

脑源性神经营养因子基因沉默 对 RPMI8226 细胞表达 VEGF 的影响

黄靖 褚章波 陈蕾 王雅丹 张璐 胡豫 孙春艳

【摘要】目的 研究脑源性神经营养因子(BDNF)对多发性骨髓瘤(MM)细胞表达血管内皮生长因子(VEGF)的调控作用,初步探讨 BDNF 与 MM 血管新生的关系。**方法** 设计和构建针对人 BDNF 基因的 siRNA 表达载体,用脂质体 Lipofectamine™2000 介导转染,将空载体质粒 pGenesil-1 和重组质粒 pGenesil-shRNA-BDNF 分别转染 MM 细胞株 RPMI8226 细胞(分别命名为 P₀组、P₁组)。采用 RT-PCR 法和 Western-blot 法鉴定干扰后 BDNF 的表达;MTT 法和流式细胞术检测细胞的增殖、凋亡;RT-PCR 法和 ELISA 法检测干扰 BDNF 对细胞表达 VEGF 的影响。**结果** ①成功构建了针对 BDNF 的 siRNA 真核表达载体。与未转染组(P_n组)及 P₀组相比,P₁组 BDNF mRNA 水平及蛋白水平显著下调(P 值均<0.05);②P₁组细胞的增殖活性(0.42±0.06)显著低于 P_n组(0.56±0.06)和 P₀组(0.50±0.04)(P 值均<0.05);③P₁组细胞的早期凋亡率[(53.84±9.95)%]明显高于 P_n组[(5.23±2.46)%]和 P₀组[(9.10±3.46)%](P 值均<0.01);④P₁组细胞 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅和 VEGF₁₆₅ mRNA 表达水平分别为 P_n组的(0.62±0.07)、(0.47±0.09)和(0.57±0.02)倍(P 值均<0.05)。⑤P₁组细胞 VEGF 的分泌水平分别为 P_n组的(0.36±0.05)倍和 P₀组的(0.44±0.06)倍(P 值均<0.05)。**结论** BDNF 基因沉默可促进 RPMI8226 细胞凋亡并抑制其增殖,下调 RPMI8226 细胞 VEGF 的表达,BDNF 可能通过调控 MM 细胞 VEGF 的表达而参与 MM 血管新生的病理过程。

【关键词】 多发性骨髓瘤; RNA 干扰; 脑源性神经营养因子; 血管内皮生长因子 A

Effect of shRNA-mediated silencing of BDNF gene on VEGF expression of RPMI8226 cells Huang Jing, Chu Zhangbo, Chen Lei, Wang Yadan, Zhang Lu, Hu Yu, Sun Chunyan*. *Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China*

Corresponding author: Sun Chunyan, Email: suncy0618@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) of human multiple myeloma (MM) cell line RPMI8226 regulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and preliminarily approach the close relationship between BDNF and angiogenesis of MM. **Methods** The recombinant eukaryotic BDNF siRNA expression vector was designed and constructed. The empty vector pGenesil-1, and the recombinant plasmid, pGenesil-shRNA-BDNF were transfected into RPMI8226 cells using Lipofectamine™ 2000 (groups P₀ and P₁, respectively). BDNF mRNA and protein level in RPMI8226 cells were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively; the cellular proliferation activity was determined by MTT assay, while the cell apoptosis was measured by flow cytometry; the variation of VEGF mRNA level in RPMI8226 cells via transfection was determined by RT-PCR, the secretion of VEGF was detected by ELISA. **Results** ①The recombinant eukaryotic BDNF siRNA expression vectors were successfully constructed. BDNF mRNA expression and protein level in P₁ group were significantly inhibited compared to those in non-transfected group (P_n) and P₀ groups (P < 0.05); ②MTT tests demonstrated that the cellular proliferation activities were obviously decreased in P_n (0.42±0.06) vs P₀ (0.56±0.06) and P₁ (0.50±0.04) groups (P < 0.05); ③The early cell apoptosis rates

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.011

基金项目:国家自然科学基金(81272625、81302042)

作者单位:518053 香港大学深圳医院血液科(黄靖);华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所(褚章波、陈蕾、王雅丹、张璐、胡豫、孙春艳)

通信作者:孙春艳, Email: suncy0618@163.com

were statistically increased in P₁ [(53.84±9.95)%] vs P_n [(5.23±2.46)%] and P₀ [(9.10±3.46)%] groups ($P < 0.01$); ④ The silence of endogenous BDNF significantly decreased the expression of VEGF in RPMI8226 cells: the relative expression level of VEGF₁₂₁, VEGF145 and VEGF165 in P₁ group were (0.62±0.07), (0.47±0.09) and (0.57±0.02) folds compared to P_n group ($P < 0.05$); ⑤ ELISA demonstrated that secretion of VEGF in P₁ group were (0.36±0.05) and (0.44±0.06) folds compared to P_n and P₀ group, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** BDNF gene silence can obviously increase apoptosis of RPMI8226 cells, inhibit their proliferation and decrease the expression of VEGF. BDNF might mediate the expression of VEGF in MM cells, which may be involved in MM angiogenesis.

【Key words】 Multiple myeloma; RNA interference; Brain- derived neurotrophic factor; Vascular endothelial growth factor A

血管新生参与多发性骨髓瘤(MM)的病理生理过程,与MM患者的病程、疾病分期及预后关系密切^[1]。脑源性神经营养因子(BDNF)可表达于多种血管内皮细胞,在体内外均有显著的促进血管新生的作用。本课题组既往研究发现外源性BDNF可促进MM细胞表达和分泌血管内皮生长因子(VEGF),并呈时间-剂量依赖性^[2]。在本研究中我们以RNA干扰为手段,抑制人MM细胞株RPMI8226细胞中内源性BDNF的表达,探讨其对MM细胞表达VEGF的调控作用,进一步阐明BDNF与MM血管新生的关系。

材料和方法

1. 细胞和主要试剂: RPMI8226细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。RPMI1640培养基、胎牛血清及G418购自美国Gibco BRL公司, Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司,真核表达载体pGenesil-1购自武汉晶赛生物工程技术有限公司,限制性内切酶BamH I、Hind III和Sal I购自日本TOYOBO公司, T4连接酶购自美国Promega公司, TRIZOL、逆转录cDNA试剂盒、Taq DNA聚合酶及dNTP均购自立陶宛Fermentas公司,兔抗人BDNF抗体购自美国Santa Cruz公司, Annexin V-FITC试剂盒购自美国BD公司,人VEGF ELISA试剂盒购自美国R&D公司, PCR扩增引物及测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。

2. pGenesil-1-shRNA-BDNF真核表达载体的构建与鉴定: 基因库中查找BDNF mRNA序列,设计并合成针对BDNF的双链短发夹RNA (small hairpin RNA, shRNA), 编码序列BDNF-A: 5'-GATCCGGCATTGGAACCTCCAGTGTTC AAGAC-GCACTGGGAGTTCCAATGCCTTTTTTGTGCGAC-A-3'; BDNF-B: 5'-AGCTTGTGACAAAAAG-GCATTGGAACCTCCAGTGCCTTGAACACTG-

GGAGTTCCAATGCCG-3'; 引物结构: BamH I + Sense+Loop+Antisense+终止信号+Sal I +Hind III。经BLAST分析显示所选序列具有良好的特异性。质粒pGenesil-1的多克隆位点为: -Hind III-shRNA-BamH I-U6Promotor-EcoR I-Sal I-Xba I-Dra III-。在插入的目的基因片段里设计了一个Sal I酶切位点,如插入正确,质粒可被Sal I酶切出一条约400 bp的DNA条带。经Sal I鉴定及DNA测序正确后用于转染实验。

3. 基因转染: 将RPMI8226细胞以 2×10^6 /ml接种至预先用10 g/L明胶平铺的24孔板,接种后4 h,按Lipofectamine2000说明书进行操作,分别将pGenesil-1和pGenesil-shRNA-BDNF转染至RPMI8226细胞(分别命名为P₀组和P₁组,未转染的细胞称为P_n组),转染48 h后将细胞转移至6孔板并加入G418(600 μg/ml)筛选。未转染的细胞在G418的作用下,于第10~14天全部死亡,收集G418抗性的细胞克隆,传代扩大培养并以半量G418维持。

4. RT-PCR法检测RPMI8226细胞BDNF mRNA表达: 分别收集3组细胞, TRIZOL一步法抽提总RNA,取5 μg RNA按cDNA试剂盒说明逆转为cDNA,取1 μl cDNA进行PCR扩增。BDNF(594 bp)引物序列: 上游为5'-GCAGCCTTCTTTTGTGTAACC-3', 下游为5'-AGAGTGATGAC-CATCCTTTTC-3'。内参GAPDH(226 bp)引物序列: 上游为5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3', 下游为5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'。PCR扩增条件为94℃预变性4 min, 94℃变性1 min, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共32个循环,最后72℃延伸5 min。PCR产物行15 g/L琼脂糖凝胶电泳,采用sensiAnsys凝胶图像分析软件分析PCR产物。以BDNF条带吸光度值与GAPDH条带吸光度值的比值表示BDNF mRNA相对表达水平。

5. Western blot法检测RPMI8226细胞BDNF蛋

白的表达:收集 3 组细胞,分别常规消化离心后加入细胞裂解液,将所得蛋白定量后行 SDS-PAGE,一抗为兔抗人 BDNF 抗体(1:200),二抗为羊抗兔 IgG(1:5 000),ECL 系统曝光显影后采用凝胶分析系统分析蛋白表达量。以 BDNF 条带吸光度值与 GAPDH 条带吸光度值的比值表示 BDNF 蛋白相对表达水平。

6. MTT 法检测 RPMI8226 细胞增殖活性:收集 3 组细胞,制成密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液,以每孔 200 μl 接种至 96 孔板,孵育 24 h。培养结束后行常规 MTT 染色,采用酶标仪(波长为 570 nm)测定各孔吸光度值。

7. 流式细胞术检测细胞凋亡率:收集 3 组细胞,调整密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$,分别经 Annexin V-FITC 和 PI 标记后,上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

8. RT-PCR 法检测 shBDNF 对细胞 VEGF 表达的影响:收集 3 组细胞,TRIzol 一步法抽提总 RNA,取 5 μg RNA 按 cDNA 试剂盒说明书逆转录为 cDNA,取 2 μl cDNA 进行 PCR 扩增。VEGF 引物序列:上游为 5'-TCGGGCCTCCGAAACCATGA-3',下游为 5'-CCTGGTGAGAGATCTGGTTC-3'。内参 β -actin 引物序列:上游为 5'-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3',下游为 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57.6 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用 sensAnsysis 凝胶图像分析软件分析 PCR 产物,以 VEGF 条带吸光度值与 β -actin 条带吸光度值的比值表示 VEGF mRNA 相对表达水平。

9. ELISA 法检测 shBDNF 对细胞 VEGF 分泌的影响:收集 3 组细胞的培养上清液,将 VEGF 标准品和待测的细胞培养上清液加入 96 孔板,按照试剂盒说明书进行操作。

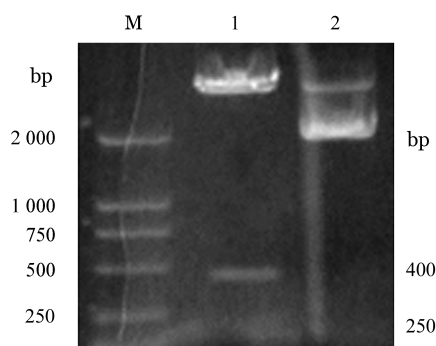
10. 统计学处理:所有实验均每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间分析采用两独立样本的 t 检验和单因素方差分析,显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 重组表达载体的酶切鉴定:酶切图谱与预期片段大小一致(图 1)。阳性克隆测序结果表明,

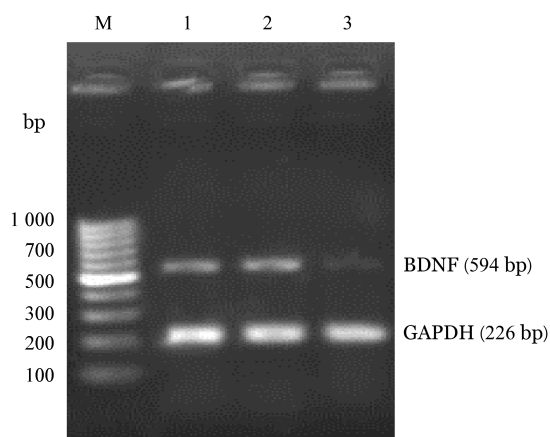
shRNA 编码序列以正确的读码框插入表达载体中,其转录产物为 shRNA,将其命名为 pGenesil-shRNA-BDNF。

2. shRNA 对细胞 BDNF 基因表达的影响:结果显示 P_n 、 P_0 、 P_1 组 BDNF mRNA 相对表达水平分别为 0.57 ± 0.10 、 0.58 ± 0.15 和 0.37 ± 0.05 , P_1 组较 P_n 、 P_0 组表达降低,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05)(图 2)。



M: DL2000 Marker; 1: 转染 pGenesil-shRNA-BDNF1 组; 2: 转染 pGenesil-1 组

图 1 PCR 法鉴定 pGenesil-1-shRNA-脑源性神经营养因子(BDNF)重组表达载体酶切电泳图



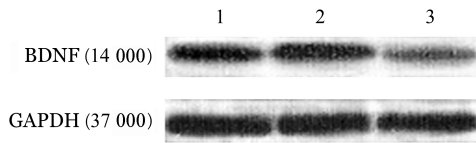
M: DNA Marker; 1: 未转染组; 2: 转染 pGenesil-1 组; 3: 转染 pGenesil-shRNA-BDNF1 组

图 2 RT-PCR 法检测脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA 表达

3. shRNA 对细胞 BDNF 蛋白表达的影响: P_n 、 P_0 、 P_1 组 BDNF 蛋白相对表达水平分别为 0.83 ± 0.12 、 0.82 ± 0.13 和 0.58 ± 0.11 。 P_1 组较 P_n 、 P_0 组表达降低,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05)(图 3)。

4. shRNA 对细胞增殖活性的影响:结果显示 P_n 、 P_0 、 P_1 组细胞的增殖活性分别为 0.56 ± 0.06 、 0.50 ± 0.04 和 0.42 ± 0.06 。 P_1 组较 P_n 、 P_0 组细胞增殖活性明显降低,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05)。

5. shRNA 对细胞凋亡的影响:结果显示, P_n 、 P_0 、

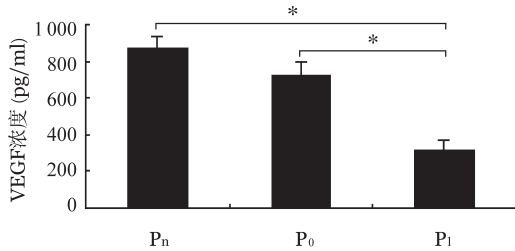


1: 未转染组; 2: 转染 pGenesil-1 组; 3: 转染 pGenesil-shRNA-BDNF1 组

图3 Western blot法检测脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达

P₁ 组细胞的早期凋亡率分别为 (5.23±2.46)%、(9.10±3.46)%和(53.84±9.95)%, 前两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$), P₁ 组细胞的早期凋亡率较 P_n、P₀ 组明显增高, 差异均有统计学意义 (P 值均 <0.01)。

6. shRNA 对细胞 VEGF 表达的影响: RT-PCR 法检测结果显示, 与 P_n 组、P₀ 组比较, P₁ 组细胞 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₆₅ mRNA 表达水平均明显受抑 (P 值均 <0.05) (表 1)。ELISA 法检测结果显示, P₁ 组较 P_n、P₀ 组细胞 VEGF 蛋白分泌水平明显降低 (P 值均 <0.05 , 图 4)。



P_n: 未转染组; P₀: 转染 pGenesil-1 组; P₁: 转染 pGenesil-shRNA-BDNF1 组; 与未转染组和转染 pGenesil-1 组比较, * $P<0.05$

图4 ELISA 法检测干扰脑源性神经营养因子(BDNF)对 RPMI8226 细胞血管生长因子分泌的影响(每组实验设 3 个复孔, 实验重复 3 次)

讨 论

大量研究证实血管新生与 MM 关系密切, 骨髓微血管密度(MVD)作为 MM 独立的预后因素与疾病分期、病情严重程度呈正相关^[3]。MM 细胞表达 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肝细胞生

长因子(HGF)等促血管新生因子及其相关受体^[4], 并与骨髓微环境中的基质细胞存在复杂的相互作用。深入了解对 MM 细胞生长、存活和血管新生病理过程起重要调控作用的细胞因子及其作用途径, 对于靶向性治疗 MM 至关重要。

新近有研究表明脑、心肌和骨骼肌血管内皮细胞可表达 BDNF, 在胚胎发育晚期维持心肌动脉血管和毛细血管的稳定性, 在缺氧条件下参与血管内皮细胞重构, 改善血管和心脏功能^[5-7]。BDNF 及其高亲和力受体酪氨酸激酶 B(TrkB)在 MM 细胞株、原代 MM 细胞、MM 患者血浆及骨髓中均有表达, 并在 MM 细胞与骨髓微环境的相互作用中发挥关键作用^[8-9]。我们前期的研究结果证实 BDNF 是一种重要的促血管新生因子, 参与 MM 相关的血管新生, 但具体机制仍在探索中^[10]。

外源性 BDNF 通过激活 TrkB 受体通路促进脑血管内皮细胞新生及存活^[5], 促进 MM 细胞增殖和迁移^[9], 调控 MM 细胞表达 VEGF^[2], 其作用方式为旁分泌形式。除旁分泌外, 自分泌也是 BDNF 的主要作用方式: 用可溶性 TrkB 受体中和内源性 BDNF, 内皮细胞 TrkB 磷酸化水平明显下降而细胞凋亡率增加^[5]; 肿瘤动物模型血浆中新鲜血小板可释放大量 BDNF, 并且 BDNF 对血小板中热休克蛋白 HSP90 的上调作用可被 TrkB 阻断剂阻断, 充分证明 BDNF/TrkB 自分泌环在肿瘤进展过程中可活化血小板^[11]。本实验中, 我们采用 siRNA 表达载体法成功构建了针对 BDNF 的 siRNA 真核表达载体 pGenesil-shRNA-BDNF, 并成功转染 RPMI8226 细胞获得稳定表达克隆。我们发现内源性 BDNF 基因表达被干扰的同时, RPMI8226 细胞 VEGF 的表达水平显著下降, 该结果一方面进一步证明 BDNF 对 VEGF 存在直接的调控作用, 可能是 VEGF 表达的上游信号分子, 另一方面也阐明了 MM 细胞存在 BDNF/TrkB 的自分泌环。提示 BDNF 可能以自分泌及旁分泌形式调控 RPMI8226 细胞表达 VEGF, 进

表1 RT-PCR 法检测干扰脑源性神经营养因子(BDNF)对 RPMI8226 细胞血管生长因子(VEGF)表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	VEGF ₁₂₁	VEGF ₁₄₅	VEGF ₁₆₅
未转染组	3	0.88±0.17	0.71±0.18	0.70±0.16
转染 pGenesil-1 组	3	0.89±0.18	0.75±0.18	0.67±0.12
转染 pGenesil-shRNA-BDNF1 组	3	0.54±0.14 ^a	0.35±0.15 ^a	0.40±0.08 ^a

注: 与未转染组和转染 pGenesil-1 组比较, * $P<0.05$; 每组实验设 3 个复孔, 实验重复 3 次

而参与 MM 细胞与骨髓基质的相互作用及 MM 血管新生的病理过程。

在 BDNF 与多种非神经系统来源的实体肿瘤的相关研究中,有研究者发现 BDNF 是一种重要的促肿瘤生长因子,可促进肿瘤细胞的增殖和存活^[12]。我们在既往的研究中发现 BDNF 以剂量和时间依赖性方式促进 MM 细胞增殖和迁移^[9]。本实验结果进一步证实沉默 BDNF 基因表达后, P₁ 组细胞的增殖活性明显低于 P_n 和 P₀ 组 ($P < 0.05$)。Kurokawa 等^[13]的研究结果证实在大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型中,视网膜神经节细胞内 caspase-2 阳性细胞明显增多,而外源性 BDNF 注射入玻璃体后可显著下调 caspase-2 表达。Liu 等^[14]的研究结果亦证实 BDNF 可促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并抑制细胞内 Ca²⁺ 超载,从而缓解 β -淀粉样蛋白对神经元造成的损伤。在本研究中我们发现沉默 BDNF 基因表达后, P₁ 组细胞凋亡率较 P_n 和 P₀ 组显著增加。因此我们推测, BDNF 不仅通过自分泌及旁分泌形式促进 VEGF 等促血管新生因子的表达,亦可促进 MM 细胞增殖和抑制 MM 细胞凋亡。

总之,我们的研究表明, BDNF 对 MM 细胞表达 VEGF 存在直接的调控作用,并且 BDNF 在细胞增殖和凋亡过程中也显示了重要的作用。RNA 干扰技术的应用,为特异性及靶向性抑制 BDNF 功能及抗肿瘤治疗提供了新的思路和策略。

参 考 文 献

- [1] Yang R, Han ZC. Angiogenesis in hematologic malignancies and its clinical implications [J]. *Int J Hematol*, 2002, 75 (3): 246-256.
- [2] 黄靖, 胡豫, 孙春艳, 等. 脑源性神经营养因子对 RPMI8226 细胞表达和分泌血管内皮生长因子的调控作用 [J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(4): 267-270.
- [3] Sezer O, Niemöller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma [J]. *Ann Hematol*, 2000, 79(10): 574-577.
- [4] Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration [J]. *Blood*, 2001, 98(2): 428-435.
- [5] Kim H, Li Q, Hempstead BL, et al. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33538-33546.
- [6] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization [J]. *Development*, 2000, 127 (21): 4531-4540.
- [7] Liu Y, Sun L, Huan Y, et al. Application of bFGF and BDNF to improve angiogenesis and cardiac function [J]. *J Surg Res*, 2006, 136(1): 85-91.
- [8] Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival [J]. *Blood*, 2005, 105(11): 4429-4436.
- [9] 孙春艳, 胡豫, 吴涛, 等. 脑源性神经营养因子及其受体在多发性骨髓瘤细胞中的表达及意义 [J]. *中华内科杂志*, 2005, 44 (12): 906-909.
- [10] Hu Y, Wang YD, Guo T, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel angiogenic protein in multiple myeloma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 178(1): 1-10.
- [11] Yang ZF, Ho DW, Lau CK, et al. Platelet activation during tumor development, the potential role of BDNF-TrkB autocrine loop [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(3): 981-985.
- [12] Serres F, Carney SL. Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor [J]. *Brain Res*, 2006, 1101(1): 36-42.
- [13] Kurokawa T, Katai N, Shibuki H, et al. BDNF diminishes caspase-2 but not c-Jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(12): 3006-3011.
- [14] Liu Z, Ma D, Feng G, et al. Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Abeta-induced neuronal damage model [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2007, 27(3): 233-236.

(收稿日期: 2014-10-12)

(本文编辑: 刘志红)