

SIPAR和 STAT3 相互作用 并对其信号通路进行负调控*

宁红秀 戎 煜 张原江 任芳丽 常智杰**

(清华大学生物科学与技术系, 清华大学生命科学与医学研究院, 北京 100084)

摘要 STAT3 对细胞的生长、存活、增殖以及机体的发育都具有重要的作用. *STAT3* 基因的失活可以引起多种疾病, 而 *STAT3* 基因的过度激活又可以引发很多癌症. 为了对 *STAT3* 信号通路的调控做进一步的研究, 采用酵母双杂交的方法, 以 *STAT3* 蛋白全长作为诱饵蛋白, 筛选了小鼠 7 天的胚胎文库. 得到了与 *STAT3* 相互作用的一个功能未知的蛋白质, 将其命名为 SIPAR (Stat3 interacting protein as a repressor). 免疫染色的实验结果表明, SIPAR 是一种在核内分布为主, 细胞质中也有少许分布的蛋白质. 荧光酶活性测定结果表明 SIPAR 对 *STAT3* 的转录活性具有抑制作用. 斑马鱼注射实验说明 *SIPAR* 基因表达严重影响了斑马鱼的正常发育.

关键词 STAT3, SIPAR, 蛋白质相互作用, 基因调控

学科分类号 Q7

STAT (signal transducer and activator of transcription) 为一类存在于胞浆中的信号转导和转录激活因子, 共有 7 个成员, 分别为 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6^[1,2]. 在 STAT 蛋白家族中, STAT3 在细胞的生长、存活、增殖和分化中都起着非常重要的作用^[3]. 还有研究表明, STAT3 对于在免疫系统中处于核心地位的树突状细胞的成熟和分化具有重要的调节作用^[4-6]. STAT3 能被多种细胞因子、生长因子和激素所激活^[3,7], 这就决定了 STAT3 在整个机体中的重要性. 有研究表明, 将 *STAT3* 基因敲除, 可引起小鼠在胚胎期致死^[8], 甚至胚胎干细胞中 *STAT3* 基因的失活也可以引起干细胞的死亡^[9,10]. 而针对不同组织的特异性 *STAT3* 基因敲除, 又分别显示出了 STAT3 在不同组织中的重要作用^[11]. *STAT3* 基因的失活可以在机体中引起很多症状^[11], 但是 STAT3 的持续激活又可以引发很多癌症和肿瘤^[12]. 胆囊腺癌^[13]、乳腺癌^[14]、头颈癌^[15]、前列腺癌^[16]、黑色素瘤^[17,18]、淋巴瘤^[19]以及多种白血病细胞^[20,21]中 STAT3 都是过度激活的.

关于 STAT3 信号通路的调控, 尽管有不少的研究报道, 但是到目前为止还有很多问题不是非常清楚. 为了进一步研究 STAT3 信号通路的调节机制, 我们以 *STAT3* 蛋白全长为诱饵蛋白, 筛选了 7 日龄小鼠胚胎文库, 得到与 *STAT3* 相互作用的蛋白 SIPAR. 本文用荧光酶报告系统和模式动物斑马鱼发育实验, 研究了 SIPAR (Stat3 interacting

protein as a repressor) 对 *STAT3* 信号通路的作用, 结果表明, SIPAR 对 *STAT3* 信号通路具有负调控作用. 过量表达 SIPAR 后, 斑马鱼的正常发育受到了严重的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

酵母双杂交系统菌株 AH109、载体 pGBKT7 和 pACT2 以及 7 日龄的小鼠胚胎文库购自 Clontech 公司, 人胚肾细胞系 HEK-293T 和人宫颈癌 HeLa 细胞为本实验室储存, 真核表达载体 pCMV-Myc 及大肠杆菌菌株 DH5 α 为本实验室所有, 载体 pXT7 和注射用斑马鱼胚胎为孟安明教授实验室提供, 培养细胞所用 DMEM 培养基及 NCS 血清购自 Gibco 公司, 转染试剂 TfxTM-20、测定荧光酶活性的细胞裂解液以及荧光酶底物购自 Promega 公司, c-Myc 单克隆抗体购自 SANTA 公司, 蛋白质印迹显色底物 ECF 购自 Pharmacia 公司, 体外转录试剂盒购自 Roche 公司, 限制性内切酶和连接酶购自 NEB 公司, 其他试剂为国产分析纯试剂.

*国家自然科学基金资助项目(39970369, 30070703) 和清华大学 985 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62785076, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2004-09-03, 接受日期: 2004-10-14

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建.用 PCR 方法得到 STAT3 cDNA, 用 *Sal* I 酶消化后, 将其连入预先用 *Sal* I 酶处理过的载体 pGBKT7, 得到酵母双杂交的诱饵质粒 pGBKT7/STAT3, 其中设计 PCR 引物时保证了 STAT3 阅读框架不变. 所用引物: 上游为 5' GCTAGTCGACGGATGGCCCAATGGAATC 3', 下游为 5' GCTAGT CGACTTCACATGGGGGAGG TAG 3'. 用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 将 SIPAR cDNA 从文库载体 pACT2 中切出 (从酵母双杂交文库筛选所得到的 pACT2/SIPAR 质粒中含有的 SIPAR cDNA, 包含了全部 SIPAR 的开放阅读框 (ORF) 和终止密码子后约 800 bp 的 3' 端序列), 用 T4 连接酶连接插入真核表达载体 pCMV-Myc 中, 得到重组质粒 pCMV-Myc/SIPAR, 所用酶切位点正好保证 SIPAR 与载体中 c-Myc 标签阅读框架一致. 以 pCMV-Myc/SIPAR 质粒为模板, 用 PCR 的方法扩增得到 SIPAR 基因的 cDNA, 而后用 *Eco*R I 和 *Xho* I 消化连入载体 pXT7, 得到用于转录 mRNA 的重组质粒 pXT7/SIPAR. 所用引物: 上游为 5' TATAGAATTCATGAAGGCTGGGAGAG GGACC 3', 下游为 5' ACCGCTCGAGCTATG GCATCAGAGACTTGCTAATC 3'. 反应条件为: 95°C 15 min; 94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min.

1.2.2 酵母双杂交筛选实验.将 pGBKT7/STAT3 质粒转化到酵母菌株 AH109 中, 在缺失 TRP 的培养基上得到表达 STAT3 的转化酵母, 然后再将 7 日龄的小鼠胚胎文库质粒转化. 在加有 3+AT 的三缺培养基 (-Trp, -Leu, -His) 上筛选阳性克隆. 整个操作按 ClonTech 手册进行. 所得阳性克隆测序后在 GenBank Blast 查询. 新基因 SIPAR 在 GenBank 登录号为 AY714985.

1.2.3 STAT3 和 SIPAR 相互作用的定性检测.将要测试的菌株转接到新的选择性 SD 培养基平板中, 30°C 培养箱中培养 2~4 天. 将无菌 Whatman 滤纸覆盖到平板表面, 沾取部分待测菌株, 用注射器在滤纸上打 3 个不对称的孔, 以标志方向. 取出滤纸放入液氮中 1~2 min, 再放置于室温融化, 如此反复冻融 3 次. 为每一个要测试的平板准备好一张无菌的 Whatman 滤纸, 置于 100 mm 无菌平板中用 1~2 ml Z 缓冲液/X-gal 浸泡. 小心地将带有菌株的滤纸放到预浸泡的滤纸上, 有菌株一面向上, 注意两层滤纸中间不要有气泡. 将平板放到 30°C 培养箱

中, 观察其是否变蓝.

1.2.4 STAT3 和 SIPAR 相互作用的定量检测.将 SD 平板上的酵母菌落接种于 5 ml SD (-Leu/-Trp/-His) 液体培养基中, 过夜培养. 用微型振荡器将过夜培养物混匀, 取部分接种于 3 ml 的 YPD 培养基中, 使 $A_{600} = 0.2 \sim 0.3$. 在 30°C 的摇床中培养 3~5 h (250~300 r/min), 使酵母菌长到对数中期 ($A_{600} = 0.5 \sim 0.8$). 取 1.5 ml 培养物置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 13 200 r/min 离心 30 s. 小心倒掉上清液, 加入 1.5 ml Z 缓冲液振荡混匀. 再次离心后倒掉上清液, 将沉淀重悬于 300 μ l 的 Z 缓冲液中. 取出 0.1 ml 的混悬液于另一新的 Eppendorf 管中, 置液氮中, 酵母菌充分冷冻 (0.5~1 min) 后, 置于 37°C 水浴中融化. 如此重复 3 次. 用 Z 缓冲液设空白对照. 每管中加入 700 μ l Z 缓冲液 / β -ME (β -巯基乙醇). 而后迅速加入 160 μ l ONPG (邻硝基苯基 β -D- 半乳糖苷), 置于 30°C 水浴中. 当管中液体变黄后, 加入 0.4 ml 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 同时记录所用的时间. 200 r/min 离心 5 min. 根据空白对照测定上清液的 A_{420} , 计算 β - 半乳糖苷酶活性.

1.2.5 蛋白质印迹.利用脂质体 TfxTM-20 将 pCMV-Myc/SIPAR 重组质粒转染至 HEK-293T 细胞, 同时转染空载体 pCMV-Myc 作为阴性对照. 培养 48 h 后将细胞收获, 用细胞裂解液裂解后, 进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 而后转移至硝酸纤维素膜, 使用 c-Myc 单克隆抗体进行蛋白质印迹. 最后用 Pharmacia 公司的 PhosphorImager 检测系统进行蛋白质印迹结果检测.

1.2.6 免疫荧光染色.将 pCMV-Myc/SIPAR 重组质粒转染至 HeLa 细胞, 培养 48 h 后, 按以下方法进行染色: 弃培养基, 用 PBS 洗去残留的培养基, 在室温用 3.7% 的甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 $\times$ 10 min, 0.5% Triton X-100 透化 5 min, PBS 洗涤 3 $\times$ 10 min, 10% 正常羊血清室温封闭 1 h, 加入适当量的 c-Myc 单克隆抗体室温孵育 1.5 h, PBST (0.05% Tween-20) 洗涤 3 $\times$ 10 min, 加入适当量 TRITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体室温孵育 1.5 h, PBST (0.05% Tween-20) 洗涤 3 $\times$ 10 min, 共聚焦显微镜观察、照相.

1.2.7 荧光素酶活性测定.用重组质粒 pCMV-Myc/SIPAR 及 STAT3 荧光素酶报告质粒 pGL2-M67sie 共同转染 HEK-293T 细胞, 用质粒 pCMV-Myc 作为阴性对照. 同时转染 pcDNA6/LIF 质粒, 以表达 STAT3 上游因子 LIF^[22]. 培养 48 h 后

将细胞裂解进行荧光素酶活性测定, 结果用内对照校正, 用任意单位表示, 参见文献[23].

1.2.7 斑马鱼注射实验.以线形化的 pXT7/SIPAR 和 pXT7/GFP 为模板, 用 Roche 公司转录试剂盒转录 mRNA, 方法严格按转录试剂盒说明手册进行. 用 100 mg/L mRNA 显微注射斑马鱼胚胎 (胚胎单细胞期), 24 h 后, 在倒置显微镜下观察其发育情况, 并拍照. 每组各注射 100 枚, 实验独立重复 2 次.

2 实验结果

2.1 STAT3 和 SIPAR 相互作用的定性分析

用 STAT3 蛋白全长做诱饵蛋白, 筛选 7.5 日龄小鼠胚胎文库后, 得到和 STAT3 相互作用的阳性克隆. 测序结果表明其中一个为功能未知的基因, 我们将其命名为 SIPAR (Stat3 interacting protein as a repressor), GenBank 登记号为 AY714985. 该基因编码的蛋白质 SIPAR 有 259 个氨基酸. 为了进一步验证 SIPAR 和 STAT3 之间的相互作用, 将 STAT3 和 SIPAR 的质粒回转到酵母菌株中, 对其相互作用进行定性检测. 通过对 β -半乳糖苷酶活性的显色反应检测, 发现将诱饵蛋白 STAT3 和文库空载体质粒共同转化酵母菌株时, 几乎检测不到 β -半乳糖苷酶的活性, 而当用 STAT3 和 SIPAR 的质粒共同转化酵母菌株时则表现出很强的 β -半乳糖苷酶的活性 (图 1), 表明 STAT3 和 SIPAR 有强的相互作用.

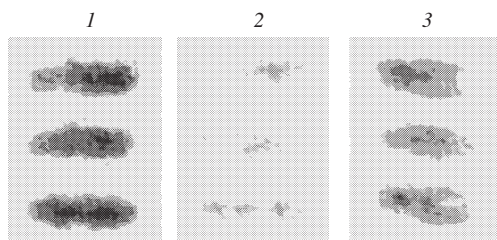


Fig.1 Colony-lift filter assay for the interaction of SIPAR and STAT3

pGBKT7/STAT3 and pACT2/SIPAR were co-transformed into yeast AH109. After culturing for 36 h, the colonies were transferred to Whatman filter and assayed for b-Gal activities. The color changes were observed within 3 h. 1: positive control; 2: pGBKT7/STAT3+pACT2; 3: pGBKT7/STAT3+pACT2/SIPAR.

2.2 STAT3 和 SIPAR 相互作用的定量分析

为了研究 SIPAR 与 STAT3 相互作用的强弱, 采用了 β -半乳糖苷酶活性定量测定实验. 把实验结果的数值以阳性对照组为 100% 表示, 每次实验进

行 3 次独立重复, 结果表明 (图 2), STAT3 和 SIPAR 之间的作用可以达到约 50%, 而阴性对照则几乎检测不到 β -半乳糖苷酶的活性. 这个结果和定性测定的结果相一致, 说明 STAT3 和 SIPAR 之间具有强的相互作用.

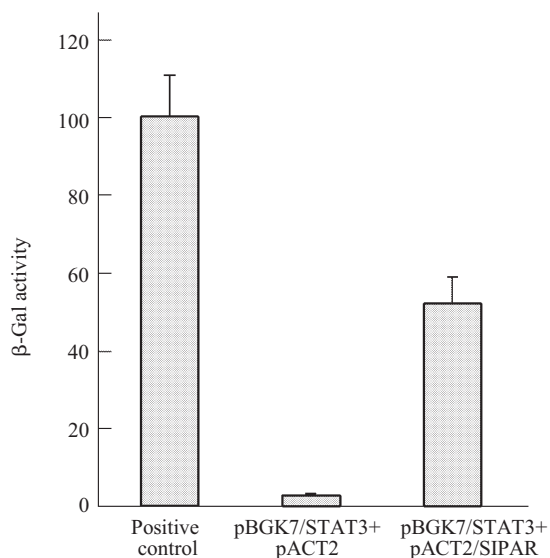


Fig.2 The liquid assay of interaction between SIPAR and STAT3

pGBKT7/STAT3 and pACT2/SIPAR were co-transformed into yeast AH109. The positive clones were inoculated into YPD liquid medium.

After culturing, the β -Gal activities were assayed.

2.3 SIPAR 在哺乳动物细胞中的表达及在细胞中的定位

为了检测 SIPAR 在哺乳动物细胞中表达情况, 构建了带有 Myc 标签的融合蛋白真核表达质粒 pCMV-Myc/SIPAR. 将构建好的重组表达质粒 pCMV-Myc/SIPAR 和空载体质粒 pCMV-Myc 分别转染到 HEK293T 细胞中, 用蛋白质印迹检测. 结果表明 (图 3a), 所克隆 SIPAR 基因在哺乳动物细胞中能够表达, 在预期大小 28 ku 处有明显的表达条带. 但有意思的是, 在 28 ku 上方约 35 ku 附近, 我们检测到了一条更为明显的条带. 这条带是否是蛋白质翻译后某种修饰所造成的, 则有待研究.

为了检测 SIPAR 在细胞中的定位, 以利于对其进行功能研究, 我们将重组表达质粒 pCMV-Myc/SIPAR 转染到 HeLa 细胞中进行表达, 而后进行免疫染色分析. 实验结果表明, SIPAR 主要定位在细胞核中, 而在胞质中只有少量分布 (图 3b), 这提示 SIPAR 可能主要在细胞核中发挥作用.

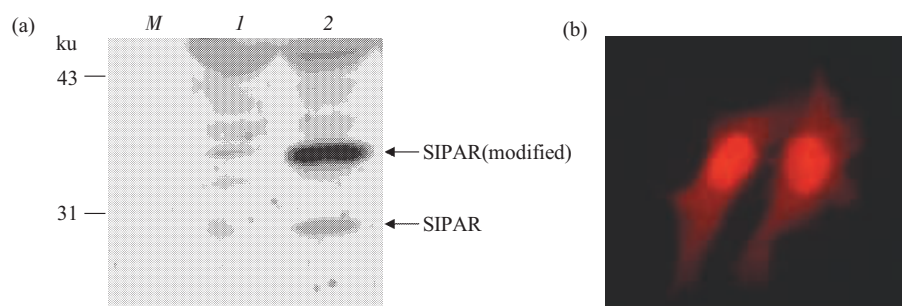


Fig.3 The expression of SIPAR protein in mammalian cells

(a) Western blot of the c-Myc-SIPAR protein expressed in mammalian cells. HEK-293T cells were transfected with pCMV-Myc/SIPAR or pCMV-Myc vector. After 48 h culturing, the cells were lysed and subjected to SDS-PAGE for Western blot using anti-c-Myc antibody. (b) Immunostaining assay. HeLa cells were transfected with pCMV-Myc/SIPAR. After 48 h culturing, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde and immunostained with anti-c-Myc antibody and TRITC conjugated goat IgG. The results were documented with confocal microscopy.

2.4 SIPAR 对 STAT3 信号通路的抑制

STAT3 信号通路可以被 IL-6 家族的 LIF 因子所激活. STAT3 被 LIF 因子激活后便可以与其特异性的 DNA 元件相结合引起下游基因的转录^[23]. 为了鉴定 SIPAR 与 STAT3 相互作用的生物学意义, 进行了特异性响应 STAT3 激活的荧光素酶报告实验. 通过瞬时转染的方法, 将重组质粒

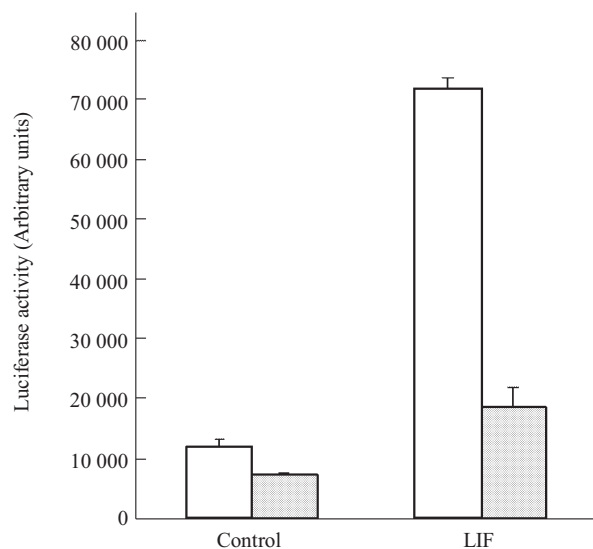


Fig.4 SIPAR inhibited STAT3 transcriptional activities

HEK-293 T cells were all transfected with STAT3 luciferase reporter plasmids pGL2-M67sie. pCMV-Myc/SIPAR and pcDNA3/LIF were transfected as indicated. pCMV-Myc and pcDNA6 were transfected as negative controls. After 48 h culturing, the cells were lysed and luciferase activities were assayed according to the Promega's protocol. The results were normalized with internal control and expressed as $\bar{x} \pm s$ from three independent repeats. □: -SIPAR; ▨: +SIPAR.

pCMV-Myc/SIPAR 及 STAT3 荧光素酶报告系统质粒 pGL2/M67sie 转染至 HEK-293T 细胞, 同时转染表达 LIF 的重组质粒 pcDNA3/LIF, 并用空质粒 pCMV-Myc 和 pcDNA3 分别作为阴性对照. 将转染细胞培养 48 h 后, 对其荧光素酶活性进行测定, 测定结果见图 4. 由图 4 中可以看出, 当未转染表达 LIF 的重组质粒时, 荧光素酶活性保持在基础水平, STAT3 的转录活性未被激活. 当转染重组质粒 pcDNA3/LIF 时, 荧光素酶活性提高了近 8 倍, STAT3 的转录活性被强烈激活 (比较图 4 两个空心柱). 而当共转染 pCMV-Myc/SIPAR 时, STAT3 的转录活性被强烈抑制 (比较图 4 右侧一空一实柱形). 有意思的是, 即使在没有 LIF 因子激活的情况下 (图 4 左), SIPAR 对 STAT3 的基础转录活性也有抑制作用, 这可能是 SIPAR 抑制内源性 STAT3 激活的原因. 总之, 这一实验结果表明, SIPAR 对 STAT3 的信号通路具有负调控作用.

2.5 SIPAR 的表达对斑马鱼发育的影响

斑马鱼为一种很好的模式生物, 具有繁殖快、生长周期短、易饲养、易于操作、通体透明、易观察等特点. 2002 年, Yamashita 等^[24]报道, STAT3 在斑马鱼发育过程中具有控制细胞迁移的作用. 在斑马鱼胚胎发育中如果注射 STAT3 反义链的 morpholino 对 STAT3 信号通路进行抑制, 则导致斑马鱼前后轴缩短. 基于荧光素酶活性测定结果, 为了进一步检测 SIPAR 对 STAT3 信号通路抑制作用的生物学意义, 我们进行了斑马鱼注射实验. 我们将 SIPAR mRNA 注射斑马鱼, 让其在斑马鱼体

内过量表达, 观察斑马鱼发育的情况. 实验结果表明 (图 5), 注射 *SIPAR* mRNA 24 h 后, 斑马鱼出现了明显的体轴缩短的发育现象, 畸形率达到 50% 以上($n=100$), 而对照组 (注射 GFP mRNA) 则没有

类似的发育异常现象. 这一结果表明, *SIPAR* 可以抑制斑马鱼体轴发育, 与注射抑制 *STAT3* morpholino 的现象相吻合, 从而暗示 *SIPAR* 在体内对 *STAT3* 信号通路具有抑制作用.

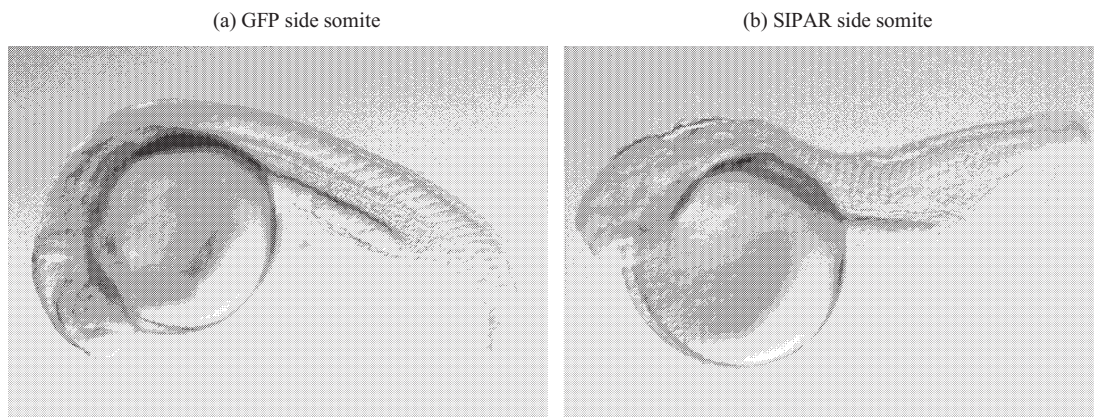


Fig.5 SIPAR affected the zebrafish development

SIPAR mRNA was microinjected into zebrafish fertilized eggs, comparing to GFP RNA as a negative control. About one hundred zebrafish eggs were injected. After 24 h culturing, the zebrafish embryos were observed with microscopy. The zebrafish embryos injected with *SIPAR* mRNA showed shortened anterior-posterior axis with the ratio of about 50% (b). But the controlled embryos injected with GFP mRNA just showed less than 10% abnormal development with different abnormal phenotype (a). This abnormal phenotypes resulted from *SIPAR* mRNA injection is in line with that from injection of *STAT3* antisense morpholino^[24].

3 讨 论

酵母双杂交系统^[25]已经是一种研究蛋白质相互作用的经典技术, 该技术在细胞信号传导、细胞周期调控、基因转录和翻译调控等研究中得到了广泛应用. 本文利用酵母双杂交技术, 以 *STAT3* 为诱饵蛋白, 成功筛选出了能与 *STAT3* 相互作用的功能未知蛋白质. 由于本研究发现该蛋白质与 *STAT3* 结合并抑制其活性, 故将其命名为 *SIPAR* (*Stat3* interacting protein as a repressor).

STAT3 作为信号转导和转录激活因子, 能将细胞外的信号转导到细胞核内, 并启动下游基因的转录, 因此在生物体中具有不可替代的作用. 有关 *STAT3* 信号通路的调节尽管有很多的研究报道^[26], 与 *STAT3* 相互作用的蛋白质也有许多报道, 然而, *STAT3* 在体内的广泛作用, 使我们相信有更多的蛋白质参与了 *STAT3* 的活性调节. 本文发现的 *SIPAR* 蛋白可能是众多与 *STAT3* 相互作用的蛋白质之一. 由于过量表达 *SIPAR* 能明显抑制 *STAT3* 的转录活性, 而且在斑马鱼发育中过量注射表达 *SIPAR* 导致了与阻止 *STAT3* 相一致的体轴发育异

常的现象, 说明了 *SIPAR* 能够抑制 *STAT3* 活性, 在生物体发育中起到重要作用.

STAT3 激活后在细胞核中以转录因子的形式启动下游基因转录. 有意思的是, *SIPAR* 也主要在细胞核中表达. 我们推测, *SIPAR* 可能在细胞核中与 *STAT3* 结合, 从而影响 *STAT3* 的转录活性. 但 *SIPAR* 如何与 *STAT3* 结合后影响其转录活性的机理有待深入探讨.

分析表明, *SIPAR* 是一个 259 个氨基酸的小蛋白质, 分子质量估计为 28 ku. 利用 Myc 融合蛋白表达实验, 检测到了约 28 ku 的表达蛋白. 这证明了我们所克隆的 *SIPAR* 基因表达的正确性. 然而, 有趣的是, 我们观察到了一条特异的较大的蛋白质, 分析这可能是 *SIPAR* 受某种细胞内蛋白质修饰机制作用的结果. 通过使用一些软件预测分析, 我们分析这种修饰可能为一种 O-糖基化的修饰 (结果未列出). 至于 *SIPAR* 如何被修饰, 修饰后对其功能是否有影响, 则有待我们继续研究.

实验结果初步表明 *SIPAR* 可以抑制 *STAT3* 信号通路, 对 *STAT3* 信号通路具有负调控作用. 目前, 正在进行一些其他功能实验, 以进一步了解

SIPAR对 STAT3 信号通路的调节作用以及作用机理, 以便对 STAT3 信号通路的调节有更进一步的了解. 另外, STAT3 的持续激活引起很多癌症和肿瘤的发生, SIPAR 作为对 STAT3 信号通路具有负调控作用的蛋白质被发现, 可以为 STAT3 的致病机理以及治疗提供一些线索.

致谢 感谢本系孟安明教授提供斑马鱼, 感谢张丽霞同学和黄慧哲同学帮助注射斑马鱼, 感谢傅新元教授审阅论文.

参 考 文 献

- Copeland N G, Gilbert D J, Schindler C, *et al.* Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*, 1995, **29** (1): 225~228
- Levy D E, Darnell J E Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3** (9): 651~662
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 2000, **19** (21): 2548~2556
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 2004, **10** (1): 48~54
- Cheng F, Wang H W, Cuenca A, *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, 2003, **19** (3): 425~436
- Welte T, Zhang S S, Wang T, *et al.* STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (4): 1879~1884
- Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, **11** (3): 199~207
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (8): 3801~3804
- Raz R, Lee C K, Cannizzaro L A, *et al.* Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (6): 2846~2851
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J*, 1999, **18** (15): 4261~4269
- Levy D E, Lee C K. What does Stat3 do?. *J Clin Invest*, 2002, **109** (9): 1143~1148
- Bromberg J F, Wrzeszczynska M H, Devgan G, *et al.* Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999, **98** (3): 295~303
- Murakami Y, Nakano S, Niho Y, *et al.* Constitutive activation of Jak-2 and Tyk-2 in a v-Src-transformed human gallbladder adenocarcinoma cell line. *J Cell Physiol*, 1998, **175** (2): 220~228
- Smith P D, Crompton M R. Expression of v-src in mammary epithelial cells induces transcription via STAT3. *Biochem J*, 1998, **331** (Pt 2): 381~385
- Grandis J R, Drenning S D, Chakraborty A, *et al.* Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *in vitro*. *J Clin Invest*, 1998, **102** (7): 1385~1392
- Mora L B, Buettner R, Seigne J, *et al.* Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2002, **62** (22): 6659~6666
- Niu G, Bowman T, Huang M, *et al.* Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 2002, **21** (46): 7001~7010
- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, *et al.* Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res*, 1999, **59** (20): 5059~5063
- Migone T S, Lin J X, Cereseto A, *et al.* Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 1995, **269** (5220): 79~81
- Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, *et al.* STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*, 1996, **87** (5): 1692~1697
- Weber-Nordt R M, Egen C, Wehinger J, *et al.* Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 1996, **88** (3): 809~816
- Ning H X, Chen Y, Rong Y, *et al.* Cloning, eukaryotic expression and function assay of recombinant leukemia inhibitory factor gene LIF. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2003, **35** (12): 1123~1127
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, *et al.* STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, 1999, **189** (1): 63~73
- Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, *et al.* Stat3 controls cell movements during zebrafish gastrulation. *Dev Cell*, 2002, **2** (3): 363~375
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **340** (6230): 245~246
- Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 2000, **19** (21): 2638~2644

SIPAR Interacts with STAT3 and Negatively Regulates Its Activities*

NING Hong-Xiu, RONG Yu, ZHANG Yuan-Jiang, REN Fang-Li, CHANG Zhi-Jie**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Institute of Biomedicine of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract STAT3 plays very important roles in cell survive, proliferation, differentiation, and transformation. Constitutively activated STAT3 was found in many cancers and tumors, including melanoma, breast cancer, head and neck cancer. In order to reveal the mechanisms of STAT3 signaling regulation, a yeast two hybrid screening using STAT3 as bait was performed in the 7days mouse cDNA library. Among the positive clones, a novel protein with 259 amino acids, named SIPAR (STAT3 interacting protein as a repressor) with a GenBank accession number AY714985, was isolated to interact with STAT3. The interaction between STAT3 and SIPAR was analyzed using yeast two hybrid experiments and the functions of the interaction in STAT3 activities as a major signaling transducer was studied. The data from β -Gal activity colony-lift filter assay and liquid assay showed that SIPAR had a strong interaction with STAT3. The Western blot experiment showed SIPAR was expressed as a 28 ku protein and a larger protein and mainly located in nucleus in mammalian cells. In order to investigate the function of SIPAR on STAT3 signal pathway, STAT3 luciferase reporter system and SIPAR expression plasmids were co-transfected into mammalian cells. The data demonstrated that when SIPAR was overexpressed, STAT3 transcription activity was inhibited dramatically. Finally, the effect of SIPAR on development was investigated in zebrafish. When SIPAR mRNA was injected, the zebrafish development was affected seriously with shortened body axis, which was in agreement with the experiment of inhibition of STAT3. The data suggested that SIPAR was a novel negative regulator on STAT3 activities.

Key words SIPAR, STAT3, protein interaction, gene regulation

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39970369, 30070703) and 985 Program of Tsinghua University.

**Corresponding author . Tel: 86-10-62785076, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

Received: September 3, 2004 Accepted: October 14, 2004