

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.011

柔红霉素对 HL-60 敏感细胞 miRNA-21 等 5 种 miRNA 表达的影响

燕 华¹, 李 卫²

(1. 河南省郑州市儿童医院血液科 450053; 2. 广西医科大学科学实验中心, 南宁 530021)

摘要:目的 通过观察柔红霉素(DNR)作用后急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞株 HL-60 敏感细胞中 miRNA-21、miRNA-181d、miRNA-125b、let-7f 和 miRNA-27a 5 种 miRNA 的表达变化,探讨它们与 HL-60 细胞耐药性形成的相关性及其潜在的临床意义。方法 常规培养 HL-60 和 HL-60/A 细胞。设置实验组、对照组 1 和对照组 2,实验组使用小剂量 DNR 持续作用于 HL-60 敏感细胞。对照组 1 和 2 分别是 HL-60/A DNR 耐药细胞和不接受 DNR 持续作用的 HL-60 敏感细胞。采用四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测 DNR 对 HL-60 细胞增的影响。采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 miRNA-21 等 5 种 miRNA 的表达量。结果 MTT 实验结果:随着小剂量 DNR 持续作用时间的延长,DNR 对 HL-60 敏感细胞的抑制作用减弱,并于加药后第 10 天左右,抑制率逐渐进入平台期。RT-PCR 检测结果:与对照组 2 比较,对照组 1 耐药细胞中的 miRNA-181d、miRNA-27a 和 let-7f 的表达下调($P<0.05$),而实验组敏感细胞中这些 miRNA 的表达于加药后的第 7 天开始下调($P<0.05$)。相反,对照组 1 中的 miRNA-21 和 miRNA-125b 表达上调($P<0.05$),而实验组敏感细胞中这 2 种 miRNA 的表达则于加药后的第 7 天开始上调($P<0.05$)。结论 miRNA-21、miRNA-125b、miRNA-181d、miRNA-27a 和 let-7f 5 种 miRNA 表达的改变可能与 HL-60 细胞耐药性有关。

关键词:白血病,髓样,急性;微 RNA;柔红霉素;白血病细胞株;耐药
中图分类号:R725.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)33-4450-04

The effects of daunorubicin on the expression of miRNA in HL-60 cells

Yan Hua¹, Li Wei²

(1. Department of Hematology, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450053, China; 2. Medical Scientific Experiment Center, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract:Objective The purpose was to explore the relativity between the drug resistance of acute promyelocytic leukemia (APL) cell line HL-60 and the expressions of miRNA-21, miRNA-181d, miRNA-125b, let-7f and miRNA-27a in HL-60 cells by analyzing these 5 miRNA expressions in HL-60 cells treated with daunorubicin (DNR). The potential clinical significance of these 5 miRNAs expressions was also discussed. **Methods** The cell line HL-60 and the doxorubicin resistant cell line HL-60/A were routinely cultured. 3 groups were set, namely, the experimental group and the controls group 1 and 2. The experimental group was the HL-60 cells were treated with DNR. The controls group 1 and 2 were the doxorubicin resistant HL-60/A cells and the HL-60 cells, respectively. MTT assay was carried out to examine the inhibition rate of HL-60 cell treated with DNR. The expressions of miRNAs were analyzed by real time RCR(RT-PCR). **Results** MTT assay: the results showed that with the extension of DNR treatment, DNR inhibition on HL-60 cells became weak. DNR inhibition rate on cells graduated into a plateau on the 10th day after DNR treatment. RT-PCR results: comparing with the control group 2, the expressions of miRNA-181d, miRNA-27a and let-7f in the cells of the control 1 were obviously down-regulated($P<0.05$). The expressions of these miRNAs in the sensitive cells of the experimental group were down-regulated on the 7th day after DNR treatment($P<0.05$). In contrast, the expressions of miRNA-21 and miRNA-125b were up-regulated in the cells of the control group 1($P<0.05$). The expressions of these miRNAs in the sensitive cells of the experimental group were up-regulated on the 7th day after DNR treatment($P<0.05$). **Conclusion** These results indicated that the change of the expression of miRNA-21, miRNA-125b, miRNA-181d, miRNA-27a and let-7f might be related to drug resistance of HL-60 cells.

Key words: leukemia, myeloid, acute; microRNA; daunorubicin; leukemia cell line; drug resistance

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓系白血病(AML)的一种特殊类型,染色体异位 t(15;17)和(PML/RARa)融合基因阳性是其惟一的形态学特征,约占 AML 的 10%~15%,临床特征易导致弥散性血管内凝血(DIC)^[1]。柔红霉素(DNR)可与 DNA 结合,并抑制核酸的生物合成,是目前治疗 AML 的主要化疗药物之一。尽管目前通过 DNR、维甲酸等治疗已经可以使初治患者的完全缓解率大幅度增加,但仍有部分患者由于病情复发而死亡,其中原因之一就是白血病细胞对化疗药物产生耐药。耐药性的产生是由多种机制作用而产生的,其中主要包括 ATP 依赖的能量泵活性增强使细胞内药物外排增加、拓扑异构酶Ⅱ表达改变使增加肿瘤细胞 DNA 损伤的修复能力增强以及肿瘤细胞凋亡减少而产生的耐药性等^[2-4]。耐药基因主要包括多药耐药基因(MDR1)、多药耐药相关蛋白基因(MRP)、肺耐药蛋白基因

作者简介:燕华(1985—),住院医师,硕士,主要从事血液肿瘤的研究工作。

(LRP)、乳腺癌耐药蛋白基因(*BCRP*)等。目前,随着 miRNA 研究的不断深入,越来越多的研究发现 miRNA 与白血病及其耐药方面存在密切的联系。

miRNA 是一类长度为 19~25 个核苷酸,非编码的 RNAs,广泛存在于真核生物中,在后转录水平调控 mRNA 的表达^[5]。现已发现,miRNA 参与许多生物学过程,例如细胞增殖,分化和凋亡等,人类大约 30% 的基因受到 miRNA 的调节^[6-7]。近年来,miRNA 与胃癌、乳腺癌、卵巢癌等相关的多药耐药 miRNA 相继报道,在白血病多药耐药方面也引起了越来越多的关注。目前,在其他肿瘤中已经发现 miRNA-21、miRNA-125b、miRNA-181d、miRNA-27a 和 let-7f 等 5 种 miRNA 可能与耐药相关,但关于他们在 HL-60 细胞中的表达及 DNR 对他们的影响鲜有报道,因此,本研究采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR)检测这 5 种 miRNA 在 HL-60 中的表达情况,并探讨 DNR 对这些表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人 APL 药物敏感细胞 HL-60 购自武汉博士德公司。人 APL 耐药细胞 HL-60/A 购自中国医学科学院血液学研究所,该细胞可在 500 ng/mL 的阿霉素培养液中稳定生长。

1.2 主要试剂 RPMI1640 培养基购自 Hyclong 公司,国产四季青胎牛血清(FBS),浙江海正药业有限公司的盐酸 DNR, Small RNA 提取试剂购于 TaKaRa 公司的 RNAiso for small RNA。逆转录 PCR 和 RT-PCR 试剂盒购自 Gene CopoeiaTM 公司。噻唑蓝(MTT)美国 Sigma 公司产品,实验前现配 5 mg/mL 溶液。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 取对数生长期的 HL-60 和 HL-60/A 置于 RPMI1640 培养液中(100 mL 里含有 10 mL FBS),于 37 ℃、50 mL/L CO₂ 饱和湿度的培养箱中稳定生长。细胞悬浮生长,正常情况 2~3 d 更换 1 次新鲜培养基。HL-60/A 以 500 ng/mL 的 DNR 维持耐药表型。

1.3.2 实验分组 分为实验组、对照组 1 和对照组 2。其中实验组以小剂量(10 ng/mL)的 DNR 持续作用于 HL-60 敏感细胞,并于用药后第 1、7、14 和 28 天检测细胞的抑制率及 miRNA 的表达。对照组 1 和 2 分别是 HL-60/A 耐药细胞和不接受 DNR 持续作用的 HL-60 敏感细胞。对照组 1 要以 500 ng/mL 的 DNR 维持其耐药表型。

1.3.3 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测小剂量 DNR 持续作用对 HL-60 细胞的抑制率 用 10 ng/mL 的 DNR 持续作用于 HL-60 DNR 敏感细胞,然后分别在 DNR 作用后的第 1、3、5、7、10 和 14 天取等量的细胞做 MTT 实验。按照上述实验方法,调整细胞密度,每孔取 200 μL 接种于 96 孔培养板中,其中实验组分别加入 4、8 和 16 ng/mL 的 DNR,对照组 1 加入与实验组最大 DNR 用量等体积的生理盐水,对照组 2 只含有培养基无细胞,每组设 6 个孔培养。培养箱中培养 48 h 后加入 MTT 20 μL,继续培养 4 h 后 2 000 r/min 离心 10 min,小心吸

去上清液,每孔再分别加入 150 μL 的二甲基亚砷(DMSO),振荡至 MTT 完全溶解,用酶标仪测各孔 490 nm 波长的吸光度(A)值,绘制小剂量 DNR 作用不同时间后对 HL-60 细胞的抑制率曲线。

1.3.4 microRNA 的提取和逆转录 按说明用 TaKaRa 公司的 RNAiso for small RNA 试剂盒分别提取各实验组及对照组的 miRNA,用紫外分光光度计测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀,计算浓度,并用 15 g/L 的琼脂糖凝胶跑电泳检测 miRNA 的完整性。采用逆转录试剂盒将 miRNA 逆转录为 cDNA,在 25 μL 逆转录体系中含有 5×RT Buffer、miRNA 模板 300 ng、2.5 U Poly A Polymerase 和 RTase Mix 1 μL。反应条件为 37 ℃ 60 min,85 ℃ 5 min。所得的逆转录产物用灭菌水稀释 10 倍进行下一步 PCR 实验。

1.3.5 RT-PCR 检测 miRNA 的表达 RT-PCR 的下游引物为 ALL-in-oneTM miRNA RT-PCR 试剂盒提供的通用引物(Universal adaptor PCR Primer),上游引物用 Primer Premier 5.0 软件按照引物设计原则进行设计,并由上海生工合成。miR-181d 上游:5'-GCG GGA ACA TTC ATT GTT GT-3'; miR-125b 上游:5'- GCT CCC TGA GAC CCT AAC TTG -3'; let-7f 上游:5'- GGG GGT GAG GTA GTA GAT TGT AT-3'; miR-27a 上游:5'- GGA GGG CTT AGC TGC TTG TGA -3'; 内参 U6 和 miRNA-21 的上下游引物由 ALL-in-oneTM miRNA RT-PCR 试剂盒提供。20 μL PCR 反应体系中含有 2×ALL-in-one Qpcr Mix,PCR Forward Primer (2 μmol/L)1.5 μL,Universal Adaptor PCR Primer (2 μmol/L)1.5 μL,10 倍稀释的 cDNA 模板 4.0 μL 和 50×ROX Reference Dyeiv 0.2 μL。PCR 反应条件为:95 预变性 10 min。95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 40 s,重复 40 个循环。各样本均重复 3 孔,以平均 CT 值(阈值循环数)作为每个样本的 CT 值。并以 U6 为内参,采用相对定量 2^{-ΔΔCT} 法进行 miRNA 相对定量的比较。样品目的基因的相对表达用 2^{-ΔΔCT} 方法计算,即 Fold change=2^{-ΔΔCT}=2-[待测组目的基因平均 Ct 值-待测组管家基因平均 Ct 值]-[对照组目的基因平均 Ct 值-对照组管家基因平均 Ct 值]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小剂量 DNR 持续作用对 HL-60 敏感细胞的抑制率 以 10 ng/mL 的 DNR 持续作用于 HL-60 细胞,然后于用药后第 1、3、5、7、10 和 14 天,再分别以 4、8 和 16 ng/mL 等 3 种浓度的 DNR 做 48 h 的 MTT 实验,观察 DNR 对细胞增殖的抑制率,见表 1。随着 DNR 作用时间的延长,各浓度的抑制率逐渐减小,且在加药的第 10 天左右,逐渐进入 1 个平台期,表明随着小剂量 DNR 的持续作用,HL-60 敏感细胞可能在用药后的第 10 天左右逐渐对 DNR 产生耐药,见图 1。

表 1 小剂量 DNR 持续作用对 HL-60 敏感细胞的抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

浓度(ng/mL)	加药第 1 天	加药第 3 天	加药第 5 天	加药第 7 天	加药第 10 天	加药第 14 天
4	18.60±1.15	15.40±1.12	9.50±0.97	7.50±1.18	4.40±0.25	3.20±0.93
8	26.70±3.19	16.60±1.22	13.70±0.85	11.50±1.20	6.90±0.93	7.60±0.75
16	33.80±3.17	27.60±2.58	16.50±2.06	14.90±1.19	9.60±1.00	10.90±1.04

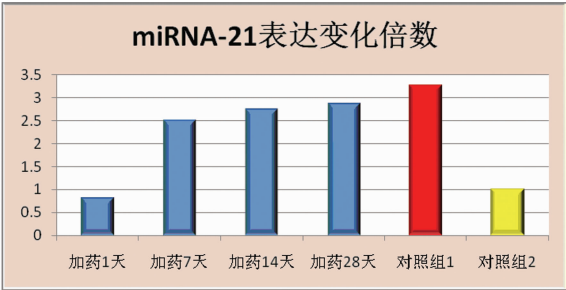


图 1 DNR 作用 miRNA-21 表达的 RT-PCR 检测结果

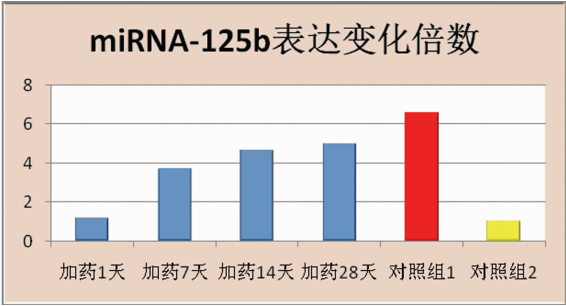


图 2 DNR 作用 miRNA-125b 表达的 RT-PCR 检测结果

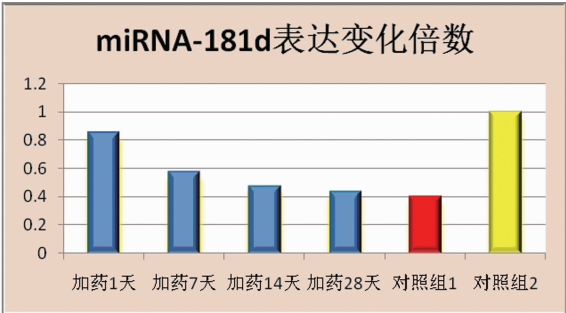


图 3 DNR 作用 miRNA-181d 表达 RT-PCR 检测结果

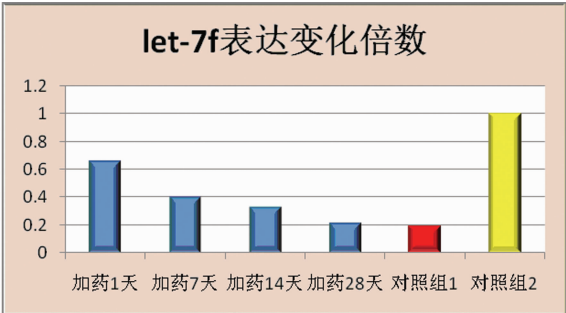


图 4 DNR 作用 let-7f 表达的 RT-PCR 检测结果

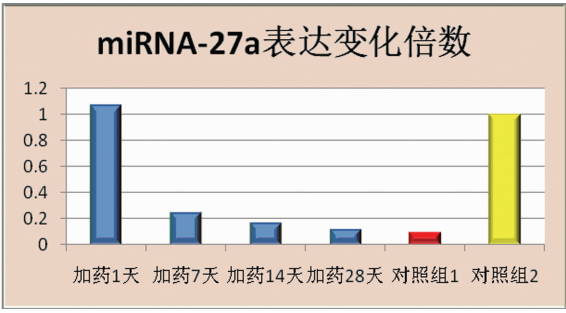


图 5 DNR 作用 miRNA-27a 表达的 RT-PCR 检测结果

2.2 miRNA RT-PCR 检测结果 RT-PCR 检测结果发现,与对照 2 组比较,miRNA-21 和 miRNA-125b 在对照 1 组中的表

达显著上调($P<0.05$),实验组细胞则从加药的第 7 天起表达上调($P<0.05$);相反,miRNA-181d、miRNA-27a、let-7f 在对照 1 组中的表达下调($P<0.05$),而在实验组细胞中则是在加药后的第 7 天开始下调($P<0.05$),见图 1~5。

3 讨 论

抗癌药物的耐药性因人而异,原因很多,其中 miRNA 也是一个重要的影响因素之一。miRNA 的调控是一个复杂的过程,一种 miRNA 可以作用于多个靶基因,而一个靶基因也可以受多种 miRNA 调控。在多种人类癌症中已经发现 miRNA-21 表达上调。Wang 等^[8]研究发现,上调 miRNA-21 在 MCR-7/ADR 细胞中的表达可导致 PTEN 蛋白下调,miRNA-21 的模拟物和抑制物明显影响乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性。转染了抗 miRNA-21 寡核苷酸(anti-miRNA-21 oligonucleotide, AMO-miRNA-21)的细胞可增加 HL-60 细胞对 Ara-C 的敏感性,并证实 AMO-miRNA-21 的作用可能是通过上调 PDCD4 来实现^[9]。随后在耐 DNR 的 K562 白血病耐药细胞中发现 miRNA-21 明显上调,并通过实验证实 miRNA-21 可以调节 PTEN 的表达,影响 PI3K/Akt 通路,从而起到调节 K562 细胞对 DNR 的耐药性^[10]。Zhu 等^[11]通过对比多药耐药细胞和亲本细胞,证实 miRNA-125b 和 miRNA-27a 在人类耐药的卵巢癌细胞和子宫颈癌细胞中表达上调。Zhang 等^[12]发现,miRNA-125b 在儿童 APL 细胞中高表达,并且进一步证实 miRNA-125b 可以通过调节肿瘤抑制基因 *Bak1* 的表达来促进细胞增殖和抑制细胞凋亡。研究还发现,miRNA-125b 在 HL-60/DOX、K562/DOX、NB4-R1 和 NB4-R2 这 4 种白血病耐药细胞中表达上调。这些研究均表明 miRNA-21 和 miRNA-125b 可能与肿瘤的耐药相关。本研究首先使用低浓度 DNR 药物作用于 HL-60 敏感细胞,然后于用药后的第 1、3、5、7、10 和 14 天用不同浓度的 DNR 测试细胞的 MTT 反应,结果发现随着小剂量 DNR 持续作用时间的延长,DNR 对于 HL-60 细胞增殖的抑制率逐渐减小,并在用药后的第 10 天左右逐渐进入平台期,提示 HL-60 敏感细胞可能在小剂量 DNR 持续作用 10 d 左右开始产生耐药。同时,笔者采用 RT-PCR 检测 DNR 不同作用时间 HL-60 敏感细胞中 miRNA-21、miRNA-181d、miRNA-125b、let-7f 和 miRNA-27a 5 种 miRNA 的表达,结果发现 HL-60/A 耐药细胞中的 miRNA-21 和 miRNA-125b 表达明显上调,而敏感细胞的 miRNA-21 和 miRNA-125b 表达也在小剂量 DNR 作用后的第 7 天起出现显著上调,提示 miRNA-21 和 miRNA-125b 的表达上调可能与 HL-60 对 DNR 产生耐药性有关。

Eric 等^[13]利用 miRNA 微阵列技术发现慢性髓细胞白血病细胞敏感株 MYL 与耐伊马替尼耐药株 MYL-R 大约有 30 种 miRNA 的表达出现超过 2 倍以上的差异。其中 miRNA181 (a~d)家族在耐药细胞株中明显下调。本研究发现,miRNA-181d 在 HL-60/A 耐药细胞中表达下调,而敏感细胞则在用药后的第 7 天起出现下调,与上述结果一致。Feng 等^[14]通过实验发现在白血病细胞中 miRNA27a 和 miRNA-331-5p 与耐药基因 *P-gp* 的表达成负相关,并对 K562 耐药细胞和 HL-60 DOX 耐药细胞中分别转染 miRNA27a 和 miRNA-331-5p,发现转染后可以增加耐药细胞对 DNR 药物的敏感性。Let-7 最初发现是参与调节线虫发育时序,Yang 等^[15]的研究表明,let-7i 在耐药的乳腺癌细胞中表达下调,并且减少 let-7i 的表达量可以明显的增加卵巢癌和乳腺癌细胞对化疗药物的抵抗性。本

研究也发现,miRNA-181d、miRNA-27a 和 let-7f 在 HL-60/A 耐药细胞中的表达下调,而 HL-60 敏感细胞则在持续用药的第 7 天起表达下调,提示 miRNA-181d、let-7f 和 miRNA27a 的表达下调也可能与 HL-60 细胞对 DNR 的耐药性也具有一定的相关性。

综上所述,本研究对 5 种 miRNA 在 HL-60 细胞中的表达进行了探索,对这 5 种 miRNA 与 HL-60 细胞耐药性的相关性有了初步的认识。今后还需要通过转染 miRNA 特异的寡核苷酸模拟物及抑制物等手段,进一步了解这些 miRNA 的靶基因及其作用机制,为降低 APL 的耐药性,提高药物化疗效果打下理论基础。

参考文献:

[1] Su YC,Dunn P,Shih LY,et al. Retinoic acid syndrome in patients following the treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid[J]. *Chang Gung Med J*,2009,32(5):535-542.

[2] Sun YL,Patel A,Kumar P,et al. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy[J]. *Chin J Cancer*,2012,31(2):51-57.

[3] Calin GA,Liu CG,Sevignani C,et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(32):11755-11760.

[4] Hong L,Piao Y,Han Y,et al. Zinc ribbon domain-containing 1 (ZNRD1) mediates multidrug resistance of leukemia cells through regulation of P-glycoprotein and Bcl-2 [J]. *Mol Cancer Ther*,2005,4(12):1936-1942.

[5] Zhao Y,Srivastava D. A developmental view of microRNA function[J]. *Trends Biochem Sci*,2007,32(4):189-197.

[6] Carleton M,Cleary MA,Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation[J]. *Cell Cycle*,2007,6(17):2127-132.

[7] Bartel DP. MicroRNAs;genomics,biogenesis,mechanism, and function[J]. *Cell*,2004,116(2):281-297.

(上接第 4449 页)

[11] Xin L,Xu R,Zhang Q,et al. Kringle 1 of human hepatocyte growth factor inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation stimulated by basic fibroblast growth factor and causes cell apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2000,277(1):186-190.

[12] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy [J]. *The Oncologist*, 2002,7 Suppl 4:2-8. .

[13] 秦玉璇,李东风,李良芳,等. 胰腺癌中 EGFR、KRAS、BRAF 基因突变状况分析及意义[J]. *实用医学杂志*, 2012,28(14):2339-2341.

[14] Shen Z,Yang ZF,Gao Y,et al. The kringle 1 domain of

[8] Wang ZX,Lu BB,Wang H,et al. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN[J]. *Arch Med Res*,2011,42(4):281-290.

[9] Li Y,Zhu X,Gu J,et al. Anti-miR-21 oligonucleotide enhances chemosensitivity of leukemic HL60 cells to arabinosylcytosine by inducing apoptosis [J]. *Hematology*, 2010,15(4):215-221.

[10] Bai H,Xu R,Cao Z,et al. Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line[J]. *FEBS Lett*,2011,585(2):402-408.

[11] Zhu H,Wu H,Liu X,et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008,76(5):582-588.

[12] Zhang H,Luo XQ,Feng DD,et al. Upregulation of microRNA-125b contributes to leukemogenesis and increases drug resistance in pediatric acute promyelocytic leukemia[J]. *Mol Cancer*,2011,10:108.

[13] Zimmerman EI,Dollins CM,Crawford M,et al. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression;implications for drug resistance in myelogenous leukemia[J]. *Mol Pharmacol*,2010,78(5):811-817.

[14] Feng DD,Zhang H,Zhang P,et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia78(5) [J]. *J Cell Mol Med*,2011,15(10):2164-2175.

[15] Yang N,Kaur S,Volinia S,et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2008,68(24):10307-10314.

(收稿日期:2014-06-01 修回日期:2014-08-12)

hepatocyte growth factor has antiangiogenic and antitumor cell effects on hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*,2008,68(2):404-414.

[15] Lu Q,Zhang L,Shen X,et al. A novel and effective human hepatocyte growth factor kringle 1 domain inhibits ocular neovascularization[J]. *Exp Eye Res*,2012,105:15-20.

[16] Zhou XH,Tang LN,Yue L,et al. HGFK1 is associated with a better prognostis and reverses inhibition by gefitinib in NSCLC cases[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012,13(4):1457-1461.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-08-15)