文章编号:1000-5404(2006)11-1191-04

论著

核干细胞因子特异性短发夹状RNA对HL-60细胞分化抗原和生物学性质的影响

岳保红[1,2],朱晓燕[2],张功员[2],孙 玲[3],赵小强[3],王清霞[1],刘 帅[1],张秋堂[3],张钦宪[2] (郑州大学:[1]第一附属医院检验科,河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室,[2]基础医学院组织学与胚胎学教研室,[3]第一附属医院血液科,郑州 450052)

提 要:目的 研究核干细胞因子(nucleostemin,NS)特异性短发夹状RNA(shRNA)阻断NS基因表达对HL-60白血病细胞分化抗原及生物学性质的影响,探讨NS的生物学功能和与急性白血病的关系以及用于基因治疗的可能性。**方法** 特异性转染试剂和合成的NS短发夹状RNA(NS-shRNA)体外直接转染HL-60细胞,采用RT-PCR判断基因阻断效果,MTT法测定转染后细胞增殖能力,流式细胞仪(FCM)测定细胞分化抗原,形态学观察细胞形状和生长状态,血细胞分析仪测定细胞大小、粒度。**结果** 合成的2条NS-shRNA均能明显阻断NS基因表达,抑制率分别为37.82%和71.88%;NS-shRNA能显著抑制HL-60细胞的增殖并存在时间和浓度依赖性,以48 h和10 nmol/L浓度最佳。转染后:分化抗原CD11b、CD33、CD14、CD64、HLA-DR增高,CD38降低,显示有向粒系继续成熟和向单核系重新分化趋势;细胞聚团性减弱,碎片增多,一部分细胞形态变成梭形和长尾形,染色后细胞核紧密,凹陷,髓过氧化物酶(MPO)和α-醋酸萘酚酯酶(α-NAE)活性增强;大小和粒度分析小体积细胞和核碎裂细胞增多。**结论** NS-shRNA通过阻断NS基因表达,对HL-60细胞有抑制增殖和促分化作用,改变了细胞的生物学性质,使细胞恶性程度有所减弱,并有可能诱发凋亡,在白血病的基因中具有潜在的临床价值。

关键词: 核干细胞因子;短发夹状RNA;分化抗原;生物学性质;增殖;分化;HL-60细胞
中图法分类号: R394.3; R730.23; R733.7 **文献标识码:** A

Effect of specific short hairpin RNA of nucleostemin on differentiation antigens and biological properties of HL-60 cells

YUE Bao-hong[1,2], ZHU Xiao-yan[2], ZHANG Gong-yuan[2], SUN Ling[3], ZHAO Xiao-qiang[3], WANG Qing-xia[1], LIU Shuai[1], ZHANG Qiu-tang[3], ZHANG Qin-xian[2] ([1]Clinical Laboratory, [3]Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, [2]Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To study the role of the specific short hairpin RNA (NS-shRNA) of nucleostemin in inhibiting the expression of nucleostemin (NS) gene and evaluate the effect of NS-shRNA on differentiation antigen and biological properties of HL-60 cells, so as to explore the relationship between the biological functions of NS and acute leukemia, the potential perspective of NS gene therapy with RNA interference (RNAi). **Methods** HL-60 cells were directly transfected NS-shRNA by using special transfection reagent. After 48 h, the inhibition rate of NS-shRNA to NS gene was detected by RT-PCR, the proliferation ability of HL-60 cells was detected by MTT, the differentiation antigens were assayed by flow cytometry (FCM), the morphologic peculiarities such as cell shape, growth condition were observed, and the volume and granularity of HL-60 cells were analyzed by blood cell analyzer. **Results** The expression of NS gene were significantly inhibited by both two NS-shRNA, the inhibition rate were 37.82% and 71.88%, respectively. The significant inhibition effect of NS-shRNA to the proliferation of HL-60 cells existed in a time-dependent and concentration-dependent manner, and the best time was 48 h, the best concentration was 10 nmol/L. The change of differentiation antigen included increase of CD11b, CD33, CD14, CD64, HLA-DR and decrease of CD38, indicating continuous maturation

基金项目: 河南省重大科技攻关基金资助项目(0222031300),河南省医学创新人才工程基金资助项目(200534)
Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of Henan Province (0222031300) and the Medical Science Foundation For Distinguished Scholars of Henan Province (200534)

作者简介: 岳保红(1968-),男,河南省温县人,博士研究生,副主任技师,主要从事血液肿瘤发病机制及实验诊断方面的研究,发表论文10篇。电话:(0371)66913128
通讯作者: 张钦宪,电话:(0371)66658153,E-mail:qxz53@zzu.edu.cn

收稿日期: 2006-02-24;**修回日期:** 2006-04-25

of HL-60 cells to granulocytes and redifferentiation trend to monocytes. The aggregation of cells declined and the cell fragments increased. Myeloperoxidase (MPO) and α-naphthol acetate esterase (α-NAE) activity increased after NS-shRNA-2 transfection. Furthermore, some HL-60 cells changed from round to fusiform shape even to pseudopod. The cells of small volume and karyorrhexis increased. **Conclusion** Through blocking the expression of NS gene, NS-shRNA can inhibit the cell proliferation and induce the differentiation of HL-60 cells, weaken malignant degree of HL-60 cells and trigger cell apoptosis. NS-shRNA is of clinical potential in gene therapy for acute leukemia.

Key words: nucleostemin; shRNA; differentiation antigen; biological property; proliferation; differentiation; HL-60 cell

核干细胞因子(nucleostemin,NS)是2002年新发现的一个与细胞增殖相关的蛋白质,首先在大鼠胚胎干细胞、神经干细胞和大鼠骨髓内干细胞等处于早期多潜能状态的细胞中发现,定位于细胞核仁内,已分化的成体细胞不表达NS[1-4]。后来发现一些恶性实体瘤细胞也有NS基因持续高表达。NS蛋白可能是维持干细胞和癌细胞增殖所必须的蛋白质并使细胞保持在不分化状态。NS的生物学功能及其对干细胞演变和肿瘤细胞的发生、发展的作用研究国外才刚起步,目前在白血病方面的研究少见报道。我们先前研究发现白血病细胞存在NS基因高表达现象[5]。

RNA干扰(RNAi)是双链RNA(dsRNA)介导的转录后基因沉默(PTGS)现象,能高效特异地阻抑特定基因的表达[6,7]。

本研究构建NS的特异性短发夹状RNA(NS-shRNA)转染HL-60白血病细胞系,研究对细胞分化抗原和细胞生物学特性的影响,为进一步探索以NS为靶目标、RNAi为手段的基因治疗奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HL-60细胞在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中悬浮培养(含青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml),条件为饱和湿度、37 ℃和5% CO_2浓度。

1.2 NS-shRNA的设计与合成

从NCBI网站GenBank中检索出目前登录的人类NS基因全长序列共有3个变异体(NM014366,NM206825,NM206826)cDNA,找出三者的共同序列1 833个碱基对(bp)。按照小干扰RNA(siRNA)序列设计原则,剔除掉与其他编码序列或EST同源的序列,最终选取2个21 bp序列作为合成shRNA的对应序列,中间加上Loop环aaguucucu 9个碱基,3′末端是2个突出的"UU",shRNA序列全长为49个碱基。首先构建含T7启动子序列的体外合成NS-shRNA的互补DNA模板单链,退火后形成模板双链,在T7 RNA聚合酶作用下的合成NS-shRNA-1和NS-shRNA-2 2条,纯化后琼脂糖凝胶电泳测定浓度。

1.3 NS-shRNA转染HL-60白血病细胞

收获对数生长期细胞,调浓度为4×10^5/μl,分为转染组(R1和R2)、对照组(C1和C2),每组500 μl于24孔板。转染方法:125 μl无血清培养基加入2 μl Code Break siRNA转染试剂(Promega公司),R1、R2分别加入NS-shRNA-1、NS-shRNA-2,根据预实验选择终浓度为10 nmol/L,C1加无关shRNA序列作为阴性对照,C2加生理盐水和转染试剂作为空白对照。

1.4 NS-shRNA对NS-mRNA表达的影响

TRIzol提取总RNA进行RT-PCR扩增NS基因片段,了解NS-mRNA被抑制情况。引物上游:5′-AAAGCCATTCGGGTTGGAGT-3,下游:5′-ACCACAGCAGTTTGGCAGCAC-3′,产物为418 bp。以β-肌动蛋白(β-actin)基因为内参照,引物上游:5′-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3′,下游:5′-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3′,产物为315 bp。从2条中筛选出1条效果最明显的进行后续实验。

1.5 NS-shRNA对HL-60细胞增殖的影响

四甲基偶氮唑蓝(MTT)光吸收法测定NS-shRNA对细胞增殖的影响:每孔200 μl 4×10^5/μl细胞接种于96孔板,每组设3个平行孔。转染方法和对照组设置同1.3,NS-shRNA浓度分别为1.0、5.0、10.0、20.0 nmol/L。于24、48、72 h不弃去培养基的情况下,每孔加入20 μl MTT溶液孵育培养4 h,离心弃上清液,每孔再加二甲基亚砜(DMSO)150 μl,振荡10 min,490 nm测吸光度值[D(490)]。抑制率=|实验组[D(490)]-对照组[D(490)]|/对照组[D(490)]×100%[8]。

1.6 NS-shRNA转染后HL-60细胞形态观察

转染48 h和未转染对照组细胞在倒置显微镜下活体观察生长状况和细胞外形,涂片后瑞特-姬姆萨(Wright-Giemsa)染色,油镜(×1 000)观察细胞形态变化。

1.7 NS-shRNA对HL-60细胞分化抗原表达的影响

取转染48 h和未转染的对照组HL-60细胞,调细胞浓度为10^8/ml,分别加入CD7、CD11b、CD13、CD14、CD33、CD34、CD38、CD64、CD41、CD117、HLA-DR单克隆荧光抗体,室温孵育30 min。以CD45和侧向角散射光(SSC)设门,用流式细胞仪(FCM)测定相应抗体荧光强度,经软件处理后出相应分化抗原表达百分率。

1.8 NS-shRNA对HL-60细胞MPO和α-醋酸萘酯酶(α-NAE)酶活性影响

取转染72 h和未转染HL-60细胞,离心浓缩,在粘片剂

3′氨丙基三乙氧硅烷（APES）处理的载玻片上涂片，固定后参照文献[9]进行 MPO 和 α-NAE 酶活性及 NaF 抑制实验染色。

1.9　细胞大小和粒度分析

取转染 48 h 和未转染对照组细胞，分别用 Sysmex K4500 型和 Sysmex SF3000 型血细胞分析仪测定细胞体积和细胞粒度变化情况。

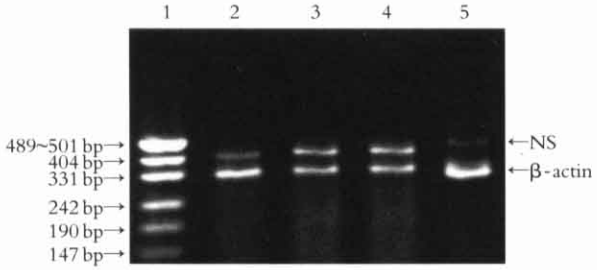
1.10　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　NS-shRNA 对 NS-mRNA 表达的阻断效应

转染 HL-60 细胞 48 h 后 RT-PCR，凝胶灰度扫描分析结果：对照组 C1、C2 与内参之比分别为 0.826、0.809，转染组 R1、R2 与内参之比分别为 0.503、0.207。所合成的 NS-shRNA 干扰效果明显，阻断了 NS-mRNA 表达，抑制率分别达 37.82% 和 71.88%，尤以 NS-shRNA-2 显著（图 1）。



1：DNA 标准；2：R1，NS-shRNA-1 处理组；3：C1，阴性对照组；4：C2，空白对照组；5：R2，NS-shRNA-2 处理组

图 1　NS-shRNA 作用 HL-60 细胞 48 h 后 RT-PCR 凝胶电泳图

2.2　对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

从时间上看，与阴性对照比较，加入 NS-shRNA-2 后 24、48 h和 72 h 细胞增殖活性均显著受抑制（$t = 4.21, 5.75, 6.06$；$P < 0.01$），其中 48、72 h 最明显，增殖抑制率分别为 42.6% 和 45.2%，48 h 和 72 h 之间无显著性差异（$t = 0.28$，$P > 0.05$）（表 1）。从 NS-shRNA-2 浓度上看，抑制 HL-60 细胞增殖活性存在浓度依赖性，其中 10 nmol/L 和 20 nmol/L 的作用最强，但两者之间无显著性差异（$t = 0.22$，$P > 0.05$）。5、10 nmol/L 和 20 nmol/L 浓度与阴性对照组差异显著（$t = 4.25, 5.96, 5.72$；$P < 0.01$），1 nmol/L 浓度与阴性对照无显著性差异（$t = 0.35$，$P > 0.05$）。转染组内 5 nmol/L 与 1 nmol/L 比较差异显著（$t = 3.49$，$P < 0.01$），10 nmol/L 与 5 nmol/L 比较也有差异（$t = 2.58$，$P < 0.05$）（表 2）。

表 1　NS-shRNA 对 HL-60 细胞增殖抑制的时间效应（$\bar{x} \pm s$）

组别	24 h		48 h		72 h	
	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)
空白对照组	1.22 ± 0.37	0	2.53 ± 0.28	0	3.97 ± 0.39	0
阴性对照组	1.20 ± 0.29	1.6	2.44 ± 0.24	3.6	3.84 ± 0.45	3.2
转染组	0.95 ± 0.15[a]	22.1	1.45 ± 0.27[a]	42.6	2.17 ± 0.31[a]	45.2

a：$P < 0.01$，与阴性对照组比较

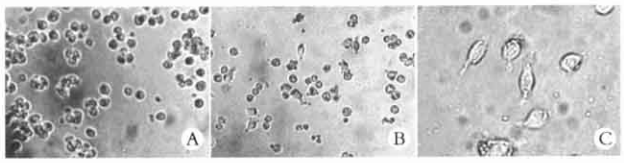
表 2　NS-shRNA 对 HL-60 细胞增殖抑制的浓度效应（$\bar{x} \pm s$）

浓度(nmol/L)	阴性对照组		转染组	
	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)
0	3.93 ± 0.52	0	3.93 ± 0.52	0
1	3.79 ± 0.63	3.6	3.75 ± 0.61[c]	4.6
5	3.86 ± 0.49	1.8	3.03 ± 0.34[a]	22.9
10	3.81 ± 0.47	3.1	2.20 ± 0.26[ab]	44.0
20	3.73 ± 0.59	5.1	2.12 ± 0.37[a]	46.1

a：$P < 0.01$，与阴性对照组比较；b：$P < 0.05$，c：$P < 0.01$，与 5 nmol/L NS-shRNA 比较

2.3　细胞生长状态和形态学变化结果

对照组 HL-60 细胞呈聚集性悬浮生长，常 20～30 个细胞聚集成团，细胞之间大小均一，光滑圆润，轮廓清晰。NS-shRNA-2 转染 48 h 后，活体观察细胞密度和聚集程度均下降，单个或几个细胞散在生长多见，细胞之间大小相差悬殊，细胞质颗粒感增强，细胞碎片增多，说明一部分细胞发生了死亡。经吹打散开后，这种现象更明显，并且发现一部分 HL-60 细胞由圆形变成了梭形或尾形并有明显的伪足（图 2）。



A：对照组 HL-60 细胞　（×200）；B：转染组 HL-60 细胞　（×200）；C：带伪足的梭形 HL-60 细胞　（×400）

图 2　NS-shRNA-2 转染后倒置显微镜观察 HL-60 细胞形态

Wright-Giemsa 染色显示对照组 HL-60 细胞大小均一，细胞多呈圆形或椭圆形；细胞核大而圆，占 3/4 面积以上，染色质细致、分散，含 1～4 个明显的核仁；细胞质量少染深蓝色。转染 48 h 后 HL-60 细胞大小不均，除圆形和椭圆形外还有一些呈不规则形，部分带有伪足，胞体小的细胞细胞核紧缩，染色质浓集，核仁不清或消失，细胞核出现了凹陷，个别细胞核凹陷程度较深且细胞质着色出现嗜酸性的粉红色。

2.4　NS-shRNA 转染后分化抗原测定结果

经 FCM 测定，10 种细胞分化抗原标志物有 7 种在转染后的 HL-60 细胞上发生了变化（表 3）。经 χ^2 检验，CD7、CD13 和 CD117 的表达率对照组与转染组无差异（$P > 0.05$），余 7 种细胞分化抗原对照组和转染组有显著性差异（$P < 0.01$），提示 NS-shRNA-2 转染 48 h 的 HL-60 细胞表面分化抗原发生了明显变化。

表 3　NS-shRNA-2 转染 48 h 后分化抗原变化结果（%）

组别	CD7	CD11b	CD13	CD14	CD33	CD64	CD117	CD34	CD38	HLA-DR
对照组	2.3	8.5	94.0	0	0	7.7	2.9	4.1	6.7	0.9
转染组	2.9	15.8[a]	97.0	14.5[a]	71.4[a]	13.7[a]	4.0	60.3[a]	4.9[a]	15.5[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较

2.5　NS-shRNA 转染对 HL-60 细胞 MPO 和 α-NAE 酶活性影响检测结果

NS-shRNA-2 转染作用 HL-60 细胞 72 h 后 MPO 阳性率由

对照组的(10.9±2.33)%提高到(27.2±2.82)%,差异明显(t=7.718,P<0.01)。对照组 HL-60 细胞 α-NAE 染色呈阴性,经 NS-shRNA-2 作用72 h 后,出现了13% 阳性细胞,NaF 能抑制该阳性反应,说明出现了一些单核细胞性质的 α-NAE。

2.6 细胞大小和粒度分析结果

对照组 HL-60 细胞体积大小均一,体积直方图上显示220 fl附近为峰值,曲线近似正态分布,低于150 fl 的细胞很少;转染后峰值和正态分布曲线消失,低于150 fl的细胞大量存在,进一步证实 NS-shRNA-2 的作用导致细胞之间大小悬殊。细胞粒度散点图显示:对照组细胞只有1个高密度散点聚集区,转染组存在2个高密度散点聚集区。转染组低角度散射光重心下移,说明有较多小体积细胞;高角度散射光重心左移,说明存在较多核碎裂细胞和无核的细胞碎片。

3 讨论

NS 与细胞增殖和分化调控密切相关,可能是决定干细胞和癌细胞穿越 G_2/M 检查点的特异性调控因子[1],细胞发生分化时 NS 蛋白表达首先下调并且早于细胞周期标志物[10]。HL-60 细胞系异常分化的干细胞所克隆的早幼粒细胞失去进一步分化成熟的能力而停滞发育[11]。

从 RT-PCR 结果看,我们所设计合成的2条 NS-shRNA 对 NS 基因表达均有明显的抑制作用。由于存在目前无法解释的位置效应,NS-shRNA-2 表现抑制作用更强。shRNA 是最接近生命自然状态的 dsRNA,不易被降解,用合成的 shRNA 直接转染细胞容易操作,可定量控制,更接近人体治疗模式。

NS 基因产物的抑制使 HL-60 白血病细胞的增殖能力减弱,并且存在时间和浓度依赖性,数据显示 NS-shRNA-2 浓度为10 nmol/L、作用48 h 达到最佳的细胞增殖抑制效果,时间的继续延长和浓度的继续增加增殖抑制效果无进一步加强。Tsai 和 Liu 等[1,2]用实体瘤细胞也发现 NS 产物的抑制伴随细胞增殖能力减弱,证实为一部分癌细胞退出了细胞周期。

用 FCM 和细胞分化抗原证实 NS-shRNA-2 转染后,HL-60 细胞有重新分化的趋势,并且可能是粒系和单核系的多向分化、成熟。根据造血细胞分化抗原的表达规律分析[12],CD11b、CD33 的增高反映向成熟粒细胞分化,CD14 和 CD64 增高说明也有一部分细胞向单核细胞方向分化,CD38 的降低和 HLA-DR 的升高说明细胞的幼稚性有所降低,成熟度有所增高。至于转染后 CD34 的增高,我们认为和 HL-60 细胞的调控信号和信号传导通路发生改变有关。Goodell[13]发现存在 $CD34^+$ 和 $CD34^-$ 2种 HSC,在一定的外界刺激下可发生相互转化。HL-60 细胞的重新分化也得到了形态和和细胞酶化学染色的支持,转染的 HL-60 细胞小部分从圆形变成了梭形和长尾形,细胞内出现了单核细胞性质的 α-NAE,这类细胞的数量和 FCM 测到的 CD14 阳性细胞数相吻合,符合单核细胞的特征。转染后 MPO 阳性率增加,说明一部分向粒细胞方向进一步成熟,Wright-Giemsa 染色显示细胞核缩小、凹陷,核染色质紧密,出现嗜酸性细胞质。

细胞大小和粒度及细胞的聚团性变化,说明细胞增殖方式也发生了变化,我们认为 NS-shRNA-2 转染后,有细胞凋亡的增加,显微镜下观察到的细胞碎裂和小细胞核可能是凋亡小体。事实是否如此,我们将作进一步验证。

本实验证实用 NS-shRNA 可以有效地抑制 NS 基因的表达,HL-60 细胞增殖受抑,在分化抗原和形态上 HL-60 白血病细胞有重新分化、成熟趋势,并可能有凋亡的增加,细胞的生长状态和生物学特性发生了重大变化,恶性程度有所减弱,从理论上有望为将来的基因治疗提供新的靶向。

参考文献:

[1] TSAI R Y, MCKAY R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(23): 2991-3003.

[2] LIU S J, CAI Z W, LIU Y U, *et al*. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(9): 1246-1249.

[3] 钱 晖,许文荣,王文兵,等. 骨髓间充质干细胞和部分肿瘤细胞中 Nucleostemin 基因的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 8-13.

[4] MICHAEL D, OREN M. The p53 and Mdm2 families in cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(1): 53-59.

[5] 岳保红,孙 玲,赵小强,等. Nucleostemin 基因在人急性白血病细胞的表达测定和意义[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(4): 49-53.

[6] SIJEN T, FLEENOR J, SIMMER F, *et al*. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing[J]. Cell, 2001, 107(4): 465-476.

[7] GUPTA S, SCHOER R A, EGAN J E, *et al*. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(7): 1927-1932.

[8] 魏 立,孔佩艳,陈幸华,等. 阻抑正常骨髓基质 SDF-1 作用对 HL-60 细胞生物学性质的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(23): 2158-2161.

[9] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 第2版. 南京:东南大学出版社,1997: 5-8.

[10] BERNARDI R, PANDOLFI P P. The nucleolus: at the stem of immortality[J]. Nat Med, 2003, 9(1):24-25.

[11] 陈 龙,陈洁平,林 晨. 重组反义 c-myc 腺病毒诱导 HL-60 细胞分化的作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1553-1556.

[12] 邓家栋,杨崇礼,杨天楹,等. 邓家栋临床血液学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001: 149-177.

[13] GOODELL M A. Introduction: Focus on hematology. $CD34^+$ or $CD34^-$: does it really matter? [J]. Blood, 1999, 94(8): 2545-2547.

(编辑 汪勤俭)