

下调 TSG101 基因对人急性髓性白血病细胞的调节作用

刘丽华* 张宏卫¹ 弭忠祥²

(绍兴文理学院医学院分子诊断实验室, 绍兴 312000; ¹绍兴文理学院医学院附属医院神经内科, 绍兴 312000;

²绍兴文理学院生命科学院, 绍兴 312000)

摘要 构建肿瘤易感基因 101(TSG101)基因的小干扰 RNA 载体并将其转入 HL-60 细胞, 获得稳定转染的阳性克隆后, 应用 RT-PCR 和 Western 印迹进行鉴定; MTT 法和流式细胞仪检测细胞转染前后生长速度和细胞周期的变化; DNA 梯带(ladder)法和流式细胞仪检测细胞对顺铂诱导的凋亡的变化; Western 印迹检测耐药相关蛋白 P-gp 和 MRP 的表达变化。结果表明, 成功构建了 TSG101 的小干扰 RNA 载体; 经蛋白质水平检测证实成功建立了稳定的 TSG101 低表达的白血病细胞模型; 转染 TSG101 小干扰 RNA 后的细胞生长速度显著减慢, 出现 G₁ 期阻滞; 对顺铂的敏感性明显增强, 形成 DNA 条带, 且低表达 P-gp。因此, 下调 TSG101 基因能抑制 HL-60 细胞生长, 增加细胞对化疗药物的敏感性, 并提示该基因具有进行白血病基因治疗的可行性。

关键词 白血病; TSG101; RNA 干扰

白血病的发生发展是一个多基因、多因素和多步骤的复杂过程, 它们之间存在相互依赖又相互制约的调节关系。肿瘤易感基因 101(TSG101)定位于染色体 11p15.1-p15.2^[1], 其编码蛋白 TSG101 含有多个功能结构域, 参与真核生物的多种代谢过程。如果 TSG101 表达异常, 就会通过调控其他基因的表达引起系列反应, 可能在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2,3]。本实验以白血病细胞 HL-60 为对象, 探讨了 TSG101 的小干扰 RNA 对白血病细胞的生长和药物敏感性的作用及其可能的分子机制, 为以 TSG101 作为靶目标进行白血病的基因治疗打下了一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人急性髓性白血病细胞系 HL-60 引自美国典型培养物保存中心(ATCC); mU6pro 载体为美国 Michigan 大学医学院 Tumer 教授赠送; T4 DNA 连接酶, 各种限制性内切酶购于 TaKaRa 公司; 脂质体转染试剂 LipofectAMINE2000 购于美国 Invitrogen 公司; RPMI1640, G418 购自 Gibco 公司; RNA 抽提试剂盒购自上海华舜公司; 鼠抗人的 TSG101, MRP 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; 鼠抗人 P-gp 单克

隆抗体为 Boehringer Mannheim Biochemica 公司产品; HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为武汉博士德产品; β 肌动蛋白单克隆抗体、DNA 标准、低分子量蛋白质标准、MTT、PVDF 膜、Western 印迹发光试剂盒购于 Sigma 公司。

1.2 TSG101 siRNA 载体的构建

根据 GenBank 中 TSG101 基因的已知序列设计其 siRNA 的序列: 上游引物: 5'-tttgaggattgtccagt-gaggttacaaacctcactggaacaatcctttt-3', 下游引物: 5'-ctagaaaaaggattgtccagt-gaggtttgtaacctcactggaacaatc-3'。上述序列用 BLAST 软件进行同源分析证实为 TSG101 高度保守后, 由 Sangon 公司合成。退火后, 以 BbsI 和 XbaI 酶切 mU6pro 质粒, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收线性化载体, 将退火产物和回收产物定量后于 16 °C 连接 16 h, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌。37 °C 培养 12~18 h。挑选单克隆扩增后进行酶切鉴定和 DNA 测序。

1.3 细胞培养与转染

HL-60 细胞常规培养于 10% RPMI1640 培养液中。G418 筛选浓度的确定: 消化 HL-60 细胞, 接

收稿日期: 2005-11-21 接受日期: 2006-04-19

浙江省自然科学基金资助项目(No.302301)

* 通信作者。Tel: 0575-8345045, Fax: 0575-8320053, E-mail:

li9544@sina.com

种于 6 孔板(2×10^5 个/孔)。G418 按 100、200、300、400、500、600、700、800 mg/L 的终浓度加入各孔细胞, 观察细胞生长状况, 以第 8 天细胞全部死亡的最低浓度为筛选浓度。确定筛选浓度为 300 mg/L。

取对数生长期 HL-60 细胞, 接种于 6 孔板(5×10^5 个/孔), 在 5%CO₂ 培养箱中过夜, 直至细胞 80% 饱和。1 ml RPMI1640 培养液中加入 10 μ g 质粒(分别加入重组质粒 mU6pro-TSG101, 空载体 mU6pro)振荡混匀, 加入 lipofectinAMINE 脂质体悬液 10 μ l, 室温温育 15 min。弃去培养基, 用无血清培养基洗两次, 逐滴缓慢加入预先制备的质粒 DNA/脂质体复合液, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中温育 5 h 后, 补充 1 ml 20% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液, 继续培养。30 h 后改用含 500 mg/L G418 的培养液筛选, 挑取阳性克隆并进行扩增培养。设立 mU6pro 空载体转染细胞作为对照。阳性克隆株分别命名为 HL-60-siRNA 和 HL-60-mU6pro 细胞, 以 RT-PCR 和 Western 印迹进行鉴定。

1.4 RT-PCR

用 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA 并定量, 取 10 μ g 的总 RNA 和 4 μ l Oligo dT₍₁₅₎ 进行反转录, 于 70 $^{\circ}$ C 10 min 后置于冰上, 再依次加入 10 μ l 5 $\times$ 缓冲液, 2 μ l dNTP, 1 μ l AMV, 1 μ l RNasin, 无核酸去离子水补至 50 μ l, 42 $^{\circ}$ C 温育 2 h 后冰冻保存。常规进行 PCR 反应, 反应引物: TSG101: 5'-cggaattcgatcggtggtgcggaga-3' 和 5'-gctctagatgaggtcactgagaccggca-3'; β 肌动蛋白, 5'-agcgggaaatcgtagcgtg-3' 和 5'-cagggtacatggtgtgcc-3'。将 PCR 反应产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外线灯下观察并照相。

1.5 Western 印迹

按分子克隆方法提取细胞总蛋白, 经 Bradford 分析方法定量, 各组取 60 μ g 总蛋白进行 12%SDS-聚丙烯酰胺电泳, 并转印到 PVDF 膜上, 用 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Tween20 封闭非特异性抗原, 和一抗于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。次日 TBST 洗膜, 羊抗小鼠 IgG- 过氧化物酶 1:5 000 稀释, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, TBST 洗膜后 ECL 荧光显色。

1.6 细胞生长曲线(MTT 实验法)

将细胞计数后以每孔 3×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每个样本设 3 个复孔。将培养板移入 CO₂ 培养箱中, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度条件下

培养, 隔日取一块板, 每孔加入 20 μ l MTT 溶液, 继续温育 4 h, 吸弃孔内培养液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 15 min, 使结晶充分溶解, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸收值, 记录结果。以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.7 流式细胞仪分析细胞周期

取指数生长期的实验细胞和未转染、转染空载体的对照细胞各约 1×10^6 个, 经胰酶消化成单细胞悬液, PBS 洗一次, 700 ml/L 冷乙醇固定, 用 DAPI 进行染色, 细胞于流式细胞仪(Becton Dickinson)进行细胞周期定量分析。所有检测重复 3 次。细胞增殖指数(PI)计算公式: $PI = (S + G_2) / (S + G_2 + G_1)$ 。

1.8 膜联蛋白/PI 染色法

取对数生长期转染细胞接种于 6 孔板(10^6 个/孔), 当细胞生长达 80% 饱和时, 加入含 10 μ g/ml 顺铂(CDDP)的培养基。继续培养 36 h 后, 加入 5 μ l 膜联蛋白 V-FITC 于含 1.5 mmol CaCl₂ 的细胞培养液中, 37 $^{\circ}$ C 温育 10 min; 收集和重悬细胞后, 加入 5 μ l PI 染液, 于 4 $^{\circ}$ C 温育 10 min; 流式细胞仪分析。按下列公式计算细胞的凋亡指数: 细胞凋亡指数 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 DNA 梯带(ladder)

取对数生长期转染细胞接种于 6 孔板(10^6 个/孔), 当细胞生长达 80% 饱和时, 加入含 10 μ g/ml 顺铂(CDDP)的培养基。继续培养 36 h 后提取 DNA 梯带, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外线灯下观察并照相。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 8.0 统计分析软件进行方差分析与卡方检验。

2 结果

2.1 TSG101 siRNA 表达载体的构建和鉴定

本研究根据 GenBank 提供的 TSG101 基因 cDNA 序列, 设计合成发夹样 TSG101 siRNA, 采用 DNA 重组技术, 将互补的双链 TSG101 siRNA 定向亚克隆入 mU6pro 真核表达载体, 转化连接子, 提取真核表达质粒。由图 1 可见所构建的载体经 XbaI 和 HindIII 双酶切鉴定后正确释放出大约 400 bp 片段, 而酶切后释放的大片断与空载体酶切片断大小一致, 表明载体构建成功。进一步 DNA 序列分析证实与已知的核酸序列完全吻合(图略)。

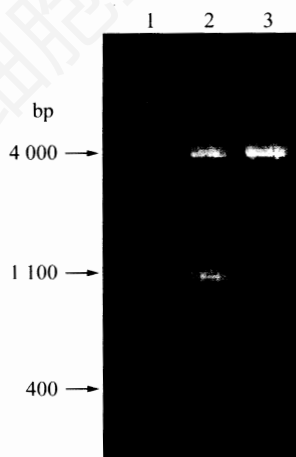


图1 TSG101 siRNA 表达载体的酶切鉴定

1: DNA 标准; 2: mU6pro 载体; 3: TSG101 siRNA 载体。

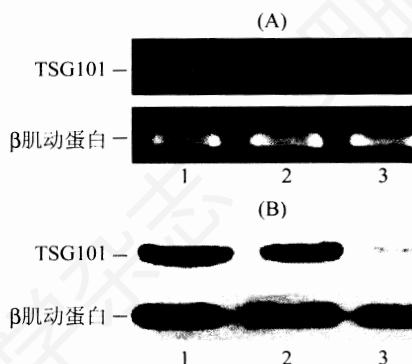


图2 RT-PCR(A)和 Western 印迹(B)鉴定 TSG101 低表达的细胞模型

1: HL-60 细胞; 2: HL-60-mU6pro 细胞; 3: HL-60-siRNA 细胞。

2.2 TSG101 低表达的细胞模型的建立

G418 筛选转染细胞 4 周后获得稳定克隆株。经 RT-PCR 和 Western 印迹鉴定(图 2), TSG101 在 HL-60-siRNA 细胞中的表达比对照细胞 HL-60-mU6pro 明显降低, 说明成功建立了 TSG101 低表达的细胞模型。

2.3 细胞生长曲线

以培养第 1~8 天的细胞 A_{490} 值作图, 绘制细胞生长曲线。如图 3 所示, HL-60-siRNA 和对照细胞 HL-60-mU6pro 相比, 细胞增殖受到抑制, 细胞生长速度显著减慢。

2.4 细胞周期分析

流式细胞仪分析结果显示, HL-60 细胞 G_1 期、 G_2 期、S 期所占比例及细胞增殖指数分别为 48.6%、26.1%、25.3% 和 0.514; HL-60-mU6pro 细胞上述 4 项指标依次为: 53.4%、18.3%、28.3% 和 0.466; HL-60-siRNA 细胞上述 4 项指标依次为 68.7%、11.8%、

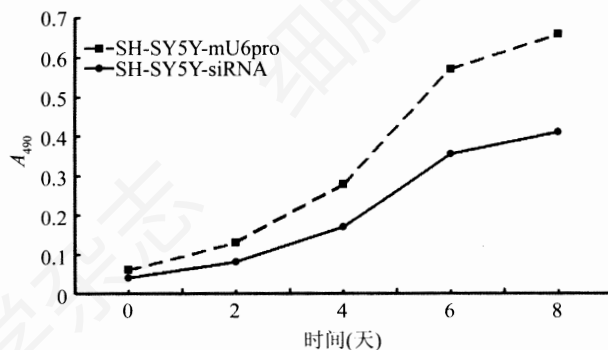


图3 转染细胞的生长曲线图

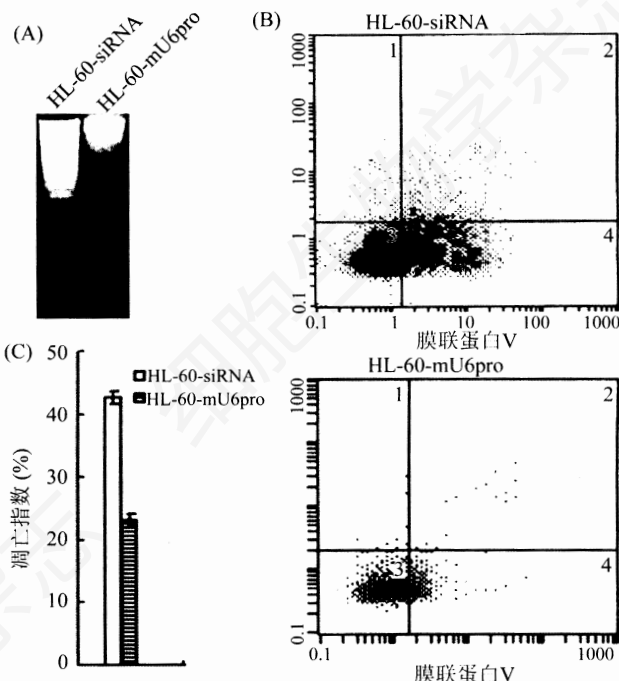


图4 TSG101 siRNA 对顺铂诱导的凋亡的影响

(A)DNA 梯带试验检测细胞凋亡; (B)流式细胞仪技术检测细胞凋亡; (C)HL-60-siRNA 细胞的凋亡率明显高于 HL-60-mU6pro 细胞。

19.5% 和 0.313; 该结果证实, TSG101 下调后的细胞生长数明显减少、速度减慢, 导致 G_1 期比例增多, S 期比例减少。

2.5 TSG101 下调增强 HL-60 细胞的药物敏感性

将转染细胞用 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 处理 36 h, 用流式细胞仪检测它们的凋亡水平, 结果见图 4。与转空载体的细胞相比, TSG101 下调后凋亡细胞数明显增多(43% vs 21%), 而且细胞出现明显的梯状条带, 细胞的药物敏感性增强, 抗凋亡能力下降。

2.6 Western 印迹

如图 5 所示, MRP 在转染的细胞中表达没有差异性, 而 P-gp 在 HL-60-siRNA 细胞中的表达明显下降, 说明 TSG101 siRNA 可以抑制 P-gp 的表达。

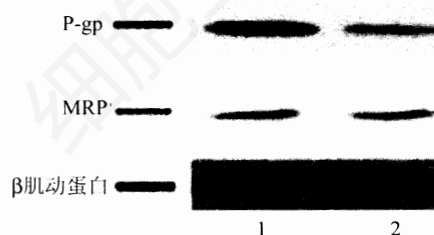


图5 Western印迹检测细胞中P-gp和MRP的表达

1: HL-60-mU6pro; 2: HL-60-siRNA。

3 讨论

TSG101 基因于 1997 年克隆成功。序列分析显示, TSG101 包括 N 端泛素结合酶 E2 样结构域、脯氨酸富含区域、亮氨酸拉链结构和 C 端卷曲螺旋结构域^[2-4]。研究证明, TSG101 参与真核生物的多种代谢过程, 如细胞内的泛素化过程、内体蛋白的运输、调节转录和细胞增殖^[5-8]。最新研究揭示, 应用反义核酸技术下调前列腺癌和乳腺癌细胞的内源性 TSG101 表达后, 细胞的生长受到明显抑制, 且集落形成能力及细胞迁移能力下降^[9], 提示 TSG101 可能与肿瘤的发生发展密切相关。本实验构建了 TSG101 的小干扰 RNA 载体并将其转导入白血病细胞 HL-60, 筛选出 TSG101 低表达的稳定的白血病细胞模型后, 对细胞的生长和药物敏感性的进行对比分析, 为深入探讨 TSG101 与白血病发生发展的关系, 探讨新的基因治疗方法打下理论基础。

HL-60 细胞高表达 TSG101, 是研究细胞增殖和凋亡的良好模型。为了探讨 TSG101 的表达对 HL-60 细胞的作用, 我们选择了 RNA 干扰技术沉默此基因的表达。RNA 干扰造成的基因抑制效率更高、特异性更好, 以致于可以和基因剔除相媲美, 但其较基因剔除简便、快速、经济, 因此具有广阔的应用前景^[10-12]。mU6pro 载体包含一个 U6 启动子, 可转录 siRNA, 被广泛应用于建立针对不同基因的 siRNA 载体^[13]。本实验成功制备了 TSG101 的小干扰 RNA 真核表达载体, 并利用 RT-PCR 和 Western 印迹, 发现 TSG101 在 HL-60-siRNA 细胞中的表达比对照细胞 HL-60-mU6pro 明显降低, 从功能角度说明成功建立了稳定低表达 TSG101 的 HL-60-siRNA 细胞亚系^[14]。

细胞周期的监控机制——检测点, 是细胞基因组完整性的重要保证。控制进入 S 期的检测点(G₁ 期检测点), 可防止 DNA 受损的细胞进入 S 期的 DNA 复制; 该检测点功能的减弱, 将导致遗传的不稳定性、受损细胞的存活和复制或细胞遗传物质的改编, 突变基因累积的细胞多步骤进化, 最终成为失控性生长的肿瘤细胞。降低 TSG101 的表达可导致 HL-60 细胞生长速度减慢, DNA 合成修复功能降低, 导致 G₁ 期比例增多, S 期比例减少, 提示 TSG101 在 G₁ 期检测点可能起重要调控作用。

凋亡是多种抗癌药物发挥作用的一个共同途径, 能耐受抗癌药物诱导凋亡的细胞最终形成了对化疗药物耐药。基于此点, 本研究检测了细胞经 CDDP 处理后凋亡水平的变化, 发现 TSG101 下调后, 细胞对 CDDP 诱导凋亡的抵抗力降低。P-gp 是属于 ABC(ATP binding cassette family)超家族成员的膜蛋白, 具有能量依赖性“药泵”功能, 能使细胞内药物转出细胞外, 造成细胞内药物浓度下降, 细胞毒作用降低或完全丧失, 细胞由此获得 P-gp 介导的 MDR, 此为经典的多药耐药途径。Western 印迹显示, 抑制 TSG101 的表达后, P-gp 的表达也降低, 说明 TSG101 小干扰 RNA 可能通过下调 P-gp 的表达在一定程度上增强 HL-60 细胞的药物敏感性。

综上所述, TSG101 可能通过调节细胞周期信号途径而抑制白血病细胞生长, 通过调节 P-gp 表达增加细胞对顺铂的敏感性, 提示 TSG101 基因具有较好的临床应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Li L *et al. Cell*, 1997, **88**: 143
- [2] Koonin EV *et al. Nat Genet*, 1997, **16**:330
- [3] Ponting CP *et al. J Mol Med*, 1997, **75**: 467
- [4] Feng GH *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 1736
- [5] Oh H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 15863
- [6] Katzmann DJ *et al. Cell*, 2001, **106**: 145
- [7] Krempler A *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 43216
- [8] Wagner KU *et al. Mol Cell Boil*, 2003, **23**: 150
- [9] Zhu G *et al. Int J Cancer*, 2004, **109**: 541
- [10] Hannon GJ. *Nature*, 2002, **418**: 244
- [11] Tavernarakis N *et al. Nat Genet*, 2000, **24**: 180
- [12] Aoki Y *et al. Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003,**30**: 96
- [13] Hong L *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321**: 611
- [14] Du J *et al. Int J Cancer*, 2005, **113**: 213

Effects of Downregulating TSG101 on the Phenotype of Human Leukemia Cells

Li-Hua Liu*, Hong-Wei Zhang¹, Zhong-Xiang Mi²

(Laboratory of Molecular Diagnosis, Medical College, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; ¹Department of Neurology, Affiliated Hospital of Medical College, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China;

²College of Life Sciences, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

Abstract The small interfering RNA eukaryotic expression vector specific to human TSG101 gene was constructed by gene recombination, then transfected into HL-60 cells. Stable transfectants were obtained by G418 screening and further identified by RT-PCR and Western blot analysis. The growth curve was made using MTT assay. Cell cycle distribution of the transfected cells was studied by flow cytometry and the proliferous indexes were calculated. The apoptosis after CDDP treatment was detected by DNA ladder and annexin V/propidium iodide binding analyses. The expressions of P-gp and MRP were analyzed by Western blot. mU6pro-TSG101 siRNA was successfully constructed and transfected into HL-60 cells. Down-regulation of TSG101 could significantly suppress the proliferation of HL-60 cells with a G₁ cell cycle arrest, and enhance the sensitivity of HL-60 cells towards CDDP-induced apoptosis. The expressions of P-gp in transfected cells was decreased as compared with that of the control, while MRP not. Therefore, down-regulation of TSG101 could suppress the proliferation of HL-60 cells, and enhance the sensitivity of HL-60 cells to conventional chemotherapeutic agents to a degree, suggesting TSG101 could be used for gene therapy in future.

Key words Leukemia; TSG101; RNAi

Received: November 11, 2005 Accepted: April 19, 2006

This work was supplied by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.302301)

*Corresponding author. Tel: 86-575-8345045, Fax: 86-575-8320053, E-mail: li9544@sina.com