

· 论 著 ·

## 过表达 HMGA2 对人垂体生长激素腺瘤细胞增殖及周期的影响\*

范月超, 颜丙超, 陈洪福, 纪建永, 张 慧, 梅鹏金

(徐州医学院附属医院颅底肿瘤外科, 江苏徐州 221006)

**摘要:**目的 探讨过表达高迁移率族蛋白 A2(HMGA2)对人垂体生长激素腺瘤细胞增殖及周期的影响。方法 HMGA2 过表达质粒转染原代培养人垂体生长激素腺瘤细胞(转染组)。蛋白免疫印迹法(Western blot)、细胞增殖实验(cell counting kit-8, CCK-8)、流式细胞仪术分别检测 HMGA2 过表达质粒转染垂体生长激素腺瘤细胞后对 HMGA2 蛋白表达、细胞增殖、细胞周期的影响。结果 24 h 后转染组垂体生长激素腺瘤细胞 HMGA2 蛋白表达水平高于空载体组(转染空质粒的细胞)( $P < 0.05$ ); 较空载体组在 24、48、72、96 h 4 个时间点 OD 值较大, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 转染组细胞增殖数量增加, 与空载体组相比转染组细胞  $G_1$  期所占比例减少, S 期所占比例增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 过表达 HMGA2 促进垂体腺瘤细胞增殖, 促进细胞  $G_1$  期进展。

**关键词:**高迁移率族蛋白类; 增量调节; 垂体肿瘤; 增殖; 细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)36-4371-03

## The effect of overexpression HMGA2 on proliferation and cell cycle in human growth hormone-secreting pituitary tumor cells\*

Fan Yuechao, Yan Bingchao, Chen Hongfu, Ji Jianyong, Zhang Hui, Mei Pengjin

(Department of Skull Base Tumor Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou

Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

**Abstract:**Objective To explore the effects of over-expression high-mobility-group A2(HMGA2) on proliferation and cell cycle in primary cultured human growth hormone-secreting pituitary tumor cells. **Methods** The protein expression of HMGA2 in growth hormone-secreting pituitary tumor cells transfected by HMGA2 overexpression plasmid(transfection group) were detected by Western blot. The effects of the HMGA2 overexpression on cell proliferation, cell cycle were measured by (cell counting kit-8, CCK-8) assay and flow cytometry respectively. **Results** HMGA2 protein of transfection group was higher than the blank load transfection group(transfected with pcDNA3.1 plasmid) after 24 h ( $P < 0.05$ ). To compare with the blank load transfection group, cells overexpression of HMGA2 could drastically increase the ability of proliferation at 24, 48, 72, 96 h and increase the S phase ratio of cell cycle and decrease the  $G_1$  phase ratio of cell cycle, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Over-expression of HMGA2 increases pituitary tumor cells proliferation ability and promote cells  $G_1$  phase progress.

**Key words:** high-mobility-group protein; up-regulation; pituitary neoplasms; cell proliferation; cell cycle

垂体瘤是一种颅内常见的良性肿瘤,约占中枢神经系统肿瘤的 15%~20%<sup>[1]</sup>。高迁移率族蛋白 A2(high-mobility-group A2, HMGA2)是非组蛋白染色体蛋白,属于高迁移率族 A(high-mobility-group A, HMGA)家族,在垂体瘤组织及体外培养细胞中高表达<sup>[2-3]</sup>。HMGA2 过表达是许多良性和恶性肿瘤的标志,是一个预后不良的指标。原代培养的人垂体生长激素腺瘤细胞,在性质和特点上更接近于肿瘤在人体的原始状态,因此,其在生物治疗或实验中的效果和作用更接近于体内肿瘤细胞对生物试剂的反应。本实验采用 HMGA2 过表达质粒转染人垂体生长激素腺瘤细胞,观察 HMGA2 蛋白过表达对人垂体生长激素腺瘤细胞增殖及周期的影响。

## 1 材料与方

**1.1 材料** HMGA2 质粒(pIRES2-dsRed-HMGA2cDNA)、空载体(pcDNA3.1)(上海艾博斯公司合成),DMEM 高糖培养基(Thermo 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),0.25%胰酶(碧云天公司),羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)(Gibco 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司),HMGA2

一抗(Santa Cruz 公司),山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(日本同仁公司),细胞周期检测试剂盒(南京凯基公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 实验细胞分为:转染组(转染 pIRES2-dsRed-HMGA2cDNA 质粒)和空载体组(转染 pcDNA3.1 空载体质粒)。

**1.2.2 细胞培养** 原代垂体生长激素腺瘤细胞的培养采用机械分离法<sup>[1]</sup>分离垂体瘤细胞;手术切除的垂体腺瘤组织在无菌操作下放入无血清 DMEM 培养基中立即送往实验室超净台内无菌 PBS 冲洗 2 次去除结缔组织、坏死组织及血块,将标本用眼科剪剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 大小组织块加 5 倍量的 0.25% 胰酶(预热至 37 ℃),在 37 ℃ 条件下消化 30 min,每隔 5 min 用吸管吹打分散 1 次,待细胞分散良好以后加入 5 倍量的细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(内含 105 U/L 青霉素,0.1 g/L 链霉素,2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.0 g/L HEPES, 10% 胎牛血清)终止消化 5 min,经 100 目细胞滤器过滤后,

\* 基金项目:江苏省卫生厅科研基金资助项目(H201019)。 作者简介:范月超(1968~),博士,主任医师/副教授,主要从事脑肿瘤机制研究。

1 000 r/min 离心 10 min 弃上清液加入 DMEM 培养基使细胞重悬并分散,成功获得稳定生长垂体瘤细胞株后,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中常规培养,以第 3 代原代培养细胞作为实验对象。

**1.2.3 质粒转染** pIRES2-dsRed-HMGA2cDNA 质粒由上海艾博斯生物科技有限公司合成并测序,将处于对数生长期的细胞接种于 60 mm 小皿中,待细胞处于 70%~90% 融合时,pIRES2-dsRed-HMGA2cDNA 质粒及空载体质粒分别转染,并严格按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行。

**1.2.4 免疫印迹法(Western blot)检测 HMGA2 蛋白表达水平** 转染 24 h 后收集两组细胞,加入细胞组织快速裂解液 RIPA 置于冰上裂解,4 °C、15 000 g/min 离心 15 min,收取上清液即总蛋白;加入 5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,100 °C 煮沸变性 5 min;通过 10% SDS-PAGE 分离,转至硝酸纤维素(nitrocellulose filter membrane,NC)膜上加入一抗兔抗人 HMGA2 及兔抗人 β-actin 抗体(1:500),4 °C 孵育过夜;复温 30 min,洗涤缓冲液(washing buffer)洗涤 5 min,3 次,加入稀释的二抗(1:1 000),室温下孵育 2 h;然后四唑硝基蓝(BCIP)和碱性磷酸酶显色试剂(NBT)显色。用 Image J 软件检测各条带灰度值,计算 HMGA2 蛋白的相对表达水平。

**1.2.5 细胞增殖实验(cell counting kit-8,CCK-8)法**<sup>[4-6]</sup> 检测转染组及空载体组垂体生长激素腺瘤细胞增殖情况 0.25% 胰酶消化转染组及空载体组垂体生长激素腺瘤细胞,96 孔板每孔铺 3 000 个细胞、每组设 4 个复孔,每孔加 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清)100 μL,四周加磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)液体防止水分蒸发;置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24、48、72、96 h;每孔加入无血清培养基 100 μL,CCK-8 溶液 10 μL,空白对照孔只加等量无血清培养基和 CCK-8 溶液,混匀两种液体,避光操作;放入培养箱中继续孵育 0.5、1、2、4 h;酶标仪检测在 450 nm 波长下的光密度(optical density,OD)值。

**1.2.6 流式细胞仪检测转染组及空载体组垂体生长激素腺瘤细胞周期变化** 0.25% 胰酶消化转染组及空载体组垂体生长激素腺瘤细胞后离心收集细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次(2 000 r/min 离心 5 min)收集并调整细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>/mL;然后用 70% 乙醇 4 °C 固定过夜;次日,离心收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 遍,小心吸出上清液,可以残留约 50 μL 左右的 PBS,避免吸走细胞,轻轻弹击离心管底适当分散细胞,避免细胞成团;加 100 μL 核糖核酸酶 A(ribonuclease A,RNaseA)(20 μg/mL)37 °C 水浴 30 min;再加入 400 μL 碘化丙啶(propidium iodide,PI)(50 μg/mL)染色混匀,4 °C 避光 30 min,然后用流式细胞仪检测<sup>[7-8]</sup>。

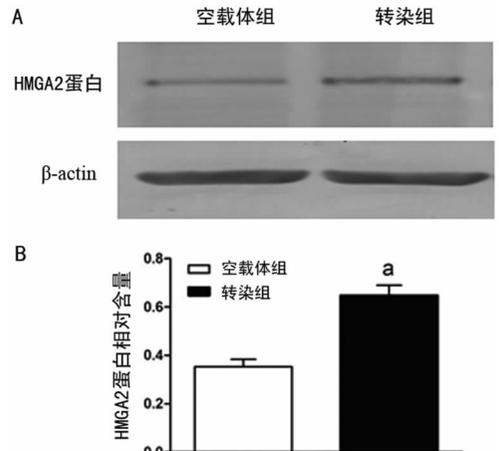
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用两样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Western blot 检测 HMGA2 蛋白的表达情况** 使用 Image J 软件测定两组蛋白条带的灰度值。结果显示,转染组 HMGA2 蛋白表达较空载体组高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明 HMGA2 质粒转染成功,见图 1。

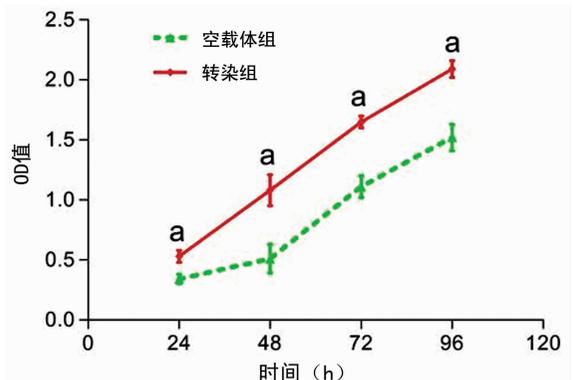
**2.2 CCK-8 实验结果** 实验中在 24、48、72、96 h 4 个时间点

转染组细胞 OD 值均较空载体组细胞 OD 值大,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验结果显示垂体生长激素腺瘤细胞转染 HMGA2 质粒后细胞增殖能力较空载体组明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),细胞生长曲线见图 2。



A: Western blot 图,转染组 HMGA2 蛋白明显高,空载体组即转染 pcDNA3.1 空载体质粒,转染组即转染 HMGA2 过表达质粒。B: HMGA2 蛋白灰度分析图。a:  $P < 0.05$ ,与空载体组比较。

图 1 Western blot 分析两组 HMGA2 蛋白的表达情况



a:  $P < 0.05$ ,与空载体组比较。

图 2 垂体生长激素腺瘤细胞生长曲线

**2.3 流式细胞仪检测垂体生长激素腺瘤细胞周期变化结果** 与空载体组相比,转染组垂体生长激素腺瘤细胞周期发生明显变化, $G_0/G_1$  期细胞所占比例减少,S 期细胞所占比例增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );两组细胞  $G_2$  期细胞所占比例差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 不同质粒转染后对垂体生长激素腺瘤细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%, n=3$ )

组别	细胞周期分布		
	$G_0/G_1$	S	$G_2$
空载体组	69.61±0.51	22.49±0.59	14.25±1.51
转染组	41.20±1.32	42.63±1.01	15.44±1.00
<i>P</i>	<0.05	<0.05	>0.05

## 3 讨论

HMGA2 属于高迁移率族家族 HMGA<sub>s</sub>。该家族的成员还包括 HMGA1a、HMGA1b 和 HMGA1c,它们均含有 3 个 N 端“AT-钩”基序,通过这一结构可以优先地结合 B 型 DNA 中

富含 AT 的序列,进而诱导构象变化促进增强子中转录因子复原。HMGA2 蛋白参与许多生物不同生理过程,如调节转录、胚胎发生、分化、致癌性转化以及病毒基因组的整合和表达<sup>[9]</sup>。

由于 HMGA2 编码基因位于许多肿瘤细胞染色体断裂点的簇集区,所以它的异常表达与肿瘤发生有关。HMGA1 和 HMGA2 的高水平表达与肿瘤高度恶性表现型、转移和低生存率有关,因此是一个不良预后指标<sup>[10]</sup>。最近研究证实 HMGA2 与多种上皮源性恶性肿瘤的转化、生长和分化密切相关<sup>[11]</sup>,如甲状腺癌、乳腺癌、口腔鳞癌及非小细胞肺癌。Piscuoglio 等<sup>[12]</sup>发现在正常胰腺组织、胰腺上皮内瘤变和侵袭性胰腺癌中 HMGA1 和 HMGA2 的平均表达量逐渐增加,与肿瘤的恶性级别及进展呈正相关,并与新生物的分化和淋巴结转移高度相关。

本实验结果显示转染 HMGA2 过表达质粒的垂体生长激素腺瘤细胞增殖能力较空载体组增强 ( $P < 0.05$ ),过表达 HMGA2 促进了垂体生长激素腺瘤细胞增殖。流式细胞仪检测细胞周期结果显示转染组 G<sub>1</sub> 期细胞所占比例较空载体组明显减少,而 S 期细胞所占比例明显增加,可能与 HMGA2 调节下游相关蛋白有关,研究表明 HMGA2 通过增强 E2F 转录因子 1 活性诱导垂体肿瘤发生<sup>[13]</sup>。HMGA2 与视网膜母细胞瘤蛋白(pRB)相互作用,取代了磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白/E2F 转录因子 1(pRB/E2F1)复合物中的组蛋白脱乙酰基酶 1 (HDAC1),增加了 E2F1 乙酰化和转录活性。除此之外 HMGA2 还可以直接作用于 E2F1 敏感元件,增强 E2F1 与 DNA 结合能力。与上述结果一致,HMGA2 转基因和 E2F1 基因敲除杂交鼠中 E2F1 活性功能性的丢失明显的减少了垂体腺瘤的发生率<sup>[13]</sup>。垂体特异性转录因子-1(pit-1)是一个与垂体细胞发育和分化有关的转录因子,其高表达是人类生长激素(GH)和催乳素(PRL)腺瘤的一个恒定特点,有研究表明 HMGA2 蛋白可以结合 pit-1 及其敏感 DNA 元件,以此正向调节 pit-1 启动子,同时 HMGA2 还可以与 pit-1 协同作用,促进 pit-1 表达上调<sup>[14]</sup>。研究证明,在 HMGA 转基因鼠垂体腺瘤中, HMGA 蛋白正向调控 pit-1 转录,诱导垂体肿瘤中 pit-1 过度表达<sup>[15]</sup>。此外, HMGA2 还可以上调 CCNB2 基因诱导垂体瘤发生。CCNB2 可以编码周期蛋白 B2,它是 B 型周期蛋白家族的一员,是细胞周期调节装置的主要成分, HMGA2 蛋白主要通过结合细胞周期蛋白 B2 基因启动子,上调其活性,诱导垂体瘤发生<sup>[16]</sup>。本实验中 HMGA2 过表达促进垂体生长激素腺瘤细胞增殖并且促进 G<sub>1</sub> 期进展,表明过表达 HMGA2 在垂体肿瘤发生中具有重要作用,具体机制有待进一步实验证实。

本实验基于成功培养原代垂体生长激素腺瘤细胞后进行,其性质和特点上更接近于肿瘤在人体原始状态,这为垂体腺瘤的生物治疗提供了新的治疗靶点,同时也为垂体腺瘤机制的进一步探索提供了基础。

#### 参考文献:

[1] 徐伟光,王海军,黄锦桃,等.人垂体腺瘤细胞原代培养的纯化及其激素的表达与分泌[J].中山大学学报:医学科学版,2006,27(1):7-10.  
[2] D' Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, et al. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas; down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HM-

GA2, and E2F1[J]. Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(7): E1128-1138.

- [3] Palmieri D, D' Angelo D, Valentino T, et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis [J]. Oncogene, 2012, 31(34):3857-3865.  
[4] 项颖,李启英,王莉,等. DC-CIK 细胞对人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(14):1571-1574.  
[5] Du Y, Yan L, Wang J, et al.  $\beta$ 1-Adrenoceptor autoantibodies from DCM patients enhance the proliferation of T lymphocytes through the  $\beta$ 1-AR/cAMP/PKA and p38 MAPK pathways[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e52911.  
[6] 田昕,罗颖,闫永波,等. 蟾蜍灵对人食管癌鳞癌 EC9706 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2012, 34(6):556-562.  
[7] Abe R, Beckett J, Abe R, et al. Olive Oil Polyphenols Differentially Inhibit Smooth Muscle Cell Proliferation through a G<sub>1</sub>/S Cell Cycle Block Regulated by ERK1/2 [J]. Int J Angiol, 2012, 21(2):69-76.  
[8] Li Y, Li D, Yuan S, et al. Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G<sub>2</sub>/M phase via the mitochondrial pathway [J]. Oncol Lett, 2013, 5(3):1005-1009.  
[9] Qian ZR, Asa SL, Siomi H, et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas [J]. Modern Pathol, 2009, 22(3):431-441.  
[10] Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(12):899-910.  
[11] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene [J]. Genes Dev, 2007, 21(9):1025-1030.  
[12] Piscuoglio S, Zlobec I, Pallante P, et al. HMGA1 and HMGA2 protein expression correlates with advanced tumour grade and lymph node metastasis in pancreatic adenocarcinoma [J]. HistoPathology, 2012, 60(3):397-404.  
[13] Fedele M, Visone R, De Martino I, et al. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity [J]. Cancer Cell, 2006, 9(6):459-471.  
[14] Fedele M, Palmieri D, Fusco A. HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? [J] Mol Cell Endocrinol, 2010, 326(1-2):19-24.  
[15] Palmieri D, Valentino T, De Martino I, et al. PIT1 upregulation by HMGA proteins has a role in pituitary tumorigenesis [J]. Endocr Relat Cancer, 2012, 19(2):123-135.  
[16] De Martino I, Visone R, Wierinckx A, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas [J]. Cancer Res, 2009, 69(5):1844-1850.