DOI:10.16016/j.1000-5404.202104054

靶向抑制 DNAJC1 基因对多发性骨髓瘤细胞凋亡和增殖的影响

杨碧慧[1],胡国瑜[1],沈婵娟[1],陈祯祯[1],陈海梅[1],刘 钊[2] 412007 湖南 株洲,湖南省株洲市中心医院:血液科[1],重症医学科[2]

[摘要] **目的** 研究 DNAJC1 基因对多发性骨髓瘤细胞增殖及凋亡的影响,初步探讨其作用机制。**方法** 将 DNAJC1-siRNA 及阴性对照 siRNA 转染人多发性骨髓瘤细胞株 U266,利用 RT-qPCR 及 Western blot 验证 DNAJC1 基因干扰效果,CCK-8 检测 DNAJC1 基因对 U266 细胞增殖的影响,流式细胞仪检测其对细胞凋亡的影响。RT-qPCR 及 Western blot 检测 U266 细胞中 PTEN mRNA 及蛋白表达。**结果** 干扰组 DNAJC1 基因 mRNA 及蛋白表达明显降低,U266 细胞的增殖明显受抑,抑制率为(58.95±8.13)%,与阴性 siRNA 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。干扰组细胞凋亡率为(44.95±6.06)%,明显高于阴性 siRNA 组[(3.91±0.38)%]及对照组[(3.97±0.43)%,$P<0.05$]。与阴性 siRNA 组相比,干扰组 PTEN 的 mRNA 及蛋白表达明显升高($P<0.05$)。**结论** 靶向抑制 DNAJC1 基因可促进多发性骨髓瘤细胞的凋亡,抑制其增殖,这种作用可能是通过上调 PTEN 水平来实现的。

[关键词] DNAJC1 基因;多发性骨髓瘤;细胞凋亡;细胞增殖;PTEN
[中图法分类号] R394.3; R73-362; R733.3 [文献标志码] A

Influence of targeted inhibition of DNAJC1 gene on apoptosis and proliferation in multiple myeloma cells

YANG Bihui[1], HU Guoyu[1], SHEN Chanjuan[1], CHEN Zhenzhen[1], CHEN Haimei[1], LIU Zhao[2] [1]Department of Hematology, [2]Department of Critical Care Medicine, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou, Hunan Province, 412007, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of DNAJC1 gene on the proliferation and apoptosis of multiple myeloma cell lines and preliminarily investigate its mechanism. **Methods** DNAJC1-siRNA and its negative control (siRNA) were transfected into human multiple myeloma cell line U266 respectively. The interference efficiency was determined by RT-qPCR and Western blotting, and cell proliferation and apoptotic rate were measured with CCK-8 assay and flow cytometry, respectively. In addition, RT-qPCR and Western blotting were also used to examine the mRNA and protein expression of PTEN in U266 cells. **Results** The mRNA and protein levels of DNAJC1 were downregulated in the interference group. The proliferation of U266 cells was inhibited significantly in the interference group, with an inhibitory rate of (58.95±8.13)%, apparently higher than that of the negative siRNA group ($P<0.05$). The apoptotic rate was (44.95±6.06)% in the interference group, which notably exceeded that of the negative siRNA group [(3.91±0.38)%] and the control group [(3.97±0.43)%] ($P<0.05$). The mRNA and protein levels of PTEN were significantly increased in the interference group ($P<0.05$). **Conclusion** Targeted inhibition of DNAJC1 gene can

[基金项目] 湖南省技术创新引导计划-临床医疗技术创新引导项目(2018SK52805)
[通信作者] 刘 钊,E-mail:372289013@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

promote the apoptosis and inhibit the proliferation in multiple myeloma cells, which may be mediated by up-regulation of PTEN.

[**Key words**] DNAJC1 gene; multiple myeloma; cell apoptosis; cell proliferation; PTEN

Supported by the Guidance Project for Clinical Medical Technology Innovation of Hunan Provincial Technology Innovation Guidance Plan (2018SK52805).
Corresponding author: LIU Zhao, E-mail: 372289013@qq.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)是一种克隆浆细胞异常增殖的恶性疾病,在很多国家是血液系统第2位常见恶性肿瘤[1]。尽管目前随着免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、CD38单克隆抗体等新药的问世,多发性骨髓瘤的治疗取得了重大的进展,但均存在复发的概率,迄今为止仍被认为是不可治愈的疾病[2]。因此,探索MM的发病机制,寻找有效的治疗手段具有重要意义。研究表明多发性骨髓瘤的发生、发展与多种癌基因过表达及抑癌基因失活密切相关,但目前对其发生、发展的分子机制尚不完全清楚。

DNAJC1与HSP40(热休克蛋白40)具有高度同源性,别名HTJ1、MTJ1、ERdj1、DNAJL1,是一种富含于微粒体和核片段中的跨膜蛋白,位于10p12.31,相对分子质量为64×10^3,在DNA的连接和蛋白的相互作用中发挥重要作用,并且属于一种转录因子,参与转录调节[3-4]。DNAJC1已被发现与多种肿瘤相关,可以通过调控肿瘤细胞的增殖及凋亡促进肿瘤的发生。CCLE数据库结果显示DNAJC1基因在多发性骨髓瘤细胞中的表达明显升高(http://www.broadinstitute.org/ccle/home)。并且将多发性骨髓瘤细胞株KAS6/1给予去甲基化药物处理后,多种抑癌基因的表达量增加,而包含DNAJC1在内的癌基因表达量下降,提示DNAJC1可能通过甲基化途径参与MM的发生[5]。DNAJC1在葡萄糖调节蛋白78(GRP78)转运至细胞表面与α2-巨球蛋白[α2-Macroglobulin(α2M*)]结合的过程中起着关键作用[6]。已知细胞表面GRP78与α2-巨球蛋白的相互作用可以激活ERK1/2、p38-MAPK、PI3K,并通过PI3K/Akt和NF-κB信号通路调节细胞增殖[7-8]。

综上所述,我们推测DNAJC1作为促癌基因参与多发性骨髓瘤的发生。为证实这一推测,本研究选择人MM细胞株U266为研究对象,应用siRNA降低人MM细胞株U266细胞中DNAJC1基因的表达,以探讨DNAJC1基因对U266细胞增殖及凋亡的影响,为下一步阐明DNAJC1基因在MM发生中的作用提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

包括:DNAJC1-siRNA、阴性siRNA、转染试剂riboFECT CP Transfection Kit(锐博生物);RPMI1640、胎牛血清(美国Gibco公司);RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、定量PCR试剂盒(Tiangen公司);总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(Beyotime公司);兔抗人DNAJC1抗体(英国Abcam公司);兔抗人PTEN抗体(美国Immunoway公司);兔抗人GAPDH多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(Mengbio公司);DNAJC1、GAPDH及PTEN上下游引物(日本TaKaRa公司);人MM细胞株U266细胞(Dowobio公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U266细胞复苏后,采用含10%胎牛血清及青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL)的RPMI-1640培养基,37 ℃、5%CO_2饱和湿度的培养箱中培养。2~3 d传代1次。取对数期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组及细胞转染 实验分为3组,对照组:未转染干预的U266细胞;阴性siRNA组:转染阴性siRNA的U266细胞;DNAJC1-siRNA组:转染DNAJC1-siRNA的U266细胞。取对数生长期的U266细胞,转染前24 h,按6×10^5/mL接种到6孔细胞培养板,用120 μL 1×riboFECT™CP Buffer稀释1.25 μL 20 μmol/L siRNA储存液,轻轻混匀。然后加入12 μL riboFECT™CP Reagent,轻轻吹打混匀,室温孵育0~15 min,制备成转染复合物。将转染复合物加入到适量无双抗完全培养基中,轻轻混匀将培养板置于37 ℃的CO_2培养箱中,培养72 h后,收集细胞。

1.2.3 RT-qPCR检测mRNA表达 转染后72 h,收集各组细胞,提取总RNA,逆转录为cDNA,进行定量PCR扩增反应,每组设3个复孔。DNAJC1上游引物:5′-ATTCCCGTCGTGTTCAAAG-3′,下游引物:5′-ACCTGATGCCCTATTACTC-3′,257 bp;GAPDH上游引物:5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′,下游引物5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′,132 bp;PTEN上游引物:5′-ATGACAGCCATCATCAAA-3′,下游引物:5′-TCAGACTTTTGTAATTTGTG-3′,216 bp。扩增条件为:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性5 s,62 ℃退火30 s,共进行40个循环。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算DNAJC1 mRNA的相对表达量。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达 转染后72 h,收集各组细胞,按照文献[9]操作方法进行Western

blot 检测。分别加入 1∶1 000 兔抗人 DNAJC1 抗体、1∶1 000 兔抗人 PTEN 抗体和 1∶2 000 兔抗人 GAPDH 抗体。ECL 化学发光法显色。以 GAPDH 为内参,Quantity One 软件分析灰度值。

1.2.5　CCK-8 检测细胞增殖　　转染后 72 h,收集细胞,调整细胞密度为 5×10^3/100 μL 于 96 孔板中。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,细胞培养箱内作用 2 h,在酶标仪 450 nm 波长处测定光密度值[$D(450)$]。细胞抑制率=[1−$D(450)_{实验组}$]/ $D(450)_{对照组}$×100%。

1.2.6　流式细胞仪检测细胞凋亡　　转染后 72 h,收集各组细胞,进行 Annexin V-FITC/PI 双染标记,采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3　统计学分析

实验数据均为计量资料,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 统计软件,2 组以上均数比较用单因素方差分析,组间两两均数比较用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

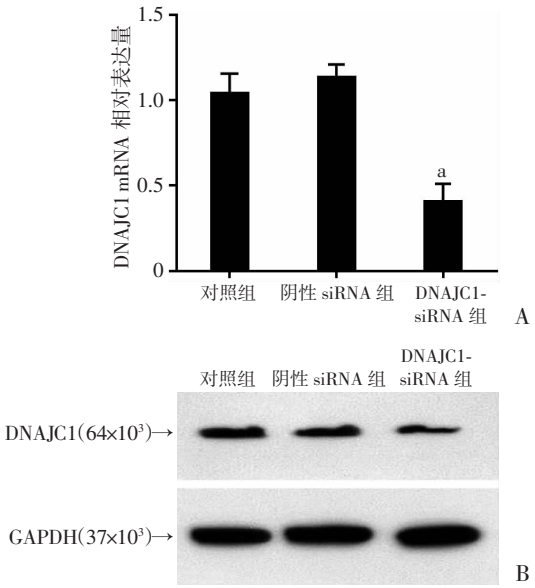
2　结果

2.1　DNAJC1 基因的干扰效果

RT-qPCR 检测结果显示:DNAJC1-siRNA 能有效降低 DNAJC1 mRNA 表达,而对照组和阴性 siRNA 组之间的表达无明显差异(图 1A);Western blot 检测结果显示:DNAJC1-siRNA 组相对于阴性 siRNA 组 DNAJC1 蛋白表达明显下降(0.30±0.02 *vs* 0.49±0.05,$P<0.05$),而对照组(0.49±0.03)和阴性 siRNA 组之间蛋白水平无明显差异(图 1B)。

2.2　干扰 DNAJC1 基因在体外对 U266 细胞生长的影响

CCK-8 检测结果显示:DNAJC1-siRNA 转染组细胞增殖变缓,生长明显受到抑制,其抑制率与阴性 siRNA 组比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。



A:RT-qPCR 检测 DNAJC1 mRNA 表达($n=3$)　a:$P<0.05$,与阴性 siRNA 组比较;B:Western blot 检测 DNAJC1 蛋白表达

图 1　DNAJC1-siRNA 干扰效果验证

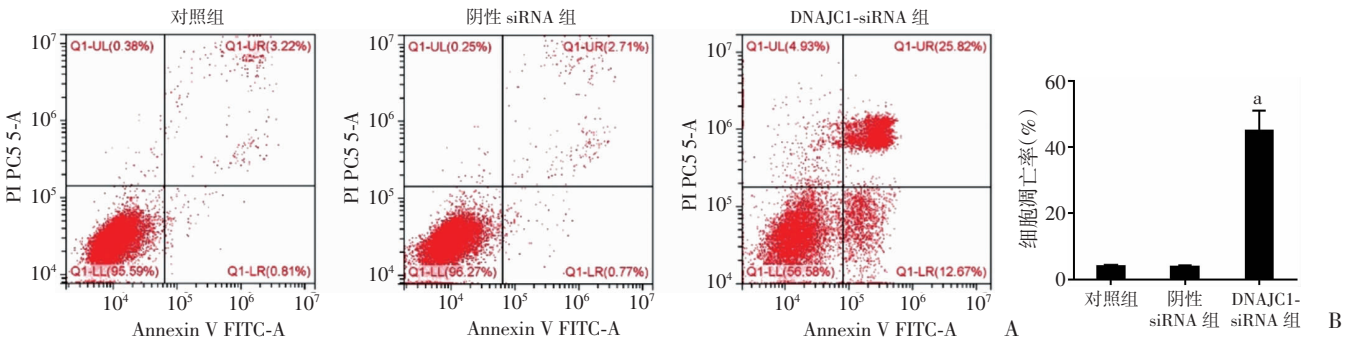
表 1　DNAJC1 基因干扰对 U266 细胞体外增殖的影响($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

组别	$D(450)$值	抑制率(%)
对照组	1.01±0.08	0
阴性 siRNA 组	0.90±0.02	9.82±2.29
DNAJC1-siRNA 组	0.41±0.06	58.95±8.13[a]

a:$P<0.05$,与阴性 siRNA 组比较

2.3　干扰 DNAJC1 基因在体外对 U266 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示:DNAJC1-siRNA 组细胞凋亡率[(44.95±6.06)%]增加,明显高于阴性 siRNA 组[(3.91±0.38)%]及对照组[(3.97±0.43)%],说明干扰 DNAJC1 可诱导 U266 细胞凋亡($P<0.05$,图 2)。

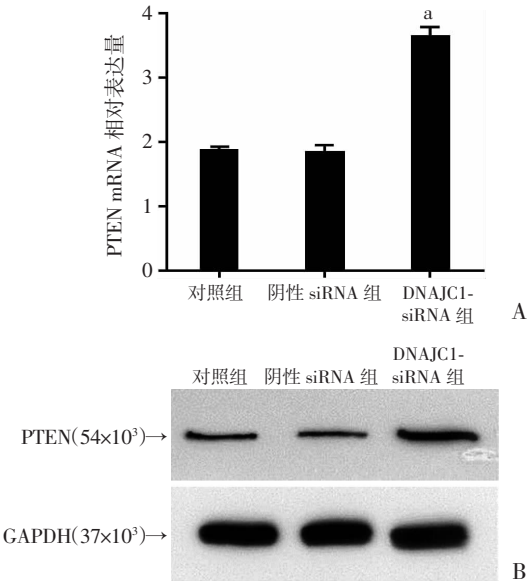


A:流式细胞仪检测各组细胞凋亡;B:各组细胞凋亡率($n=3$)　a:$P<0.05$,与阴性 siRNA 组比较

图 2　DNAJC1 基因干扰在体外对 U266 细胞凋亡的影响

2.4　DNAJC1 基因对 U266 细胞抑癌基因的影响

RT-qPCR 检测结果显示:DNAJC1-siRNA 组 U266 细胞内 PTEN 的 mRNA 表达明显高于阴性 siRNA 组,差异有统计学意义($P<0.05$),而对照组和阴性 siRNA 组间无明显差异(图 3A)。Western blot 检测结果显示:DNAJC1-siRNA 组 U266 细胞内 PTEN 的蛋白表达明显高于阴性 siRNA 组,差异有统计学意义(0.36±0.02 *vs* 0.18±0.01, $P<0.05$),而对照组(0.19±0.01)和阴性 siRNA 组间蛋白水平无明显差异(图 3B),提示 DNAJC1 基因可能通过调节 PTEN 的表达,从而导致 MM 细胞生物学行为的异常。



A:RT-qPCR 检测 PTEN mRNA 表达($n=3$)　a:$P<0.05$,与阴性 siRNA 组比较;B:Western blot 检测 PTEN 蛋白表达

图 3　DNAJC1 基因对 U266 细胞抑癌基因 PTEN 表达的影响

3　讨论

研究报道,DNAJC1 与胃癌、乳腺癌、卵巢癌等的发病密切有关[10-12]。2008 年,有研究发现 DNAJC1 基因在 MDS 的 $5q^-$ 综合征患者中表达增高,可能参与 MDS 尤其是 $5q^-$ 综合征的发生[13]。后来 MULAW 等[14]又发现在 CALM/AF10+髓系白血病患者的 10p12 区域 DNAJC1 基因的表达增高,并推测 DNAJC1 可能与 CALM/AF10 融合基因共同促进白血病的发生。近年来,利用高通量测序技术发现 DNAJC1 在 MM 患者中表达增高,可能成为 MM 发病机制及靶向药物开发的候选基因[15]。GRP78 是一种内质网上的多功能钙结合蛋白,在内质网蛋白质合成、内质网稳态维持、细胞信号控制、细胞生存等多方面起着关键作用,GRP78 可参与细胞表面信号转导,调控细胞凋亡,也可参与细胞内质网应激反应,GRP78 参与蛋白质在内质网的正确折叠和转运过程中需依靠腺苷三磷酸酶(ATP)去磷酸化释放的能量。DNAJC1 作为 GRP78 的分子伴侣,能刺激 GRP78 的 ATP 活性,并在 GRP78 转运至细胞表面与受体结合的过程中发挥重要作用[16]。在肿瘤细胞表面高表达的 GRP78 可分泌到细胞外,分泌的 GRP78 结合到内皮细胞的细胞表面受体,通过 PI3K/Akt 途径调节肿瘤细胞的增殖和存活[17]。在前列腺癌中,沉默 DNAJC1 的表达可逆转 $\alpha2M^*$ 的诱导作用,最终影响前列腺癌细胞的增殖和凋亡[18]。PTEN 是 PI3K/Akt 通路的主要负调控因子,主要是通过其脂质磷酸酶活性作用于 PI3K 的下游靶分子 PIP3,从而阻断 PI3K/Akt 信号通路来实现其抑癌作用。PTEN 表达的高低与多种血液系统恶性肿瘤密切相关,通过 GRP78、PTEN 双基因条件性敲除小鼠模型发现:GRP78 的降低主要是因为 PTEN 在骨髓中的缺失降低了 PI3K/Akt 的活性,并能有效抑制白血病的发生[8,19]。在多个多发性骨髓瘤细胞株中已经发现,有 PTEN 基因的突变或大片段缺失,并且证实 PTEN 在多发性骨髓瘤的发生、发展中起重要作用[20-21]。

本研究选用多发性骨髓瘤 U266 细胞株作为研究对象,靶向抑制 U266 细胞 DNAJC1 基因的表达,利用 RT-qPCR 及 Western blot 验证干扰效果,结果显示:DNAJC1-siRNA 转染组 DNAJC1 mRNA 及蛋白表达较阴性 siRNA 组明显降低,干扰效果明显。进一步研究发现:转染 DNAJC1-siRNA 的 U266 细胞较阴性 siRNA 组体外生长明显减缓,细胞凋亡明显增加。以上结果说明 DNAJC1 基因可能通过影响细胞的凋亡而促进 MM 细胞生长。这与 DNAJC1 基因在其他肿瘤中的报道基本一致,提示 DNAJC1 基因在肿瘤细胞的生物学行为过程中发挥了促癌基因的作用。为进一步研究 DNAJC1 影响 U266 细胞生物学行为的机制,本研究对 DNAJC1 表达下调后 PTEN 表达水平进行检测,发现 DNAJC1 基因表达降低的同时,PTEN 表达升高。因此推测在多发性骨髓瘤中 DNAJC1 基因可能通过影响 GRP78 转运至细胞表面与受体的结合,从而激活 PTEN/PI3K/Akt 通路而发挥促增殖作用,有待在后续研究中进一步验证。

综上所述,本研究结果表明 DNAJC1 基因促进 U266 细胞生长,抑制其凋亡,这种作用可能是通过上调 PTEN 水平来实现的。为进一步研究 DNAJC1 基因在多发性骨髓瘤发生中的作用奠定了实验基础。

参考文献:

[1] WANG S, XU L, FENG J, *et al*. Prevalence and incidence of multiple myeloma in urban area in China: a national population-based analysis[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1513. DOI:10.3389/fonc.2019.01513.

[2] RAJKUMAR S V. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management [J]. Am J Hematol, 2020, 95(5): 548-567. DOI: 10.1002/ajh.25791.

[3] BLAU M, MULLAPUDI S, BECKER T, *et al*. ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(11): 1015-1016. DOI:10.1038/nsmb998.

[4] DUDEK J, GREINER M, MÜLLER A, *et al*. ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic Reticulum [J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(11): 1008-1014. DOI:10.1038/nsmb1007.

[5] POMPEIA C, HODGE D R, PENG B, *et al*. Epigenetic up-regulation of gene expression in KAS 6/1 human multiple myeloma cells[J]. Cancer Genom Proteom, 2004, 1(5/6): 387-406.

[6] MISRA U K, GONZALEZ-GRONOW M, GAWDI G, *et al*. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling[J]. J Immunol, 2005, 174(4): 2092-2097. DOI: 10.4049/jimmunol.174.4.2092.

[7] LEE A S. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(4): 263-276. DOI:10.1038/nrc3701.

[8] WEY S, LUO B, TSENG C C, *et al*. Inducible knockout of GRP78/BiP in the hematopoietic system suppresses Pten-null leukemogenesis and AKT oncogenic signaling[J]. Blood, 2012, 119(3): 817-825. DOI: 10.1182/blood-2011-06-357384.

[9] 杨碧慧,张玉琳,王利,等. SPAG6 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及其对 SKM-1 细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报,2015,37(5):474-479. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408199.
YANG B H, ZHANG Y L, WANG L, *et al*. Construction of lentiviral vector for SPAG6 RNA interference and its influence on apoptosis of SKM-1 cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(5): 474-479. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408199.

[10] PHAROAH P D, TSAI Y Y, RAMUS S J, *et al*. GWAS meta-analysis and replication identifies three new susceptibility loci for ovarian cancer[J]. Nat Genet, 2013, 45(4): 362-370. DOI:10.1038/ng.2564.

[11] SHI J, SUNG H, ZHANG B, *et al*. New breast cancer risk variant discovered at 10q25 in East Asian women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(7): 1297-1303. DOI:10.1158/1055-9965.epi-12-1393.

[12] JUNG J J, JEUNG H C, CHUNG H C, *et al*. *In vitro* pharmacogenomic database and chemosensitivity predictive genes in gastric cancer[J]. Genomics, 2009, 93(1): 52-61. DOI:10.1016/j.ygeno.2008.08.002.

[13] WANG L, FIDLER C, NADIG N, *et al*. Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays[J]. Haematologica, 2008, 93(7): 994-1000. DOI:10.3324/haematol.12603.

[14] MULAW M A, KRAUSE A, DESHPANDE A J, *et al*. CALM/AF10-positive leukemias show upregulation of genes involved in chromatin assembly and DNA repair processes and of genes adjacent to the breakpoint at 10p12[J]. Leukemia, 2012, 26(5): 1012-1019. DOI:10.1038/leu.2011.307.

[15] CARRASCO D R, TONON G, HUANG Y, *et al*. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients[J]. Cancer Cell, 2006, 9(4): 313-325. DOI:10.1016/j.ccr.2006.03.019.

[16] CHEVALIER M, RHEE H, ELGUINDI E C, *et al*. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(26): 19620-19627. DOI:10.1074/jbc.m001333200.

[17] CASAS C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection[J]. Front Neurosci, 2017, 11: 177. DOI: 10.3389/fnins.2017.00177.

[18] MISRA U K, MOWERY Y M, GAWDI G, *et al*. Loss of cell surface TF Ⅱ-Ⅰ promotes apoptosis in prostate cancer cells stimulated with activated α_2-macroglobulin[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(6): 1685-1695. DOI:10.1002/jcb.23083.

[19] ZHANG J, GRINDLEY J C, YIN T, *et al*. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention[J]. Nature, 2006, 441(7092): 518-522. DOI:10.1038/nature04747.

[20] GE N L, RUDIKOFF S. Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth *in vivo*[J]. Oncogene, 2000, 19(36): 4091-4095. DOI:10.1038/sj.onc.1203801.

[21] HYUN T, YAM A, PECE S, *et al*. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas[J]. Blood, 2000, 96(10): 3560-3568. DOI: 10.1182/blood.V96.10.3560.

(**收稿**:2021-04-09;**修回**:2021-05-18)

(编辑 栾 嘉)