

文章编号:1005-6947(2005)04-0273-04

· 实验研究 ·

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

王禹, 张颖超, 潘玉琢, 赵雪俭, 关文曾

(吉林大学第二医院 基本外科, 吉林 长春 410011)

摘要:目的 应用 RNAi 技术沉默信号转导子与转录活化子 3 (STAT3) 基因, 探讨其对人乳腺癌裸鼠移植瘤的细胞凋亡及其对 Bax/Bcl-2 基因表达的影响。方法 于雌裸鼠皮下种植 MCF-7 细胞, 肿瘤长至一定大小时, 随机分为盐水对照 (A) 组、空质粒对照 (B) 组及实验 (C) 组。于肿瘤局部分别注射盐水、psilencer 1.0-U6 空质粒和 psilencer 1.0-U6-STAT3-siRNA 重组质粒。当 A 组肿瘤长至足够大时处死全部动物, 取肿瘤, 测其大小及重量, 行 HE 及免疫组化染色, 同时用 Western blot 检测 STAT3, Bax, Bcl-2 基因的表达水平。结果 C 组肿瘤瘤块的体积和重量明显小于 A, B 组 ($P < 0.01$)。免疫组化及 HE 显示 C 组肿瘤中心区出现大面积细胞坏死及细胞凋亡征象, STAT3 免疫组化呈阴性, 而 A, B 组无此现象。Western blot 显示: C 组 STAT3 的表达明显低于 A, B 组 ($P < 0.01$), 而 Bax 的表达明显高于 A, B 组 ($P < 0.05$), 各组 Bcl-2 的表达水平差异无显著性 ($P < 0.05$)。结论 应用 RNAi 技术沉默 STAT3 基因可以降低人乳腺癌裸鼠移植瘤中 STAT3 的表达, 同时引起 Bax 基因的表达上调, 导致细胞凋亡进而抑制肿瘤的生长。

关键词: 乳腺肿瘤/遗传学; 细胞凋亡; 基因表达; 基因, Bax; 基因, Bcl-2; RNAi 技术; 转录活化子 3; 沉默信号转导子

中图分类号: R730.23.13; R737.9

文献标识码: A

Effect on cell apoptosis and Bax/Bcl-2 gene expression of implanted human breast cancer cells in nude mice by applying RNAi to silence STAT3 gene

WANG Yu, ZHANG Ying-chao, PAN Yu-zhuo, ZHAO Xue-jian, GUAN Wen-zeng
(Department of Surgery, The Second Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China)

Abstract: Objective To discuss the effect on cell apoptosis and Bax/Bcl-2 gene expression of nude mice model with implanted human breast cancer cells by applying RNAi technique to silence signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) gene. Methods MCF-7 breast cancer cells were implanted under the skin of female nude mice. After the tumors grew to a definite size, the mice were randomly divided into three groups: saline control group (A), empty plasmid group (B), the experimental group (C). The tumors were respectively injected with saline, empty plasmid with psilencer1.0-U6, and recombined plasmid with psilencer1.0-U6-stat3-siRNA. When the growth of group A animals reached the sufficient size, all of the animals were killed, the tumors were taken out, their size and weight were measured, immunohistochemical (IHC) analysis was done, and protein expression of STAT3, Bax and Bcl-2 gene in tumors were examined by Western blot. Results The size and weight of tumors in group C were significantly lower than group A and group B. ($P < 0.01$). Immunohistochemical analysis and microscopic examination showed that there was a large area of cytoclasis and signs of cell apoptosis in the center of tumors of group C, and the STAT3 Immunohistochemistry result of the center was negative but that of the border area was positive; there were no such phenomena in group A and group B. The results of Western blot analysis showed that protein expressions of STAT3 gene in group C were significantly lower than those in group A and group B ($P < 0.01$), but there were no significant differences between group A and group B ($P > 0.05$), and protein expressions of

收稿日期:2004-09-22; 修订日期:2005-03-22。

作者简介:王禹(1972-),男,吉林长春人,吉林大学第二医院主治医师,博士,主要从事乳腺疾病方面的研究。

通讯作者:张颖超 电话:0431-6111385(H), 0431-8769552, 13180828448(手机)。

Bax gene in tumor of group C were significantly higher than those in group A and group B ($P < 0.05$), but there were no significant differences between group A and group B ($P > 0.05$). The protein expressions of Bcl-2 gene in all groups showed no significant differences ($P > 0.05$). **Conclusions** Silencing STAT3 gene can decrease STAT3 gene expressions, increase Bax gene expressions, induce cell apoptosis and suppress the tumor growth in the human breast carcinoma model by the RNAi technology.

Key words: BREAST NEOPLASIS/genet; APOPTOSIS; GENE EXPRESSION; GENE, Bax; GENE, Bcl-2; RNAi TECHNIQUE; ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION 3; SILENCE SIGNAL TRANSDUCERS

CLC number: R730.23.13; R737.9

Document code: A

Bax 与 Bcl-2 是调控细胞凋亡的重要基因,在肿瘤的发生发展中起重要作用。STAT3 介导多种细胞因子和生长因子的信号向细胞核传导,影响靶基因的转录,调控细胞功能,与肿瘤发生、发展及凋亡密切相关。目前已证实在人及鼠的很多恶性肿瘤中有 STAT3 的过度激活及表达,包括白血病、多发性骨髓瘤、头颈部鳞状细胞癌、多发性黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌及肺癌等^[1~4]。本文应用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术沉默 STAT3 基因,探讨其对人乳腺癌裸鼠移植瘤的细胞凋亡及其对 Bax/Bcl-2 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/C nu/nu 裸鼠,雌性,4~6 周龄,体重约 20g,购于北京中国医学科学院实验动物研究所。裸鼠饲养于恒温(22~25℃)、恒定湿度的 SPF 层流罩中。经高压灭菌的标准饲料和水供动物自由饮食。

1.1.2 试剂 MCF-7 细胞株由吉林大学一院中心研究室惠赠。培养基为 RPMI 1640,含 10% 小牛血清, pH 7.4,在 5% CO₂, 37℃ 孵箱中培养,用 0.25% 胰酶消化传代。psilencer 1.0-U6 空质粒、psilencer 1.0-U6-STAT3-siRNA 重组质粒由吉林大学基础医学院病理生理教研室惠赠。STAT3, Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体及辣根过氧化物酶结合的二抗购于广州迈新公司。Western 所用试剂购于鼎国公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人乳腺癌移植瘤模型的建立及分组 培养的 MCF-7 细胞经胰酶消化后离心,用 PBS 液清洗 2 次;将细胞团块吹散,经台盼蓝实验证实细胞活力 ≥ 95%;乳腺癌细胞最终浓度为 1×10^7 / mL。取 MCF-7 细胞 2×10^6 个 (0.2 mL) 接种于裸鼠背部皮下组织内,动物继续饲养于层流罩内。待肿瘤长至约 7 mm × 4 mm × 4 mm (约 50 mm³) 时随机分为 3 组,即盐水对照组 (A 组)、空质粒组 (B 组)、实验组 (C 组),每组动物 10 只。肿瘤局部分别注射盐水 0.2 mL, psilencer 1.0-U6 空质粒和 psilencer 1.0-U6-STAT3-siRNA 重组质粒;注射质粒剂量为 20 μg/

只。注射局部进行电转染以提高质粒在瘤体内的转染效率。

1.2.2 电转染方法 主要仪器为电脉冲治疗仪 (由日产 PAV-2000S 直流稳压电源、电脉冲发生器和针状银电极三部分组成)。每组动物注射完质粒后 1 min 给予电脉冲。电脉冲治疗仪的参数设定:电场强度 600 V/cm,脉冲时值 20 ms,次数 1 次,频率 1 Hz。2 根银电极插入肿瘤组织两侧,肿瘤位于电极中央^[1]。

1.3 观察项目

1.3.1 观察裸鼠生长状况、出瘤时间 肿瘤细胞接种后,如有肿瘤生长,则每 7 d 观察肿瘤生长情况。当 A 组肿瘤长至足够大 (约 500 mm³) 时,处死 A, B, C 组全部动物,取肿瘤。测量肿瘤最大直径及相对应的横径,根据公式 $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times \text{肿瘤直径}(\text{mm}) \times \text{肿瘤横径}(\text{mm})$, 计算肿瘤大小,称重。分别行病理学检查 (10% 甲醛固定后, HE 染色) 及免疫组织化学检查。

1.3.2 免疫组化技术 取瘤组织后,在 Carnoy 固定液 (无水乙醇:三氯甲烷:冰乙酸 = 6:3:1) 中固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。采用免疫组化 SABC 法,切片常规脱蜡水化后,其余操作按试剂盒说明书进行。

1.3.3 Western blot 印迹分析 方法参照“分子生物克隆”。每例标本取总蛋白 50 μg,上样进行 SDS-PAGE 电泳;分离后电转移到 PVDF 膜上;封闭后,加入一抗 (工作浓度 1:500) 和辣根过氧化物酶结合的二抗 (工作浓度 1:500);DAB 显色。利用天能图像分析系统测定条带的光密度值 (OD 值)。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;显著性检验采用成组设计的 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤生长情况

裸鼠接种肿瘤细胞 3 d 后即有肿瘤生长。第 10~31 d 生长曲线显示, A, B 组的肿瘤生长速度显著大于 C 组 ($P < 0.01$), 而 A, B 组则无明显差别 ($P > 0.05$) (图 1)。至第 31 天时,测定肿瘤大小

和重量如下:A组平均体积为 $(650 \pm 16) \text{ mm}^3$,平均重量 $(3.09 \pm 0.21) \text{ g}$;B组平均体积为 $(578 \pm 11) \text{ mm}^3$,平均重量 $(2.89 \pm 0.38) \text{ g}$;C组平均体积为 $(170 \pm 9) \text{ mm}^3$,平均重量 $(1.43 \pm 0.17) \text{ g}$ 。A,B组均显著大于C组($P < 0.01$),而A,B组间差异均无显著性($P > 0.05$)。

2.2 病理检查及免疫组化

结果显示,C组的肿瘤瘤块中心出现大面积的细胞坏死以及核固缩等细胞凋亡征象,中心区STAT3呈阴性,周边区呈阳性表现(图2);而A,B组STAT3均呈阳性,无坏死和细胞凋亡现象。

图1 裸鼠肿瘤生长曲线

图2 C组肿瘤切片 STAT3 的免疫组化结果

2.3 Western blot 结果

C组的STAT3表达明显减弱,光密度分析其抑制率与A,B组比较差异有显著性($P < 0.01$),b-actin表达量在各组之间差异无显著性($P <$

0.05);C组的Bax表达明显增强,光密度分析与A,B组比较差异有显著性($P < 0.01$),而各组间Bcl-2的蛋白表达量差异无显著性($P > 0.05$)(图3)。

图3 Western blot 结果

3 讨论

乳腺癌信号传导途径在肿瘤细胞中抗凋亡和促进分化增殖的作用越来越受到重视。其中,信号传导转录活化蛋白家族途径的研究尤为突出。STAT3 是转录信号传导子与激活子家族 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 的重要成员。研究发现,在肿瘤的发生过程中,由于某种细胞因子及异常的生长因子的作用使酪氨酸激酶 (PTK) 持续激活,PTK 的持续激活导致 STAT3 持续激活^[6]。STAT3 的异常活化可促进细胞的分化增殖,抑制细胞凋亡,有利于肿瘤细胞的发生发展及耐化疗细胞株的出现。因此,理论上下调 STAT3 蛋白可能改变 STAT3 信号传导通路而对肿瘤起到治疗作用。

目前,RNAi 技术已日趋成熟,在多种生物中,外源双链 RNA (dsRNA) 导入细胞中,与 dsRNA 同源的 mRNA 受到降解,其相应基因受到抑制,称为 RNA 干扰^[7]。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。

当前国内外的研究方向大多是将以 STAT3 为靶点的 RNAi 技术用于体外基因治疗,即通过破坏 STAT3 信号转导控制病变细胞的生长和增殖,增强病变细胞对药物的系统敏感性,从而治疗肿瘤、感染性疾病和炎症性疾病。本实验采用体内实验方法研究 STAT3 对裸鼠种植人乳腺癌的影响。

本实验结果显示,肿瘤细胞移植后,荷瘤裸鼠在层流罩中存活、生长良好,易于饲养。此模型对肿瘤生长易于观察,为进一步实验打下基础。瞬间高电压的电脉冲可使细胞膜上形成暂时可逆的穿孔,即电穿孔^[8],能将目的 DNA 或 RNA 导入细胞内。本研究应用该技术亦成功地使质粒进入肿瘤细胞的转染效率提高。

实验结果显示,将携带 STAT3 的双链 RNA 质粒导入裸鼠的移植瘤细胞内,可使瘤体生长明显减慢,与两对照组相比有统计学差异 ($P < 0.01$)。另外,两种染色技术还发现实验组的瘤块中心出现大面积的细胞坏死及核固缩等细胞凋亡征象,中心区 STAT3 的免疫组化呈阴性结果,周边区呈阳性结果;而两对照组却无此现象。分析原因,可能系由于注射局限于肿瘤中心,且剂量偏小所致。如果采用多点注射及加大剂量,结果可能更为显著。但本实验结果已足以说明实验组 STAT3 的蛋白表达受到了明显抑制,且肿瘤细胞出现凋

亡征象。同时,Western blot 的结果进一步表明,C 组的 STAT3 基因表达量显著下降,与 B 组和 A 组差异有显著性 ($P < 0.01$),而 A, B 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

Bax 与 Bcl-2 是调节细胞凋亡的一组相对应的基因,在细胞内以二聚体的形式存在。Bax/Bcl-2 值是细胞凋亡的关键^[9,10]。本研究显示实验组 Bax 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$),但 Bcl-2 蛋白未见明显变化。说明以 RNA 干扰技术使肿瘤中的 STAT3 蛋白下调诱导细胞凋亡的过程中伴随着 Bax 蛋白的上调。由此可以推断 Bax 蛋白表达的上调是 STAT3 蛋白下调后的早期事件,从而改变了 Bax 与 Bcl-2 的比值,使 Bax 与 Bcl-2 之间的平衡被打破。Bax 在结合了 Bcl-2 之后,余下的 Bax 即形成 Bax/Bax 同二聚体,发挥其凋亡作用。

本研究说明,应用 RNAi 技术沉默 STAT3 基因可明显地抑制裸鼠移植瘤的生长,在此过程中伴随着 Bax 基因表达的升高而促进了细胞的凋亡。说明 STAT3 基因在人乳腺癌的发生、发展中可能起着重要的促进作用。深入研究 STAT3 的作用机制将为判断乳腺癌的预后及治疗提供理论基础。同时 RNAi 技术的应用亦为抗癌药物的开发和应用开辟了新的途径。

参考文献:

- [1] Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, 264(5164):1415-1421.
- [2] Darnell JE. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997, 277(5332):1630-1635.
- [3] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devan G, et al. Stat3 as an oncogene [J]. *Cell*, 1999, 98(3):295-303.
- [4] Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, et al. Constitutive activation of that stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(8):4227-4232.
- [5] 常喜华,王金国,单纯玉,等.电脉冲化疗治疗人前列腺癌裸鼠移植瘤 [J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(6):510-511.
- [6] Turkson J, Bowman T, Garcia R, et al. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation [J]. *Mol Cell Biol* 1998, 18(5):2545-2552.
- [7] Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing [J]. *cell*, 1998, 95(4):461-70.
- [8] Neuman E, Schaefer Ridder M, Wang Y. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric field [J]. *E MBO J*, 1982, 1(7):841-845.
- [9] 韩江涛,姚榛祥.钙离子浓度对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Caspase-3, Bax 及 Bcl-2 表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 5(4):354-356.
- [10] Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, thah accelates progamed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4):609-619.