文章编号:1000-5404(2007)07-0599-04

论著

STAT3诱饵寡核苷酸抑制人胃癌细胞裸鼠腹腔种植的初步研究

刘 伟[1],余佩武[1],安 杰[2],张 超[1],赵永亮[1] ([1]第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038;[2]白求恩国际和平医院病理科,石家庄 050082)

提 要:目的 通过研究STAT3诱饵寡核苷酸对人胃癌MKN45细胞增生及荷瘤裸鼠的作用,探讨其对人胃癌细胞株裸鼠腹腔种植转移的影响。**方法** 以人胃癌细胞MKN 45为对象,四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetralolium, MTT)法检测STAT3诱饵寡核苷酸对肿瘤细胞的增殖抑制效应,凝胶迟滞电泳法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测各组细胞STAT3 DNA结合活性。裸鼠随机分为4组,将不同方法处理的胃癌细胞接种裸鼠腹腔,观察各组裸鼠的腹腔肿瘤生成、腹水产生、死亡率及生存情况。**结果** ①STAT3诱饵寡核苷酸对人胃癌细胞生长的抑制作用呈时间依赖性。②STAT3诱饵寡核苷酸可特异性抑制胃癌细胞STAT3的DNA结合活性。③STAT3诱饵寡核苷酸能明显减少裸鼠腹水产生,降低荷瘤鼠的死亡率,延长荷瘤鼠的生存期,与其他组相比有显著性差异($P<0.05$)。**结论** STAT3诱饵寡核苷酸对人胃癌裸鼠腹腔种植有明显的抑制作用。

关键词:胃肿瘤;信号传导及转录激活子;肿瘤种植;裸鼠
中图法分类号:R73-354;R735.2;R977.6 **文献标识码**:A

Primary study of STAT3 Decoy ON on inhibiting abdomino-plantation of human gastric carcinoma in nude mice

LIU Wei[1], YU Pei-wu[1], AN Jie[2], ZHANG Chao[1], ZHAO Yong-liang[1] ([1]Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Pathology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: Objective To evaluate the potential role of STAT3 Decoy ON on the proliferation and the survival of tumor-bearing nude mice, and to explore the effect of STAT3 Decoy ON on the abdomino-plantation of human gastric carcinoma in nude mice. **Methods** The human gastric cancer cell MKN-45 was employed in the study. The inhibitory effect of STAT3 Decoy ON on the proliferation of cancer cells was quantified by MTT assay. The DNA-binding activities of STAT3 were detected by EMSA method. The nude mice were randomly divided into 4 groups and treated with different methods. The formation of tumor, the production of ascites, the death rate and survival period of tumor-bearing nude mice were evaluated. **Results** STAT3 Decoy ON inhibited the proliferation of the tumor cells in time dependent manners. STAT3 Decoy ON could inhibit the DNA-binding activities of STAT3 of gastric adenocarcinoma cell MKN-45. Compared with other groups, STAT3 Decoy ON could reduce the production of ascites and the death rate of tumor-bearing nude mice, prolong the survival period of tumor-bearing nude mice significantly ($P<0.05$). **Conclusion** STAT3 Decoy ON could inhibit abdomino-plantation and relapse of gastric cancer in tumor-bearing nude mice.

Key words: gastric neoplasm; signal transducer and activator of transcription; tumor plantation; nude mice

腹腔种植及复发是胃癌患者主要致死原因,国内外研究表明,根治性手术切除加广泛淋巴结清扫术,能有效减少早期胃癌的复发,但即使行根治性手术,对较晚期胃癌的治疗亦仍不理想。至少5%以上的患者术后会出现复发转移,导致治疗失败。研究表明,国内外胃癌患者就诊时多已处于浆膜受侵的进展期,半数以上患者最终死于腹膜种植转移[1],因此针对此寻找有明显疗效的治疗药物有重要的临床意义。Janus激酶-信号转导和转录激活因子信号途径(Janus kinase-sig-

作者简介:刘 伟(1975-),男,河北省沙河市人,博士研究生,医师,主要从事胃肠道肿瘤发生机制方面的研究。电话:(023)66955796,E-mail: talismanliu@163.com
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail: yupeiwu01@vip.sina.com
收稿日期:2006-08-02;修回日期:2006-11-04

nal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)是近年来发现的一条信号传导通路,研究表明:大多数人类肿瘤中有 STAT3 的组成性激活,STAT3 过表达与恶性肿瘤侵袭转移的关系最近为人们高度重视。STAT3 诱饵寡核苷酸(decoy oligonucleotide, Decoy ON)是人工合成并经化学修饰的含有 STAT3 蛋白 DNA 结合位点的寡核苷酸,可以与活化状态的 STAT3 分子竞争结合 DNA 位点,降低其生物学作用[2]。本研究拟通过 STAT3 Decoy ON 转染胃腺癌 MKN45 细胞,将其应用于裸鼠腹腔种植瘤模型的治疗,观察其具体效果。

1 材料与方法

1.1 材料和实验动物

阳离子脂质体(Lipofectamine™ 2000)转染试剂盒,Invitrogen 公司;STAT3 Decoy ON 序列由上海博亚生物工程有限公司合成与纯化:5′-CATTTCCCGTAAATC-3′, 5′-CATTTACGGGAAATG-3′,错配对照序列:5′-CATTTCCTTAAATC-3′, 5′-GATTTAAGGGAAATG-3′,部分序列 3′端和 5′端用异硫氰酸荧光素(FITC)标记;[γ-^{32}P]dATP,PerkinElmer 公司;EMSA 试剂盒,Promega 公司;BALB/c nu/nu 裸鼠 24 只,鼠龄 4~6 周,雌雄各半,体质量 20~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 胃癌细胞培养

低分化人胃腺癌细胞株 MKN45 在含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中生长,细胞培养条件为 37 ℃,5% CO_2。

1.3 脂质体转染

按照试剂盒说明的操作步骤进行,正义和反义诱饵寡核苷酸链各 33 μg 分别溶解于 70 μl Tris · HCl EDTA 溶液(pH 8.0)中,90 ℃退火,3 h 后将反应混合物保存在 4 ℃温度。0.8 μg STAT3 双链诱饵寡核苷酸与 2.0 μl Lipofectamine 脂质体分别溶解在 50 μl 无血清 DMEM 培养基中,充分混合(预实验证实寡核苷酸与脂质体以 1∶3 质量体积比转染效率最高),室温下孵育 20 min,24 孔板中预先培养的胃癌 MKN-45 细胞融合达 80%~85%,将 Decoy ON-脂质体混合物加入到各孔中,混匀后继续培养。

1.4 细胞生长曲线

取对数生长期的 MKN45 细胞,稀释为含细胞 5×10^6/L 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,贴壁后弃旧培液,将 STAT3 Decoy ON、错配 Decoy ON 和脂质体混合物以无血清培养基稀释至所需浓度,加入相应组对应孔中,对照组加含有 100 ml/L 小牛血清 RPMI1640 培养基。于转染后 12、24、48、72 h 弃培养液,每孔加入 1 g/L 的 MTT 100 μl,继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 200 μl,酶标仪于 570 nm 处测定各孔吸光度值[D(570)],绘制生长曲线。

1.5 EMSA 检测

放射性探针按照 EMSA 试剂盒说明进行 γ-^{32}P-dATP 标记,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 5 μg,结合缓冲液 17 μl,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 μl,总反应体系为 20 μl,室温孵育 30 min 后上样。制备 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,以电流 15 mA 电泳 60 min 后,-70 ℃自显影 48 h。运用 Gel Doc2000 凝胶成像系统扫描图像,Quantity one 软件进行灰度分析比较。

1.6 动物模型

制备 MKN-45 单细胞悬液,调整细胞浓度至 2×10^7 个/ml。在超净工作台内,BALB/c nu/nu 裸鼠腹部皮肤用 75% 酒精消毒,腹腔内接种 0.2 ml 细胞悬液。24 只裸鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 6 只,A 组为 STAT3 Decoy ON 注射组,B 组为错配 Decoy ON 注射组,C 组为脂质体混合物注射组,D 组为对照组,腹腔注射 RPMI1640 培养基。接种 3 d 后,每日测鼠重并作腹腔穿刺,观察腹腔种植瘤最大直径;小鼠死亡时准确计腹水量;观察裸鼠荷瘤生存时间、生存率和生命延长率,生命延长率=(治疗组平均存活天数/对照组平均存活天数-1)×100%。新鲜瘤组织切成 1 mm^3 小块后搓网,经 260 目尼龙网过滤,2 000×g 离心 2 min,PBS 漂洗 2 次,去上清,制备单细胞悬液,冰 PBS 洗涤,加入 -20 ℃预冷的 70% 乙醇,4 ℃过夜。取细胞悬液 PI 染液 1.0 ml 染 30 min,流式细胞仪进行检测,MultiCycle 软件分析,计算细胞增殖指数(Proliferation Index, PI)。

$PI=(S\%+G_2\%)/(G_1\%+S\%+G_2\%)\times100\%$。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 转染 STAT3 Decoy ON 后鉴定

倒置相差显微镜下观察,胃癌细胞贴壁生长,密集处呈"镶嵌状或铺路石状"。Decoy ON 转染后 24 h,荧光显微镜下观察可见细胞内明显的绿色荧光表达(图 1)。随转染后培养时间的延长,细胞内绿色荧光强度逐渐减弱,至 72 h 接近完全淬灭。EMSA 检测显示,脂质体转染组、错配对照寡核苷酸组及对照组胃癌细胞 STAT3 DNA 结合活性分析结果相近,但它们均高于 STAT3 Decoy ON 转染组细胞中 STAT3 结合活性(图 2),说明 Decoy ON 对 STAT3 的抑制作用是高效具有靶位特异性的。

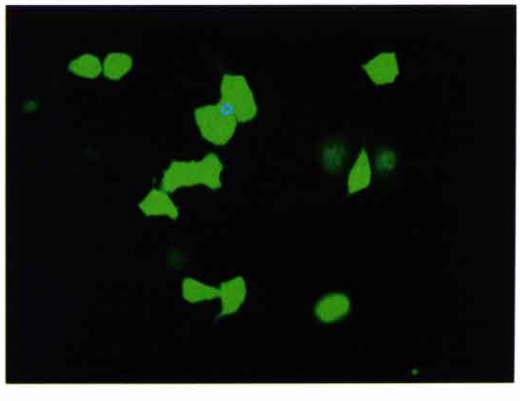
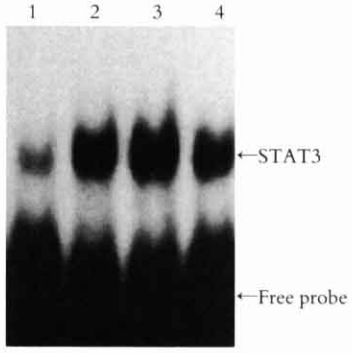


图 1 转染 STAT3 Decoy ON 后 72 h MKN-45 细胞内绿色荧光表达情况 (荧光显微镜×200)



1：Stat3 Decoy ON 组；2：错配 ON 组；3：脂质体转染组；4：对照组

图 2　EMSA 法检测各组细胞 STAT3 DNA 结合活性

2.2　转染 STAT3 Decoy ON 对 MKN45 细胞增生的影响

MTT 法显示胃癌细胞转染 STAT3 Decoy ON 后 12、24、48、72 h 测得的吸光度值分别为 0.30、0.35、0.28、0.21，较干预前细胞的增生水平受到明显抑制，抑制作用在转染后 72 h 最强，生长抑制率为 52.27%；而与对照组比较，脂质体组和错配对照寡核苷酸组细胞的生长未受显著影响（$P>0.05$）（图 3）。

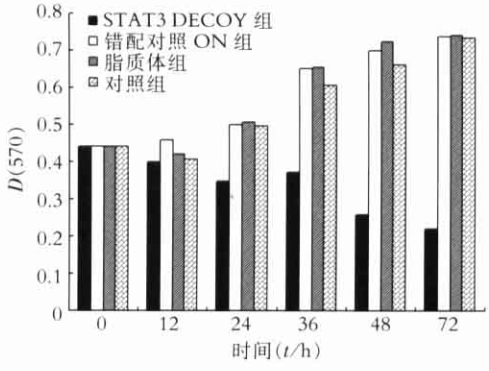


图 3　STAT3 Decoy ON 转染后不同时间对 MKN45 细胞增生的影响

2.3　动物模型及其特性

将 4×10^6 个细胞接种于裸鼠腹腔内，动物逐渐出现贫血、消瘦等恶病质状态，腹部进行性增大，死亡前或死亡后短期内剖检见腹腔内有血性腹水，死亡剖检时显示腹膜、肠管和肠系膜表面有多处散在的粟粒大小肿瘤结节，直径 0.5～1.0 cm，大网膜增厚挛缩，而膈、肝、脾及肺表面均未见肿瘤细胞种植。

2.3.1　腹腔种植瘤最大直径、腹水量及死亡率　腹水量以裸鼠死亡时，腹腔解剖获得的腹水为准，死亡率为对照组裸鼠全部死亡时各组的死亡率（表 1）。STAT3 Decoy ON 组腹腔种植瘤最大直径、腹水量明显低于其他 3 组（$P<0.05$），而 B、C、D 组之间没有显著差异；STAT3 Decoy ON 组死亡率与其他组相比，差异有显著性（$P<0.05$），B、C、D 组死亡率没有显著差异（表 1）（$P>0.05$）。

2.3.2　生存情况　对照组裸鼠 22 d 开始死亡，STAT3 Decoy ON 组 37 d 开始死亡，错配 Decoy ON 组 24 d 开始死亡，脂质体混合物组 23 d 开始死亡。各组裸鼠平均存活天数、存活率、生命延长率，见表 2。STAT3 Decoy ON 组裸鼠存活天数、存活率及生命延长率均明显高于对照组及 B、C 组，B、C、D 组之间存活天数、存活率及生命延长率没有显著差异（$P>0.05$）（表 2）。

表 1　不同处理组裸鼠的肿瘤生成、腹水量及死亡率

组别	种植瘤最大直径(mm)	腹水量(ml)	死亡率(%)
STAT3 Decoy ON	3.84±1.14[a]	1.96±0.26[a]	0
错配 Decoy ON	7.03±1.52	7.92±0.84	67
脂质体混合物	7.50±1.23	8.03±1.25	83
对照	8.03±1.67	8.82±1.42	100

a：$P<0.05$，与错配 Decoy ON、脂质体混合物、对照组比较

表 2　不同处理组荷瘤裸鼠的生存情况

组别	存活天数(t/d)	存活率(%)	生命延长率(%)
STAT3 Decoy ON	47.67±7.92[a]	100[a]	89.39[a]
错配 Decoy ON	29.67±4.76	33	17.89
脂质体混合物	27.33±3.61	17	6.60
对照	25.83±2.86	0	-

a：$P<0.05$，与错配 Decoy ON、脂质体混合物、对照组比较

2.3.3　转染 STAT3 Decoy ON 对种植瘤细胞周期分布的影响　STAT3 Decoy ON 组种植瘤细胞与对照组细胞比较，一方面 G_0/G_1 期比例增高，另一方面 S 期和 G_2/M 期比例降低，细胞的增殖指数降低；而相应的错配诱饵寡核苷酸组和脂质体组的变化不明显，表明 STAT3 Decoy ON 具有对种植瘤细胞的 G_0/G_1 期阻滞作用（表 3）。

表 3　不同处理组裸鼠种植瘤细胞周期分布

组别	各周期细胞比例(%，$x\pm s$)			增殖指数
	G_0/G_1	S	G_2/M	(%，$x\pm s$)
STAT3 Decoy ON	80.77±2.00[b]	10.86±3.89[a]	9.35±4.56[a]	19.86±2.42[b]
错配 Decoy ON	70.53±5.44	15.78±4.45	14.55±3.86	28.56±5.14
脂质体混合物	71.45±4.25	14.66±3.86	15.56±7.86	28.86±4.42
对照	67.15±1.56	18.54±2.12	13.68±2.35	30.50±2.42

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

3　讨论

胃癌患者术后出现腹膜播散，其预后极差，单纯手术治疗、全身化疗、腹腔化疗、放疗及免疫治疗都不能达到满意疗效；其根本原因在于术后腹腔内存在游离癌细胞，导致了根治性手术后的复发。目前患者是否伴有腹膜种植已经成为判断胃癌预后的一个重要因素。本研究采用 STAT3 Decoy ON 转染胃腺癌 MKN45 细胞，将其接种到裸鼠腹腔中，观察其治疗效果，以探讨防治胃癌术后复发和腹膜播散的有效策略。

最初研究表明 JAK-STAT 信号途径的作用方式主要是在正常生理活动中，STAT3 的激活快速而短暂，对于胚胎发育、器官形成、免疫功能的完善、细胞的生长、分化等过程起着关键性作用，但最近 JAK-STAT 信号途径与恶性肿瘤发生发展的关系为人们所重视的[3]，STAT3 在肿瘤组织中呈现过度激活，通过一系列作用机制，进而影响肿瘤的进程：① STAT3 的持续性激活

能通过上调 Bcl-xL、cyclins D1/D2、c-myc 的表达，干扰细胞的增殖和分化，抑制肿瘤的凋亡[4]。② STAT3 是 VEGF 基因直接的转录激活子[5]，阻断 STAT3 可消除 VEGF 过表达，产生抗血管生成作用[6]。③ 肿瘤细胞中表达的 STAT3 能够抑制促炎症介质的产生，阻断 STAT3 信号可以导致炎症细胞因子和化学趋化因子的产生，激活先天性免疫细胞[7]，从而激发了机体的肿瘤免疫监视反应[8]。由此可见，STAT3 的过表达可能同肿瘤的扩散和转移是密切相关的。

STAT3 decoy 竞争阻断法是指 STAT3 Decoy ON 特异性封闭细胞内过度活化的 p-STAT3 分子，抑制其下游生物效应；而不会对于机体发育及内环境的稳态产生不利的影响。Leong 等[2]应用 STAT3 Decoy ON 转染头颈部肿瘤细胞，发现其能明显抑制肿瘤细胞增殖和 STAT3 下游基因表达，但不对正常口腔角质细胞生长产生不良影响。因此策略具有高特异性、高效性的突出特点，特别适合于肿瘤的靶向性治疗，抑制肿瘤组织中 STAT3 信号途径无疑为人类抗肿瘤治疗提供了一条新的思路。本研究证实：STAT3 Decoy ON 转染对体外生长胃腺癌 MKN45 细胞具有明显的抑制效应，呈时间依赖性，这同国内俞丽芬等[9]应用反义寡核甘酸策略干扰 STAT3 途径的报道结果相似；体内实验同样显示 Decoy ON 对于种植瘤的生长具有抑制作用，可能的机制在于其对移植瘤细胞 G_0/G_1 期阻滞作用，使处于“休眠”状态的肿瘤细胞比例增加。EMSA 法检测到 Decoy ON 转染胃癌细胞后，细胞中 STAT3 DNA 结合活性受到明显的抑制，证实了干扰策略的靶向特异性，进一步的动物实验显示：STAT3 Decoy ON 转染细胞接种裸鼠，相对于对照组荷瘤裸鼠，前者的腹腔种植瘤最大直径、腹水产生量和死亡率明显低于后者；前者荷瘤鼠存活天数、存活率及生命延长率明显高于后者，说明 STAT3 Decoy ON 转染的胃癌细胞在裸鼠腹腔内的生长、种植和播散均受到了明显的抑制，影响到肿瘤的进一步发展，由此为将其用于胃癌患者的临床防治提供了有力的理论依据。综上，笔者认为，通过研制肿瘤治疗分子靶点 STAT3 的抑制剂，有助于进一步探究该蛋白在胃癌病程进展中所起的重要作用。

参考文献：

[1] Wang Z, Zhang X, Xu H, *et al*. Detection of peritoneal micrometastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for heparanase mRNA and cytology in peritoneal wash samples[J]. J Surg Oncol, 2005, 90(2): 59-65.

[2] Leong P L, Andrews G A, Johnson D E, *et al*. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 4138-4143.

[3] Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development[J]. Cancer Sci, 2006, 97(6): 439-447.

[4] 吕 伟，张 超，郝迎学，等. Stat3 靶向 RNA 干扰重组体的构建及鉴定[J]. 消化外科, 2006, 5(4): 283-287.

[5] Wei D, Le X, Zheng L *et al*. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis[J]. Oncogene, 2003, 22(3): 319-329.

[6] Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, *et al*. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 40026-40031.

[7] Wang T, Niu G, Kortylewski M, *et al*. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat3-signaling in tumor cells[J]. Nat Med, 2004, 10(1): 48-54.

[8] Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self[J]? Annu Rev Immunol, 2003, 21: 807-839.

[9] 俞丽芬，吴云林，乔敏敏，等. 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[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(7): 1527-1530.

（编辑 张大春）

《中华临床医师杂志(电子版)》征稿启事

《中华临床医师杂志(电子版)》拟于2007年1月正式出刊(月刊)，本刊是新闻出版总署(新出音[2006]817号)“十一五”国家重点出版规划立项的电子连续出版物之一。杂志由中华人民共和国卫生部主管，中华医学会主办，中华医学电子音像出版社出版的专业医学学术期刊，面向全国公开发行。

《中华临床医师杂志(电子版)》以CD-ROM光盘附导读形式出版发行，实现了传统纸质媒体与电子媒体的结合。主要栏目有：论著、综述、述评、临床研究、经验与发明、病例报告、疑难病例分析、会议报道和继续医学教育等。

本刊编委会郑重承诺：将以最快的速度组织专家对来稿进行评审，保证快速、高效发表学术成果。欢迎医学界同行积极投稿并订阅杂志！

投稿地址：北京市100035-50信箱　　邮　　编：100035

电　　话：(010)62234701　　传　　真：(010)62234701

电子信箱：lcdoctor@163.com　　网　　址：www.cliniemed.net / www.cliniemed.cn