基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1506-03

RNAi 沉默 STAT3 基因对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响

韩建秋[1],吴维光[2],葛红雨[2],王勇梅[2]

(1. 华北煤炭医学院研究生部,唐山 063000;2. 武警医学院附属医院妇产科,天津 300162)

【摘 要】目的:探讨应用 RNAi 技术沉默信号转导与激活因子 3(Signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)基因对人卵巢癌 SKOV3 细胞的影响。方法:根据 siRNA(Small interference RNA,siRNA)设计原则,结合 pSilencer2.1-U6-neo 质粒特点,针对 STAT3 基因设计并合成 2 条寡聚 DNA 片段,退火后克隆入 pSilencer2.1-U6-neo 质粒,应用脂质体将重组质粒转染 SKOV3 细胞。通过 RT-PCR 及 Western blot 检测 STAT3 基因不同水平的表达,采用 MTT 实验、流式细胞仪检测细胞增殖、凋亡的变化。结果:目的 siRNA 实验组细胞 STAT3 蛋白及 mRNA 表达水平均明显下降,细胞增殖能力显著降低,而细胞凋亡率则显著升高。结论:应用 RNAi 技术沉默 STAT3 基因可以降低卵巢癌 SKOV3 细胞 STAT3 的表达,进而抑制细胞的生长、增殖及诱导细胞的凋亡。

【关键词】卵巢癌;STAT3 基因;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R363.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-01

Effects of RNA interference targeting STAT3 gene on proliferation and apoptosis of SKOV3 cells

HAN Jian-qiu, et al

(*Department of Postgraduate, North China Coal Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition of SKOV3 cell by applying RNAi technique to silence signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) gene. *Methods*: shRNA templates was designed on the basis of STAT3 gene sequence and was cloned into pSilencer2.1-U6-neo vector. The resultant plasmid was transfected into SKOV3 cells with Lipofectamine 2000. The STAT3 protein and mRNA were detected by Western blot and RT-PCR, respectively. The cellular growth activity was assayed by MTT, and the apoptosis was tested by flow cytometry. *Results*: STAT3 protein and mRNA expression in target siRNA group were decreased, respectively. In target siRNA group, cell proliferation was inhibited obviously and apoptosis rate increased significantly. *Conclusion*: Silencing STAT3 gene by the RNAi technology can decrease the expression of STAT3 gene, suppress the growth and proliferation of SKOV3 cell, and induce apoptosis of SKOV3 cell.

【Key words】Ovarian cancer; STAT3 gene; Proliferation; Apoptosis

信号转导及转录活化因子(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,在细胞核内与特异性的 DNA 启动子结合,调节相关基因的表达[1]。STAT3 是一种关键的信号转导与转录激活蛋白,在肿瘤的发生和发展中起重要作用[2],已被确认为是癌基因。近年来研究发现,STAT3 信号传导通路在多种肿瘤组织中均有过度激活,影响肿瘤的生长、凋亡、侵袭及转移等[3]。因此如何抑制 STAT3 是异常表达 STAT3 肿瘤治疗的关键所在[1]。本研究利用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术,以 pSlinlencer2.1-U6-neo 载体中的 U6 为启动子,STAT3 为靶基因,构建 STAT3-siRNA 表达载体,转染人卵巢癌 SKOV3 细胞。观察其对 SKOV3 细胞中 STAT3 表达的抑制效应,并进一步观察其对 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响,探讨其作为治疗卵巢癌新的基因靶位的可行性。

作者介绍:韩建秋(1982-),女,硕士,
研究方向:妇科恶性肿瘤研究。

通讯作者:吴维光,男,副教授,E-mail:weiguangwu02@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pSilencer2.1-U6-neo 购自 Ambion 公司;DH5α 购自清华天为时代;凝胶回收试剂盒,质粒大提取试剂盒,质粒小提取试剂盒购自 Qiagen 公司;SKOV3 细胞购自武汉典型

生物保藏中心；各种工具酶为大连 Takara 生物公司产品；STAT3 单克隆抗体购自 Santa crus 公司；FITC-annexin V 凋亡试剂盒，cDNA 逆转录试剂盒，Lipofectimane 2000 脂质体转染试剂盒均购自 Invitrogen 公司；PCR 引物和 shRNA 表达载体插入片段的寡核苷酸链由北京奥科生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 STAT3 特异性 shRNA 转录模板的设计及合成 从 GeneBank 获取 STAT3 人全长 cDNA 序列(NO.003150)，参考相关文献[4]，根据 siRNA 设计的技术要求，寻找干扰 RNA 的靶序列。设计的寡核苷酸序列 5'端和 3'端分别引入两个酶切位点，加入 9 bp 的 loop 环结构，3'末端加有转录终止信号 TTTTT。采用国际通用的与所有基因均无同源性序列的 non-target siRNA 为阴性对照。合成一对互补并编码短发状 siRNA 的寡核苷酸链序列如下：STAT3 正义 5'-GATCCATCCAGAGTCACTGGAAGTTTCAAGAGAAGTTCCAGTGACTCTGGATTTTTTTGTCGACA-3'，反义 5'-AGCTTGTCGACAAAAAAATCCAGAGTCACTGG AACTTCTCTTGAAAGTTCCAGT-GACTCTGGATG- 3'。阴性对照 正义 5'-GATCCTTCTCCGAACGTCTCACGTTTCAAGAGAACGTGCACGTTCGGAGAATTTTTTGTCGACA-3'，反义 5'-AGCTTGTCGACAAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCGGAGAAG-3'。

1.2.2 重组质粒的构建和瞬时转染 合成的两条互补寡核苷酸链在退火缓冲液作用下退火，用 T4 连接酶连接于经双酶切(*Hind* Ⅲ、*BamH* Ⅰ)的质粒 pSilencer2.1-U6-neo 中，连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α，随机挑取菌落，接种于 LB 培养液中，振荡过夜，碱裂解法快速抽提质粒。取对数生长期的 SKOV3 细胞接种于 6 孔板，密度达 80%时，用 Lipofectamine^{2000} 转染重组质粒，转染 6 h 以后更换含 200 mg/L FBS 培养液继续培养 48 h。500 μg/ml 的 G418 筛选 3 周，收集 G418 抗性细胞。无干预措施的 SKOV3 正常对照组简称 SKOV3；转染空质粒的空载体对照组简称 SKOV3^{VEC}；转染 pSilencer2.1-U6-neo-nonspecific 质粒的非特异 siRNA 对照组简称 SKOV3^{NS}；转染 pSilencer2.1-U6-neo-STAT3 质粒的目的 siRNA 实验组简称 SKOV3^{siRNA}。

1.2.3 RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 表达 提取 RNA 所用的所有塑料制品须用 0.1%DEPC 水溶液浸泡过夜，高压灭菌。使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，参照 Invitrogen 公司说明使用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA，选择 GADPH 作为内参照。STAT3 引物序列为：上游 5'-CCCATACCTGAAGACAAGTTTATC-3'，下游 5'-TGGAAATAATGGTGAAGGTGCTG-3'，合成产物为 125 bp。GADPH 引物序列为：上游 5'-CATCTTCTTTTGCGTCGCCA-3'，下游 5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG-3'，合成产物为 315 bp。PCR 循环参数为：95℃预变性 3 min，然后 95℃ 30 s、52℃ 45 s、72℃ 45 s，35 个循环后再 72℃延伸 7 min。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，UVP 凝胶成像系统扫描电泳结果。

1.2.4 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达 收集细胞，裂解缓冲液提取细胞总蛋白，定量后(Bradford)，取 20 μg 上样，进行 SDS-PAGE 电泳，分离后电转移至硝酸纤维素膜上，封闭后，加入 STAT3(1:400)单克隆抗体及 HRP 标记的二抗，ECL 发光压片显色，以 β-actin 蛋白作为内参照，用 LabWork 3.0 UVP 软件进行条带的光密度积分值分析。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖能力 血清培养基调制细胞浓度为 5×10^5 个/ml 接种于 96 孔培养板，每组细胞设 3 个平行孔。细胞贴壁后，加入无血清培养液 12 h，使细胞同步化。更换含 100 mg/L FBS 培养液继续培养 72 h。各孔加入 20 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT，孵育 4 h，弃培养液，每孔加入 150 μl DMSO，用酶标仪测定 490 nm 波长处每孔的吸光度(A)值。细胞增殖率 =(实验组平均 A 值)/(对照组平均 A 值)×100%。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率 实验操作按照 FITC-annexin V 凋亡试剂盒说明书进行。将低氧培养后细胞用 PBS 洗 1 次，在 0.5 ml 结合缓冲液中加入 6 μl FITC-annexin V 及 20 μl 的 PI，室温下避光孵育 15 min，上流式细胞仪进行分析，每份样品检测 1×10^4 个细胞。

1.2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS11.5 统计软件分析，多组间差异采用单因素方差分析，两组间比较采用 *LSD* 法。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 STAT3 mRNA 表达

SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 和 SKOV3^{siRNA} 组细胞 STAT3 mRNA PCR 检测见图 1，各组细胞 STAT3 mRNA 检测结果分别为：0.42%±0.04%、0.47%±0.05%、0.44%±0.04%和0.27%±0.04%。单因素方差分析 F=13.041，P=0.002。SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 的 STAT3 mRNA 水平 3 组之间比较，差异无统计学意义，P 值分别为 0.190、0.582、0.415；而 SKOV3^{siRNA} 组 STAT3 mRNA 水平与 3 对照组比较，显著降低，差异均有统计学意义，P 值分别为 0.003、0.000、0.001。

2.2 免疫印迹检测 STAT3 蛋白表达

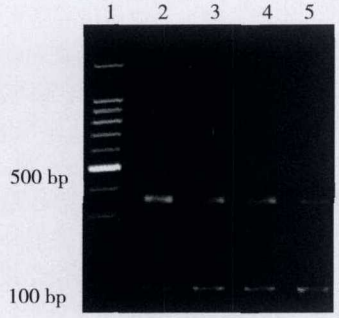
SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 和 SKOV3^{siRNA} 组细胞 STAT3 蛋白检测见图 2，各组细胞 STAT3 蛋白检测结果分别为：0.49%±0.06%、0.52%±0.06%、0.54%±0.05%和 0.32%±0.05%。单因素方差分析 F=9.926，P=0.005。SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 的 STAT3 蛋白表达 3 组之间比较，差异无统计学意义，P 值分别为 0.525、0.300、0.669；而 SKOV3^{siRNA} 组 STAT3 表达水平与 3 对照组比较，显著降低，差异均有统计学意义，P 值分别为 0.005、0.002、0.001。

2.3 MTT 法检测细胞增殖变化

SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 和 SKOV3^{siRNA} 组细胞增殖率分别为：4.06%±0.42%、4.15%±0.51%、4.23%±0.54%和 3.01%±0.47%。单因素方差分析 F=4.145，P=0.048。结果显示 SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 的增殖率 3 组之间比较，差异无统计学意义，P 值分别为 0.827、0.680、0.846；而 SKOV3^{siRNA} 组增殖率与 3 对照组比较，显著降低，差异均有统计学意义，P 值分别为 0.030、0.021、0.015。

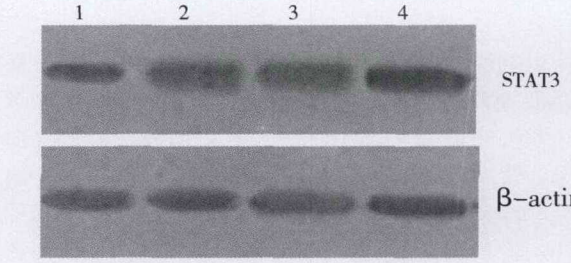
2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 和 SKOV3^{siRNA} 组细胞凋亡检测见图 3，各组细胞凋亡率分别为：11.01%±1.65%、11.29%±1.72%、10.59%±1.64%和 17.32%±1.75%。单因素方差分析 F=13.194，P=0.002。结果显示 SKOV3、SKOV3^{VEC}、SKOV3^{NS} 凋亡率 3 组之间比较，差异无统计学意义，P 值分别为0.844、0.769、0.626；而 SKOV3^{siRNA} 组凋亡率与 3 对照组比较，显著增加，差异均有统计学意义，P 值分别为 0.002、0.002、0.001。



1. Marker；2. SKOV3^{siRNA}；3. SKOV3；4. SKOV3^{VEC}；5. SKOV3^{NS}

图 1 细胞 STAT3 mRNA PCR 检测图



1. SKOV3^{siRNA}；2. SKOV3；3. SKOV3^{VEC}；4. SKOV3^{NS}

图 2 细胞 STAT3 蛋白 Western 印迹结果

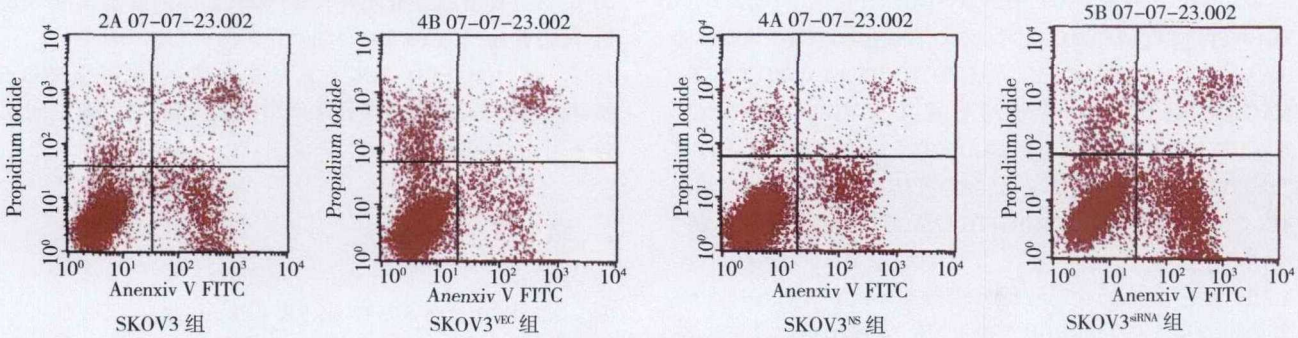


图 3 流式细胞仪检测 SKOV3 细胞调亡图

3 讨 论

卵巢癌作为女性生殖系统死亡率居首位的恶性肿瘤，其治疗效果在近数十年中仍不理想[5]，5 年存活率徘徊在 25%~30%。STAT3 基因是近年来发现的凋亡抑制基因，具有抑制凋亡和参与细胞周期调控的双重功能。STAT3 广泛表达于不同类型的细胞和组织中，其信号传导通路与肿瘤增殖分化、细胞凋亡、新血管生成和免疫逃避密切相关[6]。该通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶性转化。目前，已在乳腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中发现 STAT3 基因的过度表达。如果能够设法阻断癌细胞内 STAT3 基因的表达，定会大大减弱癌细胞增殖能力同时减弱凋亡抑制。

RNAi 现象是由与靶基因序列同源的双链 RNA（Double-stranded RNA，dsRNA）引发的体内序列特异性基因转录后的基因沉默过程[7]，能触发某种转录后监控程序，导致特定 mRNA 单链的降解。RNAi 技术具有特异、高效、简便快捷和 siRNA 可在细胞间转移等特点。它是通过核酸酶将双链 RNA（dsRNA）切割成 21~25 nt 的 siRNA，由 siRNA 介导识别并靶向切割同源性 mRNA 分子而实现。RNAi 机制可作为真核生物的基因组免疫系统，抑制外源和内源有害基因的表达。应用 RNAi 技术可以特异性的抑制癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达，从而使这类基因保持静默或休眠状态。有研究报道，应用 RNAi 技术沉默 STAT3 基因，能够抑制某些癌细胞增殖功能和诱导凋亡[8-11]。汪光蓉等[12]研究发现，RNAi 能特异，高效的抑制小鼠体内 HBV 的复制和表达。Song等[13]利用 RNAi 技术在病毒性肝炎的治疗方面也取得了很好的效果。目前有体外化学合成、体外转录（应用 T7 启动子）和应用 DNA 载体体内转录 3 种方式生成 siRNA。RNAi 技术已经成为一种功能强大的、选择性抑制特异基因表达的工具，它为肿瘤的基因治疗开辟了新的途径[14]。

本研究成功构建针对 STAT3 基因的短发夹状 RNA（Short hairpin RNA，shRNA）表达载体，脂质体介导转染 SKOV3 细胞。*Western blot* 显示人卵巢癌 SKOV3 细胞中 STAT3 蛋白表达被明显抑制；RT-PCR 检测结果显示 STAT3 mRNA 的表达水平明显下降；MTT 和流式细胞仪检测结果显示，SKOV3 细胞的增殖率明显减慢而凋亡比例显著升高。本实验初步证实了以 STAT3 为目的基因，通过 RNAi 技术可特异性地抑制其在人卵巢癌 SKOV3 细胞中的过度表达及诱导肿瘤细胞凋亡，有可能成为未来卵巢癌治疗的潜在性靶点。但是，将其真正应用于临床尚待时日，相信随着 RNAi 技术的日益成熟，它将成为卵巢癌基因治疗的强大武器。

参 考 文 献

[1] Haura E B，Turkson J，Jove R. Mechanisms of disease: insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1509-04

内质网应激在高脂血症大鼠心肌细胞凋亡中的作用

周 平[1],张 彬[1],翟福利[1],李法琦[1],常晓东[2],甘 华[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016;2.重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究内质网应激是否在高脂血症大鼠诱导心肌细胞凋亡中起作用。方法:通过建立高脂血症大鼠模型,全自动化生化仪检测血清甘油三酯(Triglycercide,TG)及胆固醇(Cholesterol,TC)水平;HE 染色观察心肌组织的病理学变化;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;免疫组化法及 RT-PCR 技术检测心肌细胞内质网应激(Endoplasmic reticulum stress,ERS)信号通路分子 GRP78 的表达变化。结果:喂养 12 周时模型组大鼠血清 TC、TG 含量明显高于对照组($P<0.01$);大鼠模型组较正常组心肌组织排列紊乱、边界不清、心肌纤维断裂、部分细胞核溶解消失;模型组大鼠心肌细胞凋亡率明显高于正常组($P<0.05$);大鼠心肌 GRP78mRNA 及蛋白的表达量,模型组均较对照组明显升高($P<0.05$)。结论:ERS 途径可能在高脂血症诱导心肌细胞凋亡中起到重要作用。

【关键词】高脂血症;内质网应激;心肌细胞;凋亡;

【中国图书分类法分类号】R541.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-08

Effect of endoplasmic reticulum stress on apoptosis of cardiomyocyte in hyperlipidemia rats

ZHOU Ping, et al

(*Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis of cardiomyocyte in hyperlipidemia rats. *Methods*: Rat model of established with fatty dieting. After twelve weaks, the serum triglycerides (TG) and cholesterol (TC) were oberserved by completely automatic biochemistry meter; The pathological changes of myocardial tissue were detected by HE staining; The apoptosis of cardiomyocyte were tested by TUNEL. The expression of endoplasmic reticulum stress associated molecular glucose regulated protein 78 in myocardial tissue were tested by immunohistochemistry and RT-PCR. *Results*: The levels

作者介绍:周 平(1971-),女,讲师,硕士,
研究方向:老年心血管基础与临床研究。

通讯作者:李法琦,男,教授,E-mail:faqili_2006@yahoo.com.cn。

cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005, 2(6): 315-324.

[2] Ren W, Duan Y, Yang Y, et al. Down-regulation of Stat3 induces apoptosis of human glioma cell: a potential method to treat brain cancer[J]. Neurol Res, 2008, 30(3): 297-301.

[3] 杨 光,裘正军,张 放,等.激活和抑制 Stat3 信号途径对胰腺癌细胞侵袭能力的影响[J].肿瘤,2009,29(7):645-649.

[4] 吴 健,王方金,何蕴韶.STAT3 特异性小干扰 RNA 表达载体的构建及其对 STAT3 表达的抑制[J].肿瘤杂志,2005,25(1):37-40.

[5] Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(4): 1065-1072.

[6] Abou-Ghazal M, Yang D S, Qiao W, et al. The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas[J]. Clin. Cancer Res, 2008, 14(24): 8228-8235.

[7] Chen X, Lin J, Kanekura T, et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma[J]. Cancer Res, 2006, 66(23): 11323-11330.

[8] 李光辉,陈正堂,胡义德,等.Lentivirus 介导 RNAi 抑制人胶质瘤干细胞 STAT3 基因生物学效应观察[J].中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(6):498-501.

[9] Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, et al. Stat3 as a molecular target in RNA interference-based treatment of oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2008, 20(4): 873-878.

[10] Kunigal S, Lakka S S, Sodadasu P K, et al. Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1209-1220.

[11] Fan Y, Zhang Y L, Wu Y, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3): 428-434.

[12] 汪光蓉,张国元,杨 健,等.小干扰 RNA(siRNA)对小鼠乙型肝炎病毒复制和表达影响的实验研究[J].中国现代医学杂志,2008,18(2):157-160.

[13] Song E, Lee S K, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347-351.

[14] Fuchs U, Borkhardt A. The application of siRNA technology to cancer biology discovery[J]. Adv Cancer Res, 2007, 96: 75-102.

(责任编辑:关蕴良)