

沉默 G 蛋白偶联受体 137 基因 对白血病 K562 细胞增殖的影响

门丽杰 陈海英 刘继筑 张丽 刘国珍 肖太武 王景霞 陈双峰 李光耀

The effect of GPR137 gene silence on K562 cells proliferation Men Lijie, Chen Haiying, Liu Jizhu, Zhang Li, Liu Guozhen, Xiao Taiwu, Wang Jingxia, Chen Shuangfeng, Li Guangyao

Corresponding author: Li Guangyao, Liaocheng Clinical School of Taishan Medical University, Liaocheng 252000, China. Email: lcrmyy@163.com

慢性髓性白血病(CML)是一种起源于异常造血干细胞克隆的骨髓增殖性疾病,是常见的慢性白血病之一,可在各个年龄段发病,其特点是髓细胞的生产过剩^[1]。尽管近年来各种治疗手段不断发展,但仅可以改善患者症状,不能根治本病,也不能阻断其发展,寻找有效抑制白血病的靶标则至关重要。

G 蛋白偶联受体(GPR)是迄今为止最大的膜蛋白家族且参与信号传导。人类基因组中 800 多个基因参与编码该蛋白,占人类基因组总编码基因的 2%^[2]。GPR 是一种整合膜蛋白,包括细胞外的 N 末端、7 层跨膜 α 螺旋结构和细胞内 C 末端,GPR 的激活可将细胞外信号传递至细胞内引起相应细胞反应^[3],对正常细胞及癌细胞的增殖监控具有重要作用。肿瘤细胞通过劫持 GPR 的正常生理功能而得以存活、增殖,进而逃脱免疫系统的监视,增加血管生成,侵袭周围组织或转移到其他器官^[2]。GPR137 也称为 TM7SF1L1、C11orf4 或 GPR-137A,是一种包含 417 个氨基酸的膜蛋白家族,属于孤儿 G 蛋白偶联受体。GPR137 在多种肿瘤细胞中高表达^[4-11],但在白血病中的作用未见报道。鉴于此,本研究构建沉默 GPR137 基因的慢病毒质粒 Lv-shGPR137,探讨 GPR137 基因对白血病 K562 细胞增殖的影响。

材料与方法

1. 质粒与细胞株:慢病毒质粒由武汉浙玛公司构建;293T 包装细胞及慢病毒包装质粒系统由本实验室保存;人 CML 细胞株 K562 由中国医学科学院血液学研究所熊冬生

教授馈赠。

2. 主要试剂:DMEM 培养基及 RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;反转录及 SYBR Green PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;GPR137 抗体购于英国 Abcam 公司;碘化丙啶(PI)及 CCK-8 均为碧云天公司产品;甲基纤维素为美国 Sigma 公司产品。

3. 细胞培养及分组:人胚肾 293T 细胞及人慢性髓性白血病细胞株 K562 细胞分别使用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基及 RPMI 1640 培养基培养,并加入 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。将对数生长期细胞分为空白对照组(未转染组)、阴性对照组(转染无效序列组)和 GPR137 基因沉默组。

4. Lv-shGPR137 慢病毒的包装及 K562 细胞的感染:对数生长期人胚肾细胞株 293T 细胞于转染前 1 d 更换为无血清无抗生素的培养基,细胞融合达 70%~80%后,分别将各重组质粒按照 lipofectamin[™]转染试剂盒(lifescience)说明共转染 293T 细胞。分别将 7 μ g 目的基因载体、7 μ g psPax2 质粒、3 μ g pRSV Rev 质粒和 3 μ g VSV-G 质粒与转染试剂按 1:2.5 比例混匀,室温静置 10 min,将混合好的转染试剂逐滴加入细胞,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,孵育 4~6 h 更换为常规新鲜培养基培养。48 及 72 h 后观察细胞转染效率并收集病毒上清,采用高速离心法浓缩收集病毒上清。浓缩后的病毒分别感染各组 K562 细胞并进行后续实验。

5. 实时 PCR 法检测 K562 细胞中 Lv-shGPR137 mRNA 的表达:K562 细胞感染后 5 d 收集各组细胞,使用 TRIzol 提取细胞总 RNA,取 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA,按 SYBR Green PCR 试剂盒说明进行 PCR 扩增,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 12 s、62 $^{\circ}$ C 退火 40 s,扩增 40 循环;最后 65 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 收集 SYBR Green 荧光信号,生成熔解曲线以确定扩增产物的特异性。目的基因 GPR137 及内参 GAPDH 的引物序列如下:GPR137 基因的上游引物为 5'-CAACGG GAAGTGTGTCAGCGA-3';下游引物为 5'-GGCATAACAGGGT-GGTGTAGG-3';GAPDH 基因的上游引物为 5'-GGACACT-GAGCAAGAGAGGC-3';下游引物为 5'-TTATGGGGTCT-GGGATGGA-3'。采用 ABI7500 检测获取各组 Ct 值,利用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组目的基因相对于对照组的变化倍数来比较基因表达的差异。每组 3 个复孔,实验至少重复 3 次。

6. Western blot 法检测 GPR137 基因在 K562 细胞的敲减水平:K562 细胞感染 5 d 后收集细胞,PBS 洗涤,加入 RIPA 细胞裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF,充分混匀,冰上裂解 30

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.06.018

基金项目:国家自然科学基金(81403263、81573772);山东省科技发展计划(2014GSF118141)

作者单位:252000 山东聊城,聊城市人民医院(泰山医学院聊城临床学院)

通信作者:李光耀,Email:lcrmyy@163.com

min。4℃离心10 min(12 000×g),收集上清,用BCA蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司产品)测定蛋白浓度。每个样品按照4:1的比例加入5×上样缓冲液,煮沸5 min。取20 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,将蛋白转移到PVDF膜,50 g/L脱脂奶粉封闭1 h后,与Anti-GPR137兔多克隆抗体孵育(1:1 000),4℃过夜,PBS洗涤后与1:3 000抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司产品)孵育1 h,采用ECL显色,以Image Lab软件进行灰度分析。

7. CCK-8法检测沉默GPR137基因后K562细胞的活性:1×10⁴个K562细胞接种于96孔板,参照CCK-8试剂盒说明进行操作,K562细胞感染后第5天,每孔(实验孔:含细胞的培养基+毒性物质;对照孔:含细胞的培养基;空白孔:不含细胞的培养基)加入10 μl的CCK-8继续孵育2 h,而后采用STAKMAX™酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值,实验重复3次。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}}{A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}} \times 100\%$$

8. 集落形成实验检测沉默GPR137基因后K562细胞集落形成能力:接种感染后5 d的K562细胞于6孔板(500个/孔),加入含0.9%甲基纤维素的完全培养基2 ml,于37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养,第10天记录细胞集落形成数,大于50个细胞者为1个克隆集落。每组设3个复孔,实验重复3次。按以下公式计算集落形成率:

$$\text{集落形成率}(\%) = \frac{\text{集落形成数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

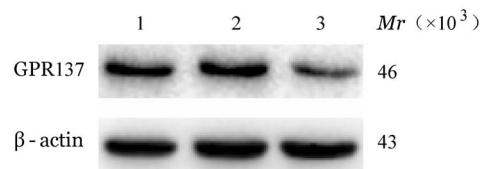
9. 流式细胞术检测沉默GPR137基因后K562细胞周期的变化:收集感染后5 d的K562细胞,调整细胞密度为1×10⁶/ml,逐滴加入预冷的75%乙醇,4℃固定细胞12 h,预冷PBS洗涤后,加入10 μl RnaseA去除样本RNA,25 μl PI 37℃避光孵育1 h,上机检测各组细胞周期分布。

10. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件进行单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1. 重组慢病毒shGPR137对K562细胞的感染效率:本实验获得高滴度的重组慢病毒shGPR137(2×10⁸),K562细胞的感染效率为90%(图1),其感染K562细胞的感染复数(MOI)值为40。

2. 沉默GPR137基因对K562细胞中GPR137mRNA及蛋白的表达的影响:GPR137基因沉默组GPR137 mRNA的表达低于空白对照组和阴性对照组[(11.18±0.97)%对100%,P=0.001;(11.18±0.97)%对(97.99±3.71)%,P=0.003]。GPR137基因沉默组中GPR137蛋白的表达量低于空白对照组和阴性对照组[(23.14±0.04)%对(81.60±0.55)%,P=0.008;(23.14±0.04)%对(80.37±0.17)%,P=0.009](图2)。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:GPR137基因沉默组

图2 沉默GPR137基因对GPR137蛋白表达的影响

3. 沉默GPR137基因对K562细胞增殖的抑制作用:感染后第5天,GPR137基因沉默组细胞的增殖率[(60.89±2.89)%]低于空白对照组(100%)、阴性对照组[(90.27±1.99)%](P值均<0.05),提示沉默GPR137基因可抑制K562细胞的活性。

4. 沉默GPR137基因对K562细胞集落形成的抑制作用:如图3所示,GPR137基因沉默组K562细胞集落形成[(10.60±0.40)%]少于空白对照组[(25.10±0.70)%]和阴性对照组[(24.40±0.40)%](P=0.002,P=0.003)。空白对照组与阴性对照组之间差异无统计学意义(P=0.477)。提示沉默

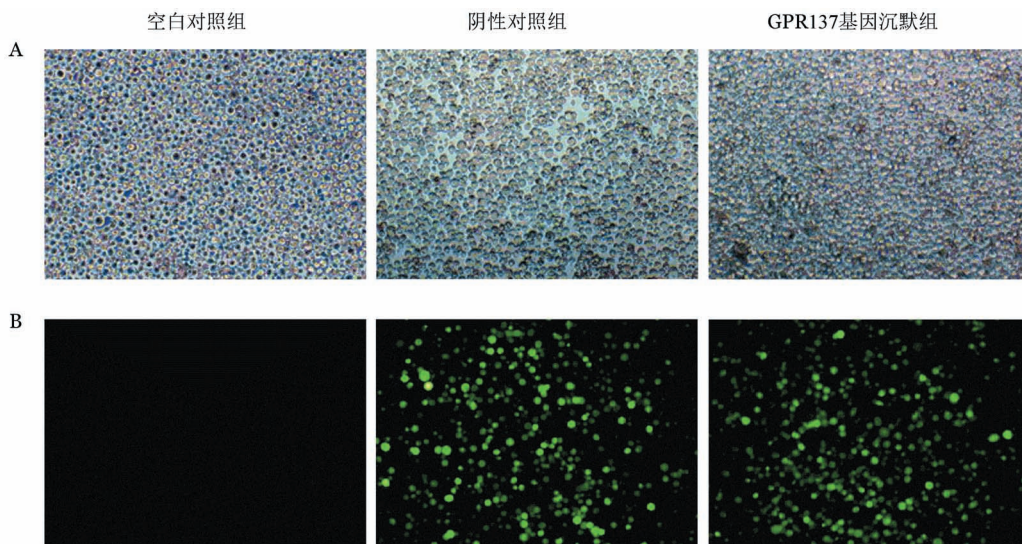


图1 光学显微镜(A)和荧光显微镜(B)下观察慢病毒shGPR137感染K562细胞的效率(×100)

GPR137基因可显著抑制K562细胞的集落形成能力。

5. 流式细胞术检测沉默GPR137基因对K562细胞周期的影响:与阴性对照组比较,GPR137基因沉默组G₀/G₁期细胞比例增高($P=0.001$),G₂/M期细胞比例减少($P=0.001$),表明沉默GPR137基因可使K562细胞停滞在G₀/G₁期(表1)。

表1 流式细胞术检测沉默GPR137基因对K562细胞周期的影响(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白对照组	50.06±0.30	26.36±0.99	23.58±1.30
阴性对照组	50.33±0.01	25.65±2.16	24.02±2.15
GPR137基因沉默组	67.39±0.56 ^a	22.61±0.55	10.00±0.01 ^b

注:同空白对照组比较,^a $P=0.001$;与阴性对照组比较,^b $P=0.001$

讨 论

GPR在多种器官或组织中高表达并影响肿瘤进展,其成员GPR137是一种新型孤儿G偶联蛋白受体,在中枢神经系统、胸腺、内分泌腺、肺癌等普遍表达^[12],诱导肿瘤发生发展过程,但其在白血病发生发展中的作用却未有研究。鉴于此,本课题主要探究GPR家族成员GPR137对白血病K562细胞的作用,通过敲减K562细胞中GPR137基因的表达,研究沉默GPR137基因对K562细胞生物学特性的影响,以揭示其作为白血病治疗靶标的理论基础。课题组成功建立了GPR137对白血病K562细胞作用的研究体系,Lv-shGPR137作用于K562细胞,可有效降低白血病K562细胞中GPR137mRNA及蛋白的表达,证明该研究体系可有效性进行后续GPR137基因在白血病K562细胞中的功能研究。采用该体系研究发现,敲减GPR137基因在白血病K562细胞中的表达,可抑制K562细胞增殖、降低细胞集落形成数目,并使细胞周期阻滞于G₀/G₁期。

GPR137在各种恶性胶质瘤细胞中普遍高表达,沉默GPR137基因可抑制胶质瘤细胞的增殖和集落形成能力,并阻滞胶质瘤细胞的周期进展^[4]。对于消化系统肿瘤,

GPR137可参与肝癌的发生发展过程^[5]、抑制肝癌细胞的增殖、降低肝癌细胞集落形成能力、诱导细胞周期阻滞在G₀/G₁期及G₂/M期,沉默GPR137可促进肝癌细胞凋亡^[6];GPR137也可促进胃肠肿瘤的增殖,敲除GPR137基因可抑制胃癌细胞生长,降低胃癌细胞的增殖^[7]、抑制结肠癌细胞的增殖和集落形成并阻滞细胞周期于G₀/G₁期^[8]。此外,GPR137基因还参与膀胱癌^[9]、胰腺癌^[10]、髓母细胞瘤^[11]等恶性肿瘤的发生发展。与上述研究类似,本研究通过慢病毒介导shRNA敲减K562细胞中GPR137基因的表达,发现K562细胞的增殖能力在GPR137基因沉默组明显降低,细胞集落形成实验进一步证明,敲减GPR137基因后K562细胞形成的集落体积小且数目减少。抑制GPR137基因的表达可有效降低K562细胞增殖及集落形成能力,该作用与GPR137基因调控细胞周期有关。沉默GPR137基因的K562细胞,其G₀/G₁期的细胞比例增加,说明GPR137基因可调控K562细胞的细胞周期,使其阻滞于G₀/G₁期,进而导致细胞增殖能力降低,从而抑制白血病K562细胞的恶性增殖。

目前已发现,GPR137与前列腺特异性气味孤儿受体(PSGR)高度同源,特异性气味孤儿(PSGR)在前列腺正常组织中限制性表达,可作为前列腺癌的诊断标志物^[13]。GPR137也可作为发育不良型纤维鞘(DFS)^[14]或乳腺癌治疗的分子靶点^[15]。本研究初步证实GPR137基因可通过调控细胞周期促进K562细胞的增殖及集落形成,沉默该基因的表达可有效抑制白血病细胞K562的增殖,可能成为慢性白血病治疗的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Yilmaz M, Jabbour E. Tyrosine kinase inhibitors early in the disease course: lessons from chronic myelogenous leukemia [J]. Semin Oncol, 2015, 42 (6):876- 886. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.030.
- [2] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(2):79-94. doi:10.1038/nrc2069.
- [3] Doze VA, Perez DM. G-protein-coupled receptors in adult neuro-

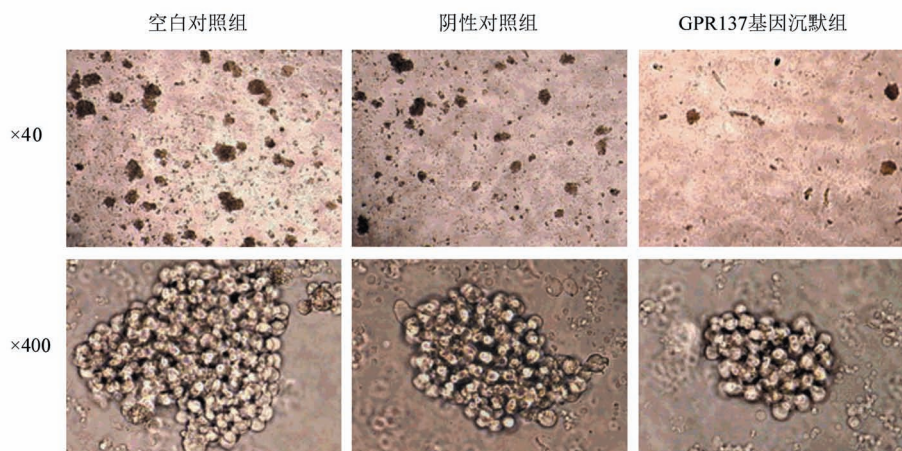


图3 沉默GPR137基因对K562细胞集落形成的抑制作用

- genesis [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(3):645-675. doi: 10.1124/pr.111.004762.
- [4] Zong G, Wang H, Li J, et al. Inhibition of GPR137 expression reduces the proliferation and colony formation of malignant glioma cells [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(11):1707-1714. doi: 10.1007/s10072-014-1817-2.
- [5] Pehkonen P, Welter-Stahl L, Diwo J, et al. Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13:50. doi: 10.1186/1471-2164-13-50.
- [6] Shao X, Liu Y, Huang H, et al. Down-regulation of G protein-coupled receptor 137 by RNA interference inhibits cell growth of two hepatoma cell lines [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(4):418-426. doi: 10.1002/cbin.10412.
- [7] Wang Z, Zhang H, Wang J, et al. RNA interference-mediated silencing of G protein-coupled receptor 137 inhibits human gastric cancer cell growth [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4):2578-2584. doi: 10.3892/mmr.2014.3091.
- [8] Zhang K, Shen Z, Liang X, et al. Down-regulation of GPR137 expression inhibits proliferation of colon cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(11):935-941. doi: 10.1093/abbs/gmu086.
- [9] Du Y, Bi W, Zhang F, et al. G-protein-coupled receptor 137 accelerates proliferation of urinary bladder cancer cells in vitro [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(6):855-860. doi: 10.1002/bab.1329.
- [10] Cui X, Liu Y, Wang B, et al. Knockdown of GPR137 by RNAi inhibits pancreatic cancer cell growth and induces apoptosis [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(6):861-867. doi: 10.1002/bab.1326.
- [11] Wang C, Liang Q, Chen G, et al. Inhibition of GPR137 suppresses proliferation of medulloblastoma cells in vitro [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(6):868-873. doi: 10.1002/bab.1331.
- [12] Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression [J]. *Cell*, 2008, 135(3):561-571. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.040.
- [13] Rigau M, Morote J, Mir MC, et al. PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine [J]. *Prostate*, 2010, 70(16):1760-1767. doi: 10.1002/pros.21211.
- [14] Lima-Souza A, Anton E, Mao S, et al. A platform for evaluating sperm RNA biomarkers: dysplasia of the fibrous sheath--testing the concept [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(5):1061-1066. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.013.
- [15] Venables JP, Klinck R, Bramard A, et al. Identification of alternative splicing markers for breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22):9525-9531. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1769.

(收稿日期:2016-01-13)

(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。冠以外国人名名的体征、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