

RNA 干扰抑制 *nm23-M1* 基因表达对骨髓瘤 SP2/0 细胞增殖的影响

叶倩 陈科 骆明勇 董艳玲 王应雄 何俊琳*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室、遗传优生教研室, 重庆 400016)

摘要 建立 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 抑制 *nm23-M1* 基因表达的骨髓瘤 SP2/0 细胞株, 初步探讨 *nm23-M1* 基因对小鼠骨髓瘤细胞增殖的影响。针对 *nm23-M1* mRNA 序列设计 3 个小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列, 分别构建表达这 3 个序列及阴性对照序列的 pGenesil-1 重组质粒, 再转染小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞并经 G418 抗性筛选稳定表达细胞株。采用半定量 RT-PCR 及 Western 印迹检测 3 个重组质粒对 *nm23-M1* mRNA 及蛋白质表达的抑制效果, 然后用 MTT 法观察抑制 *nm23-M1* 表达对 SP2/0 细胞增殖的影响。结果显示, 设计的 3 条 siRNA 不同程度地特异抑制骨髓瘤 SP2/0 细胞 *nm23-M1* mRNA 及蛋白质的表达, 其中 siRNA-2 抑制作用最强, 其对 *nm23-M1* mRNA 和蛋白质的抑制率分别为 74.4% 和 62.1%; 且 siRNA-2 抑制 *nm23-M1* 基因表达后 SP2/0 细胞增殖受到明显抑制 ($P < 0.05$)。本研究成功构建了 pGenesil-1-*nm23-M1* siRNA 重组质粒, 筛选出稳定抑制 *nm23-M1* 基因表达的 SP2/0 细胞株, 提示抑制 *nm23-M1* 基因表达有抑制骨髓瘤细胞增殖的作用; 为进一步研究 *nm23* 基因的生物学功能及临床应用打下了基础。

关键词 *nm23-M1* 基因; 小干扰 RNA; RNA 干扰; 骨髓瘤

肿瘤转移抑制基因 *nm23* (*non-metastasis 23*) 是一个多功能基因, 参与了包括细胞运动与黏附、生长与分化以及细胞周期调控在内的多个生理过程。至今已发现人 *nm23* 基因家族中的 9 个亚型: *nm23-H1~nm23-H9*, 它们之间具有很大的同源性, 其编码的蛋白质与二磷酸核苷激酶 (nucleoside diphosphate kinase, NDPK) 的氨基酸序列具有高度同源性而具有 NDPK 活性, 但又各自具有不同的生物学功能。其中 *nm23-H1* 基因与肿瘤的关系最为密切, *nm23-H1* 基因在多种实体肿瘤中能抑制瘤细胞的转移和植入, 与预后呈正相关^[1]; 但在造血系统肿瘤研究中, *nm23-H1* 抑制造血细胞的分化成熟, 参与肿瘤的发生、发展过程, 与预后呈负相关^[2]。在造血祖细胞中 *nm23-H1* 有高表达, 而在骨髓和淋巴分化期间其表达下调^[3]; 与正常血细胞相比, *nm23-H1* 在多种血液系统恶性肿瘤中的表达量明显升高。在小鼠中, 与人类 *nm23-H1* 相对应的 *nm23-M1* 基因, 两者同源性高达 95%。本研究通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术沉默小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞中 *nm23-M1* 基因的表达, 观察 *nm23-M1* 基因 mRNA 及蛋白质表达水平的变化及其对骨髓瘤细胞生长增殖的影响, 为进一步探索 *nm23* 基因的生物学功能和利用 RNAi 技术抑制肿瘤

增殖提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

骨髓瘤 SP2/0 细胞株为本校病毒性肝炎研究所保藏; 质粒 pGenesil-1 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司; 感受态大肠杆菌 JM109、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、rTaq 聚合酶、DNA marker DL2000 等均购自大连 TaKaRa 公司; 少量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; M-MLV 逆转录酶、Tfx-20 转染试剂购自美国 Promega 公司; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; RPMI-1640 培养基、FBS 购自美国 HyClone 公司; G418 购自美国 Amresco 公司; 一抗为山羊抗 *nm23-H1* 抗体 (可用于小鼠 *nm23-M1* 及人 *nm23-H1* 的检测) 购自 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG 二抗、 β -肌动蛋白抗体、DAB 显色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; 寡核苷酸由上海生工生物工程技术服务有限公司

收稿日期: 2007-11-29 接受日期: 2008-02-20

国家自然科学基金资助项目 (No.30500054)

* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn

合成。

1.2 方法

1.2.1 小干扰RNA的设计和短发夹RNA转录模板DNA链的设计与合成 查询GenBank获得*nm23-M1*基因序列(NM_008704), 根据获得的基因序列应用Ambion网站提供的设计软件设计小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)靶序列, 并用Blast软件对选择的靶序列进行同源分析, 排除非特异性地抑制其他基因片段的可能, 筛选出3对特异的siRNA(19 nt), 分别命名为siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3。然后根据这3个siRNA设计出对应的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)转录模板DNA序列, 命名为shNM-312、shNM-674、shNM-981(序列见表1)。另将设计的siRNA序列顺序打乱, 并排除基因同源性设立阴性对照, 命名为NC。所有寡核苷酸由上海生工公司合成。

1.2.2 重组质粒构建和鉴定 采用的质粒为pGenesil-1, 插入位点为BamHI和HindIII酶切位点, 携带绿色荧光蛋白基因。将3对寡核苷酸模板链分别退火, 用T4 DNA连接酶将其分别连接到经BamHI和HindIII双酶切线性化质粒的pGenesil-1质粒上, 构建成pGenesil-1-*nm23-M1* siRNA重组质粒。将重组质粒转化感受态JM109大肠杆菌, 筛选卡那霉素抗性阳性克隆, 进行酶切鉴定正确后再经测序鉴定, 获得的重组质粒分别命名P₁、P₂、P₃和P_{NC}。

1.2.3 细胞培养和重组质粒的转染 骨髓瘤SP2/0细胞在含有10%FBS的RPMI-1640培养基于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。转染前1天, 将对数生长

期的SP2/0细胞接种于100 mm培养皿, 24 h内细胞融合达60%~70%时, 用4组重组质粒分别转染细胞。转染按照Tfx-20转染试剂说明书进行, 简要过程如下: 先倾去细胞原培养液, 加少量PBS漂洗细胞一次, 每皿再加入新鲜制备的Tfx-20/DNA混合液(6 ml RPMI-1640培养基、7.5 μg质粒DNA、45 μl Tfx-20), 37℃温育1 h后轻轻添加12 ml完全培养基混匀, 转染48 h后更换加入终浓度为300 μg/ml G418的选择性培养基进行稳定表达细胞株的抗性筛选, 每隔3天更换培养液1次, 约3周后得到4组阳性克隆细胞, 降低G418为150 μg/ml维持培养, 分别收集阳性克隆细胞做相关检测。

1.2.4 半定量RT-PCR检测nm23-M1 mRNA的表达 *nm23-M1*引物和β-肌动蛋白基因引物设计采用Primer Premier 5.0软件(Premier Biosoft International公司)(序列见表2)。Trizol法提取细胞总RNA, 逆转录为cDNA第一链, 以β-肌动蛋白基因为内参照来扩增*nm23-M1*基因。扩增条件为: 94℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 54℃退火45 s, 72℃延伸50 s, 25个循环后72℃延伸10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。用Bio-Rad凝胶成像分析系统对目的DNA条带进行扫描, 用Quantity One 4.4.0软件分析每条基因条带的光密度值。以*nm23-M1*基因与β-肌动蛋白内对照的光密度值比值表示*nm23-M1* mRNA的表达量, RNAi技术对*nm23-M1* mRNA表达的抑制率的计算方法为(1-实验组转染细胞*nm23-M1* mRNA表达量/对照组转染细胞*nm23-M1* mRNA表达量)×100%。实验重复3次。

表1 shRNA转录模板DNA序列

名称	序列
shNM-312	有义链: 5'-gatccCAGTGAGCGCACCTTCATTtcaagacgAATGAAGGTGCGCTCACTGttttgtcgaca-3' 反义链: 5'-agcttgtcgacaaaaCAGTGAGCGCACCTTCATTcgtcttgaaAATGAAGGTGCGCTCACTGg-3'
shNM-674	有义链: 5'-gatccAGAGCGCAGAGAAGGAGATtcaagagaATCTCCTTCTGCGCTCTttttgtcgaca-3' 反义链: 5'-agcttgtcgacaaaaAGAGCGCAGAGAAGGAGATtctcttgaaATCTCCTTCTGCGCTCTg-3'
shNM-981	有义链: 5'-gatccTCTGAGTGGACAGAATGTAttcaagacgTACATTCTGTCCACTCAGAtttttgtcgaca-3' 反义链: 5'-agcttgtcgacaaaaTCTGAGTGGACAGAATGTAcgtcttgaaTACATTCTGTCCACTCAGAg-3'
NC	有义链: 5'-gatccGACTTCATAAGGCGCATGctcaagacgGCATGCGCCTTATGAAGTctttttgtcgaca-3' 反义链: 5'-agcttgtcgacaaaaGACTTCATAAGGCGCATGcgtcttgaaGCATGCGCCTTATGAAGTCg-3'

表2 PCR引物序列

基因	引物序列(5'→3')	PCR产物长度
<i>nm23-M1</i>	有义链: TGCTATGGTCTGGGAGGGTC 反义链: TCTCAGGGTGGTGGCTCA	556 bp
β-肌动蛋白	有义链: AGATCTGGCACACACCTTCTAC 反义链: TCAGGATCTTCATGAGGTAGTCT	330 bp

1.2.5 Western 印迹检测 *nm23-M1*/NDPK-A 表达的变化 按 RIPA 裂解液操作程序提取细胞总蛋白, Bradford 法进行总蛋白定量。将蛋白质等量上样 SDS-PAGE 分离, 采用半干转移系统将 PAGE 分离的蛋白质转到 PVDF 膜上。转膜后用含 5% 脱脂奶粉的 1×TBST 室温封闭 2 h, 再以 β -肌动蛋白为内参照, 加一抗 (1:400) 和 β -肌动蛋白一抗 4 °C 过夜, 二抗 (1:1 000) 室温反应 2 h, DAB 显色成像。用 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.4.0 软件分析 Western 印迹成像图, 获得各组细胞 *nm23-M1*/NDPK-A 的相对表达值。实验重复 3 次。

1.2.6 MTT 法检测 RNAi 抑制 *nm23-M1* 基因表达对 SP2/0 细胞增殖活性的影响 收集对数生长期稳定转染 P₂ 和 P_{NC} 的两组细胞以 3×10⁴ 个/ml 的密度接种于 96 孔板, 每组设 5 个平行孔, 每孔 100 μ l。于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后每日进行 MTT 法测定。MTT 测定: 每孔加入 20 μ l 5 mg/ml MTT 溶液, 37 °C 继续温育 4 h, 弃去上清液, 再加 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 于酶标仪 570 nm 波长处测各孔吸光度值 (A 值), 连续测 6 天, 绘制细胞生长曲线图。实验重复 3 次。

1.2.7 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 11.5 统计软件处理数据, 采用方差分析组间差异的显著性。

2 结果

2.1 重组质粒鉴定

4 组重组质粒和空质粒分别经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定, 空质粒酶切后条带分别为 4.53 kb 和 364 bp, 构建成功的重组质粒则为 4.47 kb 和 428 bp, 符合 PGenes1-1 质粒及插入的 shRNA 片的特征。重组质粒测序结果表明, 针对 *nm23-M1* 的 shRNA 表达模板成功构建于 PGenes1-1 载体上, 序列完全正确。

2.2 稳定转染细胞建株

细胞转染质粒后经过 3 周抗性筛选, 在荧光倒置相差显微镜下观察转染细胞, 可见阳性克隆细胞形成明显的孤立细胞团, 且大量细胞发出明亮的绿色荧光, 说明携带绿色荧光蛋白基因的重组质粒 DNA 已整合到 SP2/0 细胞染色质上, 成功筛选得到稳定转染的细胞株 (图 1)。

2.3 *nm23-M1* mRNA 及 *nm23-M1*/NDPK-A 表达变化

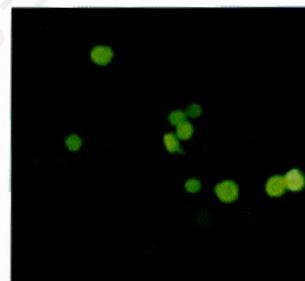


图 1 重组质粒稳定转染到骨髓瘤 SP2/0 细胞中发出绿色荧光 (200×)

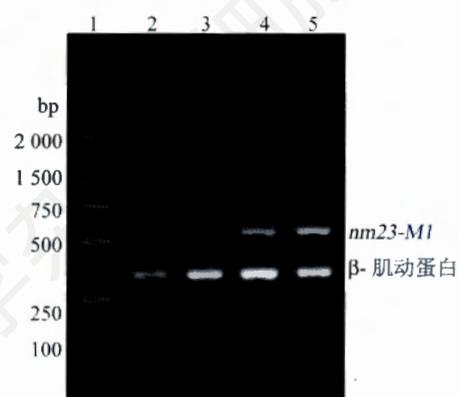


图 2 RT-PCR 检测 SP2/0 细胞 *nm23-M1* mRNA 表达变化: 1: DL2000 marker; 2: 转染 P₁; 3: 转染 P₂; 4: 转染 P₃; 5: 转染 P_{NC}。

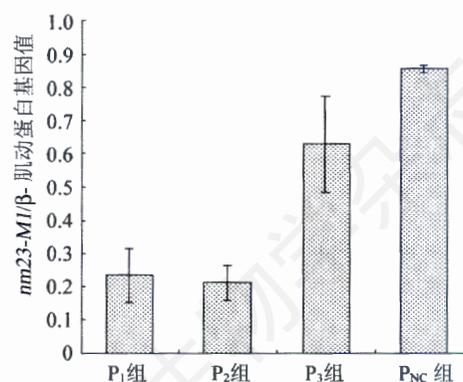


图 3 稳定转染重组质粒 P₁、P₂、P₃ 和 P_{NC} 的 SP2/0 细胞中 *nm23-M1* mRNA 表达的比较

RT-PCR 结果显示 (图 2、图 3), 阴性对照组 P_{NC} 的 *nm23-M1*/ β -肌动蛋白基因值为 0.86±0.01, 稳定转染 P₁、P₂、P₃ 的 SP2/0 细胞 *nm23-M1*/ β -肌动蛋白基因值分别为 0.24±0.08、0.22±0.05、0.63±0.15, P₁、P₂ 及 P₃ 组细胞中 *nm23-M1* mRNA 表达与阴性对照 P_{NC} 组比较均降低 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 72.1%、74.4% 和 26.7%。Western 印迹结果表明 (图 4、图

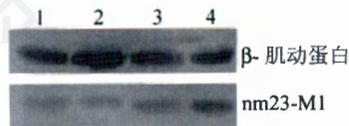


图4 Western印迹检测 nm23-M1/NDPK-A 在 SP2/0 细胞中的表达

1: 转染 P₁; 2: 转染 P₂; 3: 转染 P₃; 4: 转染 P_{NC}。

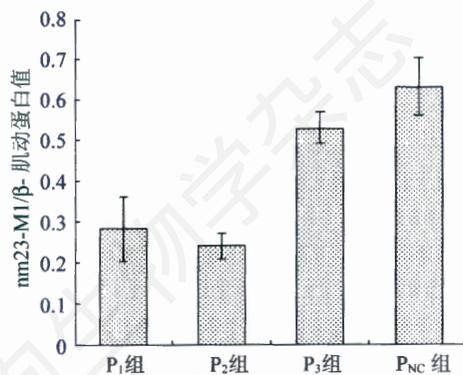


图5 稳定转染重组质粒 P₁、P₂、P₃ 和 P_{NC} 的 SP2/0 细胞中 nm23-M1/NDPK-A 表达的比较

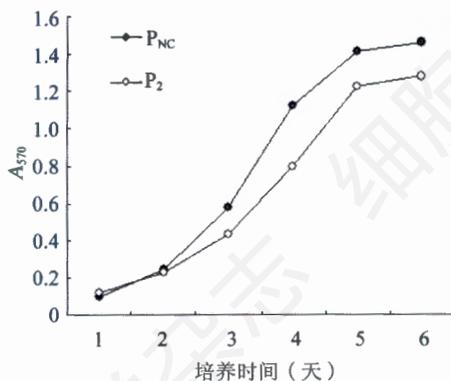


图6 MTT 法检测 RNAi 抑制 nm23-M1 基因表达对 SP2/0 细胞增殖的影响

5), 阴性对照组 P_{NC} 的 nm23-M1/β-肌动蛋白值为 0.63 ± 0.07 , 稳定转染 P₁、P₂、P₃ 的 SP2/0 细胞 nm23-M1/β-肌动蛋白值分别为 0.28 ± 0.08 、 0.24 ± 0.03 、 0.53 ± 0.04 , 在稳定转染 P₁、P₂、P₃ 的 SP2/0 细胞中 nm23-M1/NDPK-A 表达与阴性对照 P_{NC} 组比较均降低 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 55.4%、62.1% 和 16.3%。3 组重组质粒中 P₂ 对 SP2/0 细胞 nm23-M1 mRNA 及蛋白质表达的抑制效果最强。

2.4 RNAi 抑制 nm23-M1 基因表达对 SP2/0 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果见图 6, 经重复测量数据的两因素

方差分析, P₂ 实验组 (0.83 ± 0.04) 与 P_{NC} 对照组 (0.68 ± 0.04) 组间 $F = 7.67$, $P < 0.05$, 表明 P₂ 组与 P_{NC} 组相比细胞增殖能力有显著性差异, 转染重组质粒 P₂ 后对 SP2/0 细胞的增殖有明显抑制作用。

3 讨论

RNAi 是近几年发展起来在基因转录后水平上的基因阻断技术, 具有特异、有效的基因沉默效应, 是基因功能分析和基因治疗的有力工具。RNAi 常采用的策略主要有: 化学合成法、体外转录法和 shRNA 表达载体法等^[4]。前两种方法基因沉默时效短暂, 一般为 3~7 天, 难以满足一些特定实验的需求, 而 shRNA 特异性表达载体的发明为细胞内合成 siRNA 创造条件。shRNA 载体最大的优势是利用载体上的抗生素标记或通过病毒插入宿主基因组中从而建立相对稳定的长期基因沉默细胞株, 但构建 shRNA 表达载体相当麻烦费时。本研究首先从 nm23-M1 基因核苷酸序列中选取一系列靶序列, 合成双链发夹结构形成单位后, 将其克隆入 siRNA 特异性表达载体 pGenesil-1, 成功构建了 pGenesil-1-nm23-M1 siRNA 重组质粒, 并将重组质粒转染至 SP2/0 细胞中, 经过 G418 抗性筛选得到持续、稳定抑制 nm23-M1 基因表达的骨髓瘤 SP2/0 细胞株。虽然抗性筛选不是必要的, 但本研究发现其既能防止 shRNA 表达减弱而影响目的基因表达沉默的效果, 又能有效避免未转染细胞影响后继检测。而后应用 RT-PCR 和 Western 印迹进行 RNAi 抑制效率筛选, 选择其中一个具有最佳的 nm23-M1 基因表达抑制效果的 siRNA, 为后续研究打下了实验基础。

nm23 基因最初是作为一种肿瘤转移抑制基因被发现而备受关注的, nm23-H1 基因具有多种生物学功能, 目前仅有部分生物学功能得到了阐明。近年来对肿瘤的研究发现, 在乳腺癌、肝癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌等肿瘤中, nm23-H1 基因的缺失与肿瘤转移密切相关, 显示出它作为肿瘤转移抑制基因的特性^[5]; 在肺癌、前列腺癌、膀胱癌、骨肿瘤、子宫内膜癌等肿瘤中, nm23-H1 基因的表达水平、缺失与肿瘤转移似乎无关, 但却与肿瘤分化、增生和进展有关; 在神经母细胞瘤、白血病、恶性淋巴瘤等肿瘤中, 当其恶化或转移时 nm23-H1 的表达量反而增高, 其表达水平增高与癌细胞增殖、分化相关。Amrein 等^[6]发现 nm23-M1 基因的表达存在明显的组织差异性, 由此可以认为不同组织来源的肿瘤、相

同肿瘤组织不同的发展阶段, *nm23-M1* 基因表达水平及其所诱导的生物学效应具有组织特异性。还有研究表明, *nm23-H1* 除了与肿瘤侵袭转移过程密切相关, 还参与调控细胞信号传递、细胞的增殖、发育、分化等过程^[7-9]。在多种造血系统恶性肿瘤中 *nm23-H1* 都是过量表达的, *nm23-H1* 基因表达产物作为一种分化抑制因子或增殖相关蛋白起作用, 参与细胞的分化与增殖, 与造血系统肿瘤的发生、发展及预后有重要关系, 但其作用机制尚未完全阐明^[10]。

为进一步研究 *nm23* 基因功能, 本研究运用 RNAi 技术沉默骨小鼠髓瘤 SP2/0 细胞内源性 *nm23-M1* 基因表达后, 显示在一定程度上抑制了细胞增殖 ($P < 0.05$), SP2/0 细胞增殖速度减慢, 细胞体积增大, 且出现较多的退化细胞。结果提示, *nm23-M1* 基因在骨髓瘤细胞中的表达有促细胞增殖的作用, 初步证实 *nm23-M1* 基因在细胞的生长、分裂过程所起的重要作用, 这种正相关性也证实了该基因可作为一种骨髓瘤细胞增殖的标志物。分析其原因可能为: *nm23* 编码产物与 NDPK 高度同源, 并具有 NDPK 的活性。因此, *nm23-M1* 就可能通过与 NDPK-A 一致或相似的途径调节细胞的信号传递、细胞增殖分化等过程。当 *nm23-M1* 基因沉默后, 其蛋白质也相应地受到抑

制, 导致一个或多个信号转导途径中 GTP/GDP 的平衡改变; 或者相关蛋白和酶的结合特性改变, 从而阻止了 Rac/Rho 等信号转导途径的激活^[7,11], 使骨髓瘤细胞增殖受到抑制。但近年许多研究发现, *nm23-H1* 的多种生物学功能无法用 NDPK 的作用来解释, *nm23-H1* 基因如何参与肿瘤细胞的发生、发展, 调控细胞增殖、分化的机制, 还有待进一步研究。本研究初步探讨了 *nm23-M1* 基因在体外培养的骨髓瘤细胞中的生物学功能, 为进一步通过骨髓瘤动物模型在体内研究 *nm23-M1* 基因的作用及其机制打下了基础, 同时也为人 *nm23* 基因的生物学功能及其在造血系统肿瘤中作用机制的研究提供了参考。

参考文献(References)

- [1] Freije JM *et al. Biochem Soc Symp*, 1998, **63**: 261
- [2] Niitsu N *et al. Blood*, 2000, **96**: 1080
- [3] Willems R *et al. Exp Hematol*, 2002, **30**: 640
- [4] Shen WG *et al. Chin Med J (Engl)*, 2004, **117**: 1084
- [5] De La Rosa A *et al. Bioessays*, 1995, **17**: 53
- [6] Amrein L *et al. Cell Tissue Res*, 2005, **322**: 365
- [7] Postel EH. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**: 31
- [8] Lombardi D *et al. J Cell Physiol*, 2000, **182**: 144
- [9] Lombardi D *et al. J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**: 67
- [10] Okabe-Kado J *et al. Biochim Biophys Acta*, 1995, **1267**: 101
- [11] Roymans D *et al. Clin Exp Metastasis*, 2002, **19**: 465

The Effects of RNA Interference to *nm23-M1* Expression on Proliferation of Myeloma Cell Line SP2/0

Qian Ye, Ke Chen, Ming-Yong Luo, Yan-Ling Dong, Ying-Xiong Wang, Jun-Lin He*
(Laboratory of Reproductive Biology, Department of Genetics and Eugenics, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effects of *non-metastasis 23-M1 (nm23-M1)* gene on proliferation of myeloma cell, we established a myeloma cell line SP2/0 in which *nm23-M1* expression was suppressed by RNA interference (RNAi). Three small interfering RNAs (siRNA) targeting *nm23-M1* were designed, and three pGenesil-1 plasmids which could express these siRNAs and a negative control plasmid were constructed. Then the recombinant plasmids were transfected into mouse myeloma cell line SP2/0 that clones were selected by G418 in order to establish cell lines SP2/0 with stable expression of pGenesil-1-*nm23-M1* siRNA. The expression levels of *nm23-M1* mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. MTT was used to observe the effects of *nm23-M1* gene on proliferation of SP2/0 cells. The results showed three siRNAs could inhibit the expression of *nm23-M1* on mRNA and protein levels. Among them, siRNA-2 showed the strongest inhibition effect, with an inhibition rates of 74.4% and 62.1% for the expression of *nm23-M1* mRNA and protein respectively. And the proliferation of SP2/0 cells was obviously suppressed after transfection of siRNA-2 ($P < 0.05$). The study constructed pGenesil-1-*nm23-M1* siRNA recombination plasmids successfully and screened cell lines SP2/0 in which *nm23-M1* expression was inhibited stably. The findings suggested low expression level of *nm23-M1* in SP2/0 cells inhibited cell proliferation. It provides a basis for further researching the biological functions of *nm23-M1* and related clinical applications.

Key words *nm23-M1* gene; small interfering RNA; RNA interference; myeloma