

RNA 干扰 STAT3 基因对结肠癌细胞 sw620 凋亡的影响

施 露, 张献全, 蒋国燕, 李 华, 达利隽

(重庆医科大学附属第二医院肿瘤科, 重庆 400010)

【摘要】目的:构建针对信号转导和转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)的小 RNA 干扰表达质粒,利用该质粒特异性抑制人结肠癌 sw620 细胞中 STAT3 基因的表达,观察 RNA 干扰 STAT3 基因对人结肠癌细胞 sw620 凋亡的影响。**方法:**将针对 STAT3 基因的干扰短发卡 RNA(short hairpin RNA, shRNA)克隆到 pGenesil-1 质粒表达载体中,命名为 p-shSTAT3。质粒转染 sw620 细胞 48 h 后,利用 RT-PCR(reverse transcription PCR)和 Western blot 技术检测 STAT3 基因 mRNA 和蛋白水平上的表达情况。利用 Hoechst 33258 染色对转染后 sw620 细胞的凋亡情况进行检测;利用 Western blot 技术对 STAT3 基因调控相关的凋亡信号通路中的 p53、Caspase 3、Bax、Bcl-XL 和 Bcl-2 蛋白的表达情况进行检测。**结果:**转染 STAT3 干扰质粒能在细胞水平上有效抑制 sw620 细胞中 STAT3 基因 mRNA 和蛋白水平上的表达($P=0.000$)。Hoechst 33258 染色表明在 sw620 细胞中干扰掉 STAT3 基因的表达能促进细胞凋亡的发生($P=0.000$),乱序对照对细胞无明显的凋亡促进作用($P=0.218$)。对作用机理进行研究后发现,在 sw620 细胞中干扰掉 STAT3 基因能促进 p53、Caspase 3 和 Bax 3 个凋亡诱导蛋白的表达;同时下调 Bcl-XL 和 Bcl-2 2 个凋亡抑制蛋白的表达。**结论:**利用 RNA 干扰技术干扰掉 sw620 细胞中 STAT3 基因的表达能促进 sw620 细胞凋亡,为结肠癌治疗提供新的研究思路和作用靶点。

【关键词】信号转导和转录活化因子 3;RNA 干扰;结肠癌;人结肠癌细胞 sw620

【中图分类号】R737.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-04

Effects of interfering STAT3 gene by RNAi on apoptosis of colon cancer cell sw620

Shi Lu, Zhang Xianquan, Jiang Guoyan, Li Hua, Da Lijun

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct SiRNA-signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) expression vector, to silence protein of STAT3 expression in human colon cancer cell sw620 and to study apoptosis of sw620 after STAT3 interference in vitro. **Methods:** In this study, short hairpin RNA targeting STAT3 was cloned into pGenesil-1 plasmid vector, named as p-shSTAT3. Forty-eight hours after transfection with p-shSTAT3, the expression level of STAT3 mRNA and protein were measured using RT-PCR and Western blot. Moreover, Hoechst 33258 staining was used to measure the apoptosis of sw620 cell after transfection. Furthermore, downstream apoptosis-related targets of STAT3, p53, Caspase 3, Bax, Bcl-XL and Bcl-2 in sw620 cell was investigated by Western blot. **Results:** Our results indicated that p-shSTAT3 could significantly silence STAT3 mRNA and protein expression in sw620 cancer cells ($P=0.000$). Hoechst 33258 staining indicated that p-shSTAT3 induced sw620 cancer cell apoptosis ($P=0.000$) whereas controls had no effects on cell apoptosis ($P=0.218$). Knockdown of STAT3 expression induce p53, Caspase 3 and Bax protein expression, inhibit Bcl-XL and Bcl-2 protein expression in sw620 cells. **Conclusions:** Our data showed that interference of STAT3 expression promote sw620 cell apoptosis, which provide new ideas and targets for the treatment of colon cancer.

【Key words】 SiRNA-signal transducers and activators of transcription 3; RNA interference; colon cancer; sw620

结直肠癌是全世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在美国 40~79 岁的人群中,它是第 2 位导致死亡的恶性肿瘤^[1]。中国结直肠癌发病率为

20.08/10 万,位居恶性肿瘤第 3 位;结直肠癌死亡率为 13.41/10 万,位居恶性肿瘤第 5 位^[2]。信号传导和转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)是 1 个核转录因子,对多个肿瘤相关信号通路具有调控作用,包括肿瘤细胞凋亡、增殖、侵袭和肿瘤组织新生血管形成等。既往的研究显示,在结直肠癌标本中存在 STAT3 异常表达

作者介绍:施 露, 837852457@qq.com,

研究方向:结肠癌凋亡的相关分子机制。

通信作者:张献全, Email: xqzhng@hotmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000123.html>

和活化的情况。提示 STAT3 与结直肠癌的发生、发展具有密切的联系^[3-4]。本研究通过 RNA 干扰阻断 STAT3 信号,探讨结肠癌细胞的凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

人源结肠癌细胞株 sw620 购于上海科学院细胞库。Hoechst 33258 工作液(碧云天生物);质粒转染试剂 MegaTran 1.0 Transfection Reagent(Origene 公司);逆转录试剂盒(大连 TaKaRa 生物);抗 STAT3、p53、Caspase 3、Bax、Bcl-XL、Bcl-2 以及 GAPDH 的抗体(CST 公司);STAT3-shRNA 由武汉晶赛生物工程有限公司构建,并经人工合成后构建到 pGensil-1 真核表达载体上,命名为 p-shSTAT3。表达针对无关序列的 shRNA 命名为 p-shSc(该无关序列与人的所有基因不同源)。

1.2 质粒转染

将 sw620 细胞均匀铺于 6 孔板中,转染时细胞密度约 70%~80%。实验分为 3 组:p-shSTAT3 组、p-shSc 组以及空白对照组。转染步骤按转染试剂说明书操作。48 h 后收集提取 RNA 和总蛋白,用于后续实验。

1.3 逆转录 PCR(RT-PCR)

细胞转染 48 h 后,Trizol 法提取总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书,分别加入 RNA 模板、酶混合物、dNTP、缓冲液。PCR 结束后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.4 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡情况

细胞转染 48 h 后,收集细胞,按照 Hoechst 33258 染色液说明书操作。荧光显微镜下观察。

1.5 Western blot 检测 STAT3 和相关信号通路蛋白的表达

细胞转染 48 h 后,提取细胞总蛋白,取 20 μ g 变性煮沸后的蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后转印到 PVDF 膜上,然后用合适稀释浓度的抗 STAT3、p53、Caspase 3、Bax、Bcl-xl、Bcl-2 以及 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)的抗体和相应二抗进行孵育,用 ECL 化学发光底物进行显色和曝光。用图像分析软件分析条带灰度,计数相对灰度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。实验数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,3 组之间的比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检测水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 p-shSTAT3 显著抑制 sw620 细胞中 STAT3 基因的表达

RT-PCR 和 Western blot 检测 STAT3 mRNA 和蛋白的表达情况,如图 1A 所示,与空白对照组相比,转染了 p-shSTAT3 质粒的 sw620 细胞 STAT3 mRNA 的转录受到显著抑制,相比于空白对照组的抑制率为 $(61.2 \pm 3.75)\%$ ($F=64.67$, $P=0.000$)。同时,p-shSc 组和空白对照组相比,STAT3 mRNA 的

表达差异没有统计学意义($P=0.585$)。如图 1B 所示,与空白对照组相比,p-shSTAT3 质粒能有效抑制 sw620 细胞中 STAT3 蛋白的表达,相比于空白对照组的抑制率为 $(59.6 \pm 2.93)\%$ ($F=59.66$, $P=0.000$)。p-shSc 组和空白对照组相比,STAT3 蛋白的表达情况没有差异($P=0.248$)。该实验结果显示,本研究所构建的 p-shSTAT3 干扰质粒在 mRNA 和蛋白水平上都能明显、特异性地抑制 sw620 细胞 STAT3 基因的表达。

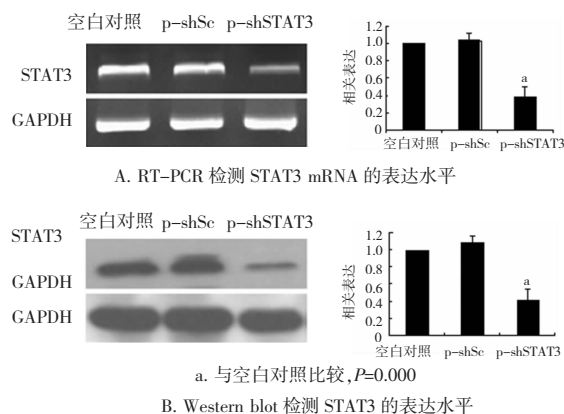


图 1 P-shSTAT3 显著抑制 sw620 细胞中 STAT3 基因的表达
Fig.1 Inhibition of mRNA and protein of STAT3 expression in sw620 cells by P-shSTAT3

2.2 p-shSTAT3 诱导 sw620 细胞凋亡

转染 48 h 后,利用 Hoechst 33258 对细胞进行染色。如图 2 所示,在同一视野中,转染 p-shSTAT3 质粒的 sw620 细胞中能见到更多核固缩细胞,各组凋亡率为:空白对照组 $(4.35 \pm 1.25)\%$; p-shSc 组 $(6.93 \pm 1.97)\%$; p-shSTAT3 组 $(18.92 \pm 4.52)\%$, p-shSTAT3 组细胞凋亡明显增加($P=0.000$);相比于空白对照组, p-shSc 质粒对 sw620 细胞的凋亡无明显促进作用($P=0.218$)。

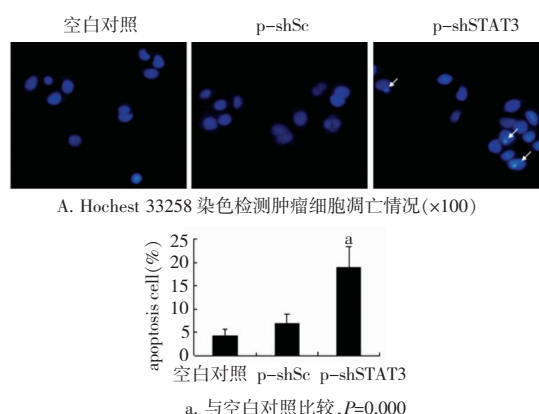


图 2 P-shSTAT3 诱导 sw620 结肠癌细胞凋亡

Fig.2 Colon cancer cell sw620 apoptosis induced by P-shSTAT3

2.3 p-shSTAT3 诱导 sw620 细胞凋亡的分子机理研究

利用 Western blot 对 STAT3 相关凋亡信号通路上的蛋白进行检测,见图 3。发现在 sw620 细胞中干扰掉 STAT3 基因的表达后,p53、Caspase 3 和 Bax 3 个凋亡诱导蛋白高表达;

Bcl-XL 和 Bcl-2 两个凋亡抑制蛋白低表达。以上实验结果表明 p-shSTAT3 诱导 sw620 细胞凋亡的发生是通过 p53-Bax 这条凋亡信号通路来实现的。

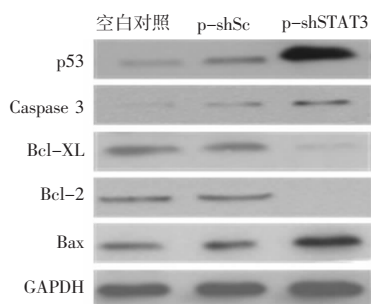


图 4 P-shSTAT3 调控 STAT3 基因介导的凋亡相关蛋白的表达

Fig.4 Regulation of expressions of apoptosis-related downstream targets of STAT3 by p-shSTAT3

3 讨论

本研究构建了能特异性干扰 STAT3 基因表达的质粒表达系统,并对该质粒对 sw620 细胞的凋亡作用及机理进行了实验研究。实验结果显示转染 p-shSTAT3 质粒能高效、特异性地抑制 sw620 细胞中 STAT3 基因的表达。p-shSTAT3 组相比于空白对照组 STAT3 mRNA 的抑制率为 61.2%。p-shSTAT3 组与空白对照组相比,STAT3 蛋白抑制率为 59.6%。同时,抑制 STAT3 基因的表达后,3 个凋亡诱导蛋白 p53、Caspase 3 和 Bax 高表达;而 2 个凋亡抑制蛋白 Bcl-XL 和 Bcl-2 低表达。因此,本研究推测 STAT3 基因的沉默直接促进了 p53 蛋白的表达,进而激活了 Caspase 3 及下游的 Bcl 家族相关的细胞凋亡通路。

Ievy 和 Darnell 等^[5]用 STAT3 的显性负性突变体阻断 STAT3 的活性,从而明显抑制结肠癌细胞的增殖^[5];STAT3 反义寡核苷酸能增强化疗药物 5-氟尿嘧啶对结肠癌细胞 HCT1 16 的治疗作用^[6]。上述研究结果都表明阻断 STAT3 信号通路或抑制 STAT3 基因的表达治疗结直肠癌的策略是可行的。在本研究中通过 RNA 干扰技术特异性地干扰掉 sw620 细胞中 STAT3 的表达。RNA 干扰技术与显性负性突变体、反义寡核苷酸比较具有以下优点:利用质粒表达系统表达产生的小干扰 RNA (small-interfering RNA, siRNA) 具有长效、稳定地抑制目的基因表达的优点^[7]。同时,由于质粒系统产生的 siRNA 是由内源性机制产生的,使得它能更好的避免脱靶效应^[8]。

STAT3 是多个具有致癌作用相关信号通路的交汇点,对大量的癌基因和抑癌基因具有调控作用。STAT3 被证明可通过调控包括 Bcl-XL、Mcl-1、Bcl-2、Fas、Cyclin D1 和 c-Myc 等在内的细胞凋亡或增殖相关蛋白的表达来实现抑制肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤细胞增殖的作用^[9-12]。近年来,大量的研究表明 STAT3 与结直肠癌的发生、发展具有重要的相关性^[3-4]。基于此,阻断 STAT3 相关的信号通路可能成为结直肠癌治疗的一个重要靶点。由于本实验仅仅在细胞水平研究 STAT3 基因的功能,体内实验及表达载体的投递系统将在后续的工作中深入研究。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] 陈琼, 刘志才, 程兰平, 等. 2003~2007 年中国结直肠癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(3): 179-182.
- [3] Lin L, Fuchs J, Li C, et al. STAT3 signaling pathway is necessary for cell survival and tumorsphere forming capacity in ALDH⁺/CD133⁺ stem cell-like human colon cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 416(3-4): 246-251.
- [4] Kusaba T, Nakayama T, Yanlazunl K, et al. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(16): 1445-1451.
- [5] Ievy DE, Darnell JE Jr. STAT: transcriptional control and biological impact[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651-662.
- [6] Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, et al. Implication of STAT 3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) and vascular endothelial growth factor mediated cellular invasion and tumor growth[J]. Cancer Res, 2005, 65(1): 195-202.
- [7] Duchaine TF, Slack FJ. RNA interference and micro-RNA-oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges[J]. Curr Oncol, 2009, 16(4): 61-66.
- [8] Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, et al. siRNA vs. shRNA: similarities and differences[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(9): 746-759.
- [9] Nam S, Wen W, Schroeder A, et al. Dual inhibition of Janus and Src family kinases by novel indirubin derivative blocks constitutively-activated Stat3 signaling associated with apoptosis of human pancreatic cancer cells[J]. Mol Oncol, 2012(12): 122-126.
- [10] Sun M, Liu C, Nadiminty N, et al. Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion[J]. Prostate, 2012, 72(1): 82-89.
- [11] Pu HH, Duan J, Wang Y, et al. Thymic stromal lymphopoietin promotes the proliferation of human trophoblasts via phosphorylated STAT3-mediated c-Myc upregulation[J]. Placenta, 2012, 33(5): 387-391.
- [12] Ernst M, Putoczki TL. Stat3: linking inflammation to (gastrointestinal) tumorigenesis[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8): 711-718.

(责任编辑: 冉明会)