

miR-15a/16 在多发性骨髓瘤患者中的表达研究

张冰云 李艳杰 姚瑶 罗建萍 李护君 陆倩 闫志凌 徐开林 李振宇

Dysfunction of miR-15a/16 in multiple myeloma Zhang Bingyun, Li Yanjie, Yao Yao, Luo Jianping, Li Hujun, Lu Qian, Yan Zhiling, Xu Kailin, Li Zhenyu

Corresponding author: Li Zhenyu, Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China. Email: lizhenyumd@163.com

染色体异常和血管生成在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)发病中占有重要地位^[1]。13q14 缺失是 MM 患者最常见的染色体异常, miR-15a/16 即定位于该染色体上。血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor, VEGF-A) 在 MM 的发病中具有诱导新生血管形成、诱导骨髓瘤细胞增殖和迁移、增加破骨细胞活性和调节免疫细胞活性等多种功能。在对骨肉瘤及神经胶质瘤的研究中也证实了 miRNA 对 VEGF-A 的调控作用^[2-3], 然而在 MM 中关于 miRNA 是否可以调节 VEGF-A 表达的研究仍较少。本研究中我们拟分析 MM 患者 miR-15a/16、VEGF-A 的表达情况; 并通过细胞模型进一步研究 miR-15a/16 对 VEGF-A 的调控作用, 从而为靶向 miR-15a/16 及抗血管生成治疗 MM 提供新的依据。

病例与方法

1. 病例资料及细胞株来源: 病例为 2013 年 11 月至 2015 年 2 月我院收治的 45 例初诊 MM 患者, 男 25 例, 女 20 例, 中位年龄 62 岁, 其中 IgG 型 22 例, IgA 型 10 例, 轻链型 12 例, 不分泌型 1 例。所有患者均符合国际骨髓瘤工作组(IMWG) 诊疗标准^[4]。对照组为 15 名健康体检者, 其中男 9 名, 女 6 名, 中位年龄 56 岁。本研究获得我院伦理委员会批准, 所有患者及对照者均签署知情同意书。骨髓瘤细胞株 U266 细胞由本实验室冻存。

2. 骨髓单个核细胞的收集: 采集患者及对照者 EDTA 抗凝骨髓 5 ml, 采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离单个核细胞和骨髓上清, 冻存于 -80 °C 冰箱备用。

3. 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 miR-15a/16、VEGF-

A mRNA 表达水平: 采用 TRIzol 法提取单个核细胞总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 质量后反转录成 cDNA (TRIzol 试剂盒和 M-MLV 反转录酶购自美国 Invitrogen 公司)。qRT-PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司。引物序列: GAPDH: 上游: 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3', 下游: 5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGTG-3'; VEGF-A: 上游: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3', 下游: 5'-AGGGGCCATC-CACAGTCTTC-3'; miR-15a: 上游: 5'-GCGGCGGTAGCAG-CACATAATG-3', 下游: 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'; miR-16: 上游: 5'-GCGGCGGTAGCAGCACGTAAAT-3', 下游: 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'; U6: 上游: 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 下游: 5'-GGAAC-GCTTCACGAATTTG-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。扩增完成后作熔解曲线验证产物的特异性, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-15a/16、VEGF-A mRNA 相对表达水平。

4. ELISA 法检测 VEGF-A 表达水平: ELISA 试剂盒购自上海富勒生物科技有限公司, 按照说明书进行操作。

5. 慢病毒感染 U266 细胞: U266 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱常规传代培养。取对数生长期细胞用于实验。绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的过表达 miR-15a/16 以及空载体 (con) 慢病毒由上海吉凯公司包装完成。感染前 1 d U266 细胞换液, 每孔接种 4 × 10⁵ 个细胞于 96 孔板中, 每孔加终浓度为 1 × 10⁸ TU/ml 的病毒 10 μl, 10 mg/L 聚凝胺 10 μl, 用 RPMI 1640 培养基补至总体积为 100 μl, 混匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。3 d 后将细胞扩大培养, 采用流式细胞术分选出 GFP 阳性细胞用于后续实验。

6. CCK-8 法检测细胞增殖: 实验分组: ① U266 细胞组; ② U266-miR-15a 组: 转染过表达 miR-15a 慢病毒载体 U266 细胞组; ③ U266-miR-16 组: 转染过表达 miR-16 慢病毒载体 U266 细胞组; ④ U266-con 组: 转染空载体 U266 细胞组。分别取对数生长期细胞, 每孔接种 4 × 10⁴ 个细胞于 96 孔板中, 每孔终体积 100 μl, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。于 22、46、70 h 时加 CCK-8 溶液 (试剂盒购自日本同仁化学研究所), 每孔 5 μl, 轻微振荡混匀, 37 °C 孵育 2 h 后采用自动酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值。结果以 (A_{处理组} - A_{空白组}) / (A_{未处理组} - A_{空白组}) 表示。每组设 3 复孔, 实验重复 3 次。

7. 流式细胞术检测细胞凋亡: 实验分组同上。Annexin V/7-AAD 凋亡试剂盒购自美国 eBioscience 公司。每管取 1 × 10⁶ 个细胞, 按试剂盒说明书进行孵育、洗涤后上流式细胞

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.07.014

基金项目: 国家自然科学基金 (81570183); 江苏省科技厅临床医学科技专项 (SBL201330199)

作者单位: 221002 徐州医学院附属医院 (张冰云、姚瑶、罗建萍、李护君、陆倩、闫志凌、徐开林、李振宇), 诊断教学实验中心 (李艳杰)

通信作者: 李振宇, Email: lizhenyumd@163.com

仪检测。每组设3复孔,实验重复3次。

8. Western blot 法检测凋亡相关蛋白:实验分组同上。参照文献[5]方法进行操作,检测过表达 miR-15a/16 后抗凋亡蛋白 Bcl-2 的变化。

9. 统计学处理:采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验或非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-15a/16、VEGF-A mRNA 在 MM 患者中的表达:结果显示 miR-15a/16 在 MM 患者中的表达水平较健康对照组低(P 值分别为 0.018 和 0.035),两组 VEGF-A mRNA 水平比较差异无统计学意义($P=0.387$),MM 患者骨髓上清中 VEGF-A 含量显著高于健康对照组($P=0.000$)(表 1)。

2. 慢病毒感染 U266 细胞:病毒感染 U266 细胞 72 h 后,荧光显微镜下均可见到绿色荧光,显示慢病毒成功感染细胞。采用流式细胞术分选 GFP 阳性细胞,其阳性率达 98% 以上(图 1)。

3. 过表达 miR-15a/16 对 U266 细胞 VEGF-A 表达水平、细胞凋亡及细胞增殖的影响:与 U266-con 组比较,过表达 miR-15a/16 后,U266 细胞 VEGF-A mRNA 表达水平无明显变化(P 值均 > 0.05),但细胞培养上清液中 VEGF-A 表达水平明显降低(P 值均 < 0.05),细胞凋亡率增加(P 值均 < 0.05)(表 2);抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降(图 2)。与 U266-con 组相比,U266-miR-15a、U266-miR-16 组细胞增殖受到抑制(P 值均 < 0.05),U266-con 组与 U266 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

讨 论

越来越多的研究表明 miRNA 在实体肿瘤以及包括 MM

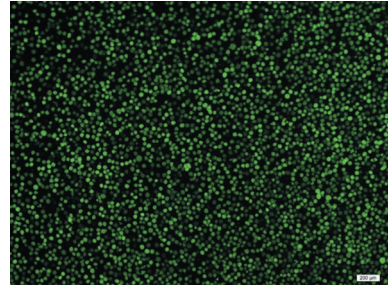
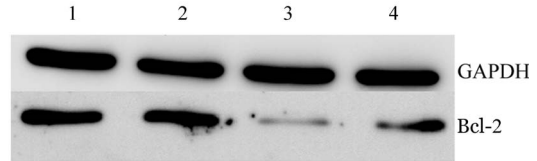


图 1 荧光显微镜下观察转染过表达 miR-15a 慢病毒载体 U266 细胞(U266-miR-15a 组)



1:U266 细胞组;2:转染空载体 U266 细胞组;3:转染过表达 miR-15a 慢病毒载体 U266 细胞组;4:转染过表达 miR-16 慢病毒载体 U266 细胞组

图 2 Western blot 法检查过表达 miR-15a/16 对 U266 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平的影响

在内的血液系统肿瘤中均存在表达失调^[6-7]。miRNA 通过靶向原癌基因或抑癌基因的表达调节肿瘤的发生、发展,可以作为疾病诊断、进展及预后的新型标志^[8-9]。近来有研究表明 miRNA 表达还与肿瘤细胞的耐药相关^[10-11],使其成为肿瘤治疗的新靶点。

miR-15a/16 是第一个被证明参与肿瘤发病的 miRNA,定位于 13q14 上。研究证实在多种实体肿瘤、淋巴瘤、白血病及约 50% 的 MM 患者中都存在该染色体的缺失或 miR-15a/16 低表达^[12-13],但关于 miR-15a/16 对 MM 细胞株生物学行为的影响及其机制的报道并不多。在本研究中我们

表 1 多发性骨髓瘤患者中 miR-15a/16、VEGF-A mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-15a	miR-16	VEGF-A mRNA	VEGF-A (ng/L)
多发性骨髓瘤患者组	45	0.34±0.27	0.86±0.80	1.62±3.59	239.93±126.38
健康对照组	15	0.85±0.62	1.27±0.66	3.94±6.42	104.93±60.74
<i>P</i> 值		0.018	0.035	0.387	0.000

注:VEGF:血管内皮生长因子

表 2 过表达 miR-15a/16 后对 U266 细胞 VEGF-A 表达水平、细胞凋亡及增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF-A mRNA	VEGF-A (ng/L)	细胞凋亡率 (%)	不同时间点细胞增殖(A 值比值)		
				24 h	48 h	72 h
U266 细胞组	1.04±0.26	384.01±5.89	1.51±0.81	0.35±0.08	1.12±0.16	1.08±0.03
U266-con 组	1.00	379.08±4.70	2.08±1.25	0.30±0.05	0.93±0.09	1.09±0.15
U266-miR-15a 组	1.11±0.27	347.62±6.94 ^a	2.98±0.95 ^a	0.22±0.03 ^a	0.76±0.15 ^a	0.99±0.06 ^a
U266-miR-16 组	1.16±0.49	346.44±5.72 ^a	2.90±1.33 ^a	0.19±0.03 ^a	0.62±0.09 ^a	0.99±0.07 ^a

注:U266-con 组:转染空载体 U266 细胞组;U266-miR-15a 组:转染过表达 miR-15a 慢病毒载体 U266 细胞组;U266-miR-16 组:转染过表达 miR-16 慢病毒载体 U266 细胞组;与 U266-con 组比较,^a $P < 0.05$ 。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次

的结果显示,与健康对照组相比,MM患者 miR-15a/16 的表达水平降低,与 Roccaro 等^[14]的研究结果一致,且我们的前期研究表明随着 MM 进展 miR-15a/16 的表达水平呈进行性下降^[15]。同时,我们选取低表达 miR-15a/16 的骨髓瘤细胞株 U266 细胞为研究对象,应用慢病毒转染技术使 U266 细胞过表达 miR-15a/16,探讨其对骨髓瘤细胞生长的影响。实验结果显示过表达 miR-15a/16 后,细胞增殖速度降低、凋亡增加,证实了 miR-15a/16 在 MM 发病中的抑癌基因作用。

Bcl-2 是一种重要的抗凋亡基因,它通过抑制细胞膜超极化、调节 caspase 信号通路等机制促进细胞生存,抑制细胞凋亡。在本研究中我们发现过表达 miR-15a/16 后,U266 细胞中 Bcl-2 的表达明显下调,说明 miR-15a/16 可能是通过抑制 Bcl-2 基因的表达实现促肿瘤细胞凋亡作用的。关于 miR-15a/16 在 MM 中是否参与其他信号通路调节及其机制还在进一步研究中。

血管新生在 MM 的发生、发展中发挥重要作用,而 VEGF-A 是目前已知最强的促血管生成因子^[16]。MM 细胞既可以直接分泌 VEGF-A,也可以诱导骨髓基质细胞分泌 VEGF-A^[17],进而促进血管内皮细胞增殖,诱导肿瘤新生血管生成,为 MM 细胞提供更适宜的生存环境,促进 MM 进展。在本研究中我们的结果显示 MM 患者 VEGF-A 的表达水平显著高于健康对照者,过表达 miR-15a/16 后,U266 细胞 VEGF-A 分泌水平下降,而 VEGF-A mRNA 水平并无变化,这与 Sun 等^[18]的研究结果一致,说明 miR-15a/16 对 VEGF-A 的调控作用发生在转录后水平。miR-15a/16 通过下调 VEGF-A 的表达减少新生血管形成,制造不利于 MM 细胞生存的环境,至少在一定程度上可以延缓 MM 的发展过程。但本研究只是体外实验,关于其体内效应还在进一步研究中。

综上,通过研究我们验证了 miR-15a/16 在 MM 患者中存在低表达,更进一步证实了 miR-15a/16 不仅可以直接抑制 MM 细胞的生长,促进其凋亡,还可以通过降低骨髓微环境中 VEGF-A 的分泌水平,减少血管生成,间接调控 MM 进展,发挥抑癌基因作用。

参考文献

- [1] Joshi S, Gupta N, Khan R, et al. Interrelationship between angiogenesis, inflammation and oxidative stress in Indian patients with multiple myeloma [J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18 (2): 132-137. doi: 10.1007/s12094-015-1344-5.
- [2] Fan L, Wu Q, Xing X, et al. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(5): 407-414. doi: 10.1093/abbs/gms019.
- [3] Yue X, Wang P, Xu J, et al. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A [J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1200-1206. doi: 10.3892/or.2011.1588.
- [4] Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma [J]. Leukemia, 2009, 23(1): 3-9. doi: 10.1038/leu.2008.291.
- [5] Sun CY, Hu Y, Huang J, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling [J]. Tumour Biol, 2010, 31 (2): 121-128. doi: 10.1007/s13277-010-0016-x.
- [6] Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer [J]. Am J Pathol, 2009, 174(4): 1131-1138. doi: 10.2353/ajpath.2009.080794.
- [7] Volinia S, Visone R, Galasso M, et al. Identification of micro RNA activity by Targets' Reverse Expression [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 91-97. doi: 10.1093/bioinformatics/btp598.
- [8] Faiman B. Myeloma genetics and genomics: practice implications and future directions [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014, 14(6): 436-440. doi: 10.1016/j.clml.2014.07.008.
- [9] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. Cancer Cell, 2006, 9 (3): 189-198. doi: 10.1016/j.ccr.2006.01.025.
- [10] Rao X, Di LG, Li M, et al. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways [J]. Oncogene, 2011, 30(9): 1082-1097. doi: 10.1038/onc.2010.487.
- [11] Feng DD, Zhang H, Zhang P, et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(10): 2164-2175. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01213.x.
- [12] Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma [J]. Blood, 2003, 101(11): 4569-4575. doi: 10.1182/blood-2002-10-3017.
- [13] Pan Y, Meng M, Zhang G, et al. Oncogenic microRNAs in the genesis of leukemia and lymphoma [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(33): 5260-5267.
- [14] Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma [J]. Blood, 2009, 113(26): 6669-6680. doi: 10.1182/blood-2009-01-198408.
- [15] Li Y, Li D, Yan Z, et al. Potential relationship and clinical significance of miRNAs and Th17 cytokines in patients with multiple myeloma [J]. Leuk Res, 2014, 38(9): 1130-1135. doi: 10.1016/j.leukres.2014.07.005.
- [16] Medinger M, Passweg J. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies [J]. Swiss Med Wkly, 2014, 144: w14050. doi: 10.4414/smw.2014.14050.
- [17] Ria R, Roccaro AM, Merchionne F, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma [J]. Leukemia, 2003, 17 (10): 1961-1966. doi: 10.1038/sj.leu.2403076.
- [18] Sun CY, She XM, Qin Y, et al. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF [J]. Carcinogenesis, 2013, 34 (2): 426-435. doi: 10.1093/carcin/bgs333.

(收稿日期:2016-01-14)

(本文编辑:刘志红)