

miR-9-3 在慢性淋巴细胞白血病中的功能与调控机制*

宫琦玉 (内蒙古牙克石市人民医院检验科, 内蒙古牙克石 022150)

摘要:目的 探讨 microRNA-9-3(miR-9-3)在慢性淋巴细胞白血病中的作用及调控机制。方法 采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)技术检测 8 例正常人骨髓组织和外周血、78 例新确诊慢性淋巴细胞性白血病患者骨髓组织和 7 种白血病细胞系的甲基化水平;采用 Western blot 技术检测甲基化阳性白血病细胞株的 NF- κ B1 信号转导通路活化水平。结果 正常对照组 miR-9-3 启动子呈非甲基化状态;7 种白血病细胞株中只有 I83-E95 和 WAC3CD5+ 两种细胞株种呈非甲基化状态(MSP 阳性率为 28.6%);78 例慢性淋巴细胞性白血病患者中 65 例发生 miR-9-3 甲基化(MSP 阳性率为 83%)。去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza2'Dc)处理后的 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株 miR-9-3 均处于去甲基化状态。结论 慢性淋巴细胞性白血病患者存在 miR-9-3 异常甲基化,可能导致癌细胞异常增生;miR-9-3 去甲基化可抑制 NF- κ B1 信号通路活化,表明 miR-9-3 可能可以通过该通路抑制癌细胞凋亡,引发患者疾病恶化;甲基化的白血病细胞株可被去甲基化药物抑制,因此 miR-9-3 可以作为治疗慢性淋巴细胞白血病的新基因靶点。

关键词:慢性淋巴细胞白血病;miR-9-3;甲基化特异性聚合酶链反应;5-氮杂-2'-脱氧胞苷

中图分类号:R557.4;R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)02-007-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.003

Function and Regulation of miR-9-3 in Chronic Lymphocytic Leukemia

GONG Qi-yu (Department of Clinical Laboratory,

Yakeshi People's Hospital, Inner Mongolia Yakeshi 022150, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role and regulatory mechanism of micro RNA-9-3 (miR-9-3) in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. **Methods** Using the methylation specific PCR (MSP) technology to detect 8 cases of normal bone marrow tissue and peripheral blood, 78 cases of bone marrow tissue came from the chronic lymphocytic leukemia patients newly diagnosed and the methylation level of 7 kinds of leukemia cell line. Used Western blot to detected the NF-kappa B1 signal transduction pathway activation levels of methylation positive leukemia cell line. **Results** The miR-9-3 of normal control group were in the negative methylation status. Only I83-E95 and WAC3CD5+ were in positive methylation status in seven kinds of leukemia cell line (the positive of MSP was 28.6%); 65 cases occurred miR-9-3 methylated in 78 of chronic lymphocytic leukemia patients (the positive of MSP was 83%). I83-E95 and miR-9-3 cells of WAC3CD5+ were in the methylation state when treatment with 5-nitrogen-2'-deoxidization cytidine (5-Aza2'Dc). **Conclusion** The abnormal methylation of miR-9-3 were usually seen in chronic lymphocytic leukemia, it could lead to abnormal hyperplasia in cancer cells. The methylation of miR-9-3 could inhibit the activation of NF-kappa B1 signal pathway suggested that it could suppress the apoptosis of cancer cells through this pathways to trogered the progression of disease. The inhibitor of methylation could be induced the demethylation of leukemia cell lines, so it is possible that miR-9-3 might be a new gene targets for the treatment of chronic lymphocytic leukemia.

Keywords: CLL; miR-9-3; MSP; 5-Aza2'Dc

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是一种 B 淋巴细胞性恶性克隆增殖性疾病,目前,CLL 的病因及发病机制尚不明确,可能与感染、免疫、遗传等多种因素相关,且在发病个体、疾病进展、治疗反应和临床预后等方面存在异质性。越来越多的研究显示 miR 的突变或者异常表达与 CLL 的发生、发展、预后及药物治疗等具有密切的相关性。MiR-9 家族是 miRNA 的一个亚型,在 miR Base 数据库中可搜索到的人类 miR-9 存在 3 条序列,分别为 has-miRNA-9-1, has-miRNA-9-2 和 has-miRNA-9-3,三者的编码基因

分别位于 1q22, 5q14.3 和 15q26.1 染色体区域,当对应区域的染色体发生突变、异位或缺失时,相应的 miRNA 序列则会异常表达。研究显示,miR-9 可表达于乳腺癌、霍奇金淋巴瘤、人神经母细胞瘤、胃癌、结肠癌、胆管癌等多种癌症性疾病,该基因型的超甲基化在癌症性疾病的发生和发展中起到重要作用。研究表明,miR 可以通过活化 NF- κ B1, MAPK, RAS 和 PI3K 等信号转导通路异常调控多种生物学行为, Hagemann 等^[1]研究表明, NF- κ B1 是 miR-9 在胃癌中的直接靶点,超甲基化的 miR-9 可以通过下调 NF- κ B1 的表达抑制胃癌细胞生长。

* 作者简介:宫琦玉(1968-),女,本科,副主任检验师,从事临床微生物和临床血液病研究, Tel:13644807055。

因此本实验拟采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)技术,研究白血病细胞 miR-9-3 的甲基化水平,及超甲基化的 miR-9-3 是否能通过 NF- κ B1 信号转导通路对慢性淋巴细胞白血病起到调控作用,旨在确定其在 CLL 的发病机制中的作用及调控机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 慢性淋巴细胞性白血病患者共 78 例,均来自内蒙古牙克石市人民医院。其中男性 51 例(65.4%),女性 27 例(34.6%),年龄 37~91 岁,平均年龄 65 岁,经诊断符合白血病 FAB 国际诊断标准。所有病例均为新诊断且未接受过放化疗、诱导分化及骨髓移植等特殊治疗。

1.2 实验方法 所有研究对象采集肝素抗凝骨髓 1~2 ml/份,收集骨髓单个核细胞,−80℃ 冻存。8 例正常供髓者单个核细胞作为对照组(健康志愿者外周血 B 细胞 CD19+, $n=3$;健康志愿者外周血浆, $n=2$;健康志愿者骨髓单个核细胞, $n=3$)。

1.2.1 细胞株培养:人类白血病细胞株 CLL-AAT, MEC1, MEC2, I83-E95, WAC3CD5+, HG3 和 232B4(由内蒙古牙克石市人民医院血液病科赠送),其培养基为含 10ml/dl 胎牛血清、50 U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素和 100 IU/ml RPMI1640,置于 5%(v/v) CO₂, 37℃ 的细胞培养箱培养。每 48~72 h 用含有 0.02 g/dl EDTA, 0.01 g/dl 胰蛋白酶的消化液消化后,进行常规传代培养。实验采用对数生长期细胞。

1.2.2 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP):按照 QIAampDNAMini Kit(QIAGEN, Germany)的操作步骤结合 DNA/RNA 提取仪(QIAcube)输入程序即可快速抽提正常对照组和慢性淋巴细胞性白血病患者细胞株 DNA。每个样品用两组引物,其中一组是针对修饰的甲基化 DNA(M),另一组是针对修饰的非甲基化 DNA(U)。重亚硫酸氢盐处理:加入新鲜配制的 20 mmol/L 氢醌 12.6 μ l 和 4.8 mol/L 亚硫酸氢钠(pH=5.0)320 μ l,PCR 仪进行 55℃, 15 min; 95℃, 30s, 共 20 个循环。以 EZ DNA Methylation kit 对基因组 DNA 进行修饰。将修饰后的 DNA 溶解于 20 μ l 的 M-Elution Buffer,反应产物在 20 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下观察结果。

1.2.3 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-dc)处理:取对数生长期的 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株 1×10^6 /ml 接种于含 10 ml/dl 小牛血清的 RPMI-1640 培养液在 5%(v/v) CO₂, 37℃ 条件下培养。用终浓度为 0.5 μ mol/L 的去甲基化药物 5-Aza-2'-dc(Sigma-Aldrich 公司,美国)处理,每 24 h 加

药一次并换液,在第 0 天和第 5 天分别收获细胞。分别检测 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株的去甲基化水平。

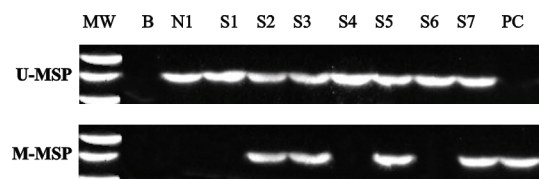
1.2.4 Western blot 检测 NF- κ B1:制作 5-Aza-2'-dc 处理后 miR-9-3 载体,利用 2.5 ng/ μ l 的处理后 miR-9-3 载体转染 I83-E9548 细胞株 48 h 后收集细胞。加入 RIPA 裂解液(50 mmol/L 的 Tris-HCl, pH=7.4, 150 mmol/L 氯化钠, 0.2 g/dl 同 SDS, 1 ml/dl TritonX-100, 2 mmol/L EDTA), Bradford 法测定蛋白浓度,取 20 μ g 蛋白,进行 10 g/dl SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后, PAGE 胶上的蛋白用 Bio-Rad 微型电转移至 0.2 μ m 的硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜加入 NF- κ B1, 4℃ 下孵育 24 h,然后将膜洗涤,加入抗兔辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗,室温下反应 1 h 洗膜,曝光, X-胶片经显影、定影后扫描记录。以 Anti-actin 为内对照。

1.3 统计学分析 以上数据均用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用秩和检验,用 SPSS16.0 统计软件分析。

2 结果

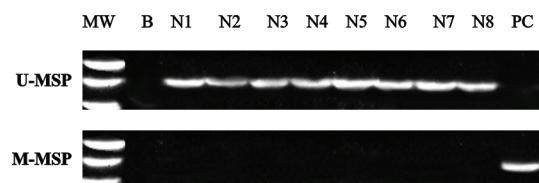
2.1 慢性淋巴细胞白血病 miR-9-3 的 MSP 结果

采用 MSP 检测了 78 例 CLL 患者骨髓和 8 例正常人外周血 miR-9-3 甲基化水平。结果表明,CLL 患者 miR-9-3 的甲基化程度显著高于正常对照组(见图 1);CLL 患者中,65 例表现为 miR-9-3 超甲基化(MSP 阳性率为 83%),正常人(N1~N8) MSP 结果均为阴性(见图 2)。



U-MSP: MSP 阴性; M-MSP: MSP 阳性; MW: Marker; B: 空白; N1: 健康志愿者骨髓单个核细胞; S: CLL 患者; PC: DNA 甲基化阳性对照组。

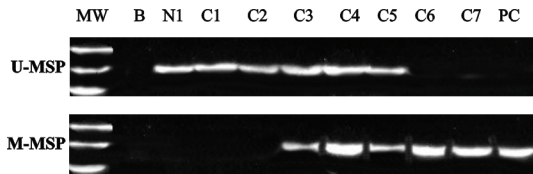
图 1 CLL 患者的 miR-9-3MSP 结果



U-MSP: MSP 阴性; M-MSP: MSP 阳性; MW: Marker; B: 空白; N1~N3: 健康志愿者外周血 B 细胞 CD19+; N4~N5: 健康志愿者外周血浆; N6~N8: 健康志愿者骨髓单个核细胞; PC: DNA 甲基化阳性对照组。

图 2 对照组的 miR-9-3MSP 结果

2.2 人白血病细胞株 miR-9-3 的 MSP 结果 采用 MSP 检测 7 种 CLL 细胞系 miR-9-3 甲基化表达谱显示: I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞系发生 miR-9-3 完全甲基化, 232B4, CLL-AAT 和 HG3 细胞系发生 miR-9-3 部分甲基化, 而 MEC1 和 MEC2 则为完全非甲基化(见图 3)。

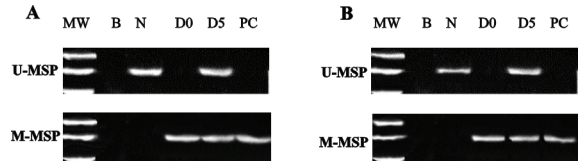


U-MSP: MSP 阴性; M-MSP: MSP 阳性; MW: Marker; B: 空白; N1: 健康志愿者骨髓单个核细胞; C1: MEC1; C2: MEC2; C3: 232B4; C4: CLL-AAT; C5: HG3; C6: I83-E95; C7: WAC3CD5+; PC: DNA 甲基化阳性对照组。

图 3 CLL 细胞株的 miR-9-3MSP 结果

2.3 5-Aza-2'-dc 对 miR-9-3 甲基化程度的影响 采用 MSP 检测 5-Aza-2'-dc 处理前后 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株 miRNA-9-3 的甲基化水

平, 结果表明, 处理后的 miRNA-9-3 甲基化水平均明显下降, 与第 5 天相比, 加入 5-Aza-2'-dc 当天对 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株 miRNA-9-3 甲基化水平的抑制作用较显著 ($P < 0.05$) (图 4A, B)。



U-MSP: MSP 阴性; M-MSP: MSP 阳性; MW: Marker; B: 空白; N: 健康志愿者骨髓单个核细胞; D0: 第 0 天; D5: 与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-AzaDc 培养的第 5 天; PC: DNA 甲基化阳性对照组。

图 4 5-AzaDc 对 I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株治疗作用

2.4 转染 miR-9-3 对 I83-E9548 细胞株 NF- κ B1 蛋白水平的影响 I83-E9548 细胞株转染 48h 后收集细胞, 提取蛋白, 采用 Western blot 法来比较各组细胞内 NF- κ B1 蛋白 P105 和 P50 的含量。结果表明, 转染 miR-9-3 后的 I83-E9548 细胞株与对照组相比 NF- κ B1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 5)。NF- κ B1 蛋白 P105 和 P50 表达水平下降。

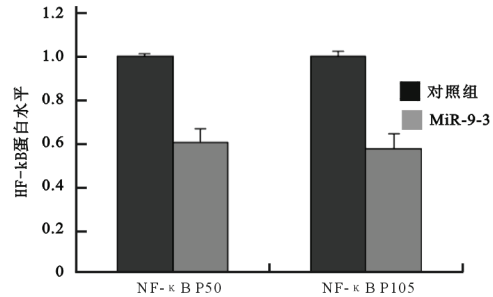
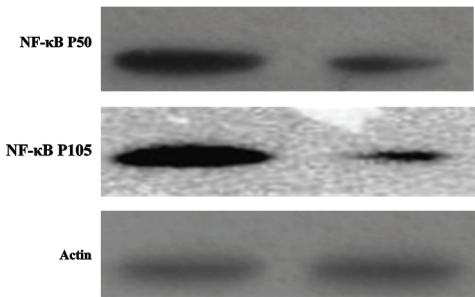


图 5 I83-E9548 细胞株 NF- κ B1 蛋白水平的变化

3 讨论

3.1 微 RNA (microRNA, miRNA) 是长度为 19 ~ 25 个核苷酸组成的非编码单链小分子 RNA, 能与靶 miRNA 特异的碱基对结合, 抑制其靶蛋白的降解或表达, 从而参与基因转录后修饰调控基因表达^[2]。根据其在癌症发生发展中的作用, 可分为致癌基因和抑癌基因 miRNA^[3]。以往研究表明一些抑癌基因的 miRNA 甲基化参与 CLL 发病, 其中包括 miR-203, miR-124-1, miR-181a/b, miR-107 和 miR-424^[4], 而在癌症性疾病中, 抑癌基因 miRNA 的 DNA 甲基化常表现为异常沉默状态。在人类基因型中有三组独立的 miR-9 基因型: miR-9-1 位于 1 号染色体上; miR-9-2 位于 5 号染色体上; miR-9-3 位于 5 号染色体上, 三者均具有相同的 miR-9 序列^[5]。miR-9 既可以作为致癌基因, 也可以作为抑癌基因, 其在癌症发生和发展中的作用取决于癌症或癌组织类型, 已证明 miR-9 过表达能促使乳腺癌癌细胞或胶质瘤母细胞的

转移和侵袭, 而反之, miR-9 又可以通过与 3' 非编码区 NF- κ B1 的 mRNA 结合, 从而抑制卵巢癌细胞增殖^[6]。

3.2 miRNA 的表达常常和表观遗传学有关, 表观遗传现象种类很多, DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传现象最常见, 且与恶性肿瘤发生发展密切相关, 特别是 CpG 岛甲基化所致抑癌基因转录失活和 N 端结构域转录后修饰, 使 DNA 甲基化和组蛋白修饰成为目前表观遗传学和表观基因组学在肿瘤研究领域的重要分支。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶的作用下通过化学修饰, 以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 为甲基供体, 将甲基 (-CH₃) 基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤 (CpG) 二核苷酸胞嘧啶的 5 位碳原子上, 导致 5-甲基胞嘧啶的形成^[7]。在健康人的基因组中, CpG 岛中的 CpG 位点一般处于非甲基化状态, 而 CpG 岛外的 CpG 位点通常是甲基化状态, CpG 岛局部高甲基化和基因组 DNA 低甲基化状态是引发肿瘤的重要原因之一。在正

常细胞中,位于抑癌基因启动子区域的 CpG 岛处于低水平或非甲基化状态,此时抑癌基因不断表达可抑制肿瘤的发生,但在肿瘤细胞中该区域的 CpG 岛则发生高度甲基化,致使染色质构象发生改变,抑癌基因的表达受抑制,从而导致细胞凋亡丧失、DNA 修复缺陷、新血管生成及细胞黏附功能缺失等,最终导致肿瘤发生^[8,9]。

3.3 我们利用 MSP 对已知引物进行测序,发现除了 CpG 位点中被甲基化的 C 未被转化外,所有的 C 均被转化为 T,说明 MSP 结果的准确性。因此,我们进一步利用 MSP 检测了 78 例 CLL,7 例不同白血病细胞株和 8 例正常人的 miR-9-3 CpG 岛甲基化情况,结果发现各类型样本间 miR-9-3 CpG 岛甲基化情况有显著性差异,比较后结果表明,CLL 患者的 miR-9-3 CpG 岛甲基化水平和阳性率均显著高于正常人,7 例不同白血病细胞株中也有 2 例发现 miR-9-3 CpG 岛甲基化阳性,且阳性水平显著高于正常人。至于 78 例 CLL 的甲基化表达存在的差异是否与 CLL 分期、性别、年龄等因素有关,尚需进一步研究。结果发现 83% 的 CLL 患者的骨髓单核细胞中存在 miR-9-3 甲基化,说明 miR-9-3 与 CLL 的发生发展具有一定的相关性。本实验研究同时研究了不同白血病细胞株中 miR-9-3 的甲基化水平发现,I83-E95 和 WAC3CD5+ 细胞株转染前均呈高甲基化状态,而利用去甲基化药物 5-Aza-2'-dc 处理后均发生去甲基化,呈非甲基化状态。说明 5-Aza-2'-dc 具有诱导 miR-9-3 去甲基化的能力,这种能力可能与 5-Aza-2'-dc 降低了 miR-9-3 表达有关。有研究表明 5-Aza-2'-dc 作用机制是先与靶基因结合,再与 DNA 甲基转移酶结合,形成一个不可逆的复合物,从而阻断甲基转移酶的活性^[10]。

3.4 研究表明 miR-9-3 可以通过调控 NF- κ B1 信号转导通路影响白血病细胞的生长,miR-9-3 可直接作用于 NF- κ B1 的 3'UTR 区,说明 NF- κ B1 是 miR-9-3 的重要靶点,当 miR-9-3 低表达时,NF- κ B1 的 mRNA 和蛋白均会受到抑制^[11]。NF- κ B1 等信号转导通路的活化不但可以干扰调节细胞因子的增殖和抑制凋亡,还可以引起造血干细胞调节生长和分化的必须黏附程序的缺失,最终导致骨髓祖细胞大量增生、凋亡减少与骨髓基质细胞黏附性下降,使大量不成熟的髓细胞释放到外周血,导致 CLL 的发生。同时通过激活 NF- κ B1 等信号转导通路,还可以促进抗凋亡蛋白 Bcl-XL 的表达,抑制 Bad, Bax, Bak 等促凋亡蛋白活性,维持线粒体结构稳定,抑制线粒体释放 CytC, Smac/Diablo 等促

凋亡蛋白,组织 Caspase-3 活化和 DNA 片段化,抑制细胞凋亡,引发宿主细胞恶性转化^[12]。本实验通过减弱或抑制 miR-9-3 的甲基化,观察其对白血病细胞 NF- κ B1 的表达,结果表明,抑制 miR-9-3 基因后,I83-E95 细胞株的 NF- κ B1 表达显著降低,说明抑制 miR-9-3 基因也可抑制白血病细胞的生长。

综上,miR-9-3 的甲基化与 CLL 的发生和发展具有很强的相关性,抑制 miR-9-3 的甲基化有望作为基因治疗 CLL 的靶点之一。

参考文献:

- [1] Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, et al. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF kappa B and JNK[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 1197-1205.
- [2] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.
- [3] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [4] Wang LQ, Liang R, Chim CS. Methylation of tumor suppressor microRNAs: lessons from lymphoid malignancies[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(7): 755-765.
- [5] Tsai KW, Liao YL, Wu CW, et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer[J]. Epigenetics, 2011, 6(10): 1189-1197.
- [6] Ma L, Young J, Prabhala H, et al. MiR-9 a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates e-cadherin and cancer metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(3): 247-256.
- [7] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1148-1159.
- [8] Kanduri, C. Long noncoding RNA and epigenomics[J]. Adv Exp Med Bio, 2011(722): 174-195.
- [9] Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 27-36.
- [10] Dixon-Mclver A, East P, Mein CA, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia [J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2141.
- [11] Zhang HY, Qi M, Li SW, et al. MicroRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(7): 1454-1466.
- [12] Wan HY, Guo LM, Liu T, et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2010(9): 16.