文章编号:1000-5404(2007)07-0603-03

论著

STAT3小干扰RNA的构建及其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

张 伟[1],吴 强[2],谭德明[3] ([1]重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016;[2]重庆市急救中心普通外科,重庆 400014;[3]三峡中心医院普通外科,重庆 404000)

提 要:目的 以信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)为靶基因,设计并构建短发夹状小干扰RNA表达载体,探讨STAT3小干扰RNA表达载体对胃癌细胞株SGC7901增殖和凋亡的影响。**方法** 以PAVU6+27质粒为载体,构建STAT3的小干扰RNA表达载体,并将其转染胃癌SGC7901细胞,G418筛选后经反转录聚合酶链反应和Western blot法检测STAT3基因和蛋白表达的改变,MTT法和^{3}H-TdR掺入率检测细胞增殖和DNA合成情况,原位凋亡检测细胞凋亡率,流式细胞术检测抗细胞凋亡因子Bcl-2的表达。**结果** 酶切鉴定和测序分析表明靶向STAT3的RNA干扰重组体构建成功;重组体转染SGC7901后,STAT3的mRNA和蛋白水平较空载体转染组显著下降;MTT比色A值和^{3}H-TdR掺入率均明显低于对照组($P<0.05$),凋亡率升高($P<0.01$),Bcl-2表达下降。**结论** STAT3小干扰RNA表达载体可能是抑制人胃癌细胞增殖和促进凋亡的有效手段。

关键词:STAT3;RNA干扰;胃癌;增殖;凋亡
中图法分类号:R394-33; R73-362; R735.2 **文献标识码**:A

Effect of STAT3 siRNA on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells *in vitro*

ZHANG Wei[1], WU Qiang[2], TAN De-ming[3] ([1]Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of General Surgery, Chongqing Emergency Center, Chongqing 400014; [3]Department of General Surgery, Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract: Objective To design and construct a vector of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) small interfering RNA (siRNA), and to investigate the effect of the recombinant plasmid on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell SGC7901. **Methods** The PAVU6+27-STAT3 siRNA expression vector was constructed, then transfected into the cultured gastric cancer cells SGC7901 by DOTAP method. STAT3 mRNA and protein in SGC7901 were determined by RT-PCR and Western blotting respectively. Cell proliferation was tested by MTT and ^{3}H-TdR incorporation. Cell apoptosis percentage and bcl-2 expression were observed by TUNEL and flow cytometry respectively. **Results** The PAVU6+27-STAT3 siRNA expression vector was successfully constructed. In the transfected SGC7901 cells, cell proliferation, ^{3}H-TdR incorporation and bcl-2 expression were decreased, and cell apoptosis percentage was increased. **Conclusion** PAVU6+27-STAT3 siRNA expression vector may be an efficient method to inhibit the proliferation and promote the apoptosis of gastric cancer cells.

Key words: signal transducer and activator of transcription 3; RNA interfering; gastric cancer; proliferation; apoptosis

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription,STATs)是细胞因子和生长因子受体信号的下游效应物,其中STAT3是家族中的重要一员,是近年来研究异常活跃的转录因子,目前进行的一些有关细胞培养和动物模型实验,已确认STAT3信号途径是多种人类肿瘤干预治疗有效的分子靶标[1],而抑制STAT3是目前探索肿瘤治疗的一条新的途径[2]。本研究拟构建以STAT3基因为靶向的RNA干扰重组体,通过RNA干扰技术(RNA interference,RNAi)沉默胃癌细胞SGC7901中STAT3基因的表达,并观察其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响,旨在为STAT3在胃癌中的基因治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

SGC7901由第三军医大学西南医院全军消化内科中心惠赠,真核表达载体PAVU6+27质粒由美国Michigan大学David Engelke博士惠赠。限制性内切酶、T_4 DNA连接酶、RT-PCR试剂盒等均为大连TaKaRa生物公司产品,质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒均购自美国Omega公司,DOTAP脂质体转染试剂、

作者简介:张 伟(1967-),男,重庆市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究,发表论文20余篇。电话:13808353353

收稿日期:2006-07-05;修回日期:2006-10-18

RNA 提取试剂 Tripure、DEPC 购自美国 Roche 公司，RPMI1640 培养基、标准小牛血清购自美国 Hyclone 公司，S-P 免疫组化染色试剂盒、波形蛋白、结蛋白、肌动蛋白、第Ⅷ因子抗体购自北京中山生物技术有限公司，^{3}H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）购自中国原子能科学研究院，DNA 缺口末端标记技术凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 靶向 STAT3 的短发夹小分子干扰 RNA（short hairpin RNA interference，shRNA）的设计

根据 GenBank 中 STAT3 的核苷酸序列，参考在线设计工具（http://bioinfo. clontech. com/rnaidesigner）的设计策略，设计 STAT3 特异寡核苷酸序列，并在两端设计合成 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切位点，用于形成茎环结构序列及 U6 启动子终止序列，以形成发夹状 siRNA 转录模板，DNA 序列由上海生工公司合成。序列为正义链：5′-GATCCGCATCTGCCTAGATCGGCTATTCAAGAGATAGCCGATCTAGGCAGATGTTTTTTGGAAA-3′，反义链：5′-AGCTTTTCCAAAAAACATCTGCCTAGATCGGCTATCTC2TTGAATAGCCGATCTAGGCAGATGCG-3′。

1.3 靶向 STAT3 的 shRNA 载体的构建

STAT3 的反向重复片段经退火成互补双链，连接到经*Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切的载体 PAVU6 +27 中，构建成重组子。阳性克隆命名为 PAVU6 +27-STAT3 shRNA。

1.4 体外转染 SGC7901 与含阳性克隆细胞的筛选

SGC7901 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃，5% CO_2 孵箱内培养，细胞生长至 70% ~80% 融合时传代。采用 DOTAP 脂质体转染试剂盒包裹经灭菌处理的重组质粒和空质粒，用含 G418 300 μg/ml 的细胞培养液进行筛选，1 周后收集 G418 抗性细胞。以转染空质粒 PAVU6 +27 的细胞作为对照。

1.5 RT-PCR 法检测 PAVU6 +27-STAT3 转染 SGC7901 后 STAT3 mRNA 表达改变

分别抽提各组细胞总 RNA，逆转录为 cDNA，以磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）为内参照。GAPDH 上游引物：5′-ACC ACA GTC CA T GCC A TC AC-3′；下游：5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′，产物长度 452 bp。STAT3 上游引物：5′-CCCATACCTGAAGACCAAGTTTATC-3′；下游引物：5′-TGGAAATAATGGTGAAGGTGCTG-3′，扩增片段长度 125 bp。PCR 产物电泳图像用紫外荧光成像分析系统专用软件行半定量分析，以平均灰度值代表相应基因的表达量，并除以 GAPDH 的平均灰度值，所得数值作为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。

1.6 Western blot 法检测 PAVU6 +27-STAT3 转染 SGC7901 后 STAT3 蛋白表达改变

分别消化上述细胞，每孔细胞中加入 80 μl 蛋白上样缓冲液，放置 5 min 后，再于沸水浴中放置 10 min 后，4 ℃冰箱中冷却。取 30 μl 上样 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜后以 STAT3 多克隆抗体 1∶500 于 37 ℃孵育 60 min，TBS 洗涤后二抗 1∶5 000 孵育 60 min，5% DAB 显色。GAPDH 为内参照蛋白。

1.7 四唑盐比色实验（MTT 法）检测细胞增殖

各组 SGC7901 培养于 96 孔板中，3 000 个细胞/孔，培养 24 h 后换无血清 1640 培养液继续孵育 24 h，使细胞生长同步进入休止期。培养 48 h 后，每孔加入 20 μl MTT 溶液（5 g/L）培养 4 h，弃培养液，加入二甲亚枫（DMSO）150 μl/每孔，振荡 10 min，在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定吸光度值[D(490)]。

1.8 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）掺入法检测 DNA 的合成

质粒转染 SGC7901 后 24 h 检测 SGC7901 中^{3}H-TdR 掺入的改变，细胞^{3}H-TdR 的孵育时间均为 6 h，即每个时相点测定前 6 h 加入^{3}H-TdR（1.85 × 10^{10} μBq/孔）。细胞消化分散制成细胞悬液，经抽滤收集于玻璃纤维纸上，生理盐水冲洗、10% 三氯乙酸固定、无水乙醇脱色，80 ℃干烤 30 min，液体闪烁计数测定 cpm。

1.9 原位凋亡检测

细胞在预置盖玻片的 24 孔板中培养，转染 48 h 后取出盖玻片，光镜和电镜观察。并用原位凋亡检测试剂盒 TdT 末端标记法检测凋亡率，棕黄色细胞为阳性凋亡细胞，随机计数 10 个视野中阳性、阴性细胞，凋亡发生率 = 阳性细胞/（阳性细胞 + 阴性细胞）×100%。

1.10 流式细胞术检测抗细胞凋亡因子 Bcl-2 表达

采用间接免疫荧光法，在细胞悬液中分别加入 1∶100 的 Bcl-2 抗体，37 ℃温浴 30 min 后洗涤，加入羊抗兔荧光指数 TC-IgG，温浴洗涤后行流式细胞仪检测，以荧光指数表示 Bcl-2 的相对含量，荧光指数 =（样品的平均荧光强度 - 对照样品平均荧光强度）/正常组织平均荧光强度。

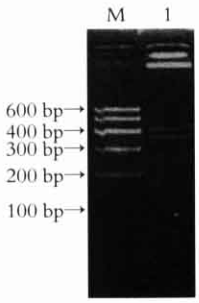
1.11 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验（$P < 0.05$）。

2 结果

2.1 STAT3 小干扰 RNA 表达载体酶切和测序鉴定

STAT3 小干扰 RNA 表达载体经 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切后呈 3 条带，分别为 6.2 kb 的载体片段、348 bp 和 416 bp 的小片段（图 1）。空载体双酶切后仅出现两条带。将重组质粒 PAVU6 +27-STAT3 shRNA 送 TaKaRa 公司测序，测序结果表明 shRNA 表达模板成功构建于 PAVU6 +27 载体上，序列完全与针对 STAT3 的靶序列相同。



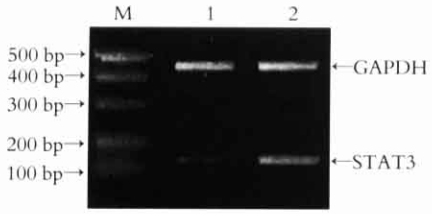
M：标准；1：STAT3 小干扰 RNA 表达载体经 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切

图 1 STAT3 小干扰 RNA 表达载体酶切鉴定电泳图

2.2 STAT3 小干扰 RNA 表达载体对 STAT3 基因表达的影响

RT-PCR 结果显示 STAT3 和 GAPDH 引物的扩增基因片段

经电泳和 EB 染色后，扩增片段大小约为 125 bp 和 452 bp。PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 转染的 SGC7901 中 STAT3 mRNA 的表达较空载体转染组的 SGC7901 中 STAT3 mRNA 表达量显著下降（图 2）。STAT3 扩增产物的强度与内对照 GAPDH 的比值分别为 0.610 和 1.291，STAT3 小干扰 RNA 表达阳性质粒转染组与对照组相比相差非常显著（$P<0.01$）（图 2）。



M：标准；1：重组子转染组；2：空载体转染组

图 2　PAVU6 + 27-STAT3 重组子对 SGC7901 STAT3 mRNA 的影响

2.3　PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 对 STAT3 蛋白表达的影响

PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 转染 SGC7901 后，Western blot 检测 SGC7901 中 STAT3 明显降低（图 3），灰度扫描半定量结果显示 PAVU6 + 27-STAT32-4 重组子的抑制效率为 58.4%。

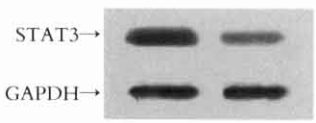


图 3　PAVU6 + 27-STAT3 重组子对 SGC7901 STAT3 蛋白的影响

2.4　PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 转染 SGC7901 后细胞增殖、^{3}H-TdR 掺入量的变化

将 PAVU6 + 27-STAT3 重组质粒进一步进行实验时观察到，PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 对 SGC7901 增殖有明显的抑制作用。空质粒和 PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 转染组吸光度值分别为（0.387 ± 0.0598）、（0.264 ± 0.0417），二者差异显著（$P<0.05$）（表 1）。^{3}H-TdR 掺入量试验表明转染 PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 入 SGC7901 后 6 h 的 ^{3}H-TdR 掺入量较空质粒组减少，相差显著（$P<0.05$），表明转染 PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 入 SGC7901 后可有效抑制细胞增殖和 DNA 合成。原位凋亡检测示 STAT3 shRNA 转染组凋亡率和抗细胞凋亡因子 Bcl-2 表达上升，相差非常显著（$P<0.01$）。

表 1　PAVU6 + 27-STAT3 shRNA 转染对 SGC7901 增殖和凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	D(490)	^{3}H-TdR 掺入量	凋亡率（%，$\bar{x}\pm s$）	Bcl-2
空质粒转染组	0.387 ± 0.059	4897.2 ± 90.1	6.05 ± 0.89	1.63 ± 0.09
STAT3 shRNA 转染组	0.264 ± 0.042[a]	3619.4 ± 67.7[a]	15.17 ± 2.04[b]	1.02 ± 0.15[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空质粒转染组比较

3　讨论

相对正常的细胞和组织而言，大多数人类原发癌灶及肿瘤细胞株中都有 STAT 的组成性激活。目前的研究表明 STAT3 在头颈部鳞状细胞癌[3]、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌[4]、胃癌[5]等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性增强，提示 STAT3 调控异常与肿瘤发生、发展密切相关，进一步研究表明在肿瘤细胞中对 STAT3 信号通路进行抑制可导致肿瘤细胞增殖减少及促进凋亡。凋亡的调控因素中，B 细胞淋巴瘤-2 家族基因发挥着重要作用，Bcl-2、Bcl-X1 和 Bax 能在线粒体上形成离子通道，研究显示它们共同参与调节一些与凋亡有关的细胞现象。本实验中，以 STAT3 小干扰 RNA 表达载体后转染胃癌细胞 SGC7901 后，抗凋亡基因 Bcl-2 表达被抑制，凋亡率上升。为有效地研究 STAT3 在胃癌中的作用，本研究选用近年发展起来的 RNAi 技术，它与传统基因沉默技术相比，具有高效性、稳定性、可传递性、特异性强等优势，自 RNAi 发现特别是在哺乳动物细胞成功应用后[6]，该技术正受到越来越多的关注。在众多制备 siRNAs 的方法中，siRNA 表达载体是唯一可以用来进行长期研究的方法，通过 PAVU6 + 27 载体导入的短发夹 RNA（shRNA）扩展了 RNAi 实验的选择。本实验成功构建短发夹状 STAT3 小干扰 RNA 表达载体后，转染到胃癌细胞 SGC7901 后发现重组的小干扰 RNA 表达载体具有较好的沉默效率，显著下调 STAT3 mRNA 和蛋白表达，并能有效地抑制 SGC7901 的增殖，促进细胞凋亡。这表明 STAT3 小干扰 RNA 表达载体可能是抑制人胃癌细胞增殖和促进凋亡的有效手段之一。

参考文献：

[1] Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al*. STATs in oncogenesis[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2474 - 2488.

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

[3] Song J I, Grandis J R. STAT signaling in head and neck cancer [J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2489 - 2495.

[4] Page C, Huang M, Jin X, *et al*. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells[J]. Int J Oncol, 2000, 17 (1): 23 - 28.

[5] 俞丽芬，朱延波，乔敏敏，等. Stat3 在人胃癌细胞株和组织中的组成性激活及其临床意义[J]. 中华医学杂志，2004，84(24)：2064 - 2069.

[6] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494 - 498.

（编辑　汪勤俭）