

· 基础研究 ·

RNAi 抑制 PIAS3 表达对胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响

纪 华^① 余 巍^② 陈 宏^① 李光辉^③ 王东林^④

摘要 目的:构建针对 PIAS3 的 RNAi 质粒载体,初步探讨抑制 PIAS3 表达对胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响。方法:构建 3 个 RNAi 载体,用脂质体法将其转染胶质瘤细胞系 CHG-5,通过半定量 RT-PCR 筛选干扰效率最高的重组 RNAi 质粒。将该 RNAi 质粒转染体外培养的人胶质瘤 U251 细胞株,用半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 PIAS3 的表达。Annexin V FITC 和 PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡,流式细胞术检测细胞增殖周期变化。结果:转染干扰质粒的细胞株 PIAS3 基因和蛋白表达均有减弱。流式细胞仪分析,抑制 PIAS3 表达能够诱导胶质瘤 U251 细胞拮抗凋亡($P<0.01$),同时出现细胞周期改变,表现为 G₂ 期细胞比例升高,S 期细胞比例降低,具有显著性差异($P<0.05$)。结论:下调 PIAS3 基因表达使 U251 阻滞在 G₂ 期,拮抗细胞凋亡。

关键词 PIAS3 RNAi 胶质瘤 细胞周期 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2014.20131904

Effects of PIAS3 silencing by RNAi on the proliferation and apoptosis of U251 glioma cells *in vitro*

Hua Ji¹, Wei Yu², Hong Chen¹, Guanghui Li³, Donglin Wang⁴

Correspondence to: Hong CHEN; E-mail: hongchen2000@tom.com

¹Department of Oncology and ²Department of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China; ³Department of Oncology, Xinqiao Hospital Affiliated to Third Military Medical University; ⁴Department of Medical Oncology, Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400037, China

Abstract Objective: To observe the effect of the proteininhibitor of activated STAT 3 (PIAS3) on the proliferation and apoptosis of U251 glioma cells after PIAS3 expression was inhibited by RNAi. **Methods:** Three RNAi expression vectorstargeting PIAS3 were constructed and transfected into CHG-5 cells by liposomein vitro. The most efficient RNAi vector was subsequently selected by examiningthe mRNA expressions of PIAS3 in the transfected cells by semi-quantitativeRT-PCR. The selected RNAi vector was then transfected into U251 cells. After 48h of transfection, the mRNA and protein expressions of PIAS3 in glioma cellswere examined by semi-quantitative RT-PCR and western blot. Apoptosis wasobserved by flow cytometry using a double-staining method with FITC-conjugatedannexin V and PI. Flow cytometry was also applied in cell cycle assay. **Results:** RNAidownregulated the mRNA ($P<0.01$) and protein ($P<0.01$) expressionsof PIAS3 in transfected cells.RNAi promoted the resistance of U251 cells to apoptosisand subsequently altered the cell cycle. A high percentage of G₂ phaseand a low percentage of Sphase were observed in U251 cells. **Conclusion:** The down-regulation of PIAS3arrested U251 cells in the G₂ phase andinduced the resistance of U251 cells to apoptosis.

Keywords: PIAS3, RNAi, glioma, cell cycle, apoptosis

信号转导调控的失常往往会导致肿瘤的发生,其中信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)转导通路与肿瘤发生密切相关,家族成员的异常活化见于许多恶性肿瘤。PIAS3(protein inhibitor of activated STAT3)蛋白是活化 STAT3 的抑制分子,通过阻断 STAT3 与 DNA 结合发挥抑制作用的^[1],在 STAT3 信号途径中发挥着负向调控的作用。为了进一步了解 PIAS3 蛋白的功能,本研究用 RNAi 技术特异性抑制 PIAS3 的表

达,观察胶质瘤细胞凋亡和细胞周期变化。

1 材料与方法

1.1 材料

引物由北京奥科生物技术公司合成;干扰质粒 pSilencer 2.0-U6、宿主菌株 DH5 α 由本实验室保存;人胶质瘤细胞株 U251 细胞、CHG-5 细胞由西南医院病理研究所提供;DOTAP 脂质体转染试剂为德国 Roche 公司产品;兔抗 PIAS3(sc-14017)购自 Santa Cruz 公司;抗人 β -actin 抗体购自博士德公司;HRP 标

作者单位:①成都军区昆明总医院肿瘤科(昆明市 650032);②药剂科;③第三军医大学附属新桥医院肿瘤科;④重庆市肿瘤医院医院肿瘤内科

通信作者:陈宏 hongchen2000@tom.com

网络出版日期:2014-1-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3969/j.issn.1000-8179.2014.20131904.html>

记的IgG抗体为北京鼎国公司进口分装产品;Annexin V-FITC检测试剂盒为南京凯基公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RNA干扰质粒构建 针对PIAS3目的基因mRNA序列,选择三个针对PIAS3(NCBI:NM_006099)的RNAi靶位点,分别为:靶位点I:5'-gaaggtcgaagtattgac-3';靶位点II:5'-gtgcagcagatttaccat-3';靶位点III:5'-tcttattcatgtatggt-3',含有PIAS3基因RNAi的3个特异性序列的寡核苷酸单链(英骏公司合成)退火形成双链后,插入pSilencer 2.0-U6质粒,将三个干扰质粒转染CHG-5细胞,用半定量RT-PCR方法检测PIAS3基因的表达情况,从3个干扰质粒中选择一个干扰效率最高的重组质粒进行RNAi实验。

1.2.2 细胞培养与转染 U251、CHG-5细胞在常规条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。按DOTAP脂质体转染试剂说明书操作,将干扰质粒转染对数生长期的细胞,无血清培养10h后更换含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养48h,荧光显微镜观察。

1.2.3 RT-PCR检测目的基因表达 用Roche公司的Trizol试剂提取细胞总RNA,逆转录后做RT-PCR扩增,参照GeneBank中PIAS3基因的开放阅读框序列设计引物,序列如下:F:5'-TCAAGGTCAATGGGAAACTG-3',R:5'-GTGGGAGACTGGACAGGAAA-3',产物900bp。PCR反应条件:94℃ 15s,56℃ 30s,68℃ 1min,30个循环,最后68℃延伸10min。内参选用GAPDH基因序列设计引物,序列如下:F:5'-CGGGAAACTGTGGCGTGAT-3',R:5'-CAAAGGTGGAGAGTGGGT-3',产物311bp。PCR反应条件:94℃ 15s,56℃ 30s,68℃ 30s,30个循环,最后68℃延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 免疫印迹(Western blot) 基因转染48h后提取转染细胞总蛋白,Bradford法测蛋白浓度。样品于100℃水浴5min,取等量蛋白上样进行SDS-PAGE电泳,转膜,脱脂奶粉封闭,一抗(1:1000稀释)4℃孵育过夜,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的IgG抗体(1:2000稀释),室温孵育2h,DAB显色。

1.2.5 流式细胞仪检测转染细胞凋亡 以0.25%胰酶消化转染细胞,0.01M PBS漂洗2次,参照Annexin V-FITC检测试剂盒说明书操作,流式细胞仪检测(Ex=488nm;Em=530nm)细胞凋亡的情况(绿色荧光通过FITC通道通常为FL1来检测;红色荧光通过PI通道通常为FL2来检测)。

1.2.6 流式细胞技术检测转染细胞增殖周期 以0.25%胰酶消化转染细胞,0.01M PBS漂洗2次,加入核糖核酸酶及碘化丙啶染液,避光染色30min,流式细胞仪检测(Ex=488nm)细胞周期分布。

1.3 统计学方法

以SPSS 11.5统计软件包采取单因素方差分析、独立样本t检验,P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰质粒的构建

质粒用Bam HI和Hind III双酶切后,与上述含有同样酶切位点的双链寡核苷酸在连接酶作用下进行等摩尔连接环化,分离环化产物并转染到DH5α感受态细菌,抗性筛选阳性克隆进行酶切鉴定,对酶切鉴定正确的克隆进行测序,将测序结果和设计序列比较后证明融合区域的碱基序列正确,并有正确的方向,表明干扰质粒克隆正确。对插入序列正确的质粒行大量扩增,并用质粒提取试剂盒提取质粒,得到PIAS3基因特异性的干扰表达质粒,分别称为干扰质粒I、II、III。

2.2 干扰质粒筛选

将这3个质粒转染CHG-5细胞,从转染质粒的胶质瘤细胞中提取总RNA,经RT-PCR扩增出900bp的片段,由图1可以看出,与未转染细胞相比,干扰质粒I的干扰效率较干扰质粒II和III高。通过对积分密度值(Integrated Density Value, IDV)进行半定量分析,结果显示,正常CHG-5细胞能表达高水平的PIAS3 mRNA,3组干扰质粒的IDV与对照组相比,明显降低(P<0.01),提示3个干扰质粒均能显著且特异地抑制PIAS3 mRNA的表达,且P干扰质粒I<P干扰质粒III<P干扰质粒II,提示干扰质粒I特异性抑制PIAS3 mRNA表达的能力最强,所以下面的RNAi实验均选用干扰质粒I。

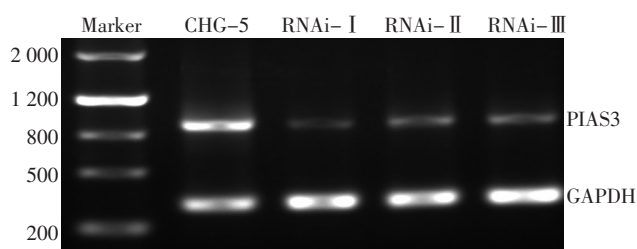


图1 3个干扰质粒对CHG-5细胞PIAS3mRNA的特异性抑制
Figure 1 mRNA expression of PIAS3 was suppressed after the three RNAi expression vector targeting PIAS3 were transfected into CHG-5 cells

2.3 RNAi质粒转染对U251细胞PIAS3的影响

RNAi质粒转染U251细胞48h后收获细胞,以转染pSilencer 2.0的U251细胞为对照进行RT-PCR。通过RT-PCR实验发现,对照组和转染组的U251细胞在900bp处皆可见的特异性PIAS3基因条带,但转染组条带明显比对照组暗淡,半定量检测发现转染细胞的PIAS3 mRNA表达下降了85.7%,提示RNAi能够有效抑制U251细胞PIAS3 mRNA的表达(图2)。

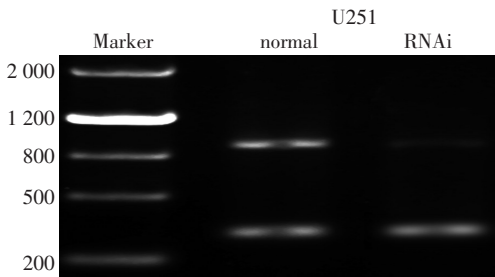
转染细胞中PIAS3蛋白表达:Western blot 检测结果显示,转染质粒的U251细胞与对照组细胞相比,转染细胞的PIAS3蛋白表达下降了60%(图3)。

2.4 RNAi对U251细胞凋亡的影响

U251细胞经PIAS3基因短暂转染48h后,行流式细胞仪分析,如表1所示,干扰质粒转染U251细胞后,早期细胞凋亡率明显低于未转染组和空载体对照组($P<0.01$),而活细胞率与未转染组和对照组比较,差异无明显统计学意义($P>0.05$),提示抑制U251的PIAS3表达能够减弱U251细胞的凋亡。

2.5 RNAi对U251细胞周期的影响

流式细胞仪测定细胞周期的结果显示(图4)。行流式细胞仪分析,转染组U251细胞的检测结果显示(表2), G_1 、 G_2 和S期细胞比例分别为:(56.8 ± 6.3)%、(22.6 ± 3.8)%、(19.1 ± 2.7)%,而未转染组的U251细胞 G_1 、 G_2 和S期细胞比例分别为(58.2 ± 7.6)%、(17.3 ± 2.96)%、(24.5 ± 4.1)%。与未转染组的U251细胞比较,转染组的U251细胞 G_2 期细胞比例升高,S期细胞比例降低,具有显著性差异($P<0.05$), G_1 期细胞比例无明显变化($P>0.05$)。



Normal: control (pSilencer 2.0-U6); RNAi (transfection by RNAi expression vectors)

图2 胶质瘤细胞PIAS3 mRNA被RNAi质粒特异性抑制
Figure 2 mRNA expression of PIAS3 before and after RNAi expression vectors were transfected into U251 cells

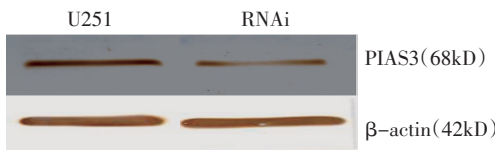
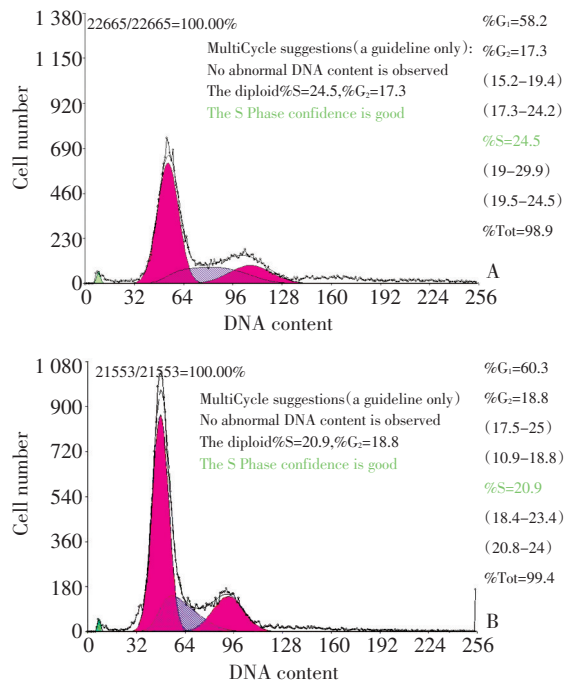


图3 RNAi对U251细胞表达PIAS3的影响
Figure 3 Effect of RNAi on PIAS3 expression in U251 cells

表1 3组U251胶质瘤细胞的细胞凋亡分析 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	Rate(%)			
	B1	B2	B3	B4
Control	0	0.3 ± 0.1	94.7 ± 1.2	3.7 ± 1.0
Transfected by pSilencer 2.0	0	0.4 ± 0.1	96.3 ± 0.9	2.8 ± 0.7
Transfected by RNAi expression vectors	0	0.4 ± 0.1	98.1 ± 0.5	$0.7\pm 0.3^*$

B1: damaged cells; B2: late apoptosis cells; B3: normal cells; B4: early apoptosis cells; *: $P<0.01$



A: non-transfected cell line; B: transfected cell line

图4 RNAi对U251细胞系细胞周期的影响

Figure 4 The cell cycle of U251 cells before and after transfection by RNAi expression vectors

表2 U251细胞周期分析 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Analysis of the cell cycle after the selected vector was transfected into U251 cells ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	G_1 (%)	G_2 (%)	S(%)
Non-transfection group	58.2 ± 7.6	17.3 ± 2.96	24.5 ± 4.1
Transfection group	56.8 ± 6.3	$22.6\pm 3.8^*$	$19.1\pm 2.7^*$

*: $P<0.05$

3 讨论

PIAS家族有PIAS1、PIAS3、 α 、 β 和 γ 5个成员,现已证明PIAS蛋白不仅可与STAT分子发生作用,还与70多种蛋白质发生相互作用,并影响它们的活性和功能。PIAS蛋白家族参与调控多个细胞信号通路,在细胞的增殖、分化和凋亡以及肿瘤的发生发展等生理病理过程中,均发挥着重要的作用^[2]。Wang等^[3]发现PIAS3在许多恶性肿瘤中都有表达,且与正常组织比较,表达量增加,其中包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌和脑肿瘤。

RNAi技术在对细胞基因功能研究中有着广泛的应用。本研究采用脂质体基因转染,选用胶质瘤细胞系CHG-5作为筛选干扰质粒的细胞株,它来源于II级星形胶质细胞瘤^[4],将3个干扰质粒转染CHG-5细胞,选取干扰效率最高的质粒作为后期实验用干扰质粒。将质粒pSilencer 2.0-U6空白质粒和选取的干扰质粒转染U251细胞,经RT-PCR和Western blot检测其表达产物,未转染组相比较,PIAS3表达减

弱。U251 细胞短暂转染 48 h 后,光镜观察和流式细胞仪检测都发现,抑制 PIAS3 基因后,胶质瘤 U251 细胞生长加快,细胞凋亡减少。

近年的研究发现 PIAS 家族蛋白有小分子泛素样调节因子 (small ubiquitin like modifier, SUMO)-E3 连接酶活性^[5],作为 SUMO 化的连接酶发挥作用^[6]。DNA 损伤应答过程有 2 个 E3-SUMO 酶参与,PIAS1 和 PIAS4 在 DNA 断裂时分别促进 SUMO2/3 和 SUMO1 与底物的连接^[7-8]。PIAS 蛋白的耗竭会影响损伤细胞 DNA 损伤的修复,提示依赖于 PIAS 的泛素化对于 DNA 双链断裂的修复是必要的。PIAS 蛋白的另一个功能是类似一个结构平台,募集其他蛋白质分子形成复合物,进而发挥转录调控和信号传导的作用。对于 STAT1、STAT3 以及 NF- κ B (核因子 κ B) 等转录因子,PIAS1 和 PIAS3 行使抑制功能就是通过这种非 SUMO 化依赖的方式阻断转录因子与 DNA 的结合来实现的^[9-10]。此外,PIAS 蛋白分子能够使转录因子在细胞核内移位,重新定位于不同的亚核区域,与靶基因接近,实现了转录因子与 DNA 的特异性结合^[11]。正是通过这些机制,PIAS 蛋白能够影响许多蛋白的功能,这些蛋白的主要作用是调控基因转录,因此,可以认为 PIAS 蛋白是转录的共调节子 (coregulators)。研究显示,许多种癌细胞中的 STAT3 受到抑制时,STAT3 的靶基因表达相应下调,这其中就包括了 Bcl-xl, c-myc、cyclin D1^[12]、Bcl2、Mcl-1^[13] 和 survivin^[14] 基因,这些基因与细胞增殖和凋亡密切相关,它们的下调诱导了癌细胞的凋亡。Konnikova 等^[15] 也研究证明,用 RNAi 方法减弱 STAT3 表达后,能够诱导胶质瘤细胞凋亡,肿瘤细胞不仅出现形态学改变,而且细胞活力下降。本研究证实减弱对 pSTAT3 的抑制出现肿瘤细胞拮抗凋亡。

S 期肿瘤细胞对化疗药物敏感,尤其是周期特异性化疗药物,本研究显示,抑制 PIAS3 的 U251 细胞 S 期比例下降,导致肿瘤细胞对药物的敏感性下降。据此推测,抑制 PIAS3 表达可能通过激活 (PI3-K)/ (PKB) 信号途径使 S 期细胞比例降低,表现为具有化疗药物抵抗。

抑制 PIAS3 表达诱导胶质瘤 U251 细胞拮抗凋亡,并出现细胞周期改变,其具体机制还有待于进一步研究,以上结果可以为神经胶质细胞瘤的发病机理提供部分实验依据。

参考文献

1 Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 593-605.

2 Yagil Z, Nechushtan H, Kay G, et al. The enigma of the role of protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) in the immune response [J]. Trends Immunol, 2010, 31(5):199-204.

3 Wang L, Banejee S. Differential PIAS3 expression in human malignancy[J]. Oncology Reports, 2004, 11(6):1319-1324.

4 Chen Ziqiang, Bian Xiuwu, Xin Rong, et al. Establishment of human glioma cell CHG-5 and its biological features[J]. Journal of Third Military Medical University, 1999, 21(12):880-883.[陈自强, 卞修武, 辛 榕, 等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12):880-883.]

5 Chen Ziqiang, Bian Xiuwu, Xin Rong, et al. Establishment of human glioma cell CHG-5 and its biological features[J]. Journal of Third Military Medical University, 1999, 21(12):880-883.

6 Borghouts C, Tittmann H, Delis N, et al. The intracellular delivery of a recombinant peptide derived from the acidic domain of PIAS3 inhibits STAT3 transactivation and induces tumor cell death[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(4):539-553.

7 Fernando JJ, Ryan JJ. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway[J]. Genes Immun, 2010, 11(8):599-608.

8 Mascle XH, Lussier-Price M, Cappadocia L, et al. Identification of a non-covalent ternary complex formed by PIAS1, SUMO1, and UBC9 proteins involved in transcriptional regulation[J]. J Biol Chem, 2013, 288(51):36312-36327.

9 Citro S, Jaffray E, Hay RT, et al. A role for paralogue-specific sumoylation in histone deacetylase 1 stability[J]. J Mol Cell Biol, 2013, 5(6):416-427.

10 Bartuzi P, Hofker MH, van de Sluis B. Tuning NF- κ B activity: A touch of COMMD proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(12): 23115-23121.

11 Liu Y, Bridges R, Wortham A, et al. NF- κ B repression by PIAS3 mediated RelA SUMOylation[J]. PLoS One, 2012, 7(5):e37636.

12 Li R, Pan Y, Shi DD, et al. PIAS1 negatively modulates virus triggered type I IFN signaling by blocking the DNA binding activity of IRF3[J]. Antiviral Res, 2013, 100(2):546-554.

13 Hoefler J, Schäfer G, Klocker H, et al. PIAS1 is increased in human prostate cancer and enhances proliferation through inhibition of p21 [J]. Am J Pathol, 2012, 180(5):2097-2107.

14 Furqan M, Mukhi N, Lee B, et al. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application[J]. Biomark Res, 2013, 1(1):5.

15 Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, et al. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells [J]. BMC Cancer, 2003, 17, 3:23.

(2013-11-01 收稿)

(2013-12-30 修回)

(本文编辑:郑莉)



作者简介

纪华 肿瘤学博士,研究方向为肿瘤内科。
E-mail:ji-hua1@163.com