

# Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞相关信号传导影响的研究

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025  
俞丽芬, 女, 1970-10-28 生, 浙江省萧山市人, 汉族, 2004 年上海第二医科大学医学博士, 主治医师, 讲师。  
上海市科学技术委员会基金资助课题, No.024119114  
项目负责人: 俞丽芬, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科. graceyu1028@sohu.com  
电话: 021-64370045-665242 传真: 021-64373909  
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-16

Effect of Stat3 antisense oligonucleotide on signal transduction pathway related to human stomach adenocarcinoma MKN45 cell line

Li-Fen Yu, Yun-Lin Wu, Min-Min Qiao, Jie Zhong, Shui-Ping Tu

Li-Fen Yu, Yun-Lin Wu, Min-Min Qiao, Jie Zhong, Shui-Ping Tu, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China  
Supported by Shanghai Science and Technology Committee Foundation, No.024119114  
Correspondence to: Dr. Li-Fen Yu, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital of Shanghai Second Medical University, 197 Ruijiner Road, Shanghai 200025, China. graceyu1028@sohu.com  
Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of antisense oligonucleotide (as-ODN) of Stat3 on the cell proliferation of human stomach adenocarcinoma cell line MKN45 and to determine the novel molecular target for treatment of gastric cancer.

**METHODS:** Stat3 as-ODN, a mixed backbone oligonucleic acid (MBO), was transfected into MKN45 cells mediated by liposomal reagent. The effect on cell proliferation was examined by MTT method. After transfection of Stat3 as-ODN, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and Western blot were used to detect the Stat3 DNA-binding activity and the expression of phospho-Stat3 protein, respectively.

**RESULTS:** Stat3 as-ODN could significantly inhibit the proliferation of MKN45 cells. After transfection of Stat3 as-ODN, both the constitutive activation of Stat3 and the expression of phospho-Stat3 protein were decreased 50.65% and 78.86%, respectively.

**CONCLUSION:** Stat3 as-ODN could remarkably inhibit the signal transduction of Stat3 in MKN45 cells. Activated Stat3 signaling in human stomach adenocarcinoma cell line provides a novel molecular target for therapeutic intervention of gastric cancer.

Yu LF, Wu YL, Qiao MM, Zhong J, Tu SP. Effect of Stat3 antisense oligonucleotide on signal transduction pathway related to human stomach adenocarcinoma MKN45 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1527-1530

## 摘要

**目的:** 通过研究 Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞增生活性的影响, 寻求胃癌治疗中相关信号传导途径的新靶点。

**方法:** Stat3 反义寡核苷酸是一种混合骨架寡核苷酸(MBO), 采用脂质体介导的方式将其转染人胃腺癌细胞株 MKN45; 通过 MTT 法观察转染前后对细胞增生状态的影响; 凝胶阻滞电泳(EMSA)和 Western blot 方法观察转染前后 Stat3 DNA 的结合活性和磷酸化 Stat3 蛋白表达的变化。

**结果:** Stat3 反义寡核苷酸对 MKN45 细胞的增生有明显抑制作用; 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 信号的组成性激活水平和磷酸化 Stat3 蛋白的表达分别下降了 50.65% 及 78.86%。

**结论:** Stat3 反义寡核苷酸能显著抑制 MKN45 细胞中 Stat3 信号的传导, 胃癌细胞株中活化的 Stat3 信号可作为胃癌治疗新的分子靶点。

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平. Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞相关信号传导影响的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7): 1527-1530  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1527.asp>

## 0 引言

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)是细胞因子和生长因子受体信号的下游效应物. 目前在哺乳动物中已鉴定出 STAT 家族的 7 个成员, 即 Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b 和 Stat6. 信号通常产生于细胞膜表面的受体, 然后传输至细胞核内, STAT 在细胞核内与特异性的 DNA 启动子结合, 调节相关基因的表达<sup>[1]</sup>. Stat3 蛋白是近年来研究异常活跃的转录因子, 目前已确认 Stat3 信号途径是多种人类肿瘤干预治疗有效的分子靶之一<sup>[1-4]</sup>, 但是国内外关于 Stat3 在消化系统疾病中的研究才刚刚起步, 发展前景广阔. 反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, as-ODN)是人工合成并经化学修饰

的寡核苷酸片段,能通过自身设计的特定序列与靶 mRNA 结合,在基因水平干扰致病蛋白的产生.由于其高度的选择性和较低的副作用,as-ODN 类药物已成为近年来药物研究和开发的热点<sup>[5-7]</sup>.国内文献报道的反义寡核苷酸几乎均为硫代修饰的寡核苷酸,而我们所采用的反义寡核苷酸为混合骨架寡核苷酸(mixed backbone oligonucleic acid, MBO),在安全性和有效性方面要优于第一代反义寡核苷酸.作者拟通过探讨 Stat3 反义寡核苷酸对人胃癌 MKN45 细胞增生活性的影响,寻求胃癌治疗中相关信号传导途径的新靶点.

## 1 材料和方法

1.1 材料 脂质体转染试剂盒(Oligofectamine),Invitrogen 公司;转染细胞的寡核苷酸由上海博亚生物工程有限公司合成与纯化,为全硫代修饰,并在末端各 5 个碱基的 2'-O 位上进行了甲氧基修饰;Stat3 反义寡核苷酸序列 5'-GCT CCA GCA TCT GCT GCT TC-3',错配寡核苷酸序列 5'-GCT CCA ATA CCC GTT GCT TC-3'<sup>[8]</sup>. 四氮唑盐(MTT),上海实生细胞生物技术有限公司.二甲亚砜(DMSO),德国 Merck 公司.细胞核蛋白抽提试剂盒和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒, Pierce 公司; [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP, PerkinElmer 公司; Stat3 双链脱氧寡核苷酸探针由上海生工公司合成, PAGE 纯化,序列如下:正义链 5'-TCG ACA TTT CCC GTA AAT C-3',反义链 5'-GAT TTA CGG GAA ATG TCG A-3'; EMSA 试剂盒, Promega 公司; MicroSpin™ G-25 柱, Amersham Biosciences 公司.兔抗人多克隆抗体 Phospho-Tyr705-Stat3, Cell Signaling 公司;  $\beta$ -actin 单克隆抗体, Sigma 公司; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, Santa Cruze 公司; MagicMarker, Invitrogen 公司; Hybond-C 膜, Amersham Biosciences 公司.

1.2 方法 低分化人胃癌细胞株 MKN45 由本实验室传代培养,细胞在含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中生长,细胞培养条件为 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>. 脂质体转染按照试剂盒说明的操作步骤进行,分为反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组、空脂质体组和对照组,以无血清培养基稀释至所需浓度, 37℃ 孵育 4 h,然后按比例加入等体积的 300 mL/L 胎牛血清,使培养基的终浓度恢复为 100 mL/L 胎牛血清.

1.2.1 细胞生长曲线 取对数生长期的 MKN45 细胞用 RPMI 1640 培养基稀释成为含细胞 0.5 × 10<sup>7</sup>/L 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,培养 24 h 使之贴壁;弃旧培养液后,分别将 Stat3 反义寡核苷酸、错配寡核苷酸和脂质体以无血清培养基稀释至所需浓度加入反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组和空脂质体组内,其余步骤按操作说明进行,对照组加 100 mL/L 胎牛血清 RPMI 1640 培养基.分别于转染后 24 h, 48 h, 72 h 弃培养液,每孔加入 1 g/L 的 MTT 100  $\mu$ L,继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 200  $\mu$ L,酶标仪于 570 nm 处测定各孔吸

光度 A 值,绘制生长曲线.

1.2.2 凝胶迟滞电泳 细胞核蛋白的抽提和蛋白浓度测定步骤均按照 Pierce 公司的操作说明进行,分为反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组、空脂质体组和对照组.探针按照凝胶迟滞电泳(EMSA)试剂盒说明进行  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dATP 标记,终浓度为 1.75 fmol/L.根据蛋白浓度,在同一实验中取等量的核蛋白样品.结合反应体系包括核蛋白 10  $\mu$ g, 5 $\times$  结合缓冲液.于室温中向上述反应体系加入同位素标记的寡核苷酸探针 1  $\mu$ L,总反应体系为 20  $\mu$ L,冰上孵育 30 min 后上样.制备 50 mL/L 非还原聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE,电流 20 mA,预电泳 1 h 后加样;再电泳 90 min 后干胶仪干胶、压片、-80℃ 曝光 24-72 h 后显影.运用美国 Bio-Rad 公司的 Fluor-S™ Multimager 扫胶仪,以 Quantity one 软件进行灰度分析比较.

1.2.3 Western blot 法 以 100  $\mu$ g 胞核蛋白为加样量进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移至 hybond-C 膜;以  $\beta$ -actin 监测各泳道蛋白加样量是否均等;以 MagicMarker 确定目标蛋白的分子质量;以 TBS 对膜进行漂洗,室温下封闭 1 h (封闭液含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS);膜与磷酸化多克隆抗体 Stat3 (稀释度 1:200) 室温下共同孵育 2 h;膜与碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 室温下共同孵育 1 h,最后进行蛋白条带的显色.运用美国 Bio-Rad 公司的 Fluor-S™ Multimager 扫胶仪,以 Quantity one 软件进行灰度分析比较.

## 2 结果

2.1 转染 Stat3 反义寡核苷酸后对 MKN45 细胞增生的影响 MTT 法显示转染不同浓度的 Stat3 反义寡核苷酸后, MKN45 细胞的增生水平受到不同程度的抑制.当反义寡核苷酸的浓度为 300 nmol/L 时 MKN45 细胞的生长受到明显抑制(生长抑制率为 54.72%,表 1),而对照组、空脂质体组和转染错配寡核苷酸组细胞的生长情况未受显著影响,抑制作用在转染后 48 h 最强.

2.2 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 组成性激活状态的变化 凝胶迟滞电泳(EMSA)结果显示转染 Stat3 反义寡核苷酸(浓度为 300 nmol/L)后, MKN45 细胞中 Stat3 DNA 的结合活性水平较对照组下调了 50.65%,而相应的空脂质体组和转染错配寡核苷酸组的变化却不明显(图 1).

2.3 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中磷酸化 Stat3 蛋白(P-Stat3)表达的变化 磷酸化 Stat3 抗体能与磷酸化的 Stat3 酪氨酸 705 位点反应,提示检测的是 Stat3 的活性状态.对 Western blot 的电泳结果进行蛋白条带灰度分析后发现,转染 Stat3 反义寡核苷酸(浓度为 300 nmol/L)后, MKN45 细胞中 P-Stat3 蛋白的表达较对照组减少了 78.86%,而空脂质体组和转染错配寡核苷酸组的 P-Stat3 蛋白表达变化不明显(图 2).

表 1 不同浓度的 Stat3 反义寡核苷酸转染后 48h 对 MKN45 细胞增生的影响 (mean±SD)

浓度(nmol/L)	0	150	200	250	300	350
570nm的吸光值	0.53±0.07	0.33±0.03	0.40±0.06	0.29±0.03	0.24±0.03	0.30±0.04



图 1 EMSA 电泳显示转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 组成性激活水平的变化. 1: 对照组; 2: 空脂质体组; 3: 竞争性探针; 4: 错配寡核苷酸组; 5: 反义寡核苷酸组.

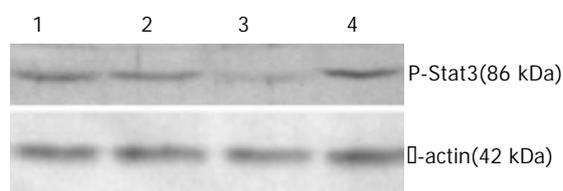


图 2 Western blot 电泳显示转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中磷酸化 Stat3 蛋白表达的变化. 1: 空脂质体组; 2: 错配寡核苷酸组; 3: 反义寡核苷酸组; 4: 对照组.

### 3 讨论

相对正常的细胞和组织而言,大多数人类原发癌灶及肿瘤细胞株中都有STAT的组成性激活.目前国外有关STAT信号传导途径的研究正蓬勃发展,但大部分多集中在恶性血液系统疾病(白血病、淋巴瘤和多发性骨肉瘤)和头颈部肿瘤、乳癌和前列腺癌等方面<sup>[3-4,9-11]</sup>,有关该信号途径与消化系统疾病的关系报道相对甚少<sup>[12-17]</sup>.Stat3在胃癌细胞株方面的研究仅有日本学者的一篇报道<sup>[18]</sup>,着重探讨了MEK-ERK途径.许多研究表明,作为STAT家族一员的Stat3能编码凋亡抑制剂和细胞周期调节剂,通过上调Bcl-x<sub>L</sub>、Mcl-1、cyclins D1/D2和c-myc基因的作用参与肿瘤的形成<sup>[2-3]</sup>,提示通过抑制Stat3信号途径的组成性激活,可抑制体内外肿瘤细胞的生长,为人类肿瘤的干预治疗提供了一种新的方式.

我们采用的反义寡核苷酸是一种混合骨架寡核苷酸(MBO),由DNA片段和RNA片段组合形成.不仅对整个序列进行了全硫代修饰,而且在序列两侧末端各5个碱基的2'-O位上进行了甲氧基修饰(RNA水平).反义DNA和RNA通过和细胞内基因或mRNA结合后,可封闭基因的转录或降解mRNA.据文献报道,MBO在PS-ODN的基础上降低了硫代磷酸二酯键的数量,减少了免疫反应,降低了体内降解速度并改变了核酸降解物的种类,从而减少了由硫代导致的副反应,提高了和RNA的结合能力并提高了RNase降解mRNA的能力.

采用反义寡核苷酸或非显性Stat3蛋白Stat3 $\beta$ 阻断Stat3的DNA结合,进一步确定了Stat3在肿瘤形成过程中的重要作用<sup>[4,11]</sup>.马向涛 et al<sup>[19]</sup>应用阳离子脂质体介导Stat3反义寡核苷酸转染人结肠癌SW480与HCT116细胞,阻断其Stat3通路,探讨了Stat3信号传导通路对结肠癌细胞G<sub>1</sub>-S期调控的可能机制.结果发现,转染Stat3反义寡核苷酸后结肠癌细胞增生受抑制,Stat3,p-Stat3,G<sub>1</sub>期cyclins,CDK<sub>s</sub>表达水平下降,p21与p27表达水平上升.认为Stat3信号传导通路可能通过调节CDK/cyclin复合物与CKI成员之间的平衡而调节结肠癌细胞G<sub>1</sub>-S期的转换.

EMSA方法具有所需细胞核蛋白量少(5-20  $\mu$ g)、灵敏度和特异性高、能检测Stat3与DNA的结合活性等特点,是研究核转录因子的首选方法.此外以混合骨架寡核苷酸直接干预Stat3信号的活化,当Stat3反义寡核苷酸的浓度为300 nmol/L时MKN45细胞的生长受到明显抑制(细胞的生长抑制率>50%),而对照组、空脂质体组和转染错配寡核苷酸组细胞的生长情况未受显著影响,抑制作用在转染后48h最强.转染反义寡核苷酸后,MKN45细胞中Stat3信号的组成性激活水平和磷酸化Stat3蛋白的表达明显下降,提示Stat3反义寡核苷酸能显著抑制MKN45细胞中Stat3信号的传导.

癌症患者可能会对任何一种单一的治疗如酪氨酸激酶抑制剂产生耐受,因此需要更为有效的治疗措施.在药物开发过程中,通过对STAT结构和活性的关系研究,需设计特异性的分子检测手段应用于药物的改进中,评估Stat3 DNA的结合活性以及对相关基因的调控能力.临床上,通过对肿瘤患者的活检,应用免疫组织化学方法观察Stat3的酪氨酸磷酸化形式的表达情况,为监测Stat3信号的有效抑制提供适宜的分子标志.总之,开发肿瘤治疗分子靶点Stat3的抑制剂,有助于进一步探究该蛋白在人类肿瘤中所起的重要作用.

### 4 参考文献

- Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19:2468-2473
- Turkzon J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000;19:6613-6626
- Bowman T, Garcia R, Turkzon J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488
- Song JJ, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 2000;19:2489-2495
- 王宏光, 李开宗, 龚科峰, 陈丹, 王春梅. 反义寡核苷酸在肝癌细胞中的分布及作用. 第四军医大学学报 2002;23:1944-1947
- 王宏光, 李开宗, 龚科峰. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸抑制肝癌的血管形成. 中华普通外科杂志 2001;16:222-224
- 王雪琴, 杨林西, 韩跃武. 细胞周期素 D1 反义寡核苷酸对胃癌细胞株 BGC-823 的作用. 中国癌症杂志 2003;13:222-224

- 8 Karras JG, McKay RA, Lu T, Pych J, Frank DA, Rothstein TL, Monia BP. STAT3 regulates the growth and immunoglobulin production of BCL(1) B cell lymphoma through control of cell cycle progression. *Cell Immunol* 2000;202:124-135
- 9 Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000;19:2511-2522
- 10 Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 2000;19:2496-2504
- 11 Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-2513
- 12 Starkel P, Bishop K, Horsmans Y, Strain AJ. Expression and DNA-binding activity of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic cirrhosis compared to normal liver and primary biliary cirrhosis in humans. *Am J Pathol* 2003;162:587-596
- 13 Tacchini L, Fusar-Poli D, Sironi M, Mantovani A, Bernelli-Zazzera A. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in rat liver after heat shock and reperfusion stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:316-323
- 14 Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:16777-16781
- 15 Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1879-1884
- 16 Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem* 2002;277:36167-36173
- 17 冯德云, 郑晖, 蒋海鹰, 颜亚辉, 谭怡, 程瑞雪. STAT3磷酸化与 c-fos 和 c-jun 蛋白表达在肝细胞癌发生中的作用. 湖南医科大学学报 2001;26:17-19
- 18 Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Kanda N, Nanakin A, Kubohara Y, Chiba T. Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) inhibits STAT3 activity involved in gastric cancer cell proliferation via MEK-ERK-dependent pathway. *Oncogene* 2003;22:548-554
- 19 马向涛, 王杉, 杜如昱, 叶颖江, 王殊, 严飞飞, 崔志荣. Stat3 信号传导通路对结肠癌细胞 G<sub>1</sub>-S 期的调控. 北京大学学报(医学版) 2003;35:50-53

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物,可作为理工科研究生的教学用书或自学教材,也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍,介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求.从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作,通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则——准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity),分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写,举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项,总结了各主要参考文献例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题,结合实例举证,从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达,较为详尽地总结了英文标点符号的使用,从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系,综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互。

本书论述缜密、案例丰富.为方便读者进一步追溯和研读相关资料,书中按章节形式标引了参考文献约220篇(次)。

编著:任胜利,理学博士,《自然科学进展》责任编辑,1998年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文30余篇.出版:科学出版社.定价:28元+2元(邮费).邮购地址:100085,国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室,北京市海淀区双清路83号.联系人:刘俐,程宇.联系电话:010-62327204;传真:010-62326921.开户银行:中国工商银行北京北太平庄支行.开户名:国家自然科学基金委员会科学基金杂志社.帐号:0200010009200062483.(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社2004-05-20)