

. 实验研究 .

siRNA 沉默 CD99 基因表达对髓母细胞瘤 DAOY 细胞增殖和凋亡的影响

张 鹏 梁励玮 陈昕薇 任 勇

【摘要】目的 探讨 siRNA 沉默 CD99 基因表达对髓母细胞瘤细胞系 DAOY 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 利用 CD99 siRNA 转染髓母细胞瘤 DAOY 细胞,细胞分为沉默 1 组(转染 CD99 siRNA-1#)、沉默 2 组(转染 CD99 siRNA-2#)、对照组(转染 siRNA 阴性对照),采用实时荧光定量 PCR 和免疫印迹法检测沉默效果。利用 CCK-8 细胞增殖实验、平板克隆形成实验检测细胞增殖能力,采用流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。**结果** 沉默 1 组和沉默 2 组 CD99 蛋白和 mRNA 表达水平均明显低于对照组($P<0.05$),而沉默 2 组又明显低于沉默 1 组($P<0.01$);因此,选用 CD99 siRNA-2# 进行后续实验。沉默 CD99 基因表达后 3、4、5 d,沉默 2 组细胞增殖水平较对照组明显降低($P<0.05$);平板克隆形成实验结果显示,沉默 2 组细胞克隆集落数明显减少($P<0.05$)。沉默 2 组 G0/G1 期细胞百分比比较对照组明显增加($P<0.05$),S 期细胞、G2/M 期细胞百分比明显低于对照组($P<0.05$)。沉默 2 组细胞早期凋亡率($8.75\%\pm 1.47\%$)显著高于对照组($3.42\%\pm 1.21\%$; $P<0.05$)。**结论** CD99 基因在髓母细胞瘤 DAOY 细胞的增殖和凋亡中发挥重要作用,推测 CD99 基因可能成为治疗髓母细胞瘤的一个新靶点。

【关键词】 髓母细胞瘤;细胞增殖;细胞凋亡;CD99;小干扰 RNA;基因沉默

【文章编号】 1009-153X(2019)10-0615-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effects of siRNA targeted to CD99 on proliferation and apoptosis in human medulloblastoma cell line DAOY cells

ZHANG Peng, LIANG Li-wei, CHEN Xin-wei, REN Yong. Department of Pathology, General Hospital; Central Theater, PLA, Wuhan 430070, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of down-regulation of CD99 expression induced by RNA interference on the proliferation and apoptosis of medulloblastoma cell line DAOY cells. **Methods** Small interfering RNA (siRNA) targeted to CD99 (CD99 siRNA) was transfected into DAOY cells by Lipofectamine™ 2000. The expressions of CD99 mRNA and protein were determined respectively by RT-PCR and Western blot 8 hours after the transfection. The proliferation of DAOY cells were determined by Cell Counting Kit-8 and plate colony formation assay. The distribution of cell cycle and apoptosis of DAOY cells were assessed by flow cytometry. **Results** Both the expressions of CD99 mRNA and protein were significantly down-regulated by transfection with CD99 siRNA-2# ($P<0.01$). The proliferation rate of DAOY cells was significantly deceased after the transfection with CD99 siRNA. The percentage of cells in G0/G1 phase was significantly increased in the experimental group than that in the control group ($P<0.05$). And the early apoptosis rate of DAOY cells transfected with CD99 siRNA was significantly increased than that of DAOY cells without transfection with CD99 siRNA ($P<0.05$). **Conclusions** Silencing CD99 can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of DAOY cells. CD99 plays an important role in the proliferation and apoptosis of DAOY cells. It is suggested that CD99 may become a new target directed to by the treatment of medulloblastoma.

【Key words】 Medulloblastoma; DAOY cells; CD99; Small interference RNA; Proliferation; Apoptosis

髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)是儿童最常见的恶性脑肿瘤之一,常发生于小脑,由于早期症状不典型且肿瘤细胞较易通过软脑膜播散,故临床预后差^[1]。近年来,随着手术方式的改进和放、化疗的

联合应用^[2-4],5 年生存率有一定程度的提高,但并未得到明显改善。近年来,分子靶向药物不断被开发,新的抑瘤靶点也在不断被发现,联合应用多种靶向药物及传统治疗手段可增敏药物靶效应,并降低副作用,这是目前临床研究的主要方向。细胞黏附分子 CD99 在部分肿瘤中高表达,并促进肿瘤的发生和进展;而在另一些肿瘤中则起着相反的抑制肿瘤的作用^[5]。本实验设计合成靶向 CD99 基因的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段转染人 MB-DAOY 细胞株,探讨沉默 CD99 基因表达对

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.10.012
基金项目:湖北省重点实验室开放基金(2018SYS001)
作者单位:430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院病理科
(张 鹏、梁励玮、陈昕薇、任 勇)
通讯作者:任 勇,E-mail:rybest@126.com

DAOY 细胞增殖和凋亡的影响,为 MB 临床靶向治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 MB-DAOY 细胞株购自美国 ATCC 公司;CD99 siRNA、对照 siRNA 均由广州锐博生物科技有限公司合成;脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司;鼠抗人 CD99 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;CD99 和 GAPDH 引物合成由上海生工生物工程有限公司合成;提取 RNA 试剂 Trizol、反转录试剂盒及实时荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;放射免疫沉淀测定蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和电化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自 Beyotime 生物有限公司;膜联蛋白凋亡检测试剂盒购自美国 Ebioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MB-DAOY 细胞复苏后用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养。细胞融合率在 80%~90%时,用含 0.02%乙二胺四乙酸的 0.25%的胰蛋白酶消化传代,传代比例为 1 传 3~4,取第 3~5 代细胞进行后续试验。

1.2.2 siRNA 的设计与合成 根据 CD99 基因在 GenBank 中的序列设计合成 CD99 siRNA。CD99 siRNA-1# 序列为 sense (5'-GGAUGGUGGUUUCGAU-UUATT-3'), antisense (5'-UAAAUCGAAACCACCA UCCTT-3'); CD99 siRNA-2# 序列为 sense (5'-CAAACCGAUGCCAAAUCCATT-3'), antisense (5'-UGGAUUUGGCAUCGGUUUGTT-3'); siRNA 无义对照序列为 sense (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUT T-3'), antisense (5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAT T-3')。干粉 siRNA 用焦碳酸二乙酯水稀释成 20 $\mu\text{mol/L}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 siRNA 转染 取对数生长期 DAOY 细胞,转染前 24 h 用 0.25%胰蛋白酶消化后,以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞融合度在 50%~70%时,进行转染,具体操作按 LipofectamineTM 2000 转染试剂操作说明书进行。细胞分为:①沉默 1 组,转染 CD99 siRNA-1#;②沉默 2 组,转染 CD99 siRNA-2#;③对照组,转染 siRNA 阴性对照。转染 48 h 后用于基因和蛋白表达检测以及细胞生物学实验。

1.2.4 实时定量荧光 PCR 检测 CD99 mRNA 水平 按 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,并反转录为 cDNA。内参 GAPDH 引物序列为 sense (5'-AAGGT-GAAGGTCGGAGTCAAC-3'), antisense (5'-GGGGT-CATTGATGGCAACAATA-3'),扩增产物长度为 102 bp。CD99 引物序列为 sense (5'-GCAATCCCCAA-GAAACCCAGTGCT-3'), antisense (5'-TTGGGT-GGGTTCGGTGGTTCGT-3'),扩增产物长度为 98 bp。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min \rightarrow (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s) \times 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算目的基因相对表达水平。

1.2.5 蛋白印迹实验检测蛋白表达水平 用细胞裂解液裂解提取细胞总蛋白,测定浓度后用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白转印迹于聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,吐温 20/Tris 盐缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min,再与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。磷酸盐缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,采用电化学发光试剂盒进行发光检测,以 GAPDH 为对照。

1.2.6 CCK-8 检测细胞增殖 取对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞悬液,以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl 。继续培养细胞 1、2、3、4、5 d 后,加入含 10% CCK-8 等量新鲜培养基培养 1 h,用酶标仪检测 450 nm 吸光度值,各组细胞均设 5 个复孔。

1.2.7 平板克隆形成实验 将已制备好单细胞悬液接种至 6 孔板,调整细胞数为 500 个/孔,每孔加完全培养基 2 ml 培养 7 d,当出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次。用 4%多聚甲醛 5 ml 固定 15 min,然后去除固定液,加适量 0.1%结晶紫染色 5 min,用流水缓慢洗去染色液,空气干燥,将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆,或在显微镜(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期 细胞转染 48 h 后,用 0.25%胰蛋白酶消化离心收集并用 PBS 重悬,加入 1 ml 70%乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min,用 500 μl PBS 重悬细胞,加入 2 mg/ml 碘化丙啶避光孵育 30 min,以流式细胞仪进行细胞周期的分析。

1.2.9 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞转染 48 h 后收集细胞,用预冷 PBS 洗涤,按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 密度重悬,然后取 100 μl 细胞置于流式管中,加入膜联蛋白凋亡检测试剂和碘化丙啶各 5 μl ,室温避光孵育 20 min 后置于避光冰浴中,通过流式细胞仪定量检测细胞

的凋亡情况。

1.2.10 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行分析;定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA对MB-DAOY细胞CD99表达水平的影响 沉默1组和沉默2组CD99蛋白和mRNA表达水平均明显低于对照组($P<0.05$,图1),其中CD99 siRNA-2#序列干扰效率最强($P<0.01$,图1)。因此,选用CD99 siRNA-2#进行后续实验。

2.2 沉默CD99基因表达对MB-DAOY细胞增殖的影响

响 沉默CD99基因表达后3、4、5 d,沉默2组细胞增殖水平较对照组明显降低($P<0.05$,图2)。平板克隆形成实验结果显示,沉默2组细胞克隆集落数明显减少($P<0.05$,图3)。

2.3 沉默CD99基因表达对MB-DAOY细胞周期分布的影响 沉默2组G₀/G₁期细胞百分比[(65.28±4.77)%]较对照组[(56.55±3.51)%]明显增加($P<0.05$),S期细胞[(25.85±1.88)%]、G₂/M期细胞[(7.87±0.62)%]百分比明显低于对照组[分别为(31.41±2.51)%、(12.04±1.03)%];($P<0.05$)。见图4。

2.4 沉默CD99基因表达对MB-DAOY细胞凋亡的影响 沉默2组细胞早期凋亡率(8.75%±1.47%)显著高

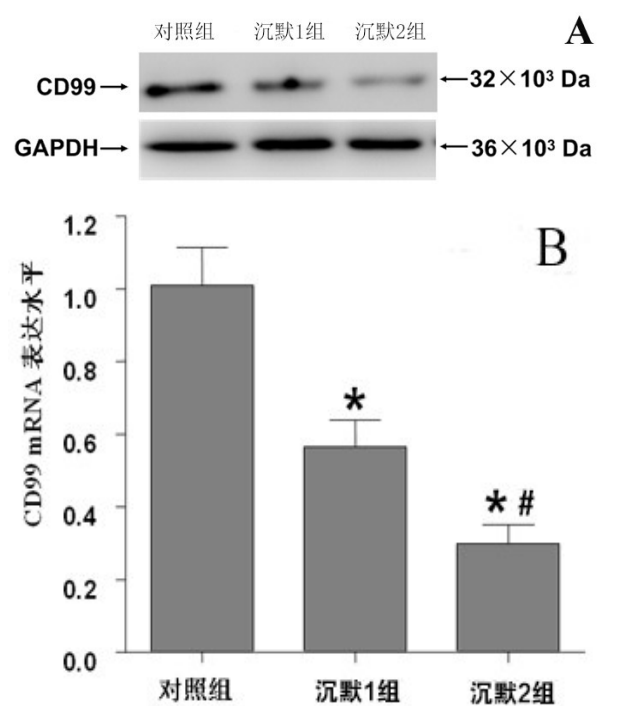


图1 siRNA对髓母细胞瘤DAOY细胞CD99表达水平的影响与对照组相比,* $P<0.05$;与沉默1组相比,# $P<0.05$

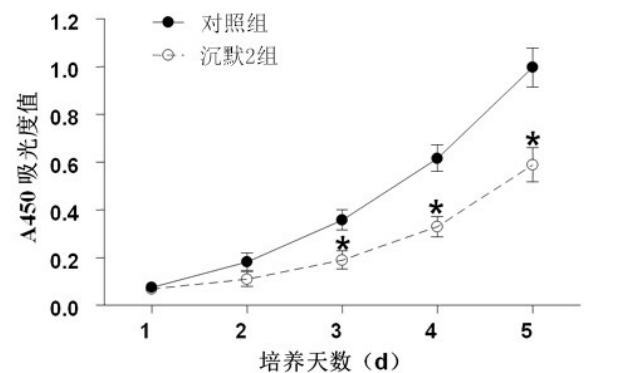


图2 沉默CD99基因表达对DAOY细胞增殖能力的影响与对照组相应值比,* $P<0.05$

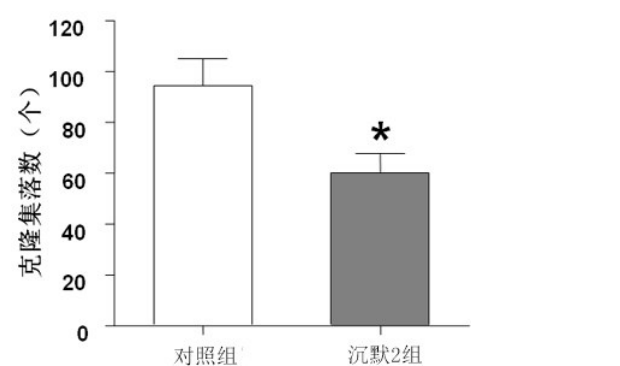


图3 沉默CD99基因表达对DAOY细胞克隆形成能力的影响与对照组相比,* $P<0.05$

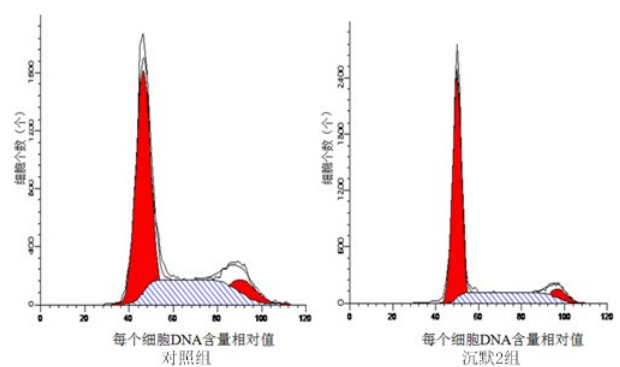


图4 沉默CD99基因表达对DAOY细胞周期分布的影响

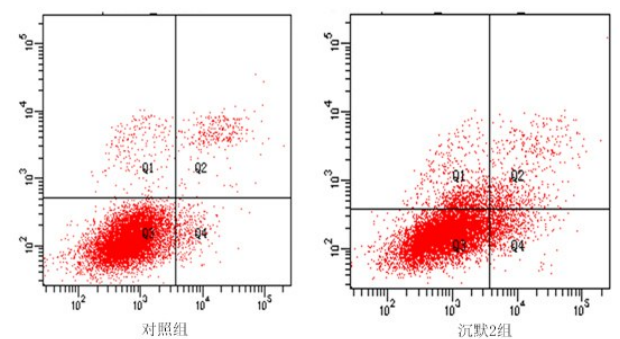


图5 沉默CD99基因表达对DAOY细胞凋亡的影响

于对照组(3.42%±1.21%; $P<0.05$;图5)。

3 讨论

MB 由 Bailey 和 Cushing^[6]于 1925 年首次发现并报道。经过几十年的研究,现在认为 MB 是一个高度异质性的胚胎性肿瘤^[7,8]。2016 年版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类根据基因表达谱、拷贝数、突变位点和预后等将 MB 分为 WNT、SHH、Group C 和 Group D 四种分子亚型^[9],各个分子亚型又可以根据基因组转录微阵列和基因甲基化微阵列进一步细分。目前,根据 MB 术后是否有肿瘤残留、有无播散等多个危险因素,划分为低危组和高危组,然后给予不同的放疗和化疗方案,病死率和致残率有所下降。但是,MB 病人多为生长发育期的儿童,术后放、化疗不可避免的产生严重的并发症,因此,寻找特异性治疗靶点显得尤为迫切。

CD99 是一个 32 kDa 大小的跨膜糖蛋白,在不同类型细胞中有着不同的功能。在正常细胞中,CD99 的激活主要与细胞的黏附和迁移相关;在炎细胞中,CD99 与 Th1 细胞的分化以及成熟 T 细胞的激活和增殖相关^[10]。而在肿瘤中,CD99 既起着癌基因作用,促进肿瘤的发生,比如胶质瘤、Ewing 肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤和乳腺癌^[11];也起着抑癌基因的作用,比如骨肉瘤^[12]、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤^[13]。在 Ewing 肉瘤中,CD99 已作为相对特异性的标志物而被应用于其辅助诊断^[14]。研究表明 CD99 的抗体可促进 Ewing 肉瘤细胞的凋亡、阻止其增殖和恶性转化,进而达到治疗的目的^[15]。我们在实际工作中发现 CD99 在部分 MB 中高表达,为研究 CD99 在 MB 中的功能,设计针对 CD99 基因的特异 siRNA 转染 MB-DAOY 细胞,检测对其细胞增殖和凋亡的影响;结果发现沉默 CD99 基因表达可以显著降低 DAOY 细胞的增殖能力并促进其凋亡。这提示 CD99 可能是 MB 靶向治疗的一个潜在靶点。

【参考文献】

[1] Quinlan A, Rizzolo D. Understanding medulloblastoma [J]. JAAPA, 2017, 30(10):30-6.
[2] Kumar V, McGuire T, Coulter DW, *et al.* Challenges and recent advances in medulloblastoma therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(12):1061-1084.
[3] 王 陈,汪立刚,胡 力,等.儿童幕下髓母细胞瘤的诊断

及显微手术治疗(附 28 例报道)[J]. 中国临床神经外科杂志,2018,23(5):305-307.
[4] 黄 勇,胡军民,张 珏,等.替莫唑胺与洛莫司汀治疗儿童复发或转移性髓母细胞瘤的临床研究[J]. 中国临床神经外科杂志,2015,20(8):478-480.
[5] Pasello M, Manara MC, Scotlandi K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology [J]. J Cell Commun Signal, 2018, 12(1): 55-68.
[6] Bailey P, Cushing H. A common type of midcerebellar glioma of childhood [J]. Arch Neurol Psychiatr, 1925, 14: 192-224.
[7] Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, *et al.* Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups [J]. Cancer Cell, 2017, 31(6): 737-54 e736.
[8] Juhnke BO, Mynarek M, Rutkowski S. Refining medulloblastoma subgroups [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(7): 847-848.
[9] Ramaswamy V, Taylor MD. Medulloblastoma: from myth to molecular [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(21): 2355-2363.
[10] Bernard G, Raimondi V, Alberti I, *et al.* CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions [J]. Eur J Immunol, 2000, 30(10): 3061-3065.
[11] Byun HJ, Hong IK, Kim E, *et al.* A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2006, 281(46): 34833-34847.
[12] Zhou Q, Xu J, Zhao J, *et al.* Downregulation of CD99 and upregulation of human leukocyte antigen class II promote tumor aggravation and poor survival in patients with osteosarcomas [J]. Onco Target Ther, 2014, 7: 477-484.
[13] Manara MC, Pasello M, Scotlandi K. CD99: a cell surface protein with an oncojanus role in tumors [J]. Genes, 2018, 9 (3): e159
[14] Louati S, Senhaji N, Chbani L, *et al.* EWSR1 rearrangement and CD99 expression as diagnostic biomarkers for ewing/pnet sarcomas in a moroccan population [J]. Dis Markers, 2018, 2018: 7971019.
[15] Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, *et al.* CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors[J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5134-5142.

(2019-05-07 收稿,2019-06-28 修回)