

STAT1 在结肠癌细胞中的异常表达 及其成瘤能力和凋亡的影响^{*}

华中科技大学同济医学院附属普爱医院 范渊 周锐 王建祥 董政 刘峰^{*}, 武汉 430033

摘要 目的:探究结肠癌细胞中信号转导子和转录激活因子1(STAT1)的表达情况及对结肠癌细胞成瘤能力和凋亡的影响。方法:应用免疫组织化学方法(SP法)检测54例结肠癌及其癌旁组织中STAT1蛋白的表达。将12只5周龄的BALB/C-nu裸鼠随机分为2组,于其背部皮下分别接种转染STAT1基因的结肠癌Ls-174-T细胞(实验组)和转染空质粒的细胞(对照组),测定2组移植瘤的大小、质量,TUNEL法检测细胞凋亡,免疫组化法检测Bcl-2、CyclinD1蛋白表达水平,比较分析转染STAT1对移植瘤成瘤能力、细胞凋亡及Bcl-2、CyclinD1蛋白表达水平的影响。结果:结肠癌组织中STAT1蛋白的阳性表达率显著高于癌旁组织,在中、低分化,伴有淋巴结转移的患者中的阳性率显著高于高分化、无淋巴结转移者。转染STAT1基因的细胞所形成移植瘤体积与质量均显著大于转染空质粒的对照组,其细胞凋亡指数(AI)显著低于对照组,此外其Bcl-2、CyclinD1蛋白的表达水平显著高于对照组。结论:STAT1在结肠癌细胞中可能作为癌蛋白发挥作用,其在结肠癌细胞中的过表达可以促进肿瘤细胞的生长,抑制肿瘤细胞的凋亡,并上调CyclinD1、Bcl-2蛋白的表达。

关键词 信号转导子和转录激活因子1; 结肠癌细胞; 成瘤能力; 细胞凋亡

中图分类号 R735.3⁺⁵ **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzz20210116

STAT1是信号转导子和转录激活因子(STAT)家族中的一员,通常以非活性形式存在于细胞质中,活化后的STAT1形成二聚体易位至细胞核,与靶基因启动子结合,诱导特异性基因表达,如LMP2、IRF1、TAP1等,从而参与调控细胞的发生、发展、分化和凋亡^[1-3]。本研究通过观察STAT1蛋白在结肠癌细胞中的表达情况及对结肠癌细胞成瘤能力、凋亡的影响,探讨其在结肠癌中所发挥的生物学作用。

材料与方法

标本来源 收集华中科技大学附属普爱医院2015年8月~2018年8月手术切除的并经临床和病理证实的结肠癌标本54例(均附癌旁结肠黏膜组织)。所取标本均在癌灶中央取材,癌旁组织距癌灶5cm,标本经10%中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,每个标本均做4μm厚连续切片2张。54例(男31,女23)患者中,年龄27~80岁,中位年龄56岁。所有病例根据2000年版WHO《Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System》标准进行组织学分型和病理分级:①按组织学类型分为:I级,高分化管状和乳头状腺癌13例;II级,中分化

腺癌12例;III级,低分化腺癌和印戒细胞癌29例。②按有无淋巴结转移分为:有转移的37例,无转移的17例。所有患者术前均未接受放化疗。

主要仪器、试剂、细胞 S-P试剂盒、鼠抗人STAT1单克隆抗体购于武汉晶美生物工程公司。结肠癌细胞Ls-174-T购于中国科学院细胞库。5~7周龄BALB/C-nu裸鼠由上海市肿瘤研究所动物实验室提供,在华中科技大学同济医学院动物实验中心无特殊病原菌(SPF)条件饲养。RPMI1640培养基购于Gibco公司,胎牛血清购于杭州四季清。TUNEL反应试剂盒、鼠抗人Bcl-2单克隆抗体、鼠抗人CyclinD1单克隆抗体均购于福州迈新生物有限公司。实验设备有:倒置相差显微镜(Olympus)、低温超速离心机400R型(德国Heraeus公司)、超净工作台(苏州安泰空气技术公司)、-20℃、-80℃低温冰箱(日本Sanyo)、恒温培养箱(上海跃进仪器厂)。

免疫组织化学染色与结果判定 组织标本中STAT1蛋白的检测采用免疫组化S-P染色,操作参照S-P试剂盒说明书进行,STAT1单克隆抗体稀释度数为1:100,以PBS替代一抗作阴性对照。STAT1阳性着色分布于细胞核,呈棕褐色,按照Zhang等^[1]的方法,以细胞核内呈棕褐色为阳性,高倍镜下(400倍)对每张切片随机选择5个视野计数200个细胞,共计1000个。0分:无着色;1分:<1%的细

^{*}基金项目:武汉市卫计委课题(No:WX14C60)

^{*}通信作者:刘峰,E-mail:fy.kid@hotmail.com

胞核着色;2分:1%~10%的细胞核弱着色;3分:10%~50%的细胞核明显着色;4分:>50%的细胞核强着色。评分结果:0~1分定为阴性,2~4分定为阳性。

荷瘤裸鼠模型的建立 取对数生长期的转染 pEGFP-N1-STAT1 质粒和空质粒 pEGFP-N1 的 Ls-174-T 细胞,0.25%胰酶消化,调整细胞浓度 $1 \times 10^7/\text{mL}$,将 12 只 5 周龄 BALB/C-nu 裸鼠,随机分为 2 组,每组 6 只,每只裸鼠背部皮下分别接种 0.2 mL。定期观察肿瘤结节形成、裸鼠精神、饮食等状况。以接种转染 STAT1 质粒的细胞组为实验组;以接种转染空质粒的细胞组为对照组。每周测量 2 组移植瘤的长、短径,并于第 5 周称重:肿瘤体积 $(V) = \pi(\text{短径}^2 \times \text{长径})/6$ 。

移植瘤的组织学观察 移植瘤组织常规石蜡包埋、切片,作 HE 染色。免疫组织化学检测 Bcl-2、CyclinD1 蛋白的表达,具体步骤参照 S-P 试剂盒说明书进行。鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体与鼠抗人 CyclinD1 单克隆抗体的稀释度数均为 1:100,以 PBS 替代一抗作阴性对照。镜下观察肿瘤细胞和/或基质细胞,胞浆和/或细胞核内呈棕褐色颗粒为阳性表达。

原位细胞凋亡的检测 采用原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的切口末端标记法,即 TUNEL 法。石蜡切片经脱蜡后,按细胞凋亡检测试剂盒(德国宝灵曼公司)说明操作。在荧光显微镜下,随机选择 10 个高倍镜视野,计算凋亡细胞,凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数目 $\times 100/\text{有核细胞的总数}$ 。

统计学处理 应用 SPSS 21.0 统计学软件。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,成组比较进行 *t* 检验;计数资料以百分数(%)表示,对免疫组化结果及其与临床病理参数的关系进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

结肠癌及癌旁组织中 STAT1 蛋白的表达 STAT1 蛋白在不同组织中的表达具有明显异质性,

STAT1 蛋白在结肠癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁组织(74.1% vs 48.1%, $P < 0.05$),见表 1。

表 1 STAT1 蛋白在不同组织中的表达

标本来源	例	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)
结肠癌组织	54	40	14	74.1*
癌旁组织	54	26	28	48.1

注:与癌旁组织比较,* $P < 0.05$

STAT1 蛋白表达与结肠癌病理特征的关系 STAT1 蛋白在不同分化程度、有无淋巴结转移患者中的表达有显著性差异(均 $P < 0.05$),而在不同性别、年龄、浸润深度患者的结肠癌组织中的表达无显著性差异(均 $P > 0.05$),见表 2。

表 2 STAT1 蛋白的表达与结肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例	阳性(例)	阳性率(%)
性别			
男	31	24	77.4
女	23	16	69.6
年龄			
≤56 岁	28	19	67.9
>56 岁	26	21	80.8
淋巴转移			
无转移	17	9	52.9*
有转移	37	31	83.8
浸润深度			
T1 + T2	18	11	61.1
T3 + T4	36	29	80.6
分化程度			
高分化	13	5	38.5
中分化	12	9	75.0 [#]
低分化	29	26	89.7 [#]

注:与有淋巴结转移组比较,* $P < 0.05$;与高分化组比较,[#] $P < 0.05$

转染 STAT1 基因对裸鼠移植瘤成瘤能力的影响 所有小鼠均有大小不等的肿瘤生成,转染 pEGFP-N1-STAT1 的细胞所形成移植瘤体积与重量显著大于对照组(均 $P < 0.05$),见表 3、4。

TUNEL 检测结果 凋亡细胞表现为细胞核固缩,TUNEL 染色为细胞核染成棕褐色。实验组组织中仅可见少量凋亡细胞,对照组组织中凋亡细胞明

表 3 转染 STAT1 基因的结肠癌 Ls-174-T 细胞的移植瘤体积(mm^3)

组别	只	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周
实验组	6	25.4 ± 4.7*	92.4 ± 18.2**	398.1 ± 77.1**	936.6 ± 180.4**	1836.3 ± 362.6**
对照组	6	7.9 ± 2.6	32.8 ± 6.7	98.4 ± 18.9	295.1 ± 55.6	597.4 ± 116.1

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

显多于实验组;实验组的细胞凋亡指数(AI)显著低于对照组(均 $P < 0.01$),见表4。

表4 2组裸鼠移植瘤质量、凋亡指数对照

组别	只	肿瘤质量(g)	凋亡指数
实验组	6	1.67 ± 0.46 **	2.36 ± 0.27 **
对照组	6	0.51 ± 0.32	14.84 ± 3.06

注:与对照组比较,** $P < 0.01$

肿瘤组织中 Bcl-2、CyclinD1 蛋白的表达 Bcl-2 阳性着色分布于胞浆;CyclinD1 阳性着色分布于细胞核,少数伴胞浆染色;与对照组比较,转染 STAT1 能显著提高裸鼠移植瘤 Bcl-2、CyclinD1 蛋白的表达水平(均 $P < 0.01$),见表5。

表5 转染 STAT1 基因对结肠癌细胞中 Bcl-2、CyclinD1 蛋白表达的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例	Bcl-2	CyclinD1
实验组	6	46.2 ± 4.1 **	37.8 ± 4.2 **
对照组	6	19.1 ± 3.8	14.9 ± 2.6

注:与对照组比较,** $P < 0.01$

讨论

一些研究^[1-3]表明活化的 STAT1 在癌细胞中发挥抑癌作用^[4,5],而另一些实验和临床研究结果则表明 STAT1 在某些恶性表型或遗传背景下,亦可作为同一细胞类型的癌蛋白发挥作用^[6-8]。STAT1 参与调控细胞的发生、发展、分化和凋亡,在一部分肿瘤中发挥抑癌作用^[4,5],在另一部分中则作为癌蛋白发挥作用^[6,7]。本实验发现结肠癌细胞中 STAT1 蛋白的表达显著高于癌旁组织,且分化程度低、有淋巴结转移的肿瘤患者的阳性率显著高于分化程度高、无淋巴结转移的患者,这提示 STAT1 在结肠癌细胞中可能是一种癌蛋白。

细胞的增殖、分化和凋亡保持着动态平衡,也维持着细胞的自稳态^[9]。实验用裸鼠为肿瘤免疫缺陷的动物,对外源性的肿瘤细胞没有免疫排斥作用,在细胞活性好的情况下极易成瘤生长。本实验转染 STAT1 基因组 Ls-174-T 细胞与转染空质粒组细胞在生长条件、接种细胞数和接种时间均相同的条件下,裸鼠接种部位成瘤的生长和瘤体质量均有明显差异,实验组裸鼠体内移植瘤生长更迅速,这表明移植瘤体内强化 STAT1 表达能促进裸鼠的肿瘤生长。而凋亡指数显著低于转染空质粒组,提示这种促瘤作用可能是通过抑制肿瘤细胞凋亡来实现的。

细胞增殖的调节失控是肿瘤产生的本质,细胞周期对细胞的增殖调控起着重要的作用。大量研究

证实在细胞周期中存在 G1/S 转换节点,通过对此转换点的调节控制可改变细胞周期的进程。CyclinD1 是重要的细胞周期素,是 G1 期进展的限速调节因素,它的合成是在 G1 早期,并在 G1 后期达到高峰,进入 S 期前降解,抑制 CyclinD1 的活性,即可使细胞周期受阻于 G1 期,从而可以限制肿瘤细胞异常增殖^[10]。研究表明 CyclinD1 可促进细胞周期 G1/S 期转换从而达到加速细胞周期的进程^[11]。CyclinD1 已被确定为原癌基因,而且在多种肿瘤组织存在高表达^[12]。在抑制细胞增殖的作用过程中发现肿瘤坏死因子、干扰素都可能与 CyclinD1 的表达相关^[13,14]。Bcl-2 家族是一个多基因家族,它们形成同源或异源二聚体,调控蛋白酶和核酸酶活性^[15]。Bcl-2 基因是一种抑制细胞凋亡的原癌基因,可以抑制细胞凋亡的发生和进程^[16]。大量研究显示 Bcl-2 的过量表达会导致细胞迅速进入 G0 期,从而导致成熟细胞集中于 G0 期^[17,18]。本实验中,转染 STAT1 后 Ls-174-T 细胞中的 Bcl-2、CyclinD1 蛋白的表达显著高于转染空质粒的对照组,提示 STAT1 可能通过上调 CyclinD1、Bcl-2 蛋白的表达而加速细胞周期的进展,抑制肿瘤细胞的凋亡,从而促进肿瘤的生长。其中详细的机制和相互作用仍待进一步研究。

综上所述,STAT1 在结肠癌细胞中可能作为癌蛋白发挥作用,其在结肠癌细胞中的过表达可以促进肿瘤细胞的生长,抑制肿瘤细胞的凋亡,并上调 CyclinD1、Bcl-2 蛋白的表达。STAT1 或许可以作为结肠癌早期诊断与预后判断的潜在生物标志物,以及临床治疗结肠癌的新的分子靶点。

参考文献

- Zhang Y, Liu Z. STAT1 in cancer: friend or foe? [J]. *Discov Med*, 2017, 24(130):19-29.
- Wei Y, Chen X, Yang J, et al. DcR3 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer via a DcR3/STAT1/IRF1 feedback loop [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(12):2618-2633.
- Liang J, Wang L, Wang C, et al. Verteporfin Inhibits PD-L1 through Autophagy and the STAT1-IRF1-TRIM28 Signaling Axis, Exerting Antitumor Efficacy [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(7):952-965.
- Chan S R, Vermir W, Luo J, et al. STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor alpha-positive luminal mammary carcinomas [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1):R16.
- Deng H, Zhen H, Fu Z, et al. The antagonistic effect between STAT1 and Survivin and its clinical significance in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(1):193-199.

- World Health Organization classification of lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2375-2390.
- 2 王黎. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤的分子诊断及治疗进展 [J]. *内科急危重症杂志*, 2011, 17(5):257-259.
 - 3 Scott DW, King RL, Staiger AM, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology [J]. *Blood*, 2018, 131(18):2060-2064.
 - 4 Cabanillas F, Shah B. Advances in diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2017, 17(12):783-796.
 - 5 Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28):3460-3647.
 - 6 Reagan PM, Davies A. Current treatment of double hit and double expressor lymphoma [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 2017(1):295-297.
 - 7 Kim H, Kim HJ, Kim SH. Diagnostic approach for double-hit and triple-hit lymphoma based on immunophenotypic and cytogenetic characteristics of bone marrow specimens [J]. *Ann Lab Med*, 2020, 40(5):361-369.
 - 8 Frosch ZAK, Landsburg DJ. Molecular risk stratification in aggressive B-cell lymphomas [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(18):2014-2017.
 - 9 Howlett C, Snedecor SJ, Landsburg DJ, et al. Front-line dose-escalated immunochemotherapy is associated with a significant progression-free survival advantage in patients with double-hit lymphomas: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Haematol*, 2015, 170(4):504-514.
 - 10 郭宝平. 关于双打击淋巴瘤的新认识:诊断、预后及治疗进展 [J]. *内科急危重症杂志*, 2017, 23(2):92-94.
 - 11 Landsburg DJ, Falkiewicz MK, Maly J, et al. Outcomes of patients with double-hit lymphoma who achieve first complete remission [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(20):2260-2267.
 - 12 Czuczman MS, Trneny M, Davies A, et al. A phase 2/3 multicenter, randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of lenalidomide versus investigator's choice in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15):4127-4137.
 - 13 Chamuleau MED, Burggraaff CN, Nijland M, et al. Treatment of patients with MYC rearrangement positive large B-cell lymphoma with R-CHOP plus lenalidomide: results of a multicenter HOVON phase II trial [J]. *Haematologica*, 2019, 105(12):2805-2812.
 - 14 Dunleavy K, Fanale MA, Abramson JS, et al. Dose-adjusted EPOCH-R (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and rituximab) in untreated aggressive diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement: a prospective, multicentre, single-arm phase 2 study [J]. *Lancet Haematol*, 2018, 5(12):e609-e17.
 - 15 Oki Y, Noorani M, Lin P, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience [J]. *Br J Haematol*, 2014, 166(6):891-901.
 - 16 Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis [J]. *Blood*, 2014, 124(15):2354-2361.

(2020-12-24 收稿 2021-01-10 修回)

(上接第 60 页)

- 6 Arzt L, Kothmaier H, Halbwedl I, et al. Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) acts like an oncogene in malignant pleural mesothelioma [J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(1):79-88.
- 7 Bozeman R, Abel E L, Macias E, et al. A novel mechanism of skin tumor promotion involving interferon-gamma (IFN γ)/signal transducer and activator of transcription-1 (Stat1) signaling [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(8):642-653.
- 8 Zhang J, Wang F, Liu F, et al. Predicting STAT1 as a prognostic marker in patients with solid cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12(1):1-16.
- 9 Arora H, Qureshi R, Rizvi M A, et al. Study of apoptosis-related interactions in colorectal cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11):14415-14425.
- 10 Lamb J, Ewen ME. Cyclin D1 and molecular chaperones: implications for tumorigenesis [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(6):525-527.
- 11 Assoian RK, Schwartz MA. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(1):48-53.
- 12 Bates S, Peters G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene [J]. *Semin Cancer Biol*, 1995, 6(2):73-82.
- 13 Moneo V, Del Valle Guijarro M, Link W, et al. Overexpression of cyclin D1 inhibits TNF-induced growth arrest [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(3):484-499.
- 14 Vongsakul M, Aksomboon A. Cyclins D1, E, A expression and synergistic cytotoxicity to a cholangiocarcinoma cell line from recombinant TNF-alpha and PHA supernate [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2002, 20(1):57-60.
- 15 Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(2):99-109.
- 16 Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1):26-34.
- 17 Simpson NH, Singh RP, Emery AN, et al. Bcl-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(2):174-186.
- 18 Liu HY, Duan GL, Xu RY, et al. DJ-1 overexpression confers the multi-drug resistance phenotype to SGC7901 cells by upregulating P-gp and Bcl-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(1):73-80.

(2019-01-31 收稿 2020-10-16 修回)