

# Stat3 信号转导通路调控 bcl-2 成员表达及抑制结肠癌细胞凋亡的机制

马向涛<sup>1</sup>, 余力伟<sup>1</sup>, 王 杉<sup>2</sup>, 张在兴<sup>1</sup>, 杜如昱<sup>2</sup>, 崔志荣<sup>2</sup>

**Stat3 Signaling Pathway Regulates the Expression of bcl-2 Family Members and Promotes Survival of Human Colon Cancer Cells**

MA Xiang-tao<sup>1</sup>, YU Li-wei<sup>1</sup>, WANG Shan<sup>2</sup>, ZHANG Zai-xing<sup>1</sup>, DU Ru-yu<sup>2</sup>, CUI Zhi-rong<sup>2</sup>

1. Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China; 2. Department of Surgery and Division of Surgical Oncology, Peking University People's Hospital

**Abstract :Objective** Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) is activated in response to cytokines and growth factors stimulation, and activation of Stat3 is involved in modulating cell proliferation, differentiation and apoptosis. The purpose of the study was to examine colon cancer cell lines to determine whether Stat3 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 HCT116 was transfected with Stat3 antisense oligonucleotide mediated by liposome, MTT assay was used to measure the proliferation, flow cytometry was applied to analyze the cell cycle and apoptosis, the expression of Stat3, p-Stat3, bcl-2, bcl-xL, Mcl-1 and Caspase-3 were measured by western blot. **Results** Targeting of Stat3 using antisense oligonucleotide directed against the translation site, resulted in apoptosis and downregulation of Stat3, p-Stat3 and bcl-2 family members. **Conclusion** Constitutive activation of Stat3 is associated with the carcinogenesis of colon cancer cells. Blocking of Stat3 signaling could induce apoptosis of colon cancer cells.

**Key words**: Colon neoplasm; Signal transduction pathway; Proliferation; Apoptosis

**摘要:目的** 转录信号转导子与激活子 3 (Signal transducers and activators of transcription 3, Stat3) 通路受细胞因子与生长因子的刺激而活化,参与调节细胞的增殖、分化与凋亡,探讨 Stat3 反义寡核苷酸诱导结肠癌细胞凋亡的作用机制。**方法** 用阳离子脂质体介导 Stat3 反义寡核苷酸转染人结肠癌 HCT116 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;Western blot 检测 Stat3、磷酸化 Stat3 及凋亡家族成员 bcl-2、bcl-xL、Mcl-1、Caspase-3 的表达。**结果** 转染 Stat3 反义寡核苷酸后 HCT116 细胞增殖受抑制,凋亡细胞增多,Stat3、p-Stat3 与 bcl-2 家族成员表达水平下降。**结论** Stat3 信号转导通路活性增高可能与结肠癌发生发展有关,阻断 Stat3 通路可以诱导结肠癌细胞凋亡。

**关键词**:结肠癌;信号转导通路;增殖;凋亡

中图分类号:R735.3<sup>+</sup>5 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)03-0182-03

## 0 引言

Stat3 是转录信号传导子与激活子通路 (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<sup>[1]</sup>。目前已发现 Stat3 在白血病、胃癌、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<sup>[2-5]</sup>,但是关于 Stat3 在调控结肠癌细胞凋亡过程中的作用还有待进一步研究。本研究应用 Stat3 反

义寡核苷酸转染人结肠癌细胞,探讨 Stat3 信号转导通路调控结肠癌细胞凋亡的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

结肠癌细胞 HCT116 由北京大学人民医院外科肿瘤研究室保存,培养于含有 10% 胎牛血清(美国 HyClone 公司)的 RPMI1640 培养基(美国 GIBCOL/BRL 公司)。

### 1.2 Stat3 寡核苷酸的合成与纯化

Stat3 反义寡核苷酸根据 Stat3 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。Stat3 反义寡核

收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-03-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271269)

作者单位:1. 100080 北京海淀医院外科;2. 北京大学人民医院外科、外科肿瘤研究室

作者简介:马向涛(1972-),男,博士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤分子生物学研究



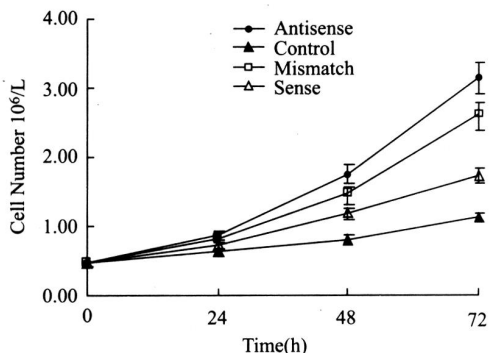
苷酸序列: 5' CCATTGGGCCATCCTGTTTCT 3'; Stat3 正义寡核苷酸序列: 5' AGA AACAGGATGGC-CCAATGG 3'; Stat3 错配寡核苷酸序列: 5' CCATTGCGCCATCGTGTACT 3'。以上寡核苷酸由美国 Santa Cruz 公司合成及纯化。

1.3 阳离子脂质体转染

阳离子脂质体 Lipofect Amine2000(美国 GIBCOL/BRL 公司), 转染过程参照 GIBCOL/BRL 公司手册。

1.4 细胞增殖状态检测(MTT法)

取第 3~6 代生长状态良好的对数生长期细胞, 常规消化、分离、收集细胞、细胞计数及测定细胞活力, 活细胞率达 95%, 按每孔  $4.0 \times 10^5$  个细胞接种于 96 孔板中, 贴壁后, 无血清培养细胞 16~24h, 使细胞同步化。实验分为以下 4 组: (1) 空白对照加无血清培养组; (2) 正义寡核苷酸组; (3) 错配寡核苷酸组; (4) 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。分别加入脂质体及 Stat3 正义寡核苷酸、错配寡核苷酸与反义寡核苷酸继续培养, 浓度分别为 0、5、10、20  $\mu\text{M}$ , 第 0、24、48、72h 分别加入 MTT 5mg/ml (美国 Sigma 公司), 继续培养 4h, 每孔加入 DMSO 200ml, 酶标仪测定 540nm 吸收值, 绘制生长曲线, 见图 1。



HCT116 细胞增殖水平随 Stat3 反义寡核苷酸 (20  $\mu\text{M}$ ) 作用时间延长而下降

图 1 HCT116 细胞增殖状态

1.5 细胞周期检测

细胞同步化后分别加入脂质体及 Stat3 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、72h 分别消化细胞, 0.5ml PBS 重悬细胞, 70% 冰乙醇固定细胞过夜, 加入 RNAase A 至终浓度 50mg/ml, 37 恒温水浴 1h, 加入 PI(美国 Sigma 公司)至终浓度 50mg/ml, 4 避光染色 1h, 上流式细胞仪 FACScan(美国 Becton-Dickinson 公司)检测, 资料用 Cell Quest 细胞周期分析软件处理。

1.6 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, 200ml 结合缓冲液重悬, 加入 ANNEXIN V-FITC 至终浓度 1mg/ml, 加入 PI 至终浓度 2.5 mg/ml, 室温避光染色 15min, 上流式细胞仪检测。

1.7 Western blot

参照 Santa Cruz 公司提供的蛋白提取方法, 分别裂解结肠癌细胞与组织得到总蛋白。以牛血清蛋白(BSA)作为标准品, 根据蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)手册绘制蛋白定量标准曲线, 于分光光度计 595nm 下测吸光值, 计算出提取液的蛋白浓度。取总蛋白 50  $\mu\text{g}$ , 7.5%~10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 PVDF 膜上, 封闭后, 加入一抗 Stat3、p-Stat3、bcl-2、bcl-xL、Mcl-1、Caspase-3 抗体(美国 Santa Cruz 公司), 工作浓度 1:1000, GAPDH 作为内参照, 辣根过氧化物酶结合的二抗, 工作浓度 1:1000。用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号。

1.8 吸光度测定

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

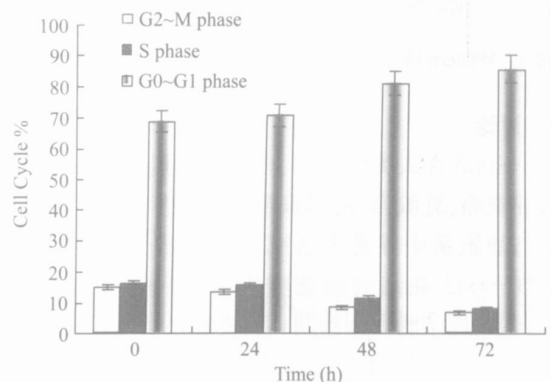
1.9 统计学方法

应用 SPSS 12.0 统计学软件, 采用 t 检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Stat3 反义寡核苷酸可以抑制结肠癌细胞增殖

Stat3 反义寡核苷酸作用 HCT116 细胞 72h 后, G<sub>1</sub> 期细胞比率由 68.9% 上升至 85.6%, S 期细胞比率由 15.4% 下降至 7.6%, 细胞增殖受抑制, 见图 2。



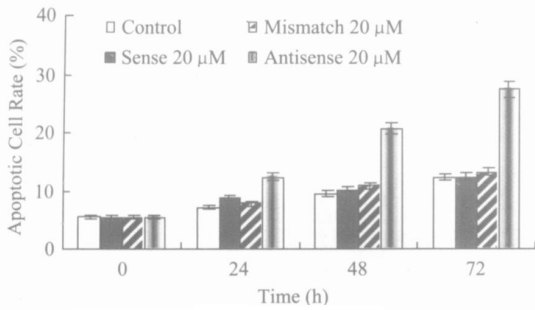
HCT116 细胞在 Stat3 反义寡核苷酸 (20  $\mu\text{M}$ ) 作用下 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期细胞比率上升, S 期细胞比率下降, 细胞增殖受抑制

图 2 HCT116 细胞周期检测

2.2 Stat3 反义寡核苷酸可以促进结肠癌细胞凋亡

HCT116 细胞在转染 Stat3 反义寡核苷酸 72h

后,凋亡细胞百分比由5.6%增加至27.5%,见图3。



HCT116 细胞在 Stat3 反义寡核苷酸(20μM)作用下凋亡细胞增加

图3 HCT116 细胞凋亡率检测

### 2.3 Stat3 反义寡核苷酸可以使 Stat3 信号传导通路成员活性与表达下降

HCT116 细胞转染 Stat3 反义寡核苷酸 72h 后,Stat3 蛋白表达与活性下调,其靶基因产物 bcl-2 成员表达下降,见图4。

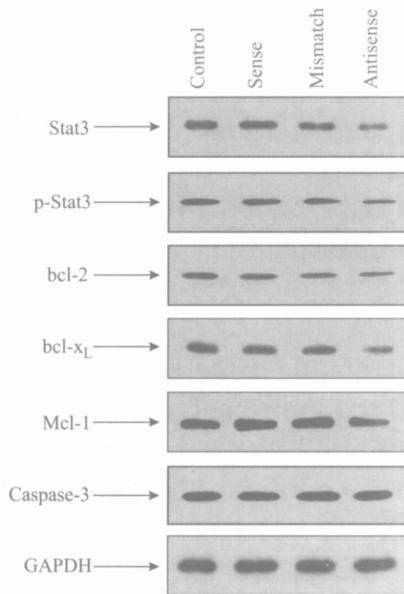


图4 Western blot 检测 Stat3 及凋亡家族成员蛋白表达变化

### 3 讨论

Stat3 在人类白血病、多发性骨髓瘤、头颈部鳞状细胞癌、乳腺癌、前列腺癌以及肺癌等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性增强<sup>[2-6]</sup>。Ma 等<sup>[7]</sup>发现 Stat3 在结肠癌细胞中持续活化,但是关于 Stat3 调控结肠癌细胞凋亡的机制还有待研究。

Stat3 靶基因产物包括影响细胞凋亡的 bcl-2 家族成员。bcl-2 与 bcl-xL 是 bcl-2 家族蛋白成员中主要的抑凋亡分子<sup>[8]</sup>,在白血病、神经母细胞瘤、骨髓瘤、结直肠癌等多种肿瘤中呈异常表达<sup>[9-11]</sup>。bcl-x 基因启动子上存在多个 Stat3 结合位点,Stat3 可直接与 bcl-x 启动子结合而启动转录。Burke 等<sup>[12]</sup>

应用酪氨酸激酶抑制剂 AG490 阻断卵巢癌细胞 Stat3 通路后,bcl-xL 蛋白表达下调,卵巢癌细胞出现凋亡。Lai 等<sup>[13]</sup>在头颈部鳞状细胞癌细胞中也得到相似结果。然而 bcl-2 家族成员表达并非是决定细胞凋亡与否的唯一因素,其翻译后修饰也是调节细胞凋亡的关键因素之一。胱冬肽酶(Caspase)是一类天冬氨酸残基特异性的半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡过程中起关键作用,它们对 bcl-2 家族成员具有重要的酶解修饰作用,目前已发现十余种成员,包括 Caspase-1-10 等<sup>[14]</sup>。本研究应用 Stat3 反义寡核苷酸转染结肠癌细胞系 HCT116,可以阻断其内源性 Stat3 信号转导通路,Stat3 及磷酸化 Stat3 表达下调,bcl-2 成员表达下降,Caspase-3 变化不明显,凋亡细胞增加,Stat3 可能通过影响 Bcl-2 家族成员调控结肠癌细胞凋亡,但是其详细机制有待进一步研究。

总之,Stat3 信号转导通路在结肠癌细胞中的转录调控机制尚不清楚,Stat3 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 Stat3 与 bcl-2 成员异常增高有关<sup>[15]</sup>,阻断 Stat3 通路可诱导耐药肿瘤细胞凋亡。已有一些学者在研究将 Stat3 作为基因治疗靶基因的可能性,并取得了初步结果,深入研究 Stat3 信号转导通路作用机制有可能为治疗结肠癌提供新的理论和实验基础。

致谢:感谢 Dr. Limei Ma 与 Dr. Congrong Yu (美国 Stowers Institute for Medical Research)对本研究提供的技术支持。

### 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] Benekli M, Baer MR, Baumann H, et al. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias[J]. Blood, 2003, 101 (8):2940-2954.
- [3] Gong W, Wang L, Yao JC, et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts expression of vascular endothelial growth factor in and angiogenic phenotype of human gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (4):1386-1393.
- [4] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7):4138-4143.
- [5] Selander KS, Li L, Watson L, et al. Inhibition of gp130 signaling in breast cancer blocks constitutive activation of Stat3 and inhibits in vivo malignancy [J]. Cancer Res, 2004, 64 (19):6924-6933.
- [6] Lee SO, Lou W, Qureshi KM, et al. RNA interference target

(下转第 188 页)

作用,还可以通过激活 *bax* 基因、抑制 *bcl-x* 基因以及诱导前凋亡基因 *PUMA*、*Bak* 及 *Fas* 的表达,促进细胞凋亡,提高多种肿瘤细胞对放化疗的敏感性<sup>[1]</sup>。对此有争议的是, *p53* 还可能会通过诱导 *p21* 基因表达等机制,使肿瘤细胞只是生长停止而不发生凋亡,同时修复放化疗导致的 DNA 损伤,从而降低了肿瘤细胞对放化疗的敏感性<sup>[19]</sup>。究竟 *rAd-p53* 抑制肿瘤的作用以及与肿瘤放化疗之间的协同作用如何表现,尚待进一步深入研究证实。

(本文图见 232 页)

参考文献:

[1] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers[J]. *Science*, 1991, 253(5015): 49-53.

[2] Seemann S, Maurici D, Olivier M, et al. The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41(5-6): 551-583.

[3] Kressner U, Lindmark G, Gerdin B, et al. Immunohistochemical p53 staining is of limited value in the staging and prognostic prediction of colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(2): 951-957.

[4] 王建华, 张涛, 纪宗正, 等. 应用噻唑蓝比色法进行大肠癌与胆囊癌细胞生长曲线的对比测定[J]. *现代肿瘤杂志*, 2005, 13(3): 310-312.

[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 第 1 版. 西安: 世界图书出版社, 1996. 174-176.

[6] 王吉甫. 胃肠外科学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 920-924.

[7] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis[J]. *Cell*, 1990, 61(3): 759-767.

[8] Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(14): 3965-3971.

[9] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development[J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(4): 525-532.

[10] Gu J, Zhang L, Swisher SG, et al. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(6): 1300-1307.

[11] Baker SJ, Markowitz S, Fearon E, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53[J]. *Science*, 1990, 249(2): 912-919.

[12] Roth JA. Gene replacement strategies for cancer[J]. *Isr J Med Sci*, 1996, 32(2): 89.

[13] Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2002, 11(3): 521-535.

[14] 郭英, 王坤, 陈积圣. 野生型 p53 基因对不同内源性 p53 状态的肝癌细胞株生长的影响[J]. *中外普通外科杂志*, 2001, 16(12): 722-724.

[15] Inoue A, Narumi K, Matsubara S, et al. Administration of wild-type p53 adenoviral vector synergistically enhances the cytotoxicity of anti-cancer drugs in human cancer cells irrespective of the status of p53 gene[J]. *Cancer Lett*, 2000, 157(1): 105-112.

[16] Quist SR, Wang-Grohke S, Kohler T, et al. Cooperative effect of adenoviral p53 gene therapy and standard chemotherapy in ovarian cancer cells independent of the endogenous p53 status[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(8): 547-554.

[17] Wolf J K, Mills GB, Bazzet L, et al. Adenovirus-mediated p53 growth inhibition of ovarian cancer cells is independent of endogenous p53 status[J]. *Gynecol*, 1999, 75(2): 261-266.

[18] Ohtani S, Kagawa S, Tango Y, et al. Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(1): 93-100.

[19] Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53[J]. *Cell Tissue Res*, 1998, 292(3): 435-445.

[编辑:周永红]

(上接第 184 页)

ting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2004, 60(4): 303-309.

[7] 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.

[8] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.

[9] Vanasse G, Winn RK, Rodov S, et al. Bcl-2 overexpression leads to increases in suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells and de novo follicular lymphoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(11): 620-631.

[10] Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, et al. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells[J]. *J Neurochem*, 2002, 80(1): 126-139.

[11] Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy

shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells[J]. *Blood*, 2002, 100(1): 194-199.

[12] Burke WM, Jin X, Lin HJ, et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20(55): 7925-7934.

[13] Lai SY, Childs EE, Xi S, et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(27): 4442-4449.

[14] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11): 897-907.

[15] Song H, Sondak VK, Barber DL. Modulation of Janus kinase 2 by cisplatin in cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4): 1017-1026.

[编辑:周永红]

