

不同细胞中 STAT 元件对刺激因子的特异性应答

黄晓敏^{1) 2)}, 李冰^{2)*}

(¹⁾ 右江民族医学院生物化学教研室, 广西 百色 533099; (²⁾ 广州医学院实验医学研究中心, 广州 510182)

摘要 以高通量药物筛选为目的, 构建转录因子 STAT 元件驱动的萤火虫荧光素酶报告载体, 并进行功能初步验证. 人工合成含 *IRF-1* 和 *C-FOS* 基因上游调控序列中的 2 个 STAT 元件的 DNA 片段, 克隆于 pGL3-promoter 报道质粒作为报道载体 pSTAT-luc; 为检测其对不同有效因子刺激的反应性, 该报道载体与荧光内参照载体 pRL-SV40 瞬时共转染不同细胞, 在各种因子刺激条件下, 双荧光素酶检测系统测定化学发光强度. 结果显示, pSTAT-luc 的报道基因载体符合预期设计; 该载体转染细胞实验显示, 在 STAT 途径阳性的 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞中, 特异刺激因子 $\text{INF-}\gamma$ 和抑瘤素 OSM 处理能够剂量依赖性的引起细胞内萤火虫荧光素酶的升高; 在 STAT 途径阴性的 PC-12 细胞, 上述因子不能引起荧光素酶的活性改变; 以非该途径因子刺激时, HeLa、A549 和 MCF-7 细胞未见发光水平的改变. 结果表明, 构建的报道系统具有阳性细胞反应特异性以及阳性刺激-反应特异性, 能够用于建立靶向 STAT 信号通路的高通量药物筛选平台.

关键词 信号转导子和转录激活子信号通路; γ -干扰素; 抑瘤素; 双荧光素酶报告基因分析
中图分类号 R965.1

Stimulating Factors Induced Specific STAT Element Binding Response in Different Cell Lines

HUANG Xiao-Min^{1) 2)}, LI Bing^{2)*}

(¹⁾ Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533099, Guangxi, China;

(²⁾ Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract In purpose of establishing a high-throughput drug screening method, a luciferase reporter vector driven by human STAT (signal transduction and activators of transcription) binding elements were constructed and the responsiveness upon stimulation were validated in different cell lines. Two STAT binding elements from upstream regulatory sequences of *IRF-1* and *C-FOS* gene were synthesized and cloned into pGL3-Luc-promoter vector. The constructed vector pSTAT-luc, and an inner calibration vector pRL-SV40, were transiently co-transfected into different cell lines and stimulated by various factors. The luciferase activity was assayed using dual-luciferase system to validate cell specific response. The result showed that in STAT pathway positive HeLa, A549 and MCF-7 cell lines, STAT specific factors $\text{INF-}\gamma$ and OSM strongly activated pSTAT-luc reporter in dose-dependent way. Neither stimulation with irrelevant factors in STAT pathway positive cells, nor with STAT specific factors in STAT pathway negative cell line PC-12, produced positive response. The result demonstrated that this vector was highly cell and pathway specific for STAT pathway activation and can be used tools for high-throughput drug screening based on STAT signal pathway.

Key words STAT (signal transduction and activators of transcription); $\text{INF-}\gamma$; OSM; dual-luciferase reporter assay

收稿日期: 2011-11-01; 接受日期: 2012-01-17

国家自然科学基金(No. 30971166)资助项目

* 联系人 Tel: 020-81340202; E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

Received: November 1, 2011; Accepted: January 17, 2012

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30971166)

* Corresponding author Tel: 020-81340202; E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

信号转导子和转录激活子 (signal transduction and activators of transcription, STATs) 蛋白家族由 7 个家族成员: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6 组成,是由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子,活化的 STAT 二聚体化后移位于细胞核,与特异性 DNA 启动子结合直接参与调节基因的表达,在免疫调控、促进细胞生长、抗凋亡、促进细胞周期方面发挥重要作用^[1-4]。STATs 途径的异常活化被认为与肿瘤发生发展、增生、免疫性疾病以及心血管病有密切联系^[5-7]。因此,以 STATs 活化为指标,可在细胞水平判断药物作用的效果,并可能通过不同的结合元件的特点判断作用路径的差异及其机制。

本实验以人工合成的 2 个 STAT 下游 DNA 结合序列串联子为调控元件,以荧光素酶为报道基因,构建 STAT 荧光素酶报道基因载体 pSTAT-luc。期望利用荧光素酶能够以多孔板高通量进行检测的优势,建立 STATs 信号途径活化检测系统,用于药物大规模筛选。为了解不同细胞以及刺激因子的特异性以及敏感性,本实验通过瞬时转染各种细胞,并用细胞因子刺激以观察荧光素酶信号强弱的变化,从而了解含 pSTAT-luc 的细胞特异性和灵敏性,为建立具有靶向 STAT 因子激活的抗炎、抗肿瘤药物筛选的细胞模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞系 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7、人宫颈癌细胞 HeLa 和鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC-12 等细胞株均为广州医学院实验医学研究中心冻存;pGL3-promoter 载体系统、pRL-SV40 海肾内参表达载体购自 Promega 公司;大肠杆菌菌株 Top10 为广州医学院实验医学研究中心冻存。

T4 DNA 连接酶、Kpn I 酶、Xho I 酶购自 NEB 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,荧光酶测定试剂盒购自 Promega 公司;RPMI1640、MEM、和 DMEM 细胞培养液及胎牛血清、胰蛋白酶、双抗,购自 Gibco 公司;人源干扰素 γ (INF- γ)、抑瘤素 (OSM)、白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 2 (IL-2)、白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、生长因子 (TGF- β)、表皮生长因子 (EGF) 购自 PeproTech 公司;佛泼酯 (TPA)、脂多糖 (LPS) 购自 Sigma 公司,其它试剂均为进口或国产分析纯。

核酸蛋白定量仪购自 Eppendorf 公司;GloMaxTM

96 孔板发光检测仪购自美国 Promega 公司;96 孔分析板购自 Corning 公司。

1.2 调控序列设计与合成

参考相关文献及生物信息系统 Transcriptional Regulatory Element Database 的 Transcription Factor Motif 查询,pSTAT-luc 调控序列为 STAT 转录因子结合元件,包含其核心序列及相邻的核苷酸序列,其正义链 (5'-3'): 5'-CTGATTTCCCGAAATGACG GCAAGTTCCTCAATCCC-3',来自编码人源干扰素调节因子-1 基因 (IRF-1,interferon regulatory factor 1) 启动子 (系列号:34347),而 5'-AGTTCCTCAA TCCC-3'来自编码人源 C-FOS 基因的启动子 (系列号:12010)。根据 pGL3-promoter 载体启动子上游多克隆位点酶切图谱,在其反义链 (3'-5') 的 5'末端和 3'末端分别设计 Kpn I 和 Xho I 酶切位点,以便于和载体连接。

1.3 DNA 片段回收与纯化

报道基因载体 pGL3-promoter 用 Kpn I 和 Xho I 双酶切,产物经胶回收并定量,于 -20 °C 冻存备用。pSTAT-luc 调控序列的正义链、反义链经退火处理形成的双链 DNA 备用。

1.4 重组报道基因载体的构建、筛选和鉴定

上述双链 DNA 和双酶切后 pGL3-promoter 载体由 T4 DNA 连接酶催化,于 16 °C 反应 4 h 之后,将连接反应混合物转化大肠杆菌菌株 Top10 的感受态细胞。挑取 10 个单菌落,少量扩增、提取质粒 DNA,直接测序鉴定,以筛选阳性克隆。

1.5 细胞培养及重组载体的转染

在 37 °C 5% CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清、200 mg/L 双抗的细胞培养液 RPMI1640、MEM 和 DMEM 分别培养 A549、PC-12、MCF-7 和 HeLa 细胞株。转染前 1 d 用 PBS 清洗细胞,将细胞接种于 48 孔板,用无抗生素的培养基培养 24 h,细胞达 70% 融合,用脂质体法转染质粒。每孔加入 pSTAT-luc 质粒 DNA 0.4 μ g,pRL-SV40 质粒 DNA 0.008 μ g、脂质体 2 μ L。转染 6 h 后每孔补充 0.5 mL 完全培养基。转染后 12 h 加入不同浓度的 INF- γ 、OSM、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、TGF- β 和 EGF,每个浓度 3 个重复孔,同时设置溶媒对照孔 (超纯水)。添加刺激因子 6 h 后收获细胞。

1.6 双荧光素酶报道基因表达活性检测

收获 48 孔板的细胞用 PBS 洗 2~3 次,用 50 μ L 1 \times 裂解液 (来源于荧光酶测定试剂盒 5 \times 裂解液贮备液) 裂解细胞,于平板振荡器上摇动 15 min,

取细胞裂解液按 5 μ L/每孔相应加入 96 孔板,备好萤火虫荧光素酶和海肾内参荧光素酶分析试剂,按 GloMax™96 孔板发光检测仪的操作手册进行的荧光素酶活性测定.

1.7 统计学方法

相对荧光素酶活性比值等于相应的萤火虫荧光素酶活性值除以相应的海肾荧光素酶活性值,所得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异. 统计分析使用 SPSS 13.0 软件.

2 结果

2.1 重组报道基因载体 pSTAT-luc 的构建

筛选挑取的单个菌落,提取其质粒进行测序. 结果显示,STAT 转录因子结合元件成功插入 pGL3-

promoter 载体中.

2.2 pSTAT-luc 载体的细胞株对不同细胞因子的反应分析

转染 pSTAT-luc 到细胞并用细胞因子刺激,分析 STAT 活化状态. 4 种实验细胞的反应性与多种刺激因子的有效性见 Table 1. 其中 INF- γ (1 ~ 1 000 U/mL) 和 OSM (1 ~ 10 ng/mL) 刺激 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞的相对表达比值较对照组均有显著升高, $P < 0.05$ (Fig. 1, 2), 且 INF- γ (0, 1, 3.33, 10 U/mL) 和 OSM (0, 0.1, 0.33, 1, 3.33, 10 ng/mL) 与相应荧光素酶相对表达值间存在线性相关关系,相关系数(r) 具有统计学意义, $P < 0.05$ (Table 2); PC-12 细胞对以上刺激均为阴性反应. IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 、TGF- β 、EGF、TPA、LPS 诸因子对前 3 种细胞株均无阳性反应.

Table 1 The responses of cell lines transfected with pSTAT-luc reporter upon treatment with cytokines and growth factors

pSTAT-luc-cell lines	INF- γ	OSM	IL-1 β	IL-2	IL-6	TNF- α	TGF- β	EGF	TPA	LPS
HeLa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MCF-7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A549	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PC-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cells were co-transfected with pSTAT-luc and calibration vector pRL-SV40, the factors listed above were added to the cell culture medium for 6 hours, and then the luciferase activity was assayed using dual-reporter assaying agent. “+” positive response; “-” negative response

Table 2 Pearson correlation between cytokines dose and the relative ratio of luciferase activity

pSTAT-luc-cell lines	INF- γ (0, 1, 3.33, 10 U/mL)		OSM (0, 0.1, 0.33, 1, 3.33, 10 ng/mL)	
	r	Sig. (2-tailed)	r	Sig. (2-tailed)
HeLa	0.635*	0.027	0.865**	0.000
A549	0.829**	0.001	0.843**	0.000
MCF-7	0.874**	0.000	0.851**	0.000

* Correlation was significant at the 0.05 level (2-tailed); ** Correlation was significant at the 0.01 level (2-tailed)

2.3 细胞因子 INF- γ 和 OSM 对含 pSTAT-luc 细胞株刺激的量效关系

INF- γ 对含 pSTAT-luc 的 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞的诱导最小有效浓度为 1 U/mL, MCF-7 最高相对表达比值较对照组升高 18 倍, HeLa 和 A549 细胞株对 INF- γ 的刺激反应较弱, 仅为前者的 1/4 倍左右 (Fig. 1).

OSM 对含 pSTAT-luc 的 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞的诱导最小有效浓度为 1 ng/mL, 其最高相对表达比值较对照组均升高约 1.5 ~ 2.5 倍, 但是比 INF- γ 的刺激反应程度弱 (Fig. 2).

3 讨论

报道基因技术能够简单、敏感、无害, 可靶向客观地观察细胞内的基因表达活动变化, 尤其适于以特定基因产物水平调节为靶向的药物高通量筛选^[8-10]. 本研究构建以 STAT 下游 DNA 结合序列串联子为调控序列的萤火虫荧光素酶为报道基因的重组质粒 pSTAT-luc, 以海肾荧光素酶报道基因 pRL-SV40 质粒作为内参照, 共转染各种细胞, 校正的萤火虫荧光素酶活性可以代表 STATs 元件调控下的基因表达的状况, 从而能够筛选引起 STATs 因子活化的药物或活性大分子.

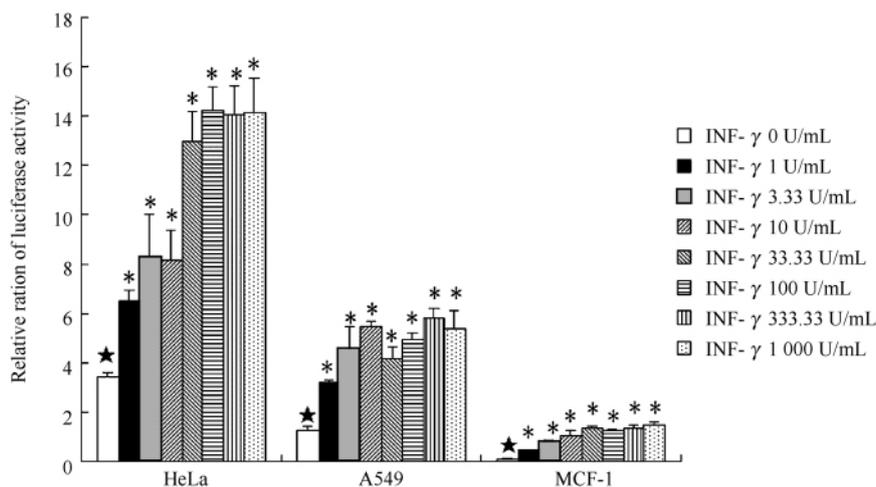


Fig. 1 The dose-dependent reporter response induced by $\text{INF-}\gamma$ in cell lines Cells were co-transfected with pSTAT-luc and calibration vector pRL-SV40, and the different concentration of $\text{INF-}\gamma$ (0, 1, 3.33, 10, 33.33, 100, 333.33, 1 000 U/mL) was added to culture medium and maintained for 6 hours (0 U/mL was marked with ★ for show the start level), then the luciferase activity was assayed using dual-reporter assaying system. The relative ratio of luciferase activity was the ratio of Luc/RL light intensity. Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$ versus the control group

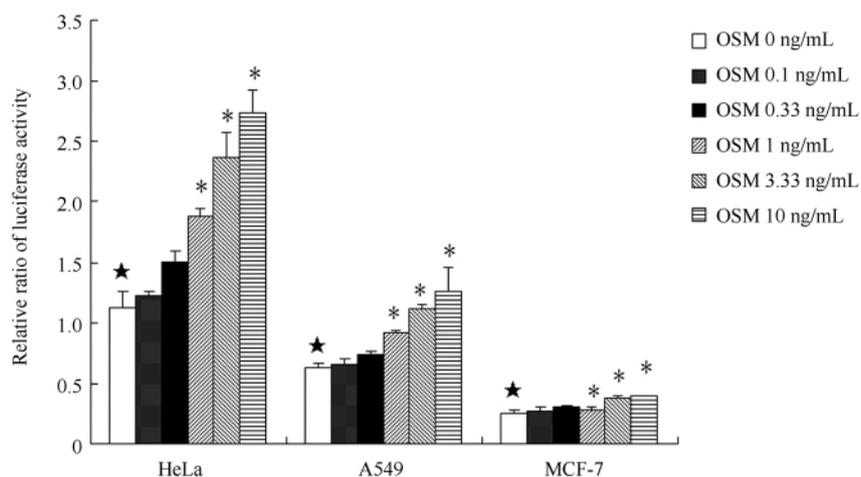


Fig. 2 The dose-dependent reporter response induced by OSM in cell lines Cells were co-transfected with pSTAT-luc and calibration vector pRL-SV40, and the different concentration of OSM (0, 0.1, 0.33, 1, 3.33, 10 ng/mL) was added to culture medium and maintained for 6 hours (0 U/mL was marked with ★ for show the start level), then the luciferase activity was assayed using dual-reporter assaying system. The relative ratio of luciferase activity was the ratio of Luc/RL light intensity. Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$ versus the control group

在建立药物筛选系统时,系统的敏感性和特异性是方法的关键.本文利用瞬时转染进行的研究结果显示,该方法具有良好的细胞特异性及敏感性和刺激因子特异性:在诸多所测试的细胞因子中,只有 $\text{INF-}\gamma$ 和 OSM 对转染 pSTAT-luc 的 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞具有不同刺激作用,转染 pSTAT-luc 的 PC-12 细胞株对所有的细胞因子刺激无响应.结果说明:1) 细胞内 JAK-STAT 通路激活具有细胞特异

性,HeLa、A549 和 MCF-7 细胞具有相关受体以及 STAT 信号分子,而不同的反应程度可能与受体水平、STAT 信号分子的种类以及数量差异有关;PC-12 细胞则可能缺乏上述相关因子的受体,因而不具有反应性^[11]. 2) MCF-7 细胞对细胞因子刺激反应强,且背景低,优于 HeLa 和 A549 细胞,有望作为今后的药物筛选细胞模型^[12]. 3) 转染 pSTAT-luc 的 HeLa、A549 和 MCF-7 细胞株仅对 $\text{INF-}\gamma$ 和 OSM 的

刺激有反应,对其它因子的反应为阴性,证明该报导系统具有较好的信号途径特异性. 因为 $\text{INF-}\gamma$ 和 OSM 是已证明的 JAK-STAT 通路的阳性细胞因子,而其它测试的因子均与该信号通路无关. 4) 在反应阳性的细胞株中, $\text{INF-}\gamma$ 激活作用强于 OSM, $\text{INF-}\gamma$ 是典型的 STAT 通路激活因子,刺激所引起的反应是直接激活效应^[13,14]. OSM 是一种多功能细胞因子,通过两类功能性受体复合物起作用^[15],除阳性信号外尚能够引起信号转导的负调节^[16],从而使 JAK/STAT 通路激活作用被部分抑制而弱化. 因此, $\text{INF-}\gamma$ 作为阳性刺激检验因子,OSM 可作为辅助性阳性刺激检验因子.

报道系统的敏感性问题是这类方法学最困难的关键问题之一. 本报道系统中, $\text{INF-}\gamma$ 对含 pSTAT-luc 的细胞刺激作用的最小有效量为 1 U/mL,这一水平在某些筛选应用中尚有不足,因此,我们需将 STAT 因子稳定转染细胞,提高其检测效率. 由于不同细胞可能具有不同的 STAT 家族成员组成,其引起的效应也有差异,在实施中还需要针对不同筛选目标进行具体设计和实验. 再者,若能够获得“正常”反应性的细胞系,今后将可以更客观地了解药物的刺激反应. 所以本室期望建立稳定转染的相对靶组织原代细胞模型,这将是较有说服力的且更为可靠性的系统.

参考文献 (References)

- [1] Ivashkiv LB, Hu X. Signaling by STATs [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, **6**(4): 159-168
- [2] Benekli M, Baer M R, Baumann H, *et al.* Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias [J]. *Blood*, 2003, **101**(8): 2940-2954
- [3] Nikol'skii N N, Vasilenko K P. STAT Pathway of intracellular signaling [J]. *Zh Evol Biochim Fiziol*, 2000, **36**(6): 504-508
- [4] Kostanian I A, Vonarshenko A V, Lipkin V M. STAT1: A many-sided transcription factor [J]. *Bioorg Khim*, 2010, **36**(1): 15-28
- [5] Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development [J]. *Cancer Sci*, 2006, **97**(6): 439-447
- [6] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(11): 798-809
- [7] Ortmann R A, Cheng T, Visconti R, *et al.* Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation [J]. *Arthritis Res*, 2000, **2**(1): 16-32
- [8] Fan F, Wood K V. Bioluminescent assays for high-throughput screening [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, **5**(1): 127-136
- [9] Naylo L H. Reporter gene technology: The future looks bright [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58**(5): 749-757
- [10] Lai C, Jiang X, Li X. Development of luciferase reporter-based cell assays [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2006, **4**(3): 307-315
- [11] Zhong H, Murphy T J, Minneman K P. Activation of signal transducers and activators of transcription by α (1A)-adrenergic receptor stimulation in PC12 cells [J]. *Mol Pharmacol* 2000, **57**(5): 961-967
- [12] 黄梅, 戒煜, 宁红秀, 等. 基于 JAK/STAT 信号通路的高通量药物筛选细胞模型的建立 [J]. *药学报* (Huang M, Rong Y, Ning H X, *et al.* Establishment of high-throughput drug screening cell models based on JAK-STAT signal pathway [J]. *Acta Pharm Sin*) 2004, **39**(3): 164-167
- [13] Darnell J E Jr, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, **264**(5164): 1415-1421
- [14] Hu X, Ivashkiv L B. Cross-regulation of signaling and immune responses by $\text{INF-}\gamma$ and STAT1 [J]. *Immunity*, 2009, **31**(4): 539-550
- [15] Heinrich P C, Behrmann I, Müller-Newen G *et al.* Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway [J]. *Biochem J*, 1998, **334**(Pt2): 297-314
- [16] Krebs D L, Hilton D J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling [J]. *Stem Cells*, 2001, **19**(5): 378-387