

## 儿童急性白血病耐药相关 microRNA 的筛选

黄礼彬, 张晓莉, 谭惠珍, 梁燕妮, 罗学群, 柯志勇\*  
(中山大学附属第一医院儿科, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】寻找、鉴定与儿童急性白血病耐药相关的 microRNA, 为治疗耐药白血病探索新的途径。【方法】在不同的阿霉素(DOX)浓度下培养原代细胞 K562/WT, 建立三种不同浓度的耐药白血病细胞株 K562/DOX。提取 K562/WT 及其耐药细胞株的 RNA 进行基因芯片检测、qRT-PCR 等方法, 初步筛选可能与白血病细胞耐药相关的 microRNA。收集治疗前、治疗后骨髓完全缓解及早期复发的儿童急性白血病的骨髓样本, 提取 RNA 检测筛查的白血病细胞耐药相关的 microRNA 的表达, 进一步验证体外实验的结果。【结果】①在 K562/DOX 耐药细胞株, miR-20a、miR-188-3p、miR-214 等 microRNA 表达上调, 而 miR-331-5p、miR-338-5p、miR-27a、miR-15a 和 miR-455-3 等的表达明显下调。qRT-PCR 进一步证实了上述结果, 并且发现 miR-331-5p 和 miR-27a 的表达与 P-gp 的表达呈反向关系。②在复发的骨髓样本组(13 例), miR-331-5p 和 miR-27a 表达明显低于治疗前骨髓组(24 例)和治疗后完全缓解组(11 例), 证明复发的儿童急性白血病耐药细胞存在 miR-331-5p 和 miR-27a 低表达。【结论】耐药白血病细胞存在 microRNA 差异性表达, 其中 miR-331-5p 和 miR-27a 在耐药白血病细胞及复发的急性白血病细胞中低表达。推测 miR-331-5p 和 miR-27a 可能在儿童急性白血病耐药中起到重要作用。

**关键词:** 白血病; 儿童; 微小 RNA; 耐药

中图分类号: R725.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)05-0592-05

### Screening of Drug Resistance Related MicroRNAs in Childhood Acute Leukemia

HUANG Li-bin, ZHANG Xiao-li, TAN Hui-zhen, LIANG Yan-ni, LUO Xue-qun, KE Zhi-yong\*  
(Department of Pediatric, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To seek the new strategy for treating drug resistant leukemia by searching and identifying drug resistance related microRNAs in childhood acute leukemia. 【Methods】Three multidrug resistant leukemia cell line-K562/DOX were derived from K562 /WT by cultured with different concentration adriamycin (DOX). RNA from K562/WT and K562/DOXs were extracted, and the possible drug resistance related microRNAs were searched and identified by using miRNA microarray assay and Quantitative real-time PCR assay. Bone-marrow samples of childhood acute leukemia were collected at three timepoints: before treatment, complete remission, or early relapse after treatment. The expression of selected microRNAs were detected by RT-PCR assay. 【Results】1. The expression of miR-20a, miR-188-3p, and miR-214 were up-regulated, while miR-331-5p, miR-338-5p, miR-27a, miR-15a, and miR-455-3 were obviously down-regulated in K562/DOX cell lines. It is further confirmed by qRT-PCR, and an inverse relationship between the expression of P-gp and the expression of miR-331-5p and miR-27a. 2. Expression of miR-331-5p and miR-27a in the recurrent bone-marrow samples group (13 cases) were significantly lower than that of before treatment group (24 cases) and complete-remission group (11 cases), demonstrating the presence of miR-331-5p and miR-27a low expression in relapse of childhood acute leukemia. 【Conclusions】There were differential microRNAs expression in K562/DOX comparing with its wildtype. Low expression of miR-331-5p and miR-27a was found in multidrug resistant leukemia cell line and relapse of children acute leukemia bone-marrow sample, which may presumably partake the process of multidrug resistance in childhood acute leukemia.

**Key words:** leukemia; children; microRNA; drug resistance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5): 592-596]

收稿日期: 2011-11-11

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B030301104)

作者简介: 黄礼彬, 硕士, 主治医师, 研究方向: 儿童血液病与肿瘤, E-mail: huanglb3@mail.sysu.edu.cn; \* 通信作者: 柯志勇, E-mail: kzy6@163.com

尽管多药联合强化疗及骨髓移植的进步使儿童急性白血病的治愈率获得很大的提高,但是仍有相当一部分白血病患者治疗失败<sup>[1-2]</sup>。白血病细胞耐药是导致白血病治疗失败的最重要原因<sup>[3-4]</sup>。研究耐药白血病细胞的生物学特征有助于寻找难治性白血病的治疗方法。既往关于白血病细胞耐药的研究主要集中在各种多重耐药(multiple drug resistant, MDR)蛋白,如 P 糖蛋白(Permeability-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白、乳腺癌耐药蛋白等的作用机制<sup>[3-6]</sup>,其中 P-gp 是第一个被发现的多重耐药蛋白,由 MDR1 基因编码,通过介导细胞内药物外流而使肿瘤细胞产生耐药。在对蒽环类抗生素、长春新碱、依托泊苷等耐药的肿瘤细胞,P-gp 表达明显增多,但其调控机制尚未得到阐明<sup>[6]</sup>。MicroRNA 是一种含有 19-22 个核苷酸、内源性、非编码的短链 RNA,其主要功能是对基因进行转录后的调控。miRNA 与靶基因 3' 端非翻译区(3'-UTR)结合,并通过降解靶基因或抑制靶基因翻译来实现转录后的基因沉默<sup>[7-8]</sup>。近年来的研究已经证实,miRNA 在白血病的发生、发展中起重要作用<sup>[7-10]</sup>,也有许多研究证实了 miRNA 通过调控耐药相关基因表达、或者调控原癌基因、抑癌基因表达,在一些实体肿瘤的耐药中起重要作用<sup>[11-13]</sup>。曹翊雄等的研究也发现在阿霉素耐药的 K562 细胞中有特殊的 microRNA 表达谱<sup>[14]</sup>。但关于 microRNA 是否在儿童急性白血病细胞耐药的发生机制上起作用,目前的研究较少<sup>[15]</sup>。儿童白血病在临床和生物学特征、治疗反应等有与成人白血病显著不同,且存在不同的 microRNA 表达谱<sup>[9]</sup>。因此,有必要研究与儿童白血病的耐药相关的 microRNA 表达谱,筛选与白血病耐药相关的 microRNA,并研究其功能,有助于从另一个角度理解白血病细胞耐药,为难治性白血病提供新的治疗思路。本研究得到伦理委员会和患儿监护人同意。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

K562 细胞由本实验室培养,白血病患者细胞样本来自本院住院病人冻存骨髓液(经 Trizol 处理后-80℃保存)。所有细胞培养的胎牛血清、培养液均购买自 Invitrogen (Carlsbad, CA)和 Hyclone。所

有细胞培养的一次性耗材均购自 Corning 公司。用于验证 P-gp 的一抗购自 Calbiochem, RT-PCR 所用试剂盒为 SYBR PrimeScript (TM) RT-PCR kit (DRR063M, TaKaRa Biotech. Co., Ltd.), miRNA RT 引物、PCR 引物参照 Applied Biosystems 公司发表的设计方法。microRNA 芯片的制备与杂交由北京博奥公司完成。

### 1.2 主要仪器

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Steri-Cycle CO, 国产),实时定量 PCR 仪(ABI StepOne, 美国),流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国),蛋白电泳仪(Bio-Rad, 美国)。

### 1.3 方法

1.3.1 建立耐药白血病细胞的细胞模型 用 microRNA 芯片、qRT-PCR 等方法,筛选可能与白血病细胞耐药相关的 microRNA。耐药白血病细胞模型的建立:参照 Davies 的方法<sup>[16]</sup>,分别以阿霉素(doxorubicin, DOX)浓度为 0.1、0.5 和 1 μg/mL 诱导处理 K562 原代细胞(K562/WT),经过 3~4 个月培养出 3 个耐 DOX 的 K562 细胞系:K562/DOX1, K562/DOX2 和 K562/DOX3。K562/WT 和 K562/DOX 细胞株的培养条件是含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>。检测耐药白血病细胞的 P 糖蛋白表达:分别用 Western blotting 和流式细胞学的方法检测 K562/WT 和 K562/DOX 细胞系的 P-gp 的表达。其中,流式细胞术使用的单抗 UIC2 为结合藻红蛋白的抗 P-gp 抗体(P-gp-PE),对照为结合藻红蛋白的 IgG。耐药白血病细胞的 RNA 提取和 miRNA 筛选:用 Trizol 法提取 K562/WT 和 K562/DOX 细胞株的总 RNA。用 miRNA 基因芯片技术分析 miRNA 表达谱<sup>[17]</sup>。miRNA 检测信号阈值定义为最大背景信号的 2 倍,背景探针的最大信号水平为 180, K562/WT 和 K562/DOX 样本用 *t* 检验进行比较,  $P < 0.05$  有统计学意义。在 miRNA 芯片初步筛选出来的白血病耐药相关 miRNA,用 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)的方法<sup>[18]</sup>进一步定量分析。

1.3.2 验证体外实验的结果 收集治疗前后及早期复发的儿童急性白血病的骨髓样本,用相同方法提取总 RNA, qRT-PCR 法检测白血病细胞耐药相关的 microRNA 的表达,进一步验证体外实验的结果。

### 1.4 统计分析

统计采用 Student's *t*-test, Fisher 精确概率法

计算  $P$  值,  $P < 0.05$  有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 耐细胞模型(K562/DOXs)的建立

在不同的阿霉素浓度下培养原代细胞 K562/WT, 成功建立了从低到高 3 个不同药物浓度的耐药白血病细胞株: K562/DOX1, K562/DOX2 和 K562/DOX3。用 Western 印迹法及流式细胞学的方法, 检测白血病细胞株 P 糖蛋白(P-gp), 证实耐药白血病细胞株的 P-gp 表达增加, 而且随着培养液 DOX 浓度增加, P-gp 表达增加(图 1)。

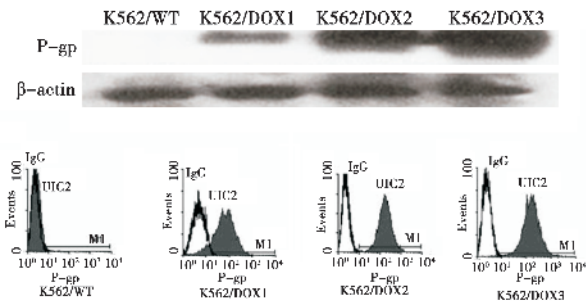


图 1 K562 细胞株 P-gp 表达结果

Fig.1 Expression of P-gp in K562 cell lines

Expression of P-gp gradually increases with the increased concentrations of DOX. A: Western blotting, B: Flow cytometry analysis; UIC2 is P-gp-PE and IgG is used as control

### 2.2 筛选出耐药相关 microRNA

对提取 K562/WT 及其耐药细胞株的 RNA 进行基因芯片分析, 结果发现在耐药细胞株, miR-20a、miR-188-3p、miR-214 等 microRNA 表达上调, 而 miR-331-5p、miR-338-5p、miR-27a、miR-15a 和 miR-455-3p 等的表达明显下调(图 2)。用 qRT-PCR 方法检测表达下调的 microRNA, 证实了上述结果, 并且发现与 K562/WT 细胞株相比, 耐药细胞株的 miR-331-5p 和 miR-27a 的表达随着培养液中 DOX 浓度升高而下降(图 3,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 在儿童急性白血病临床样本中确认耐药相关 microRNA

在本研究组 2007 年建立的儿童白血病骨髓样本库中, 有 13 例治疗前和治疗后 18 个月内骨髓复发的急性白血病, 留有治疗前和复发的骨髓

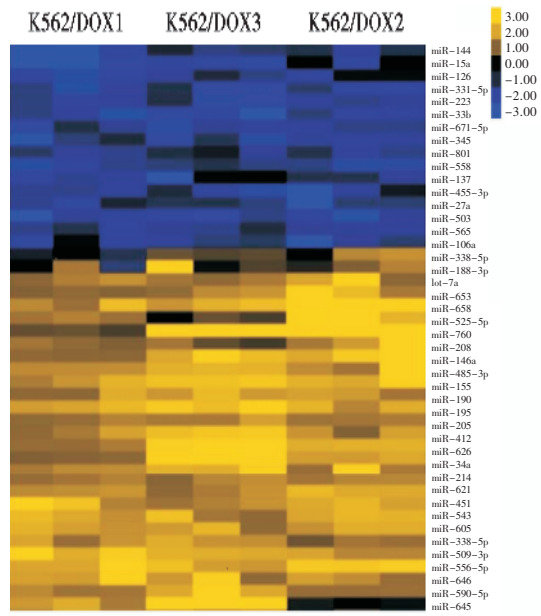


图 2 三种耐药细胞株的 miRNA 芯片筛查部分结果

Fig.2 Part of the results of miRNA microarray analysis in DOX-resistant cell lines

Test on each cell line repeated three times. Right upper bar indicates fold changes of DOX-resistant cells versus K562/WT cells.

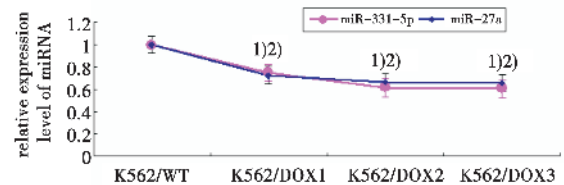


图 3 qRT-PCR 定量检测不同细胞株 miR-331-5p 和 miR-27a 表达的结果

Fig.3 Expression of miR-27a and miR-331-5p in DOX-resistant K562 cell lines compared to K562/WT by using qRT-PCR

Average expression of K562/WT were set as 1), error bars were obtained from three independent experiments, compared with K562/WT cells, 2)  $P < 0.05$

样本合共 26 份。然后根据该 13 例白血病患儿的年龄、性别及白血病类型, 再从骨髓样本库中选取与之相匹配的另外 11 例白血病患者治疗前和治疗后完全缓解的急性白血病骨髓样本共 22 份, 即共计骨髓样本 48 份。将 48 份骨髓样本分为 3 组: 治疗前骨髓 24 份、治疗后骨髓完全缓解的骨髓 11 份及复发的骨髓 13 份(具体见表 1)。其中, 年龄小于 1 岁有 1 例, 1~10 岁 15 例, >10 岁 8 例; 男性

患儿 15 例,女性患儿 9 例;急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 均为 B 细胞性 ALL, 急性非淋巴细胞白血病 (acute non-lymphoblastic leukemia, ANLL) 分 M2 型 4 例, M3 型 4 例, M5 型 3 例。所有诊断符合标准<sup>[19]</sup>, 治疗方案中均含有蒽环类抗生素<sup>[20-21]</sup>。用 qRT-PCR 方法分别检测 3 组骨髓样本的 miR-331-5p 和 miR-27a 表达。结果发现:在复发的骨髓样本组, miR-331-5p 和 miR-27a 表达明显低于治疗前骨髓组和治疗后完全缓解组(图 4a, 4b)。

表 1 48 份儿童急性白血病骨髓样本的分组资料

Table 1 Data of 48 children acute leukemia bone marrow samples

	Number of samples before treatment	Number of the following-up samples	
		Complete remission (CR)	Relapse
ALL	13	6	7
ANLL	11	5	6
Total	24	11	13

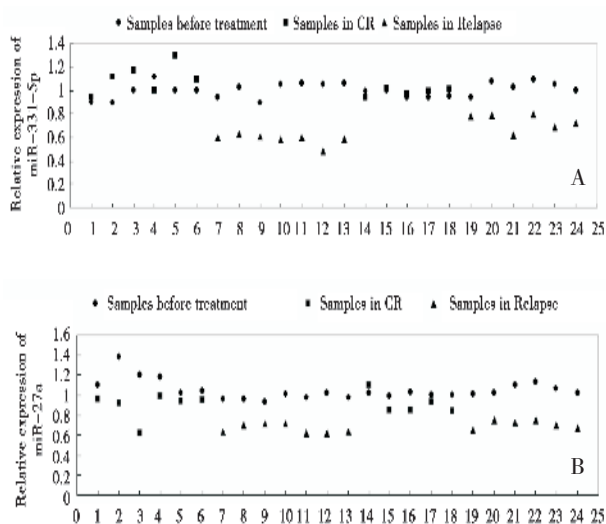


图 4 24 例儿童急性白血病治疗前后的 miR-27a 表达结果

Fig.4 Relative expression of miR-27a before and after treatment in 24 children with acute leukemia

Average expression before treatment were set as 1, compared with samples before treatment, expression of miR-331-5p is statistically different,  $P < 0.01$

### 3 讨论

microRNA 在肿瘤的发生、发展、耐药等的作

用得到了越来越多研究的证实和阐明,但是否在急性白血病的耐药中起作用,现有的研究不多<sup>[14]</sup>。本研究组之前通过对儿童急性淋巴细胞白血病的相关 microRNA 的筛选,发现了一些可能有助于预测泼尼松试验结果的 microRNA<sup>[18]</sup>。泼尼松试验不敏感往往提示存在白血病细胞耐药。这提示 microRNA 可能参与儿童急性白血病细胞耐药的发生。为此,本研究通过建立耐阿霉素的 K562 细胞模型,用 microRNA 芯片和 qRT-PCR 的方法,发现一组在耐阿霉素的 K562 细胞株中异常表达的 microRNA: miR-20a、miR-188-3p、miR-214 等 microRNA 表达上调,而 miR-331-5p、miR-338-5p、miR-27a、miR-15a 和 miR-455-3p 等的表达明显下调。部分 microRNA 的表达与之前报道<sup>[14]</sup>的有所不同,可能与实验条件不完全相同有关。已有研究证实白血病细胞中的 MDR1 基因的表达上调是受转录后调控的<sup>[5]</sup>,因此在 P-gp 高表达的耐药白血病细胞中,在转录后起直接调控作用的 miRNA 应该是低表达的。因此,本研究进一步通过 qRT-PCR 检测低表达的 microRNA,结果发现在耐药白血病细胞中,随着细胞耐 DOX 浓度越高,miR-331-5p 和 miR-27a 的表达越低,呈反向关系。这提示 miR-331-5p 和 miR-27a 可能参与白血病细胞耐药的发生。

为验证这一推测,本研究通过比较治疗前、治疗后完全缓解期及早期复发时的儿童急性白血病病人骨髓样本,发现在复发的骨髓样本组, miR-331-5p 和 miR-27a 表达明显低于治疗前骨髓组和治疗后完全缓解组。白血病细胞耐药是白血病早期复发的重要原因,因此可认为,体内耐药的白血病细胞也存在 miR-331-5p 和 miR-27a 低表达。这进一步证实在儿童耐药白血病细胞中也存在特殊的 microRNA 表达谱。结合体外耐药细胞株实验结果,提示 miR-331-5p 和 miR-27a 在儿童急性白血病耐药中也起到重要作用。此结果有助于充实白血病分子调控网络的研究。

已有报道 miR-27a 可以上调乳腺癌等其它实体肿瘤的多重耐药基因(MDR1)和 P-gp 表达<sup>[13]</sup>,对 miR-331-5p 的研究较少。miR-331-5p 和 miR-27a 低表达是怎样导致儿童白血病细胞耐药?是否也通过参与多重耐药基因(MDR1)对 P-gp 表达进行调控?进一步研究已在进行中。

## 参考文献:

- [1] Mody R, Li Suwen, Dover DC, et al. Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study [J]. *Blood*, 2008, 111(12): 5515-5523.
- [2] Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials [J]. *Leukemia*, 2005, 19(12): 2030-2042.
- [3] Roumier C, Cheek MH. Pharmacogenomics in acute myeloid leukemia [J]. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(11): 1839-1851.
- [4] Nørgaard JM, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2000, 72(3): 290-297.
- [5] Yague E, Armesilla AL, Harrison G, et al. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(12): 10344-10352.
- [6] 方建培, 陈纯, 金润铭. 儿童白血病的诊断和治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 67-80.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [8] 张华, 陈月琴. 白血病 microRNA 的研究进展 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, 39(1): 44-51.
- [9] Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7826.
- [10] Bousqueta M, Harrisb MH, Zhou, BY, et al. MicroRNA miR-125b causes leukemia [J]. *PNAS*, 2010, 107(50): 21558-21563.
- [11] 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 PIEN [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 425-433.
- [12] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast eallcer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 2152-2159.
- [13] 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.
- [14] 曹翊雄, 戴崇文, 张广森. K562 细胞及其耐药细胞株 K562/A02 细胞白血病耐药相关 microRNA 筛选 [J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(6): 361-365.
- [15] 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.
- [16] Davies GF, Juurlink BH, Harkness TA. Troglitazone reverses the multiple drug resistance phenotype in cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2009, 3: 79-88.
- [17] Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals [J]. *Nature*, 2005, 434(7031): 338-345.
- [18] 徐令, 梁燕妮, 罗学群, 等. miRNA 表达与儿童急性淋巴细胞白血病预后及复发的相关性研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(3): 178-181.
- [19] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 168-183.
- [20] Luo XQ, Ke ZY, Guan XQ, et al. The comparison of outcome and cost of three protocols for childhood non-high risk acute lymphoblastic leukemia in China [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 51(2): 204-209.
- [21] 方建培, 陈纯, 金润铭. 儿童白血病的诊断和治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 159-192.

(编辑 张恩健)