

SALL4 基因表达与急性髓细胞白血病细胞系 KG1a 耐药相关性研究

郭 野

(中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘 要:**目的** 探讨 SALL4 基因与急性髓细胞白血病耐药的相关性。**方法** 通过 RNA 干扰技术将表达 SALL4 干扰序列的质粒载体转染至急性髓细胞白血病细胞系 KG1A 中, 建立抑制 SALL4 基因的表达体系。在此条件下, 通过 MTS 细胞增殖检测法检测 SALL4 基因抑制前后对阿霉素和柔红霉素的耐药情况。**结果** 实时荧光定量 PCR 结果显示, SALL4 的干扰效率良好。在此干扰体系下, 不同浓度化疗药物阿霉素(0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$)作用时, SALL4 基因抑制表达后的细胞相对增殖率 $[(62.80 \pm 1.64)\%、(26.80 \pm 2.68)\%、(18.00 \pm 2.00)\%]$ 显著低于 SALL4 基因抑制表达前的细胞相对增殖率 $[(85.40 \pm 4.03)\%、(56.80 \pm 5.06)\%、(26.50 \pm 4.50)\%]$, 差异有统计学意义($t = -22.6、-30.4、-8.6$, 均 $P < 0.05$)。不同浓度化疗药物柔红霉素(0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$)的作用下, SALL4 基因抑制表达后的细胞相对增殖率 $[(42.00 \pm 1.87)\%、(28.00 \pm 1.22)\%、(21.60 \pm 2.51)\%]$ 也显著低于 SALL4 基因抑制表达前的细胞相对增殖率 $[(61.00 \pm 1.87)\%、(40.20 \pm 2.68)\%、(27.00 \pm 1.22)\%]$, 差异有统计学意义($t = -18.8、-12.2、-5.4$, 均 $P < 0.05$)。**结论** SALL4 基因的表达是急性髓细胞白血病产生耐药的阳性调节因素。

关键词: SALL4 基因; 急性髓细胞白血病; 耐药; RNA 干扰

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.015

中图法分类号: R733.71, R446.5

文章编号: 1673-4130(2019)22-2749-04

文献标识码: A

The study of SALL4 expression and drug resistance in acute myeloid leukemia cell line KG1a

GUO Ye

(Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract:**Objective** To investigate relevance of the expression of SALL4 gene and drug resistance in acute myeloid leukemia. **Methods** The plasmid vector expressing SALL4 interference sequence was transfected into acute myeloid leukemia cell line KG1A by RNA interference technology, and the expression system of SALL4 gene was established. Under these conditions, the drug resistance to doxorubicin and daunorubicin before and after SALL4 gene inhibition was detected by MTS cell proliferation assay. **Results** Real time fluorescent PCR illustrated that the high efficiency of RNA interference targeting SALL4. In the effect of different concentrations of doxorubicin (0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/mL}$), the proliferation of KG1A cell in the inhibition of SALL4 group $[(62.80 \pm 1.64)\%、(26.80 \pm 2.68)\%、(18.00 \pm 2.00)\%]$, respectively] were lower than that in groups of non-inhibition of SALL4 gene $[(85.40 \pm 4.03)\%、(56.80 \pm 5.06)\%、(26.50 \pm 4.50)\%]$, the difference was statistically significant($t = -22.6、-30.4、-8.6$, respectively, $P < 0.05$). In the effect of different concentrations of Daunorubicin (0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/mL}$), the proliferation of KG1A cell in the inhibition of SALL4 group $[(42.0 \pm 1.87)\%、(28.0 \pm 1.22)\%、(21.6 \pm 2.51)\%]$, respectively] were lower than that in groups of non-inhibition of SALL4 gene $[(61.00 \pm 1.87)\%、(40.20 \pm 2.68)\%、(27.00 \pm 1.22)\%]$, the difference was statistically significant($t = -18.8、-12.2、-5.4$, respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of SALL4 gene is the positive adjustment factor for drug resistance in acute myeloid leukemia.

Key words: SALL4 gene; acute myeloid leukemia; drug resistance; RNA interference

化疗能使大部分急性髓细胞白血病患者的病情获得缓解,但是仍有相当一部分患者最终会复发。白血病细胞产生耐药性是导致疾病复发、治疗失败的主要原因之一^[1-2]。在白血病细胞中存在 0.1%~1.0%

具有自我更新能力的白血病干细胞,它保留了干细胞的主要特征,其具有 ATP 相关转运体对药物、毒素、凋亡刺等耐受,可以逃避化疗药物的作用,这可能是白血病复发和耐药的原因^[3-4]。SALL4 基因过表达具

作者简介:郭野,男,助理研究员,主要从事临床血液及体液检验研究。

本文引用格式:郭野. SALL4 基因表达与急性髓细胞白血病细胞系 KG1a 耐药相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2749-2751.

有白血病致癌作用,它通过激活造血干细胞自我更新的重要通路 Wnt/ β -Catennin 通路的活性,促进白血病干细胞不断增殖,导致白血病的发生^[5-6]。但 SALL4 基因与白血病细胞耐药是否有关,还不得而知。本研究采用 RNA 干扰技术通过抑制白血病细胞 KG1A 中 SALL4 基因的表达,探讨 SALL4 基因表达改变时,其对化疗药物的耐受情况,以探寻 SALL4 基因与急性髓细胞白血病耐药的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 AML-细胞系 KG1a 购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。由 GeneBank 提供 SALL4 基因的引物序列,参考基因为 β -actin,设计荧光定量 PCR 方法所用引物,并由北京奥科生物工程有限公司合成。所用基因和引物序列相关信息见表 1。

表 1 引物序列和片段大小

基因名称	引物序列	产物	基因编号
SALL4	F: 5'-TGC AGC AGT TGG TGG AGA AC-3'	68 bp	NM020436.2
	R: 5'-TCG GTG GCA AAT GAG ACA TTC-3'		
	F: 5'-TGT ACG CCA ACA CAG TGC TG-3'		
	R: 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3'		
β -actin	F: 5'-TGC AGC AGT TGG TGG AGA AC-3'	120 bp	NM001101
	R: 5'-TCG GTG GCA AAT GAG ACA TTC-3'		
	F: 5'-TGT ACG CCA ACA CAG TGC TG-3'		
	R: 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3'		

1.2 试剂与仪器 成品 shRNA-pRS 质粒载体干扰 SALL4 基因表达系统为美国 Origene 公司产品,Opti-MEM I Reduced 血清、PLUS Reagent 及 DNA-Lipofectamin LTX 购自美国 invitrogen 公司, RNA 提取试剂盒购自美国 QIAGEN 公司,逆转录 PCR 试剂盒购自加拿大 New England BioLabs 公司,荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq 购自大连宝生物工程大连有限公司,RPMI 1640 培养液购自美国 GIBCO 公司,MTS 细胞增殖检测试剂盒购自美国 Promega 公司。阿霉素、柔红霉素购自北京中硕科技有限公司。PCR 热循环仪、电泳仪、凝胶成像仪购自美国 BIO-RAD 公司,Light Cycler 荧光定量 PCR 扩增仪购自瑞士 Roche 公司,酶标仪购自芬兰热电公司,光学显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 急性髓系白血病细胞系 KG1a 以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,每 2~3 天进行换液。

1.3.2 KG1A 细胞转染 按照文献[7]转染 KG1A 细胞,设空白组(blank)、转染对照组(control 组),转染组(test)于 37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 test 组转染 SALL4-shRNA-pRS-1 质粒载体,control 组转染空 shRNA-pRS1 质粒载体。

1.3.3 逆转录 PCR 及荧光定量 PCR 检测基因表达 转染 48 h 后收集各组 KG1A 细胞 1×10⁵ 个,进行

逆转录 PCR 及荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 扩增反应条件为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,78 ℃ 1 min,共 40 个循环。以 β -actin 为内参基因,SYBRGreen 荧光染料法和 Δ Ct 进行基因表达定量分析^[7]。

1.3.4 体外药敏试验 各组分别接种到含不同浓度化疗药物的新鲜 10% FBS RPMI 1640 培养液的 96 孔板中。其中阿霉素和柔红霉素均配成 4 个浓度梯度,分别为 0.0、0.1、0.5、1.0 μ g/mL。严格按照试剂盒操作要求在反应 24 h 后,将细胞增殖剂 MTS-1 添加到每个孔中。在 450 nm 处酶标仪读取结果。上述实验重复测定 5 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。对实验数据进行正态性检验,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料比较采用独立样本 *t* 检验;多组资料比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析,进一步两两比较均采用 LSD-*t* 检验。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNAi 抑制白血病细胞 SALL4 基因表达的分析 荧光定量 PCR 结果显示,test 组和 control 组的 SALL4 基因表达水平为 blank 组的 (30.0±4.9)%、和 (102.0±6.5)%。test 组 SALL4 基因表达水平显著低于 blank 组 (*t* = 9.1, *P* < 0.05); control 组 SALL4 基因表达水平与 blank 组相比差异无统计学意义 (*t* = 1.1, *P* > 0.05)。

2.2 体外药敏试验结果分析 各组细胞在不同浓度的阿霉素作用 24 h 后,细胞相对增殖率呈规律性变化,见表 2。在阿霉素作用下,SALL4 基因抑制表达后,细胞增殖率较其正常表达时显著下降,而这种趋势在不同浓度的阿霉素作用时均有体现。说明当 SALL4 基因抑制表达时,白血病细胞的耐药性会减弱。但随着阿霉素浓度的增加这种减弱趋势会降低,见图 1A。当使用柔红霉素进行实验时也得到了相似的发现,见表 3,在柔红霉素作用下,SALL4 基因抑制表达后,细胞增殖率较其正常表达时显著下降。在各个浓度柔红霉素作用下,SALL4 抑制表达时细胞增殖率较其正常表达时均会显著下降,见图 1B。

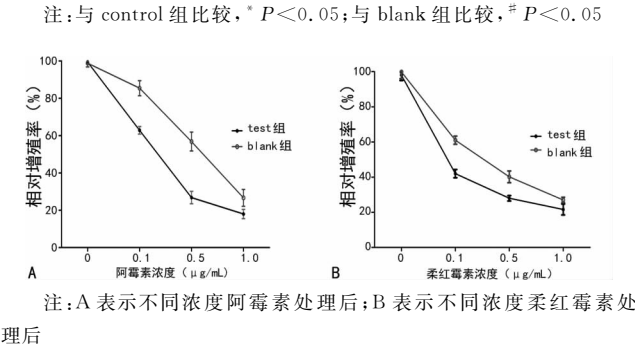
表 2 不同浓度的阿霉素处理后细胞相对增殖率的改变(%, $\bar{x} \pm s$)

阿霉素 (μ g/mL)	test 组	control 组	blank 组	<i>F</i>	<i>P</i>
0.0	99.40±2.07	98.60±4.92	98.80±2.04	0.8	0.924
0.1	62.80±1.64*	84.40±4.101	85.40±4.03	68.3	<0.001
0.5	26.80±2.68*	57.20±2.16	56.80±5.06	121.2	<0.001
1.0	18.00±2.00*	26.80±1.48	26.50±4.50	14.2	0.015

注:与 control 组比较,* *P* < 0.05

表 3 不同浓度的柔红霉素处理后细胞相对增殖率的改变 (%)

柔红霉素 (μg/mL)	test 组	control 组	blank 组	F	P
0.0	98.00±2.44	97.20±4.81	99.80±3.03	0.3	0.924
0.1	42.00±1.87* [#]	60.80±2.28	61.00±1.87	146.4	<0.001
0.5	28.00±1.22* [#]	38.80±4.32	40.20±2.68	24.4	<0.001
1.0	21.60±2.51* [#]	26.40±2.70	27.00±1.22	8.7	0.017



3 讨 论

SALL4 是一种在鼠科胚胎细胞中新发现的多功能干细胞因子。它在维持肝脏星状细胞的多能性方面具有重要的作用,并与造血系统发育和血液恶性肿瘤,特别是髓系白血病的发生具有相关性。以往研究表明它通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路而导致白血病干细胞的异常增殖^[8-9]。白血病干细胞不但是血液肿瘤发生的重要因素,而且与白血病耐药具有密切关系。SALL4 基因作为白血病干细胞的重要调节因子,其与白血病耐药的关系还鲜有报道。本研究通过 RNA 干扰技术,抑制急性髓细胞白血病细胞系 KG1A 中 SALL4 基因的表达,然后与常用的化疗药物阿霉素和柔红霉素处理后,反向探寻 SALL4 基因不同表达水平下细胞相对增殖率的变化。

阿霉素为广谱抗肿瘤药,对机体可产生广泛的生物化学效应,具有强烈的细胞毒性作用。其作用机理主要是该品嵌入 DNA 而抑制核酸的合成。临床上用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞性白血病等^[10-11]。本实验对不同处理组的 KG1A 细胞进行不同浓度的阿霉素处理,SALL4 基因抑制表达时细胞的相对增殖率要显著低于 SALL4 基因正常表达时的水平。阿霉素的治疗效果与 SALL4 基因表达量相关,而阿霉素的使用浓度逐渐增高时这种趋势并未发生改变。柔红霉素为第 1 代蒽环类抗肿瘤抗菌药物,作为一种周期非特异性化疗药,其主要用于治疗各种类型的急性白血病(包括粒细胞性、淋巴细胞性、单核细胞性及粒-单核细胞性)、红白血病、慢性粒细胞性白血病、恶性淋巴瘤等^[12-13]。使用柔红霉素来重复上述实验时,得到了相似的实验结果,柔红霉素的治疗效

果与 SALL4 基因表达量同样具有相关性,SALL4 基因表达量越高,柔红霉素的治疗效果越差。而随着柔红霉素使用浓度的增高,白血病细胞相对增殖率逐渐下降,但是药物浓度的改变并不影响 SALL4 抑制表达组的治疗效果均优于 SALL4 高表达组这一事实。上述体外实验表明,SALL4 基因与急性白血病细胞产生抗药性密切相关^[14]。而其耐药机制也是源于其 SP 细胞的特性。SP 细胞具备非常强大的细胞膜泵功能以避免有害物质的入侵。Hoechst 33342 可结合至 DNA 的 A-T 富集区域进入活细胞内,但是它也会被 ATP-Binding Cassette(ABC)转运子排出细胞外,其这一特性,可以通过流式细胞仪把 SP 细胞和非 SP 细胞分开。化疗药物可能也可以通过高表达 ABC 转运家族成员 ABCG2 后,外排药物而导致肿瘤细胞发生耐药。多个血液肿瘤细胞的 SP 细胞 SALL4 基因的表达量均高于在非 SP 细胞中 SALL4 基因的表达。另外,SALL4 基因抑制表达前后 SP 细胞的比例也会减低。SALL4 与白血病发生耐药的机制可能源于 SP 细胞的外排功能而发挥作用^[15]。

4 结 论

综上所述,SALL4 基因的表达是急性髓细胞白血病产生耐药的阳性调节因素,这一发现不仅有助于对急性髓细胞白血病发生耐药机制的认识,而且为以后的特异性靶向治疗提供了理论依据。其促进白血病发生耐药的具体机制可能是通过影响侧群细胞的外排机制而起作用,但更深入的机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 王楠,潘喆,袁宏.抑制性差减杂交技术分离白血病多药耐药基因[J].国际检验医学杂志,2016,37(6):743-745.

[2] YAMAKAWA N,KANEDA K,SAITO Y,et al. The increased expression of integrin $\alpha 6$ (ITGA6) enhances drug resistance in EVI1 leukemia[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30706.

[3] CREWS L A,BALAIAN L,DELOS SANTOS N P, et al. RNA splicing modulation selectively impairs leukemia stem cell maintenance in secondary human AML[J]. Cell Stem Cell,2016,19(5):599-612.

[4] 高莉,杨静.初治急性髓系白血病患者 MDR1 和 BAALC 基因的表达情况及其与预后的关系分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(13):1786-1789.

[5] WANG F,GAO C,LU J,et al. Leukemic survival factor SALL4 contributes to defective DNA damage repair[J]. Oncogene,2016,35(47):6087-6095.

[6] ZHANG X,YUAN X,ZHU W. et al. SALL4: an emerging cancer biomarker and target[J]. Cancer Lett,2015, 357(1):55-62.

[7] 郭野,陈倩,崔巍. RNA 干扰技术抑制急性白血病细胞 THP-1 中 SALL4 基因表达的研究[J].中华检验医学杂志,2010,33(12):1202-1207.

(下转第 2755 页)

相关^[17],而患儿粒细胞减少很有可能是抗 HCMV 药物所导致的骨髓抑制,但这种不良反应通常可以逆转,必要时给予升白细胞等措施能达到良好的治疗效果。上述研究结果提示儿科医生在临床诊疗中对 HCMV 感染要有足够的重视,及时进行检测,及早进行干预。

4 结 论

徐州地区儿童 HCMV 感染率较高,感染高峰集中在 5~12 月龄,需要加强母婴 HCMV 感染的防控工作。婴幼儿感染 HCMV 可引起多系统受累及一系列临床表现,当患儿出现原因尚不明确的上述症状时,及时进行尿液 HCMV-DNA 检测对早期诊断具有重要意义。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会感染学组,全国儿科临床病毒感染协作组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议[J]. 中华儿科杂志,2012,50(4):290-292.
- [2] 饶美兰,郑瑛,张畅斌,等. 孕妇巨细胞病毒感染及其母婴垂直传播[J]. 中国生育健康杂志,2008,19(2):91-94.
- [3] 章虎,陈迎迎,徐志伟. 巨细胞病毒感染患儿听力损害危险因素分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2018,45(1):13-17.
- [4] 唐华. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断技术研究进展[J]. 现代医药卫生,2015,31(3):383-386.
- [5] 翁玉英,倪琛,林秀凤,等. 不同标本巨细胞病毒检测在诊断小儿人巨细胞病毒感染中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2014,27(6):410-414.
- [6] 张丽科,陈倩倩,余学高,等. 血液和尿液中巨细胞病毒 DNA 的检测研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(2):179-181.
- [7] 赵巍松,刘伶,杨飞. 母乳及婴儿血液、尿液人巨细胞病毒 DNA 检测在婴儿 HCMV 感染中的应用[J]. 中国实验诊断学,2013,17(6):1059-1061.

- [8] BATE S L, DOLLARD S C, CANNON M J. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States; the national health and nutrition examination surveys, 1988 — 2004. [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(11):1439-1447.
- [9] FANG F Q, FAN Q S, YANG Z J, et al. Incidence of cytomegalovirus infection in Shanghai, China[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(11):1700-1703.
- [10] 吴美玲,陈洁,钟天鹰,等. 南京市 0~8 岁儿童巨细胞病毒感染流行病学调查[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(4):298-300.
- [11] 王婷,段歌红,陈茂才,等. 人巨细胞病毒在华中地区孕妇和住院儿童群体中的流行病学调查[J]. 微生物与感染, 2015, 10(5):288-293.
- [12] 李春林,蒋雪纷. 伊犁地区汉哈维母婴巨细胞病毒感染的流行病学调查研究[J]. 医药前沿,2012,2(13):33-34.
- [13] 钟瑞芬,黎四平,梁丽云,等. 尿 HCMV-DNA 检测在新生儿疾病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(4):475-477.
- [14] MEIER J, LIENICKE U, TSCHIRCH E, et al. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3):1318-1324.
- [15] BRYANT P, MORLEY C, GARLAND S, et al. Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies; does it matter[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2002, 87(2):F75-F77.
- [16] YASUDA A, KIMURA H, HAYAKAWA M, et al. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay[J]. Pediatrics, 2003, 111(6 Pt 1):1333-1336.
- [17] 姜毅,张小娇. 2017 孕妇及新生儿巨细胞病毒感染预防、诊断和治疗共识解读[J]. 中华新生儿科杂志,2018,33(3):161-164.

(收稿日期:2019-03-20 修回日期:2019-06-02)

(上接第 2751 页)

- [8] MA J C, QIAN J, LIN J, et al. Aberrant hypomethylation of SALL4 gene is associated with intermediate and poor karyotypes in acute myeloid leukemia[J]. Clin Biochem, 2013, 46(4/5):304-307.
- [9] 郭野,崔巍,崔京涛,等. 急性髓细胞白血病中婆罗双树样基因 4 的表达及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(1):25-29.
- [10] MURPHY T, YEE K W L. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. Expert Opin Pharmacother, 2017, 18(16):1765-1780.
- [11] PERL A E. The role of targeted therapy in the management of patients with AML[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2017, 2017(1):54-65.
- [12] ZHANG J, GU Y, CHEN B. Mechanisms of drug resist-

ance in acute myeloid leukemia[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:1937-1945.

- [13] NABISSI M, MORELLI M B, AMANTINI C, et al. Canabidiol stimulates Aml-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner[J]. Int J Cancer, 2015, 137(8):1855-1869.
- [14] CHANG X B. Molecular mechanism of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein 1[J]. Methods Mol Biol, 2010, 596(1):223-249.
- [15] LU J F, POKHAREL D, BEBAWY M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance[J]. Drug Metab Rev, 2015, 47(4):406-419.

(收稿日期:2019-03-30 修回日期:2019-06-12)