论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1052-03

RNA 干扰对 HL-60 白血病细胞株 WT1 基因表达的抑制作用

余慧青[1],刘 耀[2] ([1]重庆市肿瘤研究所血液科,重庆 400030;[2]第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

摘 要:目的 研究 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)对白血病细胞株 WT1 基因表达的抑制作用。探讨 WT1 小干扰 RNA 在白血病治疗中的应用。方法 设计制备多对针对 WT1 基因的小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA),转染 HL-60 人白血病细胞株,采用 RT-PCR 法测定 WT1 mRNA 的表达,Western blot 测定 WT1 蛋白的表达,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 siRNA 后 WT1 mRNA 与蛋白的表达强度分别为(23.62±1.28)%和(23.20±1.04)%,和对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。在 WT1 表达受到抑制的同时,HL-60 细胞的凋亡率为(13.72±1.33)%,和对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。结论 siRNA 能有效抑制 HL-60 细胞中 WT1 基因的表达,增加细胞凋亡。

关键词:白血病;RNA 干扰;WT1

中图法分类号:R394.3;R73-354;R733.7 文献标识码:A

Inhibitory effect of RNA interference on WT1 gene expression in HL-60 cell line

YU Hui-qing[1], LIU Yao[2] ([1]Department of Hematology, Chongqing Tumor Hospital, Chongqing 400030; [2]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of RNA interference (RNAi) on WT1 gene expression in HL-60 cell line. Methods Several pairs of small interfering RNA (siRNA) for WT1 gene was designed and transfected into HL-60 cells. WT1 gene expression was assessed by RT-PCR, and WT1 protein expression was tested by Western blot. Flow cytometry was used to measure the cell apoptosis. Results The expression rates of WT1 mRNA and the expression rates of WT1 protein were (23.62% ± 1.28%), (23.20% ± 1.04%), respectively in HL-60 WT1 siRNA-transfected cells, significantly lower than those of control cells ($P<0.05$); The apoptosis rates were (13.72% ± 1.33%), significantly higher than those of control cells ($P<0.05$). Conclusion Expression of WT1 gene can be effectively inhibited by siRNA in HL-60 cells. The siRNA targeting human WT1 is considered to be possible tool against leukemia.

Key word: leukemia; siRNA; WT1

Wilms 瘤基因(Wilms' tumor gene, WT1)定位于 11p13,1990 年在 Wilms 瘤中发现并克隆。WT1 基因主要在胚胎发生过程中表达,对泌尿生殖系统的发育起重要作用,成人 WT1 基因仅在肾脏、卵巢、子宫内膜、睾丸、脾脏、乳腺及正常造血祖细胞中微量表达,而在许多肿瘤组织中 WT1 基因高表达,包括白血病、肺癌、乳腺癌和胰腺癌[1]。关于白血病的研究显示:几乎所有的白血病原始细胞(无论系别)都持续过表达 WT1 基因,认为 WT1 基因是一种'泛白血病'标志,高水平的 WT1 mRNA 往往提示预后不良[2]。本研究利用特异性小干扰 RNA (small interfering RNA,siRNA)来干扰 WT1 基因的转录,以了解其能否特异性抑制白血病细胞株 WT1 基因表达,探讨其在白血病治疗中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

人白血病 HL-60 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所;RPMI1640 培养液、胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 公司产品;脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品;RNA 提取试剂盒为德国 Qiagen 产品;SuperSignal 化学发光试剂为美国 Pierce 公司产品;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛公司;Opti-MEMI 低血清培养液为美国 Invitrogen 公司产品;兔抗人 WT1 蛋白多克隆抗体为 SantaCruz 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗兔 IgG,驴抗羊 IgG

作者简介:余慧青,女,四川省渠县人,副主任医师,主要从事白血病临床诊治方面的研究。电话:(023)66760967

通信作者:刘 耀,电话:13228684685

收稿日期:2008-01-27;修回日期:2008-03-11

均购自碧云天公司，其余试剂为国产分析纯试剂。

1.2　实验方法

1.2.1　siRNA 的设计制备　　按 siRNA 基本设计原则，应用 Qigen siRNA 在线设计软件设计 3 对针对 WT1 mRNA（NM_000378）不同位点序列的 siRNA，由上海吉玛公司合成两段不同的干扰序列：siRNA1：5′-CUGGAAUCAGAUGAACUUATT-3′；siRNA2：5′-CCAUACCAGUGUGACUUCA-3′；另合成不针对 WT1 mRNA 阴性对照 siRNA，正义 3′端进行了异硫氰酸胍（fluorescein isothiocyanate，FITC）荧光标记，以便通过流式细胞仪检测 siRNA 的转染效率。以上 siRNA 序列均通过 Blast 筛查，证实与其他人类基因外显子没有同源性。

1.2.2　HL-60 细胞培养　　HL-60 细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基（含 100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素），以每瓶 3 ml 的量接种与 50 ml 培养瓶中，置于 37 ℃，5 % 的 CO_2 培养箱中培养，2 ~ 3 d 细胞传代 1 次。调整细胞数为 $2\times10^5\cdot ml^{-1}$，按每孔 1 ml 等量加到多组 6 孔培养板中，于对数生长期时准备进行细胞转染。

1.2.3　细胞转染　　分为 4 组，siRNA1、siRNA2 组，阴性对照组（转染不针对任何序列的 siRNA）、空白对照组（不转染 siRNA）。前 3 组内 siRNA 以 50 nmol/L 的浓度分别转染接种细胞，空白对照组只应用 Lipofectamine 2000。用 Lipofectamine 2000 脂质体进行转染，按说明书操作。分别继续培养 24、48 h 后进行检测分析。设立对照组，每组实验重复 3 次。

1.2.4　转染效率测定　　用标记有 FITC 荧光的 siRNA 进行转染，24 h 后收集细胞，PBS 缓冲液洗涤 3 次。经流式细胞仪检测分析 5 000 ~ 10 000 个细胞，检测绿色荧光阳性细胞比率即为转染效率，转染效率 =（发出绿色荧光的细胞数/总细胞数）×100 %。

1.2.5　RT-PCR 检测各组细胞 WT1 mRNA 表达　　收集细胞，按 Qiagen 试剂盒说明分别提取各组细胞的总 RNA。RT 法将 mRNA 转录为 cDNA，总反应体系 20 μl，混匀，快速离心 1 次，放入 PCR 仪中。30 ℃ 10 min，42 ℃30 min，99 ℃5 min，4 ℃ 5 min。PCR 反应体系中加入两对引物，第 1 对是内源对照 β-actin 基因引物，其上、下游引物碱基序列分别为正义 5′-GTGGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′，反义：5′-GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′；第 2 对是 WT1 基因的引物，正义 5′-GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3′，反义 5′-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3′。取 cDNA 10 μl 加入下列混合液：5 × PCR 缓冲液10 μl，DNA 聚合酶 0.25 μl，上游引物 1 μl，下游引物 1 μl，H_2O 27.75 μl，cDNA 10 μl，总反应体系 50 μl。混匀并快速离心，一次放入 PCR 仪中。PCR 条件：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 40 s、57 ℃退火 40 s、72 ℃延伸 1 min，共 32 个循环，72 ℃再延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，溴化乙锭染色成像并保存结果。

1.2.6　Western 印迹法检测各组细胞 WT1 蛋白表达　　50 nmol/L siRNA 转染细胞 48 h 后收集细胞，蛋白上样缓冲液裂解细胞，提取总蛋白，紫外分光光度计法进行蛋白定量，15% SDS-PAGE 凝胶电泳，以蛋白电泳转移仪将产物转至 PVDF 膜上，以 10% 脱脂奶室温封闭 2 h，以抗 WT1 抗体及羊抗人 β-actin，4℃反应过夜，PBS 洗膜，加入鼠抗兔 IgG/HRP 及驴抗羊 IgG/HRP 二抗，室温孵育 2 h，化学发光试剂反应 5 min，发光成像仪成像。

1.2.7　Annexin V 和 PI 双染色法检测 HL-60 细胞凋亡　　50 nmol/L siRNA2 转染 HL-60 细胞后 24 h，收集细胞，PBS 洗 2 次，加入 100 μl 结合缓冲液和 FITC 标记的 Annexin V（20 μg/ml）10 μl，室温避光 30 min，再加入 PI（50 μg/ml）5 μl，避光反应 5 min 后，加入 400 μl 结合缓冲液，立即进行流式细胞术定量检测，设立阴性对照组，实验重复 3 次。

1.3　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

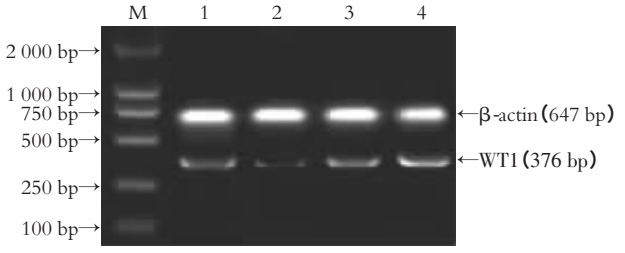
2　结果

2.1　转染效率

脂质体 2000 转染 FITC 标记的 siRNA 24 h 后，转染了荧光 siRNA 的细胞中，带有荧光的细胞占全部细胞的百分比均值为：（73.1 ± 6.74）%。

2.2　siRNA 转染后 HL-60 细胞中 WT1 mRNA 的表达

4 组细胞均可见 WT1 基因电泳带存在，但其亮度存在明显差异，siRNA2 转染组 mRNA 经 RT-PCR 后电泳带亮度明显弱于阴性对照组和空白对照组（图 1）。ImageMaster Total Lab 图像系统分析显示，siRNA1 组、siRNA2 组、阴性对照组、空白对照组 WT1 mRNA 的表达强度分别为（58.83 ± 1.24）%、（23.62 ± 1.28）%、（49.64 ± 0.89）%、（51.94 ± 1.25）%；siRNA2 组与阴性对照组和空白对照组相比差异有显著性（$P<0.05$），siRNA1 组与阴性对照组和空白对照比较差异无显著性（$P>0.05$）。



M：标准；1：siRNA1　2：siRNA2　3：空白对照组　4：阴性对照组

图 1　RT-PCR 检测转染 siRNA 48 h 后 HL-60 细胞中 WT1 mRNA 的表达

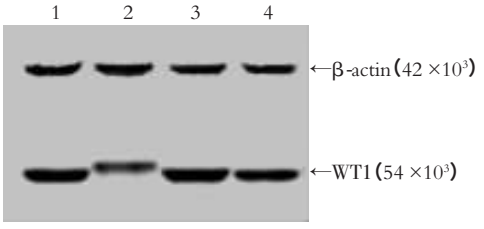
2.3　siRNA 转染后 HL-60 细胞中 WT1 蛋白的表达

Western blot 对蛋白质测定结果显示，siRNA1，2 组，阴性对照组，空白对照组的内参 β-actin 蛋白质表达量无明显差异，各组均呈现 WT1 特异性蛋白杂交带的表达，但亮度有明显差异（图 2）。ImageMaster Total Lab 图像系统分析显示，siRNA1 组、siRNA2 组、阴性对照组、空白对照组细胞 WT1 蛋白的表达强度分别为（47.46 ± 0.11）%、（23.20 ± 1.04）%、（52.76 ± 0.32）%、（50.23 ± 0.65）%。siRNA2 组与空白对照组和阴性对照组比较差异有显著性（$P<0.05$）。siRNA1 组与阴性对照组

和空白对照组相比差异无显著性($P>0.05$)。

2.4 转染后 HL-60 细胞的凋亡

经 Annexin V 与 PI 双染色流式细胞仪检测，siRNA2 组 HL-60 细胞凋亡率为(13.72±1.33)%，阴性对照组为(2.43±0.41)%，siRNA2 组与阴性对照组相比差异有显著性($P<0.05$)。



1:siRNA1 2:siRNA2 3:空白对照组 4:阴性对照组

图2 Western blot 检测转染 siRNA48h 后 HL-60 细胞中 WT1 蛋白质的表达

3 讨论

WT1 基因与各种造血调控因子相互作用，在白血病发病过程中起重要作用。WT1 基因能促进白血病细胞增殖，抑制其分化，通过影响细胞周期依赖性激酶复合物基因的表达，调节细胞周期，通过与其下游基因 p53、c-myc、bcl-2 及 P21 等基因相互作用，在维持细胞增殖与凋亡的平衡中起重要作用[3,4]。同时临床观察发现 WT1 基因在多种白血病细胞中高表达[5]，且随着病情的进展而表达逐渐增高，因而可用于白血病的预后判断和复发监测[6]，并可能成为白血病基因治疗和特异性免疫治疗的新靶点。

RNAi 是通过双链 RNA 介导特异的 mRNA 降解而使基因沉默的机制。主要通过两种方法得以实现，第一种是采用化学合成法人工制备小干扰 RNA，此法操作简单、快速，只是引起的 RNA 干扰效应往往是暂时的，难以持久。第二种为细胞内表达的 siRNA，这种方法就是先构建 siRNA 的载体，然后转染细胞，在细胞内表达 siRNA，诱导 RNA 干扰。自从发现 RNAi 能被有效的运用于哺乳动物，人们就意识到这项技术可能用来治疗肿瘤，例如使过表达的癌基因沉默[7]。在哺乳动物细胞中转入 siRNA 后导致的基因沉默比用核酸或反义 RNA 更有效。本研究采用体外人工合成 siRNA、荧光标记、脂质体直接转染的方法，简单易行。结果表明，利用 siRNA 能有效抑制 WT1 基因的表达。

WT1 基因作为一个双向调控因子，能调控多种相关基因，使其表达被激活或者受抑[8]，由于它转录产物的剪切本多，突变多见，所以本研究设计了两对针对 WT1 的 siRNA，并且选择避免临近起始密码以及一些常见的剪切位点的区域行筛选，以保证干扰的有效性。实验证实两对中只有一对具有较明显的干扰效率。初步说明在不同剪切本，碱基突变位点，以及 mRNA 的不同结构域、二级结构的影响下，针对同一基因不同位点的 siRNA 具有不同的干扰效率。

在本实验条件下，siRNA 后 WT1 mRNA 与蛋白的表达强度分别为(23.62±1.28)%和(23.20±1.04)%，和对照组比较有显著性差异；在 WT1 表达受到抑制的同时，HL-60 细胞的凋亡率为(13.72±1.33)%，和对照组比较有显著性差异。提示：采用 siRNA 技术可靶向干扰体外 HL-60 白血病细胞 WT1 mRNA 和蛋白水平的表达，在 WT1 表达受抑后可促进 HL-60 细胞凋亡。这就为包括白血病在内的血液系统恶性肿瘤的基因治疗提供了一个新的切入点。

参考文献：

[1] Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, *et al*. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2004, 95(7): 583-587.

[2] Chiusa L, Francia-di-Celle P, Campisi P, *et al*. Prognostic value of quantitative analysis of WT1 gene transcripts in adult acute lymphoblastic leukemia[J]. Haematologica, 2006, 91(2): 270-271.

[3] Elmaagacli A H, Koldehoff M, Peceny R, *et al*. WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells[J]. Haematologica, 2005, 90(3): 326-334.

[4] 刘 利，王 刚，陈 杰，等. 白血病细胞雌激素受体α启动子 CpG 岛甲基化状态的实验研究[J]. 重庆医学，2007，36(20)：2040-2041.

[5] 聂 波，杨绵本，魏彩霞，等. WT1 基因在白血病患者中的表达及临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤，2006，15(1)：24-26.

[6] Barragan E, Cervera J, Bolufer P, *et al*. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2004, 89(8): 926-933.

[7] Marcucci G, Stock W, Dai G, *et al*. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(15): 3404-3411.

[8] Mahadevan D, List A F. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies[J]. Blood, 2004, 104(7): 1940-1951.

(编辑 吴培红)