

shRNA 干扰 mTOR 基因对套细胞淋巴瘤 Jeko-1 细胞增殖抑制及其作用机制研究

郑瑞玑 黄轶群 马旭东

【摘要】 目的 探讨 RNA 干扰沉默 mTOR 基因后对套细胞淋巴瘤 Jeko-1 细胞株增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法 设计针对 mTOR 基因短发夹 RNA, 将其连入 pGPU6/GFP/Neo 质粒中, 构建 mTOR shRNA 真核表达载体, 经脂质体转染入 Jeko-1 细胞, 采用实时定量 PCR 及 Western blot 方法鉴定其干扰效果; 用 MTT 法绘制细胞生长曲线, 经流式细胞术检测细胞凋亡的变化, 用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、procaspase-3、procaspase-9 及 mTOR 下游底物激酶 P70S6K、p-P70S6K 的表达。结果 mTOR shRNA 转染 Jeko-1 细胞后, mTOR 基因的 mRNA 及蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$); 转染组增殖率明显低于 Neg-shRNA 组和空白对照组 ($P < 0.05$), mTOR shRNA 转染 48 h 后, 凋亡率为 $(36.62 \pm 3.24)\%$, 而 Neg-shRNA 组和空白对照组分别为 $(2.58 \pm 1.04)\%$ 、 $(1.24 \pm 0.30)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 凋亡相关蛋白 Bcl-2、procaspase-3、procaspase-9 的表达下降, 而 Bax 表达上升, mTOR 下游底物激酶 P70S6K 未见明显变化, 而其活性形式 p-P70S6K 的表达下降。结论 干扰沉默 mTOR 基因后可通过抑制 mTOR 信号通路的活性, 抑制套细胞淋巴瘤 Jeko-1 细胞增殖, 激活凋亡相关蛋白诱导细胞凋亡。

【关键词】 套细胞淋巴瘤; mTOR 基因; RNA 干扰; Akt/mTOR 信号途径

Antiproliferative effect of silencing mTOR gene on MCL Jeko-1 cell line and its mechanism Zheng Ruiji, Huang Yiqun, Ma Xudong. Department of Hematology, Zhangzhou Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Corresponding author: Huang Yiqun, Email: nchuangyiqun@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of silencing mTOR gene by RNA interference on proliferation and apoptosis, and its mechanism on mantle cell lymphoma Jeko-1 cell Line. **Methods** The hairpin-like oligonucleotide sequences targeting mTOR gene was designed and transfected into Jeko-1 cells by lipofectamine™ 2000. The mTOR mRNA and protein were detected by RQ-PCR and Western blot. Cell growth was determined by MTT. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expressions of Bcl-2, Bax, procaspase-3, procaspase-9, P70S6K, and p-P70S6K were detected by Western blot. **Results** mTOR mRNA was markedly suppressed by shRNA targeting mTOR. mTOR shRNA suppressed proliferation and induced cells apoptosis of Jeko-1 cells. The cell apoptotic rates were $(36.62 \pm 3.24)\%$, $(2.58 \pm 1.04)\%$, $(1.24 \pm 0.30)\%$ respectively, in mTOR shRNA, Neg-shRNA and Blank with statistically significant difference among them ($P < 0.05$). mTOR shRNA down-regulated the expressions of Bcl-2, proCaspase3, proCaspase9 and p-70S6K, up-regulated the expression of Bax. **Conclusion** Deplete of mTOR gene may be realized through inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway to promote the cell apoptosis and inhibit cell growth in Jeko-1 cell line.

【Key words】 Mantle cell lymphoma; Gene, mTOR; RNA interference; Akt/mTOR signaling pathway

Akt/mTOR 信号途径是调控细胞生长、分化、存活的重要通路, 而哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

(mTOR) 是此信号途径中的重要环节, 调节基因表达、细胞生长和增殖^[1], Akt/mTOR 通路持续活化为套细胞淋巴瘤 (MCL) 发生发展的分子生物学机制之一^[2], 因此抑制该信号通路有望成为 MCL 治疗的新靶标。我们通过 shRNA 干扰沉默 MCL Jeko-1 细胞株 mTOR 基因的表达, 观察其对细胞增殖、凋亡及细胞凋亡相关蛋白、mTOR 下游底物激酶 P70S6K

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.012

基金项目: 福建省引进重大研发机构资助项目 (2012J2004)

作者单位: 363000 福建医科大学附属漳州市医院血液内科

通信作者: 黄轶群, Email: nchuangyiqun@126.com

及其活性状态 p-P70S6K 的影响,为 MCL 的治疗提供新的思路。

材料和方法

一、材料

Jeko-1 细胞株购自中国科学院上海细胞库, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司, pGPU6/GFP/Neo 质粒、shRNA 及 PCR 引物均由上海吉玛制药技术有限公司合成, Lipofectamine™ 2000 转染试剂、RNA 提取试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司, 荧光染料 (SYBR Green) 实时定量 PCR (RQ-PCR) 试剂盒购自美国 Promega 公司, Annexin V/PI 双染凋亡试剂盒购自美国 BD 公司, Bcl-2、Bax、procaspase-3、procaspase-9、mTOR、P70S6K、p-P70S6K、 β -actin 鼠抗人一抗、羊抗鼠二抗及 Western blot 化学发光工作液均购自美国 Santa Cruz 公司。

二、实验方法

1. shRNA 的合成: 针对 mTOR 区域选择作用靶点, 根据确定序列的原则设计以下序列, 委托上海吉玛制药技术有限公司合成。

正义链: 5'-GATCCCCTGAGAGGAAAGGTG-GCATCTTCAAGAGAGATGCCACCTTCTCTC-ATTTTAA-3'; 反义链: 5'-GGGACTCTCCTTTCACCGTAGAAGTTCTCTCTACGGTGGAAAGG-AGAGTAAAAATTCGA-3'。

2. 细胞培养: Jeko-1 细胞株用含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 隔天换液传代培养, 实验时取对数生长期细胞。

3. 转染: 设定空白对照组、Neg-shRNA 组、mTOR shRNA 组。取对数生长期的 Jeko-1 细胞, 接种在 6 孔培养板上, 每孔 2×10^6 个细胞, 用低血清、无双抗的培养基 Opti-MEM 250 μ l 分别稀释 Lipofectamine™ 2000 15 μ l、Neg-shRNA 对照 1.0 μ g、mTOR shRNA 1.0 μ g, 将稀释后的 Lipofectamine™ 2000 室温放置 5 min 后与稀释的 mTOR shRNA 混合, 室温放置 20 min 方便形成转染复合物 0.5 ml, 在含有细胞的无抗培养基中加入转染复合物使终体积为 2 ml。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 48 h 后, 倒置荧光显微镜下计数发出绿色荧光的转染阳性细胞, 计算转染效率。并收集细胞, 检测 mTOR mRNA 表达及蛋白表达水平。

4. RQ-PCR 检测 mTOR mRNA 表达:

(1) 根据 Gene Bank 中的 mTOR 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物。mTOR 上游引物: 5'-CCGCTGAGTACGTGGAATTTGAG-3', 下游引物: 5'-GAAGAAGGTAGGGACGCTGATGG-3'。 β -actin 上游引物: 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3', 下游引物: 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'。

(2) 根据 TRIzol 说明书提取总 RNA, 用分光光度法检测 RNA 的浓度和纯度, 吸光度 (A)₂₆₀/ A ₂₈₀ 比值均为 1.8 ~ 2.0, 逆转录为 cDNA。PCR 扩增参数如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s; 60 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 30 s; 扩增 30 个循环; mTOR 和 β -actin 扩增出的片段大小分别为 128 和 155 bp。实验同时设空白对照组。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号。调节基线至适宜处, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据 $\Delta Ct = Ct_{\text{GENE}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$ 计算检测基因 mRNA 相对表达量, 每组重复 3 次, 取平均值。

5. mTOR shRNA 对 Jeko-1 细胞增殖的影响: 取对数生长期细胞, 细胞接种在 6 孔板中, 2×10^4 个/孔, 终体积为 200 μ l。实验分 3 组: 对照组、Neg shRNA 组、mTOR shRNA 组, 同时设立空白对照组 (只加培养液), 每组各设 3 个复孔。转染后置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养液中继续培养。分别设置 24、48、72、96 h 收获细胞, 实验结束前 4 h 取出一块板, 每孔加 20 μ l MTT 5 mg/ml, 继续培养 4 h, $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 每孔加 DMSO 150 μ l, 避光振荡 10 min, 充分溶解结晶物, 在酶标仪上测 A_{492} 和 A_{630} 值, 记录实验结果, 并计算细胞增殖率。细胞增殖率 (%) = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

6. mTOR shRNA 对 Jeko-1 细胞凋亡的影响: 将对照组 (只加脂质体)、Neg shRNA 组 (转染阴性质粒)、mTOR shRNA 组 (转染 mTOR 的 shRNA 质粒) 作用 48 h 的细胞, 按照美国 BD 公司 Annexin V 和 PI 双染试剂盒说明书处理后, 立即行流式细胞术检测。

7. mTOR shRNA 对 Jeko-1 细胞凋亡相关蛋白及对 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的影响: 离心收集细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 吸干洗涤液。按 1×10^6 细胞加入 100 μ l 裂解液 + 1 μ l 酶抑制剂的比例冰上裂解细胞 30 min, $4\ ^\circ\text{C}$ $10\ 000 \times g$ 离心 10 min, 吸取中间清亮层。BCA 法进行蛋白定量。以 120 g/L 的 SDS-PAGE 电泳分离, 电转移法转膜, 室温下摇床封

闭1 h,加入用TBS稀释的一抗,4℃过夜,TBS洗涤液洗膜后分别放入用TBS按1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下摇床作用1 h,TBS洗涤液洗膜后化学发光法显色,X射线底片曝光,以 β -actin为内参照,X射线胶片扫描后,ALphaDigiDoc图像分析软件进行分析比较。

8. 统计学处理:采用SPSS17统计软件进行分析。常规进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料以均数 \pm 标准差表示,单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. mTOR shRNA 下调 Jeko-1 细胞 mTOR mRNA 和 mTOR 蛋白表达:mTOR shRNA 处理 Jeko-1 细胞 48 h 后,倒置荧光显微镜下计数转染阳性细胞,计算转染效率,转染率为 $(40.72 \pm 4.51)\%$,采用实时定量 PCR 方法检测 mTOR mRNA 的变化,mTOR shRNA 组 0.052 ± 0.013 ,Neg-shRNA 组 0.462 ± 0.042 ,对照组 0.447 ± 0.038 ,差异有统计学意义($P < 0.05$);Western blot 方法检测 mTOR 蛋白表达,结果也呈浓度依赖性下降。

2. mTOR shRNA 抑制 Jeko-1 细胞增殖:mTOR shRNA 处理 Jeko-1 细胞 48 h 后,对照组细胞增殖率为 $(98.56 \pm 1.04)\%$,同 Neg shRN 组 $[(94.82 \pm 1.23)\%]$ 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 mTOR shRNA 组显著降低 $[(61.42 \pm 2.21)\%]$,与前两组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。证明 mTOR shRNA 可有效抑制 Jeko-1 细胞增殖能力(图1)。

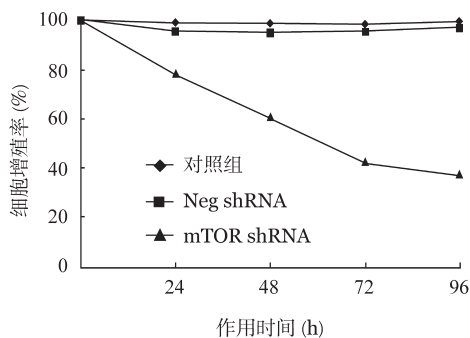


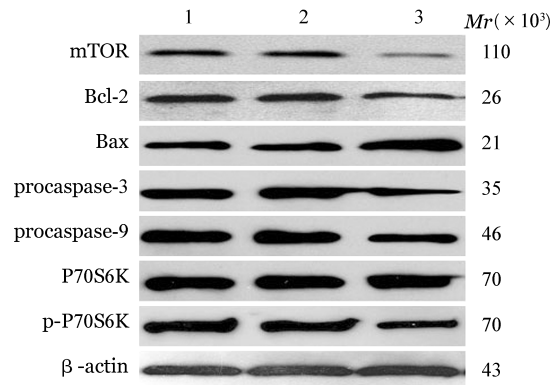
图1 MTT法检测mTOR shRNA处理后Jeko-1细胞增殖率变化

3. mTOR shRNA 诱导 Jeko-1 细胞凋亡:mTOR shRNA 转染 48 h 后,凋亡率为 $(36.62 \pm 3.24)\%$,而 Neg-shRNA 组和空白对照组分别为 $(2.58 \pm 1.04)\%$ 、 $(1.24 \pm 0.30)\%$,差异有统计学意义($F=36.24$,

$P < 0.01$)。

4. mTOR shRNA 上调凋亡蛋白 Bax,下调 Jeko-1 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、procaspase3、procaspase9 的表达:Western blot 方法检测干扰 mTOR 基因表达后,促凋亡蛋白 Bax 表达增加,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,凋亡效应因子 procaspase3、procaspase9 降解,细胞凋亡发生(图2)。

5. mTOR shRNA 抑制 Jeko-1 细胞 Akt/mTOR 信号途径 mTOR 下游底物激酶 P70S6K 磷酸化:Western blot 方法检测 Akt/mTOR 信号途径 mTOR 下游底物激酶 P70S6K 总蛋白未见明显变化,但是活性形式 p-P70S6K 的表达下降(图2)。干扰 mTOR 基因表达后,Akt/mTOR 信号途径相关蛋白的磷酸化下降,活性下降。



1:对照组;2:Neg-shRNA组;3:mTOR shRNA组

图2 Western blot法检测mTOR shRNA处理48 h后Jeko-1细胞蛋白表达变化

讨 论

MCL 占非霍奇金淋巴瘤(NHL)的6%,最具特点的是过度表达 Cyclin D1,被认为是兼有惰性和侵袭性的恶性淋巴瘤,大多数患者无法治愈,是一种难治的恶性淋巴瘤,5年生存率约25%^[3]。因此探索新的有效治疗途径有重要的临床意义。

信号传导通路异常在许多恶性肿瘤包括淋巴瘤的发病机制中具有重要作用,其相关分子的靶向治疗也是肿瘤研究中的重要方向。PI3K/Akt/mTOR 信号通路持续性激活与多种肿瘤,包括直肠癌、肺癌、前列腺癌等肿瘤发生密切相关^[4-5]。活化的 PI3K 可激活下游的 Akt,激活的 Akt 使将信号传递给多种下游底物,mTOR 即为 Akt 下游底物之一,mTOR 属于 PI3K 蛋白激酶类家族,是一类进化上非常保守的

蛋白激酶, mTOR 再作用于下游的众多底物, P70S6K(核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶)是研究较清楚的 mTOR 下游靶分子,也是蛋白质合成中重要的调控因子。P70S6K 是一种核糖体蛋白激酶,被 mTOR 磷酸化后激活,进而磷酸化 S6 蛋白,调控含有 5'TOP 结构的 mRNAs 的翻译起始^[6]。异常激活的 mTOR 可以引起肿瘤细胞的快速增殖、凋亡抑制、细胞周期加快、促进细胞侵袭和转移^[7], mTOR 异常活化在恶性肿瘤发生、发展中发挥重要作用,已成为具有潜在价值的恶性肿瘤治疗的分子靶点^[8]。抑制 mTOR 的功能可以消除由 PI3K/Akt/mTOR 信号通路介导的增殖信号,使细胞周期阻滞,抑制肿瘤生长。到现在为止,已有多种 mTOR 抑制剂被有效地应用于临床,体内外实验均证明 mTOR 抑制剂可以阻断细胞周期,促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长,抑制肿瘤血管生成等^[9-10]。但是 mTOR 抑制剂存在着特异性作用不强和效率不高等问题而限制应用。

本实验我们针对 mTOR 基因设计干扰质粒,脂质体导入套细胞淋巴瘤 Jeko-1 细胞株后,发现 mTOR 基因的 mRNA 及蛋白的表达下降,提示 mTOR 基因的表达被干扰沉默,而蛋白免疫印迹检测发现,下游 P70S6K 蛋白总蛋白未见明显变化,但是活性的磷酸化形式表达下调,提示干扰 mTOR 基因后,可以抑制 Akt/mTOR 信号途径的活性。进一步研究发现细胞增殖率明显下降,提示 shRNA 靶向沉默 mTOR 基因表达可以抑制 Jeko-1 细胞的增殖。干扰组的细胞凋亡率为 $(36.62 \pm 3.24)\%$, 而 Neg-shRNA 组和空白组分别为 $(2.58 \pm 1.04)\%$ 、 $(1.24 \pm 0.30)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), shRNA 靶向沉默 mTOR 基因表达可以诱导套细胞淋巴瘤 Jeko-1 细胞凋亡。细胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase 是引起细胞凋亡的途径之一^[11], Akt 信号通路通过抑制 caspase 级联反应对细胞凋亡进行调节。本次实验结果显示,靶向沉默 mTOR 基因可促使凋亡酶 procaspase3、procaspase9 剪切为活性亚基 caspase3、caspase9 增加,上调促凋亡蛋白 Bax, 抑制蛋白 Bcl-2 的表达则受到抑制,促进细胞的凋亡。

本实验我们探讨了 RNA 干扰沉默 mTOR 基因后对体外培养 MCL Jeko-1 细胞株的影响,实验结果显示, RNA 干扰沉默 mTOR 基因后可以抑制细胞生长、诱导 Jeko-1 细胞凋亡,其机制可能系抑制 Akt/mTOR 通路活性,通过活化凋亡执行分子 procaspase3 实现,为 MCL 抗癌药物和基因治疗靶点的选择提供新的思路。

参考文献

- [1] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 550-562.
- [2] Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma[J]. Blood, 2006, 108(5):1668-1676.
- [3] Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(4): 511-518.
- [4] Knowles MA, Platt FM, Ross RL, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(3-4): 305-316.
- [5] LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations[J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(1-2): 32-50.
- [6] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR[J]. Genes Dev, 2004, 18(16):1926-1945.
- [7] Hixon ML, Paccagnella L, Millham R, et al. Development of inhibitors of the IGF-IR/PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Rev Recent Clin Trials, 2010, 5(3):189-208.
- [8] Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy[J]. Oncogene, 2006, 25(48):6436-6446.
- [9] Faivre S, Kroemer G, Raouf E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(8):671-688.
- [10] Humer R, Kiefer FN, Berns H, et al. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling[J]. FASEB J, 2002, 16(8):771-780.
- [11] Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(2): 237-249.

(收稿日期:2014-07-29)

(本文编辑:董文革)