

CRISPR/Cas9介导的microRNA-21敲除对慢性髓性白血病细胞伊马替尼敏感性的影响

张云 王凌燕 李佳燕 江佩芳 胡建达 陈步远

福建医科大学附属协和医院、福建省血液病研究所、福建省血液病学重点实验室,福州 350001

通信作者:陈步远,Email:buyuanchensub@163.com

【摘要】 目的 观察microRNA-21(miR-21)敲除对耐伊马替尼的人慢性髓性白血病细胞株K562/G01细胞在增殖、药物敏感性等方面的影响,初步探讨miR-21影响K562/G01细胞伊马替尼敏感性的可能机制。方法 运用CRISPR/Cas9技术敲除K562/G01细胞的miR-21,经PCR筛选、Sanger测序鉴定和实时定量PCR检测获得miR-21敲除的单细胞克隆。扩增培养后,采用MTT法、细胞克隆形成实验检测miR-21敲除对K562/G01细胞增殖的影响。使用伊马替尼处理细胞后,用MTT法和Annexin V-APC/7-AAD双染流式细胞检测法观察敲除miR-21后K562/G01细胞对伊马替尼的敏感性的变化。Western blot法检测miR-21敲除前后K562/G01细胞PTEN、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、P210^{BCR-ABL}、p-P210^{BCR-ABL}蛋白表达量的变化。结果 成功构建了3个miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆,CRISPR/Cas9介导的突变效率为7.12%~8.11%。miR-21敲除使K562/G01细胞的增殖受抑,野生型和1#、2#、6#单细胞克隆的克隆形成率依次为(57.67±8.25)%、(26.94±5.36)%、(7.17±2.11)%、(31.50±3.65)% ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-21敲除使K562/G01细胞对伊马替尼的敏感性增加,野生型和1#、2#、6#单细胞克隆对伊马替尼的IC₅₀值分别为(21.92±1.36)μmol/ml、(3.98±0.39)μmol/ml、(5.38±1.01)μmol/ml、(9.24±1.36)μmol/ml,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-21敲除后,其靶基因PTEN的蛋白表达水平未见明显变化,但PI3K、AKT信号分子的活化受到抑制,并且P210^{BCR-ABL}、p-P210^{BCR-ABL}蛋白表达也下调。结论 miR-21敲除抑制K562/G01细胞增殖,提高其对伊马替尼的敏感性,这可能是通过抑制PI3K/AKT信号通路和BCR-ABL表达实现的。

【关键词】 CRISPR/Cas9; miR-21; 基因敲除; 伊马替尼; 白血病,髓性,慢性

基金项目:福建省自然科学基金(2017J05129);国家自然科学基金青年科学基金(81600137)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.011

CRISPR/Cas9-mediated microRNA-21 knockout increased imatinib sensitivity in chronic myeloid leukemia cells

Zhang Yun, Wang Lingyan, Li Jiazheng, Jiang Peifang, Hu Jianda, Chen Buyuan

Fujian Medical University Union Hospital, Fujian Institute of Hematology, Fujian Provincial Key Laboratory of Hematology, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: Chen Buyuan, Email: buyuanchensub@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of miR-21 knockout on proliferation and drug resistance in K562/G01 cells, and to preliminarily explore the mechanism of imatinib sensitivity by knocking out miR-21 in K562/G01 cells. **Methods** Using CRISPR/Cas9 to knock out the miR-21 gene in K562/G01 cells, and single-cell-derived clones of miR-21 knockout were obtained by genomic DNA PCR screening, Sanger sequencing, and real-time PCR. We used MTT and cell colony formation assays to assess the cell proliferation, and determined imatinib sensitivity by MTT assay and Annexin V-APC/7-AAD double staining flow cytometry. Using western blot, we examined the potential mechanisms affecting imatinib sensitivity by knocking out miR-21 in K562/G01 cells. **Results** Three miR-21 knockout K562/G01 single-cell-derived clones were successfully constructed. The mutation efficiency mediated by CRISPR/Cas9 was 7.12% - 8.11%. MiR-21 knockout inhibited the proliferation of K562/G01 cells; the clone formation rates of WT and 1#, 2#, 6# K562/G01 single-cell clones were (57.67±8.25)%, (26.94±5.36)%, (7.17±2.11)%, (31.50±3.65)%, respectively. MiR-21 knockout increased the sensitivity of K562/

G01 cells to imatinib, IC₅₀ of imatinib in WT, and 1#, 2#, 6# K562/G01 single-cell clones were (21.92±1.36) μmol/ml, (3.98±0.39) μmol/ml, (5.38±1.01) μmol/ml, (9.24±1.36) μmol/ml. After the knockout of miR-21, the activation of PI3K/Akt signaling molecules was inhibited, while the expression of P210^{BCR-ABL} and p-P210^{BCR-ABL} was downregulated; however, the expression of PTEN was not affected. **Conclusion** The knockout of miR-21 can suppress cell proliferation and improve sensitivity to imatinib in K562/G01 cells, which may be achieved by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway and BCR-ABL expression.

【Key words】 CRISPR/Cas9; miR-21; Knockout; imatinib; Chronic myeloid leukemia

Fund program: Fujian Provincial Natural Science Foundation (2017J05129); National Science Foundation for Young Scientists of China (81600137)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.011

甲磺酸伊马替尼(IM)是首个用于治疗慢性髓性白血病(CML)的酪氨酸激酶抑制剂(TKI),它通过特异性阻断ATP在BCR-ABL激酶上的结合位点,使酪氨酸残基不能磷酸化,从而抑制BCR-ABL阳性细胞的增殖。很多因素与IM耐药有关,目前研究最多的是BCR-ABL激酶区突变,这些突变妨碍了IM和BCR-ABL激酶的结合。虽然二代TKI尼洛替尼和达沙替尼对部分BCR-ABL激酶区突变患者的治疗效果令人鼓舞^[1],但是,进一步探索CML耐药机制,寻找新的治疗靶点,对于TKI耐药的CML患者仍有重要意义。

microRNA-21(miR-21)位于染色体17q23.2,是一个短片段非编码RNA^[2],在许多种肿瘤(包括白血病)中表达均明显上调,并且它的靶基因多为抑癌基因,相关研究结果显示miR-21在多种肿瘤的发生和发展中起着重要的作用^[3-7]。目前,关于miR-21如何影响CML患者TKI耐药的研究较少。

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)技术近年来因其高效率、强特异性、简单操作和低成本等优势已成为首选的基因编辑工具。本研究以耐IM的人CML K562细胞株K562/G01细胞作为研究对象,采用CRISPR/Cas9技术敲除miR-21,初步探讨miR-21敲除对K562/G01细胞增殖和对TKI敏感性的影响及可能机制。

材料与方法

1.慢病毒感染:CRISPR/Cas9慢病毒LV-VMP1-sgRNA(#045001)和阴性对照病毒sgRNA-CON251(U6-sgRNA-EF1a-Cas9-FLAG-P2A-EGFP)均购自中国上海吉凯基因化学技术有限公司。耐IM的K562细胞株(K562/G01)引自中国医学科学院血液病研究所。K562/G01细胞需培养于含10%胎牛血清(美国Gemini公司产品)、2 μmol/L IM(瑞士Novartis公司产品)的RPMI 1640(美国Hyclone

公司产品)培养液中以维持耐药性,在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,每2~3d换液传代1次。实验前耐药细胞株脱药培养2周,然后取对数生长期细胞用于后续实验。

2.慢病毒感染:收集对数生长期的K562/G01细胞制成细胞悬液,调节细胞密度为5×10⁴/ml,接种于96孔板中,每孔细胞数约为5×10³(100 μl),根据不同的MOI值(100、200)加入适量的慢病毒,6~8h后观察细胞状态,吸去细胞上清50 μl,加入100 μl新鲜培养基继续培养。转染72h后,直接观察GFP荧光表达情况,估算感染效率。实验分组:未转染任何病毒的野生型K562/G01细胞组作为对照组,加阴性对照病毒sgRNA-CON251(U6-sgRNA-EF1a-Cas9-FLAG-P2A-EGFP)的K562/G01细胞作为阴性对照组,加CRISPR/Cas9慢病毒LV-VMP1-sgRNA(#045001)转染的K562/G01细胞组为实验组。

3. Surveyor突变分析:离心收集转染CRISPR/Cas9慢病毒和阴性对照病毒72h的K562/G01细胞,使用QuickExtract™ DNA抽提试剂(美国Lucigen公司产品)抽取基因组DNA作为模板。使用引物进行PCR扩增,引物序列:miR-21上游引物:5'-GGGGATTCTTGGTTTGTGAA-3';下游引物:5'-ATACAGCTAGAAAAGTCCCTGAAAA-3'。扩增产物先加热至95℃变性10min后,以2℃/s的速度将孵育温度缓降至85℃,再以0.3℃/s的速度将孵育温度缓降至25℃,4℃维持。然后加入相应体积的surveyor核酸内切酶(美国Transgenomic公司产品),在42℃孵育1h。酶切产物于20g/L琼脂糖凝胶中电泳后鉴定,并运用Image J软件估算CRISPR/Cas9诱导的miR-21的突变效率。

4.转染后K562/G01细胞的单细胞克隆PCR筛选:收集CRISPR/Cas9慢病毒LV-VMP1-sgRNA(#045001)转染72h后的K562/G01细胞,将细胞密度调整为10个细胞/ml,以100 μl/孔(每孔1个细胞)接种于96孔细胞培养板中培养,待单细胞形成的克

隆在96孔板中达到70%以上的融合度,取各单细胞克隆50 μ l于EP管中,余下的细胞继续培养。使用QuickExtract™ DNA抽提试剂(美国Lucigen公司产品)抽取各EP管中基因组DNA作为模板,使用miR-21上下游引物进行PCR扩增,筛选出含有比野生型K562/G01细胞短的PCR产物片段的单细胞克隆。

5. Sanger测序:为了进一步证实CRISPR/Cas9慢病毒VMP1-sgRNA(04500-1)诱导的突变,将野生型K562/G01细胞及筛选出的miR-21敲除的单细胞克隆提取DNA,进行PCR扩增,并送上海生工生物工程股份有限公司行Sanger测序。

6. 实时定量PCR检测筛选出的K562/G01单细胞克隆中成熟miR-21的表达水平:根据TRIzol RNA提取试剂(美国Invitrogen公司产品)说明书,提取样本的总RNA。使用miScript microRNA逆转录试剂盒(美国Qiagen公司产品)合成cDNA。使用SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes试剂盒(美国Qiagen公司产品)、成熟人miR-21引物(美国Qiagen公司产品),选取人非编码RNA U6作为内参,每个样品设置3个复孔进行实时定量PCR。反应条件为95 $^{\circ}$ C 15 min,然后94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共35个循环。实验重复3次。实时定量PCR数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法。

7. 细胞增殖检测:收集对数生长期的野生型K562/G01细胞及miR-21敲除的单细胞克隆,以 3×10^4 /孔接种于96孔培养板,每孔总体积100 μ l,每组3个复孔。分别在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度条件下孵育24、48、72和96 h。实验结束前4 h,每孔加入20 μ l的MTT溶液(美国Sigma公司产品),继续培养4 h。振荡混匀,以溶剂对照孔调零,检测490 nm和630 nm处的吸光度(A)值,绘制细胞增殖曲线,实验重复3次。

将1.6%的甲基纤维素培养基500 μ l铺于24孔板,收集对数生长期野生型K562/G01细胞及miR-21敲除的单细胞克隆,用含10%FBS的RPMI1640培养基调整细胞悬液体积500 μ l,加入到预先铺好的甲基纤维素中,使其终浓度为0.8%的甲基纤维素,每孔200个细胞,每组3个复孔。孵育7~14 d时显微镜下观察克隆,以细胞数 ≥ 40 个为1个克隆,计算细胞克隆形成率,克隆形成率(%)=(克隆数/200) \times 100%,实验重复3次。

8. 细胞对药物敏感性的IC₅₀检测:收集对数生长期的野生型K562/G01细胞及miR-21敲除的单细

胞克隆,调整细胞密度为 2×10^5 /ml,分别接种于96孔培养板,加入不同浓度梯度的IM,每孔总体积200 μ l,细胞和药物悬液各100 μ l。其中IM浓度设定为0、4、8、16、32、64、128、256 μ mol/ml,每个浓度设3个复孔。细胞置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱孵育48 h,在实验结束前4 h每孔加入20 μ l MTT溶液,继续孵育4 h后,振荡混匀,检测490 nm和630 nm波长处吸光度(A)值,分别计算药物对细胞增殖抑制率。药物对细胞增殖抑制率=(1-A_{实验组}/A_{对照组}) \times 100%。使用SPSS 23.0软件,以药物浓度对细胞增殖抑制率做线性回归计算IC₅₀。实验重复3次。

9. 流式细胞术检测miR-21敲除后细胞在相同IM作用下凋亡率的变化:收集对数生长期的野生型K562/G01细胞及miR-21敲除的单细胞克隆,调整细胞密度为 2×10^5 /ml,分别接种于12孔培养板,加入不同浓度梯度的IM,每孔总体积3 ml,细胞和药物悬液各1.5 ml,其中IM浓度设为0、2、4 μ mol/ml。置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱孵育48 h后,收集各组细胞,PBS洗涤2次,使用1 \times 结合缓冲液重悬,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,吸取100 μ l重悬细胞,加入5 μ l Annexin V-APC和5 μ l 7-AAD(美国BD公司产品)混匀,室温下避光孵育15 min后,再加入400 μ l 1 \times 结合缓冲液混匀,上流式细胞仪检测并分析结果,实验重复3次。

10. Western blot法检测蛋白表达:收集对数生长期的野生型K562/G01细胞及miR-21敲除的单细胞克隆,预冷的PBS洗涤1次,加入适量的RIPA裂解液(美国Theimo Fisher公司产品)、蛋白酶抑制剂(美国Roche公司产品)、磷酸化酶抑制剂(美国Roche公司产品)及PMSF裂解细胞,超声破碎细胞,离心收集上清液即为细胞的总蛋白,测定蛋白浓度,分装,-80 $^{\circ}$ C保存。取蛋白上清80 μ g,加入5 \times 凝胶上样缓冲液3 μ l,超纯水补至15 μ l,99 $^{\circ}$ C变性5 min后,进行80 g/L SDS-PAGE。电泳完毕后,电转移至硝酸纤维素膜(NC膜),用50 g/L蛋白封闭液封闭1 h。加入不同浓度稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。洗膜后与相应的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1 h。TBST洗涤3次,ECL显色曝光,凝胶成像系统上进行结果分析。GAPDH抗体为美国Santa Cruz公司产品;PTEN、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、P210^{BCR-ABL}、p-P210^{BCR-ABL}、Anti-mouse-HRP、Anti-Rabbit-HRP抗体均为美国Cell Signaling Technology公司产品。

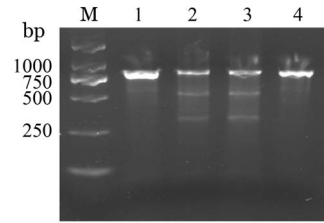
11. 统计学处理:应用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,Graphpad Prism 7进行统计作图。实验数据采用均数±标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析及t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. CRISPR/Cas9介导的K562/G01细胞中miR-21的敲除:Surveyor核酸内切酶检测CRISPR/Cas9慢病毒介导的的突变效率,结果显示:与对照组相比,CRISPR/Cas9慢病毒能靶向性剪切基因组DNA,其对K562/G01细胞诱导的突变效率为7.12%~8.11%(图1)。840个CRISPR/Cas9慢病毒转染3d后的K562/G01细胞接种于96孔板培养,获得120个单细胞克隆,克隆形成率约为14.3%。将这些单细胞克隆进行PCR筛选,其中有4个克隆(分别命名为1#、2#、6#、7#)显示只有一条较野生型短的扩增片段(图2),推断这4个克隆可能是miR-21敲除的单细胞克隆。后续扩增培养过程中7#单细胞克隆被细菌污染从实验组中剔除。实时定量PCR结果显示,在这些含有短片段PCR产物的单细胞克隆中,1#、2#、6#的miR-21表达量分别相当于野生型组的(1.77±0.77)%、(0.15±0.03)%、(2.51±0.71)%。Sanger测序进一步明确了1#、2#、6#单细胞克隆miR-21的碱基缺失情况(图3)。上述结果表明,应用CRISPR/Cas9技术成功构建了多个稳定的miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆。

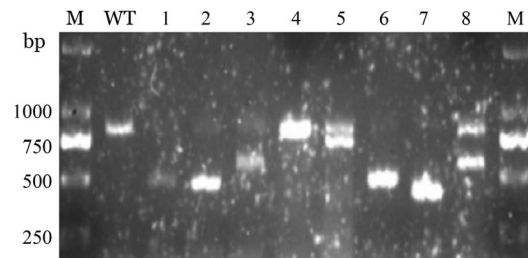
2. 敲除miR-21对细胞增殖的影响:MTT结果显示,miR-21敲除使K562/G01细胞增殖受抑,并且于96h更为明显(图4)。细胞克隆形成实验结果显示,miR-21敲除K562/G01细胞的克隆形成率较野生型显著降低(P<0.05),单个克隆大小也明显减小(图5)。计算各组克隆数,野生型和1#、2#、6#单细

胞克隆的克隆形成率依次为(57.67±8.25)%、(26.94±5.36)%、(7.17±2.11)%、(31.50±3.65)% ,差异有统计学意义(P<0.05)。



M: Marker; 1:野生型K562/G01细胞;2,3:MOI分别为100、200的CRISPR/Cas9慢病毒转导的K562/G01细胞;4:阴性对照

图1 CRISPR/Cas9诱导的突变效率



以亲本K562/G01细胞作为野生型(WT)。M:Marker;1、2、6、7泳道显示仅具有较短片段的单细胞克隆;3、4、5、8泳道显示除了有和WT相等的PCR扩增片段外,还有一个长度较短的产物片段

图2 筛选单细胞克隆的PCR结果

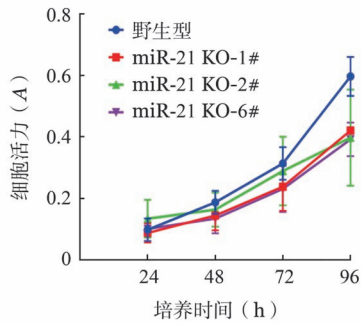
3. 敲除miR-21对药物敏感性的影响:MTT法结果显示,野生型和1#、2#、6#单细胞克隆对IM的IC₅₀值分别为(21.92±1.36)μmol/ml、(3.98±0.39)μmol/ml、(5.38±1.01)μmol/ml、(9.24±1.36)μmol/ml,单细胞克隆对IM的敏感性和野生型组相比分别提高了5.50、4.08、2.37倍,差异有统计学意义(P值均<0.05)。上述结果提示,miR-21敲除可提高K562/G01细胞对IM的敏感性。

4. IM对敲除miR-21的K562/G01细胞凋亡的

野生型	<u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAAGTCGATGGGCTGTCTGACATTTGGTA</u> TCTTTCATCTGACCATCCATCCAATGTTCTCATTTAAACATTACCCAG
miR-21 KO-1#	<u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAAGTCGATGGGCTGTCTGACATTTGGTA</u> TCTTTCATCTGACCATCCATCCAATGTTCTCATTTAAACATTACCCAG
miR-21 KO-2#	<u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAAGTCGATGGGCTGTCTGACATTTGGTA</u> TCTTTCATCTGACCATCCATCCAATGTTCTCATTTAAACATTACCCAG
miR-21 KO-6#	<u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAAGTCGATGGGCTGTCTGACATTTGGTA</u> TCTTTCATCTGACCATCCATCCAATGTTCTCATTTAAACATTACCCAG

miR-21 KO:miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆。红色部分为miR-21的5p和3p序列,5p端带红色下划线的碱基对为种子序列,删除线部分为删除序列

图3 Sanger测序检测单细胞克隆miR-21的碱基缺失情况



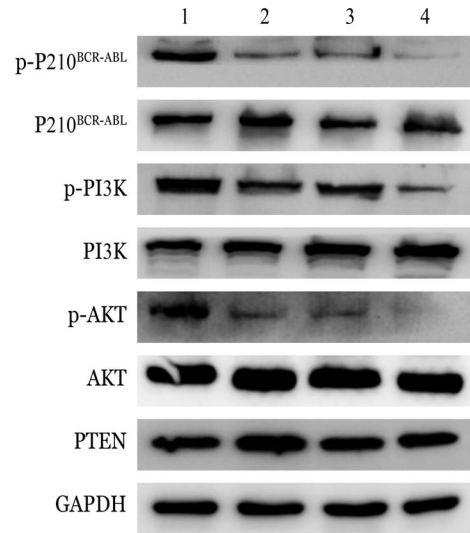
miR-21 KO:miR-21 敲除的 K562/G01 单细胞克隆

图4 MTT法分析 miR-21 敲除克隆的细胞活力(实验重复3次)

影响:采用流式细胞术检测野生型和 miR-21 敲除的 K562/G01 单细胞克隆在相同 IM 浓度作用下的凋亡现象。结果显示:野生型和 1#、2#、6# 单细胞克隆分别与 0、2、4 $\mu\text{mol/ml}$ IM 共培养 48 h, 每种浓度 IM 作用下各单细胞克隆的凋亡率均比野生型更高, 其中在 2、4 $\mu\text{mol/ml}$ IM 作用下, 1#、2#、6# 单细胞克隆与野生型的凋亡率比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图6)。此结果与 IC_{50} 相符, 同样提示了 miR-21 显著下调后细胞的药物敏感性得到了提高。

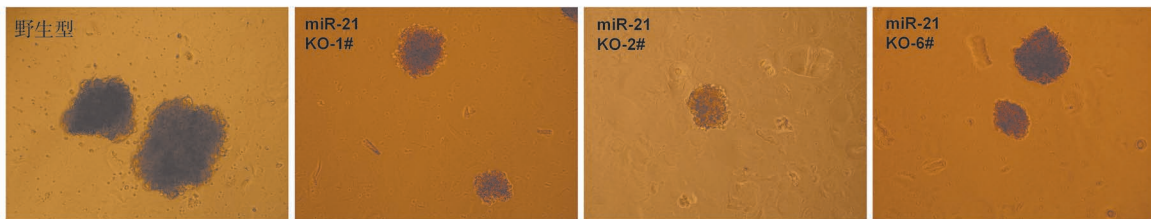
5. 敲除 miR-21 对 PTEN/PI3K/AKT 信号通路和 BCR-ABL 融合蛋白表达的影响: Western blot 法检

测结果显示, 与野生型相比, miR-21 敲除的 1#、2#、6# 单细胞克隆中公认的 miR-21 的下游靶基因 PTEN 的蛋白表达水平未见明显变化, 总 AKT、总 PI3K 蛋白水平也没有改变, 而 p-AKT、p-PI3K 蛋白表达被显著抑制。另外, 各 miR-21 敲除的单细胞克隆中 $\text{P210}^{\text{BCR-ABL}}$ 、p- $\text{P210}^{\text{BCR-ABL}}$ 蛋白表达明显下调(图7)。



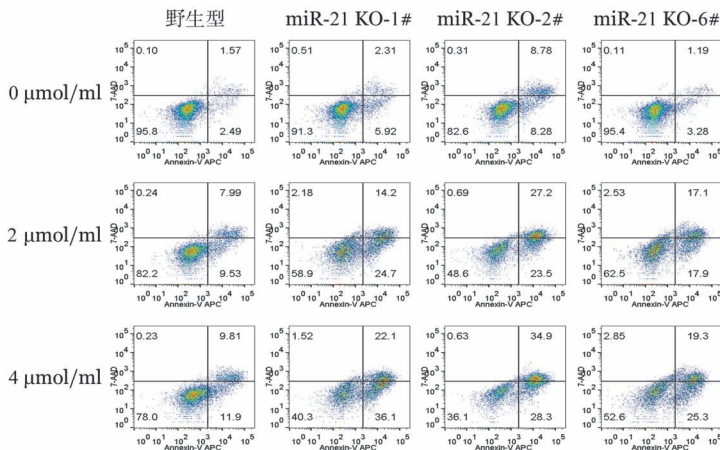
1: 野生型; 2~4 分别为 miR-21 敲除的 1#、2#、6# 单细胞克隆

图7 Western blot法比较野生型和 miR-21 敲除的 K562/G01 细胞中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路和 BCR-ABL 融合蛋白表达量



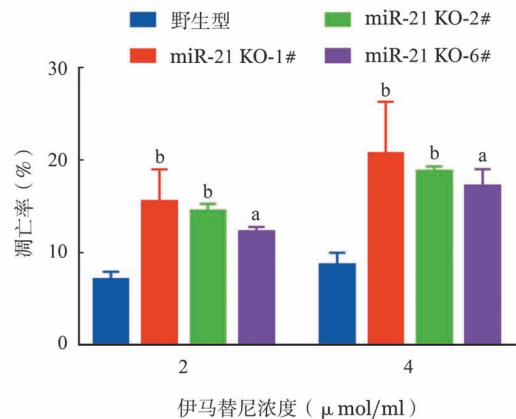
miR-21 KO:miR-21 敲除的 K562/G01 单细胞克隆

图5 甲基纤维素克隆形成实验显微镜下观察平均克隆大小($\times 400$)



miR-21 KO:miR-21 敲除的 K562/G01 单细胞克隆。与野生型比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图6 以不同浓度的伊马替尼分别处理细胞 48 h 后用 Annexin V-APC 和 7-AAD 双染色流式细胞术分析细胞凋亡率



讨 论

IM将CML的10年总生存率从大约20%提高至80%~90%^[8-9]。对慢性期(CP)CML患者的研究表明,约50%的患者达到并维持至少2年无法检测到BCR-ABL转录水平,在停止治疗后仍保持无治疗缓解状态^[10-11]。但是,仍有20%的患者在起始治疗4年内对IM耐药,一旦疾病进展至加速期或急变期,耐药率更高达70%~90%^[12]。因此解决TKI耐药对改善CML预后具有重要意义。近年来,CML对TKI的耐药的研究多数集中在BCR-ABL激酶的突变方面。但是,耐药可能是多种机制共同作用的结果。一项预测哪些CML患者将通过TKI获得最佳治疗反应的研究显示:接受TKI治疗6个月和12个月后,未能获得最佳治疗反应的患者,miRNA-21的表达水平较高^[13]。由此推测,miR-21可能参与了CML对TKI耐药。

本研究通过靶向miR-21的CRISPR/Cas9慢病毒作用于耐IM的人CML K562细胞(K562/G01),成功获得了多个miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆,表明了CRISPR/Cas9技术在miRNAs编辑方面是有效的。

Seca等^[14]发现miR-21下调降低了K562和KYO-1细胞的活力和增殖,导致白血病细胞中Bcl-2蛋白水平下降,增加了K562和KYO-1细胞对依托泊苷或阿霉素的敏感性。Bai等^[15]研究发现miR-21介导了K562细胞对柔红霉素的耐药。本研究结果也显示miR-21敲除可抑制K562/G01细胞的增殖,提高K562/G01细胞对IM的敏感性。

多个研究结果显示miR-21通过激活肿瘤细胞中PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)依赖的PI3K/AKT通路促进细胞增殖^[16-19]。PTEN被发现具有肿瘤抑制蛋白的功能^[20],是PI3K/AKT这一信号通路的主要抑制因子,可以特异性地催化PI-3脱去3'磷酸转变为无活性的PI-2,使得AKT不能活化,导致PI3K/AKT细胞信号通路阻滞^[21]。PTEN的下调被认为是miR-21在CML细胞中最重要的作用^[22]。PI3K/AKT通路也已被证实在IM相关耐药中发挥作用^[23]。本研究中Western blot结果显示miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆中总AKT、PI3K蛋白表达无变化,而p-AKT、p-PI3K蛋白表达均显著下调,证实了敲除miR-21可以抑制PI3K/AKT信号通路的活化。

但是,在我们的研究中并没有观察到PTEN蛋

白的表达有明显变化。Folini等^[24]的研究结果也显示沉默miR-21的表达没有使抑癌基因PTEN的表达发生明显改变。而Hatley等^[25]关于非小细胞肺癌的研究发现,miR-21过表达可以调控miR-21靶基因的蛋白水平,但miR-21缺失时并没有观察到miR-21靶基因蛋白水平的显著变化,表明miR-21与PTEN的靶向调控关系并不明确。目前已经实验证实的miR-21下游靶基因除了PTEN外,还包括PDCD4^[26]、BTG2^[27]、RECK^[28]、STAT3^[29]等。另外,Zhao等^[30]在研究中发现miR-21靶向MAPK/ERK和PI3K/AKT信号通路调节胰腺癌细胞的增殖。这些研究表明miR-21的调控是一个复杂的过程,提示miR-21可能通过其他靶基因参与PI3K/AKT信号通路的调节,或者PI3K/AKT信号通路与其他信号通路发生了串扰。

最后,我们在研究中还发现miR-21敲除的K562/G01单细胞克隆中P210^{BCR-ABL}、p-P210^{BCR-ABL}蛋白表达也明显下调,与既往报道一致^[31]。

综上所述,miR-21敲除抑制K562/G01细胞增殖,提高了K562/G01细胞对IM的敏感性,这可能是通过抑制PI3K/AKT信号通路和BCR-ABL表达实现的。

参 考 文 献

- [1] Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? [J]. *Blood*, 2009, 114 (27):5426-5435. DOI: 10.1182/blood-2009-08-215939.
- [2] Liu Y, Xu J, Choi HH, et al. Targeting 17q23 amplicon to overcome the resistance to anti-HER2 therapy in HER2+ breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1):4718. DOI: 10.1038/s41467-018-07264-0.
- [3] Usmani A, Shoro AA, Memon Z, et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(8):2484-2490.
- [4] Singh M, Garg N, Venugopal C, et al. STAT3 pathway regulates lung-derived brain metastasis initiating cell capacity through miR-21 activation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (29):27461-27477. DOI: 10.18632/oncotarget.4742.
- [5] Shan L, Ji Q, Cheng G, et al. Diagnostic value of circulating miR-21 for colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(1):47-56. DOI: 10.3233/CBM-140437.
- [6] Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex [J]. *Leukemia*, 2015, 29 (5):1004-1017. DOI: 10.1038/leu.2014.351.
- [7] Wang W, Li J, Zhu W, et al. MicroRNA-21 and the clinical out-

- comes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:819. DOI: 10.1186/1471-2407-14-819.
- [8] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300. DOI: 10.3322/caac.20073.
- [9] Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376 (10):917- 927. DOI: 10.1056/NEJMoa1609324.
- [10] Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study [J]. *Blood*, 2013, 122 (4):515- 522. DOI: 10.1182/blood-2013-02-483750.
- [11] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11 (11):1029- 1035. DOI: 10.1016/S1470-2045 (10) 70233-3.
- [12] Jain N, O'Brien S. The frontline treatment of chronic myeloid leukemia in the chronic phase: current clinical decisions and future prospects for treatment [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6 (5):575-586. DOI: 10.1586/17474086.2013.835697.
- [13] Alves R, Gonçalves AC, Jorge J, et al. MicroRNA signature refine response prediction in CML [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 9666. DOI: 10.1038/s41598-019-46132-9.
- [14] Seca H, Lima RT, Lopes-Rodrigues V, et al. Targeting miR-21 induces autophagy and chemosensitivity of leukemia cells [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14 (10):1135- 1143. DOI: 10.2174/13894501113149990185.
- [15] Bai H, Xu R, Cao Z, et al. Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585 (2):402-408. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.12.027.
- [16] Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR- 21- dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20 (5): 635- 648. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.10.014.
- [17] Zheng P, Chen L, Yuan X, et al. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 53. DOI: 10.1186/s13046-017-0528-y.
- [18] Chai C, Song LJ, Han SY, et al. MicroRNA-21 promotes glioma cell proliferation and inhibits senescence and apoptosis by targeting SPRY1 via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24 (5):369- 380. DOI: 10.1111/cns.12785.
- [19] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275(5308):1943-1947. DOI: 10.1126/science.275.5308.1943.
- [20] Kim SM, Kim JS, Kim JH, et al. Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 296(2):150-159. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.04.006.
- [21] Cully M, You H, Levine AJ, et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3):184-192. DOI: 10.1038/nrc1819.
- [22] Panagal M, S RSK, P S, et al. MicroRNA21 and the various types of myeloid leukemia [J]. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25 (7-8):161-166. DOI: 10.1038/s41417-018-0025-2.
- [23] Li J, Dang Y, Gao J, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway is activated after imatinib secondary resistance in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) [J]. *Med Oncol*, 2015, 32 (4): 111. DOI: 10.1007/s12032-015-0554-6.
- [24] Folini M, Gandellini P, Longoni N, et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:12. DOI: 10.1186/1476-4598-9-12.
- [25] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA- 21 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(3):282-293. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.08.013.
- [26] Ge Y, Zhang L, Nikolova M, et al. Strand-specific in vivo screen of cancer-associated miRNAs unveils a role for miR-21 (*) in SCC progression [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(1):111-121. DOI: 10.1038/ncb3275.
- [27] Liu M, Wu H, Liu T, et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma [J]. *Cell Res*, 2009, 19(7):828-837. DOI: 10.1038/cr.2009.72.
- [28] Leite KR, Reis ST, Viana N, et al. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer [J]. *J Cancer*, 2015, 6 (3):292-301. DOI: 10.7150/jca.11038.
- [29] Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA- 21 through a highly conserved enhancer [J]. *Blood*, 2007, 110(4):1330-1333. DOI: 10.1182/blood-2007-03-081133.
- [30] Zhao Q, Chen S, Zhu Z, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12):1157. DOI: 10.1038/s41419-018-1182-9.
- [31] Wang CG, Zhong L, Liu YL, et al. Emodin Exerts an Antiapoptotic Effect on Human Chronic Myelocytic Leukemia K562 Cell Lines by Targeting the PTEN/PI3K- AKT Signaling Pathway and Deleting BCR-ABL [J]. *Integr Cancer Ther*, 2017, 16(4): 526-539. DOI: 10.1177/1534735416664784.

(收稿日期:2020-10-03)

(本文编辑:王叶青)