

网络出版时间:2023-10-08 15:59:18 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1225.001

◇基础医学研究◇

磷酸钙纳米颗粒介导干扰 LMO4 对皮肤鳞癌细胞增殖的影响

项明华¹, 郭立钰², 涂珍珍³, 王月⁴, 周海胜³

摘要 目的 运用磷酸钙纳米颗粒包裹 DNA 转染皮肤鳞癌细胞,以靶向干扰 LIM 结构域蛋白 4 (LMO4) 表达,探讨转录因子 LMO4 在皮肤鳞癌中作用和机制。方法 采用逆转录-定量 PCR 技术 (RT-qPCR)、免疫组织化学和蛋白质免疫印迹技术检测目的分子表达。利用经典方法制备磷酸钙纳米颗粒,包裹含有靶向干扰 LMO4 的 shRNA 表达载体,转染人皮肤鳞癌细胞 A431。采用噻唑蓝 (MTT) 方法检测细胞增殖能力;运用流式细胞分析技术检测细胞周期变化。结果

LMO4 在皮肤鳞癌组织和 A431 细胞中高水平表达。磷酸钙纳米颗粒与 DNA 的最佳包裹比例为 10:1。此纳米颗粒包裹的 DNA 可以有效转染 A431 细胞并有效干扰 LMO4 表达,与脂质体转染后的干扰效率相比,差异无统计学意义 ($P = 0.21$)。在 A431 细胞中干扰 LMO4 后的 24、36 和 48 h,细胞的增殖能力较对照组均显著降低。细胞周期分析显示:干扰组 G₀/G₁ 期细胞为 39.82% ± 1.86%,与对照组 G₀/G₁ 期细胞 (30.76% ± 1.96%) 相比,差异有统计学意义 ($P = 0.003$);干扰组的 S 期细胞为 39.56% ± 0.65%,与对照组的 S 期细胞 (50.65% ± 0.62%) 比较,差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。干扰 LMO4 表达可以抑制细胞周期素蛋白 E 和周期素蛋白激酶 2 (CDK2) 的表达。结论 磷酸钙纳米颗粒能有效包裹 DNA,并具有较高的转染效率;干扰 LMO4 表达可抑制细胞周期素蛋白 E 和 CDK2 的表达,抑制细胞增殖。

关键词 磷酸钙纳米颗粒;LMO4;皮肤鳞癌细胞;细胞增殖;细胞周期

中图分类号 R 739.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1807-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.001

纳米颗粒作为运送基因或药物的载体,在生物医学研究中得到广泛应用。磷酸钙纳米颗粒 (calcium phosphate nanoparticles, NP) 作为一种新型的非病毒载体,可用于包裹目的基因转染真核细胞^[1]。LIM 结构域蛋白 4 (lim-domain protein 4, LMO4) 是有 2 个串联重复排列的、富含半胱氨酸-组氨酸的 LIM 结构域,故属于 LMO 蛋白家族成员。LMO4 作为核内转录因子,不与 DNA 分子直接发生作用,而是协助其他转录因子以调节靶基因的表达^[2]。研究^[3-6]表明在胚胎发育过程中,LMO4 调控生殖细胞、表皮细胞和上皮细胞的增殖、分化和迁移。多项研究^[7-9]表明上皮来源的多种肿瘤如乳腺癌、胰腺癌、肺癌和食管癌等肿瘤细胞中 LMO4 的表达显著增加,与肿瘤细胞的增殖和凋亡存在密切关系。为了探讨 LMO4 在皮肤鳞癌中作用和机制,分析皮肤鳞癌组织和细胞系中 LMO4 的表达水平,构建表达靶向干扰 LMO4 的 shRNA,利用 NP 包裹这种表达载体,转染皮肤鳞癌细胞,观察其增殖能力并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、琼脂糖、枸橼酸钠、磷酸氢二钠、氯化钙和泡沫消除剂 (聚醚 F68) 均为国产化学试剂 (化学分析纯),购自北京索来宝科技有限公司;高糖 DMEM 培养基和青-链霉素双抗试剂购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司;细胞周期素蛋白 (Cyclin) D1 和 E1 抗体均购自美国 Cell Signaling Technologies 公司;GAPDH 抗体、LMO4 抗体、细胞周期素蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 2 和 4 均购自美国 Abcam 公司;检测细胞增殖的噻唑蓝试剂盒 (thiazolyl blue, MTT)、细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;引物 (表 1) 均由上海生工生物工程有限公司合成;TRIzol 试剂盒和转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒、PCR 检测试剂盒均购自大连宝生生物公司。

2023-05-12 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81772909);安徽高校自然科学基金项目 (编号:KJ2019A0946)

作者单位:¹ 安徽医科大学生物医学工程学院应用物理学系,合肥 230032

² 深圳湾实验室,深圳 518107

³ 安徽医科大学基础医学院生物化学教研室,合肥 230032

⁴ 安徽医科大学临床医学院,合肥 230031

作者简介:项明华,女,实验师;

周海胜,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

表1 检测目的基因引物

基因	序列号	PCR产物 (bp)	引物序列(5'-3')
β -actin	NM_001101.5	203	F:CCTCGCCTTTGCCGATCC R:AATCCTTCTGACCCATGCC
LMO4	NM_001369491.1	91	F:AGTCTTGATTGCCCTTCCCG R:AGTCTCCATTAGCCGAGGT
Cyclin E	NM_001238.4	105	F:AGAGGAAGGCAAACGTGACC R:TATTGTCCCAAGGCTGGCTC
Cyclin D1	NM_053056.3	113	F:AGCTGTGCATCTACACCGAC R:GAAATCGTGGGGGTCATTG
CDK2	NM_001798.5	155	F:CATCTTTGCTGAGATGCTGACTCG R:ACTTGGGAAACTTGGCTTGT
CDK4	NM_000075.4	141	F:GGTGTATGGGCGCTAGGAA R:CACCGACACCAATTCAGCC

1.2 组织、细胞系与载体 人皮肤鳞癌组织来自安徽省立医院皮肤科,在完成临床组织病理分析后剩余的标本;人正常皮肤组织来自安徽省立医院泌尿外科门诊包皮环切手术后遗弃的组织标本。人皮肤鳞癌细胞系 A431 和永生化的人角质形成细胞系 (human immortalized epidermal cells, HaCat) 均为所在研究室保存。干扰 LMO4 的干扰序列 shRNA-L1 和 L2 为研究室设计,载体 GV248、干扰 LMO4 质粒 shRNA-L1 和 shRNAc-L2 均为课题组保存。

1.3 方法

1.3.1 NP 制备 根据文献^[1]提供方法制备 NP。制备过程描述如下:将 50 ml 的 0.05 mol/L 氯化钙、10 ml 1% SDS 和 10 ml 1% F68 混合,持续搅拌 24 h 以制备均匀的微乳液 A;同时将 50 ml 的 0.025 mol/L 磷酸氢二钠、50 ml 的 0.025 mol/L 枸橼酸钠、10 ml 1% SDS 和 10 ml 1% F68 混合,搅拌 24 h 以制备均匀的微乳液 B。再将微乳液 B 以 10 ml/h 的速度缓慢加入到微乳液 A 中,并在 35 °C 搅拌 72 h,以促进两种微乳液充分混合。将混合液 15 000 r/min 离心 15 min 获得纳米颗粒,75% 乙醇洗涤 4 次,加入 15 ml 去离子水进行超声匀化(频率 22 kHz,功率 120 W)1 h。获得的纳米颗粒溶液置于 -70 °C 冰箱中快速冷冻 2 h,再转入冷冻干燥箱放置 48 h,从而获得 NP 粉末备用。

1.3.2 NP 包被 DNA 及包裹效率分析 将制备的 NP 分别与 shRNA-L1、shRNA-L2 按照质量比 10:1、5:1 混合后,加入 0.05 mol/L 的氯化钙重悬,室温放置 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀备用。将上清液进行琼脂糖凝胶电泳分析纳米颗粒包裹 DNA 的效果。确定包裹方案,包裹载体 GV248,作为纳米颗粒介导的载体 DNA(nanoparticles media-

ted vectors, NP/sh-V);包裹的 NP/shRNA-L1 和 NP/shRNA-L2 混合,制备纳米颗粒介导的干扰 LMO4 混合液(nanoparticles mediated interfering LMO4, NP/sh-L)。制备好的纳米包裹 DNA 液于 4 °C 保存、备用。

1.3.3 细胞培养与转染 人皮肤鳞癌细胞系 A431 细胞和人皮肤角质形成细胞 HaCat 细胞均使用含 10% 热失活的 FBS 和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养基,放置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。按照脂质体 Lipofectamine 3000 说明书操作步骤,包裹 shRNA-L1、shRNA-L2,并将二者混合形成脂质体介导的干扰 LMO4 (liposome mediated interfering LMO4, Lip/sh-L);同时使用脂质体包裹载体 GV248 (Lip/sh-V),分别转染 A431 细胞。将纳米颗粒包裹的 NP/sh-L 或 NP/sh-V 加入 A431 细胞,进行瞬时转染,转染的细胞数量和 DNA 量与脂质体转染保持一致。转染后培养 24 h,更换新鲜培养基继续培养,用于后续实验。

1.3.4 逆转录-定量 PCR (RT-qPCR) 根据 TR-Izol 试剂说明书提取细胞总 RNA。参照试剂盒说明进行逆转录。PCR 反应条件为 94 °C 变性 4 min,按照 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 32 个循环,最后 72 °C 延伸 8 min。每个样品均设置 β -actin 作为内参基因。

1.3.5 免疫组织化学 脱蜡处理组织切片,枸橼酸盐修复抗原,内源性过氧化物酶进行封闭。兔源抗体 LMO4 在 4 °C 孵育过夜;次日依次滴加反应增强液和增强型酶标记二抗,室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木精染细胞核,自来水冲洗染料,烘干后使用中性和树脂封闭玻片;显微镜观察和拍片。

1.3.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验 收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min;细胞裂解液置于 100 °C 水浴 10 min,使蛋白发生变性;进行 12% 聚丙烯酰胺-SDS 电泳分离蛋白质;再以 170 mA 稳定电流转膜 1.5 h;含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭 40 min;分别加入对应的抗体 4 °C 孵育过夜;次日漂洗后加入酶标记二抗室温孵育 6 h,增强化学发光曝光显影。

1.3.7 细胞增殖实验 用 DMEM 制备 2×10^5 /ml 的细胞悬液,在 96 孔板中每孔接种 500 个细胞,接种后 12 h (细胞贴壁),在 12、24、36、48 h 等 4 个时间点,根据 MTT 试剂说明书操作。每孔加入 10 μ l 新配制好的 MTT 溶液,在培养箱内孵育 4 h,每孔加入 100 μ l 的甲臞溶液,在培养箱内继续孵育,直

至甲贇完全溶解,在 490 nm 测定吸光度值(A_{490})。

1.3.8 细胞周期分析 按照细胞周期检测试剂盒说明书操作,简要描述如下:收集细胞,制备单细胞悬液,离心后去除上清液,在细胞中加入 70% 预冷乙醇 500 μ l 固定 4 $^{\circ}$ C 过夜;去除固定液、洗涤细胞,细胞沉淀中加入 100 μ l RNase A 溶液,重悬细胞,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min;再加入 400 μ l 的碘化丙啶染色液混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。流式细胞仪检测分析细胞周期。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LMO4 在皮肤组织和细胞中表达 利用收集的皮肤鳞癌组织和正常人皮肤组织,进行免疫组织化学分析。结果显示(图 1A):LMO4 表达定位在细胞核。在正常人皮肤组织中的表达水平较低,主要分布在表皮的基底层细胞,棘层、颗粒层和角化层等位置均没有检测到 LMO4 表达;而在皮肤鳞癌组织中,LMO4 的表达水平显著增加。

为了研究 LMO4 在皮肤鳞癌发生中的作用和机制,选择了正常人皮肤来源的角质形成细胞 HaCat 和皮肤鳞癌细胞 A431 作为研究对象。首先在 mRNA 水平利用 RT-qPCR 方法对 LMO4 进行检测。结果显示(图 1B):皮肤鳞癌 A431 细胞中 LMO4 的表达水平显著增加,是正常 HaCat 细胞的 4 倍。进一步在蛋白质水平利用 Western blot 进行验证,结果显示(图 1C):LMO4 在 A431 的表达水平较 HaCat 明显增加。因此,LMO4 在皮肤鳞癌组织和鳞癌细胞中均具有较高的表达水平,由此推测 LMO4 可能参与皮肤鳞癌的发生、发展过程。

2.2 纳米颗粒包裹 DNA 效率和干扰效率 根据人 LMO4 的 mRNA 序列和表达载体 GV248 结构,设计并构建了 2 个可以表达干扰 RNA 的表达载体 shRNA-L1 和 shRNA-L2(图 2A),用于干扰 LMO4 的表达。目的基因插入位置是在 GV248 载体的 AgeI 和 EcoRI 位点(图 2B)。将纳米颗粒与 DNA (shRNA-L1 和 shRNA-L2) 按照质量比(μ g)为 5 : 1 和 10 : 1 的比例进行混合,以包裹质粒 DNA。将这些包裹的 DNA 溶液进行离心后,收集的上清液进行琼脂糖凝胶电泳,以检测上清液中残留 DNA,从而判断包裹效率。如图 2C 显示:在 5 : 1 的上清液中残留较多 DNA,包裹效率较低;而在 10 : 1 组的上清

液中未见残留 DNA,显示较好的包裹效果。在后续实验中,将纳米颗粒按照 10 : 1 包裹 DNA。

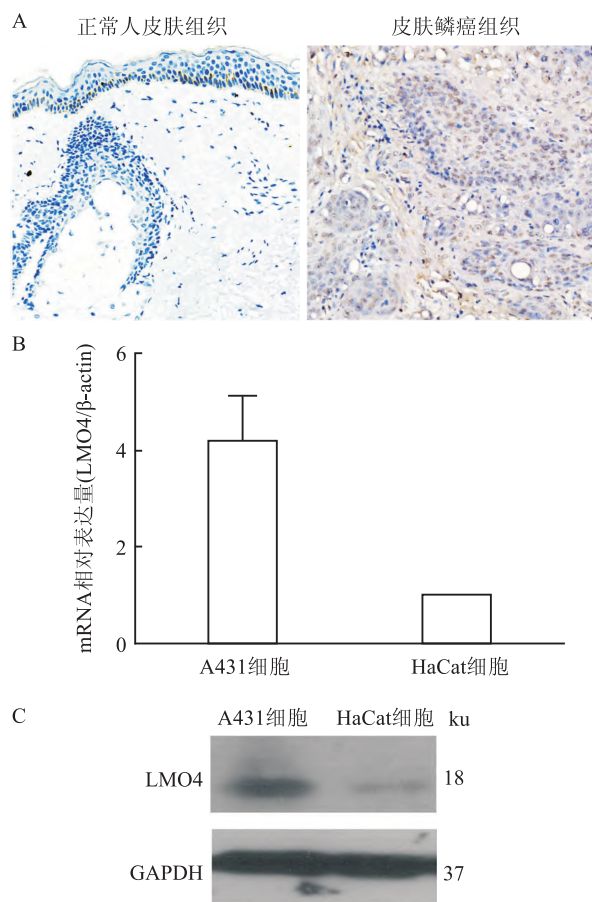


图 1 LMO4 在皮肤组织和细胞中的表达

A:免疫组织化学检测 LMO4 在皮肤组织和皮肤鳞癌组织中表达 $\times 200$;B:RT-qPCR 检测 LMO4 在 HaCat 和 A431 细胞中表达;C:Western blot 检测 HaCat 和 A431 细胞中 LMO4 的表达

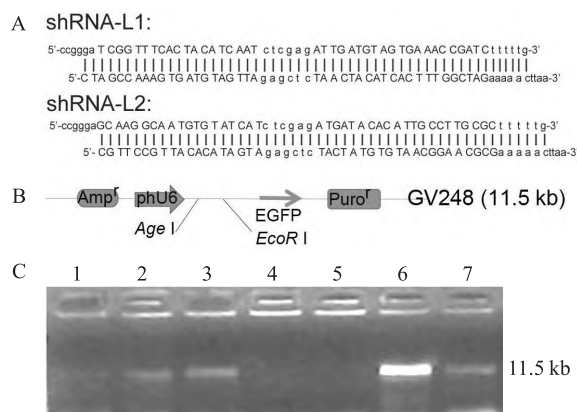


图 2 shRNA 表达载体构建及 NP 包裹 DNA 检测

A:靶向干扰 LMO4 的 shRNA 序列,中间小写字母为环结构;B:shRNA 表达载体图谱;C:琼脂糖电泳检测 NP 包裹质粒 DNA 效率;1:纳米颗粒(NP);2:NP : shRNA-L1 = 5 : 1;3:NP : shRNA-L2 = 5 : 1;4:NP : shRNA-L1 = 10 : 1;5:NP : shRNA-L2 = 10 : 1;6,7:shRNA-L1、shRNA-L2 质粒 DNA

为了检测转染效率和干扰效率,分别将纳米颗粒包裹的 DNA (NP/sh-L 和 NP/sh-V) 和脂质体包裹 DNA (Lip/sh-L 和 Lip/sh-V) 瞬时转染 A431 细胞,提取细胞总 RNA 进行 RT-qPCR 检测 LMO4 的表达水平。结果显示(图 3A):在 Lip/sh-L 组细胞和 NP/sh-L 组细胞中 LMO4 的表达水平,分别是 A431 细胞组的 64% ± 12.5% 和 55.0% ± 14.3%,分析显示差异有统计学意义 ($P = 0.0021$, $P = 0.03$)。但是 Lip/sh-L 组细胞与 NP/sh-L 组细胞相比,LMO4 的表达差异无统计学意义 ($P = 0.21$)。Western blot 检测结果脂质体和 NP 转染的干扰载体,都能降低 LMO4 的表达(图 3B)。灰度分析显示(图 3C):Lip/sh-L 组中 LMO4 的表达水平是 A431 组细胞的 74.0% ± 4.5%,差异有统计学意义 ($P = 0.024$)。NP/sh-L 转染组的细胞中 LMO4 的表达水平是 A431 细胞的 51.0% ± 3.0%,差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。可见 Lip/sh-L 和 NP/sh-L 转染的细胞,LMO4 的表达均得到有效抑制。

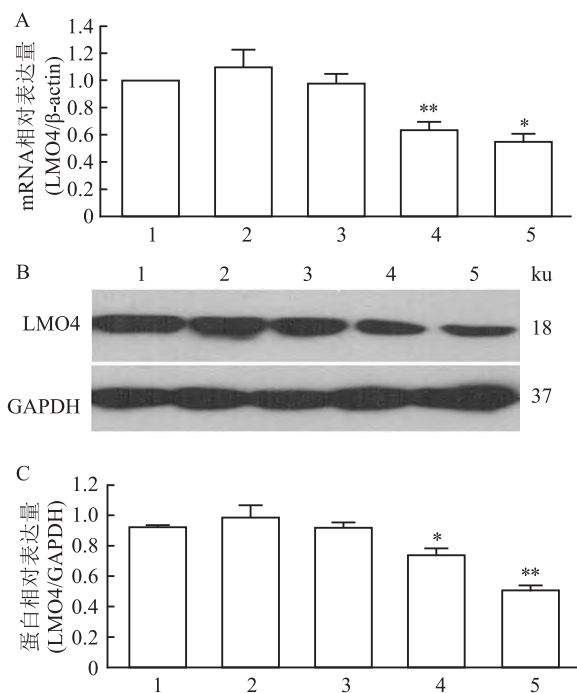


图3 A431 细胞 LMO4 干扰效率分析

A: RT-qPCR 检测 A431 中 LMO4 的表达; B: Western blot 检测 A431 中 LMO4 表达; C: Western blot 检测后灰度分析蛋白质的相对量; 1: A431 组; 2: Lip/sh-V 组; 3: NP/sh-V 组; 4: Lip/sh-L 组; 5: NP/sh-L 组; 与 A431 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 干扰 LMO4 对 A431 细胞增殖和细胞周期的影响

为了研究干扰 LMO4 的表达对 A431 细胞增殖的影响,使用 MTT 法检测细胞增殖能力,结果显

示(图 4):在转染后 24、36 和 48 h, NP/sh-L 组吸光度值 (A_{490}) 分别为 0.28 ± 0.01 、 0.31 ± 0.11 、 0.38 ± 0.18 ; NP/sh-V 组的 A_{490} 分别为 0.39 ± 0.02 、 0.54 ± 0.02 、 0.73 ± 0.11 。与 A431 组相比, NP/sh-L 组 A_{490} 在 24 h ($P = 0.011$)、36 h ($P = 0.002$) 和 48 h ($P = 0.001$) 等时间点的表达差异均有统计学意义。因此,A431 细胞在干扰 LMO4 时,其细胞的增殖能力显著降低。

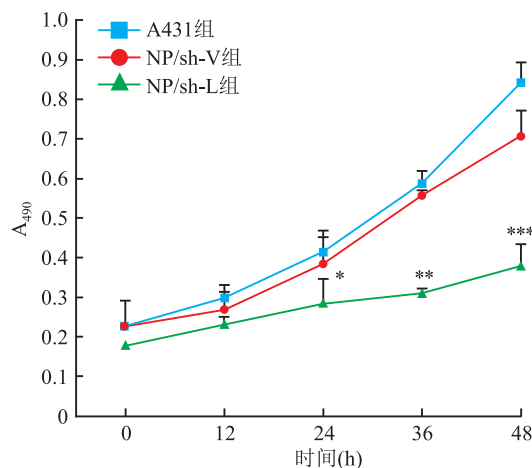


图4 干扰 LMO4 对细胞增殖能力的影响

与 NP/sh-V 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

为了进一步研究 LMO4 调节细胞增殖的机制,采用碘化丙啶染色 DNA 方法,通过流式细胞分析技术观察细胞周期的变化。结果显示(图 5A):在 A431 组细胞中,处于 G_0/G_1 期的细胞比例为 $30.76\% \pm 1.96\%$; NP/sh-L 组细胞中 G_0/G_1 期细胞比例为 $39.82\% \pm 1.86\%$,二者相比,差异有统计学意义 ($P = 0.003$)。A431 组细胞中 S 期的细胞的比例为 $50.65\% \pm 0.62\%$, NP/sh-L 组细胞中 S 期细胞比例为 $39.56\% \pm 0.65\%$,二者相比,差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。而 G_2/M 期细胞在 NP/sh-L 组与 A431 组之间比较,二者的差异无统计学意义 ($P = 0.517$)。可见干扰 LMO4 可以阻止细胞从 G_1 期进入 S 期。

为探讨 LMO4 调控细胞周期的机制,利用 RT-qPCR 方法对 Cyclin D1、Cyclin E、CDK2 和 CDK4 进行了检测。结果显示 NP/sh-L 组细胞中 Cyclin E 和 CDK2 较对照组明显降低。其中,Cyclin E 是 NP/sh-V 组细胞的 0.36 ± 0.03 倍,差异有统计学意义 ($P = 0.016$); NP/sh-L 组细胞中 CDK2 是 NP/sh-V 组细胞的 0.49 ± 0.02 倍,差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。干扰 LMO4 的表达对 Cyclin D1 和 CDK4

的表达没有明显影响(图 5B)。Western blot 方法检测 Cyclin D1、Cyclin E 及 CDK2 和 CDK4 等蛋白的表达变化,与 RT-qPCR 的结果一致(图 5C)。因此,LMO4 可以通过调控 Cyclin E 和 CDK2 表达,影响细胞周期的变化。

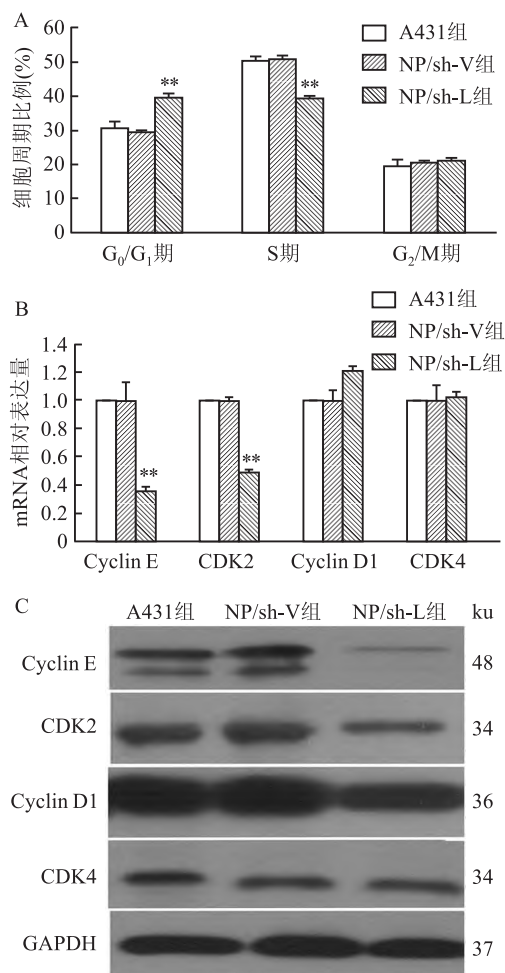


图5 干扰 LMO4 对 A431 细胞周期的影响

A: 各个细胞周期中的细胞比例; B: RT-qPCR 检测 Cyclin E、D1 及对应激酶 CDK2 和 CDK4 的表达变化; C: Western blot 检测 Cyclin E、D1、CDK2 和 CDK4 的表达变化,与 A431 组比较; ** $P < 0.01$

3 讨论

将目的基因转入真核细胞,常见的有脂质体转染、磷酸钙转染、电转染或病毒介导等方法,因操作过程较为繁琐,要求具有较高的实验条件,且需要较高的实验成本,在应用中受到一定限制。利用磷酸盐和氯化钙聚合形成直径为 23.5 ~ 34.5 nm 的纳米颗粒,具有易制备、实验成本低和较低的细胞毒性,且不具有免疫原性等优点^[1],具有一定应用价值。在氯化钙修饰制备的纳米颗粒时,改变了纳米颗粒

表面带电性,包裹带负电的 DNA 时能提高包裹效率^[10]。利用此方法制备的纳米颗粒可以有效包裹干扰载体 DNA,与传统的脂质体介导基因转移相比,其转染效率和干扰效率具有较好的一致性。

LMO4 作为核内转录因子,协助其他转录因子以调节靶基因的表达^[2]。由于胚胎发育时 LMO4 参与调控表皮细胞的增殖、分化和迁移^[3-6];而在正常皮肤组织中,LMO4 仅仅在基底层细胞中表达,其功能是参与维持角质形成细胞的增殖、分化和迁移,保持表皮层细胞的更新^[11]。有研究^[12-14]表明在上皮组织来源的肿瘤,如乳腺癌、非小细胞型肺癌、鳞状细胞癌、胰腺癌等肿瘤中,LMO4 的表达水平均显著增加,且 LMO4 参与调控这些肿瘤细胞的增殖、迁移和转移。因此,LMO4 与肿瘤细胞恶性生物学行为密切相关。免疫组织化学检测证实 LMO4 在皮肤鳞癌组织显著增加;细胞水平检测也表明 LMO4 在皮肤鳞癌细胞中表达水平较正常皮肤角质形成细胞显著增加。提示 LMO4 可能参与调控皮肤鳞癌的发生。

在皮肤鳞癌细胞系 A431 中靶向干扰 LMO4 的表达,结果显示敲低 LMO4 的表达,能显著抑制 A431 细胞的增殖。在干扰 LMO4 表达的细胞中,G₂/M 期细胞没有受到影响,而主要变化是 G₀/G₁ 期细胞数量显著增加,S 期细胞较对照组细胞明显减少。因此,干扰 LMO4 表达,有利于细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期。已知调节细胞周期的主要是周期素蛋白包括有 A、B、D 和 E 等 5 种类别。其中,Cyclin D1 和 E 主要调控细胞 G₁ 期到 S 期,Cyclin D1 能激活 CDK4 调控 G₁ 期细胞生长;Cyclin E 激活 CDK2 调控 S 期的染色体复制^[12]。在 A431 细胞中干扰 LMO4 时,Cyclin E 表达显著降低,同时伴随 CDK2 表达减少;而 Cyclin D1 和 CDK4 的表达变化不明显。这些结果与细胞周期的变化具有一致性。有研究^[15]表明在乳腺癌细胞中敲低 LMO4 后,Cyclin D1 和 E 的表达显著降低,导致细胞停留在 G₂/M 期,这可能是 LMO4 在不同类型肿瘤细胞中作用机制存在差异性。

参考文献

- [1] Liu T, Tang A, Zhang G, et al. Calcium phosphate nanoparticles as a novel nonviral vector for efficient transfection of DNA in cancer gene therapy [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20 (2): 141 - 9.
- [2] Biben C, Weber T S, Potts K S, et al. *In vivo* clonal tracking reveals evidence of haemangioblast and haematomesoblast contribu-

- tion to yolk sac haematopoiesis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 41–55.
- [3] Kenny D A, Jurata L W, Saga Y, et al. Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(19): 11257–62.
- [4] Hahm K, Sum E Y, Fujiwara Y, et al. Defective neural tube closure and anteroposterior patterning in mice lacking the LIM protein LMO4 or its interacting partner Deaf-1[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2074–82.
- [5] Tse E, Smith A J, Hunt S, et al. Null mutation of the Lmo4 gene or a combined null mutation of the Lmo1/Lmo3 genes causes perinatal lethality, and Lmo4 controls neural tube development in mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5):2063–73.
- [6] Singh N, Singh D, Modi D. LIM homeodomain (LIM-HD) genes and their co-regulators in developing reproductive system and disorders of sex development[J]. *Sex Dev*, 2022, 16(2–3): 147–61.
- [7] 李静怡, 申秀锦, 邓红. LMO4 调节肿瘤发生过程中的上皮-间质转化[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2011, 40(1):107–11.
- [8] Matthews J M, Lester K, Joseph S, et al. LIM-domain-only proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 111–22.
- [9] Chen M, Xia Z, Deng J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miR-655-3p inhibit the development of esophageal cancer by regulating the expression of HIF-1 α via a LMO4/HDAC2-dependent mechanism[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(4): 1319–39.
- [10] 陈崧, 何远丽, 谢雯佳, 等. 磷酸钙纳米颗粒药物递送系统在骨组织工程研究与应用中的优势[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(22):3565–70.
- [11] Zabihi M, Lotfi R, Yousefi A M, et al. Cyclins and cyclin-dependent kinases: from biology to tumorigenesis and therapeutic opportunities[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(4): 1585–606.
- [12] 郭立钰, 刘蒙蒙, 涂珍珍, 等. 转录因子 LMO4 调控前列腺癌细胞增殖及其机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5):659–65.
- [13] Wang W, Wu S, Guo M, et al. LMO4 is a prognostic marker involved in cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(12):3682–90.
- [14] Yu J, Ohuchida K, Nakata K, et al. LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7(1): 93–102.
- [15] Montañez-Wiscovich M E, Seachrist D D, Landis M D, et al. LMO4 is an essential mediator of ErbB2/HER2/Neu-induced breast cancer cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2009, 28(41):3608–18.

The effect of calcium phosphate nanoparticles-mediated interference of LMO4 on skin squamous cells

Xiang Minghua¹, Guo Liyu², Tu Zhenzhen³, Wang Yue⁴, Zhou Haisheng³

(¹Dept of Applied Physics, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518107; ³Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ⁴School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate lim domain protein 4 (LMO4) functions and mechanisms in regulating proliferation of skin squamous cells (A431), the shRNAs targeted to human LMO4 were coated by calcium phosphate nanoparticles (NP) and transfected into A431 cells to inhibit LMO4 expression. **Methods** Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), immunohistochemistry analysis and Western blot were used to detect expression of the interest genes. The expression vectors with shRNA targeted to human LMO4 (NP/sh-L) were coated by the calcium phosphate nanoparticles, and transfected into A431. The MTT assay was conducted to determine cell proliferation after transfected for 24, 36 and 48 h. Cells were stained with propidium iodide and examined cell cycles by using flow cytometry. **Results** LMO4 expressed at higher levels both in the skin squamous tissues and A431 cells. DNA-binding efficiency of NP/sh-L showed that the better combined ratio between calcium phosphate nanoparticles and DNA was 10 : 1. There was no significant difference of transfection efficiency between the NP/sh-L and lipofection approaches. The MTT assay showed that silencing LMO4 inhibited proliferation of cells. RNAi-induced LMO4 inhibition exerted cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. Both CDK2 and cyclin E were downregulated in the A431 cells transfected with NP/sh-L comparing to the controls. However, LMO4 knock-down did not alter expression of CDK4 and cyclin D1. **Conclusion** The calcium phosphate nanoparticles could bind and transfer the foreign DNA into the targeted cells with high efficiency. Silencing LMO4 decreased expression of cyclin E and CDK2 resulted in inhibition of cell proliferation.

Key words calcium phosphate nanoparticles; LMO4; skin squamous cells; cell proliferation; cell cycle