

Stat5 反义寡核苷酸联合 Jak 激酶抑制剂 A G490 调控结肠癌细胞增殖与凋亡的分子机制

马向涛¹, 余力伟¹, 王 杉², 杜如昱², 崔志荣²

Molecular Mechanisms Involved in Regulation of Proliferation and Apoptosis by Stat5 Antisense Oligonucleotide and AG490 in 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

Abstract: Objective In this study, we show that inhibition of the Stat5 signaling pathway using Stat5 AS-ON and AG490 significantly suppress the growth of colon cancer cell lines harboring constitutive active Stat5. **Methods** Stat5 AS-ON, AG490, or Stat5 AS-ON + AG490 was added into culture media, followed by MTT assay, the absorption value was measured and the growth curve was drawn; western blot analysis was performed on colon cancer cell lines; flow cytometry was applied to analyze the cell cycle and apoptosis. **Results** After the treatment of HT29 cells with Stat5 AS-ON and AG490 for 72h, the ratio of G₁ phase was up-regulated from 72.7% to 87.2%, S phase was down-regulated from 19.6% to 7.5%, and the percentage of apoptotic cell was increased from 8.7% to 24.2%. Stat5 AS-ON and AG490 could suppress the growth of colon cancer cells, they also induced significant apoptosis in colon cancer cells, and they diminished the expression and phosphorylation of Stat5, also the expression of cyclin D1 and Bcl-x_L. **Conclusion** These results suggest that selective inhibition of specific signaling pathway may provide a new therapeutic approach for treating colon cancers.

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

摘 要:目的 探讨 Stat5 反义寡核苷酸(Stat5 AS-ON)联合 Jak 激酶抑制剂(A G490)治疗结肠癌的作用机制。方法 应用 Stat5 AS-ON 与 A G490 处理结肠癌细胞 HT29, Western blot 检测 Stat5、p-Stat5、cyclin D1 与 Bcl-x_L 表达, MTT 法检测细胞增殖状态, 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡。结果 Stat5 AS-ON 与 A G490 作用于 HT29 细胞 72h 后, G₁ 期细胞比率由 72.7% 上升至 87.2%, S 期细胞比率分别由 19.6%, 下降至 7.5%, 凋亡细胞百分比由 8.7% 增加至 24.2%。Stat5 AS-ON 与 A G490 可以抑制结肠癌细胞增殖, 促进结肠癌细胞凋亡, 联合应用 Stat5 AS-ON 与 A G490 可以起协同作用, 明显抑制结肠癌细胞 Stat5 信号转导通路活化。结论 选择性阻断细胞内信号转导通路可能为治疗结肠癌提供新途径。关键词: 结肠癌; 信号转导; 增殖; 脱嗜作用

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)12-0883-04

0 引言

研究显示, 细胞内信号转导通路异常激活与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[1]。本研究应用 Stat5 反义寡核苷酸与 Jak 激酶抑制剂 A G490 处理结肠癌细胞, 观察对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 探讨以 Stat5 信号转导通路为靶点在药物治疗结肠癌中的作用。

1 材料与方法

1.1 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 RPMI1640 培养基(美国 GIBCOL/BRL 公司)。JAK 激酶抑制剂 A G490(美国 Calbiochem 公司)。

1.2 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。(1) Stat5 反义寡核苷酸序列: 5'-CCA CAC AGC CAT GTT TAC CCG-3'; (2) Stat5 正义寡核苷酸序列: 5'-CGG GTA AAC ATG GCT GTG TGG-3'; (3)

收稿日期: 2005-11-24; 修回日期: 2006-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271269)

作者单位: 1. 100080 北京市海淀区医院外科; 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的分子生物学研究

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。

1.3 阳离子脂质体转染核苷酸

LipofectAmine2000 (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)

接种细胞于 96 孔板,贴壁后,无血清培养细胞 16~24h,使细胞同步化。研究分为 4 组:(1)对照组;(2)AG490 组;(3)Stat5 AS-ON 组;(4)Stat5 AS-ON + AG490 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,AG490 组、Stat5 AS-ON 组与 Stat5 AS-ON + AG490 组分别加入 AG490 与 Stat5 AS-ON,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 200μl,酶标仪测定 540nm 吸光值,绘制生长曲线。

1.5 细胞周期检测

无血清培养细胞 16~24h,使同步化,分组同上,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 50μg/ml,37℃ 恒温水浴 1h,加入 PI(美国 Sigma 公司)至终浓度 50μg/ml,4℃ 避光染色 1h,上流式细胞仪 FACSscan (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 细胞总蛋白、胞浆蛋白与核蛋白提取

1.6.1 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 10min;4℃ 条件下 13 000 r/min 离心 1min;4℃ 条件下用高盐缓冲液重悬粗提的细胞核,振荡 30min;4℃ 条件下 13 000 r/min 离心 10min;取上清为核提取物,贮存于 -80℃ 于 2 个月内用完。

1.6.2 总蛋白提取 参照 Santa Cruz 公司蛋白提取方法,应用 RIPA 缓冲液裂解结肠癌细胞得到总蛋白。

1.6.3 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(美国 Bio-Rad 公司)说明绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 595nm 下测光密度值,计算提取液蛋白浓度。

1.7 Western blot

细胞蛋白样品 50μg 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(美国 Millipore 公司),封闭后,加入一抗(Stat5, p-Stat5, cyclin D1, Bcl-xL, GAPDH) (美国 Santa Cruz 公司),工作浓度 1:1000;辣根过氧化物酶结合的二

抗,(英国 Amersham 公司),工作浓度 1:1000。用 ECL(英国 Amersham 公司)化学发光试剂盒检测杂交信号。

1.8 吸光度测定

用 Phospho Imager 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 统计方法

应用 SPSS 12.0 统计学软件,采用独立样本 t 检验, P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Stat5 在结肠癌细胞中持续活化 见图 1。

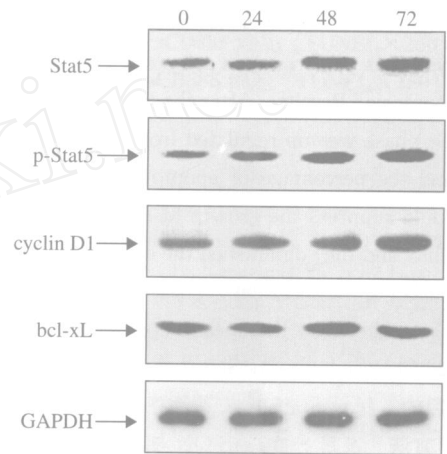
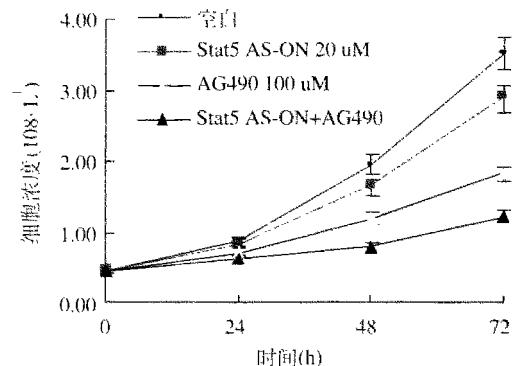


图 1 HT29 细胞增殖过程中 Stat5 信号转导通路成员表达与活性变化

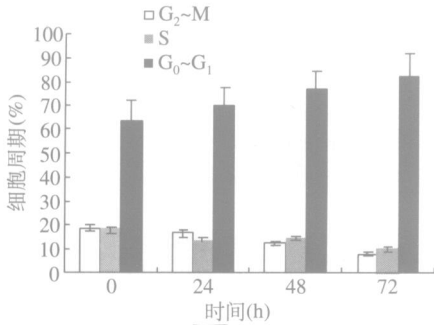
2.2 Stat5 AS-ON 与 AG490 可以抑制结肠癌细胞增殖

Stat5 AS-ON 与 AG490 作用于 HT29 细胞后,细胞增殖水平下降,见图 2。Stat5 AS-ON 与 AG490 作用于 HT29 细胞 72h 后, G₁ 期细胞比率由 72.7% 上升至 87.2%, S 期细胞比率分别由 19.6%, 下降至 7.5%, 细胞增殖受抑制,见图 3。



HT29 细胞增殖水平随 Stat5 AS-ON 与 AG490 作用时间延长而下降

图 2 HT29 细胞增殖状态

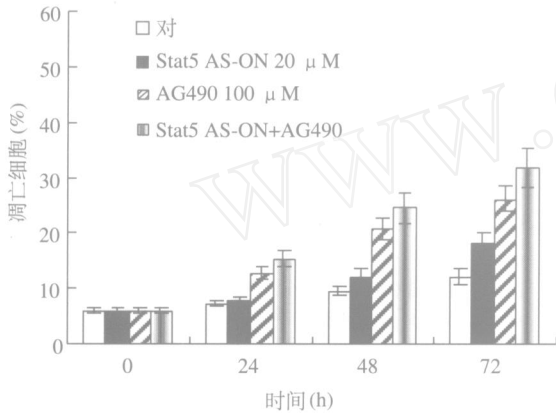


HT29 细胞在 Stat5 AS-ON 与 AG490 联合作用下 G₁ 期细胞比率上升, S 期细胞比率下降, 细胞增殖受抑制

图 3 HT29 细胞周期检测

2.3 Stat5 AS-ON 与 AG490 可以促进结肠癌细胞凋亡

Stat5 AS-ON 与 AG490 作用于 HT29 细胞 72h 后, 凋亡细胞百分比由 8.7% 增加至 24.2%, 见图 4。



HT29 细胞在 Stat5 AS-ON 与 AG490 作用下凋亡细胞增加

图 4 HT29 细胞凋亡检测

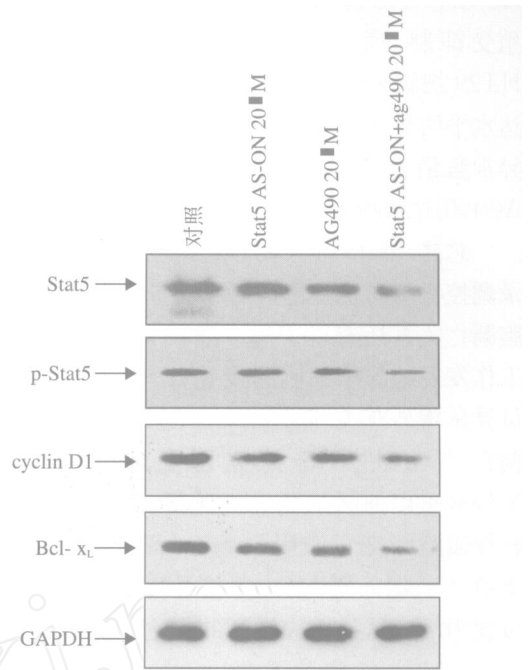
2.4 Stat5 AS-ON 与 AG490 可以使 Stat5 通路成员活性与表达下降

Stat5 AS-ON 与 AG490 作用于 HT29 细胞 72h 后, Stat5 表达与活性下调, 其靶基因产物 bcl-xL 与 cyclin D1 表达下降, 见图 5。

3 讨论

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。哺乳动物中 STATs 家族由 7 个成员组成: Stat1 ~ Stat4, Stat5a, Stat5b 及 Stat6^[2]。Stat5 最初被称为泌乳素诱导的乳腺因子 (Mammary gland factor, MGF), 在乳腺上皮细胞增殖与分化中起重要作用^[3]。Stat5 包括 Stat5a 与 Stat5b 两种异构体, 结构上具有 95% 的同源性。研究证实 Stat5 表达与活化不仅与乳腺癌发生发展密切相关, 而且在其他肿瘤如髓样白血病、前列腺癌及头颈部

鳞状细胞癌中异常表达与活化^[4,5]。



Stat5 AS-ON 与 AG490 对结肠癌作用于 HT29 细胞 72h 后对 Stat5 信号转导通路成员表达与活性下降

图 5 HT29 细胞 Stat5 信号转导通路成员表达

Stat5 作为上游酪氨酸激酶通过调控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^[6]。Bcl-2 家族包括抑凋亡和促凋亡两大类, 前者包括 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 等, 后者包括 bax、bak、bcl-xS 等^[7]。bcl-x 基因启动子上存在多个 STATs 结合位点, STATs 可直接与 bcl-x 启动子结合而启动转录^[8]。Gutierrez-Castellanos 等^[9]在研究慢性髓性白血病 (Chronic myelogenous leukemia, CML) 时发现, CML 患者外周血单核细胞中 Bcl-xL 表达在慢性期下降, 而在急变期迅速升高, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 显示在此过程中 Bcl-xL 转录受到磷酸化 Stat5 的调控。

本研究结果显示 Stat5 通路在结肠癌细胞 HT29 增殖过程中持续激活, 应用 Stat5 AS-ON 作用于结肠癌细胞系 HT29, 发现 HT29 细胞增殖水平随 Stat5 AS-ON 作用时间延长而下降, 相应空白对照组变化不明显。由于结肠癌对化疗药物属中低度敏感, 即使最有效的 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 其反应率仅有 20% ~ 30%, 因而对其耐药机制的研究仍是热点和难点。为研究 Stat5 在介导结肠癌药物治疗的作用机制, 本研究进一步应用 Stat5 AS-ON, Stat5 AS-ON + AG490 分别作用于 HT29 细胞, 发现 HT29 细胞增殖水平随药物作用时间延长而下降,

以 Stat5 AS-ON + A G490 组细胞下降为明显, Stat5 AS-ON + A G490 作用于 HT29 细胞 72h 后, 细胞增殖受抑制, 凋亡细胞增加。Western blot 显示: HT29 细胞中 Stat5、p-Stat5、Bcl-x_L 及 cyclin D1 表达水平明显下降, 提示结肠癌细胞耐药可能与 Stat5 异常激活有关, Stat5 AS-ON 可以协同化疗药物 A G490 对结肠癌细胞 HT29 起治疗作用^[10]。

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^[11]。本研究前期工作发现结肠癌细胞耐受化疗与 Stat3 与 Bcl-2 成员异常增高有关, 阻断 Stat3 通路可诱导肿瘤细胞凋亡^[12,13]。进一步研究还发现非甾体抗炎药 NS398 可以抑制结肠癌细胞 Stat5 活性, 通过信号转导通路间交互作用 (cross-talk) 抑制结肠癌细胞增殖^[14]。深入研究 Stat5 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 感谢美国 Stowers Institute for Medical Research 的 Dr. Limei Ma 与 Dr. Congrong Yu 对本研究提供的技术支持。)

参考文献:

- [1] Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21):2474-2488.
- [2] Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(48):8017-8023.
- [3] Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(5):1449-1460.
- [4] Moriggl R, Sexl V, Kenner L, et al. Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(1):87-99.
- [5] Li H, Zhang Y, Glass A, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription-5 in prostate cancer predicts early recurrence[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16):5863-5868.
- [6] Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6):717-728.
- [7] Cory S, Huang DC, Adams JM. The bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53):8590-8607.
- [8] Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(11):2120-2124.
- [9] Gutierrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L, et al. Differences in bCL-X(L) expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients[J]. *Eur J Haematol*, 2004, 72(4):231-238.
- [10] Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2004, 8(5):409-422.
- [11] Yamashita H, Iwase H, Toyama T, et al. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(11):1638-1652.
- [12] 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.
- [13] 马向涛, 王杉, 杜如昱, 等. Stat3 反义寡核苷酸联合化疗调控结肠癌细胞增殖与凋亡的分子机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(10):1212-1214.
- [14] 马向涛, 余力伟, 王杉, 等. COX-2 抑制剂调控 Stat5 信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(36):2566-2569.

[编辑:安 凤]