

TRIP13 基因 mRNA 在慢性淋巴细胞白血病 B 淋巴细胞的表达及其调控 JVM-2 细胞增殖和凋亡的分子机制探讨

周可树 张青 张文涛 刘燕燕 吴胜胜 周健 魏旭东 宋永平

【摘要】 目的 探讨甲状腺激素受体相互作用分子 13 (TRIP13) 基因表达和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的相关性, 验证 TRIP13 基因在 CLL 发生发展中发挥的生物学功能, 探讨 TRIP13 基因调控 CLL 发生发展的下游分子机制。方法 ①应用实时荧光定量 PCR 检测 30 例 CLL 患者和 12 名造血干细胞供者 (正常对照组) 外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞 TRIP13 mRNA 的表达水平。②使用慢病毒介导的 shRNA 干扰 JVM-2 细胞 TRIP13 mRNA 和蛋白表达水平, 同时使用随机序列 shRNA 处理 JVM-2 细胞作为对照组, 分别应用 MTT 法和流式细胞术检测 TRIP13 干扰组、对照组 JVM-2 细胞的增殖和凋亡情况。③Western blot 法检测 TRIP13 干扰对 JVM-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响。结果 ①30 例 CLL 患者外周血 B 淋巴细胞 TRIP13 mRNA 表达水平 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.01489$) 高于正常对照组 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.00019$) ($P < 0.001$)。②在 JVM2 细胞中筛选出有效干扰 shRNA 靶点, 下调 TRIP13 的表达能够有效抑制 JVM-2 细胞增殖并促进细胞凋亡。③干扰 TRIP13 后 JVM-2 细胞 Myc 和 Bcl-2 蛋白表达下调 ($P < 0.001$), Bax、caspase3、Bad 蛋白表达上调 ($P < 0.001$)。结论 CLL 患者外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞 TRIP13 mRNA 表达上调; TRIP13 基因通过影响细胞增殖和凋亡相关蛋白表达而调控 JVM2 细胞的增殖与凋亡。

【关键词】 白血病, 淋巴细胞, 慢性, B 细胞; 基因, TRIP13; JVM-2 细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81470336)

Study on the expression of TRIP13 mRNA in chronic lymphocytic leukemia B lymphocyte and the molecular mechanism of TRIP13 mediated JVM-2 cell proliferation and apoptosis Zhou Keshu*, Zhang Qing, Zhang Wentao, Liu Yanyan, Wu Shengsheng, Zhou Jan, Wei Xudong, Song Yongping*. *Department of Hematology, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China

Corresponding author: Song Yongping, Email: songyongping001@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of expression level of thyroid hormone receptor interactors 13 (TRIP13) gene to probe its function and downstream molecular mechanism in chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Methods** Real-time quantitative PCR method was used to detect the expression levels of TRIP13 mRNA of CD19⁺ B lymphocytes in 30 cases of patients with CLL and 12 cases of peripheral blood hematopoietic stem cell donors (normal control group). Lentivirus mediated shRNA was used to interference the mRNA and TRIP13 protein in CLL cells JVM-2. Scramble sequence was used as control. Methyl thiazolyl tetrazolium colorimetric assay (MTT) and flow cytometry was used to detect the cell proliferation and apoptosis in TRIP13 knocked-down and negative control JVM-2 cells. **Results** TRIP13 mRNA level was significantly higher in 30 cases of CLL patients ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.01489$) compared with 12 healthy donors ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.00019$) ($P < 0.001$). Validated TRIP13 shRNA target was achieved in JVM2 cell. Compared with the control group, down-regulation of TRIP13 expression could significantly inhibit the proliferation of JVM-2 cells and induce apoptosis. The expressions of Myc and Bcl-2 protein in JVM-2 cells decreased significantly after interference with TRIP13

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.07.013

作者单位: 450008 郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院血液科 (周可树、张青、刘燕燕、吴胜胜、周健、魏旭东、宋永平); 武警河南总队医院 (张文涛)

通信作者: 宋永平, Email: songyongping001@126.com

($P < 0.001$), and the expressions of Bax, caspase 3 and Bad protein increased significantly ($P < 0.001$).

Conclusion TRIP13 mRNA significantly over-expressed in CLL patients CD19⁺ B lymphocytes. TRIP13 could influence JVM2 cell proliferation and apoptosis through proliferation- and apoptosis-related proteins.

【Key words】 Leukemia, lymphocytic, chronic, B-cell; Gene, TRIP13; JVM-2 cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470336)

甲状腺激素受体相互作用分子13 (thyroid hormone receptor interactor 13, TRIP13) 是最早在小鼠中发现的一种有丝分裂检查点相关蛋白 (pachytene checkpoint 2), 是一种 AAA+ ATP 酶, 在小鼠、酵母及线虫细胞中主要发挥细胞周期检查点的功能^[1-4]。近年来 TRIP13 和人类肿瘤的关系正在引起关注。TRIP13 能够促进头颈部肿瘤细胞 DNA 损伤修复, 从而介导肿瘤细胞对化疗及放疗耐受^[5]。联合分析 TRIP13 和前列腺特异性抗原 (PSA) 表达可以更精确地诊断前列腺癌^[6]。此外, 在非小细胞肺癌中 TRIP13 基因 DNA 拷贝数发生了明显改变^[7]。本研究中, 我们应用实时荧光定量 PCR 检测慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞 TRIP13 mRNA 的表达水平, 从细胞水平探讨 TRIP13 干扰对 CLL 细胞系 JVM-2 增殖和凋亡的调控作用及其分子机制。

材料与方 法

1. 标本来源及制备: 本研究纳入 2014 年 3 月 1 日至 2015 年 10 月 31 日期间河南省肿瘤医院收治的 30 例初诊 CLL 患者。男 18 例, 女 12 例, 中位年龄 61 (52~79) 岁, 外周血中位 WBC 78.64 (31.93~252.46) $\times 10^9/L$, 中位淋巴细胞比例 0.76 (0.56~0.98)。以 12 名造血干细胞供者作为正常对照组。采集 CLL 患者及正常对照组外周血标本, 常规分离单个核细胞并应用 CD19 磁珠 (德国美天旎公司产品) 分选 CD19⁺ B 淋巴细胞。本研究经医院伦理委员会审核批准, 受试者均知情同意。

2. 细胞株: B 细胞来源 CLL 细胞系 JVM-2 购自 American Type Culture Collection 细胞库, 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司产品), 在 37 °C、5% CO₂、相对湿度 95% 条件下培养。

3. 实时荧光定量 PCR 检测外周血 B 淋巴细胞 TRIP13 mRNA 表达: 反应体系参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司产品) 说明书配制。反应条件: 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s (39 个循环)。CLL 患者和正常对照组外周血 B 淋

巴细胞 TRIP13 mRNA 相对表达量用 2^{-ΔCt} 法表示。

4. Western blot 法检测蛋白表达: 用细胞蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白, 行 SDS-PAGE 分离蛋白 (90 V 30 min, 120 V 1 h)。电泳结束后以电转移法将蛋白从凝胶转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用 5% BSA 液封闭, 依据膜面积计算抗体体积, 分别加入 TRIP13、Bcl-2、Myc、GAPDH (英国 Abcam 公司产品, 1:1 000) 室温孵育 1 h, 然后再加入 1:10 000 对应二抗 (美国 Santa Cruz 公司产品) 室温孵育 1 h, 最后将 PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒 (美国 GE 公司产品) 处理并显影。蛋白表达使用化学发光法检测并通过 G:BOX 化学凝胶成像系统 (美国 Syngene 公司产品) 检测。实验重复 3 次。

5. SiRNA 慢病毒载体构建及感染: TRIP13 干扰慢病毒载体 GV115 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。培养生长状态良好的目的细胞, 使用 MOI=50 进行正式感染。参照预实验确定的感染时间点, 于荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达情况, 感染率达 70%~80% 细胞汇合度达 80% 时收集细胞进入后续实验。TRIP13 的所有使用靶点分别为: 5'-GAAGACATAAACCTGAGT-GTT-3', 5'-GACATAAACCTGAGTGTTAGA-3' 和 5'-TACTCAACAGACATAATAT-3'。有效干扰靶点序列为 5'-TACTCAACAGACATAATAT-3', 对照序列为 5'-GCCTAACTGTGTCAGAAGGAA-3'。

6. MTT 比色法检测 JVM-2 细胞增殖能力: 取对数生长期 JVM-2 细胞, 使用 TRIP13 干扰对照慢病毒感染后接种于 96 孔板 (每孔 200 μ l), 分别培养 1、2、3、4、5 d 后加入 5 mg/ml MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10~20 min 充分溶解结晶后, 用酶标仪于 490 nm 测定每孔的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

7. 流式细胞术检测 JVM-2 细胞凋亡: 用冷 PBS 缓冲液洗涤 JVM-2 细胞 2 次, 3 000 r/min 离心 2 min (离心半径 8 cm), 弃上清, 加入 490 μ l 预冷结合缓冲液重悬细胞 (细胞密度为 $1 \times 10^5/ml \sim 1 \times 10^6/ml$), 再加入 5 μ l Annexin V-APC 和 5 μ l PI 于细胞悬浮液中,

轻轻混匀并将试管置于冰上,避光培养 10 min,上机检测。

8. 统计学处理:采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据分析,计量资料均用单样本 K-S 法进行正态性检验且符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间与组内多指标比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,非成对样本比较采用 U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

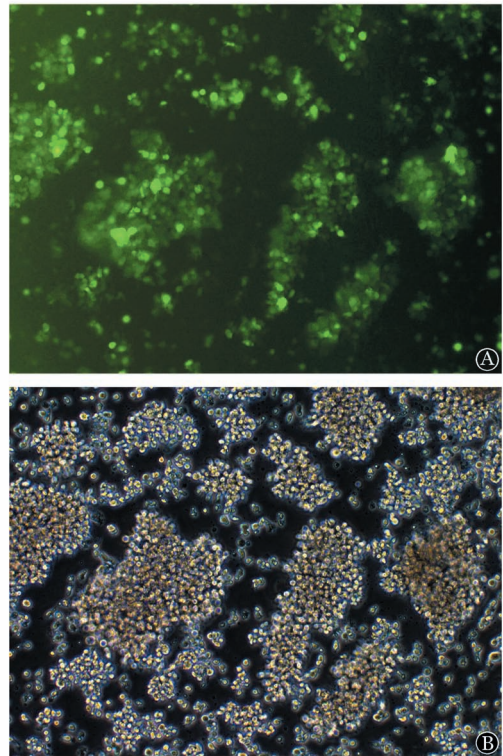
1. 实时荧光定量 PCR 检测 CLL 患者外周血 B 细胞 TRIP13 mRNA 表达:30 例 CLL 患者 B 细胞 TRIP13 基因 mRNA 的表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.01489$) 高于正常对照组 ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.00019$) ($P < 0.001$),提示 TRIP13 高表达可能和 CLL 的发病相关。

2. JVM-2 细胞有效 TRIP13 干扰靶点的筛选:使用对照慢病毒摸索 JVM-2 细胞的感染条件,为了确定慢病毒的感染效率,所有使用的慢病毒载体均携带 EGFP。如图 1 所示,荧光显微镜下在 MOI=50 时 JVM-2 细胞的感染率 >90%,适合进行后续实验。

针对人源 TRIP13 的 CDS 区域序列寻找适合的 siRNA 干扰靶点作用区域。一共设计了 3 条 siRNA 序列:5'-GAAGACATAAACCTGAGTGTT-3'、5'-GACATAAACCTGAGTGTTAGA-3' 和 5'-TACTCAACAGACATAATAT-3'。分别标记为干扰 1、干扰 2、干扰 3。通过 Western blot 实验发现,3 个靶点在 JVM-2 细胞中都能够一定程度地下调 TRIP13 的蛋白表达,且 3 号干扰靶点在 JVM-2 细胞中的蛋白敲减效率最高(图 2),因此选择 3 号靶点进入后续实验。

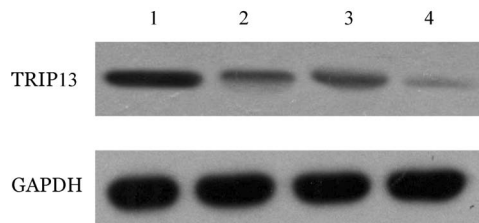
3. MTT 比色法检测 TRIP13 干扰对 JVM-2 细胞增殖的影响:使用最佳干扰靶点处理 JVM-2 细胞后应用 MTT 比色法检测 TRIP13 干扰病毒及对照病毒感染 5 d 内两组细胞的增殖活性,结果显示,TRIP13 干扰慢病毒感染后 JVM-2 细胞的增殖活性较对照组显著下降 ($P < 0.05$) (图 3)。

4. 流式细胞术检测 TRIP13 对 JVM-2 细胞凋亡的影响:由于慢病毒载体携带 EGFP 标签,因此使用 Annexin V-APC 单染方法进行凋亡检测,以去除可能的 EGFP 荧光干扰实验结果。TRIP13 干扰组 JVM-2 细胞凋亡率高于对照组 [8.78 ± 0.42]% 对 [4.95 ± 0.69]% , $t = 9.730$, $P < 0.001$],提示慢病毒介导的 TRIP13 干扰可能通过影响细胞凋亡来调控



A:绿色荧光通道;B:白光通道

图1 JVM-2 细胞的慢病毒感染效率



1:对照组;2~4 分别为干扰 1、2、3

图2 TRIP13 的 3 个干扰靶点在 JVM-2 细胞中的蛋白水平敲减效率比较

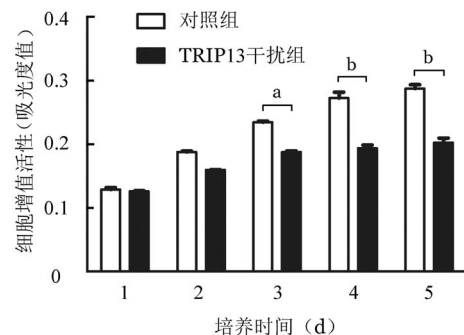


图3 MTT 比色法检测 TRIP13 干扰对 JVM-2 细胞增殖的影响 ($n = 3$; $^a P < 0.01$; $^b P < 0.001$)

JVM-2 细胞增殖。

5. Western blot 检测 TRIP13 干扰对 JVM-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响:干扰 TRIP13 后 JVM-2

细胞中 Bcl-2 和 Myc 蛋白表达下调 ($P < 0.001$), Bax、caspase3 和 Bad 蛋白表达上调 ($P < 0.001$), 详见图 4。提示 TRIP13 能够通过调控 Myc 和 Bcl-2 家族蛋白导致 JVM-2 细胞产生 caspase3 依赖性的细胞凋亡以及细胞增殖抑制。

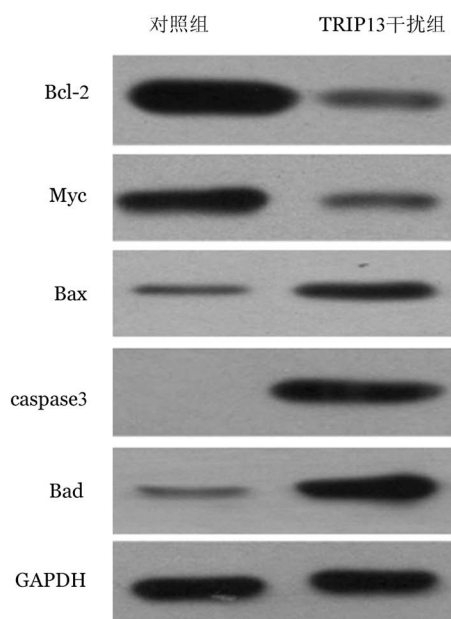


图 4 Western blot 法检测 TRIP13 干扰对 JVM-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

讨 论

CLL 是一种老年性疾病, 以免疫功能不全的高分化淋巴细胞克隆性增殖为主要特征。针对 CLL 的新的治疗方法特别是药物作用靶点是当前研究的热点。

TRIP13 基因已被证明是一个着丝粒定位蛋白, 其功能为确保细胞分裂准确进行。许多着丝粒定位蛋白在多种肿瘤中高表达, 其表达量与基因组不稳定或肿瘤细胞恶性转化相关^[8-11]。本研究首次发现 CLL 患者 TRIP13 基因 mRNA 表达高于正常人, 提示 TRIP13 的异常高表达可能与 CLL 的发生发展有关。TRIP13 的高表达也存在于头颈部肿瘤和前列腺癌中, 表明 TRIP13 可在多种肿瘤中高表达, 与其他着丝粒定位蛋白类似。因此, TRIP13 可能是一种广谱的原癌基因^[12-14]。

有丝分裂异常往往导致非整倍体细胞的产生, 促进细胞的遗传不稳定性和诱导细胞凋亡或恶性转化。有丝分裂需要确保着丝粒正确连接到纺锤体介导的染色体精确分布。该过程需要一个关键的蛋白复合物——有丝分裂检查点复合物(MCC), 其中包含有丝分裂纺锤体检查点蛋白 1(MAD1)和

MAD2 形成的二聚物。异常表达或功能失活的 MCC 和多种肿瘤的发生发展相关。MAD2 或 MAD1 的杂合性缺失会导致小鼠的胚胎成纤维细胞出现高频率的非整倍体。这些结果表明, 该复合体在肿瘤形成中发挥重要的作用^[15-18]。TRIP13 具有促进 MCC 复合体解离并抑制有丝分裂完成的作用。因此, 异常高表达的 TRIP13 和缺失的 MCC 复合体具有类似的促癌作用, 因为两者都可以导致有丝分裂的异常并产生非整倍体细胞。

本研究应用慢病毒介导的 shRNA 干扰 JVM-2 细胞 TRIP13 表达, 并应用 MTT 比色法和流式细胞术检测 TRIP13 干扰前后 JVM-2 细胞的增殖和凋亡情况, 证明了 TRIP13 在调控 JVM-2 细胞增殖和凋亡过程中所起的作用, 其调控 JVM-2 细胞增殖凋亡的分子机制包括 Myc、Bcl-2 等多个信号通路。在这项研究中, 我们发现了新的 TRIP13 促进 B 细胞恶性转化的机制。TRIP13 干扰能够诱导 Myc、Bcl-2 表达下调, 推测 TRIP13 可能通过转录调控直接影响下游各凋亡调控基因来影响 CLL 细胞的增殖和凋亡。深入研究 TRIP13 在 CLL 发生发展中的确切作用机制, 可为 TRIP13 基因成为潜在的 CLL 药物作用靶点奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ma HT, Poon RY. TRIP13 regulates both the activation and inactivation of the spindle-assembly checkpoint [J]. Cell Rep, 2016, 14(5):1086-1099. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.001.
- [2] Ye Q, Rosenberg SC, Moeller A, et al. TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching [J]. Elife, 2015, 4. DOI: 10.7554/eLife.07367.
- [3] Wu HY, Burgess SM. Meiotic chromosome metabolism is monitored by two distinct surveillance mechanisms in budding yeast [J]. Curr Biol, 2006, 16(24): 2473-2479. DOI: 10.1016/j.cub.2006.10.069.
- [4] Bhalla N, Dernburg AF. A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2005, 310(5754): 1683-1686. DOI: 10.1126/science.1117468.
- [5] Banerjee R, Russo N, Liu M, et al. TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer [J]. Nat Commun, 2014, 5:4527. DOI: 10.1038/ncomms5527.
- [6] Larkin SE, Holmes S, Cree IA, et al. Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression [J]. Br J Cancer, 2012, 106(1):157-165. DOI: 10.1038/bjc.2011.490.
- [7] Kang JU, Koo SH, Kwon KC, et al. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2008, 182 (1):1- 11. DOI: 10.1016/j.

- cancercycto.2007.12.004.
- [8] Li XC, Schimenti JC. Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis [J]. PLoS Genet, 2007, 3(8):e130. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030130.
- [9] Wojtasz L, Daniel K, Roig I, et al. Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase [J]. PLoS Genet, 2009, 5(10):e1000702. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000702.
- [10] Roig I, Dowdle JA, Toth A, et al. Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis [J]. PLoS Genet, 2010, 6(8). pii: e1001062. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001062.
- [11] Rao CV, Yamada HY, Yao Y, et al. Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(9): 1469-1474. DOI: 10.1093/carcin/bgp081.
- [12] Huang LY, Chang CC, Lee YS, et al. Activity of a novel Hec1-targeted anticancer compound against breast cancer cell lines in vitro and in vivo [J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(6):1419-1430. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0700.
- [13] Huang LY, Chang CC, Lee YS, et al. Inhibition of Hec1 as a novel approach for treatment of primary liver cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 74(3):511-520. DOI: 10.1007/s00280-014-2540-7.
- [14] Maachani UB, Kramp T, Hanson R, et al. Targeting MPS1 enhances radiosensitization of human glioblastoma by modulating DNA repair proteins [J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(5):852-862. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0462-T.
- [15] Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2 [J]. J Cell Biol, 2001, 154(5):925-936. DOI: 10.1083/jcb.200102093.
- [16] Tipton AR, Tipton M, Yen T, et al. Closed MAD2 (C-MAD2) is selectively incorporated into the mitotic checkpoint complex (MCC) [J]. Cell Cycle, 2011, 10(21):3740-3750. DOI: 10.4161/cc.10.21.17919.
- [17] Sotillo R, Schwartzman JM, Socci ND, et al. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal [J]. Nature, 2010, 464(7287):436-440. DOI: 10.1038/nature08803.
- [18] Iwanaga Y, Chi YH, Miyazato A, et al. Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice [J]. Cancer Res, 2007, 67(1):160-166. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3326.

(收稿日期:2017-02-13)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名体的体征、病名、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“'s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部