论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1022-04

小鼠STAT3基因干扰质粒的构建及其效果鉴定

星懿展[1],李泽桂[1],李红丽[1],李铁石[2],丁震宇[1] ([1]第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]清华大学生命科学与医学研究院基因组研究所,北京 100084)

提 要:目的 构建小鼠STAT3基因的特异性RNA干扰质粒,并鉴定其在细胞水平的抑制效果。**方法** 采用DNA载体介导的RNA干扰技术构建小鼠STAT3基因的特异性RNAi质粒(pBS/U6/STAT3-siRNA),并通过RT-PCR、免疫印迹、免疫细胞化学染色等技术对pBS/U6/STAT3-siRNA的抑制效率进行鉴定。**结果** 经双酶切鉴定筛选出4个阳性干扰质粒,分别转入293T细胞后均可明显降低STAT3的表达,尤以靶向(+2 334 ~ +2 351)位点的质粒干扰效率最高,达70%。**结论** 小鼠STAT3基因的特异性干扰质粒(pBS/U6/STAT3-siRNA)能从蛋白及mRNA水平上特异和高效地抑制STAT3基因的表达。这种DNA载体介导的双链RNA干扰质粒为进一步探究STAT3与胚胎发育的相关功能提供一种有效的研究工具。

关键词:pBS/U6/STAT3-siRNA;STAT3;RNAi;小鼠

中图法分类号:Q503;Q782;Q785 **文献标识码**:A

Construction and suppressive effect of siRNA targeting mouse STAT3

XING Yi-zhan[1], LI Ze-gui[1], LI Hong-li[1], LI Tie-shi[2], DING Zhen-yu[1] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective To construct the specific interference plasmid targeting mouse STAT3 gene, and identify its suppressive effect. Methods The specific siRNAs targeting STAT3 gene was constructed. The semi-quantificational RT-PCR, Western blotting, immunocytochemical staining, cell proliferation and luciferase assay were used to confirm the validity of the recombinant siRNA plasmid. Results The siRNA plasmid was proved specifically to block the activation of over-expressed STAT3 in a dose-dependent manner in 293T cell, not only at protein level but also at mRNA level. Conclusion RNAi could specifically and efficiently inhibit STAT3 gene expression, and it will become an effective tool for searching the function of STAT3 relating to embryogenesis.

Key words: pBS/U6/STAT3-siRNA; STAT3; RNAi; mouse

信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)广泛表达于不同类型的细胞和组织中,参与细胞的生长、分化、增殖和存活过程[1,2]。有研究报道STAT3在植入后胚胎中即开始有所表达[3]。Yan等[4]使用免疫印迹,免疫组织化学技术检测到STAT3在E10.5-P0的大脑、小脑、神经管中有表达,且部分区域STAT3处于激活状态,提示STAT3参与了运动神经元的分化及脊髓的发育。但Takeda等[5]发现敲除STAT3的小鼠胚胎7.5 d即发生迅速死亡,表明STAT3对于早期胚胎的发育是必需的。

由于敲除STAT3的胚胎不易存活,使在体研究STAT3功能产生困难,进而难以从局部观察STAT3参与机体发育的确切功能。那么部分抑制STAT3的表达后是否会对胚胎的存活及神经系统发育造成影响,以及引起什么程度的影响,目前少见文献报道。近几年出现的RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)[6]即一些小双链RNA可高效、特异地阻断体内特定基因表达,导致特异mRNA降解,从而引起生物体内特异基因的沉默,使细胞表现出某种基因表型的缺失。这种技术作为一种简单有效的代替基因敲除的遗传工具,已成为研究基因功能的有效手段[7,8]。

鉴于此,本研究采用DNA载体介导的RNA干扰技术,设计并构建小鼠STAT3基因的特异性RNA干

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170983);重庆市人口计划生育委员会第3批科研项目计划资助项目(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170983) and the Third Research Project of Chongqing Family Planning Committee (2004)

作者简介:星懿展(1980-),女,四川省内江市人,硕士研究生,主要从事胚胎神经发育方面的研究。电话:13228653501,E-mail:elven_35@sohu.com
通讯作者:李泽桂,电话:(023)65321842,E-mail:lzgui@yahoo.com

收稿日期:2005-12-14;修回日期:2006-03-28

扰质粒，在细胞水平检测 pBS/U6/STAT3-siRNA 是否可以特异或有效地抑制小鼠 STAT3 基因的表达，并观察其干扰效率。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒与菌株　　pBS/U6，pBS/U6/EGFPi 由美国哈佛大学施扬博士赠予，pXJ40/Flag-STAT3 表达质粒由新加坡国立大学曹新民博士赠予。大肠杆菌 DH5α 为实验室自存。

1.1.2　细胞与主要试剂　　293T（人胚肾细胞）为实验室自存。限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶购自 TAKARA 公司；所有引物由上海生物工程公司合成；一步法 RT-PCR 试剂盒购自 TakaRa 公司；DMEM 培养基和胎牛血清（FBS）购自 Gibco 公司；磷酸钙转染试剂实验室自配。β-actin、STAT3、EGFP 抗体为 Santa Cruz 产品；二抗：抗鼠 IgG 和抗兔 IgG；三抗及 ECF 增强发光系统为 Amersham Pharmacia Biotechnology 产品；羊抗鼠-TRITC 抗体为北京中山公司产品；其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2　方法

1.2.1　靶向 STAT3 序列的 siRNA 选择及寡核苷酸设计　　基于选择的靶点序列以及改进后的 siRNA 构建的方法，排除与 STAT3 以外基因有高度同源的序列，最后筛选出 4 条 siRNA 的序列，合成了以下 8 条两端分别带有 *Apa* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 限制性酶切位点的寡核苷酸（表 1），作用部位依次为 157-174、1 226-1 243、1 936-1 953、2 334-2 351。

表 1　4 段 STAT3 基因 siRNA 序列

位点	正义链(5′→3′)	反义链(5′→3′)
157-174	TCACATGCCACGTTGGTGTTCAAGAG ACACCAACGTGGCATGTGACTTTTTT	AATTCAAAAAAGTCACATGCCACGTTGGT GTCTCTTGAACACCAACGTGGCATGTGA
1 226-1 243	AGTTCAAGCACCTGACCCTTCAAGAG AGGGTCAGGTGCTTGAACTCTTTTTT	AATTCAAAAAAGAGTTCAAGCACCTGACC CTCTCTTGAAGGGTCAGGTGCTTGAACT
1 936-1 953	CAGCTGAACAACATGTCATTCAAGAG ATGACATGTTGTTCAGCTGCTTTTTT	AATTCAAAAAAGCAGCTGAACAACATGTC ATCTCTTGAATGACATGTTGTTCAGCTG
2 334-2 351	AAGCTGCAGAGACGTGACTTCAAGAG AGTCACGTCTCTGCAGCTTCTTTTTT	AATTCAAAAAAGAAGCTGCAGAGACGTGA CTCTCTTGAAGTCACGTCTCTGCAGCTT

1.2.2　干扰质粒的克隆　　载体 pBS/U6 依次经 *Apa* Ⅰ，Klenow large-fragment 和 *Eco*R Ⅰ 酶切处理回收纯化。将退火结合后的小 DNA 片段与载体混合连接，转化提取质粒，酶切鉴定得到 4 个干扰质粒，分别记为 pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ。

1.2.3　细胞培养及转染　　293T 细胞 1.5×10^5 培养在内置盖玻片的 6 孔板中，含 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养液，37 ℃，5% CO_2 饱和湿度，16 h 后磷酸钙法转染细胞。

1.2.4　免疫印迹（Western blot）　　细胞转染 48 h 后，收获细胞，裂解。定量样本经 SDS-PAGE 分离，蛋白电泳转移至 PVDF 膜，免疫印迹步骤参照《分子克隆》。蛋白显色为 ECF 增强发光系统。

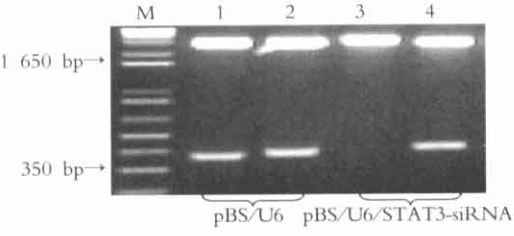
1.2.5　免疫染色　　细胞转染 36 h 后进行免疫染色。3.7% 甲醛固定，0.5% TritonX-100 透化处理，正常羊血清封闭；一抗（STAT3-K15）37 ℃孵育 30 min，羊抗鼠-TRITC 室温避光孵育 40 min，甘油封片后激光共聚焦显微镜（Leica）观察拍照。

1.2.6　RT-PCR　　细胞转染 36 h 后提取细胞总 RNA，取 1 μg 细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增，设计小鼠 STAT3 特异性引物正义链：CAACAGCCGCCGTAGTGA，反义链：CAGGCCCTAGGAGCTTCT。RT-PCR 反应条件是：50 ℃ 15 min；94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s；55 ℃ 30 s；72 ℃ 45 s；20 个循环；72 ℃ 10 min。取 5 μl PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。以 β-actin 作为内对照。

2　结果

2.1　特异性干扰质粒的构建及酶切鉴定

以小鼠 STAT3 基因 cDNA（NCBI 网站 GenBank 数据库小鼠 STAT3 基因序列号：AY299489）为模板，选取分别位于 STAT3 基因 cDNA 上 +157 ~ +174、+1 226 ~ +1 243、+1 936 ~ +1 953、+2 334 ~ +2 351 位的片段进行 RNAi 构建。干扰序列插入时选取的内切酶是 *Apa* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ，所以任意选取 1 个 U6 启动子前面的内切酶和其后可以被插入序列取代的内切酶进行双酶切，干扰载体都只能被单酶切得到线性化载体；而如果选用干扰序列不能取代的内切酶进行酶切，则能切出连同 U6 启动子和干扰序列一起的 1 个片段，略大于 U6 启动子（图 1，以Ⅰ号 siRNA 质粒为例）。所得到的质粒分别命名为 pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ。

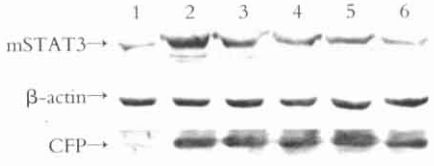


M：DNA 标准；1，3：*Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅴ 酶切；2，4：*Kpn* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ酶切

图 1　pBS/U6/STAT3-siRNA 阳性质粒酶切鉴定电泳结果

2.2　Western blot STAT3 蛋白水平改变

为研究构建的干扰质粒对小鼠 STAT3 表达的影响，将 pXJ40/Flag-STAT3 表达质粒和 4 种干扰质粒共同转染 293T 细胞，通过免疫印迹实验分析 STAT3 在 293T 细胞中的表达情况。结果如图 2：共转染了干扰质粒 pBS/U6/STAT3-siRNA 后细胞内 STAT3 蛋白表达量有不同程度地降低；其中靶向（+2 334 ~ +2 351）位点的干扰质粒效果最好，几乎把外转小鼠 STAT3 的表达降到了本底水平，并且 pBS/U6/STAT3-siRNA 仅抑制 STAT3 的表达，对 EGFP 蛋白的表达没有任何影响。

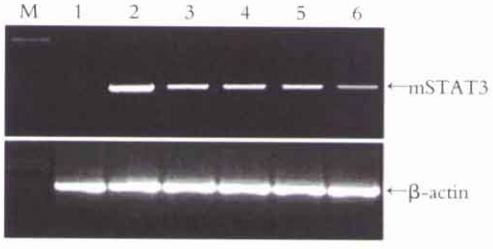


1：野生型 293T；2：转染鼠源 STAT3 表达质粒；3 - 6：依次转染 pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ

图 2　293T 细胞转染干扰质粒后 STAT3 蛋白表达

2.3 RT-PCR STAT3 mRNA 水平改变

为明确共转染干扰质粒后小鼠 STAT3 在 293T 细胞中蛋白表达减少的原因，采用 RT-PCR 技术半定量检测小鼠 STAT3 基因在 293T 细胞中的 mRNA 水平。结果如图 3 所示：共转染干扰质粒的小鼠 STAT3 基因在 293T 细胞中 mRNA 的表达量明显比共转染了空载体质粒的对照组明显降低，尤其靶向（+2 334 ~ +2 351）位点的干扰质粒效果最好，这与免疫印迹实验的结果是一致的；另外，由于所设计的引物是小鼠 STAT3 基因特异性的，所以尽管第 1 道野生型 293T 细胞总 RNA 模板中有人源 STAT3 基因的存在，也不能扩增出任何条带。

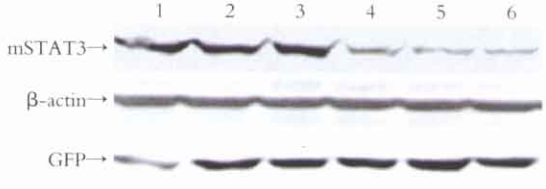


M：DNA 标准；1：野生型 293T；2：转染鼠源 STAT3 表达质粒；3 - 6：转染 pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ

图 3 293T 细胞转染干扰质粒后 STAT3 mRNA 的表达

2.4 Western blot 抑制 STAT3 蛋白表达的剂量效应

进一步选取干扰效果最好的靶向（+2334/ +2351）位点的质粒，用免疫印迹法检测不同剂量的干扰质粒对小鼠 STAT3 表达的影响。结果如图 4 所示：随着共转染干扰质粒量的增加，STAT3 的表达量相比对照组降低，并且呈现明显的剂量效应。



1：pBS/U6-GFPi；2：pBS/U6 阴性对照；3 - 6：pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅳ 剂量效应（分别为 0.5、1、2、3 μg）

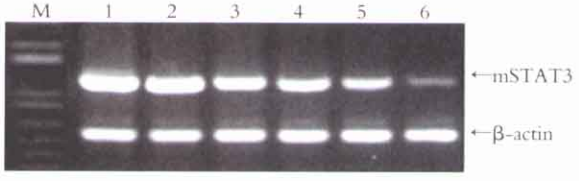
图 4 293T 细胞转染不同剂量干扰质粒后 STAT3 蛋白表达

2.5 RT-PCR 抑制 STAT3 mRNA 水平的剂量效应

同样采用半定量 RT-PCR 技术检测不同剂量的干扰质粒对小鼠 STAT3 在 293T 细胞中 mRNA 表达的影响。琼脂糖凝胶电泳结果同免疫染色以及免疫印迹实验的结果相一致，如图 5 所示。发现随着共转染干扰质粒的量的增加，STAT3 的 mRNA 表达量相比对照组降低了，并且呈现明显的剂量效应。

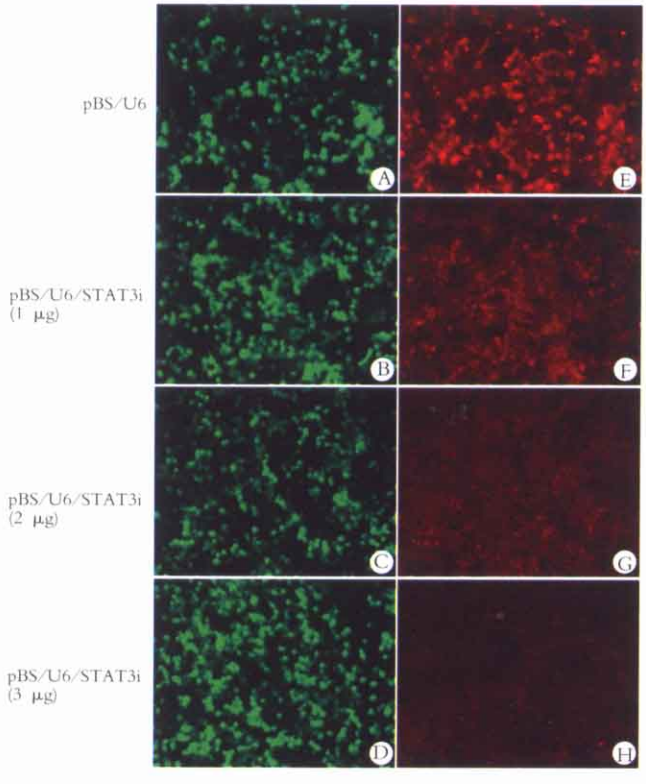
2.6 免疫细胞化学染色剂量效应

免疫细胞化学染色可以更直观地观察 pBS/U6/STAT3-siRNA 对 STAT3 基因表达的抑制作用。选择抑制效果最好的靶向（+2 334 ~ +2 351）位点的干扰质粒进行剂量效应检测。结果如图 6 所示：转染 STAT3 干扰质粒与转染空载体 pBS/U6 的细胞比较，STAT3 蛋白的表达量显著的降低，而且随着干扰质粒转染量的增加，STAT3 的表达越来越低，而 GFP 的表达几乎与对照组是相等的。染色结果直观显示了所构建的 pBS/U6/STAT3-siRNA 能够在细胞水平高效且特异地抑制 STAT3 蛋白的表达。



M：DNA 标准；1：pBS/U6 阴性对照；2：pBS/U6-GFPi；3 - 6：pBS/U6/STAT3-siRNA-Ⅳ 剂量依次为 0.5、1.0、2.0、3.0 μg

图 5 293T 细胞转染不同剂量干扰质粒后 STAT3 mRNA 表达



A - D：GFP 荧光表达（×200）；E - H：STAT3 荧光表达（荧光染色 ×200）

图 6 293T 细胞转染不同剂量干扰质粒后 STAT3 蛋白表达变化

3 讨论

STAT3 是 STAT 家族的一个重要成员，目前在哺乳动物中已鉴定出 STAT 家族的 7 个成员[9]。1994 年 STAT3 首先作为急性阶段性反应因子（acute-phase response factor，APRF）[10] 被克隆。在许多体外培养的细胞中，发现 STAT3 参与细胞的生长、分化和存活过程。组织特异性的基因敲除结果表明，STAT3 对于上皮细胞的凋亡，后哺乳期乳腺的发育，皮肤重建，角质细胞迁移，巨噬细胞失活与 Th 细胞反应中的炎性

因子下调等都具有重要的调控作用[11,12]。

在神经管发育阶段，STAT3 mRNA 的表达经历了前—中—后脑泡这一时空变化过程，提示 STAT3 可能参与了神经胚胎形成阶段的信号转导。睫状神经营养因子（ciliary neurotrophic factor，CNTF）可激活 JAK/STAT3 信号途径，Rajan 等[13]发现阻断 STAT3 功能可抑制 CNTF 促进的星形胶质细胞分化。所以选择合适的研究方法已成为了解 STAT3 功能的关键。

由于完全缺失 STAT3 的胚胎早期即死亡，如果能抑制 STAT3 部分功能，保持胚胎的存活，就可以更好的观察其在胚胎发育尤其是神经系统发育中的作用。RNA 干扰技术即可部分沉默靶基因的表达。从 2001 年首次有报道在哺乳动物培养细胞中通过 siRNA 成功诱导了靶基因沉默后，此技术就在低等生物到哺乳动物领域中得到广泛应用。通过观察基因表达被抑制后细胞以及生物体从形态到各项生理生化的变化，对该基因的功能及参与的信号网络进行分析。

因此本实验利用 RNAi 技术构建了小鼠 STAT3 基因特异的重组干扰质粒。目的基因上特异性片段的选择在 RNAi 的构建中起着关键性的作用[14]。在小鼠 STAT3 干扰质粒构建中，要确保所构建的 RNAi 只能特异性地抑制目的基因的表达而对细胞内其他基因没有非特异性的降解。以不同位点起始的基因片段为模板所构建的 RNAi 对目的基因的抑制效率也有不同，所以本实验选择了 4 个基因片段来构建相应的 RNAi 质粒，以选择抑制效果最好的 1 条。

本实验采用体外培养的 293T 细胞，将 STAT3 表达质粒与 pBS/U6/STAT3-siRNA 质粒共转染后检测 STAT3 表达水平的改变。免疫印迹分析显示 4 个干扰质粒均能特异地抑制 STAT3 蛋白的表达。因为 293T 细胞中含有内源性的人源 STAT3，而 pBS/U6/STAT3-siRNA 干扰质粒是小鼠 STAT3 序列特异的，不能干扰人源 STAT3 的表达，因此靶向 2 334～2 351 位点的干扰质粒几乎抑制了外转小鼠 STAT3 表达的 70%。同时共转 GFP 质粒对照组显示 STAT3 干扰质粒只特异性地抑制 STAT3 蛋白的表达而对其他基因的表达没有影响，说明所构建的 RNAi 具有高度专一性。RT-PCR 也证实了这种抑制作用是通过降低了 STAT3 的 mRNA 水平导致的。其干扰作用还呈现明显的剂量效应。Konnikova 等[15]报道在星形胶质细胞瘤细胞株中沉默 STAT3 基因的表达后，会抑制肿瘤细胞的增殖并导致细胞凋亡。那么沉默 STAT3 基因后对正常胚胎发育或神经上皮细胞分化是否有影响，还有待进一步研究。

本研究构建的小鼠 pBS/U6/STAT3-siRNA 质粒为后续了解该 STAT3 信号通路及其转录活性功能提供了实验基础和有效的途径。

（致谢：清华大学医学院基因功能研究组常智杰教授提供实验场所；美国哈佛大学医学院施扬博士提供 pBS/U6 和 pBS/U6/EGFPi 质粒；新加坡国立大学曹新民博士赠予 pXJ40/Flag-STAT3 表达质粒。）

参考文献：

[1] HIRANO T, ISHIHARA K, HIBI M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2548－2556.

[2] LEVY D E, DARNELL J E, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651－662.

[3] DUNCAN S A, ZHONG Z, WEN Z, *et al*. STAT signaling is active during early mammalian development[J]. Dev Dyn, 1997, 208(2): 190－198.

[4] YAN Y, BIAN W, XIE Z, *et al*. Stat3 signaling is present and active during development of the central nervous system and eye of vertebrates [J]. Dev Dyn, 2004, 231(2): 248－257.

[5] TAKEDA K, NOGUCHI K, SHI W, *et al*. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(8): 3801－3804.

[6] BAULCOMBE D. RNA silencing[J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(6): 290－293.

[7] RITTER U, DAMM-WELK C, FUCHS U, *et al*. Design and evaluation of chemically synthesized siRNA targeting the NPM-ALK fusion site in anaplastic large cell lymphoma (ALCL) [J]. Oligonucleotides, 2003, 13(5): 365－373.

[8] SHI Y. Mammalian RNAi for the masses[J]. Trends Genet, 2003, 19(1): 9－12.

[9] CALO V, MIGLIAVACCA M, BAZAN V, *et al*. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis[J]. J Cell Physiol, 2003, 197(2): 157－168.

[10] AKIRA S, NISHIO Y, INOUE M, *et al*. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway[J]. Cell, 1994, 77(1): 63－71.

[11] RAZ R, LEE C K, CANNIZZARO L A, *et al*. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(6): 2846－2851.

[12] 纪　华，李泽桂，马　路，等. STAT3 在小鼠胚胎神经系统发育中的表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：592－595.

[13] RAJAN P, MCKAY R D. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS[J]. J Neurosci, 1998, 18(10): 3620－3629.

[14] SUI G, SOOHOO C, AFFAR EL B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515－5520.

[15] KONNIKOVA L, KOTECKI M, KRUGER M M, *et al*. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells [J]. BMC Cancer, 2003, 3: 23.

（编辑　薛国文）