doi:10.11659/jjssx.01E018117

·基础研究·

miR-34a 通过调控 MYB 蛋白的表达影响慢性粒细胞白血病细胞的凋亡与迁移

张 玲[1],姚亚洲[1],叶彦军[2] (1.宝鸡市中心医院血液内科,陕西 宝鸡 721000;2.宝鸡市人民医院普外科,陕西 宝鸡 721000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-34a 对慢性粒细胞白血病细胞生物学行为的影响。**方法** qPCR 检测 miR-34a 在正常人群和慢性粒细胞白血病患者中的表达差异;划痕实验检测 miR-34a 对 K562 细胞迁移能力的影响;流式细胞术 FITC-Annexin V/PI 检测 miR-34a对 K562 凋亡的影响;荧光素酶报告基因验证 miR-34a 与 MYB 的相互作用关系。**结果** 在慢性粒细胞白血病患者骨髓中 miR-34a的表达显著低于正常对照组;miR-34a 减弱了 K562 细胞迁移能力;miR-34a 能诱导 K562 细胞凋亡;miR-34a 能与 MYB 的 3'UTR特异性结合,并可以抑制 MYB 蛋白的表达活性。**结论** miR-34a 能通过调控 MYB 的表达从而影响慢性粒细胞白血病细胞凋亡和迁移。

[关键词] miR-34a; MYB;慢性粒细胞白血病;迁移;凋亡;肿瘤抑制因子
[中图分类号] R733.72 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-05-13

miR-34a affects apoptosis and migration of chronic myelogenous leukemia by regulating expression of MYB protein

ZHANG Ling[1], YAO Ya-zhou[1], YE Yan-jun[2] (1. Department of Hematology, Baoji Centre Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China; 2. Department of General Surgery, Baoji People's Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-34a on the biological behavior of chronic myeloid leukemia cells. **Methods** The expression of miR-34a was detected by qPCR in normal population and patients with chronic myeloid leukemia. The scratch assay was used to detect the migration of K562 cells. The effect of miR-34a on the apoptosis of K562 cells was detected by flow cytometry FITC-Annexin V/PI. The interaction between miR-34a and MYB was verified by luciferase reporter gene. **Results** In the bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia MiR-34a was significantly lower than that of the normal control group. miR-34a attenuated the ability of K562 cells to migrate and induced the apoptosis of K562 cells. miR-34a could specifically bind to 3' UTR of MYB and inhibit MYB protein expression. **Conclusion** miR-34a can affect the apoptosis and migration of chronic myeloid leukemia cells by regulating the expression of MYB.

Keywords: miR-34a; MYB; chronic myelogenous leukemia, migration; apoptosis; tumor inhibitory factors

白血病是人类造血系统的恶性肿瘤,在所有的人类恶性肿瘤中发病率居第 6 位[1]。慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML)是以粒细胞增生为特征的获得性造血干细胞克隆性疾病,并且发现费城染色体(Ph)存在于超过 95% 的患者骨髓细胞中[2]。目前,化疗仍是 CML 的主要治疗方法,但是其副作用和耐药性成为了化疗的主要障碍[3]。还有其他新兴的治疗方式,例如干细胞移植,也存在匹配困难的问题,所以不能应用在大多数患者中[4]。

微小 RNA(miRNA)是一类内源非蛋白编码单链 19~25 个核苷酸的 RNA,作为重要的基因调控者而起作用[5]。据报道,miRNA 可以调节超过 30% 的人类基因[6],每个 miRNA 都有靶向大量基因的潜力。与此同时,约 60% 的 mRNA 具有一个或多个保守序列,这样可以与几个不同的miRNA交互作用[7]。更值得一提的是 miRNA 在基本的细胞过程中发挥关键作用[8],例如分化、增殖和凋亡,在器官发育代谢中起着至关重要的作用[9]。

miR-34a 常作为肿瘤抑制因子,在染色体基因座 1p36.23 上,参与了启动子甲基化、基因缺失和 p53 突变等[10]。许多学者已经探索了针对 miR-34a 的治疗方式,对多种肿瘤的生物学行为有显著的抑制作用。miR-34a 直接抑制 SIRT1、Bcl-2、CD44、Rac1、Fra-1,各种细胞周期蛋白和 CDK 以及原癌蛋白 MYC 和 MYCN,并带来肿瘤抑制作用,如细胞增殖抑制,细胞周期阻滞和衰老,细胞凋亡诱导、迁移和侵袭抑制[11]。本研究中,我们探究了 miR-34a 在慢性粒细胞白血病中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 购买于上海中科院,RPMI-1640 培养基和 0.25 胰酶(0.25 Trypsin EDTA)购买于美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine

[基金项目] 陕西省科学技术发展研究计划项目(2014K12-14)
[通信作者] 叶彦军,E-mail:haoyun1209@126.com

serum,FBS)和双抗(Penicillin-Streptomycin Solution)购买于美国海克隆公司;PBS 磷酸盐缓冲液购买于BOSTER。K562 细胞均培养在含 10% 胎牛血清和1%双抗的 L-15 培养基中,RPMI-1640 培养基中;所有细胞均在5% CO_2、37 ℃条件下培养,每隔 3 d 换液 1 次,待细胞铺满培养瓶底进行传代。以下所有试验均取处于对数生长期的细胞。

1.2 miR-34a mimics 转染

miR-34a mimics 购买于北京欧格林生物有限公司。PBS 缓冲液将细胞清洗干净,胰酶消化细胞 2 min,转移至 15 mL 无菌离心管,离心并计数细胞,以每孔 4×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,掌握过夜细胞融合率达 70% 左右,细胞分为实验组(miR-34a)和对照组;无血清培养基将 Lipofectamine 2000 按 3 μL/L 进行稀释,37 ℃孵育 20 min,用无血清培养基分别将 miR-34a mimics 和对照组 mimics 按 50 μM 浓度稀释,常温下孵育 5 min,最后将 2 组 mimics 与 Lipofectamine 2000 等体积分别混匀,分别加入 2 组细胞中,37 ℃孵箱继续培养;12 h 后,观察转染细胞状态,并将无血清培养基更换为完全培养基,继续培养 48 h 后,提取细胞 RNA,验证转染效率。

1.3 定量实时 PCR 分析

氯仿、乙醇、异丙醇购买于重庆川东化工公司。Trizol 裂解液、Premix ExTaq Version2.0 和SYBR Premix Ex Taq 购买于日本 Takara 公司。PCR 引物由上海 Sangon Biotech 公司合成。miR-34a qRT-PCR 检测以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,重复 3 次,利用荧光 PCR 仪检测 cDNA 中 miR-34a 的相对表达量,依次加入试剂,总体积 20 μL,离心,避免气泡产生,反应条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃15 s,60 ℃15 s,45 个循环,获取荧光信号温度为 60 ℃。普通 cDNA qRT-PCR 检测以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行统计,反应条件为 95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 个循环。

1.4 划痕实验

将 K562 细胞平铺在 6 孔板上。使用 200 μL 无菌枪头轻划孔板,每个孔划 4 ~ 5 次,尽量保证所划线处于平行状态,放置 37 ℃恒温细胞培育箱,在 24 h 后,分别用适量 PBS 冲洗孔板,显微镜下观察 K562 细胞迁移的距离。然后对比各组之间的统计学差异。

1.5 细胞凋亡实验

流式细胞术 FITC-Annexin V/PI 双染色被认为是理想的定量测定细胞凋亡的方法。将 K562 细胞以 2×10^6 细胞/孔的密度接种在 6 孔板中并生长 24 h。用上述方式转染后,加入 100 μL 细胞悬液5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,并将细胞在黑暗中孵育 30 min。PI(5 μL,浓度为 10 μg/mL)加入细胞,在黑暗中再次孵育 10 min。通过流式细胞术评估细胞以识别细胞周期的变化。

1.6 荧光素酶报告基因测定

构建含 MYB 基因野生型 3'UTR(含 miR-34a 识别位点/wt)、突变型 3'UTR(miR-34a 识别位点点突变/mut)片段,两端均设计 Xba Ⅰ酶切位点,插入荧光素酶报告基因质粒(pGL3-promoter, Promega)构建 pGL3-3'UTR wt、pGL3-3'UTR mut。取生长状态良好的 HEK293 细胞,质粒转染后 48 h,根据 Promega 公司操作说明,裂解细胞,加入荧光素酶底物,检测荧光素酶活性,以证明 miR-34a 直接调控 MYB 。

1.7 Western blot 实验

GAPDH 小鼠抗人一抗、MYB 小鼠抗人一抗购买于武汉三鹰生物技术有限公司;Western blot 凝胶试剂盒和全蛋白提取试剂盒购买于碧云天公司;ECL 发光液购买于索莱宝生物科技有限公司。根据蛋白分子量大小,配制凝胶,根据所测蛋白浓度适量加入蛋白样品以及每孔 5 μL 的蛋白 marker;跑胶,首先加压 80 V,保证所有样品在同一水平线,待样品至分离胶处,将电压加到 120 V;切胶,根据所需条带大小,对照蛋白 marker 进行切胶,并准备与所切胶条相同大小滤纸 2 片和 PVDF 膜(浸泡甲醇 15 s);按照滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸的顺序排好,并赶出气泡,压紧,在 250 mA 恒流下,按 1 kD 蛋白 1 min 进行转膜;转膜结束后,PBST 洗膜 1 次,并放入脱脂奶粉中封闭 1 h;一抗,PBST 洗膜 1 次,将膜浸入稀释好的一抗中,4 ℃过夜;二抗,PBST 洗膜 3 次,将膜浸入稀释好的二抗中,常温下孵育 1 h;显影,PBST 洗膜 3 次后,在暗室中曝光。

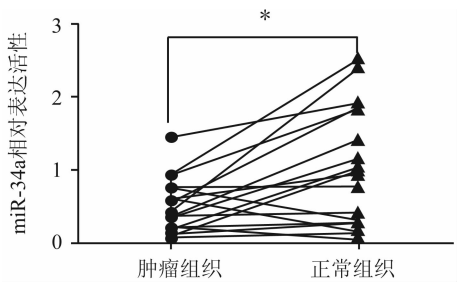
1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用 t 检验,计数资料用方差分析进行检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a 在正常人群和白血病患者中的表达

采取 qPCR 检测 17 对正常人群和慢性粒细胞白血病患者骨髓中 miR-34a 的表达情况。miR-34a 在正常人骨髓中的表达明显高于慢性粒细胞白血病患者($P<0.05$),miR-34a 在白血病患者中的平均表达水平降低约 50%,这些数据表明 miR-34a 在慢性粒细胞白血病中可能起到抑制癌症的作用(图 1)。



*:$P<0.05$

图 1 miR-34a 在正常人和白血病患者骨髓中的表达

2.2 miR-34a 对慢性粒细胞白血病细胞迁移能力的影响

肿瘤细胞的活跃迁移是癌症发生发展的前提。我们通过划痕实验检测 miR-34a 对 K562 细胞迁移的影响。与 miR-NC 组相比,48 h 后,miR-34a 组 K562 细胞的迁移速率明显减慢($P<0.05$)。这个结果表明了 miR-34a 在慢性粒细胞白血病中的抑癌作用,抑制肿瘤细胞的迁移(图 2)。

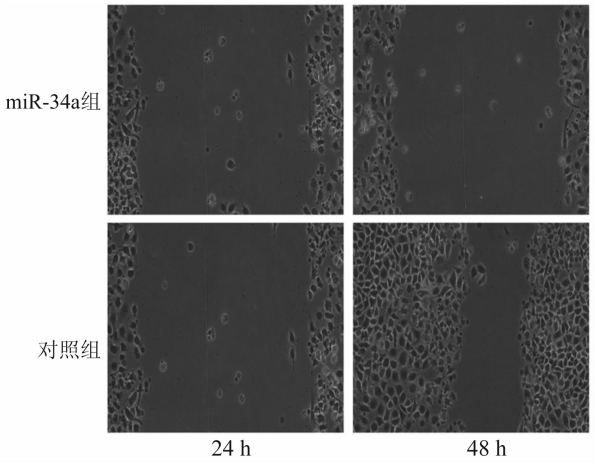


图 2 miR-34a 对白血病细胞 K562 迁移能力的影响

2.3 miR-34a 对慢性粒细胞白血病细胞凋亡的影响

通过细胞凋亡实验检测 miR-34a 对 K562 细胞凋亡的影响,Annexin V-FITC/PI 染色的流式细胞术分析,用合成的 miR-34a mimics 转染 K562 后,细胞的凋亡率显著上升($P<0.05$)。结果表明 miR-34a 在慢性粒细胞白血病中能促进肿瘤细胞的凋亡(图 3)。

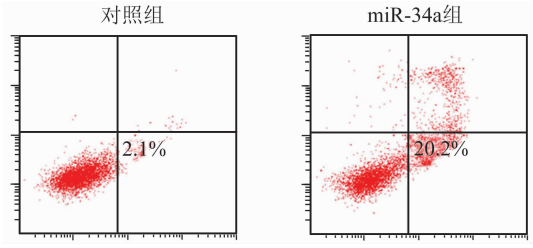
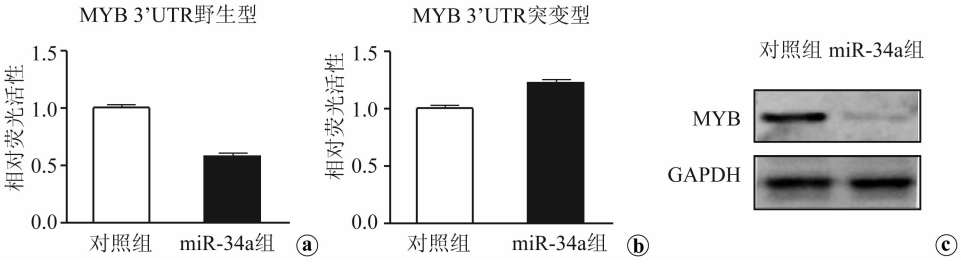


图 3 miR-34a 对慢性粒细胞白血病细胞 K562 凋亡的影响

2.4 miR-34a 通过调控 MYB 蛋白的表达影响慢性粒细胞白血病细胞的生物学行为

通过 TargetScan 生物信息学软件检测 MYB 是 miR-34a的下游相关的靶标,miR-34a 具有和 MYB 相似的 3'UTR 结合序列,然后通过该双荧光素酶实验检测 miR-34a 和 MYB 在 K562 细胞中的相互调控关系。结果显示,转染 miR-34a mimics 后可以明显抑制 MYB 的荧光素酶活性(图 4a、b)。同时,我们用 Western blot 实验检测 miR-34a 对 MYB 蛋白表达的影响(图 4c),miR-34a mimics 组的 MYB 蛋白表达量显著低于对照组($P<0.05$)。实验结果表明 miR-34a 能与 MYB 的 3'UTR 特异性结合,并可以抑制 MYB 蛋白的表达活性。



a、b:双荧光素酶检测 miR-34a 和 MYB 之间的关系;c:miR-34a 对 MYB 蛋白表达的影响

图 4 miR-34a 通过调控 MYB 蛋白的表达影响慢性粒细胞白血病细胞的生物学行为

3 讨论

作为一类新型的小分子单链非编码 RNA 调控分子,miRNA 已被证明在人类癌症中经常出现异常表达。在一般情况下,miRNA 通过直接结合发挥其功能,他们的目标基因的 mRNA 的 3'UTR 控制 mRNA 翻译和稳定性[12]。有许多证据已经表明多个 miRNA 在慢性粒细胞白血病中起到重要作用,如 miR-21,miR-125b,miR-10b,miR-26a,miR-155,miR-301[13]。

miR-34a 属于保守成员 miR-34 家族(miR-34a,miR-34b 和 miR-34c),其编码序列与其他成员不同,miR-34a 由一个转录本编码,而 miR-34b 和 miR-34c 由另一个转录本编码,而且作用也不尽相同[14]。有研究指出,miR-34a 在结肠癌和乳腺癌中起到抑制作

用[15]。还有学者证实,miR-34a 能抑制子宫内膜癌细胞的迁移、侵袭和增殖[16]。本研究通过 qPCR 方法检测 miR-34a 在正常人群和慢性粒细胞白血病患者中的表达差异,结果显示白血病患者中的表达显著降低,这也再次验证了其肿瘤抑制基因的角色。

miRNA mimics 运用化学合成的方法,合成模拟生物体内源性 miRNA。该分子可以通过转染试剂包裹后携带进入细胞内,发挥转录后基因沉默效应,而避免了构建载体繁琐的操作以及包装病毒可能存在的安全隐患[17]。我们选择 miRNA mimics 提高 K562 细胞中 miR-34a 的表达量,从而研究其对细胞迁移和凋亡的影响。本研究结果表明,过表达的 miR-34a 能显著降低 K562 细胞的迁移能力,同时还能显著增加细胞的凋亡率。miR-34a 对于慢性粒细胞白血病细胞 K562 的恶性生物学行为起到抑制作用。

转录因子 MYB 最初被鉴定为 v-myb 的细胞同源物,v-myb 是一种转化的逆转录病毒癌基因[18]。当 MYB 表达异常时,其能激活几个重要的致癌基因,如环氧化酶-2(COX-2)、Bcl-2 和 c-Myc 等促进肿瘤发生的靶点[19],影响不同肿瘤的生物学过程,如增殖、侵袭和迁移。我们通过生物信息学发现,miR-34a 可能与 MYB 特异性结合,并通过双荧光素酶实验进行证实,同时 miR-34a 的过表达能降低 MYB 蛋白的表达,从而再次证明其在慢性粒细胞白血病的抑制作用。综上所述,miR-34a 能通过调控 MYB 的表达从而影响慢性粒细胞白血病细胞凋亡和迁移。

[参考文献]

[1] Dekmezian R, Kantarjian HM, Keating MJ, et al. The relevance of reticulin stain-measured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukemia [J]. Cancer, 1987, 59(10): 1739 - 1743. doi: 10.1002/1097 - 0142(19870515)59.

[2] Fava C, Rege-Cambrin G, Saglio G. The choice of first-line chronic myelogenous leukemia treatment[J]. Ann Hematol, 2015, 94(Suppl 2): S123 - S131. doi: 10.1007/s00277 - 015 - 2321 - 3.

[3] Welner RS, Amabile G, Bararia D, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells[J]. Cancer Cell, 2015, 27(5): 671 - 681. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.004.

[4] Barrett AJ, Ito S. The role of stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia in the 21st century[J]. Blood, 2015, 125(21): 3230 - 3235. doi: 10.1182/blood - 2014 - 10 - 567784.

[5] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8): 509 - 524. doi: 10.1038/nrm3838.

[6] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6): 321 - 333. doi: 10.1038/nrc3932.

[7] Cheng CJ, Bahal R, Babar I A, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment[J]. Nature, 2015, 518(7537): 107 - 110. doi: 10.1038/nature13905.

[8] Vitsios DM, Davis MP, van Dongen S, et al. Large-scale analysis of microRNA expression, epi-transcriptomic features and biogenesis[J]. Nucleic acids research, 2017, 45(3): 1079 - 1090. doi: 10.1093/nar/gkw1031.

[9] Liu C, Kelnar K, Liu B, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44[J]. Nat Med, 2011, 17(2): 211 - 215. doi: 10.1038/nm.2284.

[10] Rokavec M, Öner MG, Li H, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(4): 1853. doi: 10.1172/JCI81340.

[11] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13421 - 13426. doi: 10.1073/pnas.0801613105.

[12] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(6): 852. doi: 10.15252/emmm.201707779.

[13] Prinsloo A, Pool R, Van Niekerk C. Preliminary data on microRNA expression profiles in a group of South African patients diagnosed with chronic myeloid leukaemia[J]. Mol Clin Oncol, 2017, 7(3): 386 - 390. doi: 10.3892/mco.2017.1319.

[14] Zhao J, Bader AG. Evaluating synergistic effects of miR-34a mimics in combination with other therapeutic agents in cultured non-small cell lung cancer cells[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1517: 115 - 126. doi: 10.1007/978 - 1 - 4939 - 6563 - 2_8.

[15] Fang C, Qiu S, Sun F, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 mediated repression of miR-34a/SIRT1/p53 feedback loop promotes the metastatic progression of colon cancer by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Cancer Lett, 2017, 410: 50 - 62. doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.012.

[16] Wang Z, Wang W, Huang K, et al. MicroRNA-34a inhibits cells proliferation and invasion by downregulating Notch1 in endometrial cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(67): 111258 - 111270. doi: 10.18632/oncotarget.22770.

[17] Trang P, Wiggins JF, Daige CL, et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice[J]. Mol Ther, 2011, 19(6): 1116 - 1122. doi: 10.1038/mt.2011.48.

[18] Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(7): 523 - 534. doi: 10.1038/nrc2439.

[19] Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(23): 9362 - 9367. doi: 10.1073/pnas.0903103106.

(编辑:左艳芳)