

治疗脊索瘤的新靶点：信号转导和转录激活因子 3

有效治疗脊索瘤的主要障碍是没有能够预测预后的可识别的生物标志物。最近的研究表明，信号转导和转录激活因子（Stat3）可能是某些癌症的重要预后标志物，但其在脊索瘤肿瘤中的作用尚未阐明。在该研究中，在包含 70 个脊索瘤样品的脊索瘤组织微阵列中评估 Stat3 的表达。在所有情况下，组织微阵列中的细胞显示磷酸化 Stat3 的核染色。磷酸化 Stat3 表达水平与疾病的存活和严重程度相关。将三种脊索瘤细胞系暴露于 SD-1029，一种新的 Stat3 活化抑制剂。MTT 测定显示 SD-1029 抑制了所有脊索瘤细胞系的生长。在用 SD-1029 处理后，在所有脊索瘤细胞系中 Stat3 信号级联的表达被抑制。SD-1029 和化学治疗药物的组合的细胞毒性显著优于单独的任一种药剂。脊索瘤细胞中 Stat3 的磷酸化 SD-1029 抑制了三维培养中的体外和细胞增殖。总之，Stat3 途径在脊索瘤中是组成型激活的，并且表达水平可以作为预后的预测因子。阻断 Stat3 途径代表了未来治疗的潜在策略

介绍

脊索瘤占 2% 至原发性恶性骨肿瘤的 4%，并且表示脊柱（最常见的原发性恶性骨肿瘤 1 - 3）。脊索瘤被认为是耐辐射和耐火材料对细胞毒性化疗（4，5）。因此，治疗方法脊索瘤历来主要依赖于手术对照（3，6，7）。很多研究，但是，已经报道局部复发率很高，尽管手术，和远处转移已经在患者（5% 至 44% 被报道 7 - 13）。脊索瘤的总体中位生存时间估计为 ~6 年（6）。

靶向化疗是在癌症治疗中的巨大潜力的区域，并且如果适当的目标可以发现（可

以是在脊索瘤的治疗中有用的 4, 14 - 16)。确定用于治疗的新靶标和设计以临床有意义的方式影响靶标的药剂可以作为治疗脊索瘤的可行途径。

信号转导和转录激活因子 3 (Stat3) 属于转录因子家族, 其依赖于细胞因子受体产生的信号被转导到细胞核中 (17)。当被激活时, 磷酸化的 Stat3 (pStat3) 同源二聚体, 易位至细胞核, 然后诱导几种 Stat3 依赖性基因的转录。异常 STAT3 的活化促进通过机制不受控制的肿瘤细胞的生长和存活, 包括致癌基因 c-myc 和细胞周期蛋白 d 的表达增加以及所述抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的和 MCL-1 (16, 18 - 20)。

的 Stat3 的组成型活化已被记录在卵巢癌, 乳腺癌, 结肠癌, 前列腺癌, 和其它几种类型的癌症 (18 - 22)。报告表明, Stat3 的途径的活化在几个这些癌症的与临床结果相关, STAT3 活性的抑制可以发挥抗癌作用 (16, 23, 24)。因为正常细胞耐受 Stat3 信号的中断, STAT3 潜在代表用于治疗 (优异的分子靶标 17, 25)。在这项研究中, pStat3 在脊索瘤肿瘤中的表达与结果和 Stat3 抑制剂 SD-1029 的作用相关 (26), 使用脊索瘤细胞系测量。

材料和方法

患者人群

1985年至2007年在马萨诸塞州综合医院接受治疗的脊索瘤患者使用马萨诸塞州综合医院癌症登记处和整形外科肿瘤数据库进行鉴定。每位患者获得的数据包括年龄, 性别, 出生日期, 肿瘤位置, 手术日期, 局部复发和/或转移的存在, 死

亡日期（如果适用）以及最终随访时的疾病状态。对那些通过病理学部提供的档案组织患者进行了回顾。具有常规形态的脊索瘤包括在该研究中，而去除分化和软骨样脊索瘤亚型。此外，在没有死亡的情况下失访的患者，或者在没有死亡的情况下进行了为期 1 年的临床随访的患者也被排除在外。

脊索瘤组织微阵列载玻片和免疫组织化学

使用标准方案制备组织微阵列。脊柱瘤组织的档案块和来自每个病例的代表性 H & E 载玻片由共同作者（GPN）和参与该研究的病理学家在显微镜下进行评价。在相应的 H & E-藏红花染色的载玻片上鉴定脊索瘤区域。从每个福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤的组织学鉴定的代表性区域取三个核心活检组织（直径 0.5mm）。将相关阵列的 5 μ m 切片的载玻片在 60 $^{\circ}$ C 下烘烤 1 小时，在二甲苯中脱石蜡 10 分钟，通过 100%乙醇转移 5 分钟，然后用梯度乙醇再水合。通过在 3%过氧化氢的甲醇溶液中孵育 10 分钟来淬灭内源过氧化物酶活性。根据制造商的指示，用 Target Retrieval Solution（Vector Laboratories）处理抗原修复。在抗原修复后，将载玻片在室温下用 PBS 洗涤三次。通过将载玻片在 PBS 中的 5%正常山羊血清和 1%牛血清白蛋白中孵育 1 小时来进行非特异性蛋白质阻断。将第一抗体在 4 $^{\circ}$ C 下应用 1%牛血清白蛋白和 5%正常山羊血清过夜（pStat3 抗体 1: 100 稀释; Cell Signaling Technology）。在 PBS 中洗涤 2 分钟三次后，用 Vectastain ABC 试剂盒（Vector Laboratories）检测结合的抗体，并用 3,3'-二氨基联苯胺高灵敏度底物（Vector Laboratories）显色。最后，

脊索瘤组织微阵列的免疫组织化学染色

使用光学显微镜，对于 pStat3 显示阳性核染色的细胞百分比由两名不知道样品来源的研究者独立评估。使用 Duan 等人描述的方案将染色模式分为六组。(18)：0，无核染色；1 +， <10% 的细胞染色阳性；2 +， 10% 至 25% 的阳性细胞；3 +， 26% 至 50% 阳性细胞；4 +， 51% 至 75% 阳性细胞；5 +， > 75% 阳性细胞。将脊索瘤患者亚组成 pStat3 低染色组 (0-3 级：核染色 < 50%) 或 pStat3 高染色组 (4 级和 5 级：核染色 > 51%)。使用具有附加的 SPOT RT 数码相机 (Diagnostic Instruments) 的 Nikon Eclipse Ti-U 荧光显微镜 (Nikon) 记录光学显微图像。

人脊索瘤细胞系

人脊索瘤细胞系 U-CH1 获自 University of Hospital of Ulm (27)。人脊索瘤细胞系 GB 60 由天主教大学医学院提供 (28)。在该实验室中建立了人脊索瘤细胞系 CH8。所有三种脊索瘤细胞系在补充有 10% 胎牛血清，100 单位/ mL 青霉素和 100 μ g/ mL 链霉素 (均来自 Invitrogen) 的 DMEM 中培养。

蛋白质印迹分析

通过用 1 \times 放射免疫沉淀测定裂解缓冲液 (Upstate Biotechnology) 裂解产生来自脊索瘤组织和细胞的蛋白质裂解物。使用 Protein Assay Reagents (Bio-Rad) 和分光光度计 (Beckman DU-640; Beckman Instruments) 测定蛋白质浓度。在 Nu-Page 4% 至 12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen) 上处理 40 微克总蛋白质并转移至纯硝酸纤维素膜 (Bio-Rad Laboratories)。针对 Stat3, pStat3, Bcl-xL, MCL-1 和聚 (ADP-核糖) 聚合酶的抗体获自 Cell Signaling Technology。针对肌动蛋白的抗体获自 Santa Cruz Biotechnology。将一抗在含有 0.1% 吐温 20 的 TBS (pH 7.4)

中以 1: 1000 稀释温育, 并在 4°C 下过夜。通过与辣根过氧化物酶缀合的第二抗体 (Bio-Rad) 一起温育产生信号, 所述第二抗体在 TBS (pH7.4) 中与 5% 脱脂乳和 0.1% 吐温 20 以 1: 2000 稀释在室温下孵育 1 小时。通过使用 SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Pierce) 检测阳性免疫反应。

细胞毒性测定

多柔比星和顺铂是通过麻省总医院药房提供的未使用的残留临床材料获得的。根据药物规格制备药物储备溶液并储存在 -20°C。Stat3 抑制剂 SD-1029 通过国家癌症研究所获得 (标识符: NSC 371488; 参考文献 26)。如 Yang 等人先前所述, 通过 MTT 测定 (Sigma) 进行体外细胞毒性测定。(29)。简而言之, 3×10^3 将每孔的细胞接种在 96 孔板中。将细胞接种在含有 SD-1029 和/或化学治疗药物多柔比星或顺铂的 DMEM 中。在 SD-1029 和/或化学治疗药物中培养 7 天后, 向每个孔中加入 10 μ L MTT (PBS 中 5mg / mL), 并将板孵育 4 小时。将得到的甲 product 产物用酸 - 异丙醇溶解, 并在 SPECTRAmax 微孔板分光光度计上读取波长为 490nm (A 490) 的吸光度。实验一式两份进行。使用 GraphPad PRISM 4 软件 (GraphPad 软件) 拟合剂量 - 反应曲线。

三维培养和细胞毒性测定

使用先前描述的方案 (30) 在重构的基底膜上进行细胞毒性测定。将生长因子减少的基质胶加入到 8 孔玻璃腔室载玻片的每个孔中并均匀地铺在孔中以形成厚度为 ~1 至 2mm 的基底膜。然后将单细胞悬浮液接种在固化层上。细胞在测定培养基 (含有 2% 马血清, 0.5 μ g / mL 氢化可的松, 100ng / mL 霍乱毒素, 10 μ

g/ mL 胰岛素, 100 单位/ mL 青霉素 G 和 100mg / mL 的 DMEM / F-12) 中生长。链霉素加 5 ng / mL 表皮生长因子和 2% 基质胶。细胞在 5% CO₂ 中生长加湿培养箱, 37°C。每 4 天用含有 2% 基质胶和 5ng / mL 表皮生长因子的测定培养基重新培养细胞。培养 4 天后, 用 6 μ mol/ L SD-1029 处理脊索瘤细胞 8 天。基于 MTT 的结果选择 SD-1029 在三维培养中的浓度(图 3)。然后使用胰蛋白酶(0.25% 胰蛋白酶, 0.1% EDTA) 从基质胶培养物中分离脊索瘤细胞。使用 Debnath 等描述的方案通过细胞计数评估细胞增殖活性。(30) 实验一式两份进行。

免疫荧光

出于免疫荧光的目的, 用 3 μ mol/ L SD-1029 处理三维培养中的脊索瘤细胞 8 天。选择非致死剂量的 SD-1029 用于免疫荧光测定。8 天后, 将脊索瘤细胞在 2% 多聚甲醛中固定 20 分钟, 然后用 0.1% Triton X-100 (PBST) 透化。用 1% 牛血清白蛋白封闭透化细胞。然后将细胞与在 PBST 中以 1: 200 稀释的一抗在室温下孵育 1 小时。针对 pStat3 的抗体获自 Cell Signaling Technology。用 PBST 洗涤细胞, 并在室温下与 Alexa 偶联的二抗 (Invitrogen) 一起温育 1 小时。为了复染细胞核, 将脊索瘤细胞与含有 1 μ g/ mL Hoechst 33342 (Invitrogen) 的 PBST 一起温育 1 分钟。

数据分析

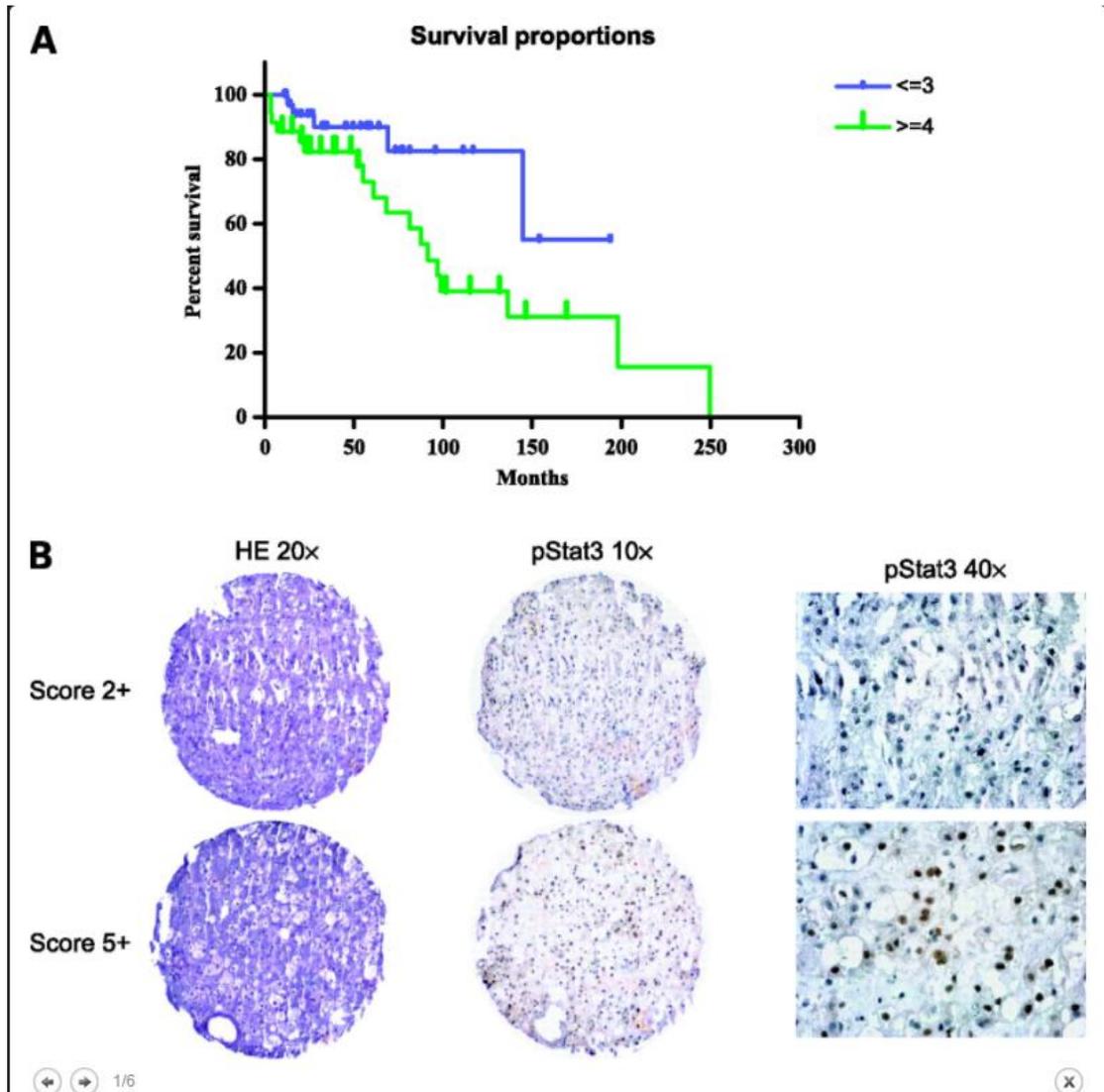
值代表两次或多次实验中的重复测定。通过 Kaplan-Meier 存活分析 (GraphPad PRISM 4 软件) 分析 pStat3 表达水平与预后之间的相关性。使用双侧 Student's t 检验 (GraphPad PRISM 4 软件) 比较原发性肿瘤, 复发性肿瘤和肿瘤转移中的

pStat3 强度评分。还使用双侧 Student's t 检验评估 SD-1029 和化学治疗药物在脊索瘤细胞中的治疗效果。误差棒是平均结果的 SD, P 值<0.05 被认为是平均值之间的显著差异。

结果

pStat3 的表达水平及其与临床预后的关系

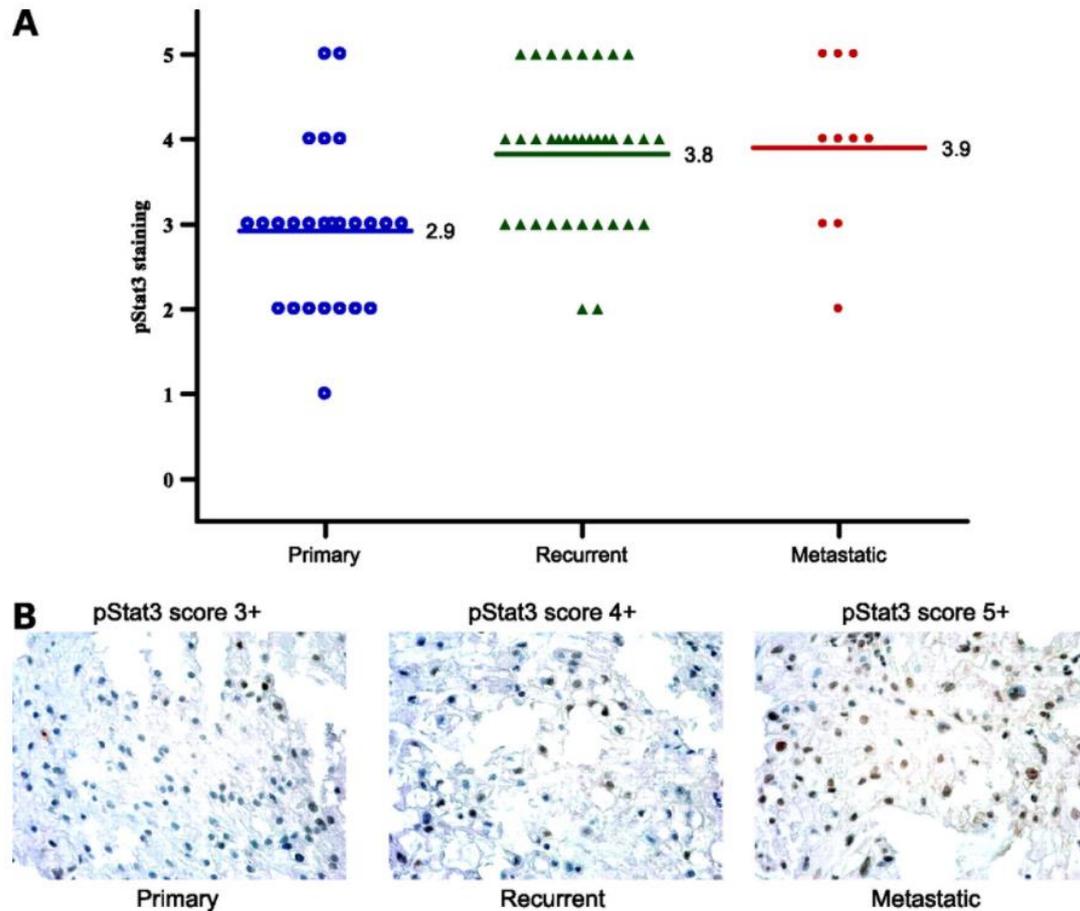
在马萨诸塞州综合医院治疗脊索瘤的 89 名患者在马萨诸塞州综合医院病理学系存放了档案组织。由于非传统的脊索瘤亚型的诊断, 或者由于跟进不足, 排除了 19 名患者, 留下 70 个样本符合研究范围。人口包括 51 名男性和 19 名女性。介绍时的平均年龄为 59.5 岁(范围 29-88 岁)。大多数肿瘤涉及骶骨($n=44, 62.8\%$), 而 26 涉及移动脊柱。免疫组织化学分析确定组织微阵列上存在的所有肿瘤对细胞核中的 pStat3 具有阳性染色。来自 70 个个体患者的肿瘤样品组中 pStat3 核染色的相对水平评分为 pStat3 (1+) 阳性的肿瘤细胞核的<10%至 pStat3 阳性的>75% (5+)。我们基于上述标准相应地对低染色和高染色组进行了分组, 并将患者预后与 pStat3 的表达水平进行了比较。在所研究的 70 名患者中, 有 35 名 (50%) 患者被分类为低染色, 35 名 (50%) 被分类为 pStat3 的高染色 (表 1)。低染色和高染色组患者的平均随访时间为 59.3 个月 ($n=35$) 和 68.1 个月 ($n=35$; $P=0.48$)。当比较低染色和高染色脊索瘤的临床特征时, pStat3 表达与年龄 ($P=0.12$), 性别 ($P=0.79$) 或肿瘤位置 ($P=0.69$; 表 1) 之间没有显著关系。低染色组和高染色组之间脊索瘤患者的 Kaplan-Meier 生存分析显示, 对于 pSTAT3 的高染色组中患者的预后比那些 pSTAT3 的低染色组 (在显著更糟 $P=0.039$; 图 1)。



总体预后与 pStat3 表达的关系。A， Kaplan-Meier 生存分析显示 pStat3 高表达患者的预后低于低表达患者 ($P = 0.039$)。B， pStat3 在低染色 (2+) 和高染色 (5+) 脊索瘤组织中的代表性表达。

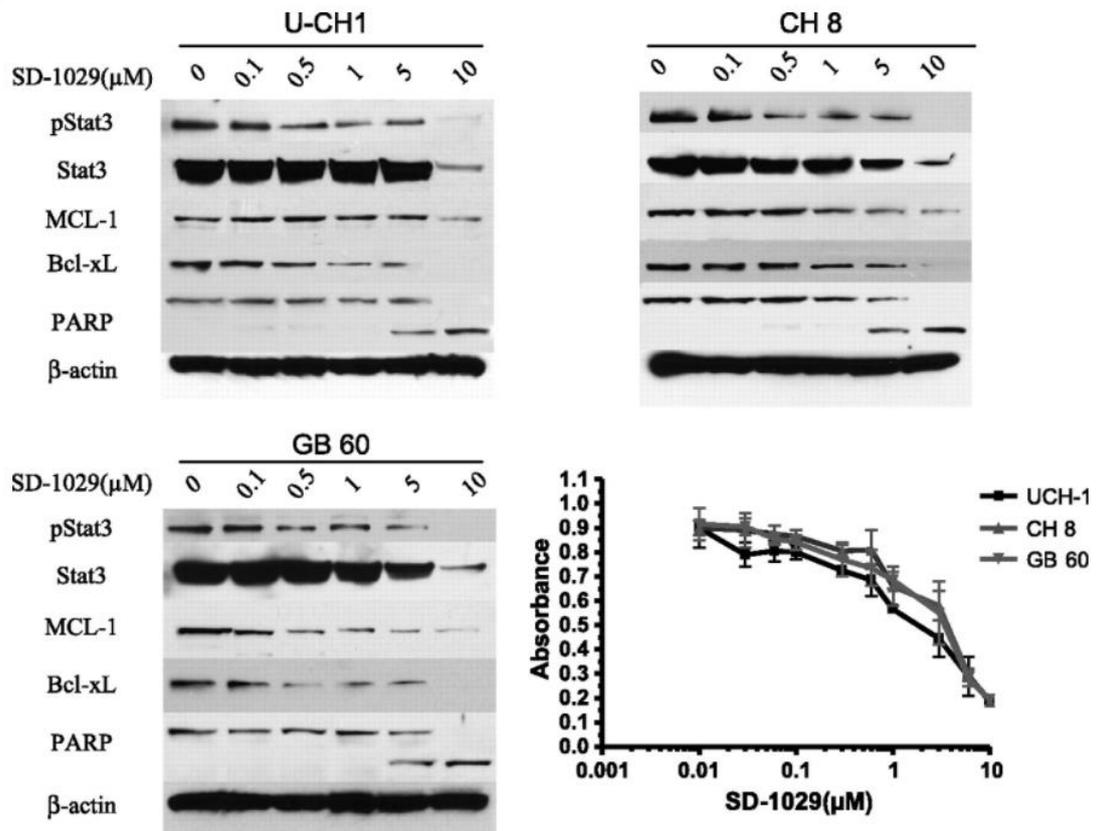
pStat3 在复发性脊索瘤和脊索瘤转移中的表达增加

我们接下来比较了原发性，复发性和转移性脊索瘤中的 pStat3 表达。与原发性肿瘤相比，我们在复发肿瘤中观察到更高水平的 pStat3 ($P = 0.0002$) 表达 (图 2)。我们还观察到与没有转移的原发性肿瘤相比，具有转移的肿瘤中 pStat3 表达强度的增加 ($P = 0.01$)。



原发性脊索瘤中 pStat3 表达与复发和转移性病变的比较。A， pStat3 免疫组织化学染色在原发性，复发性 and 转移性病变中的分布。B， pStat3 在匹配的原发性，复发性 and 转移性脊索瘤中的代表性表达

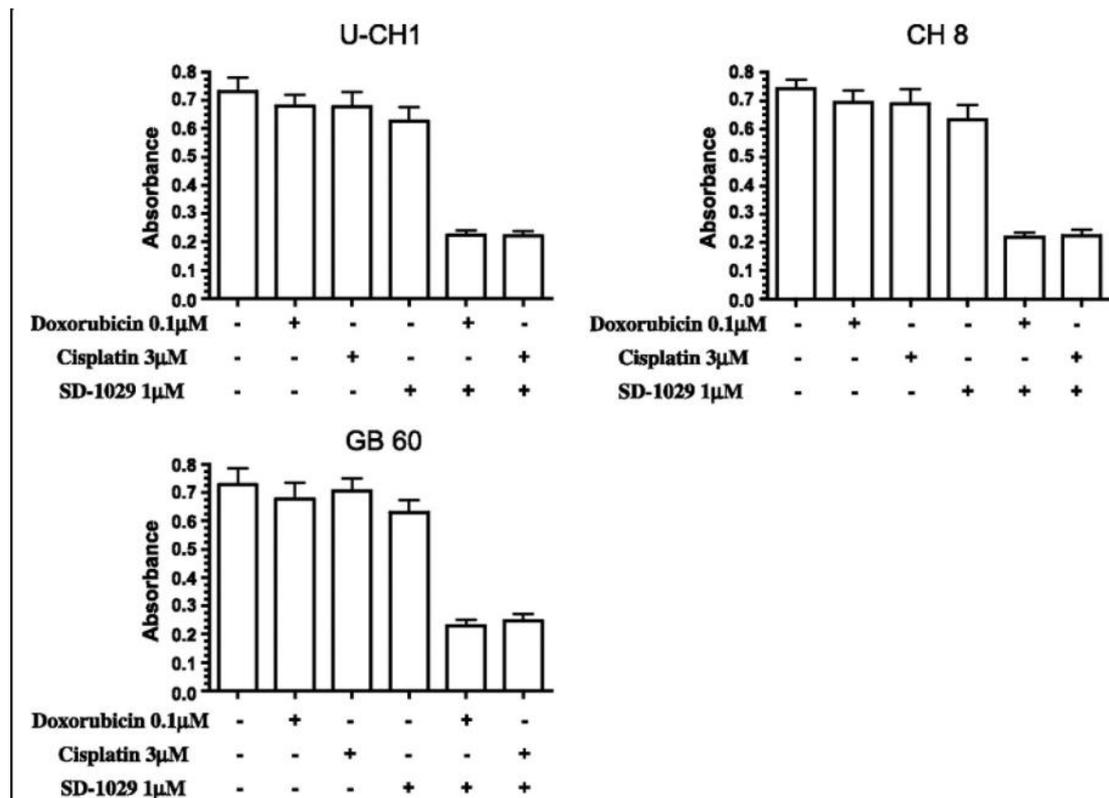
为了评估 Stat3 抑制剂 SD-1029 是否可以阻断 Stat3 途径，诱导细胞凋亡和抑制脊索瘤细胞的生长，用 SD-1029 处理三种脊索瘤细胞系，包括 U-CH1，CH8 和 GB60。蛋白质印迹分析显示，用 SD-1029 处理后，在所有三种脊索瘤细胞系中 Stat3 和 pStat3 的表达受到抑制。在用 SD-1029 处理后，三种脊索瘤细胞系中抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 MCL-1 的表达也被抑制。我们观察到，用 SDT 测量的所有三种脊索瘤细胞系的生长在用 SD-1029 处理后被抑制。在用 SD-1029 处理后，在所有三种脊索瘤细胞系中检测到聚（ADP-核糖）聚合酶切割，凋亡相关的生化事件（图 3）。



U-CH1, CH8 和 GB60 细胞的 Western 印迹图像, SD-1029 浓度从 0 增加到 10 μm。注意在较高剂量的 SD-1029 下 Stat3, pStat3, Bcl-xL 和 MCL-1 的抑制。在用 SD-1029 处理后, 在所有三种脊索瘤细胞系中也检测到聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 切割。MTT 测定的图显示在用 SD-1029 处理后所有三种脊索瘤细胞系的生长受到抑制。

SD-1029 和化学治疗药物组合的细胞毒性明显优于单独的任何一种药物

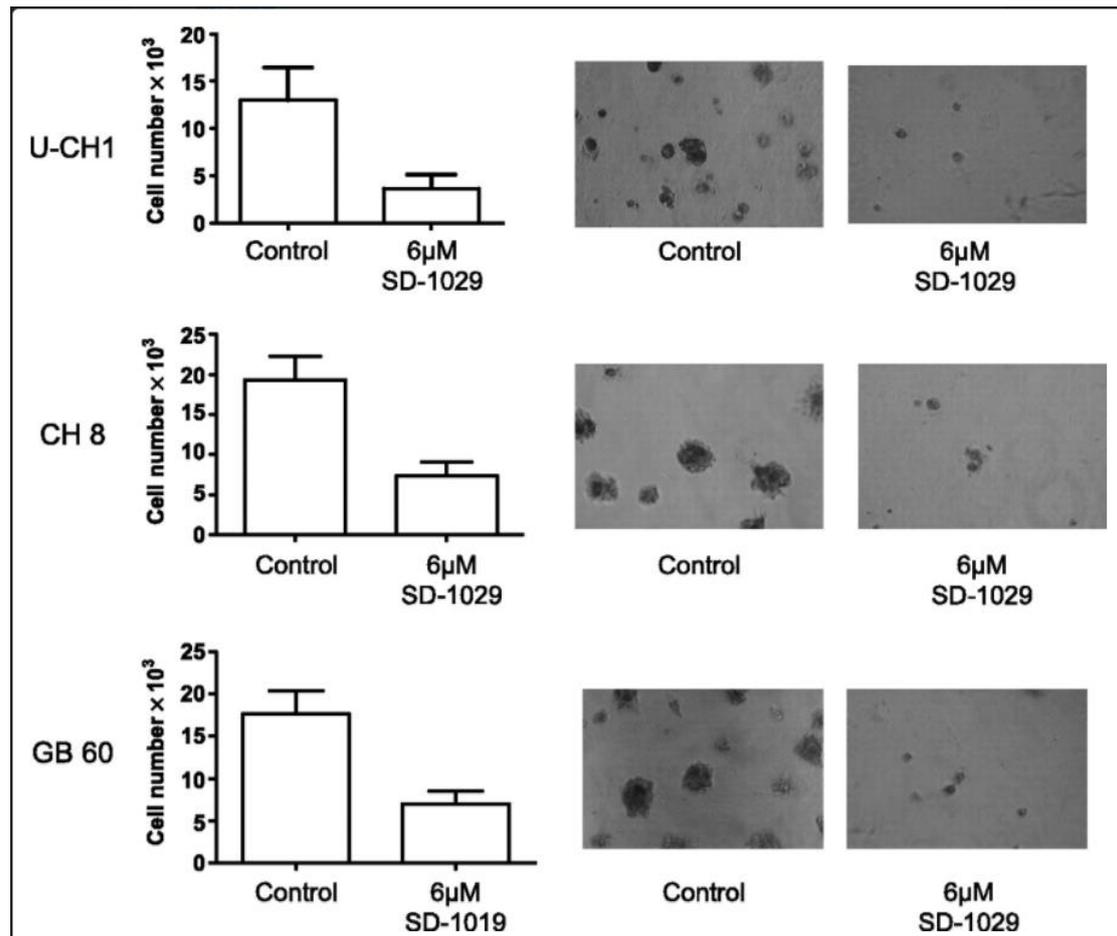
为了进一步证实 Stat3 通路在脊索瘤细胞中的作用, 我们通过 MTT 评估了 SD-1029 对顺铂和多柔比星诱导的细胞死亡 (化疗药物) 的影响。用 SD-1029 和非致死剂量的化学治疗药物治疗脊索瘤细胞。细胞毒性测定显示, 用 SD-1029 和顺铂组合或 SD-1029 和多柔比星的组合处理后, 所有三种脊索瘤细胞系的生长受到显著抑制 ($P < 0.01$)。这表明通过 SD-1029 和化学治疗药物的组合诱导的脊索瘤细胞死亡明显优于单独的任一种药物 (图 4)。



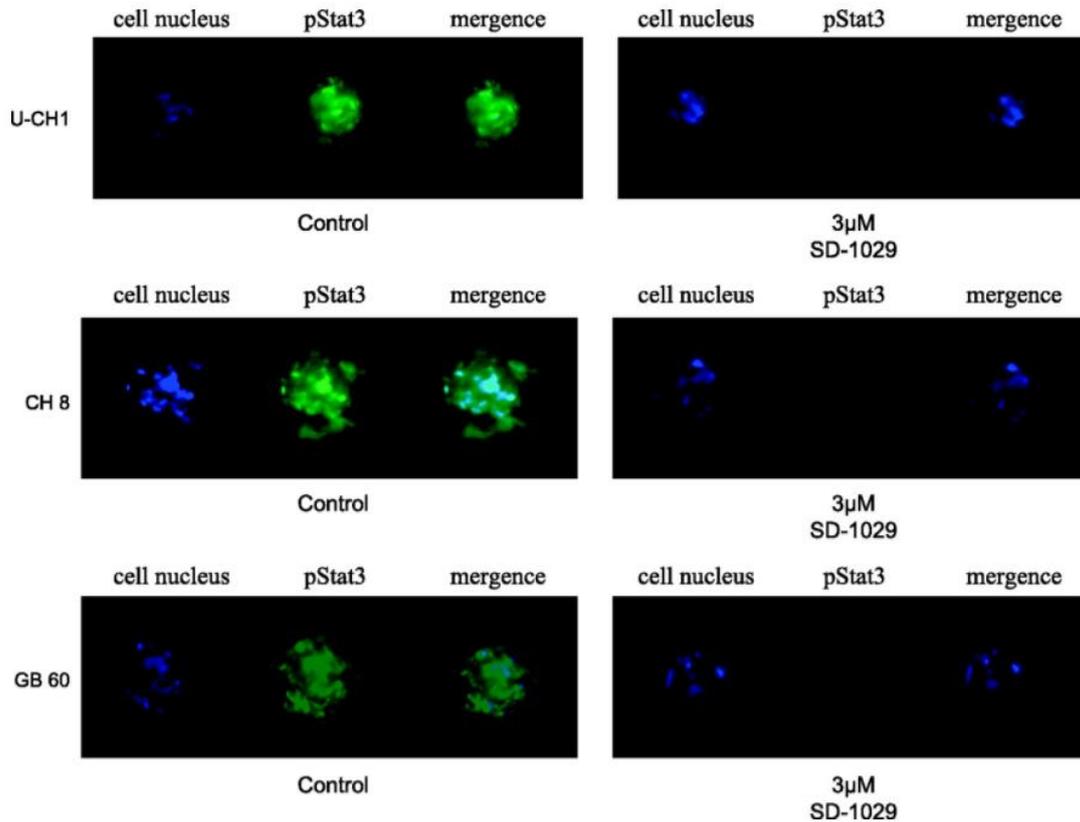
用 SD-1029 和化学治疗剂治疗脊索瘤细胞的细胞毒性测定。细胞毒性测定的条形图显示通过用 SD-1029 和化学治疗剂的组合处理抑制所有三种脊索瘤细胞系的生长。

SD-1029 阻断 Stat3 通路并抑制三维培养中脊索瘤细胞的生长

由于细胞结构可能对药物摄取，分布和功效具有显著影响，因此癌细胞系中三维模型中的药效可能显著低于二维单层（31）。为了评估 SD-1029 在三维培养中是否可以抑制脊索瘤细胞的生长，我们测量了 SD-1029 对脊索瘤细胞系的影响。细胞计数显示，用 SD-1029 处理后，三维培养中脊索瘤细胞的生长受到显著抑制（图 5）。免疫荧光分析显示，在用三维培养物中的 SD-1029 处理后，在所有三种脊索瘤细胞系中 pStat3 的表达被抑制（图 6）。



脊索瘤细胞用 SD-1029 在三维培养中处理。用 SD-1029 处理的三维培养中的脊索瘤细胞的条形图和代表性图像。



免疫荧光分析 Stat3 在三维培养中的表达。脊索瘤的免疫荧光图像显示 SD-1029 对三维培养物中 pStat3 表达的影响。

讨论

目前，脊索瘤的有效治疗仍然是一个挑战。即使在宽的手术切除的情况下，所述肿瘤是已知的频繁复发，并且在这样的情况下，病变更可能积极的行为和转移(5, 7, 11, 32, 33)。有效治疗脊索瘤的主要障碍是目前没有能够预测预后的可识别的生物标志物。最近的研究表明，Stat3 的可能是在某些癌症（预后的重要标志物 16, 23, 34 - 36），但其在脊索瘤肿瘤的作用尚未阐明。

Stat3 是肿瘤发生的主要介质 (37)，并且已发现几种癌症中 Stat3 途径的激活与高组织学分级和晚期阶段相关。最近的研究也以几种不同的癌症，包括前列腺癌，肺癌，卵巢癌和胃肠道（连接的 Stat3 到转移进程 16, 18, 20 - 22）。Stat3

的对这些癌症的转移潜能的影响发生通过多种分子机制 (35, 38 - 40) 。该研究调查了 70 名脊索瘤患者组织样本中 pStat3 的免疫组织化学染色, 并试图建立表达和结果之间的关系。

结果表明 Stat3 似乎在研究中的所有脊索瘤组织中被激活, 并且 50% 的样品显示 pStat3 的高水平染色 (> 50% 的肿瘤细胞核阳性)。与肿瘤染色不良的患者相比, pStat3 染色高的肿瘤患者的总体存活率显著降低。与原发病灶相比, 复发肿瘤以及具有转移的肿瘤中 pStat3 表达也有显著趋势。这表明 pStat3 在癌症病变中的高表达可能是脊索瘤患者预后不良的有用生物标志物。

Stat3 的已被证明是用于肿瘤细胞的生长, 增殖和细胞凋亡 (至关重要 41 - 43) 。模型系统中 Stat3 的抑制已显示肿瘤细胞的存活和增殖减少 (24) 。所述大的身体数据验证 Stat3 的作为癌症治疗的潜在靶标, 和正常细胞到 Stat3 的功能丧失的公差, 已驱动的努力来鉴定能够抑制的 Stat3 (分子 17, 25) 。SD-1029 已被确定为 Stat3 激活的新型抑制剂 (26) 。该分子阻断 Jak 活性, 结果抑制 Stat3 磷酸化, 核转运和 Stat3 依赖性转录的减少。这些作用最终导致几种人类乳腺癌和卵巢癌细胞系的细胞凋亡 (26) 。脊索瘤中 Stat3 的激活表明该途径也可以作为治疗这些肿瘤的潜在靶标。

在该研究中, SD-1029 似乎抑制 Stat3 在三种脊索瘤细胞系中的表达和活化。这导致抗细胞凋亡蛋白 Bcl-xL 和 MCL-1, 聚 (ADP-核糖) 聚合酶切割的表达降低, 并且脊索瘤细胞系的生长减少。这些发现可能表明 SD-1029 是治疗脊索瘤的可

行药物。

先前的研究表明,潜在的抗癌药物的功效在体内的情况相比的不同之在体外使用单层生长的癌细胞(研究 31, 44)。由于癌细胞系三维培养长期以来一直提倡的恶性表型的一个更好的模型的体内(31, 45)中,我们评估三维培养 SD-1029 对脊索瘤细胞系的影响。这种测试证实 SD-1029 还可以阻断 Stat3 途径并抑制脊索瘤的生长,甚至在三维培养的细胞中也是如此。

虽然人们早就知道脊索瘤对化疗药物有抗药性,但这种抗药性的机制仍然未知。最近,一些研究已经表明,Stat3 的在耐药卵巢癌细胞系和 Stat3 信号的中断高度活化可逆转对化学治疗剂(电阻 18, 46)。与匹配的原发性肿瘤相比,耐药性复发性卵巢癌具有显着更高的 pStat3 表达(18)。的 STAT3 通路的组成性激活也已显示赋予对化学疗法诱导的细胞凋亡抗性在许多癌细胞系(47 - 50)。在本研究中,我们发现脊索瘤组织中 Stat3 的组成型活化和 pStat3 的表达水平与脊索瘤患者的疾病严重程度和预后相关。另外,SD-1029 对 Stat3 途径的阻断似乎使脊索瘤细胞对化学治疗剂敏感。

这些发现表明 Stat3 途径也可能在脊索瘤的化疗耐药中起作用。虽然不是脊索瘤特异性的,但 SD-1029 可以作为使用常规化学治疗剂成功控制这些肿瘤的潜在佐剂。然而,在得出明确的结论之前,必须进行更多这方面的研究。

总之,本研究表明 Stat3 途径在脊索瘤中是组成型激活的,并且这些病变中 pStat3

的高表达可以作为预后的生物标志物。另外，Stat3 途径的有效阻断导致脊索瘤细胞凋亡并在体外抑制细胞增殖。这突出了 pStat3 作为脊索瘤治疗中分子治疗的可能靶点的潜力。

文章来源：<http://mct.aacrjournals.org>