

论著·实验研究

ShRNA 靶向沉默 HOXA10 基因 对 U937 细胞增殖和凋亡的影响

张艳君¹ 贾秀红¹ 李建厂¹ 徐酉华²

(1. 滨州医学院附属医院儿科, 山东 滨州 256603; 2. 重庆医科大学儿童发育
疾病研究省部共建教育部重点实验室, 重庆 400014)

[摘要] 目的 探讨慢病毒载体介导短发夹 RNA (shRNA, siRNA 前体) 靶向沉默 HOXA10 基因对 U937 细胞增殖、凋亡和形态的影响。方法 设计并构建 4 条针对 HOXA10 基因的 shRNA 质粒表达载体, 并构建 HOXA10 基因的过表达质粒, 将 4 条干扰质粒分别和过表达质粒共转染 293T 细胞, 用 Western blot 检测出敲减效果最好的 1 条质粒并包装成慢病毒 (lenti-shHOXA10); 将 U937 细胞分为干扰组 (lenti-shHOXA10)、阴性对照组 (lenti-NC) 和未处理组, 通过流式细胞仪测定慢病毒对 U937 细胞的感染效率并用 real-time PCR、Western blot 方法测定对 HOXA10 基因的沉默作用; 瑞氏染色观察 3 组细胞形态上的变化; MTT 法检测细胞增殖抑制率; 流式细胞术检测 3 组细胞凋亡率。结果 成功构建了有效沉默 HOXA10 基因的慢病毒-shRNA 载体。干扰组 HOXA10 mRNA 的沉默效率为 (92.3 ± 1.3)%, 蛋白表达水平下降 91.1%, 干扰组细胞抑制率为 (43.9 ± 0.7)%, 与阴性对照组、未处理组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 瑞氏染色显示干扰组细胞核质比减小、核分裂相少见; 干扰组细胞凋亡率为 (27.1 ± 1.4)%, 显著高于阴性对照组的 (19.4 ± 1.9)% 和未处理组的 (5.5 ± 1.3)% ($P < 0.05$)。结论 慢病毒载体介导的 shRNA 可稳定地降低 HOXA10 基因的表达水平, 有效抑制 U937 细胞增殖和促进其凋亡, HOXA10 基因有望成为白血病基因治疗的新靶点。 [中国当代儿科杂志, 2012, 14(10): 785-791]

[关键词] HOXA10 基因; 白血病; 慢病毒; RNA 干扰; U937 细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)10-0785-07

Effect of HOXA10 gene silenced by shRNA on proliferation and apoptosis of U937 cell line

ZHANG Yan-Jun, JIA Xiu-Hong, LI Jian-Chang, XU You-Hua. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China (Jia X-H, Email: jiaxiuhong001@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated RNA interference targeting HOXA10 gene on the proliferation, apoptosis and morphology of leukemic cell line U937. **Methods** Four different shRNA plasmids were designed and built to interfere with HOXA10 gene. The four interference plasmids were transfected into 293T cells with the HOXA10 over expression plasmid and then the RNAi efficiency of the four interference plasmids was determined by Western blot. The best one was chosen to transfect 293T cells with lentiviral helping plasmids to produce packaged lentivirus (lenti-shHOXA10). U937 cells were divided into interference group (lenti-shHOXA10), negative control group and untreated group. After infection with the packaged lentivirus, infection efficiency of lentivirus for U937 was detected by flow cytometry, and the expression of HOXA10 gene mRNA and protein was detected by real-time PCR and Western blot. Cell survival was determined by MTT assay. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. **Results** Lentiviral-shRNA vector of HOXA10 gene was successfully constructed. Compared with the negative control and untreated groups, mRNA level of HOXA10 decreased by (92.3 ± 1.3)%, protein levels decreased by 91.1%, and the inhibition rate of U937 cells [(43.9 ± 0.7)%] increased in the interference group ($P < 0.05$). Wright's staining showed that the ratio of karyon to cytoplasm was reduced and mitotic phase was rare in the interference group. Apoptosis rate in the interference group [(27.1 ± 1.4)%] was significantly higher than in the negative [(19.4 ± 1.9)%] and untreated groups [(5.5 ± 1.3)%] ($P < 0.05$). **Conclusions** Lentivirus mediated RNAi can reduce the expression level of HOXA10, effectively inhibit proliferation and promote apoptosis of U937 cells. HOXA10 gene is expected to become a new target for the

[收稿日期] 2012-04-16; [修回日期] 2012-05-15
[基金项目] 山东省科学技术发展计划项目 (No. 2010GSF10264)。
[作者简介] 张艳君, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 贾秀红, 教授。

treatment of leukemia at gene level.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):785-791]

Key words: HOXA10 gene; Leukemia; Lentivirus; RNA Interference; U937 cell

急性髓系白血病(AML)是以原始或幼稚细胞在骨髓大量扩增为特征的一组疾病,可导致贫血和血小板减少,患者的5年生存率仅有40%~50%,以化疗为主的治疗方法毒副作用大,白血病的治疗尚需要更加有效的治疗手段。目前,大量研究表明同源盒基因A10(HOXA10)的过高表达与白血病的发病机制和预后差有关,HOXA10基因有望成为人类白血病治疗的新靶点^[1-2]。本研究拟筛选HOXA10基因的有效干扰靶点并包装成慢病毒,以慢病毒载体介导短发夹RNA(shRNA)作为HOXA10基因表达载体感染人单核细胞白血病细胞株(U937细胞),抑制HOXA10基因的表达,观察其对U937细胞形态、增殖和凋亡的影响。

pGC-NC-GFP-LV均购自上海吉凯基因技术有限公司;人肾上皮细胞株293细胞和转化用大肠杆菌感受态细胞株DH5 α 细胞由重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所实验室提供;质粒小抽试剂盒(美国OMIGA Bio-TECH公司);质粒中抽试剂盒(德国QIAGEN公司);U937细胞购自中国科学院细胞库;兔抗人HOXA10多克隆抗体(Albcan公司),兔抗人 α -tubulin单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(联科生物进口分装);RPMI-1640、DMEM高糖培养基和F-12k基础培养基均购自美国Hyclone公司;GIBCO胎牛血清(美国Invitrogen公司);二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司);核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);反转录试剂盒(TaKaRa公司);聚凝胺购自美国Sigma公司;Lipofectamine 2000(购自美国Invitrogen公司)。HOXA10、GAPDH上下游引物由吉凯基因技术有限公司设计合成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

干扰质粒pGC-shHOXA10-GFP-LV(表1)、辅助质粒pHelper 1.0及pHelper 2.0、阴性对照慢病毒

表1 化学合成的HOXA10基因4条干扰序列

命名	序列
shHOXA10-1 正义链	5'-TCTCACGGACAGACAAGTGAAGCTCGAGTTTCACTTGTCTGTCCGTGAGTTTTTTC-3'
反义链	5'-TCGAGAAAAAAGCTACGGACAGACAAGTGAAGCTCGAGTTTCACTTGTCTGTCCGTGAGA-3'
shHOXA10-2 正义链	5'-TCACGGCAAAGAGTGGTCCGAACTCGAGTTCCGACCACTCTTTGCCGTGTTTTTTC-3'
反义链	5'-TCGAGAAAAAACACGGCAAAGAGTGGTCCGAACTCGAGTTCCGACCACTCTTTGCCGTGA-3'
shHOXA10-3 正义链	5'-TGAGAGCGGCGCCTAGAGATTACTCGAGTAATCTCTAGGCGCCGCTCTCTTTTTTTC-3'
反义链	5'-TCGAGAAAAAGAGAGCGGCGCCTAGAGATTACTCGAGTAATCTCTAGGCGCCGCTCTCA-3'
shHOXA10-4 正义链	5'-TAAGGAGTTTCTGTTC AATATGCTCGAGCATATTGAACAGAACTCCTTTTTTTC-3'
反义链	5'-TCGAGAAAAAAGGAGTTTCTGTTC AATATGCTCGAGCATATTGAACAGAACTCCTTA-3'

1.2 细胞培养

U937细胞和293T细胞分别置于含10%胎牛血清、青霉素和链霉素各100 U/mL的RPMI1640和DMEM/F-12K培养基中,于37℃、5% CO₂培养箱中悬浮培养。2~3 d传代一次。细胞生长状态良好,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 慢病毒包装

1.3.1 有效靶点的筛选 将设计好的4条携带干扰序列的质粒分别与目的基因的过表达质粒共感染293T细胞。过表达质粒感染:感染前1 d将生长良好的293T细胞按5×10⁴/mL密度接种于24孔板中,当293T细胞生长达80%~90%融合时,换成400 μ L的减血清培养基(opti-MEM1)使每孔表达质

粒的量均为0.5 μ g,每孔lipofectamine 2000体积为2 μ L。干扰质粒感染:将质粒和lipofectamine 2000分别溶解于opti-MEM1中,混匀,室温静置5 min;将稀释好的质粒和稀释好的lipofectamine 2000混匀,室温静置20 min;把质粒DNA与lipofectamine 2000的混合液加入293T细胞中,37℃、5% CO₂培养箱中培养6~8 h后换成新鲜的含10%血清的完全培养基。感染后24 h荧光显微镜下观察预估感染率,感染后36~48 h收集细胞,抽提总蛋白进行Western blot检测。本实验将转染过表达HOXA10基因的质粒组作为阳性对照组;共转染过表达质粒和阴性对照慢病毒载体质粒细胞组作为阴性对照组;不转染任何质粒的293T细胞组作为空白对照组;共转染过表达质

粒和干扰质粒细胞组为实验组,其中实验组(I)加入的干扰质粒的量为0.25 μg,实验组(II)加入的干扰质粒的量为0.5 μg。

1.3.2 质粒抽提和病毒包装 将有效干扰质粒 pGC-shHOXA10-GFP-LV、辅助质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 转化大肠杆菌并取其菌液扩大摇菌,用中抽试剂盒提取纯化质粒。转染前24 h,用胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞,以含10%血清的培养基调整细胞密度为 6×10^5 /mL,接种10 mL到150 cm²细胞培养瓶内,37℃、5% CO₂培养箱内培养。24 h后待细胞密度达70%~80%时即可用于转染。转染前2 h将细胞培养基更换为无血清培养基。向一灭菌离心管中加 pGC-shHOXA10-GFP-LV 载体10 μg、pHelper 1.0 载体7.5 μg、pHelper 2.0 载体5 μg与相应体积的 opti-MEM1 混合均匀,调整总体积为1.25 mL,在室温下温育5 min。将 lipofectamine 2000 试剂轻柔摇匀,取50 μL lipofectamine 2000 试剂在另一管中与1.2 mL opti-MEM1 混合,在室温下温育5 min。把稀释后的DNA与稀释后的 lipofectamine 2000 进行混合,轻轻地颠倒混匀,在室温下温育20 min后,将DNA与 lipofectamine 2000 混合液转移至293T细胞的培养液中,混匀,于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。培养8 h后弃去培养基并用0.01 M的PBS轻柔的洗一遍,每瓶细胞中加入含10%血清的细胞培养基15 mL,于37℃、5% CO₂培养箱内继续培养48 h。

1.3.3 病毒收集及滴度测定 感染48 h后,低温(4℃)4000 g离心10 min收集上清液,将上清液再用0.45 μm的滤膜负压过滤,4000 g离心15 min收集上清液,浓缩后的病毒液小量分装,-80℃长期保存。将293T细胞按 2×10^5 /孔接种于24孔板中,4 h后感染病毒;取病毒液作不同比例稀释($1:10^3 \sim 1:10^{10}$),每个浓度做3个复孔;吸取培养基,按每孔400 μL加病毒稀释液至293T细胞培养板中,放置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育,第2天换新鲜培养基,继续培养4 d后于荧光显微镜下计数表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)细胞数;按下列公式分别计算重组慢病毒的滴度:

$$\text{病毒滴度(TU/mL)} = \frac{\text{GFP 阳性细胞数} \times \text{病毒上清稀释倍(TU/mL)}}{0.4 \text{ mL}}$$

1.4 实验分组及处理

将对数生长期的U937细胞均匀接种在24孔

板中,每孔细胞数为 1.5×10^5 ,分为干扰组、阴性对照组和未处理组,每组均加入终浓度为8 μg/mL聚凝胺,慢病毒(lentiviral)对U937细胞的MOI取值为10,分别在干扰组、阴性对照组细胞中加入 lenti-shHOXA10、lenti-NC,未处理组加等量PBS,将细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育过夜。24 h后更换新鲜的培养液继续培养,慢病毒感染5 d后进行以下相关检测。

1.4.1 流式细胞术检测慢病毒对U937细胞的感染效率 在荧光显微镜下观察干扰组、阴性对照组和未处理组GFP表达情况并照相,收集3组细胞,PBS洗涤2遍,30 min内用流式细胞仪测定GFP阳性细胞率。感染效率达到80%以上时进行干扰效率测定。

1.4.2 Real-time PCR 检测 HOXA10 mRNA 的沉默效率 分别取干扰组、阴性对照组和未处理组的细胞,提取总RNA,反转录为cDNA。以各组cDNA为模板,进行real-time PCR,以相对定量法计算目的片段的扩增比例,各样本设3个复孔。HOXA10上游引物:5'-CAGAACCGCAGGATGAAA-3',下游引物:5'-ACCAGCACCAAGCAAACA-3',扩增片段长度278 bp;内参照GAPDH上游引物:5'-TGA CTTC AACAGCGACACCCA-3',下游引物:5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',扩增片段长度121 bp。反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,共进行40个循环;95℃变性15 s,60℃退火1 min,95℃变性15 s,进行1个循环。2^{-ΔΔCt}分析法对real-time PCR数值进行分析。本实验独立重复3次。

1.4.3 Western blot 检测 HOXA10 蛋白的表达 慢病毒感染5 d后收集干扰组、阴性对照组、未处理组细胞,用冷PBS洗涤2次,根据胞浆和胞核蛋白提取试剂盒说明,依次加入buffer A、B、C,裂解细胞膜和细胞核,16000 g离心10 min,收集上清,取少量用BCA法测蛋白浓度,余加5×SDS-PAGE上样缓冲液煮沸5 min,-80℃保存。取等量蛋白,进行SDS-PAGE电泳后将蛋白转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭液封闭2 h,经1×TBST充分漂洗(10 min×3次),加兔抗人HOXA10多克隆抗体(稀释度为1/300),4℃孵育过夜,充分漂洗后加山羊抗兔二抗(稀释度为1/2400),室温孵育1 h,充分漂洗,化学发光法显色。用α-tubulin做内参重复以上步骤。采用Gel-Pro analyzer软件分析图像,以HOXA10/α-tubulin比值表示目的基因蛋白的相对表达水平。

1.4.4 稳定沉默 HOXA10 基因的 U937 细胞形态改变 感染慢病毒 5 d 后分别取干扰组、阴性对照组和未处理组细胞,用 PBS 洗涤两遍,调整细胞浓度,制作细胞涂片,干片后滴加适量瑞氏染液和蒸馏水,放于湿盒内染色 13 min,流水冲洗 1 min,镜下观察染色效果,晾干后中性树胶封片,拍照。

1.4.5 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取干扰组、阴性对照组和未处理组细胞,每孔以 5×10^4 细胞/L 的密度共 100 μ L 接种于 96 孔培养板中,并设调零组,每组设 6 个复孔,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 15 μ L,孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡裂解 15 min,蓝色结晶溶解后用酶标仪于 570 nm 波长,测定吸光度(A)值。各组 A 值调零后,去掉各组的最大值和最小值,各组剩余平行孔取平均值,计算细胞增殖抑制率(IR)。IR = (1 - 实验组 A 值/细胞对照组 A 值) \times 100%。

1.4.6 流式细胞术检测细胞凋亡 慢病毒感染 5 d 后取各组细胞,用 PBS 洗涤 2 次,用 $1 \times$ 缓冲液

重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL。按凋亡试剂盒说明书,每组细胞依次加入 5 μ L 7-AAD、1 μ L Annexin V-PE,轻轻混匀,另设空白对照、Annexin V-PE 对照、7-AAD 对照,避光室温孵育 15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 测序

对 4 条 lenti-shHOXA10 干扰表达载体分别进行测序,证实构建的慢病毒干扰载体序列与预期序列完全一致,见图 1。

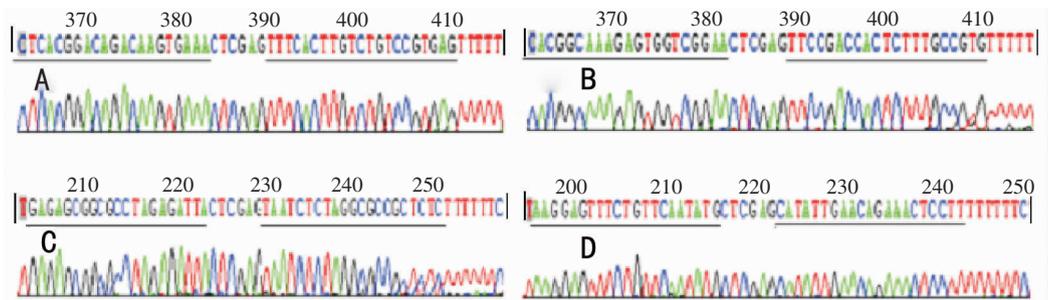


图 1 载体 DNA 测序结果 A: lenti-shHOXA10-1 载体; B: lenti-shHOXA10-2 载体; C: lenti-shHOXA10-3 载体; D: lenti-shHOXA10-4 载体;图中横线区域代表干扰靶点序列;竖线代表酶切位点。

2.2 慢病毒滴度测定及对 U937 细胞的转染效率

纯化及浓缩后的慢病毒的滴度为 1.2×10^8 , MOI = 10 时,慢病毒感染 U937 细胞 5 d 后 GFP 阳性细胞率为 90%,倒置荧光显微镜下可见 GFP 阳性细胞满视野(图 2),随着传代次数的增加干扰组细胞 GFP 阳性细胞率逐渐下降,每 2 ~ 3 d 传代一次,培养至第 13 天,经流式细胞仪测定干扰组、阴性对照组和未处理组 GFP 细胞阳性率分别为 $(66.65 \pm 0.33)\%$ 、 $(87.57 \pm 1.61)\%$ 、 $(0.12 \pm 0.12)\%$,干扰组与阴性对照组、未处理组相比差异有统计学意义($F = 6766, P < 0.001$)。

2.3 Western blot 对有效靶点的筛选

Western blot 结果显示 4 号干扰载体对目的基因的表达有敲减作用,因而是有效靶点。见图 3。

2.4 慢病毒介导的 U937 细胞 HOXA10 基因沉默效率

携带 4 号干扰载体的慢病毒感染 U937 细胞后 5 d 收集各组细胞,提取总 RNA 并反转录为 cDNA,real-time PCR 法检测 HOXA10 mRNA 的扩增曲线,干扰组细胞相对于阴性对照组细胞 HOXA10 基因的表达水平为 $(7.7 \pm 1.3)\%$,则抑制效率为 $(92.3 \pm 1.3)\%$,与阴性对照组相比差异有统计学意义($t = 11.68, P = 0.027$);Western blot 实验结果显示干扰组 HOXA10 蛋白表达水平与阴性对照组相比下降 91.1% ($F = 23.57, P = 0.01$),而阴性对照组与未处理组细胞 HOXA10 蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 4。

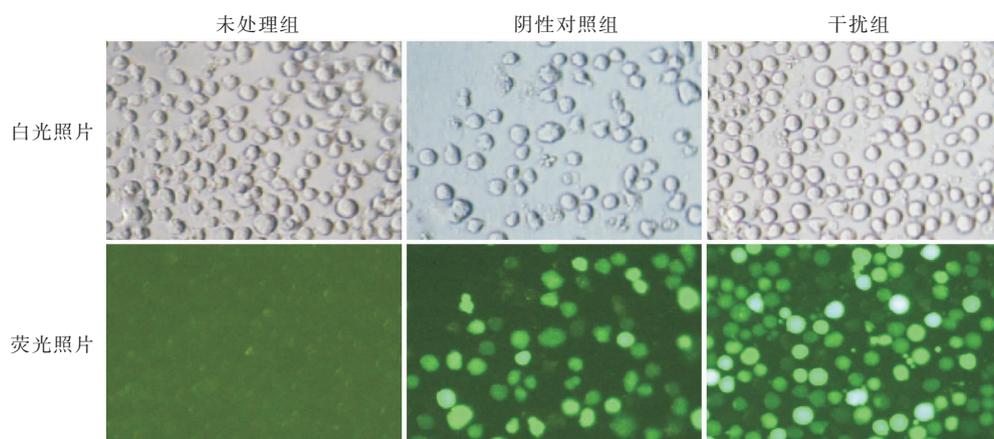


图2 慢病毒感染5 d后的U937细胞(×200) 未处理组细胞不带有绿色荧光,阴性对照和干扰组细胞感染慢病毒5 d后表达绿色荧光蛋白(GFP),GFP阳性细胞率达到90%左右。

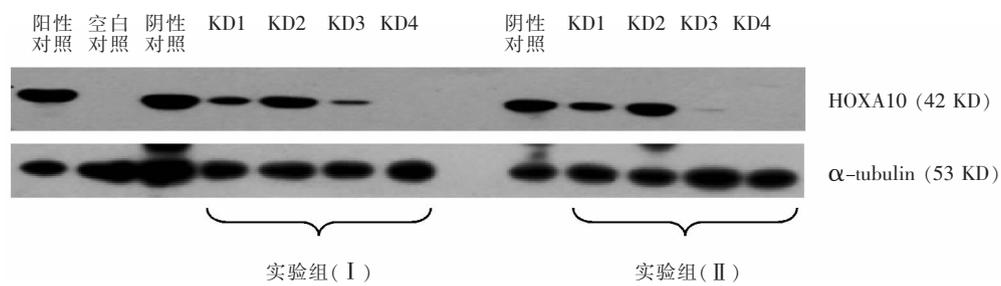


图3 Western blot 检测293T细胞中HOXA10蛋白的表达 阳性对照:转染过表达HOXA10基因的质粒细胞组;空白对照:不转染任何质粒的293T细胞组;阴性对照:共转染过表达质粒和阴性对照病毒载体质粒细胞组;实验组:共转染过表达质粒和干扰质粒细胞组;KD1~KD4分别代表1~4号干扰质粒的干扰效果。实验组(I)代表加入的干扰质粒的量为0.25 μg;实验组(II)代表加入的干扰质粒的量为0.5 μg。

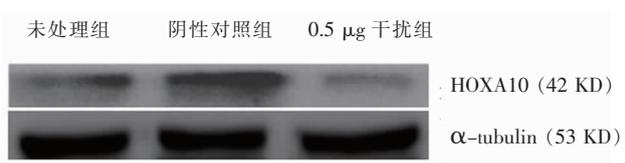


图4 Western blot 法检测shRNA干扰前后U937细胞HOXA10蛋白表达

2.5 瑞氏染色观察各组细胞形态学变化

光镜下,与阴性对照组和未处理组细胞相比,干

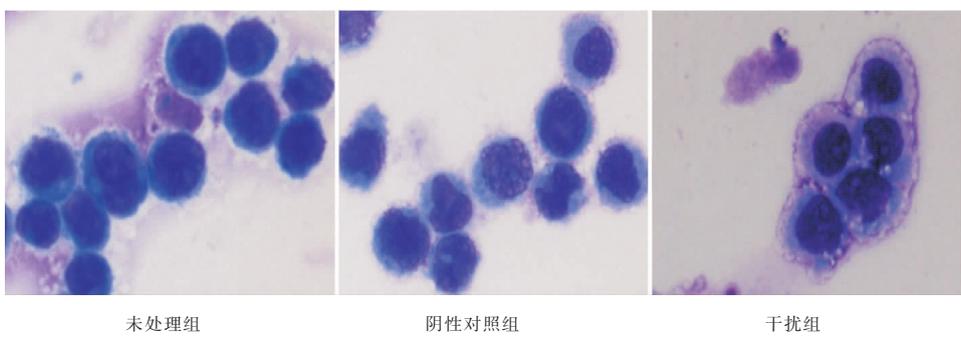


图5 瑞氏染色观察各组细胞形态学变化(×400) 未处理组和阴性对照组:细胞核异型性较明显,核大而深染,细胞质较少;干扰组:细胞核形态规则,核质比减小。

扰组细胞胞膜、胞核圆而规则,核质比减小,核分裂相少见,死亡细胞增多。见图5。

2.6 慢病毒对细胞增殖抑制和凋亡率的影响

干扰组细胞生长受到抑制,凋亡和坏死率增加,其抑制率、凋亡率与阴性对照组、未处理组相比差异有统计学意义(分别 $F = 2997.23, P < 0.001$; $F = 151.57, P < 0.001$)。见表2。

表2 慢病毒介导的RNA干扰对U937细胞增殖和凋亡的影响 (n=3)

组别	MTT		流式细胞术
	吸光度值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	凋亡率(%)
未处理组	1.38 ± 0.03	0	5.5 ± 1.3
阴性对照组	1.08 ± 0.03	22.0 ± 0.4	19.4 ± 1.9
干扰组	0.77 ± 0.01 ^a	43.9 ± 0.7 ^a	27.1 ± 1.4 ^a

a: 与未处理组和阴性对照组相比, $P < 0.05$

3 讨论

HOXA10 基因编码同源转录因子,在正常髓系祖细胞中表达。近年来研究表明,HOXA10 与白血病关系密切,HOXA10 在小鼠骨髓细胞高表达可引起小鼠发生 AML^[1]。Camós 等^[2]发现混合谱系白血病(MLL)基因重排、部分串联重复和单核细胞形态的 AML 患者 HOXA10 的表达水平较高,预后好的 AML 患者 HOXA10 的表达水平比较低,提示 HOXA10 的表达水平与 AML 患者的预后相关。HOXA10 基因参与白血病发病的机制尚不明确,较多学者从分子水平对二者的关系展开研究。Kawagoe 等^[3]通过反义寡核苷酸技术靶向下调 THP-1 细胞株 MLL-AF9 的表达可同时减少 HOXA7 ~ A10 基因的表达,并可使 THP-1 细胞凋亡增加,提示 HOXA10 在参与白血病发病的过程中受到 MLL-AF9 [AF9 t(9;11) (p22; q23)] 的调节。Shah 等^[4]用电穿孔的方法将 HOXA10 的质粒表达载体感染到 U937 细胞,构建稳定表达 HOXA10 的细胞株,发现 HOXA10 调节转化生长因子 $\beta 2$ (transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$) 的分泌,HOXA10 通过增加 TGF- $\beta 2$ 的分泌来促进髓系祖细胞的增值,这可能是 HOXA10 过表达导致 AML 的病理机制之一。

我们前期实验已筛选出高表达 HOXA10 基因的细胞株 U937, U937 是人单核细胞白血病细胞株,呈悬浮生长的特性,悬浮细胞尤其是血液系统细胞比较难感染,脂质体介导的 siRNA 和质粒感染 U937 细胞的效率非常低,且不能长期沉默目的基因,而慢病毒能够高效感染分裂期与非分裂期细胞^[5-6],其携带的 DNA 可以在感染后整合入宿主细胞的染色体并长期稳定地表达,并且具有不易引起宿主免疫反应等优点。所以本研究选择慢病毒作为载体感染 U937 细胞,稳定、持续地抑制 HOXA10 基因的功能。

由于脂质体及电穿孔等方法介导的质粒很难转染 U937 细胞,所以用质粒转染 293T 细胞,在 293T 细胞中筛选有效干扰靶点,将 4 条干扰质粒分别和 HOXA10 基因的过表达质粒感染 293T 细胞,筛选出

了 HOXA10 基因的有效干扰靶点,real-time PCR 证实 4 号干扰组慢病毒对 HOXA10 的敲减效率为 (92.3 ± 1.3)%, lenti-shHOXA10 可有效抑制 U937 细胞增殖并促进其凋亡和坏死。本研究中发现随着细胞传代次数的增加,干扰组细胞 GFP 阳性率逐渐下降,转染第 5 天为 90%,转染第 13 天降为 (66.65 ± 0.33)%,说明干扰组 GFP 阳性细胞的增殖受到抑制,阴性对照组 GFP 阳性细胞的比例稍有下降,增殖受抑的作用不明显。Orlovsky 等^[7]以慢病毒为载体分别沉默人前 B 淋巴细胞白血病细胞株 (RS4; 11) 的 MEIS1, HOXA7, HOXA9, HOXA10 基因,与对照组细胞相比这 4 种细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的增殖均受到抑制,说明这 4 种基因与 RS4; 11 细胞在小鼠体内的增殖有关,且它们的作用不能相互替代。HOXA10 基因与 U937 细胞在小鼠体内增殖的关系尚需进一步研究。

药物诱导 HOXA10 基因过表达,可促进白血病细胞凋亡,慢性髓系白血病细胞株 (如 K562) 存在抗凋亡基因 BCR-ABL, ABL 激酶抑制剂治疗慢性髓系白血病 (CML) 的效果非常好,体外实验证明 ABL 激酶抑制剂可通过诱导 K562 细胞产生 HOXA10 来促进 K562 的凋亡,提示 HOXA10 具有促凋亡作用^[8]。HOXA10 对不同白血病细胞株的作用不一致,可能与 HOXA10 表达增加的机制不同有关,即一种是自发的过表达,另一种是诱导后高表达,同样维生素 D3 可诱导 U937 细胞内 HOXA10 的表达上调,进而促进 U937 细胞分化^[9],本研究发现通过 RNAi 技术降低 HOXA10 的表达水平可促进 U937 细胞凋亡和抑制其增殖,提示人为干预 U937 细胞内 HOXA10 的表达水平,降低或者升高均不利于白血病细胞的生长,白血病细胞的恶性扩增需要 HOXA10 的表达水平维持在适度水平,HOXA10 基因即可促进原始髓系细胞增殖又参与粒单系细胞的分化,是否发挥促进分化、凋亡或增殖的作用还与药物的诱导和调节有关,具体机制尚不明确,需要继续深入研究。

慢病毒的安全性也是不容忽视的问题,逆转录病毒介导的基因治疗 X 连锁免疫缺陷病的临床试验中,由于前病毒的整合位点靠近原癌基因,导致 4 个患者患上了白血病,这使慢病毒载体的研究一度陷入低谷,但后来的一些临床试验证明慢病毒载体是相对安全的,以慢病毒为表达载体编码针对艾滋病病毒包膜基因的反义 RNA,其一期临床试验没有产生突变和重组激活病毒,慢病毒介导的 RNAi 技术无疑为治愈某些顽疾带来了曙光^[10-11]。目前,

shRNA 的慢病毒表达载体广泛用于肿瘤、神经系统疾病和病毒感染性疾病的研究上,治疗前景非常广阔。

[参 考 文 献]

- [1] Wang H, Lindsey S, Konieczna I, Bei L, Horvath E, Huang W, et al. Constitutively active SHP2 cooperates with HoxA10 overexpression to induce acute myeloid leukemia [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(4): 2549-2567.
- [2] Camós M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;6)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 6947-6954.
- [3] Kawagoe H, Kawagoe R, Sano K. Targeted down-regulation of MLL-AF9 with antisense oligodeoxynucleotide reduces the expression of the HOXA7 and -A10 genes and induces apoptosis in a human leukemia cell line, THP-1 [J]. *Leukemia*, 2001, 15(11): 1743-1749.
- [4] Shah CA, Wang H, Bei L, Plataniotis LC, Eklund EA. HoxA10 regulates transcription of the gene encoding transforming growth factor β 2(TGF β 2) in myeloid cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(4): 3161-3176.
- [5] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, Ohashi T, Kannagi M, Masuda T. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1): 76-85.
- [6] 周燕,陈奎生,高剑波,韩瑞,鲁晶晶,彭涛,等. miR-124-1 促进大鼠骨髓间充质干细胞神经分化的实验研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 12(3)215-220.
- [7] Orlovsky K, Kalinkovich A, Rozovskaia T, Shezen E, Itkin T, Alder H, et al. Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(19): 7956-7961.
- [8] Sugimoto Y, Nakamura S, Okinaka K, Hirano I, Ono T, Shigeno K, et al. HOXA10 expression induced by Abl kinase inhibitors enhanced apoptosis through PI3K pathway in CML cells[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(6): 962-971.
- [9] Gemelli C, Orlandi C, Zanicco Marani T, Martello A, Vignudelli T, Ferrari F, et al. The vitamin D3/Hox-A10 pathway supports MafB function during the monocyte differentiation of human CD34⁺ hemopoietic progenitors[J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5660-5672.
- [10] Haccin-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3132-3142.
- [11] Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(46): 17372-17377.

(本文编辑:万静)