

文章编号:1000-5404(2013)17-1797-04

论著

MLL 在 HOXA10 表达调控中作用的实验研究

姚 婕,方立超,郑峻松 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床检验学教研室)

[摘要] **目的** 通过研究在急性髓性白血病细胞中 HOXA10 表达调控机制,探讨 HOXA10 调控作为 AML 防治新靶点的可能性。**方法** 以不同剂量雌二醇(E_2)在不同时间点刺激急性粒细胞白血病细胞株(HL-60),以不刺激的 HL-60 细胞作参照应用 RT-PCR 检测 HOXA10 基因表达活性的差异明确 E_2 对 HOXA10 表达的活化作用,并在 E_2 刺激下以反义寡核苷酸转染技术分别敲除 ER α 、ER β 和 MLLs(MLL1-4)后再检测 HOXA10 mRNA 和蛋白表达的变化确定哪一种雌激素受体的活化与 HOXA10 的表达相关,哪一种 MLL 对 HOXA10 表达有调控作用。以 ChIP 实验检测 MLL 和 HOXA10 的相互作用,再以 Western blot 检测 E_2 刺激前后组蛋白 H3K4 甲基化状态以明确 MLL 是否通过表观遗传学途径调控 HOXA10 的表达。**结果** 在 E_2 50 nmol/L 6 h 刺激下 HOXA10 表达明显升高,ER α 和 ER β 反义寡核苷酸转染后 HOXA10 表达均有下降,MLL1 表达沉默时 HOXA10 表达明显降低($P < 0.05$),MLL1 可以结合到 HOXA10 启动子上的 ERE 区域而组蛋白 H3K4 甲基化状态在 E_2 刺激后明显高于刺激前($P < 0.05$)。**结论** 急性髓性白血病细胞的 HOXA10 基因表达受 MLL1 蛋白调控,可能为急性髓性白血病的致病机制分析提供了一个新的方向,MLL1 介导的 HOXA10 表达的改变有可能成为急性髓性白血病的防治新靶点。

[关键词] HOXA10; 混合系白血病基因; 雌激素受体; 急性髓性白血病

[中图分类号] R363.21; R394.3; R733.71

[文献标志码] A

Mixed lineage leukemia plays a critical role in estrogen-mediated regulation of HOXA10 in acute myelocytic leukemia cells

Yao Jie, Fang Lichao, Zheng Junsong (Department of Clinical Laboratory Medicine, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Chongqing, 40038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of HOXA10 in acute myelocytic leukemia cells, and to find the regulating mechanism of HOXA10 expression in acute myelocytic leukemia cells. **Methods** RT-PCR and Western blotting were applied to detect HOXA10 mRNA and protein expression in acute myelocytic leukemia HL-60 cells with knockdown of ER α , ER β and mix lineage leukemia (MLLs) (MLL1-4), respectively, and with or without treatment of estradiol (E_2). ChIP was used to check the interaction between MLL and HOXA10, and Western blotting was used to check the methylation status of histone H3K4. **Results** E_2 could elevate HOXA10 expression through activation of ER α and ER β . HOXA10 expression could be down-regulated by MLL1 knockdown. MLL1 could bind to the ERE region on HOXA10 promoter sequence. **Conclusion** This study may provide a new direction to study the pathogenic mechanism of acute myelocytic leukemia, and indicates that MLL1 can be a potential target for prevention and treatment of leukemia.

[Key words] HOXA10; mix lineage leukemia; estrogen receptor; acute myelocytic leukemia

Supported by the National Nature Scientific Foundation of China (81000225); Corresponding author: Zheng Junsong, Tel: 86-23-68752310, E-mail: zhengalpha@yahoo.com

急性白血病是严重危害人类健康的造血系统恶性肿瘤,占全国各年龄段恶性肿瘤死亡率的第6位,占儿童和35岁以下人群恶性肿瘤死亡率的第1位。研究^[1-3]结果表明:同源盒基因 HOXA10 基因在造血发育过程中具有双重调节作用,HOXA10 基因过表达阻

止髓细胞的分化最终导致急性髓细胞白血病,其下调有助于髓细胞进一步分化,允许细胞进入成熟过程。MLLs(mixed lineage leukemia)蛋白可通过结合到 HOX 基因启动子区域定向调控 HOX 基因的表达因其具有 H3-K4 甲基转移酶的功能^[3]。HOXA10 启动子区域包含几个雌激素反应元件(ERE),并且 ERE 在 HOXA10 启动子区域的位置靠近转录起始位点,提示 HOXA10 的表达与 E_2 依赖的雌激素受体的活化相关^[4]。但 MLL 对 HOXA10 基因的表达调控机制及 ER 在 MLL

[基金项目] 国家自然科学基金(81000225)

[通信作者] 郑峻松,电话:(023)68752310,E-mail: zhengalpha@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130428.0819.007.html>(2013-04-28)

调控 HOXA10 表达中的作用尚不清楚。为了探讨急性髓性白血病的发病机制,我们以髓性白血病细胞 HL-60 为样本,探讨了 HOXA10 在髓性白血病中的表达调控机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与 E₂ 处理白血病细胞株

HL-60 和 THP-1 (ATCC 公司产品) 细胞培养方法见文献 [12], 用 50 nmol/L 和 100 nmol/L 的雌二醇 E₂ (Sigma 公司产品) 分别刺激细胞, 并在 0、4、6、8、12 h 和 24 h 的时间点收获细胞。

1.2 RNA 的提取和 RT-PCR 检测

RNA 提取方法见文献 [5], 引物序列见表 1。

表 1 HOXA10 各 PCR 反应引物及反义寡核苷酸序列

引物	序列 (5'→3')
RT-HOXA10-F	CCCTACACGAAGCACCAGACACT
RT-HOXA10-R	GCGTCGCCTGGAGATTCATC
β-actin-F	AAGGCCAACCGCGAGAAGAT
β-actin-R	TGGGTGAGGATCTTCATGAG
MLL1 antisense	TGCCAGTCGTTCTCTCCAC
MLL2 antisense	ACTCTGCCACTTCCCGCTCA
MLL3 antisense	CCATCTGTCTCTCCACTCCC
MLL4 antisense	CCTTCTTCTCCCTCCTTGT
ERα antisense	CATGTCATGCTCAG
ERβ antisense	GAATGTCATAGCTGA
Scramble antisense	CGTTTGTCCCTCCAGCATCT

1.3 反义寡核苷酸转染

严格按照 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 试剂说明书进行转染, 于转染前 1 d 用无抗生素的含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞密度为 1 × 10⁶/mL, 接种于 12 孔板, 1 000 μL/孔。转染当天换为 500 μL 无抗生素无血清 RPMI1640。取荧光标记的寡核苷酸链 1.0 μg 加到 50 μL 的 RPMI1640 中, 混匀。再取 Lipofectamine™ 2000 2 μL, 加到 50 μL 的 RPMI1640 中混匀。室温放置 5 min 后, 将分别混有寡核苷酸链和 Lipofectamine™ 2000 的 RPMI1640 混合, 室温放置 20 min, 寡核苷酸链与脂质体比值为 1.0 μg: 2 μL。将上述混合物加入 12 孔板中, 轻轻混匀, 培养 6 h 后, 将培养基换为 500 μL 含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640, 继续培养至 24 h, 继续培养 24 h 后收获细胞。

1.4 Western blot

细胞经各因素处理后, 收集细胞, 加入蛋白裂解液 RIPA 90 μL/孔, 冰上静置 30 min 后, 4 e 12 000 r/min 离心 30 min 取上清液。总蛋白浓度用 BCA 法进行测定。每个样本取 60 μg 蛋白在 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 电泳结束后转 PVDF 膜, 分别与 HOXA10 抗体 (1 B200)、GAPDH 抗体 (1 B2000) 孵育, 然后与相应二抗孵育, 最后应用化学发光试剂检测各蛋白的含量。

1.5 染色体免疫共沉淀

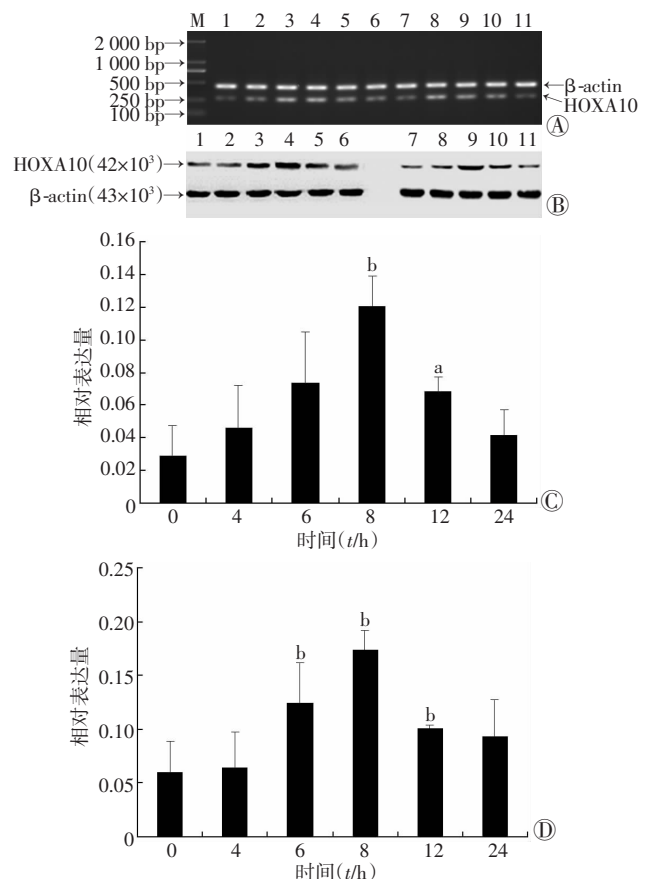
严格按照 Thermo 公司 ChIP 试剂盒说明书进行操作: 第一步: 用甲醛在体内将 DNA 结合蛋白与 DNA 交联。第二步: 分离染色体 (质), 剪切后的 DNA 小片段与结合蛋白结合。第三步: 用特异性抗体与 DNA 结合蛋白结合, 用沉淀法分离复合

体。反向交联操作释放出 DNA, 并消化蛋白质。以得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

2 结果

2.1 白血病细胞株在不同浓度不同时间点 E₂ 刺激后 HOXA10 mRNA 和蛋白表达分析

以 RT-PCR 和 Western blot 检测 HL-60 在 E₂ 刺激后不同时间点检测 HOXA10 的 mRNA 表达活性的变化。在 50 nmol/L E₂ 6 h 和 8 h 刺激下, HOXA10 的表达和对照组比较明显升高, 同样在 100 nmol/L E₂ 6 h 和 8 h 刺激下 HOXA10 的表达也有明显提高 (图 1)。



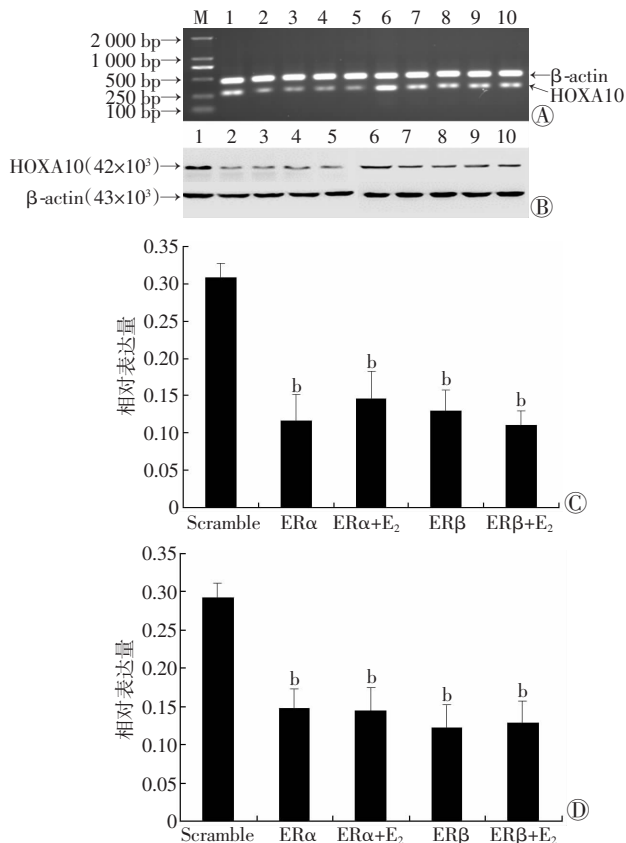
A: RT-PCR 结果; B: Western blot 结果; C: RT-PCR 表达量; D: Western blot 表达量 M: DL 2000 标准; 1~11: 分别代表 HL-60 无刺激质控, 50 nmol/L E₂ 刺激 4 h, 50 nmol/L E₂ 刺激 6 h, 50 nmol/L E₂ 刺激 8 h, 50 nmol/L E₂ 刺激 12 h, 50 nmol/L E₂ 刺激 24 h, 100 nmol/L E₂ 刺激 4 h, 100 nmol/L E₂ 刺激 6 h, 100 nmol/L E₂ 刺激 8 h, 100 nmol/L E₂ 刺激 12 h, 100 nmol/L E₂ 刺激 24 h a: P < 0.01, b: P < 0.05, 与 0 h 比较

图 1 RT-PCR 与 Western blot 检测 HL-60 在 E₂ 刺激后不同时间点 HOXA10 mRNA 和蛋白的表达

2.2 反义寡核苷酸转染技术敲除 HL-60 和 THP-1 细胞株的 ERα 和 ERβ 后 HOXA10 mRNA 和蛋白表达分析

以 RT-PCR 和 Western blot 检测 HL-60 和 THP-1 以反义寡核苷酸转染技术敲除激活后的 ERα 和 ERβ 后检测 HOXA10 的

mRNA 表达活性的变化。从图 2 可以看出雌激素受体 ER α 和 ER β 的活化都具有促进 HOXA10 表达的作用 (图 2)。



A: RT-PCR 结果; B: Western blot 结果; C: RT-PCR 表达量; D: Western blot 表达量 M: DL 2000 标准; 1~10: 分别代表 HL-60 细胞 Scramble antisense 转染阴性对照, HL-60 + ER α , HL-60 + ER α + E₂, HL-60 + ER β , HL-60 + ER β + E₂, THP-1 细胞 Scramble antisense 转染阴性对照, THP-1 + ER α , THP-1 + ER α + E₂, THP-1 + ER β , THP-1 + ER β + E₂ a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与 Scramble 比较

图 2 RT-PCR 与 Western blot 检测 E₂ 刺激敲除 ER α 和 ER β 对 HOXA10 mRNA 和蛋白的表达

2.3 反义寡核苷酸转染技术敲除 HL-60 和 THP-1 细胞株的 MLL1、MLL2、MLL3 和 MLL4 后 HOXA10 mRNA 和蛋白表达分析

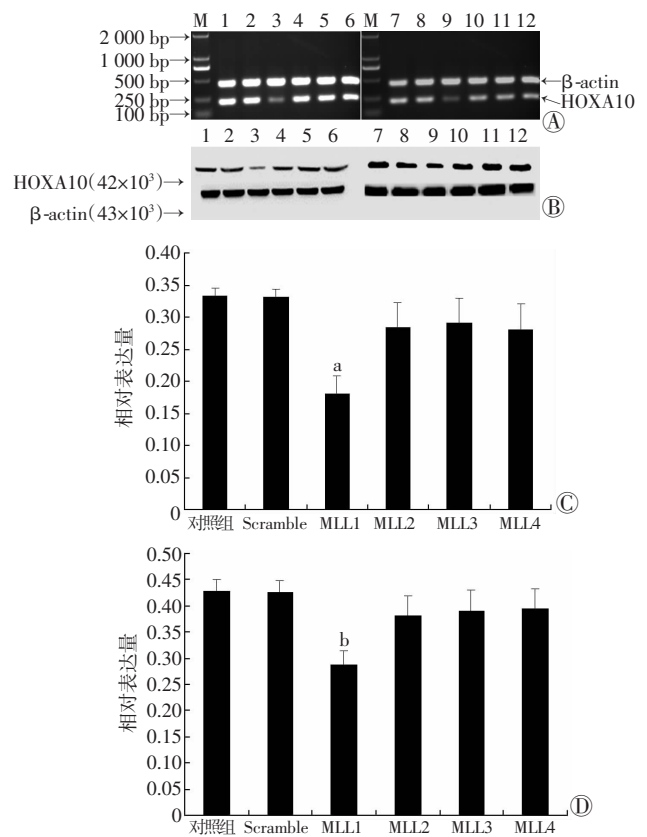
以 RT-PCR 和 Western blot 检测 HL-60 和 THP-1 分别敲除 MLL1、MLL2、MLL3 和 MLL4 后检测 HOXA10 的 mRNA 表达活性的变化。从图 3 可以看出 MLL1 都对 HOXA10 的表达有调节作用。

2.4 H3K4 组蛋白甲基化分析

Western blot 检测 HL-60、THP-1 用 E₂ 刺激前后组蛋白甲基化状态, 可以看出刺激后 H3K4 组蛋白甲基化程度明显高于无刺激组 (图 4)。

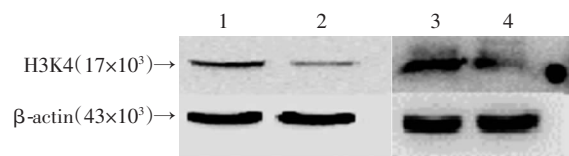
2.5 E₂ 刺激前后 MLL 蛋白与 HOXA10 启动子的相互作用

以 ChIP 检测 HL-60、THP-1 用 E₂ 处理前后 MLL 蛋白与 HOXA10 启动子上 ERE 元件的结合, 急性髓性白血病细胞株 HL-60、THP-1 用 E₂ 处理后 MLL 蛋白与 HOXA10 启动子上 ERE 元件的结合明显高于无刺激对照组 (图 5)。



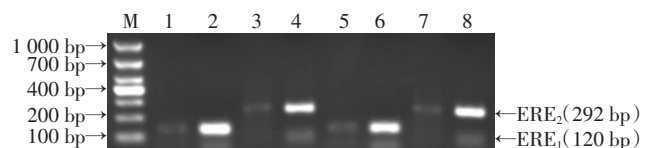
A: RT-PCR 结果; B: Western blot 结果; C: RT-PCR 表达量; D: Western blot 表达量 M: DL 2000 标准; 1~12: 分别代表 HL-60 细胞无转染阴性对照, HL-60 细胞转染 scramble, HL-60 + MLL1, HL-60 + MLL2, HL-60 + MLL3, HL-60 + MLL4, THP-1 细胞无转染阴性对照, THP-1 细胞转染 scramble, THP-1 + MLL1, THP-1 + MLL2, THP-1 + MLL3, THP-1 + MLL4 a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 3 RT-PCR 与 Western blot 检测敲除 MLL1~MLL4 后 HOXA10 mRNA 和蛋白的表达



1~4: 代表 HL-60 细胞 + E₂ 组蛋白 H3K4 甲基化表达, HL-60 细胞无 E₂ 刺激组蛋白 H3K4 甲基化表达, THP-1 细胞 + E₂ 组蛋白 H3K4 甲基化表达, THP-1 细胞无 E₂ 刺激组蛋白 H3K4 甲基化表达

图 4 Western blot 检测 E₂ 刺激对组蛋白 H3K4 甲基化状态的影响



M: DL 1000 标准; 1~8: 代表 E₂ 处理前 THP-1 细胞 MLL1 和 ERE₁ 的结合, E₂ 处理后 THP-1 细胞 MLL1 和 ERE₁ 的结合, E₂ 处理前 THP-1 细胞 MLL1 和 ERE₂ 的结合, E₂ 处理后 THP-1 细胞 MLL1 和 ERE₂ 的结合, E₂ 处理前 HL-60 细胞 MLL1 和 ERE₁ 的结合, E₂ 处理后 HL-60 细胞 MLL1 和 ERE₁ 的结合, E₂ 处理前 HL-60 细胞 MLL1 和 ERE₂ 的结合, E₂ 处理后 HL-60 细胞 MLL1 和 ERE₂ 的结合

图 5 MLL 和 HOXA10 启动子序列相互作用分析

3 讨论

同源盒基因“HOX 基因”家族是一类在进化过程中高度保守的基因。其发现源于果蝇。现研究证明存在于酵母至人类的几乎所有真核细胞中,均含有1个183个核苷酸序列编码的多肽区域——同源域,产物为一类转录因子。正常造血过程依赖于造血调控因子在细胞不同分化阶段有效的活化与失活,同源盒基因与造血调控有关。每一种因子都有其独特的功能,在造血发育过程中表现出多样性和重复性的调控作用^[6]。近来随着对白血病细胞分子生物学和细胞遗传学的特征深入研究,发现 HOXA10 基因定向表达于髓细胞,并且 HOXA10 基因在造血过程中起双重调节作用。持续过表达可增加早期造血细胞的增殖能力而诱发急性髓细胞白血病(AML)^[7]。

研究^[8]报道用逆转录病毒介导的方法观察过表达 HOXA10 的人脐血或胎肝造血祖细胞的增殖和分化情况。发现 HOXA10 过表达使髓系分化明显受阻,原始细胞明显增多,原始集落的产率也明显增高,且可封闭红系克隆的形成,使髓系祖细胞形成一个具有竞争性优势的群体。这些结果提示,HOXA10 高表达有助于维持髓系细胞的高增殖能力,使其处于未分化的状态。故 HOXA10 的表达失衡可增加早期细胞的增殖能力而诱发白血病。对 HOXA10 启动子区域的结构分析表明,HOXA10 启动子区域包含2个雌激素反应元件(ERE),ERE₁ 5'-GCCAGAGTGAAC-3', ERE₂ 5'-GGTCCCTTAGAAG-3'并且 ERE 在 HOXA10 启动子区域的位置靠近转录起始位点,提示 HOXA10 的表达可能与雌激素受体的活化相关^[9]。目前对在白血病方面的研究主要集中在 HOXA10 本身表达异常对 AML 白血病的致病作用。例如有实验^[10-11]表明 HOXA10 启动子 CpG 岛在 AML 患者中呈低甲基化或不甲基化状态,导致 HOXA10 基因持续过表达,而在正常人中 HOXA10 启动子 CpG 岛呈甲基化状态导致 HOXA10 基因低表达或不表达,提示 HOXA10 的表达是通过其启动子 CpG 岛甲基化修饰调控。MLL 具有组蛋白 H3K4 特异性甲基化转移酶(HMT)的功能,能特异性调控组蛋白 H3K4 甲基化,而 H3K4 的甲基化可导致基因启动子 CpG 岛低甲基化并且研究报道:MLL 家族作为雌激素受体的辅调节因子调控 E₂ 介导的 E₂ 敏感基因的活化^[5]。

本实验在以不同浓度的 E₂ 处理白血病细胞并在不同时间点运用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测 HOXA10 的表达,发现在 E₂ 100nmol/L 6h 刺激下 HOXA10 的表达会明显升高,再以反义寡核苷酸转染技术在有 E₂ 刺激和无 E₂ 刺激情况下敲除 ER α 和 ER β 后检测 HOXA10 的表达,实验结果显示 E₂ 可以同时和 ER α 和 ER β 结合并导致 HOXA10 的表达升高。为了进一步研究 HOXA10 启动子低甲基化导致 HOXA10 在白

血病细胞中持续高表达与雌激素受体活化的关系,我们以反义寡核苷酸转染技术分别敲除 MLL1、MLL2、MLL3 和 MLL4 后检测 HOXA10 的表达改变,发现 MLL1 的敲除导致 HOXA10 表达明显下降,表明 MLL1 对 HOXA10 有调控作用,并且以 ChIP 技术分别检测白血病细胞在 E₂ 刺激前后 MLL1 与 HOXA10 启动子上 ERE₁ 和 ERE₂ 的相互作用,结果在 E₂ 刺激后 MLL1 与 HOXA10 启动子上 ERE₁ 和 ERE₂ 的结合明显高于无 E₂ 刺激组,表明雌激素依赖的 ER 活化对 MLL1 蛋白的招募作用,促进 MLL1 结合到 HOXA10 启动子上的 ERE₁ 和 ERE₂ 序列。并且 E₂ 刺激前 H3K4 的甲基化程度明显高于无 E₂ 刺激对照组,证明 MLL1 可能是通过结合到 HOXA10 启动子上 ERE₁ 和 ERE₂ 上并导致组蛋白 H3K4 甲基化的途径来调控 HOXA10 的表达,此实验结论还需进一步研究。在急性髓性白血病细胞中 MLL1 作为雌激素受体的辅调节因子以表观遗传学途径调控 HOXA10 的表达为白血病的致病机制分析和内分泌药物治疗提供了一个新的方向,同时提示 HOXA10 启动子 CpG 岛的异常甲基化状态有可能成为临床检测白血病一个新的分子生物学上的诊断标志。

参考文献:

- [1] Bei L, Huang W, Wang H, *et al.* HoxA10 activates CDX4 transcription and Cdx4 activates HOXA10 transcription in myeloid cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 19047-19064.
- [2] Lu Z, Hardt J, Kim J J. Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(6): 357-366.
- [3] Magnusson M, Brun A C, Miyake N, *et al.* HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development[J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3687-3696.
- [4] Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, *et al.* HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML[J]. *Leukemia*, 2008, 22(11): 2041-2047.
- [5] Okitsu C Y, Hsieh C L. DNA methylation dictates histone H3K4 methylation[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(7): 2746-2757.
- [6] Eklund E A. The role of HOX genes in malignant myeloid disease[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(2): 85-89.
- [7] Milne T A, Briggs S D, Brock H W, *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters[J]. *Mol Cell*, 2002, 10(5): 1107-1117.
- [8] Ono R, Kumagai H, Nakajima H, *et al.* Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation[J]. *Leukemia*, 2009, 23(12): 2197-2209.
- [9] Akbas G E, Song J, Taylor H S. A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES)[J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(5): 1013-1023.
- [10] Stratthdee G, Holyoake T L, Sim A, *et al.* Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 5048-5055.
- [11] Pilato B, Pinto R, De-Summa S, *et al.* HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer[J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(1): 51-53.

(收稿:2013-02-26;修回:2013-03-28)

(编辑 邓强庭)