

siRNA 分析 nm23-H1 基因与人慢性髓性白血病的关系 Analysis of The Relationship Between Nm23-H1 Gene and Human Chronic Myeloblastic Leukemia Using SiRNA

陈宇霞,张美英,熊 盛*,钱垂文,王一飞*

CHEN Yu-Xia, ZHANG Mei-Ying, XIONG Sheng*, QIAN Chui-Wen and WANG Yi-Fei*

暨南大学生物医药研究开发基地,广州 510632

Jinan Biomedicine Research & Development Basement, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 设计并筛选靶向 nm23-H1 基因的 siRNAs 序列,探讨 nm23-H1 基因与人慢性髓性白血病之间的关系;依据 siRNA 设计原则,设计 3 条 siRNA 序列。将不同靶点的 siRNA 用 lipofectamine2000 转染人慢性髓性白血病细胞株 K562。转染后 24h RT-PCR 检测 nm23-H1 mRNA 水平变化;转染后 48h 免疫细胞化学法检测 nm23-H1 蛋白表达。MTT 法检测转染后 24h、48h 和 72h 有效 siRNA 对 K562 细胞生长的影响;3 条 siRNA 中,siNM526 能有效地抑制 K562 细胞 nm23-H1 基因表达,转染 siNM526 的 K562 细胞生长受到抑制。说明下调 nm23-H1 基因的表达有抑制 K562 细胞增殖的作用,即降低了 K562 细胞的恶性程度。nm23-H1 基因有可能成为白血病治疗潜在的分子靶点。

关键词 nm23-H1 基因, siRNA, 人慢性髓性白血病, K562 细胞

中图分类号 R392.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)03-0403-05

Abstract To investigate the relationship between nm23-H1 gene and human chronic myeloblastic leukemia we designed siRNAs which target nm23-H1 gene. According to the principles of designing siRNA, we selected three siRNAs and transfected them into K562 cells by lipofectamine2000. The expression levels of nm23-H1 mRNA were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction after transfection for 24 hours. The expression levels of nm23-H1 protein were assayed by immunocytochemical method after transfection for 48 hours. And after transfection for 24, 48 and 72 hours, cell proliferation was determined by MTT method. Among the three siRNAs, siNM526 can effectively inhibit the expression of nm23-H1 on mRNA and protein levels. The growth of K562 cells was suppressed after transfection of siNM526. These results suggest that low expression level of nm23-H1 in K562 cells inhibited cell proliferation, namely reduced malignant degree of them. Therefore nm23-H1 gene might be a potential target of leukemia treatment.

Key words nm23-H1 gene, siRNA, human chronic myeloblastic leukemia, K562 cell line

nm23-H1 是 nm23 基因家族的成员之一,其编码的蛋白质为核苷二磷酸激酶 NDPK-A。nm23-H1 基因与肿瘤的关系非常密切,除参与调控肿瘤转移之外,还与细胞的增殖^[1-3]、分化^[4]及个体发育^[5]等有

Received: November 30, 2005; Accepted: February 17, 2006.

This work was supported by the grant from The National Natural Science Foundation of China (No. 30400071 and 30371661), The Science and Technology Cooperation Project of China and Australia (No. 2004-43) and The Programs for Industry Development of Guangdong Province (No. 2005A10904001).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85222706; Fax: 86-20-85222706-309; E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30400071 和 30371661)、中澳合作特别基金(国外科字 2004-43 号)和广东省工业攻关计划项目(No. 2005A10904001)资助。

关,另有研究表明 nm23-H1 基因表达有促进细胞凋亡和抗氧化作用^[6]。对大量临床病例的研究表明,在乳腺癌、结肠癌、肝癌、子宫癌和恶性黑色素瘤等癌症类型中,nm23-H1 基因的表达水平与癌症的恶性程度呈负相关^[7,8];但在白血病、恶性淋巴瘤等血液肿瘤中,nm23-H1 基因的表达却与恶性程度呈正相关,与病人的存活时间呈负相关^[9]。为探讨 nm23-H1 基因与白血病的关系,我们设计了靶向 nm23-H1 基因的 siRNA,瞬时转染人慢性髓性白血病细胞株 K562,观察沉默 nm23-H1 基因对 K562 细胞生长的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人慢性髓性白血病细胞株 K562,真核表达质粒 d2GFP,鼠抗人 nm23 单克隆抗体,酶标二抗(羊抗鼠 IgG)由本单位保存;TRIzol 试剂、脂质体 lipofectamine™ 2000 购于 Invitrogen 公司;相关 siRNA 由 Invitrogen 公司合成;RevertAid™ M-MuLV 反转录酶购自 Fermentas 公司;2 × Taq PCR Master Mix 购自北京天为时代科技有限公司;PCR 扩增引物由上海生物工程公司合成;免疫组化 SP9001 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品;Opti-MEM 无血清培养基为 Gibco 公司产品;MTT 粉剂为 Sigma 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 相关 siRNA 的设计:根据 siRNA 设计原则,设计并合成相关 siRNA:①在 mRNA 的编码区内选择 AA 起始的 21 ~ 23nt 的序列,尤其是启动子下游 75nt 的位置;②G 和 C 含量在 30% ~ 60% 之间;③反义链 5' 端弱结合,即反义链 5' 末端 4nt 的 GC 含量少于 3' 末端 4nt 的 GC 含量;④避免 GGG 的出现,以免影响 siRNA 的解链;⑤通过 BLAST 确保所选序列与其他相关基因没有同源性等。

表 1 相关 siRNA 序列

Construct	siRNA sequence
siNM80	5'-GAA CCA UGG CCA ACU GUG ATT-3' 5'-UCA CAG UUC GCC AUG GUU CTT-3'
siNM497	5'-CUC GUA GAU UAC ACG AGC UTT-3' 5'-AGC UCG UGU AAU CUA CCA GTT-3'
siNM526	5'-CUG GAU CUA UGA AUG ACA GTT-3' 5'-CUG UCA UUC AUA GAU CCA GTT-3'
Negative control	5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3' 5'-ACC UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'
siGFP	5'-GAA GCA GCA CGA CUU CUU CTT-3' 5'-GAA GAA GUC GUG CUG CUU CTT-3'

1.2.2 转染试验:K562 细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种于 12 孔板,每孔 1mL。培养 24h 后加各组试剂,设空白对照组、lipofectamine2000 对照组、d₂GFP 对照组、d₂GFP 加 siGFP 对照组和阴性对照组(Negative control),实验组包括 siNM80、siNM497 和 siNM526 组。置 37℃、饱和湿度及体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中无血清继续培养 5h,补加无双抗含 30% 胎牛血清的 1640 培养液 0.5mL。继续培养 24h 后,荧光显微镜下观察,RT-PCR 检测 nm23-H1 基因表达的变化;48h 后,免疫细胞化学法检测细胞中 NDPK-A 表达的变化。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 nm23-H1 基因表达的变化:

(1)RNA 提取:Trizol 法提取细胞总 RNA, BECKMAN DU 640 型核酸蛋白分析仪测定含量及纯度。

(2)逆转录反应:在 PCR 反应管中加入总 RNA 6μL 和 oligodT 1μL,70℃ 作用 5min 后置冰上;在冰浴条件下加入 5 × RT 缓冲液 4μL,2.5mmol/L dNTPs 8μL,37℃ 水浴 5min,最后加入 M-MuLV 逆转录酶 1μL,总体积为 20μL。42℃ 60min 后,70℃ 10min 灭活逆转录酶,4℃ 冷却。RT 产物放 -20℃ 保存备用。

(3)PCR 反应:取 RT 产物(cDNA)2μL,2 × Taq PCR Master Mix 10μL,上下游引物(20μmol/L)各 1μL,以 3dH₂O 补充至 20μL,置 PTC-200 型 PCR 仪进行扩增。PCR 条件为:94℃ 预变性 1min;随后 94℃ 变性 40s,56℃ 退火 40s,72℃ 延伸 40s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 4min。PCR 产物在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,通过 SynGene GeneGenius 凝胶成像分析系统分别测定各样本 nm23-H1 及 β-actin 条带的总灰度,并计算 nm23-H1/β-actin 值。

表 2 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 2 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
nm23-H1(186bp)	5'-TTAATCAGATGCTCGGGCAT-3' 5'-GATCTATGAATGACAGGAGG-3'
β-actin(545bp)	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

1.2.4 免疫细胞化学法检测细胞中 NDPK-A 表达的变化:按免疫组化 SP9001 试剂盒进行操作:(1)离心收集各组细胞,PBS 洗 3 次。(2)用适量 PBS 重悬细胞沉淀,涂片,室温晾至半干。(3)冷丙酮 4℃ 固定 10min,PBS 冲洗 3 次,自然干燥。(4)3% H₂O₂ 孵育 5min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min。(5)滴加正常山羊

血清工作液,室温孵育 15min,倾去,勿洗。(6)滴加鼠抗人 nm23 单克隆抗体,放湿盒中,4℃孵育过夜。(7)PBS 冲洗,3min × 3 次。(8)滴加酶标二抗,37℃孵育 1h。(9)PBS 冲洗,3min × 3 次。(10)DAB 显色剂显色。(11)自来水充分冲洗,观察,拍照。

1.2.5 MTT 法检测有效 siRNA 对 K562 细胞生长的影响: K562 细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。实验组和阴性对照组于接种细胞同时加入相同浓度的 siNM526 和 Negative control;空白对照组加入等体积的转染培养液。培养 24h 后每日进行 MTT 法测定。MTT 测定:加入 MTT 溶液 (5mg/mL) 20 μ L/孔,每组 4 复孔,37℃继续孵育 4h,1000r/min 离心 5min,弃去上清,再加 100 μ L 15% SDS 和 10 μ L 异丙醇,放置过夜,于 BIO-RAD 550 型酶标仪上 570nm 波长处测各孔 A 值(参比波长 630nm)。按下列公式计算生长抑制率:

$$\text{生长抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.2.6 统计学处理: 所有实验数据以均数 \pm 标准差表示,应用 SPSS 统计软件处理数据,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 半定量 RT-PCR 检测 nm23-H1 基因表达的变化

如图 1 所示,nm23-H1 基因扩增产物的大小为 186bp;内参照 β -actin 扩增产物的大小为 545bp。阴性对照组(Negative control)、lipofectamine 2000 对照组和空白对照组的 K562 细胞 nm23-H1/ β -actin 值分别为 0.90、0.91、0.89,转染 siNM80、siNM497、siNM526 的 K562 细胞 nm23-H1/ β -actin 值为 0.89($P > 0.05$)、

0.72($P > 0.05$)、0.31($P < 0.05$),经计算可得 siNM80、siNM497 和 siNM526 的抑制率分别为 1%、20%和 66%,3 条 siRNA 中 siNM526 对 K562 细胞 nm23-H1 基因表达的抑制效果最为明显。

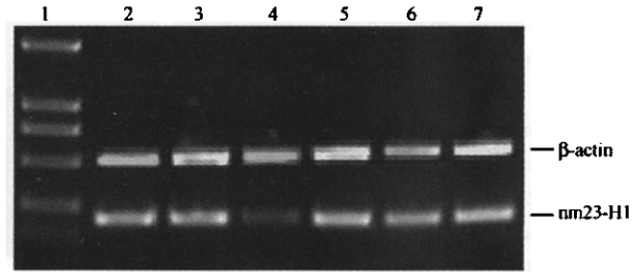


图 1 RT-PCR 检测 K562 细胞 nm23-H1 mRNA 表达的变化
Fig.1 Expression of nm23-H1 mRNA in K562 cells detected by RT-PCR

1: DL2000 markers; 2: transfected with siNM80; 3: transfected with siNM497; 4: transfected with siNM526; 5: transfected with Negative control; 6: control(added lipofectamine 2000); 7: untreated.

2.2 免疫细胞化学法检测细胞中 NDPK-A 表达的变化

如图 2 所示,经显色后,空白对照组和阴性对照组中阳性细胞占绝大部分,而转染 siNM526 组几乎看不到阳性细胞,说明转染 siNM526 组 K562 细胞中 NDPK-A 蛋白表达受到了非常明显的抑制。

2.3 转染 siNM526 对 K562 细胞生长的影响

2.3.1 转染 siNM526 对细胞形态的影响: 转染 siNM526 后 24h K562 细胞形态发生很大变化,如图 3 所示,空白对照组和阴性对照组 K562 细胞呈球形,胞体透亮,处于分裂期,生长快速;而在 siNM526 的作用下,K562 细胞出现较多退化的细胞及细胞碎片,细胞内部普遍出现黑色颗粒,胞体不再透亮。

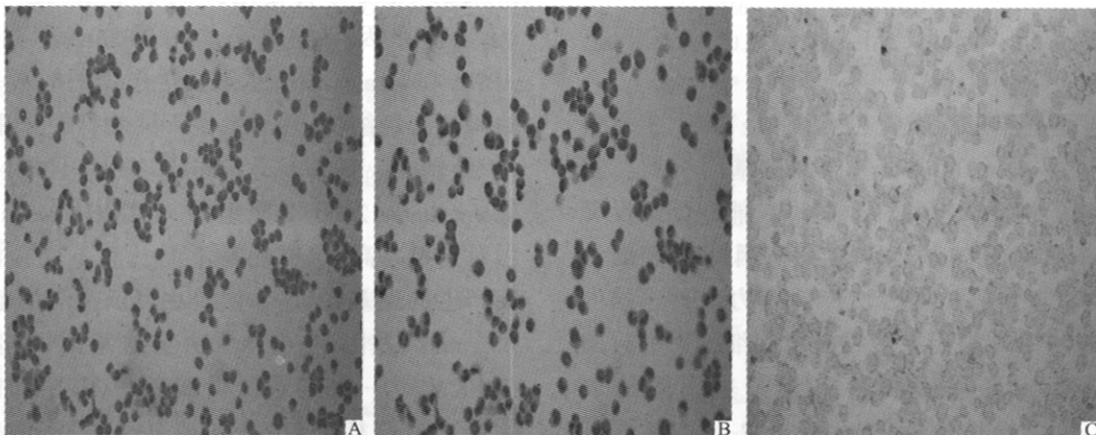


图 2 免疫细胞化学法检测 K562 细胞 NDPK-A 蛋白的表达($\times 200$)

Fig.2 Expression of NDPK-A protein in K562 cells detected by immunocytochemistry($\times 200$)

A: untreated; B: transfected with Negative control; C: transfected with siNM526.

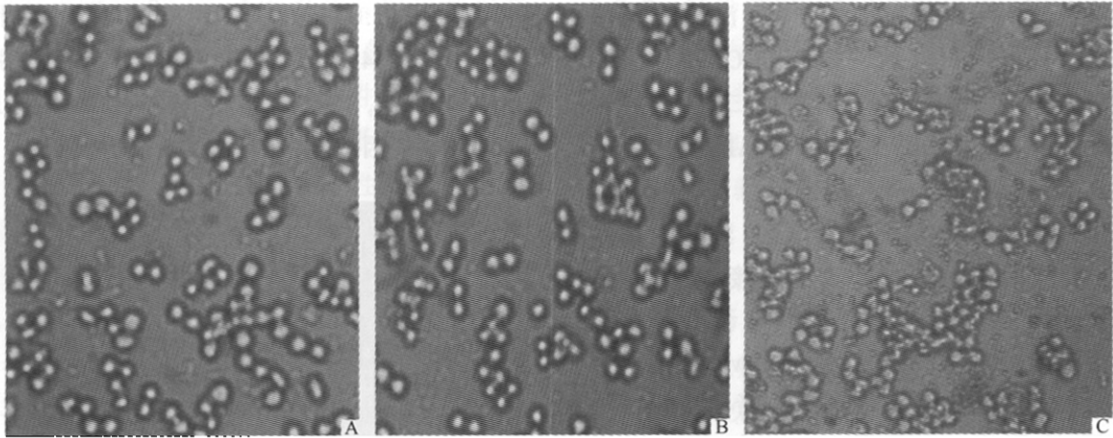


图3 倒置显微镜下观察转染前后 K562 细胞形态的变化(×100)

Fig.3 Morphological change of K562 cells observed by inverted microscope(×100)

A: untreated; B: transfected with Negative control; C: transfected with siNM526.

2.3.2 转染 siNM526 对细胞生长的抑制作用: MTT 法结果见图 4, 转染 siNM526 对 K562 细胞的生长有一定的抑制作用, 在转染后 24h、48h、72h 测得的吸光度值实验组与对照组相比均有统计学差异 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。转染 24h、48h、72h 的生长抑制率分别为 16.7%、26.1% 和 20.0%。

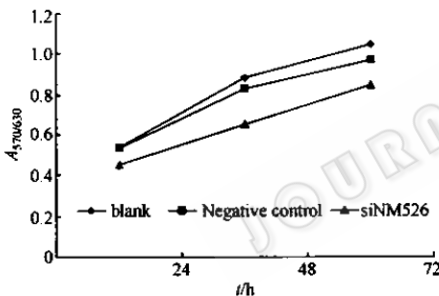


图4 MTT 检测转染 siNM526 对 K562 细胞生长的抑制作用

Fig.4 Inhibitory effect of siNM526 on the growth of K562 cells measured with MTT colorimetric assay

3 讨论

siRNA 是近年来的研究热点, 它是 21 ~ 23 个核苷酸的短双链 RNA, 可诱导转录后的基因沉默。它对靶序列特异性要求严格, 结构稳定, 能在低于反义核苷酸几个数量级的浓度下使靶基因降至极低水平, 是基因功能分析和基因治疗的有力工具。国内外已有报道 siRNA 被用在多种白血病细胞系中封闭癌基因、多药耐药基因和其它相关基因等的表达^[10-12]。例如, 慢性髓性白血病 9, 22 号染色体异位形成 bcr/abl 融合基因, 其编码的融合蛋白可干扰细胞增殖、黏附及细胞凋亡^[13]。Scherr^[14] 等将靶向 bcr/abl 基因的 siRNA 转入慢性髓性白血病患者原代

细胞和慢性髓性白血病细胞株中, 可降低细胞的 bcr/abl 蛋白表达, 细胞生长明显受到抑制。此外, 陈波斌^[15] 等设计并合成了两条抗 bcr-abl mRNA 的 siRNA, 并将其插入质粒 pSilencer1.0 U6 中得到重组子 pBCR6, 瞬时转染 K562 细胞。在转染后 48h、72h 检测到抗 bcr-abl mRNA 的 siRNA 表达载体可有效诱导 K562 细胞凋亡。这些结果均显示了 siRNA 有望成为慢性髓性白血病分子靶向治疗的一个新工具。

我们主要通过一些网站进行 siRNA 的设计, 如 <http://www.wi.mit.edu/res/res.html>。根据现在比较通用的原则, 可供选择的 siRNA 有 20 多条。再经过 blast 进行比较, 排除 antisense 链的 5' 端连续 8 个碱基与其他基因配对的 siRNA; 排除任何一段连续 14 个碱基与其他基因配对的 siRNA。最后, 经过优选获得 3 条 siRNA 进行实验。结果显示, 3 条 siRNA 中 siNM80 和 siNM497 的抑制效果不太明显, 而 siNM526 则较为明显地抑制了 nm23-H1 基因的表达, 分析原因可能由于作用的位点不同, 不同的 siRNA 在对 nm23-H1 基因发生作用的时候产生不同的局部二级结构, 进而发生不同的抑制作用。此外, 单独转染 Negative control 的阴性对照组和 lipofectamine 2000 对照组的 nm23-H1/β-actin 值比空白对照组略高, 这可能是不同孔和不同检测方法之间产生的误差, 但这个误差在可以接受的范围内。

nm23 基因是一个多功能的基因, 其蛋白产物 NDPK, 作为一种核苷二磷酸激酶, 首要功能是通过催化二磷酸核苷 (Nucleoside diphosphate, NDP) 和三磷酸核苷 (Nucleoside triphosphate, NTP) 之间的磷酸基转移反应来维持细胞内的 NTP 浓度。Roymans 等^[16] 指出 NDPK 主要通过 Rac/Rho 信号途径调控细

细胞的生长和运动。NDPK 可与 Tiam1 结合,封闭 Tiam1 的 GDP 交换功能,或者阻止 Src 与 Tiam1 结合,或者调节一些影响居间纤维磷酸化的蛋白复合物中的 GTP/GDP 平衡,最终阻止 Rac/Rho 途径的激活。本研究发现,转染了 siNM526 的 K562 细胞增殖减慢,细胞体积增大,出现有较多的退化细胞及细胞碎片,甚或细胞凋亡的表现。分析原因,可能是 siRNA 将 nm23-H1 基因沉默后,NDPK-A 蛋白的表达也相应减少,导致上述某一途径或多个途径中 GTP/GDP 的平衡改变,或者相关蛋白和酶的结合特性改变,阻止了这些途径的激活,从而使 K562 细胞增殖受到抑制。但到目前为止,还不清楚 NDPK 与其他蛋白复合物在结构上如何相互作用,也不清楚 NDPK 是仅仅起辅助作用,还是“开关”功能,其具体机制还有待进一步研究。

我们实验室早期研究中已初步证明 nm23-H1 基因在急性白血病细胞株中的过表达有促细胞增殖的作用,而用反义 RNA 封闭内源性 nm23-H1 基因表达则在一定程度上抑制细胞增殖、影响细胞形态和细胞周期分布^[17]。本研究的结果证实了 nm23-H1 基因表达与人慢性髓性白血病的正相关性,并从另一侧面证实了 nm23-H1 基因在细胞的生长、分裂过程所起的重要作用。而 nm23-H1 与白血病细胞株的这种正相关性也提示了 nm23-H1 基因有可能成为治疗白血病和淋巴瘤的一个有效分子靶点。

早有学者^[18]指出 siRNA 对靶基因的抑制效率明显高于反义核酸,与反义核酸相比,siRNA 用量更低,并且克服了反义核酸的一些缺点,如寡聚物易降解,细胞摄取效率低,寡聚物的非特异性结合,对 mRNA 的非特异性阻断等。化学合成的 siRNA 能快速地转入细胞中并且发生作用,但与此同时,化学合成的 siRNA 费用高,容易降解,仅瞬时表达,且其作用只能持续一周时间。为进一步长期稳定地进行机理研究,还需设计并构建相应的质粒,并通过稳定转染筛选能长期稳定抑制目标基因表达的细胞株。

REFERENCES(参考文献)

[1] Cipollini G, Berti A, Fiore L *et al*. Down-regulation of the nm23-H1 gene inhibits cell proliferation. *Int J Cancer*, 1997, **73**(2): 297 - 302

[2] Caligo MA, Cipollini G, Fiore L *et al*. nm23 gene expression correlates with cell growth rate and is S-phase dependent. *Int J Cancer*, 1995, **60**(6): 837 - 842

[3] Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**(1):31 - 40

[4] Lombardi D, Mileo AM. Protein interactions provide new insight into Nm23/nucleoside diphosphate kinase functions. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**(1):67 - 71

[5] Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A *et al*. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant Drosophila development. *Nature*, 1989, **342**(6246): 177 - 180

[6] Amendola R, Martinez R, Negroni A *et al*. DR-nm23 expression affects neuroblastoma cell differentiation, integrin expression, and adhesion characteristics. *Med Pediatr Oncol*, 2001, **36**(1):93 - 96

[7] Dela Rosa A, Williams RL, Steeg PS. nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *BioEssays*, 1995, **17**(1): 53 - 62

[8] Li XL, Wang YF. Recent advances in NM23 gene and the metastasis of breast carcinoma. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2003, **19**(3):418 - 422

[9] Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M *et al*. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2000, **96**(3): 1080 - 1086

[10] Yague E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multi drug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. 2004, **11**(14):1170 - 1174

[11] Tseng CP, Huang CL, Huang CH *et al*. Disabled-2 small interfering RNA modulates cellular adhesive function and MAPK activity during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *FEBS Lett*, 2003, **541**(13):21 - 27

[12] Cioca DP, Aoki Y, Kiyosawa K (2003) RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther*, 2003, **10**(2): 125 - 133

[13] Hu HY, Zhang H, He DM. Recent advances of siRNA in malignant blood diseases. *Foreign Sciences. Section of Pathophysiology and clinical Medicine*, 2004, **24**(5):413 - 416

[14] Scherr M, Battmer K, Winkler T *et al*. Specific inhibition of bcr/abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003, **101**(4):1566 - 1569

[15] Chen BB, Fan HH, Lin GW *et al*. Experimental study of k562 cell apoptosis induced by siRNA. *Chin J Hematol*, 2004, **25**(12):717

[16] Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR *et al*. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2002, **19**(6): 465 - 476

[17] Yuan Y, Wang YF, Zhang MY *et al*. Relationship between nm23-H1 gene expression and proliferation of HL-60 cells. *Journal of Jinan University (Medicine Edition)*, 2004, **25**(4):400 - 407

[18] Aoki Y, Cioca D, Oidaira H *et al*. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, **30**:96 - 102