论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0764-05

人 STAT3 重组腺病毒的制备及其对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的影响

董宗明[1],赵永亮[1],余佩武[1],黄 钢[2] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心[1],基础医学部医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 制备可表达人转录因子 STAT3 的重组腺病毒,检测该基因在胃癌细胞株 SGC-7901 的表达活性及对其增殖的影响。**方法** 以人胎盘组织 cDNAs 为模板通过 PCR 获得 hSTAT3 完整阅读框,T/A 克隆测序证实后,亚克隆至穿梭载体 pAdTrack-CMV 中,*Pme* Ⅰ线性化与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌同源重组,经 *Pac* Ⅰ线性化后转染 293FT 细胞包装,同时包装空载体腺病毒,进行病毒滴度测定。取 AdV-STAT3、AdV-GFP 分别感染 SGC-7901 细胞,设空白对照,Western blot 检测 3 组细胞 STAT3 蛋白表达,MTT 法检测对细胞增殖的影响。**结果** 获得 hSTAT3 完整阅读框,T 载体中测序无突变,亚克隆至 pAdTrack-CMV,并与 pAdEasy-1 成功重组后包装 AdV-STAT3,测定滴度为 2.8×10^{10} pfu/mL,AdV-GFP 滴度为 3.2×10^{10} pfu/mL。与 AdV-GFP 组及空白对照组比,Western blot 示 AdV-STAT3 组蛋白明显表达($P<0.05$);MTT 示 AdV-1-STAT3 组明显促进细胞增殖($P<0.05$)。**结论** 成功制备 hSTAT3 的重组腺病毒,感染胃癌细胞株 SGC-7901 后高表达并促进其增殖。

[关键词] STAT3;重组腺病毒;胃癌;增殖
[中图法分类号] R394-33;R394.2;R735.2 [文献标志码] A

Construction of human STAT3 recombinant adenovirus vector and its effect on gastric cancer cell line SGC-7901

Dong Zongming[1], Zhao Yongliang[1], Yu Peiwu[1], Huang Gang[2] ([1]Center of General Surgery, Center of Minimally Invading Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare a recombinant adenovirus vector containing human signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and to investigate the STAT3 expression in gastric cancer cell line SGC-7901 and its effect on proliferation in the cells. **Methods** The complete coding sequence of human STAT3 was obtained by PCR using the cDNAs of placenta from healthy volunteers as a template. The hSTAT3 was cloned into a T vector pTA2 and sequenced, and then the STAT3 was subcloned into a shuttle plasmid pAdTrack-CMV. The linearized product of pAd-Track-CMV-STAT was transferred into BJ5183 *Escherichia coli* for homologous recombination with pAdeasy-1 vector. The recombined adenovirus DNA was transfected into 293FT cells for packaging and amplifying after linearized by *Pac* Ⅰ, and then the titer of successfully packaged recombinant adenovirus was determined. The recombinant adenovirus vector containing human STAT3 (AdV-STAT3) was taken to transfect SGC-7901 cells, and the recombinant adenovirus vector containing GFP (AdV-GFP) was used as control. The expression of STAT3 was detected by Western blotting and the effect of STAT3 on cell proliferation was determined by MTT assay. **Results** The complete coding sequence of human STAT3 gene was obtained, and was confirmed by sequencing analysis after cloned into the T vector pTA2. The STAT3 gene was successfully constructed into the recombinant adenovirus plasmid after being subcloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV. The titers of pAdEasy-1-STAT3 and pAdEasy-1-GFP were 2.8×10^{10} pfu/mL and 3.2×10^{10} pfu/mL. Comparing with AdV-GFP and blank control, Western blot assay showed that the proteins expression of STAT3 significantly was increased in the AdV-STAT3 group ($P<0.05$). MTT assay showed that

[基金项目] 国家自然科学基金(81071980)
[通信作者] 余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130115.1727.002.html(2013-01-15)

the proliferation of the SGC-7901 cells was significantly increased after transfected with AdV-STAT3 ($P < 0.05$). **Conclusion** Adenovirus vector AdV-STAT3 is successfully obtained. STAT3 protein can be highly expressed in SGC-7901 cells and promote cell proliferation.

[**Key words**] STAT3; recombinant adenovirus; gastric cancer; proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071980). Corresponding author: Yu Peiwu, Tel: 86-23-68754161, E-mail: yupeiwu01@vip.sina.com

信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs)通路与细胞增殖、分化及凋亡密切相关,该通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶变[1]。STATs家族目前鉴定有7个成员,其中STAT1、STAT3、STAT5的异常表达、活化与肿瘤发生发展密切相关[2-3]。研究认为STAT3在肿瘤炎症微环境形成及肿瘤免疫抑制发生中处于主导地位,但其详细的细胞分子机制尚未完全明确[4]。研究表明,STAT3的异常表达和活化与胃癌的发生、发展,淋巴转移及预后密切相关[5-6],干扰STAT3蛋白表达能明显抑制胃癌细胞株的增殖[7],然而过表达STAT3是否促进胃癌细胞株增殖少见报道;STAT3信号参与了IL-6介导的树突状细胞(dendritic cells, DCs)成熟障碍,DCs分化成熟障碍、功能缺陷与胃癌等肿瘤免疫逃逸密切相关[8-9]。本课题组前期研究初步证实STAT3信号通路参与IL-6介导的DCs成熟障碍[10]。本研究构建能促进胃癌细胞增殖的人STAT3重组腺病毒,进一步阐明STAT3在胃癌的发生、发展及免疫抑制中的作用机制,为后续调控其在肿瘤细胞及肿瘤微环境中的表达研究IL-6-STAT3信号途径与胃癌之间关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人胎盘组织来源cDNAs、腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV、骨架质粒pAdEasy-1、胃癌细胞株SGC-7901、大肠杆菌BJ5183菌株、DH10B菌株及MTT、DMSO由本实验室保存,TArget Clone™-Plus-T载体克隆试剂盒购自TOYOBO公司,293FT细购自中科院上海细胞所。引物合成和测序由北京华大基因完成。质粒小抽试剂盒、胶回收试剂盒购自上海生工公司,2×*Taq* PCR MasterMix购自北京天根公司,KOD-plus DNA多聚酶购自TOYOBO,T_4 DNA连接酶、DNA Marker、限制性内切酶*Eco*RⅠ、*Not*Ⅰ、*Xho*Ⅰ购自TaKaRa公司,限制性内切酶*Pme*Ⅰ、*Pac*Ⅰ购自New England Biolabs公司,Lipofetamine 2000购自Invitrogen公司,DMEM培养基、胎牛血清购自Gibco公司;鼠抗人STAT3多克隆抗体、鼠抗人GAPDH单抗、HRP标记的羊抗鼠IgG均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 人STAT3基因的扩增及T载体的构建及测序 参照STAT3基因的标准序列(L29277.1),应用Primer Primer5.0设计克隆引物及检测引物。克隆引物:上游P1:5′-CAGTTGGGACCCCTGATTTTTAGC-3′,下游P2:5′-GATGATCTGGGGTTTGGCTGTGT-3′,预期扩增片段为2 427 bp;检测引物:上游引物同P1,下游引物P3:5′-CTGCTTGATTCTTCGTAGATTGTGCT-3′,预期产物长度为290 bp。以人胎盘组织来源的cDNAs为模板,进行PCR扩增获得含人STAT3基因完整编码区的cDNA。PCR反应体系(50 μL):胎盘cDNAs 1 μL,上下游克隆引物各1 μL(10 μmol/L),10×KOD Buffer 5 μL,dNTPs(各2 mmol/L)5 μL,Mg^{2+}(25 μmol/L)2 μL KOD-plus DNA多聚酶(1 U/μL)1 μL, ddH_2O 34 μL。PCR反应条件:98 ℃预变性6 min;98 ℃ 20 s,68 ℃ 3 min进行35次循环;而后直接向PCR产物中加入1 μL A-attachment Mix 72 ℃继续反应30 min进行加A尾。PCR产物经过1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪判断后切胶回收约2 500 bp大小的STAT3 cDNA片段,而后连入pTA2载体,4 ℃过夜连接。采用100 mmol/L氯化钙转化法将连接产物转化到大肠埃希菌DH10B,经过蓝白斑筛选,挑取2个白色单克隆,摇菌过夜后经菌液PCR筛选,PCR反应体系(20 μL),检测引物P1、P3各1 μL(10 μmol/L),2×*Taq* PCR MasterMix 10 μL,菌液1 μL ddH_2O 7 μL,设立不加菌液的阴性对照。PCR反应条件:98 ℃预变性6 min;98 ℃ 20 s,68 ℃ 30 s进行35次循环;电泳初筛后提取质粒,通过*Eco*RⅠ酶切初步鉴定后进行测序鉴定。

1.2.2 pAd-Track-CMV-STAT3穿梭质粒的构建 pTA2-STAT3质粒及pAd-Track-CMV质粒分别经过*Not*Ⅰ、*Xho*Ⅰ双酶切,酶切产物采用PCR产物回收法进行回收,将线性化的载体pAd-Track-CMV和STAT3片段经T_4 DNA连接酶过夜连接,然后将连接产物转化DH10B感受态细菌,利用含有卡那霉素(50 ng/L)LB培养基平板筛选出阳性克隆,经菌液PCR(条件体系同1.2.1)鉴定后提质粒,再经*Not*Ⅰ、*Xho*Ⅰ双酶切鉴定确认得到的pAd-Track-CMV-STAT3穿梭质粒。

1.2.3 重组腺病毒的构建及鉴定 取构建好的pAd-Track-CMV-STAT3穿梭质粒14 μL,经*Pme*Ⅰ酶切线性化后,转化含有腺病毒骨架质粒BJ5183(预先转入AdEasier)感受态大肠杆菌进行同源重组。经卡那霉素(50 ng/L)LB平板筛选克隆菌落,挑选小克隆菌落加入含有卡那霉素(50 ng/L)的LB培养液摇床过夜,提质粒,而后取2.5 μL质粒转化制备好的感受态DH10B大肠杆菌进行大量扩增,卡那霉素LB培养基平板筛选出阳性克隆,提质粒,经*Pac*Ⅰ酶切鉴定。

1.2.4 重组人STAT3腺病毒的包装、扩增、纯化及滴度测定 将293FT细胞传代接种到含100 ml/L胎牛血清的DMEM培

养基,用6孔培养板培养24 h。*Pac* Ⅰ线性化AdV-STAT3后,经乙醇沉淀回收,在无血清DEME培养基中与Lipofetamine 2000充分混合20 min,形成复合物。将复合物加入提前传代的293FT细胞,轻轻充分摇匀,同样方法包装没有目的基因的AdV-GFP作为对照。细胞培养8 h后更换含有2%胎牛血清的DMEM培养基,24 h观察细胞及绿色荧光表达情况,继续培养7~10 d,至90%细胞出现病毒空斑时收集细胞,分别于-80 ℃/37 ℃反复冻融细胞4次,离心收集上清液,而后将收集到的病毒液体重新感染293FT细胞2~3次扩增病毒。收集的病毒利用密度梯度离心(CSCl)纯化,再经0.45 μm的过滤器过滤后分装,-80 ℃保存。病毒滴度测定参考文献[11]进行:病毒滴度(pfu/mL)=GFP阳性细胞数×病毒稀释倍数/0.5。

1.2.5 利用Western blot对重组腺病毒在胃癌细胞株SGC-7901的表达鉴定 将收集的AdV-GFP、AdV-STAT3感染2组胃癌细胞株细胞,同时设置空白细胞组,96 h后分别收集裂解细胞,提取细胞总蛋白,取20 μg加入6×SDS-PAGE上样缓冲液混匀,煮沸10 min进行10% SDS-PAGE分离蛋白条带,再将凝胶蛋白转印到PVDF膜,5%的脱脂奶粉室温封闭1~2 h;TBST洗膜3次,加入鼠抗人STAT3多克隆抗体(1∶200稀释)和鼠抗人GADPH单抗(1∶200稀释),4 ℃过夜,洗膜,分别加入HRP标记的羊抗鼠IgG(1∶1 000稀释),室温孵育1 h后,ECL发光。用Quantity One软件,以STAT3和GAPDH灰度比值进行半定量分析蛋白的表达。实验重复3次。

1.2.6 MTT法检测AdV-STAT3对SGC-7901细胞增殖能力的影响 收集对数生长期的SGC-7901细胞,以1×10^4/孔接种于7个96孔培养板,统一为100 μL,接种后感染制备的重组腺病毒AdV-STAT3、空病毒AdV-GFP,同时设置空细胞组。置于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养,分别在0、1、2、3、4、5、6、7 d向相应的组孔加入20 μL MTT(0.5 mg/mL),继续培养4 h后低速离心弃上清液,加入DMSO液100 μL振荡5 min,待蓝紫色溶解后,用全自动酶标仪在波长490 nm处读取光密度值[D(490)]。计算对细胞增殖的促进率。

细胞增殖促进率=[实验组D(490)平均值/对照组D(490)平均值-1]×100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,2组间均数比较用t检验,3组总体比较用方差分析,其中两两比较采用LSD法,检验水准为0.05。

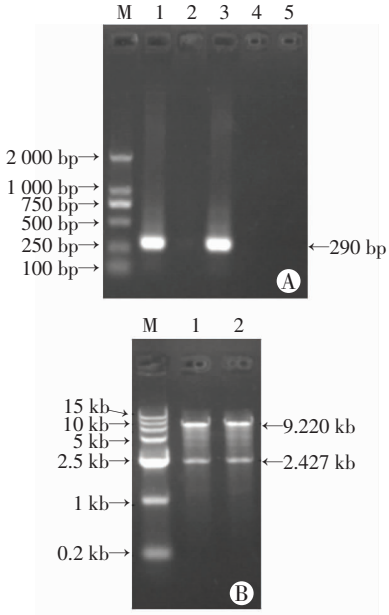
2 结果

2.1 人STAT3基因的扩增及STAT3-pTA2的构建和鉴定

以人胎盘组织来源的cDNAs为模板,PCR克隆STAT3基因并加A尾后,经琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物为2 500 bp左右的DNA,同预期片段大小一致(图1A)。经过T/A克隆后,挑选2个白色菌落,经菌液PCR鉴定均为阳性克隆(图1B),提质粒,*Eco*R Ⅰ酶切鉴定说明目的基因已插入载体(图1C),测序鉴定同GenBank发表人的STAT3(ID L29277.1)的基因序列完全吻合,且无突变发生。

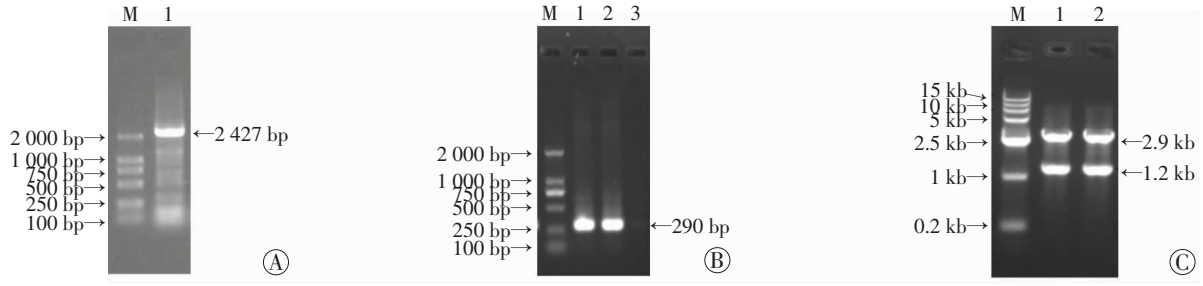
2.2 pAd-Track-CMV-STAT3穿梭质粒的构建及鉴定

经双酶切后正向连接构建的pAd-Track-CMV-STAT3穿梭质粒,通过卡那霉素LB平板挑选克隆,挑选4个菌落菌液PCR鉴定,有2个阳性克隆(图2A),提取质粒,用*Not* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切进一步鉴定,穿梭质粒构建成功(图2B)。



A:菌液PCR鉴定 M:DNA标准,1、3:穿梭质粒pAd-Track-CMV-STAT3阳性克隆,2、4:阴性克隆,5:阳性对照;B:*Not* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切鉴定 M:DNA标准,1、2:连入hSTAT3的穿梭质粒

图2 重组腺病毒穿梭质粒pAd-Track-CMV-STAT3鉴定

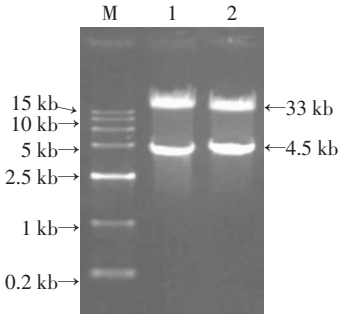


A:扩增产物鉴定 M:DNA标准;1:hSTAT3 cDNA的扩增产物;B:菌液PCR鉴定 M:DNA标准;1、2:T/A克隆阳性克隆;3:阴性对照;C:*Eco*R Ⅰ酶切鉴定 M:DNA标准;1、2:含hSTAT3的重组载体

图1 人STAT3的PCR扩增与T载体重组子的鉴定

2.3 人 STAT3 腺病毒同源重组、鉴定包装及滴度测定

经 *Pme* Ⅰ酶切线性穿梭质粒后转化感受态 BJ5183 大肠杆菌(含有 pAdEasy-1)同源重组后,挑选小的克隆菌落提质粒经酶 *Pac* Ⅰ酶切鉴定,琼脂凝胶电泳可见 33 kb 重组腺病毒骨架和 4.5 kb 两条片段(图 3),与预期结果相符,提示腺病毒重组成功。经 *Pac* Ⅰ酶线性化的 AdV-STAT3、AdV-GFP 分别转染 293 细胞后 24 h,通过荧光显微镜观察到细胞有绿色荧光,并且随时间的推移,荧光显示越明显,提示转染成功。7 d 后,大量 293 细胞表达绿色荧光,并向周围蔓延成呈葡萄状(图 4)。将收集的转染细胞的上清反复感染 293 细胞扩增病毒,发现随代数增加腺病毒感染性稳定增强,产毒时间缩短。收集扩增重组腺病毒 AdV-STAT3 及空腺病毒 AdV-GFP 滴度分别为 2.8×10^{10}、3.7×10^{10}pfu/mL。



M:DNA 标准;1、2:重组腺病毒 AdV-STAT3

图 3 重组腺病毒质粒 AdV-STAT3 的 *Pac* Ⅰ酶切鉴定

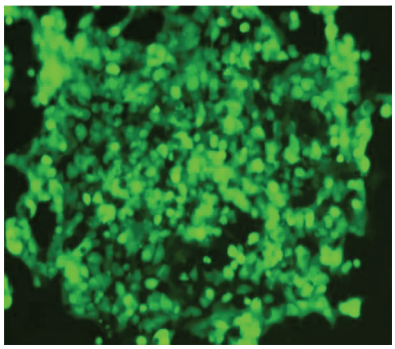
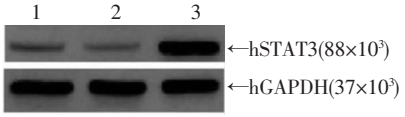


图 4 转染重组腺病毒 7 d 后 293FT 细胞绿色荧光蛋白的表达

(荧光显微镜 ×100)

2.4 腺病毒转染 SGC-7901 细胞的 STAT3 蛋白表达

Western blot 检测结果显示,AdV-STAT3 感染组 SGC-7901 细胞中 STAT3 蛋白表达较 AdV-GFP 感染组、空细胞组明显增强(图 5)。STAT3/GAPDH 显示,AdV-STAT3 感染组(0.97 ± 0.02)与 AdV-GFP 感染组(0.15 ± 0.02)和空细胞组(0.16 ± 0.02)相比,STAT3 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$)。



1:空细胞组;2:AdV-GFP 感染组;3:AdV-STAT3 感染组

图 5 Western blot 检测 3 组 SGC-7901 细胞 STAT3 蛋白表达

2.5 重组腺病毒感染后对 SGC-7901 细胞增殖能力的影响

MTT 检测示,感染 AdV-STAT3 后促进了 SGC-7901 细胞的增殖,且促进作用随着时间的延长(1、2、3、4、5、6、7 d)增强,促进率分别是 7.7%、15.3%、21.6%、30.4%、36.7%、40.2%、41.7%;感染 AdV-GFP 组的促进率分别为 1.3%、0.9%、1.5%、1.6%、1.2%、1.1%、1.0%。2 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

肿瘤的发生、发展与其所处的微环境状态密不可分,STAT3 作为肿瘤微环境的一个重要角色,与肿瘤的增殖、分化、侵袭、转移、血管生成和免疫逃逸等密切相关,被视为一种新型的肿瘤分子标志物[12-13]。既往研究表明 STAT3 在胃癌等多种恶性肿瘤组织中的肿瘤细胞和免疫细胞均持续激活和高表达[14],且持续激活和高表达导致恶性程度增高及预后不良[15],干扰 STAT3 的表达会明显抑制胃癌细胞的增殖[7]。已知 STATs 家族成员功能与天然免疫及获得性免疫均相关[1],并且 STATs 家族成员中,STAT3 在肿瘤免疫及免疫耐受中作用最为显著[16],提示 STAT3 高表达与肿瘤的免疫失调密切相关。近年研究表明,STAT3 信号参与了 IL-6 介导的 DCs 成熟障碍,DCs 分化成熟障碍与功能缺陷及胃癌等肿瘤免疫逃逸密切相关[8-9],具体的分子机制尚不清楚。

为了深入研究胃癌的发生、发展及其免疫抑制发生机制,我们选择重组腺病毒作为调控手段,通过高表达 STAT3,模拟肿瘤及肿瘤微环境 STAT3 的活化来探讨其具体分子机制。研究报道,在正常细胞中阻断 STAT3 信号通路后并不影响细胞的增殖和存活[17],因此我们构建的 STAT3 重组腺病毒还应能促进肿瘤细胞的增殖才能满足病变机制研究的需要。重组腺病毒载体因其具有宿主范围广、包装容量大、与人类基因同源等优点,是当前应用最广泛的病毒载体之一,且由于重组腺病毒基因转染细胞后,DNA 游离于宿主基因组外,因此其安全性高[18]。1998 年国外首次报道了 pAdEasy 系统,经该系统穿梭质粒与骨架质粒在原核细胞 *E. coli* BJ5183 中进行高效同源重组,通过卡那霉素培养平板筛选重组体,然后将其转染 293FT 细胞包装重组病毒,使得载体构建简单易操作。因此本研究选用 pAdEasy 系统作为载体构建重组分子。

本研究通过酶切及测序鉴定表明成功构建了人 STAT3 的重组腺病毒,并利用 293FT 细胞包装了病毒。将收集的重组腺病毒和空病毒分别感染了 2 组胃癌细胞株 SGC-7901 细胞,同时设置对照组。Western blot 检测 3 组细胞 STAT3 蛋白的表达,结果显示重组腺病

毒组显著强于空病毒组和对照组，可用于下一步STAT3基因的过表达实验。MTT结果示，转染了重组腺病毒AdV-STAT3的细胞株增殖能力明显增强，可满足下一步机制研究的需要。本研究获得了可过表达有功能活性STAT3的重组腺病毒，为进一步探讨Jak2-STAT3信号通路与胃癌之间的关系打下实验基础。

参考文献：

[1] Ihle J N. The Stat family in cytokine signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(2): 211-217.

[2] Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6(2): 107-121.

[3] Keane N, Freeman C, Swords R, *et al*. EPHA3 as a novel therapeutic target in the hematological malignancies[J]. Expert Rev Hematol, 2012, 5(3): 325-340.

[4] 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 Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 4138-4143.

[5] Jackson C B, Judd L M, Menheniott T R, *et al*. Augmented gp130-mediated cytokine signalling accompanies human gastric cancer progression[J]. J Pathol, 2007, 213(2): 140-151.

[6] Kim D Y, Cha S T, Ahn D H, *et al*. STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(4): 646-651.

[7] 童书青，肖东杰，汪运山，等. STAT3-siRNA表达载体的构建及其对胃癌细胞株HGC-27细胞增殖的影响[J]. 山东大学学报：医学版，2012，50(1)：76-80.

[8] Ikeguchi M, Hatada T, Yamamoto M, *et al*. Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2009, 12(2): 95-100.

[9] Yoon J M, Lee K H, Lee S M, *et al*. The immune modulation of Clara cell-10 in human peripheral monocytes and dendritic cells[J]. Int J Mol Med, 2010, 26(3): 415-423.

[10] 赵永亮，余佩武，雷晓，等. JAK2/STAT3途径在IL-6抑制LPS诱导的树突状细胞分化成熟中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1063-1065.

[11] 黄钢，王海燕，王凯，等. 人pri-miR-155重组腺病毒的制备及其表达与活性鉴定[J]. 免疫学杂志，2010，26(3)：246-250，254.

[12] Subramaniam A, Shanmugam M K, Perumal E, *et al*. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1835(1): 46-60.

[13] Lee J, Kang W K, Park J O, *et al*. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predictes poor clinical outcome in gastric adenocarcinoma[J]. APMIS, 2009, 117(8): 598-606.

[14] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(1): 41-51.

[15] Gong W, Wang L, Yao J C, *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.

[16] Yu H, Pardol D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 798-809.

[17] Yang Z, Cai J H, Xie S J, *et al*. Therapeutic effects of signal transducer and activator of transcription 3 siRNA on human breast cancer in xenograft mice[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(12): 1854-1861.

[18] Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, *et al*. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3- encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy[J]. Oncol Rep, 2012, 28(5): 1645-1652.

（收稿：2012-12-07；修回：2013-01-07）

（编辑 龙 亮）

（上接763页）

仅有1例IgG型抗P1导致溶血性输血反应的病例，该例红细胞为P_2型的男性患者首次输注600 mL疑为P_1型红细胞悬液，1个月后再次输注200 mL P_1型红细胞时发生了溶血性输血反应[4]。国外也仅有数例抗P1引起急性和迟发性溶血性输血反应的报道[2,5]，其中1例在交叉配血时未在37 ℃水浴后离心观察结果，漏检了抗P1，发生了急性溶血性输血反应。这些文献提示严格进行盐水和抗人球蛋白介质的交叉配血试验可以避免体内有抗P1的患者误输P_1型红细胞。

P_2血型人体内产生抗P1的机制尚不完全清楚，抗P1绝大多数为天然抗体，少数由输血等免疫方式产生[2,4]。研究表明，泰国北部人群血清中最常见的意外抗体是抗P1，可能与该地区肝吸虫感染率高发有关[6]。国外曾报道P_2血型养鸽子人群血清产生抗P1比例显著高于P_2血型的一般人群，推测鸽子的羽毛和脱落物可能与P1抗原物质相同或相似，可引起免疫反应[2]。本例献血者为女性农民，无输血、妊娠及饲养家鸽史，尚不能推断如何产生了IgM/IgG型抗P1，其临床意义有待进一步观察。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京：东南大学出版社，2006：246-249.

[2] Logdberg L, Reid ME, Zelinski T. Human blood group genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited[J]. Transfus Med Rev, 2011, 25(1): 36-46.

[3] 周根水，童小燕，舒锦，等. 抗-P1引起交叉配血不合一例分析[J]. 实验与检验医学，2010，28(2)：199.

[4] 孙迪，张易水，刘祥忠. IgG性质的抗-P_1检出1例[J]. 中国输血杂志，2002，15(1)：50.

[5] Thakral B, Bhattacharya P, Agnihotri N, *et al*. Acute hemolytic transfusion reaction by anti-P1 antibody in pregnancy[J]. Am J Hematol, 2005, 78(2): 163-164.

[6] Romphruk AV, Wanhagij C, Akahat J, *et al*. Anti-P1: the most common unexpected antibodies in northeastern-Thais[J]. J Med Assoc Thai, 1999, 82(8): 803-807.

（收稿：2013-01-04；修回：2013-04-07）

（编辑 邓强庭）