

siRNA 沉默 HLX 基因对 AML 细胞生长的影响

朱夏吟 陈伟卫 张丹琼 罗文达

摘要 目的 筛选高表达 H2.0 样同源盒基因(H2.0-like homeobox gene, HLX)的白血病细胞株,沉默 HLX 后观察急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)细胞株的生长及分化影响,为 HLX 在 AML 中的深入研究提供理论基础。方法 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)筛选高表达 HLX 基因的白血病细胞株,并检测 p21 活化激酶 1(p21-activated kinase 1, PAK1)的基因表达;设计 siRNA-HLX 沉默 HLX 基因表达最高的 AML 细胞株中的该基因,运用相差显微镜观察细胞生长情况,MTS/PMS 比色分析法检测增殖抑制率。结果 AML 细胞株中 HLX 基因的表达水平显著较高($P < 0.01$),干扰 HLX 基因后,可见 AML 细胞株生长速度减慢,增殖被抑制,并且 PAK1 mRNA 表达下调($P < 0.01$)。结论 HLX 基因可抑制 AML 细胞株的生长、增殖及分化。

关键词 HLX 基因 siRNA AML 细胞株 增殖

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.018

Effect of Growth of Silencing HLX Gene in the AML Cells by siRNA in vitro. Zhu Xiayin, Chen Weiwei, Zhang Danqiong, et al. Department of Hematology of Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression of HLX gene in leukemia cell lines, and to analyze the growth of cells and the expression of PAK1 gene by inhibiting HLX expression with RNA interference technique. **Methods** According to HLX gene coding sequence, siRNA-HLX was transfected into AML/M3 subtype NB4 cells to inhibition the HLX gene, and the expression of HLX gene and PAK1 gene was detected by qRT-PCR, and the cell growth was observed by fluorescence phase contrast microscope, MTS/PMS was used to detect proliferation inhibition rate. **Results** The expression of HLX gene in AML cell lines was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). When HLX gene was down-regulated, the expression of PAK1 mRNA was also down-regulated ($P < 0.01$), and AML cells grow slowly and its proliferation is inhibited. **Conclusion** HLX gene can inhibit the growth, proliferation and differentiation of AML cell lines.

Key words HLX; siRNA; AML cell lines; Proliferation

白血病是最常见的癌症之一,在各类恶性疾病的发生率中位于第 6 位,其中 AML 约占急性白血病的 60%~70%^[1]。目前主要治疗方案有化疗、分子靶向治疗、干细胞移植等,但现有治疗方案仅能使 1/3 的患者得到长期缓解,并不能提高长期生存率及完全缓解率^[2]。siRNA 干扰技术近年来已成为体外研究新型基因的突破点,具有重要的应用前景和科学意义。

新型 II 类同源盒基因 HLX 位于染色体 1q41~q42.1^[3],近年来研究表明,HLX 与肝癌、胃癌、膈癌、胎儿生长受限、哮喘等多种疾病密切相关^[4-6]。87% AML 患者的 HLX 基因呈过表达,HLX 与 AML 的发

生及患者预后相关,但是 HLX 在 AML 中的作用机制及功能尚不明确^[7]。有研究表明,PAK1 可抑制诱导单核细胞分化,诱导 AML 细胞凋亡^[8]。本研究通过检测 HLX 在白血病细胞株中的表达情况及分析沉默 HLX 后 PAK1 mRNA 的表达水平,探讨 HLX 与 AML 分化、凋亡的影响,进一步分析其在 AML 中的意义。

材料与方法

1. 实验仪器、试剂:小型高速离心机购于德国 Eppendorf Biophotometer 公司、压力蒸汽灭菌器购于上海一恒科技有限公司、ABI 7500 实时荧光定量仪购于美国 Applied Biosystems 公司、PCR 仪购于美国 Bio-rad 公司、倒置显微镜购于 Olympus 公司 IX70、荧光显微镜及成像装置购于 Zeiss Axiostar Plus 公司、电泳仪购于国 Bio-Rad 公司。Trizol[®] Reagent、RNA-later[®] RNA Stabilization Solution、SYBR Green、RPMI 1640 培养基、Typical RNAiMax Transfectionin Proce-

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYB309、2017KY709)

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院

通讯作者:罗文达,电子信箱:luowd@enzemed.com

ture、RNA – Stealth Select Oligos Set 购于美国 Life Technologies 公司。

2. 细胞株: AML 细胞株 KG1a (AML/M0 亚型)、HL60 (AML/M2 亚型)、NB4 (AML/M3 亚型), 人急性淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat, 人慢性髓系白血病细胞株 K562 均购于 ATCC 官网。置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 在 37℃、5% CO₂, 饱和湿度 95% 条件下培养, 取各亚型对数生长期的细胞用于后续实验。

3. 实时定量 PCR 检测: (1) 总 RNA 提取: 将细胞离心并加入 1ml Trizol, 常温静置 5min; 加三氯甲烷 200μl, 静置 5min 离心后 4℃, 12000r/min, 15 分钟离心; 上清加 0.5ml 异丙醇, 静置 10min 4℃, 12000r/min, 15min 离心; 沉淀中加 75% 乙醇 1ml, 4℃, 12000r/min, 15min 离心 2 次; 风干, 加 20μl DEPC – H₂O 溶解 RNA; 选择 A_{260/280} 值位于 1.8 ~ 2.0 的样本。 (2) cDNA 合成: 按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA; 冰上 PCR 管中按顺序加入表 1 中反应物, 离心, 70℃ 孵育 10min; 冰上冷却并离心, 表 2 按序加反应液; 混匀离心, 42℃ 孵育 1h; 70℃ 加热 15min, – 80℃ 保存。 (3) 实时荧光定量 PCR: 根据 GenBank 中人 HLX 基因序列, 输入 Primer5.0 合成引物, 同时将 GAPDH 管家基因作为内参 (购自上海捷瑞生物工程有限公司, 如表 3 所示), 根据表 4 的实时定量 PCR 反应体系进行实验。反应条件: 50℃ 2min 1 个循环; 95℃ 10min 1 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 40 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s, 60℃ 15min; 冰上裂解 1 ~ 2h, 每 20min 摇晃 1 次。 (4) SYBR Green 实时定量 PCR: GAPDH 作为内参基因; 均设 3 个平行反应孔; PCR 八联管中加入反应体系; ABI 7500 实时荧光定量仪上进行 PCR 反应。 (5) 产物分析及基因表达定量分析: 分析溶解曲线及 Ct 值; HLX 基因的 Ct 值由管家基因 GAPDH 的 Ct 值标准化; 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相关数据的处理。计算方法:
$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{HLX目的基因} - Ct_{GAPDH内参基因})_{病例组} - (Ct_{HLX目的基因} - Ct_{GAPDH内参基因})_{健康对照组}$$

表 1 cDNA 合成第 1 步试剂及剂量	
试剂	剂量
总 RNA	2μg
Oligo(dT) ₁₈ 引物	1μl
无核酸酶水	9μl
总体积	12μl

表 2 cDNA 合成第 2 步试剂及剂量	
试剂	剂量(μl)
5 × Reaction Buffer	4
RiboLock Rnase Inhibitor(20U/μl)	1
10mmol/L dNTP Mix	2
RevertAid M – MuLV RT(200U/μl)	1
总体积	20

表 3 HLX 基因及内参基因 HumanGAPDH 前后引物		
引物	引物序列(5'→3')	长度
HLX – F	ATCTCACTTCCCTGCTAACCG	21
HLX – R	AGAAGCCTCGTTAATGGGATCT	22
PAK1 – F	CAGCCCTCCGATGAGAAATA	21
PAK1 – R	CAAAACCGACATGAATTGTGTGT	23
hGAPDH – F	CTGGGCTACACTGAGCACC	19
hGAPDH – R	AAGTGCTCGTTGAGGGCAATG	21

表 4 实时定量 PCR 反应体系	
试剂	剂量(μl)
FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)	10
正向引物(20mmol/L)	0.25
反向引物(20mmol/L)	0.25
ddH ₂ O	9
cDNA	0.5
总体积	20

4. siRNA 转染: 参照 GenBank 数据库, 设计 HLX 基因特异转染片段序列为 5' – CCC UUA AAC UCG AAC CCA AGA AAU U – 3'。应用 LipofectamineTM RNAiMAX 转染高表达 HLX 的 AML 细胞株, 分设空白对照组 (不加任何试剂)、阴性对照组 (转染非特异性的 siRNA) 以及实验组 (转染 HLX – siRNA), 每组设 3 个复孔。取 NB4 细胞 5ml, 按照 700r/min 离心 5min, 加入 5ml 5% 血清的 1640 培养基, 调整浓度至 20 × 10⁴ 个/毫升; 设置 A 管: 450μl opti – MEM + RNAiMAX 27μl; B 管: 450μl opti – MEM + RNAiMAX 9μl; A_N 管: 450μl opti – MEM + RNAiMAX 27μl; B_N 管: 450μl opti – MEM + HighGC 9μl; 将 B 管加入 A 管, B_N 管加入 A_N 管, 混匀后静置 5min; 在 96 孔板中每孔加入 50μl AB、50μl A_NB_N 混合物共 32 孔, 另备 16 孔加入 50μl 5% 血清的 1640 培养基; 每孔加入 50μl 细胞悬液; 盖上盖子, 标记后在 96 孔板 4 面轻拍; 检测转染效率, 重复实验 3 次。

5. MTS 法检测转染前后细胞增殖抑制率: 取上述转染后的细胞悬液, 在检测前 1h 加入 CellTiter 试剂混匀, 1h 后在酶标仪上检测 A 值。于 12、24、48、72h 用 MTS/PMS 法测定 570nm 吸光值, 计算实验

组、阴性对照组转染细胞后的增殖抑制率,增殖抑制率(%)=(1-实验组A值/对照组A值)×100%。

6. 统计学方法:对所有数据均采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析处理。数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。定量资料组间差异比较采用两独立样本 *t* 检验。所有检测均为双侧,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. AML 各亚型细胞株中 HLX 表达水平普遍较高:在 AML/M2 亚型细胞株 HL60 中 HLX 相对表达量为 12.20 ± 2.55,在 AML/M3 亚型细胞株 NB4 中 HLX 相对表达量为 641.24 ± 49.78,在急性淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株中 HLX 相对表达量为 0.06 ± 0.02,在慢性髓系白血病 K562 细胞株中 HLX 相对表达量为 8.30 ± 2.24,在急性髓系白血病中 HLX 基因的表达水平明显高于慢性髓系白血病及急性淋巴细胞白血病中 HLX 基因的表达水平(*P* < 0.01,图 1、图 2)。

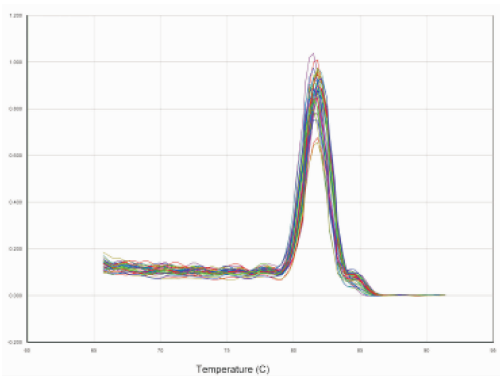


图 2 扩增溶解曲线

荧光分布情况,用计数器计数细胞内有荧光的细胞数量及所有细胞总数,计算有荧光的细胞数及细胞总数比值,重复实验 3 次,发现 siRNA-HLX 24h 转染效率均可达 70% 以上,符合转染要求,可进行下一步实验(图 3)。

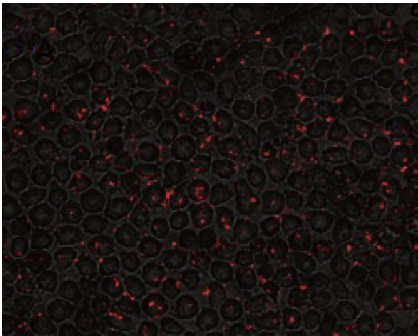


图 3 固定视野下 siRNA-HLX 转染 NB4 细胞后的荧光分布情况(×200)

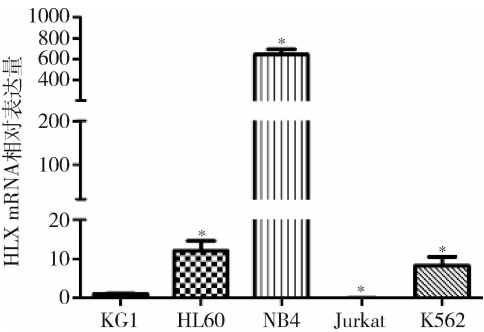


图 1 HLX 基因表达水平
与 KG1 比较,**P* < 0.01

2. 干扰 HLX 的转染效率达到要求:siRNA-HLX 干扰 NB4 细胞后在荧光显微镜下随机固定视野,观察

3. siRNA-HLX 组 NB4 细胞的生长速度减慢:干扰 HLX 基因 24h 后,NB 细胞生长速度显著减慢,细胞倍增时间延长,坏死细胞数量增多,部分细胞变狭长,胞内见空泡,形态不规则。空白对照组与阴性对照组的细胞生长速度无区别(图 4)。

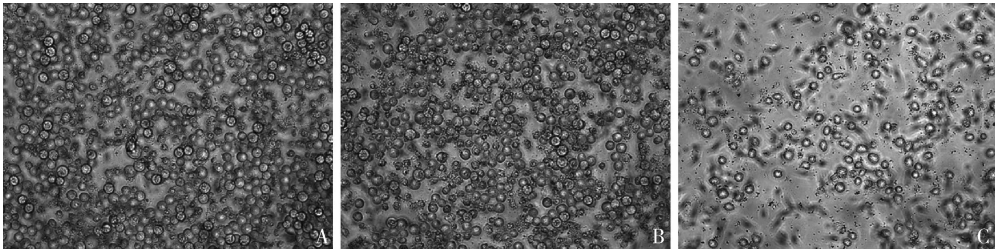


图 4 相差显微镜观察转染 siRNA-HLX 后 NB4 细胞的生长速度改变(×200)
A. 空白对照组;B. 仅转染 siRNA 的阴性对照组;C. 转染 siRNA-HLX 组

4. siRNA-HLX 组 NB4 细胞的增殖被抑制:用

MTS/PMS 比色分析法测定干扰 siRNA-HLX 基因

12、24、48、72h 后的吸光度值,分别计算转染 siRNA - HLX 组和阴性对照组的增殖抑制率,发现转染 siRNA - HLX 组的细胞增殖被显著抑制($P < 0.01$,图 5)。

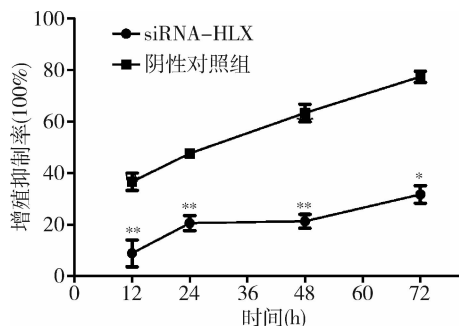


图 5 干扰 NB4 细胞的 HLX 基因后,该细胞株各时间点的增殖抑制率

与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

5. siRNA HLX 组 NB4 细胞中 PAK1 mRNA 表达水平:对比空白对照组,12h PAK1 的相对表达量为 1.04 ± 0.02 ,差异无统计学意义($P > 0.05$);24h PAK1 的相对表达量为 0.37 ± 0.14 ,差异有统计学意义($P < 0.01$);48h PAK1 的相对表达量为 0.43 ± 0.08 ,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 6、图 7)。

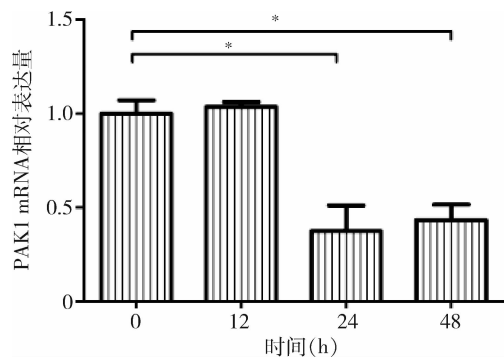


图 6 HLX 对 NB4 细胞中 PAK1 mRNA 相对表达量的影响

* $P < 0.01$

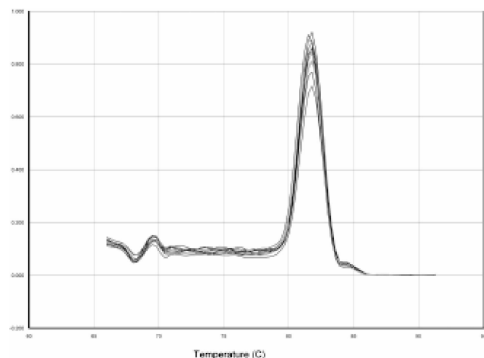


图 7 转染 24h PCR 的扩增溶解曲线

讨 论

AML 是造血系统恶性疾病,其发生率随年龄增加而增加,诱导后的治疗效果取决于白血病危险分层,即细胞遗传学和基因突变检测是诱导治疗后预后判断的重要标准^[9]。高危型 AML 主要由确定的高风险细胞遗传学诊断的标准确定^[10],目前骨髓移植及多药联合化疗是治疗 AML 的首选方案,干细胞移植是治疗高危型白血病的最佳治疗方法,但仍难以进一步提高长期缓解率。近年来,靶向治疗在白血病领域取得确切的进展,为提高 AML 治愈率带来了新的希望,也为预后及危险分层提供了新的依据。

同源盒基因(homeobox gene, HOX)是近年热点基因,包含 183bp 保守序列,分为 I、II 两类,在编码转录因子方面发挥独特的作用。HLX 属于新型 II 类 HOX。研究表明 I 类 HOX 在白血病中具有明确作用,但是 II 类 HOX 是否与血液肿瘤系统相关尚属未知^[11]。新型的 II 类 HOX——HLX 基因近年在多种肿瘤性疾病中被发现。Li 等^[12]发现,HLX 在神经、消化、生殖器官系统及免疫功能均有正常表达^[13]。Martin 等^[14]发现,在部分实体肿瘤中,HLX 的蛋白产物会因为其基因所属的组织类型和所处的肿瘤部位不同而变化,存在上调或下调的关系,如表皮间皮系统中检测到的 HLX 蛋白产物。Zhong 等^[15]发现,HLX 可联合 T-bet 转录因子使 Th2 细胞具有 Th1 的功能。Rajaraman 等^[16]发现,HLX 在 CD34⁺造血干/祖细胞中高表达,并随之分化而表达下降。近年来,Pandolfi 等^[17]发现 HLX 过表达可导致异常白血病细胞生成,进而无法分化成正常的血细胞。Kawahara 等^[7]发现,新型 II 类同源盒基因 HLX 在 AML 患者中有显著高表达。研究人员发现在这些患者中,患者 HLX 表达水平越高,他们的生存机会就越小。

相关临床研究发现 87% 的 AML 患者中 HLX 基因呈过表达,且在 AML/M4 亚型及 AML/M5 亚型中表达水平升高更为明显,而同一亚型中 HLX 表达水平越高患者预后越差^[7]。本实验分析了 AML 细胞株 KG1a (AML/M0 亚型)、HL60 (AML/M2 亚型)、NB4 (AML/M3 亚型)、人急性淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat、人慢性髓系白血病细胞株 K562 等不同类型的白血病细胞株中的 HLX 基因表达水平,发现 AML/M0 亚型、AML/M2 亚型、AML/M3 亚型中 HLX 表达水平逐渐升高。这与已知的研究报道结果一致。结合文献笔者推测,HLX 基因在其他 AML 细胞株亚型中也有显著高表达(如 AML/M4 亚型、AML/M5 亚型)。即

HLX 在急性髓系白血病中有显著高表达,且 HLX 的表达水平高低可能与 AML 亚型有关。虽然 HLX 的过表达可导致无限序列克隆的髓系祖细胞的形成,笔者目前并没有证据提示其可以引起白血病亚型上的转换,表明仅上调 HLX 基因可能不足以使亚型发生变化,但部分辅酶因子也许可以赋予 HLX 特异性,有助于白血病亚型转换。

PAK1 是与 AML 发病功能相关的一类 P21 活化激酶,与细胞分化、增殖及肿瘤的发生、发展密切相关。研究显示,靶向抑制 PAK1 基因可通过 MYC 转录网络诱导白血病细胞分化,促进白血病细胞凋亡^[8]。但是,目前 AML 疾病治疗中 PAK1 抑制剂尚未取得积极的进展。本研究进一步探讨了 HLX 基因是否介导 PAK1 分子参与 AML 细胞生长。本研究发现,沉默 HLX 基因后,NB4 细胞坏死细胞变多,细胞生长速度变慢,且细胞增殖被显著抑制,PAK1 mRNA 的表达量在 24h、48h 显著下降,提示 PAK1 可能是 HLX 基因的下游靶基因,与 HLX 共同参与 AML 的细胞生长及增殖抑制过程。

综上所述,AML 中 HLX 基因呈显著过表达,并可影响 PAK1 表达量的改变,而 PAK1 已证实参与 AML 细胞的生长与分化过程^[8]。但 HLX 与 PAK1 如何调控 AML 疾病发生、发展尚不明确,可将 HLX、PAK1 等系列基因视为一个共同的基因子集,宏观研究 HLX 基因网络中潜在的分子标志物、具体信号通路等,在更多 AML 亚型细胞株中探索其致病机制及疾病发生、发展过程。但上述实验结果均来源于细胞系,受多种因素影响,仍需继续深入研究。HLX 抑制剂的研究和临床测试的进一步发展将为 AML 临床治疗提供更多的可能。

参考文献

- 1 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤 2015,24(1):1-10
- 2 Nambiar RK, Narayanan G, Prakash NP, *et al.* Blood group change in acute myeloid leukemia[J]. *Proc*, 2017,32:74-75
- 3 Yamakawa T, Sato Y, Matsumura Y, *et al.* Screening of human cDNA library reveals two differentiation-related genes, HHX and HLX, as promoters of early phase reprogramming toward pluripotency[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(11):2661-2669
- 4 Liu T, Chen J, Xiao S, *et al.* H2.0-like homeobox 1 acts as a

- tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(5):6419-6428
- 5 Prahst C, Kasaai B, Moraes F, *et al.* The H2.0-like homeobox transcription factor modulates yolk sac vascular remodeling in mouse embryos[J]. *Arterioscler Thromb Vascular Biol*, 2014, 34(7):1468
- 6 Garcia, Luis F. Variants in the IFN gamma transcription factor genes TBET, STAT1, STAT4, and HLX and the risk of pulmonary tuberculosis in a Colombian population: a case-control study[J]. *Biomedica Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 2013, 33(2):259-267
- 7 Kawahara M, Pandolfi A, Bartholdy B, *et al.* H2.0-like homeobox regulates early hematopoiesis and promotes acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(2):194
- 8 Pandolfi A, Stanley RF, Yu Y, *et al.* PAK1 is a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. *Blood*, 2015, 126(9):1118-1127
- 9 Wallace JA, Kagele DA, Eiring AM, *et al.* miR-155 promotes FLT3-ITD-induced myeloproliferative disease through inhibition of the interferon response[J]. *Blood*, 2017,392(2):116-121
- 10 Hiroaki S, Saitoh T, Hatsumi N, *et al.* Clinical significance of granulocytic sarcoma in adult patients with acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8):1513-1517
- 11 Toyooka Y, Oka S, Fujimori T. Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes[J]. *Dev Bio*, 2016, 411(1):50-60
- 12 Li X, Liang W, Ye H, *et al.* Overexpression of Indian hedgehog partially rescues short stature homeobox 2-overexpression-associated congenital dysplasia of the temporomandibular joint in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4157-4164
- 13 Stadler CR, Vegi N, Mulaw MA. The leukemogenicity of Hoxa9 depends on alternative splicing[J]. *Leukemia*, 2014, 28(9):1838-1843
- 14 Martin A, Serano JM, Jarvis E, *et al.* CRISPR/Cas9 mutagenesis reveals versatile roles of hox genes in crustacean limb specification and evolution[J]. *Curr Biol*, 2016, 26(1):14-26
- 15 Zhong J, Yu Q, Ping Y, *et al.* MBD2 regulates TH17 differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the homeostasis of T-bet/Hlx axis[J]. *J Autoimmun*, 2014, 53:95-104
- 16 Rajaraman G, Murthi P, Pathirage N, *et al.* Downstream targets of homeobox gene HLX show altered expression in human idiopathic fetal growth restriction. [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1):278-287
- 17 Pandolfi A, Steidi U. HLX in AML: novel prognostic and therapeutic target[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(10):1059-1060

(收稿日期:2017-08-09)

(修回日期:2017-09-22)