

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.004

人 21.5 kDa MBP 基因沉默对神经胶质瘤细胞增殖与凋亡的作用研究*

田瑞敏¹, 王含彦², 易芳², 王晓明³, 陈建业^{2△}

(1. 川北医学院药学院药理学教研室, 四川南充 637000; 2. 川北医学院基础医学院生物化学教研室, 四川南充 637000; 3. 川北医学院附属医院神经内科, 四川南充 637000)

摘要:目的 研究人 21.5 kDa 人脑髓鞘碱性蛋白(MBP)基因沉默对神经胶质瘤 U251 细胞增殖与凋亡的影响。方法 将 21.5 kDa MBP 序列特异性短发夹 RNA(shRNA)重组质粒 pGenesil-1-MBP-3 转染神经胶质瘤细胞株(U251)作为 MBP 基因沉默组,以空质粒转染为阴性对照组,脂质体转染为脂质体空转组;用实时定量 PCR(RT-PCR)和 Western blot 方法检测各组 21.5 kDa MBP mRNA 和蛋白的表达水平,CCK-8 法测定细胞增殖曲线,流式细胞法分析细胞凋亡率。结果 与阴性对照组相比,MBP 基因沉默组细胞中 21.5 kDa MBP 在 mRNA 和蛋白水平的表达均显著下降($P<0.05$)、细胞增殖活性明显降低($P<0.05$)、细胞凋亡率显著增高($P<0.05$)。结论 人 21.5 kDa MBP 基因沉默对神经胶质瘤细胞 U251 具有显著的抑制增殖和促进凋亡的双重调节作用。

关键词:RNA 干扰;基因沉默;转染;21.5 kDa MBP;神经胶质瘤;增殖;凋亡

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)01-0010-04

Effects of the human 21.5 kDa MBP gene silencing on the proliferation and apoptosis of glioma cells*

Tian Ruimin¹, Wang Hanyan², Yi Fang², Wang Xiaoming³, Chen Jianye^{2△}

(1. Department of pharmacology, School of Pharmaceutical Science of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Biochemistry, School of Preclinical Medicine of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China.)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of silencing of the human cerebral 21.5 kDa myelin basic protein (MBP) gene on the proliferation and apoptosis of the glioma U251 cells. **Methods** The 21.5 kDa MBP sequence-specific short hair-pin RNA (shRNA) recombinant plasmids pGenesil-1-MBP-3 were transfected into the human glioma cell line(U251), the cells of U251 was used as MBP silencing group, the cells transfected with negative control plasmids used as negative control group, and the cells transfected with liposomes used as blank control group. Real-time PCR and Westernblot were used to detect the expression levels of the 21.5 kDa MBP mRNA and protein in each group, and the cell proliferation curve was measured by CCK-8 assay, the apoptosis rate was analysed by Flow cytometry. **Results** Both the mRNA and the protein expression levels of the 21.5 kDa MBP of MBP silencing group were significantly lower than those in the control groups ($P<0.05$); the cellular proliferation activity of the MBP silencing group decreased significantly ($P<0.05$) while the cellular apoptotic rate increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing of the human cerebral 21.5 kDa MBP gene may play a dual role in the inhibition of proliferation and the promotion of apoptosis of the glioma U251 cells.

Key words: RNA interference; genes silencing; transfection; 21.5 kDa MBP; glioma; proliferation; apoptosis

人脑髓鞘碱性蛋白(human myelin basic protein, MBP)是由中枢神经系统少突胶质细胞和外周神经系统雪旺氏细胞分泌的一种强碱性蛋白质, MBP 基因含有 7 个外显子,其转录产物经不同方式剪接可以产生分子量大小、结构和功能不同的 MBP 蛋白。在人脑主要含有 21.5、20.0、18.5、17.3 和 14.0 kDa MBP 等几种表达产物^[1],人胎脑中以 21.5 kDa MBP 表达为主,成年脑中以 18.5 kDa MBP 表达最多。MBP 不仅在神经纤维的绝缘和快速传导中发挥着重要作用,而且在人脑发育、神经细胞分化、髓鞘发生与髓鞘形成过程中具有重要功能。近年研究发现,21.5 kDa MBP 可能在细胞增殖与凋亡中发挥着重要调节作用。越来越多的实验研究显示 21.5 kDa MBP 可以促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[2-5]。但也有部分研究得出

的结论与此相反^[6-7]。为进一步深入研究 21.5 kDa MBP 对细胞增殖与凋亡的确切作用,作者构建了针对 21.5 kDa MBP 基因的序列特异性 shRNA 质粒载体,拟经脂质体介导的方法转染 21.5 kDa MBP 高表达人神经胶质瘤 U251 细胞株,观察 21.5 kDa MBP 基因沉默对 U251 细胞增殖及凋亡的确切影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人神经胶质瘤细胞株 U251 由四川大学生物化学与分子生物实验室惠赠;质粒 pGenesil-1-MBP-3 和 pGenesil-1-MBP-neg 由本实验室构建并验证^[8];Lipo2000 脂质体购自美国 invitrogen 公司;新生牛血清与 DMEM 购自美国 Hyclone 公司;RIPA 细胞裂解液购自北京普利莱基因公司;兔抗 MBP

* 基金项目:四川省教育厅重点课题基金资助项目(2006J13031);川北医学院 2013 年青年项目资助(CBY13-A-QN33)。 作者简介:田瑞敏(1987-),助教,硕士,主要从事人脑髓鞘碱性蛋白功能方向研究。 △ 通讯作者, Tel:13458254060; E-mail:chenjianye2010@163.com。

单克隆抗体购自美国 EPITOMICS 公司,其二抗购自武汉博士德公司;兔抗 GAPDH 单克隆抗体及其二抗购自武汉博士德公司;Ecl 化学发光试剂盒购自 MILLIPORE 公司;CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究;Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U251 细胞用新鲜完全 DMEM 培养液在 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养,3~5 d 换 1 次液,细胞长满 90% 培养瓶底进行传代。

1.2.2 实验分组与细胞转染 (1)实验分为 3 组:基因沉默组(21.5 kDa MBP 基因沉默质粒 pGenesil-1-MBP-3 转染);阴性对照组(空质粒 pGenesil-1-MBP-neg 转染);脂质体转染组(脂质体空转染)。(2)细胞转染:将 U251 细胞按 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于 6 孔板培养过夜,待细胞铺满 90% 以上孔底时进行细胞转染并在荧光显微镜下观察细胞转染效率。

1.2.3 实时定量 PCR(RT-PCR)检测 21.5 kDa MBP 基因的表达 细胞转染后 48 h,提取各组细胞总 RNA 进行逆转录,RT-PCR 检测各组细胞中 21.5 kDa MBP mRNA 表达水平。PCR 引物序列如下:MBP 上游:5'-CAA GAT GAA AAC CCC GTA GTC C-3',下游:5'-GTA GCC AAA TCC TGG TCT CTG G-3',序列长度 132 bp;GAPDH 上游:5'-CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C-3',下游:5'-GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC T-3',序列长度 141 bp。PCR 反应条件:95 ℃×30 s,进行预变性;95 ℃×5 s→95 ℃×30 s,共 40 个循环,进行定量 PCR 反应;95 ℃ 15 s→600 C×1 min→95 ℃×15 s,进行反应延伸。反应结束后,观察融解曲线。

1.2.4 Western blot 法检测 21.5 kDa MBP 蛋白的表达 转染后 48 h,按文献[7]方法进行 21.5 kDa MBP 蛋白的 Western blot 检测。提取各组细胞蛋白质并测定浓度,将稀释过的蛋白质与 2×蛋白上样缓冲液按照 1:1 的比例混匀,在沸水浴中煮 5 min 变性。然后进行十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),半干法转膜、封闭 1 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜、洗膜,二抗孵育 2 h、洗膜,化学发光法显色,在成像仪上成像、拍照,用 Image-Lab 软件读取各组条带灰度值。

1.2.5 CCK-8 法检测 U251 细胞的增殖变化 按 CCK-8 试剂盒方法进行细胞增殖检测。U251 细胞转染 12 h 后,将各组细胞消化重悬,调节细胞浓度至 2×10^4 个/mL。按照 100 μL/孔的量接种于 96 孔板,保证每孔含 2 000 个细胞,每个组设置 5 个重复孔,分别检测转染后 12、24、36、48、72 h 共 5 个时间点的吸光度值。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化 各组细胞转染 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,2 000 rpm 离心 5 min 收集细胞沉淀;PBS 洗涤 2 次,再离心收集细胞沉淀并用 500 μL Binding Buffer 重悬细胞。向细胞悬液内加 1 μL Annexin V-PE 混匀,室温下避光反应 15 min。用美国 BD 公司流式细胞仪进行细胞凋亡检测,以未转染组 U251 细胞进行荧光补偿调节(激发波长为 488 nm;发射波长为 578 nm),用 FL2 通道检测各转染组细胞的凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用 one-way-ANOVA 检验分析;首先做方差齐性检验,如果方差齐性,则组间比较采取 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U251 细胞染转结果 细胞转染前,呈长梭形,边缘清晰,生长旺盛,结构正常。经脂质体转染 24 h 后,用荧光显微镜观察可见基因沉默组和阴性对照组细胞内均有大量绿色荧光蛋白表达(表达率可达 80%),说明 21.5 kDa MBP 基因干扰质粒 pGenesil-1-MBP-3 和空质粒表达 pGenesil-1-MBP-neg 均已成功转入到 U251 细胞中并在细胞中有效表达,见图 1。

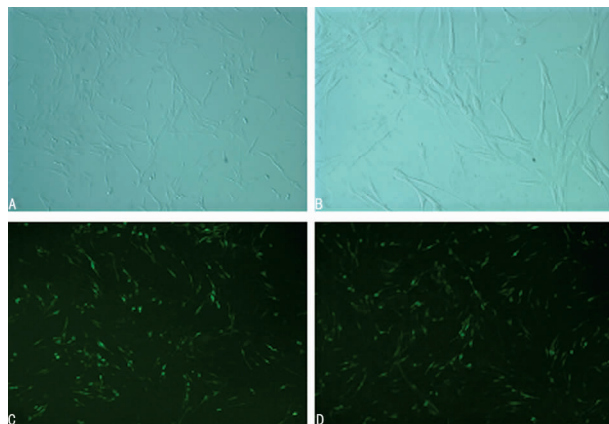


图 1 U251 细胞转染前后细胞对比图
A:U251 细胞在倒置显微镜下图(×100);B:U251 细胞在倒置显微镜下图(×200);C:pGenesil-1-MBP-3 转染 U251 细胞 24 h(×100);D:pGenesil-1-MBP-neg 转染 U251 细胞 24 h(×100)。

图 1 U251 细胞转染前后细胞对比图

2.2 各组细胞中 21.5 kDa MBP 基因在 mRNA 水平的表达结果 各转染组细胞中 MBP 基因表达的 RT-PCR 检测结果见图 2、3。图 2 可见扩增产物的溶解曲线均可扩增出单峰,且 3 次重复表现一致,表明扩增具有良好的特异性和重复性。图 3 为各转染组细胞 21.5 kDa MBP 基因表达柱状图,各组实验数据经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 转换和 SPSS13.0 软件 one-way-ANOVA 检验分析,与阴性对照组相比,基因沉默组细胞内 21.5 kDa MBP 基因表达量降低了 94.9% ($P < 0.05$)。

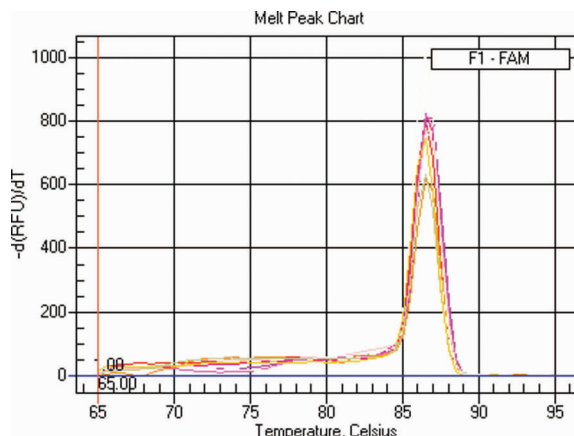
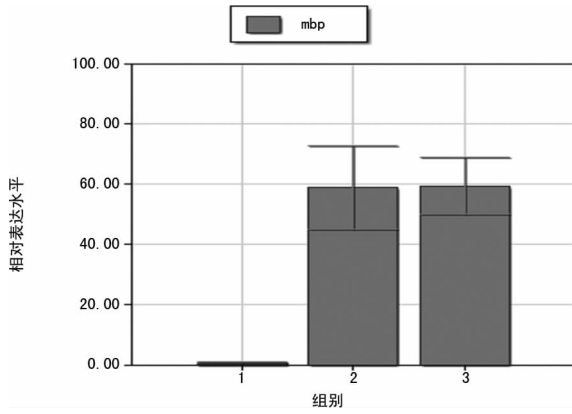


图 2 各转染组 21.5 kDa MBP mRNAs 扩增产物的溶解曲线

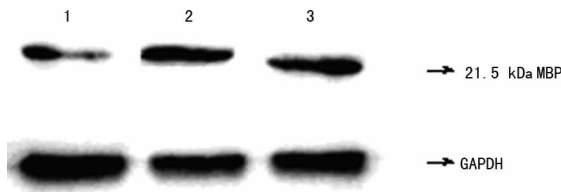
2.3 各组细胞中 21.5 kDa MBP 基因在蛋白质水平的表达结果 Western bolt 检测显示,3 组细胞中内参照 GAPDH 的表达基本一致。但基因沉默组细胞中 21.5 kDa MBP 蛋白的表达水平显著低于阴性对照组和脂质体转染组;Image-Lab 软件分析显示,基因沉默组细胞中 21.5 kDa MBP 蛋白表达的相对灰度值为 0.833 ± 0.007 、阴性对照组为 1.637 ± 0.131 、脂质体转染组为 1.543 ± 0.034 。将所得出数据进行统计分析,方差

齐性检验结果显示方差齐性($P=0.067$);方差分析结果显示组间差异具有统计学意义($F=762.277, P<0.05$);LSD 法进行两两比较,基因沉默组与其他两组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western bolt 检测结果显示,经沉默质粒 pGene-sil-1-MBP-3 转染,明显干扰了 U251 细胞中 21.5 kDa MBP 基因的表达,细胞中 21.5 kDa MBP 蛋白的表达量较阴性对照组降低了 49.12%,见图 4。



1: 基因沉默组; 2: 阴性对照组; 3: 脂质体转染组。

图 3 21.5 kDa MBP 基因在 mRNA 水平表达柱状图



1: 基因沉默组; 2: 阴性对照组; 3: 脂质体转染组。

图 4 各转染组细胞中 21.5 kDa MBP 的表达

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖结果 阴性对照组和脂质体转染组的细胞生长曲线基本重叠,基因沉默组的细胞生长曲线明显向右移,表明基因沉默组的细胞生长速度变慢。基因沉默组细胞的 OD 值随转染时间的延长而增高,转染 12、24、36、48、72 h 的 OD 值分别为(0.515±0.046)、(0.593±0.043)、(0.675±0.011)、(0.807±0.017)、(0.952±0.041),差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

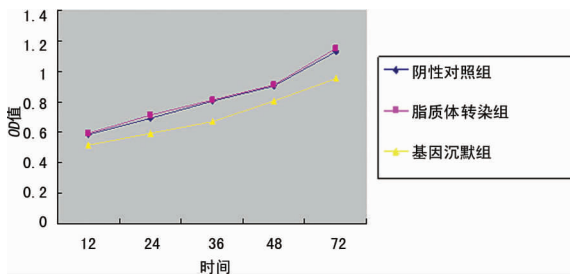
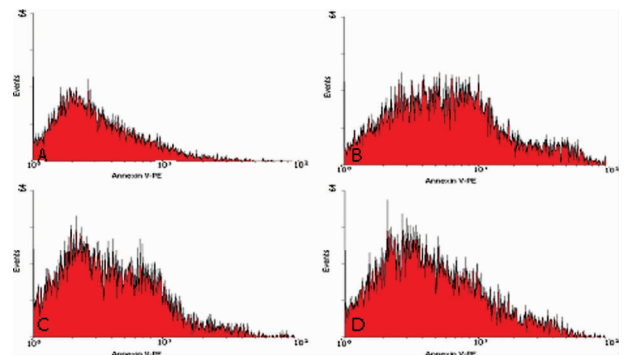


图 5 CCK-8 检测细胞增殖曲线

2.5 流式细胞仪检测转染后细胞凋亡率 U251 细胞转染 48 h 后,各转染组的细胞凋亡率分别为:基因沉默组(6.16±0.525)%、阴性对照组(1.96±0.083)%、脂质体转染组(0.96±0.115)%;方差齐性检验结果为 $P=0.077$,显示方差齐;方差分析结果为 $F=231.704, P<0.05$,说明 3 组间差异有统计学意义;用 LSD 法进行两两比较显示,与阴性对照组和脂质体转染组两组相比,基因沉默组的细胞凋亡率显著增高,差

异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。



A: 未转染组; B: 基因沉默组; C: 脂质体转染组; D: 阴性对照组。

图 6 流式细胞仪检测各组细胞凋亡图

3 讨论

MBP 是一种含有多种碱性氨基酸的强碱性膜蛋白,主要分布在神经组织,在其他组织中含量极少,主要功能是维持神经纤维的绝缘和快速传导。近年研究发现,21.5 kDa MBP 在多种肿瘤组织细胞中高表达^[9-10];在人脑神经胶质瘤细胞中 21.5 kDa MBP 的表达量更丰富^[11-12],提示 21.5 kDa MBP 可能在肿瘤细胞增殖及凋亡中发挥重要调节作用,可能与神经胶质瘤的发生、发展具有密切联系。

本研究构建了针对 21.5 kDa MBP 的特异性干扰重组质粒并经脂质体介导将其导入神经胶质瘤细胞,证实该质粒在神经胶质瘤细胞中可以显著降低 21.5 kDa MBP 的表达。通过细胞增殖实验与流式细胞凋亡检测发现,21.5 kDa MBP 基因沉默能够显著抑制 U251 的细胞增殖、促进细胞凋亡。

但神经胶质瘤细胞中的 21.5 kDa MBP 导致细胞增殖加快、凋亡减慢的机制尚不明确,有待进一步深入研究。业已证实,MBP 存在着磷酸化、脱磷酸两种形式,分别参与不同的代谢调节。例如,MBP 的磷酸化参与凋亡因子 Fas 蛋白类似物 MT-21 及抗癌剂细胞三烯菌素 A 对 HL-60 细胞凋亡的诱导^[13],MBP 的磷酸化还参与髓鞘形成与稳定性调节及脱髓鞘疾病多发性硬化症的调节^[14]。Chen 等^[3]研究发现,在体外将 MBP 微基因转染至肿瘤细胞(YTLMC-90)或正常细胞(成纤维细胞与平滑肌细胞)均可促进细胞增殖。本研究推测 MBP、磷酸化 MBP 的相对浓度改变可能是调节某些细胞增殖与凋亡的重要因素,MBP 增高则细胞增殖,磷酸化 MBP 增高则细胞发生凋亡。线粒体 Caspase 激酶级联途径与真核细胞凋亡密切相关,Kobayashi 等^[4]研究发现 MBP 可以降低 DRG 细胞中的 Caspase-3 而抑制细胞凋亡。Pan 等^[5]研究检测到 21.5 kDa MBP 转染的 HepG-2 细胞中 Caspase-3 的表达量较对照组显著降低,说明 MBP 可能通过调节细胞中的凋亡蛋白而发挥抗凋亡作用。Smith 等^[15]研究发现 21.5 kDa MBP 高表达可以促进 N19-OLG 细胞增殖,同时观察到细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、蛋白激酶 B1(Akt1)和核糖体蛋白 S6(rPS6)表达上调,说明可能通过激活某些蛋白激酶及相关的信号通路促进细胞增殖。

21.5 kDa MBP 的促细胞增殖与抗凋亡活性还可能与肿瘤细胞侵袭及周围神经组织和中枢神经系统的行为有关,这可能也是 21.5 kDa MBP 在肺癌、乳腺癌等多种非神经系统肿瘤组织中异位高表达的原因所在。因为 MBP 是神经髓鞘化过程非常重要的蛋白质,从基因上将实验老鼠剔除 MBP 后,发现

它们减少了中央神经系统的髓鞘化及渐进的失调,如颤抖、癫痫及过早死亡。因此,MBP 对正常的神经细胞形态及功能的维持是必需的,而在癌细胞中表达增强是其分化和增殖失控的结果还是调控的一个关键点,仍有待进一步深入研究。

本研究从基因沉默的角度证实了 21.5 kDa MBP 具有促进细胞增殖与抑制细胞凋亡的双重调节功能,并从基因干扰的角度为肿瘤的基因治疗进行了一次有益的尝试。本研究构建的 21.5 kDa MBP 特异性干扰重组质粒,为进一步研究 21.5 kDa MBP 的功能及神经胶质瘤的基因治疗提供了一种可供选择的物质手段。

参考文献:

- [1] Pribyl TM, Campagnoni CW, Kampf K, et al. The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit; expression in the immune and central nervous systems[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(22):10695-10699.
- [2] South SA, Deibler GE, Tzeng SF. Myelin basic protein(MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes[J]. *Glia*, 2000, 29(1):81-90.
- [3] Chen JY, Wang XM, Liu J, et al. Inhibitory effect of human brain myelin basic protein on H₂O₂-induced apoptosis of human lung cancer cell line YTLMC-90 [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(2):170-174.
- [4] Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, et al. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage[J]. *Mol Cell Neuroscience*, 2008, 39(4):619-627.
- [5] Pan H, Ren SC, He XL, et al. The effects of human 21.5 kDa MBP gene on HepG-2 proliferation and apoptosis [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, 40(5):775-779.
- [6] Althaus HH, Klopner S, Rohde G, et al. Myelin basic protein induces cell death of mature pig oligodendrocytes in vitro and produces demyelination in vivo[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(1):77-80.

- [7] Lindsey JW, Jin R. Immune regulatory effects of central nervous system antigens in culture [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(11):1605-1612.
- [8] 田瑞敏, 鄢佳城, 易芳, 等. 21.5kD MBP RNAi 有效靶点的筛选及验证[J]. *川北医学院学报*, 2013, 28(2):112-116.
- [9] Kagawa Y, Hirayama K, Tagami M, et al. Immunohistochemical analysis of equine pulmonary granular cell tumours[J]. *J Comp Pathol*, 2001, 124(2/3):122-127.
- [10] 袁斌, 谭燕, 张云辉, 等. 髓鞘碱性蛋白在肺腺癌 A549 细胞表达及其功能意义[J]. *昆明医学院学报*, 2011, (7):52-54.
- [11] Dmytrenko VV, Boiko OI, Shostak KO, et al. Expression of myelin basic protein and glial fibrillary acidic protein genes in human glial brain tumors[J]. *Tsitol Genet*, 2009, 43(1):28-35.
- [12] Popko B, Pearl DK, Walker DM, et al. Molecular Markers that Identify Human Astrocytomas and Oligodendrogliomas[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(4):329-338.
- [13] Watabe M, Kakeya H, Osada H, et al. Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 1999, 18(37):5211-5220.
- [14] Atkins CM, Yon M, Groome NP, et al. Regulation of myelin basic protein phosphorylation by mitogen-activated protein kinase during increased action potential firing in the hippocampus[J]. *J Neurochem*, 1999, 73(3):1090-1097.
- [15] Smith GS, Samborska B, Hawley SP, et al. Nucleus-localized 21.5-kDa myelin basic protein promotes oligodendrocyte proliferation and enhances neurite outgrowth in coculture, unlike the plasma membrane-associated 18.5-kDa isoform[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(3):349-362.

(收稿日期:2014-08-08 修回日期:2014-10-30)

(上接第 9 页)

- [10] Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(5):407-414.
- [10] Munajat I, Zulmi W, Norazman MZ, et al. Tumour volume and lung metastasis in patients with osteosarcoma[J]. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 2008, 16(2):182-185.
- [11] 刘志礼, 罗庆丰, 黄山虎, 等. 脂肪酸合成酶、Ki-67 在骨肉瘤中的表达及其与转移的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(10):1083-1085.
- [12] Wang W, Dai LX, Zhang S, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(3):274-283.

- [13] Zhao FL, Hu GD, Wang XF, et al. Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(3):859-866.
- [14] Zhao G, Cai C, Yang T, et al. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53906.
- [15] Ziyang W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4):1469-1474.

(收稿日期:2014-08-20 修回日期:2014-10-22)