

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.003

· 基础研究 ·

三氧化二砷联合 miR-203 对人白血病 K562 细胞的抑制作用及其机制

黄之虎¹, 韦思羽¹, 农朝赞¹, 韦仕喻¹, 农少云¹, 郭凌霄¹, 李育敏¹, 何金花², 杨林杰³ (1. 广西壮族自治区民族医院检验科, 广西南宁 530001; 2. 广州市番禺区中心医院检验科, 广东广州 511400; 3. 广州医科大学附属第二医院神经科学研究所, 广东广州 510260)

[摘要] **目的:** 研究三氧化二砷(As₂O₃)联合过表达的微小 RNA-203(microRNA-203, miR-203)对白血病 K562 细胞的抑制作用及其可能的分子机制。**方法:** 将 miR-203 的真核表达载体 pmiR-203 转染 K562 细胞, Real-time PCR 检测细胞内 miR-203 的表达。将 K562 细胞分为空白对照组、As₂O₃ 组、pmiR-203 组、空质粒对照组、As₂O₃ 联合空质粒对照组和 As₂O₃ 联合 pmiR-203 组, MTT 法检测各组细胞增殖抑制率, 流式细胞术仪检测细胞凋亡率, Western Blotting 检测细胞内 Bcr/abl 蛋白的表达水平。构建 Bcr/abl 3'UTR 和 Bcr/abl mut-3'UTR 的双荧光素酶报告基因载体, 将其与 pmiR-203 共转染 K562 细胞, 通过荧光素酶活性分析判断 miR-203 是否与 Bcr/abl 基因的 3'UTR 结合。**结果:** miR-203 的真核表达载体 pmiR-203 转染 K562 细胞后, 细胞内 miR-203 的表达水平明显增高($P < 0.05$)。高表达 miR-203 联合 As₂O₃ 使 K562 细胞对 As₂O₃ 的敏感性提高到单用 As₂O₃ 的 4.86 倍, IC₅₀ 从 3.4 μmol/L 降低至 0.7 μmol/L, 两者联用表现为协同作用。As₂O₃ 联合 pmiR-203 组的细胞凋亡率显著高于 As₂O₃ 联合空质粒对照组($29.97 \pm 3.19\%$ vs $10.77 \pm 1.71\%$, $P < 0.05$)。过表达 miR-203 显著下调 K562 细胞内 Bcr/abl 蛋白的表达水平。Bcr/abl 3'UTR 中带有明确的 miR-203 结合位点。**结论:** miR-203 可提高白血病 K562 细胞对 As₂O₃ 的敏感性, miR-203 和 As₂O₃ 联用对 K562 细胞具有协同抑制作用, 其作用机制可能与 miR-203 直接下调 Bcr/abl 融合基因的表达有关。

[关键词] 三氧化二砷; 微小 RNA-203; 白血病; K562 细胞; Bcr/abl

[中图分类号] R733.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0499-06

Inhibiting effects of arsenic trioxide in combination with miR-203 on leukemic K562 cells and its mechanisms

Huang Zhihu¹, Wei Siyu¹, Nong Chaozan¹, Wei Shiyu¹, Nong Shaoyun¹, Guo Lingxiao¹, Li Yumin¹, He Jinhua², Yang Linjie³ (1. Department of Clinical Laboratory, Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001, Guangxi, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Center Hospital of Panyu District, Guangzhou 511400, Guangdong, China; 3. Institute of Neuroscience, Guangzhou Medical University-Affiliated Second Hospital, Guangzhou 510260, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect of arsenic trioxide (As₂O₃) in combination with overexpression of miR-203 on leukemic K562 cells. **Methods:** Eukaryotic expression vector of miR-203 (pmiR-203) was transfected into K562 cells. Transcript levels of miR-203 were quantified by real-time quantitative PCR. K562 cells were incubated with different concentrations of As₂O₃ alone or in combination with pmiR-203. Cell viability was measured by MTT assay. Cell apoptosis was analyzed using flow cytometry. Bcr/abl protein contents were assessed by Western blotting. The ability of miR-203 to bind to Bcr/abl 3'UTR was determined by Bcr/abl 3'UTR and Bcr/abl mut-3'UTR dual luciferase report vector assays. **Results:** Levels of miR-203 transcript were significantly increased in pmiR-203-transfected K562 cells. Overexpression of miR-203 combined with As₂O₃ treatment increased the sensitivity K562 cells to As₂O₃ by up to 4.86-fold

[基金项目] 广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053177)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. 2012GXNSFAA053177)

[作者简介] 黄之虎(1965-),男,广西南宁人,副主任技师,主要从事肿瘤分子靶向治疗研究, E-mail: huangzhihu163@163.com

[通信作者] 杨林杰(Yang Linjie, corresponding author), E-mail: eyanglinjie@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1509.003.html>

alone while the IC_{50} was decreased from 3.4 $\mu\text{mol/L}$ to 0.7 $\mu\text{mol/L}$ as compared with As_2O_3 . The number of apoptotic cells was increased in pmiR-203-transfected K562 cells treated with As_2O_3 ($[29.97 \pm 3.19]\%$) compared with As_2O_3 alone ($[10.77 \pm 1.71]\%$, $P < 0.05$). Overexpression of miR-203 resulted in decreases in Bcr/abl protein levels and Bcr/abl-3'UTR reporter activity without affecting activity of Bcr/abl-mut-3'UTR reporter in K562 cells. A binding site in the sequence of Bcr/abl-mut-3'UTR was identified. **Conclusion:** Overexpression of miR-203 may enhance the sensitivity of leukemic K562 cells to As_2O_3 , at least partially through down-regulation of Bcr/abl expression.

[**Key words**] As_2O_3 ; miR-203; leukemia; K562 cell; Bcr/abl

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 499-504]

三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)是中药砒霜的主要成分之一,在临床上用于白血病的治疗。基础研究^[1-3]证实, As_2O_3 对肝癌、胶质瘤等多种肿瘤细胞具有较强的抑制增殖、促进凋亡的作用,与其他化疗药物联合使用还可提高抗肿瘤强度^[4]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类存在于真核生物中的内源性非编码小分子单链RNA,在转录后水平调控基因表达。研究^[5-7]表明,miRNA-203(miR-203)在白血病细胞中表达缺失或低表达,过表达miR-203可诱导细胞凋亡,具有抗白血病作用。本研究将miR-203的真核表达载体转染慢性粒细胞白血病K562细胞,并联合使用 As_2O_3 ,探讨联合用药的作用及其分子机制,为靶向miR-203的基因治疗与传统化疗联合应用抗白血病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人慢性粒细胞白血病细胞株K562由本实验室保存,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,于37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,传代至对数生长期,选用0.2%锥虫蓝拒染率>95%的细胞进行实验。

1.2 主要材料及试剂

As_2O_3 购于sigma公司。miR-203真核表达载体(pmiR-203)由广州市番禺区中心医院检验科提供^[8]。胎牛血清、DMEM/F12培养基购于Gibco公司,脂质体Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司,TRIzol购于北京天根生化科技有限公司,miR-203 Real-time PCR试剂盒购于上海吉玛制药技术有限公司,MTT试剂购于sigma公司,Annexin V/PI凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司,BCA蛋白浓度定量检测试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司,鼠抗人 β -actin购于武汉博士德生物工程有限公司,鼠抗人Bcr/abl购于Abcam公司,ECL试剂盒购于碧云天生物技术研究,psi-CHECK-2双荧光素酶报告基因载体购于Promega

公司,Bcr/abl 3'UTR和Bcr/abl mut-3'UTR PCR扩增引物由上海生物工程公司合成,PCR扩增试剂盒购于TaKaRa公司,DNA凝胶回收试剂盒和高纯质粒小量提取试剂盒购于Dongsheng Biothch公司,Xho I、Not I内切酶和T4 DNA连接酶购于TaKaRa公司。基因测序由华大基因公司完成。

1.3 Real-time PCR检测转染pmiR-203对K562细胞内miR-203表达水平的影响

实验分空白对照组、pmiR-203组和空质粒对照组,每个组设3个复孔。pmiR-203和空质粒的DNA转染终质量浓度为0.05 $\mu\text{g/ml}$ 。将K562细胞以 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于24孔板,按Lipofectamine™ 2000说明书转染质粒。48 h后离心收集细胞,按TRIzol说明书提取各组细胞的总RNA。按Real-time PCR试剂盒说明书检测细胞内miR-203的表达水平。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析,以U6 snRNA为内参照, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct_{\text{miR-203}} - Ct_{U6}) - \text{对照组}(Ct_{\text{miR-203}} - Ct_{U6})$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组miR-203的表达相对于对照组的表达变化倍数。

1.4 MTT法检测高表达miR-203联合 As_2O_3 对K562细胞的增殖抑制作用

实验分为空白对照组、 As_2O_3 组、pmiR-203组、空质粒对照组、 As_2O_3 + 空质粒组和 As_2O_3 + pmiR-203组。设 As_2O_3 浓度为0.5、1、2、3、4及5 $\mu\text{mol/L}$,设pmiR-203和空质粒的DNA转染终质量浓度为0.05 $\mu\text{g/ml}$ 。将K562细胞按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于96孔板,设4复孔,按Lipofectamine™ 2000说明书转染质粒,并加入不同浓度的 As_2O_3 。48 h后进行MTT检测,全自动酶标仪检测570 nm处各孔光密度(D)值。增殖抑制率(%) = (对照组D值 - 实验组D值) / 对照组D值 $\times 100\%$ 。药物增敏倍数 = 单纯用药组的 IC_{50} / 联合用药组的 IC_{50} 。金正均Q值法^[9]分析联合用药的效果, $Q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea \times Eb)$,Ea为 As_2O_3 的抑制率,Eb为pmiR-203的抑制率, $Ea + b$ 为两者联合用药的抑制率。 $Q < 0.85$ 表示两药具有拮抗作用, $0.85 \leq Q < 1.15$ 表示相加

作用, $Q \geq 1.15$ 表示协同作用。

1.5 流式细胞术检测高表达 miR-203 联合 As_2O_3 对 K562 细胞凋亡的影响

实验分组同前, 每组设 3 个复孔。pmiR-203 和空质粒的 DNA 转染终质量浓度为 $0.05 \mu\text{g/ml}$, As_2O_3 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。将 K562 细胞以 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 24 孔板, 转染方法同前。48 h 后离心收集细胞, 用 PBS 洗 3 次, 按 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书加入试剂, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.6 Western blotting 检测高表达 miR-203 联合 As_2O_3 对 K562 细胞内 Bcr/abl 蛋白表达的影响

实验分空白对照组、pmiR-203 组和空质粒对照组, 转染方法同前。转染 48 h 后裂解细胞提取蛋白, 按蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量并校正。加入样品裂解液和样品于沸水中煮 5 min 后进行 SDS-PAGE。半干式转膜将凝胶上的蛋白条带转到硝酸纤维膜上, TBST 洗膜后 5% 牛血清白蛋白封闭液室温封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次, 加入一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜孵育。TBST 洗膜 3 次, 加入二抗于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次后加入 ECL 显影, 曝光, 对条带进行灰度分析, 以 β -actin 作为内参照, 对 Bcr/abl 蛋白表达水平进行相对定量分析。

1.7 Bcr/abl 3'UTR 和 Bcr/abl mut-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的构建

根据 TargetScan 软件分析 miR-203 与 Bcr/abl 融合基因的 3'UTR 存在的结合位点设计 Bcr/abl 3'UTR 的引物序列。Bcr/abl (*Xho I*) 上游引物: 5'-CCGCTCGAGCAGCAGTCAGGGTCAGG-3', Bcr/abl (*Not I*) 下游引物: 5'-ATAAGAATGCC GCCGCT-TCTAATGTAAACACTGATTTATTTA-3'。Mut-Bcr/abl (*Xho I*) 上游引物: 5'-TCACTTTTCTGAGTTCTTGAAGGTAAAGTTAGCCCTGCCTCTGTGTAGC-3', Mut-Bcr/abl (*Not I*) 下游引物: 5'-GCTACACAGAGGCA GGGCTAACTTTACCTTCAAGAACTCAGAAAAGTGA-3'。PCR 扩增 Bcr/abl 3'UTR 反应条件: ① $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5 min, ② $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s, ③ $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s, ④ $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、2 min, ②~④进行 30 个循环; ⑤ $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、10 min。回收 PCR 扩增产物, 用 *Xho I* 与 *Not I* 对 PCR 回收扩增产物和 psiCHECK-2 双荧光素酶报告基因载体进行双酶切。回收酶切产物并连接, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用含氨苄青霉素 (Amp) ($100 \mu\text{g/ml}$) 的培养基筛选并扩大培养阳性克隆, 抽提质粒, 测序鉴定。

1.8 荧光素酶活性分析

实验分 psiCHECK-2 组、psiCHECK-2-Bcr/abl-3'

UTR 组、psiCHECK-2-Bcr/abl- mut-3'UTR 组、pmiR-203 真核表达载体 + psiCHECK-2 组, 空质粒 (空真核表达载体) + psiCHECK-2 组、pmiR-203 + psiCHECK-2-Bcr/abl-3'UTR 组, 空质粒 + psiCHECK-2-Bcr/abl-3'UTR 组、pmiR-203 + psiCHECK-2-Bcr/abl-mut-3'UTR 组、空质粒 + psiCHECK-2-Bcr/abl-mut-3'UTR 组, 每组设 3 个复孔。各组 K562 细胞以 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 24 孔板上, 将 pmiR-203 真核表达载体与 psiCHECK-2 双荧光素酶报告基因共转染细胞, 转染方法参照脂质体说明书。48 h 后按 Promega 公司的 Dual-Luciferase Reporter Assay System 进行荧光素酶活性 (Renilla/Firefly) 检测。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用完全随机设计的单因素方差分析法 (One-Way ANOVA) 进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 K562 细胞内 miR-203 的相对表达水平

Real-time PCR 结果 (图 1) 显示, pmiR-203 组细胞内 miR-203 的表达相对于空质粒对照组的变化倍数为 (42.68 ± 0.82) 倍, 表明转染 pmiR-203 后细胞内 miR-203 的表达水平明显增高 ($P < 0.01$)。

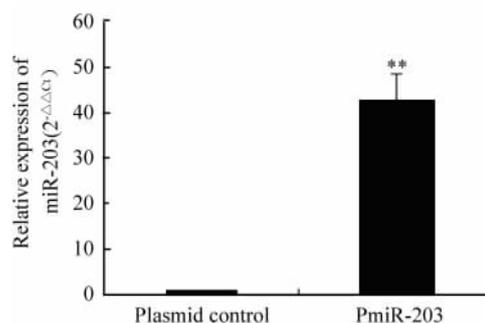


图 1 K562 细胞内 miR-203 的相对表达水平

Fig. 1 Relative expression of miR-203 in K562 cells

** $P < 0.01$ vs plasmid control group

2.2 过表达 miR-203 联合 As_2O_3 抑制 K562 细胞的增殖

单用 As_2O_3 的 IC_{50} 为 $3.4 \mu\text{mol/L}$, As_2O_3 与空质粒联合使用的 IC_{50} 为 $2.2 \mu\text{mol/L}$, 两者联用为相加作用 ($0.85 \leq Q < 1.15$); As_2O_3 与 pmiR-203 联合使用的 IC_{50} 为 $0.7 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), 增敏倍数为 4.86, 两者联用为协同作用 ($Q \geq 1.15$, 表 1)。

表 1 As₂O₃ 联合 pmiR-203 对 K562 细胞增殖的抑制作用 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Inhibitory rates of K562 cells after treatment with As₂O₃ in combination with pmiR-203(n=4, $\bar{x} \pm s$)

As ₂ O ₃ [c _B /(μmol·L ⁻¹)]	As ₂ O ₃		As ₂ O ₃ + Plasmid		As ₂ O ₃ + pmiR-203	
	IR(%)		Q		IR(%)	
0			6.8 ± 3.8		27.9 ± 3.1	
0.5	22.0 ± 3.1		26.1 ± 2.3		0.95	46.3 ± 3.3*
1	30.4 ± 3.2		37.8 ± 4.8		1.07	56.2 ± 3.0*
2	40.0 ± 3.3		46.3 ± 5.6		1.05	67.2 ± 3.6*
3	45.4 ± 2.7		52.5 ± 2.8		1.07	73.2 ± 2.7*
4	55.0 ± 2.9		60.5 ± 5.1		1.04	80.4 ± 2.5*
5	62.6 ± 2.5		69.8 ± 2.5		1.07	85.2 ± 3.3*

* P < 0.05 vs As₂O₃ + plasmid group; IR: Inhibition rate

2.3 过表达 miR-203 联合 As₂O₃ 促进 K562 细胞凋亡
流式细胞术检测结果(图 2)显示,As₂O₃ 组细胞凋亡率显著高于空白对照组[(10.31 ± 1.29)% vs (3.57 ± 1.18)% , P < 0.05]。pmiR-203 组细胞凋亡率显著高于空质粒对照组[(14.95 ± 1.35)%

vs (5.91 ± 0.84)% , P < 0.05]。As₂O₃ 联合 pmiR-203 组细胞凋亡率显著高于 As₂O₃ 联合空质粒对照组[(29.97 ± 3.19)% vs (10.77 ± 1.71)% , P < 0.05]。

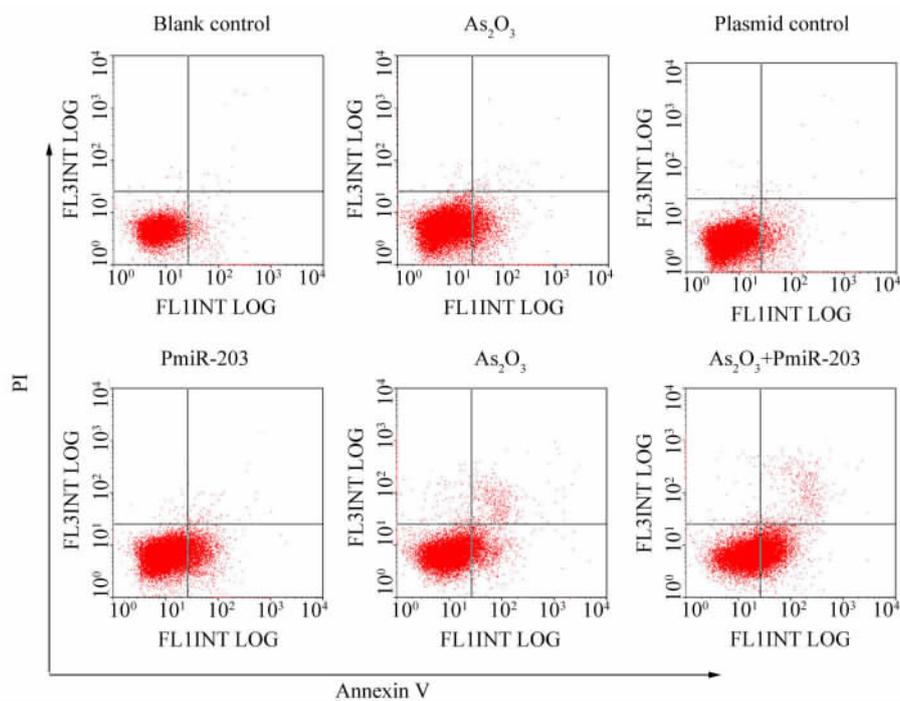


图 2 As₂O₃ 与 miR-203 联用更有效地促进 K562 细胞的凋亡

Fig. 2 As₂O₃ in combination with miR-203 promoted the apoptosis of K562 cells more effectively

2.4 高表达 miR-203 联合 As₂O₃ 抑制 K562 细胞内 Bcr/abl 蛋白表达

计算目的基因 Bcr/abl 与内参基因 β-actin 条带的灰度比值,以空白对照组为对照(control),设定目

的基因 Bcr/abl 在该对照组中的表达水平为 1,分析实验组 Bcr/abl 的蛋白表达相对于对照组的变化的情况。结果(图 3)显示,与空质粒对照组相比,pmiR-203 组细胞内 Bcr/abl 的蛋白表达水平显著降低

[(0.21 ± 0.02) vs (0.99 ± 0.04), $P < 0.05$]。

2.5 成功构建 Bcr/abl 3' UTR 和 Bcr/abl mut-3' UTR 双荧光素酶报告基因载体

Bcr/abl 3'UTR 和 Bcr/abl mut-3'UTR 双荧光素酶报告基因经华大基因公司测序,通过 BLAST 软件比对测序结果与设计序列相符,表明报告基因载体构建成功(图4)。

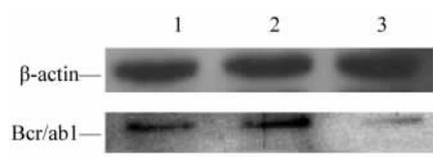


图3 K562 细胞内 Bcr/abl 蛋白的相对表达水平

Fig. 3 Expression level of Bcr/abl protein in K562 cells

1: Blank control; 2: Plasmid control group; 3: pmiR-203 group

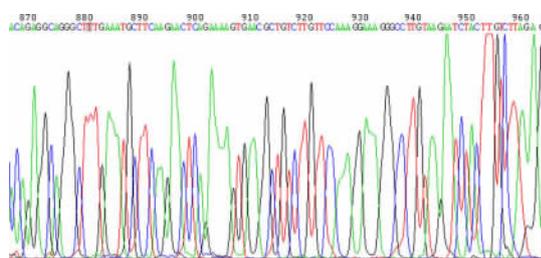


图4 Bcr/abl 3'UTR 双荧光素酶报告基因局部测序图

Fig. 4 Partiel sequencing result of Bcr/abl 3'UTR dual luciferase report vector

(In the red box is a binding site for miR-203)

2.6 荧光素酶活性分析

计算荧光素酶活性(海肾荧光素酶/萤火虫荧光素酶比值),设定空白对照组荧光素酶活性为1,分析实验组荧光素酶活性相对于空白对照组的变化的情况。结果(图5)显示,与空质粒 + psiCHECK-2-Bcr/abl-3'UTR 共转染组相比较,pmiR-203 + psiCHECK-2- Bcr/abl-3'UTR 共转染组细胞内荧光素酶活性明显下降[(0.31 ± 0.08) vs (0.98 ± 0.09), $P < 0.05$],而 pmiR-203 + psiCHECK-2 共转染组细胞内荧光素酶活性与空质粒 + psiCHECK-2 共转染组无显著差异($P > 0.05$),pmiR-203 + psiCHECK-2-Bcr/abl mut-3' UTR 共转染组细胞内荧光素酶活性(0.91 ± 0.06)与空质粒 + psiCHECK-2-Bcr/abl mut-3'UTR 共转染组无显著差异($P > 0.05$)。结果说明,miR-203 与融合基因 Bcr/abl 的 3'UTR 结合后可下调后者的表达。

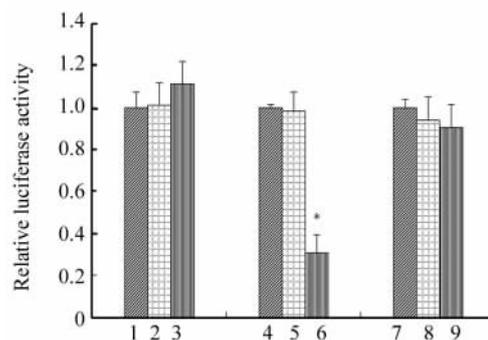


图5 荧光素酶活性分析 miR-203 与 Bcr/abl-3'UTR 的结合

Fig. 5 Luciferase activity analyze of the binding of miR-203 and Bcr/abl-3'UTR

1: psiCHECK-2 group; 2: Plasmid + psiCHECK-2 group; 3: miR-203 + psiCHECK-2 group; 4: psiCHECK-2-bcr/abl-3'UTR group; 5: Plasmid + psiCHECK-2-bcr/abl-3'UTR group; 6: miR-203 + psiCHECK-2-bcr/abl-3'UTR group; 7: psiCHECK-2-bcr/abl-mut-3'UTR group; 8: Plasmid + psiCHECK-2-bcr/abl-mut-3'UTR group; 9: miR-203 + psiCHECK-2-bcr/abl-mut-3'UTR group
* $P < 0.05$ vs plasmid + psiCHECK-2-bcr/abl-3'UTR group

3 讨论

As₂O₃ 是从中药砒霜中提取的成分,临床使用 As₂O₃ 治疗急性早幼粒细胞性白血病已经取得了很好的疗效,而且 As₂O₃ 对多种肿瘤细胞均有较强的抑制作用。但是 As₂O₃ 作为化疗药物单独使用作用有限,并存在一定毒副作用,联合用药可能降低 As₂O₃ 的用量、减少毒副反应,并提高抗肿瘤作用。研究人员^[10-12]将 miRNA 与化疗药物联合应用于抗肿瘤研究,发现 miRNA 可以通过调控癌基因、抑癌基因或凋亡相关基因的表达提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性以及调控耐药相关基因的表达逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,而且在耐药发生时 miRNA 自身的表达水平也会发生改变。

研究^[5-7]发现,在细胞内过表达 miR-203 后可抑制多种白血病细胞增殖、诱导细胞凋亡,从而发挥抗白血病作用。本研究通过将 miR-203 的真核表达载体(pmiR-203)转染 K562 细胞,使 miR-203 在细胞内过表达,与 As₂O₃ 联用后,肿瘤细胞对 As₂O₃ 的敏感性提高到单独使用 As₂O₃ 的 4.86 倍,两者表现为协同抗肿瘤作用,提示两者联合使用较单独使用 As₂O₃ 具有更强的抗白血病效果。miR-203 和 As₂O₃ 抗肿瘤的机制都与诱导细胞凋亡有关^[13-15]。本研究进一步发现,两者联用后使肿瘤细胞凋亡率

较单独用药明显增加,提示两者的协同抗肿瘤作用可能与共同诱导细胞凋亡相关。

miRNA 通过调控癌基因、抑癌基因或凋亡相关基因的表达提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[16-18]。Ph 染色体存在于大部分慢性粒细胞白血病患者中,形成 Bcr/abl 融合基因,表达具有酪氨酸激酶活性的 Bcr/abl 蛋白,从而促进慢性粒细胞白血病的发生。本研究发现,在慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞中过表达 miR-203 后,细胞内 Bcr/abl 的表达水平明显降低。进一步构建 Bcr/abl 3' UTR 的双荧光素酶报告基因载体,通过荧光素酶活性分析发现,Bcr/abl 3'UTR 中带有明确的 miR-203 结合位点,Bcr/abl 是 miR-203 的靶基因之一。结果提示,miR-203 提高 K562 细胞对 As₂O₃ 的敏感性可能是由于其下调了 Bcr/abl 融合基因的表达。研究^[19-20]表明,As₂O₃ 可抑制肿瘤细胞的 abl 蛋白酪氨酸激酶活性,同时介导细胞内多种信号分子的酪氨酸磷酸化激活,从而诱导细胞凋亡。由此推测,过表达 miR-203 联合 As₂O₃ 协同促进 K562 细胞早期凋亡可能与两者联合作用使 Bcr/abl 蛋白酪氨酸激酶活性下降有关。

发现新的抗肿瘤靶点、开发特异性的靶向抗肿瘤药物,并与传统药物联合应用,在当今肿瘤治疗研究中显示出良好的发展前景。本研究将 As₂O₃ 与靶向 miRNA 技术联合使用,提高了肿瘤细胞对 As₂O₃ 的敏感性,为靶向基因治疗与传统化疗联合应用抗肿瘤提供了实验依据,具有潜在的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] 赵炜, 陆骊工. 三氧化二砷抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 当代医学, 2013, 19(27): 11-13.
- [2] 王纪渊, 丁国善. 三氧化二砷治疗肝癌的研究进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1): 102-105.
- [3] 刘玲, 黎阳. 三氧化二砷治疗多药耐药的神经母细胞瘤的研究进展 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2014, 19(2): 103-106.
- [4] 王志刚, 钟根深, 马鹏举, 等. 三氧化二砷联合顺铂抑制 C6 胶质瘤细胞增殖的实验研究 [J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(3): 167-173.
- [5] Chim CS, Wong KY, Leung CY, et al. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(2): 2760-2767.
- [6] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression [J]. Cancer Cell, 2008, 13(6): 496-506.
- [7] Faber J, Gregory RI, Armstrong SA. Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression: The next dimension [J]. Cancer Cell, 2008, 13(6): 467-469.
- [8] 何金花, 黎毓光, 谢杏仪, 等. hsa-miR-203 真核表达载体的构建及对 K562 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 临床检验杂志, 2012, 30(8): 595-598.
- [9] 金正均. 合并用药中的相加 [J]. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70-71.
- [10] Blower PE, Chung JH, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(1): 1-9.
- [11] Bourguignon LY, Spevak CC, Wong G, et al. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284(39): 26533-26546.
- [12] Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, et al. A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(11): 3725-3732.
- [13] Braconi C, Valeri N, Gasparini P, et al. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(3): 957-966.
- [14] Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells [J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(3): 478-486.
- [15] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: MiR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425-433.
- [16] Xia L, Zhang D, Du R. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 372-379.
- [17] Li Y, Li W, Yang Y, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme [J]. Brain Res, 2009, 1286: 13-18.
- [18] Liang Z, Wu H, Xia J, et al. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1 [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6): 817-824.
- [19] 马军. 三氧化二砷在白血病治疗中的临床应用 [J]. 中国医刊, 2004, 39(10): 27-29.
- [20] 罗擎英, 李洋, 张遵真. 三氧化二砷诱导肿瘤细胞死亡的分子机制研究进展 [J]. 卫生研究, 2014, 43(2): 343-347.

[收稿日期] 2014-05-30

[修回日期] 2014-08-27

[本文编辑] 黄静怡