

从 NF- κ B 和 STAT3 相互作用研究乐胃饮加味方对 SGC-7901 人胃癌细胞的影响

朱飞叶¹ 谢冠群² 张永生³ 徐珊²

摘要 **目的** 研究乐胃饮加味方对 SGC-7901 人胃癌细胞株核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 和信号传导与转录激活因子(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 相互作用的影响。**方法** 以 SGC-7901 人胃癌细胞株为研究对象, 构建 NF- κ B (RelA/p65)-PECFP 和 STAT3-PEYFP 载体, 转染至 SGC-7901 人胃癌细胞, LPS 刺激后, 应用乐胃饮加味方干预。应用荧光共振能量转移技术和免疫共沉淀技术检测干预后 NF- κ B 和 STAT3 蛋白在细胞中的交互作用。**结果** 经 LPS 刺激后, NF- κ B 和 STAT3 的相互作用增强, 用乐胃饮加味方干预后, NF- κ B 和 STAT3 的相互作用明显减弱。**结论** 乐胃饮加味方可能通过阻断 NF- κ B 和 STAT3 蛋白间的交互作用, 可用于治疗胃癌前病变, 预防胃癌生成。

关键词 乐胃饮加味方; 核因子- κ B; 信号传导与转录激活因子; 相互作用

Effect of Modified Leweyin Recipe on SGC-7901 Human Gastric Cancer Cells from Crosstalk between NF- κ B and STAT3 ZHU Fei-ye¹, XIE Guan-qun², ZHANG Yong-sheng³, and XU Shan²
1 Center for Analysis and Testing, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 College of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 3 Library of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Modified Leweyin Recipe (MLR) on nuclear factor kappa B (NF- κ B) and crosstalk between signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) in SGC-7901 human gastric cancer cells. **Methods** SGC-7901 human gastric cancer cell strain was taken as subjects. The vectors of NF- κ B (RelA/p65)-PECFP and STAT3-PEYFP were constructed and transfected in SGC-7901 human gastric cancer cells. Cells were then intervened by MLR after stimulated by LPS. The crosstalk between NF- κ B and STAT3 in cells was detected using fluorescence resonance energy transfer and co-immunoprecipitation. **Results** After LPS stimulation, the crosstalk between NF- κ B and STAT3 was enhanced. But it was significantly weakened after MLR intervention. **Conclusion** MLR could treat precancerous lesions of gastric cancer and prevent the occurrence of gastric cancer possibly by blocking the crosstalk between NF- κ B and STAT3.

KEYWORDS Modified Leweyin Recipe; nuclear factor kappa B; signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3); crosstalk

胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)是正常胃黏膜向胃癌转变过程中的重要阶段。近年来研究发现, 这一阶段持续的慢性炎

症是肿瘤形成的关键^[1,2]。核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 和信号传导与转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 炎症信号通路与肿瘤生长、增殖相关介质的释放密切相关^[3-5], 是导致炎症相关肿瘤发生的主要因素。最新研究表明, NF- κ B 与 STAT3 的相互作用 (crosstalk) 大大增加了慢性炎症向肿瘤转变的风险^[6]。本课题组前期研究发现, 乐胃饮加味方能有效改善 PLGC 的临床症状及胃黏膜病理状况^[7]。因此, 我们采用荧光共振能量转移技术 (fluorescence reso-

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (NO. 2013ZQ009)

作者单位: 1. 浙江中医药大学分析测试中心 (杭州 310053); 2. 浙江中医药大学基础医学院 (杭州 310053); 3. 浙江中医药大学图书馆 (杭州 310053)

通讯作者: 徐珊, Tel: 0571 - 86613538, E-mail: xushanhz@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2017. 02. 0232

nance energy transfer, FRET) 和免疫共沉淀技术研究乐胃饮加味方对 NF- κ B 和 STAT3 相互作用的影响, 从蛋白间相互作用研究中医药预防胃癌的机制, 为中医药防治肿瘤形成提供新方法和新思路。

材料与方法

1 细胞株 SGC-7901 人胃癌细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

2 药物 乐胃饮加味方(薏苡仁、淮山药、炒白术、炒白芍、郁金、香茶菜, 药物比例为 2:2:1:1:1:1), 加水浸泡 2 h 后, 水煎煮 2 次, 将药液混匀静置, 浓缩成 1 g/mL, 3 000 r/min, 离心 5 min, 取上清, 灭菌后 4 ℃ 分装保存备用。

3 主要试剂 RPMI1640(批号:8114307)、胎牛血清(批号:13776154)均购于 GIBCO 公司。Lipofectamine2000(Invitrogen, 批号:886073), 免疫共沉淀用兔抗 c-myc 抗体、鼠抗 GFP 抗体分别购于 Santa-Roche, 羊抗兔和羊抗鼠二抗购于 LICOR。蛋白 Marker 购于 Fermentas。激光共聚焦培养皿购于 NEST 公司。无内毒素质粒大提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。Protein A + G Agarose 购于碧云天生物技术研究所。

4 主要仪器 奥林巴斯激光共聚焦(FV1000), Bio-Rad Mini-PROTEAN 垂直电泳仪及转印系统(BIO-RAD, 美国), Odyssey 双色红外激光成像系统(LICOR, 美国), CO₂ 培养箱(Thermo, 美国), 低温离心机(eppendorf, 德国)。

5 载体构建 NF- κ B(RelA/p65)-PECFP、STAT3-PEYFP 真核表达载体的构建。实验室原保存有 STAT3-cmyc、p65-PEGFP 以及 PEYFP、PECFP 载体。将上述载体进行双酶切, STAT3 及 PEYFP 两端引入 EcoR I 和 Apa I 酶切位点, p65 及 PECFP 两端引入 BamH I 和 Hindd III 酶切位点, 凝胶回收、纯化, 将相应片段进行连接, 并转化到 DH5 α 感受态大肠杆菌中, 涂到培养基上, 在长出细菌后挑克隆到培养液中摇菌, 抽提质粒后双酶切鉴定并测序, 保存测序正确的质粒备用。

6 细胞培养及药物干预 SGC-7901 人胃癌细胞接种于 25 mL 培养瓶, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下无菌培养。待细胞处于对数期生长时, 转入激光共聚焦显微镜或 6 孔板中培养, 进行后续实验; 或转入 6 孔板中, 加入 LPS(1 μ g/mL) 刺激, 及 5% 的乐胃饮加味方中药干预。

7 指标检测

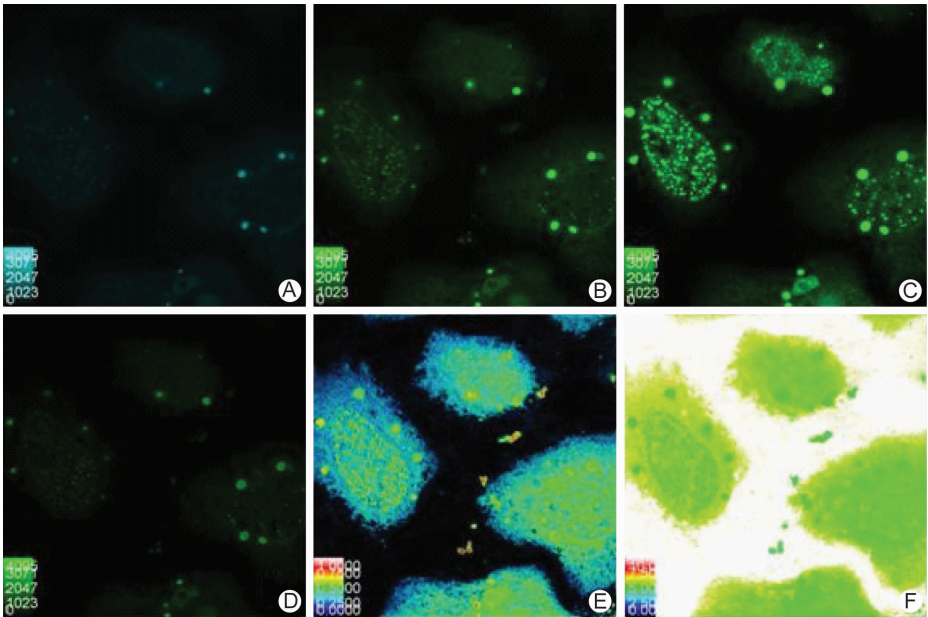
7.1 FRET 检测 p65 和 STAT3 的相互作用 采用敏化发射法检测^[8]。将细胞转入激光共聚焦专用培养皿后, 分别转染供载体(p65-PECFP)、受体载体(STAT3-PEYFP)以及同时转染供体和受体载体。并拍摄单转供载体在供体激光激发下的供体通道和受体通道的图片, 单转受体载体在供体激发光和受体激发光下受体通道的图片, 以及在供体受体同时转染下在供体激发光下的供体通道图片、在供体激发下的受体通道图片、在受体激发光下的受体通道图片, 经软件计算得出两个蛋白之间的相互作用。

7.2 免疫共沉淀技术检测 p65 和 STAT3 的相互作用 采用免疫共沉淀技术检测^[9]。将细胞转入 6 孔板中, 分别单独转染 STAT3-cmyc 和 p65-PEGFP, 以及同时转染 2 个载体。经不同方法干预后, 收集细胞, 离心后重悬于细胞裂解液, 垂直混合器上垂直混合 1 h, 离心 5 min, 吸取上清, 提取细胞中的总蛋白。取 20 μ L 于另一管中, 加 2 $\times$ 上样缓冲液 -20 ℃ 待用。剩余液体加 300 μ L PBS 及 15 μ L Protein A + G Agarose。4 ℃ 缓慢摇动 1 h。离心取上清, 加入兔抗 c-myc 抗体或鼠抗 GFP 抗体, -4 ℃, 缓慢摇床过夜。离心, 收集 Protein A + G Agarose。洗涤沉淀加入 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液重悬沉淀, 沸水浴后取全部样品用于 SDS-PAGE 电泳。

结 果

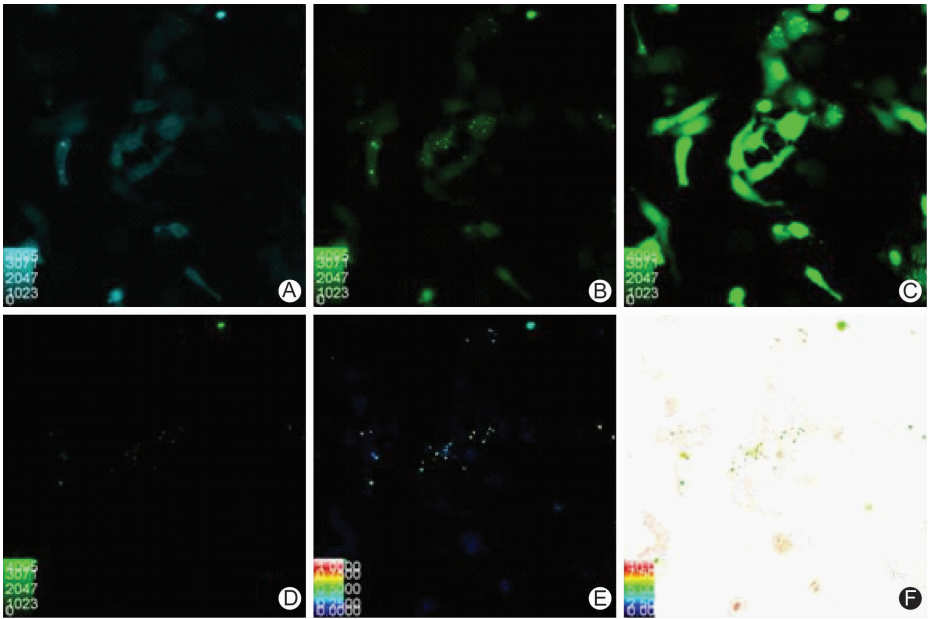
1 FRET 检测 NF- κ B 与 STAT3 的相互作用结果(图 1、2) p65-PECFP 和 STAT3-PEYFP 通过转染进入了细胞后都表达了相应的蛋白, 经过 LPS 刺激后, 绝大部分的蛋白都进入了细胞核, 以发挥转录因子的作用。而且 FRET 的作用主要发生在细胞核(图 1D), FRET 的效率也是在细胞核中最高(图 1E), 从供体与受体的距离分析, FRET 也发生在细胞核内(CFP 与 YFP 发生 FRET 的距离为 5.2767 nm, 即图中绿色部分, 图 1F)。应用乐胃饮加味方干预后, 两个载体在细胞中都能正常表达, 但相互作用的数量明显下降(图 2)。

2 免疫共沉淀技术检测 NF- κ B 和 STAT3 的相互作用结果(图 3) STAT3-cmyc 和 p65-PEGFP 载体经转染进入细胞后, 在 LPS 刺激下, 发生炎症反应, STAT3 与 p65 发生相互作用, 通过 GFP 抗体将 p65-PEGFP 融合蛋白沉淀下来, 同时也将 STAT3-cmyc 一起沉淀下来。再通过 cmyc 抗体间接表示与 p65 相互作用的 STAT3 的量。结果显示 LPS 刺激后, p65 和 STAT3 的相互作用增强, 而中药干预后, 其相互作用减弱。



注:A 为供体激发的供体通道影像;B 为供体激发的受体通道影像;C 为受体激发的受体通道影像;D 为精确的 FRET ;E 为 FRET 的效率;F 为供体与受体的距离

图 1 LPS 刺激后 NF-κB 与 STAT3 的相互作用(×1000)



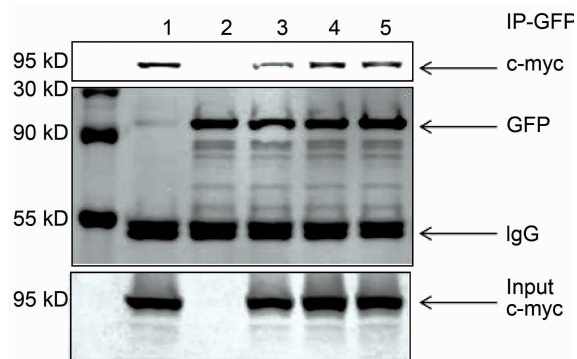
注:A 为供体激发的供体通道影像; B 为供体激发的受体通道影像;C 为受体激发的受体通道影像;D 为精确的 FRET ;E 为 FRET 的效率;F 为供体与受体的距离

图 2 中药干预后 NF-κB 与 STAT3 的相互作用(×400)

讨 论

乐胃饮加味方是经长期的临床实践总结归纳出的经验方,全方由薏苡仁、淮山药、炒白术、炒白芍、郁金、香茶菜组成,方中薏苡仁为君药,健脾渗湿;淮山药、炒白术为臣药,益气健脾;炒白芍、郁金为佐药,疏肝行

气、柔肝止痛;香茶菜为使药,清热解毒散瘀;诸药合用,发挥健脾疏肝之功效,对 PLGC 具有较好的疗效。
NF-κB 是一种核转录因子,在哺乳动物中常以 RelA (p65)/p50 二聚体形式存在,NF-κB 的 RelA (p65) 亚型与肿瘤形成密切相关。静息状态下,NF-κB 抑制因子 α (inhibitor of kappa Bα, I-κBα) 与



注:1 为单转 STAT3-cmyc;2 为单转 p65-PEGFP;3 为同时转染两载体;4 为 3 的基础上及 LPS 刺激;5 为 4 的基础上加中药干预

图 3 免疫共沉淀技术检测 NF-κB 和 STAT3 的相互作用

NF-κB 结合形成复合体,并覆盖了 NF-κB 的核定位信号,使 NF-κB 锚定于细胞质^[10]。当 NF-κB 信号通路受炎症相关细胞因子刺激后,I-κBα 在 I-κBα 激酶 (IKK) 的作用下发生磷酸化,进而水解,使 NF-κB 暴露出核定位信号并进入细胞核内,与特定基因的启动子区域结合,启动特定区域的转录^[11]。NF-κB 家族中的 c-Rel 亚型通过上调相关基因以激活 Th1 免疫应答,进而控制炎症反应并且抑制肿瘤生成;而 RelA 的下游基因编码的因子能激活 STAT3 通路。STAT3 一方面抑制 IKK,减少 NF-κB 相关 Th1 免疫应答;另一方面通过募集 p300 组蛋白乙酰转移酶与 RelA 结合,干扰 NF-κB-I-κBα 复合体的生成,并通过延长两者在细胞核内的结合时间,持续激活两者共同调控的炎症相关基因及致癌基因(如 IL-6、IL-17、c-Myc、Bcl-xL 等),形成了从炎症到肿瘤之间的桥梁^[12]。除上述相互作用以外,NF-κB 与 STAT3 之间还存在另外两种作用形式,一是未磷酸化的 STAT3 直接取代 NF-κB-I-κBα 复合体中 I-κBα 的位置与 RelA 形成复合物,共同诱导基因转录,增强 NF-κB 的活性并促使其向细胞核内转移^[13];二是 NF-κB 与 STAT3 并未形成复合物,但它们作用于相同的启动子区域,对共同调控的基因具有协同作用^[6]。

基于上述发现,有学者提出抑制 NF-κB 或 STAT3 的活化可作为防止炎症向肿瘤发展的靶点^[14],如即使在炎症环境下,抑制 STAT3 的活化,NF-κB 相关的抗肿瘤免疫应答将会增强,从而阻断炎症向肿瘤发展^[15,16]。但是,研究还表明完全抑制 NF-κB 或 STAT3 通路将对正常细胞或组织产生副作用^[17,18],如 T 细胞将失去 IL-6 等细胞因子诱导的增

殖能力。因此,打破 NF-κB 和 STAT3 的相互作用是阻断肿瘤形成的重要策略。本实验中,应用 FRET 和免疫共沉淀技术检测发现,经 LPS 刺激后,NF-κB 和 STAT3 的相互作用增强,用乐胃饮加味方干预后,NF-κB 和 STAT3 的相互作用明显减弱,表明乐胃饮加味方可能通过阻断 NF-κB 和 STAT3 蛋白间的交互作用,达到治疗 PLGC,预防胃癌生成的目的。

参 考 文 献

- [1] Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13): 2005–2013.
- [2] Rasch S, Algül H. A clinical perspective on the role of chronic inflammation in gastrointestinal cancer [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2014, 7: 261–272.
- [3] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 715–723.
- [4] De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-α synergistically activate STAT3 and NF-κB to promote colorectal cancer cell growth [J]. *Oncogene*, 2015, 34(27): 3493–3503.
- [5] Li S, Pinard M, Wang Y, et al. Crosstalk between the TNF and IGF pathways enhances NF-κB activation and signaling in cancer cells [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2015, 25(5): 253–261.
- [6] Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 11–19.
- [7] 朱君华,徐珊.乐胃饮治疗慢性萎缩性胃炎临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(8): 526–527.
- [8] Garwain O, Scarlata S. Phospholipase Cβ-TRAX association is required for PC12 cell differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(44): 22970–22976.
- [9] Foltman M, Sanchez-Díaz A. Studying protein-protein interactions in budding yeast using co-immunoprecipitation [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1369: 239–256.
- [10] Karin M. Nuclear factor-κB in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 431–436.
- [11] Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5): 392–401.
- [12] Lee H, Herrmann A, Deng JH, et al. Persistently

- activated STAT3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(4): 283–293.
- [13] Yang J, Liao X, Agarwal MK, et al. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(11): 1396–1408.
- [14] Lu J, Zhang L, Chen X, et al. SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF-κB to repress the gastric cancer growth [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 5050–5058.
- [15] Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, et al. gp130-mediated STAT3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2): 91–102.
- [16] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Inhibiting STAT3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity [J]. *Nat Med*, 2005, 11(12): 1314–1321.
- [17] Milner JD, Brechley JM, Laurence A, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome [J]. *Nature*, 2008, 452(7188): 773–776.
- [18] Al Khatib S, Keles S, Garcia-Lloret M, et al. Defects along the T(H)17 differentiation pathway underlie genetically distinct forms of the hyper IgE syndrome [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(2): 342–348.

(收稿:2015-06-01 修回:2016-11-20)

欢迎订阅 2017 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2016 年连续 13 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:25.00 元/期。全年定价:300.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。