

# RNA 干扰技术沉默 STAT3 对人肺癌细胞生长抑制的作用

孙绍娟,王鸿程,许学亮,孔志斌,简丽萍,曹 兵

**Knockdown of STAT3 Gene Expression Using siRNA Inhibits Growth of Lung Cancer Cell Lines**

SUN Shao-juan, WANG Hong-cheng, XU Xue-liang, KONG Zhi-bin, JIAN Li-ping, CAO Bing

Department of Respiration, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

**Abstract:** **Objective** To study the effects of pSUPER-siRNA-STAT3 gene on the growth of A549 cells. **Methods** Two pairs of DNA template coding siRNA were synthesized against STAT3 to reconstruct pSUPER-siRNA-STAT3. Which was transfected into A549 cells. The STAT3 expression in A549 were transfected with pSUPER-siRNA-STAT3, and it was detected by RT-PCR and cells viability by fluorescence microscope. **Results** The siRNA eukaryotic expression vector against STAT3 mRNA was successfully constructed, which was transfected into A549 cells. The level of STAT3 mRNA in A549 cells was inhibited by the specific siRNAs. The decrease of STAT3 mRNA expression began to appear 24 hours after transfection. And the most apparent interfering efficiency was 85.32%, 48 hours after transfection, which was markedly higher than that in the cells transfected with the control siRNAs. Both siRNAs from different loci had interfering effect on STAT3 mRNA expression, but there was no significant difference between them. Compared with those control cells, the apoptotic rates were significantly higher in siRNA transfected cells by fluorescence microscope. **Conclusion** pSUPER-siRNA-STAT3 could significantly inhibit STAT3 expression, suppress the growth of A549 cells. The RNA interfering technique targeted on STAT3 may provide a new method in the gene therapy of lung cancer.

**Key words:** Lung cancer; RNAi; STAT3; Apoptosis

**摘要:**目的 探讨 RNA 干扰技术沉默 STAT3 基因表达对肺腺癌 A549 细胞的生长抑制作用。方法 针对 STAT3 mRNA 序列设计合成 2 对编码 siRNA 的 DNA 模板, 构建 pSUPER-siRNA-STAT3 重组质粒, 转染 A549 细胞; 采用 RT-PCR 法检测重组质粒对 STAT3 基因表达的影响; 在荧光显微镜下观察细胞的凋亡情况。结果 成功构建 pSUPER-siRNA-STAT3 重组质粒, 并成功转染 A549 细胞。特异性 siRNA 片段能有效降低 STAT3 mRNA 水平, 最大干扰效率达 85.32%, 明显高于空质粒对照组; 干扰作用于转染后 24 h 即可出现, 48 h 达高峰, 72 h 降低。对应不同位点的两个 siRNA 片段对 STAT3 均可产生干扰作用, 彼此间差别不大。在荧光显微镜下, 与未转染细胞相比, 转染 siRNA 的 A549 细胞中凋亡细胞所占比例明显增加。结论 pSUPER-siRNA-STAT3 可抑制 STAT3 在人肺腺癌 A549 细胞中的表达, 并抑制肿瘤细胞的生长, 促进其凋亡。以 STAT3 为靶点的 RNA 干扰技术可望成为肺癌基因治疗的新方法。

**关键词:** 肺癌; RNA 干扰; STAT3; 凋亡

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)08-0565-03

## 0 引言

进入 21 世纪后, 基因重组和靶向治疗为我们寻找新的肺癌治疗途径提供了前景, 但是如何选择准

确的靶点, 目前仍存在很多技术问题。

研究发现, 信号转导子和转录激活子 3 (STAT3) 的过度激活及表达可导致细胞的无限生长, 抑制凋亡, 发生癌变, 但主要限于血液肿瘤及头颈部实体瘤<sup>[1,2]</sup>。我们最近对 NSCLC 的研究也发现 STAT3 的过表达<sup>[3]</sup>。RNA 干扰 (RNAi) 技术是以 mRNA 为靶点, 在转录后使其沉默, 不直接干扰 DNA, 具有特异、高效、简便快捷和小干扰 RNA (siRNA) 可在细胞间转移等特点<sup>[4-7]</sup>。本实验利用

收稿日期: 2006-08-14; 修回日期: 2006-11-08

基金项目: 四川省科技厅重点资助项目 (03JY029-009)

作者单位: 646000 四川泸州医学院附属医院呼吸内科

通讯单位: 王鸿程, E-mail: hongchengw49@yahoo.com.cn

作者简介: 孙绍娟 (1977-), 女, 硕士, 医师, 主要研究方向为肺癌基础与临床

RNAi 技术,针对 STA T3 基因的 2 个不同部位设计 2 对 siRNA ,用带有 u6 启动子的质粒 pSUPER 构建 siRNA-STA T3 表达载体,转染人肺腺癌 A549 细胞,阻抑 STA T3 基因的过度表达,诱导肿瘤细胞凋亡,初步探讨其作为治疗肺癌新的基因靶位的可行性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

siRNA 片段:从 STA T3 基因编码区起始密码子下游寻找符合设计特征的靶序列(989-1007 核苷酸碱基序列 CATCTGCCTA GATCGGCTA 与 2144-2162 核苷酸碱基序列 GCA GCA GCTGAA-CAACATG),上述序列用 BLAST 软件进行同源分析证实为 STA T3 高度保守,采用化学合成法合成。主要试剂:带有 u6 启动子的质粒载体(pSUPER)及肺腺癌 A549 细胞均由四川大学华西医院提供,T4 DNA 连接酶、EcoR II 和 Hind 限制性内切酶、质粒提取试剂盒及 RT-PCR 相关试剂由上海生工提供,E. coli DH5 感受态细胞由大连宝生物公司提供,脂质体(lipofectamine2000)、Trizol 试剂由 Invitrogen 提供。

#### 1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pSUPER 3/siRNA 3/STAT3 的构建及鉴定 从 GenBank 中 STAT3 mRNA (NM003150)上寻找符合特征的靶序列,合成分别针对其编码区碱基序列的两条 DNA 寡核苷酸链(分别为 STA T3-1,-2),设计的寡核苷酸序列 5'端和 3'端分别含 BglII 和 HindIII 酶切位点。5'端开始为 19 个核苷酸的 siRNA 作用链序列,中间以 9 个核苷酸的 TTCAAGAGA 间隔形成发夹结构,最后为 siRNA 作用序列的反向重复序列;3'末端加有转录终止信号 TTTTT。合成的两条互补寡核苷酸链在退火缓冲液作用下退火,形成双链结构。pSUPER 经 BglII 和 HindIII 双酶切线性化,在 T4 DNA 连接酶的作用下与退火后形成的双链结构连接,形成 pSUPER-siRNA-STA T3 重组质粒。提取重组质粒进行 PCR 及测序鉴定。

1.2.2 细胞培养及转染 肺腺癌 A549 细胞 1 × 10<sup>6</sup>个分别接种于 100 ml 培养瓶中,培养至 80% ~ 90% 细胞融合。用无血清培养液洗 3 遍,将构建的重组质粒和 pEGFP 按 20 : 1 的比例共转染(标记阳性转染细胞),与脂质体的混合物室温放置 10 min,与无血清培养液混合再放置 10 min,加入培养瓶中。将转染后细胞在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后弃上清,加入 10% 培养液继续培养至 48 h、72 h 收

获细胞,期间相差显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.3 cDNA 合成 用 Trizol 提取细胞总 RNA 后,取 10 μg 加入 10 mmol/L dNTP 5 μl、5 × 第一链缓冲液 10 μl、RNase Inhibitor 2.5 μl、随机引物 5 μl、反转录酶 SuperScript 2.5 μl,加 DEPC 处理水至 50 μl,42 ℃ 反应 50 min。向第一链反应混合物中加入 10 × 第二链缓冲液 25 μl、E. coli DNA Pol 4 μl、E. coli RNase H 1 μl、E. coli DNA Ligase 1.5 μl,加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 250 μl,12 ℃ 1 h,22 ℃ 1 h,加入 2.5 μl 0.5 mol/L EDTA 中止反应;用酚:氯仿(25 : 24)抽提 1 次,乙醇、醋酸钠沉淀后溶于 10 μl ddH<sub>2</sub>O 中。

1.2.4 荧光探针 RT-PCR 扩增与分析 按试剂盒操作说明进行,总反应体系 50 μl,93 ℃ 变性 3 min 后按如下条件进行循环:93 ℃ 30 s、55 ℃ 45 s,共 45 个循环。实验结果由电脑自动保存并分析。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

2.1.1 菌落 PCR 验证阳性克隆 在 pSUPER 载体上设计 PCR 的引物,上游设计在插入片段之前,下游设计在插入片段之后,如果是空载体,扩增片段为 246bp,如果是阳性克隆,即插入了 64 个碱基,则扩增片段为 310bp(见图 1),第 1 和第 7 泳道为阳性克隆。

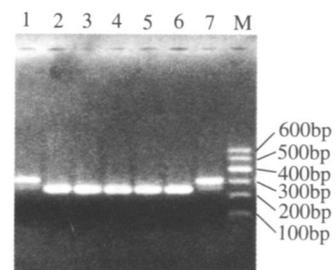


图 1 1% 普通琼脂糖电泳结果

### 2.1.2 测序结果

经上海生工生物工程技术有限公司测序,进一步证实重组载体序列正确。

第 1 条链 GGGCCCGCGGGAACCCCA GCGCGCGT GCGCCCTGGCA GGAA GATGGCTGTGA GGGACA GGGG A GTGGCGCCCTGCAA TATTTGCA TGTCGCTATGTGTT CTGGGAAA TCACCTAAACGTGAAA TGCTCTTGGATT TGGGAA TCTTA TAA GTTCTGTATGA GACCACA GATC CCCCATCTGCCTA GATCGGCTATTCAAAGATAGCCGATC TAGGCAGATGTTTTGGAAA. ....

第 2 条链 GGGCCCA GTGTCACTA GCGGGAACAC CCA GCGCGCGT GCGCCCTGGCA GGAA GATGGCTGTGA GGGACA GGGGA GTGGCGCCCTGCAA TATTTGCA TGT

CGCTATGTGTTCTGGGAAA TCACCA TAAACGTGAAA  
TGTCTTTGGA TTTGGAA TCTTA TAA GTTCTGTA TG  
A GACCACA GATCCCCCATCTGCCTAGATCGGCTATTCAAG  
AGATAGCCGATCTAGGCAGATGTTTTTGGAAAA.....

2.2 RNA 干扰的特异性、时效性及靶向位点性

与空白对照组、空质粒对照组对比,RT-PCR 检测发现,对照组 STA T3 mRNA 无明显变化,而重组质粒组含量明显下降,两条链最大干扰效率分别达75.00%、82.32%;于转染后 24 h,STA T3 mRNA 的含量已出现下降,最大的干扰作用出现在 48 h,72 h 后 STA T3 mRNA 的表达水平略有回升,但两条链的干扰效率无明显差异(图 2)

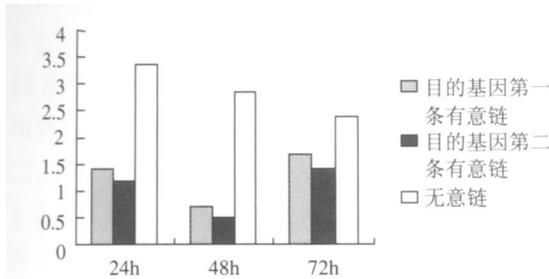


图 2 STAT3 mRNA 分析结果

2.3 A549 细胞凋亡敏感性

与对照组相比,重组质粒组细胞发生了明显变化,从相差显微镜下观察,可见对照组细胞贴壁生长,状况良好,多为梭形,大小适中,核仁清晰,核分裂相明显;siRNA-STA T3 组细胞数量明显减少,形态不规则,细胞核皱缩,颗粒增多,细胞碎片增加,细胞凋亡随着时间推移更加明显,图 3 略。

3 讨论

STA T3 是一种存在于细胞浆与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白。人们最初发现在 v-src 诱导的 NIH3 细胞分化过程中,STA T3 的激活是不可缺少的条件,其过度激活及表达通过对抗凋亡导致肿瘤细胞生长失控。目前针对 STA T3 靶基因的反义技术及显性负性蛋白在体内的表达已成功地诱导了肿瘤细胞凋亡,这在多发性骨髓瘤、黑色素瘤、头颈部肿瘤及头颈部鳞状细胞癌中已得到证实<sup>[8-9]</sup>。我们的研究发现 STA T3 蛋白在肺癌组织中有异常表达,但其对肺癌细胞的凋亡情况尚未见报道。在本研究中,我们采用 RNA 干扰技术,将对应 STA T3 的 siRNA 片段成功转染入肺腺癌 A549 细胞株,在 mRNA 水平上封闭其表达,并观察了转染前后 A549 细胞 STA T3 基因表达的变化及细胞的凋亡情况。结果表明,与对照组和空载体转染组相比,转染 siRNA 序列的 A549 细胞 STA T3 基因水平明显降低。细胞凋亡明显增加,研究结果提示

STA T3 有可能成为未来肺癌治疗的潜在性靶点。

研究结果也充分证实了 RNA 干扰的高度特异性:转染对应 STA T3 的 siRNA 片段可特异性降低目的基因的 mRNA 水平,而转染空质粒却几乎不产生任何干扰作用。但对应某一基因可能设计出许多对 siRNA,而并非所有的片段都能产生高效的沉默作用。因此,设计、选择最佳的 siRNA 片段成为了 RNA 干扰研究的关键点之一。在本实验中两条针对 STA T3 基因设计的 siRNA 链转染入 A549 细胞 48 h 后,干扰效率分别为 75.00%、82.32%,这提示对应这 2 个不同位点的 siRNA 片段均具有一定强度的基因沉默功能。Abedini 等将对应 STA T3 基因另 3 b4 个不同位点的 siRNA 片段转染入人类卵巢癌细胞株,也达到了较好的封阻效果。但这种封阻能力的相接近性是否与细胞类型、STA T3 的表达水平等因素有关,还有待于进一步探讨。

综上,我们的实验初步证实了以 STA T3 为目的基因,通过 RNAi 技术可特异性地抑制其在肺腺癌 A549 细胞中的过度表达及诱导肿瘤细胞凋亡有可能成为未来肺癌治疗的潜在性靶点。但作为实验手段的 RNAi 技术的分子机制目前仅被初步了解,虽在基因功能、疾病治疗等研究方面有成功应用,但仍有许多问题尚需进一步解决。如:如何选择最合适靶序列;如何把它高效的转入动物、甚至患者体内等等,都还需要更深的探索研究。

参考文献:

- [1] J Lara W ,Heiko van der K,Cornelius M,et al. Inhibition of BCR-ABL gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571) [J]. BLOOD, 2003, 102 (6) : 2236-2239.
- [2] J Monika W ,Uta F,Wilhelm W,et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. Oncogene, 2002, 21 (37) :5716-5724.
- [3] 王鸿程,李艳萍,李万成,等. 肺腺癌细胞增殖分化及抗凋亡作用与 STA T3 的调控效应[J]. 中国临床康复, 2005, 9(14) :128-130.
- [4] J Dimitri S,Leigh F,Aparna S,et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures [J]. PNAS, 2003, 5(11) :6347-6352.
- [5] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418 (6894) : 244-251.
- [6] Paul CP,Good PD,Winer I,et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20 (5) :505-508.
- [7] Wilda M,Fuchs U,Wossmann W,et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. Oncogene, 2002, 21 (37) :5716-5724.
- [8] Mesri M,Wall NR, Li J,et al. Cancer gene therapy using a Survivin mutant adenovirus[J]. J Clin Invest, 2001, 108 (7) :981-990.
- [9] McKay TR,Bell S,Tenev T,et al. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases Survivin transcription which can be countered with a dominant -negative mutant, Survivin T34A;a combination gene therapy strategy [J]. Oncogene, 2003, 22 (23) :3539-3547.

[编辑:贺文;校对:张麟]