

论著·基础研究

格列卫对 K562 细胞中 miR-146a、miR-29b 及 3 种甲基化酶表达的影响*

王丽娜¹, 曾建明¹, 王华成^{2△}, 李沫¹, 龙一飞¹, 邓光远¹, 陈茶¹

(1. 广东省中医院大学城医院检验科, 广东广州 510006; 2. 广州市脑科医院检验科, 广东广州 510370)

摘要:目的 观察 BCR/ABL 抑制剂格列卫作用后 K562 细胞中 microRNA(miR)-146a 及 miR-29b 的表达水平变化及 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 3 种甲基化酶水平的改变。方法 MTT 法检测格列卫作用于 K562 细胞时的 IC₅₀ 浓度。通过茎环引物法及荧光定量 PCR 的方法检测 miRNAs 以及甲基化酶基因的水平。结果 格列卫作用于 K562 细胞时的 IC₅₀ 浓度为 40.85 μmol/L。格列卫作用后 miR-29b 表达出现了上升的趋势而 3 种甲基化酶基因表达水平均有所降低, miR-146a 的水平显著升高 (P<0.05)。结论 格列卫能影响 K562 细胞中 miR-146a、miR-29b 和 3 种甲基化酶的表达水平。

关键词: microRNA146a; 慢性粒细胞白血病; 甲基化酶; 格列卫

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0301-03

Influence of Gleevec on expression of miR-146a, miR-29b and DNMT in K562 cells*

Wang Lina¹, Zeng Jianming¹, Wang Huacheng^{2△}, Li Mo¹, Long Yifei¹, Deng Guangyuan¹, Chen Cha¹

(1. Department of Clinical Laboratory, University City Hospital, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. Guangzhou Municipal Brain Hospital, Guangzhou, Guangdong 510370, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of microRNA(miR)-146a, miR-29b expression levels and the 3 kinds of methylase DNMT1, DNMT3a and DNMT3b levels in K562 cell lines after BCR/ABL inhibitor Gleevec treatment. **Methods** The half maximal inhibitory concentration(IC₅₀) of Gleevec on K562 cells was detected by the MTT method. The stem loop primers method and the fluorogenic quantitative PCR were adopted to detect miRNAs and the methylase gene level. **Results** IC₅₀ of Gleevec acting on K562 cells was 40.85 μmol/L. After Gleevec action, miR-29b showed the increasing trend, but 3 kinds of methylase expression level were decreased to some extent. Gleevec could significantly increase the miR-146a level in K562 cells (P<0.05). **Conclusion** Gleevec can influence the expression of miR-146a, miR-29b and DNMTs levels in K562 cells.

Key words: microRNA146a; chronic myelogenous leukemia(CML); DNMT; Gleevec

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是造血干细胞水平发生的获得性恶性血液肿瘤。染色体异位 t(9; 22)(q34; q11)形成 BCR/ABL 融合基因,其编码的特异性融合蛋白 BCR/ABL 具有强烈酪氨酸激酶活性,异常调控多种生物学行为,引发宿主细胞恶性转化。BCR/ABL 调节的主要信号通路有 NF-κB、STATs、PI3K、RAS-MAPK 等。NF-κB 二聚体对靶启动子的结合启动了多种免疫调节基因的转录激活。

通过抑制 BCR/ABL 融合蛋白的活性,进而逆转其下游信号通路来治疗 CML 已有数年的历史,其中最具有代表性的 BCR/ABL 抑制剂就是格列卫。格列卫是特异性的 BCR/ABL 酪氨酸激酶抑制剂。用格列卫抑制 CML 细胞的 BCR/ABL 活性会抑制 NF-κB 的转录活性^[1],受 NF-κB 调控的基因表达也将受到抑制^[2]。

Starczynowski 等^[3]研究了急性白血病细胞系 HL-60 细胞中 microRNA(miR)-146a 的表达情况,发现 HL-60 细胞在用 5-aza 处理后,miR-145 及 miR-146a 的水平呈 3 倍以上的升高。但对于 CML 细胞中 miR-146a 表达情况的研究尚未见报道。

本研究目的是观察格列卫作用后, NF-κB 的下游靶基因 miR-146a 的表达情况,检测能够抑制甲基化酶表达的 miR-29b

水平的变化,并且检测 3 种甲基化酶基因的表达水平,为分析 miR-146a 的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 胎牛血清(FBS)购于美国 Gibco 公司,台盼蓝、MTT 试剂分别为 BBI 公司及上海生工产品。格列卫(100 mg 相对分子质量 589.7)为瑞士诺华公司产品。Trizol 试剂购于东盛生物公司, Bio-Rad Ssofast EvaGreen PCR kit 购于美国 Bio-Rad 公司, Fermentas 逆转录 PCR 试剂盒购于法国 Fermentas 公司, U6、miR-146a、miR-29b 逆转录及正、反向引物为广州锐博公司产品, DNMTs 引物由 Invitrogen 公司合成, GoldView 核酸染料为赛百胜公司产品。所用的 3 种甲基化酶(DNMTs)引物序列如下, DNMT1 上游: 5'-GAG GAA GCT GCT AAG GAC TAG TTC-3', 下游: 5'-ACT CCA CAA TTT GAT CAC TAA ATC-3', 产物大小: 190 bp; DNMT3a 上游: 5'-CAG CTT CCA CGT TGC CTT CT-3', 下游: 5'-CAT CTG CAA GCT GTC TCC CTT T-3', 产物大小: 66 bp; DNMT3b 上游: 5'-TAC ACA GAC GTG TCC AAC ATG GGC-3', 下游: 5'-GGA TGC CTT CAG GAA TCA CAC CTC-3', 产物大小 200 bp。

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(S2012010008916)。

作者简介:王丽娜(1982-),主管技师,硕士,主要从事感染性疾病的血清学诊断。

△ 通讯作者, E-mail: wangmaomao80@163.com。

1.2 K562 细胞培养及格列卫 IC₅₀ 确定

1.2.1 K562 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清(使用前于 56 ℃ 恒温水浴箱中放置 30 min 以灭活补体)的 RPMI1640 培养基,细胞置于 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中,适时换液及传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 格列卫配置 母液 A,浓度为 10 mmol/mL;母液 B,浓度为 3.33 μmol/mL;母液 C,浓度为 500 μmol/L。

1.2.3 4% 的台盼蓝母液配置 1 g 台盼蓝,加入少量蒸馏水研磨,加 0.9% NaCl 至 25 mL,用滤纸过滤,4 ℃ 保存。染色时,将 2 μL 染液及 18 μL 细胞悬液混合,充入计数池,立即于显微镜下计数,计算细胞抑制率(%)=死细胞数/细胞总数×100%。

1.2.4 配置 5 mg/mL MTT 试剂 使用时于 180 μL 细胞培养体系中加入上述 MTT 溶液 20 μL(即 MTT 终浓度为 1 mg/mL)。按每孔 1 000 个细胞接种至 96 孔板(总体积为 180 μL)置于 37 ℃、5%CO₂,饱和湿度条件下培养 24 h 后,加入不同浓度的格列卫,每一浓度设 3 个平行孔,阴性对照加入等量的磷酸盐缓冲液(PBS)。继续培养 48 h 后每孔加入 MTT 试剂,继续培养 4 h,将培养板进行离心,吸弃上清液,每孔中加入 150 μL DMSO,在 492 nm(检测波长)/630 nm(参比波长)处进行检测。以不加药物的对照孔吸光度 OD 值在 0.8~1.2 为佳。

1.3 荧光定量 PCR 检测 mRNA

1.3.1 总 RNA 提取 分别取格列卫处理的 K562 细胞、及生理盐水处理(阴性对照)的 K562 细胞各 1×10⁶ 个。用 PBS 洗涤一次,置于 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL Trizol 试剂,充分混匀。加入 0.2 mL 氯仿,盖紧后剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,4 ℃ 12 000×g 离心 15 min。取上层水相置于一新 EP 管中,加入 0.5 mL 异丙醇,轻轻颠倒,充分混合均匀后,室温静置 10 min。4 ℃ 12 000×g 离心 10 min。弃上清液,加入 1 mL 75% 乙醇,漩涡混匀,4 ℃ 7 500×g 离心 5 min。弃上清液,室温干燥 10 min,加 20 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解。在 Nano-drop 核酸定量分析仪上测定 RNA 浓度。

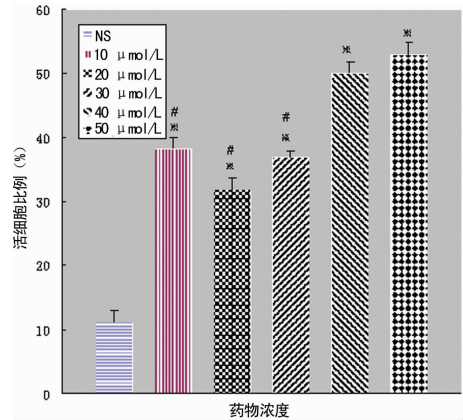
1.3.2 逆转录 miRNAs 的逆转录反应步骤如下:首先加入 RT-PCR 反应体系的试剂并进行变性退火:RT-PCR 引物(62.5 nM)2 μL,RNA 2 μL,加 ddH₂O 至 19 μL。放入 PCR 仪 70 ℃ 10 min 进行变性退火反应。之后继续加入反应体系:5×缓冲液(Buffer)10 μL,2.5 nM dNTP 2 μL,Prime Script RTase 200 U/μL 2.5 μL,加 ddH₂O 至 50 μL,按 30 ℃ 10 min,42 ℃ 60 min,70 ℃ 15 min 的反应条件进行逆转录反应。

1.3.3 荧光定量 PCR 依照说明书操作 ABI 7500 Real-Time PCR System,反应体系如下:Sso Fast EvaGreen supermix with low Rox 9 μL,正向引物 2 μL,反向引物 2 μL,RT-PCR 反应液 2 μL,无 RNA 酶的 ddH₂O 5 μL。扩增过程如下:95 ℃ 预变性 20 s;95 ℃ 10 s,60 ℃ 34 s;扩增 40 个循环后进行溶解曲线分析。数据采用 2^{-ΔΔCT} 法进行分析,以阴性对照为参照进行计算。

1.4 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。各指标的结果采用 $\bar{x} \pm S_x$ 表示,组间比较用方差分析,当方差齐时组间两两比较用 LSD,当方差不齐时,组间两两比较用 Dunnett's T3,格列卫 IC₅₀ 的确定,采用 MTT 法,并参考文献[4]进行。

2 结果

2.1 格列卫最适浓度的选择 由于本实验采用的是未经纯化处理的格列卫,因此需要重新确定其作用于 K562 的 IC₅₀ 浓度。台盼蓝染色结果显示,生理盐水以及系列浓度(10、20、30、40、50 μmol/L)的格列卫作用于 K562 细胞,细胞抑制率结果如图 1 所示。MTT 实验确定 IC₅₀ 浓度为 40.85 μmol/L,后续实验中格列卫的浓度选用 30、50 μmol/L 两种浓度。



*: $P < 0.05$, 与 NS 组比较; #: $P < 0.05$, 与 50 μmol/L 浓度组比较。

图 1 不同浓度格列卫作用于 K562 细胞的细胞存活率($\bar{x} \pm S_x$)

2.2 miR-146a、miR-29b 表达水平改变 miR-146a 水平在格列卫作用后显著升高($P < 0.05$),miR-29b 水平在格列卫作用后上升,结果见表 1。

表 1 格列卫作用后 K562 细胞中 miR-146a 及 miR-29b 表达水平改变

项目	格列卫浓度 [△] (μmol/L)	n	表达水平 ($\bar{x} \pm S_x$) [#]	97.5%CI
miR-146a	30	3	1.423±0.093*	(0.844,2.003)
	50	3	1.700±0.567	(-1.820,5.210)
miR-29b	30	3	0.397±0.246	(-1.132,1.925)
	50	3	0.903±0.445	(-1.856,3.663)

[△]: 相对荧光定量的结果,实验组的结果为对照组表达水平的倍数,对照组的表达水平设为 1; [#]: 数值以 $\log(2^{-ddCt})$ 表示。*: $P < 0.05$, 与对照组比较(95%CI 不包括 0)。

表 2 格列卫作用后 K562 细胞中甲基化酶的表达水平改变

项目	格列卫浓度 [△] (μmol/L)	n	表达水平 ($\bar{x} \pm S_x$) [#]	97.5%CI
DNMT1	30	3	-4.245±1.637	(-14.400,5.912)
	50	3	-2.715±0.539	(-6.065,6.348)
DNMT3a	30	3	-2.197±1.084	(-8.920,4.527)
	50	3	-1.587±0.681	(-5.813,2.639)
DNMT3b	30	3	-1.810±1.403	(-10.520,6.896)
	50	3	-2.015±1.989	(-14.360,10.33)

[△]: 相对荧光定量的结果,实验组的结果为对照组表达水平的倍数,对照组的表达水平设为 1; [#]: 数值以 $\log(2^{-ddCt})$ 表示。

2.3 格列卫作用后 K562 细胞甲基化酶表达水平改变 30、

50 $\mu\text{mol/L}$ 格列卫作用后, K562 细胞中甲基化酶基因 mRNA 的变化呈下降趋势, 见表 2。

3 讨 论

MiR-146a 在造血及免疫反应中具有重要作用^[5-7]。格列卫是特异性的 BCR/ABL 酪氨酸激酶抑制剂。格列卫抑制 K562 细胞中 BCR/ABL 活性后, 导致系列生物学行为的改变, 其中包括 NF- κ B、cMyc 的抑制等^[8]。作为 NF- κ B 的下游靶基因之一, miR-146a 的表达在 STI571 作用后却并未受到抑制。本研究在临床患者(结果未显示)及体外细胞研究中均发现, 格列卫作用后, 患者外周血单个核细胞中 miR-146a 水平无显著变化, 格列卫作用于 K562 细胞, 可使其细胞内 miR-146a 水平升高, 与 Stéphane Flamant 等^[9]的研究结果相互印证。但本研究选取的病例均为慢粒加速期的患者, 而 Stéphane Flamant 等^[9]的研究中纳入为初诊慢粒患者, 并且均为首次接受 IM 治疗。Wang 等^[10]的研究结果显示 miR-146a 的表达水平与 ALL 和 AML 患者的生存呈相反的关系, 高表达 miR-146a 的患者临床预后相对差。但 Wang 等^[10]的研究对象为急性白血病, 与 CML 不可比较, 无论细胞遗传学分型还是疾病的治疗方面均有显著差异。因此, 本研究结果为全面理解 miR-146a 在 CML 中的调控及作用机制提供了新的证据和线索。

MiR-29b 可以通过直接下调 DNMT3A、DNMT3B, 以及通过 sp1 间接下调 DNMT1, 从而导致大部分 DNA 的去甲基化, 进而使得急性白血病细胞中多种肿瘤抑制基因得以重新表达^[11-12]。本研究结果也显示了格列卫作用后 miR-29b 的水平升高。

本研究结果表明, 格列卫作用后, 三种甲基化酶的水平降低, 结合 Starczynowski 等^[3]对 pre-miR-146a 启动子区进行甲基化分析的结果, 本研究认为甲基化酶水平降低是格列卫作用后 miR-146a 升高的原因之一, 也就是说, K562 细胞中甲基化酶水平升高导致 miR-146a 前体启动子区的甲基化, 这是 K562 细胞中 miR-146a 维持在较低水平的原因之一。

在今后的实验中将继续探讨升高 miR-146a 对 K562 细胞的作用, 并进一步从转录因子的结合能力等方面, 探讨格列卫作用后 miR-146a 不降反升的可能作用机制。

参考文献:

[1] Kaufmann SH. Imatinib spells BAD news for Bcr/abl-positive leukemias[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(40):14651-14652.
[2] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-Independent induction of microRNA miR-146, an inhibitor

targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33):12481-12486.

- [3] Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, et al. Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations[J]. Blood, 2011, 117(2):595-607.
[4] 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC₅₀ 的计算方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(9):834-836.
[5] Wang S, Zhang X, Ju Y, et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B[J]. J Immunol, 2013, 191(1):293-301.
[6] Zhao JL, Rao DS, O'Connell RM, et al. MicroRNA-146a acts as a guardian of the quality and longevity of hematopoietic stem cells in mice[J]. Elife, 2013, 2:e00537.
[7] Yang L, Boldin MP, Yu Y, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice[J]. J Exp Med, 2012, 209(9):1655-1670.
[8] Nakamura S, Yokota D, Tan L, et al. Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression[J]. Int J Cancer, 2012, 130(5):1046-1059.
[9] Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia [J]. Haematologica, 2010, 95(8):1325-1333.
[10] Wang Y, Li Z, He C, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 44(3):191-197.
[11] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1 [J]. Blood, 2009, 113(25):6411-6418.
[12] Griffiths EA, Gore SD. MicroRNA: miR-ly regulators of DNMT[J]. Blood, 2009, 113(25):6269-6270.

(收稿日期:2012-09-14 修回日期:2012-09-28)

(上接第 300 页)

processes[J]. Biomaterials, 2011, 32(12):3233-3243.
[12] 张真, 卢晓风, 李幼平, 等. 生物材料有效性和安全性评价的现状与趋势[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1):117-121.
[13] Liu L, Li D, Wang Y, et al. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix(ECM) scaffold for pelvic reconstruc-

tion[J]. Int Urogynecol J, 2011, 22(2):221-227.

- [14] Pierce LM, Rao A, Baumann SS, et al. Long-term histologic response to synthetic and biologic graft materials implanted in the vagina and abdomen of a rabbit model [J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 200(5):546.

(收稿日期:2012-09-15 修回日期:2012-09-17)