



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 _____

U D C _____

密 级 _____

博士学位论文

**CypB/STAT3/MicroRNA-520d-5p
反馈环路促进胃癌增殖的研究**

李 钺

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(消化系病)

研 究 方 向 胃癌的多药耐药和早诊预警

指 导 教 师 樊代明 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院消化内科

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	7
中文摘要	9
ABSTRACT	14
前 言	23
文献回顾	25
1. Hp 通过炎症导致胃癌	25
1.1 胃癌和Hp 感染	25
1.2 Hp 的毒力	25
1.2.1 CagA 同胃癌发生的关系	25
1.2.2 VacA 同胃癌发生的关系	26
1.2.3 Hp 的其他因素同胃癌发生的关系	26
1.3 Hp 通过 IL-6 影响胃癌发生	28
1.3.1 IL-6 信号通路传导机制	29
1.3.2 IL-6 和细胞增殖、存活、分化	31
1.3.3 IL-6 同侵袭、血管生成和转移	31
1.3.4 IL-6 通路同 MicroRNA	32
2. STAT3 是胃癌发生关键信号通路	34
2.1 IL-6 介导 Hp 感染导致胃癌的过程	34
2.2 STAT3 持续激活是胃癌发生的驱动因素	34
2.2.1 STAT3 激活诱发胃癌	34
2.2.2 STAT3 的激活机制	36
2.2.3 STAT3 引发胃上皮细胞基因改变	37
3. CYPB 同 STAT3 功能关系密切	39
3.1 Cyclophilin 家族基因	39
3.2 CypB 的功能	40
3.2.1 CypB 是调控丙型肝炎的病毒 RNA 聚合酶的调控分子	40
3.2.2 CypB 细胞内的催乳素/CypB 复合体促进转录	40
3.3 CypB 与肿瘤	41
3.3.1 CypB 与胰腺癌	41
3.3.2 CypB 和乳腺癌	41

3.3.3 CypB 与骨髓瘤	41
3.3.4 CypB 与头颈肿瘤	42
3.3.5 CypB 与肝癌	42
3.3.6 CypB 与胶质瘤	42
3.4 CypB 受调控机制	43
3.4.1 CypB 与转录因子	43
3.4.2 CypB 与转录后修饰	43
3.4.3 MicroRNA	43
3.5 MicroRNA-520d-5p 可能参与调控 CypB	44
3.5.1 MicroRNA 是调控胃癌增殖的关键因素	44
3.5.2 miR-520d-5p 是抑癌基因	44
3.5.3 miR-520d-5p 可能在胃癌中参与调控 CypB	46
正文	47
第一部分 CypB 在胃癌表达升高且促进胃癌生长	47
1 材料	47
1.1 细胞株	47
1.2 胃癌组织	47
1.3 胃癌患者血清	47
1.4 质粒	48
1.5 裸鼠	48
1.6 其他主要试剂和材料	48
2 方法	48
2.1 免疫组织化学	48
2.2 血清样本收集及 ELISA	49
2.3 细胞培养	49
2.4 质粒构建及慢病毒包被	49
2.5 总蛋白提取	50
2.6 免疫蛋白印迹	50
2.7 流式细胞分选	50
2.8 平板克隆形成	51

2.9 裸鼠成瘤实验	51
3 结果	52
3.1 胃癌组织中 CypB 表达升高	52
3.2 高表达水平 CypB 生存期缩短，预后较差	53
3.3 胃癌患者血清中 CypB 含量升高	56
3.4 血清 CypB 滴度对胃癌具有诊断价值	56
3.5 胃癌细胞中 CypB 表达升高	57
3.6 沉默 CypB 在体外抑制胃癌增殖	57
3.7 沉默 CypB 在体内抑制胃癌增殖	59
4 讨论	60
第二部分 CypB 通过激活 STAT3 促进胃癌增殖	62
1 材料	62
1.1 细胞	62
1.2 胃癌组织	63
1.3 质粒构建	63
1.4 其他主要试剂和仪器	64
2 方法	64
2.1 细胞免疫组织化学	64
2.2 组织蛋白提取及 WB	64
2.3 细胞免疫荧光	65
2.4 载体构建及慢病毒感染	66
3 结果	69
3.1 CypB 和 pSTAT3 在胃癌组织中表达增高且正相关。	69
3.2 胃癌组织中 CypB 和 pSTAT3 的蛋白表达水平正相关。	71
3.3 CypB 介导 IL-6 引起的 STAT3 活化入核	73
3.4 CypB 促进 STAT3 的磷酸化	74
3.5 沉默 STAT3 能逆转 CypB 对胃癌增殖的调控作用	75
4 讨论	77
第三部分 miR-520d-5p 通过靶向 CYPB 调控胃癌增殖	80
1 材料	80
1.1 细胞系	80
1.2 质粒	80

1.3	miRNA 类似物和抑制物	81
1.4	PCR 引物	81
1.5	其他试剂和仪器	82
2	方法	82
2.1	生物信息学分析	82
2.2	总蛋白提取和蛋白印迹	82
2.3	总 RNA 提取和 qRT-PCR	82
2.4	报告基因野生型载体构建	84
2.6	双荧光素酶报告基因实验	91
2.7	miRNA 类似物和抑制物转染	91
2.8	CypB 载体构建	91
3	结果	93
3.1	miR-520d-5p 直接结合 CypB 的 3'-UTR 并在转录水平抑制 CypB 表达	93
3.2	miR-520d-5p 在胃癌中抑制细胞增殖、促进细胞凋亡	97
3.3	miR-520d-5p 通过直接结合 CypB 的 3'-UTR 调控胃癌增殖	102
4	讨论	107
第四部分 miR-520D-5P 通过 CypB 调控 STAT3 活性		110
1	材料	110
1.1	细胞系	110
1.2	抗体	110
1.3	其他试剂和仪器	110
2	方法	110
2.1	蛋白提取和免疫蛋白印迹	110
2.2	IL-6 处理细胞方法	111
2.3	细胞免疫荧光	111
2.4	细胞周期和凋亡测定	111
3	结果	112
3.1	miR-520d-5p 调控 JAK2/STAT3 通路的磷酸化	112
3.2	miR-520d-5p 抑制 IL-6 刺激造成的 STAT3 的激活	112
3.3	miR-520d-5p 抑制 IL-6 刺激造成的 STAT3 的入核	113
3.4	miR-520d-5p 通过 CypB 调控 JAK2/STAT3 通路及其下游蛋白	114

3.5 miR-520d-5p/CypB 通路通过 STAT3 调控胃癌增殖	115
4 讨论	117
第五部分 STAT3 直接抑制 miR-520D-5P 表达	119
1 材料	119
1.1 细胞系	119
1.2 其他试剂	119
2 方法	119
2.1 RNA 提取和 qRT-PCR	119
2.2 miR-520d 启动子的载体构建	120
2.3 双荧光素酶报告基因实验	128
步骤同前	128
2.4 染色质免疫共沉淀实验	128
3 结果	130
3.1 STAT3 磷酸化促进 CypB 的表达	131
3.2 STAT3 磷酸化抑制 miR-520d-5p 的表达	132
3.3 双荧光素酶报告系统证实 STAT3 结合 miR-520d 启动子	133
3.4 染色质免疫共沉淀实验表明 STAT3 结合 miR-520d 启动子	137
4 讨论	139
第六部分 胃癌组织中存在 CypB/STAT3/miR-520D-5P 反馈环路	142
1 材料	142
1.1 组织芯片	142
1.2 原位杂交探针	142
1.3 抗体	142
1.4 其他试剂和仪器	142
2 方法	142
2.1 组织原位杂交	142
2.2 免疫组化	143
2.3 免疫蛋白印迹	143
3 结果	143
3.1 胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达降低	144
3.2 低表达 miR-520d-5p 的胃癌患者预后较差	145
3.3 miR-520d-5p 表达同 CypB 和 pSTAT3 负相关	146

3.4 10 对胃癌组织中 miR-520d-5p 同 CypB、pSTAT3 表达负相关	147
3.5 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路示意图	148
4 讨论	149
小 结	151
参考文献	152
个人简历和研究成果	168
致 谢	170

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
CypB	Cyclophilin B	亲环素 B
miRNA	MicroRNA	小 RNA
Hp	Helicobacter pylori	幽门螺旋杆菌
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	信号转导和转录激活因子 3
JAK	Janus Kinase	两面神激酶
IL-	Interleukin-	白细胞介素
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧簇
NF-kB	Nuclear Factor-kB	核因子 kB
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
PI3K	PI 3-kinases	磷脂酰肌醇三羟基激酶
AKT	Protein Kinase B	丝氨酸苏氨酸激酶
Gp130	Glycoprotein 130	糖蛋白 130
PIAS3	Protein inhibitor of activated STAT	STAT 蛋白抑制剂
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	细胞因子信号通路 3 抑制剂
SHP-2	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type11	蛋白酪氨酸磷酸酶
EGF	Epidermal growth factor	表皮生长因子
HGF	Hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子

Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴瘤-2
Bax	Diphenhydramine	凋亡基因
Cyclin	N/A	细胞周期蛋白
CDK	Cyclin-dependent kinase	周期蛋白依赖性蛋白激酶
MMP	Matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
HIF	Hypoxia inducible factor	缺氧诱导因子
COX	Cyclo-oxygen-ase	环氧酶
IFN	Interferon	干扰素
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore	线粒体转运穿孔
VDAC	Voltage-dependent anion channel	电压依赖的离子通道
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
siRNA	Small interference RNA	小干扰 RNA
shRNA	Small hairpin RNA	小发卡 RNA
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein)	CCAAT 增强子结合蛋白
Ch-IP	Chromatin immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
Luc	Luciferase	萤光素酶
ER	Endoplasmic reticulum	内质网
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
WB	Western Blot	免疫蛋白印迹
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR	实时荧光定量 PCR

CypB/STAT3/MicroRNA-520d-5p 反馈环路

促进胃癌增殖的研究

硕士研究生：李 铤

导 师：樊代明 教授

辅 导 教 师：时永全 教授

第四军医大学西京医院消化内科，西安 710032

资助基金项目：国家 973 计划：(2012ZX09303011-001)

国家自然科学基金 (81430072, 81270445, 81370484,

81470805, 81400583)

中文摘要

胃癌是世界范围内致死率第二的恶性肿瘤，其被广泛认为同幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H.pylori*) 感染及继发的炎症反应有密切关系。通过促进包括白细胞介素 6、8 在内的多种炎症因子释放，幽门螺旋杆菌在胃癌的发生、增殖、转移等发展过程中发挥了重要作用。总的来说，IL-6 激活的 STAT3 在胃肠道上皮细胞的恶性转化中中扮演了关键的角色。作为多条癌基因通路的交汇点，STAT3 的激活被发现能促进多种肿瘤的增殖、存活、血管生成以及转移，并能够抑制抗肿瘤免疫。但是，转录因子 STAT3 在肿瘤细胞中被持续激活的原因尚未完全阐明。亲环素 B (Cyclophilin B, CypB) 属于亲环素家族，是环孢素 A 的细胞内受体，其肽酰脯氨酰异构酶活性在蛋白质折叠过程中有重要作用。有意思的是，近期研究发现在黑色素瘤和恶性胶质瘤中，CypB 的存在对于 STAT3 的激活有不可或缺的作用。敲除或药物抑制 CypB 导致 JAK/STAT3 通路的抑制及细胞死亡。此外，CypB 被发现在多种肿瘤中过表达，但是 CypB 的过表达的机制及其同 STAT3 的关系尚不明确。

MicroRNA 是一类小 RNA，通过结合靶基因信使的非翻译区导致其翻译抑制或直接降解。我们前期的生物信息学分析结果显示 miR-520d-5p 在 CypB 的 3'非翻译区具有潜在结合位点，且二者表达水平在胃癌细胞和组织中均负相关。因此我们进而

验证了 miR-520d-5p 是否是 CypB 的上游调控分子的假说。

本文中我们提供了证据显示一条由 IL-6 诱导的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈通路在胃癌发展过程中的促进作用。我们研究发现 CypB 的过表达是 STAT3 在胃癌中激活的必要条件；随后我们证实 miR-520d-5p 在转录水平直接抑制 CypB 的表达；此外，miR-520d-5p 也是 STAT3 的靶基因：这条反馈通路的发现，有助于理解幽门螺旋杆菌感染和炎症反应造成 IL-6 分泌促进胃癌中 STAT3 持续激活的原因，并为治疗胃癌恶性进展提供新的思路。

【方法】

包含 90 对胃癌和癌旁正常组织的组织微芯片用于检测 CypB、STAT3 及 miR-520d-5p 的表达。100 例胃癌病人及 50 名正常志愿者血清被收集用于检测血清中 CypB 的表达进而分析早期诊断价值。我们构建了 CypB、STAT3 的过表达载体和 shRNA 载体并包被慢病毒进行功能获得缺失模型的建立。合成的 miR-520d-5p 的 mimics、inhibitors，及 agomir、antagomir 被用于 miR-520d-5p 的过表达和抑制。BGC823、SGC7901 细胞转染后，采用 XTT 细胞增殖实验和平板克隆形成实验分析细胞生长和增殖。细胞经 PI 和 Annexin V 染色后采用流式细胞分析细胞周期和凋亡比例。裸鼠皮下成瘤实验用于体内验证细胞增殖的影响。蛋白印迹实验和聚合酶链反应分别用于分析细胞中相应分子的蛋白水平和 RNA 水平的表达。双荧光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀实验用于证实 miR-520d-5p 同 CypB 的非翻译区的直接结合以及 STAT3 转录因子同 miR-520d-5p 的启动子区域的直接结合。免疫组化和原位杂交用于检测 CypB、pSTAT3 及 miR-520d-5p 在胃癌组织中的表达。细胞免疫荧光实验用于经 IL-6 刺激后分析相应蛋白的细胞亚定位。

【结果】

1. CypB 在胃癌组织和胃癌患者血清中表达升高并同胃癌进展相关。CypB 被发现同癌旁正常组织相比，在胃癌组织中的表达明显升高。相关性分析进而发现，高水平的 CypB 同恶性肿瘤表型密切相关，并同缩短的生存期有关。Cox 回归分析也显示，高水平 CypB 是独立的预后危险因素。

2. 沉默 CypB 表达在体内和体外抑制胃癌细胞生长。蛋白印迹实验显示，CypB 在多种胃癌细胞系中的表达同永生化正常胃上皮细胞 GES-1 相比明显升高。随后，BGC823 和 SGC7901 细胞被转染了 CypB 的 shRNA。XTT 增殖实验和平板克隆形成

实验发现沉默 CypB 后细胞生长减缓。流式细胞分析显示细胞周期发生了 G0/G1 期的阻滞，且细胞凋亡率显著升高。此外，体内实验同样显示，抑制 CypB 的表达后裸鼠成瘤体积和重量降低。

3. CypB 通过影响 STAT3 激活调控胃癌增殖。我们随后通过免疫组织化学方法检测了 pSTAT3 在胃癌组织中的表达，发现胃癌组织中 CypB 同 pSTAT3 的表达水平均明显升高，且二者有正相关关系。有趣的是，胃癌细胞经 IL-6 刺激后，部分细胞中 CypB 的亚细胞定位从细胞浆向细胞核迁移。此外，CypB 的小干扰 RNA 导致了 JAK/STAT3 通路中 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平的降低，但并未影响其总蛋白水平。随后共转染实验证实，STAT3 的小干扰 RNA 能够逆转 CypB 沉默对胃癌细胞增殖的促进作用。这说明 STAT3 的激活介导了 CypB 对胃癌增殖的调控作用。

4. miR-520d-5p 通过直接结合 CypB 非翻译区抑制 CypB 的表达。通过多个 microRNA 靶基因数据库进行分析，我们筛选到若干可能调控 CypB 的 microRNA，并将其 mimics 分别转染胃癌细胞系。结果发现，miR-520d-5p 能够抑制 CypB 的表达。双荧光素酶报告基因实验证实，miR-520d-5p 能够直接结合 CypB 的 3'端非翻译区。QRT-PCR 和 western Blotting 实验进一步证实，miR-520d-5p 在转录水平导致 CypB 的 mRNA 降解。这些实验证实，miR-520d-5p 是 CypB 上游的直接调控分子。

5. miR-520d-5p 在体内和体外通过靶向 CypB 抑制胃癌增殖。为探索 miR-520d-5p 调控胃癌增殖的机制，我们建立了 miR-520d-5p 的功能获得、缺失模型。随后的功能实验证实，无论在体内还是体外，miR-520d-5p 均抑制胃癌细胞增殖，促进细胞凋亡。随后含有野生型和突变性 3'-UTR 的 CypB 表达载体同 miR-520d-5p 被用于共感染细胞，XTT 和克隆形成实验表明 miR-520d-5p 能够减弱野生型 3'-UTR 的 CypB 载体对胃癌细胞增殖的促进作用，但不能逆转突变型 3'-UTR 的 CypB 载体的作用。流式细胞周期和凋亡分析实验得到了类似的结果。这进一步说明，miR-520d-5p 通过结合 CypB 3'-UTR 调控胃癌细胞生长。

6. miR-520d-5p 通过 CypB 调控 STAT3 磷酸化和入核。我们发现，miR-520d-5p 过表达抑制了 JAK2 和 STAT3 的磷酸化；而且 IL-6 刺激造成的 STAT3 磷酸化随时间和浓度的依赖性受到 miR-520d-5p 过表达的抑制。另外，IL-6 刺激能诱导 CypB 和 STAT3 在细胞核的共定位；而 miR-520d-5p 介导 CypB 沉默后，STAT3 的入核受到了明显的抑制。随后的功能实验证实，STAT3 的敲除能够逆转 miR-520d-5p 的沉默对

细胞生长和细胞周期、凋亡的影响。这些结果说明 miR-520d-5p 通过调控 CypB/STAT3 轴影响 STAT3 的活化和胃癌细胞增殖。

7. STAT3 直接抑制 miR-520d-5p 在胃癌细胞中的表达。为了进一步阐明 CypB 同 STAT3 活化之间的关系，我们对 GES-1 细胞采用 IL-6 的刺激，发现 STAT3 的磷酸化上调的同时，CypB 的表达也明显升高；而 miR-520d-5p 的过表达则能够抑制该现象发生，这提示 STAT3 可能反馈性参与 miR-520d-5p 的表达调控。QRT-PCR 结果证实，IL-6 刺激能够在胃癌细胞中造成 miR-520d-5p 表达的下调，而 STAT3 的 shRNA 则逆转该现象发生。随后生物信息学预测发现，miR-520d-5p 的启动子区域存在多个潜在的 STAT3 的结合位点。因此针对 STAT3 在不同位置的结合位点，我们建立了一系列 miR-520d-5p 启动子的截短载体。双荧光素酶报告基因实验证实 STAT3 的结合位点位于-1329 至-722bp。对该区域的两个结合位点分别或同时突变发现，当-733 至-723bp 区域发生突变时，STAT3 依赖的 miR-520d-5p 的调控出现缺失。染色质免疫共沉淀也证实 STAT3 蛋白能够同该区域 DNA 直接结合，而且经 IL-6 刺激后其结合的 DNA 增多。这些结果说明，STAT3 通过直接结合 miR-520d 的启动子区域，转录性抑制其表达。

8. 胃癌组织中存在 CypB/STAT3/miR-520d-5p 的反馈环路。最后我们在胃癌组织中验证了该环路的中三个分子的相关关系。原位杂交结果发现，胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同癌旁组织相比明显降低，且低水平的 miR-520d-5p 患者预后较差，COX 多因素分析结果也显示低水平的 miR-520d-5p 是独立预后因素。此外，我们将 90 例胃癌患者按照 miR-520d-5p、CypB 及 pSTAT3 的表达水平高低进行分组和相关分析，发现低水平的 miR-520d-5p 同 CypB 及 pSTAT3 的表达升高有相关关系。

【结论】

总结本项研究，我们发现胃上皮细胞受炎症因子刺激后恶性转化过程中一条正反馈通路。幽门螺旋杆菌相关的慢性萎缩性胃炎诱导胃上皮细胞和巨噬细胞产生 IL-6，进而激活了 JAK2/STAT3 通路并转录性抑制 miR-520d-5p 的表达，从而导致后者的靶分子 CypB 的表达升高。CypB 随后协助 STAT3 的磷酸化和入核激活，引起下游细胞增殖和凋亡分子的变化，促进胃癌发生发展，同时也进一步转录性抑制 miR-520d-5p 的表达。从这个角度讲，胃癌细胞中 miR-520d-5p 的表达缺失及 CypB 的过表达是 STAT3 持续性激活的原因之一。这条新的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 正

反馈环路将为进一步理解胃癌中炎症-肿瘤转化提供重要理论基础，并为胃癌防治策略提供新的思路。

关键词： CypB, STAT3, 胃癌, microRNA, 反馈环路

Cyclophilin B/STAT3/microRNA-520d-5p Feedback Loop Promotes Proliferation and Survival in Gastric Cancer

Candidate for master: Ting Li

Supervisor: Daiming Fan

Tutor: Yongquan Shi

Department of Gastroenterology, Xijing hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (81430072, 81270445, 81370484, 81470805, 81400583)

Major Projects of Ministry of Science and Technology (2012ZX09303011-001).

Abstract

Introduction:

Gastric cancer (GC), the second leading cause of cancer-related deaths worldwide [1], is considered to result from *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and subsequent inflammation [2, 3]. By inducing cytokines including IL-6 and IL-8, *H. pylori* plays important roles in GC development [4], including tumour initiation [5], promotion [6] and metastasis [7]. Generally, IL-6 that activates STAT3 have particularly important roles in

the malignant transformation of gastric and intestinal epithelial cells [8]. As a point of convergence for numerous oncogenic signalling pathways, STAT3 activation in diverse human cancers has been shown to increase proliferation, survival, angiogenesis and metastasis and to inhibit anti-tumour immunity [9-11]. This transcription factor is constitutively activated both in tumour cells and in immune cells, and is involved in oncogenesis and inhibition of apoptosis; however, the cause of constitutively active STAT3 in cancer cells has not been fully explored. CypB belongs to cyclophilins, which are intracellular receptors for cyclosporin A [12] and possess peptidyl-prolyl isomerase activities that accelerate protein folding [13]. Interestingly, CypB is essential for STAT3 activation in cancer cells. Depletion and pharmacologic inhibition of CypB caused death through the loss of Janus-activated kinase (JAK)/STAT3 signalling [14]. Besides, CypB overexpression was observed in several types of cancer [15-17]. However, the mechanisms underlying dysregulation of CypB are not well understood.

MicroRNAs (miRNAs) are important small non-coding RNAs that either inhibit the translation of or trigger the degradation of target mRNAs through binding to the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) [18, 19]. Our results showed that miR-520d-5p was a bioinformatically predicted CypB regulator and that miR-520d-5p and CypB expression were inversely correlated in GC cell lines and tissues. We thus set out to testify the hypothesis that miR-520d-5p may partially account for CypB upregulation in cancer and inhibit GC growth by suppressing CypB.

Here we present evidence that a CypB/STAT3/miR-520d-5p feedback loop triggered

by IL-6 regulates gastric carcinogenesis. Our study found that CypB is required for STAT3 activation in cancer cells and that miR-520d-5p, an important inhibitory factor of CypB, is transcriptionally suppressed by STAT3, thus potentially explaining *H. pylori* infection and IL-6 stimulation-triggered constitutive STAT3 activation in cancer cells.

Materials and Methods:

A GC tissue microarray containing 90 cases of GC and paired adjacent non-cancerous tissue was purchased from Shanghai Outdo Biotech. Blood samples from 100 GC patients (without overlap to the cases of tissue array) and 50 healthy volunteers were collected from Xijing Hospital, Xi'an, China. Expression vectors encoding CypB were constructed by cloning the open reading frames and downstream 3'-UTR into the pcDNA 3.1 vector (Invitrogen) between HindIII and EcoRI sites for expression driven by the CMV promoter. The shRNA sequences of CypB and STAT3 were amplified and cloned into the GV115 vector (GeneChem) between AgeI and EcorI sites for expression driven by the CMV promoter. Synthetic miR-520d-5p mimic, miR-520d-5p inhibitor, miR-520d-5p agomir, miR-520d-5p antagomir and their negative control oligonucleotides were purchased from RiBoBio (Guangzhou, China). BGC823 and SGC7901 cells were transfected with indicated constructs or oligonucleotides. Target cells were then seeded in 96-well plates at 48 h post-transfection. XTT assays and colony formation assays were conducted to determine the cell growth according to the manufacturer's instructions. Besides, The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit was used for apoptosis assays. Total proteins were prepared from fresh frozen tissue or cultured cell samples by complete cell lysis followed by western blotting. Subcutaneous xenograft models were used to determine the in vivo effects of CypB/STAT3/miR-520d-5p feedback loop. Luciferase reporter assays and Ch-IP assays were performed to test if miR-520d-5p

directly bind to the 3'-UTR of CypB and if STAT3 binds promoter region of miR-520d. Immunofluorescence were used to determine the location of CypB and STAT3 upon restoration of miR-520d-5p after IL-6 treatment. Finally, IHC and ISH were performed on the same tissue microarray to determine the correlation between expression of miR-520d-5p and CypB/STAT3.

Results:

CypB is upregulated in GC tissues and patient sera and is correlated with GC

progression. CypB was significantly upregulated in GC tissues compared with adjacent non-cancerous gastric tissues . Correlation analysis revealed that high-level CypB expression in GC tissues was significantly associated with a more aggressive tumour phenotype. Kaplan–Meier analysis further revealed that high-level CypB expression was associated with shorter disease-free survival time for GC patients. Cox regression analysis also indicated that high CypB expression was an independent prognostic factor for poor survival in GC patients. We further found that the CypB concentrations in serum samples from GC patients were significantly increased compared with those from volunteers.

CypB silencing inhibits GC cell growth *in vitro* and *in vivo*. Western blotting revealed that CypB expression was greater in MKN45, SGC7901 and BGC823 cells compared with GES-1 cells. BGC823 and SGC7901 cells were then infected with shRNA against CypB or a control. XTT assays and colony formation assays revealed that cell growth was significantly reduced by CypB downregulation compared with the control. Moreover, cell cycle assays showed that silencing CypB increased the G0/G1 population and reduced the S and G2/M population compared with control cells. Apoptosis assays revealed that CypB

inhibition led to an increased percentage of apoptotic GC cells. Furthermore, *in vivo* analysis showed that silencing CypB in BGC823 and SGC7901 cells caused dramatic reductions in tumour weight and volume in nude mice. Together, these results suggest that CypB may play an important role in GC cell growth *in vitro* and *in vivo*.

CypB regulates GC growth through activation of STAT3

pSTAT3 (Tyr705) levels were then determined in the tissue array that was used for CypB expression analysis by IHC). Compared with normal tissues, both CypB and nuclear pSTAT3 levels were increased in GC tissues. Interestingly, after treatment with IL-6, CypB redistributed to a cytoplasmic and nuclear localization in approximately 50% or more of the cell population. Besides, CypB shRNA led to a significant reduction in the phosphorylation of JAK2/STAT3 pathway-related proteins without affecting their expression, while CypB restoration increased JAK2 and STAT3 phosphorylation. BGC823 cells were co-infected with lentiviral vectors encoding CypB and STAT3 shRNA, colony formation and XTT assays demonstrated that knockdown of STAT3 abrogated the CypB-upregulation-induced GC growth promotion.

miR-520d-5p downregulates CypB expression by directly binding its 3'-UTR.

Several mimics of microRNAs which were previously reported to have tumor suppressive roles in cancer were transfected to BGC823 cells and western blotting analysis revealed that transfection with miR-520d-5p mimics reduced CypB expression. To determine whether miR-520d-5p represses CypB by targeting the potential binding site, PCR products containing either wild-type or mutant CypB 3'-UTR sequences were cloned

downstream of the luciferase open reading frame. miR-520d-5p overexpression suppressed luciferase activities of the CypB 3'-UTR reporter constructs, whereas the effect was abolished when mutation were introduced into its seed sequences. Furthermore, qRT-PCR and western blotting analysis revealed that ectopic miR-520d-5p expression reduced CypB mRNA and protein levels, while miR-520d-5p knockdown increased CypB expression. Together, these results suggest that miR-520d-5p reduces CypB expression by directly targeting the CypB 3'-UTR.

miR-520d-5p inhibits GC growth *in vitro* and *in vivo* by targeting CypB. To investigate miR-520d-5p function with regards to GC cell growth, BGC823 and SGC7901 cells were transfected with miR-520d-5p mimics, inhibitors, agomir or antagomir, and miR-520d-5p expression was confirmed by qRT-PCR. Both XTT and colony formation assays indicated that miR-520d-5p upregulation significantly inhibited GC cell growth. Cell cycle analysis showed that restoration of miR-520d-5p induced G1-phase arrest, whereas miR-520d-5p inhibition reduced the proportion of cells in G1. Furthermore, miR-520d-5p overexpression increased the proportion of cells undergoing apoptosis, while miR-520d-5p knockdown reduced the number of apoptotic cell. Similar changes were also observed in SGC7901 cell. The effects of miR-520d-5p on GC were also studied *in vivo*: BGC823 cells transfected with agomir or control were subcutaneously injected into the right and left flanks of the same nude mice, respectively. At 21 days post-injection, the mean xenograft tumour volume and weight was significantly lower for miR-520d-5p-BGC823 xenografts than for miR-control-BGC823 xenografts.

miR-520d-5p modulates STAT3 phosphorylation and nuclear translocation through

CypB.

We further examined the phosphorylation and subcellular localization of STAT3. miR-520d-5p restoration were found to induce significant reduction in the phosphorylation of JAK2/STAT3 pathway-related proteins, while silencing miR-520d-5p elicited increased JAK2 and STAT3 phosphorylation. Moreover, we found that the IL-6-induced time- and dose-dependent increase of STAT3 phosphorylation was also blocked by restoration of miR-520d-5p. We further observed that CypB co-localized with STAT3 in the nucleus following IL-6 treatment as expected, while upon transfection of miR-520d-5p, the percentage of cells with nuclear distribution of STAT3 was significantly decreased. To investigate whether STAT3 mediates the function of miR-520d-5p in cancer growth, BGC823 cells were infected with STAT3 shRNA and then transfected with miR-520d-5p agomir. Functional study found that STAT3 knockdown abrogated the miR-520d-5p-downregulation-induced GC growth promotion, as well as changes of cell cycle distribution and apoptotic percentage. Together, these data suggest that miR-520d-5p modulates STAT3 activation and regulates cancer growth through a CypB/STAT3 axis.

STAT3 directly suppresses miR-520d-5p expression in GC cells.

To further elucidate the connection between CypB and STAT3 activation, GES-1 cells that do not express significant amounts of CypB were treated with IL-6 and assayed for the expected STAT3 activation by western blotting. Interestingly, CypB expression was also induced by IL-6 treatment, and this expression can be blocked by STAT3 knockdown. Restoration of miR-520d-5p attenuated the IL-6-induced upregulation of CypB.

miR-520d-5p expression were found to decrease in a time-dependent manner in cells treated with IL-6. Moreover, shRNA-mediated downregulation of STAT3 prevented the repression of miR-520d-5p after IL-6 treatment. We thus tested if STAT3 targets miR-520d-5p directly. We generated a series of miR-520d-5p promoter truncation mutants and determined whether STAT3 transcriptionally suppresses miR-520d-5p. Luciferase assay after IL-6 treatment showed that the regulatory region might be between -1329 and -722 bp, which contains two STAT3 binding sites (-1215 to -1205 bp and -733 to -723 bp). Reporter genes containing the miR-520d-5p promoter or various binding site mutations were then transfected into BGC823 and SGC7901 cells and then treated with IL-6. This analysis revealed that STAT3-based miR-520d-5p regulation was lost when the region between -733 and -723 bp was mutated. Ch-IP assays further confirmed that STAT3 binds to the same site of the promoter of miR-520d. Together, these results indicate that STAT3 suppresses miR-520d-5p transcription in GC cells.

The CypB/STAT3/miR-520d-5p feedback loop is characteristic of primary GC tissues.

Finally, to test whether the regulation described above in GC cell lines is clinically relevant, in situ hybridisation (ISH) for miR-520d-5p were performed on the 90 GC tissue cohort that was used for CypB and pSTAT3 analysis. Compared with normal tissues, miR-520d-5p levels were reduced in GC tissues. We found that patients with low miR-520d-5p expression had significantly poorer prognoses than those with high miR-520d-5p expression. Cox regression analysis also indicated that low miR-520d-5p expression was an independent prognostic factor for poor survival in GC patients. In

addition, we found that reduced miR-520d-5p levels tended to increase CypB and nuclear pSTAT3 expression. The 90 GC patient cases were then divided into groups with relatively high or low levels of miR-520d-5p, CypB and pSTAT3. From this analysis, we observed an inverse pattern of miR-520d-5p and CypB or pSTAT3 expression. In Summary, these results showed that the CypB/STAT3/miR-520d-5p feedback loop is active in primary human gastric carcinogenesis.

Conclusion:

In conclusion, we elucidated the schematic model of GC development. *H. pylori*-associated gastritis induces gastric epithelial cells and macrophages to produce IL-6, activating the JAK2/STAT3 pathway and transcriptionally decreasing miR-520d-5p, leading to a dramatic increase in CypB. CypB then aids STAT3 phosphorylation and nuclear translocation, resulting in JAK2/STAT3 pathway activation and increased GC cell proliferation and survival. In this view, the loss of miR-520d-5p in GC cells and overexpression of CypB may be one of the reasons that STAT3 is constitutively activated in cancer cells and this new CypB/STAT3/miR-520d-5p feedback loop may contribute to an improved understanding of inflammatory signalling in gastric carcinogenesis.

Key words: CypB, STAT3, gastric cancer, microRNA, feedback loop

前 言

胃癌是世界范围内致死率第二的恶性肿瘤，而 70% 的新发病例和死亡病例出现在包括我国在内的发展中国家[1]。因此研究胃癌的发生发展机制对于我国预防胃癌发生、遏制胃癌进展以及降低胃癌的死亡率具有重要指导意义。

胃癌的发生被广泛认为同幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*, *H.pylori*）感染及继发的炎症反应有密切关系[20]。自从 1984 年发现 Hp 感染是造成胃和十二指肠溃疡以及慢性胃炎以来[21]，多项研究陆续证明 Hp 感染能使胃癌发生率明显上升[22]。通过促进包括白细胞介素 6（Interleukin 6, IL-6）、白细胞介素 8（Interleukin 8, IL-8）在内的多种炎症因子释放，幽门螺旋杆菌在胃癌的发生[5]、增殖[6]、转移[7]等发展过程中发挥了重要作用。总的来说，IL-6 激活的 STAT3 在胃肠道上皮细胞的恶性转化中扮演了关键的角色。作为多条癌基因通路的交汇点，STAT3 的激活被发现能促进多种肿瘤的增殖、存活、血管生成以及转移，并能够抑制抗肿瘤免疫[9-11]。STAT3 在多种肿瘤中均被发现为持续激活状态，且其激活是维持肿瘤增殖和抑制凋亡状态的必要条件。但是，转录因子 STAT3 在肿瘤细胞中被持续激活的原因尚未完全阐明。

IL-6 刺激能造成 STAT3 的磷酸化并向细胞核转移，同特定的 DNA 序列结合，从而调控 STAT3 下游分子的转录。近期研究发现，STAT3 被激活的过程同亲环素 B（Cyclophilin B, CypB）的表达失常有关[14, 15]。CypB 属于亲环素家族，是环孢素 A 的细胞内受体[12]，其肽酰脯氨酰异构酶活性在蛋白质折叠过程中有重要作用[13]。CypB 主要定位于细胞的内质网中，其在肝炎病毒复制[23, 24]、免疫抑制[25]、催乳素信号通路[26]转导以及骨质疏松发生[27]等机体生理或病理过程中发挥重要作用。研究者发现在黑色素瘤和恶性胶质瘤中，CypB 的存在对于 STAT3 的激活有不可或缺的作用。敲除或药物抑制 CypB 导致 JAK/STAT3 通路的抑制及细胞死亡。此外，CypB 被发现在包括黑色素瘤、肝癌、胰腺癌、恶性胶质瘤及乳腺癌等在内的多种肿瘤中过表达[14-17, 28]，但是 CypB 在肿瘤中过表达的机制及其同 STAT3 的关系尚不明确。

MicroRNA（miRNA）是一类长度为 20-22 nt 的小 RNA，通过结合靶基因信使的非翻译区导致其翻译抑制或直接降解。我们前期的生物信息学分析结果显示

miR-520d-5p 在 CypB 的 3'端非翻译区具有潜在结合位点，且二者表达水平在胃癌细胞和组织中均负相关。近期几项研究也指出 miR-520 家族的 miRNA 在多种肿瘤中具有抑癌作用[29, 30]。综合以上文献及我们的初步研究结果，我们建立了 miR-520d-5p 可能是 CypB 的上游调控分子的假说。另外，有研究证实了 STAT3 通过直接结合相应分子的启动子区域发挥对多个 miRNA 的靶向调控作用[31, 32]。miRNA 经常同其靶分子形成反馈通路。这是因为调控它们的转录因子同时也可能是它们本身的直接或间接的靶分子[31, 33, 34]。这些调控环路是肿瘤相关信号通路的核心，因为它们在细胞受到炎症因素影响下由正常向肿瘤转变过程中帮助促进并维持细胞表型的持续变化。因此 miR-520d-5p 作为 CypB 的调控分子将 CypB 同 STAT3 的激活以及胃癌的炎症-肿瘤转化联系在了一起。

本文中我们提供了一系列证据显示一条由 IL-6 诱导的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈通路在胃癌发展过程中的促进作用。我们研究发现 CypB 的过表达是 STAT3 在胃癌中激活的必要条件；随后我们证实 miR-520d-5p 在转录水平直接抑制 CypB 的表达；此外，miR-520d-5p 也是 STAT3 的靶基因；这条反馈通路的发现，有助于理解幽门螺旋杆菌感染和炎症反应造成 IL-6 分泌促进胃癌中 STAT3 持续激活的原因，并为治疗胃癌恶性进展提供新的思路。

文献回顾

1. Hp 通过炎症导致胃癌

1.1 胃癌和 Hp 感染

胃癌是世界范围内肿瘤导致死亡的第二大原因[35]。幽门螺旋杆菌感染是导致胃癌的最重要的危险因素。目前估测全球约有 50%人口感染该病原体，它导致了胃炎、消化溃疡、胃癌以及粘膜相关的淋巴组织淋巴瘤。由于 75%的胃癌归因于 Hp 感染，世界卫生组织已经将它划分为一类致癌物[36]。

胃癌发生的危险因素包括 *cagA*-阳性的 Hp 感染、Hp 的系统地理学起源以及包括 IL-1、IL-8、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 在内的基因多态性[35, 37, 38]。在 Hp 感染后，宿主的免疫系统会被诱发非特异和特异性免疫应答，并产生多种激素反应[39, 40]。而除了如此激烈的炎症反应外，除持续使用抗生素外很难达到病原体的清除，这也导致了终生感染和继发的炎症。慢性炎症进而导致组织损伤、氧化应激和 DNA 损伤[39, 41-44]。我们推测这些感染造成的不良反应为胃黏膜创造了促癌的微环境并促进胃上皮细胞恶性转化。因此，探索 Hp 感染造成的慢性炎症的本质及其导致胃癌发生的原因是非常有必要的。

1.2 Hp 的毒力

近期的证据显示 Hp 导致的慢性炎症和氧化应激为细胞的 DNA 损伤和组织损伤创造微环境。DNA 损伤导致基因不稳定性并最终导致恶性转化。病原体编码的蛋白等致病因素诱导了稳定的免疫激活并改变了宿主的基因信号通路，降低了癌变的阈值，包括 DNA 损伤修复、聚胺合成和分解、抗氧化反应以及细胞因子合成[45]。

1.2.1 CagA 同胃癌发生的关系

CagA 是 Hp 的毒力因素中最为重要的一员，对胃黏膜上皮细胞和免疫细胞有多重影响。同 *cagA* 阴性 Hp 感染的个体相比，感染 *cagA* 阳性 Hp 的个体发生胃癌的危

险度上升明显。CagA 蛋白通过 T4SS 蛋白复合体被转入宿主细胞，后者同 cagA 基因位点接近。一旦进入细胞，宿主细胞的蛋白激酶会磷酸化 CagA，从而启动了 CagA 的一系列功能的发挥（图 1），包括 MAPK 信号通路的激活，调往信号通路的抑制，细胞生长的阻滞以及细胞运动的失调[46]。CagA 阳性的 Hp 被发现能在胃黏膜上皮细胞诱导更高水平的 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-8[47]，这些细胞因子都是炎症因子且能够诱导 ROS 的发生。此外，近期一项研究发现 CagA 阳性 Hp 感染能够显著增加细胞 H₂O₂ 的产生[48]。结果，感染的细胞和胃组织出现了 DNA 损伤和突变的增加——尤其在癌基因和抑癌基因位置——这些是肿瘤发生的重要分子基础[49]。因此，这些结果提示 CagA 诱导的 DNA 损伤是感染和胃癌发生之间的联系的关键。

1.2.2 VacA 同胃癌发生的关系

另一个 Hp 同胃癌发生相关的毒力因素是 vacA，其能够增加 Hp 定植在胃黏膜的成功率[50]。另外，vacA s1m1 等位基因阳性的菌株被发现同慢性胃炎严重程度和癌症发生危险性相关[50]。但是 VacA 导致这些变化的机制尚不清楚。

线粒体膜是 VacA 的靶点之一[51]。一项研究通过 DCFDA 染色发现，VacA 导致细胞膜的 ROS 产生明显增多[52, 53]。这些反应同样在嗜酸性粒细胞和 Hela 细胞中被发现。同时，VacA 导致了钙离子的释放并进而激活了 NF- κ B 信号通路[52]。激活的 NF- κ B 通路活性导致炎症因子的释放，进一步募集免疫细胞到达感染部位[52]。

VacA 被发现同时具有促进和抑制细胞自噬的功能 [50, 54]。近期一项研究发现 VacA 在胃上皮细胞中能够干扰自噬的发生[50]。自噬是清除包括 ROS 在内的细胞内成分的关键生理过程。因此 VacA 介导的自噬阻断导致细胞内 ROS 的聚集。而与此相反，另一项研究发现 VacA 能够诱导上皮细胞的自噬[54]。VacA 能够同 LRP1 结合，而后者的激活导致细胞内 ROS 的积聚，从而导致蛋白激酶 B 的激活。结果 P53 被降解而自噬发生。总而言之，VacA 均能够导致 ROS 累积而在 Hp 感染过程中促进细胞氧化应激。

1.2.3 Hp 的其他因素同胃癌发生的关系

其他的微生物因素同样能够被 Hp 感染诱导并在炎症反应中发挥重要作用。NapA 的作用主要是中性粒细胞向感染部位的募集，导致自由基在感染部位的释放 [55]。有趣的是，由于 NapA 依赖的机制存在，Hp 受保护而不被氧化集团损伤。

尿激酶是另一个能够招募中性粒细胞到感染部位的 Hp 毒力因子[56]。重组尿激酶足够诱导小鼠模型的中性粒细胞的浸润,进而导致 ROS 水平升高和炎症反应加剧。一般而言是寿命较短的,但这些浸润的中性粒细胞则对凋亡耐受故有较长寿命因而对机体有害。另外,尿激酶能够激活巨噬细胞产生 iNOS,因而促进固有免疫应答并加重炎症反应。

Hp 的 GGT 能够刺激胃上皮细胞产生 H₂O₂ 从而加重疾病。这些反应诱导 NF-κB 的激活和 IL-8 的产生[57]。IL-8 是炎症诱导因子,在 Hp 感染的胃上皮组织中高表达,其通过招募中性粒细胞来介导炎症反应[58, 59]。此外,IL-8 还有促癌作用[60, 61]。研究者将 rGGT 加入到胃上皮细胞中后,通过流式细胞仪检测细胞 DNA 损伤的指示剂 8-OHdG 明显增高[57]。上调的 ROS、炎症介导因子、以及 DNA 氧化损伤为胃上皮细胞的恶性转化创造了理想条件。

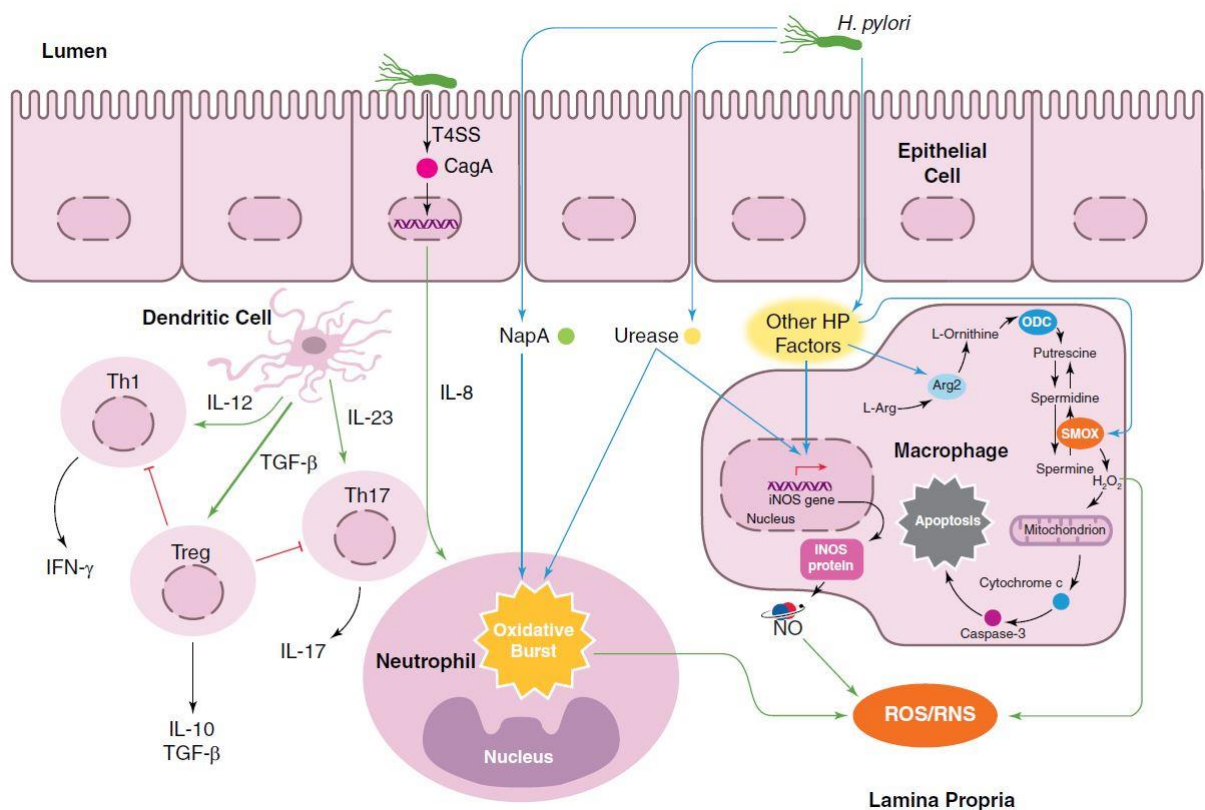


图1 胃黏膜中Hp同免疫细胞的联系示意图。Hp感染导致IL-8产生,这种IL-8产生依赖于CagA。IL-8募集了中性粒细胞, Hp的NapA和尿激酶导致中性粒细胞的氧化反应,使其产生大量的ROS并分泌入感染的微环境中。此外, NapA能够促进中性粒细胞存

活，从而进一步促进了氧化应激反应的进行。感染还能够诱导巨噬细胞产生iNOS，导致一氧化氮产生。同时，感染造成树突状细胞分泌细胞因子的改变，向调节性T细胞方向倾斜。图片摘自Hardbower DM, *J Leuk Biol*, 2014[45]。

1.3 Hp 通过 IL-6 影响胃癌发生

Hp 感染导致慢性胃炎过程中，IL-6 的产生及其下游信号通路的激活在胃癌的发生中起了关键作用。不少研究发现，Hp 的感染能够显著促进胃黏膜中 IL-6 的产生。一项在蒙古沙鼠模型中的研究发现，感染野生型 Hp 48 周后，沙鼠胃黏膜细胞的 IL-6 的 mRNA 水平明显升高，在 12 个月后达到最高峰，这种变化可能是由 Hp 的膜表面蛋白诱导出现的[62]。一项针对 Hp 感染的日本成人的调查研究发现，受检人群血清中的 IL-6 水平同 Hp 的抗体水平明显正相关。这提示 Hp 的感染可能促进 IL-6 的产生[63]。还有研究发现，Hp 感染的患者胃黏膜中 IL-6 的水平明显高于 Hp 阴性的胃炎病人。这提示 IL-6 在 Hp 相关的胃炎疾病进展中的潜在病理作用[64]。

Hp 被发现通过 IL-6 受体激活 STAT3 信号通路。研究者发现，感染 Hp 的胃上皮细胞的 STAT3 磷酸化水平升高，并出现从胞浆到胞核的定位转位现象。萤光素酶实验也证实 STAT3 信号通路被激活。进一步研究发现 STAT3 的激活是依赖于 CagA 蛋白的进入细胞而非磷酸化。研究结果表明，STAT3 的激活是通过 IL-6 受体实现的，并能够被 gp130 抗体导致的 gp130 抑制所诱发。但是，这种激活同 IL-6 或者 IL-11 的自分泌无明显关系。总之，这些结果证实 Hp 能够通过 CagA 蛋白在体内和体外激活 STAT3 信号通路[65]。

IL-6 是被研究最为深入的促癌细胞因子之一。它的家族中包括 IL11、IL-27、IL-31、白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory Factor, LIF)、OSM、CNTF、CT-1 以及 CLC 等。这些细胞因子能够影响细胞增殖、存活、分化、迁移、侵袭、转移、血管生成、炎症以及代谢 (图 2) [66]。IL-6 家族成员中除 IL-31 之外，均能够通过特定受体和共同的受体亚单位 gp130 激活 JAK-STAT3 信号通路、PI3K-AKT 通路和 MAPK-ERK 通路。在这些通路中，STAT3 是 gp130 的主要下游信号通路，它是连接炎症和肿瘤发生的癌基因[9, 67, 68]。在既往的研究中，IL-6 被发现在包括皮肤癌、乳腺癌、肺癌、食管癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、血液系统肿瘤及黑色素瘤在内的多种肿瘤中表达升高[69]，这表明 IL-6 可

能在癌症发生过程中的具有非常重要的作用。因而研究 IL-6/STAT3 信号通路在胃癌中的作用机制对于理解肿瘤恶性表型的分子基础至关重要。

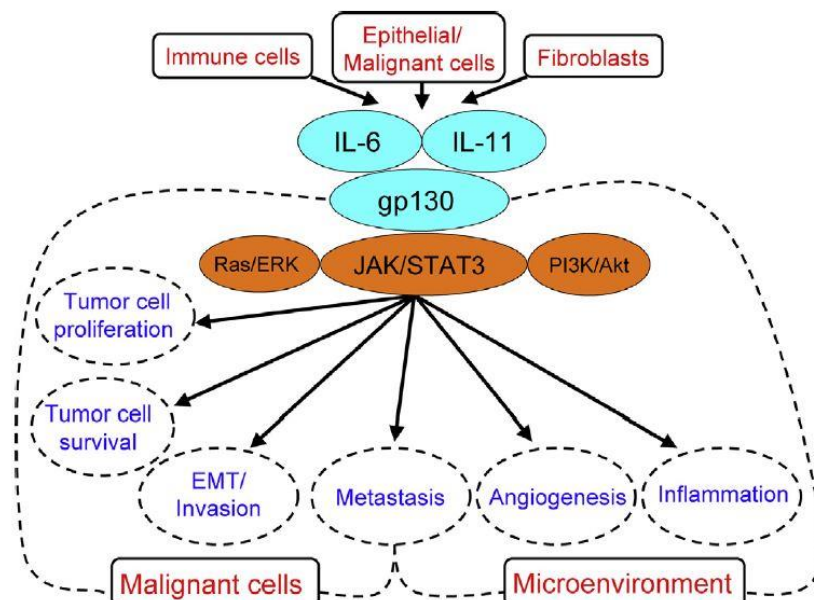


图 2 肿瘤中的 IL-6 和 IL-11 信号通路。免疫细胞、成纤维细胞以及上皮细胞产生 IL-6 和 IL-11 能够激活 JAK-STAT3、SHP-2-RAS-ERK 通路和 PI3K-AKT 通路，进而促进细胞增殖、存活、EMT、侵袭、转移、血管生成和炎症反应。图片引自 *Semin in Immunol* 2014[4].

1.3.1 IL-6 信号通路传导机制

IL-6 能够同细胞膜表面的 IL-6 受体 α 结合，形成复合体并同 gp130 形成二聚体 [70] (图 3)。此外，生理情况下细胞中存在可溶性的 IL-6 受体和 gp130，这些分子由细胞内的酶将膜上的 IL-6 受体特异性剪切产生[71]。分泌性的 IL-6 受体在不依赖膜 IL-6 受体情况下也能够激活 gp130。这种机制可能是介导炎症促进反应发生的主要机制，而经典的膜 IL-6 受体可能介导了炎症抑制反应的发生[72]。Gp130 同 IL-6/IL-6 受体复合物结合后，3 种主要的信号通路能够被激活。第一种是 JAK-STAT 信号通路。结合造成了 gp130 的二聚化，招募了相关的 JAK 磷酸化激酶(JAK1, JAK2 和 Tyk2) 靠近并促使它们发生相互磷酸化和激活。JAK 激酶磷酸化 gp130 在胞浆内的酪氨酸位点，因而创造了能够提供 STAT 蛋白、SHP-2 蛋白和 SOCS3 蛋白的 SH2 结构域结合的位点。结果，JAK 激酶直接磷酸化了 STAT3 和 STAT1，而激活的 STAT 蛋白形成了二聚体并进入细胞核发挥转录作用。Gp130 的二聚化显著激活 STAT3，

也相对较弱激活 STAT1。IL-6 诱导的 STAT3 激活能被 SOCS3 快速抑制,后者是 STAT3 的靶基因所编码的蛋白。SOCS3 抑制 STAT3 激活的机制是其能够同时结合 JAK 和 gp130 并直接覆盖 JAK1, JAK2 和 TYK2 的催化结构域 [73-75]。激活的 STAT3 蛋白抑制剂 (Protein inhibitor of activated STAT3, PIAS3) 也被报道是 STAT3 的内源性抑制剂,其通过结合 STAT3 二聚体发挥作用[76]。但近期一项研究发现近期一项研究发现, STAT3 的持续激活可能和 IL-6 受体同 EGFR 的联系有关,这种结合对 STAT3 的激活能够逃逸 SOCS3 的抑制,因为 EGFR 不能被 SOCS3 识别[77]。这种激活的信号通路能够导致强烈的癌基因激活效应。第二种信号通路是 SHP-2/Ras/ERK 信号通路。SHP-2 的募集通过 JAK 激酶和 Gab1 结合导致自身的磷酸化,这是该信号通路的启动反应。最后一种 gp130 信号通路是 PI3K-AKT 通路,这条通路的激活机制尚不明确,但可能同 SHP-2 和 Gab1 有关[78, 79]。

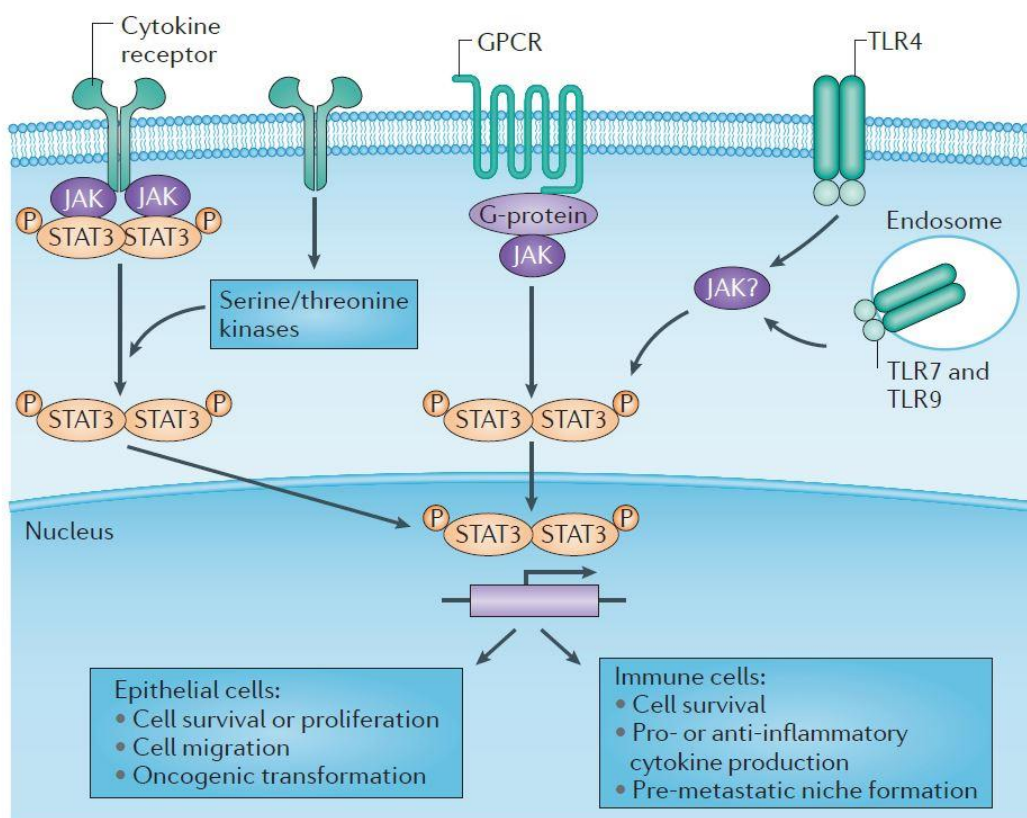


图 3 肿瘤中 JAK-STAT3 通路的激活机制。图片引自 Nat Rev Cancer,2014[10]

1.3.2 IL-6 和细胞增殖、存活、分化.

IL-6 通过多条信号通路对肿瘤细胞的生长发挥促进作用[80]。除细胞增殖和存活外, IL-6-STAT3 分子通路还调控 Th17 细胞、巨噬细胞以及树突状细胞的分化[81]。IL-6 上调造成的 STAT3 激活能够上调 Cyclin D1、D2 和 B1, 以及 c-Myc, 并抑制 Cdk 抑制分子 P21 的表达, 因而促进细胞进入细胞周期循环。IL-6 也是细胞存活的重要调控分子, 能够帮助肿瘤细胞逃逸应急和化疗药物造成的细胞死亡[80]。IL-6 激活的 STAT3 能够促进存活相关蛋白的表达, 包括 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1、Survivin 和 XIAP。这些蛋白的上调和持续激活的 STAT3 通常同肿瘤化疗耐药的机制有关[82]。另外, IL-6 通过增加端粒酶活性抑制细胞衰老, 从而促进细胞生长。IL-6 也能够通过介导 EGF 和 HGF 家族的相互作用来促进增殖 [83, 84]。IL-11 也通过类似的机制促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡 [85, 86]。

1.3.3 IL-6 同侵袭、血管生成和转移

IL-6 还能够在多种肿瘤细胞中促进细胞转移和侵袭[7, 87-91]。JAK-STAT3 信号通路的激活诱导产生基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP) 的 MMP-2、MMP-7、MMP-9, 这些蛋白能够降解细胞外基质, 促进肿瘤侵袭。上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是机体发育过程中的正常生理现象, 肿瘤侵袭入其他组织和血管中并形成远处转移的过程中也出现了 EMT 的现象[92-96]。炎症是 EMT 的一个重要启动因子, IL-6 也被发现在多种肿瘤细胞中够诱导 EMT 现象的发生[97-99]。

IL-6 能够在实体瘤中促进肿瘤血管生成。近期越来越多的证据表明 IL-6 信号通路的激活可能是 VEGF-A 抗体治疗癌症失败的原因之一[100]。IL-6 发挥促进血管生成的作用主要通过 STAT3 信号通路实现。后者的激活导致缺氧诱导因子 1 (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 介导的 VEGF-A 的转录, 同时也促进了内皮细胞增殖和迁移[100-102]。HIF-1 α 同样被报道是 STAT3 的靶分子[103]。IL-6 还可能通过影响免疫细胞的表型, 以增加血管生成因子的分泌来达到促进肿瘤细胞对抑制血管生成药物的耐受能力[100]。对 IL-6 的靶向治疗能够抑制 Notch 配体 Jagged-1 的表达和卵巢癌细胞的血管微环境[104]。在结肠癌患者中, 血清中 IL-6 水平越高, 肿瘤分期越差, 转移性越强[105]。

此外, IL-6 还通过其他机制促进肿瘤转移。在 IL-6 表达较高的器官如脑、肺、肝脏、骨髓等部位, 循环肿瘤细胞更趋向于定植和建立转移灶[80]。例如, 库普夫细胞中 NF- κ B 的激活促进 IL-6 产生, 后者进而促进肺转移癌细胞在肝脏的生长[106]。人黑色素瘤细胞中 STAT3 的激活通过增加 FGF、MMP-2、VEGF-A 等促侵袭和血管生成分子的表达诱导肿瘤脑转移灶的形成和生长[107]。此外, 结肠癌病人循环中高水平的 IL-6 同肝转移形成率相关[108]。乳腺癌的骨转移也同上调的 IL-6 表达和激活的 gp130-STAT3 信号通路有关[109]。

1.3.4 IL-6 通路同 MicroRNA

microRNA 是一种重要的调控基因表达的内源性调控机制, 其表达在多种肿瘤细胞中均有明显的变化[110]。miRNA 同样在炎症-肿瘤转化过程中发挥重要的调控作用[111]。细胞因子能够调控 miRNA 的转录和表达, 而 miRNA 也能够反过来调控细胞因子的信号通路相关蛋白的表达。近期研究发现 miRNA 在 IL-6 介导的细胞存活和 IL-6 通路的调控中占重要角色(图 4)。miR-21 被认为是在多种肿瘤细胞中高表达的癌基因。它在肿瘤发生和转移中的功能可能同其靶基因 PTEN、Spry1 等抑癌基因有关[111]。miR-21 在恶性骨髓瘤和胆管细胞癌等高表达 IL-6 的肿瘤中均表达异常升高[112, 113]。进一步研究发现 IL-6 刺激后, STAT3 被募集到 miR-21 的启动子区域并促进 miR-21 的转录本的表达[112]。miR-21 还在 IL-11-STAT3 通路的抑制凋亡通路中发挥关键作用[114]。另外, 在胆管癌细胞中过表达 IL-6 后可发现 let-7 的表达升高, 而其靶基因 NF2 的表达受到抑制[113]。相反, let-7 的表达水平降低被发现在肺癌、Burkitt 淋巴瘤和乳腺癌中是癌基因 NF- κ B 激活导致的 LIN-28B 这种 let-7 的抑制因子升高的结果。有趣的是, let-7a 能够直接靶向抑制 IL-6 本身, 因而 LIN28B 导致的 let-7 降低能够引起 IL-6 表达的升高, 进而促进细胞恶性转化[115]。IL-6 还能够通过促进 miR-17/92 簇的表达进而促进自身信号通路的转导。SOCS1 是 IL-6-STAT3 信号通路的抑制剂, 近期研究发现其也是 miR-17/92 家族 miRNA 的靶分子。因此, 在骨髓瘤的细胞系中抑制 miR-17/92 的表达后, SOCS1 的表达被上调, 而 STAT3 的磷酸化水平被显著抑制[116]。miR-204、miR-211 和 miR-379 在乳腺癌细胞中能够直接靶向 IL-11 的 mRNA 发挥调控作用[117]; 另外, 不少 miRNA 也能够调控 IL-6 通路: miR-26a 通过抑制 IL-6 的表达抑制肝癌细胞生长和转移[118]; miR-146a 在小鼠巨噬细胞中通

过抑制 Notch1 信号通路抑制 IL-6 的产生[119]；miR-30c 通过抑制 IL-11 的表达抑制乳腺癌细胞的化疗耐受[120]； miR-19a 能够促进 JAK-STAT3 信号通路调控 SOCS3 的表达[121]。

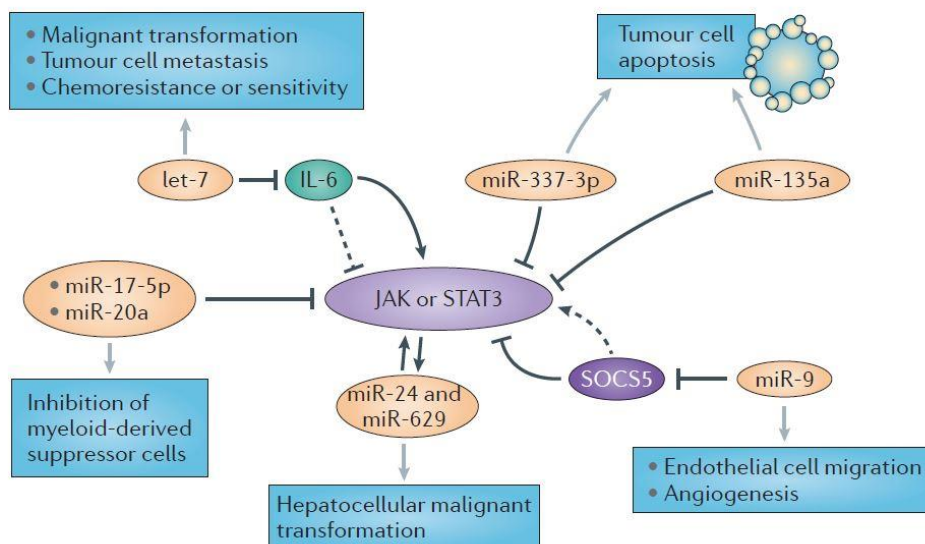


图 4 参与调控 JAK/STAT 通路的 miRNA.图片引自 Nat Rev Cancer,2014[10].

综上所述，在炎症刺激下，IL-6 信号通路在多种肿瘤中通过不同的信号通路调控激活 STAT3，并维持其激活状态，进而促进肿瘤的恶性转化和恶性表型的维持。那么在胃癌中，Hp 感染造成的炎症诱发的 IL-6-STAT3 通路激活发挥如何的作用？其机制如何？

2. STAT3 是胃癌发生关键信号通路

2.1 IL-6 介导 Hp 感染导致胃癌的过程

多种研究表明, IL-6 是胃癌的重要驱动因素[122, 123]。流行病学研究表明, IL-6 同胃癌患者的预后相关。胃癌患者血清高水平的 IL-6 是一个独立的预后危险因素[123]。IL-6 和 IL-11 在胃癌患者的胃黏膜中表达明显升高, 而且同肿瘤的恶性表型密切相关, 并影响预后[124]。在胃癌的另一项研究中, IL-11 受体同肿瘤血管浸润和侵袭有关[91]。STAT3 的激活同样同胃癌病人较差的预后相关[125]。研究表明 STAT3 的激活, 导致胃癌发生并促进胃癌细胞增殖的机制可能同 IL-11 的诱导有关[124]。Hp 的感染是启动大部分胃癌的主要原因, 而 Hp 的主要致病毒力蛋白 CagA 能够同 SHP-2 结合, 引发异常的 ERK 信号通路激活[70]。胃黏膜感染 Hp 后, 尤其是 CagA 阳性的 Hp, 能够发生持续的 ERK 信号通路的激活, 但同样激活了 STAT3 的和 IL-11 的产生[124]。

动物实验也证实了 IL-6 在胃癌发生发展中的重要作用。研究者构建了 Gp130 的转基因小鼠, 发现在 3 个月后胃黏膜出现了异型增生和腺瘤[126-129]。这类小鼠中由于缺乏 SOCS3 的抑制作用, 因而出现了 STAT3 和 STAT1 的异常激活[126]。Gp130 的配体 IL-6 和 IL-11 在这些小鼠的肿瘤中表达明显增加[130]。而且, 胃癌中 STAT3 和 Smad3 以及 mTORC1 等通路也存在上下游关系[128, 131]。另外, 在多种小鼠胃癌模型中的研究发现, IL-11 的 mRNA 在肿瘤组织中明显升高; 而对小鼠给予 IL-11 的缓慢刺激也能够在贲门和胃窦部位诱发癌前病变; 胃癌患者的肿瘤组织中 IL-11 表达明显升高; 这些结果表明 IL-11 在胃癌发生中的重要作用[129]。近期研究发现, IL-6 在人和小鼠胃癌组织中的间质纤维细胞中广泛存在, 而且胃癌的致癌物 MNU 在 IL-6 敲除的小鼠中不能诱发肿瘤[132]。这些研究强烈提示 IL-6 和 IL-11 在胃黏膜上皮恶性转化和胃癌恶性表型进展中发挥了关键作用。

2.2 STAT3 持续激活是胃癌发生的驱动因素

2.2.1 STAT3 激活诱发胃癌

胃癌的小鼠模型可以分为炎症型和非炎症型。炎症型胃癌模型一般而言是由 Hp

感染引起的[133-135]，具有其他的基因型改变的背景，包括胃泌素高表达[136, 137]或者抑癌基因的缺失。其他的模型有肺 Hp 感染造成的基因组改变和慢性炎症，如 gp130^{757FF} 突变[70, 129, 130, 138, 139]，II 类 MHC 突变，IL-1 β 过表达[140]，以及 COX-2-2/PGES1 过表达。

在其中，gp130 突变小鼠的胃癌模型的将研究者兴趣引入到 STAT3 激活在胃癌中的意义。这种转基因鼠是在 gp130 的 757 酪氨酸位点进行突变后敲入小鼠，而 gp130 是 IL-6 家族的共受体。这样的突变阻止了配体结合后下游的 SHP-2 和 SOCS3 募集，进而导致 RAS/ERK/AP-1 信号通路的抑制[127]。SOCS3 通常发挥负反馈抑制 STAT3 的功能[127, 138]，而当上述突变造成 SOCS3 的负反馈功能消失后，STAT3 就会出现持续的异常激活。因此，小鼠胃远端迅速出现了组织学同人胃癌进展阶段非常类似的肿瘤。这些阶段特征同 Correa 胃癌发生模式类似，包括胃炎、萎缩、粘液肠化生、不典型增生和粘膜侵袭，但并未出现转移。在这个模型中，STAT3 的活性形式显著升高对肿瘤的进展极为重要[128, 139]。STAT3 的基因敲除小鼠会导致胚胎死亡，但 gp130 突变同时有 STAT3 单倍体敲除的小鼠形成的胃癌肿瘤大小明显减低[128, 139]。

在 gp130 突变小鼠中，如果 gp130 不被激活，STAT3 的激活和肿瘤发生也不会出现。IL-11 也是 gp130 的配体，其在该模型中是不可或缺的刺激因素，这是因为如果在该小鼠模型中进一步敲除 IL-11 的共受体 IL-11 受体 α ，则 STAT3 不会激活，肿瘤发生率也明显降低[126, 129]。对 gp130 突变小鼠采取无菌饲养和抗生素处理，结果发现 STAT3 的激活程度降低，肿瘤发生率也显著下降[139]。因此，STAT3 的激活对于 gp130 突变小鼠胃癌发生至关重要，这依赖于 IL-11 同受体 gp130 的结合及胃的微生物环境。

在其他不依赖于 gp130 突变的胃癌模型中同样发现 STAT3 的异常激活和 IL-11 的表达。胃泌素缺乏的小鼠在 12 个月后能够发生胃癌，同时伴有萎缩、炎症和化生。这种肿瘤中能够检测出 IFN- γ 介导的炎症造成的 STAT3 激活[141]。此外，缺少炎症刺激因素条件下，STAT3 激活和肿瘤发生的情况均明显减弱。有趣的是，在高胃泌素血症的小鼠中同样出现了 gp130 激活和下游的 STAT3 异常激活。敲除 H+K+ATP 酶后，小鼠出现胃酸缺乏，高胃泌素血症以及肿瘤形成，同时有 IL-11 表达升高和 STAT3 激活[129]。此外，自身免疫性胃炎小鼠模型被发现 IL-11 表达升高和 STAT3 激活[142]。最后，过表达 COX-2、K19-C2mE 以及 K19-Wnt1C2mE 的转基因小鼠均

能够出现胃底肿瘤，以及 IL-11 表达和 STAT3 激活[129]。因此虽然启动胃癌发生的分子众多，但目前为止多数小鼠模型均能观察到 STAT3 激活引发的炎症反应。近期研究进一步支持了该观点，研究者通过小鼠尾静脉注射 IL-11 持续 7 天的方法发现胃黏膜出现炎症和胃底的明显萎缩[143]。

2.2.2 STAT3 的激活机制

Hp 是胃癌发生的重要危险因素。许多研究证明宿主对 Hp 感染的反应是细菌、胃上皮细胞、免疫细胞三者之间通过一系列细胞因子及其受体和细胞内信号通路转导介导的。目前的观点多认为胃上皮细胞和浸润的免疫细胞均能够产生炎症因子，并维持慢性炎症状态，最终导致胃癌。众多信号通路中，STAT3 的激活是研究最为深入的之一，但 STAT3 活性对于 Hp 感染的免疫反应的作用及其是否介导了细菌引起的恶性转化等问题仍然不清楚。

STAT3 在胃黏膜和免疫系统中均发挥重要作用 [127, 129, 130, 138, 139]。通过控制细胞内特异的分子事件发生，STAT3 介导了黏膜慢性感染 Hp 过程中炎症变化和肿瘤发生机制。Hp 的 CagA 蛋白同 STAT3 的激活关系最为密切。

CagA 从 Hp 穿入胃上皮细胞后，定位于细胞膜内层，其 C 端的酪氨酸位点会被 src 和 c-Abl 激酶磷酸化[144, 145]。CagA 被证实在穿入细胞后同多条信号通路相互联系，这些通路多与细胞生长和运动有关[144, 146, 147](图 5)。目前认为 SHP-2 是 CagA 最被广泛研究的细胞内靶分子。磷酸化的 CagA 能够特异性结合和激活 SHP2，导致 SHP-2/RAS/ERK 信号通路的激活，进而异常调控细胞的极性和运动。另外，小干扰 RNA 沉默 SHP2 能够抑制 CagA 诱导的 ERK 活化[148]。因此，SHP2 是 CagA 在胃上皮细胞中的关键介导分子。

SHP2 同 gp130 信号通路的联系使我们不能不考虑 STAT3 在 CagA 促进胃癌机制中的重要角色[127, 138]。研究者发现，CagA 阳性 Hp 感染的胃癌患者胃上皮中出现 STAT3 的显著激活[124]。这为 STAT3 和 CagA 之间的联系提供了证据，并进一步为 CagA 在胃上皮细胞中驱动 STAT3 磷酸化提供了理论基础[149]。近期研究发现，CagA 的磷酸化是 STAT3 激活的必要条件，这是由于将 CagA 的这些酪氨酸位点突变为丝氨酸后，CagA 诱导的 STAT3 激活现象被消除[149]。另外两项研究同样证实了类似的结论[65, 150]。

Hp 的另一个毒力因素 VacA 能够通过激活 Bcl-2 家族蛋白而导致胃上皮细胞的凋亡。STAT3 的功能是抑制凋亡，因而 VacA 在胃癌细胞系中导致的 STAT3 抑制及 Bcl-2 和 Bcl-XL 并不意外[151]。虽然在体内 STAT3 同 VacA 的关系尚不明确，但是慢性 Hp 感染在人和小鼠模型中造成的 STAT3 激活表明 VacA 对 STAT3 的抑制作用可能被 Hp 的其他机制所掩盖[152]。

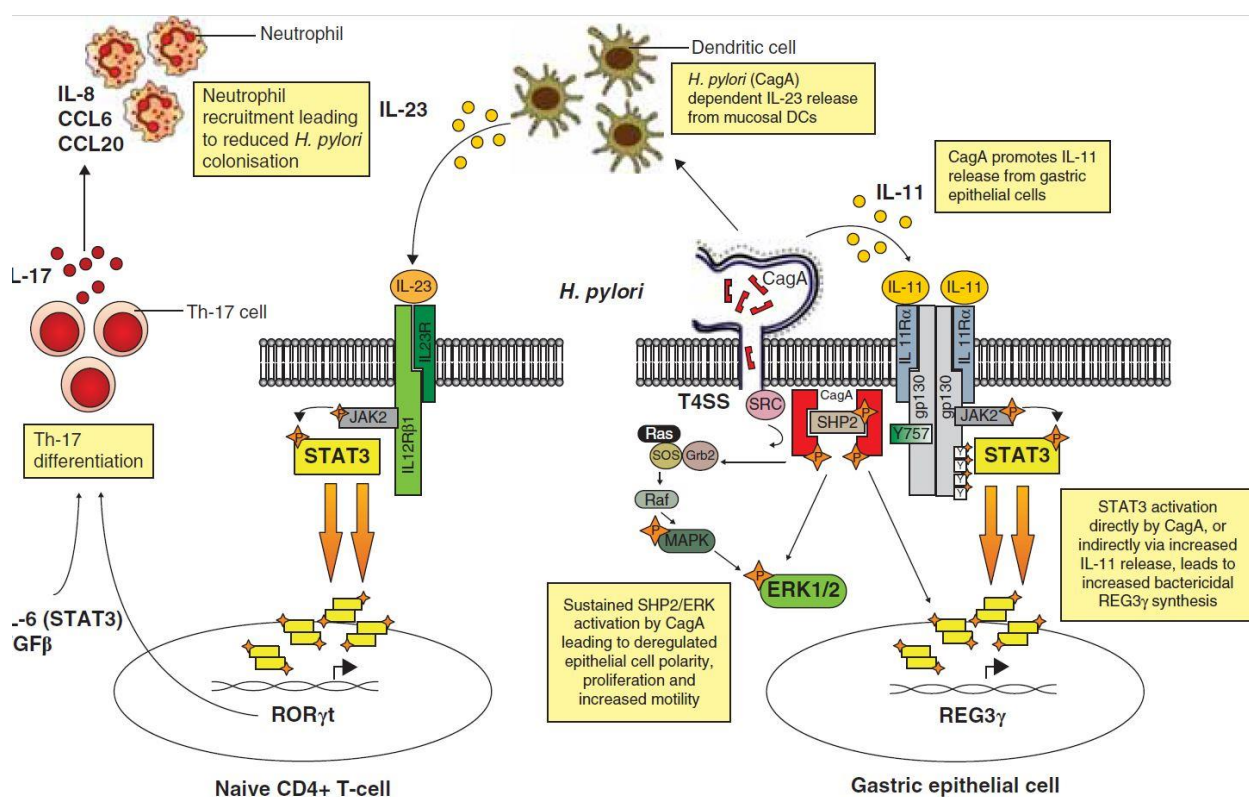


图 5 CagA 通过 STAT3 调控胃黏膜炎症的发生。图片引自 Giraud AS, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012[152]。

2.2.3 STAT3 引发胃上皮细胞基因改变

STAT3 已知能够转录调控许多靶基因。研究者深入探索了胃癌中 gp130/STAT3 通路驱动基因谱。目前普遍认为大部分胃癌的发生部位远端胃对 IL-11 反应敏感，后者特异性激活 STAT 而不影响 MAPK/ERK 通路[129]。IL-11/STAT3 激活的基因谱可分为两类：胃窦和胃体部。胃窦部早期基因改变，包括 Reg 家族基因，Clusterin，

Gremlin-1, gp130, SOCS3, Jak1, Timp1 和 Gas1[129]。

相比之下，胃体黏膜的基因改变则更为多样化，主要包括：1.增殖相关基因，如 Reg 家族基因，Igf1, Gsdmc1, Grem1 和 Blm1；2. 免疫相关基因，如 SerpinA 家族基因，Dmbt1, IL-33, Spp1, MyD88 等；3.信号转导基因，如 Socs3, Jak3 和 Jun b[70, 129]。这些基因中大部分均被报道同肿瘤相关，尤其是 Reg 家族蛋白[153, 154]、Blm1[155]和 Grem1[156, 157]。

不少其他研究也在胃癌中探讨了 STAT3 的调控基因。研究发现，STAT3 的激活同 VEGF、c-Myc、Survivin、MMP-7、CD44v6 和 CyclinD1 等相关[158]，这些靶基因中大部分也相继在小鼠模型中被证实[128]。其他研究还发现 survivin 和 Bcl-2 的表达依赖于 STAT3 的激活[128, 159]。总而言之，胃黏膜上皮中一系列基因被 STAT3 直接调控，这些基因在胃上皮细胞恶性转化过程中起了推动作用。

3. CypB 同 STAT3 功能关系密切

3.1 Cyclophilin 家族基因

亲环素蛋白 (Cyclophilins) 是一组具有肽基脯氨酰异构酶活性的蛋白[160, 161]。这类蛋白能够将含有脯氨酸的肽链由顺式转化为反式，同时能够辅助蛋白折叠。该蛋白在原核和真核细胞中均广泛表达，最早在 1984 年被发现是环孢素 A 的细胞内结合蛋白[162]。但是 5 年后的 1989 年才发现这个蛋白其实同 18kDa 的、具有肽基脯氨酰异构酶活性的 CypA 事实上是同一种蛋白[163]。

目前为止，一共有 17 种亲环素蛋白在人类基因组被发现，但其中大部分蛋白的功能尚不明确，只有 7 种亲环素蛋白具有异构酶活性或能够结合环孢素 A。亲环素家族蛋白具有一个含有 109 个氨基酸的共同结构域，即亲环素样结构域。这个核心结构域周围被特异性的结构域所围绕，这些结构域决定了不同类型亲环素家族蛋白在细胞内的定位和功能。一部分亲环素家族蛋白的定位已经被陆续鉴定，如 CypA 和 Cyp40 主要在细胞质溶胶中；CypB 和 CypC 位于内质网的膜上；CypD 位于线粒体；CypE 和 CypA 在细胞核内被发现[160]；CypNK 主要在 NK 细胞中出现[164]。

在过去 20 年中，许多研究重点被放在 CypA、CypB 和 CypD 上，这是由于这些蛋白同特异性的细胞功能和疾病进展有密切关系；而其他亲环素家族蛋白的特点和在疾病进展中发挥的作用则尚不明确。CypA 是细胞质中丰度最高的蛋白之一，其含量约占细胞质总蛋白含量的 0.1%，其功能同细胞内蛋白的折叠、运输、免疫修饰和细胞信号转导有关[165]。CypA 在炎症刺激或 ROS 反应下能够被自发的从细胞分泌[166]，而细胞外的 CypA 碎片能够作为炎症介导因子促进炎症反应并通过细胞表面受体 CD147 发挥对中性粒细胞和单核细胞的调控作用[167]。一些研究发现，CypA 的基因敲除小鼠和沉默的细胞系相关的实验表明 CypA 在细胞增殖和存活中意义并不大[168, 169]。CypA 的表达上升在多种病理过程中发挥作用，如肺纤维化过程中炎症反应[170]、类风湿性关节炎中的炎症反应和软骨破坏[171-173]，ROS 和炎症的恶化[174, 175]。近期研究也发现 CypA 在肿瘤细胞中表达升高并促进转移[176]。

CypD 是另一个关键亲环素家族蛋白，其定位于线粒体，能够调控线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP)。因此它被认为在线粒

体功能失常导致的多种疾病中具有作为药物靶点的潜能[177, 178]。线粒体被认为是控制细胞不同部位钙离子浓度的防火墙。线粒体外膜上的钙离子主要通过电压依赖的离子通道（voltage-dependent anion channel, VDAC）运输。当 MPTP 开放时，钙离子迅速从线粒体向细胞质外流，产生钙离子信号。一些肝细胞、神经元细胞或心肌细胞的研究证实 CypD 是 MPTP 开放的关键调控因子[179]。持续的 MPTP 的开放导致细胞出现不同于细胞坏死性凋亡的一种坏死状死亡，这种死亡由 RIPK3 介导[180]。近期发现线粒体通透性增加造成的细胞坏死通过两种不同的信号通路介导，而两种途径的同时抑制——如 CypD 的抑制和 RIPK1 抑制——能够对缺血再灌注损伤进行保护[180, 181]。

3.2 CypB 的功能

CypB 是第二个被鉴定的亲环素蛋白[178, 182]。它同 CypA 的不同点在于其 N 端具有一个可切除序列，用于引导蛋白进入内质网。环孢素 A 和其他亲环素抑制剂能够特异性改变 CypB 的亚细胞定位，将其从内质网移除，并促进它向细胞外的分泌。同 CypB 不同，CypA 在抑制剂作用下不会分泌到细胞外。细胞外的 CypA 和 CypB 碎片同细胞间信号转导和炎症反应有关，但单独的 CypB 似乎不能诱导炎症相关细胞因子的产生[166]。CypB 在病毒感染等疾病中发挥宿主的介导作用。

3.2.1 CypB 是调控丙型肝炎的病毒 RNA 聚合酶的调控分子

病毒复制依赖宿主的基因组来源的相关分子的调控。研究者发现细胞内的 CypB 对于 HCV 基因组复制的复制效率至关重要。CypB 同 HCV 的 RNA 聚合酶 NS5B 结合并直接促进它同 RNA 结合活性。通过小干扰 RNA 沉默内源性 CypB 表达的方式能够降低 HCV 复制的效率；而且通过其他方式诱导 NS5B 结合 CypB 也得到了同样的结果。因此 CypB 是 HCV 复制相关复合体的关键调控因子，这项研究为 CypB 作为抗病毒治疗的靶点提供了理论基础。

3.3.2 CypB 细胞内的催乳素/CypB 复合体促进转录

催乳素的细胞核内转运机制被广泛研究。催乳素被认为同 CypB 结合，后者介导了催乳素的促进增殖、细胞生长和细胞核内的催乳素运输等过程。将 CypB 的 PPI 活性结构域移除后，这些现象则消失。研究者发现，细胞核内的催乳素/CypB 复合体

能够直接同 STAT5 结合，导致 STAT 抑制剂 PIAS3 的表达降低，进而促进 STAT5 同 DNA 结合发挥对下游靶基因的转录调控作用[183]。

3.3 CypB 与肿瘤

CypB 被发现在多种肿瘤中发挥促癌作用。

3.3.1 CypB 与胰腺癌

研究者收集了肿瘤细胞培养液的上清并分析其中的蛋白组分，发现 CypB 在其中明显升高[184]。随后将 CypB 作为血清标志物，检验胰腺癌患者血清中 CypB 的含量，结果证实这种检测方法具有作为胰腺癌诊断的潜力[185]。

3.3.2 CypB 和乳腺癌

研究者在乳腺癌细胞中通过 RNAi 技术沉默了 CypB 的表达，随后发现 663 个转录本被 CypB 调控，而这些基因中大部分同细胞增殖、运动和肿瘤恶性表型相关。进一步通过 PCR 验证发现 STMN3、S100A4、S100A6、c-Myb 等基因都随 CypB 的沉默而表达下降。接下来的功能实验证实 CypB 的下调降低了细胞增殖、生长和运动。细胞免疫荧光和免疫组织化学实验发现在配对的乳腺癌组织中，CypB 的表达同乳腺癌的进展密切相关。这些结果提示 CypB 在乳腺癌中可能通过调控细胞增殖和运动促进恶性表型进展[186]。另一项乳腺癌的研究也发现，CypB 参与调控催乳素引起的乳腺癌的发生和发展。其机制可能同乳腺癌相关的基因表达、癌细胞生长增殖和运动有关[187]。

3.3.3 CypB 与骨髓瘤

研究者在骨髓瘤中发现，CypB 同 STAT3 功能相关，而同家族的成员 CypA 则不明显。CypB 的沉默抑制了 IL-6 诱导的 STAT3 转录活性，而不影响 STAT3 的磷酸化。CypB 被发现能够结合 STAT3 的靶分子启动子区，而且沉默 CypB 后 STAT3 的细胞内定位出现了变化，这说明 CypB 同 STAT3 在细胞核内的功能有密切关系。相比之下，CypA 的沉默抑制了 IL-6 诱导的 STAT3 磷酸化和细胞核内转位。Cyp 的抑制剂环孢素 A 的使用造成了类似的结果。但是 IL-6 造成的 STAT1 的激活并不会被 Cyp 的沉默所影响。结果，Cyp 的沉默造成了 IL-6 通路向 STAT1 下游信号通路倾斜。此外，Cyp 的删除或环孢素 A 的使用促进了 IL-6 依赖的多发骨髓瘤细胞的凋亡，但

IL-6 不依赖的细胞系则不受影响。因此 Cyp 蛋白促进了 STAT3 的抑制凋亡作用。总而言之，CypB 和 CypA 在肿瘤中通过不同方面发挥重要功能[15]。

3.3.4 CypB 与头颈肿瘤

研究者发现在头颈部肿瘤中 CypB 的表达同放疗的敏感性相关。通过小干扰 RNA 沉默 CypB 或者环孢素 A 抑制 CypB 后发现肿瘤细胞的放疗敏感性明显升高，而 DNA 损伤修复降低。通过免疫组化对 CypB 在患者肿瘤组织中的水平可见 CypB 的表达同放疗后的疗效有明显相关关系[188]。

3.3.5 CypB 与肝癌

研究者在肝癌中研究了缺氧环境诱导 CypB 表达的功能和机制。结果发现，HIF-1 α 在缺氧环境下诱导 CypB 的产生。有趣的是，CypB 能够保护肿瘤细胞抵抗缺氧和顺铂诱导的细胞凋亡。进一步研究发现，CypB 在血管生成和葡萄糖代谢等过程中能够反馈性调控 HIF-1 α 的表达。研究者还在体内实验中验证了 CypB 调控肿瘤化疗耐药的功能。最后，肿瘤组织中研究 CypB 的表达结果证实 CypB 在 78% 的肝癌和 91% 的结肠癌组织中均表达明显升高，且其表达同肿瘤病人的预后相关。

另一项研究发现 CypB 在肝癌细胞中能够同受体 CD147 结合，从而保护细胞抵抗氧化应激反应[189]。

3.3.6 CypB 与胶质瘤

研究者发现 CypB 向胶质瘤细胞提供关键的存活相关信号通路。功能实验发现 CypB 的低表达在体内和体外抑制细胞增殖和存活，随后发现 CypB 抑制剂环孢素 A 的使用得到同样的结果。抑制 CypB 的表达引起 Ras 信号通路的过度激活、细胞衰老信号的诱导、以及 MYC、突变型 P53、JAK/STAT3 信号通路的丢失。在 CypB 沉默的胶质瘤细胞中可观察到 ROS 增加、内质网扩展以及异常的未折叠的蛋白增多，这表明 CypB 抑制 ROS 和内质网应激。CypB 下游的促进细胞存活的突变癌基因表达可能是胶质瘤预后较差的原因[14]。

由此可见，CypB 在多种肿瘤中高表达，且同 STAT3 的激活和下游基因的转录功能密切相关。那么胃癌中 CypB 的表达如何？其功能是否同 STAT3 在 Hp 感染和炎症反应刺激条件下持续的激活有关？这些问题将是我们研究的重点。

3.4 CypB 受调控机制

从以上研究不难看出，CypB 在肿瘤中表达异常增高。那么 CypB 的上游受到何种信号通路调控？一些研究就这个问题进行了探讨。

3.4.1 CypB 与转录因子

研究者发现，CypB 的表达受到缺氧条件的诱导。首先，HIF-1 α 能够在缺氧条件下直接促进 CypB 的转录。研究发现肝癌细胞在缺氧环境培养 12 小时后，CypB 的 mRNA 和蛋白水平均表达增高，且增高趋势有时间依赖性。而对肝癌细胞系采用 HIF-1 α 诱导剂 CoCl₂ 或 DFO 刺激后 CypB 的表达同样增高明显。双荧光素酶报告基因实验证实，HIF-1 α 在缺氧条件下被诱导表达之后能够直接结合 CypB 的启动子区，促进后者的转录。这些实验表明 HIF-1 α 能够促进 CypB 的转录和表达[16]。

3.4.2 CypB 与转录后修饰

CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein) 是内质网应激的效应因子，其在肿瘤细胞存活中发挥重要作用。缺氧环境是通过内质网导致细胞死亡的重要应激刺激，尤其在实体肿瘤中。研究者发现在缺氧条件下，CypB 同 P300 结合能够促进 CHOP 的泛素化和蛋白更新。研究发现 CypB 能够直接结合 CHOP 的 N 端 α 螺旋结构域并同 P300 配合诱导 CHOP 的泛素化。研究者还发现在缺氧条件下 CypB 被 ATF6 促进转录。因此，CypB 通过调控 CHOP 的泛素化修饰影响 CHOP 降解，进而抑制了缺氧造成的细胞死亡[190]。

3.4.3 MicroRNA

MicroRNA 近年来研究逐渐深入的具有重要调控功能的小分子。其通过碱基互补序列识别或者结合靶基因 mRNA 的非编码区域，发挥抑制靶基因编码蛋白表达的表观调控作用。MicroRNA 最早被发现低等生物的分化和发育过程中发挥重要作用。在肿瘤中，miRNA 通过对靶基因的调控影响多种肿瘤的恶性表型。而胃癌中 CypB 的异常表达同 miRNA 的关系尚无研究探讨。

3.5 MicroRNA-520d-5p 可能参与调控 CypB

3.5.1 MicroRNA 是调控胃癌增殖的关键因素

许多研究发现，miRNA 被发现在癌症包括胃癌的发生和发展也发挥了不可忽视的作用。首先，大多数肿瘤组织中 miRNA 的表达同癌旁正常组织相比具有显著的差异。针对 B 细胞淋巴瘤的研究发现，13 号染色体位点扩增导致 miR-17-92 簇表达显著增加[191]，胃癌、肝癌、乳腺癌等恶性肿瘤中 miRNA 的表达谱出现了紊乱，提示 miRNA 表达失调可能与肿瘤发生发展密切相关；目前已知的 miRNA 一半以上位于肿瘤相关基因位点，如染色体断裂位点、杂合性缺失和脆性位点（Fragile Sites）等等[192]，提示 miRNA 表达紊乱是肿瘤发生的关键分子变化；此外，联合 7 个 microRNA 可以较好预测胃癌患者的生存率和复发率[193]，这说明表达异常的 microRNA 可能影响肿瘤患者的预后；最重要的是，人为调控 microRNA 在肿瘤组织中的表达，可以有效抑制肿瘤恶性表型。在胶质瘤中上调 miR-128 能显著抑制增殖和自我更新[194]。这些证据共同表明，microRNA 同肿瘤包括胃癌的发生发展密切相关[195]，且具有良好应用价值。

那么 CypB 在胃癌中表达异常变化是否同 miRNA 的表达失调有关呢？MicroRNA 是否在 Hp 感染造成的炎症引发胃癌的病理过程中参与了 CypB 的调控呢？

3.5.2 miR-520d-5p 是抑癌基因

通过生物信息学研究方法，我们发现 miR-520d-5p 是潜在的 CypB 的调控 miRNA。既往研究表示，miR-520d-5p 是一个抑癌 miRNA。

研究发现，在乳腺癌中 miR-520 家族 miRNA 可能通过直接靶向 RELA 强烈抑制 NF-kB 通路，并降低炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达和分泌。通过体内和体外实验，研究者发现 miR-520 家族基因能够抑制乳腺癌细胞转移，基因芯片的结果表明这些 miRNA 发挥功能的机制可能同 TGF- β 信号通路有关。进一步研究发现，miR-520/373 的抑制转移功能由其对靶分子 TGF- β 受体的直接抑制介导。miR-520 同 TGFBR2 的表达在 ER 阴性的乳腺癌病人组织中负相关，而在 ER 阳性的病人中则无相关。值得注意的是，miR-520 表达降低同 ER 阴性的肿瘤淋巴结转移有关。这些结果表明 miR-520 家族基因在乳腺癌中发挥抑制炎症信号通路和转移的作用[196]。

另一项研究发现，miR-520 在肝癌中也是一个抑癌基因。代谢变化在多种肿瘤中均被发现且同病人的临床转归有关。因此肿瘤细胞中的代谢异常信号通路可能是肿瘤治疗的靶点。研究表明，肝癌中 TARDBP (Tat-activating regulatory DNA-binding protein)。TARDBP 调控 PFKP (phosphofructokinase) 的表达，后者是糖酵解和葡萄糖分解过程中的限速酶。抑制 TARDBP 的表达后，肝癌细胞会出现葡萄糖的分解受阻，进而生长受抑。有趣的是，miR-520 家族基因是 TARDBP 介导的糖酵解过程中的中间调节因子。TARDBP 能够抑制 miR-520 的表达，而后者抑制 PFKP 的表达。研究最终在肝癌组织中验证了 TARDBP 同肝癌病人预后的关系。这些结果表明 miR-520 在肝癌中能够通过调控肿瘤代谢抑制肿瘤增殖[197]。

另一项在肝癌中的研究指出，miR-520d 能够增加肝癌细胞对 5 氟尿嘧啶(5-FU) 的敏感性。研究发现，EGFR 突变体 III 能够促抑制 miR-520d 的表达，进而导致转录因子 E2F-1 和胸腺嘧啶合成酶 TS 的表达升高，后二者是介导肝癌耐药的重要调控因素。研究者发现 EGFRVIII 的抗体 CH12 和 5-FU 联合使用能够对肝癌有加成的治疗作用，并延长了荷瘤小鼠的生存时间。有趣的是，CH12 的使用能够增加 miR-520d 的表达，并进而导致 E2F-1 和 TS 的 mRNA 及蛋白的水平降低。这些结果表明，miR-520d 在肝癌中具有作为增加化疗敏感性的潜在治疗价值[198]。

近期研究发现，miR-520d-5p 能够通过靶向 TWIST1 抑制肿瘤转移。研究表明 miR-520d-5p 靶向 TWIST1 的 UTR 区域，进一步研究发现 miR-520d-5p 导致的 TWIST1 表达抑制能够造成后者下游的 miR-10b 的表达降低，进而能够 E 钙粘素 (E-Cadherin) 的表达升高，从而抑制肿瘤细胞发生 EMT，抑制肿瘤转移。此外，研究者还发现 miR-520d-5p 还能够抑制肿瘤细胞的增殖，而且高水平的 miR-520d-5p 同肿瘤病人的生存期延长有关。这些结果表明 miR-520d-5p 能够抑制肿瘤的增殖和转移，是抑癌基因[30]。

miR-520d-5p 还被发现在结肠癌中调控肿瘤转移和增殖。研究通过 qRT-PCR 证实，同癌旁正常组织相比，miR-520d-5p 在结肠癌组织中表达明显降低。双荧光素酶报告基因研究表明，miR-520d-5p 能够靶向 CTHRC1 (Collagen triple helix repeat containing 1)，并受到 SP1 的直接转录促进调控。在结肠癌主细胞中过表达 miR-520d-5p 能够抑制肿瘤增殖、转移和侵袭。而 miR-520d-5p 的沉默则在体内和体外实验中均得到相反的结果。WB 结果表明，miR-520d-5p 通过抑制 ERK1/2 激活而

抑制 EMT 的发生。可见，在结肠癌中 miR-520d-5p 能够通过抑制肿瘤增殖和转移等恶性表型发挥抑癌作用[29]。

3.5.3 miR-520d-5p 可能在胃癌中参与调控 CypB

我们通过生物信息学预测，发现 miR-520d-5p 可能在 CypB 的 3'-UTR 具有潜在结合靶点。而在组织和细胞中验证 miR-520d-5p 同 CypB 的表达，结果表明二者的表达在胃癌组织和细胞中呈负相关关系。这些结果强烈提示 miR-520d-5p 可能是 CypB 在胃癌中表达异常的原因之一。

因此，本研究聚焦 CypB 在胃癌中的功能及其上下游信号通路，旨在进一步理解 Hp 感染和炎症刺激引发胃癌的机制，为胃癌的诊治新策略提供思路。

正文

第一部分 CypB 在胃癌表达升高且促进胃癌生长

CypB 属于亲环素家族，是免疫抑制剂环孢素 A 的细胞内受体[12]，其肽酰脯氨酰异构酶活性在蛋白质折叠过程中有重要作用[13]。CypB 的亚细胞分布主要定位于细胞的内质网中，其功能广泛，在肝炎病毒复制[23, 24]、免疫抑制[25]、催乳素信号通路[26]转导以及骨质疏松发生[27]等机体生理或病理过程中发挥重要作用。近期研究者发现，CypB 被发现在包括黑色素瘤、肝癌、胰腺癌、恶性胶质瘤及乳腺癌等在内的多种肿瘤中过表达[14-17, 186]，但是 CypB 在在胃癌中的表达水平和功能尚未完全阐明。

1 材料

1.1 细胞株

胃上皮细胞 GES-1，胃癌细胞系 MKN45、SGC7901 由军事科学研究院提供，胃癌细胞系 BGC823 由北京肿瘤医院提供，本所保存。

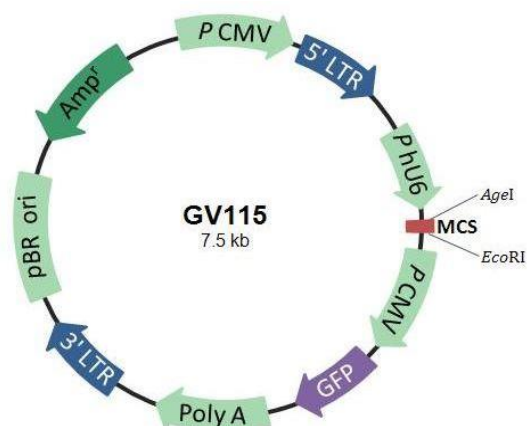
1.2 胃癌组织

胃癌组织芯片（HStm-Ade180Sur-02）购自上海芯超生物有限公司含有 90 对胃癌组织及对应的癌旁组织。此外我们还收集了 10 对 2011 年-2012 年本院外科手术切除的胃癌组织及癌旁组织标本，在液氮中保存并用于总 RNA 和蛋白提取。

1.3 胃癌患者血清

血清来源：我们收集了西京消化病医院的胃癌患者（100 例）和正常志愿者（50 例）血清。其中胃癌患者都已检测血清 CEA 和 CA19-9 水平。所有病人和志愿者均签署了科学研究知情同意书，本研究方案已通过了第四军医大学伦理委员会批准。

1.4 质粒



质粒构建方法：设计 CypB shRNA 序列如下：5'-GGTGGAGAGCACCAAGACA-3'。

1.5 裸鼠

裸鼠购自第四军医大学实验动物中心，均为 4-6 周雌性裸鼠。

1.6 其他主要试剂和材料

1.6.1 ELISA 试剂盒：北京方程生物科技有限公司

1.6.2 抗 CypB 抗体：abcam 公司

1.6.3 细胞周期试剂盒：BD 公司

1.6.4 细胞凋亡试剂盒：BD 公司

1.6.5 结晶紫：北京中杉生物公司

2 方法

2.1 免疫组织化学

- 1) 常规经 Xylene、乙醇等过缸脱蜡水化；
- 2) 高压 2 min 修复抗原，在缓冲液中冷却至室温，PBS 清洗 5 min × 3 次；
- 3) 室温封闭 10 min，PBS 洗 5 min × 3 次；
- 4) 滴加一抗：CypB (1: 2000)，4°C 过夜；
- 5) 用 0.1% Tween-20 PBS 洗 5 min × 3 次；
- 6) 滴加酶标抗鼠/兔聚合物，室温孵育 30 min；

- 7) DAB 显色： 2 min，蒸馏水洗终止显色；
- 8) 苏木素对细胞核染色；
- 9) 常规脱水透明，中性树胶封片；
- 10) 组化评分按照如下方法进行。强度（分数）：阴性(0)，弱(1)，中(2)，强(3)；范围（分数）： <1%(0)， 1-25%(1)， 26-50%(2)， 51-75%(3)， 76-100%(4)。总分=强度分数×范围分数。

2.2 血清样本收集及 ELISA

2.2.1 血清样本的提取：晨起空腹待检人群(胃癌患者或健康人)，抽取肘静脉血约 3ml，低速离心机以 3000g 离心 15 分钟，小心吸取上层血清，按照标本登记注明编号，-20℃ 保存待检。

2.2.2 酶联免疫吸附试验 ELISA 对胃癌患者血清 CypB 的检测

- 1) 稀释抗 CypB 抗体加入孔后 4℃过夜包被，次日弃去液体并用冲洗；
- 2) 1%BSA 封闭，在 37℃孵育 2 h；
- 3) 样本孔加入待测样本并稀释；
- 4) 加入 HRP 标记的检测抗体 100 μL，37℃水浴锅或恒温箱温育 60 min；
- 5) 弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1 min 后吸水纸上拍干，重复上述步骤 5 次；
- 6) 每孔加入底物并在 37℃避光孵育 15min；
- 7) 终止反应并在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

2.3 细胞培养

胃癌细胞培养于含 10%胎牛血清、1% 双抗（青霉素+链霉素）的 RPMI 1640 培养液或者高糖 DMEM 培养液，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱。

2.4 质粒构建及慢病毒包被

- 1) 化学合成单链并退火配对产生双链；
- 2) 通过两端所含的酶切位点 AgeI 和 EcoRI，与酶切后的 RNAi 慢病毒载体 GV115 相连；
- 3) 将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞；
- 4) 通过 PCR 鉴定阳性克隆之后送测序；

- 5) 随后进行慢病毒包装，转染前 24 h，消化对数生长期 HEK293T 细胞；
- 6) 配制各 DNA 溶液，与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀，调整总体积为 2.5 ml，在室温下放置 5 min；
- 7) 混合后室温下温育 20 min，以便形成 DNA 与 Lipofectamine 2000 的转染复合物。
- 8) 将 DNA 与 Lipofectamine 2000 混合液移至 293T 细胞的培养液中，混匀后放入孵箱培养；
- 9) 8 h 后更换正常的培养液继续培养 48 h；
- 10) 48 h 后收集上清，浓缩并测定病毒滴度。

2.5 总蛋白提取

- 1) 胰酶消化并收获对数生长期的细胞 2×10^7 ；
- 2) 加入 200 μ L 细胞裂解液重悬细胞并反复吹打，置于常温 10 min；
- 3) 置于冰上，使用超声震荡或者细针抽吸 2 min；
- 4) 4°C 12000g 离心 5 min；
- 5) 取上清作为细胞总蛋白，-70°C 备用；
- 6) 测定样品蛋白质的浓度。

2.6 免疫蛋白印迹

- 1) 配胶，每孔上样 50 μ g 并电泳；凝胶和 NC 膜置于转移缓冲液中平衡 5 min，半干法转膜；
- 2) 在含 10% 脱脂奶粉-TBST 封闭液中于室温封闭 1h；
- 3) 稀释 anti-CypB 抗体 (Abcam, 1: 500) 4°C 摇床过夜，次日置于常温 30 min。TBST 5 min/次，3 次；
- 4) 用 5% 脱脂奶粉稀释二抗，室温孵育 1h，TBST 摇洗 3 次，5 min/次；
- 5) ECL 化学发光系统中处理 1 min，并在 Bio Rad 仪器中显影；
- 6) 测定蛋白条带的灰度值，以目的条带同相应 β -actin 的灰度值之比作为所得目的条带相对强度。

2.7 流式细胞分选

2.7.1 细胞周期分析

- 1) 转染后 48h-72h 或病毒感染后经筛选及 WB 验证表型的肿瘤细胞生长在 6 孔板中，

1×10⁶/孔；

- 2) 胰酶消化，800rpm×5 min 离心，弃上清，并用-20℃预冷的 PBS 重悬；
- 3) 重复上述步骤中的离心和 PBS 重悬两次；
- 4) 无水乙醇固定，-20℃过夜；
- 5) PI 染色，常温 1 h，流式细胞仪进行细胞周期检测。

2.7.2 细胞凋亡分析

- 1) 转染后 48h-72h 或病毒感染后经筛选及 WB 验证表型的肿瘤细胞生长在 6 孔板中，1×10⁶/孔，将培养液更换为无血清培养液培养 24 h；
- 2) 胰酶消化，800rpm×5 min 离心，弃上清，并用-20℃预冷的 PBS 重悬；
- 3) 重复上述步骤中的离心和 PBS 重悬两次；
- 4) 按照试剂盒说明书用 Annexin V 和 PI 染色，并在流式细胞仪上进行细胞凋亡检测。

2.8 平板克隆形成

- 1) 转染后 48h-72h 或病毒感染后经筛选及 WB 验证表型的肿瘤细胞，胰酶消化后离心，计数；
- 2) 将 500 个细胞重悬于 2 mL 含 10%FBS 的 RPMI1640 中，加入 6 孔板；
- 3) 10-14 d 后，弃去培养液，PBS 洗涤 3 次；
- 4) 固定：将甲醇和福尔马林溶液按 1: 1 混合后，取 1 mL 加入六孔板中常温固定 10 min；
- 5) 弃去固定液，加入 0.5% 结晶紫溶液，常温染色 30 min；
- 6) 弃去染色液，用 PBS 清洗后晾干，照相，并使用图片分析软件 Image J 进行克隆数统计。

2.9 裸鼠成瘤实验

- 1) 病毒感染后经筛选及 WB 验证表型的肿瘤细胞，胰酶消化后离心 800 rpm×5 min，计数；
- 2) 将计数后的细胞重悬于生理盐水或 PBS 中，在裸鼠双大腿背侧分别注射 1×10⁷ 个细胞，形成皮丘，(N=5)；
- 3) 持续监测肿瘤体积，每隔 3 天测一次；
- 4) 注射肿瘤 28 天后，脱颈处死裸鼠，取出皮下肿瘤并拍照、称重和记录。

3 结果

3.1 胃癌组织中 CypB 表达升高

为探索 CypB 在胃癌发生发展中的作用，我们首先对含有 90 对胃癌及癌旁组织的组织芯片进行免疫组织化学染色，CypB 的 IHC 强度如图 1。结果发现，CypB 的表达在胃癌组织中明显升高（图 2，表 1）。

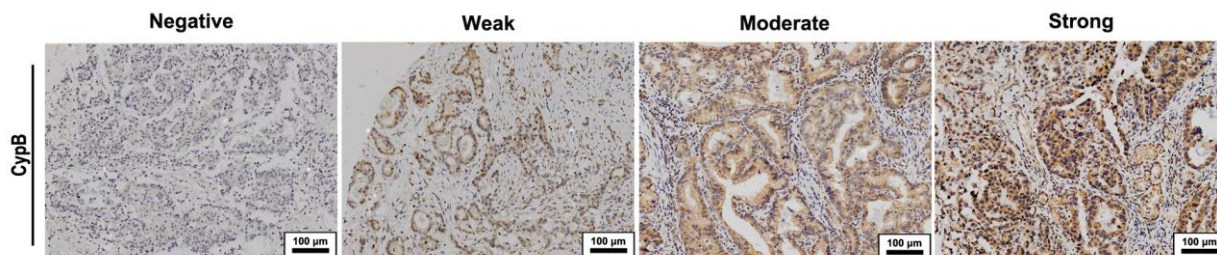


图 1 CypB 在胃癌组织中的表达强度。由左至右依次为阴性、弱、中和强。

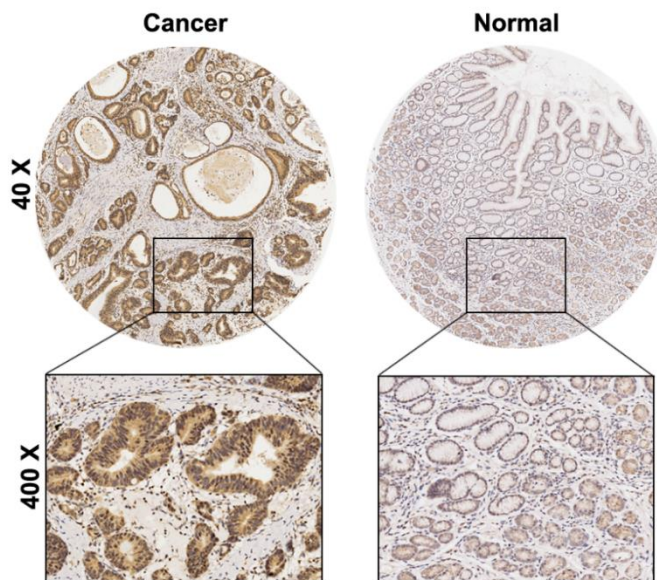


图 2 CypB 在胃癌中表达显著升高。免疫组织化学结果显示，同癌旁组织（右）相比，CypB 在胃癌组织（左）中的表达明显升高。

表 1 CypB 在胃癌及癌旁组织中的表达强度。

	cases	CypB				P value
		-	+	++	+++	
normal	90	36	32	14	8	<0.0001
cancer	90	16	22	38	14	

3.2 高表达水平 CypB 生存期缩短，预后较差

将 90 例胃癌患者按照组织中 CypB 的表达水平高低分为两组：高 CypB（IHC 分数 ≥ 5 ）和低 CypB（IHC 分数 < 5 ）。结果提示高表达水平 CypB 与患者性别和年龄并无明显关系，而同包括肿瘤浸润深度、肿瘤 TNM 分期、肿瘤大小以及淋巴结转移等在内的多种胃癌恶性表型有显著相关关系（表 2）。对胃癌患者的生存期进行 Kaplan-Meier 生存分析发现，高 CypB 组胃癌病人生存期明显缩短（图 3）。对 CypB 进行 COX 模型的单因素和多因素的分析结果显示，CypB 表达升高是胃癌病人预后较差的独立危险因素（表 3）。作为分泌蛋白，CypB 的表达能够在血清中通过 ELISA 的方法检出，那么同正常人相比，胃癌患者血清中 CypB 是否有明显变化呢？

表 2 CypB 同临床病理学特征的相关关系。

Clinicopathological Feature	No. of Patients	Percent	CypB levels		P value
			High (n=52)	Low (n=38)	
Gender					
Male	62	68.89	38	24	0.3613
Female	28	31.11	14	14	
Age					
<60	32	35.56	12	20	0.8263
>60	58	64.44	40	18	
Depth of Invasion					
T1	3	3.33	0	3	0.0043
T2	9	10.00	2	7	
T3	55	61.11	34	21	
T4	23	25.56	16	7	
Tumor stage					
I - II	34	37.78	13	21	0.0044
III - IV	56	62.22	39	17	
Tumor Size					
≤5 cm	39	43.33	16	23	0.0058
>5 cm	51	56.67	36	15	
Node Status					
N0	25	27.78	8	17	0.0007
N1	10	11.11	3	7	
N2	26	28.89	21	5	
N3a/b	29	32.22	20	9	
Organ metastasis					
Negative	89	98.89	51	38	1.0000
Positive	1	1.11	1	0	

表 3 COX 模型单因素和多因素分析。

Factors	Univariate analysis			Multivariate analysis ²		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
Gender (male/female)	0.817	0.467-1.429	0.479	-	-	-
Age (>60/<60)	1.275	0.724-2.246	0.400	-	-	-
Depth of Tumor (T1-T2/T3-T4)	3.254	1.014-10.439	0.047	0.595	0.156-2.269	0.447
Tumor Stage (I-II/III-IV)	3.415	1.608-7.253	0.001	2.808	1.316-5.992	0.008
Tumor Size (≤5 cm/>5 cm)	2.360	1.325-2.004	0.004	2.146	1.198-3.845	0.010
Node Status (N0-N1/N2-N3a/b)	4.294	2.149-8.580	0.000	3.183	1.577-6.423	0.001
CypB expression (high/low)	2.006	1.116-3.607	0.020	2.403	1.320-4.375	0.004
miR-520d-5p (low/high)	1.987	1.045-3.779	0.036	3.415	1.698-6.869	0.001

¹ Analysis was conducted on 90 cases shown in Table S2. Hazard ratios (95% confidence interval [CI]) and p-values were calculated using univariate or multivariate Cox proportional hazard regression.

² Multivariate analysis performed only for variables significant in the univariate analysis.

*P<0.05

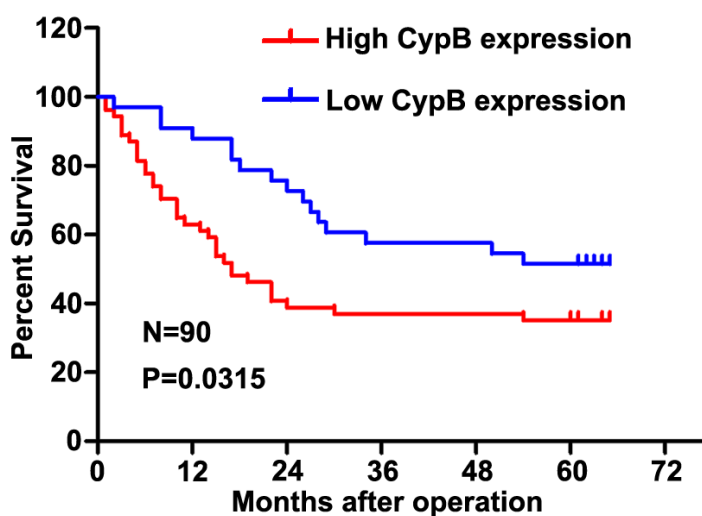


图 3 CypB 表达同胃癌患者的生存期分析。结果显示，高表达水平 CypB 患者的生存

期明显缩短。

3.3 胃癌患者血清中 CypB 含量升高

通过 ELISA 实验结果显示,与志愿者血清中 CypB 浓度相比,胃癌患者血清中 CypB 的浓度明显升高(图 4),有意思的是,将胃癌患者按照肿瘤大小和淋巴结转移与否分组,发现 T3+T4 患者的 CypB 血清含量明显高于 T1+T2 患者;且 N1 患者 CypB 的血清含量明显高于 N0 患者的 CypB 血清含量:这提示血清中 CypB 的浓度可能与胃癌的发生发展相关。

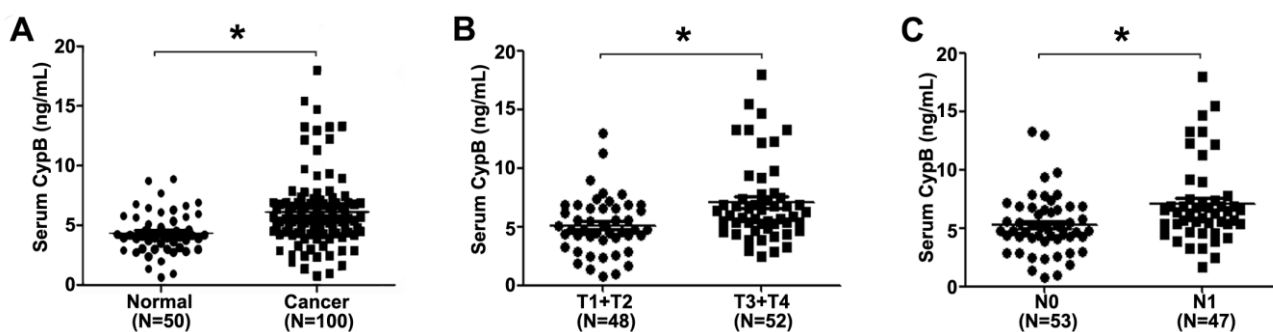


图 4 胃癌患者血清中 CypB 含量升高。A.与志愿者相比,胃癌患者血清中 CypB 浓度升高; B.T3+T4 胃癌的患者具有相对较高的血清 CypB 浓度; C.淋巴结转移的胃癌患者血清 CypB 的浓度相对较高。图引自靳江,环孢素蛋白 CypB 在胃癌中的表达和作用及其核酸适体的筛选,2013 年 5 月

3.4 血清 CypB 滴度对胃癌具有诊断价值

我们将 CypB 及传统的胃癌血清学诊断指标 CA199 和 CEA 用于胃癌患者的诊断对比诊断的敏感性和特异性,发现 CypB 的血清学水平对于早期胃癌具有诊断意义(图 5),且 ROC 曲线下面积高于 CA199 和 CEA。这些结果提示 CypB 的表达异常升高同胃癌的发生发展可能有密切关系,那么 CypB 在胃癌进展过程中有何功能呢?

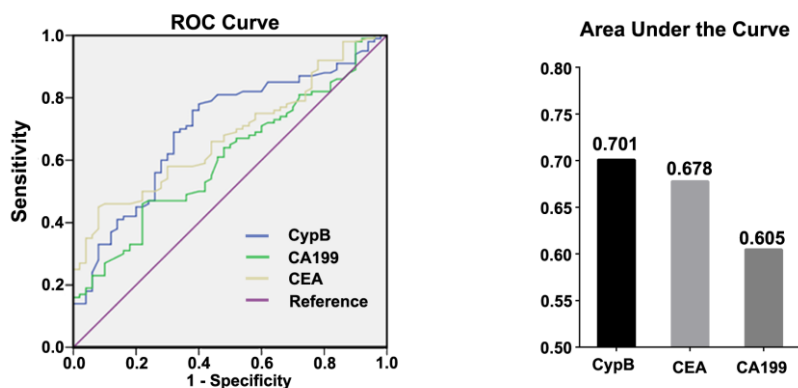


图 5 血清 CypB, CEA 和 CA19-9 的 ROC 曲线。(左图引自靳江, 环孢素蛋白 CypB 在胃癌中的表达和作用及其核酸适体的筛选, 2013 年 5 月)

3.5 胃癌细胞中 CypB 表达升高

我们通过 WB 检测了永生化胃上皮细胞 GES-1 及 MKN45、BGC823、SGC7901 等 3 种胃癌细胞系中 CypB 的表达水平, 发现胃癌细胞中 CypB 的表达明显高于其在 GES-1 中的表达 (图 6), 这提示 CypB 的表达异常升高可能与胃上皮细胞恶性转化有关。

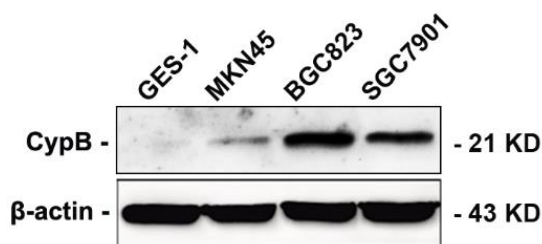


图 6 胃癌细胞系中 CypB 蛋白的表达。胃癌细胞 MKN45、BGC823 和 SGC7901 中 CypB 的表达明显高于其在 GES-1 中的表达

3.6 沉默 CypB 在体外抑制胃癌增殖

由于 CypB 在 BGC823 和 SGC7901 两种细胞系中表达相对较高, 我们挑选该两种细胞系进行功能缺失模型的建立。通过构建表达 CypB 的 shRNA 的慢病毒载体并

感染胃癌细胞系，我们前期在 BGC823 和 SGC7901 中敲除了 CypB 的表达，并通过 WB 验证了 CypB 的表达（图 7，引自靳江，环孢素蛋白 CypB 在胃癌中的表达和作用及其核酸适体的筛选，2013 年 5 月）。随后的 XTT 细胞增殖实验和平板克隆形成实验等功能实验表明，无论在 BGC823 细胞还是在 SGC7901 细胞中，沉默 CypB 后胃癌细胞的生长显著减缓（图 8）。我们进一步研究发现，

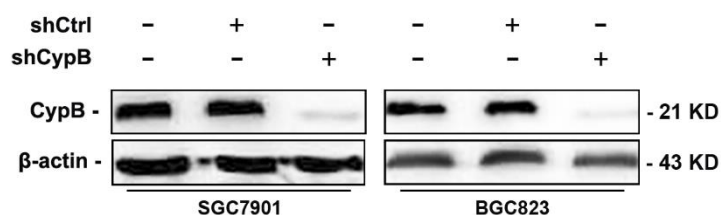


图 7 SGC7901 和 BGC823 中沉默 CypB 的表达。WB 结果显示，设计 shRNA 成功在胃癌细胞系 SGC7901 和 BGC823 中沉默了 CypB 的表达。

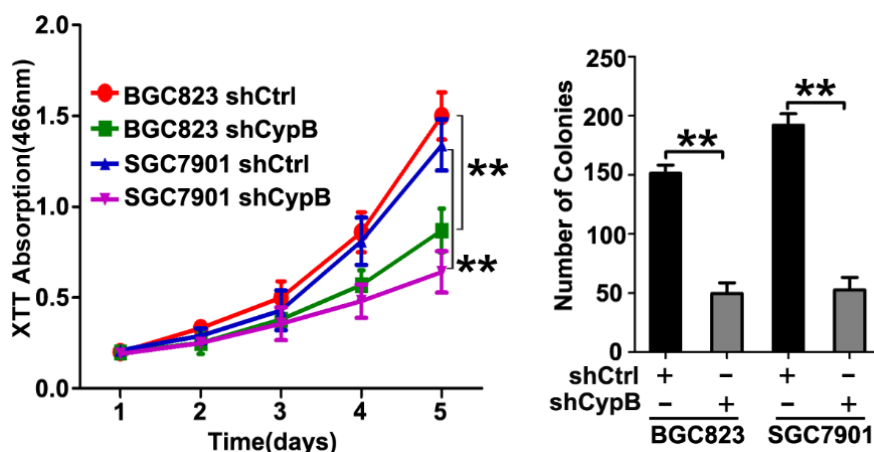


图 8 沉默 CypB 后，胃癌细胞体外生长受到抑制。左：XTT 结果显示，无论在 BGC823 细胞还是在 SGC7901 细胞中，沉默 CypB 后胃癌细胞的生长显著减缓。右：平板克隆结果显示，降低 CypB 的表达后，SGC7901 和 BGC823 细胞的平板克隆形成数明显降低。

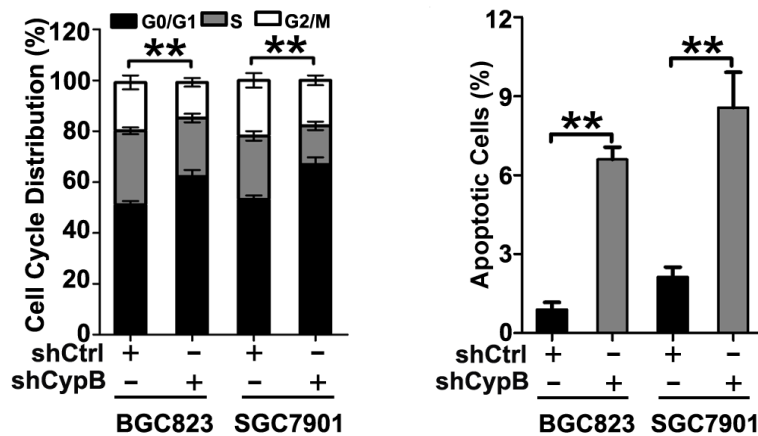


图 9 沉默 CypB 导致胃癌细胞发生细胞周期阻滞和凋亡率升高。左：沉默 CypB 的表达后，胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 的细胞周期发生 G0/G1 期阻滞；右：沉默 CypB 的表达后，胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 的细胞自发凋亡率发生明显升高。

3.7 沉默 CypB 在体内抑制胃癌增殖

我们进一步进行了体内实验探索了 CypB 在胃癌中的功能。通过裸鼠皮下注射沉默 CypB 的 BGC823 和 SGC7901 及对照细胞，我们发现沉默 CypB 的细胞形成肿瘤的体积和重量明显低于对照细胞（图 10），这表明沉默 CypB 能够在体内抑制细胞增殖。

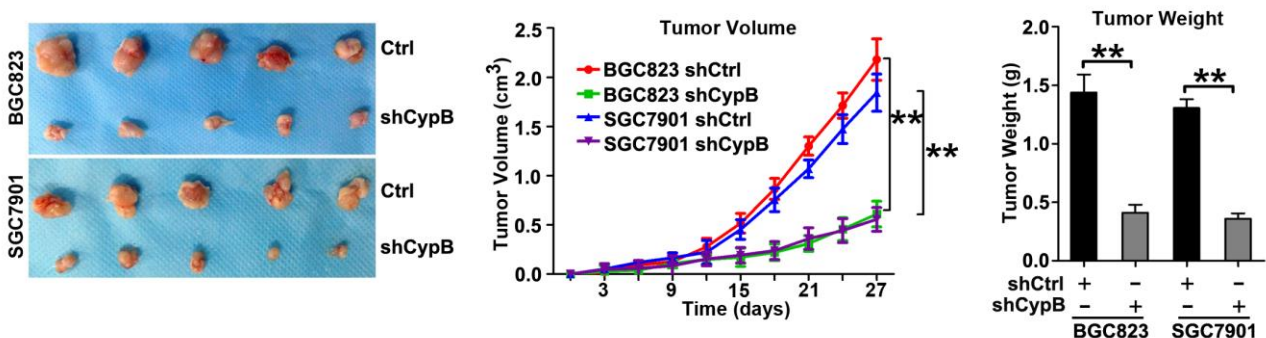


图 10 沉默 CypB 在体内抑制胃癌增殖。左：沉默 CypB 的 BGC823 和 SGC7901 及对照细胞的裸鼠成瘤图片；中：沉默 CypB 的 BGC823 和 SGC7901 及对照细胞形成肿瘤的体积变化曲线；右：沉默 CypB 的 BGC823 和 SGC7901 及对照细胞形成肿瘤的

重量

4 讨论

前期研究发现 CypB 的表达上调可能促进了乳腺癌[186]、骨髓瘤[15]、肝癌[16]以及胶质瘤[14]的恶性进展，这主要是由于 CypB 促进细胞通过产生 ROS 以存活以及 STAT3 的核转位及下游分子的表达。而 CypB 在胃癌发生发展过程中的表达和功能迄今为止尚无明确定论。在本部分研究中，我们发现胃癌中 CypB 的表达显著上调，且沉默 CypB 后，胃癌细胞的体内和体外生长均受到抑制，这与既往的其他肿瘤中的研究所得结论基本一致。

CypB 在肿瘤中的研究最早由 Fang 等在乳腺癌中进行。研究者通过转染 siRNA 对 CypB 进行沉默后进行了表达谱芯片的分析发现 663 个基因在 CypB 沉默后发生明显表达变化，而其中许多基因都同细胞的生长增殖、运动能力等有密切关系[186]，功能实验也证实了 CypB 沉默后细胞的生长、运动均显著降低。随后一项肝癌中的研究指出，肝癌的缺氧环境导致的 HIF-1 α 激活能够诱导 CypB 的产生，后者对于缺氧和顺铂诱导的细胞凋亡具有显著的保护作用[16]。此外骨髓瘤和胶质瘤中的研究结果也证实 CypB 对于维持肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡具有重要作用[14, 15]。这些研究都认为 CypB 的表达异常升高是相应肿瘤的特性，而且功能实验也证实抑制 CypB 在相应肿瘤中的表达能够抑制细胞生长，造成细胞凋亡。因而抑制 CypB 表达可能是一种重要的抑制肿瘤进展的策略。

胃癌是我国发病率、死亡率排名前列的肿瘤，而目前为止尚无研究阐明 CypB 在胃癌中的表达和功能。在本部分研究中，我们首先通过免疫组化实验证实胃癌组织中 CypB 的表达升高，还发现高水平 CypB 的病人生存期缩短，该表型是胃癌病人预后较差的危险因素。此外，作为分泌蛋白，CypB 能够在血清中被检出。我们因此同时探索了胃癌患者血清中 CypB 浓度的诊断价值。结果发现同正常人血清中 CypB 浓度相比，胃癌患者血清中的 CypB 的浓度显著升高；更有意思的是，将受检的胃癌患者按照 TNM 分期进行分组发现，T3 和 T4 期胃癌的患者具有相对较高的血清 CypB 浓度，且发生淋巴结转移的胃癌患者血清 CypB 的浓度也相对较高。近期另一项胰腺癌的研究[17]也发现，胰腺癌病人血清中 CypB 浓度也显著高于志愿者。这项研究设

计的 aptamer 能够特异性结合多种胰腺癌细胞系的培养液上清，研究者进一步通过蛋白质谱技术检测发现其 aptamer 结合的正是 CypB。综合我们的结果可知，同既往研究结论类似，CypB 在胃癌中表达升高，且高水平表达的 CypB 是独立的预后危险因素；此外，CypB 具有对胃癌的血清学诊断具有重要潜在价值。

为了进一步探索胃癌中 CypB 的功能，我们首先检测了几株胃癌细胞系及正常胃上皮细胞系中 CypB 的表达，发现胃癌细胞中 CypB 的表达明显升高，这也支持了之前在胃癌组织中进行的免疫组织化学实验结果。我们挑选了 CypB 表达相对较高的 SGC7901 和 BGC823 细胞进行功能缺失模型建立，随后进行的体内外功能实验均发现 CypB 沉默后，胃癌细胞的生长明显减缓。抑制 CypB 表达，胃癌细胞发生 G0/G1 期的细胞周期阻滞，且凋亡率明显升高。这些结果证明 CypB 的异常表达可能是胃癌维持增殖，克服凋亡的重要基础。那么，胃癌中 CypB 的表达通过何种机制促进胃癌的增殖和存活呢？我们在下一部分中着重讨论了这个问题。

第二部分 CypB 通过激活 STAT3 促进胃癌增殖

在上一部分中,我们发现 CypB 的表达在胃癌组织和细胞中以及胃癌病人的血清中异常增高,而且沉默 CypB 的表达能够在体内外抑制胃癌细胞的增殖,促进胃癌细胞的凋亡。那么 CypB 调控胃癌增殖的机制如何?

近期几项研究分别从不同方面阐述了 CypB 在肿瘤中的功能,证明 CypB 在骨髓瘤、肝癌、胶质瘤、乳腺癌等肿瘤中促进肿瘤增殖、抑制凋亡[14-16, 186]。而近期研究则发现肿瘤细胞中 CypB 的表达是 STAT3 激活的必要条件。在骨髓瘤中, CypB 与激活的 STAT3 共定位,且 CypB 能促进 STAT3 的磷酸化[15];在恶性胶质瘤中[14],药物抑制 CypB 后 STAT3 的磷酸化受到抑: 这些结果提示 CypB 在肿瘤中调控恶性表型的功能同 STAT3 的活化可能有密切关系。

作为多条癌基因通路的交汇点, STAT3 的激活被发现能促进多种肿瘤的增殖、存活、血管生成以及转移,并能够抑制抗肿瘤免疫[9-11]。IL-6 刺激能造成 STAT3 的磷酸化并向细胞核转移,同特定的 DNA 序列结合,从而调控 STAT3 下游分子的转录,其中不少是促进肿瘤增殖、抑制凋亡的分子如 Cyclin D1、Bcl-2 等等。STAT3 在多种肿瘤中均被发现为持续激活状态,且其激活是维持肿瘤增殖和抑制凋亡状态的必要条件。胃癌也不例外,胃癌中 STAT3 的激活可能同 Hp 感染有关。通过促进包括白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 8 (Interleukin 8, IL-8) 在内的多种炎症因子释放, Hp 在胃癌的发生[5]、增殖[6]、转移[7]等发展过程中发挥了重要作用。总的来说, IL-6 激活的 STAT3 在胃肠道上皮细胞的恶性转化中扮演了关键的角色。但是,转录因子 STAT3 在肿瘤细胞中被持续激活的原因尚未完全阐明。

那么,胃癌中 CypB 和 STAT3 的关系如何呢?是否 CypB 调控胃癌增殖的功能是通过 STAT3 介导呢?带着这些问题,我们进行了第二部分研究。

1 材料

1.1 细胞

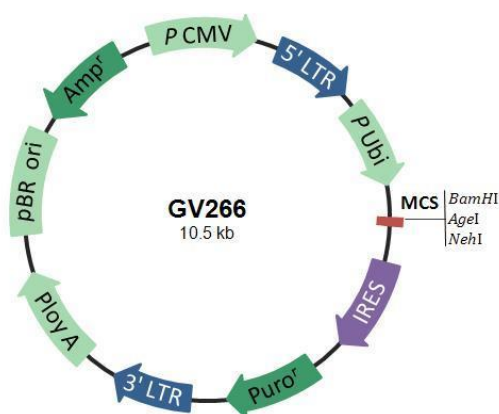
胃癌细胞系 SGC7901 和 BGC823,同第一部分。

1.2 胃癌组织

胃癌组织芯片（HStm-Ade180Sur-02）同第一部分，购自上海芯超生物有限公司，含有 90 对胃癌和癌旁正常组织标本及相应病例的 5 年随访资料。10 对胃癌和癌旁新鲜组织标本在 2011 年-2012 年收集于第四军医大学附属西京医院消化病医院。

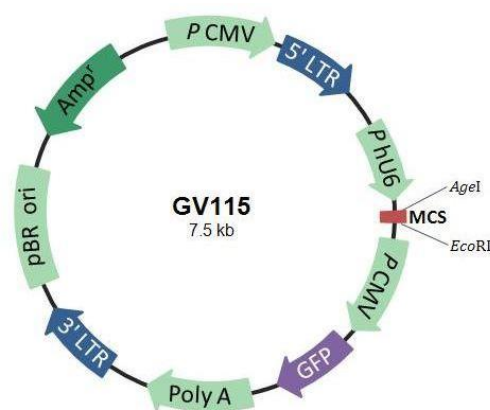
1.3 质粒构建

1.3.1 CypB 过表达质粒



CypB 的过表达质粒采用 GV266，购自上海吉凯生物公司。我们克隆了 CypB 的 CDS 区域和 3'UTR 区域，并将相应序列克隆在载体的 AgeI 和 NotI 酶切位点之间。

1.3.2 STAT3 shRNA 质粒



质粒构建方法：设计 STAT3 的 shRNA 序列如下：5'- CCGUGGAACCAUACACAAA dTdT -3'。我们将干扰序列或随机序列插入慢病毒载体 GV115（上海吉凯生物公司）相应的酶切位点中，并用慢病毒包被。载体的元件顺序为：hU6-MCS-CMV-EGFP。该载体含绿色荧光蛋白表达序列，GFP 可作为转染效率的指示标志。

1.4 其他主要试剂和仪器

- 1) anti-CypB 抗体: Abcam 公司
- 2) anti-pSTAT3 抗体 (Tyr705): 美国 Cell Signaling Technology 公司
- 3) anti- β -actin 抗体: 美国 Sigma-Aldrich 公司
- 4) anti-STAT3 抗体: 美国 Cell Signaling Technology 公司
- 5) anti-Jak2 抗体: 美国 Cell Signaling Technology 公司
- 6) anti-pJak2 抗体: 美国 Cell Signaling Technology 公司
- 7) 人重组 IL-6 蛋白: 美国 R&D 公司
- 8) 内质网标记: 美国 Cell Signaling Technology 公司
- 9) XTT 细胞增殖试剂盒: Roche 公司
- 10) 结晶紫: 北京中杉公司
- 11) PI: 美国 Sigma-Aldrich 公司
- 12) 细胞凋亡试剂盒: 美国 BD 公司

2 方法

2.1 细胞免疫组织化学

具体步骤同第一部分类似, 其余关键步骤如下: 滴加一抗: pSTAT3 (1: 500) , 4°C 冰箱过夜, 室温复温 1 h; DAB 显色 1 分钟, 蒸馏水洗终止显色; 组化评分按照如下方法进行, pSTAT3 的各强度代表图见图 11A。强度 (分数): 阴性(0), 弱(1), 中(2), 强(3); 范围 (分数): <1%(0), 1-25%(1), 26-50%(2), 51-75%(3), 76-100%(4)。总分=强度分数 \times 范围分数。

2.2 组织蛋白提取及 WB

- 1) 收取组织 30 mg, 剪碎后加入 300 μ L 蛋白裂解液, 并置于超声碎裂仪冰上震碎;
- 2) 冰上裂解 15 min;
- 3) 12000g 常温离心 3 min, 上清移入新 EP 管, 即为所得组织总蛋白, 储存-70°C备用;

- 4) 测定样品蛋白质的浓度。
- 5) WB 步骤同第一部分，一抗浓度如下：

pSTAT3	1: 500
STAT3	1: 200
JAK2	1: 500
pJAK2	1: 500

2.3 细胞免疫荧光

2.3.1 IL-6 处理细胞

- 1) BGC823 细胞或 SGC7901 细胞生长在培养皿中，融合度为 50%；
- 2) 细胞培养液更换为无血清的 RPMI1640 或 DMEM 培养液，在 5% CO₂ 的 37°C 孵箱中培养 24 h；
- 3) 在无血清培养基中加入人重组 IL-6（溶解于 DMSO），浓度为 40 ng/mL，刺激时间为 30 min，对照组加入同等体积的 DMSO；
- 4) 刺激结束后，弃培养液，用 PBS 清洗 3 次，每次 5min；
- 5) 细胞半干时，覆盖以 4% 的 -20°C 预冷的多聚甲醛固定 15 min，避光
- 6) 进入下面细胞免疫荧光的步骤。

2.3.2 细胞免疫荧光

- 1) 山羊血清室温封闭 1 h；
- 2) 用 TBST 稀释一抗 anti-CypB 1: 100；
- 3) 加入一抗覆盖细胞，锡纸包裹 4 度避光过夜；
- 4) 取出细胞复温至室温约 1 h，TBST 洗 5 min × 3 次
- 5) TBST 稀释二抗，浓度 1: 50-1:200；同时配制内质网标记探针（ER Tracker, CST）；
- 6) 加入二抗和内质网标记探针，避光室温孵育 1h，TBST 清洗 5 min × 3 次；
- 7) DAPI 染核，完全覆盖住细胞即可，室温孵育 15min，TBST 清洗 5 min × 3 次；
- 8) 加入防荧光淬灭封片剂，避光，使用 confocal 显微镜进行拍照；
- 9) 60×放大倍数下，随机挑取视野统计 200 个细胞的 CypB 和内质网的相对定位并记录。

2.4 载体构建及慢病毒感染

2.4.1 CypB 基因钓取

2.4.1.1 总 RNA 提取

- 1) 加入 1ml Trizol 溶液，吹打混匀，室温静置 10 min；
- 2) 加入 200 μ l 氯仿，振荡混匀 15s，室温静置 3-5min；
- 3) 4 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 15min，上层水相，移至新的 EP 管；
- 4) 加入 0.5ml 异丙醇，混匀后室温静置 3 min；
- 5) 4 $^{\circ}$ C, 12000g 离心 10min，收集 RNA 沉淀，去上清；
- 6) 用 75%乙醇洗涤两次，晾干 5 min；
- 7) 加入 40 μ L DEPC 水溶解沉淀并定量。

2.4.1.2 逆转录

- 1) 在 RNase free 的 PCR 管中配置反应溶液；
- 2) 吹打均匀，置 65 $^{\circ}$ C保温 5 min。随后立即置于冰上；
- 3) 在该 PCR 管中加入下列试剂：

oligo (dT)	0.5	μ l
随机 primer	0.5	μ l
10mM dNTP	2.0	μ l
RNase inhibitor	0.5	μ l
5 x buffer	4.0	μ l
M-MLV	0.5	μ l
总体积	8.0	μ l

- 4) 将上述体系置于 30 $^{\circ}$ C 10 min；
- 5) 42 $^{\circ}$ C 保温 60min；
- 6) 72 $^{\circ}$ C 保温 10mn。

2.4.1.3 PCR 扩增及产物回收

- 1) 引物序列： CypB CDS+3'UTR
F:5'CCCAAGCTTgccaccATGCTGCGCCTCTCCGAACG 3'

CypB

CDS+3'UTR

R:5'CCGCTCGAGTTTATATTAATAAAAAAAAAAAAAACCCAC 3

- 2) 在 0.2 mL EP 管中配制以下体系，基因组 DNA 模板原液稀释 20 倍后取 0.5 μ L 扩增 CypB CDS+3'UTR:

Reagent	Volume
2 mM dNTP mixture	2.5 μ L
10 \times KOD buffer	2.5 μ L
25 mM MgSO ₄	1.5 μ L
模板	0.5 μ L
引物 CypB CDS+3'UTR F	0.3 μ L
引物 CypB CDS+3'UTR R	0.3 μ L
KOD Plus Neo	0.3 μ L
ddH ₂ O	17.1 μ L
Total	25 μ L

- 3) PCR 反应条件:

- A. 95°C 5 min 1cycle
- B. 98°C 30 sec; 58°C 30 sec; 68°C 40 sec 30 cycles
- C. 68°C 5 min
- D. 16°C 保存

- 4) PCR 产物回收

2.4.2 PCR 产物酶切

- 1) 在 2 个无菌的 0.2 mL EP 反应管，分别取 **CypB CDS+3'UTR** PCR 回收产物和 GV266 载体各 15 μ L，分别用 AgeI/NehI 双酶切

- 2) 酶切体系如下:

模板	15 μ L
AgeI	1.5 μ L
NehI	1.5 μ L
10 \times buffer	5 μ L
ddH ₂ O	27 μ L
Total	50 μ L

3) 混匀后, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h 左右。

4) 酶切产物回收

2.4.3 目的片段与载体连接

向 0.2 mL EP 管中加入以下试剂

酶切回收的 PCR 产物 (CypB CDS+3'UTR)	3 μ L
酶切回收的载体 (pcDNA3.1+)	2 μ L
10 \times Ligase Buffer	1 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	3 μ L
Total	10 μ L

16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。

2.4.4 连接产物转化

- 1) 连接产物加入感受态细胞中, 混匀并冰浴 30 min;
- 2) 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s;
- 3) 快速将管转移至冰浴中, 冰浴 2 min。
- 4) 分别加入 LB 培养基并混匀, 37 摄氏度振荡培养 1 h。
- 5) 均匀涂抹菌液至含抗生素的 LB 平板上, 室温下放置 30min。
- 6) 倒置平板移入 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。

2.4.5 质粒酶切鉴定阳性克隆

- 1) 平板上挑取若干单克隆于 3 mL LB 管中摇床过夜培养；
- 2) 质粒提取；
- 3) 酶切鉴定所提取质粒；
- 4) 酶切反应体系如下：

提取的质粒 CypB CDS+3'UTR	3 μ L
<i>AgeI</i>	0.4 μ L
<i>NehI</i>	0.4 μ L
10 \times buffer	1 μ L
ddH ₂ O	5.2 μ L
Total	10 μ L

37°C酶切 2 h。

- 5) 酶切产物以含溴化乙锭（EB）的 1%琼脂糖凝胶电泳分离，UVP 凝胶成像系统成像。

2.4.7 慢病毒包被和感染

同第一部分

3 结果

3.1 CypB 和 pSTAT3 在胃癌组织中表达增高且正相关。

为研究胃癌组织中的 STAT3 的磷酸化，我们对第一部分中使用的组织芯片的进行免疫组化染色。结果发现，同癌旁正常组织相比，胃癌组织中 pSTAT3 的表达明显升高（图 11）。为进一步分析 CypB 的表达同 STAT3 的活化的关系，我们对胃癌和癌旁组织中二者表达的组化评分进行分析，统计分析显示同癌旁组织相比胃癌中 CypB 和 pSTAT3 的表达明显增高；且二者的表达呈正相关的关系（图 12）。

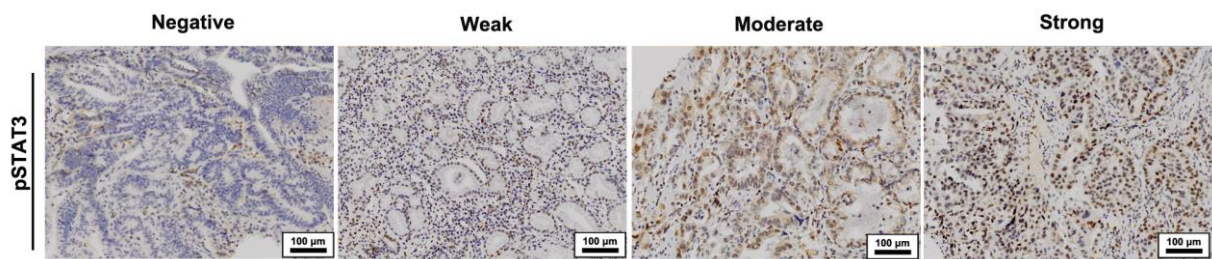


图 11 A. CypB 在胃癌组织中的表达强度。由左至右依次为阴性、弱、中和强。

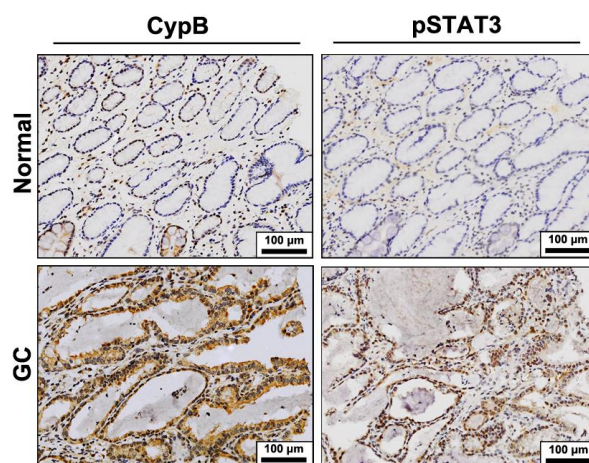


图 11B 同癌旁正常组织相比，胃癌中 CypB 和 pSTAT3 的表达均显著增高。上左：正常胃组织中 CypB 表达的代表图。下左：对应的胃癌组织中 CypB 的表达。上右：正常胃组织中 pSTAT3 表达的代表图。下右：对应的胃癌组织中 pSTAT3 的表达。

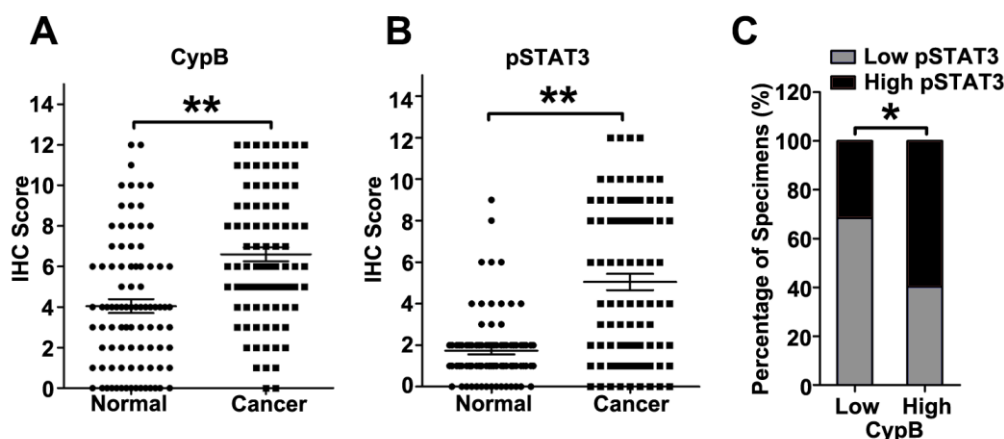


图 12 胃癌中 CypB 和 pSTAT3 表达均升高且正相关。A. CypB 在癌旁正常和胃癌组织中表达的组化评分，统计分析显示胃癌中 CypB 的表达明显增高；B. pSTAT3 在癌旁正常和胃癌组织中表达的组化评分，统计分析显示胃癌中 CypB 的表达明显增高；C. 将组织芯片中胃癌病例按照 CypB 和 pSTAT3 的表达类型进行分组并统计分析各组的比率可见，高表达 CypB 的组胃癌组织表达 pSTAT3 也相对较高，而低表达 CypB 的胃癌组织表达 pSTAT3 的比例也较低。

3.2 胃癌组织中 CypB 和 pSTAT3 的蛋白表达水平正相关。

为进一步验证 CypB 和 pSTAT3 的相关关系，我们通过 WB 在 10 对胃癌和癌旁组织中检测了 CypB 和 pSTAT3 的表达。结果发现 10 对组织中有 9 组出现了胃癌组织的 CypB 和 pSTAT3 的表达均显著上调的现象（图 13）。随后我们通过对 CypB 和 pSTAT3 的蛋白相对表达水平进行分析发现，10 对胃癌和癌旁组织中 CypB 和 pSTAT3 的表达正相关（图 13, $P=0.0192$ ）。

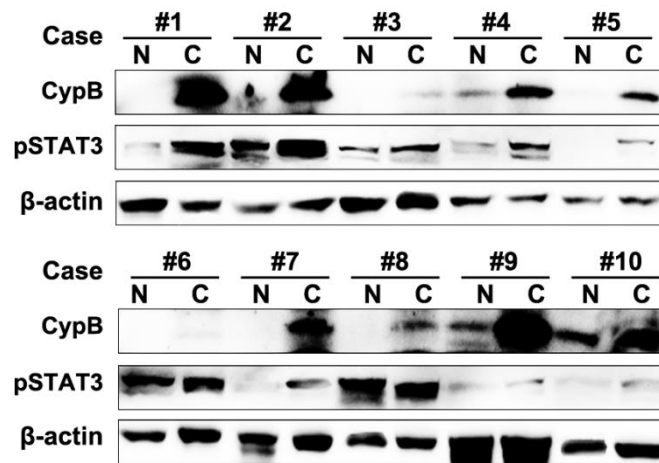


图 13 10 对胃癌和对应癌旁正常组织中 CypB 和 pSTAT3 的表达。收集 10 对胃癌和癌旁组织进行总蛋白提取和 WB。可见在多数病例 (9/10) 中, 同癌旁正常组织相比胃癌中 CypB 和 pSTAT3 的表达均显著上调。

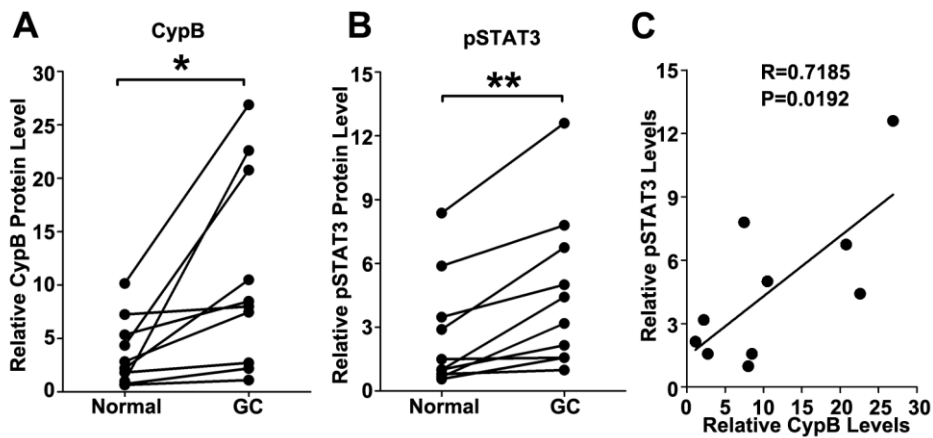


图 14 10 对胃癌和癌旁组织中 CypB 和 pSTAT3 的表达正相关。A. 胃癌和癌旁组织中 CypB 的表达相对内参蛋白 (β -actin) 表达的相对表达量; B. 胃癌和癌旁组织中 pSTAT3 的表达相对内参蛋白 (β -actin) 表达的相对表达量; C. 以 CypB 的相对表达量为横轴, pSTAT3 的相对表达量为纵轴, 进行相关性分析可见, pSTAT3 的表达同 CypB 的表达正相关 ($P=0.0192$)。

3.3 CypB 介导 IL-6 引起的 STAT3 活化入核

为进一步探索 CypB 同 STAT3 的关系，我们将胃癌细胞 BGC823 进行无血清饥饿 24 h 后，采用 IL-6，随后固定细胞并进行细胞免疫荧光对 CypB（绿色）和细胞内质网（红色）进行染色，可见对照组中大部分细胞的 CypB 均定位于内质网，而经 IL-6 处理后部分细胞出现了 CypB 由内质网向细胞核中迁移的现象。在胃癌细胞系 BGC823（图 15）和 SGC7901 中均出现类似结果（图 16）。

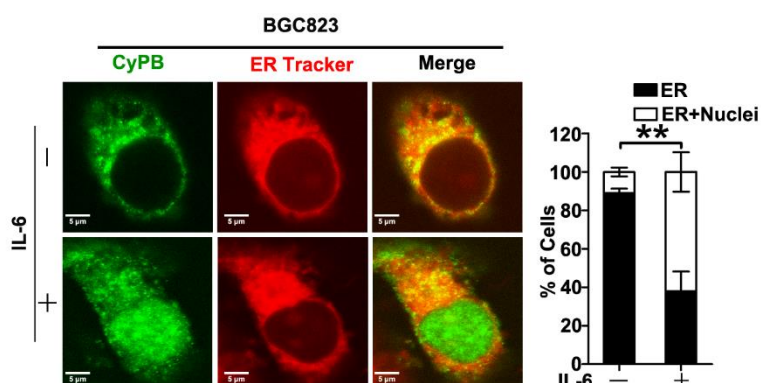


图 15 CypB 介导 IL-6 引起的 STAT3 活化入核。左：将胃癌细胞 BGC823 在无血清培养基中培养 24 h 后，进行 IL-6（40 ng/mL,30 min）刺激或 DMSO 处理作为对照，随后固定细胞并进行细胞免疫荧光对 CypB（绿色）和细胞内质网（红色）进行染色，可见对照组中大部分细胞的 CypB 均定位于内质网，而经 IL-6 处理后部分细胞出现了 CypB 由内质网向细胞核中迁移的现象。右：对单次实验的随机视野统计 CypB 的定位，可见 IL-6 能够造成 CypB 的亚细胞定位发生显著变化。

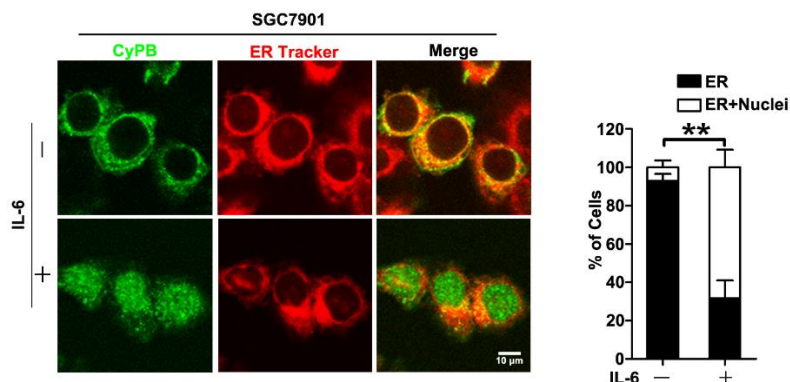


图 16 CypB 介导 IL-6 引起的 STAT3 活化入核。左：同样的将胃癌细胞 SGC7901 在

无血清培养基中培养 24 h 后，进行 IL-6 (40 ng/mL, 30 min) 刺激或 DMSO 处理作为对照，随后固定细胞并进行细胞免疫荧光对 CypB (绿色) 和细胞内质网 (红色) 进行染色，可见对照组中大部分细胞的 CypB 均定位于内质网，而经 IL-6 处理后部分细胞出现了 CypB 由内质网向细胞核中迁移的现象。右：对单次实验的随机视野统计 CypB 的定位，可见 IL-6 能够造成 CypB 的亚细胞定位发生显著变化。

3.4 CypB 促进 STAT3 的磷酸化

STAT3 发生磷酸化是进入细胞核的必要条件，为研究 CypB 影响 STAT3 活化的具体机制，我们随后通过 WB 检测了 CypB 对 JAK2/STAT3 信号通路的相关蛋白的表达和磷酸化水平的影响。我们在胃癌细胞系 BGC823 中分别过表达和沉默 CypB，WB 结果发现，JAK2 和 STAT3 的总蛋白表达水平并无明显变化。但过表达 CypB 时 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平明显升高；相反，沉默 CypB 则能够明显抑制 CypB 的表达并降低 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平 (图 17)。这说明 CypB 能够促进 STAT3 活化可能是通过其磷酸化造成的。

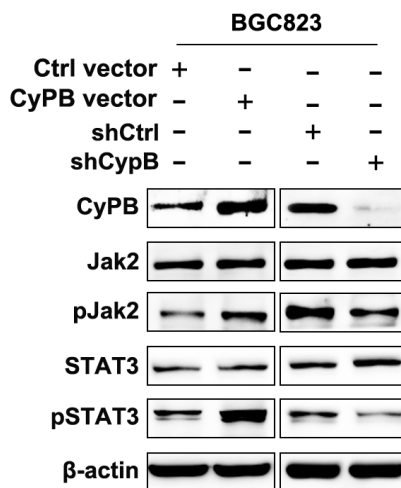


图 17 CypB 促进 STAT3 的磷酸化。对胃癌细胞 BGC823 中进行 CypB 的表达载体转染并检测 CypB 和 JAK2/STAT3 信号通路中蛋白的表达和磷酸化水平，可见胃癌细胞中 CypB 表达明显上调，JAK2 和 STAT3 的总蛋白表达水平并无明显变化而磷酸化水平明显升高；相反，沉默 CypB 则能够明显抑制 CypB 的表达并降低 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平。

3.5 沉默 STAT3 能逆转 CypB 对胃癌增殖的调控作用

为进一步探索 STAT3 的激活是否介导了 CypB 对胃癌的调控作用，我们采用了 STAT3 的 shRNA 对其进行沉默以检测 STAT3 的抑制能否影响 CypB 在胃癌中的功能。我们通过 CypB 的过表达载体和 STAT3 的 shRNA 的共感染及后续的 WB 检测证实，CypB 对胃癌中 STAT3 磷酸化水平的促进作用能够被 STAT3 的 shRNA 抑制(图 18)。我们随后进行了 XTT 细胞增殖实验(图 19)和平板克隆实验(图 20)发现，沉默 STAT3 能够逆转 CypB 对胃癌的促进功能。我们进一步采用流式细胞分选检测了 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA 后细胞周期和凋亡的变化，发现沉默 STAT3 逆转 CypB 对胃癌细胞周期和细胞凋亡的调控作用。这些结果说明 CypB 调控胃癌增殖可能通过 STAT3 的活化进行。

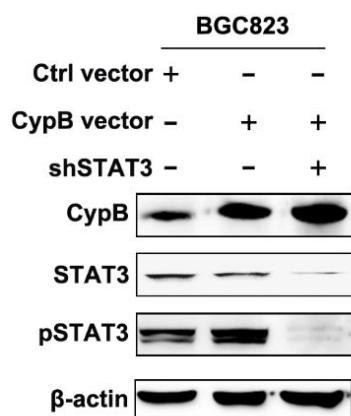


图 18 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA 后 CypB、STAT3 的表达和磷酸化。对 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA，可见 CypB 引起的 pSTAT3 上调能够被 STAT3 的 shRNA 逆转。

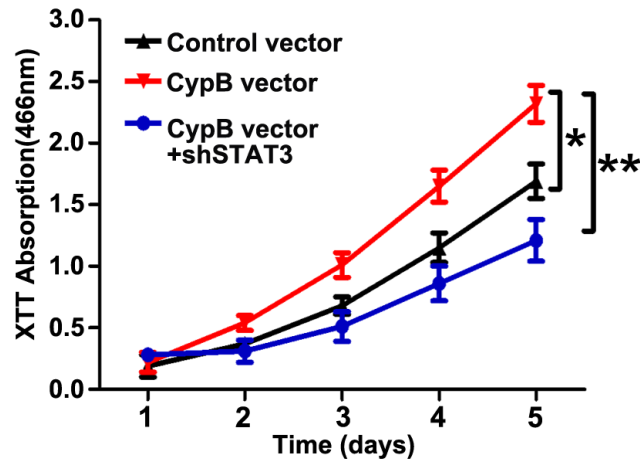


图 19 XTT 实验显示 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA 后细胞增殖的变化。对 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA，可见 CypB 过表达诱导的增殖促进作用能够被 STAT3 的 shRNA 逆转。

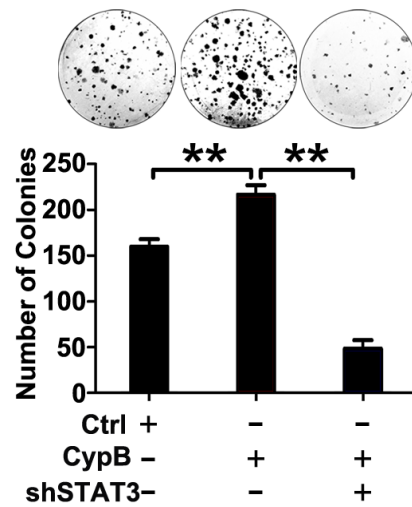


图 20 平板克隆形成实验显示 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA 后细胞增殖的变化。对 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA，可见 CypB 过表达诱导的克隆形成的促进作用能够被 STAT3 的 shRNA 逆转。

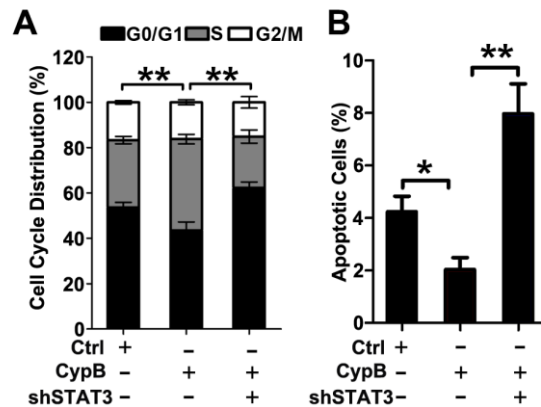


图 21 流式细胞分析结果显示 BGC823 细胞共感染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA 后细胞周期和凋亡的变化。A. 对 BGC823 细胞共转染 CypB 过表达载体和 STAT3 的 shRNA, 可见 CypB 过表达引起的细胞周期 S 期增加能够被 STAT3 的 shRNA 造成的 STAT3 磷酸化水平降低所逆转; B. 同样的, CypB 过表达引起的细胞调往率降低的现象能够被 STAT3 的 shRNA 造成的 STAT3 磷酸化水平降低所抑制。

4 讨论

本部分研究探讨了 CypB 和 STAT3 的激活在调控胃癌增殖过程中的相互关系。我们发现 CypB 和 pSTAT3 在胃癌组织中均表达上调, 且二者的表达呈正相关关系。随后我们进一步在胃癌细胞系中证实: 过表达 CypB 后, STAT3 的磷酸化增多; 相反, 沉默 CypB 后, STAT3 的磷酸化水平则降低。这些结果提示 CypB 可能在胃癌组织中的 STAT3 激活过程中具有重要作用。此外我们还发现一个有趣的现象: 作为 STAT3 信号通路的经典启动因子, IL-6 的刺激能够引发 STAT3 的磷酸化和入核, 但与此同时正常情况下大部分定位于内质网的 CypB 也伴随 STAT3 进入了细胞核。这些结果强烈提示 CypB 对于 STAT3 在包括磷酸化和进入细胞核在内的活化过程中可能具有重要功能。

近期几项研究也支持该结论。Bauer 等[15]发现在骨髓瘤中 CypB 能特异性同 STAT3 结合, 他们使用 siRNA 对 CypB 进行干扰沉默后发现 IL-6 刺激引起的 STAT3 的核转位受到了明显抑制, CypB 的特异性抑制剂环孢霉素 A 的使用也产生了类似的结果; 此外 CypB 被发现同 STAT3 的靶分子的启动子区能够结合, 这表明 CypB 在伴随 STAT3 进入细胞核后进一步发挥转录功能有密切关系。Choi 等在胶质瘤中同样

发现，抑制 CypB 后，细胞会发生 RAS/MAPK 通路的过度激活，以及细胞衰老信号通路的激活；细胞的 CypB 表达抑制后还发生大量凋亡，其原因包括 MYC、突变型 P53、Chk1 以及 JAK/STAT3 信号通路的受阻。综合这些结果可见，在骨髓瘤和胶质瘤中 CypB 是一个促癌基因，其功能可能通过 STAT3 信号通路激活发挥；而我们的实验数据在胃癌中也证实了 STAT3 磷酸化、入核及发挥促进转录的功能均需要 CypB 的辅助。

IL-6/STAT3 信号通路是多种肿瘤发生时炎癌转化的重要信号通路。IL-6 能够同细胞膜表面的 IL-6 受体 α 结合，形成复合体并同 gp130 形成二聚体[70](图 3)。Gp130 同 IL-6/IL-6 受体复合物结合后，3 种主要的信号通路能够被激活。第一种是 JAK-STAT 信号通路。结合造成了 gp130 的二聚化，招募了相关的 JAK 磷酸化激酶(JAK1, JAK2 和 Tyk2) 靠近并促使它们发生相互磷酸化和激活。JAK 激酶磷酸化 gp130 在胞浆内的酪氨酸位点，因而创造了能够提供 STAT 蛋白、SHP-2 蛋白和 SOCS3 蛋白的 SH2 结构域结合的位点。结果，JAK 激酶直接磷酸化了 STAT3 和 STAT1，而激活的 STAT3 蛋白形成了二聚体并进入细胞核发挥转录作用。

进入细胞核后，STAT3 发挥转录作用调控癌基因和抑癌基因的表达，因而是肿瘤发生和恶性表型维持的关键转录因子。在其中，gp130 突变小鼠的胃癌模型的将研究者兴趣引入到 STAT3 激活在胃癌中的意义。这种转基因鼠是在 gp130 的 757 酪氨酸位点进行突变后敲入小鼠，而 gp130 是 IL-6 家族的共受体。这样的突变造成了 STAT3 的激活 STAT3 就会出现持续的异常激活。因此，小鼠胃远端迅速出现了组织学同人胃癌进展阶段非常类似的肿瘤。这些阶段特征同 Correa 胃癌发生模式类似，包括胃炎、萎缩、粘液肠化生、不典型增生和粘膜侵袭，但并未出现转移。在这个模型中，STAT3 的活性形式显著升高对肿瘤的进展极为重要[128, 139]。STAT3 的基因敲除小鼠会导致胚胎死亡，但 gp130 突变同时有 STAT3 单倍体敲除的小鼠形成的胃癌肿瘤大小明显减低[128, 139]。

在 gp130 突变小鼠中，如果 gp130 不被激活，STAT3 的激活和肿瘤发生也不会出现。IL-11 也是 gp130 的配体，其在该模型中是不可或缺的刺激因素，这是因为如果在该小鼠模型中进一步敲除 IL-11 的共受体 IL-11 受体 α ，则 STAT3 不会激活，肿瘤发生率也明显降低[126, 129]。对 gp130 突变小鼠采取无菌饲养和抗生素处理，结果发现 STAT3 的激活程度降低，肿瘤发生率也显著下降[139]。因此，STAT3 的激活

对于 gp130 突变小鼠胃癌发生至关重要，这依赖于 IL-11 同受体 gp130 的结合及胃的微生物环境。

在其他不依赖于 gp130 突变的胃癌模型中同样发现 STAT3 的异常激活和 IL-11 的表达。胃泌素缺乏的小鼠在 12 个月后能够发生胃癌，同时伴有萎缩、炎症和化生。这种肿瘤中能够检测出 IFN- γ 介导的炎症造成的 STAT3 激活[141]。此外，缺少炎症刺激因素条件下，STAT3 激活和肿瘤发生的情况均明显减弱。有趣的是，在高胃泌素血症的小鼠中同样出现了 gp130 激活和下游的 STAT3 异常激活。敲除 H+K+ATP 酶后，小鼠出现胃酸缺乏，高胃泌素血症以及肿瘤形成，同时有 IL-11 表达升高和 STAT3 激活[129]。此外，自身免疫性胃炎小鼠模型被发现有 IL-11 表达升高和 STAT3 激活[142]。最后，过表达 COX-2、K19-C2mE 以及 K19-Wnt1C2mE 的转基因小鼠均能够出现胃底肿瘤，以及 IL-11 表达和 STAT3 激活[129]。因此虽然启动胃癌发生的分子众多，但目前为止多数小鼠模型均能观察到 STAT3 激活引发的炎症反应。近期研究进一步支持了该观点，研究者通过小鼠尾静脉注射 IL-11 持续 7 天的方法发现胃黏膜出现炎症和胃底的明显萎缩[143]。

为研究 STAT3 的激活是否在胃癌中介导了 CypB 功能的发挥，我们进一步采用了 STAT3 的 shRNA 进行研究。结果发现 CypB 的过表达促进胃癌生长，而沉默 STAT3 后，细胞增殖的促进作用被逆转，这证明 STAT3 可能是介导 CypB 发挥促进胃癌功能的下游分子。

结合我们的研究结果，可见 CypB 的表达异常增高，可能支持了 STAT3 的进一步激活，从而促进炎症反应慢性刺激过程中胃癌的发生。那么，CypB 的表达升高原因是什么？

第三部分 miR-520d-5p 通过靶向 CypB 调控胃癌增殖

在前两个部分中，我们发现 CypB 在胃癌组织和细胞中表达升高，且其促进胃癌增殖的功能发挥可能通过 STAT3 介导。但是 CypB 在胃癌组织中异常过表达的原因是什么？近期研究发现，研究者发现，CypB 的表达受到缺氧条件的诱导。HIF-1 α 能够在缺氧条件下直接促进 CypB 的转录。研究发现肝癌细胞在缺氧环境培养 12 小时后，CypB 的 mRNA 和蛋白水平均表达增高，且增高趋势有时间依赖性[16]。此外，缺氧环境下 CypB 被 ATF6 促进转录。前者进而通过调控 CHOP 的泛素化修饰影响 CHOP 降解，进而抑制了缺氧造成的细胞死亡[190]。

而 CypB 是否受到 microRNA 的调控，尚无文献报道。近期结果表明 miRNA 在胃癌发生发展中起了关键作用。因此我们在本部分中重点研究了可能参与调控 CypB 的 microRNA 及其在胃癌细胞中的功能。

1 材料

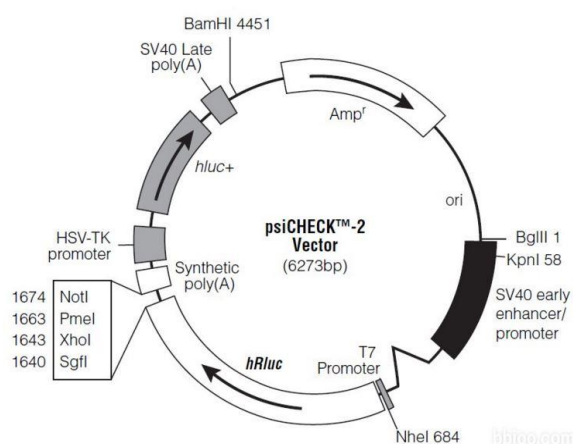
1.1 细胞系

同第一部分

1.2 质粒

1.2.1 报告基因质粒

双荧光素酶报告基因实验中所用的质粒为 psiCHECK-2 质粒购自 Promega。相应序列克隆至该质粒的 XhoI 和 NotI 酶切位点之间。图谱如下：



1.2.2 CypB 质粒

CypB 过表达的载体质粒有两种：分别为 CypB-CDS 区域+wt 3'-UTR；以及 CypB-CDS 区域+mut 3'-UTR。突变位点为：miR-520d-5p 在 3'-UTR 的潜在结合位点。其质粒同第二部分

1.3 miRNA 类似物和抑制物

对于包括 XTT 增殖实验、流式细胞周期和凋亡分析在内的体外实验，我们采用 miR-520d-5p 的类似物 mimics 和抑制物 inhibitor；对于平板克隆形成实验和裸鼠皮下成瘤实验等，我们采用胆固醇修饰的类似物（agomir）和抑制物（antagomir）。均购自广州锐博生物有限公司。

1.4 PCR 引物

所用到的 PCR 引物序列如下：

CypB	Forward: 5'-TGTGGCCTTAGCTACAGGAG -3' Reverse : 5'-CCAGGCCCGTAGTGCTTCAG-3'
miR-520d-5p	Forward: 5'-ACACTCCAGCTGGGCTACAAAGGGAAGC-3' Reverse 5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGA-3'
XhoI	Forward: 5'-CCGCTCGAG GGCACAGGGACATCTTTCTTTG -3'
NotI	Reverse:5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTTATATTAATAAAAAAAAAAA AACCCAC -3'
18S rRNA	Forward: 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3' Reverse 5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'
U6	Forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' Reverse 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	Forward: 5'-ATGTCGTGGAGTCTACTGGC-3' Reverse: 5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'
STAT3	Forward: 5'-CATCTTGAGCACTAAGCCT-3'

1.5 其他试剂和仪器

- 1.5.1 Trizol: Invitrogen
- 1.5.2 T4 DNA ligase: TakaRa
- 1.5.3 NotI: TakaRa
- 1.5.4 XhoI: TakaRa
- 1.5.5 qRT-PCR Kit: TakaRa
- 1.5.6 质粒提取试剂盒: DongSheng Biotech
- 1.5.7 引物合成: 吉玛生物公司
- 1.5.8 双荧光素酶报告系统检测试剂盒: Promega
- 1.5.9 Lipofectamine2000: Invitrogen
- 1.5.10 PCR 仪: Roche LightCycler 480
- 1.5.11 荧光报告系统检测仪器: Promega

2 方法

2.1 生物信息学分析

通过 3 个独立的 microRNA-靶分子数据库针对 CypB 的 3'-UTR 进行 microRNA 的预测, 随后对其预测结果 Overlap。其预测网址分别如下:

TargetScan: <http://www.targetscan.org/>;

MiRanDa: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>;

PicTar: <http://www.pictar.org/>。

2.2 总蛋白提取和蛋白印迹

同第一和第二部分。

2.3 总 RNA 提取和 qRT-PCR

同第一和第二部分。针对 miR-520d-5p 的逆转录和 qRT-PCR, 其具体步骤如下:

1) 总 RNA 抽提步骤同前。

2)

RNA 纯度和完整性检测

A. 逆转录: 使用茎环法, 在去 RNase 的 PCR 管中配置溶液, 85°C 孵育 5min; 随后立即置于冰上, 在另一去 RNase 的 PCR 管中配置以下溶液

10mM dNTP (promega)	2.0	μl
RNase inhibitor (promega)	0.5	μl
miR-520d-5p 逆转录引物	0.5	μl
U6 逆转录引物	0.5	μl
5x buffer	4.0	μl
M-MLV (promega)	0.5	μl
总体积	8.0	μl

B. 混匀后 42°C 放置, 并孵育 60min;

C. 85°C 孵育 10min, 置于冰上。

3) 定量 PCR

A. 检测序列片段大小。内参片段: U6-94bp; 目的片段: hsa-miR-520d-5p: 70bp (MIMAT0002855)

hsa-miR-520d-5p	F	:	5'
ACACTCCAGCTGGGCTACAAAGGGAAGC			
hsa-miR-520d-5p R: 5' CTCAACTGGTGTCTGCGTGGG			
U6-F: 5' CTCGCTTCGGCAGCACA			
U6-R: 5' AACGCTTCACGAATTTGCGT			

B. 反应体系:

cDNA (1:20)	5.0	μl
上游引物	0.5	μl
下游引物	0.5	μl
2x SYBR Green qPCR SuperMix	10	μl
dH ₂ O	4.0	μl
总体积	20	μl

C. 反应条件：50°C 2min； 95°C 2min； 95°C 15s, 60°C 32s 读板，40 cycles； 融解曲线分析：温度 60°C-95°C。每个样重复 3 次。定量 PCR 用的 SYBR Green qPCR； SuperMix 购自 Invitrogen 公司；定量 PCR 仪：ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System

2.4 报告基因野生型载体构建

2.4.1 CYPB 3' UTR 序列

划线部分为 miR-520d-5p 潜在结合位点。CYPB 3'UTR:

Ggcacagggacatctttctttgagtgaccgtctgtgcaggccctgtagtcgccacagggctctgagctgcactggccccggctgtgcatctggtggagcggaccactcccctcacattccacaggcccatggactcacttttgtaacaaactcctaccaactgacccaataaaaaaaaaatgtgggttttttttttaataataaa

mutCYPB 3'UTR:

ggcacagggacatctttctttgagtgaccgtctgtgcaggccctgtagtcgccacagggctctgagctgcactggccccggctgtgcatctggtggagcggaccactcccctcacattccacaggcccatggactcactcccacttacaaactcctaccaactgacccaataaaaaaaaaatgtgggttttttttttaataataaa

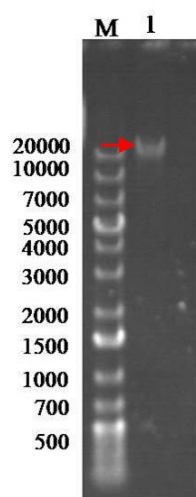
2.4.2 PCR 钓取基因

1) 基因组模板的制备

- 裂解液处理细胞，反复吹打并在 65°C 放置 20min；
- 加入 RNA 酶，37 °30min。
- 加入 200 μL 蛋白沉淀液剧烈振荡 20 s，冰上冷却 5 min；

- D. 室温 12 000 rpm 离心 4 min, 形成白色致密的蛋白沉淀;
- E. 小心移取上清, 加入 600 μ L 异丙醇;
- F. 轻轻上下颠倒直至 EP 管中形成白色沉淀;
- G. 室温 12 000 rpm 离心 5 min, 弃去上清;
- H. 加入 70% 乙醇, 轻轻颠倒 EP 管数次清洗 DNA 沉淀, 室温 12 000 rpm 离心 2 min;
- I. 小心弃去上清室温放置于滤纸并干燥 10~15 min;
- J. 加入 100 μ L ddH₂O, 60 $^{\circ}$ C 烘箱中孵育 1 h 以溶解 DNA;
- K. DNA 样品保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2) 电泳检测基因组 DNA



泳道 M: GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder Marker; 泳道 1: 人基因组 DNA;

结论分析: 人基因组 DNA 已提取出来 (红色箭头所示), 其大小在 20 kb 以上, 且未出现弥散条带, 说明所提取人的基因组 DNA 很完整, 没有 RNA 与蛋白质污染, 也没有发生降解, 因此, 可用于作为模板扩增目的基因。

3) PCR 反应体系

在 0.2 mL EP 管中配制以下体系, 基因组 DNA 模板原液稀释 20 倍后取 0.5 μ L 扩增 CypB:

2 mM dNTP mixture	2.5 μ L
10 \times KOD buffer	2.5 μ L
25 mM MgSO ₄	1.5 μ L
模板	0.5 μ L
引物 CYPBXhoIF	0.3 μ L
引物 CYPBNotIR	0.3 μ L
KOD Plus Neo	0.3 μ L
ddH ₂ O	17.1 μ L
Total	25 μL

注：KOD Plus Neo DNA Polymerase 购于东洋纺公司，货号：

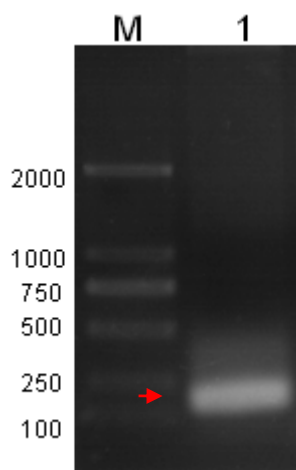
KOD 401；

扩增条件 混匀后，置于 GeneAmp PCR System 2400 型 PCR 扩增仪扩增。**CYPB** 基因的扩增条件：

94 $^{\circ}$ C	3 min	} 30 Cycles
98 $^{\circ}$ C	30 sec	
58 $^{\circ}$ C	30 sec	
68 $^{\circ}$ C	20 sec	
68 $^{\circ}$ C	5 min	
16 $^{\circ}$ C	保存	

4) PCR 产物回收

5) PCR 产物切胶回收时照片：



泳道 M: DL2000 DNA Marker; 泳道 1: **CYPB** PCR 扩增产物(210bp);

2.4.3 PCR 回收产物及载体双酶切

在 2 个无菌的 0.2 mL EP 反应管, 分别取 **CYPB** PCR 回收产物和 psiCHECK-2 载体各 15 μ L, 分别用 XhoI/NotI 双酶切, 酶切体系如下:

模板	15 μ L
<i>XhoI</i>	1.5 μ L
<i>NotI</i>	1.5 μ L
10 \times buffer	5 μ L
ddH ₂ O	27 μ L
Total	50 μ L

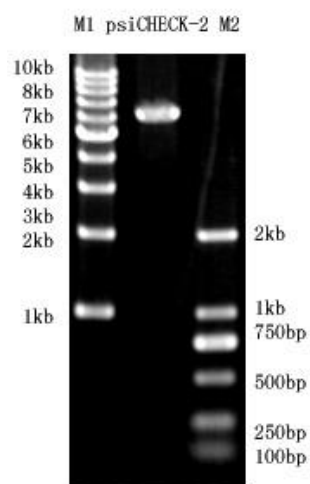
混匀后, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h 左右。

2.4.4 酶切产物回收

- 1) 酶切产物电泳后, 在紫外灯下切取含目的片段和载体的凝胶条带。
- 2) 将凝胶放于 EP 管中并按照回收试剂盒说明书, 放置于 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。
- 3) 纯化 DNA, 静置 2 min, 室温 12 000 rpm 离心 1 min, 弃滤液。
- 4) 向柱上加入 PE 并离心, 弃去滤液。
- 5) 重复上一操作一次。

- 6) 离心 1 min, 去除 DNA 纯化柱中的残留。
- 7) 将柱子置于新的 1.5 mL EP 管上, 加入 30 μ L 水, 离心 1 min 洗脱所需要的 DNA。

回收产物取 2 μ l 跑琼脂糖凝胶电泳结果图



注: 泳道 M: DL1kb DNA Marker(TaKaRa, 货号: D517A)

泳道 1: psiCHECK-2 双切后载体

2.4.5 目段片段与载体连接:

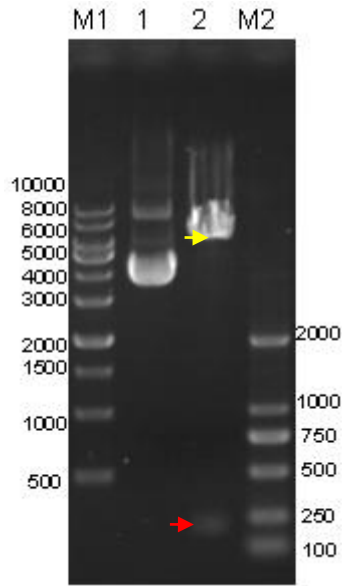
按照说明书配制 Buffer 和模版, 在 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。

2.4.6 连接产物的转化

2.4.7 质粒酶切鉴定阳性克隆

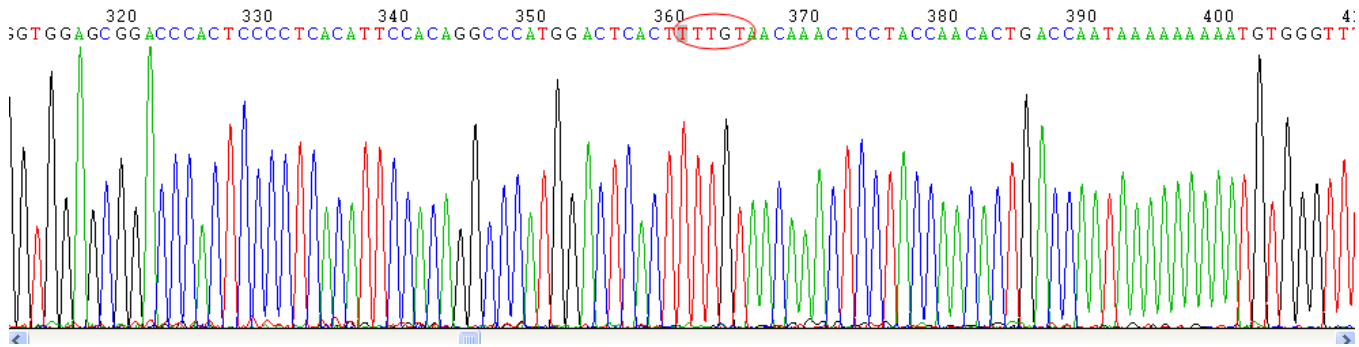
酶切产物以含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, UVP 凝胶成像系统成像。

结果如下:



CypB 的质粒与酶切后产物

测序结果进行 Blast 比对



可见基因 CYPB 已成功克隆至 psiCHECK-2 载体中，与 NCBI 上已知序列一致

2.5 报告基因突变载体构建

2.5.1 CYPB 3' UTR 序列（划线区域表示待突变区）：

```
ggcacaggacatctttctttgagtgaccgtctgtgcaggccctgtagccgccacagggtctgagctgcactggccccggtgct
ggcatctggtggagcggaccactcccctcacattccacaggcccatggactacttttgtaaactcctaccaactga
ccaataaaaaaaaaatgtgggttttttttttaataataaa
```

2.5.2 扩增引物序列：（苏州金唯智合成 PAGE 纯化 20D）：

mutCYPBF:5'CAGGCCCATGGACTCACTCCCCTACAAACTCCTACCAAC 3'

mutCYPBR:5'GTTGGTAGGAGTTTGTAAAGTGGGAGTGAGTCCATGGGCCTG 3'

2.5.3 基因突变：

PCR 反应体系

配置以下体系，模板为构建好的 CypB 质粒，后者稀释 50 倍后取 1 μL 做模板：

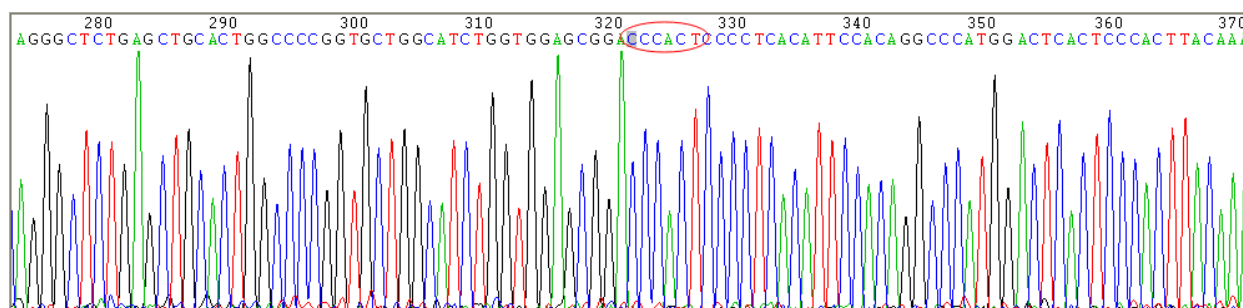
2 mM dNTP mixture	2.5 μL
10 \times KOD buffer	2.5 μL
25 mM MgSO ₄	1.5 μL
模板	1 μL
引物 mutCYPBF	0.3 μL
引物 mutCYPBR	0.3 μL
KOD plus neo	0.3 μL
ddH ₂ O	16.6 μL
Total	25 μL

注：KOD Plus neo DNA Polymerase 购于 ToYoBo 公司，货号：

KOD 401；

2.5.5 测序结果

Mir-520d-5p 结合位点处测序峰图如下（其它测序峰图见测序结果）：



测序结果 BLAST 分析：基因 CYPB 已成功在目的突变区域实现突变,因此，可用于后续实验。

2.6 双荧光素酶报告基因实验

- 1) 转染前细胞铺板，24 孔板， 2×10^4 每孔；
- 2) 使用 EP 管稀释 DharmaFect $2 \mu\text{L}$ ，室温下静置 5min；
- 3) 每个孔用 Opti-MEM 稀释 mimic 或 inhibitor 和质粒，室温下静置 5min；
- 4) 将上述 DharmaFect 的稀释液和 miRNA 类似物、抑制物及质粒的稀释液混合，室温下静置 10min；
- 5) 加入培养孔中，晃动 24 孔板混匀；
- 6) 培养 24h 后换液进行后续实验；
- 7) Luciferase 检测并分析结果检测结果。

2.7 miRNA 类似物和抑制物转染

通过脂质体转染构建 miR-520d-5p 的功能获得和缺失模型，步骤同上述类似。

2.8 CypB 载体构建

2.8.1 CypB-wt-UTR 过表达载体的构建

见第二部分

2.8.2 CypB-mut-UTR 过表达载体的构建

- 1) CYPB CDS+3'UTR 3' UTR

序列（划线区域表示待突变区）：

```
atgctgcgcctctccgaacgaacatgaaggtgctcctgccgccccctcatcgcggggtccgtcttctctctgctgctgccggg
accttctgcggccgatgagaagaagaagggcccaaagtcaccgtcaaggtgtattttgacctacgaattggagatgaagat
gtaggccgggtgatctttggtctctcggaaagactgtccaaaaacagtgataattttgtggccttagctacaggagagaaa
ggatttggctacaaaaacagcaaatccatcgtgtaatcaaggacttcatgatccagggcggagacttaccaggggagatg
gcacaggaggaaagagcatctacggtgagcgttccccgatgagaactcaaaactgaagcactacggcctggctgggtg
agcatggccaacgcaggcaaagacaccaacggctcccagttcttcatcacgacagtcaagacagcctggctagatggcaa
gcatgtggtgtttggcaaagttagagggcatggaggtggtgcggaaggtggagagcaccaagacagacagccgggata
aaccctgaaggatgtgatcatcgcagactcggcaagatcgaggtggagaagcccttgccatcgccaaggagtagggc
acagggacatcttctttagtgaccgtctgtcaggccctgtagtccgccacagggctctgagctgcactggccccggtgct
ggcatctggtggagcggaccactcccctcacattccacagggccatggactcacttttgtaacaaactcctaccaactga
ccaataaaaaaaaaatgtgggttttttttttaataataa
```

2)

扩增引物序列：：

mutCYPBF:5'CAGGCCCATGGACTCACTCCCCTACAACTCCTACCAAC 3'

mutCYPBR:5'GTTGGTAGGAGTTTGTAAAGTGGGAGTGAGTCCATGGGCCTG

3'

3) 基因突变：

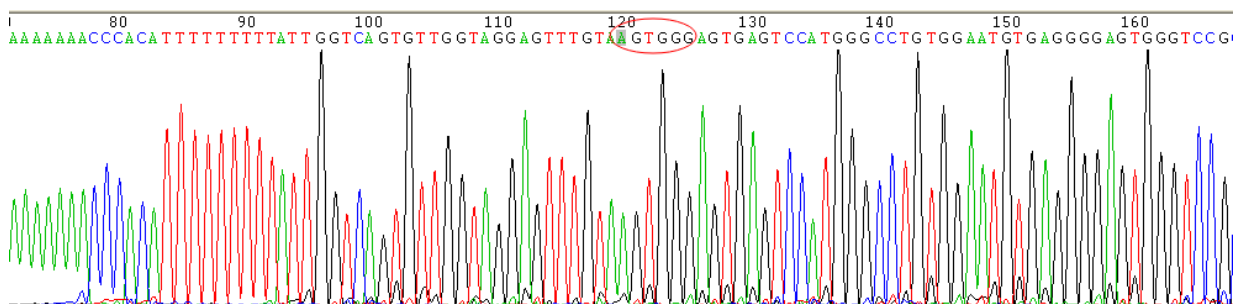
A. PCR 反应体系。

2 mM dNTP mixture	2.5	μL
10 × KOD buffer	2.5	μL
25 mM MgSO ₄	1.5	μL
模板	1	μL
引物 mutCYPB CDS+3'UTRF	0.3	μL
引物 mutCYPB CDS+3'UTRR	0.3	μL
KOD plus neo	0.3	μL
ddH ₂ O	16.6	μL
Total	25	μL

B. 扩增条件:混匀后,置于 GeneAmp PCR System 2400 型 PCR 扩增仪扩增。mutCYPB CDS+3'UTR 基因的扩增条件同前；

C. PCR 产物经酶切、转化、挑菌落；

4) 测序。预测 hsa-miR-520d-5p 结合位点处测序峰图如下：



测序结果 BLAST 分析：基因 CYPB CDS+3'UTR 已成功在目的突变区域实现突变，因此，可用于后续实验。

3 结果

3.1 miR-520d-5p 直接结合 CypB 的 3'-UTR 并在转录水平抑制 CypB 表达

为研究 CypB 的上游调控 miRNA，我们首先通过联合 3 个独立的 microRNA-靶分子数据库筛选出可能调控 CypB 的 miRNA（图 22），并通过转染类似物及 WB 检测发现 miR-520d-5p 能够降低 CypB 的表达（图 23）；此外我们还在多种胃癌细胞系中发现 CypB 的表达同 miR-520d-5p 的表达负相关（图 24）。随后我们通过双荧光素酶报告基因实验研究发现 miR-520d-5p 能够直接结合 CypB 的 3'-UTR 的 128 bp 位置的结合位点（图 25）；进一步我们通过 qRT-PCR 和 WB 证实：上调 miR-520d-5p 后 CypB 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均明显降低；而相反，沉默 miR-520d-5p 后 CypB 的 mRNA 水平则显著增高。这些结果证明：miR-520d-5p 直接结合 CypB 的 3'-UTR 并在转录水平抑制 CypB 表达（图 26、27）。

3.1.1 miR-520d-5p 能降低 CypB 的蛋白表达

我们首先通过联合 3 个独立的 microRNA-靶分子数据库（TargetScan、MiRanda、PicTar）对靶分子 CypB 的 3'-UTR 进行分析，结果发现 3 个数据库结果重合部分中 21 个 microRNA 在相应序列有潜在的结合位点（图 22）。其中 miR-1、miR-206、miR-613、miR-133、miR-146、miR-152、miR-520d-5p 等多个 microRNA 曾被报道在肿瘤中发挥抑癌作用，因此我们采用这些 microRNA 的 mimics 对胃癌细胞 BGC823 进行转染，72 h 后收集细胞总蛋白进行 WB 检测发现：miR-520d-5p 的转染能够造成 CypB 的表达明显的降低(图 23)。

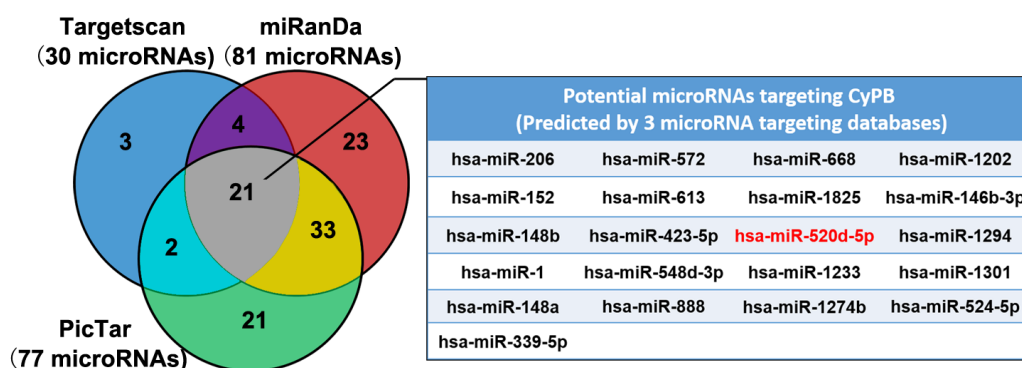


图 22 生物信息学预测可能调控 CypB 的 microRNA。我们联合 3 个独立 microRNA-靶分子数据库对 CypB 的 3'-UTR 进行分析，发现有 21 个 microRNA 在相应序列有潜在的结合位点。

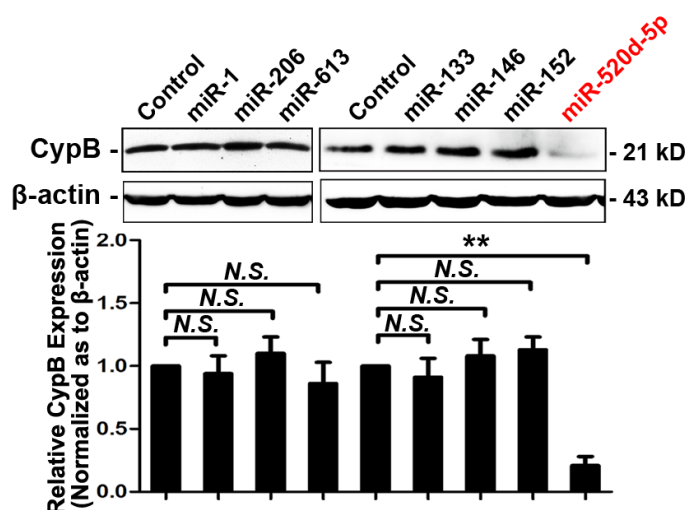


图 23 miR-520d-5p mimics 的转染能够降低 CypB 的表达。在 21 个可能调控 CypB 的 microRNA 中，miR-1、miR-206、miR-613、miR-133、miR-146、miR-152、miR-520d-5p 等多个曾被报道在肿瘤中发挥抑癌作用的 microRNA 被挑选出来，其 mimics 被分别转染入 BGC823 细胞中，WB 结果显示：miR-520d-5p 的 mimics 的转染能够降低 CypB 的表达。

3.1.2 miR-520d-5p 同 CypB 在胃癌细胞中表达水平负相关。

为进一步验证胃癌细胞中 miR-520d-5p 和 CypB 在表达上的关系，我们在多个胃

癌细胞系中检测了 miR-520d-5p 和 CypB 的表达, 进一步分析二者相对表达量的相关性可知, 胃癌细胞系中 CypB 的表达同 miR-520d-5p 的表达负相关。

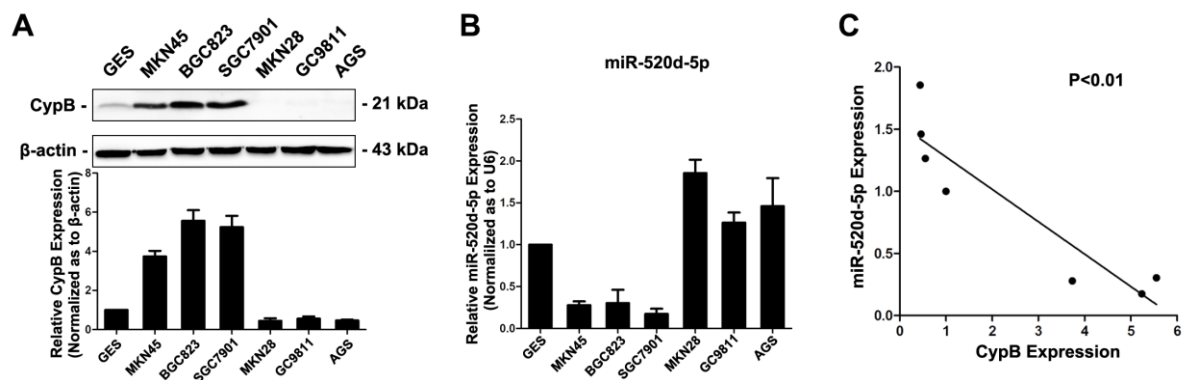


图 24 胃癌细胞中 CypB 的表达和 miR-520d-5p 表达负相关。 A. WB 检测 CypB 在包括 GES-1 和 MKN45、BGC823、SGC7901、MKN28、GC9811、AGS 等在内的多个胃上皮细胞系的表达水平, 内参: β -actin。B. qRT-PCR 检测 miR-520d-5p 在上述细胞系中的表达水平。内参: U6。C. 以 CypB 的表达相对量为横轴, 以 miR-520d-5p 的表达水平为纵轴, 分析二者的相关性可知, 胃癌细胞系中 CypB 的表达同 miR-520d-5p 的表达负相关。

3.1.3 miR-520d-5p 直接结合 CypB 的 3'-UTR。

为验证 miR-520d-5p 是否直接结合 CypB 的 3'-UTR, 我们进行了荧光素酶报告基因实验。我们首先针对 CypB 3'-UTR 上 128 bp 存在的 miR-520d-5p 潜在结合靶点, 将其野生型和突变型分别克隆入荧光素酶报告基因载体, 并转染 HEK293T、GES-1 和 BGC23 细胞(图 25 左)。结果显示: 野生型 UTR 转染后, miR-520d-5p 的 mimics 共转染能够造成荧光素酶转录并导致荧光下降; 而突变靶点则不能导致荧光下降(图 25 右)。这表明 miR-520d-5p 可直接结合 CypB 的 3'-UTR 上存在的结合位点。

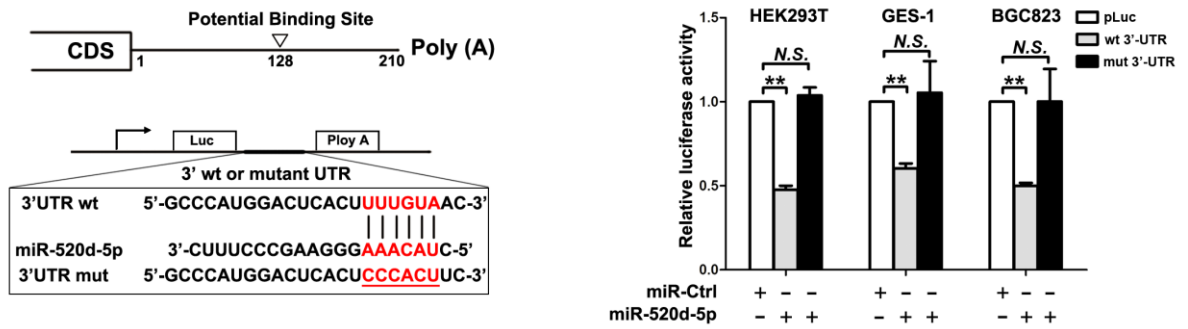


图 25 miR-520d-5p 能够直接结合 CypB 的 3'-UTR。我们针对 miR-520d-5p 在 CypB 3'-UTR 上 128 bp 存在的 miR-520d-5p 潜在结合靶点构建了野生型和突变型 Luciferase 载体 (左); 将载体和 miR-520d-5p 的 mimics 共转染 HEK293T、GES-1 以及 BGC823 细胞中发现, 野生型 3'-UTR 能够引起荧光降低, 说明 miR-520d-5p 能够与相应位点直接结合。

3.1.4 miR-520d-5p 在转录水平抑制 CypB 表达。

我们对胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 分别转染了 miR-520d-5p 的 mimics 或 inhibitor 及对照后, 针对 CypB 进行 qRT-PCR 和 WB 发现: 上调 miR-520d-5p 后 CypB 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均明显降低; 而相反, 沉默 miR-520d-5p 后 CypB 的 mRNA 水平则显著增高 (图 26、27)。

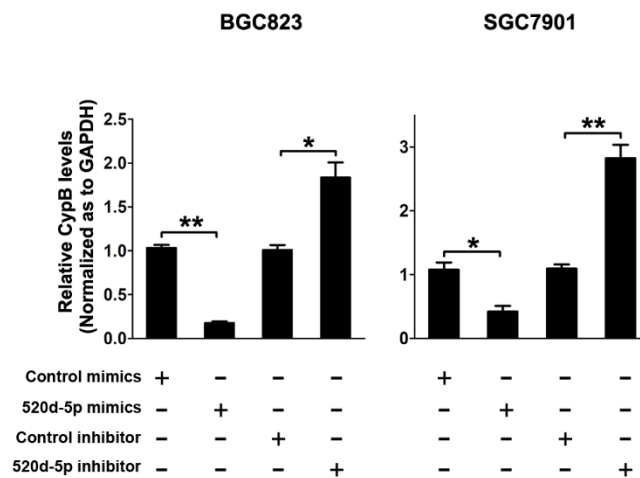


图 26 qPCR 结果显示 miR-520d-5p 能够降低 CypB 的 mRNA 水平。我们对胃癌细

细胞 BGC823 和 SGC7901 分别转染了 miR-520d-5p 的 mimics 或 inhibitor 及对照后, 提取 RNA 进行 qRT-PCR 发现: 上调 miR-520d-5p 后 CypB 的 mRNA 水平降低; 而相反, 抑制 miR-520d-5p 的表达后 CypB 的 mRNA 水平显著增高。

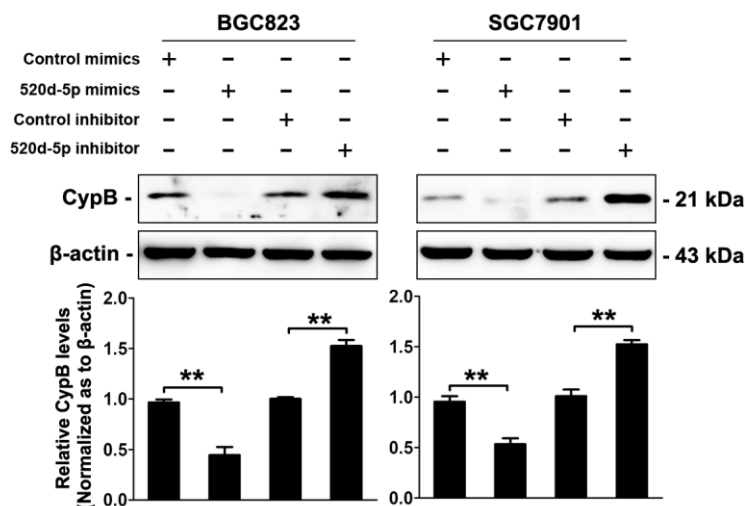


图 27 WB 结果显示 miR-520d-5p 能够降低 CypB 的蛋白水平。我们对胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 分别转染了 miR-520d-5p 的 mimics 或 inhibitor 及对照后, 提取总蛋白进行 WB 发现: 上调 miR-520d-5p 后 CypB 的蛋白表达水平明显降低; 而相反, 抑制 miR-520d-5p 的表达后 CypB 的蛋白表达水平显著增高。

3.2 miR-520d-5p 在胃癌中抑制细胞增殖、促进细胞凋亡

3.2.1 miR-520d-5p 的功能获得/缺失模型的建立。

为探索 miR-520d-5p 在胃癌中的功能, 我们通过 miR-520d-5p 的类似物和抑制剂转染 BGC823 细胞和 SGC7901 细胞建立了功能获得/缺失模型, qRT-PCR 结果显示 mimics 或 agomir 的转染使 miR-520d-5p 过表达 300-400 倍, 而 inhibitor 或 antagomir 则使 miR-520d-5p 的表达显著降低。

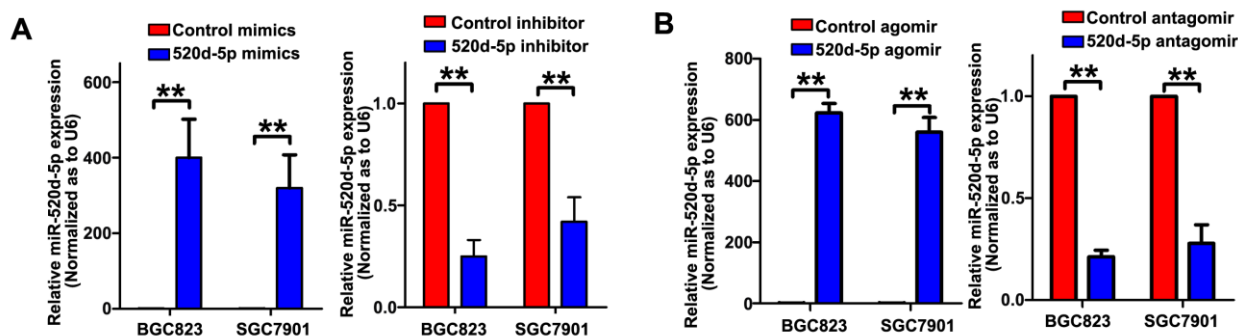


图 28 miR-520d-5p 的功能获得/缺失模型的建立。我们通过 miR-520d-5p 的类似物和抑制剂转染 BGC823 细胞和 SGC7901 细胞建立了功能获得/缺失模型。A. 在 XTT 增殖实验、细胞周期和凋亡检测等体外实验中，我们使用 mimics 和 inhibitor 的转染，qRT-PCR 结果显示 mimics 使 miR-520d-5p 过表达 300-400 倍，inhibitor 使 miR-520d-5p 的表达降低了 2-4 倍；B. 在平板克隆形成实验等体外实验及裸鼠皮下成瘤等体内实验中，我们使用 agomir 和 antagomir 的转染，qRT-PCR 结果显示了类似的结果。

3.2.2 miR-520-5p 在体外抑制细胞生长。

我们使用上述方法建立 miR-520d-5p 的功能获得缺失模型后，采用 XTT 细胞增殖实验和平板克隆形成实验证实，miR-520d-5p 过表达能够抑制胃癌细胞体外生长（图 29、30）；随后我们使用流式细胞仪对细胞周期和细胞凋亡进行分析结果显示：胃癌细胞中过表达 miR-520d-5p 后，细胞 G0/G1 期明显增多，而 S 期细胞百分比则明显降低，且细胞凋亡率明显升高（图 31、32）；相反在胃癌细胞中抑制 miR-520d-5p 的表达后，G0/G1 期明显降低，而 S 期细胞百分比则明显增多，而且细胞凋亡率也显著降低。我们进一步在体内实验中验证了上述结果，裸鼠皮下成瘤实验结果证实：miR-520d-5p 在体内抑制胃癌细胞生长（图 33）。

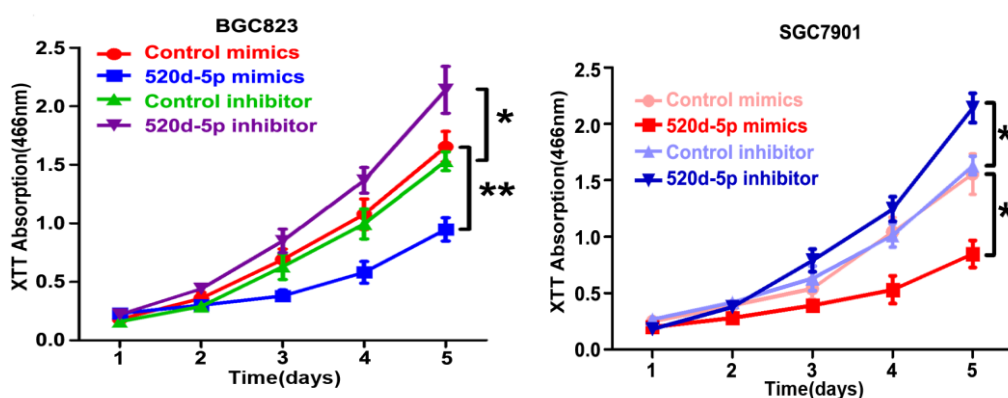


图 29 miR-520d-5p 抑制胃癌细胞生长。 XTT 结果显示，胃癌细胞中过表达 miR-520d-5p 后，细胞增殖显著减慢；抑制 miR-520d-5p 表达后，细胞增殖则加快。

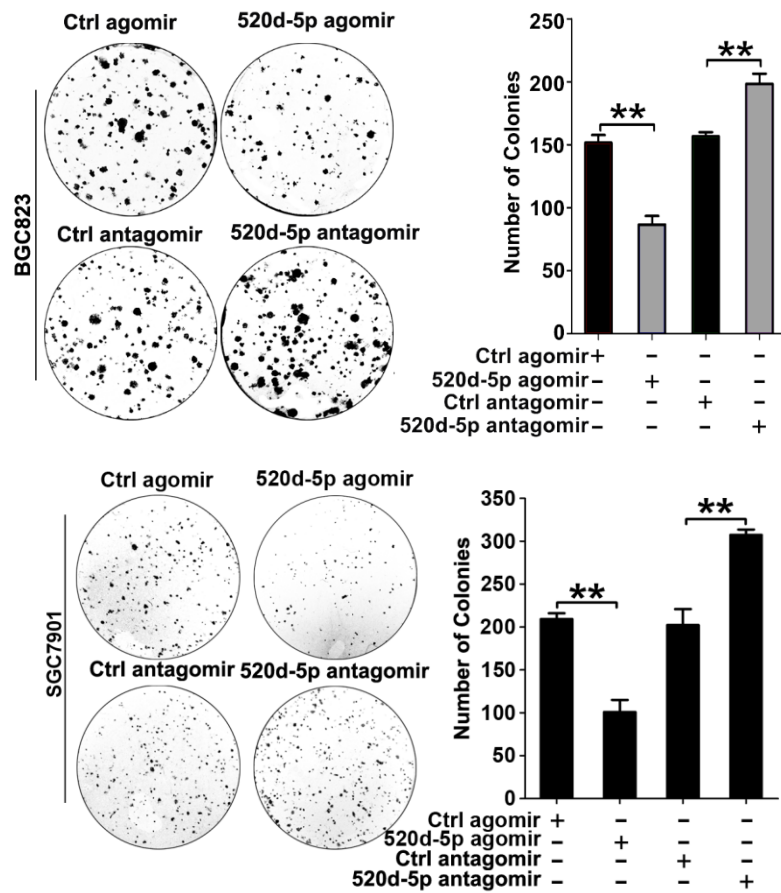


图 30 miR-520d-5p 抑制胃癌细胞克隆形成。平板克隆形成实验结果显示，胃癌细胞中过表达 miR-520d-5p 后，胃癌细胞的克隆形成数显著降低；相反抑制 miR-520d-5p 表达后，胃癌细胞的克隆形成数显著升高。

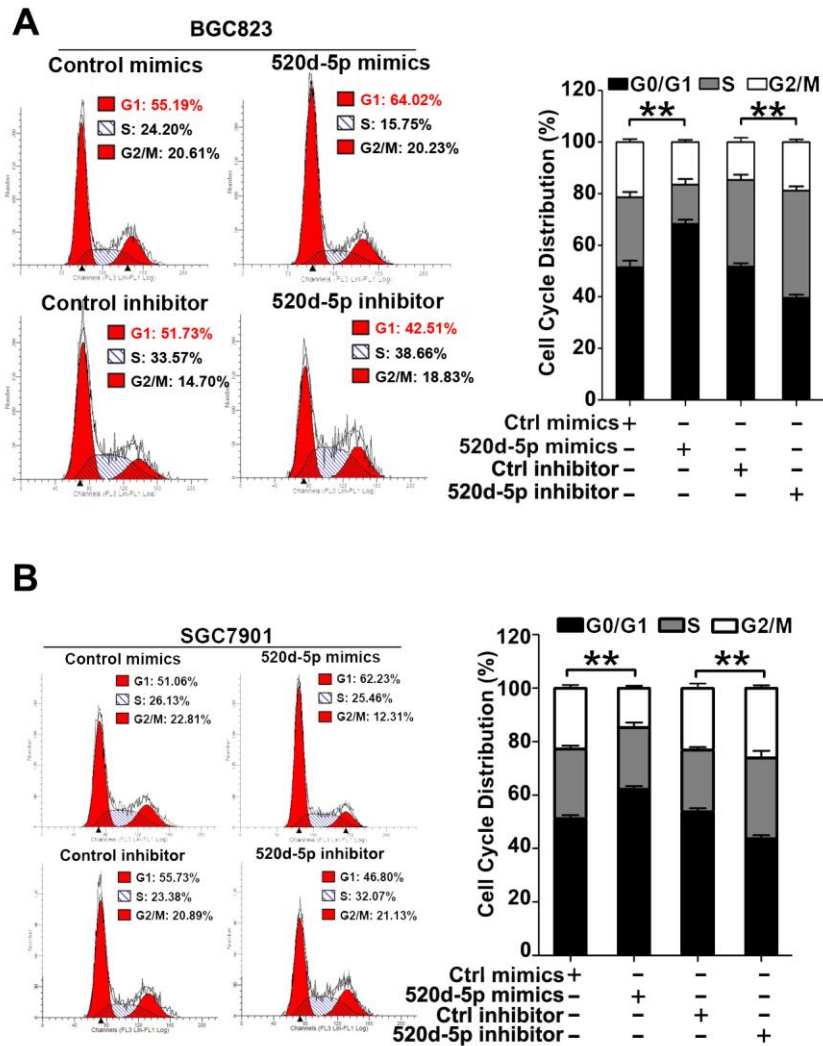


图 31 miR-520d-5p 导致细胞发生 G0/G1 细胞周期阻滞。流式细胞周期分选结果显示：胃癌细胞中过表达 miR-520d-5p 后，细胞 G0/G1 期明显增多，而 S 期细胞百分比则明显降低；相反在胃癌细胞中抑制 miR-520d-5p 的表达后，G0/G1 期明显降低，而 S 期细胞百分比则明显增多。

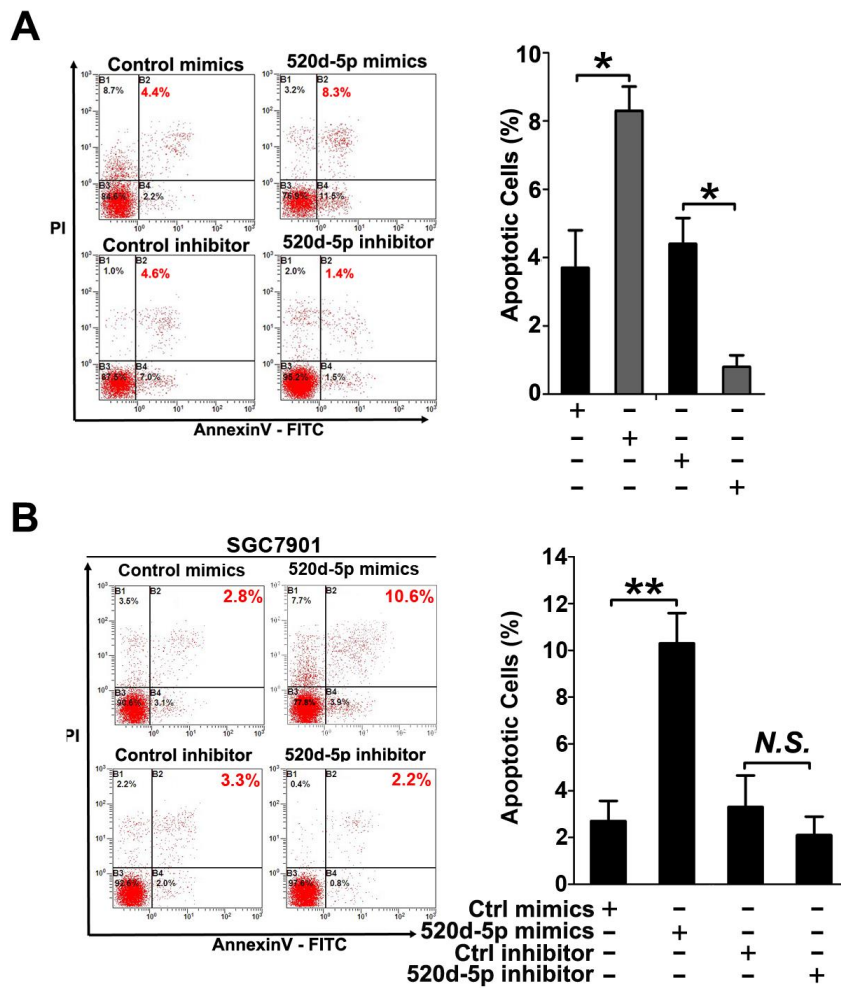


图 32 miR-520d-5p 促进胃癌细胞凋亡。流式细胞凋亡结果显示：在胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 中过表达 miR-520d-5p 后，细胞凋亡率明显升高；相反在胃癌细胞中抑制 miR-520d-5p 的表达后，细胞凋亡率明显降低。

3.2.3 miR-520d-5p 在体内抑制胃癌细胞增殖

我们随后在体内进一步验证了 miR-520d-5p 的功能。结果发现，转染了 miR-520d-5p 的胃癌细胞 BGC823 在体内生长速度明显低于对照细胞，其在裸鼠皮下形成的肿瘤体积和重量显著降低（图 33）。

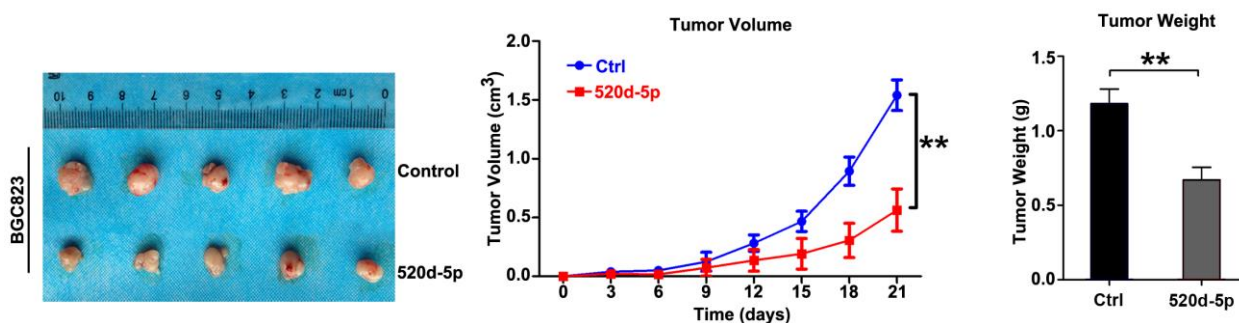


图 33 miR-520d-5p 在体内抑制胃癌增殖。左：转染 miR-520d-5p 及对照的 BGC823 细胞形成的裸鼠成瘤的代表图片；中：转染 miR-520d-5p 及对照的 BGC823 细胞形成的裸鼠成瘤的体积变化曲线；右：转染 miR-520d-5p 及对照的 BGC823 细胞形成的裸鼠成瘤的重量。

3.3 miR-520d-5p 通过直接结合 CypB 的 3'-UTR 调控胃癌增殖

3.3.1 miR-520d-5p 抑制 CypB-WT-UTR 载体对 CypB 的过表达

我们分别构建了 CypB-wt-UTR 及在 miR-520d-5p 结合位点突变的 CypB-mut UTR 载体，转染胃癌细胞 BGC823 后通过 WB 检测 CypB 的表达。结果显示，两个载体都能够过表达 CypB (图 34A)。随后我们同时共转染 miR-520d-5p 发现，CypB-wt UTR 载体过表达的 CypB 能够被 miR-520d-5p 抑制，而 mut UTR 的载体则不能 (图 34B)。

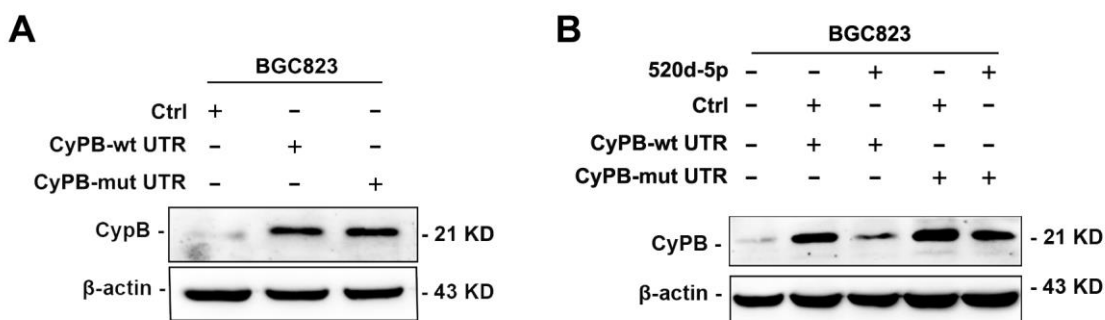


图 34 miR-520d-5p 抑制 CypB-WT-UTR 载体对 CypB 的过表达。A. 我们分别构建了 CypB-wt-UTR 及在 miR-520d-5p 结合位点突变的 CypB-mut UTR 载体，转染 BGC823 细胞结果显示，两个载体都能够过表达 CypB。B. 我们在 BGC823 中过表达

CypB 的同时共转染 miR-520d-5p 发现, CypB-wt UTR 载体过表达的 CypB 能够被 miR-520d-5p 抑制; 而 mut UTR 的载体则不能。

3.3.2 miR-520d-5p 逆转 CypB-wt-UTR 的功能

随后我们通过功能实验研究发现, 在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞增殖显著加快, 共转染的 miR-520d-5p 能够消除 CypB 对增殖的促进作用 (图 35)。流式细胞分析结果也显示, 在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞的 G0/G1 百分比明显降低, 而 S 期细胞明显增多, 且细胞的凋亡率也显著降低, 共转染的 miR-520d-5p 能够消除 CypB 对细胞周期和细胞凋亡的改变 (图 36、37)。此外, 体内实验也得出了类似的结果 (图 38)。这些数据说明 CypB 是 miR-520d-5p 的功能性靶基因。

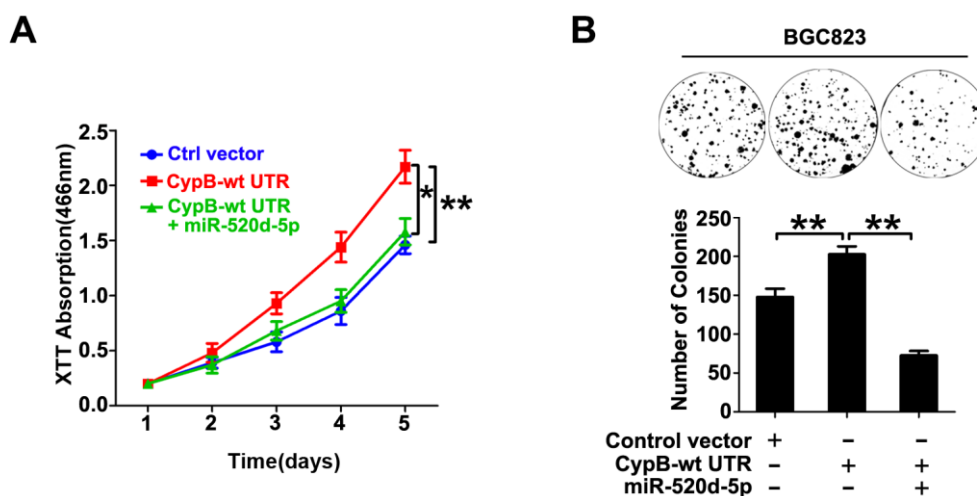


图 35 miR-520d-5p 逆转 CypB-wt-UTR 促进胃癌增殖的功能。XTT 结果 (A) 表明, 在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞增殖显著加快, 共转染的 miR-520d-5p 能够消除 CypB 对增殖的促进作用。平板克隆形成实验 (B) 也得到了类似的结果。

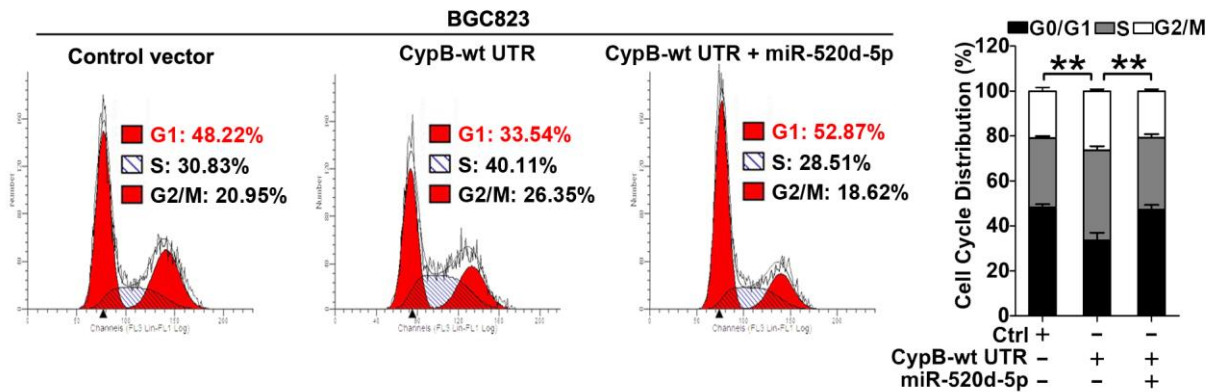


图 36 miR-520d-5p 逆转 CypB-wt-UTR 对细胞周期的调控。细胞周期结果表明，在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞的 G0/G1 百分比明显降低，而 S 期细胞明显增多，共转染的 miR-520d-5p 能够消除 CypB 对细胞周期的改变。

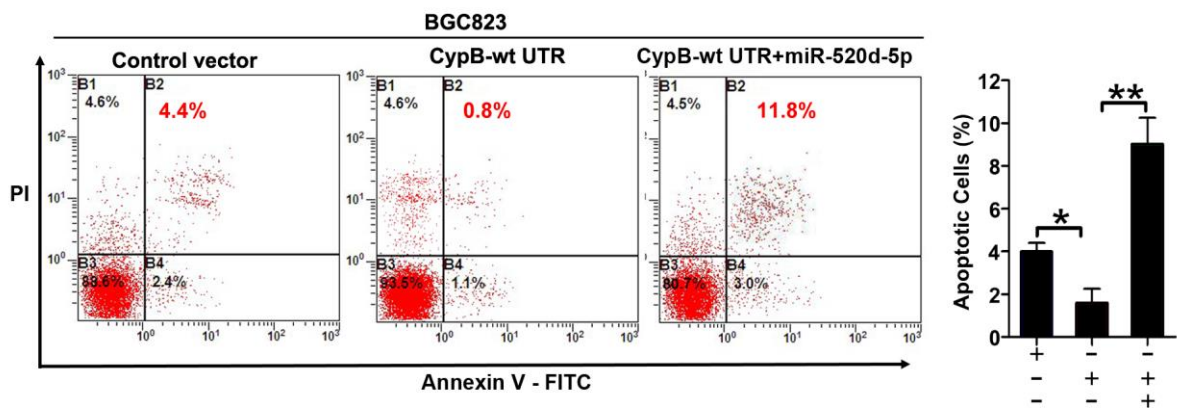


图 37 miR-520d-5p 逆转 CypB-wt-UTR 对细胞凋亡的影响。细胞凋亡结果表明，在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞凋亡率明显降低，共转染的 miR-520d-5p 能够逆转 CypB 对细胞凋亡率的降低效果。

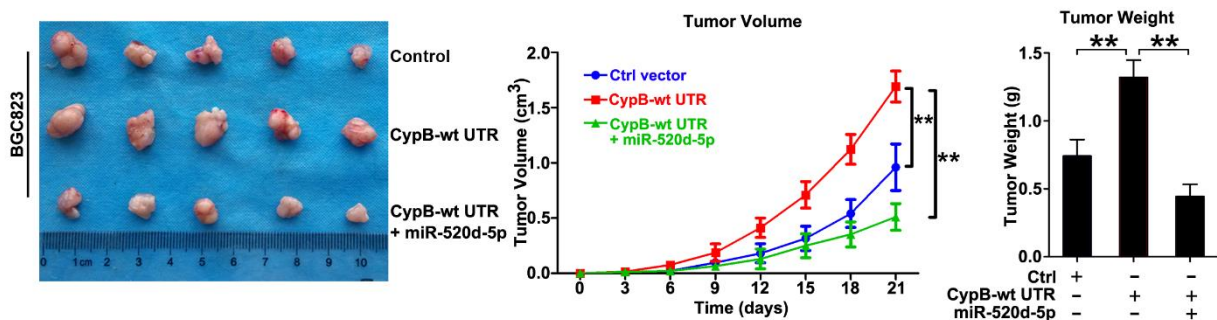


图 38 miR-520d-5p 在体内逆转 CypB 对增殖的促进作用。 裸鼠皮下成瘤实验结果显示，在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后成瘤体积、重量显著上升，而过表达 miR-520d-5p 能够逆转 CypB 对胃癌细胞生长的促进作用。

3.3.3 miR-520d-5p 不能逆转 CypB-mut-UTR 的功能

为进一步证实该结论，我们把突变型 UTR 的 CypB 载体转染入 BGC823 细胞中，发现细胞增殖同样加快，但是共转染的 miR-520d-5p 却不能够逆转 CypB 对增殖的促进作用（图 39）。流式细胞分析结果也显示，在 BGC823 细胞中过表达含有野生型 UTR 的 CypB 载体后细胞的 G0/G1 百分比明显降低，且细胞的凋亡率也显著降低，而共转染的 miR-520d-5p 不能够逆转 CypB 对细胞周期和细胞凋亡的改变（图 40、41）。这些结果进一步证明，miR-520d-5p 的功能发挥依赖位于 CypB 的 3'-UTR 的结合位点。

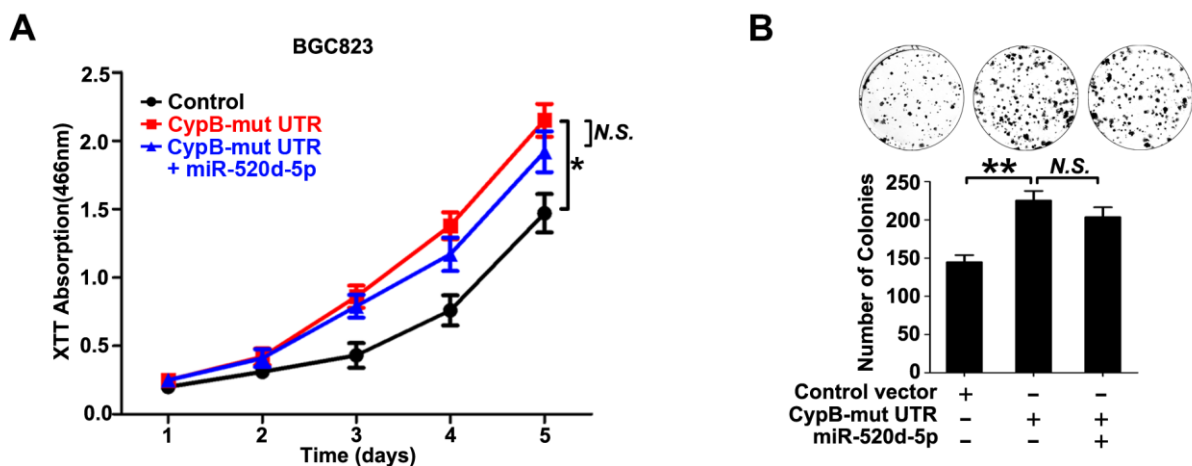


图 39 miR-520d-5p 不能逆转 CypB-mut-UTR 促进胃癌增殖的功能。(A) XTT 结果表明, 在 BGC823 细胞中感染含有突变型 UTR 的 CypB 过表达载体后细胞增殖显著减慢, 但 miR-520d-5p 过表达后则不能够消除 CypB 对增殖的促进作用。(B) 平板克隆形成实验也得到了类似的结果。

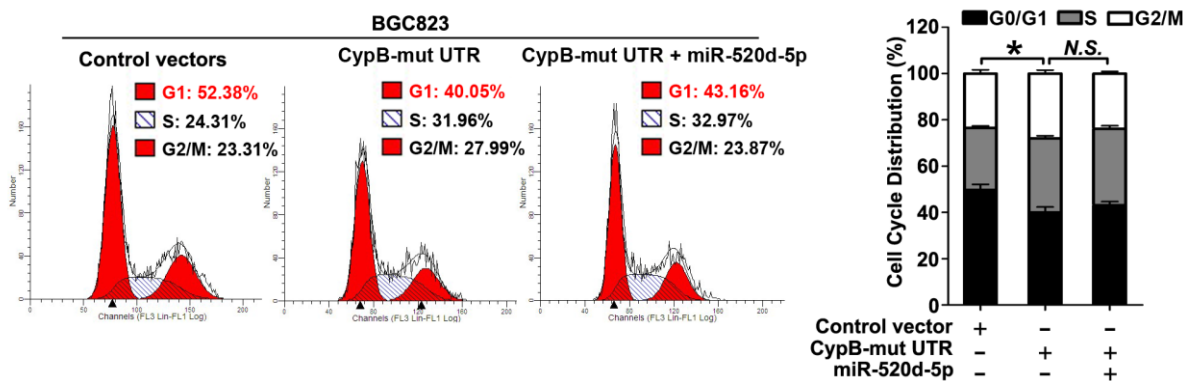


图 40 miR-520d-5p 不能消除 CypB-mut-UTR 对细胞周期的影响。细胞周期结果表明, 在 BGC823 细胞中过表达含有突变型 UTR 的 CypB 载体后细胞的 G0/G1 百分比显著下调, 而 S 期细胞明显增多, 共转染的 miR-520d-5p 不能够移除 CypB 对细胞周期的影响。

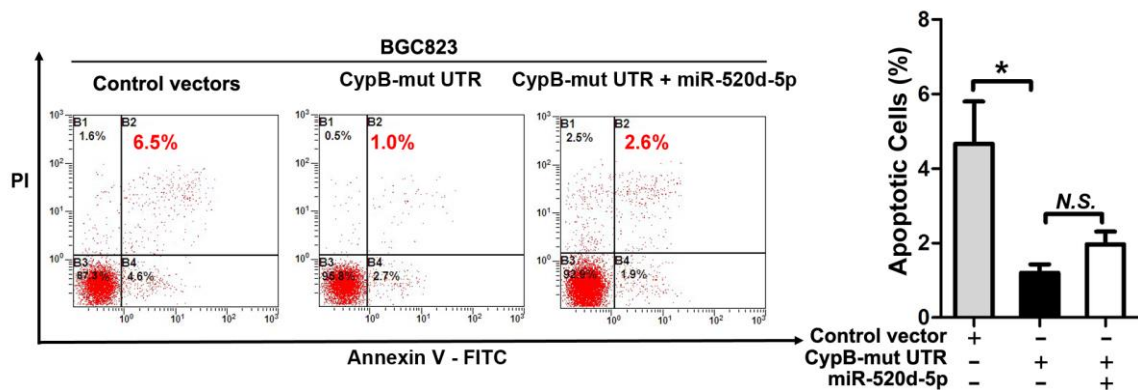


图 41 miR-520d-5p 逆转 CypB-wt-UTR 对细胞凋亡的影响。细胞凋亡结果表明，在胃癌细胞中感染含有突变型 UTR 的 CypB 载体后细胞凋亡率降低，但是 miR-520d-5p 不能消除 CypB 对细胞凋亡率的降低效果。

4 讨论

本部分研究中我们发现 miR-520d-5p 通过靶向 CypB 的 3'-UTR 抑制其 mRNA 表达，导致 CypB 的蛋白表达水平下降，进而抑制胃癌增殖。我们通过体内和体外实验证实，CypB 是 miR-520d-5p 的靶基因，介导了后者在胃癌增殖和存活中的功能。

CypB 的表达调控目前研究较少，近期研究发现 miRNA 是一类重要表观遗传学调控分子，通过靶向靶基因 3'-UTR 抑制其表达。近期许多证据表明，microRNA 同肿瘤包括胃癌发生发展密切相关[195]。那么 CypB 在胃癌中表达异常变化是否同 miRNA 的表达失调有关呢？MicroRNA 是否在 Hp 感染造成的炎症引发胃癌的病理过程中参与了 CypB 的调控呢？

我们通过生物信息预测发现 miR-520d-5p 是潜在的 CypB 上游调控 miRNA。细胞中二者表达负相关，提示 miR-520d-5p 的表达异常可能是 CypB 的表达失调的原因。近期多种研究也表明 miR-520d-5p 是抑癌 miRNA。

在乳腺癌中 miR-520 家族可能通过直接靶向 RELA 强烈抑制 NF- κ B 通路，并降低炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达和分泌。其抑制转移功能由其对靶分子 TGF- β 受体的直接抑制介导。而且，miR-520 同 TGFBR2 的表达在 ER 阴性的乳腺癌病人组织中负相关，而在 ER 阳性的病人中则无相关。有趣的是 miR-520 表达降低同 ER 阴性的肿

瘤淋巴结转移有关。这些结果表明 miR-520 家族基因在乳腺癌中发挥抑制炎症信号通路和转移的作用[196]。

肝癌中也研究发现 miR-520 是一个抑癌基因，其通过调控代谢影响肝癌表型。代谢变化在多种肿瘤中均被发现且同病人的临床转归有关，肝癌中 TARDBP (Tat-activating regulatory DNA-binding protein) 调控 PFKP (phosphofructokinase) 的表达，后者是糖酵解和葡萄糖分解过程中的限速酶。而 miR-520 家族 miRNA 则被发现是 TARDBP 介导的糖酵解过程中的中间调节因子。TARDBP 能够抑制 miR-520 的表达，而后者抑制 PFKP 的表达。研究最终在肝癌组织中验证了 TARDBP 同肝癌病人预后的关系。这些结果表明 miR-520 在肝癌中能够通过调控肿瘤代谢抑制肿瘤增殖[197]。

另一项在肝癌中的研究指出，miR-520d 能够增加肝癌细胞对 5 氟尿嘧啶(5-FU) 的敏感性。研究发现，EGFR 突变体 III 能够促抑制 miR-520d 的表达，进而导致转录因子 E2F-1 和胸腺嘧啶合成酶 TS 的表达升高，后二者是介导肝癌耐药的重要调控因素。CH12 的使用能够增加 miR-520d 的表达，并进而导致 E2F-1 和 TS 的 mRNA 及蛋白的水平降低。这些结果表明，miR-520d 在肝癌中具有作为增加化疗敏感性的潜在治疗价值[198]。

此外，miR-520d-5p 能够通过靶向 TWIST1 抑制肿瘤转移。TWIST1 被发现是 miR-520d-5p 的靶基因，上调 miR-520d-5p 导致的 TWIST1 表达抑制能够造成后者下游的 miR-10b 的表达降低，进而能够 E 钙粘素 (E-Cadherin) 的表达升高，从而抑制肿瘤细胞发生 EMT，抑制肿瘤转移。此外，研究者还发现 miR-520d-5p 还能够抑制肿瘤细胞的增殖，而且高水平的 miR-520d-5p 同肿瘤病人的生存期延长有关。这些结果表明 miR-520d-5p 能够抑制肿瘤转移[30]。

miR-520d-5p 还被发现在结肠癌中调控肿瘤转移和增殖。研究通过 qRT-PCR 证实，同癌旁正常组织相比，miR-520d-5p 在结肠癌组织中表达明显降低。在结肠癌主细胞中过表达 miR-520d-5p 能够抑制肿瘤增殖、转移和侵袭。WB 结果表明，miR-520d-5p 通过抑制 ERK1/2 激活而抑制 EMT 的发生。可见，在结肠癌中 miR-520d-5p 能够通过抑制肿瘤增殖和转移等恶性表型发挥抑癌作用[29]。

结合我们的研究结果，我们可知在胃癌中 miR-520d-5p 同样是发挥抑癌作用。我们首先通过生物信息学分析我们筛选到若干可能调控 CypB 的 microRNA，并将其

mimics 分别转染胃癌细胞系。结果发现，miR-520d-5p 能够抑制 CypB 的表达。双荧光素酶报告基因实验证实，miR-520d-5p 能够直接结合 CypB 的 3'端非翻译区。QRT-PCR 和 western Blotting 实验进一步证实，miR-520d-5p 在转录水平导致 CypB 的 mRNA 降解。这些实验证实，miR-520d-5p 是 CypB 上游的直接调控分子。这是首次在 miRNA 角度分析 CypB 的表达异常的研究，对于解释 CypB 在胃癌中表达异常变化具有重要意义。

随后我们研究了 miR-520d-5p 同其靶基因 CypB 在调控胃癌增殖过程中的功能。我们建立了 miR-520d-5p 的功能获得、缺失模型。随后的功能实验证实，无论在体内还是体外，miR-520d-5p 均抑制胃癌细胞增殖，促进细胞凋亡。随后含有野生型和突变性 3'-UTR 的 CypB 表达载体同 miR-520d-5p 被用于共感染细胞，XTT 和克隆形成实验表明 miR-520d-5p 能够减弱野生型 3'-UTR 的 CypB 载体对胃癌细胞增殖的促进作用，但不能逆转突变型 3'-UTR 的 CypB 载体的作用。流式细胞周期和凋亡分析实验得到了类似的结果。这进一步说明，miR-520d-5p 通过结合 CypB 3'-UTR 调控胃癌细胞生长。

总结本部分结果，我们探索了 miR-520d-5p/CypB 通路在胃癌中的功能，那么它们在胃癌炎癌转化中同 STAT3 激活的相关机制如何？

第四部分 miR-520d-5p 通过 CypB 调控 STAT3 活性

综合前面的结果,我们可以推断 CypB 是 miR-520d-5p 的功能性靶基因,而 CypB 的功能发挥通过 STAT3 介导,那么是否 miR-520d-5p/CypB 轴能够在胃癌细胞中调控 STAT3 的活性呢?

1 材料

1.1 细胞系

同第一部分

1.2 抗体

主要使用抗体如下:

STAT3 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

pSTAT3 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

JAK2 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

pJAK2 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

CypB 抗体: 购自 Abcam 公司

B-actin 抗体: 购自 Sigma Aldrich 公司

Bcl-2 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

Bax 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

Cyclin D1 抗体: 购自 Cell Signalling Technology 公司

1.3 其他试剂和仪器

1.1.1 激光共聚焦显微镜: 奥林巴斯 FV10i

1.1.2 人重组 IL-6: 购自 R&D 公司

2 方法

2.1 蛋白提取和免疫蛋白印迹

同第一部分。

2.2 IL-6 处理细胞方法

细胞免疫荧光中的 IL-6 刺激方法同第二部分。

WB 中的 IL-6 处理方法主要步骤如下：

- 1) BGC823 细胞细胞生长在 6 孔板中，融合度为 50%；
- 2) 饥饿细胞：细胞培养液更换为无 FBS 的 DMEM 培养液，在 5% CO₂ 的 37°C 孵箱中培养 24 h；
- 3) 在无血清培养基中加入人重组 IL-6（溶解于 DMSO），浓度为 50 ng/mL，刺激时间为 0-15 min，对照组加入同等体积的 DMSO；或者浓度为 2、20、50ng/mL，刺激时间为 30 min，对照组加入同样体积的 DMSO；
- 4) 刺激结束后，弃培养液，用 PBS 清洗 3 次，每次 5min；
- 5) 细胞半干时，采用 200uL 蛋白裂解液裂解每孔细胞；
- 6) 进入上述 WB 或细胞免疫荧光的步骤。

2.3 细胞免疫荧光

- 1) 山羊血清室温封闭 1 h；
- 2) 用 TBST 稀释一抗 anti-CypB 1: 100；
- 3) 加入一抗覆盖细胞，锡纸包裹 4 度避光过夜；
- 4) 取出细胞复温至室温约 1 h，TBST 洗 5 min×3 次
- 5) TBST 稀释二抗，浓度 1: 50-1:200；同时配制内质网标记探针（ER Tracker, CST）；
- 6) 加入二抗和内质网标记探针，避光室温孵育 1h，TBST 清洗 5 min×3 次；
- 7) DAPI 染核，完全覆盖住细胞即可，室温孵育 15min，TBST 清洗 5 min×3 次；
- 8) 加入防荧光淬灭封片剂，避光，使用 confocal 显微镜进行拍照；
- 9) 60×放大倍数下，随机挑取视野统计 200 个细胞的 CypB 和内质网的相对定位并记录。

2.4 细胞周期和凋亡测定

同第一部分。

3 结果

3.1 miR-520d-5p 调控 JAK2/STAT3 通路的磷酸化

我们对 BGC823 转染 miR-520d-5p 的 mimics 或 inhibitor 发现，无论过表达或者抑制 miR-520d-5p 的表达，BGC823 细胞中 JAK2 和 STAT3 的总蛋白水平并无明显变化；而过表达 miR-520d-5p 后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平降低，沉默 miR-520d-5p 后，则 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平则明显升高（图 42）。

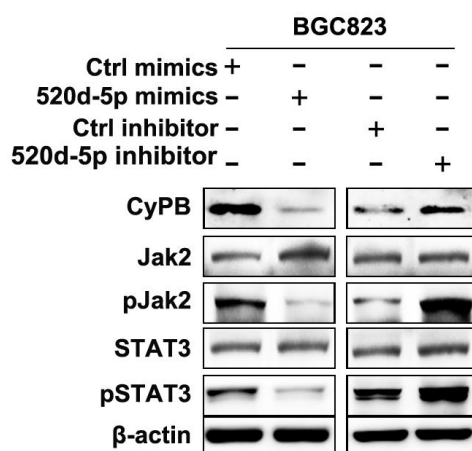


图 42 miR-520d-5p 抑制 JAK2/STAT3 通路蛋白的磷酸化 我们对 BGC823 转染 miR-520d-5p 的 mimics 或 inhibitor 发现，过表达 miR-520d-5p 后 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平；而沉默 miR-520d-5p 后，上述蛋白的磷酸化水平则明显升高。

3.2 miR-520d-5p 抑制 IL-6 刺激造成的 STAT3 的激活

我们将 BGC823 中过表达 miR-520d-5p 后，CypB 明显下调。随后我们对细胞饥饿 24h 后使用同样浓度的 IL-6（50ng/mL）刺激细胞不同的时间(0-15min)或使用不同浓度的 IL-6 刺激（0-50ng/mL）刺激同样的时间（30min），结果发现 IL-6 刺激能够造成 STAT3 磷酸化明显上调，且其上调有明显的时间和浓度依赖性；但 miR-520d-5p 过表达的细胞中，pSTAT3 随着 IL-6 刺激浓度和时间增加而上升的趋势明显被抑制（图 43、44）。

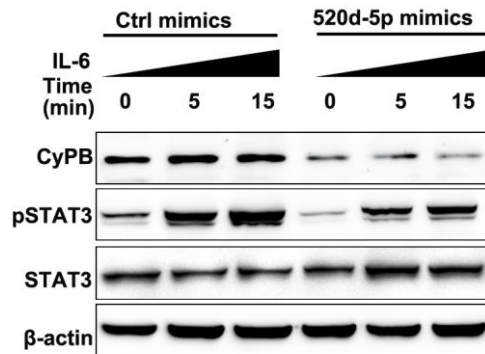


图 43 miR-520d-5p 抑制 STAT3 被 IL-6 激活的时间依赖性。我们将 BGC823 中过表达 miR-520d-5p 后，CypB 明显下调。随后我们对细胞饥饿 24h 后使用 IL-6 刺激（50ng/mL），发现 IL-6 刺激能够造成 STAT3 磷酸化明显上调；但 miR-520d-5p 过表达的细胞中，pSTAT3 上升的趋势明显被抑制。

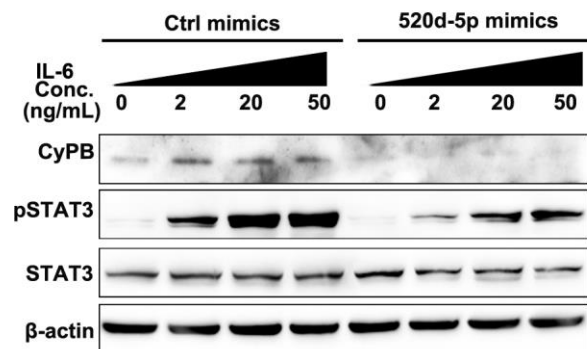


图 44 图 43 miR-520d-5p 抑制 STAT3 被 IL-6 激活的浓度依赖性。与面实验类似，我们将 BGC823 中过表达 miR-520d-5p 后，CypB 明显下调。随后我们对细胞饥饿 24h 后使用不同浓度的 IL-6 刺激（0-50ng/mL），刺激时间为 30min，发现 IL-6 刺激能够造成 STAT3 磷酸化明显上调，且其上调有浓度依赖性；但 miR-520d-5p 过表达的细胞中，pSTAT3 随着 IL-6 刺激上升的趋势明显被抑制。

3.3 miR-520d-5p 抑制 IL-6 刺激造成的 STAT3 的入核

我们通过细胞免疫荧光实验研究 miR-520d-5p 对 STAT3 入核的影响。我们将

BGC823 中过表达 miR-520d-5p 后，发现 CypB（红色）明显下调，随后我们对细胞饥饿 24h 后使用 IL-6 刺激（50ng/mL），时间为 30min。之后发现对照组中 IL-6 刺激能够造成大部分细胞出现 STAT3(绿色)入核的现象，同时 CypB 也大部分进入细胞核，并同 STAT3 在细胞核中有共定位；而在 miR-520d-5p 将 CypB 沉默后，我们则发现 STAT3 入核的比例同 IL-6 刺激之前相比无明显变化。这提示 miR-520d-5p/CypB 通路可能参与调控 STAT3 的入核过程。

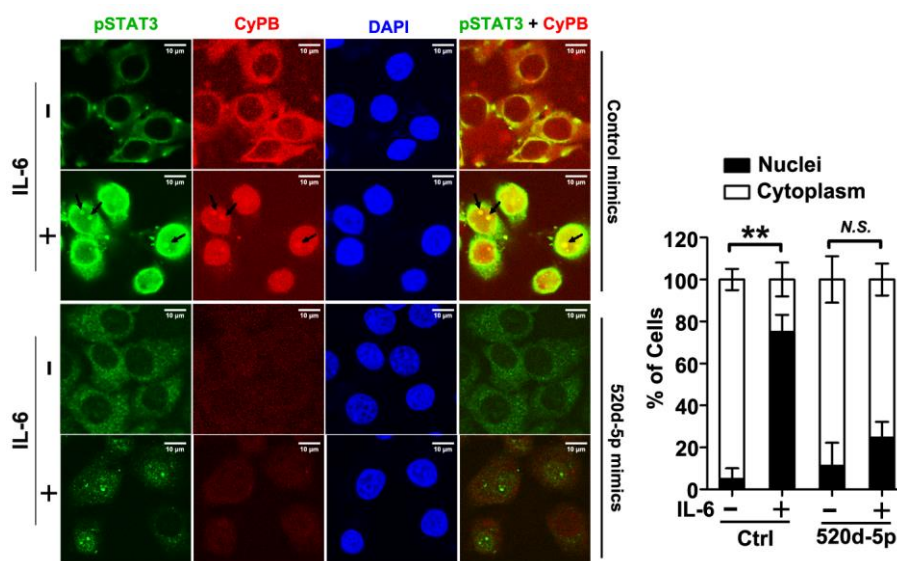


图 45 miR-520d-5p 抑制 IL-6 刺激造成的 STAT3 的入核。与上述实验类似，我们通过细胞免疫荧光实验研究 miR-520d-5p 对 STAT3 入核的影响。我们将 BGC823 中过表达 miR-520d-5p 后，CypB（红色）明显下调，随后我们对细胞饥饿 24h 后使用 IL-6 刺激（50ng/mL），时间为 30min。之后发现对照组中 IL-6 刺激能够造成大部分细胞出现 STAT3(绿色)入核的现象；而在 miR-520d-5p 将 CypB 沉默后，我们则发现 STAT3 入核的比例同 IL-6 刺激之前相比无明显变化。

3.4 miR-520d-5p 通过 CypB 调控 JAK2/STAT3 通路及其下游蛋白

我们进一步检测 STAT3 下游的细胞周期和凋亡相关蛋白后，我们发现：在稳定转染含有野生型 UTR 的 CypB 载体的 BGC823 中，miR-520d-5p 可以逆转 CypB 对 STAT3 的活性激活，而且其下游的细胞周期和凋亡相关蛋白的变化也被逆转；但是在 CypB 载体的 miR-520d-5p 结合位点突变后将其感染细胞，则无类似现象发生(图 46)。

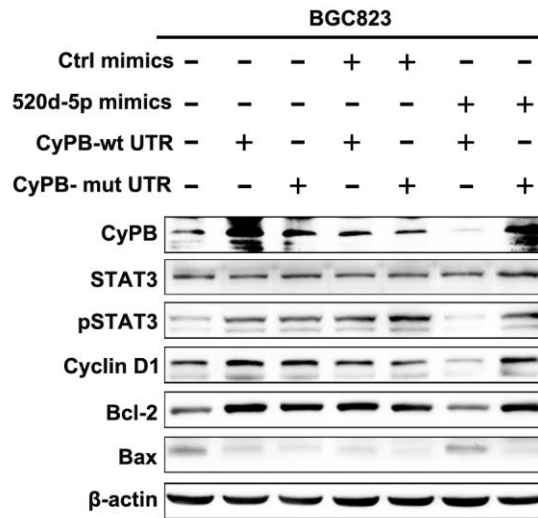


图 46 miR-520d-5p 通过 CypB 调控 JAK2/STAT3 通路及其下游蛋白。

3.5 miR-520d-5p/CypB 通路通过 STAT3 调控胃癌增殖

随后我们通过联合使用 miR-520d-5p 的抑制剂和 STAT3 的 shRNA 后发现，520d-5p 的 inhibitor 对 STAT3 的磷酸化的上调作用能够被 shSTAT3 所抑制（图 47）。进一步的功能实验证实：沉默 STAT3 能够逆转 miR-520d-5p 抑制物对胃癌细胞的增殖、平板克隆形成、细胞周期和凋亡的影响。这些结果提示，STAT3 是 miR-520d-5p 功能发挥的中介。

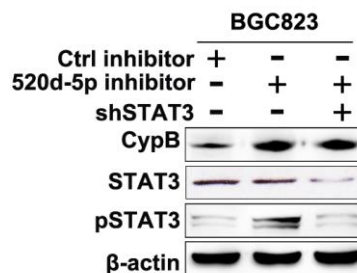


图 47 shSTAT3 逆转 miR-520d-5p 抑制物对 STAT3 磷酸化的上调。我们通过联合使用 miR-520d-5p 的抑制剂和 STAT3 的 shRNA 后发现，520d-5p 的 inhibitor 对 STAT3 的磷酸化的上调作用能够被 shSTAT3 所抑制。

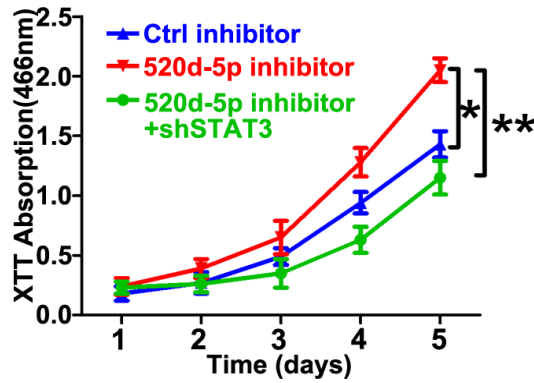


图 48 XTT 实验证实 shSTAT3 逆转 miR-520d-5p 抑制物的功能。随后的 XTT 功能实验证实，520d-5p 的 inhibitor 对胃癌细胞 BGC823 增殖的促进作用能够被 shSTAT3 所抑制。

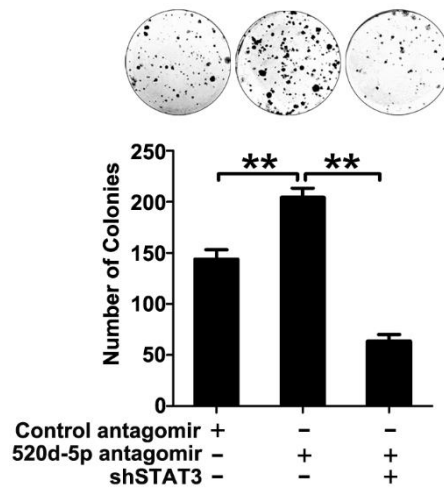


图 49 平板克隆形成实验证实 shSTAT3 逆转 miR-520d-5p 抑制物的功能。平板克隆形成实验证实，520d-5p 的 inhibitor 对胃癌细胞 BGC823 克隆形成的促进作用能够被 shSTAT3 所抑制。

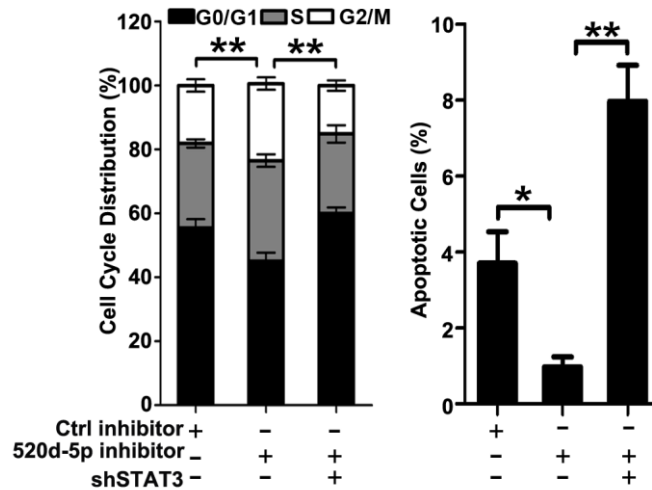


图 50 细胞周期和凋亡检测显示 shSTAT3 逆转 miR-520d-5p 抑制物的功能。流式细胞分析结果显示，520d-5p 的 inhibitor 对胃癌细胞 BGC823 的细胞周期和凋亡的调控作用能够被 shSTAT3 所抑制。

4 讨论

Hp 感染导致慢性胃炎过程中，IL-6 的产生及其下游信号通路的激活在胃癌的发生中起了关键作用。不少研究发现，Hp 的感染能够显著促进胃黏膜中 IL-6 的产生。一项在蒙古沙鼠模型中的研究发现，感染野生型 Hp 48 周后，沙鼠胃黏膜细胞的 IL-6 的 mRNA 水平明显升高，在 12 个月后达到最高峰，这种变化可能是由 Hp 的膜表面蛋白诱导出现的[62]。一项针对 Hp 感染的日本成人的调查研究发现，受检人群血清中的 IL-6 水平同 Hp 的抗体水平明显正相关。这提示 Hp 的感染可能促进 IL-6 的产生[63]。还有研究发现，Hp 感染的患者胃黏膜中 IL-6 的水平明显高于 Hp 阴性的胃炎病人。这提示 IL-6 在 Hp 相关的胃炎疾病进展中的潜在病理作用[64]。

Hp 被发现通过 IL-6 受体激活 STAT3 信号通路。研究者发现，感染 Hp 的胃上皮细胞的 STAT3 磷酸化水平升高，并出现从胞浆到胞核的定位转位现象。萤光素酶实验也证实 STAT3 信号通路被激活。进一步研究发现 STAT3 的激活是依赖于 CagA 蛋白的进入细胞而非磷酸化。研究结果表明，STAT3 的激活是通过 IL-6 受体实现的，

并能够被 gp130 抗体导致的 gp130 抑制所诱发。但是，这种激活同 IL-6 或者 IL-11 的自分泌无明显关系。总之，这些结果证实 Hp 能够通过 CagA 蛋白在体内和体外激活 STAT3 信号通路[65]。

IL-6 是被研究最为深入的促癌细胞因子之一。它的家族中包括 IL11、IL-27、IL-31、白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory Factor, LIF)、OSM、CNTF、CT-1 以及 CLC 等。这些细胞因子能够影响细胞增殖、存活、分化、迁移、侵袭、转移、血管生成、炎症以及代谢 (图 2) [66]。IL-6 家族成员中除 IL-31 之外，均能够通过特定受体和共同的受体亚单位 gp130 激活 JAK-STAT3 信号通路、PI3K-AKT 通路和 MAPK-ERK 通路。在这些通路中，STAT3 是 gp130 的主要下游信号通路，它是连接炎症和肿瘤发生的癌基因[9, 67, 68]。在既往的研究中，IL-6 被发现在包括皮肤癌、乳腺癌、肺癌、食管癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、血液系统肿瘤及黑色素瘤在内的多种肿瘤中表达升高[69]，这表明 IL-6 可能在癌症发生过程中的具有非常重要的作用。

在本部分研究中，我们进一步探索了 miR-520d-5p/CypB 通路的下游机制。我们发现，miR-520d-5p 过表达抑制了 JAK2 和 STAT3 的磷酸化；而且 IL-6 刺激造成的 STAT3 磷酸化随时间和浓度的依赖性受到 miR-520d-5p 过表达的抑制。另外，IL-6 刺激能导致 CypB 和 STAT3 在细胞核的共定位；而 miR-520d-5p 介导 CypB 沉默后，STAT3 的入核受到了明显的抑制。随后的功能实验证实，STAT3 的敲除能够逆转 miR-520d-5p 的沉默对细胞生长和细胞周期、凋亡的影响。这些结果说明 miR-520d-5p 通过调控 CypB/STAT3 轴影响 STAT3 的活化和胃癌细胞增殖。我们的研究补充了 IL-6/STAT3 信号通路中 STAT3 的调控机制。证实 miR-520d-5p/STAT3 通路调控 STAT3 的激活，进而调控胃癌恶性表型。

第五部分 STAT3 直接抑制 miR-520d-5p 表达

1 材料

1.1 细胞系

胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901。

1.2 其他试剂

1.2.1 基因组 DNA 纯化试剂盒: Promega

1.2.2 GloMax 生物发光检测仪: Promega

1.2.3 双荧光素酶报告基因检测系统: Promega

2 方法

2.1 RNA 提取和 qRT-PCR

1) 总 RNA 抽提同第三部分。

2) 总 RNA 纯度和完整性检测。纯度检测: 取 1 μ l RNA 样品 50 倍稀释, 在 BioPhotometer plus 艾本德核酸蛋白测定仪上测定 OD 值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值大于 1.8, 说明制备的 RNA 较纯, 无蛋白质污染。总 RNA 完整性检测: 取 RNA 样品 1 μ l, 1% 琼脂糖凝胶电泳 80V \times 20min, 用凝胶成像系统观察总 RNA 的 5s rRNA, 18s rRNA 和 28s rRNA 条带, 三条条带完整的话即可证明总 RNA 抽提比较完整。

3) 逆转录。在去 RNase 的 PCR 管中稀释 RNA 至相应浓度, 混匀, 85 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 以打开 RNA 二级结构。随后立即置于冰上, 以防止 RNA 复性再次恢复二级结构; 在另一去 RNase 的 PCR 管中配置以下溶液:

10mM dNTP (promega)	2.0	μ l
RNase inhibitor (promega)	0.5	μ l
miR-520d-5p 逆转录引物	0.5	μ l
U6 逆转录引物	0.5	μ l
5x buffer	4.0	μ l
M-MLV (promega)	0.5	μ l
总体积	8.0	μ l

将上述溶液混匀后 42°C 孵育 60min, 85°C 孵育 10min 灭活逆转录酶。

4) 定量 PCR。检测序列片段大小: 内参片段: U6-94bp; 目的片段: hsa-miR-520d-5p: 70bp (MIMAT0002855)

A. 引物

hsa-miR-520d-5p	F	:	5'
ACACTCCAGCTGGGCTACAAAGGGAAGC			
hsa-miR-520d-5p R: 5' CTCAACTGGTGTCTCGTGGGA			
U6-F: 5' CTCGCTTCGGCAGCACA			
U6-R: 5' AACGCTTCACGAATTTGCGT			

B. 反应体系:

cDNA (1:20)	5.0	μl
上游引物	0.5	μl
下游引物	0.5	μl
2x SYBR Green qPCR SuperMix	10	μl
dH ₂ O	4.0	μl
总体积	20	μl

C. 反应条件: 50°C 2min; 95°C 2min; 95°C 15s, 60°C 32s 读板, 40 cycles。融解曲线分析: 温度 60°C-95°C。每个样重复 3 次。

2.2 miR-520d 启动子的载体构建

2.2.1 结合位点位置和载体序列

>hg19_refGene_NR_030204 range=chr19:54221350-54223436 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

ATCTTTCTTTTTTCTAGTTTTAATAATGGCACCAGGCAGAGTACAGTGGCCCACGCCTGTAATTC
CAGCACTTTGGGAGGCTGAGACAGGAGGATCACCTGAGGTCGGGAATTTGATTCCAGCCTG
GCCAACATGGTGCAGCCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCCAGCATGGTGGTGGTAT

ATGCTTGTAATCCCAGCTACTCTGGAGGCTGAGGCAGGAGAGTCGCTTGAAGCTGGAAGGCT
GATCTTTCAATGAGCTGAGATCACGCCACTGCACTCAAGCCTCGGC AAAAAGAGTGAGACTC
CATCTCAAAAACATAAAAAATAGGCCAGACACGGTGGTCCACTCCTGTAATCCCAGCACTTT
GAGAGGCCAGGACAGGCGGATCTCCTCAGGTCAGGAGTCCAAGACTAGCTGGGCAAACAA
GGCAAACCTCGTCTATACTAAAATTAGGAAAAATGGCTGGGAACAGTGGTGGACACCTGTA
ATCTCAGCTACTTGGGAGGCCACGGCAAGAGAATCTCTTGAACTGGGAAAAGGAGATTGC
AGTGAGACGAAATCACACCATTGTA CTCCATCCTGGGTGACAGAGTGAGATTCTGTTTCAA
AATTAATAAATAGGCCGAGCACAGTGACTCATGCCTGTAATCCCAGAACTTTGGGAGGCCG
AGGTGGCGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCAAGACCAGCCTAACCAACACGTAGAAACCCC
ATCTCTACTAAAATAACAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCGCATGCCTGTAATCCCAGCTGCTC
GGGAGGTTGAGGCAAGAGAATCACTTGAACCCCAGGGGGCGGAGGTTGTGGTGAGCCGAG
ATTGTGCCATTGTATTCCAGCCTGGGCAACGAGTGAAACTCTGTCTCTAAATAAATAAATAA
ACTATTAATAAACATTA AACGTAAAAAATAAAAAATAGATAAATATGAGATCATCATGAATTT
GAGTGTACCTTTGCGCAGGGCCCATGGTAATCTTTGTCAATCCAATTTTTTTCATGCGTGCTGC
CAAAGCTAGCACTTGTGTGTAGGAAGTATTCTTCTGTGAGCATAACAATATATGGAAGTTTCTT
TTATTATTATTTTTTATGTTTTTGC GACTGAGTTTTGCTCTTGTGCGCATAGGCTGAAGTGCA
ATGGTGTGATCTGGGCTCCCTGCGATGTCCACCTCTGGGTTAAAGCGACTCTCCTACCTCAG
CCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATACACTTCCAGGGCTAGCTAATTTGTTGATTTTTAGT
AGACGGGATTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTCAA ACTCCCGACTTCAGGTGATCTGCC
ACCTTGGCTTTCCAAAGTACTGGGATTGCAGACAGCCACCGGGCTGGCCTTCATATATTCTT
ATATATATAATATCATGTACACACAAAAGACTCTTTTACACCCTGAGAATACTCTTATATCACTT
TGGGCATTTTTTTGTTGGTGTGTGCATTTTTTTGTTTGTTCGTTTCGTTTGTTTTTGAGACAAGAT
CTGGCCCTGTACCTATGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGCTCCCGGCAACCTCAACCT
CCCACCTCAGCCTCCTGAATTAGTGTCTACAGGCATGCACCTCTATACCTGGCTAACTTTTTGTA
TTTTTACAGATGAGGTTTTACCATGTTTTCCAGGCTGGTGTCTAACTCCTGAGAAATAAAGGTA
TATGTAGTAGGCGTTGCTTTTTCTCTTTGAAGACAAAACCCAGGACAGTTGTCCCTCGATGAA
CAAGGCTAACCTGCTGAACGTTTGAAGCAAGGAACTGGAGATGGTCTTTGTATCGGTTTATG
TTCTAGATTCCAGAAAATATGCAAACAGGACCAATAAATGCATCTTTATTTTTGTGTCCATTTT
GACCAGGTCAAGGAAAATTTCAACAAGAAACCCAGAGTGCCGGAGCAAGAAGATTCTCAAG

CTGTGAGTCTACAAAGGGAAGCCCTTTCTGTTGTCTAAAAGAAAAGAAAGTGCTTCTCTTTG
GTGGGTTACGGTTTGAGA

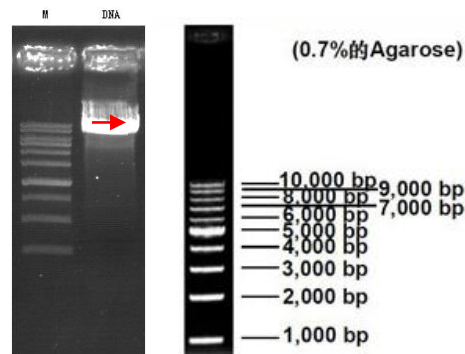
引物: 520d-1KpnIF:5'CGG GGTACC TCTCAAGCTGTGAGTCTACAAAG 3'
520d-2KpnIF:5'CGG GGTACC CATTTCAGAGCATGCTTATCAC 3'
520d-3KpnIF3:5'CGG GGTACC TGGGCACCTGTAATCCCAGCTAC 3'
520d-4KpnIF:5'CGG GGTACC GCTAAGGCTTGAGAATGGCTTG 3'
520d-5KpnIF:5'CGG GGTACC GGTTCCCTGTTGCCAGGCGG 3'
520d-6KpnIF:5'CGG GGTACC AGAGATGCCCGCCATCGTGTC 3'
520d-7KpnIF:5'CGG GGTACC ATGTTTGTGTGTGAGACAATG 3'
520d-1HindIIIR:5'CCC AAGCTT AAAAATGCATTTATTGGCCCTG 3'(共用下游引物)

2.2.2 基因钓取

1) 基因组模板的制备

- A. 收集细胞至一干净的 1.5ml EP 管中;
- B. 加入 600 μ L 核裂解液, 用移液枪反复吹打以裂解细胞并放置于 65 $^{\circ}$ 20min;
- C. 加入 3 μ L RNase, 颠倒 2-5 次, 37 $^{\circ}$ 30min 并冷却至室温;
- D. 加入 200 μ L 蛋白沉淀液并使用涡旋振荡器高速剧烈振荡 20 sec, 转移至冰上 5 min;
- E. 室温 12 000 rpm 离心 4 min, 形成白色致密的蛋白沉淀;
- F. 小心移取上清(含 DNA)至一干净的 1.5 mL EP 管中, 加入 600 μ L 异丙醇, 移取上清的时候勿碰到沉淀;
- G. 轻轻上下颠倒混匀溶液, 直至白色线状 DNA 形成块状沉淀;
- H. 室温 12 000 rpm 离心 5 min, 此时可见白色 DNA 沉淀, 小心弃去上清;
- I. 加入 600 μ L 70%乙醇, 轻轻颠倒 EP 管数次清洗 DNA 沉淀, 室温 12 000 rpm 离心 2 min;
- J. 小心弃去上清, 并将 EP 管倒置于干净的吸水纸上, 自然干燥 10-15 min;
- K. 加入 100 μ L ddH₂O, 60 $^{\circ}$ C 烘箱中孵育 1 h 以溶解 DNA;
- L. DNA 样品保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2) 电泳检测基因组 DNA



泳道 M: GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder Marker; 泳道 1: 人基因组 DNA; 由图可见, 人基因组 DNA 已提取出来 (红色箭头所示), 其大小在 10 kb 以上, 且未出现弥散条带, 说明所提取人的基因组 DNA 很完整, 没有 RNA 与蛋白质污染, 也没有发生降解, 因此, 可用于作为模板扩增目的基因。

3) PCR 反应体系

在 0.2 mL EP 管中配制以下体系, 基因组 DNA 模板量取 0.3 μL 分别进行扩增:

2 mM dNTP mixture	3 μL
10 \times buffer	2.5 μL
25 mM MgSO_4	1.5 μL
模板	0.3 μL
引物 F (20 μmol)	0.3 μL
引物 R (20 μmol)	0.3 μL
KOD-Plus-Neo	0.5 μL
ddH ₂ O	16.6 μL
Total	25 μL

注: KOD-Plus-Neo DNA Polymerase 购于 TOYOBO 公司, 货号: KOD-401;

4) 扩增条件混匀后, 置于 GeneAmp PCR System 2400 型 PCR 扩增仪扩增。

MIR-520D-5P-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7 基因启动子的扩增条件:

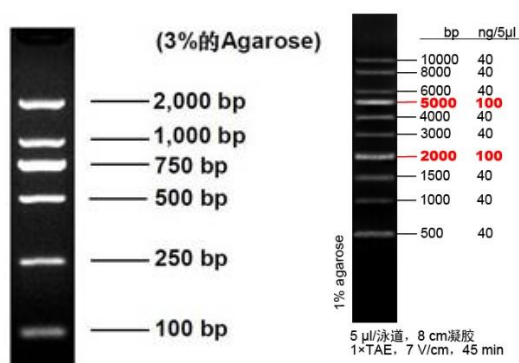
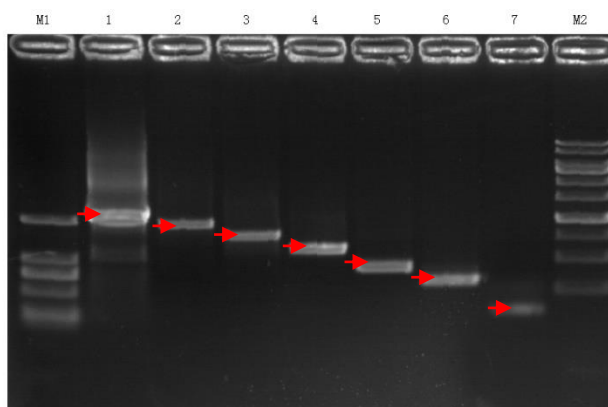
94 $^{\circ}\text{C}$	3 min	} 30 Cycles
98 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	

123-

58 °C 15 sec
 68 °C 2 min
 68 °C 5 min
 4 °C 保存

5) PCR 产物回收

6) PCR 产物切胶回收时照片:



泳道 M: DL 2000 DNA Marker

泳道 1: MIR-520D-5P-1 PCR 扩增产物(2000 bp);

泳道 2: MIR-520D-5P-2 PCR 扩增产物(1877 bp);

泳道 3: MIR-520D-5P-3 PCR 扩增产物(1551bp);

泳道 4: MIR-520D-5P-4 PCR 扩增产物(1186bp);

泳道 5: MIR-520D-5P-5 PCR 扩增产物(835 bp);

泳道 6: MIR-520D-5P-6 PCR 扩增产物(626bp);

泳道 7: MIR-520D-5P-7 PCR 扩增产物(239 bp);

泳道 M2: DL 2000 DNA Ladder Marker;

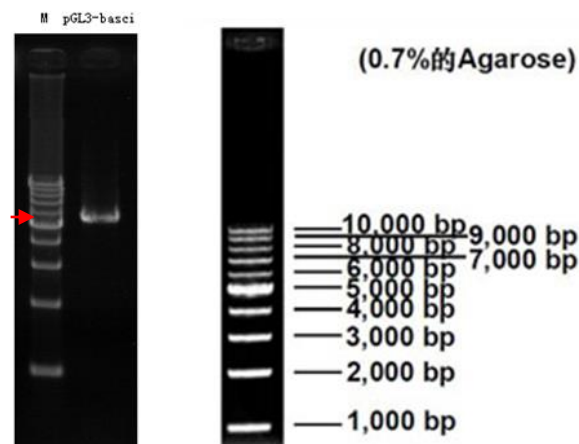
结果分析: MIR-520D-5P-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 分别用人基因组模板已扩增出来, 大小与预测一致; 证明 MIR-520D-5P 7 段启动子均已扩增出来;

2.2.3 PCR 回收产物及载体双酶切

在无菌的 0.2 mL EP 反应管, 分别取各 PCR 回收产物和 pGL3-basic 载体各 15 μ L, 用 *KpnI* 与 *HindIII* 双酶切, 酶切体系如下:

模板	15 μ L
<i>KpnI</i>	1.5 μ L
<i>HindIII</i>	1.5 μ L
10 \times buffer	5 μ L
ddH ₂ O	27 μ L
Total	50 μ L

混匀后, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h。



泳道 M: DL1kb DNA Marker; 泳道 1: pGL3-basici 双酶切后电泳结果;

结果分析: pGL3-basici 载体用 *KpnI*/*HindIII* 双切后, 在 5kb 稍左右有一条特异条带; 其它位置无明显条带, 说明载体双切完全, 可以用于后续连接实验;

2.2.4 酶切产物回收

2.2.5 目段片段与载体连接:

向 0.2 mL EP 管中加入以下试剂 (T4 DNA Ligase 酶购于 TaKaRa 公司, 货号: D2011A;)

酶切回收的 PCR 产物	3 μ L
酶切回收的载体 (pGL3-basic)	2 μ L
10 \times Ligase Buffer	1 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
ddH ₂ O	3 μ L
Total	10 μ L

16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。

2.2.6 连接产物的转化

步骤同前

2.2.7 质粒酶切鉴定阳性克隆

1) 从平板上各挑取 1 个单克隆于 3 mL LB 管中摇床过夜培养;

2) 质粒提取

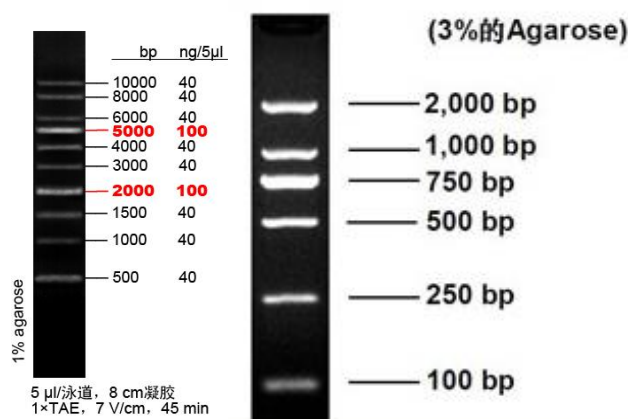
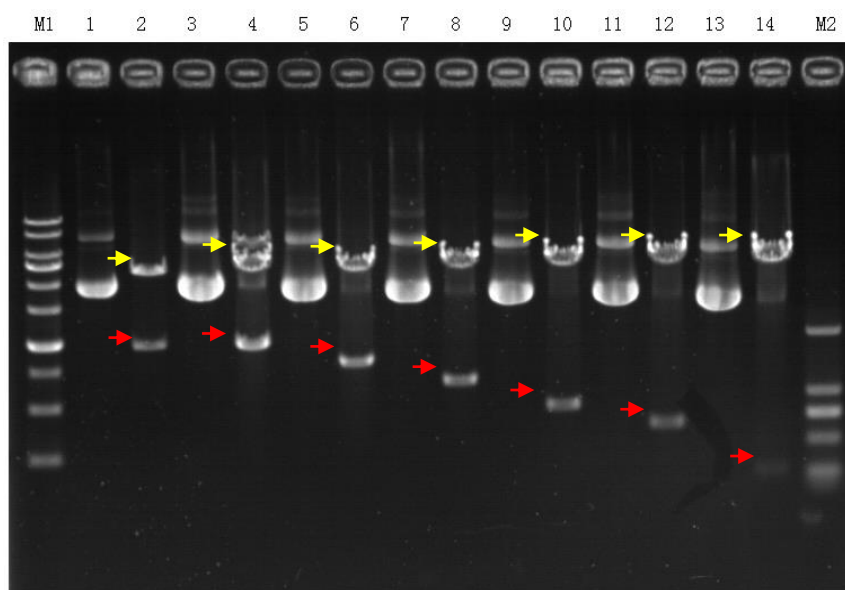
3) 酶切鉴定所提取质粒

酶切反应体系如下:

提取质粒	3 μ L
<i>KpnI</i>	0.4 μ L
<i>HindIII</i>	0.4 μ L
10 \times buffer	1 μ L
ddH ₂ O	5.2 μ L
Total	10 μ L

37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h。酶切产物以含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, UVP 凝胶成像系统成像。

结果如下:



泳道 M1: DL 1kb DNA Marker;

泳道 1-2: 分别为 MIR-520D-5P-1 的质粒与酶切后产物;

泳道 3-4: 分别为 MIR-520D-5P-2 的质粒与酶切后产物;

泳道 5-6: 分别为 MIR-520D-5P-3 的质粒与酶切后产物;

泳道 7-8: 分别为 MIR-520D-5P-4 的质粒与酶切后产物;

泳道 9-10: 分别为 MIR-520D-5P-5 的质粒与酶切后产物;

泳道 11-12: 分别为 MIR-520D-5P-6 的质粒与酶切后产物;

泳道 13-14: 分别为 MIR-520D-5P-7 的质粒与酶切后产物;

泳道 M2: DL 2000 DNA Marker;

酶切结果分析: MIR-520D-5P-1、MIR-520D-5P-2、MIR-520D-5P-3、MIR-520D-5P-5、

MIR-520D-5P-6、MIR-520D-5P-7 都在相应的位置切出一条目的条带，说明双报告载体构建已成功，选取阳性质粒送测序验证。

2.3 双荧光素酶报告基因实验

步骤同前

2.4 染色质免疫共沉淀实验

2.4.1 细胞的甲醛交联与超声破碎。

- 1) 37%甲醛固定细胞，37℃孵育 10min;
- 2) 加如甘氨酸终止交联;
- 3) 收集细胞，预冷 PBS 清洗 5 min，3 次;
- 4) 离心，弃上清，加入 SDS 裂解液和蛋白酶抑制剂复合物;
- 5) 超声破碎：VCX750，25%功率，4.5S 冲击，9S 间隙，共 14 次。
- 6) 10, 000g 4℃离心 10min
- 7) 在 100ul 的超声破碎产物中，加入 900ul ChIP Dilution Buffer 和 20ul 的 50×PIC。再各加入 60ul Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4 度颠转混匀 1h。
- 8) 4℃静置 10min 沉淀，700rpm 离心 1min。
- 9) 取上清。各留取 20ul 做为 input。一管中加入 1ul 抗体，另一管中则不加抗体。4℃摇床过夜。
- 10) 取 100ul 超声破碎后产物，加入 4ul 5M NaCl，65℃处理 4h 解交联。

2.4.2 免疫复合物的沉淀及清洗。

- 1) 孵育过夜后，加入 60ul Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA，4℃震荡 2h。
- 2) 4℃静置 10min，700rpm 离心 1min 后弃去上清。
- 3) 加入溶液，在 4℃颠转 10min，静置 10min 沉淀，700rpm 离心 1min，除去上清，TBST 清洗。
- 4) 配制洗脱液：100ul 10%SDS，100ul 1M NaHCO₃，800ul ddH₂O，共 1ml。
- 5) 每管加入 250ul 洗脱液，室温下颠转 15min，静置离心后，收集上清。
- 6)：每管中加入 20ul 5M NaCl 混匀，65 度解交联过夜。

2.4.3 DNA 样品的回收

- 1) 解交联结束后，每管加入 1ul RNaseA (MBI)，37 度孵育 1h。
- 2) 每管加入 10ul 0.5M EDTA，20ul 1M Tris.HCl (PH 6.5)，2ul 10mg/ml 蛋白酶 K。45 度处理 2h。
- 3) DNA-片段的回收———omega 胶回收试剂盒。最终的样品溶于 100ul ddH2O。

2.4.4 PCR 分析

根据Hsa-mir-520d-5p启动子序列设计三对扩增引物，引物序列及扩增序列如下：

1) 检测引物 1:

Hsa-mir-520d-5pChIPF1: 5'TAAAGCCGGGCATGGTGGCTCATG 3'

Hsa-mir-520d-5pChIPR1: 5'CACTGGGCTAATTTTTGTTGTTATTG 3'

扩增序列如下（位于预测 **Hsa-mir-520d-5p** 启动子-1680bp~ -1524bp）:

TAAAGCCGGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAT
GCAGGTAGATCATCTCAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGTCTGACCAACGTGG
TGAAAATCCGTCTCTACTAAAAATACAATAACAACAAAAATTAGCCCAGTG

2) 检测引物 2

Hsa-mir-520d-5pChIPF2: 5'ATCTCTTGGGCTCAAGTGGTGATC 3'

Hsa-mir-520d-5pChIPR2: 5'TATTCCCAACTATTCGGCAGG 3'

扩增序列如下（位于预测 **Hsa-mir-520d-5p** 启动子-790bp~ -625bp）:

ATCTCTTGGGCTCAAGTGGTGATCTTTTTATTTTTGATTTTTTGAGATGCGCTCTC
ATTCCGTTTCCCAGGCTGGAGTGCAGCGGCAGGATCCCTGTTGACCGGAAA
CTCCGCCTCCCAGCTTCCGGCGATTCTCCACCTCAGCCTGCCGAATAGTTG
GGAATA

3) 检测引物 3

Hsa-mir-520d-5pChIPF3:5'GGACAAAACCTCAGGACGATCG 3'

Hsa-mir-520d-5pChIPR3:5'TGCATTTATTGGCCCTGTTTAC 3'

扩增序列如下（位于预测 **Hsa-mir-520d-5p** 启动子-142bp~ -6bp）:

GGACAAAACCTCAGGACGATCGCCCCTTGATGAACAAGGCTAACCTGCTGAGCC
TTTGAAGCAAGGAATTGGAGATGGTCCTTTCAGGGGTTTATGTTCTGGATTC

CATAAAACATGTAACAGGGCCAATAAATGCA

4) 检测引物 4 (Control)

Hsa-mir-520d-5pChIPF4:5'TAGACTCGATTTTGGGTGCTCCC 3'

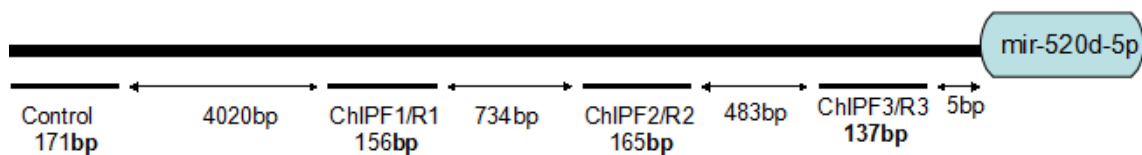
Hsa-mir-520d-5pChIPR4:5'CTGAGTTTCGTATCTGCTAAG 3'

扩增序列如下 (位于预测 Hsa-mir-520d-5p 启动子-5871bp~ -5700bp):

TAGACTCGATTTTGGGTGCTCCCATCGGGACTGTGTGTACCTGTCCTGGA^{CTC}
AAGTGCACCCTTGGCTCATAATCCATTGCTCTTCTCCAGAAATCTTACCAATT
CTCCTGCTTAAATATAAGCTACGTGTAGTAGGCATTGTTTTTTCTTAGCAGATA
CGAAACTCAG

备注: 黄色标记为扩增引物序列;

PCR扩增引物设计图



3 结果

为了进一步阐明 CypB 同 STAT3 活化之间的关系, 我们对 GES-1 细胞采用 IL-6 的刺激, 发现 STAT3 的磷酸化上调的同时, CypB 的表达也明显升高; 而 miR-520d-5p 的过表达则能够抑制该现象发生, 这提示 STAT3 可能反馈性参与 miR-520d-5p 的表达调控。QRT-PCR 结果证实, IL-6 刺激能够在胃癌细胞中造成 miR-520d-5p 表达的下调, 而 STAT3 的 shRNA 则逆转该现象发生。随后生物信息学预测发现, miR-520d-5p 的启动子区域存在多个潜在的 STAT3 的结合位点。因此针对 STAT3 在不同位置的结合位点, 我们建立了一系列 miR-520d-5p 启动子的截短载体。双荧光素酶报告基因实验证实 STAT3 的结合位点位于-1329 至-722bp。对该区域的两个结合位点分别或同时突变发现, 当-733 至-723bp 区域发生突变时, STAT3 依赖的 miR-520d-5p 的调控

出现缺失。染色质免疫共沉淀也证实 STAT3 蛋白能够同该区域 DNA 直接结合，而且经 IL-6 刺激后其结合的 DNA 增多。这些结果说明，STAT3 通过直接结合 miR-520d 的启动子区域，转录性抑制其表达。

3.1 STAT3 磷酸化促进 CypB 的表达

我们对 GES-1 细胞采用 IL-6 刺激后发现，其 STAT3 的磷酸化水平明显升高。有趣的是，CypB 的表达也明显上调，而随后我们同时使用 shSTAT3 能够部分消除 IL-6 刺激对 CypB 的促进作用。此外，miR-520d-5p 的过表达也能够抑制 IL-6 对 CypB 的诱导（图 51）。这些结果提示，IL-6 能够通过激活 STAT3 促进 CypB 的表达，而这项过程能够被 miR-520d-5p 的过表达抑制。那么是否 miR-520d-5p 被激活的 STAT3 抑制呢？

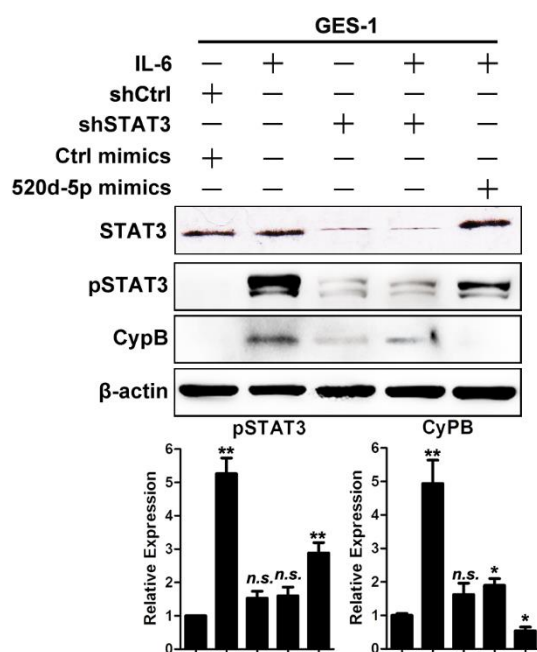


图 51 IL-6 通过 STAT3 促进 CypB 表达。我们对 GES-1 细胞采用 IL-6 (40ng/mL) 刺激后发现，其 STAT3 的磷酸化水平明显升高。有趣的是，CypB 的表达也明显上调，同时使用的 shSTAT3 能够部分消除 IL-6 刺激对 CypB 的促进作用。此外，miR-520d-5p 的 mimics 的使用同样能够抑制该现象发生。

3.2 STAT3 磷酸化抑制 miR-520d-5p 的表达

我们随后对 IL-6 刺激后 miR-520d-5p 的表达进行了研究。我们对胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 饥饿 24h 后使用 IL-6 刺激，刺激时间为 0-72h，并分别在 24h、48h、72h 通过 qRT-PCR 检测了 miR-520d-5p 的表达。结果发现 miR-520d-5p 的表达随着 IL-6 的刺激时间延长而降低（图 52）。随后为了进一步确认 STAT3 介导 IL-6 对 miR-520d-5p 的抑制作用，我们对 BGC823 和 SGC7901 细胞使用 IL-6 刺激的同时用 shSTAT3 沉默 STAT3 的表达。结果发现同前面结果一样 miR-520d-5p 在 IL-6 刺激后明显受到抑制，而沉默 STAT3 后 miR-520d-5p 的表达则升高（图 53）。这些结果提示，IL-6 导致的 STAT3 的磷酸化能够抑制 miR-520d-5p 的表达。

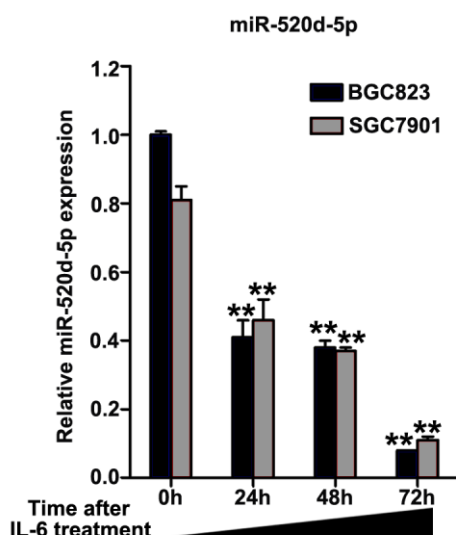


图 52 STAT3 磷酸化抑制 miR-520d-5p 的表达。我们对胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901 采用 IL-6 刺激后对 miR-520d-5p 的表达进行 qRT-PCR，结果发现随着刺激时间延长，miR-520d-5p 在两种细胞中的表达均逐渐降低。

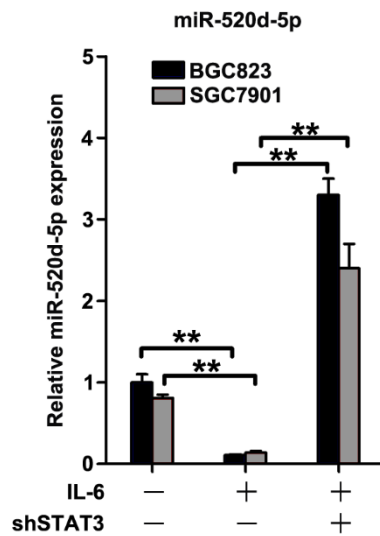


图 52 STAT3 介导 IL-6 刺激对 miR-520d-5p 的抑制。我们在对 BGC823 和 SGC7901 进行 IL-6 刺激的同时，使用 STAT3 的 shRNA 感染。结果发现 miR-520d-5p 在 IL-6 刺激后明显受到抑制，而沉默 STAT3 后这种现象消失。

3.3 双荧光素酶报告系统证实 STAT3 结合 miR-520d 启动子

那么是否 STAT3 直接抑制 miR-520d 的表达呢？我们通过 JASPAR 转录因子结合位点数据库分析了 miR-520d 的启动子区的 STAT3 的潜在结合位点。结果发现其启动子区域存在 9 个可能的 STAT3 结合位点（表 4）。为研究是否 STAT3 能够直接结合 miR-520d 的结合位点，我们根据 miR-520d 启动子区不同的结合位点位置构建了一系列截断的启动子载体并克隆入 Luciferase 载体。双荧光素酶报告基因实验发现，无论在 BGC823 细胞还是在 SGC7901 细胞中，IL-6 刺激均能够造成荧光素酶的降低，而 -1329 和 -1205 两段载体活性最高，说明这些载体可能具有 STAT3 同 DNA 结合的核心序列，即 -1215—1205bp 和 -732—722bp 两个结合位点（图 53、54）。

那么 STAT3 是同这两个位点同时结合还是其中一个？我们随后对 -1329 载体的这两个结合位点同时或者分别进行突变，并克隆至 Luciferase 载体进行荧光素酶检测。结果发现在两种胃癌细胞系中，仅突变 -1215—1205bp 位点时，荧光并无明显变化；而单独突变 -732—722bp 位点和同时突变两个位点时，荧光均明显降低；这些结果

提示，STAT3 能够直接结合 miR-520d-5p 启动子区域的-732—722bp 位点。

表 4 MiR-520d 启动子区域的潜在 STAT3 的结合位点。

Score	Relative score	Start	End	Strand	Predicted site sequence
6.020	0.870484347089046	191	201	1	ATGCTTGTAAT
4.459	0.851573528048041	539	549	1	AACCTGGGAAA
5.282	0.861543806120268	653	663	1	ATGCCTGTAAT
5.383	0.86276737609025	661	671	-1	GTTCTGGGATT
5.282	0.861543806120268	786	796	1	ATGCCTGTAAT
5.282	0.861543806120268	1268	1278	-1	ATGCCTGTAAT
6.798	0.879909470224153	1740	1750	1	CTCCTGAGAAT
9.762	0.915817008749161	1890	1900	-1	TTTTCTGGAAT
9.358	0.910922728869234	1890	1900	1	ATTCCAGAAAA

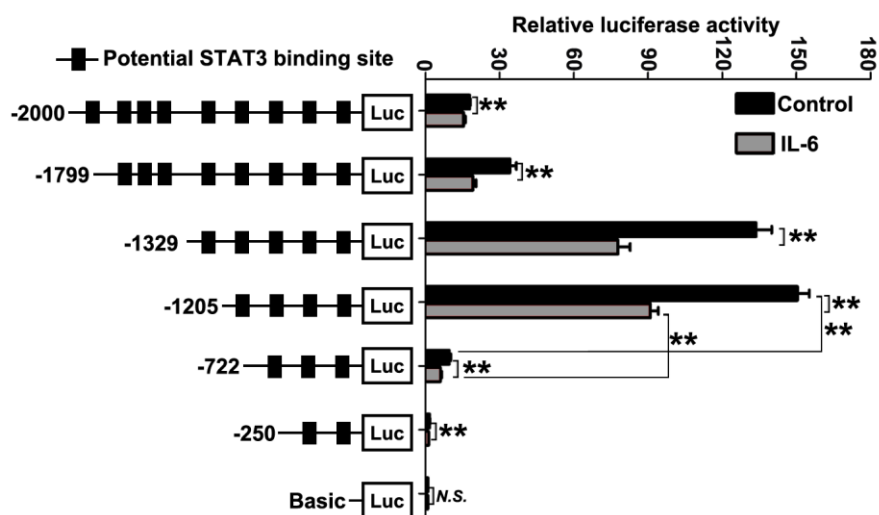


图 53 双荧光素酶报告基因证明 STAT3 在 miR-520d 启动子的结合位点 (BGC823)。

我们根据 miR-520d 启动子区的结合位点，构建了一系列截断的启动子载体并克隆入

Luciferase 载体, 双荧光素酶报告基因实验发现, IL-6 刺激能够造成荧光素酶的降低, 而-1329 和-1205 两个载体的活性最高, 说明这些载体可能具有核心序列, 即-1215—1205bp 和-732—722bp 两个结合位点。

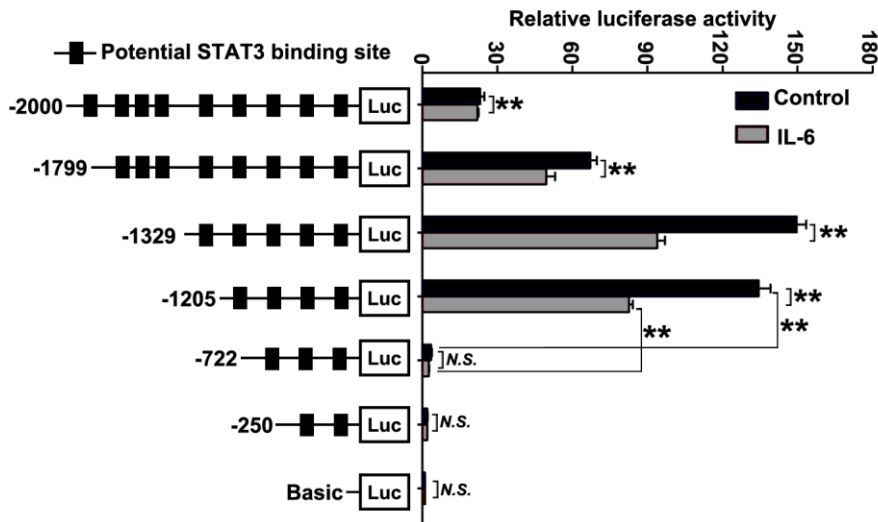


图 54 双荧光素酶报告基因证明 STAT3 在 miR-520d 启动子的结合位点(SGC7901)。结果类似在 BGC823 细胞中的结果。

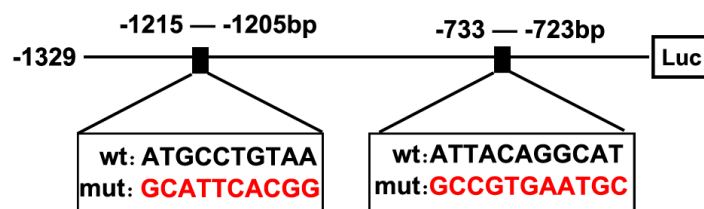


图 55 报告基因载体示意图。

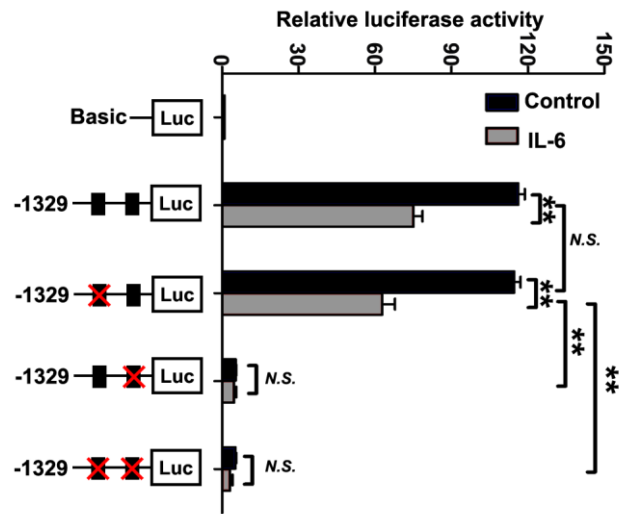


图 56 突变相应位点后的双荧光素报告基因实验（BGC823）。当仅突变-1215—1205bp 位点时，荧光并无明显变化；而单独突变-732—722bp 位点时，荧光值明显降低；此外同时突变两个位点时，荧光也会明显降低。

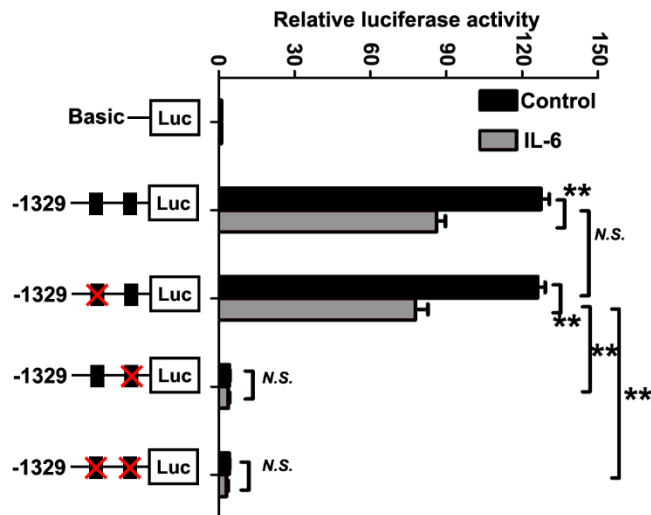


图 57 突变相应位点后的双荧光素报告基因实验（SGC7901）。其结果同 BGC823 细胞中的结果类似。

3.4 染色质免疫共沉淀实验表明 STAT3 结合 miR-520d 启动子

为了进一步研究 STAT3 是否直接结合 miR-520d 的启动子区域，我们针对该区域的-1215—1205bp 和-732—722bp 两个位点进行了染色质免疫共沉淀实验。其相应位点的位置如图 58。随后我们用 IL-6 刺激胃癌细胞 BGC823 和 SGC7901，并在刺激后用 STAT3 抗体进行沉淀 DNA 片段，之后用半定量 PCR 扩增和检测相应位点的 DNA。结果发现，我们使用 IL-6 刺激细胞后，使用 STAT3 抗体沉淀下的 DNA 的 PCR 产物中含有 Ch-IP1 和 Ch-IP2 位点产物，而且 IL-6 刺激能够造成 Ch-IP 沉淀下的产物 PCR 条带增强（图 59）。此外我们对上述 PCR 产物进行 qRT-PCR，得到了类似的结果（图 60）。

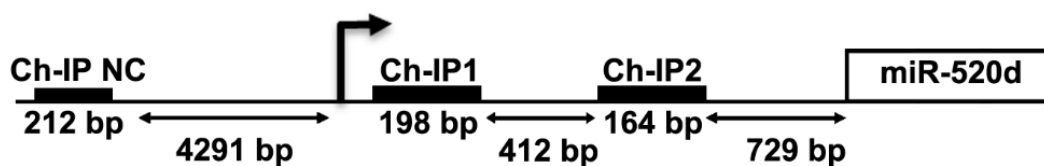


图 58 Ch-IP 位点示意图。

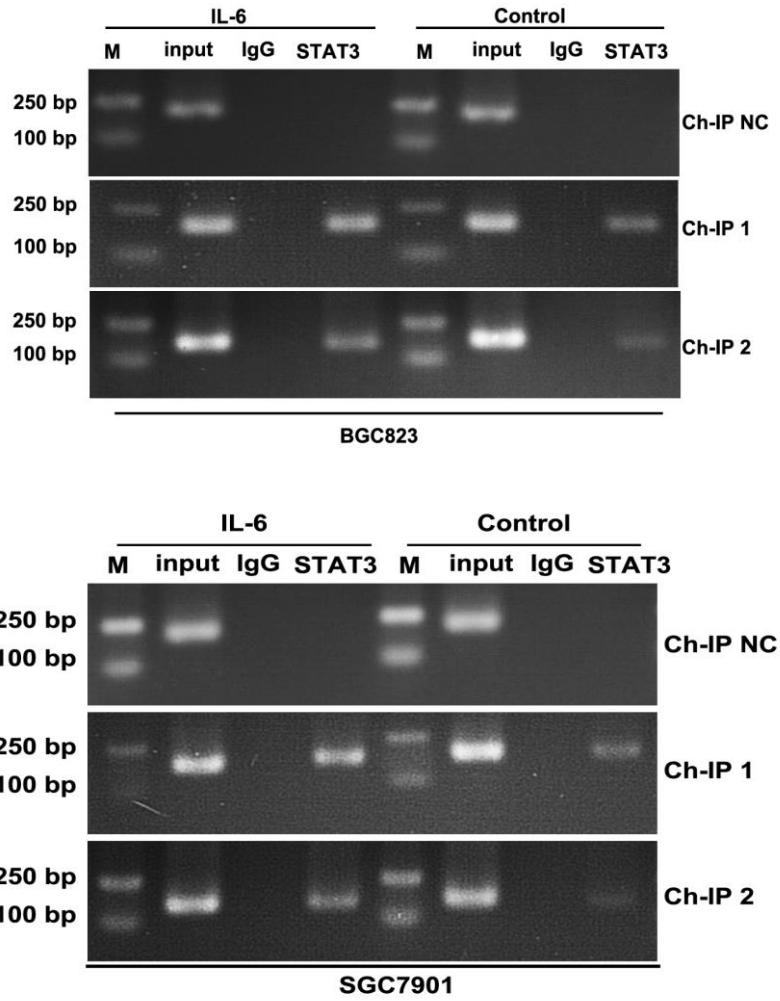


图 59 Ch-IP 显示 STAT3 同 miR-520d 启动子的结合位点。我们使用 IL-6 刺激细胞后, 提取 DNA 并进行 Ch-IP 实验。结果发现在 Ch-IP1 和 Ch-IP2 位点, 均出现 STAT3 且 IL-6 刺激能够造成 Ch-IP 沉淀下的条带增强。

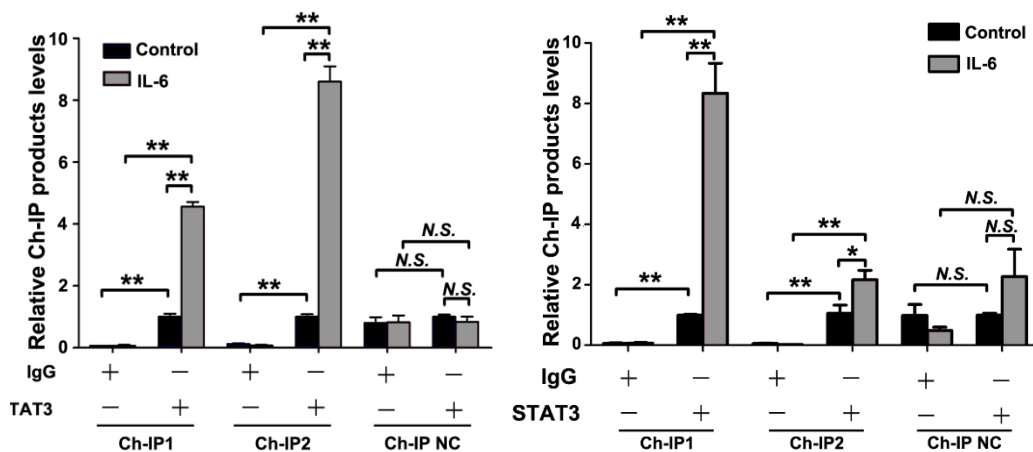


图 60 Ch-IP 显示 STAT3 同 miR-520d 启动子的结合位点。我们使用 IL-6 刺激细胞后，使用 STAT3 抗体进行沉淀。之后提取 DNA 并进行 Ch-IP 实验和随后的 qRT-PCR。结果发现在 Ch-IP1 和 Ch-IP2 位点，均出现 STAT3 且 IL-6 刺激能够造成 Ch-IP 沉淀下的条带增强。左：BGC823；右：SGC7901

4 讨论

作为转录因子，STAT3 能够直接促进或者抑制 miRNA 的表达，而 miRNA 反过来可能直接或者间接以 STAT3 信号通路相关蛋白为靶基因。

近期研究也发现 STAT3 信号通路同 miRNA 的相互作用关系。microRNA 是一种重要的调控基因表达的内源性调控机制，其表达在多种肿瘤细胞中均有明显的变化[110]。miRNA 同样在炎症-肿瘤转化过程中发挥重要的调控作用[111]。细胞因子能够调控 miRNA 的转录和表达，而 miRNA 也能够反过来调控细胞因子的信号通路相关蛋白的表达。近期研究发现 miRNA 在 STAT3 激活导致的细胞增殖和存活调控中占重要角色（图 4）。miR-21 被认为是在多种肿瘤细胞中高表达的癌基因。它在肿瘤发生和转移中的功能可能同其靶基因 PTEN、Spry1 等抑癌基因有关[111]。miR-21 在恶性骨髓瘤和胆管细胞癌等高表达 IL-6 的肿瘤中均表达异常升高[112, 113]。进一步研究发现 IL-6 刺激后，STAT3 被募集到 miR-21 的启动子区域并促进 miR-21 的转录本的表达[112]。miR-21 还在 IL-11-STAT3 通路的抑制凋亡通路中发挥关键作用[114]。另外，在胆管癌细胞中过表达 IL-6 后可发现 let-7 的表达升高，而其靶基因 NF2 的表达受到抑制[113]。相反，let-7 的表达水平降低被发现在肺癌、Burkit 淋巴

瘤和乳腺癌中是癌基因 NF- κ B 激活导致的 LIN-28B 这种 let-7 的抑制因子升高的结果。有趣的是，let-7a 能够直接靶向抑制 IL-6 本身，因而 LIN28B 导致的 let-7 降低能够引起 IL-6 表达的升高，进而促进细胞恶性转化[115]。IL-6 还能够通过促进 miR-17/92 簇的表达进而促进自身信号通路的转导。SOCS1 是 IL-6-STAT3 信号通路的抑制剂，近期研究发现其也是 miR-17/92 家族 miRNA 的靶分子。因此，在骨髓瘤的细胞系中抑制 miR-17/92 的表达后，SOCS1 的表达被上调，而 STAT3 的磷酸化水平被显著抑制[116]。另外，不少 miRNA 也能够调控 IL-6 通路：miR-26a 通过抑制 IL-6 的表达抑制肝癌细胞生长和转移[118]；miR-146a 在小鼠巨噬细胞中通过抑制 Notch1 信号通路抑制 IL-6 的产生[119]；miR-30c 通过抑制 IL-11 的表达抑制乳腺癌细胞的化疗耐受[120]；miR-204、miR-211 和 miR-379 在乳腺癌细胞中能够直接靶向 IL-11 的 mRNA 发挥调控作用[117]；miR-19a 能够促进 JAK-STAT3 信号通路调控 SOCS3 的表达[121]。

我们的研究发现，STAT3 直接抑制 miR-520d-5p 在胃癌细胞中的表达。为了进一步阐明 CypB 同 STAT3 活化之间的关系，我们对 GES-1 细胞采用 IL-6 的刺激，发现 STAT3 的磷酸化上调的同时，CypB 的表达也明显升高；而 miR-520d-5p 的过表达则能够抑制该现象发生，这提示 STAT3 可能反馈性参与 miR-520d-5p 的表达调控。QRT-PCR 结果证实，IL-6 刺激能够在胃癌细胞中造成 miR-520d-5p 表达的下调，而 STAT3 的 shRNA 则逆转该现象发生。随后生物信息学预测发现，miR-520d-5p 的启动子区域存在多个潜在的 STAT3 的结合位点。因此针对 STAT3 在不同位置的结合位点，我们建立了一系列 miR-520d-5p 启动子的截短载体。双荧光素酶报告基因实验证实 STAT3 的结合位点位于-1329 至-722bp。对该区域的两个结合位点分别或同时突变发现，当-733 至-723bp 区域发生突变时，STAT3 依赖的 miR-520d-5p 的调控出现缺失。染色质免疫共沉淀也证实 STAT3 蛋白能够同该区域 DNA 直接结合，而且经 IL-6 刺激后其结合的 DNA 增多。这些结果说明，STAT3 通过直接结合 miR-520d 的启动子区域，转录性抑制其表达。

因此，我们发现胃癌细胞中存在一条由 IL-6 炎症因子诱发的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 正反馈通路。在癌症发生的过程中，转录因子同 miRNA 经常形成反馈通路，因为转录因子能够直接促进或抑制 miRNA 的表达，而前者同时有可能是后者的直接或者间接靶基因。这些反馈通路的形成，为胃上皮细胞在炎症

刺激下的恶性转化提供了基础，并为肿瘤细胞维持恶性表型提供了先决条件。那么这条正反馈通路是否能够在胃癌组织中得到验证呢？

第六部分 胃癌组织中存在 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路

1 材料

1.1 组织芯片

同第一部分。

1.2 原位杂交探针

原位杂交探针为购自 Exiqon 公司的地高辛、生物素双标记的 miR-520d-5p 探针 (miRCury LNA probe)。

1.3 抗体

1.3.1 Anti-CypB 抗体: Abcam 公司

1.3.1 Anti-pSTAT3 抗体: CST 公司

1.4 其他试剂和仪器

1.4.1 原位杂交试剂盒: Roche 公司

1.4.2 组织芯片扫描仪: Olympus 公司

2 方法

2.1 组织原位杂交

- 1) 取材: 福尔马林固定石蜡包埋的组织芯片。
- 2) PBS 中浸泡 10 min, 移入含有 0.1 M 甘氨酸的 PBS 中浸泡 5 min。
- 3) 加入 0.3% TritonX-100 室温放置 10 min。
- 4) PBS 洗涤, 加入蛋白酶 K 并在 37°C 孵育 30 min。
- 5) -20°C 预冷的 4% 多聚甲醛中固定。
- 6) PBS 清洗, 加入 0.25% 乙酸酐/0.1 M 三乙醇胺中并在室温孵育 10 min。
- 7) 滴加适量预杂交液, 在 42°C 处理 30 min。

- 8) 弃去预杂交液，滴加杂交液，在 42°C 恒温箱中过夜后洗片。
- 9) 3% BSA/0.05 M PBS 包被，37°C 30 min。
- 10) 用抗体稀释液稀释抗地高辛和碱性磷酸酶复合物，滴加玻片，4°C 孵育过夜。
- 11) PBS 和 TSM1、2 清洗 10 min×2 次。
- 12) 快速滴加显色液，4°C 避光过夜。
- 13) TE 浸泡玻片 30 min 后终止反应。
- 14) 酒精梯度脱水、二甲苯脱脂，中性树胶封片。
- 15) 显微镜下观察结果、记录、评分。

2.2 免疫组化

- 1) 步骤同前。
- 2) 组化评分按照如下方法进行。强度（分数）：阴性(0)，弱(1)，中(2)，强(3)；范围（分数）：<1%(0)，1-25%(1)，26-50%(2)，51-75%(3)，76-100%(4)。总分=强度分数×范围分数。

2.3 免疫蛋白印迹

- 1) 步骤同第一部分，其余关键步骤如下：
- 2) 10%脱脂奶粉-TBST 稀释 anti-CypB 抗体 (Abcam, 1: 500)、anti-pSTAT3 (Tyr705 CST, 1: 200)、 β -actin 抗体 (1: 1000)，4°C 摇床孵育过夜，常温摇床 30 min。TBST 洗涤 3 次，5 min/次；
- 3) 采用 Quantity One 软件(BioRad)测定蛋白条带的灰度值。

3 结果

最后我们在胃癌组织中验证了该环路的中三个分子的相关关系。原位杂交结果发现，胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同癌旁组织相比明显降低，且低水平的 miR-520d-5p 患者预后较差，COX 多因素分析结果也显示低水平的 miR-520d-5p 是独立预后因素。此外，我们将 90 例胃癌患者按照 miR-520d-5p、CypB 及 pSTAT3 的表达水平高低进行分组和相关分析，发现低水平的 miR-520d-5p 同 CypB 及 pSTAT3 的表达升高有相关关系。

3.1 胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达降低

为了进一步在胃癌组织中验证上述 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路是否存在，我们在前面用到的含有 90 对胃癌和癌旁组织的组织芯片中通过原位杂交的方法检测了 miR-520d-5p 的表达。首先我们采用胃癌组织进行了 miR-520d-5p 原位杂交的阴性对照、阳性对照及强度对照的染色（图 61）。随后我们在胃癌组织中进行 miR-520d-5p 探针原位杂交，结果发现同癌旁正常组织相比，胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达明显降低（图 62）。

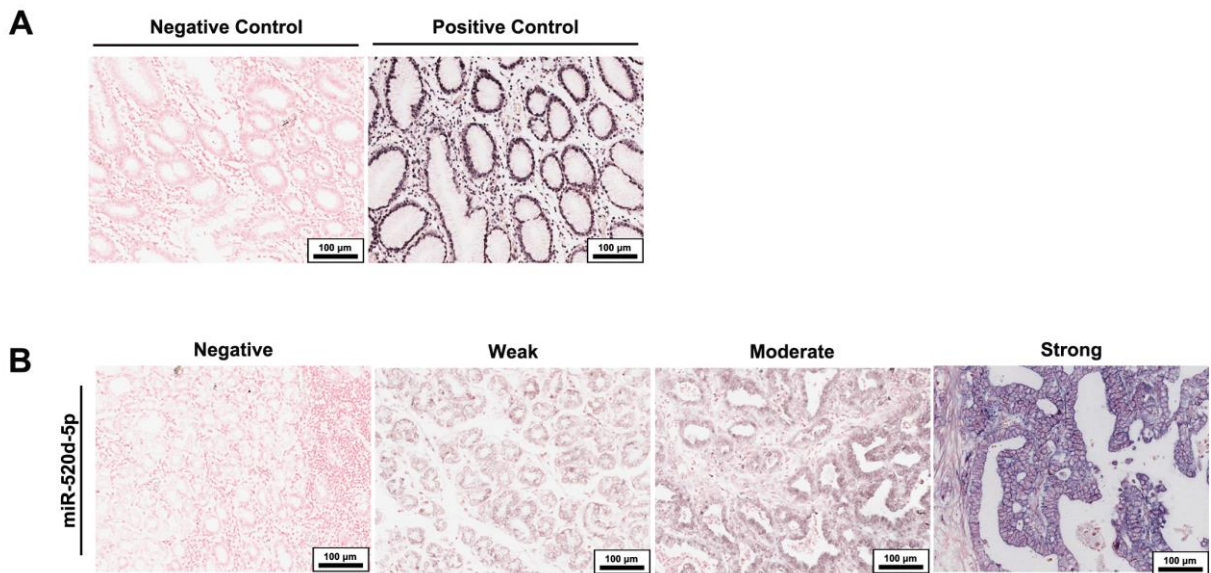


图 61 miR-520d-5p 原位杂交阴性和阳性对照及强度。A.胃癌组织中 miR-520d-5p 原位杂交阴性和阳性对照。左：阴性对照；右：阳性对照。B. 胃癌组织中不同强度的 miR-520d-5p 的原位杂交。

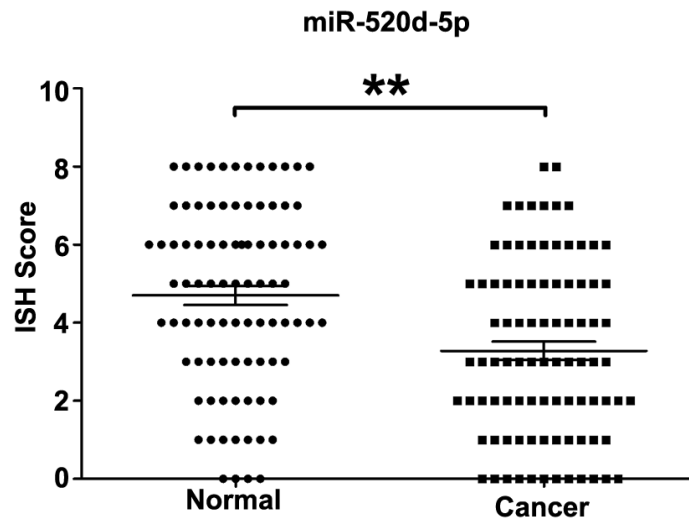


图 62 组织芯片中正常和胃癌组织的原位杂交评分。同癌旁正常组织相比，胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达明显降低。

3.2 低表达 miR-520d-5p 的胃癌患者预后较差

为了评估 miR-520d-5p 的表达对于胃癌患者预后的意义，我们按照胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达水平将 90 例患者分为两组：高表达（评分 ≥ 5 ）和低表达组（评分 < 5 ）。随后对患者生存进行 Kaplan-Meier 生存分析，结果发现组织中低表达 miR-520d-5p 的胃癌患者预后明显低于组织中高表达 miR-520d-5p 的胃癌患者。

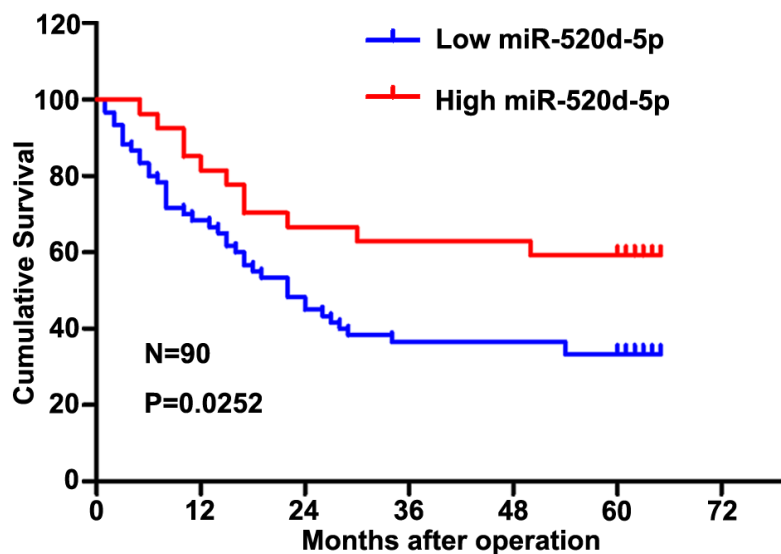


图 63 不同表达水平 miR-520d-5p 的胃癌病人生存分析。组织中低表达 miR-520d-5p 的胃癌患者预后明显低于组织中高表达 miR-520d-5p 的胃癌患者。

3.3 miR-520d-5p 表达同 CypB 和 pSTAT3 负相关

为了在胃癌组织中分析 miR-520d-5p 的表达同其下游的靶分子 CypB 及上游的 STAT3 的关系，我们将 90 例胃癌患者按照原位杂交实验中 miR-520d-5p 的表达水平分为低表达和高表达两组，分析其中各自 CypB 和 pSTAT3 的表达水平，可见低水平 miR-520d-5p 同高 CypB、pSTAT3 表达相关，而高水平 miR-520d-5p 同 CypB 和 pSTAT3 低表达相关。

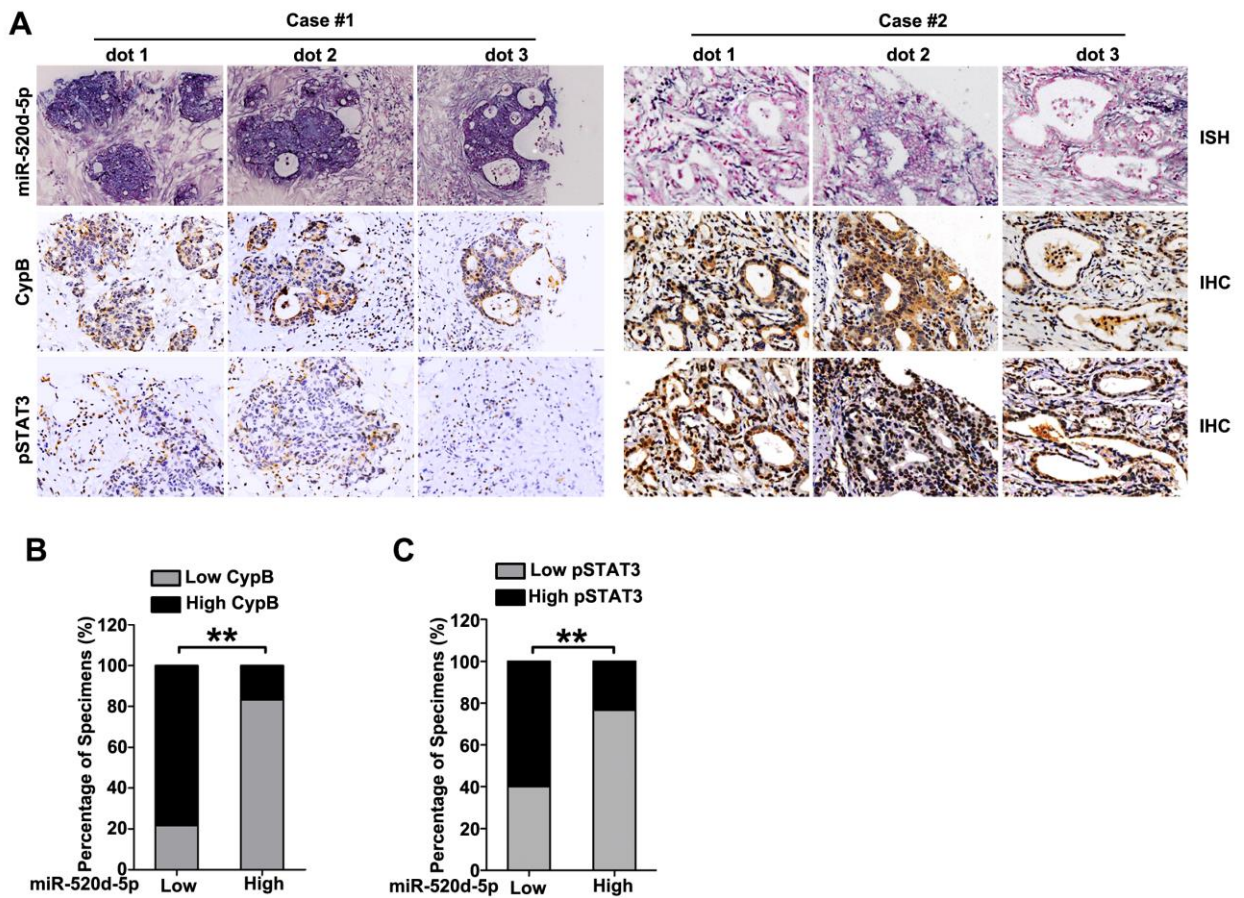


图 64 胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同 CypB 和 pSTAT3 负相关。 A.胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同 CypB 和 pSTAT3 负相关。左：高表达 miR-520d-5p 的病例代表图，其 CypB 和 pSTAT3 表达明显较低；右：低表达 miR-520d-5p 的病例代表图，其 CypB 和 pSTAT3 表达明显较高。 B.按照 miR-520d-5p 的表达水平将 90 例胃癌病人分为低表达和高表达组，分析其中各自 CypB 的表达水平，可见低水平 miR-520d-5p 同高 CypB 表达相关，而高水平 miR-520d-5p 同低表达 CypB 相关。 C. 将 90 例胃癌患者按照 miR-520d-5p 的表达水平为低表达和高表达两组，分析其中各自 pSTAT3 的表达水平，可见低水平 miR-520d-5p 同高 pSTAT3 表达相关，而高水平 miR-520d-5p 同低表达 pSTAT3 相关。

3.4 10 对胃癌组织中 miR-520d-5p 同 CypB、pSTAT3 表达负相关

此外我们还对第二部分中使用的 10 对胃癌组织样本中也验证了 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路中的分子表达相关关系。我们通过 qRT-PCR 的方法检测了 10 对胃癌和癌旁组织中 miR-520d-5p 的表达情况，可见胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达明显低于癌旁组织（图 65A）。随后我们统计分析胃癌组织中 miR-520d-5p 同 CypB 及 pSTAT3 的相关性，可见胃癌组织中 pSTAT3 及 CypB 的表达同 miR-520d-5p 负相关（图 65B、C）。这些结果同前面胃癌组织芯片中的免疫组织化和原位杂交结果得出的结论一致。

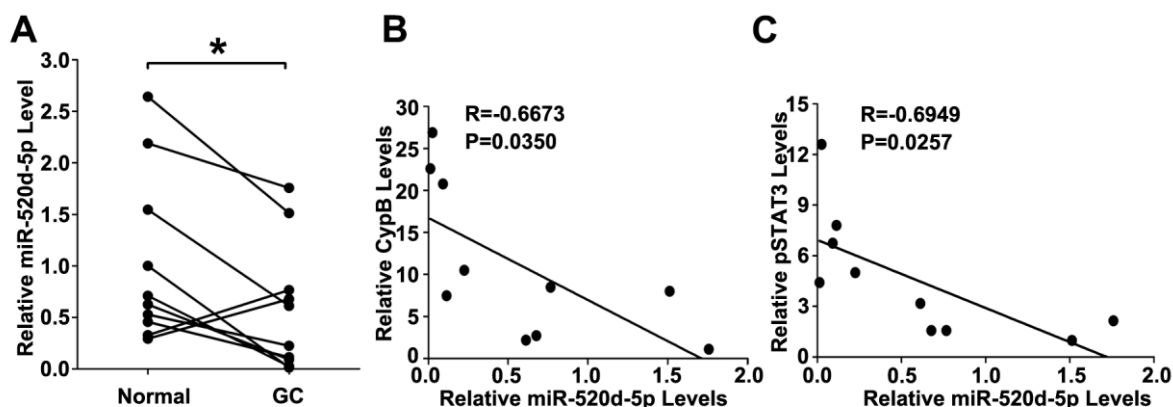


图 65 WB 显示胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同 CypB 和 pSTAT3 负相关。A. 检测图 13 中 10 对胃癌组织 miR-520d-5p 的表达情况，可见胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达明显低于癌旁组织；B. 统计分析胃癌组织中 miR-520d-5p 同 CypB 的相关性，可见胃癌组织中 CypB 的表达同 miR-520d-5p 负相关；C. 同样统计分析胃癌组织中 miR-520d-5p 同 STAT3 磷酸化水平的相关性，可见胃癌组织中 pSTAT3 的表达同 miR-520d-5p 负相关。

3.5 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路示意图

总结我们所得的结果，我们归纳出一条胃癌中存在的、由 Hp 感染诱发的、介导炎-癌转化的反馈通路。在正常的胃上皮细胞中，在正常胃癌组织中，STAT3 并不激活，miR-520d-5p 的表达相对较高，其下游的靶分子 CypB 的表达则相对较低；而在 Hp 感染的刺激下，巨噬细胞和胃上皮细胞产生 IL-6，促进 JAK/STAT3 通路的激活，该通路能够直接抑制细胞中 miR-520d-5p 的转录及表达，导致 CypB 的表达增高，进一步促进了 STAT3 的磷酸化和入核，促进了细胞的恶性转化。

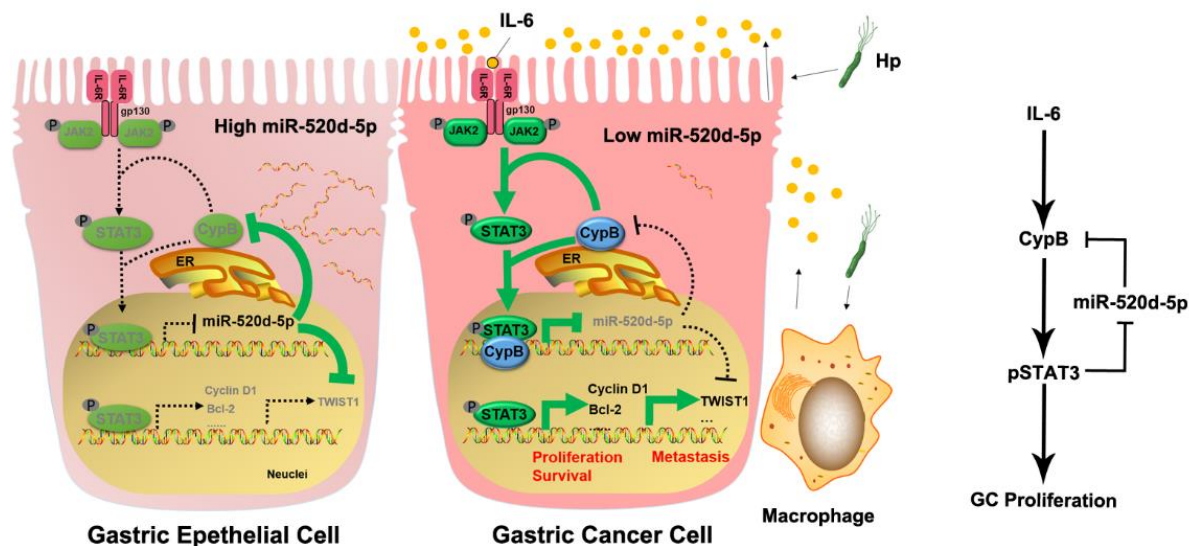


图 66 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路示意图。

4 讨论

在本部分研究中，我们在胃癌组织中验证了 CypB/STAT3/miR-520d-5p 的反馈环路的表达。我们首先通过原位杂交结果发现，胃癌组织中 miR-520d-5p 的表达同癌旁组织相比明显降低，且低水平的 miR-520d-5p 患者预后较差，COX 多因素分析结果也显示低水平的 miR-520d-5p 是独立预后因素。此外，我们将 90 例胃癌患者按照 miR-520d-5p、CypB 及 pSTAT3 的表达水平高低进行分组和相关分析，发现低水平的 miR-520d-5p 同 CypB 及 pSTAT3 的表达升高有相关关系。因此，我们在组织中验证了 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路的存在，证明了 IL-6/STAT3 信号通路通过影响 miR-520d-5p/CypB 的表达，对自身通路起到正反馈激活作用。

IL-6-STAT3 分子通路首先被发现在免疫系统中起调控 Th17 细胞、巨噬细胞以及树突状细胞的分化[81]。随后研究发现，IL-6 通过多条信号通路对肿瘤细胞的生长发挥促进作用[80]。IL-6 上调造成的 STAT3 激活能够上调 Cyclin D1、D2 和 B1，以及 c-Myc，并抑制 Cdk 抑制分子 P21 的表达，因而促进细胞进入细胞周期循环。IL-6 也是细胞存活的重要调控分子，能够帮助肿瘤细胞逃逸应急和化疗药物造成的细胞死亡[80]。IL-6 激活的 STAT3 能够促进存活相关蛋白的表达，包括 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1、Survivin 和 XIAP。这些蛋白的上调和持续激活的 STAT3 通常同肿瘤化疗耐药的机制有关[82]。另外，IL-6 通过增加端粒酶活性抑制细胞衰老，从而促进细胞生长。IL-6 也能够通过介导 EGF 和 HGF 家族的相互作用来促进增殖 [83, 84]。IL-11 也通过类似的机制促进细胞增殖，抑制细胞凋亡 [85, 86]。

IL-6 还能够在多种肿瘤细胞中促进细胞转移和侵袭[7, 87-91]。JAK-STAT3 信号通路的激活诱导产生基质金属蛋白酶（Matrix Metalloproteinase, MMP）的 MMP-2、MMP-7、MMP-9，这些蛋白能够降解细胞外基质，促进肿瘤侵袭。上皮间质转化（Epithelial-mesenchymal transition, EMT）是机体发育过程中的正常生理现象，肿瘤侵袭入其他组织和血管中并形成远处转移的过程中也出现了 EMT 的现象[92-96]。炎症是 EMT 的一个重要启动因子，IL-6 也被发现在多种肿瘤细胞中够诱导 EMT 现象的发生[97-99]。

IL-6 能够在实体瘤中促进肿瘤血管生成。近期越来越多的证据表明 IL-6 信号通路的激活可能是 VEGF-A 抗体治疗癌症失败的原因之一[100]。IL-6 发挥促进血管生

成的作用主要通过 STAT3 信号通路实现。后者的激活导致缺氧诱导因子 1 (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 介导的 VEGF-A 的转录, 同时也促进了内皮细胞增殖和迁移[100-102]。HIF-1 α 同样被报道是 STAT3 的靶分子[103]。IL-6 还可能通过影响免疫细胞的表型, 以增加血管生成因子的分泌来达到促进肿瘤细胞对抑制血管生成药物的耐受能力[100]。对 IL-6 的靶向治疗能够抑制 Notch 配体 Jagged-1 的表达和卵巢癌细胞的血管微环境[104]。在结肠癌患者中, 血清中 IL-6 水平越高, 肿瘤分期越差, 转移性越强[105]。

此外, IL-6 还通过其他机制促进肿瘤转移。在 IL-6 表达较高的器官如脑、肺、肝脏、骨髓等部位, 循环肿瘤细胞更趋向于定植和建立转移灶[80]。例如, 库普夫细胞中 NF- κ B 的激活促进 IL-6 产生, 后者进而促进肺转移癌细胞在肝脏的生长[106]。人黑色素瘤细胞中 STAT3 的激活通过增加 FGF、MMP-2、VEGF-A 等促侵袭和血管生成分子的表达诱导肿瘤脑转移灶的形成和生长[107]。此外, 结肠癌病人循环中高水平的 IL-6 同肝转移形成率相关[108]。乳腺癌的骨转移也同上调的 IL-6 表达和激活的 gp130-STAT3 信号通路有关[109]。

这些研究均表明 IL-6 激活 STAT3 后, 进一步通过下游癌基因的激活和抑癌基因的抑制, 调控多种肿瘤的增殖、侵袭、转移、血管生成等表型。但是, 肿瘤中 STAT3 一旦受到 IL-6 刺激活化后, 其状态长期处于持续激活的状态, 即使去除 IL-6 的刺激, 这种持续激活的 STAT3 状态仍然不发生变化。这种现象的原因尚鲜有文献报道。在我们的研究中, 我们发现的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈环路调控胃癌的模式可能有助于解释 STAT3 持续激活的机制。在正常胃癌组织中, miR-520d-5p 的表达相对较高, CypB 的表达较低, STAT3 通路处于不被激活的状态; 在 Hp 感染的刺激下, 巨噬细胞和胃上皮细胞产生 IL-6, 促进 JAK/STAT3 通路的激活, 该通路能够抑制细胞中 miR-520d-5p 的转录及表达, 导致 CypB 的表达增高, 进一步促进了 STAT3 的磷酸化和入核, 促进了细胞的恶性转化。

小 结

本研究证实了胃癌中存在的一条由 IL-6 诱导的 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈通路在胃癌发展过程中的促进作用。主要研究发现如下：

1. 我们首次在胃癌中研究了 CypB 表达和功能，证实了 CypB 在胃癌中表达升高并促进胃癌的增殖；
2. 我们进一步研究了 CypB 的下游信号通路，发现 CypB 是 IL-6/STAT3 信号通路在胃癌中激活的必要条件，这个发现有助于从新的角度理解 Hp 感染和随后的慢性炎症刺激导致胃癌发生的机制；
3. 我们证实 miR-520d-5p 在转录水平直接抑制 CypB 的表达，并通过功能实验证实 miR-520d-5p 通过其功能性靶基因 CypB 调控胃癌增殖；
4. 此外我们还发现 miR-520d-5p 也是 STAT3 的靶基因，后者通过直接结合启动子区域抑制 miR-520d-5p 的转录，从而反馈性促进 JAK/STAT3 通路的进一步激活；
5. 最后我们在胃癌组织中验证了 CypB/STAT3/miR-520d-5p 反馈通路的分子相关关系，在组织中证明了反馈通路的存在。

这条反馈通路的发现，有助于理解幽门螺旋杆菌感染和炎症反应造成 IL-6 分泌促进胃癌中 STAT3 持续激活的原因，并为治疗胃癌恶性进展提供新的思路。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61:69-90.
- [2] Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, Lofgren JL, Gamazon ER, Feng Y, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. *Gut*. 2014;63:54-63.
- [3] Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. 1998;114:1169-79.
- [4] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol*. 2014;26:54-74.
- [5] Li P, Shan JX, Chen XH, Zhang D, Su LP, Huang XY, et al. Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell research*. 2015;25:588-603.
- [6] Liao WC, Lin JT, Wu CY, Huang SP, Lin MT, Wu AS, et al. Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14:428-34.
- [7] Lin MT, Lin BR, Chang CC, Chu CY, Su HJ, Chen ST, et al. IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120:2600-8.
- [8] Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Strober W. Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends in immunology*. 2015;36:451-9.
- [9] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews Cancer*. 2009;9:798-809.
- [10] Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature reviews Cancer*. 2014;14:736-46.
- [11] Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. STAT3: a critical component in the response to *Helicobacter pylori* infection. *Cellular microbiology*. 2015.
- [12] Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 1984;226:544-7.

- [13] Liu J, Albers MW, Chen CM, Schreiber SL, Walsh CT. Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87:2304-8.
- [14] Choi JW, Schroeder MA, Sarkaria JN, Bram RJ. Cyclophilin B supports Myc and mutant p53-dependent survival of glioblastoma multiforme cells. *Cancer research*. 2014;74:484-96.
- [15] Bauer K, Kretschmar AK, Cvijic H, Blumert C, Loffler D, Brocke-Heidrich K, et al. Cyclophilins contribute to Stat3 signaling and survival of multiple myeloma cells. *Oncogene*. 2009;28:2784-95.
- [16] Kim Y, Jang M, Lim S, Won H, Yoon KS, Park JH, et al. Role of cyclophilin B in tumorigenesis and cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma in humans. *Hepatology*. 2011;54:1661-78.
- [17] Ray P, Rialon-Guevara KL, Veras E, Sullenger BA, White RR. Comparing human pancreatic cell secretomes by in vitro aptamer selection identifies cyclophilin B as a candidate pancreatic cancer biomarker. *J Clin Invest*. 2012;122:1734-41.
- [18] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-33.
- [19] Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012;482:347-55.
- [20] Sitas F. Twenty five years since the first prospective study by Forman et al. (1991) on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk. *Cancer epidemiology*. 2016.
- [21] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1:1311-5.
- [22] Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 1991;302:1302-5.
- [23] Flisiak R, Horban A, Gallay P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska-Drapalo A, et al. The cyclophilin inhibitor debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology*. 2008;47:817-26.
- [24] Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*. 2005;19:111-22.
- [25] Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:1903-7.

- [26] Rycyzyn MA, Reilly SC, O'Malley K, Clevenger CV. Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Molecular endocrinology*. 2000;14:1175-86.
- [27] Choi JW, Sutor SL, Lindquist L, Evans GL, Madden BJ, Bergen HR, 3rd, et al. Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS genetics*. 2009;5:e1000750.
- [28] Fang F, Flegler AJ, Du P, Lin S, Clevenger CV. Expression of Cyclophilin B is Associated with Malignant Progression and Regulation of Genes Implicated in the Pathogenesis of Breast Cancer. *Am J Pathol*. 2009;174:297-308.
- [29] Yan L, Yu J, Tan F, Ye GT, Shen ZY, Liu H, et al. SP1-mediated microRNA-520d-5p suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting CTHRC1. *American journal of cancer research*. 2015;5:1447-59.
- [30] Tsukerman P, Yamin R, Seidel E, Khawaled S, Schmiedel D, Bar-Mag T, et al. MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastamiR miR-10b. *Oncotarget*. 2014;5:12141-50.
- [31] Rokavec M, Oner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*. 2014;124:1853-67.
- [32] Rokavec M, Wu W, Luo JL. IL6-mediated suppression of miR-200c directs constitutive activation of inflammatory signaling circuit driving transformation and tumorigenesis. *Mol Cell*. 2012;45:777-89.
- [33] Shen S, Guo X, Yan H, Lu Y, Ji X, Li L, et al. A miR-130a-YAP positive feedback loop promotes organ size and tumorigenesis. *Cell research*. 2015;25:997-1012.
- [34] Zhao XD, Lu YY, Guo H, Xie HH, He LJ, Shen GF, et al. MicroRNA-7/NF-kappaB signaling regulatory feedback circuit regulates gastric carcinogenesis. *The Journal of cell biology*. 2015;210:613-27.
- [35] Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. Helicobacter pylori Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1991;325:1127-31.
- [36] Monogr. I. Infection with Helicobacter pylori. . *Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;61:177-240.
- [37] de Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, et al. Phylogeographic origin of Helicobacter pylori is a determinant of gastric cancer risk. *Gut*. 2011;60:1189-95.
- [38] Peek RM, Blaser MJ. Helicobacter Pylori and Gastrointestinal Tract Adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:28-37.
- [39] Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in Helicobacter

- pylori-induced gastric malignancy. *Physiological reviews*. 2010;90:831-58.
- [40] Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 2007;133:288-308.
- [41] Augusto AC, Miguel F, Mendonca S, Pedrazzoli J, Jr., Gurgueira SA. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*. 2007;40:615-22.
- [42] Chaturvedi R, de Sablet T, Coburn LA, Gobert AP, Wilson KT. Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. *Amino Acids*. 2012;42:627-40.
- [43] Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology*. 2003;124:1408-19.
- [44] Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, et al. Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer research*. 2004;64:8521-5.
- [45] Hardbower DM, Peek RM, Wilson KT. At the Bench: *Helicobacter pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;96:201-12.
- [46] Lin WC, Tsai HF, Kuo SH, Wu MS, Lin CW, Hsu PI, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer research*. 2010;70:5740-8.
- [47] Jr; PR, GG; M, KT; T, GI; P-P, X; Z, JC; A, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Laboratory investigation*. 1995;73:760-70.
- [48] Chaturvedi R, Asim M, Romero-Gallo J, Barry DP, Hoge S, de Sablet T, et al. Spermine Oxidase Mediates the Gastric Cancer Risk Associated With *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. 2011;141:1696-708.e2.
- [49] CM C. Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;385:502-11.
- [50] Raju D, Hussey S, Ang M, Terebiznik MR, Sibony M, Galindo-Mata E, et al. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans. *Gastroenterology*. 2012;142:1160-71.
- [51] Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cellular microbiology*. 2004;6:143-54.
- [52] Kim JM, Kim JS, Lee JY, Kim YJ, Youn HJ, Kim IY, et al. Vacuolating cytotoxin in

- Helicobacter pylori water-soluble proteins upregulates chemokine expression in human eosinophils via Ca²⁺ influx, mitochondrial reactive oxygen intermediates, and NF-kappaB activation. *Infection and immunity*. 2007;75:3373-81.
- [53] Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. 2010;594:57-72.
- [54] Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, et al. Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell host & microbe*. 2012;12:764-77.
- [55] Wang G, Hong Y, Olczak A, Maier SE, Maier RJ. Dual Roles of Helicobacter pylori NapA in Inducing and Combating Oxidative Stress. *Infection and immunity*. 2006;74:6839-46.
- [56] Uberti AF, Olivera-Severo D, Wassermann GE, Scopel-Guerra A, Moraes JA, Barcellos-de-Souza P, et al. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by Helicobacter pylori urease. *Toxicon*. 2013;69:240-9.
- [57] Gong M, Ling SSM, Lui SY, Yeoh KG, Ho B. Helicobacter pylori γ -Glutamyl Transpeptidase Is a Pathogenic Factor in the Development of Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology*. 2010;139:564-73.
- [58] Eftang LL, Esbensen Y, Tannæs TM, Bukholm IRK, Bukholm G. Interleukin-8 is the single most up-regulated gene in whole genome profiling of H. pylori exposed gastric epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2012;12:9.
- [59] Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, et al. Mice That Express Human Interleukin-8 Have Increased Mobilization of Immature Myeloid Cells, Which Exacerbates Inflammation and Accelerates Colon Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2013;144:155-66.
- [60] Li M, Zhang Y, Feurino LW, Wang H, Fisher WE, Brunnicardi FC, et al. Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer science*. 2008;99:733-7.
- [61] Wang Y, Xu RC, Zhang XL, Niu XL, Qu Y, Li LZ, et al. Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine*. 2012;59:145-55.
- [62] Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter pylori outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26:1677-84.
- [63] Nakagawa H, Tamura T, Mitsuda Y, Goto Y, Kamiya Y, Kondo T, et al. Significant association between serum interleukin-6 and Helicobacter pylori antibody levels

- among *H. pylori*-positive Japanese adults. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:142358.
- [64] P; G, D; V, M; C, J; H, M M. Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *The American Journal of Gastroenterology*. 1994;89:883-7.
- [65] Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, et al. *Helicobacter pylori* Cytotoxin-Associated Gene A Activates the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway In vitro and In vivo. *Cancer research*. 2009;69:632-9.
- [66] Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grözinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2012;23:85-97.
- [67] Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *International Immunology*. 2010;22:347-52.
- [68] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an Oncogene. *Cell*. 1999;98:295-303.
- [69] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol*. 2014;26:54-74.
- [70] Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2009;1793:1623-33.
- [71] Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss W, Scheller J. Interleukin-6 Trans-Signaling and Colonic Cancer Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2009;15:2095-103.
- [72] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813:878-88.
- [73] Yoshimura A, Yasukawa H. JAK's SOCS: a mechanism of inhibition. *Immunity*. 2012;36:157-9.
- [74] White CA, Nicola NA. Socs3. *Jak-Stat*. 2014;2:e25045.
- [75] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7:454-65.
- [76] Yoshimura A. Negative Regulation of Cytokine Signaling. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2005;28:205-20.
- [77] Wang Y, van Boxel-Dezaire AHH, Cheon H, Yang J, Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110:16975-80.

- [78] Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, et al. Gab1 Acts as an Adapter Molecule Linking the Cytokine Receptor gp130 to ERK Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 1998;18:4109-17.
- [79] Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20:5991-6000.
- [80] Ara T, DeClerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European Journal of Cancer*. 2010;46:1223-31.
- [81] Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70 Suppl 1:i104-8.
- [82] Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*. 2012;38:904-10.
- [83] Poncet N, Guillaume J, Mouchiroud G. Epidermal growth factor receptor transactivation is implicated in IL-6-induced proliferation and ERK1/2 activation in non-transformed prostate epithelial cells. *Cellular signalling*. 2011;23:572-8.
- [84] Hov H, Tian E, Holien T, Holt RU, Våsveen TK, Fagerli U-M, et al. c-Met signaling promotes IL-6-induced myeloma cell proliferation. *European Journal of Haematology*. 2009;82:277-87.
- [85] Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biological chemistry*. 2013;394:1145-61.
- [86] Putoczki T, Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol*. 2010;88:1109-17.
- [87] Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28:2745-55.
- [88] Foran E, Garrity-Park MM, Mureau C, Newell J, Smyrk TC, Limburg PJ, et al. Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8:471-81.
- [89] Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, et al. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2013;80:146-54.
- [90] Lay V, Yap J, Sonderegger S, Dimitriadis E. Interleukin 11 regulates endometrial cancer cell adhesion and migration via STAT3. *International journal of oncology*.

2012;41:759-64.

- [91] Nakayama T, Yoshizaki A, Izumida S, Suehiro T, Miura S, Uemura T, et al. Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor α in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2007.
- [92] Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*. 2013;342:1234850.
- [93] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews Cancer*. 2013;13:97-110.
- [94] Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development*. 2013;27:2192-206.
- [95] Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*. 2013;19:1438-49.
- [96] Creighton CJ, Gibbons DL, Kurie JM. The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective. *Cancer management and research*. 2013;5:187-95.
- [97] Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28:2940-7.
- [98] Huang C, Yang G, Jiang T, Zhu G, Li H, Qiu Z. The effects and mechanisms of blockage of STAT3 signaling pathway on IL-6 inducing EMT in human pancreatic cancer cells in vitro. *Neoplasma*. 2011;58:396-405.
- [99] Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9:1658-67.
- [100] Middleton K, Jones J, Lwin Z, Coward JIG. Interleukin-6: An angiogenic target in solid tumours. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014;89:129-39.
- [101] Jung JE. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *The FASEB Journal*. 2005.
- [102] Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*. 2005;24:5552-60.
- [103] Dang Eric V, Barbi J, Yang H-Y, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell*. 2011;146:772-84.
- [104] Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, Leader D, Vassileva V, Leinster DA, et al. Interleukin-6 as a Therapeutic Target in Human Ovarian Cancer. *Clinical Cancer*

- Research. 2011;17:6083-96.
- [105] Eldesoky A, Shouma A, Mosaad Y, Elhawary A. Clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in patients with colorectal cancer. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2011;17:170-3.
- [106] Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, et al. Ikappa B kinasebeta/nuclear factor-kappaB activation controls the development of liver metastasis by way of interleukin-6 expression. *Hepatology*. 2009;50:1851-60.
- [107] Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, et al. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer research*. 2006;66:3188-96.
- [108] Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2003;83:222-6.
- [109] Ren L, Wang X, Dong Z, Liu J, Zhang S. Bone metastasis from breast cancer involves elevated IL-11 expression and the gp130/STAT3 pathway. *Medical oncology*. 2013;30:634.
- [110] McCoy CE. The role of miRNAs in cytokine signaling. *Frontiers in Bioscience*. 2011;16:2161.
- [111] Cao Q, Li YY, He WF, Zhang ZZ, Zhou Q, Liu X, et al. Interplay between microRNAs and the STAT3 signaling pathway in human cancers. *Physiological genomics*. 2013;45:1206-14.
- [112] Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007;110:1330-3.
- [113] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Smith H, Ueno Y, Patel T. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:8256-64.
- [114] Haider KH, Idris NM, Kim HW, Ahmed RP, Shujia J, Ashraf M. MicroRNA-21 is a key determinant in IL-11/Stat3 anti-apoptotic signalling pathway in preconditioning of skeletal myoblasts. *Cardiovascular research*. 2010;88:168-78.
- [115] Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 2009;139:693-706.
- [116] Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

2008;105:12885-90.

- [117] Pollari S, Leivonen SK, Perala M, Fey V, Kakonen SM, Kallioniemi O. Identification of microRNAs inhibiting TGF-beta-induced IL-11 production in bone metastatic breast cancer cells. *PloS one*. 2012;7:e37361.
- [118] Yang X, Liang L, Zhang XF, Jia HL, Qin Y, Zhu XC, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology*. 2013;58:158-70.
- [119] He Y, Sun X, Huang C, Long XR, Lin X, Zhang L, et al. MiR-146a regulates IL-6 production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophage cells by inhibiting Notch1. *Inflammation*. 2014;37:71-82.
- [120] Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nature communications*. 2013;4:1393.
- [121] Jin D-Y, Collins AS, McCoy CE, Lloyd AT, O'Farrelly C, Stevenson NJ. miR-19a: An Effective Regulator of SOCS3 and Enhancer of JAK-STAT Signalling. *PloS one*. 2013;8:e69090.
- [122] Huang S-P, Wu M-S, Shun C-T, Wang H-P, Lin M-T, Kuo M-L, et al. Interleukin-6 Increases Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Gastric Carcinoma. *Journal of Biomedical Science*. 2004;11:517-27.
- [123] Liao WC, Lin JT, Wu CY, Huang SP, Lin MT, Wu ASH, et al. Serum Interleukin-6 Level but not Genotype Predicts Survival after Resection in Stages II and III Gastric Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2008;14:428-34.
- [124] Jackson CB, Judd LM, Menheniott TR, Kronborg I, Dow C, Yeomans ND, et al. Augmented gp130-mediated cytokine signalling accompanies human gastric cancer progression. *The Journal of Pathology*. 2007;213:140-51.
- [125] Gong W, Wang L, Yao JC, Ajani JA, Wei D, Aldape KD, et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts expression of vascular endothelial growth factor in and angiogenic phenotype of human gastric cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:1386-93.
- [126] Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, et al. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest*. 2008.
- [127] Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nature medicine*. 2002;8:1089-97.
- [128] Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P, et al.

- Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF- β signaling. *Nature medicine*. 2005;11:845-52.
- [129] Howlett M, Giraud AS, Lescesen H, Jackson CB, Kalantzis A, Van Driel IR, et al. The Interleukin-6 Family Cytokine Interleukin-11 Regulates Homeostatic Epithelial Cell Turnover and Promotes Gastric Tumor Development. *Gastroenterology*. 2009;136:967-77.e3.
- [130] Howlett M, Judd LM, Jenkins B, La Gruta NL, Grail D, Ernst M, et al. Differential Regulation of Gastric Tumor Growth by Cytokines That Signal Exclusively Through the Coreceptor gp130. *Gastroenterology*. 2005;129:1005-18.
- [131] Putoczki Tracy L, Thiem S, Loving A, Busuttill Rita A, Wilson Nicholas J, Ziegler Paul K, et al. Interleukin-11 Is the Dominant IL-6 Family Cytokine during Gastrointestinal Tumorigenesis and Can Be Targeted Therapeutically. *Cancer Cell*. 2013;24:257-71.
- [132] Algül H, Kinoshita H, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hayakawa Y, et al. Interleukin-6 Mediates Epithelial–Stromal Interactions and Promotes Gastric Tumorigenesis. *PloS one*. 2013;8:e60914.
- [133] Testino G. *Helicobacter pylori*, cell proliferation, and carcinogenesis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001;96:2514.
- [134] Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, et al. Intact Gram-Negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* Bacteria Activate Innate Immunity via Toll-Like Receptor 2 but Not Toll-Like Receptor 4. *Infection and immunity*. 2004;72:6446-54.
- [135] Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2007;133:659-72.
- [136] Takaishi S, Cui G, Frederick DM, Carlson JE, Houghton J, Varro A, et al. Synergistic Inhibitory Effects of Gastrin and Histamine Receptor Antagonists on *Helicobacter*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 2005;128:1965-83.
- [137] Takaishi S, Tu S, Dubeykovskaya ZA, Whary MT, Muthupalani S, Rickman BH, et al. Gastrin Is an Essential Cofactor for *Helicobacter*-Associated Gastric Corpus Carcinogenesis in C57BL/6 Mice. *The American Journal of Pathology*. 2009;175:365-75.
- [138] Judd LM, Alderman BM, Howlett M, Shulkes A, Dow C, Moverley J, et al. Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterology*. 2004;126:196-207.
- [139] Judd LM, Bredin K, Kalantzis A, Jenkins BJ, Ernst M, Giraud AS. STAT3 activation regulates growth, inflammation, and vascularization in a mouse model of gastric tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2006;131:1073-85.

- [140] Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. Overexpression of Interleukin-1 β Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell*. 2011;19:154.
- [141] Zavros Y, Eaton KA, Kang W, Rathinavelu S, Katukuri V, Kao JY, et al. Chronic gastritis in the hypochlorhydric gastrin-deficient mouse progresses to adenocarcinoma. *Oncogene*. 2005;24:2354-66.
- [142] Franic TV, van Driel IR, Gleeson PA, Giraud AS, Judd LM. Reciprocal changes in trefoil 1 and 2 expression in stomachs of mice with gastric unit hypertrophy and inflammation. *The Journal of Pathology*. 2005;207:43-52.
- [143] Howlett M, Chalinor HV, Buzzelli JN, Nguyen N, van Driel IR, Bell KM, et al. IL-11 is a parietal cell cytokine that induces atrophic gastritis. *Gut*. 2011;61:1398-409.
- [144] Tsutsumi R. Attenuation of Helicobacter pylori CagA middle dot SHP-2 Signaling by Interaction between CagA and C-terminal Src Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;278:3664-70.
- [145] Poppe M, Feller SM, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*. 2006;26:3462-72.
- [146] Higashi H. SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of Helicobacter pylori CagA Protein. *Science*. 2001;295:683-6.
- [147] Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, et al. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 2007;447:330-3.
- [148] Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, Ishikawa S, et al. Helicobacter pylori CagA Induces Ras-independent Morphogenetic Response through SHP-2 Recruitment and Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:17205-16.
- [149] Lee KS, Kalantzis A, Jackson CB, O'Connor L, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M, et al. Helicobacter pylori CagA triggers expression of the bactericidal lectin REG3 γ via gastric STAT3 activation. *PloS one*. 2012;7:e30786.
- [150] Lee IO, Kim JH, Choi YJ, Pillinger MH, Kim SY, Blaser MJ, et al. Helicobacter pylori CagA Phosphorylation Status Determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT Signal Transduction Pathways in Gastric Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285:16042-50.
- [151] Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, et al. Helicobacter pylori VacA Reduces the Cellular Expression of STAT3 and Pro-survival Bcl-2 Family Proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, Leading to Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Digestive Diseases and Sciences*. 2010;56:999-1006.

- [152] Giraud AS, Menheniott TR, Judd LM. Targeting STAT3 in gastric cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2012;16:889-901.
- [153] Ellmark P. Identification of Protein Expression Signatures Associated with *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Adenocarcinoma Using Recombinant Antibody Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006;5:1638-46.
- [154] Byungsik K, Seunghyun B, Seungkoo L, Soonok K, Yusun J, Changhee L, et al. Expression Profiling and Subtype-Specific Expression of Stomach Cancer. *Cancer research*. 2003;63:8248-55.
- [155] Gallagher PG, Bao Y, Prorock A, Zigrino P, Nischt R, Politi V, et al. Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer research*. 2005;65:4134-46.
- [156] Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:14842-7.
- [157] Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, et al. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC cancer*. 2006;6:74.
- [158] Han JC, Zhang KL, Chen XY, Jiang HF, Kong QY, Sun Y, et al. Expression of seven gastric cancer-associated genes and its relevance for Wnt, NF-kappaB and Stat3 signaling. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2007;115:1331-43.
- [159] Kanda N, Seno H, Konda Y, Marusawa H, Kanai M, Nakajima T, et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*. 2004;23:4921-9.
- [160] Wang P, Heitman J. The Cyclophilins. *Genome Biology*. 2005;6:226.
- [161] Petsko GA, Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, et al. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS Biology*. 2010;8:e1000439.
- [162] Handschumacher R, Harding M, Rice J, Drugge R, Speicher D. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 1984;226:544-7.
- [163] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 1989;337:473-5.
- [164] Anderson SK, Gallinger S, Roder J, Frey J, Young HA, Ortaldo JR. A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90:542-6.
- [165] Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease.

- Cell Death and Disease. 2013;4:e888.
- [166] Hoffmann H, Schiene-Fischer C. Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biological chemistry*. 2014;395.
- [167] Yurchenko V, Pushkarsky T, Li JH, Dai WW, Sherry B, Bukrinsky M. Regulation of CD147 Cell Surface Expression: INVOLVEMENT OF THE PROLINE RESIDUE IN THE CD147 TRANSMEMBRANE DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:17013-9.
- [168] Gallay PA. Cyclophilin inhibitors: a novel class of promising host-targeting anti-HCV agents. *Immunologic Research*. 2011;52:200-10.
- [169] Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Cyclosporine. *The Journal of Immunology*. 2005;174:6030-8.
- [170] Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, et al. Extracellular Cyclophilins Contribute to the Regulation of Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*. 2005;175:517-22.
- [171] Wang L, Wang C-h, Jia J-f, Ma X-k, Li Y, Zhu H-b, et al. Contribution of Cyclophilin A to the Regulation of Inflammatory Processes in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Immunology*. 2009;30:24-33.
- [172] Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen Zn, Zhu P. Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2008;47:1299-310.
- [173] Kim H, Kim W-J, Jeon S-T, Koh E-M, Cha H-S, Ahn K-S, et al. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clinical Immunology*. 2005;116:217-24.
- [174] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, et al. Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress. *Circulation Research*. 2000;87:789-96.
- [175] Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, et al. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nature medicine*. 2009;15:649-56.
- [176] Howard BA. Stable RNA Interference-Mediated Suppression of Cyclophilin A Diminishes Non-Small-Cell Lung Tumor Growth In vivo. *Cancer research*. 2005;65:8853-60.
- [177] Elrod JW, Molkenin JD. Physiologic Functions of Cyclophilin D and the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Circulation Journal*. 2013;77:1111-22.
- [178] Waldmeier P, Zimmermann K, Qian T, Tintelnot-Blomley M, Lemasters J.

- Cyclophilin D as a Drug Target. *Current Medicinal Chemistry*. 2003;10:1485-506.
- [179] Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 2011;50:222-33.
- [180] Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370:455-65.
- [181] Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110:12024-9.
- [182] Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88:1903-7.
- [183] Rycyzyn MA, Clevenger CV. The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:6790-5.
- [184] Mauri P, Scarpa A, Nascimbeni AC, Benazzi L, Parmagnani E, Mafficini A, et al. Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: a strategy for identification of novel cancer markers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19:1125-7.
- [185] Ray P, Rialon-Guevara KL, Veras E, Sullenger BA, White RR. Comparing human pancreatic cell secretomes by in vitro aptamer selection identifies cyclophilin B as a candidate pancreatic cancer biomarker. *J Clin Invest*. 2012;122:1734-41.
- [186] Fang F, Flegler AJ, Du P, Lin S, Clevenger CV. Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. *Am J Pathol*. 2009;174:297-308.
- [187] Fang F, Zheng J, Galbaugh TL, Fiorillo AA, Hjort EE, Zeng X, et al. Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010;44:319-29.
- [188] Williams PD, Owens CR, Dziegielewska J, Moskaluk CA, Read PW, Larner JM, et al. Cyclophilin B Expression Is Associated with In Vitro Radioresistance and Clinical Outcome after Radiotherapy. *Neoplasia*. 2011;13:1122-IN14.
- [189] Kim K, Kim H, Jeong K, Jung MH, Hahn BS, Yoon KS, et al. Release of overexpressed CypB activates ERK signaling through CD147 binding for hepatoma cell resistance to oxidative stress. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2012;17:784-96.
- [190] Jeong K, Kim H, Kim K, Kim SJ, Hahn BS, Jahng GH, et al. Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia.

- Cell death and differentiation. 2014;21:438-50.
- [191] Ota A. Identification and Characterization of a Novel Gene, C13orf25, as a Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma. *Cancer research*. 2004;64:3087-95.
- [192] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:2999-3004.
- [193] Li X, Zhang Y, Zhang Y, Ding J, Wu K, Fan D. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut*. 2009;59:579-85.
- [194] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, et al. Targeting of the Bmi-1 Oncogene/Stem Cell Renewal Factor by MicroRNA-128 Inhibits Glioma Proliferation and Self-Renewal. *Cancer research*. 2008;68:9125-30.
- [195] 李铤. MicroRNA-296-5p 通过抑制 CDX1 促进胃癌增殖的研究. 第四军医大学硕士研究生毕业论文. 2013.
- [196] Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways. *Oncogene*. 2012;31:4150-63.
- [197] Park YY, Kim SB, Han HD, Sohn BH, Kim JH, Liang J, et al. Tat-activating regulatory DNA-binding protein regulates glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the platelet isoform of phosphofructokinase through microRNA 520. *Hepatology*. 2013;58:182-91.
- [198] Jiang H, Dong Q, Luo X, Shi B, Wang H, Gao H, et al. The monoclonal antibody CH12 augments 5-fluorouracil-induced growth suppression of hepatocellular carcinoma xenografts expressing epidermal growth factor receptor variant III. *Cancer letters*. 2014;342:113-20.

个人简历和研究成果

李铤，男，1988年3月出生，汉族，中共党员。2005年考入第四军医大学临床医学系五年制本科专业，同期入伍；2010年考入第四军医大学西京医院消化内科，攻读硕士学位，导师为中国工程院院士樊代明教授，主要从事胃癌发生和胃癌早期分子预警的研究。2013年继续在第四军医大学西京医院消化内科，攻读博士学位。到现为樊代明教授。2015-2016年受国家公派在美国麻省理工学院和哈佛大学医学院附属麻省总医院进行联合培养博士学习。攻读博士期间，共发表10篇论文，其中以第一或共同第一作者5篇，影响因子5分以上的论文3篇。研究课题两项参加2012年全国消化病大会和2013年世界消化病大会并进行海报交流。参加国家科技计划973项2项，国家自然科学基金项目4项。

第一作者或共同第一作者5篇：

- [1]**Li T**, Guo H, Jin J, Zhang L, Zhao X, Li H, Lu Y, Nie Y, Wu K, Shi Y, Fan D. Cyclophilin B/STAT3/microRNA-520d-5p Feedback Loop Promotes Proliferation and Survival in Gastric Cancer. **Cancer Research** (In revision) (IF:9.3)
- [2]**Li T**, Guo H, Song Y, Zhao X, Shi Y, Lu Y, et al. Loss of vinculin and membrane-bound beta-catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. **Molecular cancer**. 2014;13:263. (IF:5.4)
- [3]**Li T**, Lu YY, Zhao XD, Guo HQ, Liu CH, Li H, et al. MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of Caudal-related homeobox 1. **Oncogene**. 2014;33:783-93.(IF:8.5)
- [4]Wang F*, **Li T***, Zhang B*, Li H, Wu Q, Yang L, et al. MicroRNA-19a/b regulates multidrug resistance in human gastric cancer cells by targeting PTEN. **Biochemical and biophysical research communications**. 2013;434:688-94.(IF:2.3)
- [5]Zhao X*, He L*, **Li T***, Lu Y, Miao Y, Liang S, et al. SRF expedites metastasis and modulates the epithelial to mesenchymal transition by regulating miR-199a-5p

expression in human gastric cancer. **Cell death and differentiation**. 2014;21:1900-13.
(IF:8.2)

协作作者 5 篇

- [1] Zhao X, Dou W, He L, Liang S, Tie J, Liu C, **Li T**, Lu Y, Mo P, Shi Y, Wu K, Nie Y, Fan D, MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor, **Oncogene** 2013 Mar 14;32(11):1363-72.
- [2] Zhou L, Zhao X, Han Y, Lu Y, Shang Y, Liu C, **Li T**, Jin Z, Fan D, Wu K: Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis. **The FASEB Journal** 2013, 27(12):4929-4939
- [3] Lu, Y., X. Zhao, K. Li, G. Luo, Y. Nie, Y. Shi, Y. Zhou, G. Ren, B. Feng, Z. Liu, Y. Pan, **T. Li**, X. Guo, K. Wu, A. Miranda-Vizuete, X. Wang and D. Fan: Thioredoxin-Like Protein 2 Is Overexpressed in Colon Cancer and Promotes Cancer Cell Metastasis by Interaction with Ran. **Antioxidants & Redox Signaling** 2013, 19(9):899-911.
- [4] Zhao X-D, Lu Y-Y, Guo H, Xie H-H, He L-J, Shen G-F, Zhou J-F, **Li T**, Hu S-J, Zhou L et al: MicroRNA-7/NF- κ B signaling regulatory feedback circuit regulates gastric carcinogenesis. **The Journal of cell biology** 2015, 210(4):613-627.
- [5] Wu J, Qing H, **Li T**, Cheng K et al: Characterization of site-specific glycosylation of secreted proteins associated with multi-drug resistance of gastric cancer. **Oncotarget** 2016 doi: 10.18632/oncotarget.8287

致 谢

本研究是在导师樊代明院士的耐心指导下完成，衷心感谢导师在实验工作中给予的谆谆教诲和学习生活中的亲切关怀，导师对科学的严谨态度，对真理的不懈追求、对研究的不竭热情令我终生难忘。

衷心感谢我的指导老师时永全教授在实验工作中给予的大力支持和在学习生活中的无微不至的关怀。指导老师对研究热点的深入剖析，对课题的深刻理解，对研究方法的细心指导是本项研究顺利完成的保障。

衷心感谢吴开春教授、韩英教授、丁杰教授和赵青川教授在工作和学习中给予的亲切指导和热情关怀。感谢聂勇战教授、陈铮技师和所有技师在实验中给予的亲切指导和帮助。衷心感谢靳江博士、赵晓迪博士、卢媛媛博士、刘常浩博士、郭汉青硕士、李红硕士、吴键硕士、雷超硕士及实验室全体研究生和西京消化病医院全体医护人员的热情支持和无私帮助。

衷心感谢我的家人给予的理解支持，他们的无私奉献和精神鼓励是我学业完成的保证。