文章编号:1000-5404(2009)12-1147-04

论著

靶向 STAT5 的 siRNA 诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

赵振军[1],张丽杰[2],鹿 刚[3],张引娟[3],单保恩[3] ([1]河北省以岭医院检验科,石家庄 050091;河北医科大学:[2]第三医院检验科,石家庄 050051,[3]第四医院科研中心,石家庄 050011)

摘 要:目的 采用 RNA 干扰技术阻断 STAT5 基因的表达,观察其对人肝癌 SMMC-7721 凋亡的影响。**方法** 构建 3 种靶向 STAT5 的小干扰 RNA (siRNA)真核表达载体,采用 Lipofectamine™2000 转染肝癌细胞 SMMC-7721;分别采用半定量 RT-PCR、Western blot 技术检测转染前后 SMMC-7721 细胞 STAT5 mRNA 和蛋白质表达的变化;采用透射电镜技术观察细胞形态变化;流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** 3 条靶向 STAT5 的序列特异性的 siRNA 可以有效地抑制 SMMC-7721 细胞 STAT5 mRNA 和蛋白质表达,STAT5 mRNA 表达抑制率分别为 70.43%、43.02%、45.07%,STAT5 蛋白表达抑制率分别为 67.45%、37.36%、41.86%;转染靶向 STAT5 的 siRNA 真核表达载体 48 h 后出现凋亡细胞的典型形态学变化,并诱导 25.61% 的 SMMC-7721 细胞发生凋亡。**结论** 靶向 STAT5 的 siRNA 真核表达载体可以有效、特异地阻断 SMMC-7721 细胞 STAT5 基因的表达,并能够诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,STAT5 siRNA 在人肝癌的基因治疗中可能具有潜在的应用价值。

关键词: STAT5;siRNA;凋亡; 人肝癌细胞 SMMC-7721
中图法分类号: R73-362;R735.7 **文献标识码:** A

siRNA targeting STAT5 induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

ZHAO Zhen-jun[1], ZHANG Li-jie[2], LU Gang[3], ZHANG Yin-juan[3], SHAN Bao-en[3] ([1]Department of Clinical Laboratory, Yiling Hospital, Shijiangzhuang 050091; [2]Department of Clinical Laboratory, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051; [3]Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of inhibition of STAT5 gene expression by RNA interference technology on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **Methods** Three siRNA eukaryotic expression vectors against STAT5 were constructed and transfected with lipofectamine™ 2000 into SMMC-7721 cells. The changes in STAT5 expression were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blot. Cell apoptosis was assayed by flow cytometry (FCM). **Results** The sequence-specific siRNA could effectively and specifically inhibit STAT5 gene expression at both mRNA and protein levels. The inhibition rates of STAT5 mRNA expression were 70.43%, 43.02%, and 45.07%, respectively. The inhibition rates of STAT5 protein expression were 67.45%, 37.36%, and 41.86%, respectively. At 48 h after transfection, apoptosis rate was 25.61%. **Conclusion** siRNA against STAT5 can inhibit STAT5 gene expression in SMMC-7721 cells effectively and specifically and induce apoptosis of SMMC-7721 cells. siRNA targeting STAT5 has a great potential value in gene therapy of hepatocellular carcinoma.

Key words: STAT5; siRNA; apoptosis; SMMC-7721 cell line

STAT5 是信号转导子与激活子家族(signal transducers and activators of transcription, STATs)的重要成员。近年来,关于 STAT5 信号转导通路的研究异常活跃,目前的研究结果已确认 STAT5 信号途径是多种人类肿瘤干预治疗有效的分子标靶[1]。大量研究表明,在多种肿瘤细胞系和多种转化细胞系中,尤其是白血病中 STAT5 呈高水平表达[1,2],持续活化的 STAT5 增

基金项目: 国家自然科学基金(3037153);河北省自然科学基金(C2004000610)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (3037153) and the Natural Science Foundation of Hebei (C2004000610)
作者简介: 赵振军,男,河北省石家庄市人,博士,副主任检验师,主要从事生物化学、免疫学方面的研究。E-mail: zzjhospital@sina.com
通信作者: 单保恩,E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-08-28;**修回日期:** 2008-09-28

强了细胞的转化,同时也阻断了细胞的凋亡。

随着 RNA 干扰技术发展通过 RNAi 技术抑制癌基因的表达,有可能成为肿瘤基因治疗的新策略,具有较好的应用前景。本实验室前期的研究结果证实,人肝癌细胞株 SMMC-7721 存在 STAT5 的表达和活化[3],本研究拟通过构建靶向 STAT5 的小干扰 RNA(siRNA)真核表达载体,并将其转染 SMMC-7721 细胞,观察其抑制 STAT5 基因的表达、诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

人肝癌细胞 SMMC-7721 为本实验室保存。RPMI1640 购自 CELLGRO 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司,STAT5 抗体(兔抗人多克隆抗体)购自美国 Santa Cruz 公司,蛋白分子量标准、细胞蛋白抽提试剂盒和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自美国 Pierce 公司,DAB 染色试剂盒购自丹麦 DAKO 公司,RT-PCR 所有试剂购自 Promega 公司,引物由上海生工公司合成,阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SMMC-7721 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基,于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养,每 2 ~ 3 天换液 1 次。

1.2.2 靶向 STAT5 的 siRNA 真核表达载体的构建 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_003152.2)提供的人类 STAT5A(NM_003152.2 GI:21618341)基因结构的已知序列,以及 siRNA 设计的技术要求用"siRNA Sequence Selector"(http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/oligoDesigner)设计针对 STAT5A 的特异的 3 个 siRNA 序列(GC 38% ~ 55%),3 个序列如下:①772 ~ 790 nt ATGCCATTGACTTGGACAA(19 nt,GC42.1%);②891 ~ 909 nt GATCAAGCTGGGGCACTAC(19 nt,GC52.4%);③2 900 ~ 2 918 nt CCTGGATGAGACCATGGAT(19 nt,GC52.64%)。以 BLAST 分析设计序列的特异性,并构建 siRNA 表达载体的模板序列。分别命名为 pGenSil-1-STAT5A1、pGenSil-1-STAT5A2、pGenSil-1-STAT5A3),其中 1 个表达载体编码 1 个小发夹状 RNA(small hairpin RNA, shRNA)。3 个质粒表达载体编码的 shRNA 的发夹序列为 AAGUUCUGC。同时构建 1 个插入无关序列的阴性对照质粒载体,其不针对任何基因,无干扰效应,命名为 pGenSil-1-HK。每条模板链的组成包括 19 个 nt 特异的正义链和与其互补的 19 个 nt 反义链,正反链之间有 9 个碱基(TTCAAGACG)间隔,反义链之后有 6 个 T 做为转录终止信号,在模板链的两端加入 *Bam*HⅠ、*Sal*Ⅰ及 *Hind*Ⅲ酶切位点。2 条 DNA 链的合成、退火与线性化质粒载体连接及连接产物转化感受态细胞 DH5α、重组质粒提取、酶切鉴定及测序、阴性对照质粒载体 HK 委托武汉晶赛公司完成。重组质粒 -20 ℃ 保存备用。

1.2.3 脂质体介导 siRNA 转染 SMMC-7721 细胞 转染方法参照说明书进行。预实验结果显示,细胞增殖活性与 siRNA 浓度有剂量依赖关系。考虑要视脂质体的细胞毒性作用以及 siRNA 的非特异性抑制作用最小,我们选择质粒的终浓度为 2 μg/ml 进行转染。转染 6 h 后,换用普通完全培养基培养,培养至 48 h 后进行相关检测。

1.2.4 实验分组 取对数生长期的细胞,接种到 6 孔板中,2.0×10^5 个细胞/孔,培养 1 d 后,根据实验要求,分成 5 组:A 组:空白对照组,转染时仅加入 Lipofectamine™2000;B 组:HK 质粒阴性对照组,转染时加入 pGenSil-1-HK 重组质粒;C 组:STAT5A1 RNAi 组,转染时加入 pGenSil-1-STAT5A1 重组质粒;D 组:STAT5A2 RNAi 组,转染时加入 pGenSil-1-STAT5A2 重组质粒;E 组:STAT5A3RNAi 组,转染时加入 pGenSil-1-STAT5A3 重组质粒。

1.2.5 激光共聚焦鉴定转染效果 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,调整细胞数为 $1\times10^5 ml^{-1}$,接种细胞于 6 孔板,每孔 2 ml,孔底放无菌玻片,按上述实验分组进行转染,培养 48 h,取出玻片,激光共聚焦显微镜下观察细胞转染情况。转染效率 = 每高倍视野表达绿色荧光的细胞数/细胞总数,观察 10 个高倍视野,求平均值。

1.2.6 半定量 RT-PCR 检测不同实验组的 STAT5 mRNA 的表达 按 RT-PCR 二步法试剂盒说明书进行操作。内参照 β-actin 序列采用国际标准序列:上游 5′-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3′;下游 5′-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3′,拟扩增片段大小为 316 bp。STAT5 的引物序列为:上游 5′-GAGTCTCAGTTCAGTGTTGGCAGC-3′;下游 5′-AGTCACTAAAGCGCAACAAGAAGGTC-3′,拟扩增片段大小为 531 bp。STAT5 基因的表达强度用 STAT5 基因 RT-PCR 反应产物的光密度与内参照 β-actin RT-PCR 反应产物光密度的比值表示。STAT5 基因表达的抑制率(%)=(1 - STAT5ARNAi 组 STAT5 表达强度/空白对照组 STAT5 表达强度)×100%。

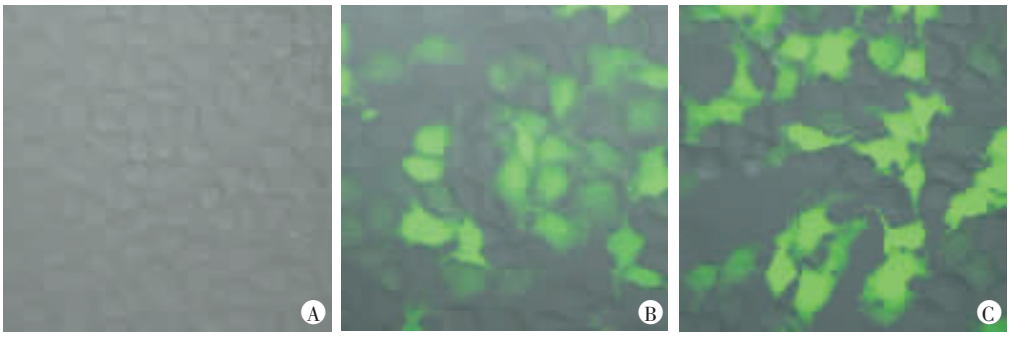
1.2.7 Western blot 检测各组的 STAT5 蛋白的表达 细胞总蛋白的抽提和蛋白浓度测定步骤均按照美国 Pierce 公司的操作说明进行,所有抽提物均保存在 -80 ℃ 备用。以 Gel-PRO ANALYZER 凝胶定量分析软件进行灰度分析比较。STAT5 蛋白表达的抑制率(%)=(1 - STAT5A RNAi 组 STAT5 表达强度/空白对照组 STAT5 表达强度)×100%。

1.2.8 细胞凋亡的超微结构观察 透射电镜观察 STAT5A1 RNAi 组凋亡细胞形态。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 Beckman Coulter 公司 Epics-XL Ⅱ型流式细胞仪检测,应用 Muticycle AV 软件分析细胞凋亡率。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,两组间均数比较用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。



A：空白对照组；B：HK 质粒阴性对照组；C 组：STAT5A1 RNAi 组

图 1　激光共聚焦显微镜观察各组 siRNA 转染效率（×400）

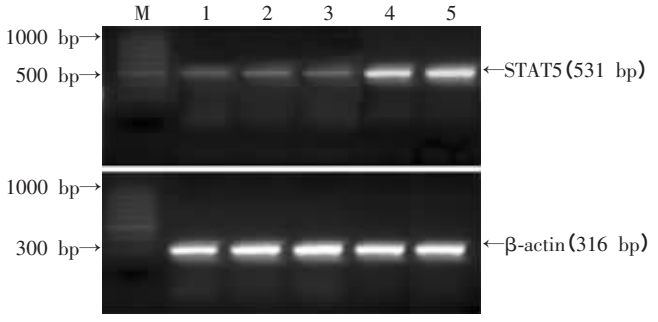
2　结果

2.1　STAT5 siRNA 转染 SMMC-7721 细胞的转染效率

激光共聚焦显微镜下，转染成功的细胞因表达报告基因 GFP 的产物绿色荧光蛋白而显示绿色荧光。B 组（HK 质粒阴性对照组）、C 组（STAT5A1 RNAi 组）、D 组（STAT5A2 RNAi 组）、E 组（STAT5A3 RNAi 组）SMMC-7721 细胞表达绿色荧光的细胞分别占细胞总数的 63%、65%、64%、65%。A 组（空白对照组）未表达绿色荧光（图 1）。

2.2　STAT5 siRNA 对 STAT5 mRNA 表达的抑制作用

细胞转染 48 h 后，C、D、E 组 STAT5 mRNA 表达抑制率分别为 70.43%、43.02%、45.07%，统计学分析表明，SMMC-7721 细胞转染 3 个针对 STAT5A 的 siRNA 后，STAT5 mRNA 的表达明显降低（$P<0.05$）。转染 HK 质粒对 STAT5 mRNA 的表达没有抑制作用，与空白对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 2。



M：DNA 标准；1：STAT5A1 RNAi 组；2：STAT5A2 RNAi 组；3：STAT5A3 RNAi 组；4：HK 质粒阴性对照组；5：空白对照组

图 2　半定量 RT-PCR 检测各组 STAT5 mRNA 表达的变化

2.3　STAT5 siRNA 对 STAT5 蛋白表达的抑制作用

细胞转染 48 h 后，C、D、E 组 STAT5 蛋白表达抑制率分别为 67.45%、37.36%、41.86%，统计学分析表明，SMMC-7721 细胞转染 3 个针对 STAT5 的 siRNA 后，STAT5 蛋白的表达明显降低（$P<0.05$）。转染 pGenSil-1-HK 质粒对 STAT5 蛋白的表达没有抑制作用，与空白对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 3。

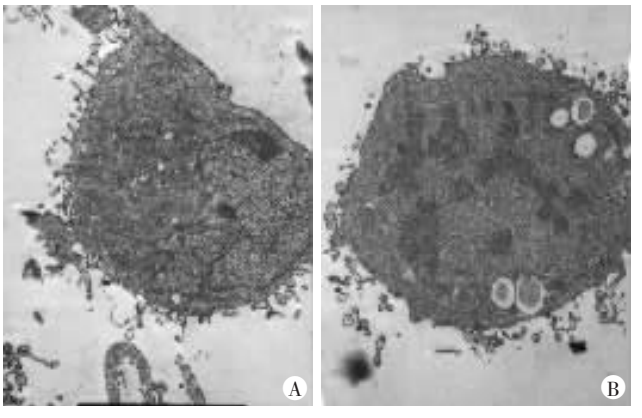
2.4　STAT5 siRNA 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的形态学检测结果

透射电镜下可见，经 STAT5A1 siRNA 作用 48 h 的 SMMC-7721 细胞，呈典型凋亡细胞形态改变，表现为线粒体大部分嵴和膜融合和消失，细胞质内有空泡变性，细胞核膜破损缺失，核质生成许多碎块散落在细胞质内。而空白对照组、HK 质粒阴性对照组细胞，形态大小规则，染色质均匀、疏散分布，细胞核大、核畸形明显，细胞器呈典型的肿瘤细胞形态，未发现凋亡征象（图 4）。



1：STAT5A1 RNAi 组；2：STAT5A2 RNAi 组；3：STAT5A3 RNAi 组；4：HK 质粒阴性对照组；5：空白对照组

图 3　Western blot 检测检测各组转染 48 h 后 SMMC-7721 细胞 STAT5 蛋白表达的变化

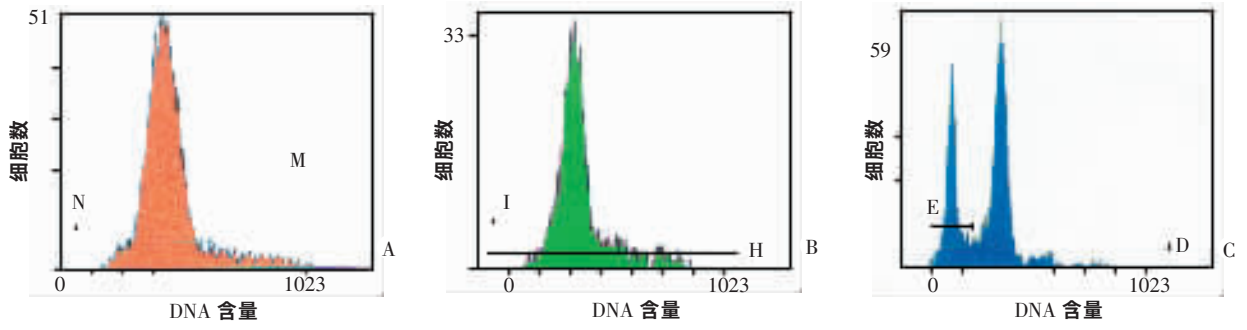


A：空白对照组；B：STAT5A1 RNAi 组

图 4　透射电镜观察 SMMC-7721 细胞凋亡的形态学变化（×5 000）

2.5　STAT5 siRNA 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的流式细胞术检测结果

流式细胞术分析结果显示，转染 pGenSil-1-STAT5A1 质粒的 SMMC-7721 细胞的凋亡率达到（32.35 ± 1.75）%，明显高于阴性对照组（3.35 ± 1.15）% 和空白对照组（3.75 ± 2.05）%（$P<0.05$），阴性对照组与空白对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 5。



A：空白对照组；B：HK 质粒阴性对照组；C：STAT5A1 RNAi 组

图5 流式细胞术检测各组转染 48 h 后 SMMC-7721 细胞的凋亡率

3 讨论

已有的研究结果显示，STAT5 或 STAT3 在多种肿瘤组织与细胞系中异常表达，高表达 STAT5 和/或 STAT3 的肿瘤细胞依赖 STAT5 和/或 STAT3 信号通路而存活，当抑制 STAT5 或 STAT3 活性即能够诱导肿瘤细胞的恶性生长[1-4]。目前国外有关 STAT5 信号转导途径的研究正在成为热点研究问题，但大部分多集中在恶性血液系统疾病（白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤）和头颈部肿瘤、乳腺癌、前列腺癌等方面，本实验室前期的研究结果证实，人肝癌细胞株 SMMC-7721 存在 STAT5 的表达和活化[3]。RNAi 自发现以来，已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病治疗等的研究。RNAi 技术为异常表达 STAT5 肿瘤的基因治疗开辟了新的途径[5-7]。

在 RNAi 研究中存在的最大问题是无法确定 RNAi 技术对目标基因的最佳作用位点。因此，需要构建多个针对不同作用位点的质粒，以便在研究中进行筛选。在本实验中，我们设计构建了 3 条靶向 STAT5A 的 siRNA 真核表达载体，其转录产物可在体内形成由一个茎环所分离的具有反向重复序列的发卡样 RNA（short hairp in RNA，shRNA），此 shRNA 随后被加工成 siRNA 而降解靶基因 STAT5 mRNA，达到阻断靶基因 STAT5 表达的目的。本实验的结果表明，我们所构建的靶向 STAT5A 的 3 条靶向 STAT5A 的 RNAi 真核表达载体中，pGenSil-1-STAT5A1 真核表达载体能够成功转染到 SMMC-7721 细胞，转染效率达 63%，pGenSil-1-STAT5A1 干扰质粒具有高度特异性，可以有效地阻断 SMMC-7721 细胞 STAT5 基因的表达，在 mRNA 和蛋白质水平抑制率分别达到 70.43% 和 67.45%，并且能够诱导 SMMC-7721 细胞凋亡，凋亡率达 32.35%，说明该干扰序列所针对的 STAT5A 的作用位点是 RNAi 技术对 STAT5A 的最佳作用位点。此外，STAT5A 和 STAT5B 具有高度同源性，加之在设计干扰序列时我们同时兼顾考虑了二者的基因序列，推测是这些原因导致了针对 STAT5A1 的 pGenSil-1-STAT5A1 干扰质粒载体可以有效抑制 STAT5 基因的表达。本实验结果提示靶向 STAT5 的 RNAi 技术在肝癌的治疗中可能具有重要的潜在应用价值。本实验为今后进一步的研究提供了必要的实验基础。

参考文献：

[1] Buettner R, Mora L B, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(4): 945-954.

[2] Darnell J E Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10): 740-749.

[3] 赵振军，左连富，单保恩，等. 香加皮杠柳苷抑制 Stat5 信号通路诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的实验研究[J]. 临床检验杂志，2008，26(1)：46-48.

[4] 张丽杰，鹿 刚，张引娟，等. 香加皮提取物杠柳苷抑制 SMMC-7721 细胞 Stat3 信号通路诱导细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(15)：1448-1451.

[5] 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.

[6] Zhelev Z, Bakalova R, Ohba H, *et al*. Suppression of bcr-abl synthesis by siRNAs or tyrosine kinase activity by Glivec alters different oncogenes, apoptotic/antiapoptotic genes and cell proliferation factors (microarray study)[J]. FEBS Lett, 2004, 570(1-3): 195-204.

[7] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, *et al*. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2004, 10(1): 162-171.

（编辑 王小寒）