

转录因子类癌基因——Stat3*

王凤阳 常智杰**

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 信号传导与转录激活因子家族 (signal transduction and activators of transcription, STATs) 的成员之一——Stat3, 被胞外细胞因子、生长因子等多肽类配体激活, 在胚胎的早期发育, 皮肤重建, 免疫反应等生理过程中发挥重要作用。近几年的研究发现, Stat3 在各种肿瘤细胞中持续激活, 持续激活的 Stat3 能促使细胞的恶性转化并阻断凋亡。Stat3 作为转录因子类癌基因作用机理的研究, 为肿瘤形成机理的阐释及某些肿瘤的治疗药物筛选工作奠定了坚实的基础。

关键词 Stat3, 转录因子, 癌基因, 肿瘤

学科分类号 R730.2

信号传导与转录激活因子家族 (signal transduction and activators of transcription, STATs) 是一类由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子。最初作为 γ 干扰素 (interferon γ , IFN γ) 调控下基因表达的 DNA 结合蛋白而被克隆。迄今已经发现了由其不同 RNA 转录元件剪接形成的, 分别含有 750~850 个氨基酸, 大小为 90~115 ku, 位于 3 个不同染色体区域的 7 个家族成员^[1,2]。配体依赖的 STAT 信号途径的激活, 常常和细胞的分化与生长抑制紧密相关, 而 STAT 分子的持续激活 (即没有已知的对于胞外多肽的要求) 常常伴随着生长失调^[3]。近几年的研究表明, 诸多的肿瘤细胞系与人的癌变组织存在着持续激活的 STAT 蛋白, 其中以 Stat3 尤为活跃, 本文重点介绍转录因子 Stat3 促进细胞恶性转化的有关研究进展。

1 STAT3 的结构及其生物学功能

Stat3 是作为 IL-6 激活的转录因子, 或作为 Stat1 的同源物被克隆的, 其结构见图 1。包括 7 个主要部分: a. 位于第 600~700 位氨基酸之间的 Src 2 型同源物 (Src-homology 2, SH2) 区的主要功能是促使 Stat3 分子与活化的受体形成复合物, 介导 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)-STAT 间的相互作用, 使 Stat3 形成二聚体, 移入细胞核, 结合 DNA, 导致特定靶基因的开启; b. 位于第 500~600 位氨基酸之间的 SH3 区, 保守性较差, 功能尚不清楚; c. 位于羧基端第 705 位的酪氨酸磷酸化位点, 当该位点磷酸化后, Stat3 呈活化状态, 通过 SH2 区的作用导致 Stat3 二聚体的形成, 转核

并结合 DNA, 激活靶基因的转录; d. DNA 结合区, 位于高度保守的第 400~500 位氨基酸之间, Stat3 的最佳结合序列为 TTCC (G/C) GGAA; e. 保守性较差的羧基端, 该区域两种不同的剪接方式分别形成了 Stat3 α 和 Stat3 β , 该区域含有转录激活区 (transactivation domain, TAD), 和转录激活有关; f. 位于 727 位的丝氨酸磷酸化位点, 可能由有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 磷酸化, 激活 Stat3, 使 STAT 途径和 Ras 途径发生联系; g. 保守的氨基端序列, 为 Stat3 和其他转录因子之间的作用, Stat3 二聚体的形成以及和细胞因子受体间的结合等功能所必需^[4~6]。

两个 Stat3 单体在 SH2 区相接触形成二聚体, 在 Stat3 单体的 705 位磷酸化的酪氨酸与另一个 Stat3 单体分子的 SH2 区 608 位的精氨酸结合, 生成同源二聚体 (Stat3 还可以同样的方式和 Stat1 形成异源二聚体), 移入细胞核, 识别特异的 DNA 序列, 激活靶基因的转录。酪氨酸去磷酸化后, 作用失活, 返回胞浆^[3]。

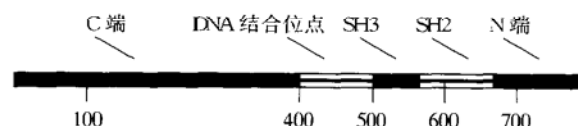


Fig 1 Structure of stat3 protein

图 1 stat3 分子的结构

* 国家自然科学基金资助项目 (39970369, 30070703)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62773626, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2001-10-23, 接受日期: 2001-11-28

通过小鼠 STATs 基因的敲除及其表型的分析, 在一定的程度上揭示了 STAT 家族分子的生理功能 (表 1)^[1]. 但我们必须认识到, 多达 40 余种的不同多肽配体能够激活一种或几种 Stat 分子的现象, 预示着 Stat 分子作为转录因子, 具有广泛的生物学功能, 存在于不同细胞类型的 7 种 Stat 分子, 结合于各自特异的启动子序列, 彼此协同或不协同, 最终通过复杂的作用机制, 使细胞和机体呈现一定的生物学功能.

Table 1 Results of targeted disruptions of mouse STAT genes

表 1 小鼠 STATs 基因敲除的表型

靶基因	表型
Stat1	对于病毒和细菌的感染没有先天性应答
Stat2	早期胚胎死亡
Stat3	早期胚胎死亡; 无原肠胚形成
Stat4	无 Th1 细胞功能
Stat5A	无乳腺发育和泌乳
Stat5B	无乳腺发育和泌乳
Stat6	无 Th2 细胞功能

Stat3 在胚胎早期发育的过程中具有重要作用^[7]. 组织特异性的基因敲除结果表明, Stat3 对于上皮细胞的凋亡, 后哺乳期乳腺的发育, 皮肤重建, 角质细胞迁移, 巨噬细胞失活与 Th 细胞反应中的炎症因子下调等都具有重要的调控作用^[1].

2 Stat3 转录因子类癌基因

癌基因包括存在于逆转录病毒基因组中可使被感染动物细胞癌变的病毒癌基因 (*v-Onc*) 和存在于所有动物细胞基因组中和 *v-Onc* 具有相似结构和功能的细胞癌基因 (*c-Onc*). 细胞癌基因在正常情况下不引起癌变, 并在个体发育的某一阶段, 对维持细胞的正常功能, 调节生长和分化负有重要使命. 当癌基因在不恰当的时间和空间被激活后, 依赖其表达产物 (通常称为转化蛋白), 通过不同的途径和方式, 改变了细胞的生长和分化程序, 以渐进的方式最终诱变了细胞的癌性转化. 癌基因有多种分类方法, 根据癌基因蛋白产物的功能, 可以分为生长因子类、生长因子受体类、G 蛋白信号传递类、胞浆激酶类、转录因子类等. 近年来, 转录因子类癌基因与肿瘤的关系日益受到人们的重视, 目前已经发现的转录因子类癌基因包括 *Myc*、*Myb*、*Maf*、*c-Jun*、*c-Fos* 等多种.

最近有关研究的大量表明, 在多种肿瘤细胞系及多种转化细胞系中, Stat3 持续激活, 激活的 Stat3 或为细胞转化所必需, 或增强转化, 或阻断凋亡.

为了探究 Stat3 持续激活在整个细胞转化过程中所充当的角色, Bromberg 等^[8] (1998 年) 根据已知的 Stat 分子的结构, 设计了 Stat3 的多种显性负向 (dominant negative) 突变体, 而这些突变体明显逆转了由 *Src* 导致的小鼠、大鼠成纤维细胞的转化. 这一结果表明, Stat3 持续激活是使整个细胞转化的重要一环. Kube 等^[9] (2001 年) 发现, 酪氨酸激酶抑制剂 AG490 阻断了在霍金奇细胞内 Stat3 的持续激活, 并抑制了细胞的自发性生长, 说明在该细胞系内, Stat3 的持续激活能够引起细胞的自发性生长, 和细胞的恶性转化之间存在着重要联系. Cong 等^[10] 将可以导致细胞 “锚定型生长” 的表皮生长因子 (epithelial growth factor, EGF) - Ros 嵌合受体 (ER2) 和持续激活的胰岛素样生长因子 I 型受体 (NM1) 转染 NIH3T3 细胞, 建立稳定细胞系, 由于 ER2 和 NM1 受体蛋白-酪氨酸激酶可以引起 Stat3 激活, 应用显性负向突变体引起的 ER2 细胞克隆形成的抑制, 说明 Stat3 激活对于转化过程的启动具有重要意义, 而同样方法导致的 NM1 细胞转化的逆转, 则说明 Stat3 激活对于转化的维持意义重大.

为了进一步澄清 Stat3 持续激活并促使细胞发生恶性转化作用机理的研究目的, Jacqueline 等^[3] (1999 年) 在 Stat3 二聚体蛋白已知晶体结构的基础上, 运用点突变技术, 在 Stat3 的特定区域引入二硫键形成位点, 使其能够在体内形成二聚体, 并利用该突变体对 Stat3 作为癌基因的有关特性进行了系统的分析. 首先, 将野生型 Stat3 第 661 位丙氨酸和第 663 位天冬酰胺都突变为胱氨酸, 形成 Stat3-C. Stat3-C 即使 705 位胱氨酸不磷酸化, 仍能够在其单体的 SH2 区的 C 端环之间形成二硫键, 生成二聚体. 将启动子序列内含有 Stat3 结合位点的荧光素酶报告基因, 分别和 Stat3-C 及野生型 Stat3 共转染靶细胞 293T、3Y1、NIH3T3 和 HepG2, Stat3-C 激活荧光素酶报告基因的转录比对照组高出 10 倍, 而野生型 Stat3 不激活转录. 在白介素-6 (interleukin 6, IL-6) 和 *v-Src* 存在的情况下, Stat3-C 和野生型 Stat3 激活荧光素酶报告基因转录的效果同时增加. 为了确定 Stat3-C 是否能够引起细胞转化, 将空载体 RcCMV 和 Stat3、

Stat3-C、*v-Src* 的表达质粒分别转染永生化成纤维细胞系 NIH3T3 和 3Y1, 进行软琼脂培养实验. 由 RcCMV 和野生型 Stat3 转染的细胞, 未出现转化克隆, 而 Stat3-C 和 *v-Src* 转染的细胞出现转化克隆. 但由 Stat3-C 得到的转化克隆数是由 *v-Src* 得到的转化克隆数的 1/10. 收集转化克隆的细胞, 进行蛋白质印迹 (Western blotting), 证实了转化细胞内 Stat3-C 蛋白的存在. 致瘤性是检测典型恶性转化细胞的一个最有力的生物学指标. 将来自 Stat3-C 转化克隆的细胞注入无胸腺裸鼠皮下, 2~4 周内, 出现明显肿瘤, 收集肿瘤细胞蛋白质提取物, 进行蛋白质印迹, 检测到了 Stat3-C 的高表达. 细胞核形态明显异常, 有丝分裂异常. 而注射未转化的 3Y1 细胞的裸鼠, 在 8 周的观察期内, 未出现肿瘤. 实验结果表明, 持续激活的 Stat3 会使细胞发生恶性转化而导致肿瘤.

如果说 Jacqueline 等的工作在 Stat3 促进细胞恶性转化的机理研究方面做出了可贵的探索, 那么 Catlett^[11] 的实验从持续激活的 Stat3 能够使肿瘤细胞凋亡受阻的另一方面, 揭示了持续激活的 Stat3 与肿瘤的关系. Catlett 等^[11] (1999 年) 发现, Stat3 的多种显性负向突变体能够使 U266 细胞系发生凋亡, 从而得出了肿瘤细胞系内持续激活的 Stat3 具有阻断凋亡的初步结论. Jenifer 等^[12] (2000 年) 将头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 细胞系-1843, 注射无胸腺裸鼠皮下, 肿瘤出现后, 将含有针对 Stat3 cDNA 设计的 215 个碱基的反义寡聚核糖核酸质粒, 经脂质体包裹, 肿瘤内注射, 2 d 后, 采集肿瘤组织进行检测. 电泳迁移率分析 (electrophoresis mobility assay, EMSA) 实验结果显示: 基因治疗组裸鼠肿瘤的 Stat3 活性明显降低, 并且和未注射 Stat3 反义基因的对照组相比, 基因治疗组的裸鼠肿瘤细胞凋亡作用明显升高. 这一结果进一步说明, 持续激活的 Stat3 具有阻断凋亡的作用.

通过 Stat3 持续激活和多种肿瘤及转化细胞系之间关系的研究, 目前, 已经在多种肿瘤及转化细胞系中发现了持续激活的 Stat3. Ni 等^[13] (2000 年) 和 Melinda 等^[14] (2000 年) 分别发现前列腺癌细胞内和卵巢癌细胞内的 Stat3 持续激活. 在由 *v-Src* 转化的 NIH3T3 细胞内^[10]、*v-Sis* 和 *v-Fps* 转化的成纤维细胞内^[10] 和 *Ras* 转化的人内脏上皮细胞发现 Stat3 持续激活^[15]. 另外, 脑瘤、乳腺癌、头颈癌等肿瘤细胞系中也发现了 Stat3 分子持续激活^[16~20].

3 STAT3 致癌的相关基因

广泛存在于多种细胞中的转录因子 Stat3, 是由包括诸如 IL-6、白血病抑制因子 (leukemia inhibitor factor, LIF) 和血小板生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 等利用 gp130 亚单位且具有酪氨酸激酶活性的细胞因子受体调控. 它可以和转录因子 *c-Jun* 结合, 并协同作用于大鼠 α -2-巨球蛋白的启动子序列, 使 α -2-巨球蛋白在 IL-6 作用下得到最高表达. 另外, 与其明显促细胞生长的作用相一致, Stat3 和生长信号的下游导致细胞分裂的几个基因有联系, 如 *c-Fos* 在其顺式作用元件含有 Stat3 结合序列, 而转录因子 II-1 (transfactor II-1, TF II-1) 可以直接结合 Stat3, 从而增强 *c-Fos* 的表达^[1].

位于质膜内表面的 *v-Src* 可以直接特异性地导致昆虫细胞 Stat3 的持续激活, 而在 NIH3T3 细胞, JAK1 和 PDGF 受体可以通过和 *v-Src* 的作用, 最大程度地使 Stat3 激活^[5]. Jacqueline 等^[3] (1999 年) 发现, 经 Stat3-C 转化的 3Y1 细胞内 *cyclinD1*, *Bcl-X_L* 和 *c-Myc* 的 RNA 水平比未经转化的 3Y1 细胞要高 3~5 倍. 随着细胞周期过程中各个时相转换而改变的 *cyclinD1* 表达水平的升高, 表明 Stat3 具有促进细胞转化的作用, 含有 *cyclinD1* 启动子序列的荧光素酶报告基因实验, 也证实了这一点; *c-Myc* 的表达水平升高, 也说明了细胞恶性转化的趋势; *Bcl-X_L* 表达水平的升高, 表明 Stat3 具有使细胞凋亡受阻的作用. Melinda 等^[14] (2000 年) 的研究结果也证实, 在卵巢癌细胞内, Stat3 持续激活, *cyclinD1* 和 *Bcl-X_L* 表达水平升高. 有关由 STAT3 调控, 其他的可能参与肿瘤形成靶基因的筛选研究正在进行中^[21].

4 结束语

由于在特定的细胞类型、不同时间、不同空间和 Stat3 有关的信号传导途径的复杂性, 以及肿瘤的发生、发展、是由多基因参与, 并经多步骤形成的复杂生理过程. 完整、清晰的展示转录因子类癌基因 Stat3 导致肿瘤的有关作用机理, 还有大量的工作要做. 但毋庸置疑, 随着对于 Stat3 作为癌基因作用机理研究的不断深入, 必将使肿瘤形成机理的阐释及某些肿瘤治疗药物的筛选工作揭开新篇章.

参 考 文 献

- 1 Curt M H. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *TIBS*, 2000, **25** (10): 496~ 502
- 2 Moitreyee C K, Follo V D A, George R S. Association of STATs with relatives and friends. *Trend Cell Biology*, 2000, **10** (3): 106 ~ 111
- 3 Jacqueline F B, Melissa H, Wrzeszczynska B, *et al.* Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999, **98** (8): 295~ 303
- 4 James N I. STATs: Signal transduction and activators of transcription. *Cell*, 1996, **84** (2): 331~ 334
- 5 James E, Darnell Jr. STATs and gene regulation. *Science*, 1997, **277** (12): 1630~ 1635
- 6 Yi Z, James T, Christin C, *et al.* Activation of Stat3 in v-src transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol Chem*, 2000, **275** (32): 24935~ 24944
- 7 Regina R, Chien K L, Linda A, *et al.* Essential role of Stat3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (3): 2486~ 2851
- 8 Bromberg J F, Horvath C M, Besser D, *et al.* Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (5): 2553~ 2558
- 9 Kube D, Holtick U, Vockerodt M, *et al.* Stat3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, 2001, **98** (3): 762~ 770
- 10 Cong S, Zong, Liyu Z, *et al.* Stat3 plays an important role in oncogenic ras and insulin-like growth factors I receptors induced anchorage independent growth. *J Biol Chem*, 1998, **273** (43): 28065~ 28072
- 11 Catlett F R, Landowski T H, Oshiro M M, *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 1999, **10** (1): 105~ 111
- 12 Jenifer R G, Stephenie D, Qing Z, *et al.* Constitutive activation of Stat3 signal abrogate apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (8): 4227~ 4232
- 13 Ni J, Lou W, Leman Z S, *et al.* Inhibition of constitute activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2000, **60** (5): 1225~ 1228
- 14 Melinda H, Carmen P, Kevin R, *et al.* Constitute activation of Stat3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 2000, **79** (1): 67~ 73
- 15 Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, *et al.* Stat3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transforming intestinal epithelial cells. *Int J Cancer*, 1998, **78** (3): 326~ 330
- 16 Garcia R, Yu C L, Hudnall A, *et al.* Constitute activation of Stat3 in fibroblasts transforming diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Diff*, 1996, **8** (12): 1267~ 1276
- 17 Rober S, Steimle C, Meinhardt G, *et al.* Stat3 is constitutively active in some patients with polythmia rubra vera. *Exp Hematol*, 2001, **29** (6): 694~ 702
- 18 Magrassi L, DeFraja C, Conti L, *et al.* Expression of the JAK and STAT superfamilies in human meningiomas. *J Neurosurg*, 1999, **91** (3): 440~ 446
- 19 Schaefer L K, Menter D G, Schaefer T S, *et al.* Activation of Stat3 and Stat1 DNA binding and transcription activity in human brain tumor cell lines by gp130 cytokines. *Cell signal*, 2000, **12** (3): 143~ 151
- 20 Turkson J, Jove R. Stat3 proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 2000, **19** (56): 6613~ 6626
- 21 Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 2000, **19** (21): 2474~ 2488

Transcription Factor Stat3 as an Oncogene*

WANG Feng-Yang, CHANG Zhi Jie**

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Stat3, one of the members of STATs (signal transduction and activators of transcription), activated by polypeptide ligand such as cytokin and growth factors, plays an important role in early embryonic development, epithelial cell apoptosis, skin remodeling and keratinocyte migration *et al.* The progress in study of Stat3 shows that Stat3 can be constantly activated in many kinds of tumor cell lines; constantly activated Stat3 can make cell malignant transformation happened and repress apoptosis. Study of Stat3 as an oncogene, sets an important basis for explanation of oncogenesis and screening the therapy medicine of many kinds of tumor.

Key words Stat3, transcription factor, oncogene, tumor

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (39970369, 30070703).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62773626, E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

Received: October 23, 2001 Accepted: November 28, 2001