

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00076

STAT3 反义寡核苷酸对人肺腺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

孙 顶, 蔡建明*, 祝宝让, 程 赢, 李百龙, 崔建国

第二军医大学海军医学系防原医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨我们自行设计的 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 反义核酸(ASODN)对裸鼠肺腺癌 A549 细胞移植瘤的成瘤能力和移植瘤的抑制作用。**方法** 将经全硫代修饰的 STAT3 ASODN 加入到培养的 A549 细胞内, CCK-8 法检测细胞生长的抑制率, 然后将这种细胞接种于裸鼠颈部皮下, 观察肿瘤出现的时间和肿瘤体积的变化, 并计算成瘤率。同时取未经处理的 A549 细胞接种于裸鼠颈部皮下建立移植瘤模型, 待瘤结节直径大于 5 mm 后, 分为 STAT3 ASODN 实验组、生理盐水组和无义寡核苷酸对照组。实验组用 15 mg/kg ASODN 每天 1 次直接瘤内注射, 连续 3 周, 隔日测量肿瘤大小。处理 30 d 后, 剥离瘤块称质量。蛋白质免疫印迹法检测肿瘤中 STAT3、p-STAT3 的表达。**结果** STAT3 ASODN 显著抑制 A549 细胞生长, 与无义寡核苷酸组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。STAT3 ASODN 作用后的 A549 细胞在裸鼠皮下成瘤能力明显降低, 抑瘤率达 75.8%。在各组荷瘤动物模型中, 生理盐水对照组和无义寡核苷酸对照组的瘤体进行性增大, 而 STAT3 ASODN 处理组的瘤块生长缓慢, 与 2 个对照组相比均有差异($P < 0.01$), 处理 30 d 后, ASODN 处理组的肿瘤质量与 2 个对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$), STAT3 ASODN 处理组裸鼠 A549 细胞移植瘤的生长明显受到抑制, 抑瘤率为 51.1%。肿瘤中 STAT3 蛋白表达水平以及磷酸化水平也明显下调。**结论** STAT3 ASODN 能降低 A549 细胞的成瘤率、抑制移植瘤生长。

[关键词] 反义寡核苷酸类; STAT3; 肺肿瘤; 腺癌; 肿瘤移植; 抑瘤作用

[中图分类号] R 734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)01-0076-04

Inhibitory effect of STAT3 antisense oligodeoxynucleotide against human adenocarcinoma of lung derived from A549 cell in nude mice

SUN Ding, CAI Jian-ming*, ZHU Bao-rang, CHENG Ying, LI Bai-long, CUI Jian-guo

Department of Atomic Irradiation Prevention, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotide(ASODN) of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3) on development and growth of transplanted lung A549 cell adenocarcinoma in nude mice. **Methods** The inhibitory effects of STAT 3 ASODN on A549 cell growth was evaluated by CCK-8 assay. STAT 3 ASODN-treated A549 cells were implanted subcutaneously into nude mice; the tumor growth was observed and the tumor-forming rate was calculated. After subcutaneous implantation of the untreated A549 cells, the tumor-bearing mice were randomized into 3 groups: control group, STAT 3 ASODN group, and nonsense oligodeoxynucleotide (NSODN) group, with normal saline, STAT 3 ASODN, and STAT 3 NSODN injected intatumorally (15 mg/kg daily for 3 weeks). The tumor volumes were measured every other day and the tumor weights were determined. The protein expressions of STAT 3 and p-STAT 3 in xenografts were examined by Western blotting analysis. **Results** STAT 3 ASODN significantly inhibited the growth of A549 cells compared with STAT 3 NSODN group ($P < 0.05$). The tumor formation ability of A549 cells treated with STAT 3 ASODN was significantly decreased (with the tumor inhibitory rate being 75.8%). Moreover, the growth of transplanted tumor was also significantly inhibited in STAT 3 ASODN group as compared with those in NSODN group and control group ($P < 0.05$). The tumor weights were significantly reduced in STAT 3 ASODN group than in STAT 3 NSODN group and control group (with the tumor inhibitory rate being 51.1%). The expression of STAT 3 protein and p-STAT 3 was also down-regulated in STAT 3 ASODN group. **Conclusion** STAT 3 ASODN can suppress the tumorigenic ability of A549 cells and inhibit the growth of transplanted tumor in nude mice.

[Key words] antisense oligonucleotides; STAT 3; lung neoplasms; adenocarcinoma; neoplasm transplantation; antitumor effect

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1): 76-79]

[收稿日期] 2010-03-30

[接受日期] 2010-12-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30470415). Supported by National Natural Science Foundation of China(30470415).

[作者简介] 孙 顶, 硕士, 讲师. E-mail: sd-369@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871148, E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 是 EGFR、IL-6/JAK、Src 等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道的汇焦点,调节下游多个靶基因如 Bcl-x_L、Bcl-2、Mcl-1、c-Myc、VEGF、P²¹^{WAF/CIP1}、CyclinD1 等的表达,在多种肿瘤细胞和组织中都有激活,是近年来备受关注的的一个重要基因靶点。本室在前期研究中利用自行设计的 STAT3 反义核酸 (ASODN) 的体外实验发现:在 50~300 nmol/L 范围内,STAT3 ASODN 能极强地抑制 A549 细胞增殖,抑制 A549 细胞中 STAT3 蛋白表达及降低其磷酸化水平,促进其凋亡^[1]。本研究在前期研究的基础上,观察 STAT3 ASODN 对人肺癌细胞裸鼠的成瘤能力的影响;并建立人肺癌裸鼠移植瘤模型,观察 STAT3 ASODN 在体内的抑瘤效果,探讨其临床应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 STAT3 反义序列 设计和筛选参见文献^[1],以细胞增殖抑制效率最高的 AS10 作为研究对象(其序列因涉及专利,暂不公开),无义序列(NS-STAT3):5'-GCT CCA GCA TCT GCT GCT TC-3',各序列由上海生工生物工程技术有限公司合成,全硫代修饰,聚丙烯酰胺纯化。

1.1.2 细胞株 人肺癌细胞株 A549 由中国科学院上海药物研究所惠赠。

1.1.3 实验动物 4 周龄 BALB/c 裸小鼠,体质量 16~18 g,雄性,购于第二军医大学实验动物中心,饲养于 SPF 级无菌饲养室,自由摄取食物和水。

1.1.4 试剂 RPMI 1640 培养液购于 Gibco 公司,胎牛血清购于兰州民海生物工程有限公司,Cell Count Kit(CCK-8)为日本同仁化学研究所提供。兔源多克隆抗 STAT3 总蛋白抗体、鼠源单克隆抗 705-酪氨酸磷酸化 STAT3(p-STAT3) 抗体均购自 Santa Cruz 公司;鼠源多克隆抗 Bcl-x_L 抗体购自 e-Bioscience 公司,鼠源单克隆抗 β-actin 的抗体购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、兔抗鼠二抗(200 μg/ml)购自上海普飞生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 A549 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,实验所用细胞均处于指数生长期。

1.3 CASY 细胞计数分析 指数生长期细胞接种于 6 孔板内,每孔细胞数约 1×10⁵ 个,按实验要求设对照组(不加寡核苷酸,其他处理同)和不同处理组(无义组、反义组),以 400 nmol/L 浓度转染,48 h 后

以相同体积的培养液消化收集各组细胞,上 CASY 细胞计数分析仪(CASY-TT 型,德国 Innovatis 公司)进行计数。

1.4 抑制成瘤实验 细胞置于 200 ml 培养瓶中连续培养,待细胞长满至 70%~80% 时,分别用含浓度为 100 nmol/L ASODN、NSODN 的培养液替代原培养液继续培养 24 h,0.25% 的胰酶消化并收集细胞,制成细胞悬液备用。24 只裸鼠分为未处理组、ASODN 组、NSODN 组,每组 8 只,分别于颈部皮下接种未经处理的以及分别用 ASODN 和 NSODN 处理的细胞,细胞接种数量约 1×10⁷ 个(0.2 ml 细胞悬液),以皮下结节直径大于 0.5 cm 为成瘤标准,观察肿瘤形成时间,计算成瘤率。接种后 30 d 颈椎脱臼致死,剥离肿瘤称质量。

1.5 移植瘤抑制实验 接种未经处理的 A549 细胞悬液的裸鼠待成瘤后,选 30 只符合条件的裸鼠(皮下结节直径大于 0.5 cm)随机分为 3 组:(1)生理盐水组:每日于瘤体内多点注射 0.2 ml 生理盐水;(2)ASODN 组:同法注射 0.2 ml STAT3 ASODN,给药剂量 15 mg/kg;(3)NSODN 组:同法注射 0.2 ml NSODN,给药剂量 15 mg/kg。各组连续给药 3 周,处理后隔天用游标卡尺测量肿瘤最长径(L)和横径(S),按 $V(\text{cm}^3) = 0.5 \times L \times S^2$ 计算肿瘤近似体积。处理 3 周后颈椎脱臼处死动物,剥瘤称重,计算抑瘤率。抑瘤率(%) = (NSODN 组平均瘤质量 - ASODN 组平均瘤质量) / NSODN 组平均瘤质量 × 100%。

1.6 蛋白质免疫印迹法检测 STAT3、p-STAT3 的表达 取各组裸鼠移植瘤组织标本,用蛋白抽提试剂盒抽提总蛋白,考马斯亮蓝法定量,50 μg 总蛋白上样,经 10% SDS-PAGEA,转膜,含 50 g/L 脱脂奶粉的 T-BST 封闭 2 h,4℃ 过夜,加入一抗(STAT3 多克隆抗体 1:1 000、酪氨酸磷酸化 STAT3 单克隆抗体 1:1 000、β-actin 单克隆抗体 1:3 000),4℃ 孵育 4 h,加入二抗(1:1 000),化学发光试剂盒曝光底片显影。

1.7 统计学处理 用 SPSS 11.0 软件处理数据,采用单因素方差分析比较组间差异。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 STAT3 ASODN 对 A549 细胞的抑制作用 图 1 中横轴表示细胞的直径大小,纵轴表示该直径大小的细胞数,标示线表示正常细胞直径大小的临界值,曲线下面积表示测量该组的细胞总数,结果可见 AS10 组的细胞数明显少于对照组和无义 STAT3 组($P < 0.05$),表明 AS10 对 A549 细胞有明显的增殖抑制效应。

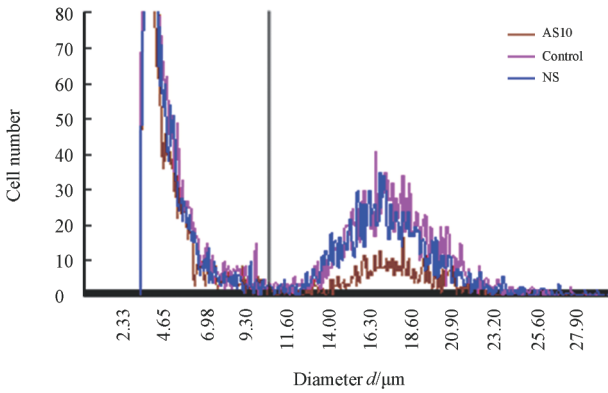


图 1 CASY 细胞计数仪分析高效反义 STAT3 对 A549 细胞增殖的抑制效应

Fig 1 Proliferation inhibition of A549 cells transfected with AS10-STAT3, NS-STAT3 as detected by CASY

AS10: No. 10 antisense STAT3 group; Control: None treatment control group; NS: Nonsense STAT3 group

表 1 裸鼠皮下接种不同处理的瘤细胞后肿瘤体积的比较

Tab 1 Tumor volume comparison after implantation of STAT3 ASODN- and NSODN-treated A549 cells in nude mice

($\bar{x} \pm s, V/cm^3$)

Group	n	Time t/d				
		10	15	20	25	30
Control	7	0.40 ± 0.07	0.67 ± 0.16	0.88 ± 0.21	1.13 ± 0.27	1.21 ± 0.32
NSODN	6	0.39 ± 0.06	0.68 ± 0.12	0.85 ± 0.18	1.11 ± 0.24	1.18 ± 0.35
ASODN	3	0.00 ± 0.00**	0.36 ± 0.03**	0.42 ± 0.08**	0.48 ± 0.13**	0.57 ± 0.18**

STAT3; Signal transducer and activator of transcription 3; ASODN; Antisense oligodeoxynucleotide; NSODN; Nonsense oligodeoxynucleotide. ** $P < 0.01$ vs NSODN and control groups

2.3 STAT3 ASODN 对裸鼠皮下移植瘤的作用 在裸鼠颈部皮下接种瘤细胞的第 8 天有肉眼可见的瘤块形成,至接种后 2 周左右可形成直径 0.5 cm 大小的瘤块。ASODN 处理后肿瘤生长缓慢,处理后第 4 天瘤体积与对照组比较开始出现差异,随着给药时间的延长差异愈发明显,至 STAT3 处理后第 22 天差异最为显著,与生理盐水对照组和 NSODN 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2、图 3)。所有实验动物在处理期间生长状态良好。处理期末处死所有裸鼠,剥瘤称质量,对照组、NSODN 组和 ASODN 组肿瘤质量分别为: (6.15 ± 0.56)、(5.88 ± 0.62)、(2.74 ± 0.32) g, STAT3 ASODN 组与其他 2 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ASODN 组抑瘤率为 51.1%。

2.4 肿瘤组织中 STAT3 蛋白表达、磷酸化水平的改变 由图 4 可见,肿瘤组织内 ASODN 组 STAT3 蛋白表达水平以及磷酸化水平均低于 NSODN 组和正常对照组。

3 讨论

STAT3 是 STATs 家族中目前研究得最多的

2.2 STAT3 ASODN 对 A549 细胞裸鼠皮下成瘤的抑制作用 裸鼠皮下接种经不同处理的瘤细胞后,对照组成瘤 7 只,NSODN 组成瘤 6 只,ASODN 组成瘤 3 只。成瘤时间也存在显著差异,对照组和 ASODN 组最早成瘤时间为 12 d,ASODN 组最早成瘤时间为 19 d,3 组平均成瘤时间分别为 13.8、14.2 和 22.4 d,前两者和后者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),NSODN 组和对照组比较差异无统计学意义。各组皮下肿瘤的体积随时间变化而不同,ASODN 组生长最为缓慢,与对照组和 NSODN 组对比,瘤体积大小差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。接种后 30 d 处死动物,对照组、NSODN 组和 ASODN 组肿瘤质量分别为: (5.62 ± 0.54)、(5.44 ± 0.62) g、(1.35 ± 0.28) g,ASODN 组抑瘤率为 75.8%。

成员。研究表明在多种肿瘤组织和细胞中 STAT3 呈高表达,STAT3 过度激活可导致多种细胞的异常增殖和凋亡障碍,促进肿瘤的形成、发展^[2],表明 STAT3 信号通道可以作为肿瘤基因治疗的一个靶位。本研究的目的在于设计并筛选出一个针对 STAT3 的高效反义核酸,通过体内外实验评价其对入肺腺癌细胞的增殖抑制作用。

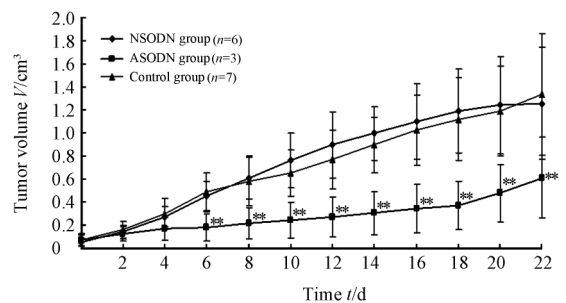


图 2 STAT3 反义核酸对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用

Fig 2 Inhibitory effect of STAT3 ASODN on tumor growth in nude mice

STAT3; Signal transducer and activator of transcription 3; ASODN; Antisense oligodeoxynucleotide; NSODN; Nonsense oligodeoxynucleotide. ** $P < 0.01$ vs NSODN and control groups. $\bar{x} \pm s$

在前期实验中,我们设计了 10 条 STAT3 反义序列,以 ASC 作阳性对照,通过增殖抑制实验筛选出对 A549 细胞增殖抑制效应最强的序列,筛选出

的 AS10 序列转染后,对 A549 细胞产生了强烈的增殖抑制效应,在一定浓度范围内,其效应呈浓度依赖性,并且能有效的诱导 A549 细胞的凋亡^[1]。



图 3 各组荷瘤鼠处理后 22 d 照片

Fig 3 Tumor volumes in each group 22 d after STAT3 ASODN or NSODN treatment

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide; NSODN: Nonsense oligodeoxynucleotide. A: ASODN group; B: NSODN group; C: Control group

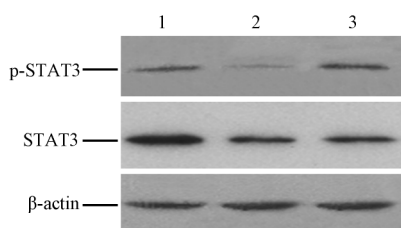


图 4 各组裸鼠皮下移植瘤中 STAT3 蛋白表达及其磷酸化水平的变化

Fig 4 Expression of STAT3 protein and p-STAT3 in xenografts in each group

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; ASODN: Antisense oligodeoxynucleotide; NSODN: Nonsense oligodeoxynucleotide. 1: Control group; 2: ASODN group; 3: NSODN group

本实验进一步观察裸鼠皮下接种经不同处理的瘤细胞后,各组成瘤率、成瘤时间及肿瘤生长的速度均不同,STAT3 ASODN 处理组成瘤率降低,成瘤时间延长,肿瘤生长速度缓慢,而 NSODN 组肿瘤生长不受明显抑制;成瘤后,STAT3 ASODN 处理组从肿瘤大小增长速度和肿瘤质量来看,肿瘤生长速度受到明显的抑制;瘤组织 STAT3 蛋白表达水平和磷酸化水平均明显低于正常对照和 NSODN 组,表明 STAT3 ASODN 抑制移植瘤的形成具有序列特异性和高度选择性。我们前期体外研究也证明 STAT3 ASODN 对 A549 细胞增殖抑制和促凋亡作用与其降低细胞 STAT3 蛋白及其下游的 Bcl-x_L 蛋白表达降低、STAT3 蛋白磷酸化水平降低有关^[1]。因此认为:反义 STAT3 通过抑制 STAT3 蛋白表达及活化,下调 Bcl-x_L 及其他下游抗凋亡基因如 Bcl-2、Mcl-1 等的表达,进而诱导细胞的凋亡^[3-5],抑制肿瘤生长。

多篇文献报道,阻断 STAT3 信号通道并不影响正常细胞的增殖和存活^[2,6],本实验室也得到了相似的结果。本实验在肺腺癌裸鼠移植瘤模型中,采用局部多次给药,既可使瘤内达到较高的药物浓度,又可减少药物的全身毒性作用,裸鼠的生长状态良好,表明 STAT3 有可能成为肺腺癌及其他高表达 STAT3 肿瘤治疗的一个新的治疗靶位。我们可以使用不同的手段对 STAT3 信号途径进行阻断,从而抑制肿瘤细胞增殖,或诱导凋亡增加,以达到治疗肿瘤的目的;如果同时联合放疗或化疗以及其他肿瘤的杀伤手段,临床应用前景乐观。

[参考文献]

- [1] 祝宝让,蔡建明,唐古生,李百龙,高福,崔建国,等. STAT3 反义核酸对 A549 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 癌症,2007,26: 820-827.
- [2] Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, et al. Gene therapy with dominant-negative STAT3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo* [J]. Cancer Res, 1999, 59: 5059-5063.
- [3] 唐古生,蔡建明,倪瑾,项莺松,崔建国,朱丹,等. 反义 STAT3 对肿瘤细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用[J]. 癌症, 2006, 25: 269-274.
- [4] Bromberg J F, Wrzeszczynska M H, Devgan G, Zhao Y, Pestell R G, Albanese C, et al. STAT3 as an oncogene[J]. Cell, 1999, 98: 295-303.
- [5] Niu G, Wright K L, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive STAT3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis[J]. Oncogene, 2002, 21: 2000-2008.
- [6] Hammond S M, Boettcher S, Caudy A A, Kobayashi R, Hannon G J. A link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. Science, 2001, 293: 1146-1150.

[本文编辑] 尹 茶