

siRNA 对白血病细胞株 HEL 中 EDAG1 基因的干涉作用

周颖¹,程勇²,高宗侠¹,肖敏¹,冯定庆¹,沈国栋¹,凌斌¹

Effect of siRNA Targeting EDAG1 Gene in Leukemia Cell Line HEL

ZHOU Ying¹, CHEN Yong², GAO Zong-xia¹, XIAO Min¹, FENG Ding-qing¹, SHEN Guo-dong¹, LING Bin¹

1. Anhui Province Key Laboratory of Molecular Medicine, Molecular Medicine Research Center of Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 2. Department of Oncological Radiotherapy of Anhui Provincial Hospital

Corresponding Author: LING Bin, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

Abstract :Objective The purpose of this study is to explore the effects of silence of EDAG1 on the growth of leukemia cell line and its mechanism. **Methods** HEL was infected by the virus supernatant collected from packing cell line transfected by recombinant retroviral vector, the stable cell lines were selected with puromycin. The reduction of EDAG1 was inspected with RT-PCR; and proliferation was assayed with MTT. The tumor growth of the null mice was analyzed after injection HEL/ siRNA、HEL/ negative into the skin. **Results** The stable HEL cell lines with a persistent knockdown of EDAG1 were established. Comparison with HEL/ negative, the proliferation of HEL/ siRNA was inhibited significantly ($P < 0.05$), the growth of HEL/ siRNA implanted tumor slowed down significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of the expression of EDAG1 can reduce the proliferation of leukemia cell lines, suggesting that EDAG1 may be an effective target for the treatment of leukemia.

Key words: EDAG1; RNA interference; Leukemia; Cell apoptosis

摘要:目的 探讨抑制胚胎发育相关基因-1(EDAG1)的表达对白血病细胞株生长的影响及其机制。方法 收集重组质粒转染包装病毒细胞的上清转染 HEL 细胞株,经嘌呤霉素筛选稳定抑制 EDAG1 基因表达的细胞株,RT-PCR 检测 EDAG1 基因的抑制情况,运用 MTT 检测转染细胞的增殖能力,并将稳定转染的细胞株种植到裸鼠皮下检测成瘤情况。结果 成功建立了抑制 EDAG1 基因表达的 HEL 细胞株。与 HEL/negative 相比,HEL/ siRNA 细胞株增殖速度降低($P < 0.05$),接种裸鼠皮下的肿瘤生长明显减慢($P < 0.05$)。结论 沉默 EDAG1 基因的表达可以抑制白血病细胞株的增殖,提示 EDAG1 基因可能是白血病治疗的一个有效靶点。

关键词: EDAG1; RNA 干扰; 白血病; 细胞凋亡

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)10-0688-03

0 引言

胚胎发育相关基因-1(embryonic development-associated gene 1, EDAG1)是定位于 9q22 的造血系统分化相关基因^[1],研究发现 EDAG1 基因同时在多种造血系统肿瘤(尤其是红系和巨核系白血病细胞)中高表达,可能与血液肿瘤的发病有关,该基因的高表达通过激活调节核转录因子 NF- κ B 调节造血细

胞的增殖与分化^[2-4]。本文利用 RNA interference (RNAi) 干扰技术的高效性和特异性,用逆转录病毒载体直接在红系白血病细胞株 HEL 内表达特异性针对 EDAG1 基因的小分子干扰(small interfering RNA, siRNA),发现沉默 EDAG1 基因的表达可以有效抑制白血病细胞的增殖。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 逆转录病毒载体 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ 购自 BD 公司,重组质粒 EDAG1/ siRNA(针对 EDAG1 基因的特异寡核苷酸定向克隆入 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ,序列为 5'-GGA TCCGCTCCTAACACA TGCCAA GTTTC

收稿日期:2007-10-31;修回日期:2008-03-20

基金项目:安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006 KJ080C)

作者单位:1. 230001 合肥,安徽省分子医学重点实验室 安徽省立医院分子实验室; 2. 安徽省立医院肿瘤放疗科

通信作者:凌斌, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

作者简介:周颖(1975-),女,硕士,助理研究员,主要从事肿瘤免疫学研究

AA GA GAACTTGGCA TGTGTTA GGAG TTTT TACGCGTGAA TTC-3)、EDA G1/ negative(不能形成发夹结构的非特异序列定向克隆入 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ, 序列为 5-GGA TCCGTG CGTTGCTA GTACCAACTT CAA GAGA TTTT TTACGCGTGAA TTC-3) 由本室构建并鉴定。脂质体 Lipofect2000、总 RNA 提取试剂 Trizol、嘌呤霉素购自美国 Invitrogen 公司, 小剂量质粒提取试剂盒、逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司, 焦碳酸二乙酯 (DEPC)、聚凝胺 (Polybrene)、氯喹 (Chloroquine) 购自美国 Sigma 公司, TaqDNA 聚合酶购自华美生物工程有限公司, 上、下游引物由上海生物工程有限公司合成。细胞培养基 RPMI 1640、特级胎牛血清均购自美国 GIBCO 公司。细胞凋亡检测试剂盒 apoAlert Annexin V-FITC apoptosis kit 购自美国 BD clontech 公司。

1.1.2 细胞株 HEL 细胞株购自上海细胞所, 包装病毒细胞株 PT67 购自 BD 公司。稳定转染 EDA G1/ siRNA、EDA G1/ negative 的包装病毒细胞株 PT67 由本室构建^[1]。培养液均含有 100mg/L 的氨苄青霉素和链霉素, 37、5% CO₂ 饱和湿度下培养。

1.2 方法

1.2.1 重组逆转录病毒感染 HEL 产病毒细胞株 PT67 达 90% 汇合后换成无嘌呤霉素的完全培养基, 24 h 后收集细胞上清, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液立即进行感染。HEL 培养至对数生长期, 弃去原液, 加入 1 ml 产病毒细胞株 PT67 的细胞上清滤液和 1.4 μg/ml 的聚凝胺, 37、5% CO₂ 条件下培养 1 h, 重复感染 1 次, 继续培养 24 h, 更换含 1.875 μg/ml 嘌呤霉素的完全培养基筛选培养, 每 3~4 天换液, 约 20 天后筛选成活的细胞扩增至完全汇合, 以后改用含 1.875 μg/ml 嘌呤霉素的完全培养基培养、传代, 细胞株命名为 HEL/ siRNA、HEL/ negative。

1.2.2 RT-PCR 提取细胞的总 RNA, 取定量好的 RNA 1 μg, 根据 Promega 反转录试剂盒的步骤合成 cDNA, 将 cDNA 产物稀释 5 倍。取 5 μl 做模板, 以此模板进行 PCR 反应, 以引物 (5-ACA CCT CAT TCT GAA GAC -3、5-GGG GTA CCT AAA ACA AAA CAT AAC TAT AG-3) 扩增 EDA G1 基因, 以引物 (5 GTGGGGCG CCCCAGGCACCA-3、5-CTCCTTAATGTCAC GCACGATTT-3) 扩增管家基因 -actin 作内对照。PCR 扩增体系为 94 1 min, 50 1 min, 72 1 min, 30 个循环, 72 7 min 延伸, 扩增产物在 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 细胞增殖实验 收获细胞并计数, 用含 10% 血清的 RPMI1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞浓度, 接种到 96 孔培养板, 每孔 200 μl, 细胞数为 1 × 10⁴。分别培养 24、48、96 h 后加入 30 μl MTT (5 mg/ml) 继续培养 4 h, 离心后除去上清加入 150 μl DMSO, 振荡 20 min 后使用酶标仪检测 570 nm 波长的光吸收值, 取 4 孔的均值。

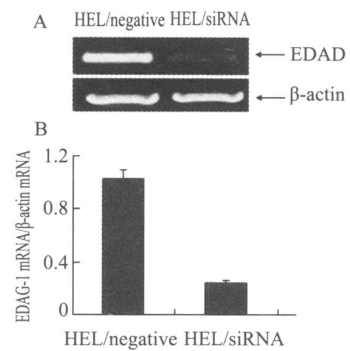
1.2.4 裸鼠成瘤实验 将 HEL/ siRNA、HEL/ negative 细胞分别接种到 Balb/c 裸鼠背部皮下, 每只裸鼠接种细胞 2 × 10⁶, 注射体积为 0.1 ml, 各接种裸鼠 5 只。注射后每周观察肿瘤生长状况, 分别在第 10、20、30、40 天测量肿瘤体积: 用游标卡尺测量肿瘤块 3 个方向的直径, 分别记为 a、b、c, 瘤体积计算公式: V = abc × 0.4。将细胞接种后裸鼠成瘤的体积进行比较。

1.2.5 统计学方法 数据采用统计学软件 SPSS10.0 进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的统计学意义采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 siRNA 对 HEL 细胞株 EDA G1 基因表达的抑制分析

经 RT-PCR 检测 EDA G1 mRNA 的表达, 与对照组相比, HEL/ siRNA 细胞株的 EDA G1 基因的表达明显受抑, 抑制率达 76.5%, 见图 1。



A: RT-PCR inspection of the inhibition effects on the expression of EDA G1 mRNA; B: Quantitative analysis of mRNA expression from A. y-axis indicates the rates of EDA G1 mRNA and -actin mRNA

图 1 siRNA 对 HEL 细胞株 EDA G1 基因表达的抑制作用
Fig 1 The inhibited effects of siRNA on the expression of EDA G1 mRNAs in HEL cells

2.2 siRNA 干扰 EDA G1 基因的表达对 HEL 细胞株增殖的影响

与对照组相比, HEL/ siRNA 细胞株在第 4 天、第 6 天的增殖速度明显减慢 (P < 0.05), 见图 2。

2.3 裸鼠成瘤实验

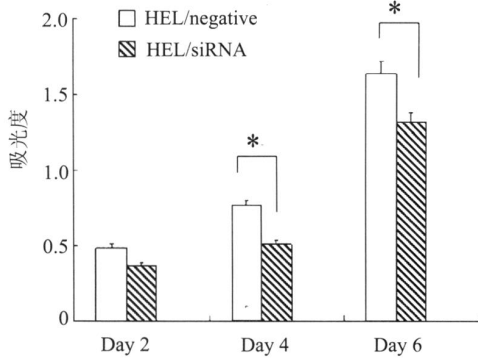


图2 干扰 EDAG1 基因的表达对 HEL 细胞株增殖的抑制作用 (* : P < 0.05)

Fig 2 The proliferation of HEL is inhibited after infection with EDAG1/ siRNA (* : P < 0.05)

细胞株接种第 10、20、30、40 天测量肿瘤体积, HEL/ negative 接种瘤、HEL/ siRNA 接种瘤体积见图 3,显示 HEL/ siRNA 接种肿瘤生长明显缓慢 (P < 0.05)。

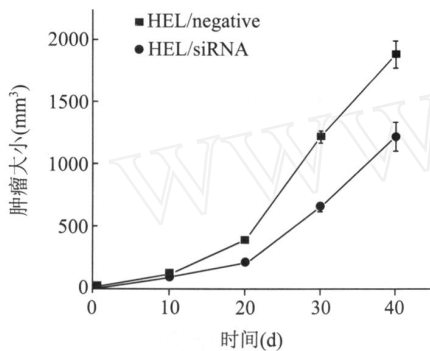


图3 接种裸鼠肿瘤生长曲线

Fig 3 Tumor growth curve of the planted nude mice

3 讨论

红细胞和巨核细胞在发育过程中可能来源于同一种造血干细胞,均与转录因子 GATA-1、GATA-2 等的表达密切相关,其特征性表面标志(红细胞 GlyA、巨核细胞 CD41/ CD42/ CD61)的表达也存在相互交叉现象;在特定因子的刺激下,红细胞可以分化成巨核细胞,巨核细胞也可以转化成红细胞^[5]。由于 EDAG1 基因是转录因子 GATA-1 信号转导途径中的下游基因,而 GATA-1 是红系、巨核系发育、分化成熟过程中的关键性转录因子^[6],因此,推测 EDAG1 基因很可能在红细胞、巨核细胞发育中发挥着重要的作用,值得进一步深入研究。

本文的研究结果表明抑制 EDAG1 基因的表达可以有效抑制红系白血病细胞株 HEL 的增殖,体内成瘤实验表明,低表达 EDAG1 基因的 HEL 接种裸鼠肿瘤生长明显减慢。表明 EDAG1 基因

参与调控红系白血病细胞的增殖,而对 HEL 细胞中高表达的 EDAG1 基因的研究发现,该基因编码区结构未发生碱基的点突变、插入或缺失,Southern 印迹也未发现 EDAG1 基因组有重排和扩增现象^[4]。据此推测 EDAG1 的高表达很可能是调控异常造成的。

EDAG1 基因对增殖的作用可能发生在对 G₀/G₁ 期的调控^[7]。An LL 等抑制 K562 细胞株中 EDAG1 基因的表达发现,p21 的表达水平升高、Bcl-2、c-myc 的表达则降低,认为 EDAG1 基因可能是通过调节 p21、c-myc 的表达作用于 G₀/G₁ 期,调控白血病细胞的增殖^[8]。本研究同时发现 EDAG1 可能是通过抑制 NF- κ B 的激活影响 IL-8 的表达,调控细胞的增殖^[9]。由于 IL-8 和 NF- κ B 的表达异常将参与造血细胞的分化,使白血病细胞生物学行为发生改变^[10]。因此,EDAG1 基因可能是白血病治疗的有效靶点之一。

参考文献:

- [1] Yang LV, Nicholson RH, Kaplan J, et al. Hemogen is a novel nuclear factor specifically expressed in mouse hematopoietic development and its human homologue EDAG maps of chromosome 9q22, a region containing breakpoints of hematological neoplasms[J]. Mech Dev, 2001, 104(1-2): 105-111.
- [2] Lu J, Xu WX, Wang SY, et al. Isolation and characterization of EDAG1, a novel gene related to regulation in hematopoietic system[J]. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2001, 33(6): 641-646.
- [3] Li CY, Zhan YQ, Xu CW, et al. EDAG regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic cells and resists cell apoptosis through the activation of nuclear factor-kappa B[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(12): 1299-1308.
- [4] Zhou Y, Xu WX, Zhan YQ, et al. Expression of EDAG1 gene in human leukemia and lymphoma cell lines[J]. Chin J Cancer, 2004, 23(11): 1238-1243.
- [5] Hans GD, Yoshinobu M, Roderick AFM. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of erythroleukemia[J]. Leuk Res, 2004, 28(12): 1243-1251.
- [6] Yang LV, Wan J, Ge Y, et al. The GATA site-dependent hemogen promoter is transcriptionally regulated by GATA 1 in hematopoietic and leukemia cells[J]. Leukemia, 2006, 20(3): 417-425.
- [7] 周颖,凌斌,程勇,等. siRNA 靶向 EDAG1 基因对 K562 细胞株生长的影响[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(12): 1002-1006.
- [8] An LL, Li G, Wu KF, et al. High expression of EDAG and its significance in AML[J]. Leukemia, 2005, 19(8): 1499-1502.
- [9] Ling B, Zhou Y, Feng D, et al. Down-regulation of EDAG Expression by Retrovirus-mediated Small Interfering RNA Inhibits the Growth and IL-8 Production of Leukemia Cells[J]. Oncol Rep, 2007, 18(3): 659-664.
- [10] De Bont ES, Vellenga E, Molema G, et al. A possible role for spontaneous interleukin-8 production by acute myeloidleukemic cells in angiogenesis related processes: work in progress[J]. Med Pediatr Oncol, 2001, 37(6): 511-517.

[编辑:周永红;校对:安 凤]