

## 微RNA对K562细胞基因表达谱的影响

微RNA(miRNA)是继小干扰RNA(siRNA)之后,新发现的一类长约22 nt的小分子单链非编码RNA。本研究利用siRNA在形成RNA诱导的沉默复合物过程中的不对称特点[1], [2],设计并合成类似于siRNA duplex的特异性的miRNA duplex,转染真核细胞以获得表达特定miRNA的细胞模型,从而为miRNA的功能研究打下基础。通过脂质体法转染体外设计并合成的造血系统特异性的miR-181a进入人白血病K562细胞,结合应用基因芯片技术研究其对K562细胞基因表达谱的影响,将为阐明微RNA的功能及其具体的作用机制提供了重要的线索和依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

人慢性髓系白血病(CML)K562细胞由本实验室培养。RPMI 1640培养基、精制小牛血清、Oligofectamine™及Opti-MEM I减血清培养基购自美国Invitrogen公司。RNeasy mini试剂盒购自德国Qiagen公司。RNA 6000 Pico LabChip试剂盒、cRNA线性扩增标记试剂盒及人全基因组寡核苷酸芯片购自美国Agilent Technologies公司。RT-PCR试剂购自大连宝生物公司。

#### 1.2 仪器

CO<sub>2</sub>细胞培养箱(德国WTB-Binder)、倒置显微镜(日本NIKON)、低温离心机(德国Beckman)、紫外分光光度计(德国Beckman)、PCR仪(美国PE公司)、UVP凝胶图像分析系统(美国Gene公司)、Agilent 2100生物分析仪、Agilent 2565BA 基因芯片扫描仪由美国Agilent Technologies公司提供。

#### 1.3 方法

1.3.1 微RNA的设计与合成 通过在线的Sanger microRNA registry数据库获取人miR-181a成熟序列信息,利用siRNA duplex的两条链在掺入形成沉默复合物过程中的不对称性,设计对应的miRNA duplex,其序列信息(23 bp), sense: 5'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-3'; antisense: 5'-UCACCGACAGCGUUGAAUGUUGU-3'。miRNA duplex 由广州市锐博生物科技有限公司合成,-20℃保存。

1.3.2 细胞培养 K562细胞培养于含10%小牛血清,无青、链霉素的RPMI 1640培养基中,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>,每3~4 d换液传代培养。

1.3.3 转染 用Oligofectamine™脂质体转染法 当K562细胞汇合率达到70%~80%时,在24孔板中进行转染。实验共分3组,每组8孔,分别为转染组、阴性对照组和空白对照组。先用PBS缓冲液将细胞洗1遍,之后用Opti-MEM<sup>®</sup> I 减血清培养基重悬细胞沉淀,接种于24孔板中,每孔细胞数为5×10<sup>5</sup>,终体积为600 μl,然后各组再分别按如下进行转染。处理组每孔miRNA终浓度为0.1 μmol/L[3 μl miRNA duplex溶于50 μl 减血清培养基 + 3 μl Oligofectamine™溶于12 μl 减血清培养基];阴性对照组每孔为:3 μl Oligofectamine™溶于12 μl 减血清培养基;空白对照组未加任何处理。将24孔板放在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h后,每孔加入60 μl 小牛血清,使培养液血清终浓度约为10%,培养48 h后收集细胞。

1.3.4 总RNA抽提及样品标记 收集转染组、阴性对照组,按照RNeasy mini试剂盒说明抽提细胞总RNA, RNA质量采用Agilent 2100生物分析仪进行鉴定,结果显示28 S和18 S RNA比值约为2:1,符合芯片检测要求。样品标记按照Agilent cRNA线性荧光扩增标记试剂盒说明书提供的方法进行,采用Cy5标记转染组样品, Cy3标记对照组样品,标记好的cRNA样品用RNeasy mini试剂盒进行纯化。

1.3.5 芯片杂交、扫描及数据采集 采用Human 1A全基因组寡核苷酸芯片(22575个点),包含约20173个基因,918个阳性对照探针,162个阴性对照探针。按照Agilent公司的原位杂交试剂盒说明书配制2×cRNA样品溶液、2×杂交溶液。之后取一新盖玻片(标签面向上)置于杂交盒底座上,在盖玻片上滴加450 μl杂交标本,将寡核苷酸芯片(数字面向上)盖在盖玻片上,装好杂交盒后,置于杂交炉中60 °C, 4 r/min杂交16 h。芯片洗涤、干燥等操作均按照说明书进行。采用Agilent 2565BA基因芯片扫描仪进行芯片扫描,扫描后的图像用Feature Extraction软件进行数据采集、分析及均一化处理。

1.3.6 差异基因筛选方法 将Feature Extraction软件导出的数据导入Excel软件进行分析,以Cy3以及Cy5 LogRatio P Value为标准进行判断。

1.3.7 半定量RT-PCR验证部分差异基因 从上述差异表达基因中,选出4个可能的靶基因作进一步验证。取15 μg总RNA,加入Oligo(dT)18在AMV逆转录酶作用下进行逆转录反应,反应体系为20 μl,反应条件为42°C 60 min, 72°C 10 min。以GAPDH为内参照采用半定量RT-PCR验证RALA、SEMA4C、CTCF、ZAP704个基因,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列及扩增产物长度见表1。PCR反应条件为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C延伸10 min。

表 1 半定量 RT-PCR 引物序列  
Tab.1 Sequence of the primers for semi-quantitative RT-PCR

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer	Length of product
<i>GAPDH</i>	5'-CAACGGATTTGGTTCGTATT-3'	5'-CACAGTCTTCTGGGTGGC-3'	541 bp
<i>SEMA4C</i>	5'-GCCTTCTTGTGGATGGTG-3'	5'-TGAGGATGTTGTCGGGTAG-3'	669 bp
<i>RALA</i>	5'-ATCGGAAGAAGGTAGTGC-3'	5'-AATCTGCTCCCTGAAGT-3'	182 bp
<i>CTCF</i>	5'-AGGTGGTCCAGGATGTC-3'	5'-CTTCAGGCAAAGGTAGGG-3'	342 bp
<i>ZAP70</i>	5'-TCCCTGTGAGCAATGTGGC-3'	5'-TGAGCGGGCAGTGTAGTAGC-3'	194 bp

## 2 结果

### 2.1 芯片杂交结果

除质量控制点及未能达到分析要求而被排除的基因探针之外,在检测的20173个基因中,共筛出差异表达基因228个,其中169个基因表达下调,59个基因表达上调,它们当中可能存在着miR-181a调控基因表达的作用靶点。

### 2.2 生物信息学分析

对上述差异表达基因进行Panther生物学过程分类,结果发现上调的59个基因中,已知功能基因有57个,包括①与信号转导相关: CABP2、DDEF1、ETL1、ETV4、GLP2R、GNG10、FOXC1、SH3MD1、PE- NK、PTPRN2、S100A1、SPSB3、VN1R1; ②与免疫防御相关: SELP、NOX4; ③与肿瘤发生相关: ANGPT2、CYP1A1、ETV1、GARP、PIP、S100A4、STK11、AP1S2、CTCF、KIAA1055、COMMD5; ④与细胞周期及生长、分化相关: KIF5B、RAB23、RAB28、RPIP8、THOP1、ZAP70、ZFP29; ⑤与转运相关: KCNJ9、ACCN1、SLC12A5、KCNA2、SLC6A13、PTGDS、COPE、SYT9; ⑥与核苷酸代谢相关: FLJ22578、ZNF215、PCBP1、POLR2D; ⑦其它: BGLAP、ZCCHC6、TMEM44、C6orf136、FLJ3577等。

而169个下调基因中, 已知功能基因有154个, 包括①与肿瘤发生相关: ABCC6、CAV2、ERBB4、HOXA7、ICT1、LMO2、OGG1、RAD51C、RALA、RAP-1GDS1、TK1、TAX1BP1、RU2、EPLIN、MUCDHL、TS-AP6、NM\_022097.1、AKR1B10、LEPRE1、NM\_025214.1、B3Gn-T6; ②与免疫防御相关: ABCC4、ALOX12B、AP3S1、BF、CCL25、CD84、HLA-A、IL13RA2、DEFB4、IL18BP、KREMEN2、NM\_015569.1、SOD1、SYTL4、V-AMP1; ③与抑制凋亡相关: IFNA4、IFNA21、RELB; ④与发育相关: DRIL2、KIAA0976、FRABIN、NUP50、HEM1、KRT9、RBM3; ⑤与蛋白代谢与修饰相关: B3GALT3、BMPR1B、CABP5、CDC2L5、FLJ20313、IN-DO、MRPS5、MTMR1、NEU1、I\_957066、NM\_005881.1、NM\_152699.1、NYD-TSPG、PTPN18; ⑥与核苷酸代谢相关: DKFZP547E2110、BLVRA、CSTF2T、DDX18、TDP1、LQFBS-1、NM\_001152.1、RPP20、PRPS-AP1、FLJ10581、RGR、STAU; ⑦与脂类代谢相关: APOA1、HADH2、HSD11B2、PLA2G2E、PLCB2、PLCL2、SORT1、SIAT4C、NM\_015141.1; ⑧与mRNA转录相关: CNOT4、HDAC9、MGC15631、OTX2、TADA2L、HBXAP、TAF12、I\_1109211、DERM01、ZFP28、I\_1151-919、ZNF300、FLJ13590; ⑨与信号转导相关: ARRB2、ATP6V0C、DSCR1L2、EPN3、GJB5、GNB3、GPR15、G-PR56、MTNR1B、SERPINA12、RALBP1、PPFIA1、I\_1151949、I\_929207、I\_1221818、SEMA4C、I\_1152096、TNXB、CEB1、TRH; ⑩其他: CYGB、FBX032、LEP-REL2等。

本文实验数据已经提交美国NCBI的Gene Expression Omnibus数据库(GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 接受号为GSE3605。

### 2.3 RT-PCR验证

选择其中4个差异基因, 采用半定量RT-PCR作进一步验证。经RT-PCR检测, 转染微RNA至K562细胞48 h后, RALA的表达降低了28.8%, SEMA4C的表达降低了26.1%, 而CTCF的表达上调了39.8%, ZAP70的表达上调了93.7%, 该结果进一步证明了芯片结果的可靠性(图1)。

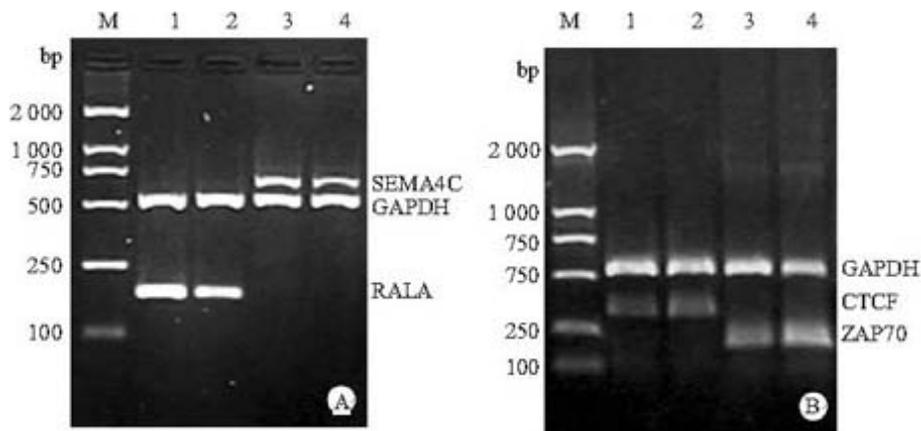


图1 芯片数据可靠性验证

Fig.1 Confirmation of the reliability of the microarray data

A: Expressions of RALA and SEMA4C mRNA in transfection group and control group; B: Expressions of CTCF and ZAP70 mRNA in transfection group and control group; M: DNA marker DL2000; Lanes 1 and 3: Control group; Lanes 2 and 4: Transfection group

## 3 讨论

微RNA的研究已经成为当前的一大热点, 据预测人的微RNA基因数约在200~255之间, 约占人类基因组的1%。目前已经确定的人的微RNA数有227个, 但对于微RNA的功能研究仍不尽人意, 从1993年发现第一个微RNA至今, 在动物中发现的确定功能的微RNA数量不超过10个[3]。

微RNA miR-181a是研究较多的一种与造血调控相关的微RNA, 它在小鼠骨髓B细胞中优先表达, 其表达上

调与B淋巴细胞的分化相关。体外试验证实, 当其在造血干/祖细胞中表达时, 促进了组织培养试验和移植小鼠外周血中的B细胞分化[4]。尽管并未见到有文献报道miR-181a与白血病有关, 但Cheng等[5]人通过反义抑制miR-181a的表达促进了肺癌细胞株A549的增殖, 提示miR-181a可能与肿瘤细胞的增殖密切相关, 但其具体的作用机制仍不清楚。Ramkinssoon等[6]人通过Northern分析证实, 在K562细胞株中未检测到miR-181a的表达。因此, 本研究利用Oligofectamine脂质体法转染化学合成的miR-181a进入K562细胞, 模拟体内miR-181a的高表达, 观察其对K562生长和增殖的影响, 并结合基因芯片技术对miR-181a转染K562细胞48 h后的基因表达谱进行了研究, 同时结合生物信息学方法对相关基因进行分析, 初步探讨miR-181a抑制K562细胞生长的具体机制。

本研究中, 转染造血组织特异性的微RNA后, 细胞生长亦受到了抑制, 但是否可以促使K562细胞向良性方向发展还有待进一步研究。

我们还发现, ZAP70在转染后K562细胞内表达上调, 而ZAP70信号通路的激活与T淋巴细胞的活化有关, 同时它又在TCR和MARK信号通路中起了重要的作用。RPIP8、RAB23、I\_1152453、GNG10都属于Ras信号通路成员, 已有研究表明CML病情的发生发展确实与Ras信号传导通路有关及Ras基因活性失调有关[7]。由此推测, miR-181a在K562细胞内发挥作用的过程中可能涉及Ras信号传导通路。PCBP1编码的是一种poly(rC)结合蛋白, 其主要作用是抑制蛋白的翻译, 同时可以稳定mRNA, 它可能与微RNA调控靶基因的机制有关。

研究发现的差异基因约75%(169个)为下调基因, 这说明微RNA在体内主要是通过负调控靶基因来完成其调控作用, 而这些基因主要是与肿瘤、mRNA转录、核苷酸代谢相关基因。我们发现miR-181a对K562细胞基因表达谱的影响, 总体上看表现为抑癌基因表达上调, 而原癌基因表达下调, 可以推测miR-181a可能对于肿瘤的生长具有一定的抑制作用。下调基因还包含了一些与转录调控相关的基因, 它们可能是微RNA在转录后水平上抑制基因表达的调控方式得以实现的基础。然而, 这种调控方式是十分复杂的, 是多基因共同调控的最终结果, 因此很难通过一次实验得知其靶基因。但本研究, 将造血系统特异性微RNA转染K562细胞, 并从全基因组水平上分析这种小分子非编码RNA对于真核生物细胞基因表达的影响, 这为下一步深入了解微RNA的功能及其具体的作用机制提供了重要的线索和依据, 同时也为白血病的治疗提供了一种新思路。

#### 参考文献:

- [1]Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. Cell, 2003, 115(2): 199-208.
- [2]Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias[J]. Cell, 2003, 115(2): 209-16.
- [3]陈芳, 殷勤伟. 调控基因表达的miRNA[J]. 科学通报, 2005, 50(13):1289-99.
- [4]Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis[J]. Semin Immunol, 2005, 17(2):155-65.
- [5]Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1290-7.
- [6]Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells[J]. Leuk Res, 2006, 30(5): 643-7.
- [7]燕翔, 马文丽, 宋艳斌, 等. N-ras基因在K562细胞中的表达研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(3):245-6.