

文章编号:1005-6947(2008)05-0462-04

· 基础研究 ·

# 短发卡 RNA 对人胃癌细胞 STAT3 基因的沉默作用

童强<sup>1</sup>, 舒晓刚<sup>1</sup>, 卢晓明<sup>1</sup>, 黎维勇<sup>2</sup>, 陶凯雄<sup>3</sup>, 陈道达<sup>1</sup>, 王国斌<sup>1,3</sup>

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 胃肠外科 2. 药剂科 3. 腔镜外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨 STAT3 基因小发夹 RNA (shRNA) 表达质粒对胃癌 MKN-45 细胞 STAT3 基因的干扰作用。方法 根据 STAT3 mRNA 编码序列, 设计 RNA 干扰靶点, 构建 STAT3 基因的特异性小 RNA 干扰质粒 (psiRNA-H1/STAT3), 使用脂质体转染人胃癌细胞系 (MKN-45 细胞)。实验分为对照 (A) 组, psiRNA-H1 转染 (B) 组和 psiRNA-H1/STAT3 转染 (C) 组。通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测 STAT3 特异性小 RNA 干扰基因对胃癌细胞 STAT3 基因 mRNA 和蛋白表达的影响。结果 psiRNA-H1/STAT3 经限制性酶切及部分序列分析证明基因插入正确, 并经测序证实。将其成功转染 MKN-45 细胞后, 该细胞的 STAT3 mRNA 和蛋白表达均明显下降 ( $P < 0.05$ )。结论 将成功构建的针对 STAT3 基因的 shRNA 表达载体转染 MKN-45 细胞, 能有效抑制该细胞的 STAT3 mRNA 和蛋白表达, 为 STAT3 基因靶向治疗提供一定的实验依据。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(5):462-465]

**关键词:** 胃肿瘤; STAT3 转录因子; RNA 干扰; 基因表达

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

## Silence effect of plasmid mediated shRNA on STAT3 gene in gastric cancer cells

TONG Qiang<sup>1</sup>, SHU Xiaogang<sup>1</sup>, LU Xiaoming<sup>1</sup>, LI Weiyong<sup>2</sup>, TAO Kaixiong<sup>3</sup>,  
CHEN Daoda<sup>1</sup>, WANG Guobin<sup>1,3</sup>

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Pharmaceutical Preparation Section 3. Department of Laparoscope Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To study the interfering effect of short hairpin RNA (shRNA) expressing plasmid vectors on STAT3 gene expression of human gastric carcinoma cells. **Methods** Specific shRNA plasmids to STAT3 were constructed, and then transfected into MKN-45 cells by lipofectamine methods. Semi-quantitative RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of STAT3 mRNA and protein respectively. Cells were divided into three groups: control group (A group), psiRNA-H1 group (negative group, B group) and psiRNA-H1/STAT3 group (C group). **Results** The synthesized strands of oligonucleotide contained correct and complete sequence of the shRNA, and the STAT3 specific shRNA was inserted into eukaryotic expression. Compared with the A and B group cells, semi-quantitative RT-PCR and Western blotting showed the expression of STAT3 mRNA and protein was down-regulated in the C group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The recombinant plasmid psiRNA-H1/STAT3 shRNA has been constructed successfully, and it can specifically inhibit not only the expression of STAT3 mRNA, but also the protein expression in gastric

**基金项目:**湖北省科技攻关计划课题资助(2006AA301A05)。

**收稿日期:**2008-01-10; **修订日期:**2008-03-18。

**作者简介:**童强,男,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**童强 E-mail: etongqiang@yahoo.com.cn

carcinoma cells in vitro. It provides certain experimental basis for STAT3 gene target therapy.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 ( 5 ): 462 - 465 ]

**Key words:** Stomach Neoplasms; STAT3 Transcription Factor; RNA Interference; Gene Expression

**CLC number:** R 735.2

**Document code:** A

信号传导及转录活化因子-3 ( signal transducers and activators of transcription 3, STAT3 ) 是近年来研究异常活跃的转录因子<sup>[1]</sup>。有研究发现, STAT3 具有强烈的抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用, 参与了多种恶性肿瘤的发生、发展和演进<sup>[2-3]</sup>。然而, 国内外关于 STAT3 在消化系统疾病中的研究才刚起步。笔者先前的工作发现, STAT3 在胃癌中呈高表达。此结论为本研究提供了理论基础。本研究以质粒 psiRNA-hH1 neo 为基础, 将针对 STAT3 表达 shRNA ( short hairpin RNA ) 的重组质粒转染入人胃癌细胞系 MKN-45 细胞, 观察其对该种细胞 mRNA 和蛋白表达的抑制作用, 以期为胃癌的基因靶向治疗提供新的靶点和思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

限制性内切酶 Bbs 1 及 Ase 1 ( MBI 公司 ), RPMI1640 培养基和新生牛血清 ( 美国 Gibco 公司 ), 脂质体 lipofectamine 2000 及 trizol ( 美国 Invitrogen 公司 ), 逆转录试剂盒及 taq DNA 聚合酶 ( 美国 Fermentas 公司 ), 胶回收试剂盒 ( 日本 TaKaRa 公司 ), X-gal 和 IPTG ( Gibco-BRL 公司 ), 兔抗人 STAT3 单克隆抗体 ( 美国 Santa Cruz 公司 ), Western 所用试剂 ( 晶美生物工程有限公司 ), 胃癌细胞系 MKN-45 ( 武汉大学中国典型培养物保藏中心 ), 载体质粒 psiRNA-hH1 neo ( 华中科技大学同济医学院免疫学系提供 )。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 设计和构建 STAT3 的 shRNA 表达质粒

从 NCBI Gene Bank 基因库中查找 STAT3 的基因序列 ( 序列号: X75932 ), 利用 siRNA 设计软件在起始密码子下游寻找符合特征的靶序列, 并人工设计合成针对 STAT3 的 siRNA 寡核苷酸序列, 正义链为 5'-TCCCTGTTCTCTATCAGCACAATTCAAGA-GATTGTGCTGATAGAGAACATT-3'; 反义链为: 5'-CAAAAATGTTCTCTATCAGCACAATCTCTTGAATTGTGCTGATAGAGAACA-3'。该 shRNA 的茎环结构为 TCAAGAG, 其两侧为两段完全互补的核苷酸序列。在以上寡核苷酸序列的 5' 端和 3' 末端引入 Bbs I 半位点, 以便于克隆。将上述序列退火形成双链 DNA, 插入酶切后的空质粒载体中。连接产物转

化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选单菌落, 聚合酶链反应 ( PCR ) 验证阳性克隆。为检测目的基因是否正确插入载体及有无基因突变的产生, 阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司测序。

1.2.2 质粒转染 胰酶消化细胞并计数。将细胞接种于 6 孔细胞培养板, 用 250  $\mu$ L 无血清培养基稀释 10  $\mu$ L lipofectamine 2000 转染试剂, 在 5 min 内与稀释的质粒 DNA 混合; 将复合物加入到每孔中, 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 中保温 48 h。实验分为空白对照组 ( A 组 ), 空白质粒 psiRNA-H1 转染组 ( B 组 ) 和 psiRNA-H1/STAT3 转染组 ( C 组 ) 3 组; 每组均设 3 个复孔。

1.2.3 逆转录 - 聚合酶链反应 ( RT-PCR ) 检测 STAT3 mRNA 按 Invitrogen 公司 Trizol 试剂说明使用氯仿和异丙醇抽提总 RNA。使用 Fermentas 公司逆转录试剂盒以 oligdT 和逆转录酶合成 cDNA 链。PCR 引物由应用软件 Prima5.0 设计, 由上海生工公司合成。上游引物为 5' GTCAGATGCCAAATGC 3'; 下游引物为 5' CCTGGAGCTTAGTGC 3'; 长度为 409 bp。 $\beta$ -actin 上游引物为 5' TGTACGTTGC-TATCCAGGCT 3'; 下游引物为 5' CTCCTTAATGT-CACGCACGA 3'; 长度为 248 bp。PCR 反应体系 ( 总体积 25  $\mu$ L ): H<sub>2</sub>O 16  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer ( 缓冲液 ) 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, Taq 酶 0.5  $\mu$ L。PCR 条件: 预变性 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 94  $^{\circ}$ C, 45 s, 53  $^{\circ}$ C, 45 s, 72  $^{\circ}$ C, 1 min; 36 个循环; 延伸 72  $^{\circ}$ C, 10 min。反应结束后取 5  $\mu$ L 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 ( 内含溴化乙啶 ) 电泳, 紫外灯下观察并用凝胶成像系统成像。

1.2.4 免疫印迹 ( Western Blot ) 检测 STAT3 蛋白表达 细胞经胰酶消化后, 用预冷至 4  $^{\circ}$ C 的裂解缓冲液加入到经磷酸盐缓冲液 ( PBS ) 漂洗第 3 天收集的培养细胞中, 冰上作用 20 min, 12 000r/min, 离心 2 min 后, 上清液保存于 -20  $^{\circ}$ C。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 以 50  $\mu$ g/孔上样, 12% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( SDS-PAGE ) 凝胶电泳分离, 通过电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜。后者在含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 中 37  $^{\circ}$ C 封闭 90 min, 加入一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; TTBS 充分漂洗 ( 10 min  $\times$  3 次 ), 加



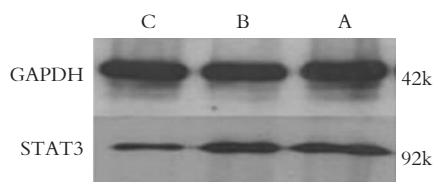


图4 各组 STAT3 蛋白的表达 A: 对照组; B: psiRNA-H1 转染组; C: psiRNA-H1/STAT3 转染组

### 3 讨论

寻找新的靶点已经成为肿瘤靶向治疗的研究热点<sup>[4]</sup>。STAT3 是在研究干扰素 (IFN) 信号转导机制的过程中发现的一种转录因子,可以在外界信号的刺激下激活并直接转入细胞核内引发相应靶基因的转录。近年来研究发现,STAT3 是 EGF, IL26/ JAK, Src 等多个酪氨酸激酶信号通道汇聚的焦点<sup>[5-6]</sup>,它具有强烈的抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用,参与了人类恶性肿瘤的发生、发展过程,在多种肿瘤中都有过度激活<sup>[7]</sup>。但在正常鼠成纤维细胞及人口腔角化细胞、乳腺细胞中阻断 STAT3 信号通道并不影响细胞生长<sup>[8]</sup>。故认为阻断 STAT3 途径也许不会过多地损伤正常细胞的功能。

然而,要证实抑制 STAT3 的表达可作为治疗胃癌的一种方法,首先必须运用较有效的手段抑制 STAT3 在胃癌细胞中的表达。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近几年发现的一种有效的基因沉默技术,在基因功能研究、抗病毒、抗肿瘤、药物靶点筛选和细胞信号传导通路分析中显示了其良好的应用前景。进行 RNAi 时,主要的效应分子是双链的、短的、干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 分子<sup>[9]</sup>。每一个 siRNA 分子中的 1 条链进入到细胞质中多蛋白、RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中,充当定位互补 RNA 靶标的向导。一种 RISC 核酸酶在与 siRNA 碱基配对的区域内裂解靶标 RNA,然后靶标被细胞质中的核酸外切酶降解。有文献报道,通过短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 使目的基因失活是 RNA 干扰的有效途径<sup>[10-11]</sup>。

本实验针对 STAT3 设计 DNA 单链,退火后形成双链,与经酶切的线性化的 psiRNA-H1 连接,通过酶切电泳及测序鉴定,成功构建了表达 STAT3 shRNA 的真核表达载体。McIntyre 等<sup>[12]</sup>检索关于表达 shRNA 的最新文献 117 篇,87 篇报道 (即 74% 的研究者) 运用的方法是将互补的 DNA 单链退火连接到载体上。因此,通过合成互补的 DNA

单链连接到线性化载体上是表达 shRNA 较可靠的方法。笔者将构建成功的针对 STAT3 基因的特异性小 RNA 干扰质粒 (psiRNA-H1/STAT3) 转染 MKN-45 细胞,通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测其对胃癌细胞 STAT3 基因 mRNA 和蛋白表达的影响,结果显示 psiRNA-H1/STAT3 转染组细胞 STAT3 的表达在 mRNA 水平和蛋白水平均较对照组和 psiRNA-H1 转染组明显减少,而 psiRNA-H1 转染组细胞与对照组比较差异无显著性,说明 psiRNA-H1/STAT3 具有特异性封闭 STAT3 mRNA 和蛋白表达的作用。本研究的结果为 STAT3 基因靶向治疗提供了一定的实验依据;STAT3 有望成为胃癌治疗中新的靶位。

#### 参考文献:

- [1] Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* STATs in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (21): 2474 - 2488.
- [2] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (4): 945 - 954.
- [3] 王禹,张颖超,潘玉琢,等.应用 RNAi 沉默 STAT3 基因促裸鼠移植瘤细胞凋亡及对 Bax/Bcl-2 基因表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (4): 273 - 276.
- [4] Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (56): 6613 - 6626.
- [5] Niu G, Wright KL, Huang M, *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (13): 2000 - 2008.
- [6] Garcia R, Bowman TL, Niu G, *et al.* Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (20): 2499 - 2513.
- [7] Niu G, Bowman T, Huang M, *et al.* Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (46): 7001 - 7010.
- [8] Niu G, Shain KH, 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.
- [9] Takasaki S, Kotani S, Konagaya A. Selecting effective siRNA target sequences for mammalian genes [J]. *RNA Biol*, 2005, 2 (1): 21 - 27.
- [10] Antoszczyk S, Taira K, Kato Y. Correlation of structure and activity of short hairpin RNA [J]. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2006, (50): 295 - 296.
- [11] 沈汉斌,郑启昌,王国斌,等. Survivin shRNA 表达质粒的构建及其抑制 survivin 表达的初步研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (12): 927 - 931.
- [12] McIntyre GJ, Fanning GC. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors [J]. *BMC Biotechnol*, 2006, 6 (1): 1 - 8.