

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.014

STAT3 小干扰 RNA 的构建及对缺氧复氧人肾小管 上皮细胞凋亡的影响 *

斯妍娜 韩 流 程 浩 吕云落 蔡朦朦 谢欣怡 鲍红光[△]

(南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)麻醉科 江苏 南京 210006)

摘要 目的:构建信号转导与转录因子 3(STAT3)小干扰 RNA(siRNA)表达载体,并观察其对缺氧复氧后人肾小管上皮细胞(HKC)凋亡的影响。**方法:**设计 3 对人 STAT3 siRNA 靶序列,用 DNA 重组技术克隆至质粒 pRNAT-U6.1/neo 中,构建重组质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA,检测并筛选出最佳抑制效率的 siRNA 质粒载体。重组质粒转染至缺氧复氧后 HKC 细胞,Western blotting 和 Real Time-PCR 测定 STAT3 蛋白和 mRNA 表达量,流式细胞仪测定细胞凋亡,间接荧光法测定 Bcl-2 和 Bax 表达的变化。**结果:**靶向 STAT3 基因表达的质粒载体构建成功,并筛选出抑制效率最佳的重组质粒。缺氧复氧后 HKC 细胞 STAT3 表达、凋亡率和 Bax/Bcl-2 比值增加;缺氧复氧后 HKC 细胞转染重组质粒后 STAT3 表达、凋亡率和 Bax/Bcl-2 比值明显降低。**结论:**成功构建并筛选最佳抑制效率的靶向 STAT3 的重组质粒载体。该载体可有效抑制缺氧复氧后 HKC 细胞中 STAT3 信号转导通路的活化,并进一步通过上调 Bcl-2、下调 Bax 蛋白的表达,从而抑制细胞凋亡。

关键词:信号转导与转录因子 3;小干扰 RNA;缺氧复氧;肾小管上皮细胞

中图分类号:Q78;R69 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2858-05

Construction of the Vector Expressing Small Interference RNA Targeting STAT3 Gene and its Effect on Apoptosis of Human Tubular Epithelial Cells Induced by Hypoxia-Reoxygenation Injury*

SI Yan-na, HAN Liu, CHENG Hao, LV Yun-luo, CAI Meng-meng, XIE Xin-yi, BAO Hong-guang

(Department of Anesthesiology, Affiliated Nanjing Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210006, China)

ABSTRACT Objective: To construct the vector expressing small interference RNA targeting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene and to investigate its effect on apoptosis of human tubular epithelial cells (HKC) induced by hypoxia-reoxygenation injury. **Methods:** Design 3 pairs of small interference RNA sequences targeting STAT3 gene and clone into plasmid pRNAT-U6.1/neo to construct recombinant plasmid pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA within which the best suppressive efficiency plasmid was determined and elected. Recombinant plasmid was transfected into HKC induced by hypoxia-reoxygenation injury. The expression of STAT3 protein and mRNA were determined by western blotting and RT-PCR. The apoptosis was measured by flow cytometry (FCM). The expression of Bcl-2 and Bax was determined by indirect fluorescence method. **Results:** The recombinant plasmid was constructed successfully. Select the best recombinant plasmid which produced the best suppression effect. The expression of STAT3, the apoptosis rate and the ratio of Bax/Bcl-2 of HKC induced by hypoxia-reoxygenation injury was significantly increased. The expression of STAT3, the apoptosis rate and the ratio of Bax/Bcl-2 was significantly decreased after recombinant plasmid was transfected into HKC induced by hypoxia-reoxygenation injury. **Conclusion:** The recombinant plasmid was constructed successfully. This recombinant plasmid can effectively inhibit the activity of STAT3 pathway of HKC induced by hypoxia-reoxygenation injury, upregulate the expression of Bcl-2 and downregulate the expression of Bax, which cause the apoptosis of cells.

Key words: Signal transducer and activator of transcription 3; Small interference RNA; Hypoxia-Reoxygenation; Tubular Epithelial Cell

Chinese Library Classification(CLC): Q78; R69 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)15-2858-05

前言

临床上,肾缺血再灌注损伤(IRI)常见于肾脏移植手术、休

克、重度创伤和心血管手术等重症创伤和大手术中。肾脏在缺血的基础上恢复血流,组织损伤进一步加重。肾 IRI 导致围术期急性肾损伤(AKI)高发,严重者可致急性肾功能衰竭,使死

* 基金项目:南京市医学重点科技发展项目(201108028);南京市医学科技发展项目(YKK12085)

作者简介:斯妍娜(1974-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:围术期脏器保护,025-52271032, E-mail:siyanna@163.com

△通讯作者:鲍红光, E-mail: hongguang_bao@hotmail.com

(收稿日期:2013-11-15 接受日期:2013-12-12)

亡率增加。细胞的缺氧复氧性损伤和组织 IRI 有非常相似之处,是常用的体外研究方法。肾脏 IRI 的发生机制与活性氧大量产生、细胞内钙超载、中性粒细胞活化和高能磷酸化合物生成障碍等有关,导致细胞凋亡、增殖或分化^[12]。信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)是 STAT 家族的重要成员,其信号转导通路与细胞的增殖分化、凋亡和免疫逃逸密切相关^[13]。小干扰 RNA (siRNA)技术具有序列特异性和抑制基因表达的高效性,引发体内序列特异性基因转录后的基因沉默^[9]。本研究拟观察靶向 STAT3 小干扰 RNA (siRNA)对缺氧复氧后人肾小管上皮细胞 (HKC) 细胞凋亡的影响,为围术期肾 IRI 的靶向基因治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞与制剂

人肾小管上皮细胞(HKC)购自上海艾研生物科技有限公司。质粒 pRNAT-U6.1/neo 购自 Ambion 公司,带有 GFP 基因和新霉素(neo)抗性基因。大肠杆菌 DH5 α 由南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)实验中心保存。质粒小量提取试剂盒购自北京博克泰克公司。Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒、无血清培养基 DMEM/F12、RPMI-1640 培养液和 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。总 RNA 提取试剂盒(RNA fast 200) 购自上海飞捷生物有限公司。限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Hind* III、RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKara 生物公司。胎牛血清(TBS)购自美国 Hyclone 公司。胰蛋白酶购自上海微晶生物技术有限公司。FITC-Annexin-V/PI 细胞凋亡试剂盒购自 Biovision 公司。STAT3 兔抗人多克隆抗体、Bax 和 Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体、二抗羊抗鼠 FITC-IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

采用组织贴壁法培养 HKC 细胞,以含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,常规培养于 37 $^{\circ}$ C、95 % O₂、5% CO₂ 培养

箱中,每隔 2 天更换培养液,当细胞培养至 80 % ~90 % 融合时,用 0.25 % 的胰酶消化传代。实验用第 4 代细胞。

1.3 实验分组

第一部分实验中培养细胞随机分为 4 组: 阴性对照 pRNAT-U6.1/neo 转染组(A 组)、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1 转染组(B1 组)、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2 转染组(B2 组)和 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3 转染组(B3 组)。A、B1、B2 和 B3 组 HKC 细胞分别转染质粒 pRNAT-U6.1/neo、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2 和 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3。第二部分实验中,选择抑制效果最好的质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 转染缺氧复氧后 HKC,随机分成 4 组:正常培养组(D1 组)、缺氧复氧组(D2 组)、阴性对照转染组(D3 组)、重组质粒转染组(D4 组)。D1 组细胞在正常 37 $^{\circ}$ C、95% O₂、5% CO₂ 环境中培养,D2 组细胞在缺氧复氧环境中培养,两组均在缺氧复氧前加入转染液;D3 和 D4 组的细胞在缺氧复氧前分别转染质粒 pRNAT-U6.1/neo、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA,余同 D2 组。

1.4 STAT3 siRNA 目的片段的设计

根据 GenBank 提供的人 STAT3 全长基因设计 siRNA 的靶区^[14],使用 Genscript 公司在线设计软件,选择 mRNA 序列上的 3 个编码区合成目标序列(siRNA1、siRNA2 和 siRNA3)。同时将 siRNA 的碱基序列打乱设计阴性对照,对照序列经 BLAST 检测证实与 siRNA 序列有相同的组成,但和 STAT3 mRNA 和人类其他基因无同源性。根据阴性对照序列和 3 条 siRNA 序列设计 4 对互补的单链 DNA,正义链 5' 端有 *Bam* HI (GGATCC)酶切位点,3' 端有 *Hind* III (AAGCTT)酶切位点和终止信号(TTTTTTCCAA)。siRNA1、siRNA2、siRNA3 和阴性对照片段的 4 对 DNA 单链模板见表 1。完成设计的单链 DNA 模板交由大连 Takara 公司化学合成。

表 1 人 STAT3 siRNA 模板序列
Table 1 Template sequence of human STAT3 siRNA

Sequence	Starting	cDNA	Sense(5'-3')	Sense(3'-5')
siRNA1	455	TCAGCACAATC- TACGAAGA	GATCCCGTCAGCACAATCTACGAA- GATTCAAGAGATCTTCGTAGATTGT- GCTGATTTTTTCCAAA	AGCTTTTGAAAAAATCAGCACAATC- TACGAAGATCTCTTGAATCTTCGTA- GATTGTGCTGACGG
siRNA2	2037	CTGCTAA- GATTCAGT- GAAA	GATCCCGCTGCTAAGATTTCAGT- GAAATTCAGAGATTTCAGT- GAATCTTAGCAGTTTTTCCAAA	AGCTTTTGAAAAAAGTCTGCTAA- GATTCAGT- GAAATCTCTTGAATTTCACTGAATCT- TAGCAGCGG
siRNA3	1243	GCGTCCAGTTCA CTACTAA	GATCCCGCTCCAGTTCACTAC- TAATTCAGAGATTAGTAGT- GAACTGGACGCTTTTTTCCAAA	AGCTTTTG- GAAAAAAGCGTCCAGTTCACTAC- TAATCTCTTGAATTAGTAGTGAAGT- GACGCGG
Negative control		TTCTCC- GAACGTGT- CACGT	GATCCCGCTGCTAAGATTTCAGT- GAAATTCAGAGATTTCAGT- GAATCTTAGCAGTTTTTCCAAA	AGCTTTTGAAAAAAGTCTGCTAA- GATTCAGT- GAAATCTCTTGAATTTCACTGAATCT- TAGCAGCGG

1.5 STAT3 siRNA 重组质粒的构建和鉴定

将分别合成 4 个模板的各 2 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,与经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的质粒 pRNAT-U6.1/neo 连接,热转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上,37℃ 培养过夜,次日挑取平板上的阳性单克隆菌落接种于含 Amp 的 LB 培养液中,摇菌过夜,碱裂解法小提质粒。双酶切质粒并以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳初步确定重组载体后,送交大连 Takara 公司测序。构建的重组质粒分别命名 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2 和 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3。

1.6 细胞转染

取对数生长期的 HKC 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,接种于 24 孔培养板,于 37℃、95% O₂、5% CO₂ 培养箱中培养。当贴壁细胞达到 70%~80% 融合时,将 Lipofectamine™ 2000 用无血清培养液稀释并包裹重组质粒,转染 HKC 细胞,放入 37℃、95% O₂、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,吸去无血清培养液,加入含 10% FBS 的细胞培养基继续培养 24 h。第一部分实验:重组质粒转染 HKC 细胞时,A 组加入质粒 pRNAT-U6.1/neo (空载体),B1、B2 和 B3 组分别加入质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1、pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2 和 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3;Western blotting 和 Real Time-PCR(RT-PCR)检测靶基因为 STAT3 的 3 个不同 siRNA 的抑制作用,选取抑制效果最佳的重组质粒。第二部分实验:应用抑制效果最佳的重组质粒转染缺氧复氧后 HKC 细胞,D1 和 D2 组细胞加入转染液,D3 和 D4 组细胞在缺氧复氧前分别转染空载体 pRNAT-U6.1/neo 和重组质粒。

1.7 缺氧复氧细胞模型制备

第二部分实验的各组细胞,取转染后对数生长的 HKC 细胞株,调节细胞浓度为 1×10^6 /mL,种入 6 孔培养板,在 37℃、

95% O₂、5% CO₂ 环境中培养 12 h,然后换无糖 Hank's 液,将培养板置于持续 95% N₂、5% CO₂ 平衡的孵育容器中 2 h,再换含 5% 血清的 RPMI 1640 培养液在 37℃、95% O₂、5% CO₂ 环境中持续培养 24 h。各组细胞行 Western blotting 检测 STAT3 蛋白的表达,RT-PCR 测定 STAT3 mRNA,Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡,流式细胞术检测凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 表达。

1.8 检测指标

1.8.1 Western blotting 检测 STAT3 蛋白的表达 细胞加入 RIPA 裂解液,加入 PMSF 冰上孵育细胞 30 min,冰上刮取细胞,4℃ 下 12000 r/min 离心 15 min 并取上清。加入上样缓冲液,Bradford 比色法测定蛋白浓度。沸水浴加热 3~5 min 使蛋白变性,100 μ g 总蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。常规封闭后,加入一抗 4℃ 过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 下孵育 2 h,ECL 显色。测定蛋白条带的吸光度值,以 STAT3/ β -actin 的相对值表示蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.8.2 RT-PCR 测定 STAT3 mRNA 采用 1 mL Trizol 试剂提取细胞总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 以 Oligo(dT)为引物逆转合成 cDNA,并以 cDNA 链为模板行 PCR 扩增。根据人 STAT3 mRNA 序列设计引物,选择硝酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参基因。STAT3 mRNA 和内参基因的上游引物、下游引物序列见表 2,引物序列设计合成均由大连 Takara 公司完成。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 60 s,56℃ 50 s,72℃ 60 s,30 个循环,72℃ 延伸 10 min,维持 4℃ 保存。对图像进行软件分析,得到样品量的循环阈值(Ct 值),以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因的相对表达量, $\Delta\Delta C_t = [Ct(STAT3) - Ct(GAPDH)]_{\text{待测组}} - [Ct(STAT3) - Ct(GAPDH)]_{\text{对照组}}$ 。取 10 μ L 扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。实验重复 3 次。

表 2 STAT3 和内参基因的上游引物、下游引物序列

Table 2 Upstream primer and downstream primer sequences of STAT3 or reference gene

Gene	Upstream primer sequence(5'-3')	Downstream primer sequence(5'-3')
STAT3 mRNA	CACCAAGCGAGGACTGAGCAT	GCCAGACCCAGAAGGAGAAGC
GAPDH	AATTCAACGGCACAGTCAAGGC	GGATGCAGGGATGATGTTCTGG

1.8.3 Annexin V/PI 染色法检测细胞凋亡 按照 Annexin V/PI 染色检测凋亡试剂盒操作说明进行。0.25% 胰酶消化细胞,转速 2000 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm)收集细胞。冷 PBS 洗涤细胞两次,2000 r/min 离心 5 min。用 400 μ L $1 \times$ Annexin V binding buffer 悬浮细胞,细胞浓度 1×10^6 /mL。在细胞悬浮液中加入 5 μ L Annexin V-FITC/EGFP,轻轻混匀后于 2~8℃ 避光条件下孵育 15 min。加入 10 μ L PI 后轻轻混匀于 2~8℃ 避光条件下孵育 5 min。在 1 h 内上机检测,CELLQuest 软件采集数据分析,计算凋亡率 = 凋亡细胞数目 / 细胞总数,重复 3 次。

1.8.4 流式细胞术检测凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 表达 采用间接免疫荧光法,在细胞悬液中加入 1:100 的 Bcl-2 或 Bax 抗体,37℃ 温浴 30 min 后洗涤,加入 1:100 稀释的 FITC 标记

的羊抗鼠二抗,温浴洗涤后立即上流式细胞仪检测。实验重复 3 次,以平均荧光强度表示 Bcl-2 和 Bax 蛋白的含量,计算 Bax/Bcl-2 比值。

1.9 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件包对数据进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复测量设计的方差分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 重组质粒的鉴定

STAT3 小干扰 RNA 表达载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶

切鉴定电泳图如图1所示。测序结果表明,STAT3 干扰序列与 GenBank 中的序列一致,无碱基突变和移码,证实 STAT3 siRNA 表达载体构建成功。

2.2 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 对 STAT3 蛋白表达的影响

第一部分实验中,重组质粒转染 HKC 细胞 48 h 后,Western blotting 结果显示 A、B1、B2 和 B3 组细胞 STAT3/ β -actin 比值分别为 0.82 ± 0.01 、 0.34 ± 0.01 、 0.73 ± 0.01 和 0.54 ± 0.02 ,重组质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 1~3 均能抑制 HKC 细胞中 STAT3 蛋白的表达,质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1 抑制效果最佳,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图2)。第二部分实验中,D1~4 组 STAT3/ β -actin 比值分别为 0.79 ± 0.01 、 0.93 ± 0.02 、 0.94 ± 0.02 和 0.51 ± 0.01 。和 D1 组比较,D2 和 D3 组比

值明显升高,D4 组比值显著降低($P < 0.05$);D4 组 STAT3/ β -actin 比值显著低于 D2 和 D3 组($P < 0.05$)(图3)。

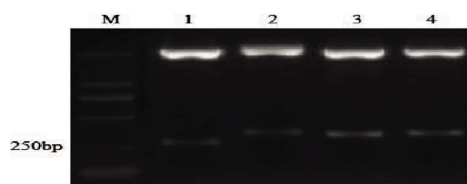


图1 STAT3 siRNA 表达载体酶切鉴定电泳图

Fig.1 Restriction enzyme digestion electrophoresis of STAT3 siRNA expression vector

M: Marker; 1: pRNAT-U6.1/neo; 2: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1; 3: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2; 4: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3

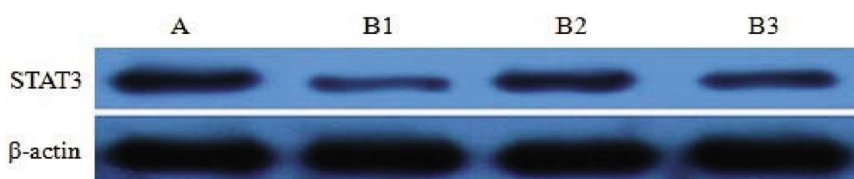


图2 第一部分实验中 Western Blotting 检测 A、B1、B2 和 B3 组的 STAT3 蛋白表达

Fig.2 STAT3 protein expression of group A, B1, B2 and B3 detected by Western Blotting in the first part of the experiment

A 组: pRNAT-U6.1/neo; B1 组: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1; B2 组: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2; B3 组: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3

Group A: pRNAT-U6.1/neo; Group B1: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1; Group B2: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2; Group B3: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3

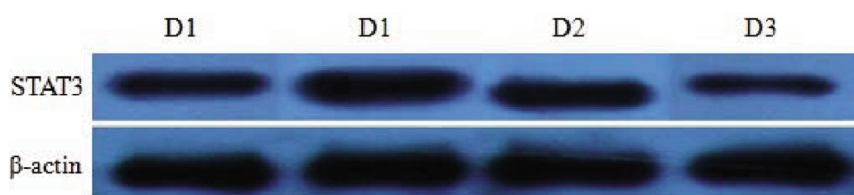


图3 第二部分实验中 Western Blotting 检测 D1、D2、D3 和 D4 组的 STAT3 蛋白表达

Fig.3 STAT3 protein expression of group D1, D2, D3 and D4 detected by Western Blotting in the second part of the experiment

D1: 正常培养组; D2: 缺氧复氧组; D3: 阴性对照转染组; D4: 重组质粒转染组

D1: Normal culture group; D2: Hypoxia reoxygenation group; D3: Negative control transfection group; D4: Recombinant plasmid group

2.3 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 对 STAT3 mRNA 表达的影响

第一部分实验中,重组质粒转染 HKC 细胞 48 h 后,RT-PCR 结果显示 A、B1、B2 和 B3 组细胞 STAT3 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 0.336 ± 0.018 、 0.778 ± 0.022 和 0.684 ± 0.019 ,质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 1~3 均能抑制 HKC 细胞中 STAT3 mRNA 的表达,其中质粒 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1 抑制效果最佳,差异有统计学意义($P < 0.05$)。RT-PCR 产物凝胶电泳检测 STAT3 mRNA 表达如图4。第二部分实验中,4 组 STAT3 mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.830 ± 0.089 、 1.742 ± 0.056 和 1.310 ± 0.036 。和 D1 组比较,D2、D3 和 D4 组 STAT3 mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$);D4 组 STAT3 mRNA 相对表达量显著低于 D2 和 D3 组 ($P < 0.05$)。

2.4 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 对细胞凋亡的影响

D1~4 组细胞的凋亡率分别是 0.063 ± 0.002 、 0.637 ± 0.022 、 0.604 ± 0.019 和 0.219 ± 0.013 。和 D1 组比较,D2~4 组比值明显升高;D4 组比值显著低于 D2 和 D3 组 ($P < 0.05$)。

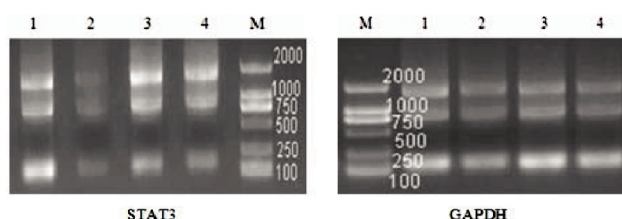


图4 第一部分实验中 RT-PCR 产物凝胶电泳检测 STAT3 mRNA 表达

Fig.4 Expression of RT-PCR product STAT3 mRNA detected by gel electrophoresis in the first part of the experiment

1: 阴性对照 pRNAT-U6.1/neo 转染组(A 组); 2: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA1 转染组(B1 组); 3: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA2 转染组(B2 组); 4: pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3 转染组(B3 组); M: Marker

M: Marker

2.5 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA 对 Bcl-2 和 Bax 表达

与 D1 组比较, D2、D3 组的 Bax 荧光强度明显增加, Bcl-2 荧光强度明显下降, Bax/Bcl-2 比值增加 ($P < 0.05$); D4 组的 Bax

荧光强度明显低于 D1、D2 和 D3 组, Bcl-2 荧光强度高于 D1、D2 和 D3 组, Bax/Bcl-2 比值低于 D1、D2 和 D3 组 ($P < 0.05$) (见表 3)。

表 3 D1~4 组细胞 Bax、Bcl-2 的 FI 值和 Bax/Bcl-2 比值

Table 3 The FI value of Bax and Bcl-2 and the ratio of Bax/Bcl-2 of cells in D1-4 groups

Group	The FI value of Bax	The FI value of Bcl-2	Bax/Bcl-2
Group D1	64.93 ± 6.71	55.89 ± 6.00	1.16
Group D2	89.90 ± 9.02 ^{ab}	34.38 ± 5.08 ^{ab}	2.61 ^{ab}
Group D3	91.21 ± 8.25 ^{ab}	37.92 ± 5.37 ^{ab}	2.41 ^{ab}
Group D4	45.41 ± 7.12 ^a	69.87 ± 7.65 ^a	0.64 ^a

*Note:: a $P < 0.05$ compared with group D1; b $P < 0.05$ compared with group D4

3 讨论

心血管大手术、肾移植术等大手术因肾缺血再灌注损伤 (IRI) 导致术后急性肾损伤 (AKI) 发生率高达 30%, 使死亡率大大增加^[1,2]。肾脏缺血再灌注损伤可直接导致肾髓质和皮质的损伤, 细胞凋亡和组织炎症是其主要病理变化^[6,7]。但其发生的内在分子机制尚未明确, 有关靶基因治疗的方法是当前研究的热点。

STATs 是酪氨酸蛋白激酶 (JAK)/STAT 通路中重要的 JAKs 底物, 在细胞因子信号传导中发挥着关键作用。STATs 家族有 7 个成员组成: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6^[8,9]。其中 STAT3 是 STAT 家族的重要成员, 既是细胞内信号转导蛋白, 亦是转录因子, 静息状态下存在于细胞质内, 可被细胞因子、生长因子和 ROS 等激活。STAT3 是多种细胞内信号传导的共同通路之一, 能将信号快速从膜传递到核, 广泛参与细胞增殖分化、凋亡和炎症等多种过程^[10,11]。生长激素、干扰素、白细胞介素等细胞因子均通过 JAK2/STAT3 通路调控靶基因转录, 影响细胞的增殖、分化和凋亡^[12]。STAT3 活化后可调控抗凋亡蛋白 Bcl2 和凋亡蛋白 Bax 的表达^[13,14]。如能设法阻断 IRI 肾组织 STAT3 基因的表达, 可抑制肾组织细胞凋亡, 从而起到肾保护的作用。阐明 STAT3 在细胞凋亡中的作用, 具有良好的应用前景, 可为肾 IRI 治疗提供新的靶点和重要的理论依据。本研究通过构建靶向 STAT3 siRNA 表达载体, 转染缺氧复氧肾小管上皮细胞沉默 STAT3 基因, 观察对肾小管上皮细胞凋亡的影响。

小干扰 RNA 技术是近几年发展起来的选择性抑制基因表达的工具, 具有序列特异性和抑制基因表达的高效性, 引发体内序列特异性基因转录后的基因沉默^[15]。与传统基因沉默技术相比, siRNA 技术操作流程简便、周期短、效果强、持续时间长, 在细胞内稳定表达, 具有可传递性和高效性^[5]。由于 siRNA 的干扰效率受多种因素如靶序列在 mRNA 上的位置、基因表达的丰度、mRNA 和目的蛋白的半衰期等影响, 常用方法是针对同一个基因设定多个靶序列, 选择最为有效的靶序列^[16]。本研究设计了 1 条阴性对照序列和 3 条 STAT3 siRNA 靶序列, 并以此构建重组质粒 pRNAT-U6.1 STAT3 siRNA (阴性对照序列构建为空载体)。质粒 pRNAT-U6.1/neo 属于采用 pol III 启动子 U6 的质粒载体, 引入新霉素抗性基因, 被证实是具有稳定 siR-

NA 表达的载体。文献报道, 该载体能诱发高达 80%~90% 的基因沉默效率^[17]。本实验成功构建 3 条沉默 STAT3 靶基因表达的 siRNA 序列, 并克隆至载体 pRNAT-U6.1/neo 中, 经双酶切和 DNA 测序鉴定完全正确。构建的 3 个 STAT3 siRNA 质粒载体均能抑制 STAT3 基因的表达, 其中起始点为 455 的质粒 pRNAT-U6.1 STAT3 siRNA3 抑制 STAT3 蛋白和 mRNA 表达的效果最佳。这为下一步利用重组载体进行缺氧复氧 HKC 细胞凋亡调控的实验研究打下了基础。

本实验进一步研究发现: 缺氧复氧使 HKC 细胞的 STAT3 表达增加; 质粒 pRNAT-U6.1 STAT3 siRNA3 转染后, 缺氧复氧 HKC 细胞中 STAT3 蛋白和 mRNA 表达均明显低于缺氧复氧组和阴性对照 pRNAT-U6.1/neo 转染组。研究表明, 肾缺血再灌注损伤引起 IL-6 的大量释放, 并与其受体的两个亚基 IL-6Rα 和 gp130 分子形成三元复合体, 之后激活与 gp130 相偶联的 JAK 家族的酪氨酸蛋白激酶 JAK2, 使之磷酸化, 从而激活 STAT3 信号通路, 诱导靶基因表达, 导致组织细胞炎症损伤和细胞凋亡^[13,18]。Bax 和 Bcl-2 是调节凋亡的一组相对应的基因, 均是 Bcl-2 家族成员, 在细胞内以同源或异源二聚体存在, 通过线粒体途径调控细胞凋亡^[14,19]。Bax 和 Bcl-2 的功能分别是促进和抑制细胞凋亡, Bax/Bcl-2 的比值降低时可抑制细胞凋亡的发生^[18,20]。本研究结果提示, 沉默 STAT3 基因可调控 Bcl-2 和 Bax 基因的表达和 Bax/Bcl-2 比值, 最终抑制细胞凋亡, 与文献报道相似。

综上所述, 成功构建并筛选最佳抑制效率的靶向 STAT3 质粒载体 pRNAT-U6.1-STAT3 siRNA3。该载体可有效抑制缺氧复氧后 HKC 细胞中 STAT3 信号转导通路的活化, 抑制 STAT3 蛋白并调控 Bcl-2 和 Bax 基因的表达和 Bax/Bcl-2 比值, 从而抑制细胞凋亡。

参考文献 (References)

- [1] Borthwick E, Ferguson A. Perioperative acute kidney injury: risk factors, recognition, management, and outcomes[J]. BMJ, 2010, 341: 3365
- [2] S lling C, Christensen AT, Krag S, et al. Erythropoietin administration is associated with short-term improvement in glomerular filtration rate after ischemia-reperfusion injury [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2011, 55(2):185-195

- [8] Katzan IL, Dawson NV, Thomas CL, et al. The cost of pneumonia after acute stroke[J]. *Neurology*, 2007, 68(22): 1938-1943
- [9] Gao Zhi-qiang, Liu Ding-hua. Lung infection in patients with acute cerebral infarction[J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2011, 16(11): 123-125
- [10] Davenport RJ, Dennis MS, Wellwood I. Complications after acute stroke[J]. *Stroke*, 1996, 27: 415-420
- [11] Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, et al. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke[J]. *Neurology*, 2003, 60(4): 620-625
- [12] Ovbiagele B, Hills NK, Saver JL, et al. Frequency and determinants of pneumonia and urinary tract infection during stroke hospitalization [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2006, 15(5): 209-213
- [13] 赫丹丹, 李永男, 刘丽娜, 等. 急性脑梗塞后肺部感染的相关因素及预后[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(20): 3860-3863
He Dan-dan, Li Yong-nan, Liu Li-na, et al. The Related Risk Factors and Prognosis in Patients with Acute Cerebral Infarction Complicated with Pulmonary Infection[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(20): 3860-3863
- [14] Keith PK. Clinical impact of antibiotic resistance in respiratory tract infections[J]. *Int J Antimicrobial Agents*, 2007, 29(Suppl 1): S6
- [15] Sellars C, Bowie L, Bagg J, et al. Risk factors for chest infection in acute stroke: a prospective cohort study[J]. *Stroke*, 2007, 38(8): 2284-2291
- [16] Mattila KJ, Valtanen VV, Nieminen MS, et al. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction and stroke [J]. *Clin Infect Dis*, 1998, 26(3): 719-734
- [17] Cheng Tao, Wang Dao-xin. 59 cases of inhalation pneumonia in elderly stroke and etiological study[J]. *Chongqing Medical Journal*, 2010, 39(19): 2633-2634
- [18] Wang Hong-bing, Li Pei-zhen. The difficulties of diagnosis and treatment for senile aspiration pneumonia[J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2006, 25(5): 325-327
- [19] Walter U, Knoblich R, Steinhagen V, et al. Predictors of pneumonia in acute stroke patients admitted to a neurological intensive care unit [J]. *J Neurol*, 2007, 254(10): 1323-1329
- [20] Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, et al. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke[J]. *Neurology*, 2003, 60(4): 620-625

(上接第 2862 页)

- [3] Yang N, Luo M, Li R, et al. Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(1): 91-100
- [4] Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, et al. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the in vivo antitumor functions of adoptively transferred T cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7455-7464
- [5] Cernilogar FM, Onorati MC, Kothe GO, et al. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*[J]. *Nature*, 2011, 480(7377): 391-395
- [6] Lassen S, Lech M, R mmele C, et al. Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure[J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1976-1983
- [7] White LE, Hassoun HT. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury[J]. *Int J Nephrol*, 2012, 2012: 505197
- [8] Das A, Salloum FN, Durrant D, et al. Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(6): 858-869
- [9] Negoro S, Kunisada K, Tone E, et al. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47(4): 797-805
- [10] Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do ?[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1143-1148
- [11] Boengler K, Hil?ker-Kleiner D, Heusch G, et al. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(6): 771-785
- [12] Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, et al. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(10): 898-905
- [13] Vanessa Coelho-Santos, Joana Gon?alves, et al. Prevention of methamphetamine-induced microglial cell death by TNF- α and IL-6 through activation of the JAK-STAT pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 103
- [14] Zhang D, He D, Xue Y, et al. PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2193-2202
- [15] Evelina Miele, Gian Paolo Spinelli, Ermanno Miele, et al. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 3637-3657
- [16] Zhao SH, Zhao F, Zheng JY, et al. Knockdown of stat3 expression by RNAi inhibits in vitro growth of human ovarian cancer[J]. *Radiol Oncol*, 2011, 45(3): 196-203
- [17] Fang L, Hu QG, Hua ZC, et al. Construction of targeting-Skp2 shRNA plasmids and observation of their inhibitory effect on Tca8113 cells [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2007, 42(10): 624-628
- [18] Jung JE, Kim GS, Chan PH. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3574-3579
- [19] Wang T, Xue Y, Wang M, et al. Silencing of the hTERT gene through RNA interference induces apoptosis via bax/bcl-2 in human glioma cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4): 1153-1158
- [20] Maria Kaparou, Despoina Choumerianou, Chrysoula Perdikiogianni, et al. Enhanced levels of the apoptotic BAX/BCL-2 ratio in children with acute lymphoblastic leukemia and high-risk features[J]. *Genet Mol Biol*, 2013, 36(1): 7-11