

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.002.html>

siRNA 抑制 syk 基因对外周 T 细胞淋巴瘤细胞增殖与凋亡的影响

李舒婷 詹鹤琴 舒炎 刘蒙蒙 孟刚

摘要 目的 探讨 siRNA 抑制脾酪氨酸激酶(syk) 基因后对外周 T 细胞淋巴瘤细胞株 HUT-78 细胞增殖与凋亡的影响。方法 针对 syk 基因特异靶点设计 3 条 siRNA (siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3), 采用电穿孔法转染外周 T 细胞淋巴瘤细胞株 HUT-78, 同时设 Mock 组和 siRNA-NC 组, 转染 48 h 后, 分别用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测 syk mRNA 和蛋白的表达水平, 筛选出最有效的 syk siRNA; syk siRNA 转染 HUT-78 后分别用软琼脂克隆形成实验检测 syk 下调后 HUT-78 细胞的克隆形成能力, MTT 法检测干扰 24、48、72 h 后细胞增殖情况, 流式细胞术检测 syk 下调后 HUT-78 细胞的凋亡情况。结果 RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与 Mock 组和 siRNA-NC 组相比, 3 条 siRNA 均能有效降低 HUT-78 细胞中 syk mRNA 和蛋白的表达, 其中 syk siRNA-1 抑制效果最明显。克隆形成实验显示, 下调 syk 基因表达后 HUT-78 细胞的克隆形成能力与 Mock 组相比明显下降 ($P < 0.05$); MTT 实验结果显示, 下调 syk 基因表达后 HUT-78 细胞的增殖能力与 Mock 组相比显著下降 ($P < 0.05$); 流式细胞术结果显示, 下调 syk 基因表达后 HUT-78 细胞的凋亡比例明显高于 Mock 组 ($P < 0.05$)。结论 siRNA 下调 syk 基因表达后可抑制外周 T 细胞淋巴瘤细胞的增殖、克隆形成, 促进凋亡, 推测 syk 基因在外周 T 细胞淋巴瘤的发生发展中发挥重要作用, 有可能成为外周 T 细胞淋巴瘤基因治疗的新靶点。

关键词 syk; siRNA; 外周 T 细胞淋巴瘤; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)05-0628-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.002

外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T-cell lymphoma,

2017-01-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(编号: 1208085MH175);

安徽医科大学博士科研基金资助项目(编号: XJ201101);

国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81202006)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 李舒婷, 女, 硕士研究生;

詹鹤琴, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: heqinzh@163.com

PTCL) 是起源于成熟 T 细胞或胸腺后 T 细胞, 是生物学行为及临床表现有明显异质性的一组恶性淋巴瘤, 占有非霍奇金淋巴瘤的 5% ~ 15%^[1-2]。这类淋巴瘤具有明显的地域和种族性差异, 其中亚洲人群发病率较高, 病理形态学及免疫表型差异性更为明显^[3-4]。该病目前尚无最佳治疗方案, 治疗反应差, 易复发, 5 年生存率仅 20% ~ 30%^[5]。近年来对 PTCL 的研究已成为热点, 但其分子生物学机制尚未明了。众多研究^[6-10]表明, 脾酪氨酸激酶(the spleen tyrosine kinase, syk) 与多种肿瘤的发生发展密切相关。syk 在乳腺癌、胰腺癌、肝癌等上皮性肿瘤组织中表达缺失^[6-8], 而在 B 细胞淋巴瘤研究中恰与此相反, syk 过表达促进淋巴瘤细胞的增殖与侵袭^[9]。syk 在 PTCL 中的作用尚不明确, 目前国内相关报道较少。本课题组前期研究^[10]显示 syk 在 PTCL 组织中高表达。syk 能否成为 PTCL 潜在治疗靶点, 有待进一步深入研究。该研究在细胞水平上探讨 siRNA 抑制 syk 基因后对 PTCL 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与 siRNA 合成 选取人外周 T 细胞淋巴瘤细胞株(HUT-78) 作为观察对象, HUT-78 细胞株购自中国科学院上海细胞库; syk siRNA 共设计 3 条, 在 5' 端增加 FAM 荧光基团方便观察转染效率, 序列分别为: siRNA-1: 5'-FAMGCAUGAGUGAUGGGCUUUATT-3'; siRNA-2: 5'-FAMGGUGGAAUAAUCUCAAGAAATT-3'; siRNA-3: 5'-FAMCCGGAUUGC AUCAACUACUTT-3'; siRNA-NC 组: 5'-FAMUUCUCGGAACGUGUCACGUTT-3'; 由上海吉玛公司设计并合成, 冻干 -20 °C 保存, 用前用 DEPC 水稀释到所需浓度。

1.1.2 主要试剂 淋巴细胞提取液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司; 红细胞裂解液、小鼠抗人 β -actin、MTT 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡

检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 分选缓冲液和正选人 CD3 磁珠购自德国美天旌公司; 兔抗人 syk 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG 二抗和辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司; syk 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; PCR 逆转录试剂盒购于美国 Thermo Fisher 公司; TRIzol 裂解液购于美国 Invitrogen 公司; 细胞培养液 IMDM 购于美国 Gibco 公司, 胎牛血清购于美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 正常 T 淋巴细胞的提取与分选 收集抗凝血标本(安徽医科大学第一附属医院血液科), 抽取 2 ml 标本转移到盛有 2 ml PBS 离心管内混匀, 缓慢加入 2 ml 的淋巴细胞分离液, 2 000 r/min 离心 10 min。小心吸取第二层白色膜样物质(即淋巴细胞层)至另一离心管内, PBS 洗涤 3 次, 弃上清液; 加入 3~5 ml 红细胞裂解液轻轻吹打混匀, 室温静置 5~10 min 后 1 300 r/min 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗涤细胞 3 次; 弃去上清液后加入 80 μ l 分选缓冲液重悬细胞, 再加入 20 μ l 磁珠混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 15 min; 再加入 1~2 ml 分选缓冲液轻轻吹打混匀, 离心后弃上清液, 加入 500 μ l 分选缓冲液重悬细胞, 将细胞悬液加入已放在分选器上的分选柱内过柱, 约 1~2 min, 重复一次; 用注射器吸取 500 μ l 分选缓冲液与分选柱连接, 快速将目的细胞打入一干净离心管中离心, 弃上清液, 提取总蛋白后进行 Western blot 检测。

1.2.2 细胞培养 HUT-78 细胞用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中常规培养。

1.2.3 实验分组 实验设 Mock 组(未转染 siRNA 的 HUT-78 细胞)、siRNA-NC 组(转入 Negative control siRNA 的 HUT-78 细胞)、syk siRNA 转染组(共 3 组, 分别为转染 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 组), 每组分 3 个复孔。转染前 1 d 用新鲜培养基调整细胞浓度, 使转染时细胞量达到 80%。

1.2.4 电穿孔转染 siRNA 取对数生长期 HUT-78 细胞, 在室温下用 PBS 洗 2 遍, 用不含血清的 IMDM 培养基调节细胞浓度为 5×10^6 个/ml, 加入终浓度为 40 nmol/L 的 siRNA, 混匀后加入 2 mm 电转杯中。电穿孔仪采用 Gene Pulser II Electroporation

System(BIO-RAD), 脉冲电压和时间为 300 V/15 ms。电穿孔后即加入提前预温的含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 并转移至 24 孔培养皿中, 继续培养 48 h。

1.2.5 RT-PCR 检测 收集各组细胞, 按照 TRIzol 法进行总 RNA 的提取, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 反应, β -actin 作为内对照, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 15 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。将产物进行电泳或 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。syk (429 bp) 基因引物序列上游为 5'-GTGGTGACTG-CATCTGAGAAAGAG-3'; 下游为 5'-GTGGCTACAGG-GGAAAGGATAATT-3'; β -actin (481 bp) 上游为 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'; 下游为 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'。分别取扩增产物 8 μ l 上样, 1 \times TAE 为电泳缓冲液, 在 1% 琼脂糖粉(含 Gelsafe 0.1%) 中电泳, 稳压 110 V, 电泳时间 40 min, 在凝胶成像系统下观察是否出现预期分子量大小的条带。

1.2.6 Western blot 检测 将 5 组细胞离心后 PBS 溶液洗涤 3 遍, 离心, 弃上清液, 加入适量 RIPA 裂解液, 并加入 PMSF(1% RIPA 量), 冰上裂解 30 min, 然后 4 $^{\circ}$ C、12 950 r/min 离心 10 min, 收集上清液。加入蛋白上样缓冲液上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h, 孵育兔抗人 syk 单克隆抗体(1:1 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 第 2 天, TBST 摇床洗膜 3 次, 每次 15 min; 孵育辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG 二抗(1:30 000) 37 $^{\circ}$ C 1.5 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 采用高灵敏度试剂盒进行发光检测, 并在 Tanon-5500 Multi 成像系统(上海天能科技有限公司)上进行观察, 然后进行图像分析。同法检测 β -actin 表达。

1.2.7 软琼脂克隆形成实验 从转染 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 的细胞中选取 syk 基因下调效果最佳的一组进行后续试验, PBS 洗涤 2 次后用含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养液重悬成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml。按 1:1 的比例使 1.2% 琼脂糖与 37 $^{\circ}$ C 新鲜 2 \times IMDM(含 20% 胎牛血清) 培养液混合制备 0.6% 底层凝胶, 冷却凝固后置于培养箱中备用。0.7% 琼脂糖与等体积 37 $^{\circ}$ C 新鲜 2 \times IMDM(含 20% 胎牛血清) 培养液混合制成上层

琼脂凝胶,取各组细胞悬液加入上层凝胶,充分混匀,注入铺有底层平皿中,待凝固后置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养,10 d 后计数,重复 3 次,计算克隆数。

1.2.8 MTT 检测 将 Mock 组、siRNA-NC 组、转染 siRNA-1 组细胞用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基调整为 5 × 10⁴ 个/ml,接种于 96 孔板(每孔 100 μl),每组设 3 个复孔,于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养。分别于 0、24、48、72 h 后,每孔加新配置的 10 μl 噻唑蓝液(5 mg/ml)继续培养 4 h;2 360 r/min 离心 15 min,弃上清液,每孔加入 100 μl 二甲基亚砷,摇床上低速震荡 10 min,在酶标仪上检测 570 nm 波长下吸光值(A),每组设置 3 个复孔,计算各组细胞平均增殖率。

1.2.9 流式细胞仪检测 细胞转染 72 h 后,收集 Mock 组、siRNA-NC 组和转染 siRNA-1 组细胞,3 730 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 1 × 10⁵ 个细胞,3 730 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀。加入 10 μl PI 染色液,轻轻混匀。室温避光孵育 20 min,随后置于避光冰浴中,通过流式细胞仪定量检测细胞的凋亡情况。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析,各组实验数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间比较采用 *t* 检验,多组均数间比较采用单因素方差分析 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 syk 蛋白在 HUT-78 细胞中的表达 结果显示: syk 蛋白在正常人 T 淋巴细胞中不表达,在 HUT-78 细胞中高表达,见图 1。

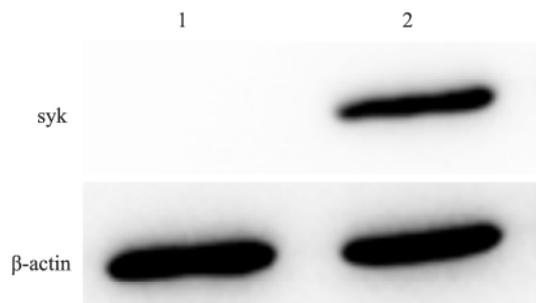


图 1 syk 在正常人 T 淋巴细胞和 HUT-78 细胞中的表达
1: 正常人 T 淋巴细胞; 2: HUT-78 细胞

2.2 siRNA 对 HUT-78 细胞 syk mRNA 表达水平的影响 RT-PCR 实验结果显示: siRNA-NC 组与 Mock 组相比, syk mRNA 表达水平未见明显变化; 针对 syk 基因设计的 3 条 siRNA 在转染 48 h 后均能下调 syk mRNA 表达水平,其中 siRNA-1 下调效果最明显,见图 2。

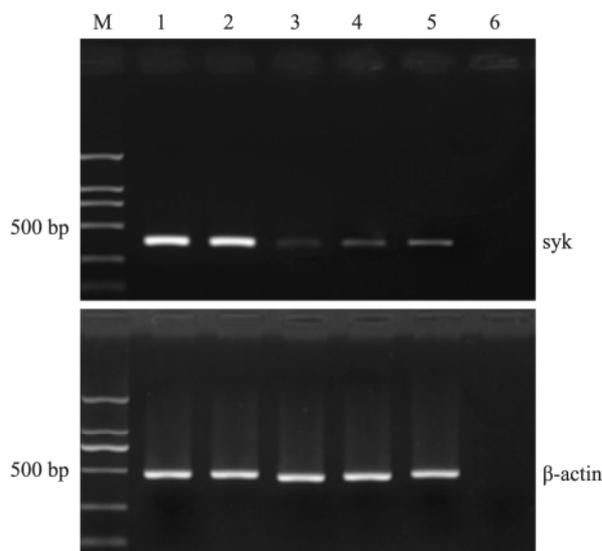


图 2 siRNA 转染 HUT-78 细胞后 RT-PCR 的电泳图

M: DNA Marker DL 2 000; 1: Mock 组; 2: siRNA-NC 组; 3: 转染 siRNA-1 组; 4: 转染 siRNA-2 组; 5: 转染 siRNA-3 组; 6: 未加模板

2.3 siRNA 转染 HUT-78 细胞后 syk 蛋白的表达

Western blot 结果与 RT-PCR 结果一致, siRNA-NC 组和 Mock 组相比, syk 基因表达水平未见明显改变,针对 syk 基因设计的 3 条 siRNA 在转染 48 h 后均能下调 syk 蛋白表达水平,其中 siRNA-1 下调效果最明显。RT-PCR 和 Western blot 均证实 siRNA-1 下调效果最明显,因此后续实验选择 siRNA-1 作为实验组,见图 3。

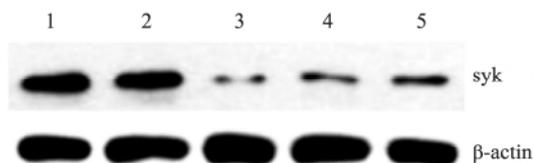


图 3 siRNA 转染 HUT-78 细胞 48 h 后免疫印迹图

1: Mock 组; 2: siRNA-NC 组; 3: 转染 siRNA-1 组; 4: 转染 siRNA-2 组; 5: 转染 siRNA-3 组

2.4 软琼脂克隆形成 结果显示通过 siRNA-1 下调 HUT-78 细胞中 syk 基因表达能够显著抑制克隆

形成,见图4,转染 siRNA-1 组与 Mock 组相比抑制率为(60.3 ± 10.6)%,差异有统计学意义($t = 3.758, P = 0.0198$)。siRNA-NC 组与 Mock 组相比差异无统计学意义。

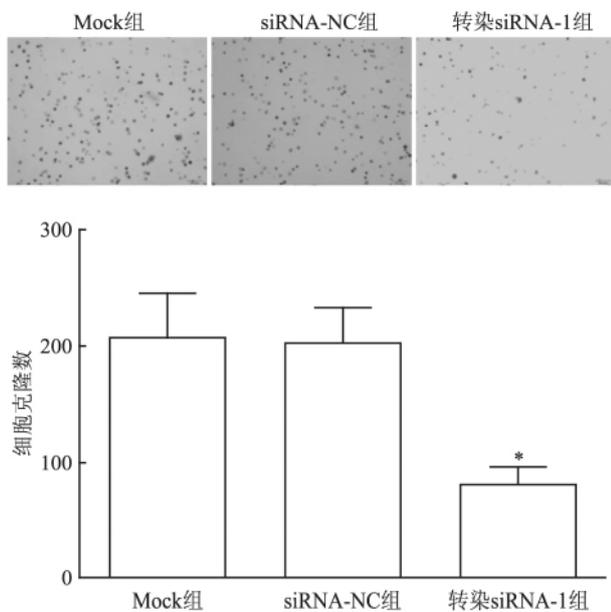


图4 干扰 syk 基因对 HUT-78 细胞克隆形成能力的影响 ×40
与 Mock 组比较: * $P < 0.05$

2.5 MTT 检测结果 通过 siRNA 下调 HUT-78 细胞中 syk 基因表达后,能够显著抑制 HUT-78 细胞活力,见图5。比较转染后 0~72 h 细胞活力可见转染 siRNA-1 组与 Mock 组($F = 154.1, P < 0.001$)及 siRNA-NC 组($F = 156.2, P < 0.001$)相比细胞活力显著下降,siRNA-NC 组与 Mock 组相比差异无统计学意义。

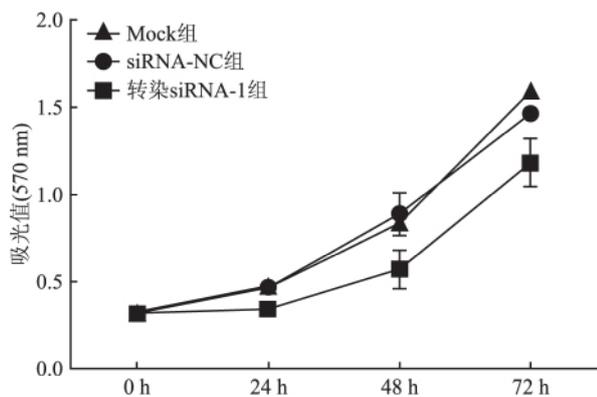


图5 干扰 syk 基因对 HUT-78 细胞增殖能力的影响

2.6 流式细胞仪检测结果 转染 siRNA-1 组细胞

凋亡比例约 37%,而 Mock 组(8.6 ± 3.4)%和 siRNA-NC 组(8.0 ± 3.7)%凋亡比例在 10% 以内,转染 siRNA-1 组与 Mock 组($t = 3.141, P = 0.0348$)和 siRNA-NC 组($t = 3.193, P = 0.0331$)相比凋亡比例显著提高,见图6。

3 讨论

外周 T 细胞淋巴瘤是一种恶性程度较高的非霍奇金淋巴瘤,具有较高的异质性,常规化疗效果较差,5 年生存率仅 20%~30%^[3]。深入研究 PTCL 发病的分子学机制,寻求新的治疗方法是提高 PTCL 整体疗效的关键。syk 最早于 1991 年由日本学者 Coopman et al^[6]从猪脾 cDNA 中克隆出来,是一种非受体型的酪氨酸激酶。syk 为造血细胞中特有的信号分子,在淋巴细胞的成熟和活化中起关键作用,与 T 细胞激活中的 ZAP-70 属于同一个 PTKs 家族。

研究^[6-8]表明, syk 在人乳腺癌、胰腺癌、胃癌、结直肠癌等恶性肿瘤中表达缺失,并与肿瘤的发生、发展及预后有密切关系,提示 syk 在上皮性肿瘤中或起抑癌基因的作用。另有研究^[9]显示, syk 在 B 细胞淋巴瘤中高表达,应用 syk 抑制剂下调 syk 表达可以抑制 B 细胞淋巴瘤细胞株的增殖,促进其凋亡。口服 syk 抑制剂已经应用于治疗 B 细胞淋巴瘤 I / II 期临床实验,治疗效果显著^[11]。在 T 细胞发展过程中, syk 主要表达于 CD4CD8 双阴性和双阳性的胸腺细胞,但在 CD4CD8 单阳性的胸腺细胞和外周 T 细胞中表达水平大大下降。syk 不是双阳性选择的主要因素,但 syk 在前 TCR 信号发展中起着重要的作用。T 细胞中 syk 的表达,可以独立于 CD45 和 LcK 对 TCR 信号进行调节,是通过触发 CD3 酪氨酸磷酸化来完成的。syk 还可以与 ITAM 的磷酸化启动 TCR 信号。这些结果提示, syk 在 TCR 信号中起着重要的作用。

目前, PTCL 中 syk 的作用机制尚不明确。Feldman et al^[12]应用免疫组化、Western blot 检测显示 syk 在 PTCL 组织中高表达,阳性率高达 93% (133/144),而后应用流式细胞术检测 PTCL 病例显示, syk 在肿瘤细胞和反应性增生的 B 细胞中表达,在外周血、淋巴结和脾反应性增生的 T 细胞中均不表达。本课题组前期免疫组织化学检测结果显示 syk 在 84 例 PTCL 组织中阳性率为 73.81%,而在 30 例反应性淋巴组织增生中阳性表达率仅为 13.33%,

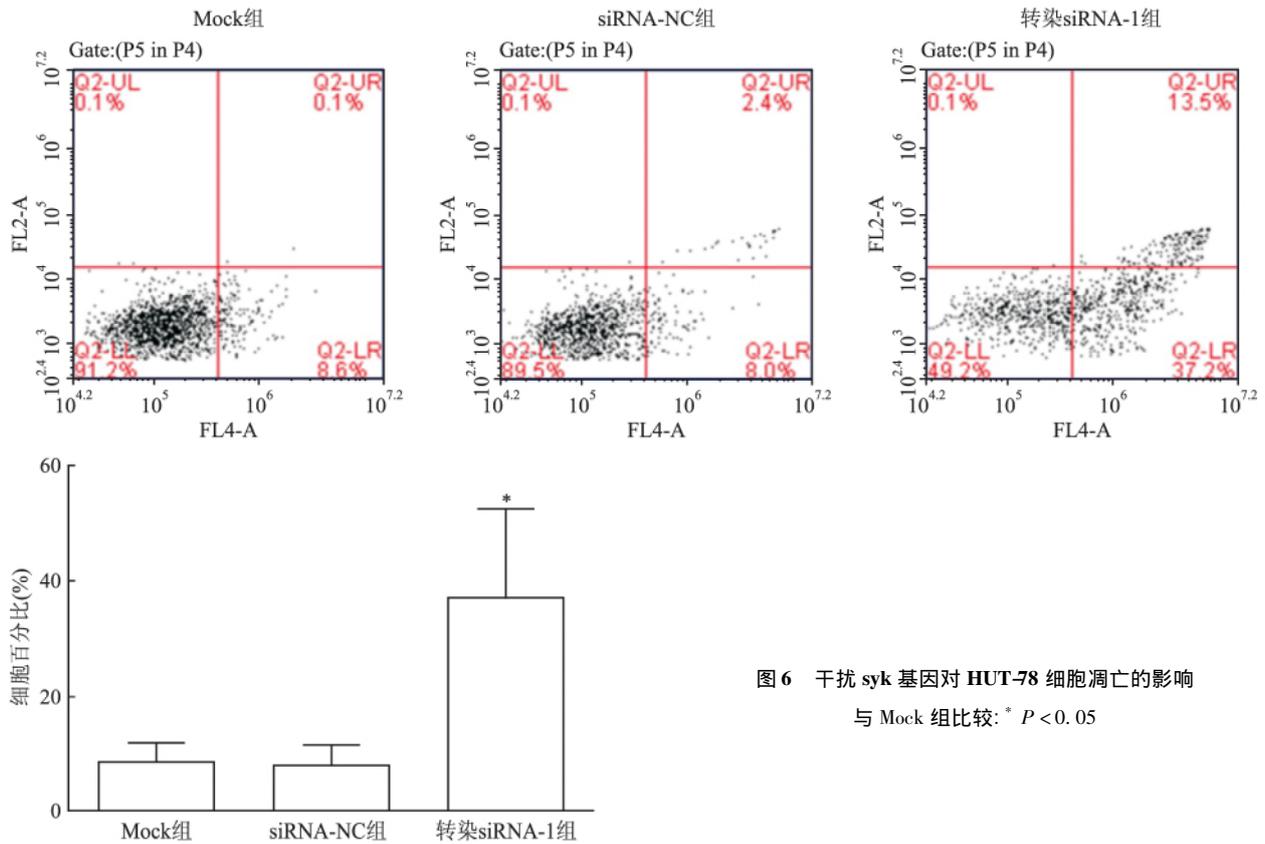


图6 干扰 syk 基因对 HUT-78 细胞凋亡的影响
与 Mock 组比较: * P < 0.05

表明 syk 在 PTCL 中的表达明显高于反应性淋巴组织增生^[10],与 Feldman et al^[12]报道结果一致。本实验结果也证实 syk 在正常人 T 细胞中不表达,而在 PTCL 细胞 HUT-78 中高表达。以上研究^[10,12]表明 syk 在 PTCL 中可能发挥重要的作用。电穿孔技术是通过脉冲电流,瞬时提高细胞膜的通透性而不致杀伤细胞,从而吸收周围介质中的外源分子^[13]。siRNA 干扰技术是将一段与目的基因同源的双链 RNA 导入细胞中,使其对应 mRNA 发生降解,从而实现特异性的基因序列沉默^[14]。本实验通过设计 3 条针对 syk 基因特异靶点的 siRNA 及一条阴性对照 siRNA,采用电穿孔法将其分别导入 PTCL 细胞株 HUT-78 细胞中,通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测 syk mRNA 及其蛋白的表达,筛选出一条下调效果最佳的 siRNA 进行细胞增殖和凋亡的检测。

Wilcox et al^[15]利用 syk siRNA 抑制 PTCL 细胞株(SU-DHL-1, SR-786, SeAx)中 syk 的表达,采用 Western blot 和流式细胞术检测显示, syk siRNA 能显著抑制 3 种细胞株细胞增殖能力和细胞活力,促进细胞凋亡。本研究采用的细胞株为 HUT-78,通过电穿孔法将 syk siRNA 导入细胞中后,Western blot 和流式细胞术检测结果与此一致。此外,本研究还

应用软琼脂克隆形成实验及 MTT 法对转染前后细胞的克隆形成能力及细胞增殖能力进行了检测,其结果表明转染入特异的 syk siRNA 后, HUT-78 细胞增殖和克隆能力降低,凋亡增加。

综上所述,采用 siRNA 干扰技术沉默 syk 基因,可有效抑制 PTCL 细胞的克隆形成能力、增殖能力,促进其凋亡。本研究为以 syk 基因为靶点的基因治疗的可能性提供理论依据。

参考文献

- [1] Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes[J]. J Clin Oncol 2008, 26(25): 4124-30.
- [2] Savage K J. Peripheral T-cell lymphomas[J]. Blood Rev 2007, 21(4): 201-16.
- [3] 李小秋. 淋巴瘤病理研究新进展[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(10): 721-6.
- [4] Li X Q, Li G D, Gao Z F, et al. Distribution pattern of lymphoma subtypes in China: A nationwide multicenter study of 10 002 cases [J]. J Diagn Concepts Pract 2012, 11(2): 111-5.
- [5] Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German high-grade non-Hodgkin lymphoma study group [J]. Blood 2010, 116(18): 3418-25.

- [6] Coopman P J , Do M T , Barth M , et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells[J]. *Nature* 2000 406(6797): 742-7.
- [7] Layton T , Stalens C , Gunderson F , et al. Syk tyrosine kinase acts as a pancreatic adenocarcinoma tumor suppressor by regulating cellular growth and invasion[J]. *Am J Pathol* 2009 175(6): 2625-36.
- [8] Hong J , Hu K , Yuan Y , et al. CHK1 targets spleen tyrosine kinase(L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest* 2012 122(6): 2165-75.
- [9] Ma J , Xing W , Coffey G , et al. Cerdulatinib , a novel dual SYK/JAK kinase inhibitor , has broad anti-tumor activity in both ABC and GCB types of diffuse large B cell lymphoma[J]. *Oncotarget* , 2015 6(41): 43881-96.
- [10] 代群 , 詹鹤琴 , 曹立宇 等. Syk、PI3K、Akt 在外周 T 细胞淋巴瘤中的表达及其意义[J]. *安徽医科大学学报* , 2014 49(8): 1141-5.
- [11] Friedberg J W , Sharman J , Sweetenham J , et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood* 2010 115(13): 2578-85.
- [12] Feldman A L , Sun D X , Law M E , et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas[J]. *Leukemia* , 2008 22(6): 1139-43.
- [13] Agarwal A , Tyner J W. RNAi screening of leukemia cells using electroporation[J]. *Methods Mol Biol* 2016 1470: 85-94.
- [14] Fakhr E , Zare F , Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing[J]. *Cancer Gene Ther* 2016 23(4): 73-82.
- [15] Wilcox R A , Sun D X , Novak A , et al. Inhibition of Syk protein tyrosine kinase induces apoptosis and blocks proliferation in T-cell non-Hodgkin lymphoma cell lines[J]. *Leukemia* 2010 24(1): 229-32.

Influence of down-regulation of syk by siRNA on the proliferation and apoptosis of peripheral T-cell lymphoma cells

Li Shuting , Zhan Heqin , Shu Yan et al

(Dept of Pathology , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the influence of down-regulation of syk via siRNA on the proliferation and apoptosis of human peripheral T-cell lymphoma HUT-78 cells. **Methods** 3 siRNAs targeting syk were designed , synthesized and transfected into HUT-78 cells via electroporation. Cells transfected with negative control siRNA and untreated cells were used as controls. 48 h after transfection , the expression of syk mRNA and protein were examined by RT-PCR and Western blot respectively , and the most effective syk siRNA was screened out. The proliferation of cells after 24 h , 48 h and 72 h interference and colony formation ability were examined by MTT and soft agar assay. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis. **Results** 3 siRNAs notably down-regulated syk expression at mRNA and protein levels , and the inhibitory effect of siRNA-1 was the most obvious. The colony formation of syk siRNA-1 group was significantly decreased compared with control groups after down-regulation of syk expression ($P < 0.05$) . The results of MTT test showed that the proliferation ability of syk siRNA-1 group was significantly decreased compared with control groups ($P < 0.05$) . Flow cytometry results showed that the apoptosis ratio of syk siRNA-1 group was about 37% , obviously higher than control groups ($P < 0.05$) . **Conclusion** The down-regulation of syk expression suppressed the cell proliferation and colony formation ability , and promoted the cell apoptosis of peripheral T-cell lymphoma cells. The results showed that syk gene may play a very important role in the occurrence and development of peripheral T-cell lymphoma , and it may be a novel target for gene therapy of peripheral T-cell lymphoma.

Key words syk; siRNA; peripheral T-cell lymphoma; proliferation; apoptosis