

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.009

· 基础研究 ·

慢病毒介导 *bcr/abl* 基因 RNAi 对白血病 K562 细胞生物学特性的影响

吴枝娟^{1,2}, 许建华^{1*}, 黄秀旺¹, 吴丽贤¹ (1. 福建医科大学药学院临床药理学研究所, 福建福州 350004; 2. 福建医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 福建福州 350004)

[摘要] 目的: 研究慢病毒介导 RNAi 致 *bcr/abl* 基因长期沉默对 K562 白血病细胞各种生物学特性的影响。方法: 构建含 *bcr/abl* RNAi 序列的 pNL-B/A-EGFP 慢病毒重组质粒载体并包装病毒, 感染 K562 细胞, 挑取稳定转化的克隆 (B/A-K562)。Real-time PCR 及 Western blotting 验证干扰效应; 锥虫蓝染色、集落形成实验检测细胞增殖能力变化; 联苯胺染色观察细胞分化; ELISA 法检测酪氨酸激酶活性; AO-EB 染色观察细胞凋亡; 比色法检测 Caspase-3、Caspase-9 活性; 以上检测均以 K562 细胞和转染空质粒 EGFP-K562 作对照。结果: 成功构建 *bcr/abl* 基因 RNAi 稳定转染的 B/A-K562 细胞, Real-time PCR 及 Western blotting 证实 B/A-K562 细胞中 *bcr/abl* mRNA 及 P210^{*bcr/abl*} 蛋白含量明显下调。*bcr/abl* 基因稳定下调后, K562 细胞倍增时间明显延长 (37.1 vs 20.4, 23.3 h)、集落形成能力减弱 ($P < 0.01$), K562 细胞向红系分化, 酪氨酸激酶活性下降 ($P < 0.01$), 自发凋亡率显著提高 ($P < 0.01$), 细胞中 Caspase-3 ($P < 0.05$) 及 Caspase-9 ($P < 0.01$) 活性明显提高。结论: 慢病毒介导的 RNAi 能实现 *bcr/abl* 基因长期沉默, 从而抑制 K562 细胞恶性增殖, 诱导其分化及凋亡。

[关键词] RNA 干扰; 白血病细胞; *bcr/abl* 基因; 慢病毒; 稳定转染

[中图分类号] R733.72; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0145-06

Effects of lentivirus-mediated long term *bcr/abl* RNAi on biologic characteristics of human leukemia cell line K562

WU Zhi-juan^{1,2}, XU Jian-hua^{1*}, HUANG Xiu-wang¹, WU Li-xian¹ (1. Institute of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of lentivirus-mediated *bcr/abl* RNAi on the biological characteristics of human leukemia cell line K562. **Methods:** *Bcr/abl* RNAi lentivirus vector pNL-B/A-EGFP was constructed and was used to transfect K562 cells, the stable transfectants (B/A-K562) were selected. RNAi efficiency was assessed by Real-time PCR and Western blotting. Cell proliferation was detected by trypan blue staining and colony formation assay, cell differentiation was investigated by benzidine staining, PTK activity was determined by ELISA, apoptosis was observed by AO-EB staining, and caspase-3 and caspase-9 activation were measured by chromometry. K562 cells and mock transfected EGFP-K562 cells were used as controls. **Results:** pNL-B/A-EGFP stably transfected K562 cells (B/A-K562) was successfully constructed. Real-time PCR and Western blotting analysis confirmed that lentivirus-mediated *bcr/abl* RNAi down-regulated *bcr/abl* mRNA and P210^{*bcr/abl*} protein expression in K562 cells. The doubling time of B/A-K562 cells was obviously longer than those of K562 cells and EGFP-K562 cells (37.1 vs 20.4, 23.3 h). Furthermore, B/A-K562 cells showed decreased colony formation ability, strengthened differentiation toward erythrocytes, decreased activation of PTK, increased apoptosis and enhanced caspase-3 and caspase-9 activation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Lentivirus-mediated *bcr/abl* RNAi can result in long time silencing of *bcr/abl* gene, inhibit malignant proliferation and induce differentiation and apoptosis in K562 cells.

[Key words] RNA interfere; leukemia; *bcr-abl* gene; lentivirus; stably transfection

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 145-150]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30873101)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30873101)

[作者简介] 吴枝娟 (1979-), 女, 汉族, 福建省福州市人, 博士生, 讲师, 主要从事肿瘤生物治疗方面研究。E-mail: judywulucy@mail.fjmu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: xjh@mail.fjmu.edu.cn

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是造血干细胞的恶性克隆性疾病,其 *c-Abl* 基因从第9号染色体转位到第22号染色体断裂集簇区,产生 *bcr/abl* 融合基因;该基因编码的蛋白 P210^{*bcr/abl*} 具有酪氨酸激酶活性,改变细胞信号转导,导致凋亡缺失、细胞恶性增殖,在 CML 发病中起到重要作用^[1]。针对 *bcr/abl* 基因靶向治疗是 CML 治疗的重要策略^[2-3]。RNA 干扰(RNAi)能够从 RNA 水平高效、特异地抑制基因表达^[4-5]。目前针对 *bcr/abl* 基因的 RNA 干扰,多是通过瞬时转染,短期下调 *bcr/abl* 基因表达^[6-7]。Scherr^[8] 等首先报告慢病毒介导的 RNA 干扰能实现 *bcr/abl* 基因的长期沉默。然而 *bcr/abl* 基因长期沉默后对靶细胞各种生物学特性的影响、实际疗效及远期安全性还有待进一步研究^[9]。本课题应用高表达 *bcr/abl* 基因的人慢性粒细胞白血病 K562 细胞,尝试应用慢病毒质粒载体 pNL-EGFP,建立 *bcr/abl* 基因 RNAi 稳定表达的人慢性粒细胞白血病细胞株 B/A-K562,利用该细胞株探索 *bcr/abl* 基因长期沉默对 K562 细胞各生物学特性、恶性表征、相关激酶活性的影响,为慢病毒载体在 CML 靶向治疗的应用提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒载体 pSilencer 1.0-U6、3 个慢病毒系统质粒(pNL-EGFP、pVSVG、pHelper)、大肠杆菌 TOP10 菌株由福建师大生命科学院发育生物学研究室张彦定教授惠赠。DNA 限制性内切酶、RNase A、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA Polymerase、PrimeScript RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自 TaKaRa 公司, Lipofectamine 2000 试剂盒购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自美国 Difco 公司, γ 吡啶橙(AO)和溴化乙锭(EB)购自 Fluka 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所, NC 膜购自美国 Amersham 公司。Western blotting 试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司,鼠抗人 ABL 单克隆抗体、β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,抗 p-Tyr 抗体购自美国 Cell Signal 公司,右旋糖酐酪氨酸(PGT)购自美国 Sigma 公司。Caspase-3、Caspase-9 分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司, ELISA 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 细胞株与培养条件

人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 和 293T 细胞购自中科院上海细胞生物研究所,培养于含 10%

胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养。

1.3 *bcr/abl* 基因 RNA 干扰 pNL-EGFP- B/A 载体的构建

针对 *bcr/abl* 融合位点,参考文献[4],按照 RNA 干扰 pSilencer 1.0-U6 质粒要求,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;序列如下:正义链 5'-GCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCCACACCAAGGGCTTTTGAAGTCTGCTTTTTT-3';反义链 5'-AATTA AAAAAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTGCTGTGGAAGGGCTTTTGA ACTCTGCGGCC-3'。HPLC 纯化并测序。

EcoR I 和 *Apa* I 双酶切的 pSilencer 1.0-U6 载体与正、反交链寡聚核苷退火形成的 DNA 小片段进行连接反应,构建 pSilencer 1.0-U6-*bcr/abl*-I 质粒。转化到 TOP10 菌株,筛选阳性克隆,进行酶切鉴定并测序。用 *Xba* I 酶切下 U6-*bcr/abl*-I 片段与 pNL-EGFP 载体进行连接反应,将筛选的克隆进行酶切鉴定,获取 pNL-EGFP-U6-*bcr/abl*-I (pNL-EGFP- B/A) 质粒 DNA。

1.4 EGFP 及 B/A 病毒包装

按 lipofectamine 2000 试剂盒说明操作,空载体 pNL-EGFP、RNAi 载体 pNL-EGFP-B/A 与 pVSVG、pHelper 3 个质粒共转染 293T 细胞,48 h 后收集上清,收获 EGFP 及 B/A 病毒。

1.5 EGFP 及 B/A 病毒对 K562 细胞的感染及稳定表达克隆的获取

以 1×10^5 /ml 的密度接种 K562 细胞于 6 孔板(1 ml/孔),生长 12 h,加入 EGFP 及 B/A 病毒上清 2 ml/孔,与 K562 细胞共培养 24 h 后换液,继续培养。荧光显微镜观察 K562 细胞绿色荧光。慢病毒感染的 K562 细胞混合克隆每 3 d 传代 1 次,连续传代 6 个月。以极限稀释法、甲基纤维素克隆形成法,反复挑选表达绿色荧光的阳性克隆,计数表达绿色荧光的细胞比例,获取稳定表达绿色荧光蛋白的 EGFP-K562 及 B/A-K562 细胞。

1.6 Real-time PCR 检测 RNAi 对 *bcr/abl* mRNA 表达的影响

根据文献[8]合成 b3a2 *bcr-abl* 引物,正义链:*bcr* exon 2 (b2a, 5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3'),反义链 *abl* exon 4 (na4, 5'-CGGCTCTCGGAGGAGACGTAGA-3')。以 *G6PD* 为内参,正义链:*G6PD* exon 6 (*G6PD1*, 5'-CCCGATCGACCACTACCTGGGCAAG-3'),反义链:*G6PD* exon 9 (*G6PD2*, 5'-GTTCCCCACGTA CTGGCCCAGGACCA-3')。BLAST

检索证明靶基因序列特异性;引物由上海生工公司合成,PAGE 纯化。抽取 K562、EGFP-K562 及 B/A-K562 细胞总 RNA,应用 PrimeScript RT reagent Kit 逆转录 cDNA。按 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书操作,20 μ l PCR 体系,置 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,95 $^{\circ}$ C 10 s 预变性;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环,PCR 延伸;95 $^{\circ}$ C 0 s 变温速度 20 $^{\circ}$ C/s,65 $^{\circ}$ C 15 s 变温速度 20 $^{\circ}$ C/s,95 $^{\circ}$ C 0 s 变温速度 0.1 $^{\circ}$ C/s,分析融解曲线。

1.7 Western blotting 检测 *bcr/abl* RNAi 对 P210^{bcr/abl} 蛋白表达的影响

收集 K562、EGFP-K562 及 B/A-K562 三种细胞,PBS 洗涤,加入单去污裂解缓冲液,4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,离心吸取上清,即细胞总蛋白。BCA 法蛋白定量,各组取等量蛋白上样,在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。电泳后转膜,封闭液封闭过夜,一抗室温孵育 2 h,洗去未结合的一抗,以 Western blotting 试剂盒加二抗,DAB 染色。

1.8 锥虫蓝染色法检测 RNAi 对细胞增殖的影响

以 1×10^5 /ml 的密度接种 K562、EGFP-K562 及 B/A-K562 细胞,接种后 12、24、36、48 h 计数锥虫蓝拒染活细胞,制作 48 h 生长曲线。计算细胞倍增时间(Td)。Td = $\Delta t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$,其中 Td 为倍增时间, Δt 为计数间隔时间, N_t 为对数生长期任一点的理论观察值, N_0 为对数生长期理论初始值。

1.9 克隆法检测 RNAi 对细胞集落形成的影响

以 100 个/孔的密度接种 K562、EGFP-K562 及 B/A-K562 细胞于 24 孔板,培养体系总体积 1 ml 的含 10% 胎牛血清、0.8% 甲基纤维素的 RPMI 1640 培养液,每组设 4 个平行孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 2 周。荧光显微镜下观察集落内子代细胞荧光表达情况,计数克隆集落数(大于或等于 50 个细胞组成的细胞群为一个集落)^[9]。集落形成率(%) = (克隆集落数/接种细胞数) \times 100%。

1.10 联苯胺染色法检测 RNAi 对细胞分化的影响

收集细胞 2×10^5 个,加入 20 μ l 联苯胺染液(0.5 mol/L 乙酸配制成 0.2% 联苯胺储备液,临用前 0.5 ml 加 30% 过氧化氢 10 μ l),避光孵育 30 min,镜下计数 200 个细胞中蓝染阳性细胞百分率^[10]。

1.11 ELISA 法观察 RNAi 对细胞酪氨酸激酶活性影响

25 μ g/ml PGT 包被 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 密闭孵育 16 h。收集 K562、EGFP-K562 及 B/A-K562 细胞各 1×10^6 个,加入裂解液 50 μ l,4 $^{\circ}$ C 5 min,以样品稀释液稀释 5 倍。将该溶液加入包被的 96 孔板 50 μ l/孔,设 3 个平行孔。加入 100 μ mol/L ATP 50 μ l,孵

育 60 min,PBS-Tween20 洗板 3 次。加入抗 p-Tyr 单抗 IgG1 一抗(1:1 000)100 μ l/孔,孵育 60 min,洗板 3 次。加入 HRP-羊抗小鼠 IgG 二抗(1:1 000)100 μ l/孔,孵育 60 min,洗板 3 次。TMB 底物显色,3 mol/L H₂SO₄ 终止反应。全自动酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)检测 450 nm 处的光密度值(D_{450})。

1.12 AO-EB 染色法观察 *bcr/abl* RNAi 对细胞凋亡的影响

收集细胞 2×10^6 个,加入 AO/EB 染液 4 μ l 混匀,滴于载玻片上,封片后在荧光显微镜下观察,可见 4 种细胞:活细胞(VN)核染色质被 AO 染成绿色并呈正常结构;早期凋亡细胞(VA)核染色质着绿色并呈固缩状或圆珠状;晚期凋亡细胞(NVA)膜受损,核染色质被 EB 染成桔红色并呈固缩或圆珠状;坏死细胞(NVN)膜受损,核染色质被 EB 染成桔红色并呈正常结构。分类计数 100 个细胞,凋亡率(%) = (VA + NVA) / (VN + NVN + VA + NVA) \times 100%。

1.13 分光光度法检测 RNAi 对细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

收集细胞 5×10^6 个,按 Caspase-3、-9 试剂盒说明操作,测定 D_{405} 确定为 Caspase-3、-9 活性。

1.14 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据采用 t 检验。数据采用 SPSS10.0 软件包进行处理。

2 结果

2.1 *Bcr/abl* 基因 RNAi 慢病毒的成功制备

3 个质粒共转染 293T 细胞,12 h 后 293T 细胞出现绿荧光,随时间延长荧光强度逐渐增强,48 h 荧光强度最强。293T 细胞生长良好,表明病毒包装成功。离心收集含病毒上清。将 EGFP 及 B/A 病毒上清感染 293T 细胞,共培养 48 h,约 60% 293T 细胞呈绿荧光,提示包装出的病毒具有感染活力。

2.2 EGFP-K562、B/A-K562 稳定克隆的成功获取

病毒感染 12 h 后,K562 细胞开始出现绿荧光,此后荧光强度逐渐增强,72 h 后荧光最强。绿荧光细胞比例约 40%。混合克隆以极限稀释法及甲基纤维素克隆形成法反复挑取表达绿荧光 K562 细胞。传代半年以后,荧光显微镜下观察 EGFP-K562 细胞表达绿荧光比例约 95%,B/A-K562 细胞表达绿荧光比例约 85%,绿荧光阳性细胞比例较为稳定。提示 EGFP、B/A-EGFP 基因较稳定地整合入 K562 细胞基因组。

2.3 RNAi 对 *bcr/abl* 基因 mRNA 水平影响

结果显示,B/A-K562 细胞 *bcr/abl* mRNA 水平较空载体 EGFP-K562 细胞下调($63.5 \pm 7.6\%$), K562 细胞与 EGFP-K562 细胞 *bcr/abl* mRNA 水平差别不大。连续传代 6 个月后的稳定克隆的 *bcr/abl* mRNA 仍下调约 67%。

2.4 RNAi 对 P210^{bcr/abl} 蛋白表达的影响

实验结果显示,空载体对照 EGFP-K562 细胞 P210^{bcr/abl} 较 K562 细胞略有降低,而 B/A-K562 细胞 P210^{bcr/abl} 蛋白含量较 K562 细胞及空载体对照 EGFP-K562 细胞均有明显降低(图 1),提示 *bcr/abl* RNAi 明显降低 *bcr/abl* 基因表达。

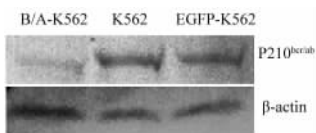


图 1 RNAi 对 P210^{bcr/abl} 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of *bcr/abl* RNAi on expression of P210^{bcr/abl} in K562, EGFP-K562 and B/A-562 cells

2.5 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对细胞增殖的影响

由图 2 可见,空载体 EGFP-K562 细胞增殖速度和 K562 细胞差别不大,而 B/A-K562 细胞增殖速度较 K562 细胞及空载体 EGFP-K562 细胞明显降低。K562 细胞倍增时间为 20.4 h,EGFP-K562 细胞倍增时间为 23.3 h,B/A-K562 细胞倍增时间为 37.1 h。提示空载体 EGFP 基因整合对 K562 细胞的增殖影响不大;*bcr/abl* 基因 RNAi 能明显抑制 K562 细胞的恶性增殖。

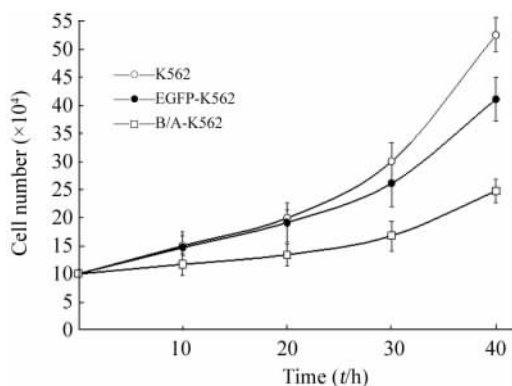


图 2 K562、EGFP-K562、B/A-K562 细胞 48 h 的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of K562, EGFP-K562 and B/A-K562 cells at 48 h

2.6 RNAi 对 K562 细胞集落能力的影响

实验后 5 d,K562 及 EGFP-K562 细胞开始出现

较明显细胞集落, B/A-K562 细胞实验 9 d 后方见较明显的细胞集落,且 B/A-K562 细胞集落数明显少于 K562、EGFP-K562 细胞集落($P < 0.01$),其细胞集落体积较小、细胞数亦少(图 3,表 1)。荧光显微镜下观察,EGFP-K562 细胞 95% 的集落表达绿色荧光,B/A-K562 细胞 86% 的集落表达绿荧光,均未见同时存在表达绿荧光细胞与不表达绿色荧光细胞的混合集落,提示细胞分裂中 EGFP、B/A-EGFP 基因基本稳定,无丢失。

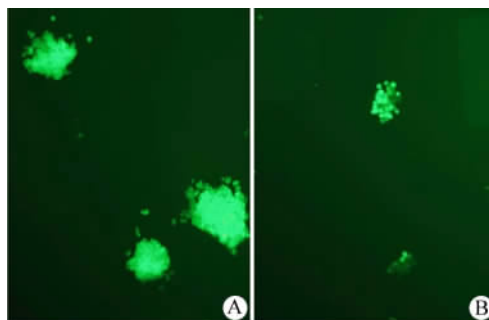


图 3 EGFP-K562、B/A-K562 细胞的集落形成($\times 400$)

Fig. 3 Colony formation of EGFP-K562 and B/A-K562 cells ($\times 400$)

A: EGFP-K562 cells; B: B/A-K562 cells

表 1 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对 K562 细胞集落形成能力的影响

Tab. 1 Effect of *bcr/abl* RNAi on colony formation ability of K562 cells

Group	Colony formation(%)	GFP(%)
K562	84.75 ± 7.63	
EGFP-K562	76.75 ± 8.46	95.77 ± 11.17
B/A-K562	$42.25 \pm 7.97^{**}$	86.39 ± 16.90

** $P < 0.01$ vs K562 cells or EGFP-K562 cells

2.7 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对 K562 细胞分化的影响

K562 及 EGFP-K562 细胞联苯胺染色阳性率分别为(6.17 ± 1.43)%和(7.83 ± 2.01)%,两者差别不大。而 B/A-K562 细胞联苯胺染色阳性率为(24.83 ± 1.93)%,明显高于 K562 及 EGFP-K562 细胞($P < 0.01$)。提示慢病毒介导的 *bcr/abl* 基因长期沉默诱导 K562 细胞合成血红蛋白,向红系分化(图 4)。

2.8 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对 K562 细胞酪氨酸激酶活性的影响

ELISA 法检测结果显示,K562、EGFP-K562 细胞代表酪氨酸激酶活性的 D_{450} 为(1.173 ± 0.193)、

(1.077 ± 0.124), 而 B/A-K562 细胞的 D_{450} 则明显降低 ($P < 0.01$), 仅为 (0.682 ± 0.021)。由此说明 *bcr/abl* 基因 RNAi 显著降低 K562 细胞酪氨酸激酶活性。

2.9 *Bcr/abl* 基因 RNAi 干扰对 K562 细胞凋亡的影响

AO-EB 染色后荧光显微镜下观察(图 5)显示: K562 细胞呈绿色荧光, 罕见凋亡细胞, 凋亡率为(1.33 ± 1.15)%; 空载体 EGFP-K562 细胞仅见少量散在红荧光凋亡细胞, 凋亡率为(8.67 ± 2.08)%; B/A-K562 细胞见较多凋亡细胞, 凋亡率为(26.67 ± 4.62)%, 差别有统

计学意义($P < 0.01$)。表明 *bcr/abl* RNAi 使 K562 细胞恢复了对细胞因子等生长因子的依赖性, 以至于在常规培养液中培养时凋亡率显著提高。

2.10 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对 K562 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性影响

分光光度法检测结果(图 6)显示: B/A-K562 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活化水平较 K562 及 EGFP-K562 细胞明显提高, 提示慢病毒介导 *bcr/abl* RNAi 诱导慢粒 K562 细胞凋亡与线粒体途径有关。



图 4 *Bcr/abl* 基因 RNAi 诱导 K562 细胞的分化(×400)

Fig. 4 *bcr/abl* RNAi increased differentiation of K562 cells (×400)

A: K562 cells; B: EGFP-K562 cells; C: B/A-K562 cells

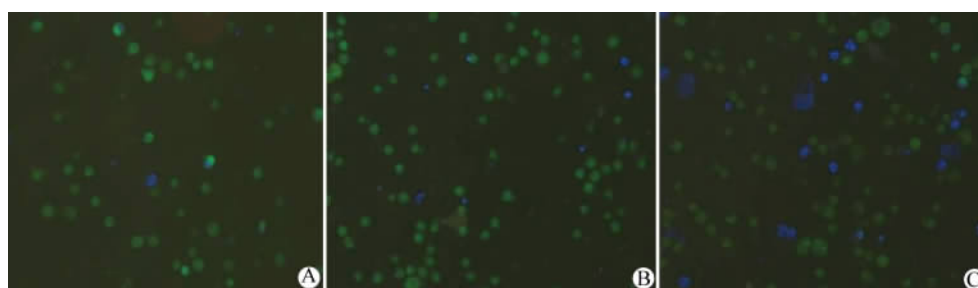


图 5 K562, EGFP-K562, B/A-K562 细胞凋亡的 AO-EB 染色结果(×400)

Fig. 5 Apoptosis of K562, EGFP-K562 and B/A-K562 cells detected by AO/EB staining (×400)

A: K562 cells; B: EGFP-K562 cells; C: B/A-K562 cells

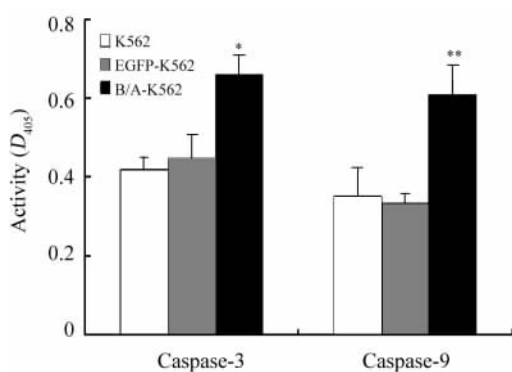


图 6 *Bcr/abl* 基因 RNAi 对 K562 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

Fig. 6 Effects of *bcr/abl* RNAi on Caspase-3 and Caspase-9 activation in K562 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs EGFP-K562 cells or K562 cells

3 讨论

应用 RNA 干扰技术下调 *bcr/abl* 基因是 CML 靶向治疗研究的热点^[13]。研究^[14-15]发现 siRNA 瞬时转染, 可使 CML 细胞 *bcr/abl* 的 mRNA 水平降低达 80% 以上, P210^{*bcr/abl*} 蛋白也明显减少, 但是 72 h 后基因封闭作用逐渐消失。siRNA 合成成本高, 不稳定、易降解, 对动物或细胞毒性大, 转染效率低, RNAi 的窗口时间短, 难以满足临床治疗需要, 使其应用受到限制。

近年, 以人免疫缺陷病毒(HIV-1)为代表的慢病毒载体(lentivirus)日益成为基因治疗的有力工具^[16]。慢病毒是假病毒, 没有自我复制和传播的能力, 可同时感染分裂与非分裂细胞, 能实现高效的基

因转染和长期稳定的基因表达,但是慢病毒载体用于人体的安全性仍需进一步评价^[8,17-18]。本实验中慢病毒载体携带的 siRNA 片段稳定整合入 K562 细胞基因组,连续传代半年挑选出的稳转克隆, *bcr/abl* mRNA 仍下调约 67%, P210^{bcr/ab} 蛋白表达亦明显减少,证明慢病毒介导的 RNAi 可以实现 *bcr/abl* 基因的长期沉默。构建的 *bcr/abl* RNAi 稳转细胞株长期存活,为特异性作用于 *bcr/abl* 基因及其产物的抗癌药物提供有价值的研究平台。

bcr/abl 基因长期沉默后,慢粒白血病 K562 细胞的恶性增殖被明显抑制,倍增时间显著延长,集落形成能力大大降低,提示细胞恶性程度有所降低。

K562 细胞是来源于慢性粒细胞白血病患者,并含有 *bcr/abl* 融合基因的红白血病细胞株。*bcr/abl* 融合基因产生的具有结构性酪氨酸酶活性导致细胞信号转导的紊乱是 K562 细胞红系分化受阻的主要原因^[19]。*bcr/abl* 基因长期沉默后,在细胞增殖明显减缓的基础上,诱导未成熟的慢粒细胞向成熟粒细胞分化,有可能成为 CML 治疗中的重要策略。

CML 发病过程中,*bcr/abl* 基因引起的恶性变紧密依赖于其蛋白质酪氨酸激酶(PTK)的活性,由此引起多条信号转导途径以激酶依赖的形式被激活,并活化恶性表型相关基因^[20]。本研究观察到 *bcr/abl* 基因长期沉默导致 PTK 活性的降低,减少了下游信号转导对各种癌基因的活化。

本研究还观察到 K562 细胞的自然凋亡率仅为 1.33%,而 *bcr/abl* 基因长期沉默后,细胞凋亡率增加到 26.67%。这从另一个侧面证明了 *bcr/abl* 基因在 CML 的凋亡逃逸中的重要作用。另外,*bcr/abl* 基因长期沉默后引起 Caspase-3、Caspase-9 上调,提示凋亡的发生与线粒体途径有关。

综上所述,慢病毒介导的 *bcr/abl* 基因 RNAi 可实现基因的长期沉默,从而抑制慢粒细胞增殖、诱导分化和凋亡,有望成为研究 CML 治疗药物的新工具。但其相关机制等还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(10): 5531-5541.
- [2] Tefferi A, Levine RL, Kantarjian H. Oncogenic signals as treatment targets in classic myeloproliferative neoplasms[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 15(1 Suppl): 114-119.
- [3] Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML[J]. *Blood*, 2008, 112(13): 4808-4817.
- [4] 周颖,程勇,高宗侠,等. siRNA 对白血病细胞株 HEL 中 EGA-1 基因的干涉作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, (10): 688-690.
- [5] 张立智,蔡宣松,钱志康,等. VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞凋亡和伤血管发生的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(4): 352-356.
- [6] Scherr M, Battmer K, Winkler T, et al. Specific inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA[J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1566-1569.
- [7] Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, et al. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1 (+) leukemia cells[J]. *Nat Med*, 2004, 10(11): 1187-1189.
- [8] Scherr M, Battmer K, Schultheis B, et al. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-*bcr-abl* therapy[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 12-21.
- [9] Bakalova R. RNA interference--about the reality to be exploited in cancer therapy[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(6): 417-421.
- [10] Emig M, Saussele S, Wittor H, et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR[J]. *Leukemia*, 1999, 13(11): 1825-1832.
- [11] 周小玉,费小明,汪承亚,等. 应用逆转录病毒载体构建荧光标记的 K562 细胞模型[J]. *南京医科大学学报*, 2007, 27(7): 656-660.
- [12] Jakubowska J, Stasiak M, Szulawska A, et al. Combined effects of doxorubicin and STI571 on growth, differentiation and apoptosis of CML cell line K562[J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, 54(4): 839-846.
- [13] Chaturvedi A, Battmer K, Schaefer D, et al. Comparison between molecularly defined and conventional therapeutics in a conditional BCR-ABL cell culture model[J]. *Oligonucleotides*, 2007, 17(1): 22-34.
- [14] Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5716-5724.
- [15] Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, et al. Inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571) [J]. *Blood*, 2003, 102(6): 2236-2239.
- [16] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184-204.
- [17] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3): 243-247.
- [18] 褚波,黄雪峰. 慢病毒载体及其应用进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(1): 224-226.
- [19] 刘小珊,蒋纪恺. 苦参碱联合伊马替尼对 K562 细胞红系分化的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(1): 1-2.
- [20] Korade-Mirmics Z, Corey SJ. Src kinase-mediated signaling in leukocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68(5): 603-613.

[收稿日期] 2008 - 12 - 24

[修回日期] 2009 - 02 - 25

[本文编辑] 王莹