

Bmi-1 基因及其编码蛋白在 SKM-1 细胞系中的表达

马国光, 郭坤元, 尚振川

A Study on the Expression of Bmi-1 in SKM-1 Cell Line in vitro

MA Guo-guang, GUO Kun-yuan*, SHANG Zhen-chuan

Department of Hematology, Zhujiang Hospital Affiliated of Nanfang Medical University, Guangzhou 510018, China

Corresponding Author: GUO Kun-yuan

Abstract: **Objective** To determine the role of Bmi-1 gene and its coded protein in the incidence of myelodysplasia syndrome. **Methods** To determine the expression of Bmi-1 on the level of mRNA and protein in MDS cell line SKM-1 by means of semi-quantities RT-PCR and Western Blot technique, normal bone marrow and cell line K562 as negative and positive comparison specifically. **Results** Bmi-1 expression level SKM-1 differs from that of normal bone marrow remarkably, while the difference is not remarkable from that of K562. **Conclusion** Bmi-1 may play an important role in the incidence of MDS subtype RAEB.

Key words: Bmi-1; MDS; SKM-1

摘要: **目的** 探讨人类 B lymphoma Mo-MLV insertion region (Bmi-1) 基因及其编码蛋白在骨髓增生异常综合征 (myelodysplasia syndrome, MDS) 发病中的地位和作用。 **方法** 以正常骨髓和白血病细胞系 K562 为对照, 利用半定量 RT-PCR 和 Western Blot 研究 MDS 细胞系 SKM-1 中 Bmi-1 基因在 mRNA 和蛋白水平的改变。 **结果** SKM-1 中 Bmi-1 在 mRNA 和蛋白水平均较正常组织有明显表达 ($P < 0.05$), 二者表达水平与 K562 细胞系无显著差异 ($P > 0.05$)。 **结论** Bmi-1 基因在 MDS 亚型 RAEB 细胞系 SKM-1 中有明显表达, 其在 RAEB 发病中可能具有重要意义。

关键词: Bmi-1; MDS; SKM-1

中图分类号: R733.73 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)02-0083-03

0 引言

Bmi-1 是 Polycomb 家族成员, 其最初发现是作为一种原癌基因与另一种癌基因 *c-myc* 共同导致 B 细胞淋巴瘤的发病。近年来研究发现, 该基因对于维持干细胞及肿瘤干细胞的自我更新, 进而维持干细胞池的大小具有重要意义。骨髓增生异常综合征 (MDS) 是一种干细胞水平的恶性血液疾病, Bmi-1 在 MDS 中的表达国内外尚无相关研究。我们通过研究 Bmi-1 在 MDS 细胞系 SKM-1 中的表达水平, 初步探讨了 Bmi-1 在 MDS 发病中的作用, 以期为进一步指导临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Bmi-1 单克隆抗体 (Santa Cruz 产品), 二抗 (HRP 标记羊抗鼠 IgG, 晶美), K562 细胞系 (本室保存), SKM-1 细胞系 (JCRB0118, Kawaguchi, R),

蛋白标准品 (Sigma), ECL 发光试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒 (晶美), Beyozol RNA 抽提试剂盒、硝酸纤维素膜 (展晨), Bmi-1, GAPDH 引物均由上海生工合成, 显影液、定影液 (晶美)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SKM-1、K562 细胞系培养传代, 每周半量换液, 培养条件为含 10% 小牛血清的 RPMI1640, 37℃, 5% CO₂。

1.2.2 正常对照

取正常人骨髓, 常规分离单个核细胞备用。

1.2.3 RT-PCR

(1) 收集细胞: 取对数生长期的细胞, 按 1×10^7 浓度制备细胞悬液, 1 000r/min 离心 3min, 去上清, 1 × PBS 洗涤沉淀 1 次; (2) 提取 RNA 按 Beyozol 试剂盒说明提取总 RNA, 取少量琼脂糖凝胶电泳测试 RNA 完整性; (3) 一步法 RT-PCR 按试剂盒说明进行。反应体系: 5 × buffer 10μl, 25mmol/L MgCl₂ 2μl, dNTP 各 2μl, Taq 酶 2μl, 模板 1.5μl, p1、p2 (5pmol/μl) 各 1μl, DEPC 处理 ddH₂O 水补足 50μl,

收稿日期: 2005-03-21; 修回日期: 2005-06-24
作者单位: 510018 广州, 南方医科大学附属珠江医院血液科
通讯作者: 郭坤元

混匀,离心。反应条件:逆转录 60 30min;预变性 95 5min;变性 95 1min,退火 54 1min,延伸 72 1min,进行 25 个循环,最后 72 延伸 10min。结束后,取产物 5μl,1%琼脂糖凝胶电泳(80V,10min),灰度扫描。

Bmi-1 引物序列:p1: 5'-CTG GTTGCCCATT-GACA GC-3'; p2: 5'-CA GAAAATGAATGCGA GC-CA-3',片段长度为 70bp。

GAPDH 引物序列:p3: 5'-CCATGGAGAA G-GCTGGGG-3'; p4: 5'-CAAA GTTGTCATGGATGA CC-3',片段长度为 199bp。扩增条件见文献[1]。

1.2.4 Western Blot

常规提取蛋白,Bradford 法蛋白定量,蛋白电泳,电转膜(80mA 恒流电 20h),0.01M PBS 洗膜 3 次,8%脱脂奶粉室温封闭 2h,加入一抗(1 1 000),4 过夜,洗膜 3 次,加入二抗(1 1 000),37 孵育 1h,洗膜 3 次,按 ECL 发光试剂盒说明操作,显影,定影,冲洗,晾干,灰度扫描。

1.2.5 统计学分析

KS400 图像系统进行灰度分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用 one-way anova (SPSS 10.0)。

2 结果

2.1 Bmi-1 mRNA 在 MDS 细胞系 SKM-1 中的表达

Bmi-1 mRNA/ GAPDH mRNA 表达灰度比值 ($\bar{x} \pm s$) 在正常骨髓单个核细胞以及白血病细胞系 K562, MDS 细胞系 SKM-1 中分别为 0.984 ± 0.112 , 4.406 ± 0.163 , 4.632 ± 0.226 ,如图 1 显示 Bmi-1 mRNA 在 SKM-1 中有明显表达,而在正常组织中仅有少量表达,表达量经统计学处理有显著差异 ($P < 0.05$)。K562 细胞系中 Bmi-1 mRNA 表达亦较明显,与 SKM-1 表达量经统计学处理无显著差异 ($P > 0.05$)。

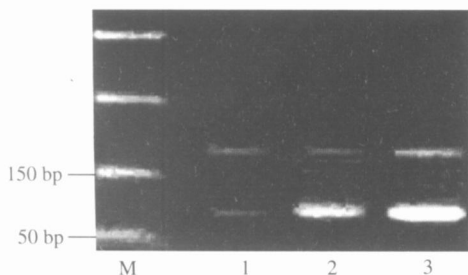


图 1 Bmi-1 mRNA 在正常骨髓、K562 以及 MDS 患者骨髓中的表达

M 为 marker;1 为正常骨髓单个核细胞;2 为 K562;3 为 SKM-1

2.2 Bmi-1 蛋白在 SKM-1 中的表达

以正常人骨髓以及白血病细胞系 K562 为对照。图 2 显示在上样蛋白量基本一致条件下,Bmi-1 蛋白在 SKM-1 中有明显表达,而在正常组织中仅有少量表达,前者是后者的 3.94 倍。K562 细胞系中 Bmi-1 蛋白表达亦较明显(3.01)。这一结果与 Bmi-1 mRNA 在 SKM-1 中的表达吻合。

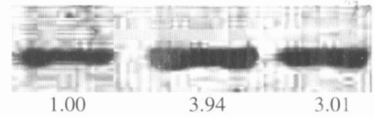


图 2 Bmi-1 蛋白表达

3 讨论

Bmi-1 是人类基因组中小鼠 Bmi-1 基因的相似基因,二者在序列上有较强的同源性,事实上,关于人类 Bmi-1 基因的许多功能都是通过对小鼠 Bmi-1 基因的研究得到的。

早期研究表明,Bmi-1 主要功能是作为一种原癌基因参与多种肿瘤的发生,如 B 细胞淋巴瘤,神经系统肿瘤等[1]。其发挥作用的途径是通过一种叫 Bmi-1 的信号通路控制下游人们所熟知的癌蛋白以及细胞周期调控蛋白,如 c-myc、pRB 等的激活。近年来研究发现[2,3],Bmi-1 信号通路对于维持干细胞的自我更新,进而维持干细胞池大小的稳定具有重要意义。近年来兴起的肿瘤干细胞理论认为,肿瘤的行为学特征和干细胞非常相似,有可能肿瘤的发生是来源于肿瘤干细胞[4,5]。这种恶性的干细胞不同于一般的肿瘤细胞,因为它可以按严格的方式自我更新、自我复制,从而维持自身数量的恒定,而其子代肿瘤细胞则不具有这种能力。许多研究证明[6-9],能够转化实验动物产生肿瘤的是一些具有干细胞标志的细胞,而干细胞相关基因在肿瘤的发生中具有重要地位。

MDS 是一类干细胞水平的血液疾病,众多研究表明 MDS 是一类异质性很强的疾病,不同的 MDS 亚型,甚至属于同一亚型的不同病人,从发病机理到临床表现、预后都有很大不同,这给治疗带来很大困难。另外,同其他类型肿瘤相比,MDS 研究存在一个重要问题,即目前缺乏广泛认可的动物模型和细胞系,这严重阻碍了 MDS 研究进展[10]。

本研究试图通过对 MDS 亚型 RAEB 细胞系 SKM-1 的研究,初步探讨 Bmi-1 在骨髓增生异常综合征发病中的地位和作用。我们的研究结果表明,Bmi-1 mRNA 和 Bmi-1 蛋白在 SKM-1 细胞系中均较正常组织有显著表达,这表明 Bmi-1 可能在 MDS 亚型 RAEB 的发病中具有重要意义。

限于 MDS 细胞系的缺乏,我们的研究仅仅限于

RAEB 亚型 MDS。至于 Bmi-1 在其他亚型 MDS 发病中的地位 and 作为,尚需进一步结合相关细胞系和临床研究的结果来证实。另外,Bmi-1 信号通路的组成以及激活的始动因素尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Jacobs JL, Scheijen B, Vonken JW, et al. Bmi-1 collaborates with c-myc in tumorigenesis by inhibiting c-myc-induced apoptosis via INK4A/ARF[J]. Genes Dev,1999,3(9):2678-2690.

[2] Park I.-K., Qian D, Kiel M,et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells[J]. Nature,2003,423(6937):302-305.

[3] Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T,et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation[J]. Nature,2003,425(6961):962-967.

[4] Muhammad AH, Michael BW, Max W, et al. Therapeutic implication of cancer stem cells[J]. Curr Opin Genet Dev, 2004,14(1):43-47.

[5] Blair A, Hogge DE, Allies LE,et al. Lack of expression of thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo[J]. Blood,1997,89(9):3104-3112.

[6] Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34+/CD71-/HLA-DR-[J]. Blood, 1998,92(11):4325-4335.

[7] Muhammad AH, Max SW, Adalberto BH, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(7):3547-3549.

[8] Dick JE. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(7):3547-3549.

[9] 邵宗鸿,郝玉书. 骨髓增生异常综合征某些研究进展[J]. 中华血液学杂志,1996,17(2):106-108.

[10] Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, et al. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney[J]. Kidney Int, 1994, 45(4):998-1005.

[编辑:安凤]

· 技术交流 ·

迈普新联合化疗治疗恶性淋巴瘤的临床研究

王文武, 欧阳学农, 张霞

关键词:胸腺肽 1;淋巴瘤;化疗;免疫功能;药物治疗

中图分类号:R730.53;R733.4 文献标识码:B

文章编号:1000-8578(2006)02-0085-01

0 引言

本研究旨在评价胸腺肽 1 联合化疗治疗恶性淋巴瘤的临床情况。

1 资料和方法

1.1 一般资料 49 例恶性淋巴瘤患者均有病理学诊断;霍奇金病(HD)11 例,非霍奇金淋巴瘤(NHL)38 例;B 细胞来源 38 例,T 细胞来源 11 例;均为首次治疗,karnofsky 评分 60~100 分;男 35 例,女 14 例;临床分期:IIIB 期 30 例,IVB 期 19 例;将患者随机分为单纯化疗组(20 例)和迈普新(胸腺肽 1)组(29 例)。

1.2 治疗方案 HD 和 NHL 分别用 COPP 方案和 CHOP 方案化疗 4 个周期后开始评价。胸腺肽 1 为 1.6mg,皮下注射,从第 8 天开始,连用两周,1 次/天。

1.3 观察指标 分别测定患者化疗前 1 天、化疗开始后第 8 天和第 22 天的细胞免疫功能和体液免疫功能。流式细胞仪检测外周血淋巴细胞 CD3、CD4 和 CD8 百分比,CD4/CD8 和 NK 细胞比率。体

液免疫功能指标包括血清免疫球蛋白 IgG、IgM 和补体 C3、C4 浓度。疗效评定采用 WHO 实体瘤近期疗效统一标准。统计学方法采用 t 检验和 ² 检验。

2 结果

2.1 细胞免疫功能变化 患者化疗第 8 天外周血 CD3、CD4 百分率、NK 细胞比率均显著低于化疗前。单纯化疗组 CD3、CD4 百分率化疗第 22 天低于化疗前,CD4/CD8 化疗前后无明显差异,NK 细胞活性低于化疗前,而胸腺肽 1 组 CD3、CD4 百分率、CD4/CD8、NK 细胞比率化疗后 22 天均高于化疗前,与单纯化疗组相比,差异有显著意义(P<0.001)。

2.2 体液免疫功能变化 两组血清 IgM、C3、C4 水平化疗前后差异均无显著意义;而化疗第 22 天胸腺肽 1 组 IgG 水平高于单纯化疗组(P<0.05)。

2.3 近期疗效比较 胸腺肽 1 的有效率为 93.0%,单纯化疗组的为 80.0%(P<0.05)。

3 讨论

恶性淋巴瘤的病因之一是与患者免疫功能低下有关,抑制性 T 淋巴细胞的缺失和功能障碍起着重要作用^[1]。而化疗进一步抑制了已经降低的免疫功能。应用胸腺肽 1 对晚期的恶性肿瘤患者化疗有明显的辅助治疗作用^[2]。李桂芳等^[3]研究结果表明胸腺肽 1 可以恢复因化疗抑制的免疫功能。研究表明胸腺肽 1 不仅与细胞免疫功能的形成直接相关,也可以增强循环血中成熟 T 淋巴细胞的功能^[4]。本研究中观察到,胸腺肽 1 可对抗化疗对患者外周血 T 细胞百分比和淋巴细胞及 NK 细胞活性的负面影响;对抗体的生成也有促进作用。对化疗有辅助治疗作用,可使患者有效率提高。

参考文献:

[1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 10 版. 北京:人民卫生出版社,2001.2186.

[2] 陆建伟,周振英,陈嘉,等. 胸腺肽 1 对恶性肿瘤患者化疗期间免疫功能影响[J]. 中国新药杂志,1999,8(12):35-37.

[3] 李桂芳,骆益宙,瞿群,等. 日达仙联合化疗药物经动脉介入栓塞化疗治疗恶性淋巴瘤的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志,2002,7(4):275-277.

[4] Garaci E, Pica F, Sinibaldi-Vallebona P, et al. T Thymosin alpha(1) in combination with cytokines and chemotherapy for the treatment of cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(8):1145-1150.

[编辑:刘红武]

收稿日期:2005-03-06;修回日期:2005-06-29

作者单位:350025 福建南京军区福州总医院肿瘤科

作者简介:王文武(1972-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤内科的临床研究

