

核糖体蛋白 RPL34-PS1 对 B 细胞淋巴瘤的生长促进作用

周芳超¹, 蒋 静^{1,2}, 刘金晶¹, 郁多男¹

(1. 扬州大学 医学院, 江苏 扬州 225001; 2. 扬州大学 转化医学研究院, 江苏 扬州 225009)

摘要:一种核糖体蛋白 RPL34 具有促进 B 细胞淋巴瘤生长的作用, 通过分子克隆将 RPL34 基因的序列克隆到逆转录病毒载体 pBABE-Puro 上后, 包装逆转录病毒并感染 Balb/c 小鼠来源的 B 淋巴瘤细胞 3B9, 经嘌呤霉素筛选后构建稳定过表达 RPL34 的 B 淋巴瘤细胞系 RPL34-3B9。体外培养计数比较细胞增殖变化情况; 流式检测细胞凋亡和细胞周期水平; 小鼠皮下荷瘤并测量肿瘤体积。结果表明: 过表达的核糖体蛋白 RPL34 能够显著促进 B 淋巴瘤细胞的生长速率, 减少细胞凋亡, 同时能够显著增加 B 淋巴瘤细胞的成瘤速率。

关键词:核糖体蛋白; B 细胞淋巴瘤; 凋亡; 细胞周期

中图分类号:R289.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-5322(2019)04-0038-04

淋巴瘤是起源于淋巴结和淋巴组织免疫系统的恶性肿瘤, 淋巴瘤大致可分为非霍奇金淋巴瘤(90%)和霍奇金淋巴瘤(10%)。大多数淋巴瘤(90%)起源于 B 细胞, 但也可能是 T 细胞或自然杀伤细胞^[1]。B 细胞淋巴瘤是 B 细胞发生的恶性实体肿瘤, 涉及免疫球蛋白位点的染色体易位是许多 B 细胞淋巴瘤的标志。然而, 其他例如环境因素 DNA 复制错误等也在 B 细胞恶性肿瘤的发病机制中起重要作用^[2]。核糖体蛋白(ribosomal protein, RP)是核糖体的重要成分之一, 它可以和 RNA 结合形成核糖体并起到合成蛋白质的作用。RP 除了参与蛋白质的合成以外, 还能够参与调控细胞增殖, 凋亡和分化以及参与 DNA 的复制^[3], 目前也有报道核糖体蛋白异常表达会导致恶性血液疾病^[4], 同时部分核糖体蛋白也被报道能参与调控胃癌, 但是对于核糖体蛋白与淋巴瘤之间的关系, 目前尚无报道。本实验旨在证明一种核糖体蛋白 RPL34 具有显著促进 B 细胞淋巴瘤生长的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

小鼠 B 淋巴瘤细胞(由本实验室组负责人郁

多男教授构建); Alph MEM 细胞培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司); Annexin V Alexa Fluor647/PI/Appotosis dection kit(南京福麦斯生物公司); BrdU 细胞周期检测试剂盒(美国 BD 生物公司)。

1.2 稳定过表达 RPL34 的 B 淋巴瘤细胞系构建

在 pubmed 上查询到 RPL34 的基因序列后, 设计引物通过 PCR 的方法体外扩增 RPL34 的序列后, 通过分子克隆将 RPL34 的序列插入逆转录病毒载体 pBABE-Puro 中, 包装病毒并感染 3B9 细胞 48 h 后用 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的嘌呤霉素连续筛选 7 d 即得到稳定表达 RPL34 的 B 淋巴瘤细胞系 RPL34-3B9。

1.3 细胞计数

取对数生长期的 RPL34-3B9 及其对照组 pBABE-3B9, 细胞体外培养, 连续计数 4 d。

1.4 细胞周期

取对数生长期的 RPL34-3B9 及其对照组 pBABE-3B9 细胞, 使用 BD 公司的 BrdU 细胞周期检测试剂盒检测细胞周期变化, 具体步骤见产品说明书。

1.5 细胞凋亡

取对数生长期的 RPL34-3B9 及其对照组

收稿日期: 2019-09-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81470277, 81670186)

作者简介: 周芳超(1994—), 男, 江苏盐城人, 硕士生, 主要研究方向为非编码 RNA 与淋巴瘤功能和机制。

通信作者: 郁多男(1963—), 男, 江苏苏州人, 扬州大学特聘教授, 博导, 主要研究方向为肿瘤学已经发育生物学。

pBABE-38B9 细胞,用 PBS 离心清洗后弃去上清,100 μ L 缓冲液重悬细胞。每管加入 5 μ L Annexin V 和 10 μ L PI 染液染色后,避光孵育 15 min 后再加入 400 μ L 缓冲液后用流式细胞仪 (FACS Verse) 检测。

1.6 H&E 染色

取 10^6 对数生长期的 RPL34-38B9 细胞及其对照组 pBABE-38B9 细胞后,皮下注射到 Balb/c 小鼠体内,每组 4 只,成瘤后连续测量肿瘤大小^[5]。

1.7 统计学分析

数据分析采用 SPSS 16.0 软件,用单因素方差分析,数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。所有试验均重复 3 次。

2 结果分析

2.1 核糖体蛋白 RPL34 能够显著提高 38B9 细胞的增殖能力

取相同浓度对数生长期的 RPL34-38B9 及其对照组 pBABE-38B9 细胞体外培养并连续计数 4 d 后发现,如图 1 结果显示,过表达核糖体蛋白

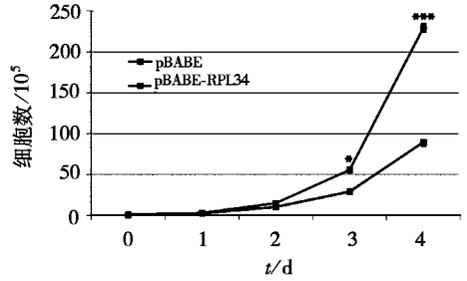


图 1 RPL34 在体外对 38B9 增殖能力的影响
Fig 1 Effect of RPL34 on proliferation of 38B9 in vitro

RPL34 能够显著提高 38B9 细胞的生长速度。

2.2 核糖体蛋白 RPL34 能够通过增加细胞合成期加速细胞生长

取 2×10^6 对数生长期的 RPL34-38B9 及其对照组 pBABE-38B9 细胞,用 PBS 清洗一遍后,用 70% 乙醇冰上固定 1 h 后,加入破膜剂冰上孵育 15 min 后,加入 PI 和 RNA 酶 A 后 Flow Cytometry 分析发现,如图 2 所示,核糖体蛋白 RPL34 能够显著增加细胞 S 期,并且整个细胞周期中处于静息期外的细胞比例更高。

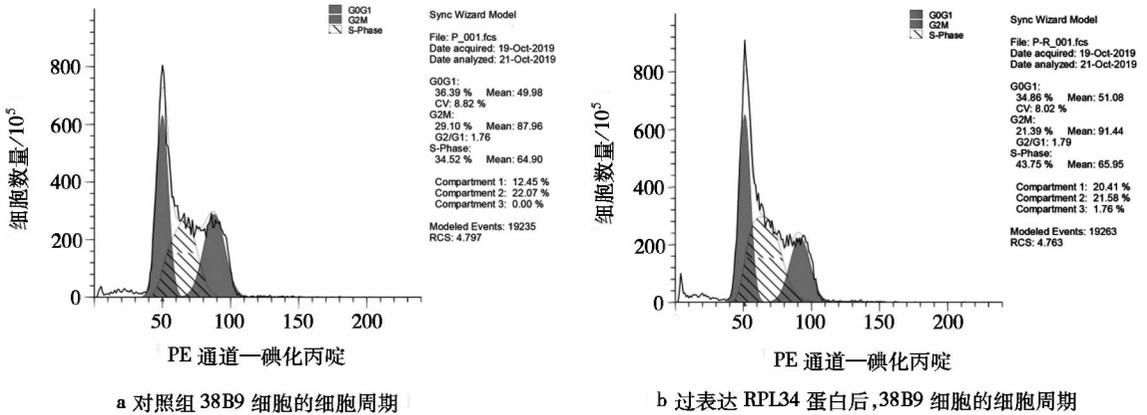


图 2 RPL34 对 38B9 细胞周期的影响

Fig 2 Effect of RPL34 on cell cycle of 38B9 cells

2.3 核糖体蛋白 RPL34 能够减少 38B9 的凋亡

取 10^5 对数生长期的 RPL34-38B9 及其对照组 pBABE-38B9 细胞后,用 PBS 离心清洗后弃去上清,100 μ L 缓冲液重悬细胞。每管加入 5 μ L Annexin V 和 10 μ L PI 染液染色后,避光孵育 15 min 后再加入 400 μ L 缓冲液后 Flow Cytometry 分析,结果如图 3 所示,发现过表达 RPL34 能够减少细胞早凋和晚凋的比例,同时死细胞也有一定程度的减少。

2.4 核糖体蛋白 RPL34 能显著提高 38B9 细胞的成瘤能力

取 10^6 对数生长期的 RPL34-38B9 及其对照组 pBABE-38B9 的细胞注射入 Balb/c 小鼠腋下,每组 4 只,待第一只小鼠成瘤后开始测量肿瘤大小,每隔 2~3 d 测量一次,肿瘤体积结果如图 4a 所示,取第 11 d 肿瘤称重后结果如图 4b 所示。由图 4 可知,核糖体蛋白 RPL34 能够显著增强 38B9 细胞的成瘤能力。

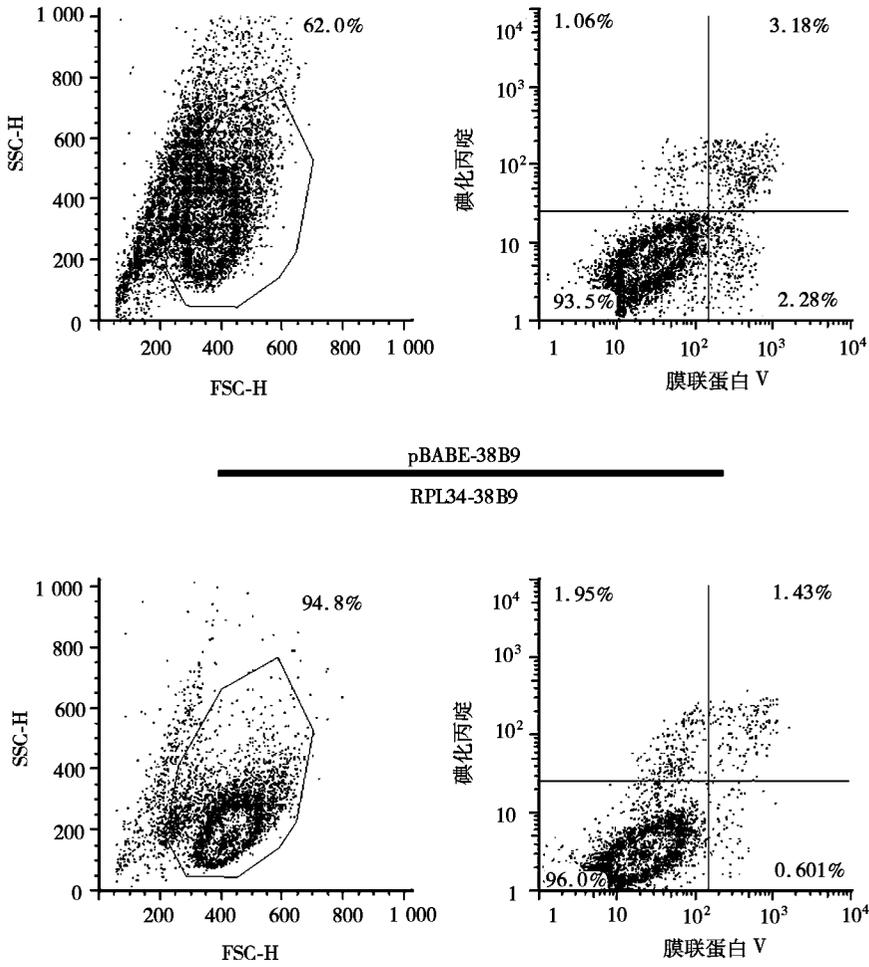


图 3 RPL34 对 38B9 细胞凋亡的影响
 Fig 3 Effect of RPL34 on apoptosis of 38B9 cells

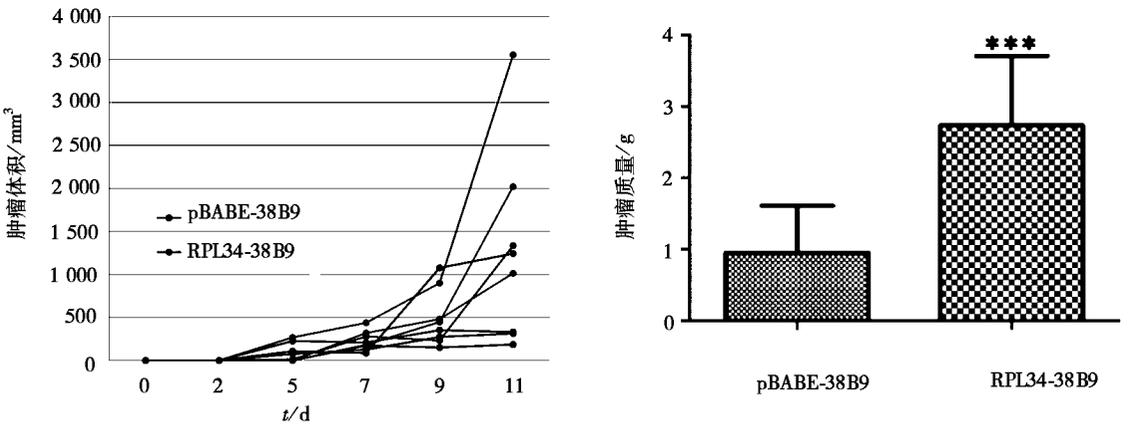


图 4 RPL34 对 38B9 细胞成瘤能力的影响
 Fig 4 Effect of RPL34 on tumorigenesis of 38B9 cells

3 讨论

核糖体作为蛋白质合成的场所,在细胞发育生长的过程中发挥着多种重要的功能。核糖体蛋

白作为核糖体重要的组成成分,它的异常表达会阻碍核糖体的正常组装和功能发挥,从而影响细胞的生物合成功能;同时由于核糖体蛋白具有核糖体外功能,其异常将进一步影响细胞的生物学

功能,进而引起疾病的病理生理学改变^[10]。

近年来的研究已经发现核糖体蛋白的异常与一些恶性肿瘤或者血液疾病息息相关^[6-9],但是其与淋巴瘤之间的关系尚未见报道,B 细胞淋巴瘤作为一种高度异质性,高度恶性的肿瘤,目前在临床治疗上并无有效手段。

随着对肿瘤发生发展机制的研究不断深入,肿瘤靶向治疗开始成为现实和当前研究的热点。肿瘤靶向治疗,顾名思义,是专门针对肿瘤特异性靶点的治疗方法。一般来说,这些靶点所具有的

共有特征是在肿瘤细胞中高表达,在正常细胞中低表达或不表达。通过阻止这些特异性的靶点,就可以抑制癌细胞的生长,杀死肿瘤细胞肿瘤。随着靶向治疗的研究的不断深入,不断寻找的新的肿瘤靶点或许会对治疗 B 细胞淋巴瘤提供新的思路。我们发现并确认了一种核糖体蛋白 RPL34 可以显著促进 B 细胞淋巴瘤的发生和生长,因而可以为淋巴瘤的靶向治疗提供一种新的可能,并且核糖体蛋白 RPL34 基于何种通路促进 B 细胞淋巴瘤的发生和生长也是值得更进一步探究的。

参考文献:

- [1] MUGNAINI E N, GHOSH N. Lymphoma[J]. Prime Care, 2016,11:661-675.
- [2] KÜPPERS R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2005,4:251-262.
- [3] WARNER J R, MCLINTOSH K B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. Molecular Cell, 2009,34(1):3-11.
- [4] SHENOY N, KESSEL R, BHAGAT T D, et al. Alterations in the ribosomal machinery in cancer and hematologic disorders [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2012,5:32-40.
- [5] 常仁旭,崔一喆,徐闯,等. 加减当归芍药汤对小鼠最大耐受量及组织病理学观察[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2019,1:51-56.
- [6] ARMISTEAD J, TRIGGS-RAINE B. Diverse diseases from a ubiquitous process: the ribosomopathy paradox[J]. FEBS Letters, 2014,9:1491-1500.
- [7] SIM E U, ANG C H, NG C C, et al. Differential expression of a subset of ribosomal protein genes in cell lines derived from human nasopharyngeal epithelium[J]. Journal of Human Genetics, 2010,2:118-120.
- [8] WU Q, GOU Y, WANG Q, et al. Downregulation of RPL6 by siRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human gastric cancer cell lines[J]. PLoS One, 2011,10:c 26401.
- [9] LUFT F. The rise of a ribosomopathy and increased cancer risk[J]. Journal of Molecular Medicine(Berl), 2010,1:1-3.
- [10] 祁岳坤,吴凌云. 核糖体蛋白异常与相关血液疾病[J]. 中国实验血液学杂志, 2016,6:1892-1896.

Effect of Ribosomal Protein RPL34-PS1 on the Growth of B-cell Lymphoma

ZHOU Fangchao¹, JIANG Jing^{1,2}, LIU Jinjing¹, YU Duonan¹

(1. College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001, China;

2. Institute of Translational Medicine, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225001, China)

Abstract: A ribosomal protein RPL34 has the effect of promoting the growth of B-cell lymphoma. After cloning the sequence of RPL34 gene onto the retrovirus vector pBab-puro by molecular cloning, the retrovirus was packaged and infected with Balb/c murine derived B lymphoma cell 38B9. After screening with purinomycin, a stable B lymphoma cell line rpl34-38b9 overexpressing RPL34 was constructed. Cell proliferation changes were compared in vitro culture count. Cell apoptosis and cell cycle were determined by flow cytometry. Subcutaneous tumor is borne in mice and the tumor volume is measured. The results showed that the overexpressed ribosomal protein RPL34 could significantly promote the growth rate of B lymphoma cells, reduce apoptosis, and significantly increase the tumorigenic rate of B lymphoma cells.

Keywords: ribosomal protein; B cell lymphoma; Apoptosis; cell cycle

(责任编辑:熊璐璐)