

沉默 c-maf 基因对多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 增殖和侵袭力的影响

徐 冬^① 吕晓伟^① 毕作木^① 任国华^① 王鲁群^②

摘要 目的:探讨 c-maf 基因对多发性骨髓瘤细胞增殖、侵袭力的影响。方法:脂质体法用 c-maf siRNA 转染多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226, RT-PCR 技术检测 c-maf 基因的表达, MTT 实验和 Transwell 小室分别检测多发性骨髓瘤细胞增殖活性和侵袭力的改变, 流式细胞术检测细胞周期, Western blots 检测相关蛋白的表达情况, 并检测 Caspase 的活性。结果:c-maf siRNA 有效地转染入细胞并抑制了 c-maf 基因的表达。转染 c-maf siRNA 细胞的增殖活性及体外侵袭力均显著下降 ($P<0.05$), 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, survivin、MMP-2、MMP-9、ARK5、cyclin B1 蛋白水平明显低于对照组 ($P<0.05$), Caspase-3/7 蛋白活性高于对照组 ($P<0.05$)。结论:c-maf siRNA 可明显抑制多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞的增殖活性及侵袭力。c-maf 基因可作为多发性骨髓瘤基因治疗的靶基因。

关键词 c-maf 基因 多发性骨髓瘤 RNA 干扰 增殖 侵袭 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2014.0168

Experimental study on the proliferation and invasion activity of the c-maf gene inhibited multiple myeloma RPMI8226 cells

Dong XU¹, Xiaowei LV¹, Zuomu BI¹, Guohua REN¹, Luqun WANG²

Correspondence to: Luqun WANG; E-mail: wanglq@sdu.edu.cn

¹Department of Hematology, The First Hospital of Zibo City, Zibo 255200, China; ²Department of Hematology, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, China

This work was supported by the Tumor Clinical Research Fund of The Chinese Medical Doctor Association (No.20100123)

Abstract Objective: To investigate the effect of c-maf gene on the MM cells' proliferation and invasion activity. **Methods:** Lipofectin Reagent was used to transfect c-maf siRNA into multiple myeloma cell of RPMI8226. The mRNA expression level of c-maf was detected by RT-PCR. Cell growth curve was measured by MTT assay. Transwell chamber test was used to measure MM cells' *in vitro* invasion activity. The cell cycle distribution were assessed by flow cytometry. The protein expression levels of survivin, MMP-2, MMP-9, ARK5 and cyclin B1 were detected by Western blot. We also detected the activity of Caspase-3/7. **Results:** The c-maf siRNA was effectively transfected into cells and the mRNA expression of the c-maf gene was inhibited. MTT test and Transwell chamber test showed that the proliferation and *in vitro* invasion activity of transfected cells were significantly lower than those of other two groups ($P<0.05$). Cell cycle of c-maf siRNA transfected group cells was arrested in G₂/M phase. The expression levels of survivin, MMP-2, MMP-9, ARK5, cyclin B1 and the activity of Caspase-3/7 between c-maf siRNA transfected group and the other two groups were statistically different ($P<0.05$). **Conclusion:** c-maf gene by c-maf siRNA can remarkably inhibit proliferation and invasion of multiple myeloma cell lines of RPMI8226. C-maf gene may be used as the target for multiple myeloma gene therapy.

Keywords: c-maf gene, multiple myeloma, RNAi, proliferation, invasion, apoptosis

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)约占血液系统疾病的10%,是起源于B淋巴细胞的恶性肿瘤。新型的靶向治疗药物,如蛋白酶体抑制剂硼替佐米在提高缓解率、改善生活质量及延长患者寿命方面均优于传统治疗^[1-3]。但是仍有相当部分患者疗效较差,有待于我们发现新的治疗靶点。Hurt等^[4]发现,约50%骨髓瘤患者样本中c-maf存在高表达。生理情况下,c-maf蛋白在浆细胞的细胞粘附、移动,细胞

周期调控等生理过程中发挥作用。本研究利用RNAi技术沉默多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226的c-maf基因,观察其对多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226的增殖和侵袭力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人多发性骨髓瘤RPMI8226细胞株:潍坊医学院冯永堂教授惠赠。Matrigel胶:BD公司产品,Tran-

作者单位:①淄博市第一医院血液科(山东省淄博市255200);②山东大学齐鲁医院血液科

*本文课题受中国医师协会血液肿瘤临床研究基金(编号:20100123)资助

通信作者:王鲁群 wanglq@sdu.edu.cn

swell小室:Costar公司产品,c-maf干扰序列及对照序列:Qiagen公司产品,小鼠抗人survivin、MMP-2、MMP-9、 β -actin、ARK5、cyclin B1单克隆抗体均购自美国Santa cruz公司,HPR标记山羊抗小鼠IgG购自北京鼎国生物公司,细胞总蛋白提取试剂盒:北京康成生物公司产品,Caspase-3/7活性检测试剂盒:美国Promega公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与培养 37℃水浴箱中复苏细胞,成功后置于CO₂培养箱培养传代。

1.2.2 脂质体法转染多发性骨髓瘤细胞系 实验分组:实验组(c-maf siRNA组);阴性对照组(NC siRNA组);空白对照组(mock siRNA组)。24孔培养板中将siRNA、脂质体混合液100 μ L按照不同的试验分组进行转染,镜下观察转染效果。

1.2.3 RT-PCR检测c-maf基因的表达 逆转录、扩增目的基因。PCR反应条件:94℃变性45s,56℃退火50s,72℃延伸1 min,共25个循环。表达抑制率计算公式:表达抑制率(%)=(1-c-maf条带平均灰度值/ β -actin条带平均灰度值) $\times$ 100%。引物序列:c-maf:P1 5'-AGCGGCTTCCGAGAAAAC-3',P2 5'-ACTTGCGAGTGGGCTCAG-3'; β -actin:P1 5'-GACTGCCTGCCTCACTTT-3',P2 5'-GCTGATCTCGGCTCTGT-3'。

1.2.4 MTT法检测细胞增殖抑制效应 分别取培养1~7d各组细胞行MTT实验。以时间为横坐标,各组OD值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.5 Transwell小室侵袭试验 Matrigel胶包被Transwell小室上室面。取转染后24 h的各组细胞 1×10^5 个移到无血清培养基中,放入Transwell小室上层。下室加入含15%胎牛血清的培养基,置5% CO₂培养箱24 h。取出Transwell小室,倒置显微镜下计数下室面10个高倍视野细胞数,取平均值。

1.2.6 细胞周期检测 收集转染后0、24、48、72 h各组细胞,乙醇固定过夜,RNA酶水浴消化后加入碘化丙啶(PI,50 μ g/mL),4℃放置15 min后流式细胞仪检测。

1.2.7 Western blot检测 survivin、MMP-2、MMP-9、ARK5、cyclin B1蛋白表达 PBS漂洗、裂解细胞,蛋白质定量、分离后PVDF膜上免疫杂交,洗涤后将滤膜与标记的抗免疫球蛋白抗体温育。发光法确定靶蛋白数值。

1.2.8 Caspase活性检测 取培养1、2、3 d的各组细胞,按照试剂盒的操作说明将缓冲液与底物混合,混合物100 μ L加入等体积培养的细胞悬液后孵育3 h,酶标仪检测并计算Caspase活性。

1.3 统计学分析

实验所得数据采用SPSS统计学软件处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置荧光显微镜下观察转染后的细胞

在荧光显微镜下观察实验细胞,绝大多数细胞都荧光着色,与背景反差明显,荧光着色细胞有明显的细胞轮廓(图1)。

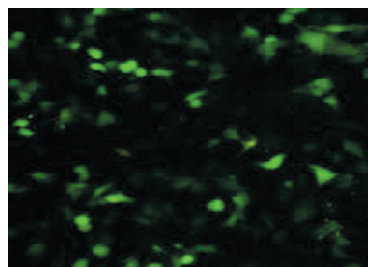


图1 转染24 h后倒置荧光显微镜下观察转染后实验细胞($\times 100$)

Figure 1 MM cells under the fluoroscope at 24 h after transfection($\times 100$)

2.2 RT-PCR检测c-maf基因的表达

实验组条带亮度较阴性对照组和空白对照组明显弱(图2)。表达抑制率:c-maf siRNA组:76.38% $\pm$ 7.36%,NC siRNA组:44.01% $\pm$ 6.31%,mock siRNA组38.66% $\pm$ 6.95%,差异有显著统计学意义($P<0.05$,表1)。

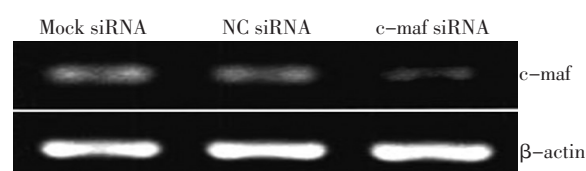


图2 c-maf siRNA对多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226 c-maf基因表达的影响

Figure 2 Effect of siRNA on c-maf mRNA expression in RPMI8226 cells

表1 c-maf siRNA抑制c-maf基因的表达

Table 1 siRNA inhibits c-maf mRNA expression in RPMI8226 cells

Group	n	Inhibiting rate($\bar{x}\pm s$)
c-maf siRNA	6	60.38 $\pm$ 7.36*
NC siRNA	6	44.01 $\pm$ 6.31
Mock siRNA	6	39.66 $\pm$ 6.95

*There was a statistical difference between the c-maf siRNA group and the other two groups($P<0.05$)

2.3 MTT法检测各组细胞的增殖活性

转染c-maf siRNA后第1、2d,各实验组增殖活性无明显差异,48 h的OD值,c-maf siRNA组:0.65 $\pm$ 0.07,NC siRNA组:0.66 $\pm$ 0.11,空白对照组:0.65 $\pm$ 0.17,无统计学差异($P>0.05$),c-maf siRNA组较其他两组在第3~7d出现差异,第5d差异最明显,此时c-maf siRNA组OD值:0.67 $\pm$ 0.08,NC siRNA组OD

值: 0.74 ± 0.12 , 空白对照组 OD 值: 0.75 ± 0.29 , 比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。以时间为横轴、OD 值为纵轴绘制生长曲线(图3)。7d后由于培养基营养成分消耗,失去统计意义。

2.4 沉默 c-maf 基因对人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 体外侵袭力的影响

增殖抑制实验表明, c-maf 基因沉默后第3d开始出现显著差异。因此, 为了减少细胞增殖对侵袭力实验的影响, 检测侵袭力的实验选定在转染后 24 ~ 48 h 进行。结果显示 c-maf siRNA 组、NC siRNA 组、空白对照组粘附于下室面的细胞数量分别为: 35.66 ± 5.09 , 57.01 ± 10.22 , 60.33 ± 9.63 。c-maf siRNA 组与其余二组对比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图4)。

2.5 流式细胞术检测细胞周期变化

c-maf siRNA 组在转染后3天 G₂/M 期比例逐渐增加, 由 16.20% 升至 51.10%, 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。c-maf siRNA 组的细胞周期图出现亚二倍体凋亡峰(图5, 表2)。

2.6 Western blot 检测蛋白表达

Western blot 检测转染 72 h 后, c-maf siRNA 组、NC siRNA 组、空白对照组的蛋白表达水平, 结果显示 c-maf siRNA 组 Survivin、MMP-2、MMP-9、ARK5、cyclin B1 均明显低于其他两组 ($P < 0.05$, 图6)。

2.7 Caspase-3/7 蛋白活性检测

转染后, 随着时间延长 c-maf siRNA 组细胞的 Caspase-3/7 的活性逐渐增高, 转染 0、24、48、72 h, 各实验组 Caspase-3/7 活性为: c-maf siRNA: 0.314 ± 0.029 , 0.468 ± 0.039 , 0.636 ± 0.052 , 0.786 ± 0.081 , NC siRNA: 0.314 ± 0.029 , 0.350 ± 0.035 , 0.361 ± 0.033 , 0.373 ± 0.038 , Mock siRNA: 0.314 ± 0.029 , 0.348 ± 0.026 , 0.357 ± 0.033 , 0.370 ± 0.034 。c-maf siRNA 组和其他二组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图7)。

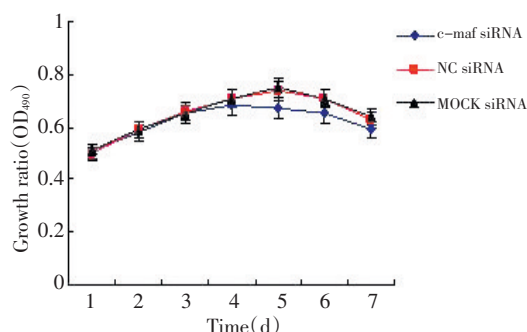


图3 转染 c-maf siRNA 对人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 增殖的影响

Figure 3 The growth curve according to the MTT assay in different groups of RPMI8226 after transfection with c-maf siRNA

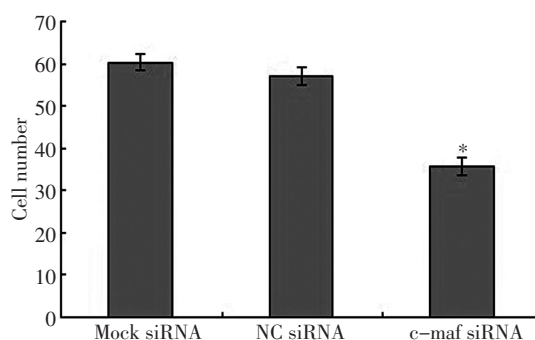
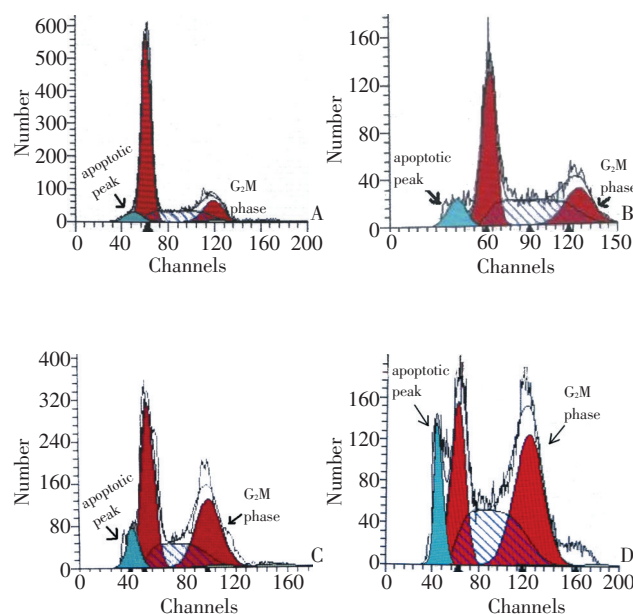


图4 c-maf 基因沉默对人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 体外侵袭力的影响 (* $P < 0.05$)

Figure 4 The effect of c-maf siRNA on *in vitro* invasion activity of RPMI8226 cells



A: 0 h; B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h

图5 c-maf 基因沉默对人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI8226 细胞周期的影响

Figure 5 The effect of c-maf siRNA on cell cycle progression of RPMI8226

表2 转染后不同时间 G₂/M 期细胞数量比例 (%)

Table 2 The percentage of RPMI8226 cells in G₂/M phase at different time points (%)

Time (h)	G ₂ /M		
	c-maf siRNA	NC siRNA	MOCK siRNA
0	16.20	16.32	17.11
24	26.34 [△]	18.64*	18.80*
48	35.84 ^{△△}	19.95**	19.36**
72	51.10 ^{△△}	20.28**	20.44**

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ compared with 0 h time. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with c-maf siRNA groups

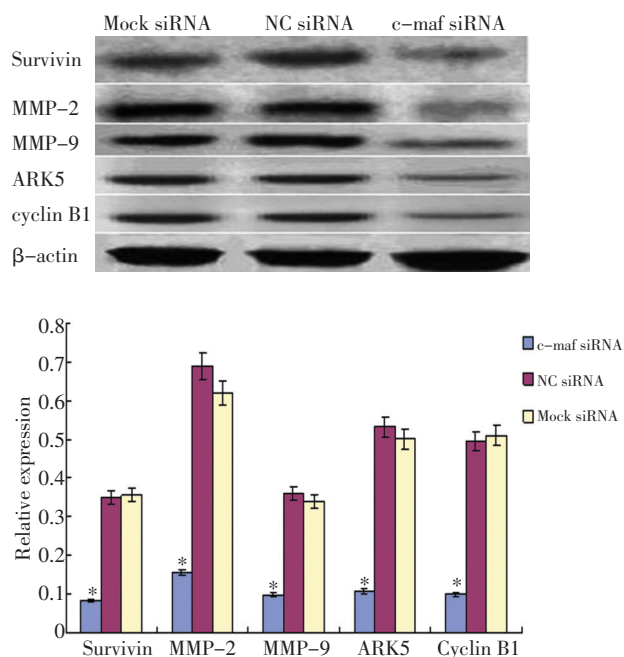
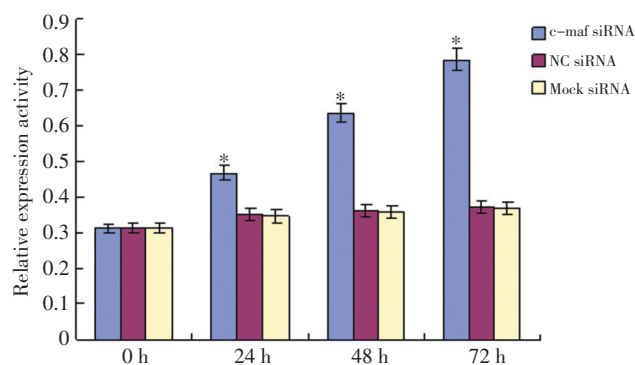


图6 转染后RPMI8226细胞的survivin、MMP-2、MMP-9、ARK5、cyclin B1蛋白表达的差异

Figure 6 The expression of survivin, MMP-2, MMP-9, ARK5, and cyclin B1 protein in RPMI8226 cells after transfection



* $P < 0.05$ c-maf siRNA group compared with other two groups

图7 转染后RPMI8226细胞的Caspase-3/7蛋白活性的差异

Figure 7 The change of Caspase-3/7 protein activity in RPMI8226 cells after transfection

3 讨论

如前所述,c-maf基因在50%骨髓瘤患者标本中异常高表达。研究显示^[5-7],转染外源性c-maf基因的小鼠B细胞可发展为MM。在高表达c-maf的MM细胞中,c-maf蛋白分子可促进新血管的生成;增加MM细胞的迁移力;提高对周期特异性化疗药的耐受性等。临床资料显示^[8],c-maf基因高表达者的肿瘤负荷较高,对传统化疗的有效率较差,导致总体生存和无进展生存较短。所以,c-maf基因高表达是MM患者的预后不良因素。

在细胞周期检测中,沉默c-maf基因后细胞发生了G₂/M期阻滞,提示c-maf蛋白是通过促进细胞周期

诱导细胞增殖。细胞周期蛋白研究较多的是Cyclin D。但Park等^[9]证实在多发性骨髓瘤细胞中有cyclin B的高表达。Tamura等^[10]进一步研究证实,cyclin B1表达水平较高的MM患者,有较快的细胞增殖速率,在相同的化疗周期间隔下,容易复发,所以对cyclin B1高表达患者建议缩短化疗间隔。本实验证实抑制c-maf基因的表达能下调cyclin B1,使细胞周期阻滞,所以靶向c-maf的药物能减缓MM细胞的增殖速率,减少化疗次数,降低复发率。凋亡峰的出现说明c-maf也抑制了RPMI8226细胞的凋亡。细胞凋亡的共同途径是Caspase的激活,Caspase酶是凋亡过程的主要调控蛋白,Caspase-3是多种凋亡途径共同作用的因子,其表达水平的高低决定着细胞凋亡程度^[11]。Survivin是公认的凋亡抑制基因。本实验发现,转染c-maf siRNA的RPMI8226细胞Survivin蛋白表达水平降低,而Caspase-3/7活性增高,提示沉默c-maf基因诱导RPMI8226细胞凋亡与上调Caspase-3/7和下调Survivin基因表达有关。ARK5(AM-PL-related protein kinase 5)是AMPK(AMP-activated protein kinase)的亚家族成员之一,ARK5在各种肿瘤细胞系中表达。有研究^[12,13]证实把ARK5基因转染到乳腺癌细胞MDA-MB-231,增强了其侵袭和转移的能力,而沉默内源性ARK5基因则细胞侵袭转移能力降低,并且细胞侵袭力和MMP-2、MMP-9蛋白的表达呈正相关。Chen等^[14]在人非小细胞肺癌细胞中也得到了相似的结果。Morito等^[15]发现在ARK5基因启动子区有两个MARE序列,使c-maf蛋白分子能与之结合,上调ARK5基因的表达。所以,ARK5是c-maf的下游靶基因。本研究发现,在沉默c-maf基因后ARK5、MMP-2、MMP-9的蛋白表达均明显降低,提示在RPMI8226细胞中c-maf基因很可能是通过上调ARK5基因而高表达MMP-2、MMP-9从而获得较强的侵袭活性。所以靶向c-maf基因的治疗可通过下调ARK5进而降低MMP-2、MMP-9的水平,降低瘤细胞的侵袭力,从而降低患者体内瘤细胞负荷,减少髓外转移、改善患者预后。

综上所述,本实验证实了通过沉默c-maf的表达可明显抑制多发性骨髓瘤RPMI8226细胞的增殖及侵袭力并诱导其凋亡,结合c-maf在增强多发性骨髓瘤细胞粘附、迁移和血管发生等方面的作用,我们认为靶向c-maf的治疗是可行的,将有可能成为MM基因治疗的一种新的选择。

参考文献

- 1 Morabito F, Recchia AG, Mazzone C, et al. Targeted therapy of multiple myeloma: the changing paradigm at the beginning of the new millennium[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12

- (7):743-756.
- [2] Gentilini F, Levi A, Federivo V, et al. Bortezomib a safe treatment for patients With multiple myeloma and cystic fibrosis[J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2012, 4(1):124-127.
- [3] Jasielec JK, Jakubowiak AJ, et al. Current approaches to the initial treatment of symptomatic multiple myeloma[J]. Int J Hematol Oncol, 2013, 2(1):133-139.
- [4] Hurt M, Wiestner A, Rosenwald A. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation an pathological interactions with bone marrow stroma[J]. Cancer Cell, 2004, 5(2):191-199.
- [5] Tai YT, Soydan E, Song W, et al. CS1 promotes multiple myeloma cell adhesion, clonogenic growth, and tumorigenicity via c-maf-mediated interaction with bone marrow stromal cells[J]. Blood, 2010, 115(14):2983.
- [6] Neri P, Ren L, Azab AK, Brentnall M .et al. Integrin $\beta 7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion[J]. Blood, 2011, 117(23):6202-6213.
- [7] Inagaki A, Tajima E, Uranishi M. et al. Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma[J]. Leuk Res, 2013, 37(12):1648-1655.
- [8] Kuehl WM, Bergsagel PL. Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005:346-352.
- [9] Park WH, Seol JG, Kim ES, Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(11):3065-3071.
- [10] Tamura D, Arao T, Tanaka K, et al. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition[J]. Cancer Sci, 2010, 101(6):1403-1408.
- [11] Törmänen-Näpänkangas U, Soini Y, Kahlos K, et al. Expression of caspase-3,-6 and-8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma[J]. Int J Cancer, 2001, 93(2):192-198.
- [12] Chang XZ, Yu J, Liu HY, et al. ARK5 is associated with the invasive and metastatic potential of human breast cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(2):247-254.
- [13] Ji J, Zhang BG, Zhang WD, et al. ARK5 is associated with the invasive and metastatic of breast carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2012, 28(4):382-385.[姬 静,张宝刚,张伟栋,等.ARK5与乳腺癌侵袭转移关系的研究[J].临床与试验病理学杂志,2012,28(4):382-385.]
- [14] Chen P, Li K, Liang Y, et al. High NUA1 expression correlates with poor prognosis and involved in NSCLC cells migration and invasion[J]. Exp Lung Res, 2013, 39(1):9-17.
- [15] Morito N, Yoh K, Fujioka Y, et al. Overexpression of c-maf contributes to T-Cell lymphoma in both mice and human[J]. Cancer Res, 2006, 66(2):812-819.

(2014-01-23 收稿)

(2014-04-28 修回)

(本文编辑:郑莉)



作者简介

徐冬 主治医师,硕士研究生。研究方向为多发性骨髓瘤的治疗。

E-mail:lvxiaowei102@sina.com

• 读者 • 作者 • 编者 •

二维码概念简介及与学术刊物的联系

二维码(Two-dimensional code),又称二维条码,它是用特定的几何图形按一定规律在平面(二维方向)上分布的黑白相间的图形,是所有信息数据的一把钥匙。在现代商业活动中,可实现的应用十分广泛,如:产品防伪/溯源、广告推送、网站链接、数据下载、商品交易、定位/导航、电子凭证、车辆管理、信息传递、名片交流、wifi共享等。如今智能手机扫一扫功能的应用使得二维码更加普遍。

如今已有多家期刊在其封面页或是文章底部等处印刷有一个黑白相间的矩形方框,它其实就是一个二维码,读者只要用智能手机里的二维码识别软件一"扫",即可瞬间登录相应网页,观看最新的文章资讯,读者不仅可以浏览期刊,甚至还能对文章进行评论,二维码缩短了期刊与读者的距离,增加了阅读的互动性与趣味性。

《中国肿瘤临床》编辑部