论著

文章编号:1000-5404(2013)05-400-04

可调控STAT3干扰载体抑制BIU-87细胞侵袭的体外研究

党微旗,唐 浩,曹 红,王 林,陈婷梅 (400016 重庆,重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨可调控RNA干扰载体通过抑制STAT3信号通路对膀胱癌细胞BIU-87侵袭性的影响。**方法** 采用受CRE重组酶调控的RNA干扰载体pSico构建针对STAT3的shRNA表达载体,以pLVX-CRE作为CRE蛋白的表达载体,将BIU-87细胞分为pSico-shNeg、pSico-shNeg/CRE、pSico-shSTAT3、pSico-shSTAT3/CRE 4组,分别转染相应质粒,RT-PCR和Western blot法检测其干扰效率,Transwell实验检测其侵袭能力。**结果** 双酶切及测序证实载体构建正确;各组细胞在转染重组质粒后EGFP的表达受CRE调控;RT-PCR结果显示STAT3的表达在干扰之后有显著降低。Western blot结果显示,在无CRE时,pSico-shSTAT3组与pSico-shNeg组STAT3的表达无显著差异($P>0.05$),在有CRE时,pSico-shSTAT3组STAT3相对表达量下降为pSico-shNeg组的(43±4.2)%($P<0.05$);体外侵袭实验显示pSico-shNeg组透膜细胞数为(203.33±12.42)/视野、pSico-shNeg/CRE组(196.33±11.85)/视野、pSico-shSTAT3组(201.00±16.64)/视野,而pSico-shSTAT3/CRE组(42.00±3.00)/视野,较其他3组显著降低($P<0.01$)。**结论** 由可调控RNA干扰载体介导的CRE依赖性STAT3表达载体能降低细胞内STAT3信号水平,并降低BIU-87细胞体外侵袭迁移能力。

[关键词] STAT3;RNA干扰;BIU-87细胞;CRE;侵袭
[中图法分类号] R394.3; R73-362; R737.14 [文献标志码] A

Effect of CRE-dependent RNA interference targeting STAT3 on invasion and migration in human bladder cancer BIU-87 cells

Dang Weiqi, Tang Hao, Cao Hong, Wang Lin, Chen Tingmei (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of CRE-dependent RNA interference targeting STAT3 on the invasion and migration of human bladder cancer BIU-87 cells. **Methods** RNA interfering vectors pSico was used to construct CRE-dependent shRNA expression plasmids targeting STAT3, and pLVX-CRE was used as an expression vector of CRE. BIU-87 cells were divided into 4 groups and were transfected with pSico-shNeg, pSico-shNeg/CRE, pSico-shSTAT3 and pSico-shSTAT3/CRE, respectively. RT-PCR and Western blot analysis were carried out to assess the efficiency of RNA interference. The abilities of invasion and migration of BIU-87 cells after CRE-dependent RNA interference of STAT3 were detected by Transwell chamber assay and wound-healing assay. **Results** Restriction analysis and DNA sequencing proved that the recombinant plasmid pSico-shSTAT3 was constructed successfully. CRE-dependent green fluorescent cells were detected after the transfection. The shRNA against STAT3 significantly inhibited STAT3 mRNA expression, and CRE and shSTAT3 transfection down-regulated the expression levels of STAT3 in BIU87 cells significantly ($P<0.05$). The number of migrating cells were significantly less in the pSico-shSTAT3/CRE group (42.00±3.00) than in the pSico-shNeg (203.33±12.42), pSico-shNeg/CRE (196.33±11.85) and pSico-shSTAT3 (201.00±16.64) groups ($P<0.01$). **Conclusion** RNA interference of STAT3 mediated by CRE-dependent shRNA expression plasmid can down-regulate intracellular STAT3 signal level and reduce the abilities of invasion and migration of BIU-87 cells.

[**Key words**] STAT3; RNA interference; BIU-87 cell; CRE; invasion

Supported by the General Program National Natural Science Foundation of China (30971131). Corresponding author: Chen Tingmei, Tel: 86-23-68485555, E-mail: chentingmei@sohu.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971131)
[通信作者] 陈婷梅,电话:(023)68485555,E-mail:chentingmei@sohu.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1739.012.html(2012-12-19)

双链 RNA(dsRNA)导入细胞中会引起同源 mRNA 的降解,其相应的基因受到抑制的现象称为 RNA 干涉(RNA interference, RNAi),又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。RNAi 技术近年来广泛应用于肿瘤的体内外实验研究,并逐渐应用于临床[1-2]。CRE/loxP 定位重组系统是指在 CRE 重组酶的介导下,两个邻近的 Loxp 位点序列发生交换重组。这为基因靶位操作创造了有利条件,被广泛应用于建立基因敲除模型[3]。能有效发挥调控作用的 pSico-shRNA 表达载体即利用该原理构建,在 CRE 存在时通过重组启动 shRNA 的表达。信号转导及转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription,STAT3)是转录信号传导子与激活子家族中的重要成员,是多种致癌信号通路的汇聚点。近年研究[4-5]发现,STAT3 在肿瘤细胞中常持续激活和过表达,其异常活化与肿瘤细胞转化、增殖和侵袭转移密切相关。本实验拟利用 pSico 构建受 CRE 重组调控的干扰载体 pSico-shSTAT3,以 pLVX-CRE 作为 CRE 蛋白的表达载体,分别从基因和蛋白水平检测其受控干扰效率,并进一步证实 STAT3 下调可降低 BIU-87 细胞侵袭转移,同时也充分验证了可调控 RNA 干扰载体的实用性,为进一步拓展其应用范围奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和主要试剂

pSico 和 pLVX-CRE 质粒由四川大学生物治疗国家重点实验室周钦博士惠赠;质粒转化宿主菌大肠杆菌 DH5α 菌株和膀胱癌细胞株 BIU-87 均为本实验室保存。

T_4 DNA 连接酶、DNA 标准、RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶(*Xho* Ⅰ、*Hpa* Ⅰ、*Sac* Ⅱ、*Not* Ⅰ)、DNA 聚合酶(Prime STAR® HS DNA Polymerase)均为 TaKaRa 公司产品;胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;转染试剂 购自 Roche 公司;DMEM 细胞培养基、胎牛血清和胰酶均购自 Gibco 公司;STAT3 鼠单克隆抗体购自 B. D 公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 Ig G 二抗以及小鼠抗 β-actin 单克隆抗体均购自中杉金桥公司;Transwell 小室购自 Milliproe 公司;基质胶购自 Sigma 公司;引物合成及测序为上海 Invitrogen 生物工程有限公司。

1.2 可调控 shRNA 干扰载体的构建及酶切鉴定

根据文献[6]报道的 STAT3 干扰序列及阴性对照 STAT3 干扰序列设计并合成表达 shRNA 的 DNA 片段。中间加入 9 个碱基(TTCAAGAGA)发夹序列;正义链模板的 5′端加 T,能与 *Hpa* Ⅰ酶切后形成的黏性末端互补,反义链模板的 5′端加 AGCT,能与 *Xho* Ⅰ酶切后形成的黏性末端互补。STAT3-shRNA 序列正义链:5′-TGCAGCAGCTGAACAACATGTTCAAGAGACATGTTGTTCAGCTGCTGCTTTTTTC-3′,反义链:5′-TCGAGAAAAAAGCAGCAGCTGAACAACATGTCTCTTGAACATGTTGTTCAGCTGCTGCA-3′;阴性对照序列正义链:5′-TGCTTCATAAGGCGCATAGCTTCAAGAGAGCTATGCGCCTTATGAAGCTTTTTTC-3′,反义链:5′-TCGAGAAAAAAGCTTCATAAGGCGCATAGCTCTCTTTGAAGCTATGCGCCTTATGAAGCA-3′。将合成好的引物退火形成双链,用 *Xho* Ⅰ和 *Hpa* Ⅰ双酶切 pSico 载体,电泳回收线性载体,在 T_4 DNA 连接酶的作用下与 shRNA 连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,筛选阳性克隆,提取质粒,双酶切鉴定,阳性质粒送测序,测序正确的重组质粒命名为 pSico-shSTAT3。

1.3 分组及转染

将对数生长期的 BIU-87 细胞按每孔 5×10^4 个分 4 组接种于 24 孔板上,其中两组于 24 h 后用转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagen 转染质粒 pLVX-CRE,方法参见说明书。24 h 后分别转染干扰质粒。在倒置荧光显微镜下观察转染后 24、72 h 的荧光表达,判断 CRE-LoxP 重组情况,72 h 后检测其基因及蛋白水平的表达情况。

1.4 RT-PCR 检测 pSico 载体的干扰效果

提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 检测。反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s,70 ℃ 50 s,共 30 个循环;72 ℃再延伸 10 min。STAT3 上游引物:5′-AGAGAAGCAGCAGATGTTGGAGCA-3′,下游引物:5′-ATCCTGCATGTCTCCTTGGCTCTT-3′,扩增片段为 190 bp;内参 β-actin 上游引物:5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′,下游引物:5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′,扩增片段为 290 bp。结果用 Quantity One4.6.2 分析软件进行分析。

1.5 Western blot 检测 pSico 载体的干扰效果

提取总蛋白,取 50 μg 总蛋白行 10% SDS-PAGE 分离,电转至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 4 ℃封闭过夜;4 ℃ 一抗(Mouse Anti STAT3:1∶1 000)孵育过夜,TBST 洗涤 2 次,TBS 洗涤 1 次;室温二抗孵育 2 h(兔抗鼠 IgG:1∶1 000),TBST 洗膜 3 次;滴加等体积混合的 ECL 化学发光试剂 AB 液,暗室静置 2 min,Bio-Rad 凝胶成像系统进行图像采集,使用 Quantity One 4.6.2 软件分析条带灰度值,同时设置 β-actin 为内参对照。

1.6 侵袭实验

将 4 组细胞消化后,用无血清 DMEM 调整细胞浓度为 5×10^4/mL。Matrigel 胶按 50 μL/孔均匀铺于 Transwell 小室中,再将小室放入每孔加有 500 μL 含 10% 胎牛血清 DMEM 的 24 孔板中,每个小室加入各组细胞悬液 200 μL,37 ℃、5% CO_2 孵育 18 h。结晶紫染色,于正置显微镜下观察小室滤膜底膜下室侧附着的细胞。选取 3 个视野(×200),计数每一视野内穿过膜的细胞数目。

1.7 统计学分析

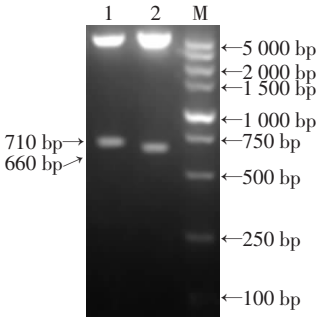
利用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒双酶切鉴定

重组质粒 pSico-shSTAT3 经 *Sac* Ⅱ和 *Not* Ⅰ双酶切及 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,如图 1,重组载体释放的片段(710 bp)比空载体释放的片段(660 bp)大 50 bp,与 shRNA 片段长度相符,并

且测序结果与设计序列完全相同。

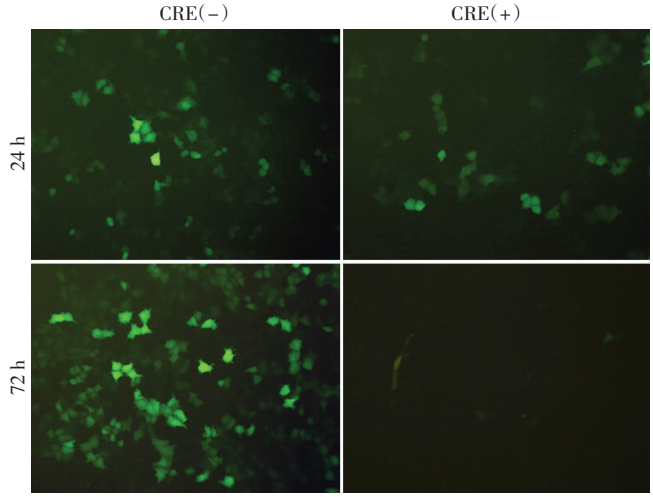


1:双酶切重组质粒 pSico-shSTAT3;2:双酶切空载体 pSico;M:DNA 标准(DL5000)

图1 重组质粒 pSico-shSTAT3 的双酶切鉴定

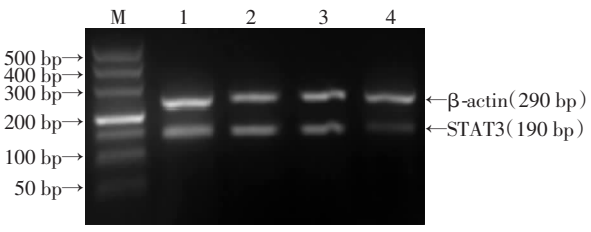
2.2 pLVX-CRE 对 pSico-STAT3-shRNA 干扰作用调控

CMV-EGFP 表达盒存在于 pSico 质粒载体上的 1 对 Loxp 位点之间,因此可以根据细胞表达荧光情况判断 CRE-Loxp 重组效果。倒置荧光显微镜下观察细胞转染后 24 h 及 72 h 荧光表达情况,可见经 CRE 重组后的 72 h 细胞荧光表达明显降低(图2)。RT-PCR 结果表明,STAT3 的表达在干扰之后有显著降低,且干扰效应受 CRE 调控(图3)。Western blot 结果显示,当 CRE 不存在时,pSico-shSTAT3 实验组与 pSico-shNeg 组比较,STAT3 的表达无显著差异($P>0.05$);当存在 CRE 时,pSico-shSTAT3 组 STAT3 相对表达量下降为 pSico-shNeg 组的(43.0±4.2)%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图4。



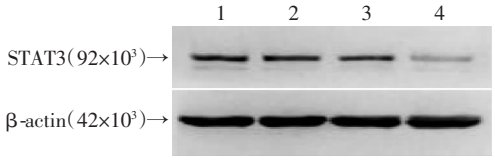
CRE(+):转染 pLVX-CRE 的细胞;CRE(−):不转染 pLVX-CRE 的细胞

图2 倒置荧光显微镜观察 pLVX-CRE 对 pSico-shSTAT3 质粒重组的能力



M:标准;1:转染 pSico-shNeg 组;2:转染 pSico-shNeg/CRE 组;3:转染 pSico-shSTAT3 组;4:转染 pSico-shSTAT3/CRE 组

图3 RT-PCR 检测 pSico-shSTAT3 介导的 RNA 干扰效果

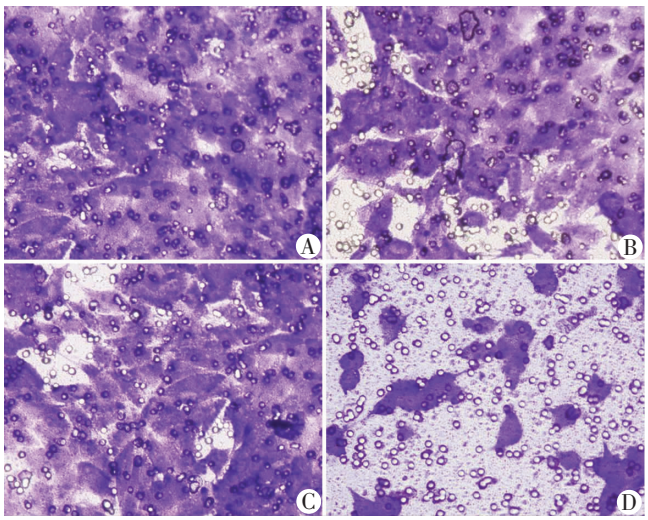


1:转染 pSico-shNeg 组;2:转染 pSico-shNeg/CRE 组;3:转染 pSico-shSTAT3 组;4:转染 pSico-shSTAT3/CRE 组

图4 Western blot 检测 pSico-shSTAT3 介导的 RNA 干扰效果

2.3 pSico 载体系统能有效地阻断 STAT3 途径并引起细胞体外侵袭减弱

Transwell 细胞侵袭试验结果显示,转染 pSico-shNeg 组、pSico-shNeg/CRE 组 、pSico-shSTAT3 组的 BIU87 细胞数分别是(203.33 ± 12.42)、(196.33 ± 11.85)/视野和(201.00 ± 16.64)/视野,且各组间差异无统计学意义($P>0.05$);而转染 pSico-shSTAT3 /CRE 组的细胞数是(42.00 ± 3.00),较其他 3 组显著降低($P<0.01$)。见图5。



A:转染 pSico-shNeg 组;B:转染 pSico-shNeg/CRE 组;C:转染 pSico-shSTAT3 组;D:转染 pSico-shSTAT3/CRE 组

图5 Transwell 检测 pSico-shSTAT3 介导的 RNA 干扰引起的细胞侵袭的改变 (结晶紫染色 ×200)

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤形成的重要环节,也是其复发和死亡的主要原因。因此,探讨膀胱癌侵袭转移分子机制对膀胱癌患者的治疗和改善预后具有重大意义[7-9]。本研究利用 Transwell 侵袭实验检测转染干扰质粒的 BIU87 细胞的侵袭能力改变,结果表明,在 CRE 存在时,干扰组与阴性对照组比较,BIU87 细胞的侵袭能力明显下降,说明 STAT3 基因在膀胱癌侵袭转移中扮演着重要角色。

STAT3是STATs蛋白家族中的重要成员,当细胞外因子和炎性介质激活STAT3上游的JAK或SRC酪氨酸激酶时,STAT3被磷酸化(pSTAT3),形成二聚体,进入细胞核,参与调节多种与肿瘤细胞增殖、转化和侵袭转移密切相关的靶基因转录活性[10-12]。目前,STAT3已被定义为癌基因,组成性活化STAT3以较高水平表达于人类膀胱癌细胞中,促进细胞增殖、癌变,抑制细胞凋亡,同时促使肿瘤的浸润和转移,且与不良预后密切相关[13-14]。此外有研究[15]发现,抑制STAT3具有旁观效应(bystander effect),即仅仅抑制一种细胞的STAT3,可杀灭"旁观"的、未受此抑制效应的肿瘤细胞,因此,抑制STAT3是一种全效(multicomponent)的抗肿瘤策略。故本实验构建靶向STAT3的特异性shRNA表达载体,通过RT-PCR和Western blot检测BIU87细胞中STAT3的沉默表达量,结果显示其抑制效果明显。

近年来诸多具有调控功能的RNAi载体的发布为RNA干扰技术作为基因治疗及相关基础研究提供了更多的研究策略。通过相应的诱导机制可在特定条件下获得高效稳定的干扰效果,本实验所采用的pSico受CRE-LoxP重组酶系统调控,利用RNA聚合酶Ⅲ启动子的活性与其紧凑的结构密切相关这一特性[16],在U6启动子后引入改造过的Loxp序列,能在重组后被切除的同时保持U6启动子的活性。pSico能在CRE存在的情况下通过重组启动shRNA的表达而产生干扰效应。pSico载体本身带有慢病毒骨架结构,可用于慢病毒RNAi载体的构建及包装,从而获得稳定持续的干扰效果,这是本课题下一步的研究内容。

综上所述,本实验利用可调控的pSico干扰载体对BIU-87细胞的STAT3表达进行抑制,检测到STAT3信号激活的下调,并出现了较明显的侵袭转移减弱。对STAT3基因的进一步研究,可为临床监测膀胱癌进展和预后评估提供实验依据。

参考文献:

[1] Leachman S A, Hickerson R P, Schwartz M E, *et al*. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder [J]. Mol Ther, 2010, 18(2): 442-446.

[2] Davis M E, Zuckerman J E, Choi C H, *et al*. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles [J]. Nature, 2010, 464(7291): 1067-1070.

[3] Ghosh K, Van-Duyne G D. Cre-loxP biochemistry [J]. Methods, 2002, 28(3): 374-383.

[4] Kortylewski M, Yu H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(2): 228-233.

[5] 徐建华, 张超, 唐波, 等. JAK2/STAT3通路在表皮生长因子诱导结肠癌细胞侵袭迁移中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 638-641.

[6] Wang C G, Sun M, Zhao X J, *et al*. Effect of STAT3 siRNA-induced inhibition of STAT3 gene expression on the growth and apoptosis of lewis lung cancer cells[J]. Chin J Clin Oncol, 2006, 3(6): 392-399.

[7] Majid S, Dar A A, Saini S, *et al*. MicroRNA-1280 Inhibits Invasion and Metastasis by Targeting ROCK1 in Bladder Cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46743.

[8] Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou G I, *et al*. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer[J]. J Urol, 2012, 188(2): 615-623.

[9] Awsare N S, Martin T A, Haynes M D, *et al*. Claudin-11 decreases the invasiveness of bladder cancer cells[J]. Oncol Rep, 2011, 25(6): 1503-1509.

[10] Deng J, Liu Y, Lee H, *et al*. S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites[J]. Cancer Cell, 2012, 21(5): 642-654.

[11] Shodeinde A L, Barton B E. Potential use of STAT3 inhibitors in targeted prostate cancer therapy: future prospects[J]. Onco Targets Ther, 2012(5): 119-125.

[12] Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, *et al*. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the *in vivo* antitumor functions of adoptively transferred T cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(19):7455-7464.

[13] Ho P L, Lay E J, Jian W, *et al*. Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3135-3142.

[14] Chen C L, Cen L, Kohout J, *et al*. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival[J]. Mol Cancer, 2008(7): 78.

[15] Niu G, Shain K H, Huang M, *et al*. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3276-3280.

[16] Paule M R, White R J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases Ⅰ and Ⅲ[J]. Nucleic Acids Res,2000,28(6): 1283-1298.

(**收稿**:2012-09-31;**修回**:2012-11-09)

(编辑 汪勤俭)