

文章编号: 1674-7054(2014)01-0025-05

靶向 *bcr/abl* 融合基因的 RNAi 对慢性粒细胞白血病 K562 增殖活性的影响

潘彦鹏¹, 曹献英¹, 武昭颖², 常志杰², 王银银², 田 博³, 郝新宝⁴

(1. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228; 2. 清华大学 医学院/生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084; 3. 陕西中医学院 附属医院肿瘤外科, 陕西 咸阳 712083; 4. 海南医学院 附属医院, 海南 海口 570228)

摘 要: 构建含 *bcr/abl* RNAi 慢病毒重组质粒载体并包装病毒, 转染 K562 细胞, 通过 Real-time PCR 及 Western blotting 验证干扰效应。采用 CCK-8 法、软琼脂细胞集落形成实验检测 RNAi 对 K562 细胞的增殖影响作用。结果表明, 慢病毒介导 *bcr/abl* 基因 RNAi 明显下调 K562 细胞中 *bcr/abl* mRNA 及 P210^{*bcr/abl*} 融合蛋白, 显著抑制了 K562 细胞的增殖, 这说明靶向 *bcr/abl* 融合基因的 RNAi 有望成为治疗慢性粒细胞白血病的有效方法。

关键词: 慢病毒; *bcr/abl* 基因; P210^{*bcr/abl*}; 增殖

中图分类号: R 733.72

文献标志码: A

CML(慢性粒细胞白血病 Chronic myelogenous leukemia)是一种源于多能造血干细胞的血液系统常见恶性肿瘤,以 *bcr/abl* 融合基因为特征,并产生具有 t(9;22)(q34;q11)染色体异位的费城染色体^[1]。*bcr/abl* 融合基因编码的 p210^{*bcr/abl*} 蛋白具有酪氨酸激酶活性,它可以改变细胞信号传导,导致细胞恶性增殖,在 CML 发病中起到重要作用^[2]。临床上通常选用具有选择性的酪氨酸激酶抑制剂(imatinib)对 CML 进行治疗,但一些患者通过治疗会出现耐药性^[3],所以需要更有效的手段来治疗 CML。RNAi(RNA interference)是体外沉默特定基因的有效手段^[4],具有高效性和序列特异性。它通过一种双链 RNA 与一种核酶复合物结合成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),RISC 能够通过序列互补识别并与特定的 mRNA 结合,在 Dicer 酶的作用下将 mRNA 降解。SCHERR 等^[5]最先报道慢病毒介导的 RNAi 能实现 *bcr/abl* 基因的长期沉默。慢病毒可感染非分裂期和分裂期的细胞,将目的基因整合到靶细胞的基因组中,并能长期表达,具有免疫反应小、感染率高等优点,因此,有望成为理想的基因转移载体^[6]。笔者通过慢病毒载体介导靶向 *bcr/abl* 融合基因的体外的 RNAi,研究 RNAi 对 K562 细胞增殖活性的影响,旨在为治疗慢性粒细胞白血病提供更有效的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 K562 细胞购自中国典型培养物保藏中心,用含 10%(V/V)胎牛血清(Gibco)的 RPMI-1640 培养基(Gibco),在 $\varphi=5\%$ CO₂ 37℃ 的条件下培养。

1.2 慢病毒的包装 转染前 24 h 将 293T 细胞 $[(4\sim5)\times 10^6 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}]$ 接种到直径 10 cm 的平皿中。用 Polyfect-V 转染试剂将 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pCMV-VSVG 和慢病毒载体质粒一同转染 293T 细胞。

收稿日期: 2014-01-17

作者简介: 潘彦鹏(1987-) 男,研究方向:生物制药. E-mail: suiyan314@163.com

通信作者: 郝新宝(1966-) 男,博士,教授. E-mail: 8427680@qq.com

中。培养 4~6 h 后,用 10 mL 新鲜的 293T 培养基换液。转染后 24 h,用 10 mL 病毒培养基换液。转染后 48 h 收获病毒上清。1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min 去除细胞碎片, -80°C 保存。共收获 4 种病毒,实验分 3 组,分别为 B/A₁, B/A₂ 和 B/A₃,空病毒阴性对照组为 GFP。

1.3 感染细胞 于直径 10 cm 平皿中接种 K562 细胞(5×10^6 cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$) ,在常规培养条件下培养 24 h 后,分别用 10 mL B/A₁, B/A₂, B/A₃ 和 GFP 病毒液给细胞换液,空白对照为 K562,用 10 mL 完全培养基换液。继续培养 12 h 后,用新的完全培养基换液,再培养 48 h 后进行检测。

1.4 *bcr/abl* mRNA 表达水平的检测 常规方法抽取 B/A₁, B/A₂, B/A₃, GFP 及 K562 组细胞总 RNA。根据 Tiangen FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 反应。BCR/ABL 上游 aaatggactgcacccgagag,下游 ctcattgtccagaggatcgc。PCR 产物经 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶成像仪下观察并拍照。

1.5 *bcr/abl* 融合蛋白 p210^{*bcr/abl*} 表达水平的检测 收集 B/A₁, B/A₂, B/A₃, GFP 及 K562 组细胞,提取蛋白。用酶标仪(Bio-Rad, USA) 检测蛋白浓度,并将所有样品稀释至同一浓度。蛋白样品与等量的上样缓冲液煮沸 10 min 后,取 10 μL 上样。SDS-PAGE 分离胶浓度 8%,于 4°C 冷室,100 V,300 mA 转膜 1.5 h。转移后于封闭液(10% 脱脂奶粉, TBST 配制), 37°C 封闭 45 min,与 bcr 一抗(Cell Signaling Technology) 和 β -actin 一抗 4°C 孵育过夜。TBST 溶液室温洗膜 3 次,每次 15 min,然后与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz) 室温孵育 2 h。TBST 溶液室温洗膜 3 次,每次 10 min,压片显影。

1.6 CCK-8 法检测增殖抑制率 将 B/A₁, B/A₂, B/A₃, GFP 及 K562 组细胞分别接种于 96 孔培养板内。每孔含培养液 100 μL ,含细胞 1×10^4 个。均至少设 3 复孔,每块板上另设一组调零孔(加培养液,不加细胞和病毒),培养 24~48 h,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液作用 2~4 h,采用酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的光密度值(D 值)。细胞增殖抑制率(%) = $100\% \times (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{实验组}}$

1.7 软琼脂细胞集落形成实验 配置含 $w = 0.6\%$ 琼脂糖的 DMEM 完全培养基作为下层胶,含 0.3% 琼脂糖的 DMEM 完全培养基作为上层胶。现在 6 孔板中每孔加入 1.5 mL 下层胶冷却凝固。收集 B/A₁, B/A₂, B/A₃, GFP 及 K562 组细胞,把细胞加到含 0.3% 琼脂糖的 DMEM 完全培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液。分别在 6 孔板的下层胶上加入 1 mL 含有细胞的上层胶(每组至少 3 个重复),室温凝固。然后移 6 孔板于 CO_2 培养箱 37°C 培养 14 d,向每孔加入 400 μL 0.1% 结晶紫染色液,染色 15~30 min。观察并计数细胞集落。集落的计数和计算:集落数 = n 孔中细胞集落数总和 / n 孔;集落形成率 = 集落数 / 接种培养细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学处理 实验结果用 SPSS17.0 统计软件分析处理。两样本均数采用 t 检验,多样本间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 慢病毒的成功制备 4 个质粒共转染 293T 细胞 48 h,细胞生长良好,荧光度强。表明病毒包装成功,离心收集含病毒上清。用 B/A₁, B/A₂, B/A₃ 和 GFP 病毒上清感染 293T 细胞,共培养 48 h,约 90% 293T 细胞呈绿荧光, B/A₁, B/A₂, B/A₃ 和 GFP 组病毒感染 K562 细胞 72 h 后,绿荧光细胞比例约为 50%。证明包装的慢病毒具有感染能力。

2.2 *bcr/abl* mRNA 表达水平的检测 实验结果显示,阴性对照组比空白组细胞 *bcr/abl* mRNA 表达略有降低,而 B/A₁, B/A₂, B/A₃ 组比空白组细胞 *bcr/abl* mRNA 表达有明显的下降(见图 1)。说明慢病毒介导的 RNAi 明显降低 *bcr/abl* 基因表达。

2.3 *bcr/abl* 融合蛋白 p210^{*bcr/abl*} 表达水平的检测

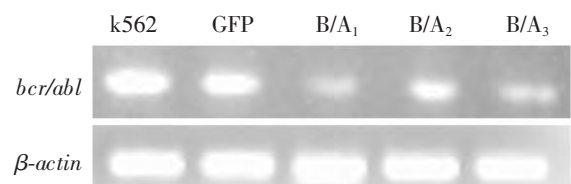


图 1 *bcr/abl* mRNA 表达

Fig. 1 *bcr/abl* mRNA expression

实验结果显示, 阴性对照组比空白组细胞 $P210^{bcr/abl}$ 蛋白表达略有降低, 而 B/A_1 、 B/A_2 、 B/A_3 组较空白组细胞 $P210^{bcr/abl}$ 蛋白表达有明显的降低(见图 2)。这说明慢病毒介导的 RNAi 明显降低 $P210^{bcr/abl}$ 蛋白表达。

2.4 RNAi 对 K562 细胞增殖抑制作用 CCK-8 法检测结果见图 3 结果显示: 阴性对照 GFP 组培养 24 h 和 48 h 后, 与空白组相比变化不大, 而实验组 B/A_1 、 B/A_2 和 B/A_3 组对 K562 细胞的增殖均有不同程度的抑制作用。培养 24 h 后, B/A_1 、 B/A_2 、 B/A_3 组可使细胞活力分别降至空白组的 46.4%、41.5% 和 33.0% ($P < 0.01$ 均值)。培养 48 h 后, B/A_1 、 B/A_2 和 B/A_3 组可使细胞活力分别降至空白组的 80.8%、63.3% 和 59.8% ($P < 0.05$ 均值)。

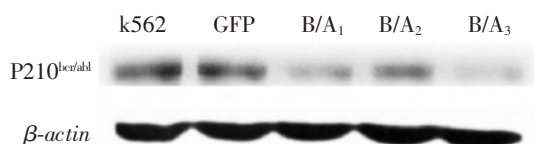


图 2 $P210^{bcr/abl}$ 蛋白表达

Fig. 2 $P210^{bcr/abl}$ protein expression

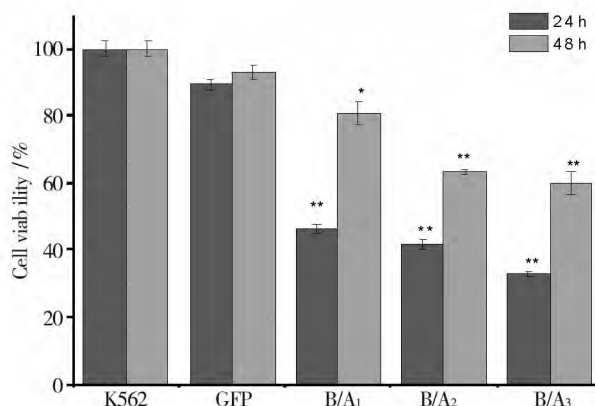


图 3 RNAi 24 h、48 h 对 K562 细胞的影响

与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of RNAi 24 h, 48 h on K562 cells

Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 细胞集落形成试验 K562 细胞集落形成数见表 1。软琼脂培养 14 d 后细胞集落见图 4、5, 从表 1 和图 4 可见, 空白组、GFP 组、 B/A_1 组、 B/A_2 组和 B/A_3 组的克隆形成率分别为 17.6%、16.6%、9.8%、12.3% 和 11.5%。从图 5 可见, 与空白组相比, 阴性对照组几乎没有影响, B/A_1 组、 B/A_2 组和 B/A_3 组抑制率分别为 44.3%、30.1% 和 34.7%。 B/A_1 组、 B/A_2 组和 B/A_3 组的克隆形成率低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 K562 细胞集落形成数

Tab. 1 Colony formation efficiency of K562 cell

组别 Group	细胞集落数/个 Colony formation units	集落形成率/% Colony formation efficiency/%
K562	176 ± 6	17.6 ± 0.6
GFP	166 ± 4	16.6 ± 0.4
B/A_1	98 ± 3	$9.8 \pm 0.3^{**}$
B/A_2	123 ± 4	$12.3 \pm 0.4^*$
B/A_3	115 ± 7	$11.5 \pm 0.7^{**}$

注: 与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

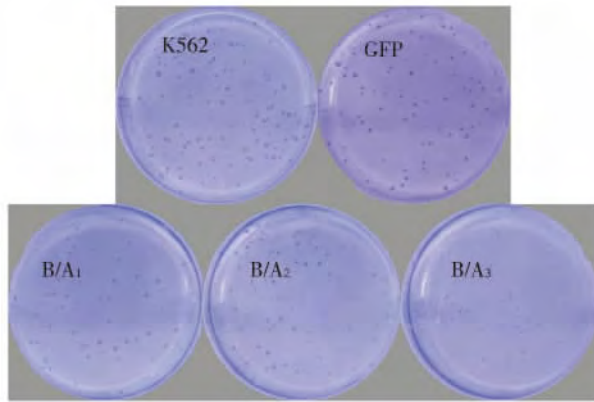


图4 空白组、GFP组、B/A₁组、B/A₂组和B/A₃组细胞集落图

Fig. 4 Cell colonies of the blank group, GFP group, B/A₁ group, B/A₂ group, and B/A₃ group

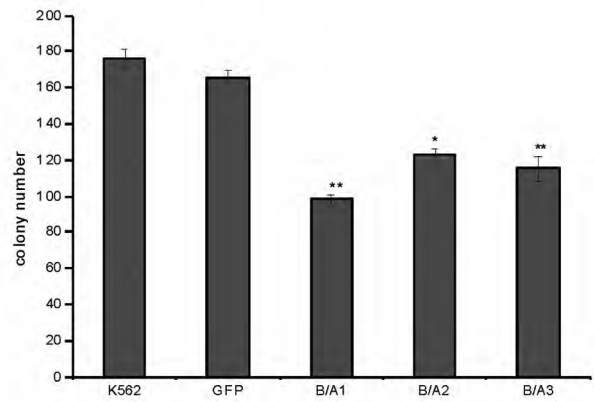


图5 空白组、GFP组、B/A₁组、B/A₂组和B/A₃组细胞克隆形成率

Fig. 5 Clone formation rates of the blank group, GFP group, B/A₁ group, B/A₂ group, and B/A₃ group

3 讨论

K562 具有特征性的融合基因 *bcr/abl* 产生的 p210^{*bcr/abl*} 融合蛋白,该融合蛋白可激活 Ras、JAK-STAT 等多条信号途径,导致细胞异常增殖^[7]。临床上使用治疗 CML 药物的主要机制是药物与 p210^{*bcr/abl*} 融合蛋白竞争 ATP 上的结合位点,使 p210^{*bcr/abl*} 融合蛋白无法被激活,如酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(Imatinib)、酪氨酸激酶抑制剂 Nilotinib 和 Dasatinib。其中 Imatinib 是一种可以使 CML 达到分子效应的药物^[8]。但是使用 Imatinib 药物的病人会对其产生耐药性,不宜长期使用。研究结果表明,siRNA 能有效抑制多药耐药白血病 K562 细胞 *mdr1* 基因 mRNA 的表达,可阻断 JAK-STAT 等多条信号途径,JAK2 和 STAT5 蛋白表达水平下降,说明 JAK-STAT 信号途径对 p210^{*bcr/abl*} 融合蛋白作用起着关键作用^[9-10]。siRNA 瞬时转染,可使 *bcr/abl* 的 mRNA 水平降低约 80%,P210^{*bcr/abl*} 蛋白也明显减少,但是 72 h 后 siRNA 作用逐渐消失^[11-12]。慢病毒载体(lentivirus)慢慢成为基因治疗的工具^[13],慢病毒具有容量大、安全性高等优点,并且可以感染分裂期和非分裂期的细胞,在 RNAi、基因治疗及转基因等领域极具应用前景^[14]。MI-CHAEL 等^[15]联合运用 siRNA、Imatinib 和 Nilotinib 抑制酪氨酸激酶抑制剂抗性细胞的生长,结果表明,对 K562 细胞的抑制效果特别明显。张雪涛等^[16]利用 siRNA 直接转染 K562 细胞,转染后 48 h 干扰效果明显,转染 72 h 后逐渐减弱,这是脂质体介导的 RNA 转染中,siRNA 未经保护从而被 RNA 酶降解的缘故。

在本研究中笔者使用了第 3 代“四质粒”共转染慢病毒载体系统,结果显示,实验组较空白组细胞 *bcr/abl* mRNA 表达和 P210^{*bcr/abl*} 蛋白表达均有明显的降低;增殖抑制实验结果表明,siRNA 能够显著地抑制 K562 细胞的增殖;软琼脂细胞集落形成实验进一步证明 siRNA 可以抑制 K562 细胞集落形成能力,证明构建的慢病毒介导的 siRNA 可以实现 *bcr/abl* 基因的长期沉默,并显著抑制 K562 细胞的增殖。笔者下一步将进行体内试验,验证慢病毒介导的 siRNA 在动物体内的治疗效果。

参考文献:

- [1]MICHAELA M, HANA K, RADIM B, et al. Targeting of gene expression by siRNA in CML primary cells[J]. Mol. Biol. Rep., 2007, 34: 27-33.
- [2]CORTEZ D, KADLEC L, PENDERGAST A M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis[J]. Mol. Cell Biol., 1995, 15(10): 5531-5541.
- [3]MERCEDES E G, MANSOOR M, KATJARINE E, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by *BCR-ABL* gene mutation or amplification[J]. Sci., 2001, 5531: 876-880.

- [4] CEJKA D, LOSERT D, WACHECK V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? [J]. Clin. Sci. (Lond), 2006, 110(1): 47 – 58.
- [5] SCHERR M, BATTMER K, SCHULTHEIS B, et al. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-bcr-abl therapy [J]. Gene. Ther. , 2005, 12(1): 12 – 21.
- [6] 庞凤. 用于肿瘤基因治疗的慢病毒载体研究进展 [J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(5): 493 – 497.
- [7] MALGORZATA N S, WASIK M A, SLUPIANEK A, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH) 3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis [J]. J. Exp. Med. , 1999, 189(8): 1229 – 1242.
- [8] 陈姗姗. 甲磺酸伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病需注意的问题 [J]. 中华血液学杂志, 2006, 7: 433 – 435.
- [9] 祁萍, 安娴, 高丽萍, 等. siRNA 逆转白血病 K562/ADM 细胞对抗癌药物耐受性的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(9): 648 – 651.
- [10] 马晓霞. RNAi 抑制 *bcr/abl* 融合基因表达及其对 K562 细胞的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [11] WILDA M, FUCHS U, WSSMANN W, et al. Killing of leukemic cells with a *BCR/ABL* fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. Oncogene, 2002, 21(37): 5716 – 5724.
- [12] WOHLBOLD L, van der KUIP H, MIETHING C, et al. Inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571) [J]. Blood, 2003, 102(6): 2236 – 2239.
- [13] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. Mol. Biotechnol. , 2007, 36(3): 184 – 204.
- [14] 魏征. RNA 干扰应用于慢性粒细胞白血病治疗的实验研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2009, 32(2): 136 – 140.
- [15] KOLDE HOFF M, KORDELAS L, BEELEN DW, et al. Small interfering RNA against BCR-ABL transcripts sensitize mutated T315I cells to nilotinib [J]. Haematologica 2010; 95(3): 388 – 397.
- [16] 张雪涛, 郝新宝. 小干扰 RNA 对白血病细胞 K562 的生长和蛋白表达的影响 [J]. 海南医学院学报, 2012, 18(6): 727 – 730.

The Effect of RNAi Targeting *bcr/abl* Fusion Gene on the Proliferation Activity of the Chronic Myelogenous Leukemia K562

PAN Yanpeng¹, CAO Xianying¹, WU Zhaoying², CHANG Zhijie², WANG Yinyin², TIAN Bo³, HAO Xinbao

(1. College of Materials Sciences and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. School of Medicine/State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China; 4. Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570228, China)

Abstract: *bcr/abl* RNAi lentivirus vector was constructed and used to transfect K562 cells (the first human immortalised myelogenous leukemia line to be established), and the stable transfectants were selected. RNAi efficiency was assessed by Real-time PCR and Western blotting. The viability of the K562 cells was detected by CCK-8 assay and clonogenic assay. The results showed that *bcr/abl* RNAi significantly down regulates the amount of *bcr/abl* mRNA and P210^{*bcr/abl*} fusion protein, and inhibits the proliferation of the K562 cells. The method of RNAi targeting *bcr/abl* fusion gene highlights a new way of chronic myelogenous leukemia treatment.

Key words: lentivirus; *bcr/abl* gene; P210^{*bcr/abl*}; proliferation