

## STAT3 入核分子机制的初步研究

叶中德<sup>1,2</sup> 沈倍奋<sup>1\*</sup> 宋伦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850) <sup>2</sup>北京国家生命科学研究所以,北京 100100)

**摘 要** 为了研究 Stat3 入核的分子机制,将 SV40 大 T 抗原的经典核定位序列(NLS, nuclear localization sequence)分别融合在 Stat3-GFP 分子和缺失突变体 Dstat3-GFP 的分子之间,构建 Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 融合分子。转染 293T 细胞,以 NLS-GFP 为阳性对照,通过激光共聚焦显微镜的观察融合分子的亚细胞位置,未经白介素-6 刺激的 Stat3-NLS-GFP 和经白介素-6 刺激的 Stat3-GFP 呈胞核分布,未经白介素-6 刺激的 Stat3-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 呈胞浆分布。初步证明 Stat3 入核是由于获得了核定位序列。

**关键词** Stat3,入核,核定位序列(NLS)

中图分类号 Q756 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0299-03

STAT(signal transducers and activators of transcription)是潜在的转录因子。它在胞浆中是信息的传递者,在胞核中作为转录的激活者<sup>[1]</sup>。Stat3 是 STAT 家族的重要一员,能够被多种细胞因子、生长因子和癌蛋白激活,对细胞的生长和存活起重要作用<sup>[2]</sup>。已经发现越来越多的转录因子受核和胞浆转运机制的调控从而调节特定的基因表达。这些转录因子包括:STATs(signal transducers and activators of transcription)、NF- $\kappa$ B(nuclear factors of Igk B cells)<sup>[3]</sup>和 NFAT(nuclear factors of activated T cells)等<sup>[4]</sup>。随着被激活的信号分子得到修饰,他们很快地进入细胞核结合在特定的 DNA 上。

当细胞表面的受体激活后,Stat3 蛋白通过自身的 SH2 结构域的相互作用而被招募到激活受体的磷酸化停泊位点。Stat3 然后通过受体激酶本身或中间激酶发生磷酸化。二聚化的 Stat3 进入细胞核而结合在基因启动子的特定 DNA 序列上来调节基因的表达<sup>[5]</sup>。

但是自从 STAT 家族发现以来,对其在胞浆中激活后怎样进入细胞核发挥它们的生物学功能还知之甚少。一般来说,蛋白质分子进入细胞核的调控机制主要有两种:一是蛋白质分子具有能引导入核的核定位序列(NLS),在核定位序列的引导下蛋白质分子进入细胞核,二是蛋白质分子与其它信号分子形成复合物在需要能量的情况下进入细胞核<sup>[6]</sup>。

尽管 Stat3 蛋白在 705 位酪氨酸磷酸化后很快聚集在细胞核,然而其核定位序列(NLS, nuclear localization sequence)一直没有被发现。有报道认为 Stat1 的 DNA 结合域的一段碱性氨基酸具有核定位功能,而 Stat 家族在 DNA 结合域有很高的同源性,但随着 Stat3 蛋白三维晶体结构的解析发现其

DNA 结合域在没有外界信号分子的刺激时被包裹在发卡环中<sup>[7]</sup>,即核定位序列被隐藏起来。为了研究 Stat3 由胞浆进入细胞核是否由核定位序列调控或与其它信号分子结合调控所完成,我们将经典的 SV40 大 T 抗原的核定位序列 NLS 融合在绿色荧光蛋白的 N 端(NLS-GFP),然后再将 Stat3 及其缺失突变体 Dstat3(403aa-426aa,对应于 Stat1 的核定位序列)分子融合在 NLS 的 N 端形成 Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 融合分子。转染后激光共聚焦显微镜下观察发现核定位序列(NLS)能将 Stat3 分子由胞浆带入细胞核;而野生型 Stat3 只有在 IL-6 的刺激下才能进入细胞核,但是 NLS 不能将 Stat3 的缺失突变体带入细胞核。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株与细胞** 质粒 pEGFP-N1(Clontech)由本室保存,含有全长 STAT3 基因的质粒 PMS1 由耶鲁大学的付新元博士提供;转化菌 DH5 $\alpha$  由新加坡国立大学李蓬博士提供;293T 细胞由本室保存。

**1.1.2 工具酶和主要试剂**:限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶来自 New England Biolab 公司,Pyrobest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,转染试剂盒购自 Gibco 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 NLS-GFP, Stat3-GFP, Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 表达载体的构建:**

NLS-GFP 的构建:依照 SV40 大 T 抗原的核定位序列

(NLS):CGGGPKKKRKVED 合成两段寡核苷酸如下,在 5' 和 3' 分别加上 *Bma*HI 和 *Eco*RI 位点。

序列 1:5' A ATT CCC GCC ACC ATG TGT GGT GGA GGC CCA AAA AAG AAG AGA AAG GTA GAA GAC CTC 3' (58bp)

序列 2:3' G GG CGG TGG TAC ACA CCA CCT CCC GGT TTT TTC TTC TCT TTC CAT CTT CTG CA CCT AG 5'(58bp)

将序列 1 和序列 2 寡核苷酸分别溶于水中,0.05 $\mu$ mol 等量混合后,100 $^{\circ}$ C 水浴 5min,室温退火。然后将退火后的 NLS 插入载体 pEGFP-N1 的 *Bma*HI 和 *Eco*RI 之间。

Stat3-GFP 的构建:根据 Gene tool 软件设计一对引物,上游引物:5'-CCG CTCGAG (*Xho*I)ATG GCC CAA TGG AAT CAG CTA CA-3'

下游引物:5'-CCC AAGCTT (*Hind*III)CAT GGG GGA GGT AGC GCA CT-3'

以含有全长 Stat3 基因的质粒 pSM1 为模板,PCR 扩增 Stat3 全长基因,将其插入载体 pEGFP-N1 的 *Xho*I 和 *Hind*III 位点之间。

Stat3-NLS-GFP 的构建:用 *Xho*I 和 *Hind*III 将 Stat3 基因从 Stat3-GFP 切下,插入经 *Xho*I 和 *Hind*III 充分消化过的 NLS-GFP 构建 Stat3-NLS-GFP。

Dstat3-NLS-GFP 的构建:用 *Xho*I 和 *Hind*III 将缺失 403aa-426aa 的 Dstat3 从 Dstat3-GFP 切下,插入经 *Xho*I 和 *Hind*III 充分消化的 NLS-GFP 构建 DStat3-NLS-GFP。

**1.2.2 转染及激光共聚焦显微镜观察:**分别将 2 $\mu$ g 的空载体 pEGFP-N1、Stat3-GFP、NLS-GFP、Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 及 5 $\mu$ l Lipofectamine2000 稀释于 250 $\mu$ L 的无双抗和无血清的 DMEM 中,将 DNA 滴入脂质体中轻轻混匀,室温静置 20min。转染激光共聚焦专用培养皿培养 24h 的 293T 细胞,转染 24h 后经 100ng/mL 白介素-6 刺激 20min 后或直接用激光共聚焦显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 NLS-GFP, Stat3-GFP, Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 的酶切鉴定

将人工合成的 SV40 大 T 抗原的经典核定位序列 NLS 插入载体 pEGFP-N1 的酶切位点 *Bma*HI 和 *Eco*RI 构建表达载体 NLS-GFP,经 *Bma*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定切出约 60bp 大小的片段并经测序证明重组质粒是正确的 (Fig. 1, A);将 PCR 扩增的 Stat3 基因插入载体 pEGFP-N1 的 *Xho*I 和 *Hind*III 间构建 Stat3-GFP,酶切鉴定切出 2.3kb 的片段并经测序证实 (Fig. 1, B);将 Stat3 基因及其缺失体 Dstat3 分别从 Stat3-GFP 及 Dstat3-GFP 切下后插入 NLS-GFP 的 *Xho*I 和 *Hind*III 位点间构建 Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 经酶切鉴定正确 (Fig. 1, B)。

### 2.2 基因的瞬时表达及激光共聚焦显微镜观察

将含有空质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 Stat3-GFP、NLS-GFP、Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 的 DH5 $\alpha$  大量培养,用质粒大提试剂盒提取高纯度的质粒用于转染。分别将质粒

pEGFP-N1 和重组质粒 Stat3-GFP、NLS-GFP、Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 转染 DMEM 培养 24h 的 293T 细胞,24h 后经 100ng/mL 白介素-6 刺激 20min 后或直接用激光共聚焦显微镜观察 (7 $\times$ 100 倍)。结果空载体 pEGFP-N1 在 293T 细胞中呈全细胞分布;重组质粒 Stat3-GFP 在 IL-6 刺激前主要呈胞浆分布,在刺激后主要分布于细胞核;重组质粒 NLS-GFP 转染 293T 细胞 24h 后主要分布在细胞核;重组质粒 Stat3-NLS-GFP 转染 293T 细胞 24h 后激光共聚焦显微镜观察主要分布在细胞核;重组质粒 DStat3-NLS-GFP 转染 293T 细胞 24h 后激光共聚焦显微镜观察主要分布在细胞浆。本实验重复 3 次,图片代表不同实验 (Fig. 2)。

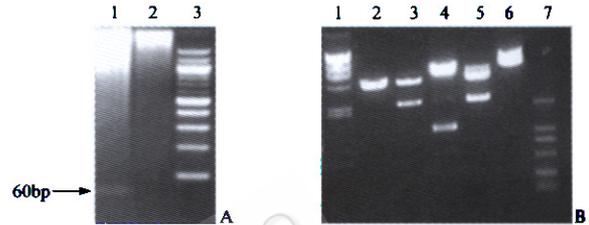


图 1 重组质粒 NLS-GFP, Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 的限制性酶切图

Fig. 1 Restriction digestion of recombinant plasmids: NLS-GFP, Stat3-NLS-GFP and Dstat3-NLS-GFP

(A) NLS-GFP digestion. 1: positive clones of NLS-GFP (*Bam*HI/*Eco*RI); 2: pEGFP-N1 (*Bam*HI/*Eco*RI); 3: DL-2000 marker. (B) Stat3-NLS-GFP and Dstat3-NLS-GFP digestion map. 1: ADNA (*Hind*III); 2: NLS-GFP (*Hind*III/*Xho*I); 3: Stat3-NLS-GFP (*Bam*HI/*Eco*RI); 4: Stat3-NLS-GFP (*Eco*RI); 5: Dstat3-NLS-GFP (*Hind*III/*Xho*I); 6: Dstat3-NLS-GFP (*Eco*RI), (*Eco*RI site was deleted in DNA binding domain); 7: marker DL2000

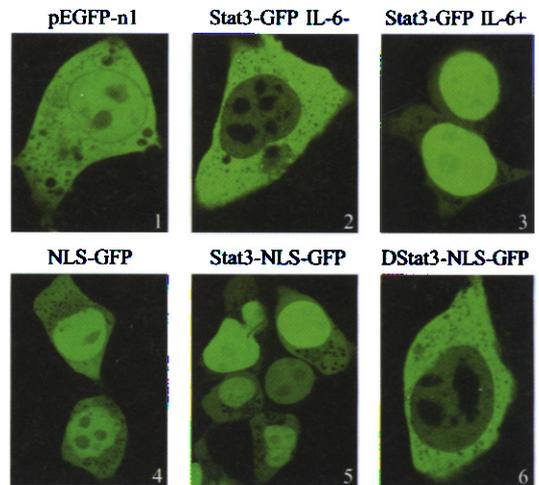


图 2 基因 GFP, Stat3-GFP, NLS-GFP, Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of transiently expressed pEGFP-N1, Stat3-GFP, NLS-GFP, Stat3-NLS-GFP and Dstat3-NLS-GFP imagined by laser confocal microscopy

### 3 讨论

本研究初步证明 Stat3 入核是由于获得了入核的核定位序列而不是由于和其它信号分子结合形成复合物而入核。为了研究 Stat3 在没有信号分子刺激下,是否由伴侣分子结合而停留在胞浆中。我们将 SV40 大 T 抗原的经典核定位序列 NLS 融合在 Stat3 和 Stat3 的缺失突变体 Dstat3(403aa-426aa)的 C 端,然后再将 Stat3-NLS 和 Dstat3-NLS 融合在绿色荧光蛋白的 N 端形成 Stat3-NLS-GFP 和 Dstat3-NLS-GFP 分子。有证据表明,胞浆分布分子蟾蜍核因子 7(NF7),即使加上 NLS,也不会引起在细胞核中聚集<sup>[9]</sup>。仅仅随 NF7 磷酸化后,随后释放伴侣分子才能进入细胞核。将 SV40 大 T 抗原的 NLS 融合于 Stat3 和 Dstat3 的下游,是为了减少破坏 Stat3 的结构以及和其它蛋白分子的相互作用。转染 293T 细胞 24h 后经激光共聚焦显微镜观察,Stat3-NLS-GFP 主要分布在细胞核,而 Dstat3-NLS-GFP 主要分布在胞浆中。由于 Stat3 的缺失突变体 Dstat3(403aa-426aa)正好将其在 DNA 结合域的一段与 Stat1 有高度同源性的碱性氨基酸缺失掉,有报道证实 Stat1 的 DNA 结合域(378aa-413aa)对 Stat1 的入核起重要作用<sup>[10]</sup>。缺失该段碱性氨基酸后即使加上核定位序列也不能将 Stat3 分子带入细胞核,为我们研究 Stat3 入核的核定位序列提供了线索。Stat3-NLS-GFP 研究说明 Stat3 在加上核定位序列(NLS)后,被核膜上的受体识别,在核定位序列的引导下进入细胞核。Stat3-GFP 在没有信号分子刺激的情况下,主要分布在胞浆,通过 IL-6 等细胞因子刺激后使其位于发卡结构中的 DNA 结合域的构象发生变化,使其核定位序列暴露,引起 Stat3 聚集于细胞核(Fig. 2),Stat3 入核需要在 IL-6 等细胞因子的刺激下获得可被识别的 NLS。当然,对 Stat3 入核的更精细的分子机制还有待更进一步的深入研究。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Krister Melen, Leena Kinnunen, Ilkka Julkunen. Arginine/Lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem*, 2001 **276**:16447-16455
- [2] Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. Stats in oncogenesis. *Oncogene*, 2000 **19**:2474-2488
- [3] Ghosh S, May MJ, Kopp E B. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998 **16**:225-260
- [4] Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through  $Ca^{2+}$ , calcineurin and NF- $\kappa$ B. *Cell*, 1999 **96**:611-614
- [5] Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*, 1997 **277**:1630-1635
- [6] Kevin M McBride, Christine McDonald, Nancy C Reich. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *The EMBO Journal*, 2000 **19**:6196-6206
- [7] Stefan Becker, Bernd Groner, Christoph W Muller. Three-dimensional structure of the Stat3 $\beta$  homodimer bound to DNA. *Nature*, 1998 **394**(9):145-151
- [8] Nrdrea H Bild, James Turkson, Richard Jove. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*, 2002 **21**:3255-3263
- [9] Li X, Shou W, Kloc M, Reddy BA, et al. Cytoplasmic retention of Xenopus nuclear factor 7 before the mid blastula transition uses a unique anchoring mechanism involving a retention domain and several phosphorylation sites. *J Cell Biol*, 1994 **124**:7-17
- [10] Riku Fagerlunds, Krister Melen, Leena Kinnunen et al. Arginine/Lysine-rich Nuclear Localization signals mediate interactions between dimeric Stats and importin  $\alpha$ 5. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002 **277**:3072-30078

## The Mechanism of Stat3 Nuclear Import

YE Zhong-De<sup>1,2</sup> SHEN Bei-Fen<sup>1\*</sup> SONG Lun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

<sup>2</sup>(National Institute of Biological Science, Beijing 100100, China)

**Abstract** In order to investigate the mechanism of stat3 nuclear import, positioned a characterized NLS of the SV40 large T antigen into Stat3-GFP, Dstat3-GFP respectively between the C-terminus of Stat3 and the N-terminus of GFP to create Stat3-NLS-GFP and Dstat3-NLS-GFP. With NLS-GFP as the positive control, Expression of the Stat3-NLS-GFP without IL-6 stimulation and Stat3-GFP with IL-6 stimulation resulted in a predominantly nuclear localization in 293T cell. Expression of Stat3-GFP and Dstat3-NLS-GFP without IL-6 stimulation resulted in predominantly cytoplasm localization in 293T cell. The results suggest that latent Stat3 is not anchored in the cytoplasm, and that nuclear localization in response to IL-6 is facilitated by gain of an NLS function.

**Key words** Stat3, nuclear import, NLS

Received: 08-14-2003

This work was supported by Grant from National Natural Science for Distinguished Young Scholars(No. 3995019), and State Key Basic Research Program(No. 001CB510005).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66931325, E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>