

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.08.005

# siRNA 阻断 Stat3 信号促进食管鳞癌细胞株凋亡

王新华,李珊珊,田芳,郑献召,李道明,孙洋

## Blocking Stat3 Signal by RNAi Promotes Cell Apoptosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

WANG Xin-hua, LI Shan-shan, TIAN Fang, ZHENG Xian-zhao, LI Dao-ming, SUN Yang

*The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, He'nan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, China**Corresponding Author: LI Shan-shan, E-mail: lsspath@yahoo.com.cn*

**Abstract: Objective** To investigate the blockage of constitutively activated signal transducers and activators of transcription3 (Stat3) signal and the effect on cell apoptosis by applying RNA interfere technique to silence Stat3 gene in human esophageal squamous cell carcinoma cell line (EC9706).

**Methods** EC9706 was transfected with chemical syntheswased Stat3 siRNA (100nM), RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of Stat3 mRNA, the protein levels of Bcl-2, Stat3 and phosphorylated-Stat3 (p-Stat3) before and after transfection. The change of DNA-binding activity and the cells apoptosis were evaluated by electrophoretic mobility gel shift assay (EMSA) and FCM, respectively. **Results** After transfected Stat3 siRNA 48h, cells morphology were significantly transformed. RT-PCR and Western blot showed the expression of Stat3 gene was inhibited at mRNA and protein levels by Stat3 SiRNA and the constitutively activated Stat3 signal was blocked. Stat3-DNA-binding activity was supressed directly at DNA level confirmed by EMSA. The expression of Bcl-2 protein was reduced after transfected by Stat3 siRNA. FCM indicated cell that apoptosis was promoted significantly in EC9706. **Conclusion** Stat3 siRNA blocked the constitutively activated Stat3 signaling specially and efficiently in EC9706, which promoted cell apoptosis obviously.

**Key words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Stat3; RNA interference; Apoptosis

**摘要:目的** 研究 RNA 干扰技术沉默 Stat3 基因对食管鳞癌细胞(EC9706)中持续性激活 Stat3 信号的阻断作用及对细胞凋亡的影响。**方法** 将化学合成的 100nM 的 Stat3 siRNA 转染 EC9706 细胞,RT-PCR 检测转染前后 Stat3 mRNA 的表达,Western blot 检测转染前后细胞中 Bcl-2、Stat3 及磷酸化 Stat3 (p-Stat3) 蛋白的表达,凝胶电泳迁移率 (EMSA) 检测转染前后活化 Stat3 蛋白的 DNA 结合活性,流式细胞术检测转染前后细胞凋亡的改变情况。**结果** Stat3 siRNA 转染细胞 48h 后细胞形态发生明显的改变,RT-PCR 及 Western blot 结果显示 Stat3 siRNA 干扰后 Stat3 mRNA 及蛋白表达均受到明显抑制,Stat3 信号的激活被阻断,活化 Stat3 蛋白的核结合活性显著下降。转染后细胞中 Bcl-2 蛋白的表达明显减少。流式细胞术结果证明 Stat3 siRNA 可明显促进细胞凋亡。**结论** Stat3 siRNA 能够特异地阻断食管鳞癌细胞中 Stat3 信号的持续性激活并促进肿瘤细胞凋亡。

**关键词:** 食管鳞癌;信号转导子及转录活化子 3;RNA 干扰;凋亡

**中图分类号:** R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)08-0873-05

## 0 引言

信号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, Stat3) 是一种双功能的信号分子,不仅能够直接把细胞外的信号传递到细胞内,而且能够通过酪氨酸磷酸化信号通道相偶联,直接调控多种与细胞增殖、凋亡相关的功能蛋白的表达<sup>[1]</sup>。研究表明大量人类肿瘤中存在着持续性激活的 Stat3 信号通路。利用各种方法在多种

收稿日期:2009-03-25;修回日期:2009-10-21

基金项目:河南省科技攻关基金资助项目(0624410048);“十五”“211 工程”重点学科建设基金资助项目[教重办(2002)第 2 号];河南省医学科技攻关基金资助项目(2006)

作者单位:450052 郑州,郑州大学第一附属医院 河南省肿瘤病理重点实验室

通信作者:李珊珊, E-mail: lsspath@yahoo.com.cn

作者简介:王新华(1972-),女,博士,主治医师,主要从事临床肿瘤工作

肿瘤细胞中阻断 Stat3 信号后,能够明显抑制肿瘤细胞的增殖或促进肿瘤细胞凋亡,提示阻断 Stat3 信号通路可能起到广泛而有效的抗肿瘤作用。本研究在前期已证实食管鳞癌细胞中存在着持续性激活的 Stat3 信号基础上,利用靶向 Stat3 RNA 干扰技术阻断该信号的激活,探讨 Stat3 信号对食管鳞癌细胞凋亡的影响,以了解 Stat3 能否成为肿瘤治疗的一个新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

EC9706 细胞由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。将 EC9706 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下,在含有 10% 的胎牛血清,100u/ml 青霉素,100μg/ml 链霉素的 1640 培养液(Gibco 公司)中进行培养。0.1%~0.2%胰蛋白酶消化传代。实验所用细胞均处于对数生长期。

### 1.2 细胞转染

按照试剂盒说明,用 siRNA 转染试剂(sc-29528,Santa)将化学合成的 Stat3 siRNA (h)(sc-29493,Santa)加入到 EC9706 细胞培养液中(终浓度为 100nM),培养 48、72h 后,收获细胞进行检测。

### 1.3 Western blot 测定蛋白的表达

根据 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extract 试剂盒(78833, Pierce)说明书,分别提取细胞质、细胞核蛋白。Bradford 法检测蛋白质的含量,-80℃保存蛋白样品。将细胞总蛋白 100μg 与 2×SDS 上样缓冲液按 1:1 混合,与预染的蛋白质分子量 Marker (SM0441,上海生物工程有限公司)一起上样,Stat3、p-Stat3 经 10%SDS-PAGE 分离。按预染蛋白分子量标志物标记,切取分子量在 86~120kDa 之间的凝胶,用水浴式电转移将蛋白转移到硝酸纤维膜上。5%的 TBST 脱脂奶粉溶液 4℃封闭过夜。依次与多克隆兔抗 Stat3(1:100)、单克隆鼠抗 p-Stat3(1:100)和单克隆鼠抗 Bcl-2(1:100)室温孵育 2h,硝酸纤维膜分别与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔(1:3000)室温孵育 90min 后,TBST 溶液洗涤 3 次,每次 10min。DAB 显色。实验重复 3 次。

1.4 凝胶电泳迁移率(electrophoretic mobility shift assay,EMSA)实验用于检测 p-Stat3 与 DNA 的结合活性

采用生物素 3'末端标记法,用 Biotin 3' End DNA Labeling(89818, Pierce)试剂盒将 p-Stat3 探针(5'-GAT CTA GGA ATT CCC AGA AGG

ATC-3, 3'-GAT CCT TCT GGG AAT TCC TAG ATC-5',北京奥科生物技术有限公司合成)进行标记。将细胞核提取物(10μg)与生物素标记的探针在 20 μl 的缓冲液(10M Tris-HCl, pH 8.5, 0.5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M KCl, 0.05% NP-40, 2.5% Glycerol, 1 μg/μl Poly (dI · dC) 和 0.2μg/μl BSA)中充分结合,行 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用毛吸转移法转移至带正电荷的尼龙膜上,120mJ 紫外交联 5min,增强探针与膜的结合。生物素标记的 DNA 探针与 HRP 标记的亲合素相结合,用 LightShift Chemiluminescent EMSA (20148, Pierce)试剂盒采用化学发光法,将 X 光片曝光,定显影。

### 1.5 RT-PCR 反应

细胞长至 90%融合时,加 1ml Trizol (Invitrogen)试剂提取 RNA。Stat3 的上游引物为 5'-GGA GGA GGC ATT CGG AAA G-3',下游引物为 5'-TCG TTG GTG TCA CAC AGA T-3';产物长度为 110bp;内参 β-actin 的上游引物为 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA -3',下游引物为 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC -3',产物长度为 385bp。参照 RT-PCR 一步法试剂盒(DRR024A,大连宝生物)说明书,将目的基因的引物与内参引物进行同管扩增。取 1μl RNA 加入总体积为 25μl 的反应体系中,50℃ 30min 进行逆转录反应,94℃ 2min 使 RNase 失活,然后 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1 min,共 32 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。反应结束后取 PCR 产物 8μl 行 1%琼脂糖凝胶电泳,实验重复 3 次。以 Stat3 和 β-actin 的比值对 Stat3 mRNA 的表达进行半定量分析。

### 1.6 流式细胞仪检测凋亡细胞

按 Annexin V 凋亡检测试剂盒(sc-4252 AK, Santa Cruz)说明,制备单细胞悬液(10<sup>6</sup>/ml);冰预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,冰预冷 1×Binding Buffer 重悬细胞;将细胞悬液与 Annexin V-FITC 及 PI 混匀,室温避光孵育 10min。用对照细胞另设未染色管、单染 Annexin V-FITC 管及单染 PI 管。以未染色细胞调零流式细胞仪,以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照,测定每个上样管数据,每个样品至少检测 10<sup>4</sup> 个细胞,利用 CellQuest 软件进行参数获取和资料分析,计算凋亡细胞百分比。

### 1.7 统计学方法

利用 SPSS11.0 软件处理数据,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示;两组均数的比较用 *t* 检验; $\alpha = 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染前后细胞中 Stat3 mRNA 的表达

半定量分析结果表明,转染后 72h,食管鳞癌 EC9706 细胞中 Stat3 mRNA 的含量( $0.028 \pm 0.022$ )较转染前( $0.502 \pm 0.015$ )明显下降( $t = 33.420, P = 0.001$ ),转染前后差异有统计学意义,提示 Stat3 siRNA 对 Stat3 基因的沉默作用具有高效特异性,见图 1。

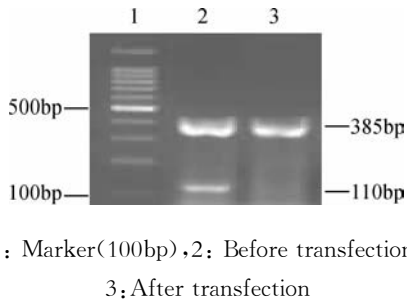
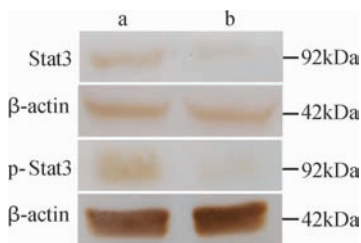


图 1 Stat3 siRNA 转染前后细胞中 Stat3 mRNA 的表达  
Figure 1 The expression of stat3 mRNA in cells before and after transfection with Stat3 siRNA

### 2.2 转染前后细胞中 Stat3、p-Stat3 蛋白的表达

Stat3、p-Stat3 蛋白的相对分子质量均为 92kDa。Western blot 结果显示转染后 72h Stat3 蛋白的表达明显减少,转染前后 Stat3 蛋白的表达量差异具有统计学意义( $P = 0.038$ )。Stat3 蛋白磷酸化成为 p-Stat3 蛋白后被激活,转染后 72h p-Stat3 蛋白的表达明显减少,转染前后 p-Stat3 蛋白的表达量差异具有统计学意义( $P = 0.021$ ),见图 2。

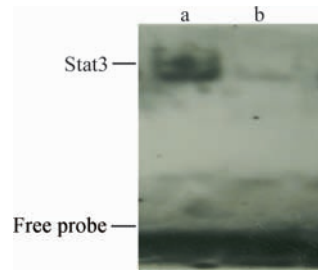


a: Before transfection, b: After transfection

图 2 Stat3 siRNA 转染前后细胞中 Stat3、p-Stat3 蛋白的表达  
Figure 2 The expressions of Stat3 and p-Stat3 protein in cells before and after transfection with Stat3 siRNA

### 2.3 转染前后细胞中 Stat3 与 DNA 结合活性的改变

EMSA 结果显示细胞中 Stat3 蛋白的 DNA 结合活性在转染后 72h 基本消失。灰度扫描结果显示转染后约 82.8% 的 Stat3 蛋白 DNA 结合活性被抑制( $P = 0.000$ ),该结果与 p-Stat3 蛋白的表达结果基本一致,见图 3。



a: Before transfection, b: After transfection

图 3 Stat3 siRNA 转染前后细胞中 Stat3 与 DNA 结合活性的改变

Figure 3 The changes of Stat3 DNA-binding activity in cells before and after transfection with Stat3 siRNA

### 2.4 Stat3 siRNA 对食管鳞癌细胞形态学特征的影响

食管鳞癌细胞转染 Stat3 siRNA 48h 后,倒置显微镜下观察发现,未转染组的细胞贴壁生长,细胞轮廓清楚,细胞间结构紧密,生长旺盛。而转染组细胞融合度变差,形态变小变圆,细胞皱缩,颗粒增多,增殖减慢,培养液中出现较多的悬浮细胞,见图 4。

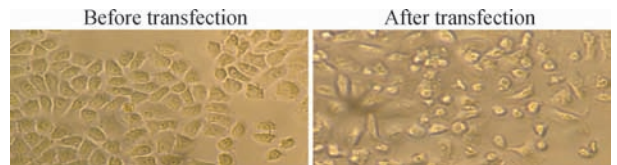


图 4 Stat3 siRNA 对食管鳞癌细胞形态学特征的影响( $\times 400$ )

Figure 4 The effect on morphology of cells before and after transfection with Stat3 siRNA( $\times 400$ )

### 2.5 转染前后细胞中的凋亡情况

将转染前后的细胞用 Annexin V-FITC 和 PI 合染,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果显示,转染 72h 后细胞凋亡发生率明显升高达 32.62%,是对照组的 14.37 倍,凋亡率差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。提示 Stat3 siRNA 阻断细胞中 Stat3 信号通路的激活后可明显促进细胞的凋亡,见图 5。

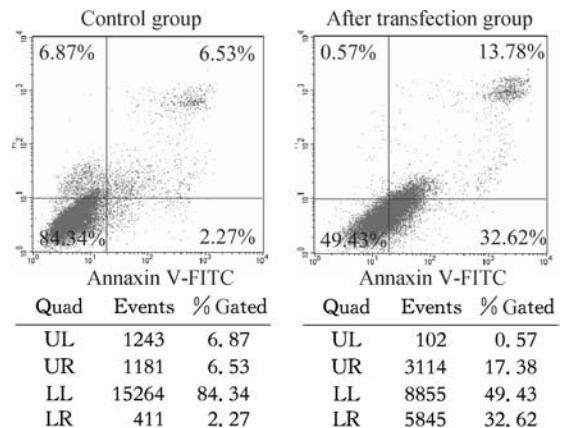
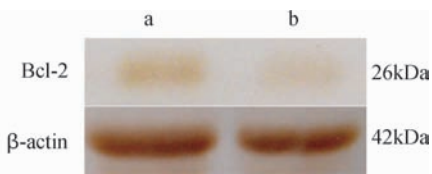


图 5 Stat3 siRNA 转染细胞前后细胞凋亡情况  
Figure 5 The effect on cell apoptosis before and after transfection with Stat3 siRNA

## 2.6 转染前后细胞中 Bcl-2 蛋白的表达

转染 Stat3 siRNA 后 72h, Western blot 结果显示细胞中 Bcl-2 蛋白的表达减少了 16.9%; 转染前后 Bcl-2 蛋白的表达差异有统计学意义 ( $P=0.011$ ), 说明抑制 siRNA 诱导的细胞凋亡可能部分是通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达而实现的, 见图 6。



a: Before transfection, b: After transfection

图 6 Stat3 siRNA 转染前、后细胞中 Bcl-2 蛋白的表达

Figure 6 The expression of Bcl-2 protein in cells before and after transfection with Stat3 siRNA

## 3 讨论

信号转导途径在肿瘤细胞抗凋亡和分化增殖的过程中起到重要作用。研究发现, 来自于细胞外的各种刺激信号如细胞因子 IFN、IL-6 等使酪氨酸激酶 (PTK) 持续激活, PTK 的持续激活导致 Stat3 的持续性激活<sup>[2]</sup>。异常活化的 Stat3 信号能够通过调控目标靶基因的表达, 抑制凋亡, 促进细胞增殖, 诱导血管生成, 使正常细胞转化为癌细胞。研究表明大约 82% 的前列腺癌<sup>[3]</sup>、70% 的乳腺癌<sup>[4]</sup>、71% 的鼻咽癌<sup>[5]</sup>及超过 82% 的头颈部鳞状细胞癌中存在着持续性激活的 Stat3 信号通路<sup>[6]</sup>, 提示阻断 Stat3 信号通路可能起到广泛而有效的抗肿瘤作用。

许多人类肿瘤是由于少数癌基因超表达导致细胞过度增殖所致。2001 年 Elbashir 等<sup>[7]</sup>首次报道 siRNA 抑制了体外培养的哺乳动物细胞内特异基因的表达后, siRNA 是否可应用于人类疾病的治疗受到了广泛的关注。因此, 推测如果利用 RNAi 技术抑制在肿瘤的发生和发展中起重要作用的基因会使肿瘤表型逆转或病程得以控制。本研究首次报道了在食管鳞癌中应用靶向 Stat3 的 siRNA 能够促进食管鳞癌细胞发生凋亡。

在前期<sup>[8-9]</sup>证实食管鳞癌中存在持续性激活的 Stat3 信号的基础上, 应用化学合成的 100nM 的 Stat3 siRNA 体外转染食管鳞癌细胞株 EC9706, 发现转染后 72 小时, 细胞内 Stat3 mRNA、Stat3 蛋白和 p-Stat3 蛋白的表达基本消失; 由于 p-Stat3 蛋白是 Stat3 蛋白第 705 位酪氨酸磷酸化后形成的活化形式, 也是穿入细胞核中调控基因转录的核结合蛋

白, 因此, p-Stat3 蛋白表达的降低水平也就意味着 Stat3 信号发挥的阻断水平。提示 Stat3 siRNA 对 Stat3 基因的沉默作用具有高效特异性。凝胶滞留实验 DNA 水平直接证实 Stat3 siRNA 能够抑制 Stat3 蛋白的 DNA 结合活性, 阻断了 Stat3 信号的持续性激活。以上结果表明 Stat3 siRNA 可以高效特异地将食管鳞癌细胞中 Stat3 基因沉默, 阻断癌细胞中 Stat3 信号通路的持续性激活, 为进一步研究 Stat3 信号通路在食管鳞癌细胞增殖、凋亡中的作用及对下游靶基因的表达调控机制奠定了基础, 同时也为食管鳞癌中针对 Stat3 信号通路的肿瘤基因治疗提供了新的策略和技术平台。

持续性激活的 Stat3 信号通路在肿瘤的发生中具有重要的作用, 与它调控一些与细胞基本生理功能有关的靶基因是分不开的。Stat3 能够通过调控 CyclinD1 和 c-Myc 使细胞进入增殖周期<sup>[10-11]</sup>, 通过诱导 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 和 Survivin<sup>[12-13]</sup>促使细胞抵抗凋亡, 通过调控 VEGF、MMP-7 的转录促进肿瘤的浸润和转移<sup>[14-15]</sup>。前期<sup>[8-9, 16]</sup>研究结果表明在食管鳞癌中存在着持续性激活的 Stat3 信号通路和高表达的 Bcl-2。但 Bcl-2 是不是食管鳞癌中激活的 Stat3 信号直接调控的下游靶基因, 是否参与了 Stat3 siRNA 的抗肿瘤机制尚不清楚。本研究将 siRNA 转染食管鳞癌细胞 48h 后, 发现细胞融合度变差, 贴壁减少, 形态变小变圆, 细胞皱缩, 颗粒增多, 增殖减慢, 培养液中出现较多的悬浮细胞。同时, 流式细胞仪检测发现转染后 72 小时出现了较多的凋亡细胞。Western blot 结果显示转染后 72 小时随着 Stat3 蛋白表达的下降及 Stat3 信号活性的降低, 细胞中 Bcl-2 的表达受到明显抑制, 提示 Bcl-2 是受 Stat3 直接调控的下游靶基因, 食管鳞癌组织中持续性激活的 Stat3 信号通路至少部分是通过上调 Bcl-2 的表达促进食管鳞癌细胞抗凋亡作用。

本研究表明, 应用 RNAi 技术沉默 Stat3 基因, 可高效特异地抑制 Stat3 蛋白的表达及激活, 从 DNA 水平直接抑制活化的 Stat3 蛋白的 DNA 结合能力, 特异性阻断组成性激活的 Stat3 信号, 并在此过程中伴随着 Bcl-2 基因表达的升高、细胞凋亡的增加, 形态学和生物学行为发生改变。说明 Stat3 基因在人食管鳞癌的发生、发展中可能起着促进作用。深入了解 Stat3 信号的作用机制有可能为肿瘤的治疗提供理论基础, 同时 siRNA 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 Jr, 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 Jr. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997, 277(5332):1630-1635.
- [3] Mora LB, Buettner R, Seigne J, et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines; direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6659-6666.
- [4] Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, et al. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2):594-600.
- [5] Nagpal JK, Mishra R, Das BR. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis [J]. *Cancer*, 2002, 94(9):2393-2400.
- [6] Nagpal JK, Jin YT, Tsai ST, et al. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(2):344-349.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494-498.
- [8] 王新华, 李珊珊, 阎爱华, 等. 食管鳞癌细胞系中 STAT3 的激活及 VEGF 和 BCL-2 的表达 [J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(6): 325-328.
- [9] 王新华, 李珊珊, 阎爱华, 等. STAT3 在食管鳞癌细胞系中的激活及其靶基因产物的表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(4):441-444.
- [10] Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9):1143-1148.
- [11] Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells [J]. *Immunity*, 1999, 10(1):105-115.
- [12] Kim KW, Mutter RW, Cao C, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 activity results in down-regulation of Survivin following irradiation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11):2659-2665.
- [13] Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells [J]. *Biochem J*, 2005, 392(Pt 2):335-344.
- [14] 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.
- [15] Udayakumar TS, Stratton MS, Nagle RB, et al. Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and Stat3 [J]. *Neoplasia*, 2002, 4(1):60-67.
- [16] 王新华, 李珊珊, 阎爱华, 等. 小干扰 RNA 阻断信号转导子和转录激活子 3 信号对食管鳞癌细胞株增殖的抑制作用 [J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(6):379-383.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]