

# 子宫颈癌细胞中 STAT3 对 $\Delta$ Np63 $\alpha$ 的转录调控机制研究

钱莉莉<sup>1</sup>, 宋伟国<sup>1</sup>, 王娟<sup>1</sup>, 申震<sup>1</sup>, 吴大保<sup>1</sup>, 肖卫华<sup>2</sup>, 单革<sup>2</sup>, 周颖<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨  $\Delta$ Np63 $\alpha$  在子宫颈癌细胞株中的转录调控机制。方法 通过生物信息学分析  $\Delta$ Np63 $\alpha$  可能转录调控因子, 构建  $\Delta$ Np63 $\alpha$  启动子报告基因质粒, 在 HEK293T 及子宫颈癌细胞中通过报告基因检测  $\Delta$ Np63 $\alpha$  及细胞信号转导与转录激活因子 (STAT3) 对  $\Delta$ Np63 $\alpha$  转录水平的调控。通过 STAT3 的激活剂及抑制剂, 检测子宫颈癌细胞株中  $\Delta$ Np63 $\alpha$  的蛋白表达情况。通过 Western blot 检测  $\Delta$ Np63 $\alpha$  的表达水平对子宫颈癌细胞株中 P-STAT3 的表达影响。结果 ① 成功构建了含  $\Delta$ Np63 $\alpha$  启动子的质粒并通过酶切及测序验证; ② 荧光素酶报告基因检测系统显示  $\Delta$ Np63 $\alpha$ 、STAT3 均可以激活  $\Delta$ Np63 $\alpha$  启动子的表达; ③ Western blot 结果显示: STAT3 激活剂及抑制剂分别可以激活或抑制  $\Delta$ Np63 $\alpha$  蛋白的表达水平; ④ Western blot 结果显示:  $\Delta$ Np63 $\alpha$  蛋白的过表达或沉默可以抑制子宫颈癌细胞株中 STAT3 的磷酸化, 而对正常细胞株 HEK293T 没有相应的调控作用。结论 子宫颈癌细胞株中 STAT3 可以正性调控  $\Delta$ Np63 $\alpha$  的表达, 而  $\Delta$ Np63 $\alpha$  的表达上调负反馈抑制 STAT3 的磷酸化, 推测  $\Delta$ Np63 $\alpha$  可能通过与 STAT3 的复杂调控机制影响肿瘤细胞的恶性生物学行为。

**关键词** 子宫颈癌;  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ; STAT3; IL-6

**中图分类号** R 737.33

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0035-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.008

p63 是 p53 的家族成员之一, 位于染色体 3q27-3q29, 根据其 N 端转录激活区的不同, 分为 TAp63 和  $\Delta$ Np63, 根据其转录本 3' 端的选择性剪切产生不同的 C 端:  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  等<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示, p63 作为重要的转录因子, 在不同的组织中, 其发挥的功能也不

尽相同。其中  $\Delta$ Np63 主要表达部位在复层上皮基底细胞, 部分研究结果表明其在许多上皮性肿瘤中表达上调, 如膀胱癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌等; 但大部分证据表明其在上皮细胞的发育及分化尤其是表皮细胞的形成中发挥着重要的功能<sup>[4]</sup>。该课题组前期研究<sup>[5-6]</sup>结果显示 p63 在子宫颈癌组织及宫颈癌细胞株中的主要表达亚型  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , 且其表达的高低与宫颈癌分化程度密切相关。在宫颈癌细胞中  $\Delta$ Np63 的调控机制尚不清楚。

信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是 JAK-STAT 信号通路的重要成员, 在信号转导和转录激活上发挥了关键性的作用<sup>[7]</sup>。在不同的癌细胞系及原发肿瘤中 STAT3 的表达处于持续激活状态<sup>[8]</sup>。最近研究<sup>[9]</sup>显示, STAT3 能够负性调控肿瘤细胞中固有免疫和获得性免疫的应答, 提示其在人类肿瘤中的功能有待于进一步的研究<sup>[10]</sup>。该文探讨了子宫颈癌中  $\Delta$ Np63 的转录调控机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和试剂** TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶购自美国 Thermo 公司; T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司; pGL3-basic 系列质粒、真核  $\Delta$ Np63 $\alpha$  质粒及其对照质粒 PS10002 购自美国 Origene 公司; 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 购自上海生工生物工程有限公司; 脂质体 Lipofect2000、总 RNA 提取试剂 TRIzol 及逆转录试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; 上、下游引物由上海生物工程有限公司合成; STAT3 Inhibitor 购自美国 Santa Cruz 公司 (SC-204304), 经 DMSO 配成 20 mmol/L 分装后 -80 °C 保存备用。白介素 (interleukin, IL) -6 购自美国 PeproTech 公司, 经 0.1% BSA 的溶液溶解为 1 mg/ml, 分装后 -80 °C 保存备用; 双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国 Promega 公司; FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 购自美国 Roche 公司; p63 抗体购自美国 GeneTex 公司; STAT3、P-STAT3 (Tyr-705) 单抗购自美国 Cell signaling 公司; Western blot 化学发光底物购自美国 PIERCE 公司; DNA 胶回收试剂盒、PCR

2017-10-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81272881、81001168); 安徽省科技厅年度重点科研项目 (编号: 1301043053); 2015 年省学术和技术带头人后备人选科研活动经费 (编号: 2015H062); 中国科学院天然免疫与慢性疾病重点实验室开放课题 (编号: KLIICD-201603)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学附属省立医院妇产科, 合肥 230001

<sup>2</sup> 中国科学院天然免疫与慢性疾病重点实验室、中国科学院技术大学生命科学院, 合肥 230021

作者简介: 钱莉莉, 女, 硕士研究生;

周颖, 女, 副主任医师, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caddie1234@gmail.com

产物回收试剂盒、中小抽质粒试剂盒购自美国 Axygen 公司。

**1.2 细胞株** 人源胚胎肾细胞(293T)、子宫颈鳞癌细胞株(SiHa、ME-180)细胞株及子宫颈腺癌细胞株(C-33A)购自上海细胞所。其中 ME-180 细胞培养液为 McCoy's 5A Medium Modified + 10% 胎牛血清,余细胞均为 DMEM 高糖培养基 + 10% 胎牛血清。培养液均含有 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液和 100 mg/L 的氨苄青霉素和链霉素。

### 1.3 方法

**1.3.1  $\Delta$ Np63 $\alpha$  启动子序列的设计及合成** 在转录起始位点向上 900 bp 获得序列通过软件 Promoter 2.0 prediction 和 Softberry FPRM/human promoter prediction 软件分析序列预测  $\Delta$ Np63 $\alpha$  启动子位点,预测到 p53/p63 RE(-479 ~ -465) 及 STAT3 RE(-557 ~ 540)。设计并合成其启动子引物:上游引物序列为 5'-ACTGGGGCAGACATTTCTCTA-3',下游引物序列为 5'-TGCAGTTGCTCTCCAGCGGTTA-3'。

**1.3.2 双荧光素酶报告基因质粒的构建及鉴定** 抽取 SiHa 细胞基因组为模板,引物为合成的上述序列,以 TaqDNA 聚合酶进行 PCR 扩增,扩增时设计阴性对照。扩增产物用 1% 的琼脂糖胶中电泳,目的条带符合预期后切胶回收,目的条带回收产物及 PGL3-Basic Vector 分别用 Bgl II 和 Mlu I 双酶切过夜,酶切产物清回收后,目的基因与载体摩尔比为 1:5, T4 连接酶连接 2 h。经转化及涂含氨苄抗性 LB 平板(100 mg/L)筛出阳性克隆,挑 7 个克隆摇菌小抽提取质粒。各取 2  $\mu$ g 进行 0.9% 琼脂糖胶中电泳,选取质粒较完整者进行单双酶切鉴定,结果符合预期,于上海生工测序,测序正确,命名为  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter。

**1.3.3 细胞培养** 将 293T、C-33A、SiHa 细胞接种于含 10% FBS 的高糖完全培养液(含青霉素 100 U/ml 和链霉素 100  $\mu$ g/ml)中,ME-180 细胞接种于含 10% FBS 的 McCoy's 5A 完全培养基中,均置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 体积的饱和湿度培养箱中进行培养。用 0.25% 的胰蛋白酶消化并进行传代,约 3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

**1.3.4 重组质粒的转染** 取对数生长期的细胞按照  $6 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔培养板中培养过夜,待细胞密度约为 70% 时进行转染,转染前 2 h 换为不含双抗的 10% FBS 的新鲜培养液。用减血清培养基稀释 PRL-TK 质粒后,再分别稀释以下 4

组质粒: PGL3-Basic 与 PS10001 对照质粒;  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 质粒与 PS10001 对照质粒;  $\Delta$ Np63 $\alpha$  质粒与 PGL3 质粒;  $\Delta$ Np63 $\alpha$  质粒与  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 质粒(每孔质粒总质量为 1  $\mu$ g,其中 PRL-TK Vector 质粒为 0.1  $\mu$ g),每组质粒做 3 个复孔。参照 Lipofectamine 2000 脂质体转染体系说明,在 293T、SiHa、ME-180 及 C-33A 中共转染上述 4 组质粒,转染后 8 h 更换完全培养基。36 h 后处理细胞进行检测。在检测 STAT3 对  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 的作用时,则是在 293T、SiHa、ME-180 细胞系中共转染  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 及 PRL-TK Vector 质粒后,5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养 8 h 后换液,培养基中分别加入终浓度为 100、200 ng/ml 的 IL-6 及 50、100  $\mu$ mol/L 的 STAT3 Inhibitor。36 h 后处理细胞检测荧光素酶活性。

**1.3.5 双荧光素酶报告基因活性测定** 按照 Promega 双荧光素酶检测试剂盒提供的操作方法检测在细胞中转染不同质粒后  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 3'UTR 的荧光素酶的活性。用只含 PBS 的孔将荧光检测仪校准,测量萤火虫荧光素酶活性和海肾素荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活性/海肾素荧光素酶活性的值作为荧光素酶活性。以只转染空载体的细胞作为对照,并将该组的荧光素酶活性值进行归一化转染  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 3'UTR 质粒组的荧光素酶活性为其相对值。

**1.3.6 细胞的处理及 Western blot 检测** 待细胞密度为 60% 时,在培养液中加入不同浓度的 IL-6 和 STAT3 Inhibitor,48 h 后收细胞,采用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,冰箱 40 min,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液分别至新的 EP 管中,对每个样本进行蛋白定量,确定蛋白上样量。加蛋白上样缓冲液(4  $\times$ )和还原剂(1 mol/L DTT 或  $\beta$  巯基乙醇),比例为 13:5:2。沸水煮样 5 ~ 10 min,短暂离心后用手弹匀。SDSPAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜上。5% BSA 室温封闭 1 h,一抗孵育 4  $^{\circ}$ C 过夜,室温孵育二抗 1 h。洗膜后加入适量显影底物,化学发光检测仪成像。

**1.4 统计学处理** 实验数据用 GraphPad Prism 5.0 进行单因素方差分析和作图,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 重组质粒的测序鉴定

$\Delta$ Np63 $\alpha$ -promoter 双荧光素酶报告基因质粒酶切鉴定后送于公司测序,测序结果为单一尖峰,与 NCBI

参考序列比对符合预期(图1)。证明目的基因已成功转入 PGL3-Control 载体中。

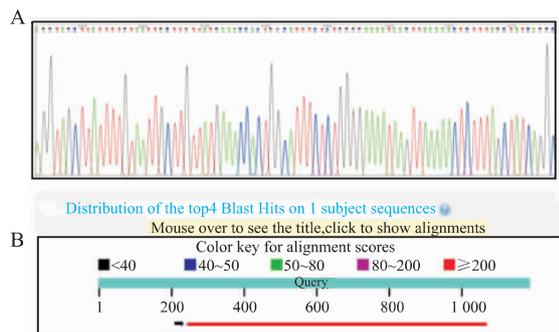


图1 构建  $\Delta Np63\alpha$ -promoter 质粒鉴定

A:  $\Delta Np63\alpha$ -promoter 质粒测序结果峰值; B: 测序结果与  $\Delta Np63\alpha$  5' UTR 区序列比对结果

**2.2  $\Delta Np63\alpha$  对自身调控的影响** 将构建的  $\Delta Np63\alpha$ -promoter 质粒与 pGL3-Basic 空载质粒分别转染至 HEK293T、SiHa、ME-180 及 C-33A 细胞中, 进行双荧光素酶报告基因检测, 显示与对照质粒相比,  $\Delta Np63\alpha$  启动子质粒活性在 HEK293T、SiHa、ME-180 及 C-33A 这 4 种细胞系中均显著升高, 升高倍数分别为 1.7 倍、2.8 倍、2.4 倍和 1.75 倍, 差异有统计学意义 ( $P = 0.0097, 0.0083, 0.0061, 0.0053$ )。见图 2。

**2.3 STAT3 对  $\Delta Np63\alpha$  转录水平的影响** 分别将  $\Delta Np63\alpha$ -promoter 质粒转染至 293T、SiHa 和 ME-180 细胞中, 通过加入不同浓度的 IL-6 (100、200 ng/ml) 和 STAT3 Inhibitor (50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行刺激 36 h, 报告基因结果显示 STAT3 在这 3 种细胞系中均能够在转录水平上调控  $\Delta Np63\alpha$  的表达, 其表达强度与 IL-6 的刺激浓度呈正相关性 ( $P = 0.0083, 0.0093, 0.0042$ ), 与 STAT3 Inhibitor 的刺激浓度呈负相关性 ( $P = 0.0074, 0.0037, 0.0046$ ), 差异有统计学意义。见图 3。

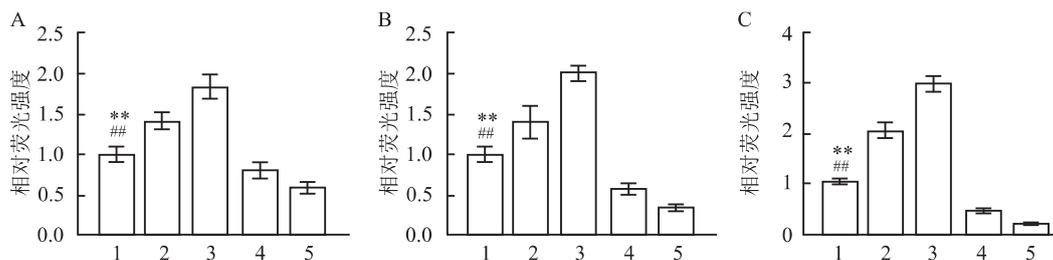


图3 不同细胞中 STAT3 对  $\Delta Np63\alpha$  启动子活性影响

A: 293T; B: SiHa; C: ME-180; 1: 只转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro; 2: 转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加低浓度 IL-6 刺激; 3: 转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加高浓度 IL-6 刺激; 4: 转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加低浓度 STAT3 抑制剂刺激; 5: 转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加高浓度 STAT3 抑制剂刺激; 与转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加高浓度 IL-6 刺激比较:  $**P < 0.01$ ; 与转染  $\Delta Np63\alpha$ -pro 后加高浓度 STAT3 抑制剂刺激比较:  $##P < 0.01$

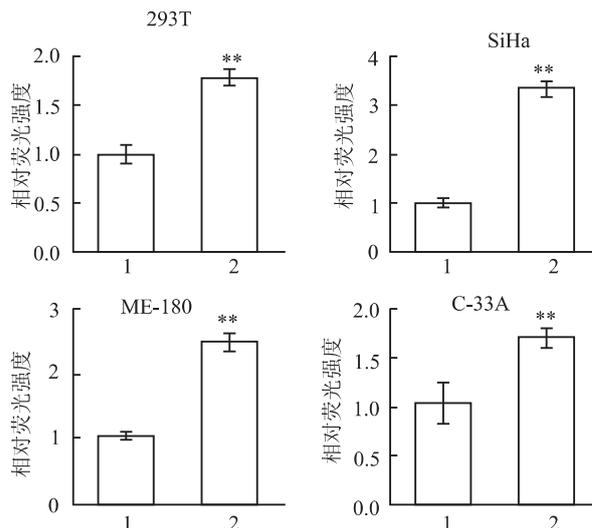


图2 4 种细胞中  $\Delta Np63\alpha$  质粒对  $\Delta Np63\alpha$  启动子的活性影响

1: pCon + promoter; 2:  $\Delta Np63\alpha$  + promoter; 与 pCon + promoter 比较:  $**P < 0.01$

**2.4 STAT3 对  $\Delta Np63\alpha$  的蛋白水平影响** 分别用不同浓度的 IL-6 和 STAT3 Inhibitor 刺激细胞 SiHa 和 ME-180 细胞后, Western blot 结果显示 IL-6 在 ME-180 能够激活  $\Delta Np63\alpha$  的表达, 但在 SiHa 细胞中激活作用不明显。STAT3 Inhibitor 均明显可抑制 2 种细胞系中  $\Delta Np63\alpha$  的表达(图 4)。

**2.5  $\Delta Np63\alpha$  对 STAT3 的调控作用** 通过检测 293T、SiHa、ME-180 细胞中  $\Delta Np63\alpha$  的表达水平, 显示与 ME-180 细胞相比,  $\Delta Np63\alpha$  在 HEK293T 及 SiHa 细胞中表达较低(图 5A)。将  $\Delta Np63\alpha$  瞬时转染 SiHa 细胞中, 显示 P-STAT3 的表达水平明显受到抑制; 而将  $\Delta Np63\alpha$  干扰序列瞬时转染 ME-180 细胞中, 显示 P-STAT3 的表达水平明显激活(图 5B)。在正常细胞 HEK293T 中, 瞬时转染不同浓度的  $\Delta Np63\alpha$ , P-STAT3 蛋白表达量并没有明显的变化(图 5C)。

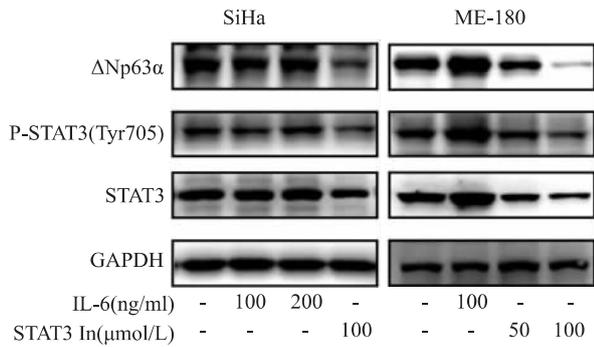


图4 不同浓度的 IL-6 及 STAT3 抑制剂对 SiHa 和 ME-180 细胞中 ΔNp63α 的表达影响

### 3 讨论

p63 作为重要的转录调控因子,主要选择性的高表达于上皮组织中,是上皮组织分化调控的关键基因<sup>[11]</sup>。其突变可能导致部分关键信号分子中的 RNA 剪切发生巨大变化从而可导致缺趾畸形、外胚层发育不良,表皮生成障碍等<sup>[12]</sup>。虽然 TAp63 的亚型的功能与 p53 相似,能够诱导细胞周期停滞及凋亡,但 p63 的抑癌功能尚存在争议<sup>[13]</sup>。在宫颈鳞状上皮和宫颈鳞癌细胞株中,p63 主要的表达亚型为 ΔNp63α,提示 ΔNp63α 在宫颈鳞状上皮的发生发展具有重要的功能。

有研究<sup>[14]</sup>表明,在肝癌细胞中 ΔNp63 具有双向的自我调控功能,ΔNp63α 水平较低时,ΔNp63α 可以通过结合到 p53 作用元件对自我进行负性调控。反之,当 ΔNp63α 水平较高时,其可以通过间接的方式正向的自我调控。在本研究中,首先通过生物信息学分析了 ΔNp63α 的启动子位点,显示了其

启动子区含有 p63 及 STAT3 的作用元件,并构建了 ΔNp63α 报告基因质粒。通过将报告基因质粒转染到 HEK293T 及宫颈癌细胞(SiHa、ME-180、C-333A)中进行报告基因检测,结果表明 ΔNp63α 及 STAT3 均能够正性激活 ΔNp63α 的转录活性。通过加入 IL-6 及 STAT3 抑制剂刺激 SiHa 及 ME-180 细胞后,在蛋白水平,同样显示 STAT3 的激活可以促进 ΔNp63α 的表达,而抑制 STAT3 的表达同时 ΔNp63α 的表达水平也显著下调,进一步确定了 STAT3 对 ΔNp63α 表达的正性调控作用。STAT3 在许多癌细胞系及原发性肿瘤组织中处于持续激活状态并能抑制细胞的凋亡,如前列腺癌、非小细胞肺癌等<sup>[7]</sup>。相反,在许多癌细胞中,抑制 STAT3 的表达可抑制细胞增殖及诱导其凋亡<sup>[15]</sup>。已有研究<sup>[16]</sup>表明 JAK/STAT3 信号通路的异常表达与细胞的恶性转化密切相关。细胞因子可通过 JAK1 途径刺激酪氨酸磷酸化,而 Tyr-705 的磷酸化作用可通过加强 STAT3 的二聚化、核转运及 DNA 结合作用进而增强 STAT3 应答基因的表达<sup>[17-18]</sup>。

本研究进一步对 ΔNp63α 是否对 STAT3 具有调控作用进行探讨,首先在 HEK293T 和两种不同的宫颈癌细胞系 SiHa、ME-180 细胞中检测了 ΔNp63α、P-STAT3 的表达水平,本研究显示在这两种宫颈癌细胞系中 ΔNp63α 的表达水平与 STAT3 的活性呈负相关性。值得深思的是,在 SiHa 细胞系中过表达 ΔNp63α,同时在 ME-180 细胞系中进行 ΔNp63α 敲低,检测 STAT3 的活性,同样显示 ΔNp63α 对 STAT3 呈负反馈调控。而在正常细胞 HEK293T 中,不同程度过表达 ΔNp63α,P-STAT3 的表达无明显变化,推测可能由于正常细胞的微环境

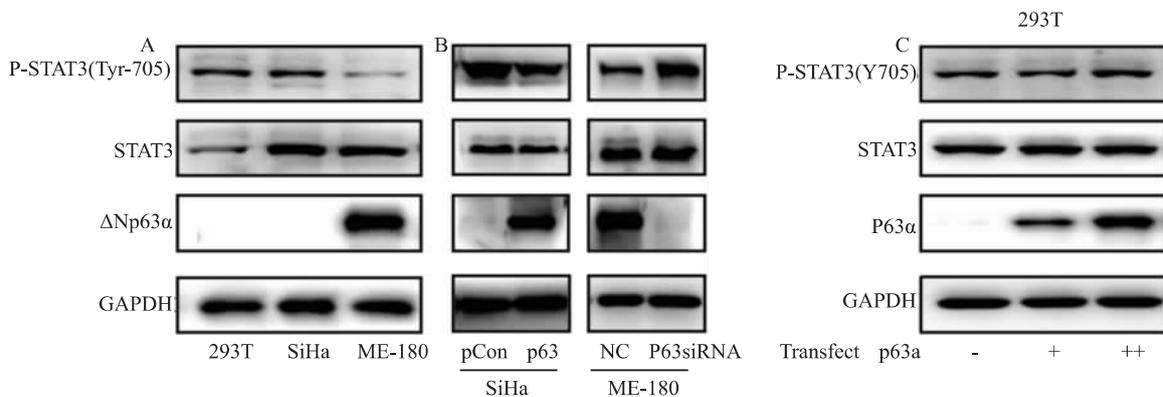


图5 ΔNp63α 表达对 P-STAT3( Tyr705) 表达的影响

A: 293T、SiHa、ME-180 种细胞中 ΔNp63α 与 P-STAT3 本底表达水平; B: SiHa 细胞中过表达 ΔNp63α, P-STAT3 表达下调和 ME-180 细胞中敲低 ΔNp63α, P-STAT3 表达上调; C: 293T 细胞中过表达 ΔNp63α, P-STAT3 表达无明显变化

与肿瘤细胞的微环境的差异及基因表达谱不同有关。

综上所述,本研究明确了子宫颈癌细胞株中  $\Delta Np63\alpha$  的转录调控机制,并且显示  $\Delta Np63\alpha$  在子宫颈癌细胞及正常细胞株中对 STAT3 的表达水平影响不同,推测  $\Delta Np63\alpha$  在子宫颈癌细胞株中可能具有抗肿瘤的作用。

### 参考文献

- [1] Wang L, Zhou M, Feng C, et al. Prognostic value of Ki67 and p63 expressions in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(4): 495–501.
- [2] Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, et al. The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 719–24.
- [3] Hegazy R, Kamel M, Salem E A, et al. The prognostic significance of p53, p63 and her2 expression in non-muscle-invasive bladder cancer in relation to treatment with bacille Calmette-Guerin [J]. *Arab J Urol*, 2015, 13(3): 225–30.
- [4] Gonfloni S, Caputo V, Iannizzotto V. P63 in health and cancer [J]. *Int J Dev Biol*, 2015, 59(1–3): 87–93.
- [5] Zhou Y, Xu Q, Ling B, et al. Reduced expression of Delta Np63 alpha in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Clin Invest Med*, 2011, 34(3): E184–91.
- [6] Shirendeb U, Hishikawa Y, Moriyama S, et al. Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2009, 42(6): 181–90.
- [7] Bui Q T, Im J H, Jeong S B, et al. Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 390: 115–25.
- [8] McDaniel J M, Varley K E, Gertz J, et al. Genomic regulation of invasion by STAT3 in triple negative breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8226–38.
- [9] Cacace A, Sboarina M, Vazeille T, et al. Glutamine activates STAT3 to control cancer cell proliferation independently of glutamine metabolism [J]. *Oncogene*, 2017, 36(15): 2074–84.
- [10] Nakamura H, Taguchi A, Kawana K, et al. STAT3 activity regulates sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cervical cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 2155–62.
- [11] Dabelsteen S, Hercule P, Barron P, et al. Epithelial cells derived from human embryonic stem cells display p16INK4A senescence, hypermotility, and differentiation properties shared by many P63 + somatic cell types [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1388–99.
- [12] Kurita T, Cunha G R. Roles of p63 in differentiation of Mullerian duct epithelial cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 948: 9–12.
- [13] Nair R P, Krishnan L K. Identification of p63 + keratinocyte progenitor cells in circulation and their matrix-directed differentiation to epithelial cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(2): 38.
- [14] Chu W K, Dai P M, Li H L, et al. Transcriptional activity of the Delta Np63 promoter is regulated by STAT3 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(12): 7328–37.
- [15] Hu Y, Zhao C, Zheng H, et al. A novel STAT3 inhibitor HO-3867 induces cell apoptosis by reactive oxygen species-dependent endoplasmic reticulum stress in human pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(4): 392–400.
- [16] Liu R Y, Zeng Y, Lei Z, et al. JAK/STAT3 signaling is required for TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1643–51.
- [17] Wang S W, Sun Y M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(4): 1032–40.
- [18] Ren W, Shen S, Sun Z, et al. Jak-STAT3 pathway triggers DICER1 for proteasomal degradation by ubiquitin ligase complex of CUL4A(DCAF1) to promote colon cancer development [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 209–20.

## Study on the transcriptional regulation mechanism of $\Delta Np63\alpha$ and STAT3 in cervical cancer cells

Qian Lili, Song Weiguo, Wang Juan, et al

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the regulatory role of  $\Delta Np63\alpha$  in cervical cancer cell lines and its mechanism. **Methods** We first predicted the possible transcriptional regulators through the bioinformatics analysis and constructed the reporter gene plasmids of  $\Delta Np63\alpha$  promoter. Then we detected the regulatory function of  $\Delta Np63\alpha$  and signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) to  $\Delta Np63\alpha$  promoter in HEK293T and cervical cancer cell lines. The effect of  $\Delta Np63\alpha$  on the expression of P-STAT3 in cervical cancer cells were detected by Western blot. **Results** ① A plasmid containing the  $\Delta Np63\alpha$  promoter was constructed successfully identified by sequencing technique; ② The luciferase reporter gene revealed that  $\Delta Np63\alpha$  and STAT3 can positively regulated the

## 结核分枝杆菌耐药性相关膜蛋白 MmpL6 的表达与纯化

崔克乐<sup>1</sup>, 李静<sup>2</sup>, 孙安源<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 构建结核分枝杆菌外排泵蛋白 MmpL6 (Rv1557) 表达载体, 在大肠杆菌 *E. coli* 中诱导 MmpL6 蛋白高表达并进行纯化。**方法** 以结核分枝杆菌 H37Rv 菌株基因组 DNA 为模板, 采用聚合酶链反应扩增目的基因片段, 构建 pET21b-MmpL6 表达载体。将表达载体转化至大肠杆菌中, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组蛋白表达, 并针对不同表达菌株、温度进行优化, 获取最优表达条件。采用 Ni-NTA 亲和层析以及凝胶过滤色谱纯化目标蛋白。**结果** 成功构建 pET21b-MmpL6 重组表达质粒, 经 IPTG 诱导后, 在 Rosetta 菌株中 25 °C 条件下获得最高表达量。**结论** 成功表达并纯化了 MmpL6 蛋白, 为该蛋白后续的结构与功能研究奠定了基础。

**关键词** 结核分枝杆菌; 外排泵蛋白; 原核表达; 纯化; 亲和层析

**中图分类号** R 378.91

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0040-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.009

结核病是世界范围内流行的三大传染性疾病之一, 对人类健康具有严重危害<sup>[1]</sup>。结核分枝杆菌是结核病的致病菌, 能够产生多种致病因子, 并极易发生毒力、免疫原性和耐药性等变异, 其中耐药性变异是目前结核病治疗上的重要难题。研究<sup>[2]</sup>显示, 分枝杆菌存在药物主动外排泵的表达, 是结核分枝杆

菌内生耐药性的重要机制。结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组有 20 个编码外排泵蛋白的开放阅读框<sup>[3]</sup>。根据氨基酸序列的同源性, 这些蛋白大致分为四类: MFS (major facilitator superfamily) 类、RND (resistance-nodulation-division family) 类、ABC 转运体 (ATP-binding castle transporters) 和 SMR (small multi-drug resistance) 类。这些药物外排泵蛋白主要转运氟喹诺酮类、四环素、氨基糖苷类药物<sup>[4]</sup>。

在转运蛋白的 RND 超家族中, MmpL 家族蛋白已经成为研究棒状细菌细胞包膜相关功能的重要切入点<sup>[3-4]</sup>。结核分枝杆菌的基因组编码有 13 个 MmpL 蛋白<sup>[3]</sup>, 拓扑结构预测表明 MmpL 家族具有典型的 12 次跨膜结构。然而 MmpL6 (Rv1557) 预测只有 6 次跨膜, 因此是 MmpL 家族中较为特殊的一个成员, 目前对于其功能尚未有明确报道。该研究将构建 MmpL6 蛋白的原核表达载体, 在大肠杆菌中表达目的蛋白, 为进一步制备蛋白, 研究其结构与生物学功能, 设计针对 MmpL 家族的抗结核药物提供线索和基础。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂与菌株** PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase、dNTP Mixture、100 bp DNA Marker、限制性内切酶 Nde I、Xho I、T4 DNA Ligase 等购自大连宝生物工程有限公司; TIANprep mini plasmid kit (50 次) 购自北京天根生化科技有限公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、anti-His 抗体购自美国 Promega 公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; N-十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷 (n-do-

2017-09-25 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085QH177)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学附属省立医院检验科, 合肥 230001

<sup>2</sup> 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 崔克乐, 女, 博士;

孙安源, 男, 博士, 副主任技师, 责任作者, E-mail: ustesu-nay@163.com

activity of  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ; ③ STAT3 stimulant and inhibitor can activate and inhibit the expression of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  detected by Western blot; ④ Overexpression of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  negatively control the phosphorylation level of STAT3 and knock-down of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  can activate the expression of P-STAT3, but no effects on HEK293T cells. **Conclusion** STAT3 can positive regulate the expression of  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , while  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in turn inhibits the activity of STAT3 in cervical cells. It is presumed that  $\Delta$ Np63 $\alpha$  may affect the malignant biological behavior of tumor cells through the complex regulatory mechanism with STAT3.

**Key words** cervical cancer;  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ; STAT3; IL-6