

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0015-08

RNA 干扰沉默同源异型基因 A5 逆转 K562/ADM 细胞耐药性的研究 *

高菲, 刘文君

(西南医科大学附属医院 儿科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 研究 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默同源异型基因 A5 (*HOXA5*) 对白血病耐阿霉素细胞株 K562/ADM 细胞耐药性的影响并探讨其机制。**方法** Western blot 检测各组细胞中 *HOXA5*、p38 和 p-p38 的蛋白表达, qRT-PCR 检测 *HOXA5*、p38 的 mRNA 表达; CCK8 检测各组细胞对阿霉素的敏感性变化; 流式细胞术 (FCM) 检测各组细胞的凋亡及周期变化。**结果** K562/ADM 细胞中 *HOXA5* 基因的表达高于 K562 细胞, 且其耐药性是 K562 细胞的 4.94 倍。转染后实验组 K562/ADM 细胞中 *HOXA5* 基因的表达受抑制, 而实验组细胞的 IC_{50} 较对照组降低 2.55 倍。同时, 实验组细胞中 p38 的 mRNA 及 p-p38 的蛋白表达高于对照组。与对照组比较, 实验组的细胞周期 G_0/G_1 期增高, S 期降低。经 ADM (2.5 μ g/ml) 诱导后, 实验组细胞凋亡率高于对照组。**结论** RNAi 沉默 *HOXA5* 能在一定程度上逆转白血病耐药, 其机制可能与 p38MAPK 信号转导通路的激活有关。

关键词: 白血病; *HOXA5*; P38; 逆转耐药

中图分类号: R725.5

文献标识码: A

Effect of RNA silencing targeting *HOXA5* gene on drug resistance of leukemia cell line K562 / ADM*

Fei Gao, Wen-jun Liu

(Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of RNA silencing targeting homeotic genes A5 (*HOXA5*) on drug resistance of leukemia adriamycin-resistant cell strain K562/ADM. **Methods** Cells were divided into siRNA group from which cells received silencing RNA of *HOXA5* and control group from which cells did receive any treatments. Western blot and qRT-PCR were performed to identify expression levels of *HOXA5*, p38 and p-p38. Drug resistance to Adriamycin was measured through CCK8 assay. Apoptosis and cellular cycle status were determined by FCM technology. **Results** Expression of *HOXA5* in K562/ADM cells was up-regulated significantly compared with K562 cells. CCK8 assay, which suggested that dramatic increase of drug resistance to Adriamycin (4.94 fold) was witnessed in K562/ADM in comparison with that in K562 cells. Transfection of siRNA obviously decreased expression of *HOXA5* in K562/ADM cells, thus IC_{50} of Adriamycin was deducted (2.55 fold) compared with that in control group. Both protein and mRNA levels of p-p38 in siRNA group were increased dramatically when compared with control group. Compared with control group, number of cells in G_0/G_1 stage increased and decreased in S stage in siRNA group. Cellular apoptosis rate induced by ADM (2.5 μ g/ml) in siRNA group increased significantly compared with control group. **Conclusions** siRNA silencing of *HOXA5*

收稿日期: 2017-05-26

* 基金项目: 四川省基础研究项目 (No: 14JC0193-LH-35)

[通信作者] 刘文君, E-mail: lwjlyfy@qq.com; Tel: 13980259012

reverses leukemia drug resistance to Adriamycin through activation of p38-MAPK signal pathway.

Keywords: leukemia; *HOXA5*; p38; drug resistance reversing

白血病 (leukemia) 是一类造血干细胞异常的恶性克隆性疾病, 是儿童最常见的恶性肿瘤, 严重危害儿童的健康^[1-2], 其治疗主要是以化疗为主的综合性治疗, 而耐药已成为白血病治疗的一大阻碍。研究发现, 同源盒 (homeobox, *HOX*) 基因的过表达可使细胞分化成熟障碍、造血能力降低, 最终可导致造血系统恶性肿瘤的发生和发展^[3-4]。作为 *HOX* 基因家族中的一员, *HOXA5* 定位于 7 号染色体 (7p15.2), 其表达主要局限在粒-单核细胞系。据报道, *HOXA5* 基因与肿瘤的耐药性有关, 但其作用机制不清^[5]。近年来研究发现信号通路异常与白血病的发生、发展及其多重耐药密切相关, 其中 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号转导通路异常是白血病耐药的重要机制之一^[6-9], 其主要参与细胞的活化、生长及凋亡。研究表明 *HOX* 基因与 p38MAPK 信号转导通路的活化存在相关性^[10]。因此, 我们推测 *HOXA5* 基因可能通过 p38MAPK 通路逆转 K562/ADM 的耐药性。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 介导的序列特异性转录后引起同向靶基因表达沉默, 具有快速、特异、高效等优点^[11]。本实验建立在前期设计并合成 3 条针对 *HOXA5* 的特异性有效 siRNA 序列, 并通过相关检测方法筛选出对 *HOXA5* 表达抑制效率最佳的 1 条 siRNA 序列的基础上^[12-13], 通过 RNAi 技术沉默 *HOXA5*, 探讨 p38MAPK 信号通路在耐药白血病细胞中的作用, 为耐药白血病的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人白血病耐阿霉素细胞株 K562/ADM 细胞 (购自上海信裕生物科技有限公司), 阿霉素 (购自浙江海正药业股份有限公司), RPMI 1640 培养液和胎牛血清 (购自美国 Hyclone 公司), 二甲基亚砜 (DMSO) (购自美国 Sigma 公司), 100 u/ml 青霉素和 0.1 mg/ml 链霉素双抗、总 RNA 提取试剂盒、CCK8 及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (购自碧云天公司), 逆转录试剂盒及实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒

(购自日本 ToYoBo 公司), Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒及细胞周期检测试剂盒 (购自南京凯基生物科技有限公司), 脂质体 Lipofectamine™ 2000 (购自美国 Invitrogen 公司), 靶向 *HOXA5* 的 siRNA 序列、阴性对照 siRNA 序列 (杭州艾迪康公司合成), 兔抗人 *HOXA5* 多克隆抗体一抗 (购自英国 Abcam 公司), 兔抗人 p38MAPK 及 p-p38MAPK 多克隆抗体一抗 (购自美国 CST 公司)。

1.2 细胞培养

将 K562/ADM 细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 0.1 mg/ml 链霉素双抗、1 000 ng/ml 阿霉素完全培养基中并接种在培养瓶, 置于 5% 二氧化碳 CO₂ 的 37℃ 饱和湿度的培养箱中连续培养。每 2 天更换 1 次培养液并传代, 实验前细胞用无 ADM 的完全培养基培养 2 周, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的实验分组及转染 实验先分为 K562 细胞及 K562/ADM 细胞组。然后以本课题组前期实验为基础对 K562/ADM 细胞进行转染后再分为 3 组: 实验组 (pRNAT-GFP-Neo-siHOXA5), 阴性对照组 (pRNAT-GFP-Neo-siNC), 空白对照组 (未作任何处理的 K562/ADM)。本课题组前期设计并合成 3 条针对 *HOXA5* 的特异性有效 siRNA 序列, 并筛选出对 *HOXA5* 抑制率最高的 1 条序列, 正向: 5'-TTGCGGTCGCTATCCAAATGG-3', 反向: 5'-CCATTGGATAGCGACCGCAA-3'^[12-13]。根据此序列合成靶向抑制 *HOXA5* 的特异性真核表达载体 pRNAT-GFP-Neo-siHOXA5, 并设计合成阴性对照载体 pRNAT-GFP-Neo-siNC。转染时调整细胞浓度为 3×10^7 个/ml 接种于 6 孔板内, 按 Lipofectamine™ 2000 说明书将脂质体与表达载体在无血清无抗生素培养基中混合配成转染液转染 K562/ADM 细胞。优化转染条件, 实验独立重复 3 次。收集上述各组细胞进行后续实验。

1.3.2 CCK-8 检测 CCK-8 实验采用的 ADM 的干预浓度依次为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 及 40.00 μ g/ml。分别收集上述各组细胞, 经不同浓度的 ADM 干预后调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 用微量移液器吸取 100 μ l 细胞悬液加入 96 孔板中, 同时设

置对照组和空白调零组,每组设3个复孔,每孔再加10 μ l的CCK-8溶液,放入CO₂培养箱内作用2 h,在450 nm处用酶标仪测量各孔的OD值。求得均值计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率=(OD对照组-OD实验组)/(OD对照组-OD空白组)×100%。IC₅₀=lg-1[Xm-i(∑p-0.5)]。耐药逆转倍数=对照IC₅₀/实验IC₅₀。

1.3.3 qRT-PCR检测各组细胞中HOXA5及P38的mRNA表达 收集上述各组细胞,用总RNA提取试剂盒提取总RNA,逆转录为cDNA,荧光定量PCR法扩增目的基因和内参照基因人GAPDH。HOXA5、p38及GAPDH引物扩增片段长度分别为140、130及262 bp,各引物的序列见表1。荧光定量PCR反应条件:95℃预变性60 s;95℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸45 s,共40个循环。数据运用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析,由此表示目的基因mRNA的相对表达水平。

表1 HOXA5、p38及GAPDH引物序列

基因	引物序列
HOXA5	正向: 5'-TTTTGCGGTCGCTATCC-3'
	反向: 5'-CTGAGATCCATGCCATTGTAG-3'
p38	正向: 5'-GCCCCAGTAGTCAGAAGCAG-3'
	反向: 5'-TGAAGAGAGCAGCACAAGCA-3'
GAPDH	正向: 5'-ATGCTGGCGCTGACTACCTC-3'
	反向: 5'-GGTCATGACTCCTTCCACGATA-3'

1.3.4 Western blot检测各组细胞中HOXA5、p38及p-p38的蛋白表达 分别收集上述各组细胞,按照全蛋白提取试剂盒说明书提取细胞全蛋白。BCA法测蛋白浓度,根据蛋白浓度取等量蛋白,加5×SDS上样缓冲液煮沸5 min,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2 h,经TBST充分漂洗(5 min,3次),HOXA5、p38及p-p38多克隆抗体均按1:1000稀释。4℃孵育过夜,充分漂洗后加山羊抗兔二抗按照1:3000稀释,室温27℃孵育1 h,ECL发光显影。通过Gel-Pro analyzer软件分析图像,以HOXA5、p38及p-p38蛋白条带的灰度值与β-actin蛋白条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.3.5 Annexin V-PE/7-AAD细胞凋亡检测 取对数生长期的K562/ADM,转染24 h后,每组再分为ADM未干预组及加浓度为2.5 μ g/ml的ADM干预组。用

冷PBS将上述细胞组的细胞洗2次,调整细胞密度为 3×10^5 个/ml将细胞重悬于50 μ l的Binding Buffer,并加入5 μ l 7-AAD,室温27℃,避光染色5~15 min,然后分别加入450 μ l Binding Buffer混匀,再加入1 μ l Annexin V-PE,室温27℃,避光染色5~15 min,在1 h内上流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验独立重复3次。

1.3.6 细胞周期的检测 取对数生长期的K562/ADM,转染24 h后用冷PBS将上述细胞组的细胞洗2次,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,取1 ml的单细胞悬液去除上清液,用70%的冷乙醇500 μ l悬浮细胞4℃放置2 h或至过夜对细胞进行固定,PBS洗涤去乙醇。加入RNAase 100 μ l 37℃水浴30 min。采用流式细胞仪进行DNA含量测定,结果用Multicycle software进行分析。实验独立重复3次。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用方差分析,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 荧光显微镜观察转染的各组细胞

用脂质体转染K562/ADM细胞24 h后,在荧光显微镜下观察各组细胞,因为转入的重组质粒载体pRNA-GFP-Neo-siHOXA5和pRNAT-GFP-Neo-siNC带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因,因此实验组和阴性对照组在荧光显微镜观察下出现绿色荧光,而空白对照组未见荧光。见图1。

2.2 ADM对各组细胞的抑制作用

ADM对各组细胞均有抑制作用,各组细胞的IC₅₀比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 98.325, P = 0.000$),实验组细胞的IC₅₀与对照组比较降低($P < 0.05$)。见表2。

2.3 细胞中HOXA5、p38的mRNA表达情况

K562/ADM细胞中HOXA5的mRNA表达高于K562细胞($P < 0.05$)。重组质粒转染对数生长期的K562/ADM细胞后,比较各组细胞中HOXA5 mRNA的表达量,经方差分析,差异有统计学意义($F = 122.282$ 和 172.900 ,均 $P = 0.000$),重组质粒能抑制K562/ADM细胞中HOXA5的mRNA表达($P < 0.05$),同时p38的mRNA表达经方差分析,差异有统计学意义

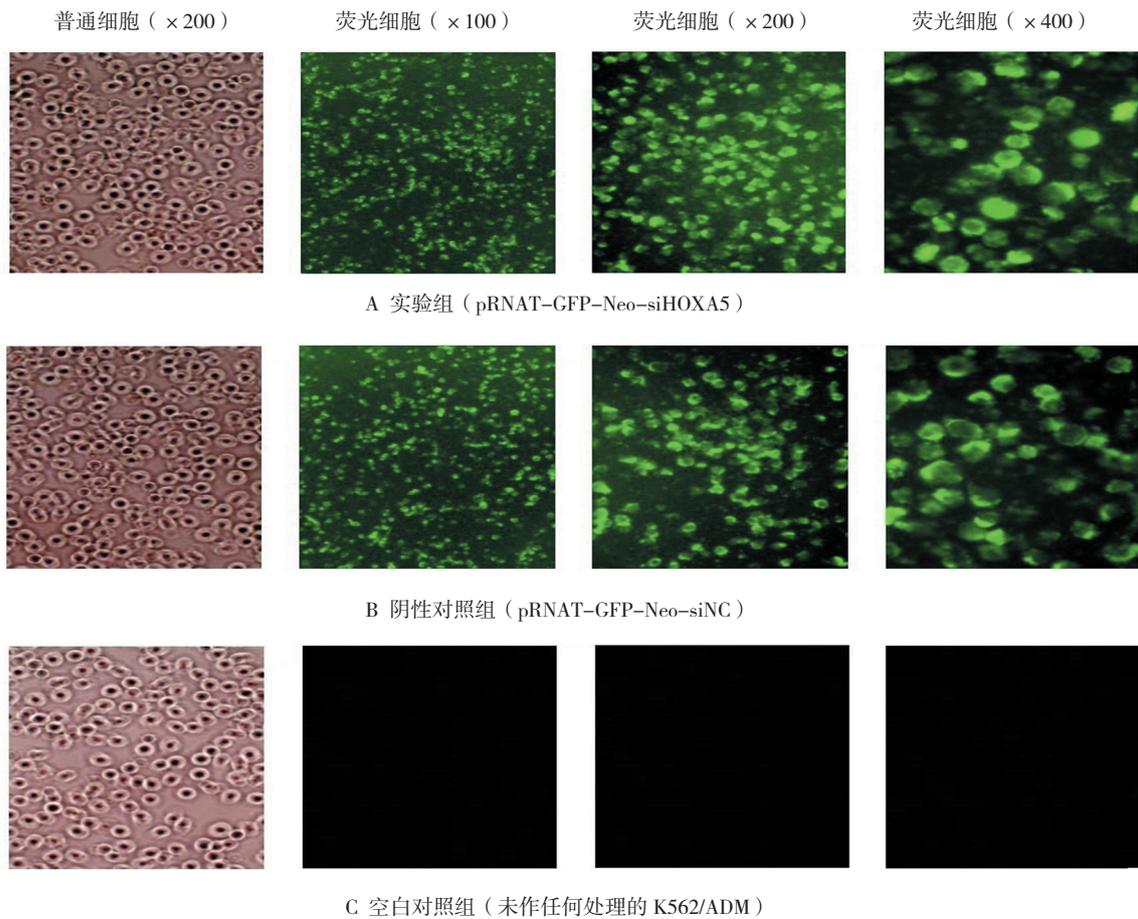


图 1 普通倒置相差显微镜及荧光显微镜下转染的各组 K562/ADM 细胞

表 2 ADM 作用下各组细胞 IC₅₀ 的变化

组别	IC ₅₀ / (μg/ml, $\bar{x} \pm s$)	耐药逆转倍数
实验组	7.41 ± 0.77 ^{1) 2)}	2.55
阴性对照组	18.67 ± 1.79	1.01
空白对照组	18.92 ± 1.84	1.00
K562	3.83 ± 0.35	4.94
F 值	98.325	-
P 值	0.000	-

注: 1) 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与空白对照组比较, $P < 0.05$

($F = 152.817$ 和 34.227 , 均 $P = 0.001$), 结果显示, 实验组与对照组比较 p38 的 mRNA 表达增高 ($P < 0.05$), 而阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3、4 和图 2。

2.4 各组细胞中 HOXA5、p38 及 p-p38 的表达情况

Western blot 检测发现, K562 细胞中 HOXA5 蛋白的相对表达量低于 K562/ADM 细胞 ($P < 0.05$)。稳

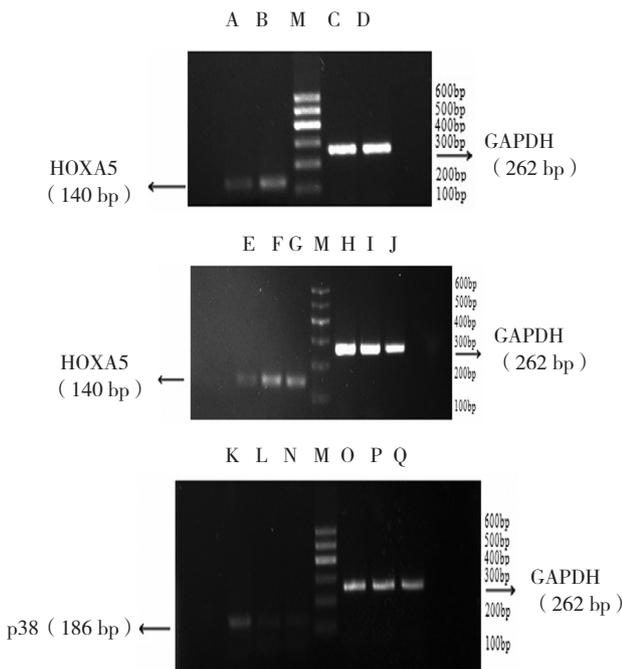
定转染后比较各组中 HOXA5 蛋白及 p-p38 的表达, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 1722.480$ 和 115.433 , 均 $P = 0.000$), 实验组中 HOXA5 蛋白被抑制 ($P < 0.05$)。实验组中 p-p38 的蛋白相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$)。而阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, siRNA 能特异性沉默 K562/ADM 中的 HOXA5 基因, 并使 p38 激活为 p-p38, 但对 p38 的蛋白表达量差异无统计学意义 ($F = 4.153$, $P = 0.074$)。见表 5 和图 3。

表 3 HOXA5 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HOXA5 mRNA (目的基因 / 内参照基因)	相对表达量 (RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$)
实验组	0.31 ± 0.12	0.22 ± 0.09
阴性对照组	1.35 ± 0.10	0.99 ± 0.04
空白对照组	1.37 ± 0.06	1.00
K562	0.58 ± 0.11	0.42 ± 0.11
F 值	122.282	172.900
P 值	0.000	0.000

表 4 p38 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	P38 mRNA (目的基因 / 内参照基因)	相对表达量 (RQ=2 ^{-ΔΔCt})
实验组	1.17 ± 0.07	3.26 ± 0.59
阴性对照组	0.38 ± 0.06	1.06 ± 0.29
空白对照组	0.37 ± 0.05	1.00
F 值	152.817	34.227
P 值	0.000	0.001



A、C: K562 细胞; B、D: K562/ADM; E、H、K、O: 实验组 (pRNAT-GFP-Neo-siHOXA5) F、I、L、P: 阴性对照组 (pRNAT-GFP-Neo-siNC); G、J、N、Q: 空白对照组 (未作任何处理的 K562/ADM)

图 2 HOXA5、p38 及 GAPDH 的扩增产物

2.5 siRNA 特异性沉默 HOXA5 后 K562/ADM 细胞的凋亡情况

比较 ADM 未干预及 ADM 干预中各组细胞的凋亡, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=17.606$ 和 423.492 , $P=0.003$ 和 0.000)。ADM 未干预及干预中实验组的凋亡率与对照组相比增高 ($P < 0.05$); ADM 干预中各组细胞的凋亡率高于 ADM 未干预 ($P < 0.05$), 而 ADM 干预与 ADM 未干预中阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 6 和图 4。

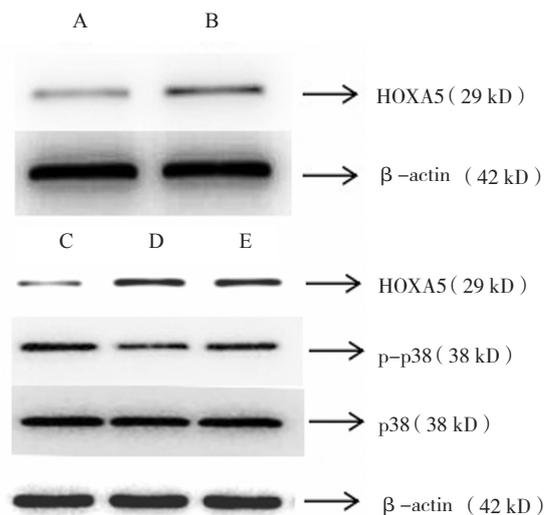
2.6 siRNA 特异性沉默 HOXA5 后 K562/ADM 细胞的周期变化

各组细胞的 G₀/G₁ 期和 S 期比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=115.783$ 和 70.549 , 均

$P=0.000$)。与对照组比较, 实验组 G₀/G₁ 期升高 ($P < 0.05$), 而 S 期降低 ($P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组转染细胞的 G₂/M 期差异无统计学意义 ($F=0.568$, $P=0.594$)。见表 7 和图 5。

表 5 HOXA5、p38、p-p38 的蛋白表达 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	HOXA5	p38	p-p38
实验组	0.15 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.75 ± 0.02
阴性对照组	0.65 ± 0.14	0.58 ± 0.00	0.56 ± 0.02
空白对照组	0.64 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.57 ± 0.03
K562	0.18 ± 0.05	-	-
F 值	1722.480	4.153	115.433
P 值	0.000	0.074	0.000

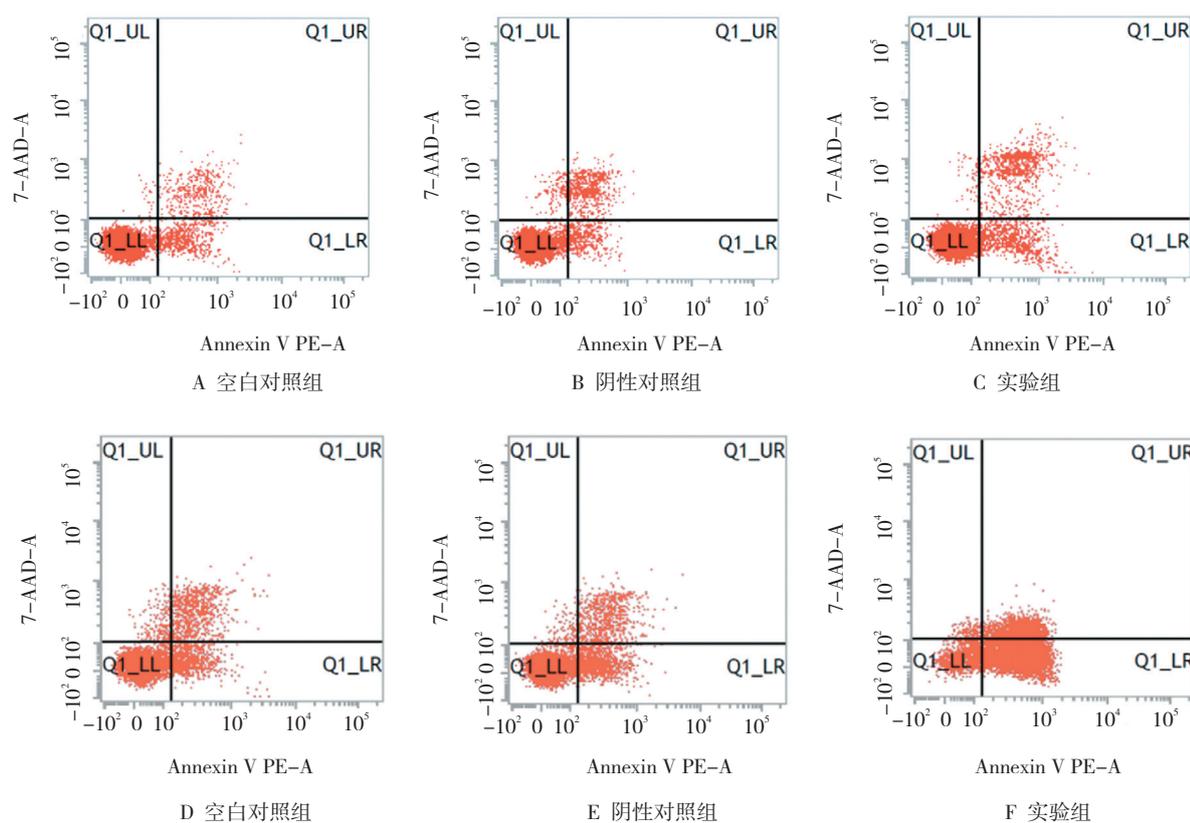


A: K562 细胞; B: K562/ADM 细胞; C: 实验组 (pRNAT-GFP-Neo-siHOXA5); D: 阴性对照组 (pRNAT-GFP-Neo-siNC); E: 空白对照组 (未作任何处理的 K562/ADM)

图 3 各组细胞中 HOXA5、p38 及 p-p38 的蛋白表达 (Western blot)

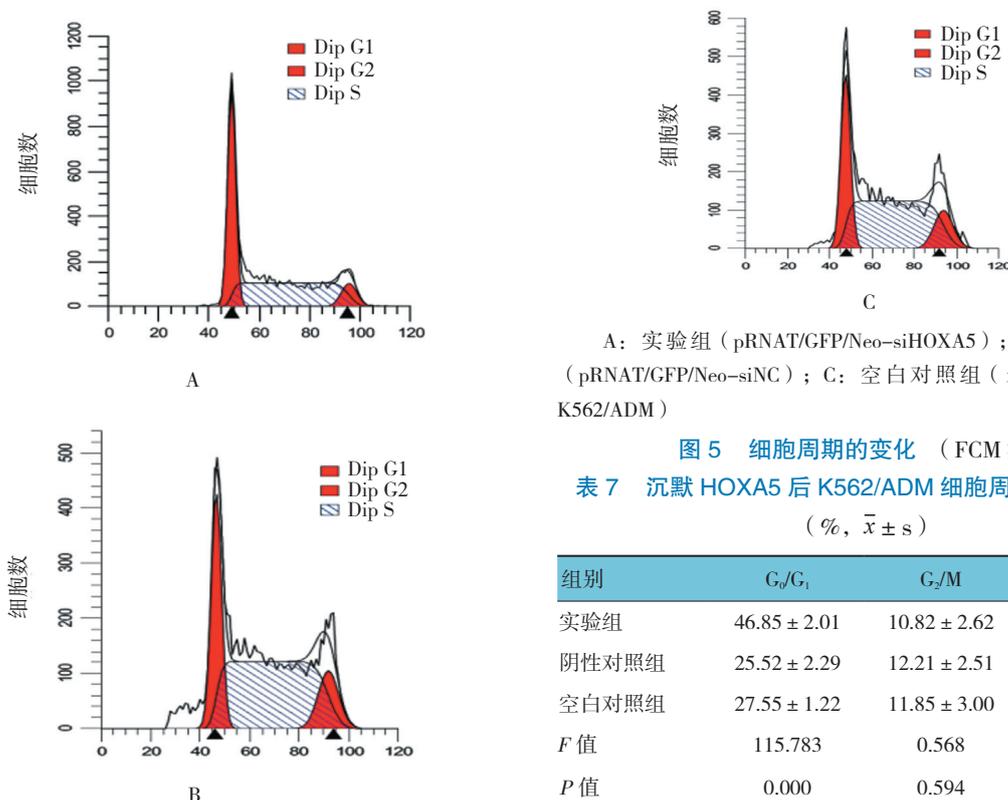
表 6 ADM 干预下各组细胞的凋亡率 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	ADM 未干预	ADM 干预
实验组	19.73 ± 2.22	65.92 ± 2.23
阴性对照组	11.74 ± 1.45	24.81 ± 1.87
空白对照组	10.23 ± 2.50	23.75 ± 1.95
F 值	17.606	423.492
P 值	0.003	0.000



UL: 坏死细胞; UR: 凋亡晚期细胞群; LL: 正常细胞群; LR: 凋亡早期细胞; 以 UR、LR 象限细胞数之和与总细胞数之比计算凋亡率。A、B、C: 转染 24 h 后的 K562/ADM 细胞的凋亡情况; D、E、F: 转染 24 h 后在浓度为 2.5 μ g/ml ADM 干预下 K562/ADM 细胞的凋亡情况

图 4 细胞的凋亡情况 (FCM 法)



A: 实验组 (pRNAT/GFP/Neo-siHOXA5); B: 阴性对照组 (pRNAT/GFP/Neo-siNC); C: 空白对照组 (未作任何处理的 K562/ADM)

图 5 细胞周期的变化 (FCM 法)

表 7 沉默 HOXA5 后 K562/ADM 细胞周期的分布情况 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
实验组	46.85 \pm 2.01	10.82 \pm 2.62	42.93 \pm 1.68
阴性对照组	25.52 \pm 2.29	12.21 \pm 2.51	62.60 \pm 2.26
空白对照组	27.55 \pm 1.22	11.85 \pm 3.00	60.26 \pm 2.59
F 值	115.783	0.568	70.549
P 值	0.000	0.594	0.000

3 讨论

哺乳动物的 *HOX* 基因在结构上分为 A、B、C、D 4 个簇, 依次定位于 7、17、12 及 2 号染色体上, 其按照线性顺序进行表达并参与造血细胞的发育调控^[14]。据报道, *HOX* 基因在许多髓系白血病样品中高表达, 但是其表达的模式和相关监管机制并不清楚^[15]。在 MLL 患者中能检测到上调的 *HOXA* 基因, *HOXA* 异常表达是造血细胞正常分化的一大障碍^[16]。而 *HOXA5* 基因作为 *HOXA* 族中的一员, 对白血病的发生、发展同样具有重要影响。FULLER 等^[17]发现, 过度表达 *HOXA5* 的 K562 细胞株红细胞分化被抑制, 抑制 *HOXA5* 表达有助于增高红细胞祖细胞的分化及成熟。本实验结果显示, *HOXA5* 基因在 K562 及 K562/ADM 细胞中高表达, 且其在 K562/ADM 中的表达高于 K562 细胞, 进一步证明 *HOXA5* 的过表达与白血病的发生、发展密切相关。

儿童慢性髓系白血病的 5 年生存率 (5-year event-free survival, EFS) 为 44%^[18], 复发和耐药是影响其生存率的重要原因, 因此, 进一步研究髓系白血病的耐药机制具有重要意义^[19]。有研究表明, 运用 RNAi 技术抑制 *HOXA7* 基因的表达在一定程度上可逆转白血病细胞 U937 的多重耐药^[20]。据报道, 通过降低和提高细胞中 *HOXA5* 的表达, 观察肺癌细胞对小细胞肺癌 (SCLC) 常用化疗药物敏感性的变化发现 *HOXA5* 可能参与 SCLC 耐药性的产生^[5]。而本实验结果显示 K562/ADM 细胞中 *HOXA5* 的表达增高, RNAi 特异性沉默 K562/ADM 细胞中的 *HOXA5* 基因后, 实验组细胞对 ADM 的 IC_{50} 较对照组的 IC_{50} 降低 2.55 倍。结果提示, *HOXA5* 基因与白血病细胞的耐药性相关, 沉默 *HOXA5* 基因能在一定程度上逆转白血病细胞的耐药性, 与上述报道^[20, 5]的研究结果相似。

CUI 等^[10]应用 TGF- β_2 抑制性抗体及 p38 抑制剂等干预胰腺癌细胞后发现下调 *HOXA10* 能降低 TGF- β_2 及 MMP-3 的表达并抑制 p38 的活化, 表明 *HOX* 基因与 p38 的活化相关。本实验中有效沉默 K562/ADM 细胞中的 *HOXA5* 基因后, 经检测后发现实验组细胞中的 p38 mRNA 及 p-p38 蛋白表达增高。结果提示, 沉默 *HOXA5* 能增强 p38mRNA 的表达, 并能激活 p38 使其磷酸化为 p-p38, 与 CUI 等^[10]的研究结果相似。

结果显示 ADM 未干预及 ADM 干预中, 实验组细胞的凋亡率较对照组增高; 并且 ADM 干预组中各组

细胞的凋亡率高于 ADM 未干预组。在细胞周期检测中, 实验组与对照组比较 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 期细胞比例相应降低, 说明抑制 *HOXA5* 的表达能减缓 G_0/G_1 期细胞进入增殖周期, 减少细胞分裂增殖。以上结果提示沉默 *HOXA5* 基因后, 能在一定程度上能增强细胞对 ADM 的敏感性, 阻滞细胞的 G_0/G_1 期, 减少细胞分裂增殖, 从而促进细胞的凋亡。

综上所述, *HOXA5* 与 K562/ADM 细胞的耐药性密切相关。沉默 *HOXA5* 在一定程度上能逆转白血病的多重耐药, 其机制可能是通过增强 p38 的 mRNA 表达并使其激活为 p-p38。RNAi 技术沉默 *HOXA5* 基因后, 激活 p38MAPK 信号转导通路逆转 K562/ADM 细胞的耐药性可能成为耐药白血病治疗的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] MAGNO G D, SILVA N L, FELIZ P V, et al. Avascular necrosis of the jaws as initial presentation of acute leukemia[J]. Quintessence International, 2016, 47(9): 791-796.
- [2] XU Q, LIU W J. Platelet changes in acute leukemia[J]. Cell Biochemistry and Biophysic, 2013, 67(3): 1473-1479.
- [3] LIU W J, ZHANG T, GUO Q L, et al. Effect of ATRA on the expression of *HOXA5* gene in K562 cells and its relationship with cell cycle and apoptosis[J]. MOL MED REP, 2016, 13: 4221-4228.
- [4] FOURNIER M, RONDEAU I S, LAROCHELLE F, et al. Inability of *HOXB4* to enhance self-renewal of malignant B cells: favourable profile for the expansion of autologous hematopoietic stem cells[J]. Experimental Hematology, 2014, 42(7): 526-535.
- [5] 肖法嫒, 陈珍珠, 曾香萍, 等. 同源型盒基因 *HOXA5* 对小细胞肺癌细胞多药耐药性的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(11): 1665-1668.
- [6] WESAM A, RICHARD V E. Signal transduction in the chronic leukemias: Implications for targeted therapies[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2013, 8(1): 71-80.
- [7] IGEA A, NEBREDA A R. The stress kinase p38 α as a target for cancer therapy[J]. Cancer Research, 2015, 75(19): 3997-4002.
- [8] KIM S H, BARK H, CHOI C H. Mercury induces multidrug resistance-associated protein gene through p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Toxicology Letters, 2004, 155(1): 143-150.
- [9] BARANČIK M, BOHÁCOVÁ V, KVACKAJOVÁ J, et al. SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 14(1): 29-36.
- [10] CUI X P, QIN C K, ZHANG Z H, et al. *HOXA10* promotes cell invasion and MMP-3 expression via TGF β 2-mediated activation of the p38 MAPK pathway in pancreatic cancer cells[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2014, 59: 1442-1451.
- [11] OLIVIERI D, SYKORA M M, SACHIDANANDAM R, et al. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular

- requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*[J]. *Embo Journal*, 2010, 29(19): 3301-3317.
- [12] HUANG H P, LIU W J, GUO Q L, et al. Effect of silencing HOXA5 gene using RNA interference on cell cycle and apoptosis in Jurkat cells[J]. *INT J MOL MED*, 2016, 37(3): 669-678.
- [13] YANG Y, LIU W J, HUANG H P, et al. The influence of HOXA5-specific siRNA on the expression of Livin and Smac proteins[J]. *EUR REV MED PHARMACO*, 2016(20): 3101-3111.
- [14] ALHARBI R A, PETTENGE L R, PANDHA H S, et al. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia[J]. *Leukemia*, 2013, 27(5): 1000-1008.
- [15] SPENCER D H, YOUNG M A, LAMPRECHT T L, et al. Epigenomic analysis of the HOX gene loci reveals mechanisms that may control canonical expression patterns in AML and normal hematopoietic cells[J]. *Leukemia*, 2015, 29(6): 1279-1289.
- [16] ALESSA K, DENISE L, ROLF M. The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t (4; 11) - specific cancer mechanism[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35341-35352.
- [17] FULLER J F, MCADARA J, YARON Y, et al. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation[J]. *Blood*, 1999, 93(10): 3391-3400.
- [18] GATTA G, LUKSCH R, COLEMAN M P, et al. Survival from acute non- lymphocytic leukaemia (ANLL) and chronic myeloid leukaemia (CML) in European children since 1978: a population-based study[J]. *European Journal of Cancer*, 2001, 37(6): 695-702.
- [19] SUMITOMO Y, KOYA J, NAKAZAKI K, et al. Cytoprotective autophagy maintains leukemia- initiating cells in murine myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2016, 128(12): 1614-1624.
- [20] 尹宝慧, 贾秀红, 李建厂. RNA 干扰抑制 HOXA7 表达能逆转白血病 U937 细胞多药耐药 [J]. *肿瘤*, 2013, 33(7): 155-160.

(王荣兵 编辑)