

miRNA-196b过表达对K562细胞增殖、凋亡及survivin、Cox-2表达的影响

尹虹 刘玥 郑文岭 宋艳斌 马文丽*

南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515

[摘要] **背景与目的:** BCR-ABL融合基因是慢性粒细胞白血病发病的分子病理基础,也是诊断慢性粒细胞白血病、观察疗效、评估预后等的有效指标。miRNA-196b在急性粒细胞白血病中低表达并对疾病的发展起主要作用。在慢性粒细胞白血病中miRNA-196b的靶基因为BCR-ABL, miRNA-196b过表达抑制BCR-ABL融合基因的表达。生存素(survivin)是BCR-ABL的一个下游基因,已在多种肿瘤中发现survivin与环氧化酶-2(Cox-2)协同调节细胞的增殖凋亡。本研究旨在探讨miRNA-196b过表达对K562细胞增殖、凋亡及survivin、Cox-2 mRNA表达的影响。**方法:** 实验分为K562-196b组、空载K562-pLV组与K562组,采用CCK-8法检测细胞增殖;采用Annexin V-PE检测细胞凋亡;采用实时荧光定量PCR法检测Cox-2、survivin mRNA的表达情况。**结果:** miRNA-196b过表达可以明显抑制K562细胞增殖;K562-196b组细胞凋亡率显著高于K562组($P<0.05$);miRNA-196b组中survivin基因显著低表达($P<0.05$),Cox-2基因中无明显变化($P>0.05$)。**结论:** miRNA-196b对K562细胞的增殖抑制和诱导凋亡有显著作用;miRNA-196b过表达可下调survivin基因的表达,为miRNA-196b作为慢性粒细胞性白血病的治疗靶点提供了依据。

[关键词] miRNA-196b; K562细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.05.004

中图分类号: R73-35 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)05-0341-06

Effects of miRNA-196b overexpression on proliferation, apoptosis and survivin, Cox-2 expression of K562 cells YIN Hong, LIU Yue, ZHENG Wen-ling, SONG Yan-bin, MA Wen-li (Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China)

Correspondence to: MA Wen-li E-mail: 339093503@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** BCR-ABL fusion gene is considered to be the molecular pathological basis and an effective indicator for diagnosis, observation, prognosis, and monitoring of chronic myelogenous leukemia (CML). MiRNA-196b had low expression in acute myeloid leukemia and played an important role in the development of disease. BCR-ABL is the target gene of miRNA-196b in CML, miRNA-196b overexpression led to BCR-ABL down-regulation or silencing. Survivin is a downstream gene of BCR-ABL signal pathways. Various studies had showed that survivin and Cox-2 cooperative regulated of cell proliferation and apoptosis in variety of tumors. The purpose of this study was to investigate the effects of miRNA-196b overexpression on proliferation, apoptosis and surviving, Cox-2 mRNA expression of K562 cells. **Methods:** Three groups including K562-196b, K562-pLV and K562 control groups were set up in this study. The cell proliferation and apoptosis were measured by CCK-8 assay and Annexin V-PE, respectively. The expression of Cox-2 and survivin genes at the mRNA level were detected by Q-PCR. **Results:** The proliferation of K562 cells could be significantly inhibited by miRNA-196b overexpression; Compared of the three groups of apoptosis rate, K562-196b group was significantly higher than K562 group ($P<0.05$). The expression of survivin gene in miRNA-196b was downregulated ($P<0.05$), but the expression of Cox-2 gene in miRNA-196b group had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The miRNA-196b plays an important role in K562 cells proliferation inhibition and apoptosis; Overexpression of miRNA-196b can down-regulate survivin gene expression, and provide some basis for miRNA-196b as a therapeutic target for chronic myelogenous leukemia.

[Key words] MiRNA-196b; K562 cells; Cell proliferation; Cell apoptosis

BCR-ABL融合基因所编码的具有络氨酸激酶活性的P210融合蛋白在慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的发生中起着重要作用^[1], 是研究治疗CML的关键所在。伊马替尼作为治疗CML的一线用药, 其作用机制就是通过抑制BCR-ABL蛋白的自身磷酸化和底物磷酸化, 使BCR-ABL阳性细胞的增生受到抑制或凋亡。但随着越来越多的耐药情况出现, 需要寻找治疗CML的新方法或补充途径。

在我们之前的研究中, 已经验证了miRNA-196b的靶基因为BCR-ABL, miRNA-196b过表达可下调BCR-ABL的表达。又有研究表明miRNA-196b在急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)中低表达^[2], 并且对混合淋巴细胞型白血病的发展起重要作用^[3]。因此, 推测miRNA-196b在CML的治疗中也有着重要的意义。

生存素(survivin)和环氧化酶-2(Cox-2)这两种细胞因子均可抑制细胞凋亡, 并在肿瘤的形成中发挥重要作用。Survivin作为BCR-ABL的一个下游基因, 以survivin为分子靶点的联合治疗策略是近来CML治疗的研究热点。Cox-2不仅能够促进细胞黏附, 抑制细胞凋亡的发生, 促进肿瘤侵袭和转移, 还发现Cox-2高表达与白血病进展及预后不良有密切关系。miRNA-196b过表达抑制BCR-ABL融合基因, 是否对survivin、Cox-2 mRNA的表达也有影响, 值得深入研究。本实验用慢病毒介导的miRNA-196b处理K562细胞, 检测miRNA-196b对细胞增殖、凋亡的影响, 以及Cox-2、survivin癌症因子表达的变化, 从分子水平探讨针对BCR-ABL的CML的治疗。

1 材料和方法

1.1 菌株、细胞及其培养

K562细胞293T细胞和大肠杆菌DH5 α 为本实验室保存^[4]。K562细胞接种于含体积分数10%的胎牛血清, 青霉素、链霉素各100 U/mL的RPMI-1640培养液中, 置于37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%的培养箱, 饱和湿度下培养。每隔2~3 d换

液传代。

1.2 主要试剂

慢病毒载体pLVTHM以及包装质粒均为本实验室保存^[5]; CCK-8试剂盒购于日本同仁株社; Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 限制性内切酶、MMLV-RT反转录试剂盒、DNA连接酶、DNA聚合酶和转染试剂LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国Promega公司; 实验所用引物由上海英俊公司合成。

1.3 慢病毒介导的miRNA-196b稳定表达K562细胞株的构建

以人外周血淋巴细胞cDNA文库为模板, 通过采用PCR扩增长度为284 bp的pre-miR-196b扩增片段, PCR产物切胶回收后再进行Mlu I和Cla I双酶切, 与载体pLVTHM连接, 连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 在Amp抗性筛选平板上挑取单菌落, 并培养鉴定。构建成功的重组载体命名为pLVTHM-miR-196b。重组质粒转染293T细胞制备慢病毒, 病毒滴度测定后, 将K562细胞接种到6孔板中, 24 h后感染病毒, 72 h用流式细胞仪分选GFP阳性的细胞, 扩大培养, 构建K562-196b稳定细胞株, 同时设立空载体(pLVTHM)感染的K562细胞株为对照组, 命名为K562-pLV细胞株。具体方法参考文献^[5]。

1.6 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

细胞总RNA的提取过程参见文献^[6], 逆转录参照invitrogen的M-MLV逆转录试剂盒操作进行逆转录, 得到cDNA, 进行下一步反应。按照ABI 7500 Real-time仪器说明书, 每一样本和基因同时做3个复孔, 输出数据为复孔Ct值的平均值, 统计时采用 2^{-ddCt} 进行比较。引物见表1。反应体系为SYBR Premix Ex Taq II(2 \times) 10 μ L, ROX 0.4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L, 模板cDNA 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L。反应条件为95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 45个循环; 72 $^{\circ}$ C 30 s; 融解曲线。

表 1 RT-qPCR所使用的引物

Tab. 1 Primers used for RT-qPCR	
Primer set	Primer sequence (5'-3')
miR-196b	F: GCAGCACGCTAGGTAGTTTC
	R: TATCGTTGTTCTCCACTCCTTGAC
U6	F: ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
	R: GGAACGCTTCACGAATTTG
COX2	F: TGACCAGAGCAGGCAGATGAA
	R: CCACAGCATCGATGTCACCATAG
Survivin	F: TCCACTGCCCACTGAGAAC
	R: TGGCTCCCAGCCTTCCA
BCR-ABL	F: CCCTTCTCCTCCCTCTTCC
	R: ATTCCAGCCCCAAATGTCTCC
β-actin	F: CATGGGTCAGAAGGATTCTATGTG
	R: ATAGCACAGCCTGGAT AGCAACGTA

F: Forwards; R: Reverse.

1.7 Western blot检测BCR-ABL蛋白

裂解细胞，提取总蛋白，根据申能博彩BCA法测定蛋白浓度试剂盒对蛋白进行定量后，进行SDS-PAGE凝胶电泳，以BCR-ABL和β-actin为一抗(1:500稀释)，二抗为相应的辣根过氧化物酶标记的IgG，电泳分离、转膜、显影及照相参见文献[6]方法操作。图片结果应用WO-9413B型凝胶成像系统自带软件Gelpro32分析目的条带平均灰度及背景灰度，前者减去后者作为统计分析数值。最后统计取值为其灰度值与相应内参灰度值比值。

1.8 CCK-8法检测细胞生长曲线

实验分K562-196b组、K562-pLV组，K562组和空白对照组4组，每组设3个复孔。每组细胞以 $2 \times 10^7/L$ 的密度接种于96孔板，每孔100 μL，每2~3 d换1次液。每隔24 h加入CCK-8液体10 μL，3 h后在多功能酶标仪上测定吸光

度 A_{450} 值，共测量7 d，绘制生长曲线。 $A = A_s - A_b$ ，其中 A_s 为实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8)， A_b 为空白孔(不含细胞的培养基、CCK-8)。

1.9 Annexin V-PE检测细胞凋亡

实验设K562组为对照组，K562-196b组、K562-pLV组为处理组。细胞处理48 h后，收集细胞，PBS重悬细胞并计数，取 5×10^4 重悬细胞， $1\ 000 \times g$ 离心5 min，弃上清液，加入195 μL Binding Buffer重悬细胞，加入5 μL Annexin V-PE，混匀后室温避光温育10 min， $1\ 000 \times g$ 离心5 min后收集细胞，弃上清液，将细胞重悬于0.5 mL $1 \times$ Binding Buffer，流式细胞仪进行检测。

1.7 统计学处理

应用SPSS 13.0版统计软件进行分析，采用ONEWAY ANOVA分析，并对各组之间数据进行两两比较(Scheffe法)。检验水准 $\alpha=0.05$ ，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pLVTHM-miR-196b重组载体的鉴定

pLVTHM-miR-196b重组载体转化DH5 α菌后，在Amp抗性筛选平板上挑取单菌落进行培养，提取质粒后进行双酶切鉴定和测序鉴定。结果显示，两条条带分别为11 085 bp(pLVTHM片段)和284bp(pre-miR-196b扩增片段)。B为pLVTHM-miR-196b测序结果，阴影部分与数据

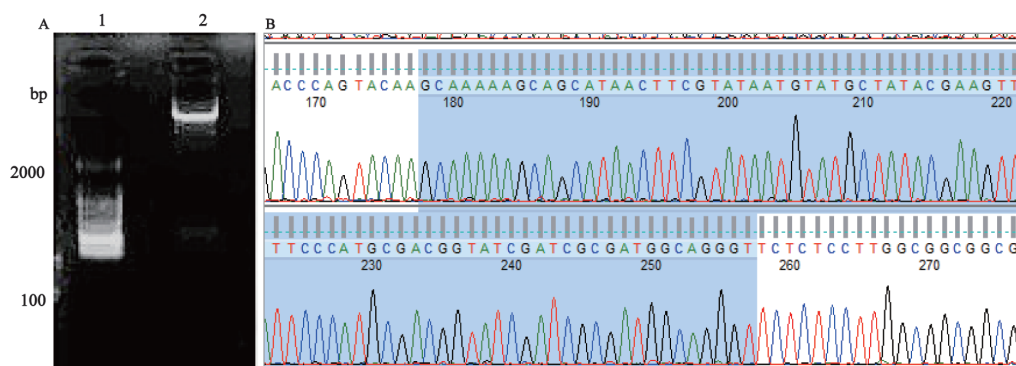


图 1 pre-miR-196b慢病毒表达载体pLVTHM-miR-196b的鉴定

Fig. 1 Identification of the lentiviral expression vector pLVTHM-miR-196b

A: Double enzyme digestion; Lane 1: DNA maker 2000; Lane 2: Restricted fragments including pLVTHM vector (11 085 bp) and the pre-miR-196b amplification fragment (284 bp); B: Sequencing results of pLVTHM-miR-196b.

库获得的pre-miR-196b 84 bp片段一致(图1)。

2.2 RT-qPCR验证感染病毒后miRNA-196b在K562细胞中表达增多

K562细胞转染慢病毒pLVTHM-miR-196b 48 h后收集细胞, 提取总RNA, 反转录得到第一链cDNA, 并进行RT-qPCR反应, 得到Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表征各组之间miRNA-196b表达的倍数关系。其中U6为内参基因, K562组为对照组, K562-pLV为空载体组, hNC为正常人外周血有核细胞组。miRNA-196b的表达水平在K562-196b组中是K562组的10.32倍($P < 0.05$); hNC组是K562组的3.01倍($P < 0.05$); K562-196b组中miRNA-196b的表达水平高于hNC组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); K562-pLV组与K562组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果证明转染成功, miRNA-196b在K562-196b细胞稳定表达(图2)。

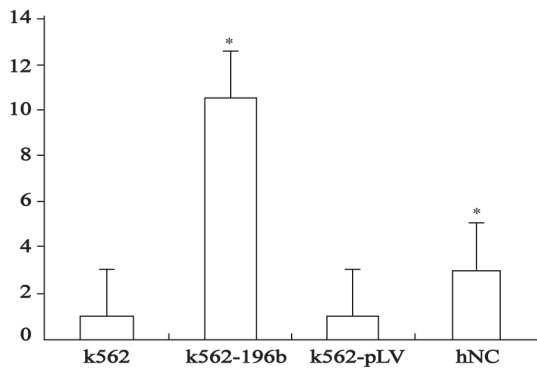


图2 3组细胞miRNA-196b的相对定量结果

Fig. 2 Relative expression of miRNA-196b in 3 groups

*: $P < 0.05$ vs control group.

2.3 BCR-ABL融合基因在K562-196b组中表达降低

K562细胞转染慢病毒pLVTHM-miR-196b 48 h后收集细胞, 分别提取总RNA和蛋白进行RT-qPCR和Western blot(图3)。β-Actin为内参基因, K562组为对照组, K562-pLV为空载体组。图3A为利用RT-qPCR通过计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到BCR-ABL融合基因mRNA水平的相对表达量。K562组与K562-pLV组中BCR-ABL mRNA的表达基本一致; BCR-ABL mRNA在K562-196b组中表达低于对照组, 约为对照组的0.5倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。图3B为Western blot检测BCR-ABL融合蛋白的表达, K562组、K562-

196b组与K562-pLV组的灰度值比值分别为0.896 42、0.639 87和0.778 28, BCR-ABL融合蛋白在K562-196b组的表达低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。RT-qPCR检验结果与Western blot结果一致, 证明BCR-ABL在K562-196b组中表达降低。

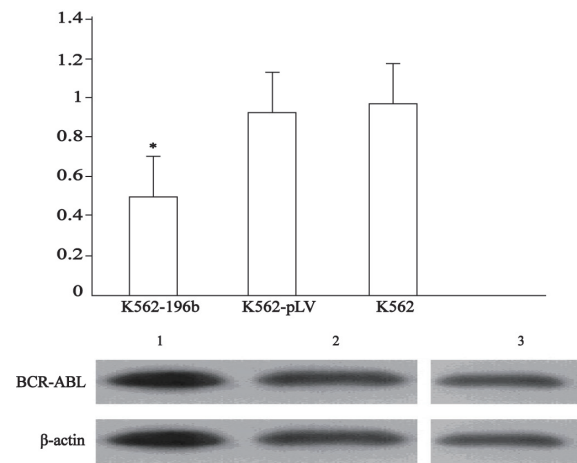


图3 RT-qPCR和Western blot检测3组细胞中BCR-ABL mRNA及蛋白的表达

Fig. 3 Expression of BCR-ABL mRNA and protein in three groups cells by RT-qPCR and Western blot, respectively

A: RT-qPCR result; B: Western blot result; Lane 1: K562-196b group; Lane 2: K562-pLV group; Lane 3: K562 group; *: $P < 0.05$ vs control group.

2.4 miRNA-196b过表达抑制K562细胞生长

每24 h向接种于96孔板的细胞悬液中加入CCK-8液体 $10 \mu\text{L}$, 37°C 温育3 h后在多功能酶标仪上测定吸光度 A_{450} 值, 共测量7 d, 绘制生长曲线(图4)。K562组与空载K562-pLV组细胞在第5、6天分别到达平台期, 而K562-196b组细胞生长明显受到抑制且无平台期, 证明miRNA-196b过表达对K562细胞生长有抑制作用。

2.5 miRNA-196b促进K562细胞凋亡

细胞培养48 h后收集3组细胞, 按照Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒说明书进行温育, 经流式细胞仪检测, 未经处理的K562细胞对照组、K562-pLV组与K562-196b组, 细胞凋亡率分别为 $(4.37 \pm 0.44)\%$ 、 $(9.75 \pm 0.58)\%$ 、 $(21.42 \pm 1.08)\%$ 。K562-196b组细胞凋亡率均显著高于K562组($P < 0.05$), 两两相比, K562-196b组细胞凋亡率显著高于K562-pLV组($P < 0.05$),

K562-pLV组高于K562组($P<0.05$)。

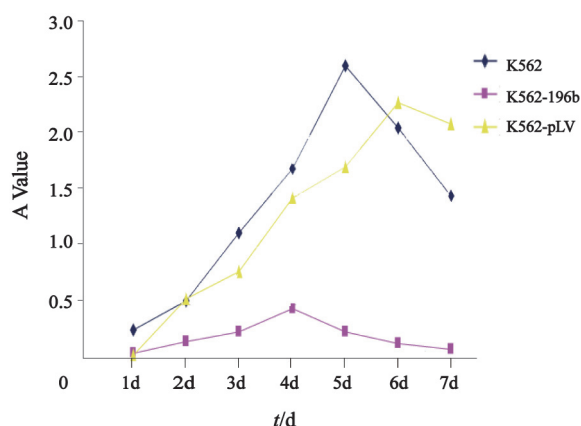


图4 3组细胞的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of the 3 groups of cells

2.6 RT-qPCR检测Cox-2、survivin的表达

3组细胞提取总RNA和逆转录同前， β -actin为内参基因，Cox-2、survivin为目的基因，通过计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到目的基因mRNA水平的相对表达量。与对照组相比，Cox-2基因在K562-196b组中无明显变化($P>0.05$)，Survivin基因在K562-196b组中表达降低，差异有统计学意义($P<0.05$ ，图5)。

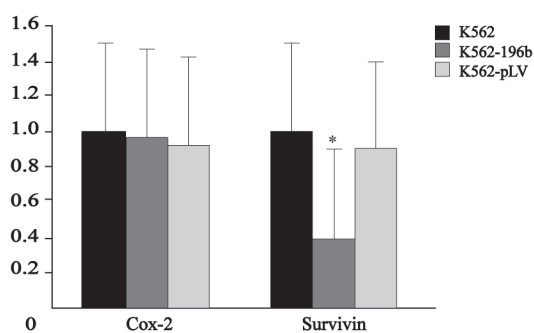


图5 3组细胞中Cox-2、survivin的相对定量

Fig. 5 The relative quantity of Cox-2 and survivin in 3 groups cells

*: $P<0.05$ vs control group.

3 讨论

本研究发现，miRNA-196b过表达可以有效抑制K562细胞的生长，并诱导K562细胞的凋亡。这一结果提示miRNA-196b过表达对CML的

治疗具有一定作用。但由于每个miRNA的靶基因一般不会只有1个，而每个靶基因又可能和多个miRNA相互作用，从而组成复杂的调控网络。为了更好地了解miRNA-196b对CML K562细胞的作用机制，我们选取了与肿瘤形成息息相关的survivin和Cox-2进行RT-qPCR检测。Survivin是人们最近发现的凋亡抑制蛋白家族的新成员^[7]，是一种独特的细胞凋亡抑制剂，在肿瘤的形成中发挥重要作用^[8]。Ibrahim等^[9]的研究中，AML患者与健康人相比，survivin超标达36.7%，提示survivin对白血病的生成和预后具有重要意义。Carter等^[10]也提出survivin是治疗白血病的潜在重要靶点，且研究证明，survivin是BCR-ABL激活的信号中的一个下游基因，以survivin为分子靶点联合应用BCR-ABL阻断剂是治疗CML的良好策略。Cox-2通过上调抗凋亡蛋白bel-2抑制细胞凋亡^[11]，在恶性血液病的发生发展中有着重要作用。成志勇等^[12]研究发现，CML患者慢性期及急变期细胞内Cox-2 mRNA表达明显高于正常对照，这一发现表明，Cox-2高表达与白血病进展及预后不良有密切关系。又有众多研究表明，在胃癌、肺癌、老年急性白血病等疾病中，survivin与Cox-2表达密切相关，发挥协同作用或survivin水平依赖于Cox-2的表达^[13-15]。Guo等^[16]的研究也发现Cox-2与survivin的表达密切相关，且核survivin低表达会促使肺鳞状细胞癌的抗凋亡和过度增殖，而Cox-2与细胞质survivin在肺鳞状细胞癌中的表达与低生存率、独立的预后标志以及潜在的治疗靶点相关。根据以上研究我们推测miRNA-196b过表达下调BCR-ABL融合基因，会导致survivin与Cox-2表达下调。结合本实验RT-qPCR结果，我们发现miRNA-196b过表达可以下调survivin基因，却对Cox-2无影响，这与推测不符，进行如下分析。

Krysan等^[14]证实的在非小细胞肺癌中survivin依赖Cox-2的调节，且survivin在Cox-2过表达细胞中稳定表达。Wang等^[17]的研究确定了survivin是BCR-ABL信号通路的一个下游基因，且受到BCR-ABL融合基因的调控。BCR-

ABL融合基因是miRNA-196b的靶基因之一, miRNA-196b过表达会下调BCR-ABL的表达, 从而导致在miRNA-196b组中survivin基因含量显著低于对照组。然而, Cox-2的表达却没有如预期中协同survivin一同降低, 而是与对照组基本一致, 导致这一结果的原因, Li等^[18]认为, miRNA-196b的其他靶基因, 如HOXA9/MEIS1、FAS等基因的改变调控了Cox-2, 使Cox-2的表达与K562组基本一致。

本研究通过miRNA-196b对CML K562细胞增殖和凋亡的影响, 证明miRNA-196b可以抑制K562细胞的增殖并促进K562细胞的凋亡。通过比较K562-196b组与K562组中survivin和Cox-2表达水平的变化, 发现miRNA-196b过表达可以下调survivin的表达, 为miRNA-196b作为CML的治疗靶点提供了依据。

致谢: 感谢广东省优秀人才引进项目对该研究的支持。

[参 考 文 献]

- [1] 张济, 李君君, 颜家运, 等. 英国原位杂交在慢性粒细胞白血病BCR/ABL融合基因检测中应用及意义 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(5): 825-827.
- [2] GARZON R, VOLINIA S, LIU C G, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2008, 111(6): 3183-3189.
- [3] POPOVIC R, RIESVECK L E, VELU C S, et al. Regulation of miR-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization [J]. Blood, 2009, 113(14): 3314-3322.
- [4] 宋艳斌, 马文丽, 冯春琼, 等. 应用RNA干扰技术抑制K562细胞BCR-ABL基因表达及诱导细胞凋亡 [J]. 基础医学与临床, 2005, 25(7): 620-623.
- [5] LIU Y, SONG Y B, MA W L, et al. Decreased microRNA-30a levels are associated with enhanced ABL1 and BCR-ABL1 expression in chronic myeloid leukemia [J]. Leuk Res, 2013, 37 (3): 349-356.
- [6] 危敏, 姜立, 王妮莎, 等. 水通道蛋白1基因过表达对K562细胞红系分化和增殖的影响 [J]. 肿瘤, 2012, 32(7): 489-494.
- [7] ALTIERI D C. Survivin and apoptosis control [J]. Adv Cancer Res, 2003, 88: 31-52.
- [8] 陈志明, 王东军. 肿瘤治疗的新靶点survivin [J]. 海南医学, 2010, 21(22): 139-142.
- [9] IBRAHIM A M, MANSOUR I M, WILSON M M, et al. Study of survivin and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) genes in acute myeloid leukemia (AML) [J]. Lab Hematol, 2012, 18(1): 1-10.
- [10] CARTER B Z, QIU Y, HUANG X, et al. Survivin is highly expressed in CD34 (+) 38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML [J]. Blood, 2012, 120(1): 173-180.
- [11] 方志鸿. survivin在BCR/ABL转化白血病细胞中的表达调控、作用与治疗策略的研究 [DB/OL]. http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1414251.aspx, 2009-04-29/2012-12-17.
- [12] 成志勇, 张昕, 王哲, 等. PTEN和COX-2在髓系白血病中的表达及作用机制探讨 [J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(2): 165-169.
- [13] 王滔明, 许建明, 胡乃中. Survivin、Cox-2和VEGF在胃癌中的表达及其与预后的意义 [J]. 临床消化病杂志, 2007, 19(1): 35-39.
- [14] KRYSAN K, MERCHANT F H, ZHU L, et al. Cox-2-dependent stabilization of surviving in non-small cell lung cancer [J]. FASEB J, 2004, 18(1): 206-208.
- [15] 王晔, 刘云鹏, 张敬东, 等. 老年性白血病Survivin、Cox-2蛋白的表达 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(5): 485-487.
- [16] GUO Y K, LIM S J, YOUN W K. Expression of HuR, COX-2, and surviving in lung cancers; cytoplasmic HuR stabilizes cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinomas [J]. 2011, 5(24): 1336-1347.
- [17] WANG Z, SAMPATH J, FUKUDA S, et al. Disruption of the inhibitor of apoptosis protein survivin sensitizes Ber-abl-positive cells to STI571-induced apoptosis [J]. Cancer Res, 2005, 65(18): 8224-8232.
- [18] LI Z, HUANG H, CHEN P, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumor suppressor in MLL-rearranged leukemia [J]. Nat Commun, 2012, 3: 688.

(收稿日期: 2012-12-18 修回日期: 2013-04-19)