

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.011

· 基础研究 ·

## MicroRNA-17-5p 反义寡核苷酸阻滞白血病 K562 细胞的细胞周期

马卓娅<sup>1</sup>, 李欣<sup>2</sup>, 汤华<sup>2</sup>, 刘民<sup>2</sup> (1. 深圳市儿童医院 儿科疾病研究所, 广东深圳 518026; 2. 天津医科大学 生命科学中心, 天津 300070)

**[摘要]** 目的: 以反义寡核苷酸技术研究 microRNA-17-5p (miR-17-5p) 对人慢性髓系白血病 K562 细胞增殖的影响及其可能的机制。方法: 脂质体法将 miR-17-5p 反义寡核苷酸 (miR-17-5p antisense oligonucleotide, miR-17-5p-ASO) 和对照无义寡核苷酸 (control nonsense oligonucleotide, Ctrl-NSO) 转染入 K562 细胞, 同时设未转染对照组 (Ctrl)。MTT 法检测 K562 细胞的增殖, TUNEL 法检测 K562 细胞的凋亡, 流式细胞术检测 K562 细胞周期的改变。结果: MTT 检测结果显示, miR-17-5p-ASO 组 K562 细胞增殖活性为 Ctrl-NSO 组的 (61.7 ± 4.7)%, miR-17-5p-ASO 转染显著抑制 K562 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ )。TUNEL 检测显示, miR-17-5p-ASO 转染不影响 K562 细胞凋亡 ( $P > 0.05$ ); miR-17-5p-ASO 组 K562 细胞 G<sub>2</sub> 期细胞比例为 (10.8 ± 0.8)%, 显著低于 Ctrl-NSO 组和 Ctrl 组的 (34.6 ± 0.4)% 和 (33.9 ± 1.3)% ( $P < 0.05$ )。结论: miR-17-5p 反义寡核苷酸可以通过调控细胞周期抑制 K562 细胞的增殖, 有望成为白血病治疗的新手段。

**[关键词]** microRNA-17-5p; 反义寡核苷酸; 白血病; K562 细胞; 细胞周期

**[中图分类号]** R733.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)06-0644-04

## MicroRNA-17-5p specific antisense oligonucleotide inhibits cell cycle of leukemia K562 cells

MA Zhuo-ya<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, TANG Hua<sup>2</sup>, LIU Min<sup>2</sup> (1. Institute of Pediatric Disease, Shenzhen Children Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong, China; 2. Life Science Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of microRNA-17-5p (miR-17-5p) on the growth of chronic myelocytic leukemia K562 cells by antisense oligonucleotide technique. **Methods:** miR-17-5p antisense oligonucleotide (miR-17-5p-ASO) and control nonsense oligonucleotide (Ctrl-NSO) were transfected into K562 cells by Lipofectamine assay, and untransfected K562 cells were used as blank group (Ctrl). The proliferation, apoptosis, and cell cycle changes of K562 cells were examined by MTT, TUNEL, and flow cytometry assays, respectively. **Results:** MTT results showed that the proliferation of K562 cells in miR-17-5p-ASO group was (61.7 ± 4.7)% of that in Ctrl-NSO group, and miR-17-5p-ASO transfection significantly inhibited the proliferation of K562 cells ( $P < 0.05$ ). TUNEL results showed that miR-17-5p-ASO transfection did not affect apoptosis of K562 cells ( $P > 0.05$ ). The ratio of K562 cells in G<sub>2</sub> phase was (10.8 ± 0.8)% in miR-17-5p-ASO group, which was significantly lower than those in Ctrl-NSO and Ctrl groups ([34.6 ± 0.4]%, [33.9 ± 1.3]%, all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-17-5p specific antisense oligonucleotide can suppress K562 cells growth by inhibiting cell cycle, which may provide a new way for treatment of leukemia.

**[Key words]** microRNA-17-5p; antisense nucleotide; leukemia; K562 cell; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 644-647]

白血病居儿童恶性肿瘤的首位, 严重威胁儿童的健康, 其中以急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 最常见, 其次为急性髓性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 和慢性髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML)。MicroRNA (miRNA) 是近年来发现的具有调控作用的小 RNA 分子, 参与细胞分化、增殖和凋亡等多种过程。

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 30873017)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30873017)

**[作者简介]** 马卓娅 (1979 - ), 女, 回族, 河北省邯郸市人, 硕士, 主要从事肿瘤发生机制研究。E-mail: mazhuoya1@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 汤华 (TANG Hua, corresponding author), E-mail: htang2002@yahoo.com

已有大量文献<sup>[1-3]</sup>报道,miRNA 和肿瘤密切相关。本课题前期<sup>[4]</sup>已发现,miR-17-5p 在人慢性髓系白血病 K562 细胞中高表达,但其病理意义不十分清楚。导入与 microRNA 互补的反义寡核苷酸序列抑制 miRNA 活性被认为可能是目前最好而且最实用的方法<sup>[5]</sup>。因此,本研究设计与 miR-17-5p 序列互补的反义寡核苷酸,作用于 K562 细胞,观察其对细胞增殖的影响,希望能为儿童白血病的病因学研究及临床治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人慢性髓系白血病 K562 细胞购于 ATCC,天津市生命科学中心实验室常规冻存。细胞培养条件:用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液,细胞置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 饱和湿度培养箱中培养。实验所用无血清培养基、RPMI 1640、FBS 均购自美国 Gibco 公司。DMSO 购自天津化学试剂一厂,MTT 购自美国 Genview 公司,替尼泊昔(teniposide,又称 VM-26)(批号:010207)购自北京双鹤现代医药技术有限责任公司,Lipofectamine™ 2 000 购自美国 Invitrogen 公司,TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司。实验中所用寡核苷酸由北京三博远志生物技术有限公司合成。

### 1.2 miR-17-5p 反义寡核苷酸转染 K562 细胞

取对数生长期 K562 细胞,用无血清 1640 培养基调整至  $3 \times 10^5$ /ml,每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板,培养 18 ~ 24 h。实验分 miR-17-5p 反义寡核苷酸组(miR-17-5p antisense oligonucleotide, miR-17-5p-ASO)、对照无义寡核苷酸组(control nonsense oligonucleotide, Ctrl-NSO)和未处理对照组(Ctrl),每组设 3 个复孔。转染过程参照 Lipofectamine™ 2 000 说明进行。配制转染混合物:脂质体分别与 miR-17-5p-ASO(5'-AACCATACAACCTACTACCTCA-3')和 Ctrl-NSO(5'-TGACTGTACTGAGACTCGACTG-3')混合后,加至 K562 细胞。Ctrl 组加 100  $\mu$ l 无血清培养

液,孵育 4 h 后,每孔补加 10% FBS 1640 培养液 100  $\mu$ l,继续培养。

### 1.3 MTT 法检测转染后 K562 细胞的增殖

各组细胞转染 72 h 后,每孔加 20  $\mu$ l MTT(5 mg/ml),孵育 4 h 后,2 000  $\times$  g 离心 5 min,弃上清,每孔加 100  $\mu$ l DMSO 溶解甲斐蓝紫色颗粒,震荡混匀后,Quant 型酶标仪(Bio-Tek)测定波长为 570 nm 的各孔光密度值( $D$ )。转染后细胞的增殖活性(%) = (实验组  $D_{570}$  - 空白  $D_{570}$ ) / (对照无义组  $D_{570}$  - 空白  $D_{570}$ )  $\times$  100%<sup>[6-7]</sup>。

### 1.4 TUNEL 法检测转染后 K562 细胞的凋亡

各组细胞转染 72 h 后,TUNEL 法检测 K562 细胞的凋亡。同时用 0.09 mg/ml 抗肿瘤药物 VM-26 诱导 K562 细胞凋亡,作为阳性对照组。按 TUNEL 检测试剂盒说明操作,荧光显微镜下观察结果。

### 1.5 FACS 法检测转染后 K562 细胞的细胞周期

取转染 48 h 后的 K562 细胞,PBS 洗涤 2 遍,冰乙醇 4 °C 固定,95% 乙醇渗透化处理过夜,室温条件下碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色 1 h,洗涤后上流式细胞仪检测<sup>[8]</sup>。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS12.0 统计软件,采用单因素方差分析方法, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-17-5p-ASO 抑制 K562 细胞的增殖

MTT 法检测结果显示,与 Ctrl-NSO 组相比,miR-17-5p-ASO 组细胞增殖活性为(61.7  $\pm$  4.7)%。结果表明,miR-17-5p-ASO 显著抑制 K562 细胞的活性( $P < 0.05$ )。

### 2.2 miR-17-5p-ASO 对 K562 细胞凋亡的影响

TUNEL 检测结果显示,VM-26 处理组 K562 细胞出现明显的凋亡,而 miR-17-5p-ASO 组、Ctrl-NSO 组、Ctrl 组均未见凋亡细胞(图 1)。由此可见,miR-17-5p-ASO 对 K562 细胞凋亡没有影响。

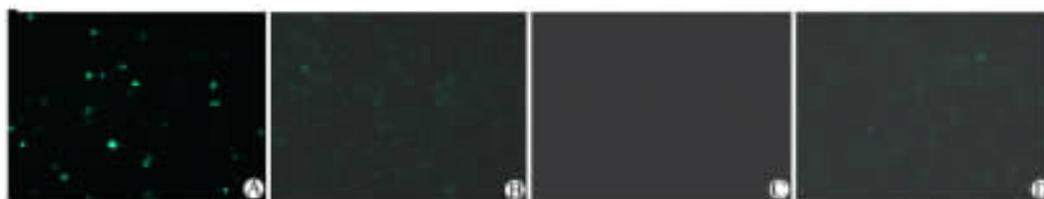


图 1 TUNEL 法检测 miR-17-5p-ASO 对 K562 细胞凋亡的影响( $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of miR-17-5p-ASO on apoptosis of K562 cells as detected by TUNEL staining( $\times 200$ )

A: VM-26; B: Ctrl-NSO; C: Ctrl; D: miR-17-5p-ASO

### 2.3 miR-17-5p-ASO 阻滞 K562 细胞的细胞周期

FACS 检测 miR-17-5p-ASO 组、Ctrl-NSO 组和 Ctrl 组 K562 细胞的细胞周期。miR-17-5p-ASO 组 K562 细胞 G<sub>2</sub> 期比例为 (10.8 ± 0.8)%, Ctrl-NSO 组 G<sub>2</sub> 期 K562 比例为 (34.9 ± 0.7)%, Ctrl 组 G<sub>2</sub> 期 K562 细胞比例为 (34.3 ± 1.7)% (图 2)。Ctrl 组与 Ctrl-NSO 组差异间无统计学意义 (P > 0.05)。miR-17-5p-ASO 组与 Ctrl 组、Ctrl-NSO 组间差异均有统计学意义 (P < 0.05)。提示进入 G<sub>2</sub> 期的 K562 细胞 miR-17-5p-ASO 组明显少于 Ctrl 和 Ctrl-NSO 组。

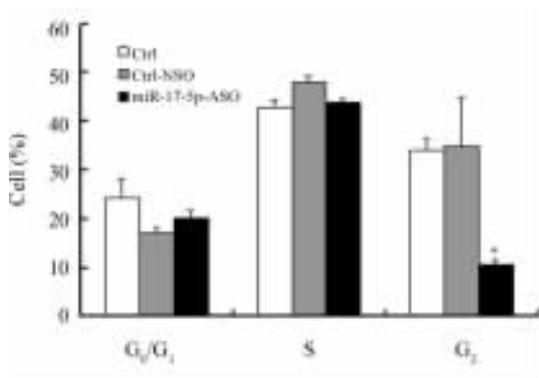


图 2 miR-17-5p-ASO 对 K562 细胞周期的阻滞

Fig. 2 miR-17-5p-ASO blocked cell cycle of K562 cells

\* P < 0.05 vs Ctrl and Ctrl-NSO group

### 3 讨论

MicroRNA 是一类长度约为 22 nt 的非编码小 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 区互补在转录后水平调控蛋白的表达<sup>[9]</sup>。近年来已发现上千种 miRNA, 在细胞的增殖、分化、代谢等方面发挥重要作用<sup>[10]</sup>。本研究前期实验<sup>[4]</sup>检测到 miR-17-5p 在人髓系白血病细胞 K562 中及卵巢癌细胞 ES-2 中高表达, 但其在这两种细胞中的生理作用还不是十分清楚。因此本研究旨在进一步探索其功能。

文献<sup>[11-13]</sup>报道, miR-17-5p 和其他 5 种 miRNA (miR-18、-19a、-19b、-20、-92) 成簇存在于人类染色体 13q31, 而这一区域常常在几种类型的淋巴瘤与实体肿瘤中扩增。例如在乳腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌和甲状腺癌中等均高表达<sup>[14-17]</sup>。为了进一步探索 miR-17-5p 对 K562 细胞生长的影响, 本研究应用反义寡核苷酸技术发现 miR-17-5p-ASO 转染入 K562 肿瘤细胞后, 生长受到抑制。为了探寻 miR-17-5p 通过何种途径影响了 K562 细胞的生长状态, 进一步对 K562 细胞进行了凋亡及细胞周期

的检测。结果发现, miR-17-5p-ASO 并未引起 K562 细胞明显凋亡, 而是阻滞了细胞周期。

几乎所有癌基因、抑癌基因的功能效应最终都会聚到细胞周期机制上来, 许多癌基因、抑癌基因直接参与细胞周期的调控, 它们表达突变或表达水平异常导致细胞周期失控。已有研究<sup>[18]</sup>证实, *c-Myc* 和 *E2F1* 均可以通过参与 DNA 复制调控细胞周期。O'Donnell 等<sup>[19]</sup>发现, miR-17 集簇是 *c-Myc* 的靶基因, miR-17-5p 的高表达总是伴随 *c-Myc* 的高表达。与其他 *c-Myc* 的靶基因一样, 当 *c-Myc* 的表达水平降低后, miR-17-5p 的表达也降低。*c-Myc* 基因还可以诱导 *E2F1* 的表达, 同时被 *E2F1* 诱导, 这也是一个正反馈调节<sup>[20-21]</sup>。本研究通过 miRanda、TargetScan 和 PicTar 3 种主要的 microRNA 预测软件预测到 *E2F1* 可能为 miR-17-5p 靶基因。而且 O'Donnell 等也证实了 *E2F1* 是 miR-17-5p 的靶基因。因此我们可以推测 miR-17-5p-ASO 转入 K562 细胞后, 干扰了 *E2F1* 和 *c-Myc* 对细胞周期的调控, 抑制了肿瘤细胞的生长。

虽然有文献<sup>[22]</sup>报道, miR-17-5p 通过抑制肿瘤细胞的凋亡发挥作用, 但本研究结果显示, 在 K562 细胞中 miR-17-5p-ASO 主要是通过参与调控细胞周期而影响细胞的增殖。可见 miRNA 发挥作用具有细胞特异性, 即同一种 miRNA 在不同的细胞类型中通过不同的途径发挥作用; 而且 miR-17-5p 还可能通过与其它靶基因相互作用, 调控 K562 细胞的生长<sup>[23-24]</sup>。

本研究应用反义寡核苷酸方法初步探讨了 miR-17-5p-ASO 对 K562 细胞的影响, 也证实了反义寡核苷酸可以在 miRNA 的功能研究中发挥作用<sup>[5]</sup>, 并且 miRNA 有可能发展成为肿瘤生物治疗的新靶点。但肿瘤的发生、发展是一个多基因参与、逐步演化的复杂过程, miRNA 间、miRNA 与靶基因间也是一个错综复杂的网络, 其中任何一个生物分子并不能独立发挥作用。因此对于 miR-17-5p 引起的上述改变的具体机制还需进一步的研究, 以期理解肿瘤的发生、发展机制、寻找有效的肿瘤治疗靶标和方法打下基础。

### [参考文献]

[1] Anglicheau D, Muthukumar T, Suthanthiran M. MicroRNAs: Small RNAs with big effects [J]. Transplantation, 2010, 90(2): 105-112.

[2] Chen T. The role of microRNA in chemical carcinogenesis [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2010, 28(2): 89-124.

- [ 3 ] Grady WM, Tewari M. The next thing in prognostic molecular markers: microRNA signatures of cancer [ J ]. *Gut*, 2010, 59 ( 6 ): 706-708.
- [ 4 ] 马卓娅, 汤华, 李欣, 刘民, 吴海东, 王晶. MicroRNA 在 6 种肿瘤细胞中的差异表达 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 3 ): 254-258.
- [ 5 ] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [ J ]. *Nature*, 2005, 438( 7068 ): 685-689.
- [ 6 ] 孟颖, 汤华, 强冉, 刘民, 李欣. MicroRNA 对肿瘤细胞活性的影响 [ J ]. *肿瘤*, 2006, 26( 7 ): 692-693.
- [ 7 ] 王芳, 孟颖, 刘民, 李欣, 刘悦, 汤华. MicroRNA-21 反义寡核苷酸可以抑制 U373MG 细胞对缃尼泊昔 VM-26 的耐受性 [ J ]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24 ( 7 ): 674-678.
- [ 8 ] Rodolosse A, Chalaux E, Adell T, Hagège H, Skoudy A, Real FX. PTF1alpha/p48 transcription factor couples proliferation and differentiation in the exocrine pancreas [ J ]. *Gastroenterology*, 2004, 127( 3 ): 937-949.
- [ 9 ] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [ J ]. *Cell*, 2004, 116( 2 ): 281-297.
- [ 10 ] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [ J ]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11( 9 ): 597-610.
- [ 11 ] Ota A, Tagawa H, Karman S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64( 9 ): 3087-3095.
- [ 12 ] Gibcus JH, Tan LP, Harms G, Schakel RN, de Jong D, Blokzijl T, et al. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile [ J ]. *Neoplasia*, 2009, 11( 2 ): 167-176.
- [ 13 ] Nagel S, Venturini L, Przybylski GK, Grabarczyk P, Schmidt CA, Meyer C, et al. Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia [ J ]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50( 1 ): 101-108.
- [ 14 ] 张振武, 安洋, 滕春波. miR-17-92 基因簇 microRNAs 对哺乳动物器官发育及肿瘤发生的调控 [ J ]. *遗传*, 2009, 31( 11 ): 1-9.
- [ 15 ] Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, et al. Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38( 17 ): 5919-5928.
- [ 16 ] Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues [ J ]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 ( 4 ): 652-657.
- [ 17 ] Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis and involved in cancer cell proliferation and invasion [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2010, [ Epub ahead of print ]
- [ 18 ] Bracken AP, Citro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: Unraveling the biology [ J ]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29( 8 ): 409-417.
- [ 19 ] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. C-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression [ J ]. *Nature*, 2005, 435( 7043 ): 839-843.
- [ 20 ] Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F [ J ]. *Nature*, 1997, 387( 6631 ): 422-426.
- [ 21 ] Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein [ J ]. *Genes Dev*, 2003, 17( 9 ): 1115-1129.
- [ 22 ] Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92 [ J ]. *Oncogene*, 2007, 26( 41 ): 6099-6105.
- [ 23 ] Xie SY, Li YJ, Wang PY, Jiao F, Zhang S, Zhang WJ. miRNA-regulated expression of oncogenes and tumor suppressor genes in the cisplatin-inhibited growth of K562 cells [ J ]. *Oncol Rep*, 2010, 23( 6 ): 1693-1700.
- [ 24 ] Chow TF, Mankaruos M, Scorilas A, Youssef Y, Girgis A, Mossad S, et al. The miR-17-92 cluster is over expressed in and has an oncogenic effect on renal cell carcinoma [ J ]. *J Urol*, 2010, 183( 2 ): 743-751.

[ 收稿日期 ] 2010 - 08 - 16

[ 修回日期 ] 2010 - 09 - 25

[ 本文编辑 ] 王莹

## 本期广告目次

|                      |        |
|----------------------|--------|
| 沈阳三生制药有限责任公司 .....   | 封二     |
| 德国美天旆生物技术有限公司 .....  | 封三     |
| 碧迪医疗器械有限公司 .....     | 封四     |
| 上海先声药业有限公司 .....     | 前插页 I  |
| 上海医元生物基因发展有限公司 ..... | 前插页 II |