文章编号:1000-5404(2014)05-0437-05

论著

PCDH10基因促进多发性骨髓瘤细胞凋亡及机制研究

李 珍[1],陈建斌[1],彭 曦[1],谭 栩[1],杨泽松[2],黄宗干[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:血液科[1],血液科实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨PCDH10(protocadherin 10)基因诱导多发性骨髓瘤KM3细胞凋亡的作用及相关机制。**方法** 采用脂质体法将重组质粒pcDNA3.1(+)PCDH10以及pcDNA3.1(+)空质粒稳定转染入人骨髓瘤KM3细胞,以未转染组和转染pcDNA3.1(+)空质粒组作为对照,通过RT-PCR和Western blot检测PCDH10基因和蛋白的表达,应用MTT法检测PCDH10转染后细胞增殖能力;应用流式细胞仪检测细胞凋亡率;应用透射电镜观察细胞凋亡超微结构;应用Western blot检测凋亡相关蛋白表达水平。**结果** PCDH10转染KM3细胞后,PCDH10基因和蛋白表达水平均明显升高。MTT结果显示PCDH10转染后细胞增殖明显受到抑制($P<0.05$);流式细胞仪结果显示转染PCDH10基因的KM3细胞凋亡率明显增高($P<0.05$);透射电镜下观察,PCDH10转染组细胞可以看到胞质空泡样变,核固缩以及明显的凋亡小体,对照组未见明显异常;Western blot结果显示PCDH10能降低Bcl-2的表达,促进P53、Fas的表达($P<0.05$)。**结论** PCDH10基因有促进多发性骨髓瘤细胞KM3凋亡作用。

[关键词] PCDH10;多发性骨髓瘤;细胞凋亡
[中图法分类号] R73-362;R730.59;R733.3 [文献标志码] A

PCDH10 promotes apoptosis in multiple myeloma cells

Li Zhen[1], Chen Jianbin[1], Peng Xi[1], Tan Xu[1], Yang Zesong[2], Huang Zonggan[1] ([1]Department of Hematology, [2]Laboratory of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the apoptosis-inducing effect of protocadherin 10 gene (PCDH10) on multiple myeloma (MM) cells and its mechanisms. **Methods** The human MM cell line KM3 was stably transfected with pcDNA3.1(+)PCDH10 or pcDNA3.1(+) by lipofectamine. Untransfected and pcDNA3.1(+) plasmid transfected cells were used as control. The expression of PCDH10 at mRNA and protein levels in the PCDH10-transfected cells were detected by real-time PCR and Western blotting. Cell proliferation after transfection was detected by MTT assay. The apoptotic rate was assayed by flow cytometry, and transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the ultra-structure of the cells. The expressions of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. **Results** Transfection of PCDH10 resulted in obviously increased expression of PCDH10 at mRNA and protein levels. MTT assay showed that the proliferation of PCDH10-KM3 cells was significantly suppressed ($P<0.05$). Flow cytometry revealed increased apoptosis in KM3 cells transfected with PCDH10 ($P<0.05$). TEM displayed that the PCDH10-transfected KM3 cells had cytoplasmic cavities, karyopyknosis and obvious apoptotic bodies. But no such change was found in the control cells. At the same time PCDH10-transfected KM3 cells resulted in down-regulation of Bcl-2 ($P<0.05$), and up-regulation of p53 and Fas gene ($P<0.05$). **Conclusion** PCDH10 plays a promoting role in the apoptosis of MM cell line KM3.

[**Key words**] PCDH10;multiple myeloma;apoptosis

Supported by the Key Project of 2011 Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-032) and the Project of Medical Scientific Research of Chongqing (2010-2-108). Corresponding author: Chen Jianbin, Tel: 86-23-89012918, E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划重点项目(2011-1-032);重庆市医学科研计划(2010-2-108)
[通信作者] 陈建斌,电话:(023)89012918,E-mail:cqchenjianbin2007@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.1916.008.html(2013-12-19)

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是浆细胞克隆性增生的恶性肿瘤,其发病率在血液系统肿瘤中居于第2位,约占肿瘤总死亡率的2%。由于其发病机制不明,临床上仍不可彻底治愈[1]。肿瘤的发生、发展可能与其抑制特异性的凋亡通路有着密切关系。因此,对多发性骨髓瘤发病机制及诱导瘤细胞凋亡的研究将为治疗骨髓瘤提供新的策略。

PCDH10(protocadherin 10)基因亦称OL-PCDH或KIAA1400,属δ2组原钙黏素家族,位于4q28.3,该家族对细胞分化、黏附、细胞间特异性识别以及信号传导等功能起着重要作用[2-3]。国内外研究表明PCDH10基因是一种抑癌基因,其启动子CpG岛高度甲基化和其低表达或沉默发生在胃癌、宫颈癌、鼻咽癌、食道癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肝癌等多种人类肿瘤中,且其表达下调与肿瘤细胞的增殖、侵袭等恶性生物学行为密切相关[2-10]。在体外过表达PCDH10基因可抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭以及克隆形成等,但其具体机制未进行深入研究[3]。

我们前期的研究表明,PCDH10基因在多发性骨髓瘤KM3细胞中因启动子甲基化而完全沉默,且体外过表达PCDH10基因对多发性骨髓瘤细胞增殖、克隆形成以及血管新生具有显著的抑制效应[5]。本研究进一步探讨外源性PCDH10基因对多发性骨髓瘤细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响,为探索骨髓瘤的发病机制、寻求新的治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

KM3细胞系由上海第二军医大学长征医院血液科侯健教授惠赠。pcDNA3.1(+)PCDH10重组质粒以及pcDNA3.1(+)TP53真核表达载体由日本Kazusa基因研究所惠赠。RPMI1640、胎牛血清(Gibco公司,美国),二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司),DNA Marker 2000(天根生物公司),质粒DNA提取试剂盒(Qiagen公司,美国),Lipofectamine 2000脂质体转染试剂及Trizol reagent(Invitrogen公司),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。逆转录及PCR试剂盒(TaKaRa公司),抗PCDH10抗体(Abnova公司),抗Fas、Bcl-2、P53、β-actin抗体及HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(Cell Signaling Technology公司)。Annexin V/PI试剂盒购自碧云天,CO_2培养箱,倒置显微镜,流式细胞仪,HI-TACHI-7000透射电子显微镜。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养、基因转染及筛选

KM3细胞系在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基(Gibco公司,美国)中,置于5% CO_2、37 ℃及饱和湿度的培养箱中培养传代。取对数生长期的细胞用于转染实验。实验分为3组:未转染组、空质粒转染组和PCDH10转染组。未转染组仅转染脂质体,空质粒转染组转染pcDNA3.1(+),PCDH10转染组转染pcDNA3.1(+)PCDH10重组质粒。抽提质粒,核酸蛋白定量仪定量后,按Lipofectamine 2000脂质体(Invitrogen公司,美国)说明书的方法,将pcDNA3.1(+)PCDH10或pcDNA3.1(+)质粒导入KM3细胞。转染72 h后用G418进行筛选,先在转染的KM3细胞中加入600 mg/L的G418,待对照组的细胞大部分死亡后,换用维持浓度200 mg/L连续筛选,直至阳性集落形成。

1.3 RT-PCR检测PCDH10转染后KM3细胞PCDH10 mRNA表达

收集G418筛选稳定转染的各组细胞各1×10^6个,RNA提取采用Trizol法(Invitrogen公司),并参照逆转录试剂盒(TaKaRa公司)说明书将RNA逆转录成cDNA。PCR总反应体系为12.5 μL,反应条件:95 ℃ 10 min,1个循环。94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s(内参为51 ℃),72 ℃ 30 s,PCDH10基因32个循环,β-actin基因23个循环,最后72 ℃延伸3 min[12]。PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳。PCDH10及内参β-actin基因的引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列、退火温度及产物长度

基因名称	引物序列	退火温度	产物长度
PCDH10	上游:5′-ACTGCTATCAGGTATGCCTG-3′	53℃	219 bp
	下游:5′-GTCTGTCAACTAGATAGCTG-3′		
β-actin	上游:5′-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3′	51℃	268 bp
	下游:5′-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′		

1.4 Western blot检测PCDH10转染后KM3细胞PCDH10蛋白表达

收集G418筛选稳定转染的各组细胞各1×10^7个,用含10 mmol/L PMSF的蛋白裂解液RIPA(碧云天公司)提取转染后细胞总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度,经沸水浴5 min后,取等量蛋白上样。经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,将蛋白转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上。1%脱脂牛奶室温封闭1 h后,一抗1∶1 000稀释,内参β-actin 1∶2 500稀释,4 ℃孵育过夜。HRP酶标山羊抗兔二抗1∶2 500稀释,室温孵育1 h后,ECL化学发光试剂(碧云天公司)显色,暗室曝光显影。内参选用β-actin抗体。用Quantity One图像分析软件对条带进行分析。

1.5 MTT法检测细胞生长曲线

取稳定转染后的各组细胞,换液后制成单细胞悬液。以每孔2×10^3个细胞接种于96孔板培养,每组设3个复孔。每天取出1块培养板,每孔加MTT 20 μL,继续培养4~6 h后弃除培养液,每孔加10% SDS 200 μL,继续孵育过夜,紫外分光光度仪测定各孔波长570 nm处的光密度值[$D(570)$],以时间为横坐标、$D(570)$值为纵坐标作图。

1.6 细胞凋亡率的测定

收集稳定转染后的各组细胞,以1×结合缓冲液重悬细胞并调整细胞数为5×10^5/mL。吸细胞混悬液100 μL至5 mL流式管中,加Annexin V-FITC 5 μL和20 g/L PI 5 μL,充分混匀,室温避光孵育15 min,每管加入1×结合缓冲液400 μL,轻微漩涡混匀,1 h内上流式细胞仪检测。同时以不加Annexin V-FITC和PI的一管为阴性对照。用Cell Quest软件进行分析,右下象限Annexin V^+/PI^-代表早期凋亡细胞百分率。

1.7 透射电镜观察细胞结构变化

取稳定转染后生长良好的KM3细胞,分别放入10 mL离

心管,800 r/min 离心 5 min,保留 1.5 mL 上清,轻轻吹散细胞后转入 1.5 mL 离心管,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清,缓慢加入 4% 戊二醛固定,1% 锇酸后固定,酒精、丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋后制备超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色,透射电镜观察细胞结构。用 Quantity One 图像分析软件对条带进行分析。

1.8 Western blot 检测凋亡相关基因表达蛋白的表达

按照上述的 Western blot 方法,将蛋白转至 PVDF 膜上。1% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,一抗抗 Bcl-2、Fas、P53 抗体以 1∶1 000 稀释,内参 β-actin 1∶2 500 稀释,4 ℃孵育过夜。

HRP 酶标山羊抗兔二抗 1∶2 500 稀释,室温孵育 1 h 后,ECL 化学发光试剂显色,暗室曝光显影。用 Quantity One 图像分析软件对条带进行分析。

1.9 统计学处理

实验均重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 18.0 统计软件进行 t 检验。

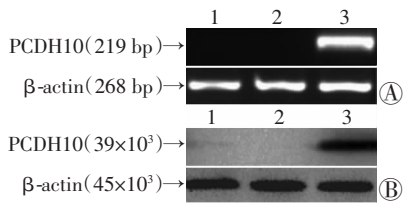
2 结果

2.1 RT-PCR 检测 PCDH10 mRNA 表达

提取 3 组 KM3 细胞总 RNA 后进行 RT-PCR 检测。结果显示,PCDH10 转染组 KM3 细胞中 PCDH10 mRNA 高表达,而未转染组及空质粒转染组则基本不表达(图 1A)。

2.2 Western blot 检测 PCDH10 蛋白的表达

提取 3 组 KM3 细胞总蛋白,进行 Western blot 检测。结果显示,PCDH10 转染组 KM3 细胞中 PCDH10 蛋白高表达,且较未转染组和空质粒转染组明显增强,而各组细胞中β-actin 内参表达恒定,与 RT-PCR 检测结果一致(图 1B)。

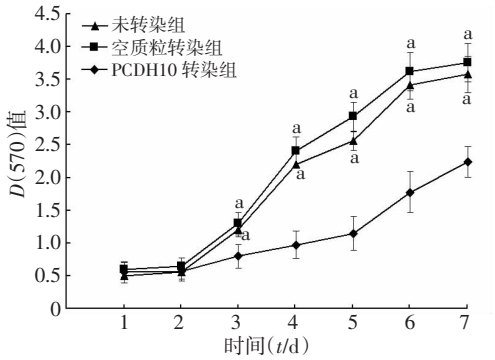


1:未转染组;2:空质粒转染组;3:PCDH10 转染组

图 1 pcDNA3.1(+)-PCDH10 转染后 RT-PCR(A)、Western blot(B)检测结果

2.3 PCDH10 基因对细胞增殖的抑制作用

倒置相差显微镜观察显示,PCDH10 转染组以及空质粒转染组细胞体积稍小,胞膜完整连续,余无其他特异性形态学变化。3 组细胞经过第 1、2 天的平台期,第 3 天开始生长速度出现较明显的差别,PCDH10 转染组细胞增殖水平显著低于未转染组和空质粒转染组($P < 0.05$),而空质粒转染组和未转染组没有明显变化($P > 0.05$)。其结果提示,PCDH10 基因能抑制 MM 细胞的增殖(图 2)。



a:$P < 0.05$,与 PCDH10 转染组比较

图 2 MTT 法检测 pcDNA3.1(+)-PCDH10 转染后细胞增殖能力

2.4 流式细胞仪检测 PCDH10 转染后细胞凋亡情况

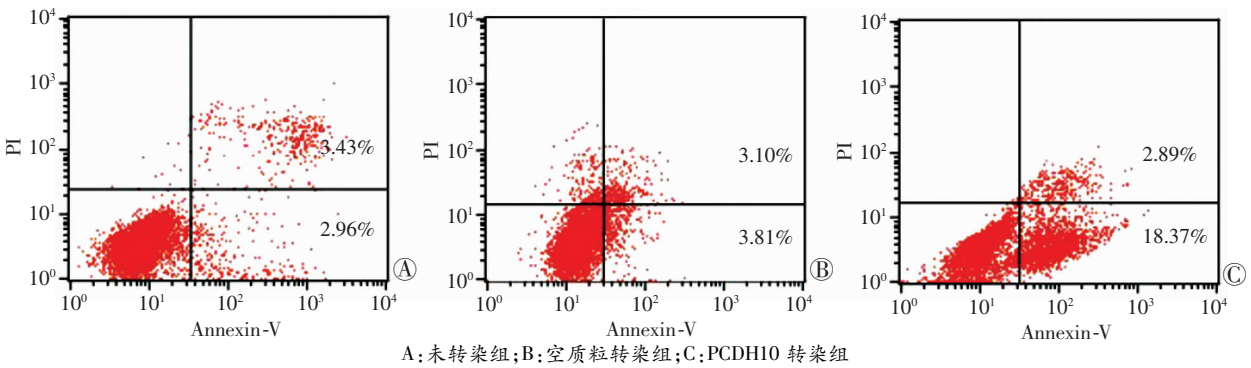
从 Annexin V-FITC 和 PI 荧光双参数点图结果见图 3,未转染组、空质粒转染组和 PCDH10 转染组的凋亡率分别为(2.47 ± 0.17)%、(3.52 ± 1.03)%、(28.47 ± 1.56)%。空质粒组细胞凋亡率高于未转染组,但差异无统计学意义($P = 0.086$)。PCDH10 转染组凋亡率显著高于未转染组和空质粒转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 透射电镜观察结果

透射电镜下,未转染组和空质粒转染组细胞器等未见明显异常(图 4A、B);PCDH10 转染组表现为线粒体略有肿胀,胞质大量的空泡形成,可见细胞膜和细胞器相对完整的核固缩及明显的凋亡小体形成(图 4C)。

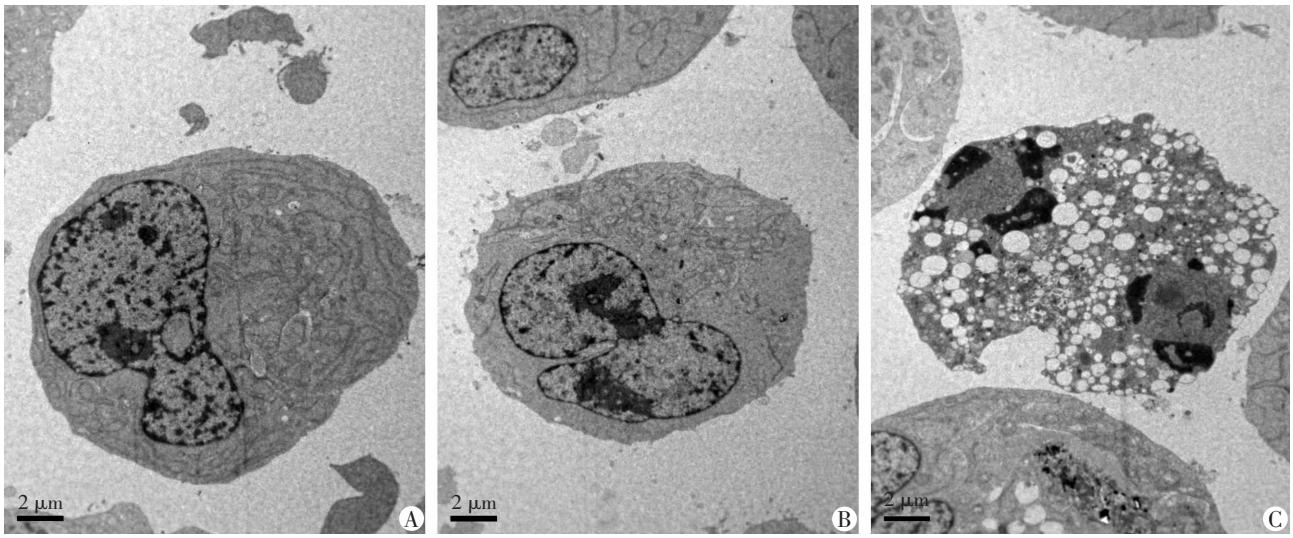
2.6 凋亡相关蛋白的表达

Western blot 检测表明 PCDH10 基因稳定转染 KM3 细胞后,未转染组和空质粒转染组在各凋亡相关蛋白水平检测中均无显著差异($P > 0.05$);PCDH10 转染组 Bcl-2 表达与未转染组和空质粒转染组比较明显降低($P < 0.05$,图 5);P53 表达水平较未转染组和空质粒转染组上调($P < 0.05$,图 5);Fas 表达水平较未转染组和空质粒转染组升高($P < 0.05$,图 5)。



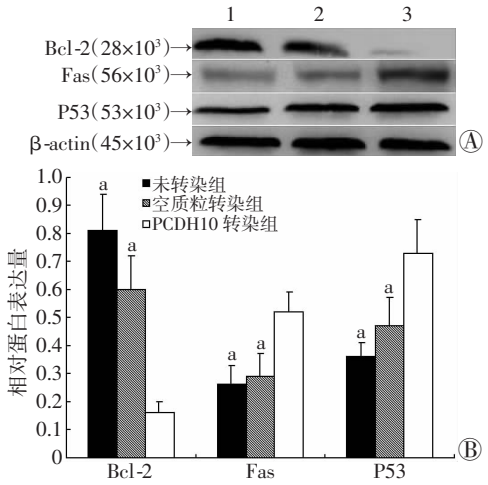
A:未转染组;B:空质粒转染组;C:PCDH10 转染组

图 3 流式细胞仪检测 PCDH10 基因对 KM3 细胞凋亡的作用



A:未转染组;B:空质粒转染组;C:PCDH10转染组

图4 透射电镜观察PCDH10基因对KM3细胞凋亡的作用



A:Western blot检测结果 1:未转染组;2:空质粒转染组;3:PCDH10转染组;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与PCDH10转染组比较

图5 Western blot检测PCDH10基因对凋亡相关蛋白的表达的作用

3 讨论

我们前期研究表明PCDH10基因在MM中因其甲基化而低表达或沉默,且PCDH10可以使细胞停滞于G_0/G_1期,从而抑制肿瘤细胞增殖[5]。此外,通过甲基化特异性PCR(MSP)检测出77.27%(34/44)的MM临床患者PCDH10基因呈甲基化而低表达[11]。这表明PCDH10基因可作为MM的分子生物学标志之一,从而为临床MM的早期诊断提供重要的实验依据。研究表明,PCDH10基因在鼻咽癌、食管癌等肿瘤中广泛沉默的分子机制是其启动子CpG岛甲基化而沉默,且体外过表达PCDH10基因能抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、克隆形成等[3];过表达PCDH10基因能抑制胃癌细胞的增殖、转移和侵袭,并通过上调促凋亡基因Fas、Caspase 8、Jun、HTATIP2和CDKN1A,下调抗凋亡基因FGFR2和CDKN1A促进胃癌细胞凋亡[10]。另外,Li等[7]发现Sp1/Sp3和CBF/NF-γ等转录因子对调节PCDH10基因表达起着很重要的作用。以上研究均说明了PCDH10基因在人类肿瘤中作为基因靶向治疗的重要性。目前国内外对于PCDH10的研究还主要集中在一些功能学的研究上,对于其抑制肿瘤的作用和具体机制还需要进一步的研究。

本研究通过稳定转染PCDH10基因后观察其对骨髓瘤KM3细胞凋亡的影响。PCDH10转染后RT-PCR和Western blot结果均表明PCDH10基因被成功表达。在观察PCDH10基因对KM3细胞凋亡影响的实验中发现,PCDH10转染KM3细胞后,电镜下PCDH10转染组出现胞质空泡样变,核固缩以及明显的凋亡小体;流式细胞仪结果显示PCDH10转染组细胞凋亡率较对照组明显增加,表明PCDH10有促KM3细胞凋亡的作用,这与文献[10]在胃癌中的研究一致;通过Western blot检测凋亡相关基因发现,PCDH10基因可导致抗凋亡基因Bcl-2的表达水平显著下调,Fas蛋白表达明显上调,抑癌基因P53的表达较对照组上调。这些结果表明PCDH10可能通过调节Bcl-2、P53和Fas等凋亡相关基因促进骨髓瘤KM3细胞凋亡,从而为临床治疗MM提供了新的策略与方向。

MM是一种增殖与凋亡活性均低的分子克隆病。Bcl-2基因是很重要的细胞凋亡调控基因,其在抑制凋亡的同时并不促进细胞增殖[12]。研究表明Bcl-2基因的过度表达参与了多种血液肿瘤(包括MM)的发生、发展,而且Bcl-2基因表达的上调与MM细胞的寿命和抗药性相关[13-14]。结合本实验结果说明PCDH10基因促进骨髓瘤细胞凋亡可能涉及Bcl-2基因。

P53是重要的抑癌基因,它在细胞周期调控、细胞凋亡以及肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用。研究表明c-Jun/JNK通路的激活对P53介导的多发性骨髓瘤细胞凋亡起着重要作用,而激活的P53反过来也会增强JNK信号通路,从而促进肿瘤细胞凋亡[15]。由于PCDH10基因能上调Jun蛋白进而促进胃癌细胞凋亡[10],本研究也表明PCDH10基因可上调P53基因表达,故我们推测PCDH10与P53基因可能在促进骨髓瘤细胞凋亡作用中起着协同作用。

Fas是最典型的死亡受体,在介导细胞凋亡过程中可能起到很重要的信号传递作用,同时Fas系统调节失调也是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一[16]。PCDH10基因可上调Fas、Caspase 8蛋白的表达而促进胃癌细胞凋亡[10]。本研究也显示PCDH10基因可上调Fas蛋白表达。因此,PCDH10基因促进骨髓瘤细胞凋亡可能与Fas死亡受体相关。

综上所述,本研究显示,PCDH10基因在多发性骨髓瘤KM3细胞凋亡中起促进作用,且参与调节Bcl-2、P53和Fas凋亡相关蛋白的表达,从而进一步表明了PCDH10基因在多发性骨髓瘤的发生、发展中具有重要作用,且其可能通过下调Bcl-2,上调P53、Fas等凋亡相关蛋白而促进骨髓瘤细胞凋亡。然而PCDH10促进骨髓瘤细胞凋亡的精确分子作用机制还未阐明,有待于更深入的实验研究。此外,PCDH10基因是否通过其他途径促进骨髓瘤细胞凋亡仍需进一步的研究证明。

参考文献:

[1] Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L, *et al*. Study of specific genetic and epigenetic variables in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(12): 2270-2274.

[2] Berand K C, Mack S C, Northcott P A, *et al*. PCDH10 is a candidate tumour suppressor gene in medulloblastoma[J]. Childs Nerv Syst, 2011, 27(8): 1243-1249.

[3] Ying J, Li H, Seng T J, *et al*. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation[J]. Oncogene, 2006, 25(7): 1070-1080.

[4] Li Z, Chim J C, Yang M, *et al*. Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(2): 298-305.

[5] Li Y, Yang Z S, Song J J, *et al*. Protocadherin-10 is involved in angiogenesis and methylation correlated with multiple myeloma[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(4): 704-710.

[6] Li Z, Li W, Xie J, *et al*. Epigenetic inactivation of PCDH10 in human prostate cancer cell lines[J]. Cell Biol Int, 2011, 35(7): 671-676.

[7] Li Z, Xie J, Li W, *et al*. Identification and characterization of human PCDH10 gene promoter[J]. Gene, 2011, 475(1): 49-56.

[8] Yu B, Yang H, Zhang C, *et al*. High-resolution melting analysis of PCDH10 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers[J]. Neoplasma, 2010, 57(3): 247-252.

[9] Wang K H, Liu H W, Lin S R, *et al*. Field methylation silencing of the protocadherin 10 gene in cervical carcinogenesis as a potential specific diagnostic test from cervical scrapings[J]. Cancer Sci, 2009, 100(11): 2175-2180.

[10] Yu J, Cheng Y Y, Tao Q, *et al*. Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2009, 136(2): 640-651.

[11] 李颖, 陈建斌, 宋君君, 等. 甲基化修饰致PCDH10基因在多发性骨髓瘤中沉默[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 817-820.

[12] Reed J C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994, 124(1/2): 1-6.

[13] Chen Q, Ray S, Hussein M A, *et al*. Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(7): 1209-1214.

[14] Zhang B, Gojo I, Fenton R G. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma[J]. Blood, 2002, 99(6): 1885-1893.

[15] Saha M N, Jiang H, Yang Y, *et al*. Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30215.

[16] Villa-Morales M, Santos J, Perez-Gomez E, *et al*. A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas[J]. Cancer Res, 2007, 67(11): 5107-5116.

(**收稿**:2013-10-21;**修回**:2013-11-19)

(编辑 王 红)