

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000462

慢病毒介导 STAT3-shRNA 对胃癌细胞化疗敏感性的影响及机制

钟 竹¹, 周 伟², 吴小翎¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010; 2. 重庆市肿瘤医院放疗科, 重庆 400030)

【摘要】目的:探讨慢病毒介导的 shRNA 靶向沉默信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)对人胃癌细胞 SGC-7901 化疗敏感性的影响及相关机制。**方法:**构建靶向 STAT3 基因的 shRNA 序列,以慢病毒为载体转染 SGC-7901 细胞。以 real-time PCR 及 Western blot 检测 STAT3 干扰效果;MTT 法分析各组细胞对 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)化疗敏感性的变化;用流式细胞仪比较细胞凋亡率的差异;Western blot 检测抗凋亡蛋白 B 细胞白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)及 survivin 的变化。**结果:**成功构建靶向 STAT3 基因的慢病毒并转染 SGC-7901 细胞,有效抑制 55% STAT3 mRNA 表达和 40%STAT3 蛋白表达($P<0.05$)。STAT3-shRNA 转染后细胞的增殖抑制率及凋亡率均明显升高($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 及 survivin 蛋白水平明显下降($P<0.05$)。**结论:**慢病毒介导的 STAT3-shRNA 可抑制 SGC-7901 细胞增殖并诱导其凋亡,导致细胞对 5-Fu 的化疗敏感性增强,相关机制可能是通过抑制 STAT3 表达从而阻断 STAT3 信号通路,导致该通路下游的抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1、survivin 的活性下调。

【关键词】STAT3;慢病毒;化疗敏感性;抗凋亡蛋白

【中图分类号】R735.2;R573

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-09-14

Lentiviral-shRNA-mediated STAT3 silencing enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer cells

Zhong Zhu¹, Zhou Wei², WU Xiaoling¹

(1. Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Radiation Oncology, Chongqing Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and the mechanisms of lentiviral-shRNA-mediated signal transducers and activators of transcription 3(STAT3) silencing on the chemosensitivity to 5-fluorouracil(5-Fu), of human gastric cancer cells SGC-7901. **Methods:** The shRNA sequences targeting STAT3 was constructed and lentiviral vectors was used to transfect human gastric cancer cells SGC-7901. The interference effect of STAT3-shRNA was detected by real-time PCR and Western blot. The chemosensitivity to 5-Fu was analyzed by MTT assay and the flow cytometry was used to examine cell apoptotic rate. Western blot was used to compare the expressions of anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1, survivin. **Results:** Lentiviral vectors containing shRNA targeting STAT3 gene were successfully established and transfected into SGC-7901 cells. Real-time PCR and Western blot analysis showed that the STAT3-shRNA significantly inhibited the mRNA expression by 54% and protein expression by 40% ($P<0.05$). The inhibitory rate of cell proliferation and the apoptotic rate were obviously higher in the cells treated by STAT3-shRNA ($P<0.05$). STAT3-shRNA also induced downregulation of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and survivin ($P<0.05$). **Conclusion:** In summary, STAT3-shRNA could effectively inhibit the proliferation and accelerate the apoptosis of SGC-7901 cells, leading to the enhancement of their sensitivity to 5-Fu. The mechanism may be related with block of STAT3 signaling pathway though inhibiting STAT3 activation, thus decreasing expressions of its downstream anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and survivin.

【Key words】STAT3; lentivirus; chemosensitivity; anti-apoptotic protein

作者介绍: 钟 竹, Email: 413421094@qq.com,
研究方向: 消化内科。

通信作者: 吴小翎, Email: wuxiaoling@cqmu.edu.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1721.027.html>

(2015-01-12)

胃癌作为全世界最常见恶性肿瘤之一,其发病率及病死率皆在恶性肿瘤中居于前列,居消化道恶性肿瘤首位。外科手术是胃癌主要的治疗方式,但绝大部分胃癌患者在就诊时已发展为进展期胃癌,仅靠手术不能完全治愈,辅助化疗及新辅助化疗在临床上的广泛应用说明了化疗的重要性,尤其对于不能进行手术的晚期胃癌患者,化疗更是其首选的治疗方法。然而,由于癌细胞易对化疗耐受,以致化疗未能达到预期的疗效。临床上仅通过改变化疗药物组合的方式对癌细胞耐药的改善作用十分有限,随着分子生物学的快速发展,对胃癌分子特征的研究不断深入,能否在基因水平上逆转胃癌细胞的化疗抵抗性引起了科研工作者广泛关注。

信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3),是细胞内一种信号传导蛋白,通过调控下游相关基因的表达,介导肿瘤细胞的增殖、凋亡、浸润及肿瘤血管生成等生理过程,与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,是潜在的抗肿瘤靶点^[1-3]。研究者在胃癌细胞中也发现 STAT3 的异常高表达,并且介导胃癌的发生发展^[2-3]。本实验拟构建 STAT3-shRNA 慢病毒载体靶向干扰 SGC-7901 细胞,观察其对 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)的化疗敏感性的影响,初步探究相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌细胞株 SGC-7901 为重庆市肿瘤研究所提供;新鲜胎牛血清、RPMI1640 培养基、青霉素/链霉素溶液均购自美国 Hyclone;兔抗人 STAT3 单克隆抗体为 Cell Signaling Technology;B 细胞白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、survivin、髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)多克隆抗体均购自武汉博士德;鼠抗人 β -actin 抗体、辣根酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗为北京中杉;RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物;PCR 引物由上海生工公司合成,Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天;干扰载体载体 pLKD-CMV.G&PR.U6.shRNA 购自上海纽恩。

1.2 方法

1.2.1 STAT3-shRNA 慢病毒表达载体的构建 选择 Gen Bank 提供的 STAT3 基因序列(NM_139276.2)为靶基因,委托上海纽恩公司设计多个 RNA 干扰靶点序列,结合设计软件评估测定结果及公司设计经验,最终确定并合成 shRNA 序列:5'-AACTTCAGACCCGTCACAAA-3',进一步合成双链 DNA oligo,退火后与 Age I 和 EcoR I 双酶切载体 pLKD-CMV.G&PR.U6.shRNA 连接,转化细菌感受态细胞,对长出的克隆进行 PCR 鉴定,测序比对正确后,抽提重组质粒,与包

装质粒 psPAX2、外膜质粒 pMD2.G 共转染 293T 细胞完成病毒组装。离心去除细胞碎片并用 0.45 μ m PES filter flask 过滤收集上清液,100 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 超速离心 2 h 后得到浓缩的 STAT3-shRNA 病毒液。同法构建阴性对照病毒。进一步梯度感染 293T 细胞,荧光显微镜下计算绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)数目,计算病毒滴度。测得干扰病毒滴度为:3.80 $\times$ 10⁸ Tu/ml,阴性对照病毒滴度为:6.51 $\times$ 10⁸ Tu/ml。

1.2.2 细胞培养 用含 10%小牛血清、1%的青/链霉素双抗的 RPMI1640 培养基于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的培养箱中培养 SGC-7901 细胞,每 3 天按 1:3 的比例传代。

1.2.3 慢病毒转染 SGC-7901 细胞 实验共分为 3 组:实验组(STAT3-shRNA 转染组)、阴性对照组(空病毒载体转染组)、空白对照组(正常 SGC-7901 细胞)。SGC-7901 细胞按 1 $\times$ 10⁶ 个/孔均匀接种至 6 孔板,长至汇合度为 30%~40%时,加入慢病毒(感染复数 MOI=20),12 h 后更换为新鲜的无病毒培养基。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 各组细胞按 2 $\times$ 10⁵ 个/孔均匀接种至装有灭菌爬片的 24 孔板中,48 h 后弃培养基, PBS 溶液洗 3 次, 4%多聚甲醛固定 10 min,轻轻取出爬片并倒扣于载玻片上,甘油封片后用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.5 Real-time PCR 检测 STAT3 基因表达 收集各组细胞 1 $\times$ 10⁶ 个, trizol 法抽提总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 纯度及浓度后逆转录为 cDNA,反应条件为:42 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。取 2 μ l cDNA 模板进行 PCR。STAT3 上游引物序列为:5'-GAGGACTGAGCATCGAGCA-3',下游引物序列:5'-CATGTGATCTGACACCTGAA-3',扩增产物长 85 bp;内参引物 β -actin 上游序列为:5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3',下游引物序列:5'-AAGGGACTTCTCTGAACAATGCA-3',扩增产物长 140 bp。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s 及 60 $^{\circ}$ C 30 s 共循环 40 次。每个样本设 3 个复孔,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 公式比较 mRNA 相对表达水平, Δ Ct = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值。

1.2.6 Western blot 检测 STAT3、Bcl-2、survivin 及 Mcl-1 蛋白表达 收集各组细胞,裂解缓冲液(裂解液:蛋白酶抑制剂混合物=500:2)冰上裂解 15~20 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 以分离细胞碎片。BCA 蛋白定量法测蛋白浓度,加入上样缓冲液煮沸至完全变性。50 μ g 总蛋白提取物在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离,然后转至 PVDF 膜(90 V, 1.5 h)。室温下用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液孵育 1 h 以阻断非特异性结合,一抗(STAT3 稀释比例为 1:2 000, Bcl-2、survivin 及 Mcl-1 稀释比例为 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 5 min;二抗(1:2 500)37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 5 min,最后用 ECL 化学发光法显影。应用 Quantity One 软件分析图像,蛋白相对表达强度用目的基因条带灰度值/ β -actin 条带灰度值表示。

1.2.7 MTT 法分析 5-Fu 的化疗敏感性 将细胞均匀接种至 96 孔板(5 $\times$ 10³ 个/孔),贴壁后加入 5-Fu 至终浓度分别为 0、5、10、15、20、50、100 μ g/ml,每个浓度设 3 个复孔。48 h 后每孔加 20 μ l 5 mg/ml 的 MTT 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,弃培养基,每

孔加 150 ml DMSO 溶液。摇床上震荡 15 min, 用酶标仪测定 570 nm 处吸光度值(absorbance, A)。以不加 5-Fu 组作对照, 计算各组细胞的增殖抑制率, 公式为: 增殖抑制率(100%)=[对照组 $A_{570\text{ nm}}$ -实验组 $A_{570\text{ nm}}$]/对照组 $A_{570\text{ nm}}$ × 100%。

1.2.8 流式细胞仪比较细胞凋亡差异 细胞接种至 6 孔板, 贴壁后加入 5-Fu 至终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 。48 h 后, 收集 4×10^5 个细胞, PBS 洗涤 2 遍后用 195 μl Annexin V-PE 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V-PE(带红色荧光), 混匀后室温下避光孵育 10 min, 离心弃上清, 加入 200 μl 结合缓冲液, 尽快送流式细胞仪检测。

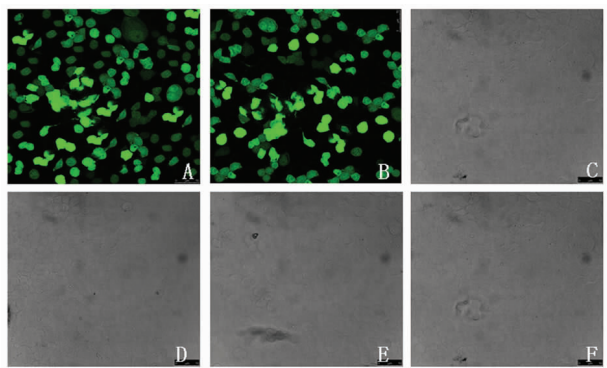
1.3 统计学处理

实验均重复 3 次, 使用统计分析软件 SPSS 17.0 处理数据, 用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示数据, 以单因素方差分析法比较多组间差异, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GFP 在 SGC-7901 细胞中的表达

慢病毒感染 SGC-7901 细胞后, 在激光共聚焦显微镜下观察到细胞生长状态良好, 可见实验组及阴性对照组均有明显 GFP 表达(图 1)。



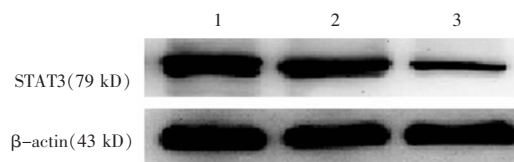
A~C: 激光共聚焦显微镜观察; D~F 正常白光观察;
A、D: 实验组; B、E: 阴性对照组; C、F: 空白对照组

图 1 激光共聚焦显微镜观察 SGC-7901 细胞中 GFP 的表达
(100 $\times$)

Fig.1 Expression of GFP in SGC-7901 cells observed
by confocal laser scanning microscope (100 $\times$)

2.2 STAT3-shRNA 转染后 STAT3 mRNA 及蛋白表达情况

Real-time PCR 结果(表 1)所示, 阻断 STAT3 信号后, STAT3 mRNA 相对表达水平下降为 0.46 ± 0.04 , 明显低于空白对照组 1.00 ± 0.01 、阴性对照组 0.93 ± 0.05 ($P < 0.05$)。免疫印迹结果(图 2、表 1)显示, STAT3 蛋白相对表达强度在空白对照组、阴性对照组及实验组中依次为 0.78 ± 0.07 、 0.75 ± 0.05 、 0.47 ± 0.04 , 表明 STAT3-shRNA 可明显下调 STAT3 蛋白活性($P < 0.05$), 而阴性对照组和空白对照组之间无明显差异($P=0.528$)。



1. 空白对照组; 2. 阴性对照组; 3. 实验组

图 2 SGC-7901 细胞 STAT3 蛋白的表达

Fig.2 Expression of protein of STAT3 in SGC-7901 cells

表 1 各组 SGC-7901 细胞 STAT3 mRNA 及蛋白的相对
表达强度 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Expression of mRNA and protein of STAT3
in SGC-7901 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白
实验组	$0.46 \pm 0.04^{\text{ab}}$	$0.47 \pm 0.04^{\text{ab}}$
阴性对照组	$0.93 \pm 0.05^{\text{c}}$	$0.75 \pm 0.05^{\text{c}}$
空白对照组	1.00 ± 0.01	0.78 ± 0.07
F 值	395.426	29.976
P 值	0.000	0.001

注: a, $P=0.000$, 与空白对照组比较; b, $P=0.000$, 与阴性对照组相比; c, $P > 0.05$, 与空白对照组比较

2.3 抑制 STAT3 表达后 SGC-7901 细胞对 5-Fu 的敏感性

MTT 结果(表 2)示, 与阴性对照组及空白对照组相比, 实验组细胞增殖抑制率明显升高($P < 0.05$), 表明 STAT3-shRNA 能抑制细胞增殖, 增强细胞对 5-Fu 的化疗敏感性。

2.4 慢病毒介导 shRNA 抑制 STAT3 后细胞凋亡率的变化

抑制 STAT3 后细胞凋亡率($39.16 \pm 2.25\%$), 较阴性对照组($23.43 \pm 2.86\%$)、空白对照组($23.75 \pm 1.23\%$)明显升高, 差

表 2 不同浓度 5-Fu 处理后细胞的增殖抑制率 ($\%, \bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

Tab.2 Inhibitory rate of proliferation in SGC-7901 cells ($\%, \bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

组别	5	10	15	20	50	100
实验组	$38.44 \pm 1.32^{\text{ab}}$	$41.81 \pm 1.70^{\text{ab}}$	$44.43 \pm 1.45^{\text{ab}}$	$45.17 \pm 1.28^{\text{ab}}$	$48.93 \pm 1.96^{\text{ab}}$	$58.57 \pm 2.28^{\text{ab}}$
阴性对照组	$25.83 \pm 1.05^{\text{c}}$	$29.42 \pm 2.25^{\text{c}}$	$32.26 \pm 0.69^{\text{c}}$	$34.31 \pm 0.99^{\text{c}}$	$36.38 \pm 1.46^{\text{c}}$	$39.18 \pm 1.15^{\text{c}}$
空白对照组	24.72 ± 1.54	29.36 ± 1.01	31.32 ± 0.63	33.51 ± 1.35	37.91 ± 1.93	39.12 ± 0.96
F 值	100.336	51.750	160.435	86.419	43.473	152.337
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 与空白对照组比较, $P=0.000$; b, 与阴性对照组比较, $P=0.000$; c, 与空白对照组比较, $P > 0.05$

具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明抑制 STAT3 表达能增强 5-Fu 的凋亡诱导作用 (表 3)。

表 3 5-Fu 诱导的 SGC-7901 细胞凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Apoptosis induced by 5-Fu in SGC-7901 cells
($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SGC-7901 细胞
实验组	39.16 ± 2.25^{ab}
阴性对照组	23.43 ± 2.86^c
空白对照组	23.75 ± 1.23
<i>F</i> 值	49.253
<i>P</i> 值	0.000

注: a, 与空白对照组比较, $P=0.000$; b, 与阴性对照组比较, $P=0.000$; c, 与空白对照组相比, $P=0.867$

2.5 STAT3 信号通路阻断后抗凋亡蛋白表达情况

Western blot 结果表明 (图 3、表 4), Bcl-2、Mcl-1 及 survivin 的蛋白表达水平在实验组中分别为 0.47 ± 0.03 、 0.35 ± 0.02 、 0.45 ± 0.02 , 空白对照组中为 0.81 ± 0.06 、 0.52 ± 0.05 、 0.71 ± 0.03 , 阴性对照组为 0.78 ± 0.07 、 0.49 ± 0.01 、 0.67 ± 0.05 。与阴性对照组相比, 实验组上述蛋白水平分别下调约 40%、29%、33% ($P < 0.05$), 而两对照组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。

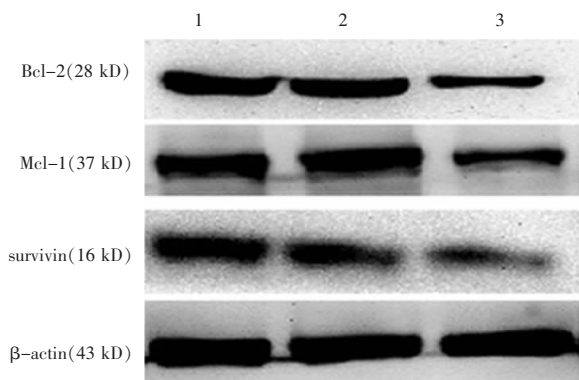


图 3 STAT3-shRNA 下调 SGC-7901 细胞中抗凋亡蛋白的活性

Fig.3 STAT3-shRNA downregulates the activity of
anti-apoptotic proteins in SGC-7901 cells

表 4 SGC-7901 细胞中抗凋亡蛋白的相对表达强度 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 Expression of anti-apoptotic proteins in SGC-7901 cells
($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Mcl-1	survivin
实验组	0.47 ± 0.03^{ab}	0.35 ± 0.02^{ab}	0.45 ± 0.02^{ab}
阴性对照组	0.81 ± 0.06^c	0.52 ± 0.05^c	0.71 ± 0.03^c
空白对照组	0.78 ± 0.07	0.49 ± 0.01	0.67 ± 0.05
<i>F</i> 值	31.135	23.901	48.190
<i>P</i> 值	0.001	0.001	0.000

注: a, 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b, 与阴性对照组相比, $P < 0.05$; c, 与空白对照组相比, $P > 0.05$

3 讨论

5-Fu 是胃癌化疗的一线药物, 其通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶影响 DNA 的生物合成, 属于抗代谢类化疗药物, 然而其疗效往往因癌细胞获得多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 而受到极大影响^[4]。MDR 的形成机制十分复杂, 耐药蛋白过表达、细胞凋亡异常、转录因子活化、药物代谢异常等皆可诱导 MDR。研究证明, 化疗药物发挥细胞毒性作用的主要机制是诱导凋亡, 可由于肿瘤细胞内在的抗凋亡程序激活, 使得其对化疗药物耐受, 最终导致化疗失败^[5]。

STAT3 作为络氨酸信号通路中的重要转录因子, 通过调控多个下游靶分子介导细胞的增殖、分化及凋亡。在正常细胞中, STAT3 的活化快速而短暂, 而在肿瘤细胞中 STAT3 却能异常的持续活化, 促进细胞不断增殖, 抑制凋亡, 诱导肿瘤血管生成及免疫逃逸, 最终促进肿瘤发生与发展。Bcl-2、Mcl-1、survivin 均是 STAT3 通路下游的靶基因, 其中 Bcl-2 及 Mcl-1 是 Bcl-2 家族蛋白的主要成员, 依赖线粒体途径抑制促凋亡因子的释放, 抑制细胞凋亡^[6]; survivin 则是凋亡抑制蛋白 (IAPs) 家族成员, 主要依赖 Caspase 途径抑制细胞色素 C 释放从而抑制凋亡^[7]。近来的研究认为, STAT3 的异常活化与肿瘤细胞耐药有关, 抑制 STAT3 可逆转细胞的化疗抵抗性。Liu 等^[8]和 Gu 等^[9]分别在黑色素瘤及头颈部鳞癌中发现, 耐药细胞中 STAT3 表达水平较不耐药细胞明显上调, 沉默 STAT3 可抑制肿瘤生长, 逆转耐药细胞的化疗抵抗性。Duan 等^[10]发现, 转染 IL-6 (STAT3 的活性配体) 可诱导卵巢癌细胞对紫杉醇耐药, 利用 siRNA 沉默 STAT3 可增强紫杉醇的抗肿瘤活性。目前, STAT3 沉默对胃癌细胞化疗敏感性影响的研究相对甚少, 鉴于此, 本实验拟阻断胃癌 SGC-7901 细胞的 STAT3 信号通路, 观察 5-Fu 化疗敏感性的变化。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是利用体外合成的 RNA 序列特异性地结合并降解同源目的 mRNA, 使目的基因功能完全或部分丧失的生物学过程, 可通过 2 种途径实现: 一种是直接向细胞转染小干扰 RNA (siRNA), 另一种则是通过质粒、

病毒或细菌载体将短发夹 RNA(shRNA)传递至靶细胞^[1]。siRNA 由于存在易被血清核糖核酸酶降解、稳定性差、转运效率差等不足之处,因此本实验选择更加特异、稳定的 shRNA 以抑制靶基因表达。

本研究通过构建靶向 STAT3 基因的慢病毒载体,介导 shRNA 转染 SGC-7901 细胞,在激光共聚焦显微镜下可观察到明显的 GFP 表达,real-time PCR 及免疫印迹结果表明干扰后 STAT3 mRNA 表达抑制率约为 54%,蛋白水平下降达 40%,说明 STAT3 在基因及蛋白水平均得到有效抑制。MTT 及流式细胞仪检测发现 STAT3-shRNA 可增强 5-Fu 的增殖抑制及凋亡诱导作用,提示 SGC-7901 细胞对 5-Fu 的化疗敏感性升高。为了阐明其化疗增敏的机制,进一步检测了 STAT3 下游靶分子 Bcl-2、Mcl-1、survivin 蛋白的表达,发现三者的活性均明显下调,这与 Liu^[12]、Wen 等^[13]的实验结果一致,说明 STAT3-shRNA 能通过抑制 STAT3 表达进而下调该通路下游的抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1、survivin 的活性,诱导肿瘤细胞凋亡,使 5-Fu 的抗肿瘤活性增强。

总之,慢病毒介导的 STAT3-shRNA 能靶向抑制 SGC-7901 细胞中 STAT3 基因表达,通过阻断 STAT3 信号通路使下游的抗凋亡信号 Bcl-2、Mcl-1、survivin 的表达下降,促进细胞凋亡,在一定程度上提高胃癌细胞对 5-Fu 的化疗敏感性。本实验结果表明,靶向 STAT3 的基因治疗联合化疗,能逆转胃癌细胞对 5-Fu 的抵抗性,有可能成为胃癌治疗的有效新途径。但本实验仅为初步的体外实验,肿瘤细胞的耐药是涉及多种机制的复杂过程,尚需进一步开展动物实验验证。

参 考 文 献

- [1] Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(41): 16158-16163.
- [2] Yu LF, Zhu YB, Qiao MM, et al. Constitutive activation and clinical significance of Stat3 in human gastric cancer tissues and cell lines[J]. Chinese Medical Journal, 2004, 84(24): 2064-2069.
- [3] Yakata Y, Nakayama T, Yoshizaki A, et al. Expression of p-STAT3 in human gastric carcinoma; significant correlation in tumour invasion and prognosis[J]. Int J Oncol, 2007, 30(2): 437-442.
- [4] 魏 嘉, 王立峰, 刘宝瑞. 5-Fu 相关的药物疗效及毒性预测分子研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(15): 1889-1893.
- [5] Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer[J]. Mol Biotechnol, 2010, 46(3): 308-316.
- [6] Cosentino K, García-Sáez AJ. Mitochondrial alterations in apoptosis[J]. Chem Phys Lipids, 2014(181): 62-75.
- [7] Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. survivin as a preferential target for cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(2): 2494-2516.
- [8] Liu F, Cao J, Wu J, et al. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2013, 133(8): 2041-2049.
- [9] Gu F, Ma Y, Zhang Z, et al. Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncology reports, 2010, 23(3): 671-676.
- [10] Duan Z, Foster R, Bell DA, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(17): 5055-5063.
- [11] Sioud M. Promises and challenges in developing RNAi as a research tool and therapy[M]//RNA. Humana Press, 2011: 173-187.
- [12] Liu T, Peng H, Zhang M, et al. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 641(1): 15-22.
- [13] Wen K, Fu Z, Wu X, et al. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells; effects associated with STAT3/survivin[J]. Cancer Lett, 2013, 333(1): 56-65.

(责任编辑:冉明会)

[1] Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/