DOI:10.16016/j.1000-5404.201501238

论著

MicroRNA-193b 对 K562 细胞 bcr/abl 表达的影响

舒 燕,齐杰玉,王灿蔚,于淑静,陶 崑 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院免疫学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 用 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒感染 K562 细胞,探讨 miR-193b 在细胞中过表达对 bcr/abl 表达的影响。**方法** 将前期构建的 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒感染 K562 细胞后,采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-193b 的表达;qRT-PCR 检测 bcr/abl 融合基因的表达;Western blot 检测 BCR/ABL 融合蛋白的表达;CCK-8 检测 K562 细胞的增殖情况,流式细胞术(FCM)检测 K562 细胞凋亡率。**结果** 与对照比较,K562 细胞感染 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒后,miR-193b 表达明显升高;bcr/abl 融合基因及 BCR/ABL 融合蛋白表达明显下调;K562 细胞增殖能力明显降低($P<0.05$),凋亡水平明显升高($P<0.05$)。**结论** miR-193b 可下调 bcr/abl 表达,抑制 K562 细胞的生物学效应,过表达 miR-193b 能作为治疗 CML 的有效手段。

[关键词] miR-193b;K562 细胞;bcr/abl
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R733.72 [文献标志码] A

MicroRNA-193b down-regulates bcr/abl in K562 cells

Shu Yan, Qi Jieyu, Wang Canwei, Yu Shujing, Tao Kun (Department of Immunology, Research Center of Molecular Medicine and Cancer, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of miR-193b over-expression on the expression of bcr/abl in chronic myelocytic leukemia K562 cells by transfection of recombinant adenovirus of Ad-pre-microRNA-193b. **Methods** After K562 cells were infected by Ad-pre-microRNA-193b virus, the expression of miR-193b was detected by real-time PCR. The expression of bcr/abl at mRNA and protein levels was detected by qRT-PCR and Western blotting. Cell proliferation was measured by CCK-8 assay, and cell apoptosis was tested by flow cytometry. **Results** Compared with control cells, the level of microRNA-193b was significantly up-regulated in K562 cells after Ad-pre-microRNA-193b infection. The expression of bcr/abl was significantly decreased, and BCR/ABL fusion protein was decreased too. The virus infection resulted in significant inhibition in cell proliferation and obvious improvement in apoptotic rate (both $P<0.05$). **Conclusion** miR-193b down-regulates the expression of bcr/abl and inhibits the biological effects of K562 cells. The over-expression of miR-193b may be an effective target in the treatment of chronic myelogenous leukemia.

[**Key words**] microRNA-193b; K562 cells; bcr/abl

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5369S). Corresponding author: Tao Kun, E-mail: taokun68@126.com

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种起源于造血干细胞的恶性血液系统疾病,其发生是由于 t(9;22)(q34;q11)所致的 bcr/abl 融合基因并编码产生具有强烈酪氨酸激酶活性的 BCR/ABL 融合蛋白(P210),后者使造血干细胞发生异常转化而导致 CML 形成。在 CML 的治疗中,传统的放、化疗副作用比较大,最有效的方法慢性期异基因造血干细胞移植受供体来源的影响,目前,主要是针对 BCR/

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5369S)
[通信作者] 陶 崑,E-mail: taokun68@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150715.1033.005.html (2015-07-15)

ABL进行靶向治疗的酪氨酸激酶抑制剂——STI571[1],但易产生耐药。因此,探索其他治疗方法具有重要的实际意义。微小RNA(MicroRNA,miRNA)是一种长度为19~26 nt的非编码单链小分子核苷酸,在转录后通过抑制蛋白质的翻译或导致miRNA的降解来抑制基因的表达[2-3]。近年来,研究发现miRNA的表达失控与肿瘤发生密切相关,在肿瘤发生过程中可以起到癌基因或抑癌基因作用[4]。人微小RNA-193b(microRNA-193b,miR-193b)位于16号染色体上,在CML细胞株K562细胞中表达明显下调,同时它可抑制急性粒细胞白血病细胞生长及促进其凋亡[13]。鉴于此,本研究拟将前期构建的Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒感染K562细胞,实现miR-193b在其中高效表达,探索miR-193b对K562细胞bcr/abl表达的影响,旨在为寻找治疗CML的有效靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒由重庆医科大学基础医学院免疫学教研室构建并鉴定;K562细胞重庆医科大学基础医学院免疫学教研室保存;qRT-PCR试剂盒和miScript逆转录试剂盒均购自TaKaRa公司;引物由上海生工生物公司合成;CCK-8试剂盒购自Beyotime生物有限公司;兔抗人c-abl pAb购自cell signal公司,兔抗人β-actin pAb、HRP标记的羊抗兔IgG均购自北京四正柏公司。RPMI1640培养液、小牛血清均购自HyClone公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒感染K562细胞 将生长良好的K562细胞以2.5×10^6/孔接种于6孔板中。实验设3组,Ad-pre-miRNA-193b组和空载腺病毒组采用Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒和空载病毒Ad以最适感染复数(MOI=10)分别感染K562细胞;以未感染的K562细胞作为空白对照组。每组细胞培养48 h后于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,提取总RNA及总蛋白,检测miR-193b、bcr/abl融合基因及其融合蛋白的表达。

1.2.2 qRT-PCR检测miR-193b在K562细胞中的表达 分别用Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒和空载病毒Ad感染K562细胞,每组细胞培养48 h后,TRIzol提取每组总RNA。设计合成miR-193b茎-环结构的特异性逆转录引物,序列为:5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCATCT-3′,按照miScript逆转录试剂盒说明书逆转录总RNA得到cDNA。以U6为内参基因,采用实时荧光定量PCR检测3组基因表达水平,miR-193b引物序列:正义链5′-GCGGCGGCGGGGTTTTGAGGGC-3′,反义链5′-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3′;U6引物序列:正义链5′-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3,反义链5′-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3′,PCR条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,56 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,40个循环。溶解曲线:65 ℃~95 ℃,每5 s增加0.5 ℃。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$值计算目的基因的相对表达量。

1.2.3 qRT-PCR检测感染K562细胞中的bcr/abl融合基因的表达 分别用Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒和空载病毒Ad感染K562细胞,每组细胞培养48 h后,TRIzol提取每组总RNA。设计合成bcr/abl和β-actin引物序列。按照miScript逆转录试剂盒说明书将总RNA进行逆转录,得到cDNA。采用qRT-PCR法检测每组bcr/abl融合基因的表达水平,bcr/abl引物序列:正义链5′-GCAAGCTTACCATGGACATCCGTGG-3′,反义链5′-GTCGACCTTGCCATCAGAAGC-3′,β-actin引物序列:正义链5′-ACACTGTGCCCATCTACGAG-3′,反义链5′-CACAGGATTCCATACCCAAG-3′,反应条件都为95 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,40个循环。熔解曲线:65~95 ℃,每5 s增加0.5 ℃。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$值计算目的基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot检测感染K562细胞中BCR/ABL融合蛋白的表达 分别用Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒和空载病毒Ad感染K562细胞,收集细胞用RIPA蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA检测各组蛋白浓度。经SDS-PAGE电泳后电转移至PVDF膜上后,用5%脱脂奶粉封闭2 h;分别加入兔抗人c-abl抗体(1∶1 000稀释)、兔抗人β-actin抗体(1∶1 000稀释),4℃孵育过夜;加入HRP标记的羊抗兔IgG(1∶10 000稀释),37 ℃孵育1 h后经ECL发光显色系统显色。

1.2.5 CCK-8检测感染K562细胞的增殖能力 将生长良好的K562细胞接种于96孔板中,感染Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒培养48 h后为第1天,设置5个时间点(1、2、3、4、5 d),分别在各个时间点时加入CCK-8试剂,继续培养4 h后在酶标仪450 nm波长处检测各组的光密度值[$D(450)$]。分别设置未感染K562细胞及感染空载体K562细胞组为对照组,并设置试剂对照组,每组设5个复孔。

1.2.6 流式细胞仪检测K562细胞凋亡率 将生长良好的K562细胞接种于6孔板中,分别用Ad-pre-miRNA-193b重组腺病毒和空载病毒Ad感染K562细胞作为Ad-pre-miR-193b组和空载腺病毒组;以未感染的K562细胞作为空白对照组,每组设3个复孔。

72 h 后收集每孔细胞于离心管中,10 000 r/min,离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤 2 次,再用 1 mL PBS 重悬细胞转入 EP 管中,采用 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒,采用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

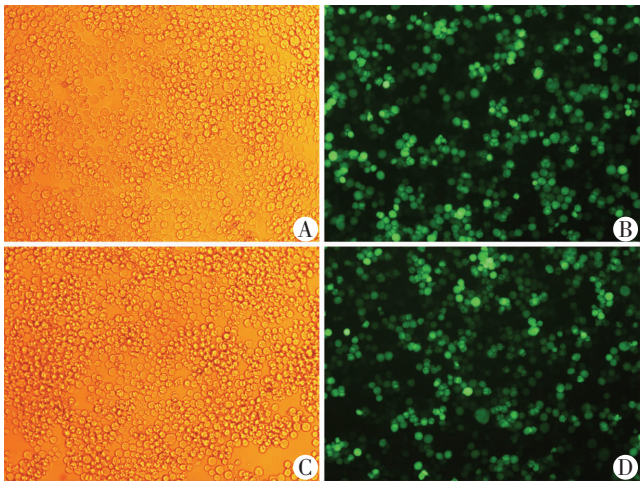
1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据资料的比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒感染 K562 细胞后绿色荧光的表达

重组腺病毒感染 K562 细胞 48 h 后,GFP 达到 80% 以上,重组腺病毒在体外可高效感染 K562 细胞(图 1)。

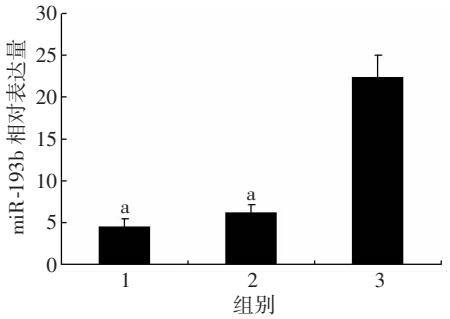


A、B:Ad-pre-miRNA-193b 组;C、D:空载腺病毒组; A、C:光镜观察;B、D:荧光显微镜下观察

图 1 荧光显微镜观察重组腺病毒感染 K562 细胞 48 h 后的效率 (×100)

2.2 qRT-PCR 检测 miR-193b 的表达量

Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒感染 K562 细胞 48 h 后,miR-193b 的表达水平较空载腺病毒组、空白对照组显著升高($P<0.01$,图 2)。



a: $P<0.01$,与 Ad-pre-miRNA-193b 组比较

1:空白对照组;2:空载腺病毒组;3:Ad-pre-miRNA-193b 组

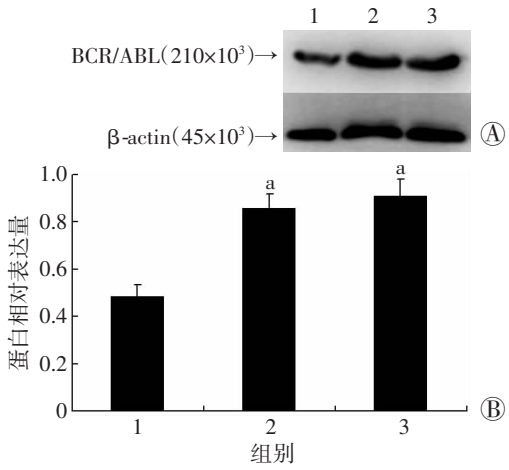
图 2 qRT-PCR 检测各组 K562 细胞 miR-193b 的表达

2.3 qRT-PCR 检测 bcr/abl 融合基因的表达量

Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒感染 K562 细胞 48 h 后,bcr/abl 融合基因的表达水平较空载腺病毒组显著降低[(1.05 ± 0.21) *vs* (0.23 ± 0.07), $P<0.01$]。

2.4 Western blot 检测 BCR/ABL 融合蛋白的表达水平

Western blot 检测结果显示:感染 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒组与两对照组相比,BCR/ABL 融合蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),空载腺病毒组和空白对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。



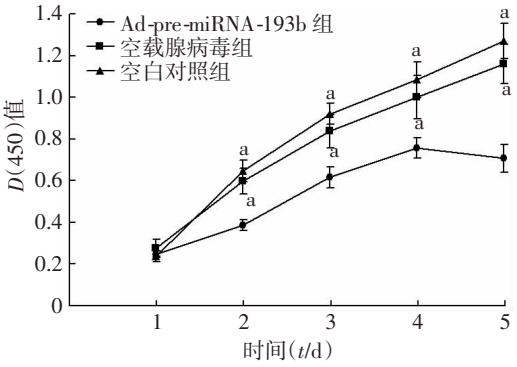
1:Ad-pre-miRNA-193b 组;2:空载腺病毒组;3:空白对照组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.05$,与 Ad-pre-miRNA-193b 组比较

图 3 Western blot 检测各组 BCR/ABL 融合蛋白的表达

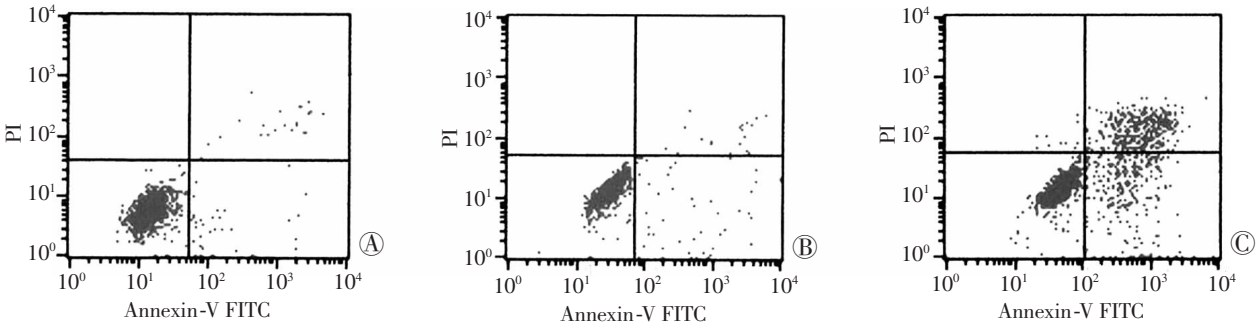
2.5 CCK-8 检测细胞的增殖能力

与两对照组相比,Ad-pre-miRNA-193b 组 K562 细胞增殖明显受到抑制($P<0.05$),空载腺病毒组和空白对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图 4)。



a:$P<0.05$,与 Ad-pre-miRNA-193b 组比较

图 4 CCK-8 检测各组 K562 细胞增殖能力



A:空白对照组;B:空载腺病毒组;C:Ad-pre-miRNA-193b 组

图5 流式细胞术检测 miRNA-193b 对 K562 细胞凋亡的作用

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

Ad-pre-miRNA-193b 组凋亡率[(13.60 ± 0.22)%]与空载腺病毒组[(2.69 ± 0.10)%]和空白对照组[(2.04% ± 0.13)%]比较,差异具有统计学意义($P<0.05$,图5)。

3 讨论

bcr/abl 融合基因由9号染色体长臂断端远侧的 c-abl 原癌基因与22号染色体长臂断端近侧的 bcr 基因异位相互连接形成,其存在于90%的 CML 患者中,编码产生具有强烈酪氨酸酶活性的 BCR/ABL 蛋白使 CML 患者病情恶化。因此,针对 bcr/abl 融合基因及其蛋白的靶点治疗 CML 备受重视:如反义 RNA、反义 DNA、反义核酶、RNA 干涉技术和 BCR/ABL 蛋白激酶抑制剂 STI571[5]。但由于 CML 通常会发生继发性遗传学改变,导致临床上 CML 由慢性期发展为急变期,即便是 STI571,对急变期 CML 细胞的抑制作用也明显减弱[6]。因此,需要寻求新的机制调控 bcr/abl 融合基因。近年研究表明,miRNA 参与白血病、肺癌、结肠癌等恶性肿瘤的发生、发展过程[7],在转录后通过抑制蛋白质的翻译或导致 mRNA 的降解来抑制基因的表达。目前,在人类肿瘤和肿瘤细胞株中,已鉴定出不同的 miRNA 表达谱。根据 miRNA 作用的靶基因不同,其在不同癌组织中发挥的作用也不同,其中 miRNA 的抑癌作用成为 CML 治疗研究热点。

miR-193b 是一种肿瘤抑制基因,在乳腺癌、恶性黑色素瘤、白血病、前列腺癌等肿瘤中表达下调,具有调节肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、凋亡以及对化疗药物敏感性都具有重要的作用[8-17]。如 miR-193b 在乳腺癌中表达降低,过表达的 miR-193b 通过抑制 α 型雌激素受体和尿激酶型纤溶酶原激活剂,从而抑制乳腺癌细胞株的增殖和侵袭[8-9];研究发现,在恶性黑色素瘤和肝癌中,过表达的 miR-193b 可以靶向作用于 cyclin D 和 Mcl-1,抑制癌细胞增殖、转移、侵袭,促进癌细胞的凋亡[10-12,16]。Mao 等[16]研究证实在乙型肝炎性肝癌细胞中,miR-193b 通过靶向作用于 Mcl-1 降低肝癌细胞对化疗药物索拉菲尼的抵抗,增强肝癌细胞对其作用的敏感性,促进癌细胞凋亡。Gao 等[13]利用健康人骨髓标本、急性髓细胞白血病(acute myelogenous leukemia, AML)患者骨髓标本以及白血病细胞株(Kasumi-1、HL-60、NB4、U937、KG-1、K562),采用荧光定量 PCR 检测发现 miR-193b 在 AML 患者细胞中以及白血病细胞株中表达量明显降低,并证实 miR-193b 可以直接靶向作用于 c-Kit 原癌基因,抑制 Kasumi-1 细胞生长,为 AML 的治疗提供了新的治疗靶点。鉴于此,本研究利用前期构建的 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒转染 K562 细胞,实现 miR-193b 的过表达,探索 miR-193b 对 K562 细胞中 bcr/abl 的表达及增殖能力的影响,从细胞水平探讨其抗白血病的效应。

本研究表明,前期构建的 Ad-pre-miRNA-193b 重组腺病毒可高效感染 K562 细胞,实现 miR-193b 在 K562 细胞中的过表达。K562 细胞中过表达的 miR-193b 可抑制 bcr/abl 融合基因及 BCR/ABL 蛋白的表达。同时,本研究结果显示过表达的 miR-193b 可明显抑制 K562 细胞的增殖,增加其凋亡,提示 miR-193b 可能具有潜在的抗白血病效应,但还有待于在更多白血病细胞株中加以验证。总之,本研究证实过表达 miR-193b 可抑制 bcr/abl 融合基因及 BCR/ABL 蛋白的表达,抑制 K562 细胞增殖。K562 细胞的增殖抑制可能与过表达的 miR-193b 诱导的细胞凋亡有关,具体

机制尚待后续进一步研究。本研究为后续进一步研究miR-193b的抗白血病效益提供了实验依据。

参考文献：

[1] Faderl S, Kantarjian H M, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment[J]. Oncology (Williston Park), 1999, 13(2): 169-180.

[2] Mauro M J, Deininger M W. Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective[J]. Haematologica, 2006, 91(2): 152.

[3] Rowe J M. Closing the gap in CML[J]. Blood, 2007, 109(6): 2271.

[4] Meltzer P S. Cancer genomics: small RNAs with big impacts[J]. Nature, 2005, 435(7043): 754-746.

[5] Yamamoto M, Kurosu T, Kakihana K, *et al*. The two major imatinib resistance mutations E255K and T315I enhance the activity of BCR/ABL fusion kinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(4): 1272-1275.

[6] Hochhaus A, Kreil S, Corbin A S, *et al*. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy[J]. Leukemia, 2002, 16(11): 2190-2196.

[7] Carmell M A, Girard A, van-de-Kant H J, *et al*. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline[J]. Dev Cell, 2007, 12(4): 503-514.

[8] Leivonen S K, Makela R, Ostling P, *et al*. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines[J]. Oncogene, 2009, 28(44): 3926-3936.

[9] Li X F, Yan P J, Shao Z M. Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer[J]. Oncogene, 2009, 28(44): 3937-3948.

[10] Chen J, Feilotter H E, Pare G C, *et al*. MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2520-2529.

[11] Chen J, Zhang X, Lentz C, *et al*. miR-193b Regulates Mcl-1 in Melanoma[J]. Am J Pathol, 2011, 179(5): 2162-2168.

[12] Xu C, Liu S, Fu H, *et al*. MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(15): 2828-2836.

[13] Gao X N, Lin J, Gao L, *et al*. MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2011, 35(9): 1226-1232.

[14] Mets E, Van-der-Meulen J, Van-Peer G, *et al*. MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukeimia, 2015, 29(4): 798-806.

[15] Xie C, Jiang X H, Zhang J T, *et al*. CFTR suppresses tumor progression through miR-193b targeting urokinase plasminogen activator (uPA) in prostate cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(18): 2282-2291.

[16] Mao K, Zhang J, He C, *et al*. Restoration of miR-193b sensitizes Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma to sorafenib[J]. Cancer Lett, 2014, 352(2): 245-252.

[17] Hu H, Li S, Liu J, *et al*. MicroRNA-193b modulates proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(5): 424-430.

（**收稿**：2015-01-31；**修回**：2015-03-14）

（编辑　吴培红）