论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0700-04

RNA干扰抑制KM_3细胞APE1蛋白表达对其增殖与凋亡的影响

谢家印,王 东,杨镇洲,王 阁,向德兵,李增鹏 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease,APE1)基因RNA干扰对KM_3人多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)细胞APE1蛋白表达及细胞增殖、凋亡的影响,以期为转基因治疗多发性骨髓瘤提供实验依据。**方法** 将构建的APE1siRNA表达载体导入人多发性骨髓瘤细胞株KM_3细胞,应用Western blot检测APE1蛋白表达的改变,并通过细胞增殖曲线、MTT法和流式细胞术、DNA片段化百分率检测观察靶细胞的增殖与凋亡。**结果** Western blot分析表明APE1siRNA表达载体使KM_3细胞APE1蛋白表达下降,细胞生长曲线观察、MTT法检测显示,转染的KM_3细胞生长受抑,流式细胞术和DNA片段化百分率检测观察到APE1 RNA干扰使靶细胞凋亡明显增加。**结论** APE1 RNA干扰通过降低APE1蛋白表达,抑制KM_3细胞生长和促进其凋亡。

关键词:多发性骨髓瘤;凋亡;APE1基因;RNA干扰;DNA损伤修复

中图法分类号:R73-362;R730.23;R733.3 **文献标识码**:A

Proliferation and apoptosis of KM_3 cells after decreasing APE1 protein level using silencing RNA

XIE Jia-yin, WANG Dong, YANG Zhen-zhou, WANG Ge, XIANG De-bing, LI Zeng-peng (Center of Oncology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the expression of APE1 protein and proliferation, apoptosis of KM_3 cells by decreasing apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) gene expression by RNA interfering. **Methods** APE1siRNA expression vector or pSilencer U_6-control (as blank control) were transfected to KM_3 cells by liposome. The changes of APE1 protein was detected by Western blotting. The cellular proliferation capacity was observed with cell growth curve and MTT assay. The cell cycle distribution and apoptosis rate were measured by flow cytometry and DNA fragmentation rate. **Results** The expression of APE1 protein decreased in KM_3 cells by RNAi. The proliferation of transfected KM_3 cells was inhibited and the apoptosis of the transfected KM_3 cells increased significantly. **Conclusion** The APE1-siRNA could inhibit the proliferation and improve the apoptosis of KM_3 cells.

Key words: multiple myeloma; apoptosis; APE1 gene; RNA interfering; DNA damage repair

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)治疗中,化疗占据着不可替代的重要地位。影响MM化疗效果进一步提高的因素很多,其中,耐药性是影响疗效的最重要因素之一[1,2]。近年来,随着对DNA损伤修复机制研究的深入,对DNA损伤修复与肿瘤耐药的相关性研究尤为引人关注。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease,APE1)具有DNA损伤修复和氧化还原双功能,主要负责修复烷化剂和氧化性损伤的DNA脱嘌呤/脱嘧啶(apurinic/apyrimidinic,AP)位点[3],我们既往的研究表明APE1表达增强与多发性骨髓瘤细胞对马法兰耐药有关[4],且其表达强度可影响MM疗效和预后[5]。RNAi技术是目前沉默某些致病基因功能的有效手段。因而我们将构建的APE1siRNA表达载体导入人多发性骨髓瘤细胞株KM_3细胞,观察其对KM_3细胞APE1蛋白表达及细胞增殖、凋亡的影响,以期为进一步转基因治疗多发性骨髓瘤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

人多发性骨髓瘤细胞株KM_3在含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素和2 mmol/L谷氨酰胺的RPMI1640培养基内,37 ℃、饱和湿度、5% CO_2,常规培养传代。pSilencer U_6-control、APE1siRNA由我室自行构建[6]。

1.2 试剂和仪器

DOTAP脂质体转染试剂盒:Roche集团,兔抗人APE1多克

作者简介:谢家印(1964-),男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤DNA损伤修复分子机制方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68757354

收稿日期:2005-09-16;**修回日期**:2005-11-28

隆抗体：美国 SantaCruz 公司，PVDF 膜购自 DUPONT 公司，垂直平板式电泳槽为北京六一厂产品，DAB 显色试剂购自大连 TaKaRa 公司。MTT 为 Sigma 公司产品，流式细胞仪：FACS-440 型，美国。

1.3　APE1siRNA 载体转染 KM_3 细胞及阳性克隆的筛选

1.3.1　APE1siRNA 质粒转染（同时设 pSilencer U_6-control 转染为对照组）　按 DOTAP 脂质体转染试剂盒说明书进行：处于对数生长期的 KM_3 细胞，于转染前 1 d，换新鲜培养液后调整浓度为 2×10^5/ml，以 5 ml/孔接种于 6 孔培养板中培养。用 10 mmol/L HEPES 缓冲液将 3 μg 质粒 DNA 稀释至 50 μl，将 30 μl DOTAP 脂质体稀释至 100 μl，再将他们混合并轻轻摇匀，室温放置 15 min。将待转染细胞换新鲜培养基后，加入质粒 DNA/脂质体复合物 150 μl，混匀，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度培养 8 h（每小时振摇 1 次），换新鲜培养液继续培养 48 h。

1.3.2　阳性克隆的筛选　转染细胞培养 48 h 后按 1∶3 传代，加 800 μg/ml G418 筛选，每 2～3 天换液 1 次。第 7 天左右空白对照细胞完全死亡，10 d 后减低 G418 的浓度为400 μg/ml 维持筛选 7 d。取对数生长期细胞，制备成 100 细胞/ml 悬液，接种于 96 孔板中，每孔 0.1 ml。次日挑选只含有 1 个细胞的孔，作好标记。当细胞形成较大的克隆时，转种于 24 孔板扩大培养，细胞扩增后冻存保种。

1.4　Western blot 分析 APE1siRNA 诱导 APE1 基因表达沉默作用

收集不同条件处理的 KM_3 细胞，按 1×10^7 细胞加入 100 μl 预冷至 0 ℃的细胞裂解液冰上放置 30 min，低温 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液 100 ℃煮沸变性 5 min，为确保蛋白上样量一致，样品中蛋白经 Bradford 定量，样品中蛋白通过 12% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上，加入兔抗人-APE1 抗体（1∶500），4 ℃过夜，用 PBS 洗膜 10 min，3 次，加入 1∶20 稀释的生物素化二抗（通用型生物素标记羊抗兔和鼠 IgG）工作液，室温振摇 1 h，PBS、Tris · Cl 洗膜后，加入 1∶20 稀释的辣根过氧化酶标记链霉卵白素工作液，室温振摇 1 h，Tris · Cl 洗膜 10 min，3 次，用含 0.05% DAB、0.03% H_2O_2 的 10 mmol/L Tris · Cl（pH 7.4）室温避光显色，至理想条带出现，水冲洗，膜保存于 PBS 中，照相。最后，以 image-pro plus 4.5 图像分析系统测定各条带灰度值，以此反映 APE1 蛋白的表达程度。

1.5　细胞增殖曲线观察

不同条件处理的 KM_3 细胞以 1×10^5 个/ml 细胞密度接种于 24 孔培养板中，每孔 1 ml，加处理因素，培养 1～4 d，每天各取 3 孔，台盼蓝染色，计数，绘制生长曲线。

1.6　MTT 比色法检测多发性骨髓瘤细胞的增殖功能

选择指数增生期的 KM_3 细胞，台盼蓝染色计数，以 1×10^5 个/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板，每孔 200 μl，培养 1～3 d，每孔加入 15 μl MTT（5 mg/ml）、空白对照加 20 μl 0.01 mol/L PBS，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度条件下培养 4 h。去掉培养液，加入 200 μl 异丙醇、二甲基亚砜混合液（1∶1，体积分数），将 96 孔板置水平摇床上摇动 10 min，在 96 孔酶标仪上测定每孔 492 nm处 OD 值[$D(492)$]。

细胞存活率(%) = 实验组 $D(492)$ 值/对照组 $D(492)$ 值 ×100%

1.7　流式细胞仪检测多发性骨髓瘤细胞周期分布及凋亡

将不同条件处理的 KM_3 细胞吹打均匀，制成单细胞悬液，转移至 5 ml 离心管，离心 1 000 r/min×5 min。PBS 洗 2 次，用 PBS 重悬细胞，计数，调整细胞浓度至 10^6/ml。沿管壁缓慢加入 -20 ℃预冷的 95% 乙醇，使其终浓度为 70%，冰浴 30 min，4 ℃放置。用 PBS 洗去细胞固定液酒精，调节细胞浓度 10^6/ml，加入等体积的 PI 染液 1 ml，4 ℃放置 30 min。以 300 目尼龙膜过滤，用 FCS4000 型流式细胞仪测定每个细胞的荧光强度。

1.8　DNA 片段化百分率检测

选用 KM_3、$KM_3^{APE1control}$ 及 $KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞，予 15 μmol/L 马法兰处理 1～2 d，参照 Lenardo 等[7]的方法。细胞（约10^6个）在 400 μl 低渗溶解缓冲液（10 mmol/L Tris · Cl，1 mmol/L EDTA，0.2% Triton X-100，pH 7.5）中溶破，37 ℃水浴 1 h，13 000×g 离心 15 min，上清移至另一离心管中，上清和沉淀中分别加入 1 ml 12.5% 三氯醋酸，4 ℃过夜，离心弃上清，加 80 μl 5% 三氯醋酸，90 ℃，15 min，再加入 160 μl 新鲜配制的二苯胺试剂（1.5 g二苯胺、1.5 ml 浓硫酸、0.5 ml 乙醛溶于 98 ml 冰醋酸），37 ℃水浴过夜，200 μl 转移至 96 孔培养板中，用酶标仪在 595 nm处检测 OD 值[$D(595)$]。

$$\text{DNA 片段化百分率}(\%)=\frac{\text{上清 } D(595)}{\text{上清 } D(595)+\text{沉淀 } D(595)}\times100\%$$

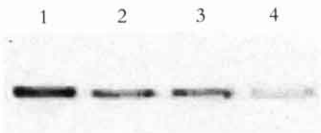
1.9　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 软件包进行方差分析。

2　结果

2.1　Western blot 分析 APE1siRNA 诱导 APE1 基因表达沉默情况

测定免疫印迹相应蛋白条带的光密度值，结果显示：APE1siRNA 质粒 3 μg 转染 KM_3 细胞组，APE1 表达较 pSilencer U_6-control 和单独脂质体组显著降低，沉默效率约为 KM_3 空白组的 80%（图 1、表 1）。表明 APE1siRNA 表达载体转染成功，且其可明显诱导 APE1 基因沉默。



1：KM_3 组；2：脂质体组；3：pSilencer U_6-control 质粒组；4：APE1siRNA 质粒组

图 1　Western blot 分析 APE1siRNA 转染对 KM_3 细胞 APE1 蛋白表达的影响

表 1　APE1siRNA 质粒转染对 KM_3 细胞 APE1 蛋白表达的影响

组别	A_{APE1}
APE1siRNA 质粒组	0.216 ± 0.050
pSilencer U_6-control 质粒组	0.833 ± 0.043[a]
脂质体组	0.862 ± 0.051[a]
KM_3 组	0.988 ± 0.029[a]

A_{APE1} 为灰度值；a：$P<0.01$，与 APE1siRNA 质粒组比较

2.2 细胞生长曲线观察

$KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞与未转染 KM_3 细胞及 $KM_3^{APE1control}$ 细胞相比，细胞生长受抑（图2）。

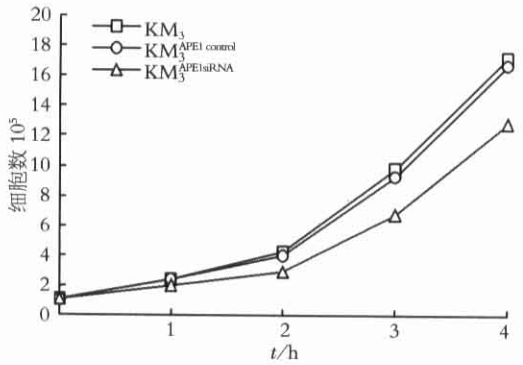


图2 转染 APEsiRNA 质粒后 KM_3 细胞增殖曲线

2.3 MTT 法检测 APE1siRNA 对 KM_3 细胞增殖功能的影响

MMT 比色实验结果显示，KM_3、$KM_3^{APE1control}$ 和 $KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞培养 1～3 d，$KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞 D(492) 值比 KM_3、$KM_3^{APE1control}$ 细胞明显下降（$P<0.05$）（表2）。表明 APE1siRNA 表达载体对 KM_3 细胞具有增殖抑制作用。

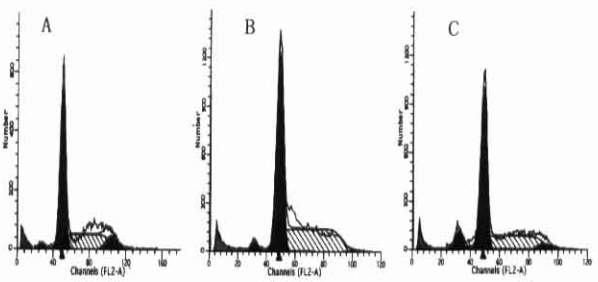
表2 MTT 法检测 APE1siRNA 对 KM_3 细胞增殖功能的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	培养时间		
	1 d	2 d	3 d
KM_3	0.391±0.018	0.766±0.038[a]	1.044±0.061[a]
$KM_3^{APE1control}$	0.385±0.031	0.760±0.034[a]	1.029±0.041[a]
$KM_3^{APE1siRNA}$	0.378±0.029	0.567±0.028	0.838±0.037

a：$P<0.05$，与 $KM_3^{APE1siRNA}$ 组比较

2.4 流式细胞仪分析 APE1siRNA 对 KM_3 细胞周期相分布及凋亡率的影响

收集 KM_3、$KM_3^{APE1control}$ 和 $KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞，流式细胞仪分析细胞周期相分布和凋亡率，结果显示：$KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞 G_1/G_0 期阻滞增多，S 期细胞减少，细胞凋亡率增加（图3）。



A：KM_3 细胞周期分布和凋亡率；B：$KM_3^{APE1control}$ 细胞周期分布和凋亡率；C：$KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞周期分布和凋亡率

图3 流式细胞仪分析 APE1siRNA 对 KM_3 细胞周期相分布及凋亡率的影响

2.5 DNA 片段化百分率分析 APE1siRNA 对 KM_3 细胞凋亡的影响

进一步分析 DNA 片段化百分率得到类似结果：APE1siRNA 转染的马法兰处理 KM_3 细胞 DNA 片段化百分率显著增高，提示细胞凋亡百分率增加（表3）。

表3 APE1siRNA 转染对马法兰处理 KM_3 细胞 DNA 片段化百分率的影响［$n=3$，($\bar{x}\pm s$)%］

组别	1 d	2 d
KM_3	8.33±2.52[a]	9.57±1.98[a]
$KM_3^{APE1control}$	9.23±2.06[a]	11.50±1.80[a]
$KM_3^{APE1siRNA}$	18.13±2.90	20.20±2.63

a：$P<0.01$，与 $KM_3^{APE1siRNA}$ 组比较

3 讨论

人类基因的功能是编码遗传信息从而保护其完整性。DNA 损伤修复基因可修复癌基因和细胞化学物所致的核苷酸残基的破坏，从而保护遗传信息的完整性。脱嘌呤嘧啶核酸内切酶（APE1）是1个 DNA 碱基切除修复途径的限速酶[3]，具有氧化还原与 DNA 损伤修复双功能。既可以修复 DNA 的碱基损伤，对损伤的适应性反应起着重要作用[8]；又参与氧化还原反应，通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态，而参与多种关键的细胞反应，如氧化应激，转录因子调节，细胞周期控制与凋亡等[9]。如转录因子 AP-1 家族的 c-fos、c-jun 基因属于即早基因，其产物（Jun 和 Fos）的 DNA 连接功能分别依赖于其 DNA 连接域内半胱氨酸（Cys）亚基的氧化还原状态，在氧化状态下，无法连接 DNA 链，而 APE/Ref-1 N 端能维持 Fos 和 Jun 半胱氨酸的还原状态，以保证其正常的 DNA 连接功能，顺利地完成转录任务[10]。因此，APE1 蛋白与细胞增殖、分化、DNA 损伤修复密切相关[11,12]。

RNAi 技术是目前沉默某些致病基因功能的有效手段。本研究通过构建 APE1siRNA 表达载体，并将该重组质粒导入人多发性骨髓瘤细胞株 KM_3 细胞，采用单克隆筛选法和报告基因 EGFP 与 RNAi 质粒共转染观察，保证实验中所选细胞具有较高的纯度和表达率[6]。Western blot 分析表明，APE1siRNA 质粒诱导 APE1 基因沉默效率约为 80%，表明 APE1siRNA 表达载体转染成功。进一步通过细胞生长曲线、MTT 法检测观察敲除 APE1 蛋白表达对 KM_3 细胞增殖的影响，结果表明：$KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞与未转染 KM_3 细胞及 $KM_3^{APE1control}$ 细胞相比，细胞生长明显受抑，提示 APE1 蛋白为细胞增殖的重要因子。应用流式细胞术和 DNA 片段化百分率检测发现，APE1 RNA 干扰使靶细胞凋亡明显增加，且 $KM_3^{APE1siRNA}$ 细胞 G_1/G_0 期阻滞增多，S 期细胞减少。本研究为进一步探讨 APE1siRNA

载体拮抗肿瘤耐药，增强化疗药物对 MM 细胞的敏感性提供了实验依据。

参考文献：

[1] STEIN W D, BATES S E, FOJO T. Intractable cancers: the many faces of multidrug resistance and the many targets it presents for therapeutic attack[J]. Curr Drug Targets, 2004, 5(4): 333 - 346.

[2] SAWICKA M, KALINOWSKA M, SKIERSKI J, *et al*. A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence[J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(9): 1067 - 1081.

[3] EVANS A R, LIMP-FOSTER M, KELLEY M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83 - 108.

[4] 杨镇洲，王　东，谢家印，等. APE1 表达增强与多发性骨髓瘤细胞对马法兰耐药的关系研究[J]. 肿瘤防治杂志，2005，12(19)：1445 - 1448，1452.

[5] 杨镇洲，陈幸华，王　东，等. 多发性骨髓瘤患者 APE1 蛋白表达的临床意义[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：554 - 556.

[6] 杨镇洲，陈幸华，张　曦，等. 多发性骨髓瘤特异的 APE1siRNA 在 KM_3 细胞中的转染与表达[J]. 重庆医学，2005，34(9)：1308 - 1309，1312.

[7] LENARDO M J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis[J]. Nature, 1991, 353 (6347): 858 - 861.

[8] RAMANA C V, BOLDOGH I, IZUMI T, *et al*. Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9): 5061 - 5066.

[9] OKAZAKI T, CHUNG U, NISHISHITA T, *et al*. A redox factor protein, ref1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium[J]. J Biol Chem, 1994, 269 (45): 27855 - 27862.

[10] KAKOLYRIS S, KAKLAMANIS L, ENGELS K, *et al*. Human AP endonuclease 1(HAP1) protein expression in breast cancer correlates with lymph node status and angiogenesis[J]. Br J Cancer, 1998, 77 (7): 1169 - 1173.

[11] KAWASE M, FUJIMURA M, MORITA-FUJIMURA Y, *et al*. Reduction of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis[J]. Stroke, 1999, 30(2): 441 - 449.

[12] GILLARDON F, BOTTIGER B, HOSSMANN K A. Expression of nuclear redox factor Ref-1 in the rat hippocampus following global ischemia induced by cardiac arrest[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 52(2): 194 - 200.

（编辑　薛国文）

（上接 699 页）

口晨用 1 /1 000 的肥皂水各灌肠 1 次，以防术中肠道损伤。

2　术后护理

2.1　一般护理

按全麻后护理常规，术后行心电监护 6 ~ 8 h，密切观察血压、脉搏、呼吸、血氧饱和度。低流量吸氧 2 h，以加快排出积聚的 CO_2。去枕平卧 2 h，头偏向一侧，以防呕吐物误吸造成窒息。

2.2　呼吸道消化道护理

术后避免剧烈咳嗽及便秘，防止因腹压骤然增高使悬吊缝合组织撕裂，缝线绷断，使固定失败。术后注意观察患者呼吸道情况，有痰液者，给予生理盐水 20 ml，妥布霉素 8 万单位，地塞米松 5 mg，超声雾化吸入，以减轻全麻插管后喉头水肿，预防呼吸道感染。痰液较多，不易咳出者，应给予吸痰。术后鼓励患者早下床活动，促使胃肠蠕动恢复，并给予石蜡油口服，以使大便通畅。

2.3　导尿管的护理

留置尿管时按常规护理。每天清洁尿道口 2 次，保持局部洁净；妥善固定、观察尿量、颜色，保持尿管通畅。术后第 3 天 2 h开放导尿管 1 次，夜间长期开放。提高膀胱顺应性，促进膀胱功能恢复，术后第 4 ~ 5 天拔除导尿管后，指导患者 2 h 排尿 1 次，观察排尿过程是否通畅，有否漏尿情况。排尿后即测残余尿量。

2.4　排尿困难的护理

排尿困难是膀胱颈悬吊术后的主要并发症，虽主要与术中悬吊张力有关，但患者精神状况、膀胱功能恢复状况亦对排尿有一定影响。因此术后对患者排尿情况的观察及护理尤为重要。术后 4 ~ 5 d 拔除尿管后，注意指导患者 2 h 排尿 1 次，不要憋尿。测膀胱残余尿，如果大于 100 m 则应继续留置尿管，进行膀胱功能训练，即定时夹闭引流管，第 1 天 2 ~ 3 h 开放 1 次，第 2 天 3 ~ 4 h 开放 1 次，以逐步增加膀胱容量，2 d 后夹闭引流管，待有尿意后，开放尿管排尿。

2.5　出院指导

女性 SUI 的主要原因是尿道括约肌力量不强，加之骨盆底肌平坦，支托力薄弱，使膀胱底部下垂，尿道位置发生改变，削弱了尿控能力。另外，女性因妊娠、分娩等生理情况，特别是产钳接生、与年龄有关的女性激素减少会使骨盆底部的肌肉松弛，而神经方面的缺陷也会影响阴道神经对骨盆肌的支持。因此术后需指导患者进行必要的盆底肌肉的收缩训练，加强其功能，即 kegel 运动。方法：首先臀部肌肉用力、收缩肛门，坚持数到 10 后，由口缓缓吐气，放松。呼吸一下后，反复进行。10 次为 1 组，1 d 最少做 5 组。同时指导患者养成良好的生活习惯，注意避免增加腹压的生活习惯，如长期站立、蹲位、负重，吸烟、咳嗽、便秘等。患者术后禁性生活 1 个月，如出现排尿困难，尿不尽感，或尿失禁复发应及时就诊。

关键词：腹腔镜膀胱颈悬吊术；压力性尿失禁

中图法分类号：R473.71　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Bergman A, Charles A, Paul P K. Comparison of three different surgical procedures for urinary stress incontinence. prospective randomized study[J]. Am J Obstet Gynecol, 1989, 160: 1102 - 1106.

[2] 梁志清，徐惠成，陈　勇，等. 张力性尿失禁腹腔镜 Burch 氏膀胱颈悬吊术治疗[J]. 重庆医学，2002，31(7)：577 - 578.

（编辑　张大春）