

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.003

· 论著 ·

干扰HMGA2基因表达抑制HL60细胞的增殖及浸润

刘文丹¹, 周坚¹, 杜伟峰¹, 何伟²

(广州医科大学附属第二医院番禺院区 1. 健康管理中心; 2. 肿瘤科, 广州 511400)

[摘要] 目的: 探索干扰高迁移率族蛋白A2(high mobility group protein A2, HMGA2)基因的表达对HL-60白血病细胞体外增殖、浸润的影响。**方法:** 实验分为3组, 实验组为稳定转染慢病毒干扰HMGA2基因表达载体的HL-60细胞; 阴性对照组为稳定转染慢病毒空载体HL-60细胞; 空白对照组为未转染的HL60细胞。3组分别接种BALB/c裸鼠建立种植瘤模型, 检测接种后各个时间点裸鼠外周血和骨髓中白血病细胞的比例(肿瘤负荷)、生活质量, 计算接种40 d后各组小鼠的肝脾指数。**结果:** RT-PCR及Western印迹证明干扰RNA慢病毒表达载体可明显降低HL-60细胞靶基因的表达。接种后骨髓涂片结果显示裸鼠白血病模型成功建立。接种后21, 28, 40 d, 实验组HL-60细胞在小鼠外周血和骨髓中的比例均明显低于阴性对照组及空白对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其白血病细胞比例随接种时间延长而增加的速度亦明显变缓; 且实验组小鼠萎靡少动、腹部膨隆、皮下结节等并发症出现时间明显较空白对照组及阴性对照组延迟; 接种40 d后实验组小鼠肝脾指数分别为 66.76 ± 5.56 和 20.57 ± 0.75 , 均明显低于其余两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 干扰HMGA2基因表达, 可明显抑制HL60白血病细胞在小鼠体内增殖、浸润。

[关键词] 高迁移率族蛋白A2; RNA干扰; HL-60细胞

Interference of HMGA2 expression inhibits the proliferation and invasion of HL-60 cells

LIU Wendan¹, ZHOU Jian¹, DU Weifeng¹, HE Wei²

(1. Health Management Center; 2. Department of Oncology, Panyu District, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511400, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of interference of high-mobility-group protein A2 (HMGA2) on the in-vitro proliferation and invasion of HL-60 cells. **Methods:** RNA interference was used to inhibit HMGA2 expression by HL-60 cells. Animal model was established by inoculating nude mice with HL-60 cells, which was stably transfected with HMGA2-specific shRNA expression vector, and cells transfected with blank vector were used as negative control and cells without transfection as blank control. At different time points after inoculation, the percentage of leukemic cells in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) was detected by Wright's staining and spleen and liver index were calculated at day 40 after inoculation. **Results:** RT-PCR and Western blot showed that HMGA2 expression by HL-60 cells was markedly reduced. BM smear demonstrated that HL-60 cells

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-01

通信作者 (Corresponding author): 何伟, Email: heman1974@163.com

transfected with or without vectors were successfully implanted into nude mice. At day 21, 28, 40 after inoculation, significantly lower percentage of leukemic cells in PB and BM was seen in mice inoculated with HMGA2-targeted HL-60 cells than that in mice from both negative and blank control ($P < 0.05$). The increase of leukemic cells in PB and BM along with prolonged time after inoculation was markedly slowed in HMGA2-targeted mice as compared with the other two groups. The complications occurred of mice in the experimental group, such as moving slowing, the abdominal swelling and the subcutaneous nodules were significantly delayed. The liver and spleen index determined in HMGA2-targeted mice were respectively 66.76 ± 5.56 and 20.57 ± 0.75 , both which were remarkably lower than that in mice from the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Interference of HMGA2 expression could remarkably inhibited HL-60 cell proliferation and invasion in nude mice.

Keywords high mobility group A2; RNA interference; HL-60 cells

白血病是一种造血组织恶性克隆性疾病, 克隆性增殖是白血病患者产生异常造血和器官浸润的必要因素。目前白血病细胞恶性增殖机制仍不清楚。高迁移率族蛋白组A2(high mobility group A2, HMGA2)是一种非组蛋白核染色质结合蛋白, 多位于细胞核内, 由109个氨基酸残基组成。研究^[1]表明在胚胎发育早期, 几乎所有组织都大量表达HMGA2, 而在成人组织、分化成熟的组织中几乎检测不到其转录产物。HMGA2广泛参与人类多种肿瘤的发生, 与肿瘤细胞的增殖和细胞恶性转化密切相关, 但在白血病中的相关报道较少。本研究拟通过探讨干扰HMGA2基因表达对HL60细胞在白血病小鼠体内增殖的影响, 探索HMGA2表达差异对造血组织恶性克隆增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

RT-PCR试剂盒、胎牛血清为美国Gibco公司; TRIzol、瑞-吉染色液、核蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

1.1.2 细胞株

急性早幼粒细胞白血病细胞株HL-60、稳定干扰HMGA2的HL60/ShHMGA2细胞株及转染阴性对照病毒的HL60/ShControl细胞株由广州医科大学附属第一医院肿瘤血液中心实验室建立及保存^[2]。

1.1.3 实验动物

4周龄雌性BALB/c裸鼠85只, 购自南方医科大学动物中心, 在SPF级动物合格环境下饲养。实验过程中, 对动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 方法

1.2.1 裸小鼠 HL60/ShHMGA2 和 HL60/ShControl 细胞移植瘤模型的建立

取75只BALB/c裸鼠(预留8只作为健康对照组), 给予X射线4 Gy照射24 h, 然后以抽签法随机分成3组, 每组25只, 每组小鼠尾静脉分别接种HL-60细胞 $4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ /只(空白对照组)、HL60/ShHMGA2细胞(实验组)、HL60/ShControl(阴性对照组)。分别于接种后14, 21, 28, 40 d处死小鼠, 未到处死时间死亡的小鼠记录死亡日期, 归入死亡日期最近的处死时间组。

1.2.2 瘤细胞形态学分析和计数

分别在接种白血病细胞第14, 21, 28, 40天, 取小鼠尾静脉血25 μL , 制备血涂片, 经瑞氏染色, 油镜下分类、计数。处死小鼠取上肢骨, 刀片沿骨纵轴线切开后涂片, 经瑞氏染色, 油镜下分类、计数。

1.2.3 肝、脾指数测量

接种白血病细胞40 d后, 小鼠发病濒死时, 颈椎脱臼处死后称重; 取肝、脾组织称重, 计算肝、脾指数。肝(脾)指数=肝(脾)重量(mg)/小鼠总重(g)^[3]; 肝(脾)组织取横切面制片, 采用HE染色, 光学显微镜下观察肝、脾白血病细胞浸润情况。

1.2.4 RT-PCR 检测 HMGA2 mRNA 表达

按TRIzol试剂盒抽提总RNA。参照NCBI基因库中HMGA2序列设计引物, 上游: 5'-GCGCCTCAGAAGAGAGGAC-3', 下游: 5'-GGTCTCTTAGGAGAGGGCTCA-3', 产物长度为76 bp。PCR反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 35次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳(100 V, 30 min)。凝胶系统成像。

1.2.5 Western 印迹检测 HMGA2 蛋白的表达

核蛋白提取试剂盒提取核蛋白, BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。核蛋白和总蛋白分别经15%和5%聚丙烯酰胺凝胶电泳; 120 V恒定电压转膜1 h 20 min, 室温封闭2.5 h, 4 ℃封闭过夜。HMGA2一抗工作浓度为1:1 000; β -actin一抗工作浓度为1:1 000, 4 ℃孵育过夜(平缓摇动); 二抗工作浓度1:2 000, 室温孵育1 h ECL发光液, 反应后, 曝光, 显影, 定影后拍照。

1.3 统计学处理

计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用GraphPad Prism 5.0软件进行制图和统计分析, 两组均数间比较采用 t 检验, 多组均数间比较采用单因素或双因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 及 Western 印迹验证 HL-60 细胞中 HMGA2 的表达

经灰度值扫描计算相对量结果显示: 实验组 HMGA2 mRNA的表达明显低于阴性对照组和空白对照组, Western印迹结果显示实验组 HMGA2 蛋白的表达明显低于阴性对照组和空白对照组; 证明在RNA和蛋白水平, 慢病毒干扰载体干扰效率很高(图1)。

2.2 荷瘤裸鼠发病情况

裸鼠在接种不同组细胞株14 d后均发生白血病, 裸鼠出现不同程度的精神萎靡、脱毛、腹部

膨隆、体重减轻; 28 d后, 空白对照组小鼠超过半数出现步态不稳、侧偏或转圈; 以上症状实验组小鼠明显较空白对照组及阴性对照组轻, 以空白对照组小鼠最为严重。各组小鼠在不同接种时间节点出现以上并发症的数量(图2)。

2.3 不同时间点荷瘤裸鼠外周血及骨髓中白血病细胞比例的变化

3组裸鼠外周血中白血病细胞比例随接种时间的延长均逐渐增加, 但空白对照组(HL-60)和阴性对照组(ShControl)增长速度明显较快, 在各个时间点二者白血病细胞比例差异均无统计学意义($P>0.05$), 而实验组(ShHMGA2)白血病细胞比例增长缓慢, 除接种后14 d外, 其他时间点该组裸鼠白血病细胞比例均明显低于前两组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3A)。同样情况也见于骨髓, 即: 随着接种时间的延长, 实验组骨髓白血病细胞比例增加明显变缓, 且显著低于其他两组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3B), 说明实验组裸鼠白血病细胞的增殖和浸润受到明显抑制。

2.4 各组小鼠肝、脾指数测量

接种后白血病细胞对小鼠肝和脾的浸润会导致肝脾肿大, 肝脾指数可反映小鼠肝脾的大小, 间接说明白血病细胞对肝脾的浸润程度。尽管与健康对照组相比, 接种白血病细胞后3组小鼠的肝脾指数均明显增加($P<0.05$), 但接种稳定干扰 HMGA2蛋白HL60细胞株的实验组小鼠肝脾指数明显小于空白对照组和阴性对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表1), 说明干扰 HMGA2蛋白表达抑制白血病细胞对肝脾的浸润。镜下观察实验组和空白对照组小鼠白血病细胞肝的浸润, 经HE染色制片比较, 具有明显的差异(图4)。

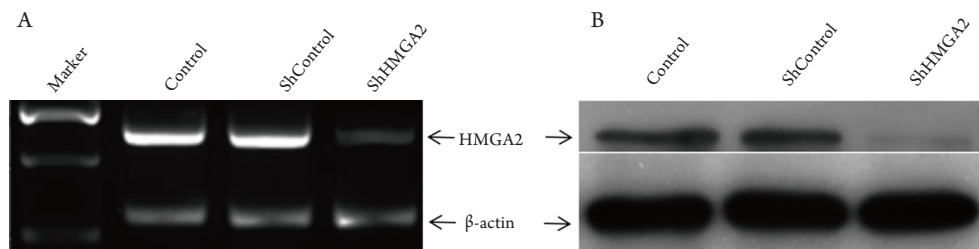


图1 RNAi稳定下调HL60细胞中HMGA2 mRNA和蛋白的表达水平

Figure 1 Expression of HMGA2 mRNA and protein was stably down-regulated by interference RNA (RNAi) in HL60 cells

(A) RNAi稳定下调HL60细胞中HMGA2 mRNA的表达水平; (B) RNAi稳定下调HL60细胞中HMGA2蛋白的表达水平。

(A) HMGA2 mRNA expression was stably down-regulated by interference RNA (RNAi) in HL60 cells; (B) HMGA2 protein expression was stably down-regulated by interference RNA (RNAi) in HL60 cells.

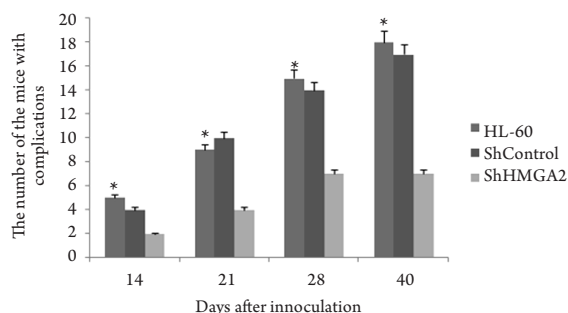


图2 接种后荷瘤裸鼠并发症比较

Figure 2 Comparison of complications in tumor-bearing mice after inoculation

与空白对照组或阴性对照组相比, *P<0.05。

Compared with the HL-60 group or the ShControl group, *P<0.05.

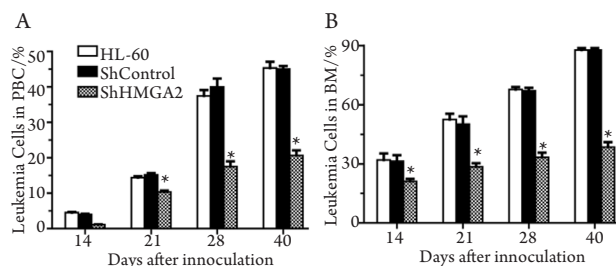


图3 接种后荷瘤裸鼠外周血和骨髓中白血病细胞比例的变化

Figure 3 Leukemic cell percents both in PBC and bone marrow in tumor-bearing mice after inoculation

(A)各组小鼠外周血中白血病细胞百分比; (B)各组小鼠骨髓中白血病细胞百分比。同空白对照组或阴性对照组相比, *P<0.05。

(A) Leukemic cell percents in PBC; (B) Leukemic cell percents in bone marrow. Compared with the HL-60 group or the ShControl group, *P<0.05.

表1 各组小鼠肝、脾指数(n=8, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Liver and spleen index in each group (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	肝指数/(mg·g ⁻¹)	脾指数/(mg·g ⁻¹)
健康对照组	38.34 ± 0.91	4.23 ± 0.28
空白对照组	124.41 ± 1.81*	39.21 ± 0.35*
阴性对照组	121.21 ± 9.30*	38.54 ± 7.21*
实验组	66.76 ± 5.56*#	20.57 ± 0.75*#

与健康对照组比较, *P<0.05; 与空白对照组和阴性对照组比较, #P<0.05。

Comparison with the healthy control group, *P<0.05; comparison with the HL-60 group and the ShControl group, #P<0.05.

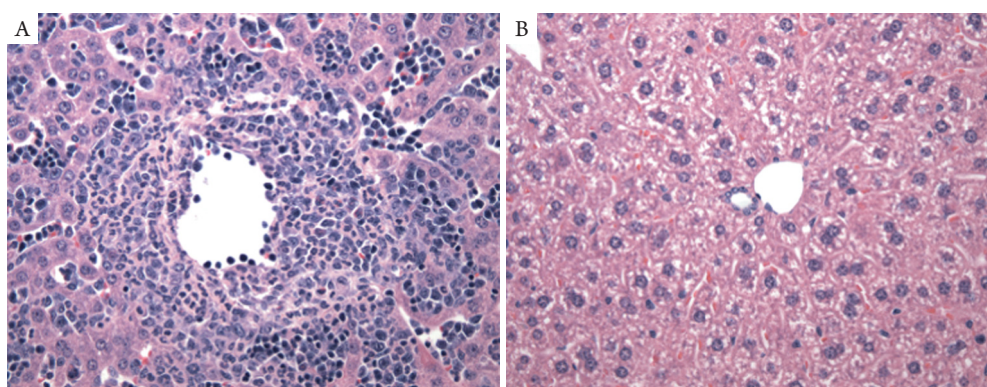


图4 实验组和空白对照组小鼠肝HE染色(×200)

Figure 4 HE staining of liver in the HL-60 group and the ShHMGA2 group (×200)

(A)空白对照组; (B)实验组。

(A) HL-60 group; (B) HL-60ShHMGA2 group.

3 讨论

HMGA2基因是HMG蛋白超家族成员之一,其编码的蛋白由109个氨基酸残基组成,可以特异性地结合DNA序列中富含AT的区域,改变核染色质的结构,调控目的基因的转录水平,发挥生物学效应。

近来研究^[4]表明:HMGA2在多种实体肿瘤中均高表达,参与肿瘤的发生、发展和预后,被认为是一个新型的肿瘤生物标志物。尽管如此,HMGA2参与肿瘤发生、发展的具体机制仍不十分明确。HMGA2蛋白可通过激活Wnt信号通路促进结直肠癌细胞的增殖^[5];亦可结合细胞周期蛋白基因的启动子而上调细胞周期蛋白的表达,加速细胞周期G₂/M期的转化,促使肿瘤发生^[6];HMGA2还可促进上皮细胞间质化,上调转录生长因子βR II,促进肿瘤细胞侵袭和转移^[7]。慢性髓系白血病加速期和急变期(chronic myelocytic leukemia, CML-AP/BP)患者HMGA2转录水平异常增高,可能与疾病进展有关,但详细机制仍不清楚^[8]。

本研究表明:转染小鼠HMGA2特异性短发卡RNA(shRNA)的HL60细胞明显低表达目标蛋白HMGA2,接种裸鼠后,这种基因修饰的白血病细胞在外周血和骨髓中的增殖明显慢于空白对照组和阴性对照组,对小鼠肝脾的浸润亦明显下降。本研究结果显示沉默HMGA2基因表达,可在体内使得白血病细胞增殖和浸润等生物学行为减弱,过高表达HMGA2可能对维持白血病细胞恶性增殖及浸润具有促进作用。

综上所述, HMGA2可能与HL60细胞恶性增殖、浸润以及分化受阻有关,降低HMGA2的表达可抑制白血病细胞系的增殖和浸润。但HMGA2基因与白血病细胞恶性克隆性增殖及抑制分化的相关分子机制尚不完全明确。HMGA2成为有效的白血病治疗靶基因和作为评估预后的

指标,尚需要更进一步的科研试验及临床研究来证明。

参考文献

1. Singh I, Mehta A, Contreras A, et al. Hmga2 is required for canonical WNT signaling during lung development[J]. *BMC Biol*, 2014, 12: 21.
2. 刘文丹, 谭丽, 熊喜峰, 等. 慢病毒介导的RNA干扰HMGA2基因表达对HL-60细胞增殖及细胞周期素B2、A2表达的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(6): 448-452.
LIU Wendan, TAN Li, XIONG Xifeng, et al. The effects of lentivirus-mediated RNA interference silencing HMGA2 on proliferation and expressions of cyclin B2 and cyclin A2 in HL-60 cells[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2012, 33(6): 448-452.
3. 肖燕妮, 邓小军, 龚奕, 等. 抑制CRIF1基因促进L615白血病细胞体内增殖的动物实验初步研究[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(5): 488-491.
XIAO Yanni, DENG Xiaojun, GONG Yi, et al. Inhibition of CRIF1 gene promotes L615 leukemia cells proliferation in mice model[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2014, 27(5): 488-491.
4. Pallante P, Sepe R, Puca F, et al. High mobility group a proteins as tumor markers[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 1-7.
5. 熊湾湾, 王纪莲, 王绪宁. HMGA2通过激活Wnt信号通路促进结直肠癌细胞增殖[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(3): 414-417.
XIONG Wanwan, WANG Jilian, WANG Xuning. HMGA2 promotes colorectal cancer cell proliferation through activating Wnt signaling[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17(3): 414-417.
6. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12): 899-910.
7. Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, et al. HMGA2 is a driver of tumor metastasis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14): 4289-4299.
8. Wei J, Li H, Wang S, et al. let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(13): 1452-1463.

本文引用: 刘文丹, 周坚, 杜伟峰, 何伟. 干扰HMGA2基因表达抑制HL60细胞的增殖及浸润[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1786-1790. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.003

Cite this article as: LIU Wendan, ZHOU Jian, DU Weifeng, HE Wei. Interference of HMGA2 expression inhibits the proliferation and invasion of HL-60 cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1786-1790. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.003