

[文章编号] 1000-4718(2007)06-1049-04

Stat5b/Survivin 信号转导通路调控结肠癌 细胞凋亡的机制*

马向涛¹, 余力伟¹, 王杉², 杜如昱², 崔志荣²(¹北京海淀医院外科, 北京 100080; ²北京大学人民医院外科, 外科肿瘤研究室, 北京 100044)

[摘要] 目的: 探讨 Stat5b/Survivin 信号转导通路调控结肠癌细胞凋亡的作用机制。方法: 用阳离子脂质体介导 Stat5 反义寡核苷酸转染人结肠癌 HT29 细胞, MTT 法检测细胞增殖状态; 流式细胞术检测细胞周期与凋亡; EMSA 检测 Stat5 活性; Western blotting 检测 Stat5、p-Stat5、cyclin D1、Survivin 与 Bcl-2 凋亡家族成员 Bcl-2 和 Bcl-x_L 的表达。结果: 转染 Stat5 反义寡核苷酸后 HT29 细胞增殖受抑制, 凋亡细胞增多, Stat5、p-Stat5 与 Survivin 表达下降, Bcl-2 与 Bcl-x_L 变化不明显。结论: 阻断 Stat5 通路可以抑制靶基因 *Survivin* 表达并诱导结肠癌细胞凋亡。

[关键词] 结肠肿瘤; 信号转导; 细胞凋亡; 存活素

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A

Stat5b signaling pathway regulates the expression of Survivin and promotes apoptosis in human colon cancer cells

MA Xiang-tao¹, YU Li-wei¹, WANG Shan², DU Ru-yu², CUI Zhi-rong²(¹ Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China; ² Department of Surgery and Division of Surgical Oncology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China. E-mail: xiangtao_ma@pku.org.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** The purpose of the study was to examine colon cancer cell lines to determine whether Stat5b/Survivin plays an important role in the process of apoptosis in colon cancer cells. **METHODS:** Protein lysates were extracted from colon cancer cells. Human colon cancer cell line HT29 was transfected with Stat5b antisense oligonucleotide mediated by liposome. MTT assay was used to measure the proliferation. Flow cytometry was applied to analyze the cell cycle and apoptosis. EMSA was used to detect the activity of Stat5. Western blotting was applied to measure the expression of Stat5, p-Stat5, cyclin D1, Survivin, Bcl-2 and Bcl-x_L. **RESULTS:** Targeting of Stat5 using antisense oligonucleotide against the translation site resulted in apoptosis and downregulated the expressions of Stat5, p-Stat5, cyclin D1 and Survivin, but not Bcl-2 and Bcl-x_L. **CONCLUSION:** Constitutive activation of Stat5 is associated with the carcinogenesis of colon cancer cells. Blocking of Stat5 signaling inhibits the expression of Survivin and induces apoptosis in colon cancer cells.

[KEY WORDS] Colonic neoplasms; Signal transduction; Apoptosis; Survivin

Stat5 是转录信号转导子与激活子通路 (signal transducers and activators of transcription, STATs) 的重要成员, 该通路接受生长因子与细胞因子等细胞外信号刺激, 调节细胞增殖、分化及凋亡^[1]。已发现 Stat5 在白血病、头颈部鳞癌及乳腺癌等多种肿瘤组织及细胞系中呈持续活化^[2]。Survivin 是新近发现的凋亡抑制因子, 在胚胎发育时期有较高的表达, 在正常成体组织一般很少表达, 而在大多数肿瘤组织中均可见 Survivin 的异常高表达^[3]。Survivin 可以抑制由多种刺激诱导的凋亡, 但是关于

Survivin 在结肠癌发生发展过程中的作用还有待进一步研究^[4]。本研究通过阻断结肠癌细胞中 Stat5 通路, 探讨 Stat5b/Survivin 信号转导通路调控结肠癌细胞凋亡的机制。

材料和方 法

1 细胞培养

人结肠癌细胞 HT29, 培养于含有 10% 胎牛血清 (美国 HyClone 公司) 的 RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco-BRL 公司)。

[收稿日期] 2005-09-21 [修回日期] 2006-03-31

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30271269)

Tel: 010-62639764; E-mail: xiangtao_ma@pku.org.cn

2 Stat5 寡核苷酸的合成与纯化

Stat5 反义寡核苷酸根据 Stat5 翻译起始点合成,同时本研究还设立了正义寡核苷酸链和错配寡核苷酸链作为对照组,错配链的序列在 GenBank 数据库进行同源性检索,未发现同源序列。Stat5 反义寡核苷酸序列:5'-CCA CAC AGC CAT GTT TAC CCG-3';Stat5 正义寡核苷酸序列:5'-CGG GTA AAC ATG GCT GTG TGG-3';Stat5 错配寡核苷酸序列:5'-CCA CAG AGC CAT GTT TTC CCG-3'。以上寡核苷酸由(美国 Santa Cruz 公司)合成及纯化。

3 阳离子脂质体转染

LipofectAmine2000 (美国 Gibco-BRL 公司),转染过程参照 Gibco-BRL 公司手册。分为空白对照组、正义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组与反义寡核苷酸组。

4 细胞增殖状态检测(MTT 法)

接种细胞于 96 孔板,贴壁后,无血清培养细胞 16-24 h,使细胞同步化。空白对照组加无血清培养基,正义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组与反义寡核苷酸组分别加入脂质体及 Stat5 正义寡核苷酸、错配寡核苷酸与反义寡核苷酸至浓度达到 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$,第 0、24、48、72 h 分别加入 MTT 5 g/L (Sigma),继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 200 μL ,酶标仪测定 540 nm 吸光度,绘制生长曲线。

5 细胞周期检测

接种细胞于 96 孔板,贴壁后,无血清培养细胞 16-24 h,使细胞同步化。实验分 4 组,即空白对照组、正义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组与反义寡核苷酸组。每个研究点设置 3 组平行对照,重复 3 次实验取平均值。空白对照组加无血清培养基,正义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组与反义寡核苷酸组分别加入脂质体及 Stat5 正义寡核苷酸、错配寡核苷酸与反义寡核苷酸继续培养,第 0、24、48、72 h 分别消化细胞,0.5 mL PBS 重悬细胞,70% 冰乙醇固定细胞过夜,加入 RNase A 至终浓度 50 mg/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 1 h,加入 PI(Sigma)至终浓度 50 mg/L,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 1 h,上流式细胞仪 FACScan(Becton-Dickinson)检测,资料用 Cell Quest 细胞周期分析软件处理。

6 细胞凋亡检测

同步化处理及单细胞悬液制备同前,应用凋亡检测试剂盒,PBS 离心洗涤 2 次,200 μL 结合缓冲液重悬,加入 Annexin V-FITC 至终浓度 1 mg/L,加入 PI 至终浓度 2.5 mg/L,室温避光染色 15 min,上流式细胞仪 FACScan(美国 Becton-Dickinson 公司)检测。

7 细胞总蛋白、胞浆蛋白与核蛋白提取

7.1 细胞总蛋白提取 细胞于裂解缓冲液中裂解(150 mmol/L 氯化钠;1% 过氧胆酸钠;1% Triton X-100;0.1% 十二烷基磺酸钠;10 mmol/L Tris, pH 7.2;1 mmol/L 正钒酸钠;1 mmol/L 苯甲磺酰氟;1 mmol/L 氟化钠;0.1 mmol/L 抑肽酶;1 mmol/L 亮抑蛋白酶肽)。裂解液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 r/min 离心 30 min,收集上清液得到细胞总蛋白。

7.2 胞浆蛋白提取 收集细胞悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 r/min 离心 2 min;胞浆缓冲液(20 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸,pH 7.9;10 mmol/L 氯化钾;10% 甘油;1 mmol/L 乙二胺四乙酸;1 mmol/L 二硫苏糖醇;0.1 mmol/L 正钒酸钠;1 mmol/L 苯甲磺酰氟)重悬,裂解产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 r/min 离心 5 min,收集上清液得到胞浆蛋白。

7.3 细胞核蛋白提取 收集细胞悬液,用低渗缓冲液于冰上裂解细胞 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 r/min 离心 1 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用高盐缓冲液(420 mmol/L 氯化钠;20 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸,pH 7.9;10 mmol/L 氯化钾;20% 甘油;1 mmol/L 乙二胺四乙酸;1 mmol/L 二硫苏糖醇;0.1 mmol/L 正钒酸钠;1 mmol/L 苯甲磺酰氟)重悬粗提的细胞核,振荡 30 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 13 000 r/min 离心 10 min;取上清为核提取物,贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.4 蛋白浓度测定方法(Bradford 法) 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,根据蛋白定量试剂盒(Bio-Rad)手册绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 595 nm 下测吸光度(A)值,计算提取液蛋白浓度。

8 Western blotting

在进行 Western blotting 之前将蛋白提取物与 2 \times 十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液按 1:1 混合(125 mmol/L Tris-HCl,pH 6.8;4% 十二烷基磺酸钠;20% 甘油;10% 2-巯基乙醇)后 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下加热 5 min。取蛋白样品 50 μg ,7.5% - 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 PVDF 膜上。电泳时在聚丙烯酰胺凝胶中加入预染标准分子量蛋白作为指示。转膜后用 TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5;150 mmol/L 氯化钠;0.5% Tween-20)与 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min。封闭后,加入 I 抗(Stat5,p-Stat5,Survivin,cyclin D1,Bcl-2,Bcl-x_L,GAPDH)(Santa Cruz),工作浓度 1:1 000;GAPDH 作为内参照,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,用 TBST(每次 5 min)洗膜后,与辣根过氧化物酶结合的 II 抗(Amersham)孵育 30 min,工作浓度 1:1 000。然后用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号。细胞核蛋白样品 50 μg 上样于 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶经电泳分

离后,电转移至 PVDF 膜(Millipore),封闭后,辣根过氧化物酶结合的 II 抗(Amersham),工作浓度 1:1 000。用 ECL(Amersham)化学发光试剂盒检测杂交信号。

9 凝胶电泳迁移率变动分析(EMSA)

从细胞的核提取物中取 10 μg 核蛋白,于 4 °C 与 5 × 结合缓冲液及 1 μg 的 poly(dI · dC)(Pharmacia)。合成的 SIE 寡核苷酸探针于 1 条链的末端用 [γ -³²P]ATP(美国 Du Pont New England Nuclear)标记。EMSA 混合物包括 [³²P]末端标记的寡核苷酸与核蛋白提取物使终体积达到 20 μL,加入 1 μg BSA 与 1 μg poly(dI · dC)作为非特异的竞争物继续与室温孵育 20 min。反应混合物上样于 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶,于 0.5 × TAE 电泳缓冲液中 200 V 电泳 2 h。为加强凝胶电泳的分辨率,延长电泳时间到 3.5 h,使未结合的探针从凝胶的底部溢出。电泳后的凝胶经干胶后于 -70 °C 加强屏放射自显影(美国 Kodak 公司放射自显影胶片)。

10 吸光度测定

用 PhosphoImager 图像分析仪(Molecular Dynamics)测定条带的吸光度(A)值,以 A 值代表蛋白的相对表达量。

11 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计学软件,采用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 Stat5b 反义寡核苷酸可以抑制结肠癌细胞增殖

Stat5 反义寡核苷酸作用 HT29 细胞 72 h 后,G₁ 期细胞比率由 61.4% ± 5.3% 上升至 75.6% ± 8.9%,S 期细胞比率由 19.4% ± 2.1% 下降至 8.6% ± 1.3%,*P* < 0.05,细胞增殖受抑制,见图 1。

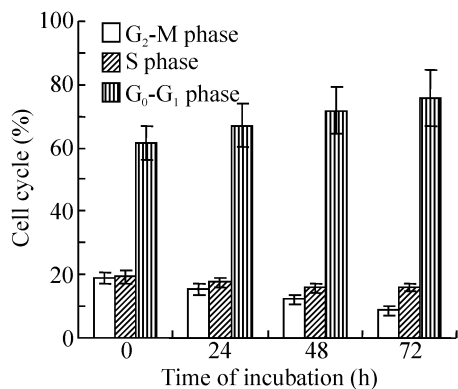


Fig 1 Analysis of cell cycle of HT29.

图 1 HT29 细胞周期检测

2 Stat5b 反义寡核苷酸可以促进结肠癌细胞凋亡

HT29 细胞在转染 Stat5 反义寡核苷酸 72 h 后,凋亡细胞百分比由 5.6% ± 0.6% 增加至 22.1% ±

1.2%,*P* < 0.05,细胞凋亡增多,见图 2。

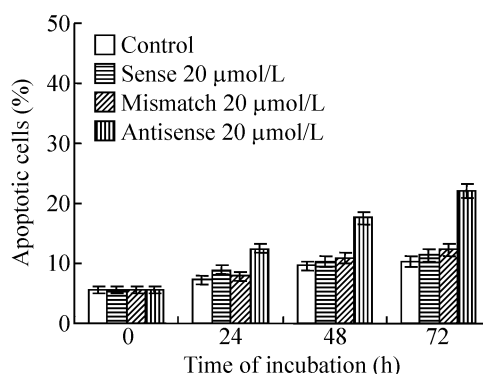


Fig 2 Analysis of cell apoptosis of HT29.

图 2 HT29 细胞凋亡检测

3 Stat5b 反义寡核苷酸可以使 Stat3 信号转导通路成员活性与表达下降

HT29 细胞转染 Stat5b 反义寡核苷酸 72 h 后,Stat5 蛋白表达与活性下调,其靶基因产物 cyclin D1、Survivin 表达下降,Bcl-2 与 Bcl-x_L 变化不明显,见图 3、4。

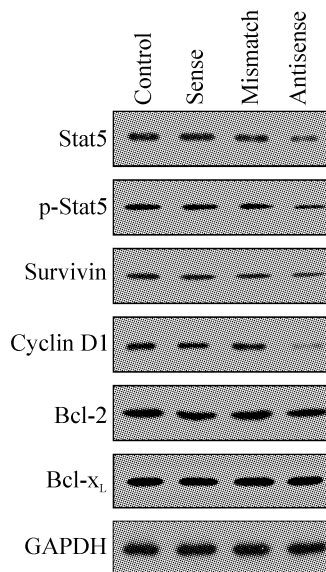


Fig 3 Expression of Stat5 and downstream mediators were analyzed by Western blotting.

图 3 Western blotting 检测 Stat5 通路成员蛋白表达变化

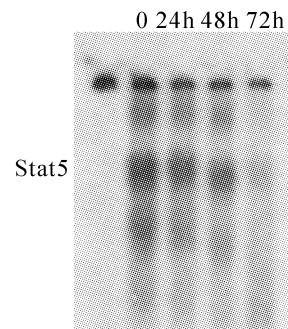


Fig 4 Activity of Stat5 was checked by EMSA.

图 4 EMSA 检测 Stat5 活性变化

讨 论

JAKs/STATs 信号转导通路与细胞的增殖、分化及凋亡关系密切,该通路异常活化可导致细胞异常增殖和恶性转化。其重要成员 Stat1、Stat3、Stat5 在人类白血病、多发性骨髓瘤、头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌以及前列腺癌等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性改变^[1],提示 STATs 成员调控异常与肿瘤发生发展密切相关,而其重要成员 Stat5 在结肠直肠癌发生发展中的作用机制尚不清楚^[2]。

Stat5 包括 Stat5a 与 Stat5b 两种异构体,结构上具有 93% 的同源性。近年研究结果证实 Stat5 与细胞恶性转化密切相关,其中 Stat5 通过激活靶基因而诱导某些关键产物的表达来影响肿瘤的发生,重要的靶基因产物包括影响细胞凋亡的 Bcl-2 家族成员。Bcl-2 家族包括抑凋亡和促凋亡两大类,前者包括 Bcl-2、Bcl-x_L、Mcl-1 等,后者包括 Bax、Bak、Bcl-x_S 等^[6]。Bcl-2 与 Bcl-x_L 是 Bcl-2 家族蛋白成员中主要的抑凋亡分子,它们通过其 BH3 结构域与 Bcl-2 家族中促凋亡蛋白形成异二聚体,调节细胞凋亡。bcl-x 基因启动子上存在多个 STATs 结合位点,Stat5 可直接与 bcl-x 启动子结合而启动转录^[7]。阻断肿瘤细胞中 Stat5 通路后,Bcl-x_L 表达下降,肿瘤细胞增殖受抑制并促进凋亡发生。但是 Bcl-2 家族成员并非是决定细胞凋亡与否的唯一因素,Survivin 也是重要的细胞凋亡抑制因子^[3]。Survivin 在调节细胞凋亡方面具有双重作用,一方面抑制细胞凋亡,另一方面调控细胞有丝分裂。同时 Survivin 表达依赖于细胞周期正常运行,阻断细胞 G₁-S 期,可以抑制 Survivin 表达^[8]。本研究应用 Stat5b 反义寡核苷酸转染结肠癌细胞系 HT29,可以阻断其内源性 Stat3 信号转导通路,Stat5 表达与活性下调,凋亡细胞增加,cyclin D1 与 Survivin 表达下降,但是 Bcl-2 与 Bcl-x_L 变化不明显。其作用机制可能为阻断 HT29 细胞中 Stat5 通路后,失活状态的 Stat5 不能与 Survivin 启动子结合,从而抑制 Survivin 表达,细胞出现凋亡。

总之,Stat5 信号转导通路在结肠癌细胞中的转

录调控机制尚不清楚,Stat5 的异常激活与结肠癌细胞凋亡关系还有待于进一步明确。实验动物模型及临床观察中发现:肿瘤细胞耐受化疗与 Stat5 与 Survivin 异常增高有关^[9],阻断 Stat5 通路可诱导耐药肿瘤细胞凋亡。深入研究 Stat5 信号转导通路调控 Survivin 的作用机制有可能为治疗结肠癌提供新的理论和实验基础^[10]。

[参 考 文 献]

- [1] Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651-662.
- [2] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis[J]. J Clin Invest, 2002, 109(9):1139-1142.
- [3] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8589.
- [4] Li F. Role of Survivin and its splice variants in tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 212-216.
- [5] Ma XT, Wang S, Ye YJ, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1569-1573.
- [6] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [7] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 4138-4143.
- [8] Kanda N, Seno H, Konda Y, et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with Survivin expression in gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4921-4929.
- [9] Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery[J]. Expert Opin Ther Targets, 2004, 8(5): 409-422.
- [10] Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G₁ cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma[J]. Oncogene, 2004, 23(32): 5426-5434.