论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0020-04

人 PGI 基因 siRNA 慢病毒质粒的构建及对白血病细胞增殖的影响

赵 亮,李 静,魏 强,游智梅,夏 菁,李丹阳,陈地龙 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程研究室)

[摘要] **目的** 构建共表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因和人磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase, PGI)基因的慢病毒载体,初步探讨干扰人 PGI 基因对白血病细胞增殖的影响。**方法** RT-PCR、Western blot 检测人单核细胞、K562、KG1-α、HL-60 细胞中 PGI mRNA 和蛋白表达水平,筛选高表达 PGI 的白血病细胞系;构建人 PGI 基因 siRNA 的慢病毒载体及阴性对照,经 293T 细胞包装后,获得可表达人 PGI 基因 siRNA 的慢病毒载体及阴性对照;分别使用重组病毒(干扰组)、原始病毒(阴性对照组)和等量 PBS(空白对照组)转染白血病 KG1-α 细胞,筛选稳定转染细胞株。RT-PCR 和 Western blot 检测干扰组、阴性对照组及空白对照组 KG1-α 细胞 PGI 基因表达水平;CCK-8 检测各组细胞增殖情况并作生长曲线。**结果** PGI 基因在白血病 KG1-a 细胞中高表达;成功构建了稳定低表达 PGI 的白血病细胞株(KG1-α-siPGI);低表达 PGI 基因的 KG1-α 细胞增殖能力较空白对照组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功构建了低表达 PGI 基因的白血病 KG1-α 细胞株,干扰 PGI 基因的表达能够抑制 KG1-α 细胞的生长。

[关键词] 白血病;慢病毒载体;RNA 干扰;细胞增殖
[中图法分类号] R-332; R730.23; R733.7 [文献标志码] A

Construction of a lentiviral vector expressing human phosphoglucose isomerase gene siRNA and its influence on leukemia cell proliferation

Zhao Liang, Li Jing, Wei Qiang, You Zhimei, Xia Jing, Li Danyang, Chen Dilong (Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a lentiviral vector co-expressing green fluorescent protein (GFP) and human phosphoglucose isomerase (PGI), and to study the effect of human PGI gene interference on the proliferation of leukemia cells. **Methods** RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of PGI in human mononuclear cells, K562 cells, KG1-α cells and HL-60 cells, respectively, to screen a leukemia cell line with high expression of PGI. Recombinant human PGI gene siRNA lentiviral vector and its negative control were constructed and packaged by 293T cells, and the lentiviral vector that could express PGI siRNA in mammal cells were obtained. Recombinant lentivirus (interference group), original lentivirus (negative control group) and the same volume of phosphate buffer solution (PBS) (blank control group) were used to transfect KG1-α cells, respectively. After KG1-α cells with stable transfection were obtained, the mRNA and protein expression levels of PGI were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting, and cell proliferation was examined by CCK-8 assay. **Results** PGI was highly expressed in KG1-α cells, and KG1-α-siPGI cells with stable and low PGI expression were successfully constructed. Compared with the blank control group, the proliferation capability of KG1-α-siPGI cells decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** We successfully construct the KG1-α leukemia cell line with low expression of PGI, and the interference of PGI expression can inhibit the proliferation of KG1-α cells.

[**Key words**] leukemia; lentiviral vector; siRNA; cell proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171929), and the Foundation of Chongqing Educational Commission (KJ110308). Corresponding author: Chen Dilong, Tel: 86-23-68485614, E-mail: chendilong@21cn.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81171929);重庆市教委基金(KJ110308)
[通信作者] 陈地龙,电话:(023)68485614,E-mail:chendilong@21cn.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121101.0923.005.html(2012-11-01)

化疗为目前治疗白血病的主要方法,而白血病中一部分病例因化疗耐药,效果不佳,并发症多,预后较差。基因及染色体变异是白血病发生、发展的重要步骤,因此找到致病基因并研究其作用机制能极大提高白血病治疗水平。

磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase, PGI)是一种广泛存在的多功能蛋白,在细胞内能够催化糖酵解和糖异生途径葡萄糖-6-磷酸酶与果糖-6-磷酸酶之间的互化,是糖酵解途径第二步关键酶[1]。PGI 在肿瘤血管生成、转移等方面重要扮演了重要角色;在胞外作为一种细胞因子被称作自分泌活动因子(autocrine motility factor, AMF)[2]。它具有增强肿瘤细胞活动性,促进肿瘤细胞生长、浸润、转移的作用。本课题组前期研究发现,人参多糖 GPS 能有效抑制白血病细胞的生长,用人参多糖 GPS 作用于白血病细胞 K562 后,PGI 基因被明显抑制[3]。但 GPS 对白血病细胞的作用是否与下调 PGI 密切相关,尚缺乏实验依据。为此,我们构建了表达人 PGI 基因 siRNA 的慢病毒载体,转染入高表达 PGI 基因的人白血病细胞株内,初步观察了干扰人 PGI 基因对该白血病细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人白血病细胞系 K562、HL-60、KG1-α 由我实验室保存。

1.1.2 293T 慢病毒包装细胞 由上海纽恩生物科技公司提供。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基、灭活胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;单核细胞提取试剂盒购自碧云天生物技术研究所;SimplyP 总 RNA 提取试剂盒购自中国博日公司;第 1 链合成试剂盒及 PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司;兔抗人 PGI 多克隆抗体购自美国 Santa 公司;pLKD. GFP Vector、Polybrene、Lipofectamine 2000 购自纽恩上海生物科技有限公司;携带 PGI 基因的 oligo DNA 片段购自美国 Invitrogen 公司;Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、β-actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗、抗体稀释液、预染蛋白质分子量标准、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购自碧云天生物技术研究所;嘌呤酶素、CCK-8 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞株采用含 10% ~15% 灭活胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养基,37 ℃,5% CO_2 孵箱常规培养,每隔 2 ~3 天传代 1 次。

1.2.2 人单核细胞的提取 取人新鲜抗凝血 1 mL,与 RPMI1640 培养基 1∶1混合,加于 1 mL 单核细胞分离液的液面上。1 500 r/min 离心 15 min,离心管由上至下细胞分为 4 层。第 1 层为血浆,第 2 层为单核细胞层,第 3 层为透明分离液层,第 4 层为红细胞层。吸取第 2 层白膜,移入离心管,PBS 稀释至 10 mL。

1.2.3 RT-PCR、Western blot 筛选高表达 PGI 的白血病细胞株 RT-PCR:取收集细胞约 2×10^5 个,按说明书提取细胞总 RNA 后,逆转录为 cDNA。目的基因及内参引物用 premier 5 设计,经 blast 验证特异性,引物由上海生工生物工程公司合成。PGI 上游引物 5′-GTGAGAAGATCAACTACACCGAG-3′,下游引物 5′-TGACCTCTGGCATCACATCCT-3′,产物大小 108 bp;内参 β-actin 上游引物 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,下游引物 5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′,产物大小 258 bp。PCR 反应体系为 2 × PCR Master Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 50 ng,去离子水补足 25 μL。两个基因循环参数相同:94 ℃预变性 5 min;然后 94 ℃ 变性 30 s,58 ℃复性 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,扩增 30 个循环:最后 72 ℃延伸 5 min 终止反应。取 5 μL PCR 产物混合 1 μL 上样缓冲液在含 EB 的 2.0 % 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统拍照。以人单核细胞作为阴性对照,对比 K562、HL-60、KG1-α 各白血病细胞株 PGI mRNA 的转录情况。

Western blot:总蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,测定浓度后常规进行 SDS-PAGE 电泳。70 V 电泳30 min,再 110 V 电泳 120 min,电转入 0.3 μm DVPF 膜约61 min,采用兔抗人 PGI 多抗(1∶200),兔抗人 β-actin 多抗(1∶500)4 ℃孵育 1 夜。相应羊抗兔二抗(1∶1 000)常温孵育 1 h。ECL 显色,Bio-Rad 凝胶成像仪器成像。同样以人单核细胞作为阴性对照,对比 K562、HL-60、KG1-α 各白血病细胞株 PGI 的蛋白水平。

1.2.4 慢病毒表达载体的构建和包装 依照文献[4]设计人 PGI 基因 cDNA 的特异突变序列,序列如下:正义链:5′-GATCCGTGGTACCGCGAGCACCGCTTTCAAGAGAAGCGGTGCTCGCGGTACCATTTTTTGGAAA-3′;反义链:5′-AGCTTTTCCAAAAAATGGTACCGCGAGCACCGCTTCTCTTGAAAGCGGTGCTCGCGGTACCACG-3′。纽恩上海生物科技有限公司合成寡链 DNA 经退火,连入经 *Age* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切 pLKD. CMV. GFP 载体,$CaCl_2$法转入 DH5α 菌中扩增,提取质粒经 *Xba* Ⅰ酶切鉴定构建成功,送 Invitrogen 公司测序正确。将 293T 细胞以 8×10^5/25 mL 每孔接种于 6 孔板中,培养至融合度 30% ~40%,以不含血清 DMEM 饥饿培养 4 h;取 1.5 mL EP 管,加入 1.5 μg 包装混合质粒和 0.5 μg 表达质粒以及 250 μL 的无血清培养基。轻柔混匀,室温孵育 5 min;按脂质体 2000 说明书,取 1.5 mL 灭菌 EP 管,取 9 μL 脂质体 2000 溶于 250 μL 无血清培养基中。轻柔混匀,室温孵育 5 min;将 DNA 溶液和脂质体溶液轻柔混匀,分别将对照质粒组,目的质粒组转入 293T 细胞,第 2 天后常规培养传代并收取病毒上清液过滤备用。

1.2.5 载体病毒感染高表达 PGI 的人白血病细胞株,筛选稳定细胞 实验设立 3 个组:干扰组、阴性对照组及空白对照组、干扰组和阴性对照组分别使用重组病毒、原始病毒,空白对照组使用等量 PBS 代替。通过预实验得到合适的 MOI(multiplicity of infection,感染指数)为 10。将长势良好的高表达 PGI 的白血病细胞株接种于 24 孔板中,浓度调整为(3 ~5) × 10^4/mL,每孔 450 μL。第 2 天进行病毒感染时细胞汇合率介于 30% ~50% 之间。第 2 天加入病毒上清 50 μL 及 4 mg/mL 的 Polybrene,8 h 后更换新鲜培养基,于第 5 日观察荧光,用 0.1 mg/L 的嘌呤酶素条件培养。隔日换液,直至空白对照组细胞全部死亡,得到成功转染的白血病细胞系。

1.2.6 RT-PCR、Western blot 检测转染后 PGI 的表达 RT-PCR, Western blot 检测 3 组细胞的 PGI mRNA 及蛋白水平差异。

1.2.7 CCK-8 检测干扰人 PGI 基因对白血病 KG1-α 细胞增殖

的影响　分别取对数生长期细胞，以 1.0×10^3/孔的密度接种于96孔板，设5个复孔，分别培养1、2、3、4、5 d后。每孔加入CCK-8液(5 g/L)20 μL，37 ℃孵育4 h，于酶联免疫检测仪上490 nm波长处比色测光密度值[D(490)]，以时间为横轴，光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

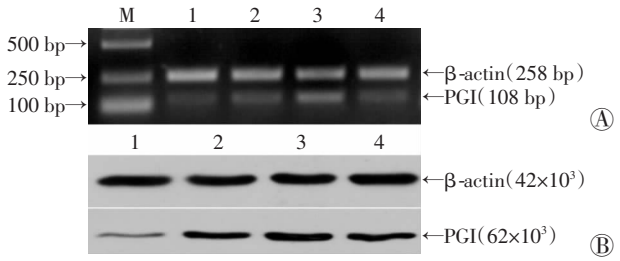
1.3 统计学分析

应用SPSS 13.00统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR和Western blot筛选高表达PGI的白血病细胞株

以正常人单核细胞作为阳性对照，单核细胞、HL-60、KG1-α、K562细胞PGI mRNA的表达量为(0.58±0.02)、(0.73±0.01)、(0.83±0.04)、(0.63±0.02)；蛋白表达量为(0.12±0.01)、(0.59±0.02)、(0.83±0.04)、(0.61±0.03)。KG1-α、HL-60、K562高表达PGI；尤以KG1-α细胞中PGI含量最高。KG1-α为慢性髓细胞性白血病，因此以KG1-α细胞作为研究对象。见图1。



M：标准；1：人单核细胞；2：HL-60细胞；3：KG1-α细胞、4：K562细胞
A：mRNA表达；B：蛋白表达

图1　人单核细胞、HL-60、KG1-α、K562细胞中人PGI的表达

2.2 构建人PGI基因siRNA慢病毒质粒

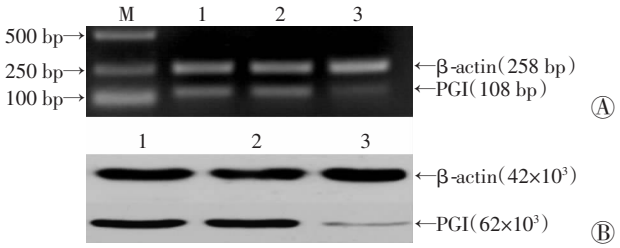
干扰序列为：CCGGTGGTACCGCGAGCACCGCTTTCAAGAGAAGCGGTGCTCGCGGTACCATT TTTT由第210个碱基开始测序图结果证实干扰片段已经连入质粒，获得了特异性干扰PGI的慢病毒质粒。

2.3 包装病毒并收集上清转染KG1α细胞，筛选稳定表达siRNA的KG1α细胞

在倒置显微镜下观察发现空白对照组KG1α细胞多为成团聚集生长，细胞团大小不一，背景干净。经病毒上清转染后干扰组及阴性对照组的KG1α细胞则成团性减弱，呈分散生长，其数量较空白对照组有所减少，细胞周边有较多细胞碎片。在荧光显微镜下无法观察到空白对照组的细胞，但在干扰组和阴性对照组中则可见到大量发出绿色荧光的细胞(图2)。

2.4 干扰组、阴性对照组及空白对照组KG1α细胞PGI mRNA及蛋白表达

检测各组KG1-α细胞中PGI mRNA的表达，发现干扰组中PGI mRNA表达(0.33±0.05)明显低于阴性对照组和空白对照组[(0.74±0.07)，(0.78±0.04)，$t=-4.168$，-5.265，$P<0.05$]。Western blot检测各组KG1-α细胞中PGI蛋白的表达，发现干扰组中PGI表达(0.14±0.03)明显低于后两者[(0.83±0.02)，(0.79±0.01)，$t=-4.536$，-3.905，$P<0.05$]。见图3。

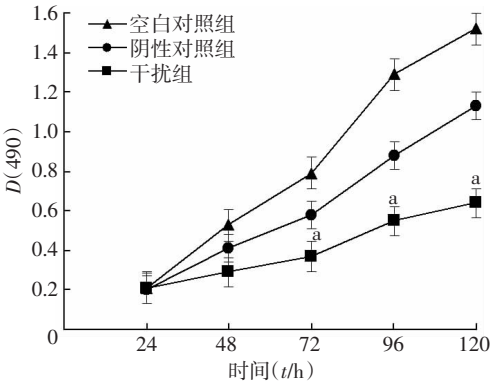


M：标准；1：空白对照组；2：阴性对照组；3：干扰组
A：mRNA表达；B：蛋白表达

图3　经病毒感染后各组白血病KG1-α细胞中人PGI的表达

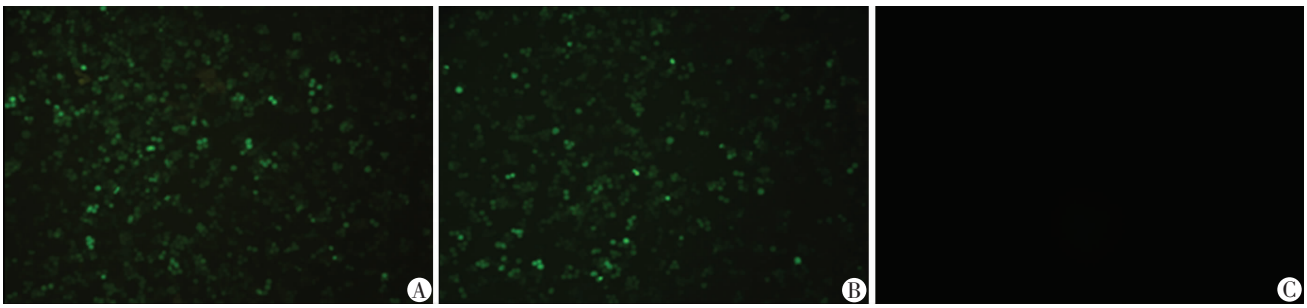
2.5 CCK-8检测对比各组白血病KG1-α细胞的增殖

增殖曲线显示，细胞呈指数生长，与空白对照组及阴性对照组比较，第3～5天干扰组细胞生长受到明显抑制，具有统计学意义($t=-6.435$，-6.258，-4.365，$P<0.05$)。见图4。



a：$P<0.05$，与空白对照组及阴性对照组相比

图4　各组白血病KG1-α细胞增殖曲线分析



A：干扰组；B：阴性对照组；C：空白对照组

图2　倒置显微镜下观察病毒上清转染KG1-α细胞

3 讨论

白血病特征为造血组织中某一类型的白血病细胞在骨髓或其他造血组织中恶性增生,大量累积,并浸润体内各脏器、组织,导致正常造血细胞受抑制,产生各种症状。肿瘤细胞的糖代谢较相应的正常细胞有很大的差异,主要特征是糖酵解显著增强,而白血病患者血液黏稠,白血病细胞增殖明显,处于缺氧的环境,因此糖酵解应该是增强的[5-7]。

PGI是糖酵解途径第2步关键酶[1],广泛分布于人体各组织。PGI活性最突出的改变见于各型肺癌患者,升高幅度约达对照值的6倍。其他恶性肿瘤也可以引起血清PGI活性升高,研究证明PGI在促进肿瘤形成和转移等方面有着重要的意义:在乳腺癌中,PGI的过表达能促进乳腺癌细胞的上皮间质样改变,从而促进肿瘤的生长和转移[8]。在骨肉瘤中,PGI能加速骨肉瘤的肺转移[9]。在肺纤维肉瘤中,下调PGI的表达能促进肿瘤细胞的间质上皮样改变,从而降低肿瘤的成瘤性和侵袭性[2]。PGI是肿瘤分泌的细胞因子,在肿瘤附近非常丰富,它可以与细胞表面糖蛋白gp78(AMFR)结合,通过多种途径增强肿瘤细胞活动性,促进肿瘤细胞生长、浸润、转移的活性[10]。但PGI在白血病中是否也增高,对白血病是否有重要影响则尚少见报道。

为研究PGI/AMF与白血病细胞发展的关系,采用RT-PCR和Western blot检测了3种白血病细胞内PGI mRNA及蛋白的表达水平,发现与正常人单核细胞相比,KG1-α、HL-60、K562细胞内PGI均为高表达,尤以KG1-α细胞中的PGI含量最高。因此,本实验以KG1-α细胞作为研究对象。KG1α细胞是人急性髓系白血病(AML)细胞株KG1的变异体,有研究表明KG1α细胞高表达CD34抗原,且对一般化疗药物不敏感。这可能提示我们白血病细胞与正常人单核细胞比较,PGI均为高表达,且对化疗药物越不敏感的细胞株PGI的表达水平越高,但这还需要进一步证实。

我们构建了PGI siRNA慢病毒质粒,稳定转染白血病KG1-α细胞,通过检测得到低表达PGI基因的白血病细胞株,并发现下调PGI后,白血病细胞的生长成团性减弱,增殖受到明显抑制。虽然大量研究结果证实PGI有促进成瘤性和侵袭性潜能,但其生物活性机制尚不清楚。如果通过PGI siRNA下调肿瘤细胞PGI基因,并找出其下游的信号通路的变化,就能了解PGI对肿瘤细胞的作用机制,为肿瘤的基因治疗提供依据。

PGI/AMF作用于肿瘤细胞要与细胞表面gp78结合,gp78称作AMFR(自分泌因子受体)。AMFR信号传导通路的下游包括了蛋白激酶CK2,Rho家族,rho GDP分离抑制因子β,以及驱动蛋白3A等,上调PGI/AMF的转录表达可下调E-cadherin的表达使上皮间质样转化,上皮间质样改变可以增加肿瘤细胞的侵袭性和转移性[11]。此外,PGI/AMF与AMFR结合后,可以激活PI3K/AKT信号途径,使下游蛋白cyclin D1增加,促进肿瘤细胞的增殖。而PGI调控的靶基因目前尚未研究明确。

PGI具有类似癌基因的作用[12],它对肿瘤的促进作用一方面通过糖酵解途径进行;另一方面以自分泌的形式,激活下游一些信号途径,促进肿瘤细胞的增殖并抑制肿瘤细胞的凋亡。这将在以后的实验中加以证实。

参考文献:

[1] Jeffery C J, Bahnson B J, Chien W, *et al*. Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator[J]. Biochemistry, 2000, 39(5): 955 - 964.

[2] Funasaka T, Hu H, Yanagawa T, *et al*. Down-regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor results in mesenchymal-to-epithelial transition of human lung fibrosarcoma cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4236 - 4243.

[3] 李建平, 何轩, 姜蓉, 等. 人参多糖对K562细胞基因表达谱的影响[J]. 中草药, 2011, 42(5): 940 - 943.

[4] Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, *et al*. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor activities by the poly(ADP-ribose) polymerase family-14[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8682 - 8689.

[5] Brahimi-Horn M C, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway [J]. Int Rev Cytol, 2005(242): 157 - 213.

[6] Ramanathan A, Wang C, Schreiber S L. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(17): 5992 - 5997.

[7] Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, *et al*. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death[J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 999 - 1006.

[8] Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, *et al*. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis[J]. Cancer Res, 2010, 70(22): 9483 - 9493.

[9] Takanami I, Takeuchi K, Watanabe H, *et al*. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 95(6): 384 - 387.

[10] Chiu C G, St-Pierre P, Nabi I R, *et al*. Autocrine motility factor receptor: a clinical review[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(2): 207 - 217.

[11] Funasaka T, Raz A. The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 725 - 735.

[12] Funasaka T, Hogan V, Raz A. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial and mesenchymal phenotype conversions in breast cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5349 - 5356.

(**收稿**:2012-08-14;**修回**:2012-10-08)

(编辑 吴培红)