论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1210-04

shRNA 干扰沉默 Mcl-1 基因对淋巴瘤细胞系增殖的影响

岳光星[1],张明智[1],张旭东[1],许伟朋[2],陈新峰[1],陈昱丞[1],曹 玲[1],杨 黎[3],盛誉乔[3] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院:肿瘤科[1],骨科[2],河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室[3])

[摘要] **目的** 研究慢病毒介导的髓细胞白血病基因(Mcl-1)短发夹状 RNA(shRNA)干扰对淋巴瘤细胞系 SNK-6 增殖和凋亡的影响。**方法** 设计以 Mcl-1 为靶点的 shRNA 并构建携带此 shRNA 的慢病毒载体,转染淋巴瘤细胞系 SNK-6,荧光定量 PCR(qPCR)及 Western blot 方法检测病毒感染前后 Mcl-1 mRNA 及蛋白表达变化,四甲基偶氮唑盐法(MTT 法)和流式细胞仪分析细胞增殖和凋亡变化的情况。**结果** 成功构建 Mcl-1-shRNA 慢病毒表达载体,并可有效感染淋巴瘤细胞株 SNK-6,感染后 SNK-6 细胞 Mcl-1 基因的 mRNA 水平及蛋白水平表达明显下调,MTT 法检测显示慢病毒介导的 Mcl-1 基因 shRNA 干扰与对照病毒组相比可明显抑制 SNK-6 细胞增殖[(31.6±3.3)% *vs* (5.8±2.7)%, $P<0.01$],流式细胞仪测定感染后细胞凋亡明显高于对照病毒组[(28.9±2.1)% *vs* (5.3±1.5)%, $P<0.01$]。**结论** 慢病毒介导的 Mcl-1 基因 shRNA 干扰技术可特异性阻断 SNK-6 细胞 Mcl-1 基因的表达,抑制细胞的增殖并促进细胞的凋亡。

[关键词] 淋巴瘤;髓细胞白血病基因-1;短发夹 RNA;凋亡;慢病毒载体

[中图法分类号] R394-33;R730-362;R733 [文献标志码] A

Effect of shRNA interference targeting myeloid leukemia-1 gene on proliferation in lymphoma cell line

Yue Guangxing[1], Zhang Mingzhi[1], Zhang Xudong[1], Xu Weipeng[2], Chen Xinfeng[1], Chen Yucheng[1], Cao Ling[1], Yang Li[3], Sheng Yuqiao[3] ([1]Department of Ooncology, [2]Department of Orthopedics, [3]Open Laboratory of Key Disciplines in Clinical Medicine, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] Objective To explore the effect of lentivirus-mediated short hairpin RNA (shRNA) interference targeting myeloid leukemia-1 (Mcl-1) gene on the proliferation and apoptosis of lymphoma cell line SNK-6. Methods The shRNA targeting Mcl-1 gene was designed and the lentiviral vector carrying the shRNA was constructed. Lymphoma SNK-6 cells were transfected with the recombinant lentiviral vectors (shRNA group) and the blank lentiviral vectors (control group), respectively. Real-time PCR and Western blotting were used to analyze the mRNA and protein expression of Mcl-1 gene in SNK-6 cells before and after transfection. MTT assay and flow cytometry were applied to detect the proliferation and apoptosis of the transfected SNK-6 cells, respectively. Results The shRNA targeting Mcl-1 gene was successfully inserted into the lentiviral vectors, which could effectively infect lymphoma SNK-6 cells. The mRNA and protein expression of Mcl-1 gene in the shRNA group significantly decreased as compared with those in the control group. The MTT assay results suggested that the proliferation of SNK-6 cells was significantly inhibited in the shRNA group as compared with that in the control group [(31.6±3.3)% *vs* (5.8±2.7)%, $P<0.01$]. The flow cytometry showed that the apoptosis rate of the shRNA group was significantly higher than that of the control group [(28.9±2.1)% *vs* (5.3±1.5)%, $P<0.01$]. Conclusion Lentivirus-mediated shRNA interference targeting Mcl-1 gene can specifically block Mcl-1 gene expression, and inhibit the proliferation and promote the apoptosis of SNK-6 cells.

[**Key words**] lymphoma; Mcl-1; shRNA; apoptosis; lentiviral vector

Corresponding author: Zhang Mingzhi, Tel: 86-371-66295563, E-mail: mingzhi_zhang@126.com

[通信作者] 张明智,电话:(0371)66295563,E-mail: mingzhi_zhang@126.com

NK/T细胞淋巴瘤是恶性淋巴瘤的1个亚型,属于高度侵袭性恶性肿瘤,其发病率在西方国家较低,而在亚洲和南美洲高发。国际上缺乏标准的治疗方案,目前的常规治疗存在疗效差、易复发的特点,且多数人就诊时已处于中晚期,因此NK/T细胞淋巴瘤的5年生存率仅为34%[1]。目前探索新的治疗方法势在必行,而基因治疗NK/T细胞淋巴瘤正成为目前的研究热点。髓细胞白血病-1(Mcl-1)基因是Bcl-2家族基因中的抗凋亡因子之一,它可以通过与Bcl-2前凋亡家族成员Bim[2]、Bak[3]、NOXA[2]相互作用,抑制线粒体细胞色素C的释放从而抑制细胞凋亡。Mcl-1可在多种肿瘤中表达,其高表达可拮抗药物、放射和生物制剂的抗肿瘤作用。余琴等[4]通过短发夹RNA(shRNA)干扰肝癌细胞HepG2中Mcl-1基因引起其表达下调,从而抑制肿瘤细胞的增殖和促进细胞的凋亡。有研究表明,B细胞淋巴瘤中该基因普遍表达,其表达高低与肿瘤恶性程度呈正相关[5]。

由于淋巴瘤细胞为悬浮细胞,应用普通质粒转染方法存在较多弊端,比如感染效率低下和瞬时表达问题,为了克服这些限制,逆转录病毒载体、腺病毒载体以[6]及最新的慢病毒载体[7]均已应用于实验室,并被证明对人体是安全的。本实验应用包含pll3.7质粒的慢病毒为载体,pll3.7质粒具有mU6启动子,可以用于高效表达shRNA,同时还有CMV-EGFP元件作为报告基因,可用于评价转染效率。因此本实验通过慢病毒介导的Mcl-1-shRNA干扰,研究Mcl-1基因对淋巴瘤细胞系SNK-6细胞增殖和凋亡的作用,从而探索治疗NK/T细胞淋巴瘤的新方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI1640培养基(Solarbio公司),DMEM培养基(Gbico公司),胎牛血清(杭州四季青),总RNA提取、胶回收试剂盒(北京天根),质粒小量提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒(Axygen),限制性内切酶(TaKaRa),荧光定量试剂盒(上海诺论),GAPDH抗体、Mcl-1多克隆抗体(Santa Cruz),ECL发光试剂盒(碧云天)。

1.2 细胞培养、质粒及菌株

SNK-6细胞(人NK/T淋巴瘤细胞株)由Chiba大学Norio Shimizu教授和张羽教授惠赠,293T细胞(人肾胚细胞株)由本实验室保存。SNK-6细胞为悬浮细胞,在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养。293T细胞为贴壁细胞,在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,培养条件同SNK-6,每隔2~3 d换液并传代1次。慢病毒载体质粒pll3.7、包装质粒Δ8.2和包膜蛋白质粒VSV-G均为本实验室保存。

1.3 慢病毒载体pll-Mcl-1-shRNA质粒的构建及鉴定

利用网上资源在线设计针对Mcl-1基因的siRNA,以此序列为模板,根据碱基互补配对原则设计寡核苷酸链,在互补2条序列中间加入Loop,同时在正义链5′端引入*Hpa* Ⅰ酶切位点,在反义链3′端引入*Xho* Ⅰ酶切位点,同样设计无义shRNA为对照质粒,送上海生工公司合成。合成的shRNA如下:Mcl-1-shRNA正义链5′-AACGCAGTCCTCTAGTGTTTCATTCAAGAGATGAAACACTAGAGGACTGCTTTTTTC-3′,Mcl-1-shRNA反义链:5′-TCGAGAAAAAAGCAGTCCTCTAGTGTTTCATCTCTTGAATGAAACACTAGAGGACTGCGTT-3′。对照shRNA如下:control-shRNA正义链:5′-AACGGGCATTAACTTTCAGCTCTTCAAGAGAGAGCTGAAAGTTAATGCCCTTTTTTC-3′,control-shRNA反义链:5′-TCGAGAAAAAAGGGCATTAACTTTCAGCTCTCTCTTGAAGAGCTGAAAGTTAATGCCCGTT-3′。将合成的寡核苷酸模板退火,得到互补的双链DNA片段。限制性内切酶*Hpa* Ⅰ和*Xho* Ⅰ分别单酶切慢病毒载体质粒pll3.7,胶回收酶pll3.7(7.6 kb)大片段。将得到的pll3.7线性化大片段与上述退火后的双链DNA片段连接,形成重组pll-Mcl-1-shRNA质粒和重组对照质粒。将重组质粒转化感受态细菌DH5α,扩增并提取质粒,应用*Xho* Ⅰ和*Xba* Ⅰ双酶切方法进行鉴定。将含有重组质粒的新鲜菌液送至郑州晶艾生物技术有限公司测序。

1.4 慢病毒的包装与滴度测定

pll-Mcl-1-shRNA质粒、对照质粒和空载体质粒分别与辅助包装质粒(Δ8.2和VSV-G)按照Lipofectamine 2000说明书进行共转染293T细胞,转染后6 h更换培养基,继续培养48 h后收集细胞上清液,提取慢病毒,分别命名为Mcl-1-shRNA病毒、对照病毒和空载体病毒。将粗提液用ViraBind慢病毒纯化和浓缩试剂盒进行纯化浓缩,-80 ℃保存。取出部分慢病毒浓缩液系列稀释后感染293T细胞,利用绿色荧光蛋白表达测定慢病毒滴度。

1.5 慢病毒感染SNK-6细胞

实验设空白细胞组、空载体病毒组、对照病毒组及Mcl-1-shRNA病毒组共4组。将淋巴瘤细胞以1×10^6/ml的密度接种于细胞培养瓶中,根据细胞数量和制备的3种病毒滴度,以感染复数(MOI)不同值感染淋巴瘤细胞,同时添加多聚季胺(polybrene)至8 μg/ml,感染12 h后换液,37 ℃,5% CO_2继续培养。96 h后于荧光显微镜下观察感染细胞阳性率。

1.6 荧光定量PCR(qPCR)检测Mcl-1基因表达情况

收集空白细胞和慢病毒感染96 h后的3组细胞(MOI=50),提取总RNA并逆转录总RNA为cDNA,设计荧光定量PCR引物,进行PCR扩增。以β-actin为内参照。具体步骤参照上海诺论荧光定量试剂盒说明书。引物如下:Mcl-1正义链5′-GTAAGGACAAAACGGGAC-3′,Mcl-1反义链5′-CTCTTCAATCAATGGGGA-3′,扩增产物长度350 bp;β-actin正义链5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,β-actin反义链5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′,扩增产物长度285 bp。应用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对结果进行分析。

1.7 Western blot检测Mcl-1蛋白的表达

收集空白细胞和慢病毒感染96 h后的3组细胞(MOI=50),提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白质浓度,应用10% SDS-

PAGE电泳分离蛋白质,电转移至PVDF膜,与Mcl-1多克隆抗体反应孵育过夜,二抗室温孵育1 h后,ECL化学发光剂于暗室中曝光和显影,用凝胶图像处理系统分析目的条带光密度值,以Mcl-1与GAPDH蛋白条带光密度比值反应Mcl-1蛋白表达水平,并进行半定量分析,计算Mcl-1蛋白表达抑制率。

1.8 MTT法检测细胞生长活性

取3组稳定感染96 h后的细胞(MOI=50)和空白细胞,配制成5.0×10^5/ml的单细胞悬液接种到96孔板,实验分组如下,空白细胞组:只有培养液;空载体病毒组:培养液+慢病毒;对照病毒组:细胞+MTT;Mcl-shRNA病毒组:细胞+培养液+慢病毒+MTT。每个组均设5个复孔,培养48 h,每孔加MTT液20 μl,继续培养4 h,用全自动酶标仪置493 nm波长测各孔D(493)值。实验重复3次,按以下公式计算生长抑制率。细胞生长抑制率=[1-加病毒孔D(493)/空白对照孔D(493)]×100%。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

取感染96 h后的细胞(MOI=50)和空白细胞接种于24孔板,每孔1×10^6个,800 r/min离心5 min,弃上清,PBS重悬,再次800 r/min离心5 min,弃上清。用结合缓冲液重悬细胞,取100 μl的细胞悬液于5 ml流式管中,加入10 μg/ml的PI,混匀后避光孵育15 min,在反应管中加入400 μl稀释好的结合缓冲液上机测试。

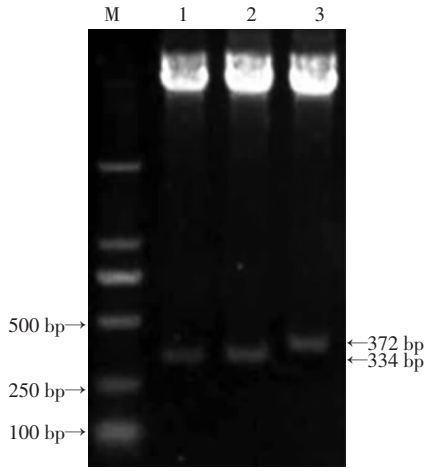
1.10 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用K-W检验进行数据分析。

2 结果

2.1 pll-Mcl-1-shRNA慢病毒载体质粒的构建和鉴定

重组质粒pll-Mcl-1-shRNA转化后,挑取单克隆进行细菌扩增并提取质粒,用*Xho* Ⅰ和*Xba* Ⅰ双酶切未插入shRNA片段的pll3.7载体,可以切下334 bp的小片段;用*Xho* Ⅰ和*Xba* Ⅰ双酶切插入shRNA片段的pll3.7载体,可以切下372 bp的小片段,与预期结果相符(图1)。质粒DNA测序证实插入的shRNA片段碱基序列与设计序列完全一致。



M:标准;1、2:空pll3.7质粒;3:插入Mcl-1-shRNA的pll3.7质粒

图1 pll-Mcl-1-shRNA重组质粒双酶切鉴定凝胶电泳结果

2.2 Mcl-1-shRNA慢病毒滴度测定和感染淋巴瘤细胞效率测定

重组慢病毒载体在293T细胞中成功组装并浓缩。应用浓缩液系列稀释后感染293T细胞,通过观察绿色荧光蛋白表达测定慢病毒滴度(图2A),病毒滴度均可达109 TU/ml。制备的3种慢病毒均可以有效感染SNK-6细胞,感染效率无明显差异($P>0.05$),且随MOI的增加感染效率也随之增加,在MOI=10~500时,增加最为明显,而MOI<10时,感染效率较低,而>500时感染效率进入平台期。在MOI=50的情况下,感染效率均可达68%~70%(图2B)。

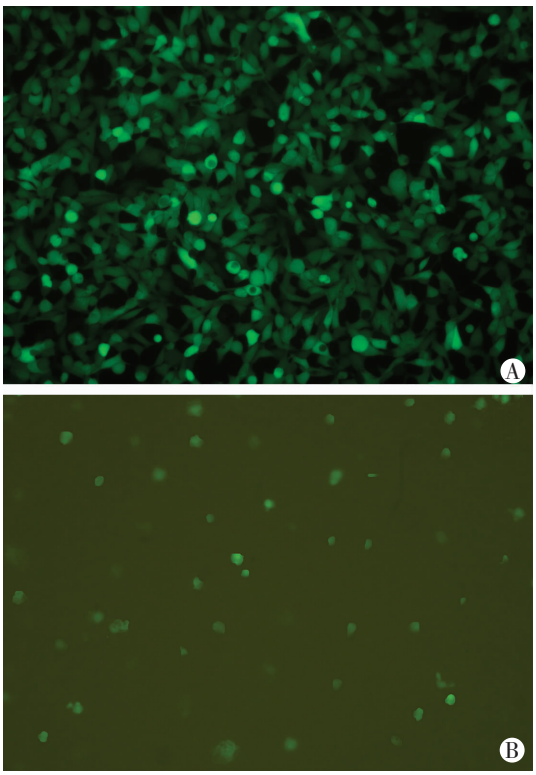


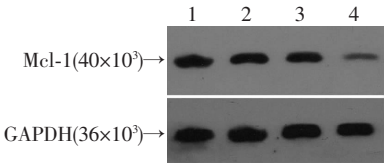
图2 荧光显微镜观察慢病毒感染293T细胞(A)及其Mcl-1-shRNA慢病毒感染SNK-6细胞(B)96 h后绿色荧光蛋白的表达 (×200)

2.3 qPCR检测结果

应用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对qPCR结果进行分析,Mcl-1-shRNA病毒组细胞的Mcl-1基因mRNA表达水平(0.322±0.043)低于其余3组($P<0.01$),空白细胞组(1.000±0.000)、空载体病毒组(1.002±0.054)、对照病毒组(0.985±0.078)无明显差异($P>0.05$)。

2.4 Western blot检测结果

Western blot检测结果显示,感染Mcl-1-shRNA病毒组的细胞Mcl-1蛋白表达水平[相对于空白细胞组Mcl-1蛋白表达抑制率为(65.7±3.9)%]低于其余3组($P<0.01$),空白细胞组(0)、空载体病毒组(4.2±1.3)%、对照病毒组(3.7±2.5)%无明显差异($P>0.05$)。见图3。



1:空白细胞组;2:空载体病毒组;3:对照病毒组;4:Mcl-1-shRNA 病毒组

图 3 空白 SNK-6 细胞及不同慢病毒感染后的 3 组细胞 96 h 后 Mcl-1 和 GAPDH 蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳结果

2.5 MTT 检测结果

MTT 检测结果显示空白细胞组、空载体病毒组、对照病毒组对 SNK-6 细胞的增殖抑制作用无明显差异($P > 0.05$),感染 Mcl-1-shRNA 病毒组的细胞抑制率显著高于其余 3 组($P < 0.01$)。见表 1。

2.6 流式细胞仪检测结果

空白细胞组、空载体病毒组、对照病毒组细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$),感染 Mcl-1-shRNA 病毒组的细胞凋亡率显著高于其余 3 组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 MTT 法与流式细胞仪检测 4 组细胞生长抑制率和凋亡率

(%, $n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	抑制率	凋亡率
空白细胞组	4.3 ± 1.8^a	4.6 ± 1.3^a
空载体病毒组	6.7 ± 1.1^a	4.7 ± 1.2^a
对照病毒组	5.8 ± 2.7^a	5.3 ± 1.5^a
Mcl-1-shRNA 病毒组	31.6 ± 3.3	28.9 ± 2.1

a: $P < 0.01$,与 Mcl-1-shRNA 病毒组比较

3 讨论

Mcl-1 在多种肿瘤组织中高表达,如白血病、宫颈癌、肝癌等,此外 Mcl-1 与多发性骨髓瘤的复发、慢性淋巴细胞白血病和结肠癌肝转移的耐药有关[8]。在淋巴瘤的研究中发现 T 细胞淋巴瘤中该基因普遍表达,不同亚型 T 细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NKL)中的表达存在显著性差异,其中 ALK 阳性的间变 T 细胞淋巴瘤(ALCL)呈特征性高表达[9]。最近在 ALCL 中的研究表示 miR-29a 表达降低在 Mcl-1 的高表达中起重要的作用,从而导致肿瘤细胞的凋亡减弱[10]。然而目前 Mcl-1 基因在 NK/T 细胞淋巴瘤中的研究较少,Yasuda 等[11]应用免疫组化的方法对 11 例鼻腔 NK/T 细胞淋巴瘤的患者研究发现 Mcl-1 的表达存在 2 个显著不同的组别,与预后的关系尚待进一步研究。

本实验我们选择 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK-6 为靶细胞,并且应用慢病毒为载体以提高悬浮细胞的感染效率,结果显示我们构建的 3 种慢病毒均可以有效感染 SNK-6 细胞,在 MOI = 50 的情况下,效率可达 68% ~70%。感染 Mcl-1-shRNA 病毒组的细胞可特异性阻断 Mcl-1 基因的表达,其 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低。MTT 和流式细胞仪显示慢病毒介导的 Mcl-1 基因 shRNA 干扰与对照组相比可明显抑制肿瘤的增殖,促进肿瘤细胞凋亡,揭示了 Mcl-1 基因是 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK-6 细胞重要的生存因子。

综上所述,慢病毒介导的 Mcl-1 基因 shRNA 干扰有望成为 NK/T 淋巴瘤基因治疗的一个新靶点,但本实验没有涉及 Mcl-1 基因与其他凋亡调节基因及信号分子的相互作用,下一步我们将继续 Mcl-1 基因的机制方面的研究,并联合应用化疗药物观察其对肿瘤细胞的影响。

参考文献:

[1] Cuttica A, Zallio F, Ladetto M, *et al*. Patients with high-risk aggressive lymphoma treated with frontline intensive chemotherapy and autografting: evidence of marked differences in outcome between patients with age-adjusted International Prognostic Index scores 2 and 3[J]. Cancer, 2003, 98(5): 983 - 992.

[2] Chen L, Willis S N, Wei A, *et al*. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function[J]. Mol Cell, 2005, 17(3): 393 - 403.

[3] Willis S N, Chen L, Dewson G, *et al*. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xl, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins[J]. Genes Dev, 2005, 19(11): 1294 - 1305.

[4] 余琴, 陈琼, 黄焕军, 等. 靶向 Mcl-1 的 shRNA 重组质粒的构建及其对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2009, 38(2): 158 - 161.

[5] Cho-Vega J H, Rassidakis G Z, Admirand J H, *et al*. MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(9): 1095 - 1100.

[6] Yang G, Huang C, Cao J, *et al*. Lentivirus-mediated shRNA interference targeting STAT3 inhibits human pancreatic cancer cell invasion [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(30): 3757 - 3766.

[7] 赵丽娜, 郝杰, 胡建刚, 等. PRP 基因 RNAi 重组慢病毒制备及 PRP 基因与睾丸间质细胞增殖和睾酮产生的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1099 - 1102.

[8] Yoon J H, Werneburg N W, Higuchi H, *et al*. Bile acids inhibit Mcl-1 protein turnover *via* an epidermal growth factor receptor/Raf-1-dependent mechanism[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6500 - 6505.

[9] 李晔雄. 间变性大细胞淋巴瘤[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2004, 13(1): 60 - 63.

[10] Desjobert C, Renalier M H, Bergalet J, *et al*. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression[J]. Blood, 2011, 117(24): 6627 - 6637.

[11] Yasuda H, Sugimoto K, Imai H, *et al*. Expression levels of apoptosis-related proteins and Ki-67 in nasal NK/T-cell lymphoma[J]. Eur J Haematol. 2009, 82(1): 39 - 45.

(**收稿**:2011-11-19;**修回**:2011-12-17)

(编辑 王 红)