文章编号:1000-5404(2008)09-0791-04

论著

Bmi-1 siRNA 对人白血病 K562 细胞增殖的影响及其机制

朱 勇,胡义德,胡中华 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨 Bmi-1 siRNA 对人白血病 K562 细胞增殖的影响及其作用机制。方法 通过脂质体将化学合成针对 Bmi-1 基因的 siRNA 转染 K562 细胞,采用 MTT 法观察 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞增殖的抑制作用;流式细胞术分析细胞周期变化;Western blot 检测 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞中 Bmi-1 和 P16 蛋白表达的影响。结果 Bmi-1 siRNA 能明显延长 K562 细胞的倍增时间、G_1 期比例增加;下调 Bmi-1 表达的同时上调 P16 蛋白表达。结论 体外化学合成的 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞的体外增殖具有明显的抑制作用,下调 Bmi-1 蛋白表达的同时上调 P16 蛋白表达。

关键词:Bmi-1 基因;小分子干扰 RNA;人白血病 K562 细胞;P16 蛋白
中图法分类号:R394.3;R73-354;R733.7 文献标识码:A

RNAi-silenced human Bmi-1 gene inhibits proliferation of human leukemia cell line K562

ZHU Yong, HU Yi-de, HU Zhong-hua (Cancer Research of Institute, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the silence of B-cell specific Moloney murine leukaemia virus insertion site 1 (Bmi-1) by RNA interference on the proliferation of human leukemia cell line K562 and its mechanisms. Methods Small interfering RNA (siRNA) targeting Bmi-1 gene was designed and double-stranded siRNA was chemically synthesized. After double-stranded siRNA was transfected into K562 cells with Lipofectamine 2000, the proliferation of K562 cells was detected by MTT colorimetry, cell cycle was determined by flow cytometry, and the expression of Bmi-1 and P16 were analyzed by Western blotting. Results The siRNA targeting human Bmi-1 gene effectively prolonged the double time of K562 cells, increased the percentage of cells at G_1 phase, and the expression of Bmi-1 was significantly down-regulated but the expression of P16 was up-regulated. Conclusion The siRNA targeting human Bmi-1 gene inhibits the proliferation of K562 cells, and up-regulates the expression of P16 in the cells.

Key words: B-cell specific Moloney murine leukaemia virus insertion site-1 gene; small interference RNA; human leukemia cell line K562; P16 protein

Bmi-1 基因(B-cell specific moloney murine leukaemia virus insertion site 1)最初被作为 c-Myc 基因的协同基因而发现,其编码由 326 个氨基酸组成的 Bmi-1 蛋白是 1 个核蛋白,属于 PcG 家族的转录抑制因子之一,在细胞核中通过与染色质结合后抑制其下游 INK4a-ARF 基因,减少 P16 蛋白表达而发挥生物学作用[1-3]。Bmi-1 基因的适量表达是正常造血干细胞和白血病干细胞维持自我更新能力所必需的。进一步研究表明造血干细胞分化能力丧失的过程中常伴随 Bmi-1 基因表达的减少[4,5]。不仅如此,Bmi-1 基因在胃肠道肿瘤干细胞、成神经瘤细胞、间充质细胞起源的肿瘤中均发挥了重要作用[6-8]。最近研究还表明,Bmi-1 基因的表达水平还可以作为部分肿瘤患者预后指标之一[9]。Vonlanthen 等[10]采用免疫组化研究证实 Bmi-1 基因在人白血病细胞株 K562 中呈高水平表达。这些研究均提示,在具有完整 Bmi-1-P16 通路的 K562 细胞中筛选出有效沉默 Bmi-1 基因的小干扰 RNA(small interference RNA,siRNA)将可能为针对肿瘤干细胞进行基因治疗提供 1 个新的有效靶点。为初

基金项目:国家自然科学基金(30772144)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772144)
作者简介:朱 勇,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤治疗学基础与临床方面的研究。电话:(023)65218865,E-mail:medtmmu@163.com
通信作者:胡义德,电话:(023)68774481,E-mail:huyide_mit@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-29;修回日期:2008-03-14

步探讨 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞增殖的影响及其作用机制，本实验通过脂质体将化学合成的 Bmi-1 siRNA 转染 K562 细胞，采用 MTT 法观察 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞增殖的抑制效应，计算出该有效序列的 IC_{50} 浓度；用流式细胞术分析细胞周期变化；Western blot 检测 Bmi-1 siRNA 对 K562 细胞中 Bmi-1 和 P16 蛋白表达的影响，以筛选出针对 Bmi-1 基因进行干扰的有效序列，旨在为针对 Bmi-1 基因进行 RNA 干扰提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及其来源

K562 细胞由本实验中心保存。Bmi-1 一抗购自 Santa Cruz 公司，P16 一抗购自 Biocompare 公司，DAB 显色试剂盒购自北京金杉中桥公司，PCR 引物设计和合成由上海生工完成。根据 GenBank 中人 Bmi-1 基因 mRNA 序列（ACCESSION005180）自行设计 3 条 Bmi-1 siRNA，Bmi-1 siRNA1 位于 KRRR 结构与 HTHT 结构之间，Bmi-1 siRNA2 位于 HTHT 结构与 PEST 结构之间，Bmi-1 siRNA3 位于 PEST 结构之外，然后由广州锐博公司化学合成 3′带 dTdT 的双链 siRNA。

Bmi-1 siRNA1 正义链 5′-UCUUCAUUAGAGCCAUUGGdTdT-3′，反义链 5′-CCAAUGGCUCUAAUGAAGAdTdT-3′；Bmi-1 siRNA2 正义链 5′-GUAUUAGGUAUGUCCAUUUdTdT-3′，反义链 5′-AAAUGGACAUACCUAAUACdTdT-3′；Bmi-1 siRNA3 正义链 5′-UAGGUCGAACUCUGUAUUUdTdT-3′，反义链 5′-AAAUACAGAGUUCGACCUAdTdT-3′。

1.2 细胞培养及转染方法

K562 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基，于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 条件下培养。取对数生长期的 K562 细胞配制细胞悬液，加入 96 孔板内（Coosmo，美国），每孔加入 0.6×10^4 个细胞，补培养基至终体积为 100 μl/孔。于次日弃上清，按脂质体 Lipofectamine 2000 说明进行转染实验，脂质体用量为每孔 0.2 μl。

1.3 脂质体对 Bmi-1 siRNA 的转染效率

按照 1.2 转染方法，用带荧光标记的 Bmi-1 siRNA 转染 K562 细胞，实验中设置 50、100、150、200 nmol/L 4 个浓度组，转染 6 h 后在同一视野中分别用白光和荧光照相，然后观察具有荧光信号的细胞在总细胞中的比例，求出该转染方法的转染效率。

$$\text{转染效率}(\%)=\frac{\text{相同视野内具有荧光的细胞数}}{\text{总细胞数}}\times100\%$$

1.4 采用 MTT 法初步筛选出有效序列

Bmi-1 siRNA1、Bmi-1 siRNA2、Bmi-1 siRNA3 均设置 5 个浓度，分别为 60、70、80、90、100 nmol/L（广州锐博公司转染指导中提示常规工作浓度为 100 nmol/L）及空白对照。按照 1.2 方法进行转染，于 48 h 后分别加入 MTT 液 20 μl（5 mg/ml），培养 3 h，弃去上清，每孔中加入 120 μl 二甲基亚砜（DMSO），振荡 15 s，酶标仪 490 nm 处（630 nm 为参考）读出绝对吸收光度值（MTT 值）。根据各个浓度组的 MTT 值绘制曲线，根据该曲线变化趋势筛选出相对最有效序列。按照公式求出各个浓度的抑制率，并计算出有效序列的 50% 抑制浓度（IC_{50}）。

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{1-\text{实验组 MTT 值}}{\text{空白对照组 MTT 值}}\times100\%$$

1.5 有效序列对 K562 细胞倍增时间的影响

将 K562 细胞铺于 2 张 96 孔板中，每张中均设空白对照组、$1\times IC_{50}$ 浓度组、$2\times IC_{50}$ 浓度组，各剂量组重复 10 孔。分别于转染后 24、40 h 测各组细胞的 MTT 值。然后按照公式 $DT=T\times\lg2/\lg(A/B)$ 计算细胞的倍增时间（DT 为细胞倍增时间，T 为前后 2 次测细胞 MTT 值的间隔时间，A、B 分别为所测细胞的 MTT 值）[11]。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

转染 48 h 后收集各组细胞，细胞用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次，70% 乙醇固定，加入 1 ml 碘化丙锭（PI，100 mg/L）染色，流式细胞仪检测。

1.7 半定量 RT-PCR 方法检测转染前后细胞中 Bmi-1 mRNA 表达情况

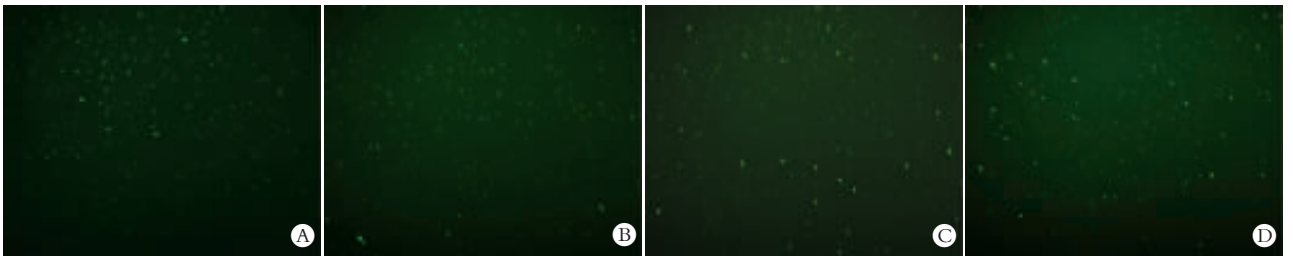
将 1.0×10^5 个细胞接种于 6 孔板，24 h 后弃去上清，按 1.5 方法分组进行转染实验，24 h 后 PBS（0.01 mol/L）冲洗 3 次。按照 Tripure 说明书提取各组细胞总 RNA，取 3 μg 总 RNA 按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。取 1 μl cDNA 产物进行 PCR 反应：Bmi-1 正义链 5′-TACCCATAACCTATGTTGTGCCT-3′，反义链 5′-ATAGCCAATGGAAAATTAAGACG-3′，反应条件：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，38 个循环，扩增产物为 215 bp；内参 GAPDH（甘油醛磷酸脱氢酶）正义链 5′-CGGGAAACTGTGGCGTGA-3′，反义链 5′-CAAAGGTGGAGGAGTGGG-3′，反应条件：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，56.5 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，38 个循环扩增产物为 311 bp。将 PCR 扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳并照相，然后应用图像分析软件对条带进行灰度计算。检测各组 Bmi-1 基因 PCR 产物和与其对应的内参 GAPDH 基因 PCR 产物的灰度值，计算出 Bmi-1/GAPDH 值，依据各组的比值初步估计该 Bmi-1 siRNA 对细胞中 Bmi-1 mRNA 表达量的影响。

1.8 Western blot 检测有效 Bmi-1 siRNA 转染后 K562 细胞中 Bmi-1 和 P16 蛋白的表达

转染 Bmi-1 siRNA 48 h 后用 0.01 mol/L PBS 反复冲洗细胞 3 次，离心收集细胞，用 PRO-PREM™ 提取蛋白，用 R250 测蛋白浓度。每个孔上样蛋白量为 100 μg，经 SDS-PAGE 电泳分离后，将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% BSA（TBS，0.1% Tween-20）封闭 2 h，加 Bmi-1、P16 多克隆抗体（1∶500）和 GAPDH 抗体（1∶500），室温孵育 2 h，TBST（0.1% Tween-20 TBS）漂洗 3 次，加 HRP 标记的二抗（1∶2 000）室温孵育 2 h，常规 DAB 显色。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 q 检验，计数资料采用 χ^2 检验。



A:50 nmol/L 组;B:100 nmol/L 组;C:150 nmol/L 组;D:200 nmol/L 组

图 1　不同浓度的 Bmi-1 siRNA 转染 K562 细胞后观察结果　(荧光显微镜 ×100)

2　结果

2.1　不同浓度荧光标记的 Bmi-1 siRNA 在 K562 细胞中的分布情况

从图 1 中我们可以看出随着荧光标记的 Bmi-1 siRNA 浓度增大,细胞中荧光信号强度逐渐增强,同 1 个视野中,荧光镜下带有荧光标记的细胞在总细胞中的比例约为 85%,且荧光信号逐渐增强,说明转染效率高,可以按此方法进行后续实验。

2.2　Bmi-1 siRNA 有效序列的筛选

根据转染结果所作的 3 条'浓度-MTT 值"曲线(图 2)可以看出 Bmi-1 siRNA1 相对最好。随着 Bmi-1 siRNA 浓度逐渐增大,细胞 MTT 值逐渐减小,提示 Bmi-1 siRNA1 对细胞的抑制作用呈浓度依赖性,故选 Bmi-1 siRNA1 进行后面实验。同时根据不同浓度对应的细胞抑制率计算出 Bmi-1 siRNA1 在 K562 细胞中的 IC_{50} 浓度为 87.69 nmol/L。

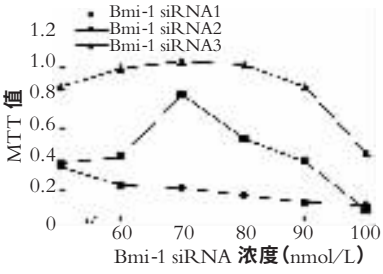


图 2　细胞 MTT 值随转染 Bmi-1 siRNA 浓度变化曲线
(MTT 值为绝对吸收光密度值)

2.3　Bmi-1 siRNA1 转染前后对 K562 细胞倍增时间的影响

$1 \times IC_{50}$ 组细胞倍增时间(27.61 h)较空白对照组延长 1/3 左右,差异有统计学意义($P < 0.05$);$2 \times IC_{50}$ 组细胞倍增时间(30.57 h)较 $1 \times IC_{50}$ 组再延长 1/10 左右,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4　细胞周期变化

结果显示,$1 \times IC_{50}$ 组和 $2 \times IC_{50}$ 组与空白对照组比较其 G_1 期细胞比例明显上升($P < 0.05$,表 1)。

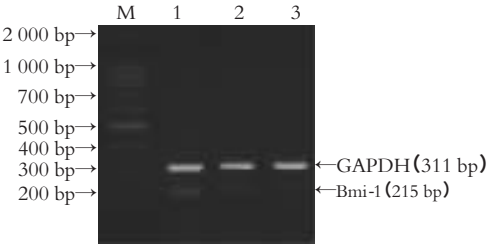
2.5　Bmi-1 siRNA 转染前后细胞中 Bmi-1 mRNA 表达水平的变化

电泳结果显示,空白对照组可见一 215 bp 的高亮目的条带,见图 3。应用图像系统分析结果,分别得出各组 GAPDH 和 Bmi-1 的灰度值,结果显示,转染 Bmi-1 siRNA1 24 h 后 $1 \times IC_{50}$ 组和 $2 \times IC_{50}$ 组 Bmi-1 mRNA 的量仅为空白对照组的 52.51% 和 32.49% [分别为(4 212 ± 313)、(2 912 ± 294)、(10 939 ± 2 564)]。

表 1　2 个浓度组及空白对照组细胞周期分析结果($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照组	59.1 ± 2.98	32.63 ± 1.50	8.24 ± 2.26
$1 \times IC_{50}$ 组	75.9 ± 2.46[a]	19.29 ± 8.63	4.80 ± 6.15
$2 \times IC_{50}$ 组	85.03 ± 1.01[a]	9.24 ± 7.26	5.75 ± 6.39

a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

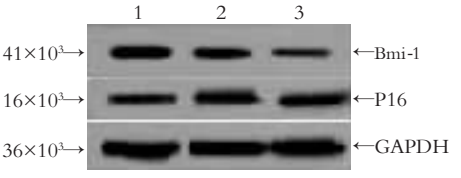


M:DNA 标准(DL 2000);1:空白组;2:$1 \times IC_{50}$ 组;3:$2 \times IC_{50}$ 组

图 3　半定量 RT-PCR 方法检测各组细胞中 Bmi-1 mRNA 水平变化

2.6　Western blot 检测 Bmi-1 siRNA 转染前后 K562 细胞株中 Bmi-1 蛋白和 P16 蛋白的表达

Western blot 检测结果可见,与空白对照组比较,$1 \times IC_{50}$ 组 Bmi-1 蛋白下降 45.53%,P16 蛋白表达上升 35.69%;$2 \times IC_{50}$ 组 Bmi-1 蛋白下降 69.25%,P16 蛋白表达上升 65.69%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。即转染 Bmi-1 siRNA1 有效序列后 K562 细胞中 Bmi-1 蛋白表达明显减少,相反 P16 表达上调,见图 4。



1:空白对照组;2:$1 \times IC_{50}$ 组;3:$2 \times IC_{50}$ 组

图 4　Western blot 检测各蛋白的表达

3　讨论

Bmi-1 基因是 van-Lohuizen 等[1]在研究 Eu-myc 转基因小鼠感染 Moloney murine leukaemia virus 的插入

突变位点时首次发现。326 个氨基酸组成的 Bmi-1 蛋白主要由 N 端的富含半胱氨酸的锌指结构(ring finger, RF),两端的 KRRR 和 KRMK 信号蛋白结构,中间的旋-转角-螺旋重复结构(HTHT),C 末端的一个富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的 PEST 结构所组成,其中 RF 结构是 Bmi-1 蛋白均匀分布在细胞核边缘异染色质集中区域和 Bmi-1 基因能引起细胞恶性转化的关键因素,在此基础上 Bmi-1 蛋白借助其 HTHT 结构与染色质结合而抑制下游 INK4a-ARF 基因表达[1,2,12]。

Bmi-1 基因的适量表达是维持生物个体正常生长发育所必需的,但 Bmi-1 基因的过度表达则参与了肿瘤的形成[13]。Vonlanthen 等[10] 运用免疫组化等方法研究发现 Bmi-1 基因在人白血病 K562 细胞株中呈高水平表达。在人肺癌标本中呈差异性表达且与 P16 的表达量呈负相关,再次证实 Bmi-1 基因可通过抑制其下游的 INK4a-ARF 基因而参与肿瘤的形成[2]。

我们通过采用 MTT 法在 K562 细胞中筛选出针对 Bmi-1 基因进行 RNAi 的有效 siRNA 序列,发现 Bmi-1 siRNA1 的基因沉默效果较好,而且发现 Bmi-1 siRNA1 对 K562 细胞的抑制效率呈浓度依赖性[14]。Bmi-1 siRNA1 位于 Bmi-1 蛋白 RF-KRRR 结构与 HTHT-PEST 结构之间,其中 RF 结构是保证 Bmi-1 蛋白均匀分布在细胞核边缘异染色质集中区域而发挥转录抑制作用的限制性因素之一。KRRR 结构是保证 Bmi-1 蛋白能进入细胞核的信号蛋白。HTHT 结构是 Bmi-1 蛋白结合在染色质的中介。进一步研究表明,不同浓度的 Bmi-1 siRNA1 可以引起细胞倍增时间不同程度延长,以及细胞群体中 G_1 期比例上升,这与前期研究结果是一致的。前期研究发现 Bmi-1 基因通过抑制其下游 INK4a-ARF 基因而延长细胞寿命并参与肿瘤形成,而 INK4a-ARF 基因位点编码的 P16 蛋白是细胞周期由 G_1 期进入 S 期的监视器,一旦过量表达的 Bmi-1 蛋白解除 P16 蛋白对 Rb 蛋白的抑制作用则促进细胞由 G_1 期进入 S 期,加速细胞周期进程,促进细胞增殖[2]。同时我们在免疫印迹实验中也观察到 Bmi-1 siRNA1 转染后 K562 细胞中 P16 蛋白表达上调,这同转染 Bmi-1 siRNA1 后 K562 细胞群中 G_1 期比例增加的流式分析结果一致。前期研究发现上调细胞中 P16 蛋白的表达将促进细胞去分化和加速凋亡[15,16],那么通过转染 Bmi-1 siRNA1 后在 K562 细胞中增加的 P16 是否也会引起同样的去分化和加速凋亡呢,这值得进一步研究。结合最近有关 Bmi-1 基因调节通路在正常及肿瘤干细胞中的重要作用,本研究将为针对白血病和肿瘤干细胞的基因治疗提供一个新的参考。

参考文献:

[1] van-Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, *et al*. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [J]. Cell, 1991, 65(5): 737 - 752.

[2] Jacobs J J, Kieboom K, Marino S, *et al*. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the INK4a locus [J]. Nature, 1999, 397(6715): 164 - 168.

[3] Grinstein E, Wernet P. Cellular signaling in normal and cancerous stem cells [J]. Cell Signal, 2007, 19(12): 2428 - 2433.

[4] Raaphorst F M. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1 [J]. Trends Immunol, 2003, 24(10): 522 - 524.

[5] Kirstetter P, Anderson K, Porse B T, *et al*. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block [J]. Nat Immunol, 2006, 7(10): 1048 - 1056.

[6] Reinisch C, Kandutsch S, Uthman A, *et al*. Bmi-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract [J]. Histol Histopathol, 2006, 21(11): 1143 - 1149.

[7] Cui H, Ma J, Ding J, *et al*. Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of Ⅰ-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner [J]. J Biol Chem, 2006, 281(45): 34696 - 34704.

[8] Cui H, Hu B, Li T, *et al*. Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells [J]. Am J Pathol, 2007, 170(4): 1370 - 1378.

[9] Silva J, Garcia V, Garcia J M, *et al*. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(4): R55.

[10] Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt H J, *et al*. The Bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression [J]. Br J Cancer, 2001, 84(10): 1372 1376.

[11] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京:科学出版社, 2001: 3431.

[12] Cohen K J, Hanna J S, Prescott J E, *et al*. Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5527 - 5535.

[13] Hanson R D, Hess J L, Yu B D, *et al*. Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25): 14372 - 14377.

[14] 孙 毅,阳 强,黄 琳,等. 亚硒酸钠诱导 K562 细胞凋亡作用及机制探讨 [J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(6): 588 - 591.

[15] Janzen V, Forkert R, Fleming H E, *et al*. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a [J]. Nature, 2006, 443(7110): 421 - 426.

[16] 李学昌,闵家新,蒋 力,等. 非小细胞肺癌组织中 Survivin、p16 基因的表达及关系 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(22): 2289 - 2292.

(编辑 王 红)