1 基因非甲基化引物序列:5'-TTATGAGTATTTGTGTGTATTTTGTAGGTTGGTT-3'(上游),5'-CACTAACAACACAACCTCTACAACAACCA-3'(下游)。以 GAPDH 为内参进行 MSP 反应。

**1.2.5 Western blotting 检测磷酸化 STAT3 蛋白水平的变化:**U266 和 RPMI8226 经不同浓度  $As_2O_3$  作用 72 h 后,收集各组骨髓瘤细胞  $4 \times 10^6/\text{mL}$ ,PBS 清洗后加入蛋白抽提裂解液 50  $\mu\text{L}$  抽提细胞总蛋白,冰浴 15 min,离心收集细胞总蛋白。蛋白提取物经定

量后,30  $\mu\text{g}$  上样至 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳,常规转膜。后者经 5% 脱脂奶粉封闭后,分别与 1:500 稀释度的相应一抗(抗 STAT3 抗体、抗 P-STAT3 抗体)和适宜稀释度的二抗(羊抗鼠 Ig-HRP)孵育,经 Odyssey 显色系统显色,收集蛋白印迹图像。  
**1.3 统计学处理** 采用 SAS 6.12 软件进行统计学处理,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, $As_2O_3$  作用前后细胞周期变化采用方差分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度  $As_2O_3$  对骨髓瘤细胞增殖活力的影响** 经  $As_2O_3$  作用后,U266 和 RPMI8226 细胞生长抑制明显,增殖率与  $As_2O_3$  剂量呈负相关( $r = -0.95$ ,  $P < 0.05$ )。与对照组比较,不同浓度  $As_2O_3$  (0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 对骨髓瘤细胞均有抑制作用( $P < 0.05$ ) (表 1)。其中, $As_2O_3$  作用于 U266 的  $IC_{50}$  为  $(1.62 \pm 0.30) \mu\text{mol/L}$ ,作用于 RPMI8226 的  $IC_{50}$  为  $(2.23 \pm 0.18) \mu\text{mol/L}$ 。

表 1  $As_2O_3$  对骨髓瘤细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ , %)

Tab 1 Inhibition of  $As_2O_3$  on the growth and survival of multiple myeloma cell lines U266 and RPMI8226 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ , %)

Group	U266	RPMI8226
Control		
$As_2O_3$		
0.5 $\mu\text{mol/L}$	18.4 $\pm$ 0.32 <sup>①</sup>	12.2 $\pm$ 0.39 <sup>①</sup>
1.0 $\mu\text{mol/L}$	35.5 $\pm$ 0.17 <sup>①</sup>	27.8 $\pm$ 0.22 <sup>①</sup>
2.0 $\mu\text{mol/L}$	64.7 $\pm$ 0.30 <sup>①</sup>	45.2 $\pm$ 0.24 <sup>①</sup>

<sup>①</sup>  $P < 0.05$  vs control group

**2.2 不同浓度  $As_2O_3$  对骨髓瘤细胞周期的影响** 在不同浓度的  $As_2O_3$  作用下,细胞周期  $G_0 \sim G_1$  期发生阻滞,与对照组比较,呈现  $G_0 \sim G_1$  期细胞增加,S 期细胞减少,细胞凋亡比例增加,细胞周期改变呈现明显的  $As_2O_3$  剂量依赖( $P < 0.05$ ) (表 2)。

**2.3  $As_2O_3$  对 MM 细胞 SOCS-1 基因甲基化状态的影响** 野生型骨髓瘤细胞株 U266 显示为 SOCS-1 基因完全甲基化,野生型 RPMI8226 显示为 SOCS-1 基因半甲基化; $As_2O_3$  作用后,SOCS-1 基因发生基因甲基化状态的改变,随着  $As_2O_3$  浓度的升高,SOCS-1 基因甲基化条带逐渐消失,非甲基化条带逐渐出现,提示各组骨髓瘤细胞 SOCS-1 基因高甲基化状态已被逆转[SOCS-1 基因甲基化阳性参照(Jurkat)、SOCS-1 基因甲基化阴性参照(Raji)、健康成人作 SOCS-1 基因正常对照(PBMCs)和去甲基化阳性参照(DAC)] (图 1)。

表 2 不同 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度对骨髓瘤细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3, \%$ )  
Tab 2 Effects of AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on cell cycles of myeloma cell lines( $\bar{x} \pm s, n = 3, \%$ )

Group	U266			RPMI8226		
	G <sub>0</sub> - G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> - M	G <sub>0</sub> - G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> - M
Control	18.23 ± 1.72	53.22 ± 1.86	28.55 ± 0.25	25.36 ± 2.52	54.30 ± 1.68	20.34 ± 1.55
AS <sub>2</sub> O <sub>3</sub>						
0.5 μmol/L	24.96 ± 2.30 <sup>①</sup>	56.02 ± 1.96 <sup>①</sup>	19.02 ± 0.72 <sup>①</sup>	50.82 ± 0.87 <sup>①</sup>	42.87 ± 1.87 <sup>①</sup>	6.31 ± 0.67 <sup>①</sup>
1.0 μmol/L	57.32 ± 0.87 <sup>①</sup>	30.06 ± 2.40 <sup>①</sup>	12.62 ± 0.53 <sup>①</sup>	57.33 ± 0.48 <sup>①</sup>	30.75 ± 2.86 <sup>①</sup>	11.92 ± 0.50 <sup>①</sup>
2.0 μmol/L	52.38 ± 1.59 <sup>①</sup>	24.46 ± 0.56 <sup>①</sup>	23.16 ± 1.84 <sup>①</sup>	69.64 ± 1.75 <sup>①</sup>	24.26 ± 0.76 <sup>①</sup>	6.10 ± 1.30 <sup>①</sup>

<sup>①</sup>  $P < 0.05$  vs control group

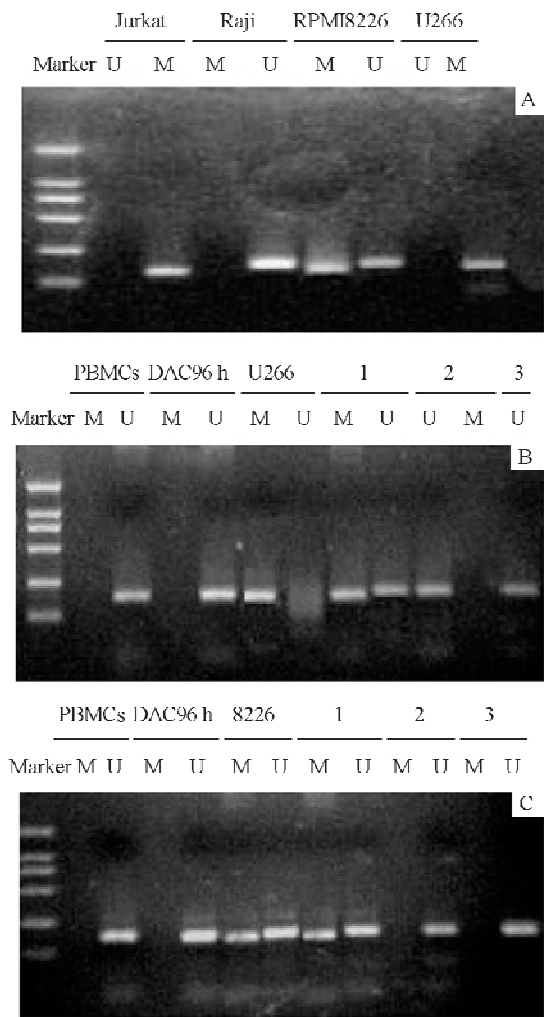


图 1 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用前后骨髓瘤细胞内 SOCS-1 基因的甲基化表达  
Fig 1 SOCS-1 methylation status in myeloma cell lines before and after exposure to AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

A: U266 presented SOCS-1 with complete hypermethylation, while RPMI8226 presented SOCS-1 with hemi-methylation in wild type; B: U266; C: RPMI8226; U: unmethylated; M: methylated; 1: 0.5 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 2: 1.0 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 3: 2.0 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**2.4 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对磷酸化 STAT3 (P-STAT3) 蛋白表达的影响** 以与 AG490 50 μmol/L 共孵育 1 h 和 24 h 细胞组作 P-STAT3 蛋白表达的阴性对照,以 STAT3 蛋白表达水平作内参,经 Western blotting 检测发现,不

同浓度 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0、0.5、1.0 和 2.0 μmol/L) 作用 72 h 后,骨髓瘤细胞 U266 和 RPMI8226 细胞内 JAK/STAT3 细胞通路 P-STAT3 蛋白表达水平明显降低 (图 2)。

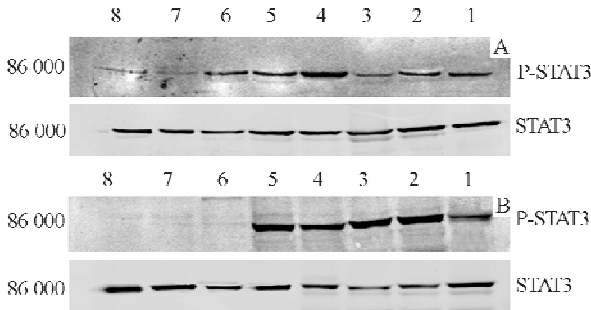


图 2 不同浓度 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于 U266 和 RPMI8226 后 P-STAT3 蛋白的表达

Fig 2 Expression of P-STAT3 protein after exposure of U266 and RPMI8226 to AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

A: U266; B: RPMI8226; 1: control; 2: 1 h AG490 (-); 3: 1 h AG490 (+); 4: 24 h AG490 (-); 5: 24 h AG490 (+); 6: 0.5 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 7: 1.0 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 8: 2.0 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

3 讨论

在 MM 的病理机制中,目前认为 IL-6 在支持 MM 细胞无序增殖和维持细胞去分化、去凋亡状态中起着重要作用<sup>[6]</sup>,而原癌基因表达 STAT3 则是 IL-6 受体 Gp130-介导的细胞生长分化的重要分子,P-STAT3 具有促进细胞核内因子表达和细胞生长因子应答<sup>[7]</sup>,参与细胞增殖凋亡调控、信号转导和细胞恶性转化的作用。Galm 等<sup>[4]</sup>发现,肿瘤抑制基因 SOCS-1 基因甲基化频率在 MM 中高达 62.9%,SOCS-1 基因高甲基化失活,导致该基因对 JAK/STAT3 细胞信号转导通路<sup>[5]</sup>抑制的解除,JAK/STAT3 通路过度激活,P-STAT3 水平异常升高,促使细胞增殖周期通过 G<sub>1</sub> 限制点进入 G<sub>1</sub> 期,同时细胞周期调节基因细胞周期素依赖激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 上调、细胞周期蛋白 D1、p21、p27 基因上调<sup>[8]</sup>,细胞周期素

乱,凋亡减少。

近年来,研究<sup>[9]</sup>发现,AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在人体内代谢所需的甲基来自 S-腺苷甲硫氨酸(s-adenosylmethionine, SAM),经 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)代谢产生一甲砷酸或二甲砷酸,通过竞争甲基或选择性抑制 DNMT,诱导细胞内出现缺甲基状态的产生,从而抑制细胞下游信号转导 JAK/STAT3 通路的失活,抑制肿瘤细胞恶性增殖。

我们的实验发现,在骨髓瘤细胞 U266 和 RPMI8226 内均存在 JAK/STAT3 细胞通路 P-STAT3 的异常活化和蛋白表达上调,在不同浓度 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用后, P-STAT3 表达水平明显降低,细胞内 SOCS-1 基因甲基化程度明显降低至消失,细胞生长明显受抑,上述反应均与 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 药物浓度正相关。由此我们推测, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可能通过改变骨髓瘤细胞内 SOCS-1 基因的甲基化状态,开放 SOCS-1 基因对 JAK/STAT3 通路的抑制作用,逆转 STAT3 蛋白的异常表达,限制细胞周期通过 G<sub>1</sub> 限制点,从而诱导细胞凋亡增加,肿瘤生长受到抑制。我们的实验还证明,0.5 μmol/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于骨髓瘤细胞即可诱导 P-STAT3 蛋白表达下调,推测目前临床采用的 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗剂量可在细胞蛋白水平上影响细胞内 P-STAT3 蛋白的表达,导致肿瘤细胞凋亡。上述结果为研究 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 治疗 MM 提供了一种新思路 and 新的分子研究靶点。

## 参考文献:

- [1] Hussein MA, Saleh M, Ravandi F, et al. Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *Br J Haematol*, 2004, 125(4): 470-476.
- [2] Diaz Z, Laurenzana A, Mann KK, et al. Trolox enhances the anti-lymphoma effects of arsenic trioxide, while protecting against liver toxicity[J]. *Leukemia*, 2007, 21(10): 2117-2127.
- [3] 傅海英, 沈建箴, 沈松菲, 等. 巢式 MSP 检测砷剂诱导人多发性骨髓瘤 U266 细胞系 p16 基因去甲基化及转录[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(1): 79-85.
- [4] Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, et al. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2784-2788.
- [5] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity[J]. *Nat Genet*, 2001, 28(1): 29-35.
- [6] Bauer K, Kretschmar AK, Cvijic H, et al. Cyclophilins contribute to Stat3 signaling and survival of multiple myeloma cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(31): 2784-2795.
- [7] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation[J]. *Biochem J*, 2003, 374(Pt 1): 1-20.
- [8] 王 杉, 马向涛, 杜如显, 等. Stat3 信号传导通路对结肠癌细胞 G1~S 期的调控[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2003, 35(1): 50-53.
- [9] Gui X, Wakai T, Shirai Y, et al. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(3): 298-311.

收稿日期: 2009-03-04

本文编辑: 周殊凤

(上接第 1177 页)

- [3] Mildner M, Weninger W, Trautinger F, et al. UVA and UVB radiation differentially regulate vascular endothelial growth factor expression in keratinocyte-derived cell lines and in human keratinocytes[J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 674-679.
- [4] Kuroda K, Sapadin A, Shoji T, et al. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(5): 713-720.
- [5] 邓 辉, 袁定芬, 阎春林. 光化学疗法对上皮细胞明胶酶表达的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27(1): 79-81.
- [6] Dechend R, Luft FC. Angiogenesis factors and preeclampsia[J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1187-1188.

- [7] Kwon OS, Yoo HC, Han JH, et al. Photoaging-associated changes in epidermal proliferative cell fractions *in vivo*[J]. *Arch Dermatol Res*, 2008, 300(1): 47-52.
- [8] Avraamides CJ, Carmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 604-617.
- [9] Chan PG, Chen SY, Chen CH, et al. Crosstalk between hepatocyte growth factor and integrin signaling pathways[J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(2): 215-223.
- [10] Stetli CH. Integrins and cell-fate determination[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 2): 171-177.

收稿日期: 2009-04-08

本文编辑: 朱宝渊