

MSI-2小干扰RNA对急性髓系白血病细胞株THP-1细胞增殖及NUMB表达的影响

黄芸菲 牧启田 余梦霞 王云贵 金洁

【摘要】 目的 探讨 Musashi-2 (MSI-2) 基因小干扰 RNA (siRNA) 对急性髓系白血病细胞株 THP-1 细胞增殖的抑制作用及其下游通路基因 NUMB 表达的影响。方法 选择针对 MSI-2 基因三种不同的 siRNA 片段, 在脂质体介导下转染 THP-1 细胞, 采用 MTT 法、集落形成实验及 Annexin V/PI 法分别观察沉默 MSI-2 基因后对细胞增殖、集落生成和细胞凋亡的影响; Western blot 法检测 caspase-3、PARP 和 NUMB 蛋白表达水平。结果 HSS 133730 片段干扰后 MSI-2 mRNA 及蛋白水平的降低最明显。转染 MSI-2 siRNA 24 h 后, THP-1 细胞增殖抑制率为 $(47.89 \pm 7.64)\%$, 明显高于阴性对照组 (无序列) ($P=0.005$)。培养 9 d 后, MSI-2 siRNA 组细胞集落数为 7.50 ± 1.53 , 明显低于阴性对照组的 35.75 ± 7.46 ($P<0.001$); 转染 MSI-2 siRNA 24 和 48 h 后, THP-1 细胞凋亡率分别为 $(15.22 \pm 1.52)\%$ 和 $(33.83 \pm 3.96)\%$, 均明显高于阴性对照组的 $(9.67 \pm 1.27)\%$ 和 $(12.42 \pm 2.07)\%$ (P 值分别为 0.008 和 0.001), 并伴随 caspase-3 和 PARP 剪切增加; 同时也观察到潜在下游基因 NUMB 上调。结论 沉默 MSI-2 基因能抑制 THP-1 细胞增殖, 诱导细胞凋亡; 上调 NUMB 可能是其分子作用机制之一。

【关键词】 基因, MSI-2; RNA, 小分子干扰; THP-1 细胞; 基因, NUMB

Influence of RNA interference on MSI-2 gene in THP-1 cell and expression of NUMB Huang Yunfei, Mu Qitian, Yu Mengxia, Wang Yungui, Jin Jie*. *Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*
Corresponding author: Jin Jie, Email: zjuhematology@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA) for MSI-2 on the growth, apoptosis and NUMB expression of THP-1 cells. **Methods** Three siRNA for MSI-2 gene was designed and transfected into THP-1 cells. The cell inhibition, colony formation and apoptosis were determined. The protein expression of NUMB, caspase-3 and PARP were detected by Western blotting. **Results** After MSI-2 expression of THP-1 cells was down-regulated for 24 hours, cell inhibition of siRNA MSI-2 group was $(47.89 \pm 7.64)\%$, obviously higher than that of negative control group ($P=0.005$). After 9 days, cell colony count of siRNA MSI-2 group was 7.50 ± 1.53 , also lower than that of negative control group (35.75 ± 7.46 , $P<0.001$). In addition, apoptotic rates of siRNA MSI-2 group at 24 hours [$(15.22 \pm 1.52)\%$] and 48 hours [$(33.83 \pm 3.96)\%$] were significantly higher than those of negative control group ($P=0.008$ and $P=0.001$, respectively). Accordingly, activations of caspase-3 and PARP and increased NUMB were observed in siRNA MSI-2 group. **Conclusion** siRNA for MSI-2 gene could increase the expressions of NUMB to inhibit the proliferation and induce apoptosis of THP-1 cells.

【Key words】 Gene, MSI-2; RNA, small interfering; THP-1 cells; Gene, NUMB

Musashi 基因家族包括 Musashi-1 (MSI-1) 和 Musashi-2 (MSI-2), 是一组 mRNA 结合蛋白, MSI-1

在造血干/祖细胞中低表达或不表达, 而 MSI-2 呈现高表达, 对维护后者细胞功能状态起着重要作用^[1]。研究表明, MSI-2 表达水平随慢性髓性白血病 (CML) 进展而逐渐增高, 并与 BCR-ABL 有协同作用。MSI-2 高表达预示急性髓系白血病 (AML) 预后不良^[2]。最近, 我们也发现 MSI-2 高表达不仅是 AML 预后不良指标^[3], 也是急性淋巴细胞白血病 (ALL) 预后风险因素^[4]。然而, MSI-2 基因在急性白血病中具体作用机制尚不清楚。因此, 本研究以 AML 细胞株 THP-1 细胞为研究对象, 观察 MSI-2 沉

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.10.011

基金项目: 宁波市自然科学基金 (2014A610217); 浙江省重点创新团队 (2011R50015)

作者单位: 315211 宁波大学医学院 [黄芸菲 (现在宁波医疗中心李惠利医院检验科 315040)]; 宁波市第一医院 (牧启田); 浙江大学附属第一医院血液科 (余梦霞、王云贵、金洁)

通信作者: 金洁, Email: zjuhematology@163.com

默对细胞增殖、凋亡及潜在靶基因 NUMB 表达的影响,初步探讨 MSI-2 在急性白血病中分子作用机制。

材料和方法

一、细胞株与主要试剂

THP-1 细胞购于中国科学院上海细胞研究所。RPMI 1640 培养基和新生牛血清购于美国 Gibco 公司;脂质体(Lipofectamine™ RNAiMAX)转染试剂和 MSI-2 定量 PCR 引物购于美国 Invitrogen 公司; caspase-3、PARP 和 NUMB 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;MSI-2 和 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;MTT 试剂购于美国 Sigma 公司,Annexin V/PI 试剂盒购自美国 BD 公司。

二、方法

1. 细胞培养:THP-1 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,接种细胞密度为 $(2\sim 5)\times 10^5/\text{ml}$,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,1~3 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

2. 细胞转染:将 THP-1 细胞分为三组,分别采用 3 种不同 siRNA 片段(HSS133729、HSS133730、HSS133731)干扰 THP-1 细胞,同时设置空白对照组和阴性对照组(无关序列 RNA)。采用脂质体(Lipofectamine™ RNAiMAX)转染法转染 siRNA 片段。以 10 nmol/L 阳性对照 RNA(红色荧光标记)按说明书分别接种 THP-1 细胞(细胞密度为 $4\times 10^5/\text{ml}$),转染 24、48 h 后收集细胞,用荧光显微镜和流式细胞仪检测 THP-1 细胞转染率,定量 PCR 和 Western blot 法验证干扰效率并进行后续实验。

3. 实时定量 RT-PCR 法检测 MSI-2 mRNA 表达:提取不同处理组细胞的总 RNA,取 2 μg 总 RNA 为模板,用随机引物反转录合成 cDNA,采用 GAPDH 管家基因作为内参。反应体系为 25 μl : $2\times$ SYBR@ Premix Ex Taq™ II 12.5 μl ,内参基因和目的基因上、下游引物终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$,cDNA 模板 1 μl ,加 DEPC 双蒸水补足 25 μl ,按说明书操作。PCR 条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^\circ\text{C}$ 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 1 min,40 个循环。PCR 收集荧光信号,制作 GAPDH、MSI-2 溶解曲线,均为单一溶解峰提示 PCR 特异性较好。反应体系在 BIO-RAD 仪器上进行,结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

4. Western blot 法检测 MSI-2、PARP、caspase-3 和 NUMB 蛋白表达:收集转染 siRNA 24 h 的 THP-1 细胞并提取蛋白,用 Bradford 法测定样本蛋白浓

度。各组取 50 μg ,经 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白转至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂奶粉溶液封闭液室温封闭 2 h,加入封闭液稀释的一抗(MSI-2 1:2 000)4 $^\circ\text{C}$ 过夜,以 β -actin 为内参。TBST 洗 4 次,每次 10 min;再将 PVDF 膜放入 1:2 000 二抗中室温孵育 2 h 洗膜。用化学发光显色试剂进行显色,凝胶成像系统成像。

5. MTT 法检测 THP-1 细胞的增殖抑制率:将转染 24 h 后的细胞接种于 96 孔板(调整细胞密度为 $4\times 10^5/\text{ml}$),每孔 200 μl ,培养 48 h;加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl ,继续培养 4 h;吸去上清后每孔加入 200 μl 二甲基亚砷,避光振荡 10 min,使蓝紫色结晶充分溶解,酶标仪上读取 570 nm 波长处吸光度(A)值。每组设 5 个平行孔,实验重复 3 次。按下式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

6. 细胞集落生成检测:将转染 siRNA 24 h 后的 THP-1 细胞调整密度为 $1\times 10^3/\text{ml}$,接种于甲基纤维素培养基,进一步观察转染后集落形成能力。

7. 细胞凋亡的检测:选取干扰效率最高的一组细胞,加入 Annexin V 和 PI 溶液染色,混匀后于室温避光孵育,然后上流式细胞仪进行分析。

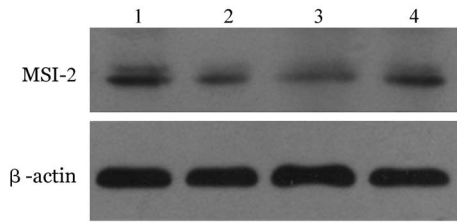
三、统计学处理

应用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MSI-2 siRNA 干扰效率验证:与阴性对照相比,HSS133729、HSS133730 和 HSS133731 转染 24 h 后,THP-1 细胞 MSI-2 mRNA 表达水平分别为 $(69.02\pm 8.45)\%$ 、 $(32.47\pm 12.12)\%$ 和 $(57.50\pm 15.06)\%$ 。Western blot 法对 MSI-2 蛋白表达水平测定结果与 RT-PCR 结果类似,siRNA 转染组条带亮度明显弱于阴性对照组,其中 HSS133730 转染组最弱(图 1)。

2. MSI-2 siRNA 对 THP-1 细胞增殖的影响:转染 MSI-2 siRNA 24 h 后,我们用 MTT 法检测细胞增殖抑制率。结果显示,与阴性对照组相比,HSS133729、HSS133730、HSS133731 转染组 THP-1 细胞增殖抑制率分别为 $(2.09\pm 2.99)\%$ ($47.89\pm 7.64\%$) 和 $(5.23\pm 4.11)\%$ (t 值分别为 1.207、10.850、1.266, P 值分别为 0.351、0.008、0.333)。此外,我们通过甲基纤维素集落形成实验检测集落生成能力。



1: 阴性对照组(无关序列RNA); 2: HSS133729 转染组; 3: HSS133730 转染组; 4: HSS133731 转染组
图1 Western blot 法检测不同 siRNA 片段转染 THP-1 细胞 24 h MSI-2 蛋白表达变化

结果发现,阴性对照组、HSS133729、HSS133730 和 HSS133731 转染组集落数分别为 35.75 ± 7.46 、 36.00 ± 9.56 、 7.50 ± 1.53 和 25.25 ± 4.35 。与阴性对照组相比, HSS133729 转染组集落数无明显变化($t = -0.041, P = 0.968$), HSS133730 组集落数则明显减少($t = 7.382, P < 0.001$), HSS133731 组集落数有减少趋势($t = 2.433, P = 0.051$)。

3. MSI-2 siRNA 干扰对 THP-1 细胞凋亡的影响: 转染 24 h 后, HSS133730 组凋亡率为 $(15.22 \pm 1.52)\%$, 明显高于阴性对照组的 $(9.67 \pm 1.27)\%$ ($t = -4.863, P = 0.008$); 转染 48 h 后, HSS133730 组凋亡率为 $(33.83 \pm 3.96)\%$, 明显高于阴性对照组的 $(12.42 \pm 2.07)\%$ ($t = -8.295, P = 0.001$) (图 2)。Western blot 法检测转染 siRNA 24 h THP-1 细胞凋亡相关蛋白的表达, 结果显示 HSS133730 转染组的 PARP 和 caspase-3 剪切带比阴性对照组明显增高(图 3)。

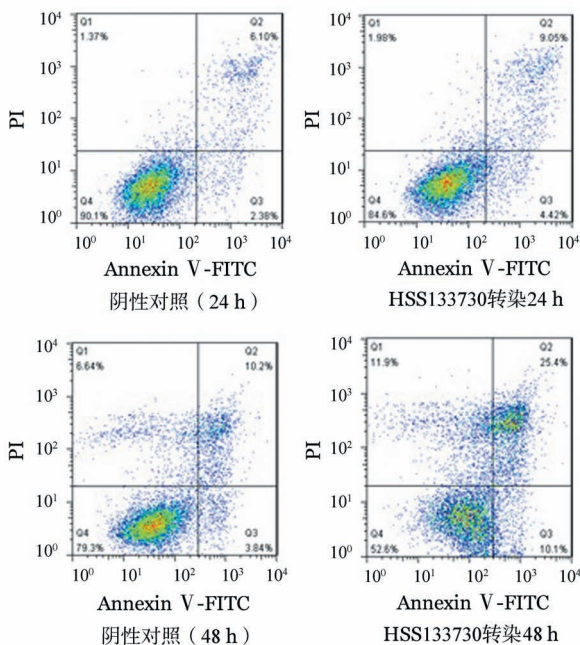
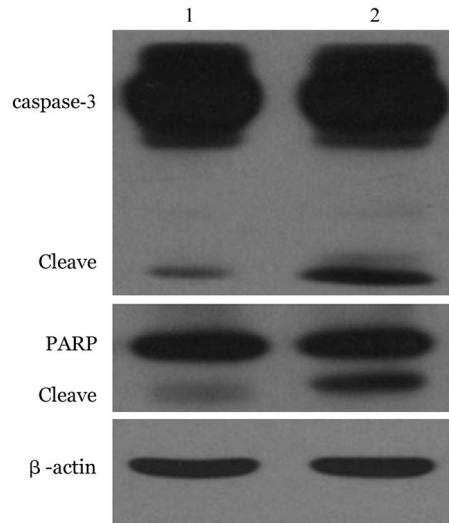
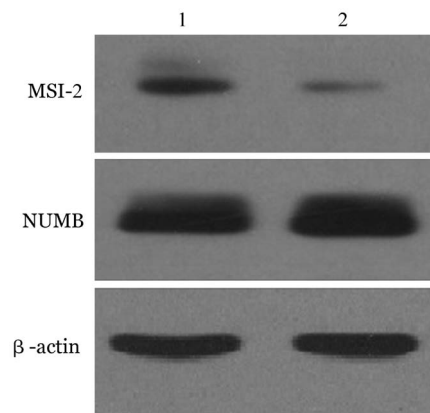


图2 流式细胞术检测 MSI-2 siRNA 干扰对 THP-1 细胞凋亡的影响

4. MSI-2 siRNA 对 MSI-2 潜在下游基因 NUMB 表达的影响: 用 Western blot 检测发现, 与阴性对照组相比, HSS133730 转染组 MSI-2 表达明显下调, 而 NUMB 表达明显上调(图 4)。



1: 阴性对照组(无关序列RNA); 2: HSS133730 转染组
图3 Western blot 法检测 MSI-2 siRNA 对 THP-1 细胞 PARP 和 caspase-3 蛋白表达的影响



1: 阴性对照组(无关序列RNA); 2: HSS133730 转染组
图4 MSI-2 siRNA 对 THP-1 细胞 NUMB 蛋白表达水平的影响

讨 论

AML 是临床上常见的一种造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病。近些年来,随着科学技术不断进步,人们对 AML 分子发病机制的认识已经有了很大的提高,如 FLT3-ITD、NPM1、TET2 等基因突变^[5-7]和 SET、MMP-9 等基因的异常表达^[8-9],这些基因均参与了 AML 发生或发展过程,可能成为治疗靶点。

近年来国外几项研究及我们的研究结果均表明 AML 患者 MSI-2 表达水平高于正常人,并与预后

呈负相关。为此,我们选用 AML 细胞株 THP-1 细胞作为研究对象,观察下调 MSI-2 表达水平对细胞增殖的影响。我们针对 MSI-2 合成 3 个 siRNA 片段,尽管 HSS133729 和 HSS133731 片段使 MSI-2 mRNA 水平有所下降,但不到 50%。而 HSS133730 片段干扰 RNA 后,对 MSI-2 mRNA 抑制最为明显,表达水平为阴性对照组的 32.47%。该 siRNA 片段在转染 THP-1 细胞 24 h 后,细胞增殖抑制率明显高于阴性对照组。此外,甲基纤维素集落形成实验结果也证实转染组集落生成能力明显低于阴性对照组。Park 等^[10]在 小鼠白血病模型中证实:敲除 MSI-2 基因能明显改善小鼠的生存状况,降低白血病细胞的增殖能力。这些结果均提示下调 MSI-2 表达水平,能抑制肿瘤细胞生长,从而也能解释 MSI-2 高表达更易导致 AML 患者治疗失败的现象。我们最近的报道显示 MSI-2 高表达也是成人急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)预后不良指标^[4]。由此可推测,无论是 AML 还是成人 B-ALL,MSI-2 都是潜在治疗靶点。

癌基因通常通过抑制细胞凋亡或干扰细胞周期来促进细胞增殖。为了进一步探索 MSI-2 生物学功能,我们观察沉默 MSI-2 对细胞凋亡的影响。结果表明,沉默 MSI-2 基因 24 h 后,siRNA 组凋亡率为 $(15.22 \pm 1.52)\%$,沉默 48 h 后,凋亡率为 $(33.83 \pm 3.96)\%$,均明显高于相应阴性对照组。同时我们也观察到凋亡相关蛋白 PARP 和 caspase-3 剪切带也明显增高,这些与 Zhang 等^[11]在 K562 细胞株中的研究结果相似。沉默 MSI-2 基因 24 h 后,siRNA 组细胞增殖抑制率为 $(47.89 \pm 7.64)\%$,而此时凋亡率仅为 $(15.22 \pm 1.52)\%$ [阴性对照组为 $(9.67 \pm 1.27)\%$],提示细胞周期阻滞可能也参与其中机制。在将来研究中,我们拟用 caspase 广谱抑制剂抑制细胞凋亡,进一步观察沉默 MSI-2 对细胞周期及周期蛋白影响。

目前 MSI-2 的分子作用机制仍不是很清楚。由于 MSI-2 与 MSI-1 蛋白有 75% 的同源性^[12],因而推测与 MSI-1 类似,MSI-2 能和 NUMB 基因 mRNA 结合来抑制 NUMB 蛋白翻译。而 NUMB 是一个抑癌基因,能通过 NOTCH 途径、p53 途径和 Hedhog 途径发挥生物学功能^[13]。为此,我们观察沉默 MSI-2 基因对 NUMB 蛋白表达水平影响。结果表明,MSI-2 siRNA 处理 THP-1 细胞后,随着 MSI-2 蛋白表达水平下降,NUMB 蛋白表达却增高。提示沉默 MSI-2 基因后,减少了该基因对 NUMB 蛋白负性调

控,从而抑制肿瘤细胞生长。

综上所述,我们发现通过 siRNA 方法下调 THP-1 细胞 MSI-2 表达水平,能抑制细胞增殖和集落形成能力并诱导细胞凋亡,同时观察到 NUMB 表达水平上调。提示 MSI-2 可能通过 NUMB 介导影响细胞增殖和凋亡。

参考文献

- [1] Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia[J]. Nat Med, 2010, 16(8): 903-908.
- [2] Byers RJ, Currie T, Tholouli E, et al. MSI2 protein expression predicts unfavorable outcome in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2011, 118(10): 2857-2867.
- [3] 陆滢, 余梦霞, 牧启田, 等. Musashi2 基因在成人初发急性髓系白血病中的表达及临床意义[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(6):713-717.
- [4] Mu Q, Wang Y, Chen B, et al. High expression of Musashi-2 indicates poor prognosis in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2013, 37(8): 922-927.
- [5] Levis M. FFLT3/ITD AML and the law of unintended consequences[J]. Blood, 2011, 117(26): 6987-6990.
- [6] Balatzenko G, Spassov B, Stoyanov N, et al. NPM1 Gene Type A Mutation in Bulgarian Adults with Acute Myeloid Leukemia: A Single-Institution Study [J]. Turk J Haematol, 2014, 31(1): 40-48.
- [7] Gaidzik VI, Paschka P, Spath D, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group [J]. J Clin Oncol, 2012, 30: 1350-1357.
- [8] 叶佩佩, 余梦霞, 牧启田, 等. SET 基因在急性髓系白血病患者中的表达及其临床意义 [J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(5): 397-402.
- [9] 禹莉, 凌云志, 肖霄, 等. RNA 干扰技术沉默 MMP-9 基因对 THP-1 细胞影响的实验研究. 中华免疫学杂志, 2014, 30(8): 1069-1073.
- [10] Park SM, Gönen M, Vu L, et al. Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program [J]. J Clin Invest, 2015, 125(3): 1286-1298.
- [11] Zhang H, Tan S, Wang J, et al. Musashi2 modulates K562 leukemic cell proliferation and apoptosis involving the MAPK pathway [J]. Exp Cell Res, 2014, 320(1): 119-127.
- [12] de Andrés-Aguayo L, Varas F, Kallin EM, et al. Musashi 2 is a regulator of the HSC compartment identified by a retroviral insertion screen and knockout mice [J]. Blood, 2011, 118(3): 554-564.
- [13] Pece S, Confalonieri S, Romano P, et al. NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 15(1): 26-43.

(收稿日期:2015-04-23)

(本文编辑:王叶青)