

李长美,金亚,孙寅,等. *IGHG1* 对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 7-13, 54.

Li CM, Jin Y, Sun Y, et al. Mechanism study of *IGHG1* on proliferation, apoptosis, and invasion of THP-1 cells in acute myeloid leukemia [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 7-13, 54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.002

IGHG1 对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的机制研究

李长美,金亚,孙寅,刘建,姜道亮,张教国,杨瑞,杨勇,邱立*

(滕州市中心人民医院儿科,山东滕州 277500)

【摘要】 目的 探讨免疫球蛋白 γ -1 重链恒定区 (immunoglobulin γ -1 heavy chain constant region, *IGHG1*) 在急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) THP-1 细胞中的表达以及调控转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad 通路对细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法** 以 9 例 AML 患儿的骨髓标本、8 例骨折患儿的骨髓标本、人骨髓基质细胞 HS-5 及人 AML 细胞 THP-1、HL60 为研究对象, Western blot 检测 *IGHG1* 蛋白表达; 将 THP-1 细胞分组为空白 (细胞未经任何处理)、si-NC、si-*IGHG1*-1、si-*IGHG1*-2、si-*IGHG1*-3、TGF- β 、si-*IGHG1*-1+TGF- β 、si-*IGHG1*-1+TGF- β +LY364947 (TGF- β /Smad 通路抑制剂) 组。CCK-8 法检测细胞增殖; 流式细胞术和 Transwell 实验分别测定细胞凋亡和侵袭; Western blot 评估细胞中 *IGHG1*、TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达。**结果** 与骨折患儿骨髓比较, AML 患儿骨髓中 *IGHG1* 蛋白 ((0.24 $\pm$ 0.03) vs (0.87 $\pm$ 0.12)) 表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与 HS-5 细胞比较, THP-1、HL60 细胞中 *IGHG1* 蛋白 ((0.89 $\pm$ 0.14) (0.75 $\pm$ 0.08) vs (0.21 $\pm$ 0.02)) 表达升高 ($P<0.05$); 与空白组比较, si-*IGHG1*-1 组 THP-1 细胞 OD₄₅₀ 值 (24、48、72 h)、侵袭细胞数目、TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达均显著降低, 细胞凋亡率升高, TGF- β 组对应指标呈相反变化 ($P<0.05$); TGF- β 逆转了沉默 *IGHG1* 对 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响; 与 si-*IGHG1*-1+TGF- β 组比较, si-*IGHG1*-1+TGF- β +LY364947 组 TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD₄₅₀ 值 (24、48、72 h) 及侵袭细胞数目显著降低, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。**结论** *IGHG1* 在 AML 细胞中高表达, 沉默 *IGHG1* 可抑制 AML 细胞增殖及侵袭, 并促进 AML 细胞凋亡, 该机制可能与抑制 TGF- β /Smad 通路有关。

【关键词】 急性髓系白血病; 免疫球蛋白 γ -1 重链恒定区; TGF- β /Smad 通路; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0007-07

Mechanism study of *IGHG1* on proliferation, apoptosis, and invasion of THP-1 cells in acute myeloid leukemia

LI Changmei, JIN Ya, SUN Yin, LIU Jian, JIANG Daoliang, ZHANG Jiaoguo, YANG Rui, YANG Yong, QIU Li*
(Department of Pediatrics, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of immunoglobulin γ -1 heavy chain constant region (*IGHG1*) in acute myeloid leukemia (AML) THP-1 cells and its influence on cell proliferation, apoptosis, and invasion via its regulation of the transforming growth factor β (TGF- β)/Smad pathway. **Methods** Bone marrow specimens from nine children with AML and eight children with fractures, human bone marrow stromal HS-5 cells, and human AML THP-1 and HL60 cells were used in the research. Western blot was used to detect *IGHG1* protein expression. THP-1 cells were divided into a blank group (without any treatment), si-NC group, si-*IGHG1*-1 group, si-*IGHG1*-2 group, si-*IGHG1*-3

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202006010355); 徐州医科大学附属医院发展基金面上项目 (XYFM2020018)。

[作者简介] 李长美 (1984—), 女, 主治医师, 研究方向: 儿科。E-mail: lichangmeil@163.com

[通信作者] 邱立 (1974—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 儿科。E-mail: t4068w@163.com

group, TGF- β group, si-*IGHG1*-1 + TGF- β group, and si-*IGHG1*-1 + TGF- β + LY364947 group. Cell proliferation was measured by CCK-8 method. Flow cytometry and Transwell experiment were performed to measure apoptosis and invasion. Western blot was used to detect the protein expression of *IGHG1*, TGF- β , p-Smad2 and p-Smad3 in each group of cells.

Results Compared with the bone marrow of children with fractures, the bone marrow of children with AML ($P < 0.05$) had significantly higher expression levels of *IGHG1* ((0.24 ± 0.03) vs (0.87 ± 0.12)). Compared with HS-5 cells, human AML THP-1 and HL60 cells had significantly increased expression levels of *IGHG1* ((0.89 ± 0.14) (0.75 ± 0.08) vs (0.21 ± 0.02)) ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the si-*IGHG1*-1 group of THP-1 cells showed significantly reduced OD_{450} values (24 h, 48 h, 72 h), invading cell numbers and protein expression of TGF- β , p-Smad2, p-Smad3 and their apoptosis rate was increased ($P < 0.05$), while the corresponding indexes showed the opposite trend in the TGF- β group ($P < 0.05$). TGF- β reversed the effects of silencing *IGHG1* on the proliferation, apoptosis and invasion of THP-1 cells. Compared with the si-*IGHG1*-1 + TGF- β group, the si-*IGHG1*-1 + TGF- β + LY364947 group had significantly decreased TGF- β , p-Smad2, p-Smad3 and protein levels, OD_{450} values and cell invasion numbers and the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** *IGHG1* is highly expressed in AML cells. Silencing the *IGHG1* gene can inhibit the proliferation and invasion of AML cells and promote the apoptosis of AML cells. This mechanism may be related to the inhibition of the TGF- β /Smad pathway.

【Keywords】 acute myeloid leukemia; immunoglobulin γ -1 heavy chain constant region; TGF- β /Smad pathway; proliferation; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种以大量细胞遗传学和分子畸变为特征的造血系统疾病,属于血液学癌症类型,其特征是髓系原始细胞在骨髓、血液和其他组织中恶性增殖,导致正常骨髓造血障碍^[1]。相关数据显示,儿童 AML 约占儿童白血病的 25%,虽然发生率相对较低,但预后较差^[2]。因此,确定参与儿童 AML 增殖与侵袭的机制对于开创新的治疗方法和改善患儿的预后具有重要意义。免疫球蛋白 γ -1 重链恒定区(immunoglobulin γ -1 heavy chain constant region, *IGHG1*)是位于 14 号染色体 q32.33 上的基因,其在卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中表达明显增多^[3]。但 *IGHG1* 在 AML 中表达及作用尚不清楚。已有研究证实,*IGHG1* 在胃癌组织中的高表达可通过激活转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)/Smad3 信号通路诱导胃癌细胞上皮间质转化,促进细胞增殖、迁移和侵袭^[4]。研究发现,AML 细胞分泌 TGF- β 1,其自主激活 TGF- β 信号通路并诱导其表型变异,阻断 TGF- β 信号通路不仅可抑制 AML 细胞变异,还抑制 AML 细胞增殖、迁移及侵袭,并诱导细胞凋亡^[5-6]。然而,*IGHG1* 能否通过调控 TGF- β /Smad 通路来影响 AML 细胞的增殖及侵袭尚不明确。故本文探讨 AML 中 *IGHG1* 表达情况以及 *IGHG1* 影响 AML 细胞增殖、侵袭的潜在机制,旨在为 AML 的靶向药物的开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人骨髓基质细胞 HS-5 及人 AML 细胞 THP-1、HL60 均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 临床标本收集

收集 2018 年 3 月至 2021 年 3 月期间在本院首次确诊为 AML 患儿的骨髓标本共 9 例,另取同时期本院的骨折患儿的骨髓标本 8 例作为对照。本研究在试验开始时获得患儿监护人的书面知情同意,并经济宁医学院附属滕州市中心人民医院伦理委员会批准(2018-01108)。

1.2 主要试剂与仪器

根据 siRNA 设计原则设计 *IGHG1* 的 3 条干扰序列 si-*IGHG1*-1、si-*IGHG1*-2、si-*IGHG1*-3、及阴性对照序列 si-NC(均广州基迪奥生物科技有限公司合成,批号:20150217、20171120、20170523、20160924);TGF- β 过表达质粒(上海禾午生物公司,批号:20161125);TGF- β /Smad 通路抑制剂 LY364947(美国 Selleck Chemicals 公司,批号:20150910);Lipofectamine™ 2000 试剂(北京宜科思源科技有限公司,批号:20160511);胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、RPMI 1640 培养基、BCA 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司,批号:20170622、20151019、20170720);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin

V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) 细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:20160427、20151206);总蛋白提取试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,批号:20170326); β -actin、TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3、Smad2、Smad3 兔多克隆抗体(anti- β -actin、anti-TGF- β 、anti-p-Smad2、anti-p-Smad3、anti-Smad2、anti-Smad3)及辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司,批号:20170821、20170522、20160325、20170924、20170326、20151206、20170321)。CO₂ 培养箱(艾美捷科技有限公司,批号:20170922);凝胶成像系统(北京原平皓生物技术有限公司,批号:20161127)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及分组

将人 AML 细胞 THP-1、HL60、U937 及人骨髓基质细胞 HS-5 在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养,培养条件为 5% CO₂、37℃。取对数生长期的 THP-1 细胞,加入 4 μ L 脂质体 Lipofectamine™ 2000 和 100 μ L 无血清的培养液进行转染,为了验证 *IGHG1* 能否通过调控 TGF- β /Smad 通路来影响 AML 细胞的增殖及侵袭,需在转染 *IGHG1* 小干扰 RNA 的同时加入 TGF- β 过表达质粒或 TGF- β /Smad 通路抑制剂 LY364947 干预 THP-1 细胞,并分组为:空白组(细胞未经任何处理)、si-NC 组(20 pmol si-NC 转染细胞, si-NC 序列: 5'-CGUCACCUGAACGACAC-3')、si-*IGHG1*-1 组(20 pmol si-*IGHG1*-1 转染细胞, si-*IGHG1*-1 序列: 5'-CCAAGGACACCCCTCATGAT-3')、si-*IGHG1*-2 组(20 pmol si-*IGHG1*-2 转染细胞, si-*IGHG1*-2 序列: 5'-AGTGCAAGGTCTCCAACAA-3')、si-*IGHG1*-3 组(20 pmol si-*IGHG1*-3 转染细胞, si-*IGHG1*-3 序列: 5'-GCCTCCTTCTTCTCTACAG-3')、TGF- β 组(40 μ mol/L TGF- β 转染细胞)、si-*IGHG1*-1 + TGF- β 组(20 pmol si-*IGHG1*-1 和 40 μ mol/L TGF- β 同时处理细胞)、si-*IGHG1*-1 + TGF- β + LY364947^[6] 组(20 pmol si-*IGHG1*-1、40 μ mol/L TGF- β 同时处理细胞 24 h 后再用 40 μ mol/L LY364947 处理细胞 24 h)共 8 组。

1.3.2 Western blot 检测 *IGHG1* 及 TGF- β /Smad 通路相关蛋白表达水平

利用总蛋白提取试剂盒提取组织和细胞中的总蛋白,等量的蛋白质在 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上,然后用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。将膜与一抗在 4℃ 下孵育过夜。使用以下一抗: anti-*IGHG1* (1 : 2000)、anti-TGF- β (1 : 2000)、anti-Smad2 (1 : 1000)、anti-p-Smad2 (1 : 3000)、anti-Smad3 (1 : 2000)、anti-p-Smad3 (1 : 2000)、anti- β -actin (1 : 2500)。次日,将膜用 TBST 洗涤 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗在 37℃ 下孵育 1 h 后,使用 ECL 化学发光试剂盒观察蛋白条带显色情况,以 β -actin 为参照,通过 Image J 软件分析蛋白质条带灰度值,实验设置 6 个复孔。

1.3.3 CCK-8 法测定细胞增殖

将各组 THP-1 细胞以 10³/孔密度接种到 96 孔细胞板上,并在 37℃、5% CO₂ 下孵育。在细胞转染或处理的 0、24、48、72 h 时,每孔分别添加 CCK-8 溶液 10 μ L。37℃ 下孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值以评估细胞的增殖能力,实验设置 6 个复孔。

1.3.4 Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 双染检测细胞凋亡

不同处理后收获细胞,用 PBS 洗涤两次。然后将细胞重悬在 500 μ L 的结合缓冲液中,用 5 μ L Annexin V-FITC 染色 15 min, 5 μ L PI 染色 5 min,在 4℃ 的黑暗中染色。流式细胞术检测各组凋亡细胞的百分率(Annexin V+/PI- 为早期凋亡, Annexin V+/PI+ 为晚期凋亡)。

1.3.5 Transwell 法测定细胞侵袭

将稀释的基质胶加入每个小室中,并在自然条件下风干。将各组细胞用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬,并以 2×10⁵/孔的密度接种到上室中。将含有 10% FBS 的 500 μ L RPMI 1640 培养基加入到下室中。37℃、5% CO₂ 培养 48 h 后,取出 Transwell 小室,弃去孔内培养基,用棉签去除小室上表面细胞,然后用甲醛固定穿过基质胶的细胞并用结晶紫(0.1%)染色 30 min。显微镜下对细胞计数,观察细胞侵袭具体情况,实验设置 6 个复孔。

1.4 统计学方法

本研究所有数据均符合正态分布,并以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用独立样本 *t* 检验对两组数据进行比较,采用单因素方差分析对多组数据进行比较,并用 SNK-*q* 检验进行进一步的两两比较。使用 SPSS 25.0 作为分析软件。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGHG1 在 AML 患儿骨髓及不同 AML 细胞中的表达

与骨折患儿骨髓(0.24 ± 0.03)比较,AML 患儿骨髓中 IGHG1 蛋白(0.87 ± 0.12)表达水平显著升高($P<0.05$,图 1A)。与人骨髓基质细胞 HS-5(0.21 ± 0.02)比较,人 AML 细胞 THP-1(0.89 ± 0.14)、HL60(0.75 ± 0.08)中 IGHG1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),且 IGHG1 蛋白在 THP-1 细胞中的表达量最高,因此,选择 THP-1 细胞进行后续转染实验(图 1B)。

2.2 各组细胞转染后 IGHG1 蛋白表达比较

与空白组和 si-NC 组比较,si-IGHG1-1 组、si-IGHG1-2 组、si-IGHG1-3 组 THP-1 细胞中 IGHG1 蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$),且 si-IGHG1-1 组中 IGHG1 蛋白的表达量最低,因此,以 si-IGHG1-1 组细胞为研究对象进行后续细胞生物学功能的研究(图 2,表 1)。

2.3 沉默 IGHG1 对 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响

与空白组和 si-NC 组比较,si-IGHG1-1 组 THP-1 细胞 OD₄₅₀ 值(0、24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与空白组比较,si-NC 组 THP-1 细胞 OD₄₅₀ 值(0、24、48、72 h)、细胞凋亡率及侵袭细胞数目无显著性差异($P>0.05$,图 3,表 2)。

2.4 沉默 IGHG1 对 IGHG1 蛋白及 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达的影响

与空白组和 si-NC 组比较,si-IGHG1-1 组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);空白组与 si-NC 组比较,上述指标无显著性差异($P>0.05$,图 4,表 3)。

2.5 沉默 IGHG1 通过抑制 TGF-β/Smad 通路抑制 THP-1 细胞增殖与侵袭

与空白组比较,TGF-β 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD₄₅₀ 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$);与 si-IGHG1-1 组比较,si-IGHG1-1+TGF-β 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD₄₅₀ 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义

($P>0.05$);与 si-IGHG1-1+TGF-β 组比较,si-IGHG1-1+TGF-β+LY364947 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD₄₅₀ 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$,图 5、图 6,表 4、表 5)。

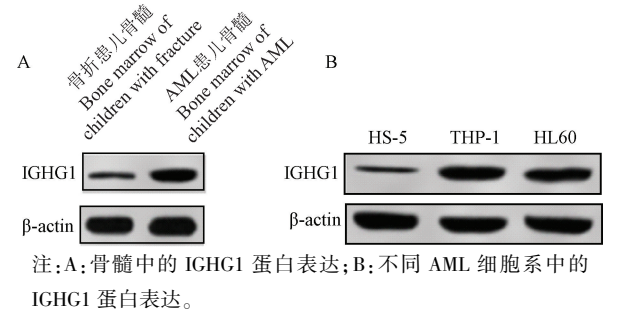


图 1 Western blot 检测 IGHG1 蛋白表达
Note. A, IGHG1 protein expression in bone marrow. B, IGHG1 protein expression in different AML cell lines.

Figure 1 Western blot detection of IGHG1 protein expression

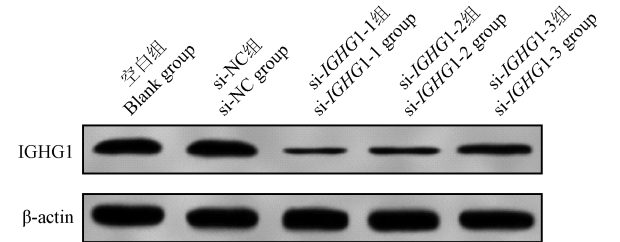


图 2 Western blot 检测每个转染组 THP-1 细胞中的 IGHG1 蛋白表达

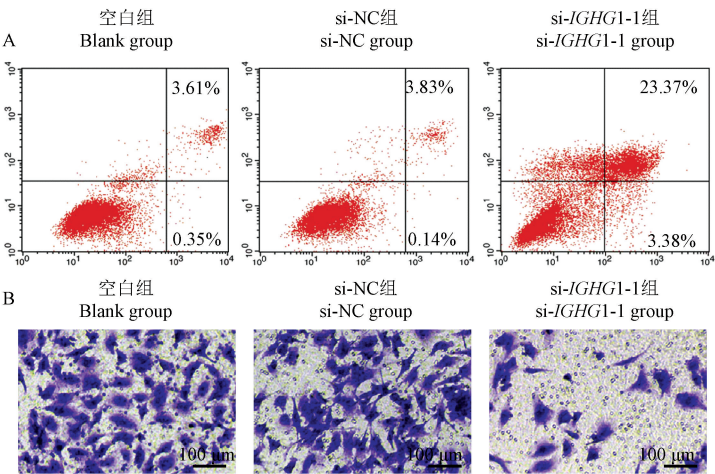
Figure 2 Western blot detection of IGHG1 protein expression in THP-1 cells of each transfection group

表 1 各转染组 THP-1 细胞中 IGHG1 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of IGHG1 protein expression in THP-1 cells of each transfection group

组别 Groups	IGHG1/β-actin
空白组 Blank group	0.88±0.13
si-NC 组 si-NC group	0.89±0.12
si-IGHG1-1 组 si-IGHG1-1 group	0.12±0.02**
si-IGHG1-2 组 si-IGHG1-2 group	0.18±0.01**
si-IGHG1-3 组 si-IGHG1-3 group	0.23±0.03**

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 si-NC 组比较,# $P<0.05$ 。
Note. Compared with blank group,* $P<0.05$. Compared with si-NC group,# $P<0.05$.



注:A:流式细胞术检测细胞凋亡;B:Transwell 法检测细胞侵袭(结晶紫染色)。

图 3 各组细胞凋亡和侵袭水平

Note. A, Apoptosis was detected by flow cytometry. B, Cell invasion was detected by Transwell assay (crystal violet staining).

Figure 3 Cell apoptosis and invasion levels in each group

表 2 各组 THP-1 细胞 OD₄₅₀ 值和侵袭细胞数的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of OD₄₅₀ values and number of invasion cells of THP-1 cells in each group

组别 Groups	OD ₄₅₀				凋亡率(%) Apoptosis rate	侵袭细胞数 Number of invasion cells
	0 h	24 h	48 h	72 h		
空白组 Blank group	0.21±0.04	0.53±0.04	0.87±0.09	1.23±0.14	3.94±0.45	87.67±10.63
si-NC 组 si-NC group	0.22±0.03	0.55±0.06	0.88±0.07	1.21±0.13	4.01±0.48	85.24±9.89
si-IGHG1-1 组 si-IGHG1-1 group	0.23±0.05	0.27±0.02 ^{**}	0.39±0.04 ^{**}	0.84±0.12 ^{**}	26.52±1.13 ^{**}	30.29±4.68 ^{**}

注:与空白组相比, * $P<0.05$;与 si-NC 组相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank group, * $P<0.05$. Compared with si-NC group, # $P<0.05$.

表 3 各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells of each group

组别 Groups	IGHG1/β-actin	TGF-β/β-actin	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3
空白组 Blank group	0.87±0.12	0.82±0.12	0.57±0.04	0.43±0.03
si-NC 组 si-NC group	0.88±0.14	0.83±0.11	0.55±0.05	0.42±0.04
si-IGHG1-1 组 si-IGHG1-1 group	0.11±0.01 ^{**}	0.34±0.03 ^{**}	0.15±0.01	0.10±0.01

注:与空白组相比, * $P<0.05$;与 si-NC 组相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank group, * $P<0.05$. Compared with si-NC group, # $P<0.05$.

表 4 各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells of each group

组别 Groups	IGHG1/β-actin	TGF-β/β-actin	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3
空白组 Blank group	0.87±0.12	0.81±0.06	0.56±0.04	0.44±0.03
TGF-β 组 TGF-β group	0.85±0.13	1.24±0.15 [*]	0.89±0.06 [*]	0.72±0.04 [*]
si-IGHG1-1 组 si-IGHG1-1 group	0.13±0.01	0.34±0.02	0.18±0.01	0.10±0.01
si-IGHG1-1+TGF-β 组 si-IGHG1-1+TGF-β group	0.12±0.01	0.72±0.05 [#]	0.37±0.03 [#]	0.32±0.02 [#]
si-IGHG1-1+TGF-β+LY364947 组 si-IGHG1-1+TGF-β+LY364947 group	0.14±0.01	0.30±0.02 ^{&}	0.19±0.01 ^{&}	0.12±0.01 ^{&}

注:与空白组相比, * $P<0.05$;与 si-IGHG1-1 组相比, # $P<0.05$;与 si-IGHG1-1+TGF-β 组相比, & $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank group, * $P<0.05$. Compared with the si-IGHG1-1 group, # $P<0.05$. Compared with si-IGHG1-1+TGF-β group, & $P<0.05$.

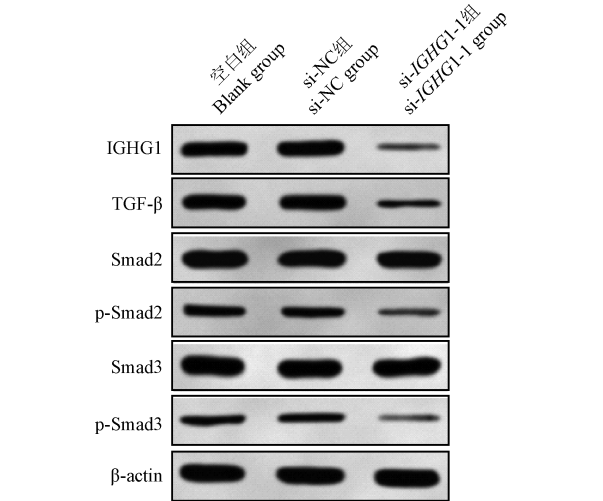


图 4 Western blot 检测各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达

Figure 4 Western blot detection of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells in each group

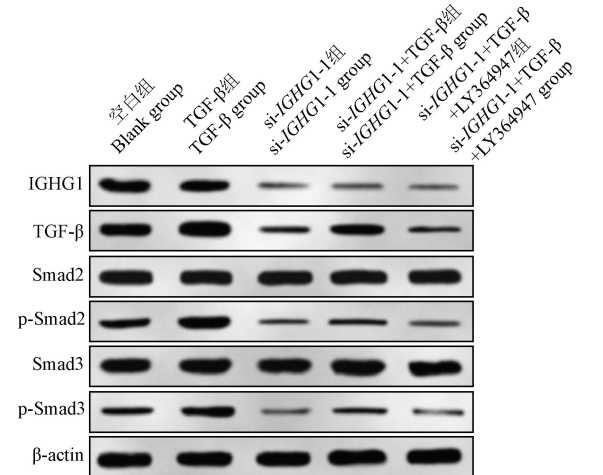
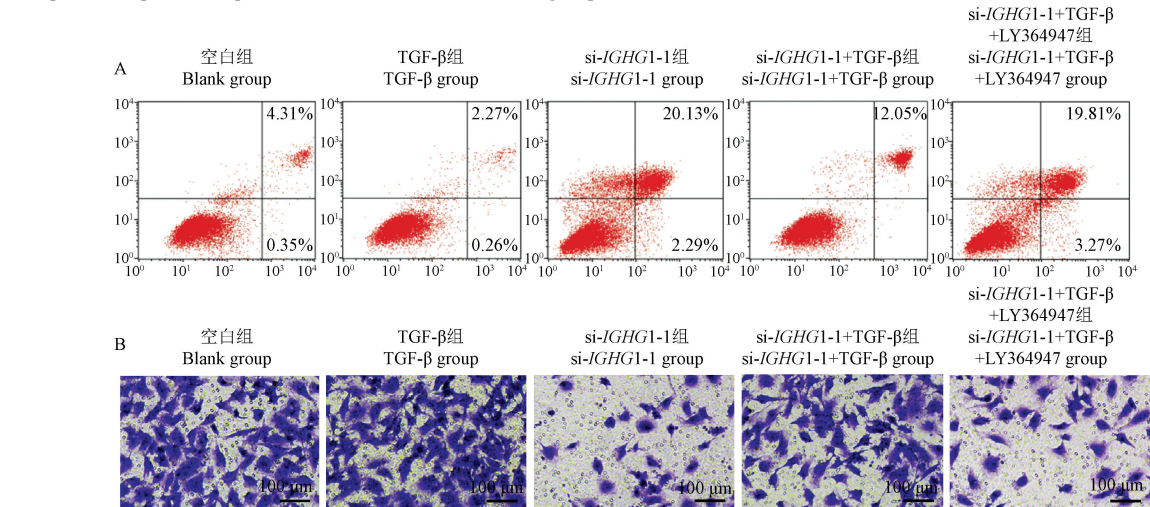


图 5 Western blot 检测 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达

Figure 5 Western blot detection of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression



注：A：流式细胞术检测细胞凋亡；B：Transwell 法检测细胞侵袭（结晶紫染色）。

图 6 各组细胞凋亡和侵袭水平

Note. A, Apoptosis was detected by flow cytometry. B, Cell invasion was detected by Transwell assay (crystal violet staining).

表 5 各组 THP-1 细胞中 OD₄₅₀ 值和侵袭细胞数量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	OD ₄₅₀				凋亡率 (%) Apoptosis rate	侵袭细胞数 Number of invasion cells
	0 h	24 h	48 h	72 h		
空白组 Blank group	0.23±0.02	0.59±0.04	0.91±0.07	1.19±0.13	4.24±0.52	90.18±7.25
TGF-β 组 TGF-β group	0.22±0.03	0.72±0.05 [*]	1.23±0.11 [*]	1.37±0.15 [*]	2.51±0.30 [*]	112.35±8.42 [*]
si-IGHG1-1 组 si-IGHG1-1 group	0.25±0.02	0.29±0.02	0.41±0.04	0.82±0.06	22.30±0.91	32.57±3.08
si-IGHG1-1+TGF-β 组 si-IGHG1-1+TGF-β group	0.24±0.01	0.52±0.04 [#]	0.83±0.06 [#]	1.03±0.09 [#]	11.85±0.64 [#]	79.89±6.26 [#]
si-IGHG1-1+TGF-β+LY364947 组 si-IGHG1-1+TGF-β+LY364947 group	0.23±0.03	0.31±0.03 ^{&}	0.40±0.02 ^{&}	0.80±0.06 ^{&}	21.92±0.87 ^{&}	34.78±2.86 ^{&}

注：与空白组相比，^{*}P<0.05；与 si-IGHG1-1 组相比，[#]P<0.05；与 si-IGHG1-1+TGF-β 组相比，[&]P<0.05。

Note. Compared with blank group, ^{*}P<0.05. Compared with the si-IGHG1-1 group, [#]P<0.05. Compared with si-IGHG1-1+TGF-β group, [&]P<0.05.

3 讨论

研究显示,AML/ALL 患者血清 IgG 水平高于健康者^[7]。IgG1 是 IgG 亚类中最常用的治疗性 IgG 抗体,抗 IgG1 抗体可有效治疗 AML^[8]。*IGHG1* 的表达量随肿瘤中 IgG 水平的增高而增加,且 *IGHG1* 参与肿瘤细胞增殖、抗凋亡、免疫逃逸、转移等过程^[9-10]。据报道,*IGHG1* 在胃癌^[11]、前列腺癌^[12]、卵巢癌^[13]中高表达,下调 *IGHG1* 表达能促进癌细胞凋亡并抑制增殖、迁移和侵袭。本研究结果显示,*IGHG1* 蛋白在 AML 患儿骨髓及 AML 细胞 THP-1、HL60 中高表达,且 THP-1 细胞中 *IGHG1* 蛋白相对表达量最高,因此,选择 THP-1 细胞进行后续转染实验。本研究通过 RNA 干扰技术敲减 *IGHG1* 在 THP-1 细胞中的表达,发现 si-*IGHG1*-1 组、si-*IGHG1*-2 组、si-*IGHG1*-3 组 THP-1 细胞中 *IGHG1* 蛋白表达水平显著低于空白组和 si-NC 组,且 si-*IGHG1*-1 组中 *IGHG1* 蛋白表达量最低,因此,选择 si-*IGHG1*-1 组细胞为研究对象进行后续细胞生物学功能研究。此外,本研究还发现抑制 *IGHG1* 表达可明显抑制 THP-1 细胞的增殖与侵袭能力,并诱导 THP-1 细胞凋亡,这与既往的研究结果一致^[11-13],提示 *IGHG1* 在 AML 中发挥促癌作用。

TGF- β /Smad 信号传导由活化的 TGF- β 与 TGF- β II 型受体的结合启动,然后募集 TGF- β I 型受体以激活并磷酸化下游的 Smad2 和 Smad3,其磷酸化后与 Smad4 结合形成三聚体,然后转移到细胞核中以促进下游靶基因的转录^[14-15]。据报道,TGF- β 的高表达与多种癌症的恶性程度相关,如乳腺癌^[16]、胃癌^[17]、卵巢癌^[18]和肝癌^[19]。TGF- β /Smad 信号通路是造血的负调节剂,该通路的失调被认为是白血病发生的主要因素^[20]。LY364947 (TGF- β 信号通路抑制剂)能通过阻滞 TGF- β 通路抑制白血病细胞增殖,并诱导细胞凋亡^[6]。本实验发现,沉默 *IGHG1* 降低了 TGF- β /Smad 通路相关蛋白 TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3 的表达,提示沉默 *IGHG1* 对 THP-1 细胞增殖与侵袭的抑制作用可能是通过抑制 TGF- β /Smad 通路实现的。为了验证该猜想,本研究在沉默 *IGHG1* 的基础上利用 TGF- β 过表达质粒进行干预,发现过表达 TGF- β 可减弱沉默 *IGHG1* 对 THP-1 细胞增殖与侵袭的抑制作用以及对 THP-1 细胞凋亡的促进作用。最后,在 TGF- β 过表达质粒和沉默 *IGHG1* 共同处理的 THP-1 细胞中添加 TGF-

β /Smad 通路抑制剂 LY364947,结果显示,LY364947 会拮抗 TGF- β 过表达质粒处理后的作用。以上结果证实了沉默 *IGHG1* 可抑制 AML 细胞的增殖与侵袭,并诱导 THP-1 细胞凋亡,该机制与抑制 TGF- β /Smad 通路有关。

综上所述,*IGHG1* 在 AML 细胞中高表达,沉默 *IGHG1* 可能通过对 TGF- β /Smad 通路的抑制,从而抑制 AML 细胞的增殖与侵袭,并进一步诱导 THP-1 细胞凋亡。本研究首先证实 *IGHG1* 在 AML 中充当致癌基因,可能是治疗 AML 的潜在靶点,为 AML 的靶向治疗提供了理论依据。然而,本研究尚未涉及到 *IGHG1* 对 AML 细胞其他的生物学特性的影响以及机制,是否有其他信号通路参与此过程,后续将进行相关探究。

参考文献:

- [1] 吴福群,阴常欣,邓绍团,等.急性髓系白血病患者血清 sPD-L1、VEGF 表达及相关性[J].中国医药导报,2019,16(20):76-79,87.
- [2] Lonetti A, Pession A, Masetti R. Targeted therapies for pediatric AML: gaps and perspective[J]. Front Pediatr, 2019, 7: 463.
- [3] Zhang Y, Fang X, Sun Y. IGHG1 promotes malignant progression in breast cancer cells through the regulation of AKT and VEGF signaling[J]. Biomol Biomed, 2023, 23(4): 616-623.
- [4] Li Y, Wang P, Ye D, et al. IGHG1 induces EMT in gastric cancer cells by regulating TGF- β /SMAD3 signaling pathway[J]. J Cancer, 2021, 12(12): 3458-3467.
- [5] Shingai Y, Yokota T, Okuzaki D, et al. Autonomous TGF β signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia[J]. Stem Cells, 2021, 39(6): 723-736.
- [6] 林晓静,赵臻怡,陈舒雅,等.沉默血红素加氧酶-1对急性单核细胞白血病小鼠模型的影响[J].中国比较医学杂志,2021,31(12):7-13,42.
- [7] Wu L, Xia M, Sun X, et al. High levels of immunoglobulin expression predict shorter overall survival in patients with acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2020, 105(4): 449-459.
- [8] Yeung YA, Krishnamoorthy V, Dettling D, et al. An optimized full-length FLT3/CD3 bispecific antibody demonstrates potent anti-leukemia activity and reversible hematological toxicity[J]. Mol Ther, 2020, 28(3): 889-900.
- [9] Sheng Z, Liu Y, Qin C, et al. IgG is involved in the migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(6): 497-504.
- [10] 王国辉,杨雄涛,朱广迎.利用生物信息学、免疫组化分析肿瘤来源免疫球蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J].中国肺癌杂志,2019,22(6):341-348.

(下转第 54 页)