

在不同应激状态下 MDM2 基因对 Jurkat 细胞的作用

朱有凯, 林汉良, 马怡晖, 顾霞, 吴红阳, 廖冰
(中山大学基础医学院病理教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨 MDM2 基因在不同应激状态下对 T 细胞性白血病细胞株 Jurkat 增殖、凋亡和基因表达的影响。【方法】采用 RNA 干扰下调白血病细胞株 Jurkat MDM2 基因表达后, 用 Western blot、流式细胞术等方法检测 Jurkat 细胞在不同应激状态下的变化。【结果】无应激状态下, MDM2 基因表达下降后, Jurkat 细胞增殖减慢, 细胞周期表现一定程度的 G1-S 阻滞; E2F1 表达明显降低超过 78%, p65 表达下调超过 58%; 细胞损伤后, MDM2 表达下调可导致细胞损伤修复减慢, 增强紫外线和甲氨喋呤诱导凋亡作用, 导致甲氨喋呤作用下 Rb 和 Bax 基因的表达相对增加。【结论】在不同应激状态下, MDM2 基因表达下降广泛影响 Jurkat 细胞的增殖、凋亡和基因表达等生物学特性, 提示 MDM2 基因有可能作为 T 细胞性白血病治疗的潜在新靶点。

关键词: MDM2 基因; T 细胞性白血病, Jurkat; RNA 干扰

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0545-04

Effect of MDM2 Gene on T-Cell Leukemia Jurkat Cells under Different Stress States

ZHU You-kai, LIN Han-liang, MA Yi-hui, GU Xia, WU Hong-yang, LIAO Bing

(Department of Pathology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of MDM2 gene on the proliferation, apoptosis, and gene expression of T-cell leukemia Jurkat cells under different stress states. 【Methods】 After knockdown of MDM2 gene by RNAi, the modification of T lymphoblastic leukemia Jurkat cells under different stress states was assessed by Western blot analysis and flow cytometry. 【Results】 After down regulation of MDM2 gene under no stress reaction, the growth of Jurkat cells was slow and the certain extent of G1-S arrest was observed. On the other hand, the expression of E2F1 and p65 protein was obviously down-regulated by 78% and 58%, respectively. When the cells were injured, the knockdown of MDM2 gene slowed the process of repairment and increased the apoptosis of UV irradiation and induced by methotrexate. Consequently, the expression of Rb and Bax was upregulated with the effects of MTX. 【Conclusion】 The present study showed that the knockdown of MDM2 may have broad effects on the biological characteristics of Jurkat cells such as proliferation, apoptosis, and gene expression under different stress states. The results suggested that MDM2 gene may be the new target for treatment of T-cell leukemia.

Key words: MDM2 gene; T-cell leukemia; Jurkat; RNA interference

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(5):545- 548]

在我国 T 细胞性白血病约占白血病发病总数 20%~30%, 其中 80%~90% 为 T 淋巴母细胞性白血病。相对于 B 细胞性白血病, T 细胞性白血病治疗效果不佳, 患者生存时间较短。文献报道这种情况与致瘤基因和(或)抑瘤基因的异常密切相关。近年来, MDM2 在 T 细胞性白血病中作用逐渐引起重视。MDM2 是一种癌基因, 不仅可结合 p53 蛋白, 同时还能与 E2F1、Rb 等重要基因产物相结合, 从

而影响细胞周期、细胞增殖和凋亡、应激反应等重要生命过程。在白血病中 MDM2 主要以过表达形式存在, 已往的研究显示 MDM2 与白血病之间存在相关性^[1,2], 但是其中的分子机制仍未被阐明。应用 RNA 干扰技术使 T 淋巴母细胞性白血病细胞株 Jurkat MDM2 基因表达下降后, 细胞增殖减慢, 并出现一定程度的 G1-S 期阻滞^[3]。本实验以 MDM2 表达降低的 Jurkat 细胞株作为研究对象, 通过流

收稿日期: 2005-06-24

作者简介: 朱有凯(1966-), 男, 广西北海人, 博士生, 讲师; 林汉良, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: yk_zhu@163.com

式细胞术、Western blot 等研究方法, 进一步探讨在常规培养和细胞损伤等不同应激状态下, MDM2 基因在影响基因表达、抗凋亡等方面的作用, 为基础和临床研究提供有价值的研究资料。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

shRNA 表达载体 pSilencer CMV-4.1 neo (Ambion), Trizol、lipofetmine2000 (Invitrogen), DNA 内切酶、连接酶 (Takala), 鼠抗人 MDM2 抗体 (DAKO)、鼠抗人 β -actin 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体、羊抗兔 IgG 抗体、兔抗人 p65、E2F1 抗体(武汉博士德)、化学发光底物(北京普利伟)。

1.2 细胞培养

Jurkat 细胞株(购自上海细胞库)为本实验室保存, 细胞复苏后用不含抗生素的培养基(RPMI1640+150 mL/L 胎牛血清)培养。

1.3 应用 RNA 干扰建立 MDM2 基因表达下降 Jurkat 细胞株

根据 Berns 等^[4] 实验结果, 构建可表达针对 MDM2 基因的 shRNA 载体和无功能 shRNA 载体, 分别命名为 pMDM2-shRNA 和 pCMV。采用 lipofectamine 2000 将表达载体转染 Jurkat 细胞后, 用 G418 筛选抗性细胞。

1.4 紫外线照射和甲氨喋呤作用

紫外线照射: 1 000 r/min ($r=20$ cm) 离心 5 min 收集细胞, 用无菌 1 \times PBS 洗涤细胞并计数。重悬细胞, 使之浓度为 2×10^6 , 用无菌 1 \times PBS 洗 6 孔板, 尽量吸干残余 PBS。每孔加入 0.5 mL 细胞悬液, 将培养板开盖直接在无菌台 20 W 紫外灯下照射, 距离为 0.5 m, 短时间照射 10 s 后, 细胞转到 24 孔板做生长曲线试验; 长时间照射时间为 40 s 后, 培养 24 h 收集细胞。

甲氨喋呤 (methotrexate, MTX) 作用: 在 24 孔板上接种细胞, 每孔含培养液 1 mL, 细胞数为 1×10^6 , 加入 1 μ g/mL MTX, 培养 24 h 后收集细胞。

1.5 蛋白免疫印迹 (Western blot)

细胞总蛋白用 RIPA 细胞裂解液抽提, BCA 法进行定量。用 80 g/L ~120 g/L 的 SDS-PAGE 分离后电转膜至 PVDF 膜上。按常规方法进行封闭、一抗、二抗作用后, 加入发光底物 SuperECL Plus Western blotting, 在暗房内曝光将胶片显影固定。在图象分析系统 (FluorChem 8900, USA) 上检测目标基因条带与 β -actin 条带相对吸光度比值的均数和标准差, 分析不同细胞目标基因相对表达量

的差别。

1.6 细胞生长曲线、细胞周期和凋亡

细胞生长曲线: 在 24 孔板上每孔接种细胞数 2×10^5 , 共 21 孔。每天取 3 孔细胞分别计数, 取平均值作为当天的细胞增殖数, 连续计数 7 d, 将结果绘成曲线图。细胞周期和凋亡: 在相同时段收集待检测细胞, PBS 洗涤 2 次, 然后用 100 μ L 1 \times PBS 重悬细胞, 4 \times 用 700 mL/L 乙醇固定, 采用 PI 染料染色后, 在流式细胞仪 (Coulter, USA) 上检测细胞周期和凋亡。

2 结果

2.1 转染 MDM2 shRNA 表达载体对 Jurkat 细胞的影响

成功建立 MDM2 表达下降的细胞株和表达无功能 shRNA 对照细胞株。MDM2 表达下调后, 在蛋白质层次引起多个基因表达水平的改变。图象分析显示转染 pMDM2-shRNA 细胞 E2F1 与 β -actin 相对吸光度比值的均数为 0.1488 (标准差 0.013), 转染 pCMV 细胞相对吸光度比值的均数为 0.6907 (标准差 0.019); p65 表达的图象分析相应结果为 0.7643 (标准差 0.092) 和 1.8356 (标准差 0.057)。E2F1 表达降低超过 78%, p65 表达下调超过 58% (图 1)。

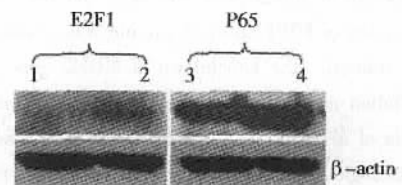


图 1 E2F1 和 p65 基因表达的 Western blot

Fig.1 Western blot for E2F1 and p65 expression in Jurkat cells

1, 3 lanes showed the results of Western blot of the cells transfected with the pMDM2-shRNA vector; 2, 4 lanes were the results of cells transfected with pCMV

2.2 UV 照射和 MTX 作用对 MDM2 表达下降 Jurkat 细胞的影响

短时间 (非致死性) 紫外线照射后, 转染 pMDM2-shRNA 的细胞前 3 d 处于生长停滞状态, 直至第 4 天以后细胞的增殖活性才逐渐恢复 (图 2)。相对于转染 pCMV 的细胞, 长时间紫外线照射和 MTX 作用均能导致 MDM2 下调的细胞出现不同程度的细胞凋亡增加 (图 3,4)。无应激状态下, 2 种细胞 Rb 和 Bax 蛋白表达无明显差别; 加入 MTX

24 h 后, 相对于转染 pCMV 细胞, 转染 MDM2 shRNA 细胞 Bax 基因表达增加 75%, Rb 基因表达

增加 55% (图 5)。

3 讨 论

3.1 常规培养条件下 MDM2 基因影响其他基因表达

转染 MDM2 shRNA 表达载体后, shRNA 在细胞内经 Dicer 酶作用转变为双链 siRNA, 特异性地降解 MDM2 基因的 mRNA, 使基因转录后表达水平下降^[6]。伴随 MDM2 的敲低, MDM2 对 Jurkat 细胞的增殖活性、细胞周期产生不同程度的影响^[3]。在本实验中, 为了探讨 MDM2 表达下降是否影响其他基因的表达, 检测了 E2F1、p65 等基因的表达水平, 结果表明在蛋白质水平 E2F1 表达明显降低, p65 也出现较明显的下调。这些结果与 Zhang 等^[6]实验结果相似。

在白血病细胞中, MDM2 能直接作用于 P65 蛋白的启动子, 增加 p65 蛋白表达^[7]。MDM2 过表达及 p65 蛋白表达上调见于 BCP-ALL 患者和 EU-4 细胞株, 体外实验显示 p65 上升导致细胞对阿霉素耐药。此外 p65 还能增强白血病细胞抗凋亡的能力。本实验 MDM2 下降后导致 p65 表达减少, 从另一个侧面证实了 MDM2 对 p65 的直接调控作用。

E2F1 具有刺激细胞增殖和促使细胞从 G1 进入 S 期功能。MDM2 可直接激活 E2F1 的转录活性, 增加 E2F1 的表达, 促进细胞的生长^[8]。另外 MDM2 抑制 Rb 蛋白的活性, 间接地增强 E2F1 转录功能。E2F1 表达上升与肿瘤的侵袭性相关以及促进肿瘤转移。本文显示 MDM2 被干扰后可引起 E2F1 表达下降, 提示 MDM2 可能是调节 Jurkat 细胞周期和增殖的重要基因。

3.2 MDM2 基因在损伤 Jurkat 细胞应激反应中的作用

DNA 损伤作用和细胞毒性作用是抗肿瘤治疗主要的作用机制。肿瘤细胞损伤后, MDM2 等癌基因常常参与细胞的应激反应, 增强肿瘤细胞的抗损伤能力。短时间的紫外线照射引起细胞 DNA 非致死性的损伤, 本实验生长曲线显示细胞出现了生长抑制。相对于转染 pCMV 的细胞, MDM2 表达下调的细胞需要更长时间(3 d)才能从生长抑制状态恢复增殖活性, 显示细胞抗损伤能力减弱。实验结果提示 MDM2 能增强细胞修复 DNA 损伤能力。

文献报道采用针对 MDM2 的反义核酸下调 MDM2 表达后, 可导致细胞凋亡增加, 增强抗肿瘤治疗效应^[6,9]。可能相关机制有: MDM2 表达下调

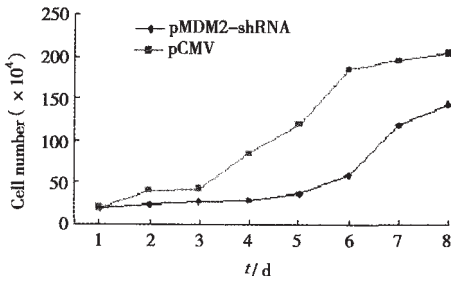


图 2 短时间紫外线照射后 Jurkat 细胞生长曲线

Fig.2 The growth curve of Jurkat cells after short time of UV irradiation

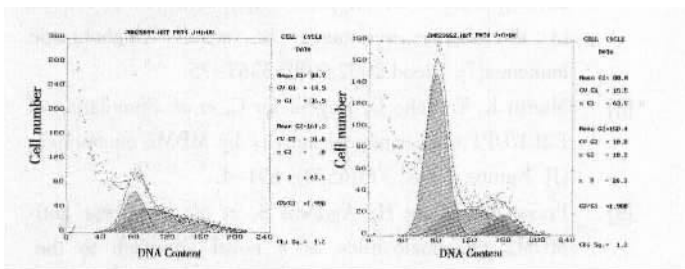


图 3 紫外线照射后 Jurkat 细胞流式细胞检测

Fig. 3 Flow cytometry of Jurkat cells after UV irradiation The left was the result of cells transfected with the pMDM2-shRNA; The right was the result of cells transfected with the pCMV

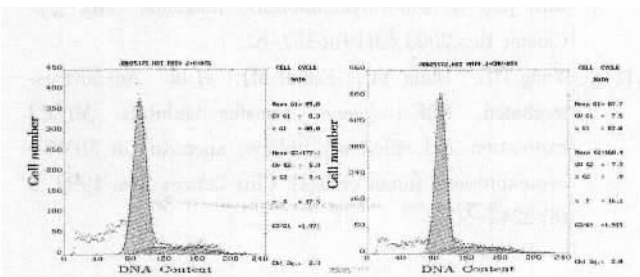


图 4 加入 MTX 后 Jurkat 流式细胞检测

Fig. 4 Flow cytometry of Jurkat cells after added MTX The left was the result of cells transfected with the pMDM2-shRNA; The right was the result of cells transfected with the pCMV

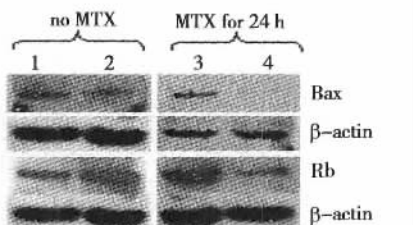


图 5 Rb 和 Bax 基因表达的 Western blot 结果

Fig.5 Western blot for Rb and Bax expression in Jurkat cells

1,3 lanes showed the results of Western blot of the cells transfected with the pMDM2-shRNA vector; 2, 4 lanes were the results of cells transfected with pCMV

后,导致野生型 p53 活性增加,抑制肿瘤生长和导致肿瘤细胞凋亡;MDM2 蛋白与 PTEN、E2F1、Rb 等相关基因产物作用,它的表达下调直接导致细胞凋亡^[10,11]。本实验显示用 shRNA 干扰 MDM2 表达后,可增强紫外线照射和 MTX 的诱导凋亡作用,实验结果与先前报道相似,提示 MDM2 在 T 细胞性白血病细胞也具有抗凋亡的作用。

目前 MDM2 抗损伤和抗凋亡的有关机制仍未阐明。本实验检测了存在 MTX 时 Rb 和 Bax 基因的表达水平,结果显示两个基因在转染 pMDM2-shRNA 的 Jurkat 细胞株表达水平平均高于转染 pCMV 的细胞。Rb 蛋白增加导致细胞停滞在 G1 期,细胞出现生长抑制;Bax 表达上调可诱导细胞凋亡。由于 Rb 和 Bax 是调控细胞周期和凋亡的重要基因,两者表达水平改变可部分解释 MDM2 在细胞抗损伤应激反应过程中的作用。

本实验的结果显示 MDM2 基因可影响 Jurkat 细胞多个基因表达,在调控细胞增殖、细胞周期以及抗凋亡和促进损伤修复等方面发挥重要作用,表明 MDM2 基因与 T 细胞性白血病具有较密切的相关性,MDM2 基因有可能作为 T 细胞性白血病治疗的潜在新靶点。

参考文献:

- [1] 晁恒军,王立,王建祥,等.MDM2 基因在急性白血病中作用的研究[J].中华血液学杂志,1997,18(1): 13-6.
- [2] 付康,吴蒙,吴健民,等.实时荧光 PCR 检测癌基因 MDM2 在急性白血病中的表达[J].华中科技大学学报(医学版),2004,33(4): 405-8.
- [3] 朱有凯,林汉良,顾霞,等. shRNA 干扰 Jurkat 细胞株 MDM2 表达对细胞生物特性的影响.临床病理学与实验病理学杂志[J]. 2005,21(3):347-50.
- [4] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway[J]. Nature, 2004, 428 (6981): 431-7.
- [5] Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi[J].Cell, 2004, 117(1): 1-3.
- [6] Zhang Z, Li M, Wang H, et al. Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003,100 (20):11636-41.
- [7] Qu L, Findley HW, Zhou M. MDM2 induces NF-kappaB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood,2002,99(9):3367-75.
- [8] Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, et al. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein [J]. Nature, 1995, 375(6533): 691-4.
- [9] Prasad G, Wang H, Agrawal S, et al. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel approach to the treatment of glioblastoma multiforme[J]. Anticancer Res, 2002,22(1A):107-16.
- [10] Zhou M, Gu L, Findley HW, et al. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Cancer Res,2003,63(19):6357-62.
- [11] Yang HL, Dong YB, Elliott MJ, et al. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer inhibits MDM2 expression and efficiently induces apoptosis in MDM2-overexpressing tumor cells[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5 (8):2242-50.

(编辑 黄小延)