技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0881-03

# RNA 干扰抑制 STAT6 基因表达的初步研究

刘丹丹,符 州,田代印,杨 琴,王莉佳
(重庆医科大学附属儿童医院呼吸科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建针对信号转导子和转录激活子 6(Singnal transducers and activators of transcription 6,STAT6)基因的干扰质粒,并观察其对 STAT6 蛋白表达的抑制效果。方法:将构建的短发夹干扰质粒(Short hairpin RNA,shRNA)表达载体,与合成的 pIRES2-EGFP-STAT6 基因表达质粒共同转染 COS7 细胞,荧光显微镜下观察干扰效果,并利用 Western blot 观察蛋白表达的变化。结果:将 pIRES2-EGFP-STAT6 重组载体转染 COS7 细胞后,结果显示 STAT6 蛋白可以在细胞中高水平表达;与阴性对照组相比,STAT6 shRNA-1 干扰组和 STAT6 shRNA-2 干扰组 STAT6 蛋白表达水平分别是 23.1%和 9.6%。结论:成功构建并筛选到具有显著干扰效率的 STAT6 干扰质粒,为哮喘的基因治疗研究奠定了基础。

【关键词】STAT6 基因;STAT6 蛋白;RNA 干扰 (RNA interference,RNAi);shRNA;哮喘
【中国图书分类法分类号】R392.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-07

# The study on gene silence of STAT6 gene by RNA interference

*LIU Dan-dan, et al*
(*Department of Respiratory Diseases, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant plasmid expressing STAT6 shRNA and observe the effects of RNAi suppressed STAT6 gene expression. *Methods*: shRNA and pIRES2-EGFP-STAT6 plasmid were cotransfected into COS7 cell, to investigate the suppression effect of shRNA on STAT6 under fluorescent microscope . This effect was confirmed by Western blot at protein expression level. *Results*: STAT6 protein exhibitited high expression in COS7 cells after transfecting pIRES2-EGFP-STAT6 plasmid into COS7 cells alone ; compare with the negative group, the level of the STAT6 protein in the two shRNAs group were 23.1% and 9.6%. *Conclusion*: STAT6 shRNA were successfully constructed.This technique deserves further study as a potential therapentic tool for asthma .

【Key words】STAT6 gene; STAT6 protein; RNAi; shRNA; Asthma

哮喘是以气道高反应性和慢性气道炎症为特征的变态反应性疾病。Th1 功能下降,Th2 功能亢进是目前比较公认的哮喘免疫学发病机制。最近研究表明 STAT6 通过 JAK-STAT 信号转导途径介导细胞因子 IL-4、IL-13 诱导的基因表达,在 Th2 分化中起至关重要的作用,并参与促进抗体 Ig-E 的产生和转换[1]。由于 STAT6 基因特异性调控 Th 细胞向 Th2 分化,因此我们选择 STAT6 基因作为哮喘治疗的候选基因。目前对 STAT6 基因尚未报道获得高效且特异性的 SiRNA 序列,本研究通过构建并筛选 STAT6 干扰质粒,为哮喘的治疗和预防研究提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pIRES2-EGFP-STAT6 真核表达质粒由本课题组之前构建,大肠埃希菌 DH5a 由重庆医科大学儿研所免疫室提供,COS7 细胞购自昆明细胞库,pGenesil-3 质粒表达载体购自武汉晶赛公司。质粒大抽试剂盒购自天根公司,Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,蛋白提取试剂盒购自凯基公司,ECL 检测液购自凯基公司,抗 STAT6 多克隆抗体购自 cell signaling 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及转染 COS7 细胞在含 10%血清的 DMEM 培养液,37℃,5%$CO_2$ 饱和湿度环境条件下连续培养。转染前 1 d,将处于对数生长期的细胞传代,接种于 T25 培养瓶,培养过夜,次日进行转染。具体操作方法按照说明书进行。

1.2.2 pIRES2-EGFP -STAT6 真核表达质粒在 COS7 细胞中的表达 测序鉴定确证后将构建的 pIRES2-EGFP-STAT6 质粒进行脂质体转染 COS7 细胞,转染后 24、48、72 h 利用荧光显微镜观察镜下绿色荧光蛋白的表达情况。72 h 后收集细胞提取蛋白,Western Blot 检测 STAT6 蛋白的表达。

1.2.3 shRNA 的设计和构建 根据 siRNA 的设计原则和小鼠 STAT6 编码序列(NM-009284),利用 ambion 公司提供的

作者介绍:刘丹丹(1983- ),女,硕士,研究方向:哮喘发病机制。
通讯作者:符 州,男,教授,E-mail:Fu_zhou79@yahoo.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672268);重庆市卫生局课题(编号:052159)。

siRNA 设计软件选择 GC 含量在 30% ~ 50% 之间的 siRNA 编码序列，同时进行 blast 同源分析，筛选了两条 siRNA 序列并设计一条阴性对照（HK）。筛选到的靶序列分别为 AACATGGCCAGTGCCCTACTT 和 AAGGGAAACAGCATCTTGCCG。阴性对照序列为 GACTTCATAAGGCGCATGC。shRNA 的插入片段结构为：正义链(19nt)- 环(9nt)- 反义链(19nt)-6 个连续 T，序列两端设计有 *Bam H* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 酶切位点。shRNA-1 的正义链：5'-GATCCGCATGGCCAGTGCCCTACTTCTATGGACAAAGTAGGGCACTGGCCATGTTTTTTGTCGACA-3' 反义链：5'-AGCTTGTCGACAAAAAACATGGCCAGTGCCCTACTTTGTCCCATAGAAGTAGGGCACTGGCCATGCG-3'；shRNA-2 的正义链：5'-GATCCGGGAAACAGCATCTT GCCGTTCAAGACGCGGCAAGATGCTGTTTCCCTTTTTTGTCGACA-3 反义链：5'-AGCTTGTCGACAAAAAAGGGAAACAGCATCTTGCCGCGTCTTGAACGGCAAGATGCTG TTTCCCG -3'。将合成的编码 shRNA 的 DNA 模板的两条单链退火，得到 shRNA 的 DNA 双链模板与经 *Bam H* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 双酶切的 PGenesil-3-U6 空载体连接，转入大肠埃希菌扩增，小量抽提质粒，酶切并测序鉴定，选择具有预期插入序列的载体大量纯化重组质粒，保存备用。

1.2.4 pIRES2-EGFP-STAT6 与 shRNA 共转染 COS7 细胞 将无关 shRNA、STAT6 shRNA-1、STAT6 shRNA-2 分别与质粒 pIRES2-EGFP -STAT6 进行脂质体共转染 COS7 细胞。细胞分组：(1)空白对照组(未转染质粒，Con-A)；(2)正常对照组（仅转染 pIRES2-EGFP-STAT6，Con-B)；(3) 阴性对照组(转染无关 shRNA 和 pIRES2-EGFP-STAT6，Con-C)；(4)干扰组 -1（转染 STAT6 shRNA-1 和 pIRES2-EGFP- STAT6)；(5) 干扰组 -2（转染 STAT6 shRNA-2 和 pIRES2-EGFP-STAT6)。转染后 72 h 用荧光显微镜观察干扰效果。

1.2.5 蛋白检测 转染后 72 h 收集细胞，提取蛋白，以 β -actin 为内参照，常规进行 western blot 检测。方法简要如下：提取各实验组细胞总蛋白，蛋白定量后，用 10%SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，分离的蛋白电泳转移至 PVDF 膜后，用 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 ~ 2 h，加入 1:1 000 稀释的 STAT6 抗体，4℃孵育过夜，以 1:5 000 稀释的酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG)室温孵育 1 ~ 2 h，取出膜，最后进行化学发光检测。用 Quantity one 软件测出目的蛋白条带与其对应的 β -actin 条带灰度的比值。

1.2.6 统计方法 采用 SPSS13.0 软件分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 STAT6 在 COS7 细胞中的表达及鉴定

将构建的重组质粒 pIRES2-EGFP-STAT6 用脂质体转染 COS7 细胞，转染后 24、48、72 h 荧光显微镜观察，可见细胞中大量的绿色荧光点(见图 1)，并且随着时间的增加，荧光的强度也逐渐增高，说明 pIRES2-EGFP-STAT6 重组质粒可以在 COS7 细胞中成功表达。转染后 72 h 进行细胞收集，裂解细胞提取蛋白后进行 western blot 检测，蛋白电泳结果示 EGFP-STAT6 融合蛋白的相对分子质量与预测值接近相等，约为 110 kD 左右(见图 2)。该高水平表达 EGFP-STAT6 融合蛋白的体外瞬时表达系统可用于后续的 RNAi 在培养细胞中的相关研究。

### 2.2 重组质粒 shRNA 的酶切鉴定

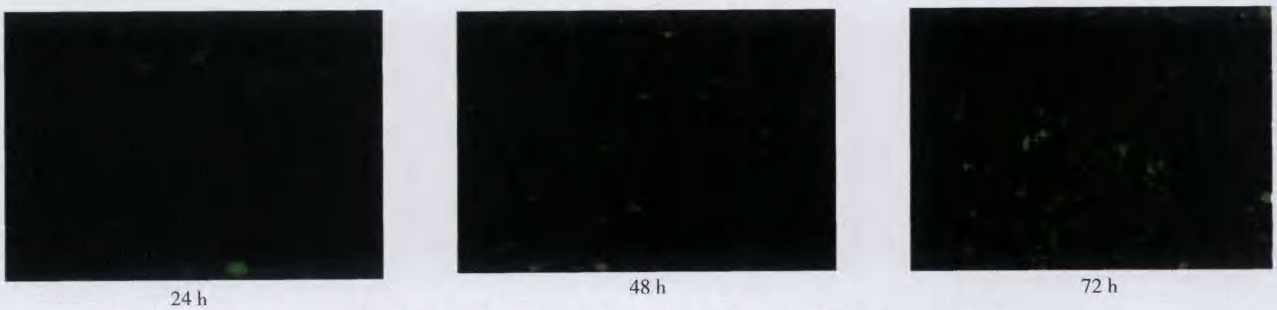
在插入的目的基因片段里，我们设计了一个 *Sal* Ⅰ 的酶切位点，插入在质粒 pGenesil-3 的 *Bam H* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ之间，如若插入正确，质粒就能被 *Sal* Ⅰ 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 小片段。经酶切鉴定分析，质粒 shRNA1、shRNA2 均符合设计要求(图 3)。

### 2.3 shRNA 对 STAT6 的体外干扰作用

将无关 shRNA、STAT6 shRNA-1、STAT6 shRNA-2 分别与质粒 pIRES2-EGFP - STAT6 进行脂质体共转染 COS7 细胞，转染后 24、48、72 h 进行荧光显微镜观察，可见空白对照组没有荧光表达；阴性对照与正常对照组的绿色荧光表达相似，且绿色荧光的表达随时间延长逐渐增加；干扰组中表达绿色荧光的细胞明显减少，且干扰组 -2 较干扰组 -1 荧光减少的更为显著。(图 4)。

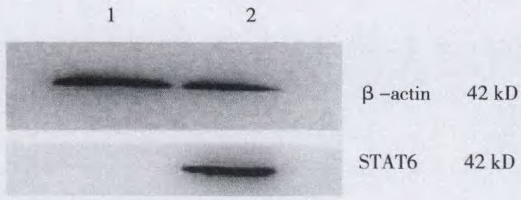
### 2.4 shRNA 对 STAT6 的体外干扰作用的鉴定

转染 72 h，收集细胞，提取细胞蛋白，检测各实验组 COS7 细胞中 STAT6 蛋白的表达水平。如图 5 所示，空白对照组未见 STAT6 蛋白的表达，而正常对照组可见 STAT6 蛋白呈高水平表达，阴性对照组的 STAT6 蛋白的表达水平与正常对照组相似。STAT6 shRNA-1 干扰组与 STAT6 shRNA-2 干扰组 STAT6 蛋白表达水平较正常对照组和阴性对照组均有明显下降，表达水平分别是阴性对照组的 23.1% 和 9.6%（均 $P<0.05$)，以 STAT6 shRNA-2 抑制 STAT6 表达效果最为显著。



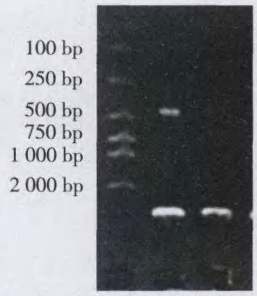
24 h　　48 h　　72 h

图 1　PIRES2-EGFP-STAT6 蛋白在 COS 7 细胞中的表达( ×40)



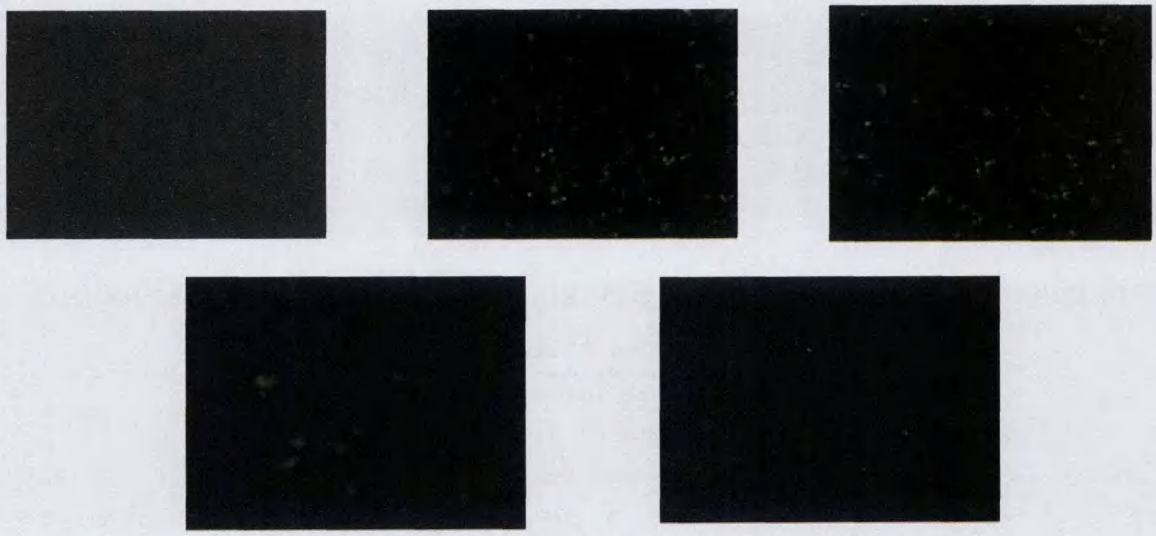

1. 未转染质粒组; 2. 转染 PIRES2-EGFP-STAT6 质粒组

**图 2 western blot 检测 STAT6 蛋白在 cos7 细胞中的表达**



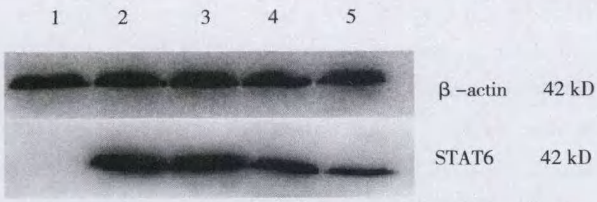

M. marker; 1. *Sal* Ⅰ酶切 STAT6 shRNA-1; 2. *Sal* Ⅰ酶切 STAT6 shRNA-2

**图 3 质粒酶切鉴定图**



A. 空白对照组; B. 正常对照组; C. 阴性对照组; D. STAT6 shRNA-1 干扰组; E. STAT6 shRNA-2 干扰组

**图 4 转染后 72 h 荧光显微镜观察 STAT6 基因的 RNAi 效果 ( ×40)**




A. 空白对照组; B. 正常对照组; C. 阴性对照组; D. STAT6 shRNA-1 干扰组; E. STAT6 shRNA-2 干扰组

**图 5 western blot 检测 shRNAs 对 STAT6 在 cos7 细胞中的干扰作用**

## 3 讨 论

在支气管哮喘中,Th2 细胞通过释放 IL-4、IL-5、IL-13 等多种细胞因子和趋化因子而促进了 Ig-E 的形成, 嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞的聚集和活化,黏液的过度分泌,气道纤维化及组织重建[2]。STAT6 调控 Th2 细胞的分化[1],参与 IL-4、IL-13 介导的信号转导。Akimoto 等将致敏的小鼠持续地暴露于卵清蛋白烟雾中,制成小鼠的气道炎症模型,用组织免疫化学分析法发现野生型小鼠支气管肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞增多, 而 STAT6-/- 的小鼠 BALF 中无嗜酸性粒细胞增多,气道炎症及反应性亦比野生型低[3]。STAT6 分布于各级支气管的上皮细胞中, 哮喘小鼠各级支气管 STAT6 蛋白表达显著高于对照组[4]。鉴于 STAT6 基因在哮喘发病机制中的重要作用,本研究选择了此目的基因作为 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)的靶位点。

本研究应用真核表达载体 PGenesil-3-U6 构建了 2 个针对 STAT6 基因的 ShRNA 干扰质粒。近年来的研究表明,具有茎环结构的小发卡 RNA(ShRNA)分子比在细胞中同时表达的 SiRNA 分子的正义链或反义链对靶基因的抑制效率要高,ShRNA 通过稳定转染的质粒载体或整合的病毒载体进行表达,能够长效的抑制基因表达,而且不引起特异性反应[5]。真核表达载体与病毒载体相比其生物相容性更好。

Western blot 检测结果表明构建的 2 个 ShRNA 干扰质粒均可以有效的抑制 STAT6 蛋白的表达,但干扰效率却不同,与荧光显微镜观察观察的结果一致。2 个干扰组 STAT6 蛋白表达水平分别是阴性对照组的 23.1% 和 9.6%(均 $P<0.05$),以 STAT6 shRNA-2 抑制 STAT6 表达效果最为显著。这可能与 RNA 干扰有严格的序列特异性有关, 往往一个碱基的差

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0884-04

# 固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中羟基积雪草苷的浓度

谭欣玮,刘颖菊,朱丽莎,高丽佳
(重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立大鼠血浆中羟基积雪草苷测定的高效液相色谱法。方法:固相萃取法对样品进行纯化处理后,选用 Welchrom-$C_{18}$ 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),水 - 乙腈(24:76)为流动相测定药物含量;流速:1.0 ml/min;紫外检测波长:225 nm;柱温:30℃;内标:葫芦素 B。结果:在此色谱条件下,羟基积雪草苷和内标葫芦素 B 的保留时间分别为 5.11 min 和 8.14 min。线性范围为 5 μg/ml ~ 1.5 mg/ml ($r$ = 0.999 8),最低检测浓度为 1 μg/ml。方法回收率在 90.21% ~ 95.65%,提取回收率在 80.65% ~ 87.04%。日内与日间精密度的 RSD 在 1.31% ~ 3.07%($n$=5)。结论:该检测方法简便可靠,选择性和重现性好,符合常规生物样品检验的要求,可用于羟基积雪草苷在大鼠体内的药代动力学研究。

【关键词】羟基积雪草苷;固相萃取;高效液相色谱法
【中国图书分类法分类号】R965.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-08

# Determination of madecassoside in SD rats plasma by solid-phase extraction RP-HPLC

*TAN Xin-wei, et al*
(*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method for madecassoside determination by solid-phase extraction RP-HPLC in SD rats plasma. *Methods*: The sample was cleaned with an Strata-X solid-phase extraction . HPLC conditions were as follows: Welchrom-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), water-acetonitrile (24 : 76) as mobile phase (flow rate: 1.0 ml/min), cucurbitacin B as internal standard, detection wavelength of 225 nm, and column temperature of 30℃. *Results*: In this situation, the remaining times of the madecassoside and cucurbitacin B were 5.11 min and 8.14 min, respectively. The linear range of the method was 5 μg/ml ~ 1.5 mg/ml ($r$ = 0.999 8). The low limit of detection was 1 μg/ml. The method recoveries and the extraction recoveries were 90.21% ~ 95.65% and 80.65% ~ 87.04%, respectively. The within-day RSD and between-day RSD were between 1.31% ~ 3.07% ($n$=5). *Conclusion*: The

作者介绍:谭欣玮(1984- ),男,硕士,
研究方向:药物代谢动力学。
通讯作者:刘颖菊,女,教授,E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn。
基金项目:留学回国人员科研启动基金(编号:2006-331)。

异就可能直接影响干扰的效果和特异性[6]。由于靶 mRNA 的空间构像、位点等存在差异,导致并非所有的 ShRNA 产生的小干扰 RNA 均可对靶 mRNA 产生有效的的 RNA 干扰效应[7]。

本研究成功的构建并筛选到具有显著干扰效率的 STAT6 干扰质粒,这为 RNA 干扰技术应用到哺乳动物奠定了实验基础,对进一步观察 RNA 干扰技术在治疗哮喘中的作用具有重要意义,同时为哮喘的治疗和预防提供了新思路。

## 参 考 文 献

[1] Kaplan M H, Grusby M J. Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules[J]. Leukoc boil, 1998, 64(9): 2-5.

[2] 田新瑞,刘卓拉,牛 勃,等. STAT6 在哮喘小鼠肺组织的表达及激素的影响作用[J].中国药物与临床,2009,9(1):18-20.

[3] Akimoto T, Numata F, Tamura M, et al. Abrogation of bronchial Eosinophliic inflammation and airway hyperreactivity in singal transducers and activators of transcription (STAT) deficient mice[J]. J Exp Med, 1998, 187(9): 1537-1542.

[4] 叶乐平,谢丽微,李昌崇,等.布地奈德对哮喘大鼠信号转导子和转录激活子 6 的表达[J].中华微生物与免疫学杂志,2005,25(7):588-593.

[5] Caplen S T, Parrish S, Imam F, et al. Spesifec inhibition of gene expretion by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(1): 9742-9747.

[6] Wang Q Z, Lv Y H, Diao Y, et al. The design of vectors for RNAi delivery system [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(13): 1327-1340.

[7] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami P. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalion cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

(责任编辑:关蕴良)