

• 论 著 •

UbcH10 基因沉默对多发性骨髓瘤 U-1996 细胞增殖和凋亡的作用研究*

奚昊¹, 赵黎明², 姜华¹, 李璐¹, 侯健^{1△}

(1. 第二军医大学长征医院血液内科, 上海 200003; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院呼吸内科, 上海 218307)

摘要:目的 采用脂质体法转染 siRNA 的方法沉默多发性骨髓瘤 U-1996 细胞中的 UbcH10 基因, 研究基因沉默后 U-1996 细胞增殖活性及凋亡等生物学特性的变化情况。方法 根据 UbcH10 基因信息, 设计针对 UbcH10 基因编码序列(CDS)区的 siRNA 序列。通过脂质体法转染相关 siRNA 序列至多发性骨髓瘤 U-1996 细胞。在转染 siRNA 后 48 h, 采用实时定量聚合酶链反应及蛋白免疫印迹法检测 U-1996 细胞中 UbcH10 基因的 mRNA 和其蛋白水平。选取未转染 siRNA 序列的空白组和转染阴性 siRNA 序列组作为试验对照, 采用 CCK-8 法检测转染 siRNA 序列后 24、48、72 h U-1996 细胞的增殖情况, 采用流式细胞术检测 48 h 后 U-1996 细胞的凋亡情况。结果 通过脂质体法成功转染构建 siRNA 序列至 U-1996 细胞。转染后的 U-1996 细胞中 UbcH10 基因的 mRNA 及蛋白表达情况较转染前均明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。和对照组相比, 沉默 UbcH10 基因后 U-1996 细胞的增殖活性下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 细胞凋亡率上升, 差异也有统计学意义($P < 0.05$)。结论 干扰 UbcH10 基因表达可显著抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖活性并增加细胞凋亡。

关键词: UbcH10; 多发性骨髓瘤; siRNA; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.12.002 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)12-1603-03

The effects of UbcH10 gene silencing on proliferation and apoptosis research of multiple myeloma U-1996 cell*

XI Hao¹, ZHAO Liming², JIANG Hua¹, LI Lu¹, HOU Jian^{1△}

(1. Department of Hematology, Changzheng Hospital, Secondary Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Respiratory Disease, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Secondary Military Medical University, Shanghai 218307, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of UbcH10 gene silencing on proliferation and apoptosis of myeloma cell line U-1996. **Methods** According to the UbcH10 genetic information, the siRNA sequence targeting UbcH10 was designed. It was transfected into U-1996 cells via lipofectamine2000. UbcH10 mRNA and protein were examined 48 h after transfection FQ-PCR and western blot, respectively. Cells without transfection were served as blank controls and those transfected with negative sequence as negative controls. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay 24 h, 48 h and 72 h after transfection, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry 48 h after transfection. **Results** The siRNA sequence was transfected into U-1996 cells via lipofectamine successfully. The expression level of UbcH10 mRNA and protein was significantly decreased than before transfection ($P < 0.05$). Compared with control group, the proliferative activity of U-1996 cells after UbcH10 gene silencing was significantly decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** UbcH10 gene silencing can significantly inhibit the proliferative activity of U-1996 cells and increase the cells apoptosis.

Key words: UbcH10; multiple myeloma; siRNA; proliferation; apoptosis

多发性骨髓瘤(MM)是一种骨髓浆细胞恶性疾病。自 20 世纪末期以来,随着蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂为代表的新药出现,MM 患者的治疗有效率得以明显提高,生存期逐渐增加。尽管如此,目前国际上仍认为 MM 是不能被治愈^[1]。UbcH10 基因是泛素结合酶 E2(E2C)基因家族成员,在泛素-蛋白酶体途径(UPP)中具有重要的生物学作用^[2]。而目前许多研究结果表明,UbcH10 具有原癌基因的性质,参与了多种肿瘤的发生和发展进程^[3]。本研究拟通过应用 siRNA 技术在 MM 患者 U-1996 细胞中干预 UbcH10 基因的表达,观察 UbcH10 基因沉默后 MM 患者细胞增殖和凋亡的变化情况,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人 MM 细胞株 U-1996 购自中科院上海细胞所; RPMI1640 试剂、胎牛血清和脂质体系统 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;反转录聚合酶链反应(RT-PCR)试

剂盒及 DNA 合成试剂盒购自日本 Takara 公司;兔抗人 UbcH10 多克隆抗体购自美国 R&D 公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒购自日本同仁公司;流式细胞仪及细胞凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 UbcH10 基因的 siRNA 序列设计、合成及转染 检索 UbcH10 基因编码序列(CDS)区数据信息(Genebank 序列号为 NM_007019.2),应用 siRNA 序列设计软件构建相应的 siRNA 序列(5'-GGC TAC AGC AGG AGC TGAT-3'),并合成互补双链 siRNA。收集 U-1996 细胞,按照 2×10^5 个/孔的浓度,接种到 6 孔板,放置在 37.0°C 和 5% CO_2 的细胞培养箱内过夜。培养 24 h 后,按照 Lipofectmaine2000 说明书进行 siRNA 转染操作。48 h 后,通过实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测 U-1996 细胞内的 UbcH10 mRNA 及蛋白水平。

1.2.2 实时定量 PCR 检测 UbcH10 mRNA 水平 取转染

* 基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(81372529)。

作者简介:奚昊,男,主治医师,主要从事多发性骨髓瘤临床及基础研究。△ 通讯作者,E-mail:hujian@medmail.com.cn。

UbcH10-siRNA 后 48 h 的 U-1996 细胞, 采用 TRIzol 法抽提总 RNA, 按照试剂盒设定步骤反转录合成 cDNA。然后进行 PCR 检测转染 siRNA 后的 U-1996 细胞 UbcH10 mRNA 水平。UbcH10 特异性引物序列: 上游 5'-ACC CTC ATG ATG TCT GGC GAT AAA-3', 下游 5'-GTG ATA GCA GGG CGT GAG GAA CTT-3'; 内部参照 β -actin 引物序列: 上游 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3', 下游 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'。反应条件: 95.0 °C, 10 min; 60.0 °C, 20 min; 72.0 °C, 20 min, 共 40 个循环。数据分析: Ct 值通过应用交点法计算得到, 相对定量结果则通过 Δ Ct 来说明, UbcH10 相对于 β -actin 的表达量为 $2^{\Delta Ct} = 2^{Ct_{UbcH10} - Ct_{\beta-actin}}$ 。

1.2.3 蛋白免疫印迹法检测 UbcH10 蛋白水平 UbcH10-siRNA 转染 U-1996 细胞后继续培养 48 h, 收集 U-1996 细胞, 加入裂解液, 然后提取总蛋白, 应用二喹啉甲酸(BCA)法行蛋白质水平测定。此后再行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用 5% 的脱脂奶粉溶液 37.0 °C 封闭 2 h, 加入兔抗人 UbcH10 多克隆一抗, 然后 4.0 °C 过夜; 此后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次, 加入二抗, 孵育 2 h, 再用 PBS 洗涤 3 次, 给予 ECL 显色检测。最后通过 Image-Pro Plus 8.0 软件对所形成的条带光密度加以扫描并给予分析。

1.2.4 CCK-8 法检测 U-1996 细胞增殖能力 取 UbcH10-siRNA 转染后 24 h 的 U-1996 细胞, 以 1×10^5 个/mL 水平(每孔 100 μ L)接种到 96 孔板中, 分别于接种后 24、48 和 72 h 采用 CCK-8 法检测细胞活性。每孔加入 CCK-8 液 10 μ L, 放置于 37.0 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱内继续温育 4 h, 用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度(A)值, 根据结果绘制 U-1996 细胞生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测 U-1996 细胞凋亡情况 取 UbcH10-siRNA 转染后 48 h 的 U-1996 细胞, 用 PBS 洗涤 2 遍, 以 3 200 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用 $1 \times$ Binding Buffer 500 μ L 重悬细胞, 流式细胞仪检测 U-1996 细胞的凋亡情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较多组间差异, 采用 *t* 检验比较两组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

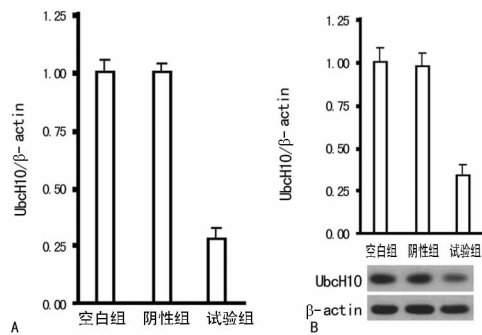
2 结 果

2.1 基因沉默前、后 UbcH10 水平检测 实时定量 PCR 检测结果见图 1A, UbcH10-siRNA 转染组(试验组)U-1996 细胞中 UbcH10 基因 mRNA 水平较空白对照组(空白组)、转染阴性序列组(阴性组)显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白免疫印迹法检测结果见图 1B, UbcH10-siRNA 转染后试验组 U-1996 细胞 UbcH10 蛋白表达水平较空白组、阴性组下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 UbcH10 基因沉默后 U-1996 细胞增殖活性检测 见图 2。CCK-8 法检测结果显示, 采用 UbcH10-siRNA 转染后 48 h, 试验组 U-1996 细胞增殖活性较空白组、阴性组分别下降了 24.3% 和 31.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 转染后 72 h, 增殖活性分别下降了 52.8% 和 68.6%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 UbcH10 基因沉默后 U-1996 细胞凋亡率检测 见图 3。转染 UbcH10-siRNA 进入 U-1996 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测试验组的细胞凋亡率为 $(65.95 \pm 10.14)\%$, 而空白组和阴性组分别为 $(18.13 \pm 2.49)\%$ 和 $(16.94 \pm 2.26)\%$ 。与空白组和阴性组比较, 试验组 U-1996 细胞凋亡率显著上升, 差异有统

计学意义($P < 0.05$)。



注: A 为 UbcH10 mRNA; B 为 UbcH10 蛋白。

图 1 转染 siRNA 后 U-1996 细胞 UbcH10 mRNA 及蛋白水平检测

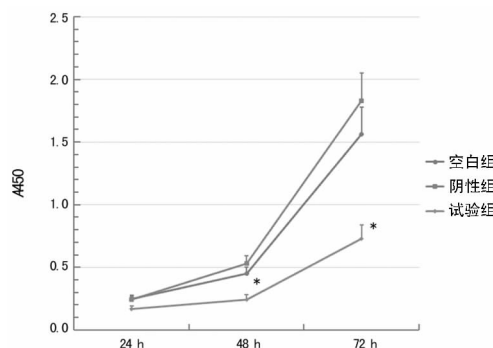


图 2 转染 UbcH10-siRNA 后 U-1996 细胞增殖活性检测

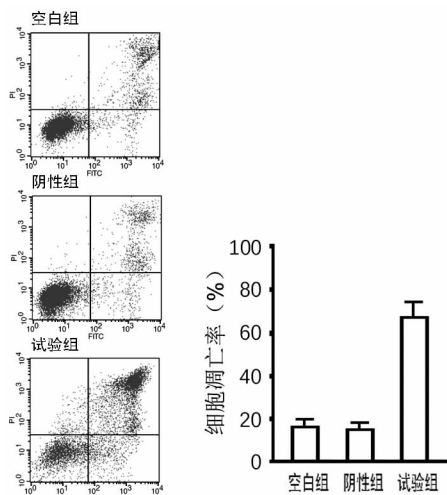


图 3 转染 siRNA 48 h 后 U-1996 细胞凋亡率检测

3 讨 论

在中国, 随着居民寿命延长, MM 发病人数呈逐年增高的趋势。近年来, 针对 MM 的治疗出现了一些新型靶向药物, 一定程度上提高了 MM 患者的治疗缓解率^[4]。但是绝大多数 MM 患者都会出现复发和(或)耐药的情况, 最终导致死亡。因此, 积极深入研究 MM 的发病机制, 探索 MM 治疗的新靶点、新手段, 创新改变 MM 治疗策略, 对于改善 MM 患者的预后是十分重要的。

UPP 是众多调控蛋白转录后降解的主要方式, 对于维持细胞正常的生命活动具有重要作用, 而 E2C/UbcH10 正是其核心成员之一^[5]。有文献报道, UbcH10 基因与许多肿瘤的发生、进展关系密切, 如结肠癌、肺癌、淋巴瘤等^[6]。最初 Okamo-

to 等^[7]通过对一些恶性肿瘤组织、正常对照组织及相应的肿瘤细胞株中 17 种 E2C 家族成员 mRNA 的检测发现,其中 UbcH10 mRNA 在多个肿瘤组织及细胞株中表达增加。有学者进一步研究发现,UbcH10 基因不仅在多种肿瘤组织中呈高表达,并与这些恶性肿瘤的分化程度有密切关联。而且如果在转基因小鼠上对 UbcH10 基因进行过度表达技术干预,可诱发转基因小鼠发生肿瘤^[8]。由此认为,UbcH10 具有一定原癌基因的特性。近年来随着生物科学技术的发展,基因调控技术已成为目前肿瘤治疗的新手段之一。许多研究显示,应用转染 UbcH10 siRNA 的方法干扰 UbcH10 在肿瘤细胞中的表达后,可以使肿瘤细胞的增殖活性受到抑制,同时还能阻滞肿瘤细胞的细胞周期,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的。Jiang 等^[9]在 U251 细胞株中采用 siRNA 技术沉默 UbcH10 基因的表达,发现 U251 细胞的增殖活性明显下降。Zhao 等^[10]发现 UbcH10 基因不但在非小细胞肺癌患者肿瘤组织中呈过度表达状态,而且还是非小细胞肺癌患者的独立预后不良因素。同时应用小分子 RNA 干扰 UbcH10 的表达同样可以抑制肺癌 SK-MES-1 细胞的增殖活性,并可增加吉西他滨和紫杉醇对 SK-MES-1 细胞化疗的敏感度。Wang 等^[11]研究显示,对乳腺癌 MCF-7 细胞进行 UbcH10 基因敲除后,可逆转 MCF-7 细胞对阿霉素等细胞毒药物的耐药性。上述研究均提示 UbcH10 可能是一个肿瘤基因治疗的有效靶点。

众所周知,UPP 在 MM 的发病机制中有重要作用,而 E2C 作为 UPP 中的重要组成部分,是如何影响 MM 细胞的生物学特征,目前对此少有研究报道^[12]。本试验通过设计构建针对 UbcH10 基因的 siRNA,并应用脂质体法转染至 MM 细胞株 U-1996 中,通过检测转染后 U-1996 细胞中 UbcH10 mRNA 及蛋白的相对水平,证实可显著减少 UbcH10 mRNA 和蛋白水平。同时 UbcH10 基因沉默可以显著抑制 U-1996 细胞的增殖活性,并通过流式细胞仪检测也进一步证实 UbcH10 基因沉默还能够增加 U-1996 细胞的凋亡。因此,本文认为通过基因沉默 UbcH10 的表达,可以影响 MM 细胞增殖和凋亡的生物学特性,进而抑制 MM 细胞生长。

近年来,肿瘤基因治疗研究发展迅速,已成为肿瘤生物治疗领域中的一个重要组成部分,而寻找与肿瘤发病密切相关的关键靶点基因,并能够通过各种干预技术达到防治肿瘤的目的,这是目前该领域研究的核心问题。本试验正是通过沉默人体内 UPP 中关键基因 E2C/UbcH10 的表达,发现能够抑制多发性 MM 细胞的增殖活性,并增加凋亡率,这为今后 MM 的基因治疗开拓了新思路。

参考文献

[1] Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and

treatment[J]. Mayo Clin Proc, 2005, 80(10): 1371-1382.

[2] Datta K, Suman S, Kumar S, et al. Colorectal carcinogenesis, radiation quality, and the ubiquitin-proteasome pathway[J]. J Cancer, 2016, 7(2): 174-183.

[3] Xie C, Powell C, Yao M, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C: a potential cancer biomarker[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 47(2): 113-117.

[4] 奚昊, 侯健. 老年多发性骨髓瘤诊治策略[J]. 实用老年医学, 2013, 27(9): 712-716.

[5] Nath S, Banerjee T, Sen D, et al. Spindle assembly checkpoint protein Cdc20 transcriptionally activates expression of ubiquitin carrier protein UbcH10 [J]. J Biol Chem, 2011, 286(18): 15666-15677.

[6] 赵黎明, 孙光远, 娄丽蓉, 等. UbCH10 基因沉默对肺癌 NCI-H226 细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(6): 608-612.

[7] Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, et al. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme[J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 4167-4173.

[8] van Ree JH, Jeganathan KB, Malureanu L. Overexpression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH10 causes chromosome missegregation and tumor formation [J]. J Cell Biol, 2010, 188(1): 83-100.

[9] Jiang L, Bao Y, Luo C, et al. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(2): 211-217.

[10] Zhao LM, Jiang L, Wang LZ, et al. UbcH10 expression provides a useful tool for the prognosis and treatment of non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11): 1951-1961.

[11] Wang C, Pan YH, Shan M, et al. Knockdown of UbcH10 enhances the chemosensitivity of dual drug resistant breast cancer cells to epirubicin and docetaxel[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(3): 4698-4712.

[12] Lub S, Maes K, Menu E, et al. Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2015, 7(6): 6521-6537.

(收稿日期: 2016-01-13 修回日期: 2016-03-20)

(上接第 1602 页)

J Clin Oncol, 2011, 29(15): 1987-1996.

[8] Wu DP, Du X, Jin J, et al. Decitabine for treatment of myelodysplastic syndromes in Chinese patients: an Open-Label, phase-3b study[J]. Adv Ther, 2015, 32(11): 1140-1159.

[9] 高苏, 仇惠英, 金正明, 等. 地西他滨单药及联合半程和全

程 CAG 方案治疗骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病疗效观察[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(11): 961-965.

[10] 邵秀茹, 梁红, 关晓军, 等. 地西他滨治疗中、高危骨髓增生异常综合征患者的临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11): 789-791.

(收稿日期: 2016-01-21 修回日期: 2016-03-16)