

• 临床检验研究论著 •

STAT3 表达下调对人肝癌细胞增殖的影响及相关分子机制

李 健, 王丽华, 李 磊
(重庆江津中心医院, 重庆 402260)

摘 要:目的 探讨 RNA 干扰技术下调信号转导和转录激活因子(STAT)3 基因表达对人肝癌细胞增殖的抑制作用及具体机制。方法 构建重组质粒 PLKO-1-shRNA-STAT3, 通过 RT-PCR、Western blot 检测 STAT3 表达的变化; 采用流式细胞术检测细胞周期来反映细胞的增殖状态; 通过 RT-PCR、Western blot 检测 Bcl-2 和 Survivin 表达水平的变化。结果 转染了 PLKO-1-shRNA-STAT3 重组质粒的肝癌细胞, STAT3 表达明显下调, 流式细胞术检测显示 S 期细胞减少, G_0/G_1 期细胞增加($P<0.05$), Bcl-2 和 Survivin 基因的 mRNA 及蛋白表达水平明显低于对照组。结论 RNA 干扰技术明显下调细胞内 STAT3 蛋白的表达, 进而下调 Bcl-2 和 Survivin 的表达水平, 诱导细胞凋亡。

关键词: 肝癌; 信号传导及转录激活因子; 细胞周期; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)15-1951-02

The effect of down-regulating STAT3 expression on growth of human hepatocellular carcinoma cells and its molecular mechanism

Li Jian, Wang Lihua, Li Lei

(Center Hospital of Jiangjin District in Chongqing, Chongqing 402260, China)

Abstract: **Objective** To study the mechanism and the suppression effect on human hepatocellular carcinoma cell by down-regulating the expression of signal transducers and activators of transcription(STAT)3 with RNA interference technology. **Methods** Construct recombinant plasmid PLKO-1-shRNA-STAT3, and detect STAT3 expression by RT-PCR and Western blot, detect cellular cycle by flow cytometry which reflect the cell proliferation. Detect Bcl-2 and Survivin expression by RT-PCR and Western blot. **Results** In hepatoma cells transfected with PLKO-1-shRNA-STAT3 recombinant plasmid, STAT3 expression was significantly reduced, flow cytometry analysis showed a significant reduction in S phase cells, G_0/G_1 phase cells increased significantly($P<0.05$), Bcl-2 and Survivin mRNA and gene protein expression levels were significantly lower than other groups. **Conclusion** The STAT3 protein was down-regulated by RNA interference technology in human hepatocellular carcinoma cell, leading to the reduced expression of Bcl-2 and Survivin, which induce cell apoptosis.

Key words: liver cancer; signal transducers and activators of transcription; cell cycle; apoptosis

原发性肝癌病死率高, 仅次于胃癌、食道癌居第三位, 中国死于肝癌的人数占全世界肝癌死亡人数的 45%^[1]。信号转导和转录激活因子(STAT)3 是 STATs 家族的重要成员^[2], 参与了人类恶性肿瘤的发生、发展, 在抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖方面发挥了重要作用。本实验通过 RNA 干扰技术抑制 STAT3 基因在人肝癌细胞 SMMC-7721 中的表达, 观察肝癌细胞的增殖状态, 及其对凋亡抑制相关蛋白的影响, 为肝癌治疗寻找新的靶点^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料 真核表达质粒 PLKO-1 来自本院实验室, STAT3、Bcl-2、Survivin 和 GAPDH 的抗体均购自 Abcam 公司, 二抗购自 Santa Cruze 公司, 流式细胞术检测试剂盒、转染试剂 Lipo2000 均购自 Invitrogen 公司, 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中科院细胞库。

1.2 PCR 引物设计 STAT3-shRNA 引物序列, 正向: 5'-GCA GCA GCT GAA CAA CAT GTT CAA GAG CAT GTT GTT CAG CTG CTG CTT TTT-3'; 反向: 5'-AAT TAA AAA GCA GCA GCT GAA CAA CAT GTC TCT TGA ACA TGT TGT TCA GCT GCT GCT GCG GCC-3' 分别经退火合成双链, 插入到质粒载体 PLKO-1。根据 RT-PCR 引物设计的数据库, 设计引物 STAT3 引物, 正向: 5'-GCA GCA GCT GAA CAA CAT GTT CAA GAG ACA TGT TGT TCA GCT GCT

GCT TTT T-3'; 反向: 5'-AAT TAA AAA GCA GCA GCT GAA CAA CAT GTC TCT TGA ACA TGT TGT TCA GCT GCT GCT GCG GCC-3'。Bcl-2 引物序列, 正向: 5'-CGA CTG CTT AGA GAT GTC CAG CCA G-3'; 反向: 5'-ACT GCC ATG CGT AGT GGC CCA CAG-3'。Survivin 引物序列, 正向: 5'-AGC CCT TTC TCA AGG ACC AC-3'; 反向: 5'-GCA CTT TCT TCG CAG TTT CC-3'。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养与转染 人肝癌细胞 SMMC-7721 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养, 培养条件为 5% CO_2 , 37℃ 恒温培养箱, 每 2~3 d 传代一次。按转染试剂说明书进行细胞的转染。按不同处理方式将细胞分为 3 组, 对照组: 不做任何处理的肝癌细胞 SMMC-7721; Mock 组: 转染阴性对照质粒 PLKO-1-shRNA-Control 的细胞组; 实验组: 转染重组质粒 PLKO-1-shRNA-STAT3 的细胞组。转染 24 h 后, 提取细胞 RNA 用于目的基因 mRNA 的 RT-PCR 检测, 并进行 STAT3 的 Western blot 检测。

1.3.2 Western blot 检测目的蛋白的表达变化 用蛋白裂解液处理细胞, 收集蛋白样品。将蛋白样品用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 每孔加入 50 μ g 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 将蛋白转到 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 加一抗 Actin(1:1 000 稀释)、STAT3(1:1 000 稀

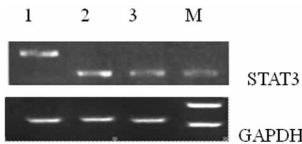
释),4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min×3 次后, 加二抗(1:3 000)稀释, 室温 1 h, TBST 洗膜 10 min×3, ECL 发光检测目的蛋白的表达变化。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞周期变化 每组各取约 1×10^6 个细胞, 培养 48~72 h 后用胰酶消化收集细胞, PBS 洗两遍, 弃上清, 加入 1 mL 70% 预冷乙醇中, 4 ℃ 固定 12 h, PBS 洗涤去乙醇, RNAaseA 消化 30 min, 然后用碘化丙啶(PI)染色, 细胞于流式细胞仪进行细胞周期定量分析, 实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行数据分析, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间的比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

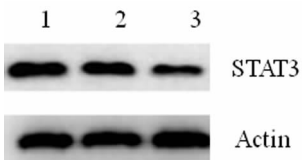
2 结 果

2.1 转染细胞的 STAT3 的表达水平 STAT3 的 mRNA 表达水平: 对照组与 Mock 组相比无明显差异; 实验组与其他两组比, 差异明显, STAT3 表达受到抑制, 见图 1。Western blot 测得的 STAT3 蛋白表达水平, 也是实验组明显低于其他两组, 见图 2。



1: 对照组; 2: Mock 组; 3: 实验组; DNA 分子标记物。

图 1 STAT3 的 mRNA 表达水平



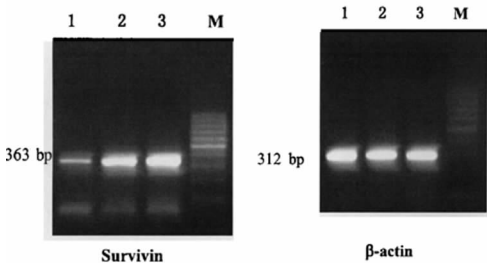
1: 对照组; 2: Mock 组; 3: 实验组。

图 2 STAT3 的蛋白表达水平

2.2 肝癌细胞细胞周期变化 实验组与对照组、Mock 组相比较, S 期细胞比例明显减少, G₀ 和 G₁ 期细胞比例增加 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 流式细胞术检测各细胞周期细胞所占比例($\bar{x}\pm s, \%$)

分组	不同细胞周期的细胞比例	
	G ₀ 和 G ₁ (%)	S (%)
对照组	58±0.42	26.00±0.20
Mock 组	69±0.22	16.38±0.32
实验组	71±0.35	19.00±0.29

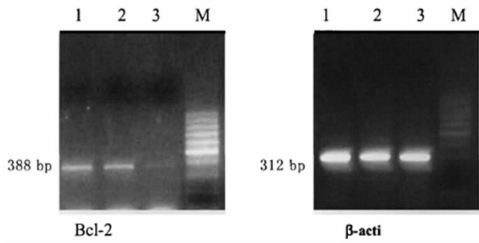


1: 对照组; 2: Mock 组; 3: 实验组; M: DNA 分子标记物。

图 3 Survivin 的 mRNA 表达水平

2.3 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Survivin mRNA 表达水平的变化

对照组与 Mock 组比较, Bcl-2 和 Survivin mRNA 的表达水平无明显差异; 实验组与对照组、Mock 组比较, 中 Bcl-2 和 Survivin mRNA 的表达水平明显降低, 见图 3、4。



1: 对照组; 2: Mock 组; 3: 实验组; M: DNA 分子标记物。

图 4 Bcl-2 的 mRNA 表达水平

2.4 Western blot 检测 Bcl-2 和 Survivin 的蛋白表达量 实验组中 Bcl-2 和 Survivin 的蛋白表达量水平与与对照组、Mock 组比较明显下调, 见图 5。



1: 对照组; 2: Mock 组; 3: 实验组。

图 5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Survivin 的蛋白表达水平

3 讨 论

STATs 是胞浆蛋白家族, 在多种类型的细胞和组织中, 均发现有 STATs 蛋白的表达, 它不仅参与了细胞生长、分化、凋亡等多种生理过程, 而且调控炎症、肿瘤和免疫反应^[4], 其中 STAT3 与肿瘤关系最密切的, 作为白细胞介素-6(IL-6)信号传递中的急性反应因子被发现。STAT3 同样广泛存在于多种类型的细胞和组织中, 调控细胞的增殖、分化及凋亡。有文献报道 STAT3 参与信号转导通路的活化与肝癌密不可分^[5], 所以 STAT3 可成为肝癌治疗的潜在靶点^[6]。

RNA 干扰技术可针对某些特异性的基因进行剔除或关闭, 在基因功能研究和恶性肿瘤的基因治疗等领域被广泛采用^[7]。在肝癌细胞, 高表达的端粒逆转酶, c-myc, survivin 等基因已通过 RNAi 技术被成功抑制。本研究, 针对人的 STAT3 基因, 构建了 PLKO-1-shRNA-STAT3 表达载体, 通过 PCR、Western Blot, 发现 STAT3 基因被有效抑制。流式细胞仪检测细胞周期, 发现转染 PLKO-1-shRNA-STAT3 表达载体后, 肝癌细胞 SMMC-7721 多数进入 DNA 合成期, G₀/G₁ 期细胞比例较大, S 期细胞比例较小, 细胞增殖被抑制, 凋亡加速^[8]。Survivin 为凋亡蛋白抑制因子, 仅仅在恶性肿瘤组织中特异地表达, Survivin 通过 caspase 信号通路参与调控细胞的凋亡。Survivin 抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性, 直接作用 caspase 信号通路, 抑制凋亡。Survivin 也可通过 p21 间接抑制 Caspase。在细胞凋亡过程中, 同样发挥重要作用的是 Bcl-2 家族。根据参与细胞凋亡功能的不同, Bcl-2 家族分为两大类, 一类是抗凋亡的, 主要有 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 等, 另一类是促细胞死亡的, 主要包括 Bax、Bak、Bad、Bid 等。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的, 特别是当细胞受到外界刺激时, 可以保护细胞免于凋亡^[9], 很多肿瘤细胞逃避线粒体调控的凋亡, 主要是由 Bcl-2 表达导致^[10]。进一步通过 RT-PCR 和 Western Blot, 实验组肝癌细胞 SMMC-7721 中 Bcl-2 和 Survivin 的 mRNA、蛋白表达水平和对照组与 Mock 组相比较, 均明显下调。本实验发现, 通过 RNAi 技术抑制 STAT3 基因在肝癌细(下转第 1954 页)

表 2 ITP 患儿外周血淋巴细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD19 ⁺
ITP 组(<i>n</i> = 57)	61. 69 ± 6. 14 *	30. 68 ± 7. 40 *	25. 02 ± 6. 78	13. 64 ± 5. 67	17. 79 ± 4. 95 *
ITP-EB 病毒感染组(<i>n</i> = 48)	58. 40 ± 8. 14 * #	25. 20 ± 5. 42 * #	27. 80 ± 7. 07 * #	10. 40 ± 6. 04 #	22. 70 ± 9. 28 * #
对照组(<i>n</i> = 59)	68. 55 ± 9. 29 #	37. 10 ± 7. 95 #	24. 12 ± 4. 85	11. 67 ± 4. 92	10. 56 ± 1. 41 #

* : 与对照组比较, *P* < 0. 05; # : 与 ITP 组比较, *P* < 0. 05。

3 讨 论

随着儿童慢性难治性 ITP 比例的增加, 目前常规的治疗手段对 ITP 的疗效有限, 亟需进一步研究 ITP 病因及发病机制以指导临床治疗。经典的 ITP 发病机制是由于单核-巨噬细胞系统中自身抗体介导的血小板破坏增加、骨髓巨核细胞损伤或功能异常使血小板减少, 而 B 细胞产生血小板抗体是血小板被破坏的直接原因, B 细胞的激活需要自免疫 T 细胞的活化。有研究显示 ITP 患儿 T 细胞免疫功能异常是关键^[4], 而病毒感染造成的交叉抗原反应被认为是 ITP 发病的主要原因之一^[5]。

EB 病毒感染后机体可产生与正常组织蛋白发生交叉反应的自身抗体, 可使血小板相关抗体和血小板相关免疫球蛋白 G (PAIGG) 增高, 其抗原决定簇主要位于血小板膜糖蛋白 GP II b 上, PAIGG 直接结合在血小板 GP II b, 可加速循环血中血小板的清除, 引起血小板减少^[6]。此外, EB 病毒还可以直接破坏巨细胞, 从而抑制血小板的产生。EB 病毒感染患儿 WBC 增高提示 EB 病毒具有活化细胞周期, 促进细胞大量增值的作用。EB 病毒感染发病机制复杂, 因为 B 淋巴细胞上有 EB 病毒受体(CR2 或 CD21 的糖蛋白), 因此 EB 病毒感染后 B 淋巴细胞首先累及, 但 B 淋巴细胞并不支持 EB 病毒复制, 而成为“储藏库”, 继之 T 淋巴细胞出现强烈反应, 导致炎症介质的高水平分泌(IL-1、IFN、TNF 等), 从而出现 T 淋巴细胞的分化异常。有文献报道活化 T 淋巴细胞的凋亡相关蛋白 Fas/FasL 及 Bcl-2 表达异常, 从而产生异常的细胞免疫应答是临床多样性的基础^[7]。本研究发现 ITP 伴 EB 病毒感染患儿与无 EB 病毒感染的 ITP 患儿比较, CD3⁺ T 细胞、CD4⁺/CD8⁺、CD3-CD16⁺CD56⁺ 的 NK 细胞降低, CD3⁺CD8⁺ 的 T 细胞、CD19⁺ 的 B 细胞升高。EB 病毒感染的 ITP 患儿调节性 T 细胞比例

降低, 免疫自稳功能减弱; NK 细胞降低提示其对 B 细胞激活、增值、分化和抗体应答抑制能力下降, 从而使 B 细胞异常活化, 体液免疫过强导致发病; 而 B 细胞增高可能是抗血小板克隆异常扩增活化的结果。综上所述, 对 ITP 患儿检测 EB 病毒, 有助于探讨 ITP 的发病机制及指导临床治疗。

参考文献

[1] Yetman RJ. Evaluation and management of childhood idiopathic (immune) thrombocytopenia[J]. J Pediatr Health Care, 2003, 17 (5): 261-263.

[2] France EK, Glanz J, Xu S, et al. Risk of immune thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella immunization in children [J]. Pediatrics, 2008, 121(3): 687-692.

[3] Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(10): 757-768.

[4] Zhang F, Chu X, Wang L, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Eur J Haematol, 2006, 76(5): 427-431.

[5] Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases [J]. FASEB J, 1998, 12(13): 1255-1265.

[6] Aref S, Selim T, Ibrahim L, et al. Flow cytometry detection of platelets autoantibodies in children with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2009, 25(3): 96-103.

[7] 成胜权. EB 病毒感染的临床多样性与细胞凋亡的遗传基础[J]. 国外医学: 儿科学分册, 1999, 26(2): 63-65.

(收稿日期: 2013-04-17)

(上接第 1952 页)

胞中的表达, 可以抑制肝癌细胞的增殖, 促进肝癌细胞的凋亡, 因此 STAT3 基因可成为肝癌治疗中重要的靶点。

参考文献

[1] 陈陶阳, 朱源荣. 我国肝癌发病趋势及展望[J]. 肿瘤, 2008, 28 (10): 908-910.

[2] Ma SM, Jiao BZ, Liu X, et al. Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(2): 157-163.

[3] 黄文方, 张鹏辉, 刘华, 等. RNA 干扰体外抑制肝癌细胞端粒逆转酶基因表达的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 423-425.

[4] 闫歌, 蒲丹, 唐觉, 等. RNA 干扰技术对肝癌细胞内源 survivin 基因表达的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(9): 829-833.

[5] 邱伟华, Zhou BS, Darwish D, et al. STAT3 在 SAmE 抑制 HepG2 细胞 VEGF 表达中的作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2006, 26(6): 576-580.

[6] Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melano-

ma on multiple fronts[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(2): 315-327.

[7] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58 (23): 5315-5320.

[8] Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 351-362.

[9] Kanda N, Seno H, Konda Y, et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric Cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(28): 4921-4929.

[10] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127-134.

(收稿日期: 2013-03-28)