

miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 对多发性骨髓瘤细胞自噬及凋亡的影响

尚晋 陈志忠 王志红 魏天南 吴文冰 陈为民

【摘要】 目的 探讨多发性骨髓瘤(MM)细胞 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 表达与自噬和凋亡的关系。方法 以人 MM 细胞株 U266 细胞及 45 例 MM 患者瘤细胞为研究对象,以 40 例健康体检者为对照,采用实时定量 PCR 法测定细胞中 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 表达水平,采用 Western blot 法测定自噬相关蛋白(LC3- II、LC3- I、P62、Beclin-1)、凋亡相关分子(CL caspase3、CL caspase7、Bcl-2、Bax)和 TGF- β /Smad 通路相关蛋白(TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad3、Smad7)表达水平,采用流式细胞术测定细胞凋亡率,分析 miRNA 表达水平与 MM 患者临床特征的相关性。结果 ①与正常浆细胞比较,U266 细胞、MM 患者瘤细胞的 miRNA-196b-5p 表达显著增加(0.43 ± 0.15 对 2.44 ± 0.63 、 2.02 ± 0.85 , P 值均 < 0.001),miRNA-99a-5p 表达显著降低(1.87 ± 0.61 对 0.62 ± 0.15 、 0.80 ± 0.33 , P 值均 < 0.001),LC3- II/LC3- I、Beclin-1、Bcl-2 表达显著增加,P62、Bax、CL caspase3、CL caspase7 表达显著降低,细胞凋亡率降低(P 值均 < 0.05)。②正常 CD138⁺浆细胞分别转染 miRNA-196b-5p mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 48 h 后,与未转染对照组比较,LC3- II/LC3- I、Beclin-1、TGF- β 1、p-Smad3 表达显著增高,P62、Smad7 表达显著降低,细胞凋亡率减少(P 值均 < 0.05);上述反应体系加入自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤后,细胞凋亡率未见明显改变(P 值均 > 0.05)。③miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 表达与 MM 患者 DS 分期(P 值分别为 0.004、0.012)、ISS 分期显著相关(P 值均为 0.001)。结论 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 表达与 MM 患者临床特征密切相关,miRNA-196b-5p 过表达和 miRNA-99a-5p 表达下调通过上调自噬水平抑制骨髓瘤细胞凋亡,其机制与活化 TGF- β /Smad 信号通路有关。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 微RNAs; 自噬; 细胞凋亡

基金项目:福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2016-ZQN-5)

Association of miRNA-196b-5p and miRNA-99a-5p with autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells Shang Jin, Chen Zhizhong, Wang Zhihong, Wei Tiannan, Wu Wenbing, Chen Weimin. Fujian Medical University Shengli Clinical Medical College, Department of Hematology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: Chen Weimin, Email: chenwm1962@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between miRNA-196b-5p and miRNA-99a-5p expression and autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells. **Methods** Human myeloma cell line U266 and normal CD138⁺ plasma cells were selected as the research objects. The subjects were divided into 45 cases of multiple myeloma patients and 40 healthy controls. The expression of miRNA-196b-5p and miRNA-99a-5p was measured by real-time quantitative PCR, and Western blot was used to determine the expression of autophagy related protein LC3- II, LC3- I, P62, Beclin-1 expression, apoptosis related protein CL caspase3, CL caspase7, Bcl-2, Bax, and TGF- β /Smad pathway associated proteins TGF- β 1, Smad2/3, p-Smad3 and Smad7. The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry. The correlation between miRNA expression level and clinical characteristics of multiple myeloma patients was analyzed. **Results** Compared with normal plasma cells, the expression of miRNA-196b-5p in myeloma cells increased significantly (0.43 ± 0.15 vs 2.44 ± 0.63 or 2.02 ± 0.85 , all $P < 0.001$), the expression of miRNA-99a-5p was significantly decreased (1.87 ± 0.61 vs 0.62 ± 0.15 or 0.80 ± 0.33 , $P < 0.001$), LC3- II/LC3- I increased significantly ($P < 0.05$), Beclin-1 expression increased significantly ($P <$

0.05), P62 expression decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of Bax, CL caspase3 and CL caspase7 decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 increased significantly ($P < 0.05$) and apoptosis rate significantly decreased ($P < 0.05$). After transfected with miRNA-196b-5p mimic or miRNA-99a-5p inhibitor, the LC3- II/LC3- I of CD138+ plasma cells increased significantly ($P < 0.05$), the expression of Beclin-1 increased significantly ($P < 0.05$), P62 expression decreased significantly ($P < 0.05$), and the apoptosis rate significantly decreased ($P < 0.05$). However, after autophagy inhibitor of 3-MA was administered, the apoptotic rate of the above reaction system did not change significantly ($P > 0.05$). The expression of miRNA-196b-5p and miRNA-99a-5p was significantly correlated with DS and ISS stage in multiple myeloma patients ($P < 0.05$). **Conclusion** miRNA-196b-5p and miRNA-99a-5p are closely related to the clinical characteristics of patients with multiple myeloma. The overexpression of miRNA-196b-5p and down regulation of miRNA-99a-5p could inhibit the apoptosis of myeloma cells by up regulation of autophagy, and the mechanism is related to the activation of the TGF- β /Smad signaling pathway.

【Key words】 Multiple myeloma; MicroRNAs; Autophagy; Apoptosis

Fund Program: Fujian Provincial Health and Family Planning Youth Key Talent Training Project (2016-ZQN-5)

近年研究发现miRNA与多种人类肿瘤的发生、发展关系密切,靶向抑制或过表达miRNA可抑制膀胱癌、乳腺癌和上皮癌细胞的体外增殖,促进其细胞凋亡^[1-4]。自噬过程与肿瘤细胞增殖、分化、转移等多种生物学功能关系密切^[5]。目前,有关多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)miRNA与自噬关系的研究较少。有研究者发现抑制或过表达miRNA在体外可诱导骨髓瘤细胞凋亡,但机制不明^[6-7]。MM自噬活性显著高于正常浆细胞^[8],MM细胞通过自噬降解细胞内未折叠和错误折叠的蛋白质,降低内质网应激,抑制凋亡^[9]。因此我们推测MM miRNA的表达与自噬及凋亡有关。miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p是我们在前期研究中,采用CD138⁺免疫磁珠分选富集MM患者浆细胞,然后利用miRNA微阵列芯片筛选出的表达异常的miRNA分子。在本研究中我们采用miRNA干扰技术,观察miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p对骨髓瘤细胞自噬和凋亡的影响,并探讨其分子机制。

病例与方法

1. 研究对象:纳入福建省立医院2015年1月至2018年3月收治的45例MM患者,男29例,女16例,中位年龄61岁。MM诊断和临床分期参照2017年中国专家共识标准^[10],排除入院之前接受过放、化疗或合并其他肿瘤患者。骨髓穿刺术抽取MM患者骨髓后通过流式细胞术分选骨髓瘤细胞(CD38⁺CD138⁺浆细胞),同时留存其详细临床资料。抽取40例健康体检者外周血作为正常对照。所有临床检验样本的采集均经受检者知情同意并获得医院伦理学委员会批准。人MM细胞株U266

细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2. 材料:胎牛血清、DMEM培养液及Opti-MEM培养液购自美国Gibco公司。Lipofectamine RNAiMAX及相关转染试剂购自美国Invitrogen公司。LC3- II、LC3- I、Beclin-1、Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3(CI caspase-3)、CI caspase-7、TGF- β 1、p-Smad3、Smad2/3、Smad7单克隆抗体购自美国Affinity Biosciences公司。Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自美国BD公司。miRNA-196b-5p mimic和miRNA-99a-5p inhibitor由广州吉赛生物科技股份有限公司提供。3-甲基腺嘌呤(3-MA)购自美国Santa Cruz公司。miRNA qRT-PCR检测试剂盒购自美国GeneCopoeia公司。采用美国ABI公司的ABI 7500仪器进行qRT-PCR检测。

3. 细胞培养、转染和实验分组:CD138⁺浆细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,培养条件为37℃恒温、5%CO₂。每2~3d换液,4~5d传代。取对数生长期的细胞消化后接种至6孔板,待细胞生长至60%~80%融合,更换为1%胎牛血清的培养液同步化12h后进行转染。实验分组:①空白对照组;②阴性对照组(未转染对照组);③转染miRNA-196b-5p mimic组;④转染miRNA-99a-5p inhibitor组;⑤转染miRNA-196b-5p mimic+3-MA组;⑥转染miRNA-99a-5p inhibitor+3-MA组。

转染方法如下:分别将5 μ l miRNA mimic(20 μ mol/L)或inhibitor(20 μ mol/L)溶解于200 μ l Opti-MEM培养液制成A液,取10 μ l Lipofectamine RNAiMAX溶解于200 μ l Opti-MEM培养基制成B液;A液和B液混合,静置20min后加至含1.6ml

Opti-MEM培养基的各组细胞中,培养6 h后更换为含10%胎牛血清的常规培养液继续培养48 h(加3-MA组则在培养24 h后加入3-MA,终浓度为5 mmol/L,继续培养24 h)。提取细胞RNA测定转染效率,并进行后续实验分析。

4. qRT-PCR法检测miRNA相对表达水平:按TRIzol一步法提取细胞中总RNA并测定其浓度。miRNA引物序列见表1,以U6为内参照。按照试剂盒说明书进行操作,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miRNA基因的相对表达水平。

5. Western blot法检测蛋白表达:提取各实验组细胞蛋白,常规蛋白定量后行SDS-PAGE。电泳后将蛋白转移至PVDF膜,用5%脱脂牛奶液室温封闭90 min,加入一抗4℃孵育过夜,TBST洗涤3次;再加入相对应的二抗室温孵育120 min,TBST洗涤3次,常规显影、冲洗胶片。采用Image-Pro Plus 6.0灰度扫描软件对结果进行半定量分析。

6. 流式细胞术检测细胞凋亡:收集各实验组细胞,PBS洗涤2次,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/ml$ 。取400 μl 细胞悬液,加入5 μl Annexin V-FITC混匀,室温避光孵育10 min,离心去上清,重悬细胞后加入PI,终浓度为1 $\mu g/ml$,避光作用后上FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司产品)检测细胞凋亡率。

7. 统计学处理:采用SPSS13.0软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组之间的比较采用t检验,多组间比较采用方差分析,各组均数间的两两比较用Bonferroni校正的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p在MM细胞中的表达:qRT-PCR结果显示,与正常浆细胞比较,U266细胞、MM患者瘤细胞(CD38⁺CD138⁺浆细胞)的miRNA-196b-5p表达显著增加(0.43 ± 0.15 对 2.44 ± 0.63 、 2.02 ± 0.85 , P 值均 < 0.001),miRNA-99a-5p表达显著降低(1.87 ± 0.61 对 0.62 ± 0.15 、 0.80 ± 0.33 , P 值均 < 0.001)。

2. miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p与MM患

者临床特征的相关性分析:45例MM患者的miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p表达水平详见表2。结果显示miRNA-196b-5p和miRNA-99a-5p表达与MM患者Durie-Salmon(DS)分期(P 值分别为0.004、0.012)、国际分期系统(ISS)分期显著相关(P 值均为0.001)。细胞遗传学分析显示,29例(64.4%)骨髓瘤患者检出染色体异常,依次为1q21扩增13例(28.9%),IgH重排12例(26.7%),RB1缺失10例(22.2%),D13S319缺失9例(20.0%),p53缺失8例(17.8%);同时2种染色体异常的患者9例(20.0%),同时3种以上染色体异常的患者8例(17.8%)。

3. MM细胞自噬和凋亡相关蛋白的表达:Western blot法检测结果显示,与正常对照组比较,U266细胞组、MM患者组的自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1表达显著增加,P62表达显著降低,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)(表3);凋亡相关蛋白Bcl-2表达显著增加,Bax、CL caspase3、CL caspase7表达显著降低,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)(表3)。

培养72 h后采用流式细胞术检测三组细胞的凋亡率,结果显示,正常对照组为(15.21 ± 3.51)%,U266细胞组为(4.21 ± 1.51)%,MM患者组为(4.55 ± 1.21)%,后两组细胞的凋亡率显著低于正常对照组(P 值分别为0.002、0.012)。

4. 转染miRNA-196b-5p mimic或miRNA-99a-5p inhibitor对浆细胞自噬和凋亡的影响:正常CD138⁺浆细胞分别转染miRNA-196b-5p mimic或miRNA-99a-5p inhibitor 48 h后,与未转染对照组比较,LC3-II/LC3-I、Beclin-1表达显著增高,CL caspase3表达降低,细胞凋亡率降低(P 值均 < 0.05);转染miRNA-196b-5p mimic或miRNA-99a-5p inhibitor组加入自噬抑制剂3-MA后,与未转染对照组相比,上述检测指标的差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)(表4、图1)。

5. 转染miRNA-196b-5p mimic或miRNA-99a-5p inhibitor对浆细胞TGF- β /Smad信号通路活化的影响:转染miRNA-196b-5p mimic或miRNA-99a-

表1 miRNA引物序列

名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
miRNA-196b-5p	GGTAGTTTCCTGTTGTTG	GAACATGTCTGCGTATCTC
miRNA-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATC	GAACATGTCTGCGTATCTC
U6(内参照)	CTCGTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT

表 2 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 的表达与多发性骨髓瘤患者临床特征的相关性分析

临床特征	例数	miRNA-196b-5p			miRNA-99a-5p		
		$\bar{x}\pm s$	t 值	P 值	$\bar{x}\pm s$	t 值	P 值
年龄			0.352	0.743		0.458	0.643
< 60 岁	20	2.11±0.58			0.91±0.22		
≥60 岁	25	2.03±0.61			0.85±0.25		
性别			0.686	0.507		0.712	0.462
男	31	2.07±0.58			0.75±0.25		
女	14	2.18±0.41			0.80±0.22		
HGB			3.476	0.001		6.169	0.001
< 100 g/L	33	2.11±0.42			0.56±0.14		
≥100 g/L	12	1.45±0.52			1.32±0.41		
肌酐			1.174	0.291		1.065	0.321
< 176.8 mmol/L	34	1.95±0.57			0.85±0.21		
≥176.8 mmol/L	11	2.14±0.65			0.80±0.27		
白蛋白			4.505	0.001		2.475	0.014
< 35 g/L	33	2.05±0.55			0.74±0.21		
≥35 g/L	12	1.41±0.37			1.23±0.29		
血清钙			1.572	0.147		1.251	0.219
< 2.75 mmol/L	24	1.89±0.66			0.82±0.18		
≥2.75 mmol/L	21	2.23±0.55			0.72±0.22		
β ₂ 微球蛋白			3.169	0.006		2.225	0.015
< 5.5 mg/L	30	1.71±0.52			0.92±0.22		
≥5.5 mg/L	15	2.35±0.58			0.75±0.23		
LDH			0.924	0.354		1.512	0.167
< 240 U/L	16	1.97±0.52			0.86±0.23		
≥240 U/L	29	2.13±0.49			0.76±0.25		
C 反应蛋白			0.606	0.512		0.786	0.398
< 8.2 mg/L	17	1.88±0.58			0.87±0.22		
≥8.2 mg/L	28	2.01±0.56			0.81±0.23		
DS 分期			3.280	0.004		3.037	0.012
I 期	4	1.54±0.31			1.56±0.32		
II 期	8	1.57±0.32			1.42±0.42		
III 期	33	1.89±0.66			0.57±0.25		
ISS 分期			3.528	0.001		4.276	0.001
I 期	10	1.49±0.45			1.01±0.35		
II 期	20	1.61±0.47			0.82±0.32		
III 期	15	2.54±0.61			0.47±0.21		

注:DS: Durie-Salmon 分期;ISS: 国际分期系统

表 3 自噬和凋亡相关蛋白在骨髓瘤细胞中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	自噬相关蛋白			凋亡相关蛋白			
		Beclin-1	P62	LC3- II / LC3- I	Bcl-2	Bax	CL caspase3	CL caspase7
正常对照组	40	0.35±0.04	1.38±0.24	1.02±0.06	0.52±0.05	0.73±0.09	0.85±0.11	0.75±0.13
U266 细胞组	5	0.81±0.11 ^a	0.52±0.13 ^a	2.23±0.31 ^a	1.42±0.21 ^a	0.31±0.03 ^a	0.25±0.04 ^a	0.34±0.07 ^a
MM 患者组	45	0.75±0.13 ^a	0.45±0.08 ^a	2.53±0.51 ^a	2.32±0.52 ^a	0.32±0.07 ^a	0.23±0.03 ^a	0.32±0.05 ^a

注:MM: 多发性骨髓瘤;^a与正常对照组比较, P < 0.05

表 4 转染 miRN-196b-5P mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 对浆细胞自噬和凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

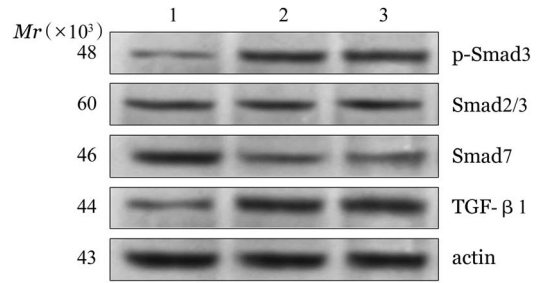
分组	LC3- II / LC3- I	Beclin-1	CL caspase3	细胞凋亡率(%)
未转染对照组	1.02±0.06	0.35±0.04	0.85±0.11	18.21±2.51
miRNA-196b-5p mimic	2.27±0.31 ^a	0.75±0.13 ^a	0.37±0.09 ^a	5.21±0.84 ^a
miRNA-99a-5p inhibitor	2.03±0.34 ^a	0.85±0.18 ^a	0.40±0.12 ^a	6.16±0.65 ^a
miRNA-196b-5p mimic +3-MA	1.06±0.13	0.42±0.07	0.85±0.27	13.49±2.66
miRNA-99a-5p inhibitor +3-MA	1.07±0.13	0.47±0.09	0.81±0.13	16.01±2.45

注:^a与对照组比较, P < 0.05。每组设 3 个复孔, 实验重复 5 次

5p inhibitor后,Western blot法检测结果显示,与未转染对照组比较,转染 miRNA-196b-5p mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor组的 TGF-β1 和 p-Smad3 蛋白表达上调,Smad7 蛋白表达下调(*P*值均 < 0.05) (表5、图2)。

讨 论

自噬是正常细胞的一种防御机制,细胞通过隔离膜包裹胞质中的蛋白或细胞器,形成封闭、双层的膜性结构,即自噬体。自噬体经过一系列步骤后成熟,通过与内体小泡融合,递送至溶酶体并降解^[11]。自噬对肿瘤细胞凋亡是一把“双刃剑”,一方面,低水平的自噬可以清除异常的蛋白质和受损的细胞器,抑制肿瘤细胞凋亡;另一方面,高强度的自噬必然瓦解细胞结构,导致肿瘤细胞不可逆的功能丧失乃至凋亡^[12]。本研究结果显示,相对于正常浆细胞,骨髓瘤细胞自噬活性明显增强,凋亡减弱,提示自噬对骨髓瘤细胞存活有保护作用。研究表明,MM 恶性增殖的过程中,细胞内产生大量免疫球蛋白,引起内质网应激,骨髓瘤细胞自噬活性增强,增强处理错误折叠蛋白质的能力,并提供增殖需要的大量能量,有利于维持骨髓瘤细胞生存^[13]。Pan 等^[14]研究发现,DNA 损伤药物多柔比星和美法仑 caspase 依赖性诱导骨髓瘤细胞凋亡,骨髓瘤自噬活性增加,使用自噬抑制剂 3-MA 显著增加多柔比星和美法仑诱导的骨髓瘤细胞凋亡。



1: 未转染对照; 2: 转染 miRN-196b-5P mimic; 3: 转染 miRNA-99a-5p inhibitor

图2 Western blot法检测转染 miRN-196b-5P mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 对浆细胞 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达的影响

miRNA 是一类长约 18~22 个核苷酸的小分子单链非编码 RNA,通过破坏靶 mRNA 的稳定性或者抑制其翻译的方式调控基因的表达,近年研究发现,miRNA 作为转录调控分子,参与多种肿瘤的发生与发展^[15]。本研究通过阳离子脂质体转染 miRNA-196b-5p mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor,上调 miRNA-196b-5p 表达或下调 miRNA-99a-5p 表达,发现正常 CD138⁺浆细胞的自噬活性增强,伴凋亡减少,提示 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 可能通过调节自噬活性,影响骨髓瘤细胞凋亡。为了证实这个猜测,我们进一步在反应体系中加入自噬抑制剂 3-MA,结果显示 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 对浆细胞凋亡的影响被抑制,证实 miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 通过调节自噬活性,影响骨髓瘤细胞凋亡,使其获得生存优势。本研究结果

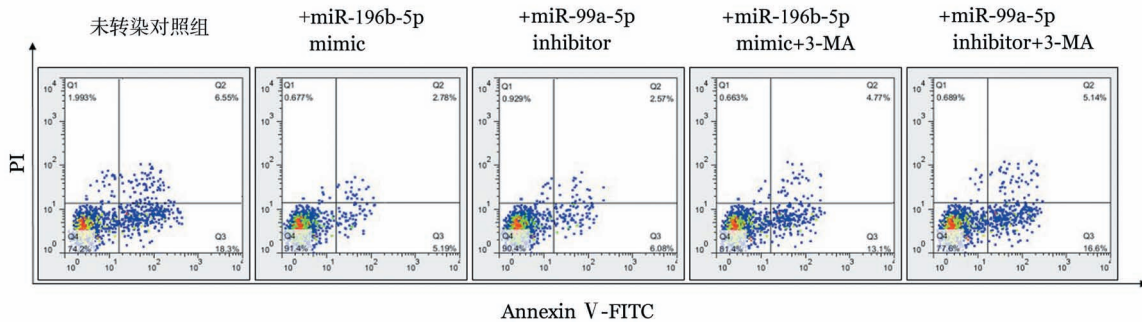


图1 流式细胞术检测转染 miRN-196b-5P mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 对浆细胞凋亡率的影响

表5 转染 miRN-196b-5P mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 对浆细胞 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	Smad7	Smad2/3	p-Smad3
未转染对照组	0.42±0.08	1.35±0.24	1.15±0.17	0.35±0.07
miRNA-196b-5p mimic	1.37±0.31 ^a	0.65±0.14 ^a	1.02±0.13 ^a	0.80±0.29 ^a
miRNA-99a-5p inhibitor	1.44±0.34 ^a	0.43±0.17 ^a	1.07±0.12 ^a	0.87±0.22 ^a

注:^a与对照组比较,*P* < 0.05。每组设3个复孔,实验重复5次

提示用外源性 miRNA 靶向抑制骨髓瘤细胞自噬, 促进凋亡, 可能成为 MM 的治疗新策略。另一方面, 用外源性 miRNA 靶向诱导骨髓瘤细胞过度自噬, 通过溶酶体降解细胞内重要细胞质, 细胞器和蛋白等成分, 导致细胞不可逆损伤而凋亡^[16-17], 也是治疗 MM 的一个全新思路。

有研究者发现, 60% ~ 90% 的 MM 患者存在分子细胞遗传学异常, 常见类型有 1q21 扩增、13q14 缺失、p53 缺失、IGH 重排等, 与 MM 患者的疗效及预后密切相关^[18]。我们分析了 miRNA 的前体 (pre-miRNA) 的染色体定位, miRNA-196b-5p 前体位于 7 号染色体 p15.2, miRNA-99a-5p 前体位于 21 号染色体 q21.1, 提示 miRNA 表达异常可能与 MM 的染色体脆性位点有关^[19-20]。MM 目前常用的预后评估系统是 DS 分期和 ISS 分期, 可以反映 MM 患者的肿瘤负荷与预后。我们的研究结果显示, miRNA-196b-5p 和 miRNA-99a-5p 在不同 DS 分期和 ISS 分期组中均有显著差异。Zhou 等^[21]对 52 例新诊断 MM 患者进行全基因组微阵列分析, 发现 MM 存在显著的 miRNA 表达异常, 并与细胞遗传学高危有关, 结论与本研究相仿, 均提示 miRNA 可以反映 MM 患者的肿瘤负荷与预后。miRNA 易于检测, 在唾液、尿液中均可检测到表达, 与在血液中的表达有良好的相关性^[22], 因此, miRNA 分子可能成为 MM 诊断和预后评估的一种无创性检测方法, 具有良好的临床应用前景。

TGF- β /Smad 信号通路是调控自噬活性的重要信号通路之一^[23]。通过 Western blot 法检测, 我们发现转染 miRNA-196b-5p mimic 或 miRNA-99a-5p inhibitor 后, TGF- β 1 和 p-Smad3 蛋白表达上调, 而抑制蛋白 Smad7 表达下调, 提示 TGF- β /Smad 信号通路被活化, 证实 miRNA-196b-5p mimic 和 miRNA-99a-5p inhibitor 通过 TGF- β /Smad 通路调节骨髓瘤细胞自噬活性。此外, Wen 等^[24]发现 miR-196-5p 在 高危骨髓增生异常综合征 (MDS) 中高表达, 过表达 miR-196-5p 后, 细胞增殖上调, 凋亡率下降, miR-196-5p 表达上调还与 MDS 患者的白血病转化风险密切相关。Huang 等^[25]发现, miR-99a 通过靶向 mTOR/P4E-BP1/p6S6K1 通路抑制人甲状腺癌细胞增殖。以上研究均提示 miR-196b 与 miR-99a 分别具有癌基因和抑癌基因特征, 与本研究结果相仿。

本研究的一个局限是未观察 MM miRNA 表达与克隆演变及临床疗效的关系, MM miRNA 与自噬之间依生物学背景而变化的调控机制还有待进一

步研究阐明。总之, 本研究通过临床观察和体外细胞实验证明了 miRNA-196b-5p 增强 MM 细胞自噬, 抑制凋亡, 具有癌基因的特征; 而 miRNA-99a-5p 的作用恰好相反, 具有抑癌基因特征, 其机制可能与 TGF- β /Smad 通路活化有关。本研究结果为靶向 miRNA 治疗 MM 提供新的治疗靶点和体外实验依据。

参考文献

- [1] Ji W, Sun B, Su C. Targeting microRNAs in cancer gene therapy [J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(1) DOI: 10.3390/genes8010021.
- [2] Blick C, Ramachandran A, McCormick R, et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(4): 634-644. DOI: 10.1038/bjc.2015.203.
- [3] Xia W, Zhou J, Luo H, et al. MicroRNA-32 promotes cell proliferation, migration and suppresses apoptosis in breast cancer cells by targeting FBXW7 [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 14. DOI: 10.1186/s12935-017-0383-0.
- [4] Alanazi I, Hoffmann P, Adelson DL. MicroRNAs are part of the regulatory network that controls EGF induced apoptosis, including elements of the JAK/STAT pathway, in A431 cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0120337. DOI: 10.1371/journal.pone.0120337.
- [5] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 726-734. DOI: 10.1038/nrc1692.
- [6] 张怡堃, 王华, 杨萍, 等. 携带 miR29c 重组腺病毒的制备及其促骨髓瘤细胞凋亡作用 [J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(1): 20-25. DOI: 10.3969/cmba.j.issn.1673-713X.2012.01.006.
- [7] Zhang Q, Yan W, Bai Y, et al. Synthetic miR-145 mimic inhibits multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1): 448-456. DOI: 10.3892/or.2014.3591.
- [8] Yang LJ, Chen Y, He J, et al. Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(12): 1542-1548. DOI: 10.1038/aps.2012.102.
- [9] Fu YF, Liu X, Gao M, et al. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy and apoptosis while inhibiting proliferation and drug resistance in multiple myeloma through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 61093-61106. DOI: 10.18632/oncotarget.17862.
- [10] 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学分会, 中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南 (2017 年修订) [J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(11): 866-870. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2017.11.021.
- [11] Vernon PJ, Tang D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(6): 677-691. DOI: 10.1089/ars.2012.4810.
- [12] Oral O, Akkoc Y, Bayraktar O, et al. Physiological and pathological significance of the molecular cross-talk between autophagy

- and apoptosis [J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31 (5): 479-498. DOI: 10.14670/HH-11-714.
- [13] Hoang B, Benavides A, Shi Y, et al. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8 (7): 1974-1984. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1177.
- [14] Pan Y, Gao Y, Chen L, et al. Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (10): 3248-3258. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0890.
- [15] Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(6): 1283-1290. DOI: 10.1002/ijc.25014.
- [16] Zismanov V, Lishner M, Tartakover-Matalon S, et al. Tetraspanin-induced death of myeloma cell lines is autophagic and involves increased UPR signaling [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(8): 1402-1409. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605291.
- [17] Grandér D, Kharaziha P, Laane E, et al. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies [J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1198-1200.
- [18] Hu Y, Chen W, Chen S, et al. Cytogenetic abnormality in patients with multiple myeloma analyzed by fluorescent in situ hybridization [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 1145-1149. DOI: 10.2147/OTT.S95818.
- [19] Handa H, Sasaki Y, Hattori H, et al. Recurrent alterations of the WW domain containing oxidoreductase gene spanning the common fragile site FRA16D in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14 (4): 4372-4378. DOI: 10.3892/ol.2017.6672.
- [20] Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 114 (25): e20-26. DOI: 10.1182/blood-2009-08-237495.
- [21] Zhou Y, Chen L, Barlogie B, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(17): 7904-7909. DOI: 10.1073/pnas.0908441107.
- [22] Debernardi S, Massat NJ, Radon TP, et al. Noninvasive urinary miRNA biomarkers for early detection of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(11): 3455-3466.
- [23] Liu FL, Mo EP, Yang L, et al. Autophagy is involved in TGF- β 1-induced protective mechanisms and formation of cancer-associated fibroblasts phenotype in tumor microenvironment [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (4): 4122-4141. DOI: 10.18632/oncotarget.6702.
- [24] Wen J, Huang Y, Li H, et al. Over-expression of miR-196b-5p is significantly associated with the progression of myelodysplastic syndrome [J]. *Int J Hematol*, 2017, 105 (6): 777-783. DOI: 10.1007/s12185-017-2201-9.
- [25] Huang HG, Luo X, Wu S, et al. MiR-99a inhibits cell proliferation and tumorigenesis through targeting mTOR in human anaplastic thyroid cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(12): 4937-4944.

(收稿日期:2018-05-25)

(本文编辑:刘志红)

·读者·作者·编者·

本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MESH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。冠以外国人名人的体征、疾病、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“'s”。

文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。

本刊编辑部