

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00359

• 专题报道 •

STAT3 反义核酸对肺腺癌 A549 细胞辐射增敏作用研究

孙 顶, 祝宝让, 高 福, 李百龙, 程 赢, 蔡建明, 崔建国*

第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 STAT3 反义核酸对肺腺癌辐射敏感性的影响。**方法** 以本室自行设计的 STAT3 反义核酸转染肺腺癌 A549 细胞, 分别接受 4、8、12、16、20 Gy ^{60}Co γ 射线照射, CCK-8 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞早期凋亡。建立局部照射荷瘤小鼠模型, 瘤内多点注射 STAT3 反义核酸, 给药剂量 15 mg/kg, 连续 2 周, 给药后 2 h 以 ^{60}Co γ 射线局部照射, 照射剂量 20 Gy, 每次 2 Gy, 每周 5 次, 连续 2 周, 照射剂量率 1 Gy/min。计算肿瘤体积、肿瘤生长延缓时间、相对生长速率、生长抑制率、 q 值, 测量肿瘤质量。**结果** 体外实验结果表明, 与单独照射组相比, 反义 STAT3 联合照射能降低 A549 细胞的存活率, 增加细胞早期凋亡; 体内实验结果表明反义 STAT3 联合肿瘤局部照射能明显减慢移植瘤的生长速度。**结论** 反义 STAT3 既具有化疗效果, 又具备放疗增敏作用, 对提高肿瘤的放疗效果有良好的开发前景。

[关键词] 反义寡核苷酸类; STAT3; 辐射增敏药; 肺腺癌

[中图分类号] R 815; R 734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)04-0359-05

Role of STAT3 antisense nucleic acid in promoting radiosensitivity of A549 cells

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

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of self-designed STAT3 antisense oligodeoxynucleotides (STAT3 ASODN) on irradiation sensitivity of lung adenocarcinoma. **Methods** Lung adenocarcinoma cells were exposed to different doses of irradiation (4, 8, 12, 16, and 20 Gy ^{60}Co γ) after transfected with STAT3 ASODN. The survival rates of cells in each group were evaluated by CCK-8 assay. Early apoptosis of cells was observed by FACS. Local irradiation models were established with tumor-bearing mice. STAT2 ASODN was intratumorally injected for two weeks at a dose of 15 mg/kg, and 2 h after injection the animals were locally irradiated with ^{60}Co γ (totally 20 Gy, 2 Gy each time, 5 times each week for 2 weeks, with a irradiation rate of 1 Gy/min). The following parameters were observed, including the tumor size, delay of tumor growth, relative growth rate, growth inhibition rate, q value, and tumor mass. **Results** *In vitro* experiment showed that compared with irradiation alone, combination of irradiation with STAT3 ASODN significantly decreased the survival rate and increased the early apoptosis rate of A549 cells. *In vivo* experiment found that combination of STAT3 ASODN with local irradiation greatly inhibited the growth rate of lung adenocarcinoma xenografts ($q = 1.27$). **Conclusion** STAT3 ASODN not only possess chemotherapeutic effect, but also can improve the sensitivity of tumor cells, making it a promising agent for future research and clinical application.

[Key words] antisense oligonucleotides; STAT3; radiation-sensitizing agents; lung adenocarcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 359-363]

STAT3 是 STATs 家族中的重要成员之一。有证据证实 STAT3 参与了肿瘤的形成, 而且在越来越多的肿瘤细胞中发现 STAT3 的持续性高表达^[1], 在这些肿瘤中又有相当一部分对放射治疗不敏感, 比如非小细胞肺癌等。研究表明反义 STAT3 能抑制 STAT3 蛋白表达和活化, 下调其下游抗凋亡基因的表达, 进而诱导细胞凋亡^[2-3]。本课题组前期研究利

用自行设计的 STAT3 反义核酸(ASODN)在体外实验中发现 STAT3 反义核酸能极强地抑制 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^[4]; 体内实验也表明该序列能显著延缓移植瘤的生长速度, 抑制移植瘤内 STAT3 蛋白表达。本研究观察了该反义序列核酸对人非小细胞肺癌是否具有辐射增敏效果, 探讨其

[收稿日期] 2011-04-06

[接受日期] 2011-04-11

[基金项目] 国家自然科学基金(30470415, 30800284). Supported by National Natural Science Foundation of China(30470415, 30800284).

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

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871150, E-mail: mustardcc@yahoo.com.cn

成为放疗增敏剂的可能性。

1 材料和方法

1.1 反义序列、试剂和仪器 STAT3 反义序列(ASODN)的设计参见文献^[4](因其序列涉及专利,暂不公开),无义序列(NSODN):5'-GCT CCA GCA TCT GCT GCT TC-3',各序列交由上海生工生物工程服务技术有限公司合成,全硫代修饰,聚丙烯酰胺纯化。RPMI 1640 购于 Gibco 公司,胎牛血清购于兰州民海生物工程有限公司,阳离子脂质体 Oligofectamine 为 Invitrogen 公司产品,Cell Count Kit (CCK-8)为同仁化学研究所提供,细胞全蛋白抽提试剂盒、考马斯亮蓝 G250、细胞凋亡 Hoechst33258 染色试剂盒购自杭州碧云天生物技术研究,Annexin V/PI 购自 Bender 公司,PI 为 Sigma 公司产品。倒置荧光显微镜为 Olympus 公司产品,酶标仪为 Thermo 公司产品,流式细胞仪为 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 体外实验

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞株 A549 由中国科学院上海药物所惠赠。细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,实验所用的细胞均处于指数生长期。

1.2.2 寡核苷酸转染 各寡核苷酸用阳离子脂质体(Oligofectamine)包裹转染 A549 细胞,细胞融合度达 30%~40%时转染,继续培养预定时间后行相应的指标检测。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 指数生长期细胞接种于 96 孔板,2 500 个/孔。设空白对照组(空脂质体转染)、单纯照射组、NSODN+照射组和 ASODN+照射组,给药组相应寡核苷酸转染浓度为 70 nmol/L,转染 24 h 内,所有照射组均接受 4、8、12、16、20 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射(辐照源为第二军医大学长海医院 ⁶⁰Co 治疗机),照射剂量率 0.35 Gy/min,每组设 6 个重复孔,培养 48 h 后,每孔加 CCK-8 试剂 10 μ l,继续孵育 4 h,以 450 nm 为吸收波长,630 nm 为参比波长,上酶标仪检测各孔的光密度(D)值,实验重复 3 次,按公式计算各组的存活率,存活率=(处理组 D 值-本底 D 值)/(正常对照组 D 值-本底 D 值)×100%。

1.2.4 Hoechst33258 DNA 染色 在 6 孔板内以 70 nmol/L ASODN 或 NSODN 转染 A549 细胞,空白对照组转染空脂质体。转染 24 h 后接受 16 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射,照射剂量率 0.35 Gy/min,继续培养,不同时间内以 Hoechst33258 染色,荧光显微镜

下观察。

1.2.5 Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测早期凋亡 在 6 孔板内以 70 nmol/L ASODN 或 NSODN 转染 A549 细胞,空白对照组转染空脂质体。细胞转染后 20~30 h,按上述放射剂量照射,照射后 48 h 收集各组细胞,按照 Annexin V/PI 说明书配制所需溶液,将细胞悬浮在 1×结合缓冲液中,密度调整为 $2\times 10^5\sim 5\times 10^5$ /ml。将细胞悬液和 FITC 标记 Annexin V 混合,室温孵育 15 min;PI 避光染色细胞(终浓度为 1 μ g/ml)10 min 后,用流式细胞仪分析。

1.3 动物体内实验

1.3.1 局部照射荷瘤小鼠模型的建立 4 周龄 BALB/c 裸鼠,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。A549 细胞接种于 10 只裸鼠颈部皮下,细胞接种数量约 1×10^7 个(0.2 ml 细胞悬液),待瘤体长至 1.5~2 cm 时处死动物,剥离肿瘤,剔除筋膜组织,生理盐水冲洗,肿瘤组织匀浆,用骨髓穿刺针将匀浆组织接种于裸鼠右后腿膝关节处皮下,待肿瘤体积长至 100~150 mm³即可用于实验。

1.3.2 动物照射方法 将荷瘤裸鼠固定在自制的固定装置上,以铅块屏蔽除右下肢以外的其他部位,仅对右下肢进行 ⁶⁰Co γ 射线局部照射(第二军医大学辐照中心 ⁶⁰Co 辐照源),照射剂量 20 Gy,每次 2 Gy,每周 5 次,连续 2 周,照射剂量率 1 Gy/min。

1.3.3 裸鼠放疗增敏实验分组 30 只荷瘤裸鼠模型,平均分为 5 组,每组 6 只。(1)空白对照组:肿瘤局部及瘤内多点注射生理盐水 0.2 ml,连续 2 周。(2)单纯照射组:同法注射生理盐水,2 h 后接受照射。(3)ASODN 单纯给药组:同法注射 0.2 ml STAT3 ASODN,给药剂量 15 mg/kg。(4)ASODN+照射组:同法注射 0.2 ml STAT3 ASODN,给药剂量 15 mg/kg,2 h 后接受照射。(5)NSODN+照射组:同法注射 0.2 ml NSODN,给药剂量 15 mg/kg,2 h 后接受照射。

1.3.4 评价指标^[5] (1)肿瘤体积: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。(2)生长时间:肿瘤体积生长到实验开始体积的 10 倍所用的时间。(3)生长延缓时间:各实验组肿瘤的生长时间减去对照组的生长时间。(4)相对生长速率:实验结束时肿瘤体积与实验开始体积的比值。(5)生长抑制率和 q 值:以公式“生长抑制率=(1-实验组体积)/对照组体积”计算各实验组肿瘤的生长抑制率,以公式“ $q=E_{(A+B)}/(E_A+E_B-E_A\times E_B)$ ”计算是否有增敏作用,其中 $E_{(A+B)}$ 表示 ASODN+照射组对肿瘤的生长抑

制率, E_A 、 E_B 分别表示单纯照射组、ASODN 组对肿瘤的生长抑制率。 q 值 > 1 说明有增敏作用, q 值 $= 1$ 说明有相加作用, q 值 < 1 说明有拮抗作用。(6) 抑瘤率: 处理 3 周后颈椎脱臼处死动物, 剥瘤称量, 计算抑瘤率。抑瘤率 $= (\text{空白对照组平均瘤质量} - \text{各处理组平均瘤质量}) / \text{空白对照组平均瘤质量} \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 用 SPSS 11.0 软件处理数据, 采用单因素方差分析进行组间比较, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 反义 STAT3 增强辐射对 A549 细胞的增殖抑制作用 由图 1 可见, 各组细胞的存活率随着照射的增加而逐渐降低, ASODN + 照射组下降更为明显, 在所照剂量范围内, 同一照射剂量下, ASODN + 照射组细胞活力明显低于单纯照射组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 在 4~12 Gy 范围内差别最为明显。而 NSODN + 照射组与单纯照射组相比差异无统计学意义。

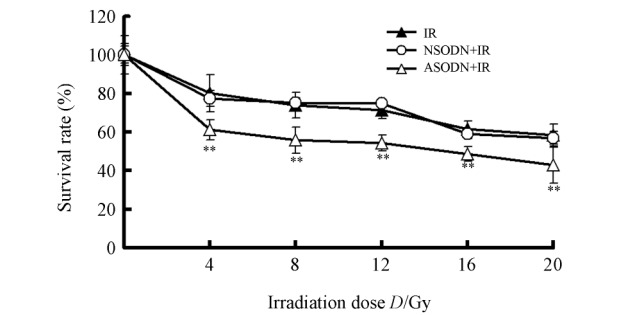


图 1 各组细胞接受照射后的存活率
Fig 1 Survival rate of A549 cells exposed to different irradiation 48 h after transfected with 75 nmol/L STAT3 ASODN or STAT3 NSODN
IR: Irradiation. ** $P < 0.01$ vs IR group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 反义 STAT3 增强辐射诱导的细胞凋亡作用
2.2.1 Hoechst33258 染色 用 DNA 染色剂 Hoechst33258 对细胞进行染色, 结果见图 2。在空白对照组和 NSODN 组, 可见大小均匀、分布较密的正常细胞核形态, 两组之间未见明显差异; 在 ASODN 组可见细胞核分布较稀, 可见部分典型的凋亡小体; 在单纯照射组和 NSODN + 照射组, 未见典型的凋亡细胞, 但细胞核分布较未照射组稀, 两组之间未见明显差异; 在 ASODN + 照射组, 可见细胞核分布稀疏, 有较多的典型凋亡细胞出现 (图 2 中箭头所示)。
2.2.2 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞早期凋亡情况 在相同照射剂量条件下, ASODN + 照

射组细胞早期凋亡率较单纯照射组和 NSODN + 照射组均有不同程度的增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且随着照射剂量的增加, 早期凋亡率也上升 ($P < 0.01$)。而 NSODN + 照射组与单纯照射组各相应剂量点处相比差异无统计学意义 (图 3)。

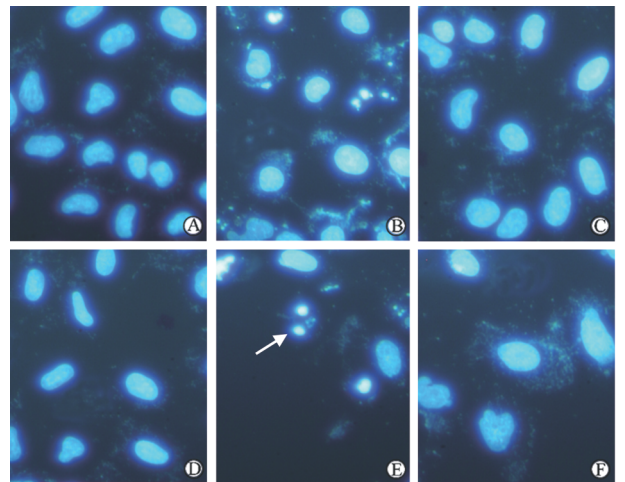


图 2 不同处理组细胞早期凋亡图片
Fig 2 Apoptosis induced by different treatments in all groups
A: Normal control; B: ASODN group; C: NSODN group; D: 16 Gy irradiation group; E: ASODN + 16 Gy irradiation group; F: NSODN + 16 Gy irradiation group. The arrow indicates the apoptosis cell. Hoechst33258 staining, original magnification: $\times 400$

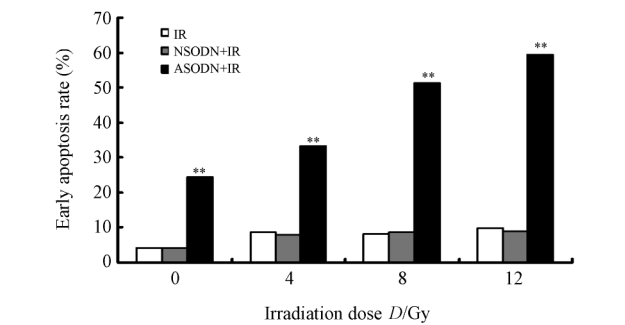


图 3 各组细胞早期凋亡率
Fig 3 Early apoptosis of A549 cells in each group
IR: Irradiation. ** $P < 0.01$ vs IR and NSODN + IR group

2.3 反义 STAT3 对荷瘤鼠的放疗增敏作用
2.3.1 肿瘤体积的变化 图 4 是各组肿瘤体积随时间的变化趋势, 从图中可以看出: 相对于空白对照组, 各处理组肿瘤生长速度均明显延缓, ASODN 单纯给药组肿瘤生长延缓程度大于单纯照射组, ASODN + 照射组肿瘤生长速度最为缓慢, 明显低于其他各组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); NSODN + 照射组与单纯照射组相比差异无统计学意义。
2.3.2 肿瘤生长延缓时间、相对生长速率、生长抑制率和 q 值 由表 1 可见, 与空白对照组相比, 各处理组肿瘤相对生长速率均有降低, 以 ASODN + 照射组下降

最为显著($P<0.01$);与单纯照射组比较,ASODN+照射组生长延缓时间和生长抑制率也明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$),其 q 值为 1.27,说明 STAT 3 ASODN 具备一定的放疗增敏作用。同时可以看出单纯照射组其肿瘤生长相对速率并无明显改变,肿瘤生长延缓时间和生长抑制率甚至低于 ASODN 单纯给药组,说明该肿瘤对放疗并不敏感。

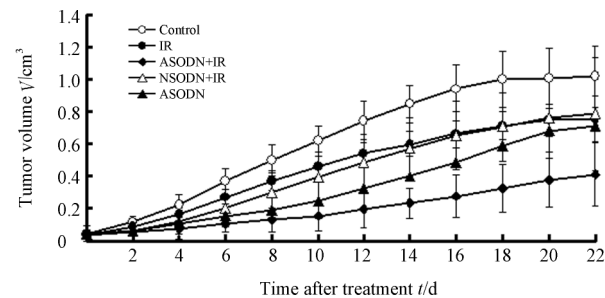


图 4 各组荷瘤鼠肿瘤生长曲线

Fig 4 Tumor growth curves in different groups

$n=6, \bar{x} \pm s$

表 1 各组荷瘤小鼠肿瘤生长参数

Tab 1 Tumor growth parameters in different groups

($n=6$)

Group	Relative growth rate(%)	Growth delay t/d	Inhibition rate(%)	q value
Control	22.22±8.64			
IR	20.94±8.33	2.21	0.25	
ASODN+IR	15.16±4.25	8.63	0.32	
NSODN+IR	17.00±5.78	2.55	0.24	
ASODN+IR	10.19±2.57**	13.34	0.62	1.27

IR: Irradiation; ** $P<0.01$ vs IR group and ASODN group

2.3.3 肿瘤质量的变化 由图 5 可见,空白对照组、单纯照射组、ASODN 单纯给药组、NSODN+照射组和 ASODN+照射组肿瘤质量分别为(5.64±0.87) g、(4.02±0.61) g、(3.56±0.44) g、(3.97±0.56) g、(1.43±0.28) g。ASODN+照射组抑瘤率为 74.6%,ASODN 单纯给药组抑瘤率为 36.9%,单纯照射组抑瘤率 28.7%。

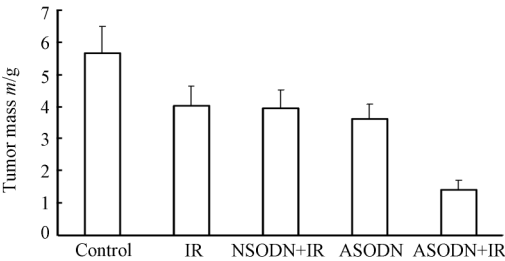


图 5 各组荷瘤小鼠肿瘤质量

Fig 5 Tumor masses of different groups

$n=6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

放疗是目前临床治疗肿瘤以及部分良性疾病的重要手段之一,然而许多恶性肿瘤对放疗不敏感,目前的各种放疗增敏剂效果也不尽如人意。近几年基因水平的研究,使得人们对放射抗性基因水平的机制有了更深的了解,同时也为在基因水平上改变细胞的放射敏感性提供了线索。

辐射因素作用于细胞引起细胞损伤与死亡,除了与 DNA 损伤修复有关,还与细胞周期调控、细胞凋亡等因素密切相关。现有的资料表明,针对 STAT3 信号通道下游基因之一 p21^{WAF/CIP1} 的反义核酸与辐射因素同时作用于人直肠癌细胞,能够促进细胞通过细胞周期阻滞诱发其凋亡进而增加了细胞对辐射的敏感性^[6]。STAT3 下游基因 Bcl-x_L 的反义序列同样增加了结肠癌细胞的辐射敏感性^[7]。而 STAT3 信号通道下游靶基因中包括了 Bcl-x_L、p21^{WAF/CIP1} 及 Mcl-1、c-Myc、VEGF、cyclin D1、p53 等其他大量与细胞周期及细胞凋亡相关的基因^[1,3,8-11],这些基因调控着细胞的凋亡、增殖、细胞周期、血管生成等。理论上阻断 STAT3 信号通道可同时调控这些与细胞活动相关的重要靶基因,将反义 STAT3 与辐射联合应用应该能增加细胞的辐射敏感性,提高辐射对细胞的杀伤作用。

本研究结果表明高效反义 STAT3 转染后,A549 细胞的辐射敏感性在相同照射剂量点处较无义序列组和单纯照射组提高($P<0.01$),在低剂量区更加明显。通过凋亡形态学观察及早期凋亡的检测,发现 A549 细胞具有很强的辐射抗性,单纯照射 16 Gy 时,仅对其有一定程度的增殖抑制效应,未见有典型的凋亡形态的细胞出现;转染反义 STAT3 联合照射后,则有较多典型凋亡形态的细胞;流式检测早期凋亡也发现,转染反义 STAT3 联合照射组的凋亡率较单纯照射组和无义序列联合照射组有显著提高,在 12 Gy 联合反义 STAT3 转染时,早期凋亡率达到 57.93%。体内实验结果也表明,反义 STAT3 联合照射能显著延缓肿瘤的生长速度,具有放疗增敏作用。这些结果表明反义 STAT3 能够特异性提高照射对肿瘤细胞的杀伤能力,提高了肿瘤的辐射敏感性,具有临床研究意义。

以往的研究表明,STAT3 高表达的肿瘤中 Bcl-x_L、Mcl-1、c-Myc、cyclin D1、VEGF 等促进癌细胞生长的基因和抗凋亡基因也高表达,表明 STAT3 的促

肿瘤生长作用至少部分是通过提高抗凋亡基因的表达产生的;阻断黑素瘤细胞中 Src-STAT3 信号通道, Bcl-x_L、Mcl-1 等抗凋亡基因的表达也降低,进而诱导凋亡的发生。除此以外,在体内研究中发现细胞旁效应和免疫反应在 STAT3 通道的阻断杀伤肿瘤的过程中可能也起着重要作用^[11]。Niu 等^[12]的研究表明在体内实验中,采用基因治疗的方式用无促转录活性的显性负蛋白 STAT3 β 竞争有活性 STAT3 蛋白的促转录作用,尽管只有 10%~15% 的肿瘤细胞被转染,但却诱发了大量的细胞凋亡。进一步体外研究发现阻断 STAT3 信号通道,导致肿瘤细胞释放出某些可溶性的因子,这些可溶性的因子可以诱发肿瘤细胞的凋亡及细胞周期阻滞。他们认为这些可溶性的因子通过细胞旁效应的途径导致未转染肿瘤细胞发生凋亡,提高了 STAT3 信号途径阻断后的肿瘤杀伤效果,这种旁效应部分弥补了体内基因治疗转染效率不高的缺陷。因此,我们认为高效反义 STAT3 寡核苷酸能够阻断或削弱 STAT3 信号通道,抑制 A549 的增殖、促进其凋亡,能够和放射对细胞的损伤效应产生协同作用,增加了放射抗性肿瘤的辐射敏感性,有利于在较低的辐射剂量下杀死更多的肿瘤细胞。其机制可能是反义寡核苷酸阻断细胞中 STAT3 蛋白表达后,进而调节了其下游的抗凋亡基因 Bcl-x_L、Mcl-1、survivin 和细胞周期控制基因 c-myc、cyclin D1 以及 VEGF、p53 等基因表达,影响了细胞的生长、存活和凋亡。在体内也可能有阻断 STAT3 信号通路后,肿瘤细胞表面的 Fas 表达升高,肿瘤的免疫逃逸及微血管形成受到抑制等因素的参与^[13]。加上电离辐射本身对生物大分子的损伤和系列功能基因改变的联合作用,使细胞不能通过 G₁ 期的检查点,发生周期阻滞,进而对细胞产生了增殖抑制效应。STAT3 反义寡核苷酸使抗凋亡基因 Bcl-x_L 等的表达降低,促进了凋亡的发生,而诱导细胞凋亡也是辐射杀死肿瘤细胞的重要途径。

由于阻断 STAT3 对正常的细胞生长几乎没有影响,反义 STAT3 与放射联合应用,对正常细胞可能不会有辐射增敏作用,但对高表达 STAT3 的肿瘤细胞,反义 STAT3 与放射联合至少具有叠加的杀伤效应。靶向 STAT3 蛋白在辐射增敏领域的研究可能具有比较乐观的临床前景。我们自行设计、筛选得到的部分高效 STAT3 反义序列已申报国家专利,

进一步的体内实验和相关机制的研究正在开展之中。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 任振义, 白春学, 洪群英, 曾昭冲, 金一尊. 泰索帝对 Lewis 肺癌放疗增敏作用的实验研究 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2002, 20:191-195.
- [6] Tian H, Wittmack E K, Jorgensen T J. p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis [J]. Cancer Res, 2000, 60:679-684.
- [7] Wacheck V, Selzer E, Günsberg P, Lucas T, Meyer H, Thallinger C, et al. Bcl-x_L antisense oligonucleotides radiosensitize colon cancer cells [J]. Br J Cancer, 2003, 89:1352-1327.
- [8] Haura E B, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G. Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival *in vivo* in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11:8288-8294.
- [9] Dalwadi H, Krysan K, Heuze-Vourc' h N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, et al. Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11:7674-7682.
- [10] Alvarez J V, Greulich H, Sellers W R, Meyerson M, Frank D A. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor [J]. Cancer Res, 2006, 66:3162-3168.
- [11] Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4:97-105.
- [12] Niu G, Shain K H, Huang M, Ravi R, Bedi A, Dalton W S, et al. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest [J]. Cancer Res, 2001, 61:3276-3280.
- [13] Omori S, Takiguchi Y, Suda A, Sugimoto T, Miyazawa H, Takiguchi Y, et al. Suppression of a DNA double-strand break repair gene, Ku70, increases radio- and chemosensitivity in a human lung carcinoma cell line [J]. DNA Repair (Amst), 2002, 1: 299-310.