

长链非编码RNA AC002454.1 对NB4细胞生物学功能的影响

曹岚¹ 胡绍燕¹ 潘健² 王易¹ 何海龙¹ 卢俊¹ 肖佩芳¹ 杜智卓¹
古桂雄² 柴忆欢¹

¹苏州大学附属儿童医院血液肿瘤科 215025; ²苏州大学附属儿童医院儿科研究所
215025

通信作者:柴忆欢, Email: cyh_1949@aliyun.com

基金项目:江苏省青年医学人才项目(QNRC2016760);江苏省社会发展项目
(BE2017659)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.014

The effects of long non-coding RNA AC002454.1 on the biological behaviour of NB4 leukemia cells

Cao Lan¹, Hu Shaoyan¹, Pan Jian², Wang Yi¹, He Hailong¹, Lu Jun¹, Xiao Peifang¹, Du Zhizhuo¹,
Gu Guixiong², Chai Yihuan¹

¹Hematology-Oncology Department, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025, China;

²Institute of Pediatrics, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025, China

Corresponding author: Chai Yihuan, Email: cyh_1949@aliyun.com

虽然已陆续发现一些与癌症发生发展相关的功能性长链非编码RNA(lncRNA),但人们对lncRNA功能和机制的研究尚处于起步阶段,目前已知确切功能的lncRNA数量极少。lncRNA与多种血液系统疾病相关,然而其在白血病发病中的作用尚不清楚。我们前期实验揭示了急性白血病(AL)患儿lncRNA与正常儿童存在明显差异^[1],本研究选取差异最显著的AC002454.1,探讨AC002454.1在儿童AL中的表达及其对NB4白血病细胞生物学功能的影响。

对象与方法

一、研究对象

选取经细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学(MICM)分型诊断的初诊AL患儿43例,其中急性淋巴细胞白血病(ALL)21例、急性髓系白血病(AML)22例;中位年龄5.85(1.3岁~13.0)岁,男31例、女12例。骨髓象正常的21例非恶性血液病患儿作对照组,中位年龄7.1(0.7~15.0)岁,男9例、女12例。收集骨髓标本用于lncRNA芯片扫描及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测,并对在儿童AL中显著异常表达的lncRNA进行验证。标本采集经医院伦理委员会批准及患者知情同意。

二、细胞株和培养

白血病细胞株NB4购于美国模式培养物集存库(ATCC)。培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,采用37℃、含5% CO₂的恒温无菌培养箱培养。

三、主要试剂

基因芯片表达配套试剂盒购自美国Agilent公司;

SuperRT cDNA第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;SYBR Green mix购自瑞士Roche公司;Cell Counting Kit-8试剂盒购自上海华雅思创生物科技有限公司;溴化乙锭(PI)、Triton X-100购自上海生工生物工程技术服务有限公司;RNase A购自美国Thermo Scientific公司;PE Annexin V Apoptosis Detection Kit 1购自美国BD公司;RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司;TRIzol、SDS、聚丙烯酰胺、蛋白Marker购自美国Invitrogen公司;PVDF膜、化学发光试剂盒购自美国Millipore公司;鼠抗人GAPDH抗体、鼠抗人CDK6抗体、鼠二抗购自美国Cell Signaling Technology公司。

四、实验方法

1. lncRNA芯片扫描和数据分析:将骨髓单个核细胞标本加入1 ml TRIzol,干冰运输至上海康成生物工程有限公司进行,经过Microarray基因芯片扫描仪扫描后得到原始数据,原始数据经过统计软件转换后进行统计分析,经过图像采集和数据分析后得到lncRNA数据,设定差异表达的标准:差异改变倍数 ≥ 2.0 , $P < 0.05$,根据此标准筛选得到AL患儿与对照组之间lncRNA的差异表达谱。

2. qRT-PCR:利用实时荧光定量PCR仪(LightCycler 480® II,瑞士Roche公司产品)检测lncRNA相对表达量,由Invitrogen公司合成引物。定量PCR扩增反应体系20 μ l,含0.2 mmol/L引物各0.1 μ l,10 μ l SYBR Green mix;反应条件:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸60 s,共进行45个循环,后95℃10 s,65℃60 s,4℃ ∞ 。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,以 $10^4 \times 2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算

每个基因的相对表达量。

3. 细胞株的收获与冻存:待 NB4 细胞处于对数生长期,细胞密度达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 时收获细胞。1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,保留细胞沉淀,每管中各加入 1 ml 冻存液,混匀,编号后放入 -80°C 冰箱保存。

4. RNA 的提取和 cDNA 合成:采用 TRIzol 提取细胞的总 RNA 后,采用分光光度计测定 RNA 浓度,通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 纯度。将所得的 RNA 利用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒 $10 \mu\text{l}$ 体系逆转录 cDNA。

5. AC002454.1 沉默病毒的设计、合成及细胞转染:AC002454.1 沉默病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。根据试剂盒说明书操作。实验分为 3 组:实验组为 NB4 细胞转染时加入 AC002454.1 沉默病毒;阴性对照组为 NB4 细胞转染时加入阴性对照病毒;空白对照组为未进行任何干预的 NB4 细胞。并利用流式细胞仪检测转染效率。

6. CCK-8 法检测细胞增殖:收集空白对照组、阴性对照组及实验组对数生长期细胞 ($5 \times 10^4/\text{ml}$) 分别接种于 4 块 96 孔板中,空白对照组、阴性对照组、实验组及培养基对照组各设 5 个平行孔,培养 24、48、72、96 h 检测细胞增殖情况,按照 CCK-8 试剂盒操作说明,检测前每孔各加入 $20 \mu\text{l}$ CCK-8 试剂,后于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱孵育 2 h,于酶标仪检测,在 450 nm 波长处读取相应的吸光度 (A) 值。

7. 细胞周期检测:取对数生长期细胞,制备单细胞悬液;PBS 洗涤 2 次,离心后弃上清液;加入预冷的 75% 乙醇固定,吹打均匀, 4°C 固定过夜;检测前离心,PBS 洗涤 2 次;加入 $500 \mu\text{l}$ PBS (含 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ PI)、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A、0.2% Triton X-100, 4°C 避光孵育 30 min;流式细胞术检测各周期 DNA 含量。实验重复 3 次。

8. 细胞凋亡检测:制备单细胞悬液,调整细胞密度,以每孔 2×10^5 细胞接种于 6 孔板,培养 48 h, PBS 洗涤 2 次,离心收集并重悬计数,保证每个待检样本细胞量为 $(5 \sim 10) \times 10^5$ 个;离心收集细胞后,加入 $100 \mu\text{l}$ 1×结合缓冲液,吹匀;加入 $5 \mu\text{l}$ 7-ADD 及 $5 \mu\text{l}$ PE, 25°C 避光放置,流式细胞术检测分析;结果判定:左下象限显示活细胞;其余象限为凋亡细胞。

9. Western blot 法测定蛋白表达:收集各组细胞采用 RIPA 裂解液裂解后提取蛋白,应用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取 $20 \mu\text{g}$ 总蛋白行 SDS-PAGE,然后转移至聚偏二氟乙烯膜,膜封闭后加入一抗孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗稀释液封闭 1 h,洗涤后用增强的化学发光试剂盒显影,利用 Amersham Imager 600 显像系统扫描条带。

五、统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理,同时采用 GraphPad Prism 5 软件进行绘图。结果以均数±标准差表示,两样本均数的比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 筛选并验证儿童 AL 异常表达的 lncRNA:从前期研究基因芯片数据中选取了 97 个异常表达的 lncRNA,对 21 个儿

童 ALL 样本、22 个儿童 AML 样本和 21 个对照样本进行 qRT-PCR 验证并比较。结果显示:和对照样本比较,儿童 ALL 组 16 个 lncRNA 表达差异显著 (P 值均 < 0.05),其中 9 个上调 (uc002ehu.1、AC002454.1、uc001guz.2、BC035649、uc001kpt.2、AK123765、NR_026776、NR_027182、ENST00000508489), 7 个下调 (ENST00000415964、uc010arh.1、ENST00000457799、ENST00000511213、NR_002712、X61079、ENST00000417930); 儿童 AML 组 24 个 lncRNA 表达差异显著 (P 值均 < 0.05),其中 12 个上调 (AC002454.1、uc002ehu.1、ENST00000509150、uc001guz.2、ENST00000457457、uc001kpt.2、NR_027182、AK123765、BC031319、AK124936、uc003hhv.1、NR_026776), 12 个下调 (AK027193、AK024584、BC005232、AK094982、uc003ebe.1、ENST00000512129、AF088004、uc002vje.1、uc010arh.1、ENST00000428188、ENST00000457799、ENST00000415964)。AC002454.1 表达差异最显著 ($P = 0.040$, $P = 0.002$),尤其在 AML 组表达明显升高 (图 1)。

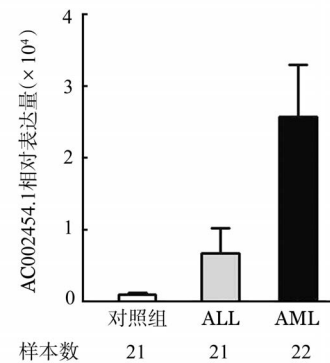


图 1 AC002454.1 在对照组、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 组和急性髓系白血病 (AML) 组的表达

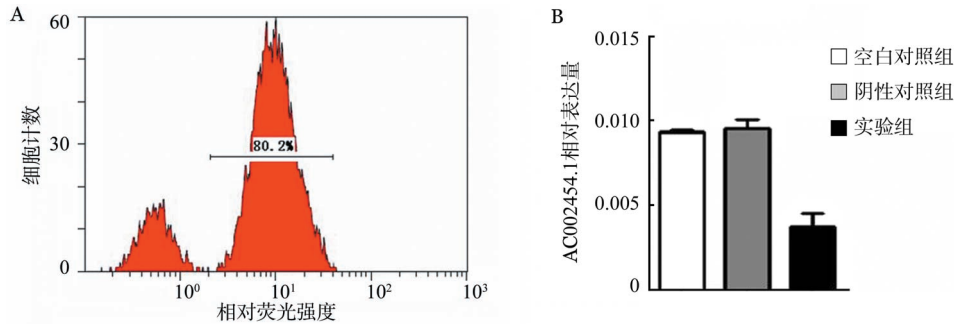
2. AC002454.1 沉默病毒的构建及转染效率:构建沉默 AC002454.1 的慢病毒载体并转染至 NB4 细胞中。多次行转染实验,当转染条件被优化到转染效率 $> 50\%$ 时,行下一步实验的检测 (图 2)。

3. AC002454.1 对 NB4 细胞增殖的影响:用沉默 AC002454.1 的慢病毒载体转染 NB4 细胞,采用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒分析其对细胞增殖的影响,结果显示 48、72、96 h 实验组均出现细胞增殖抑制 (P 值均 < 0.01) (图 3)。

4. AC002454.1 对 NB4 细胞周期的影响:流式细胞术检测结果显示,下调 AC002454.1 表达后 G₂/M 期 NB4 细胞比例显著增加 ($P < 0.01$) (图 4)。

5. AC002454.1 对 NB4 细胞凋亡的影响:流式细胞术结果显示,空白对照组、阴性对照组、实验组的凋亡率分别为 $(0.80 \pm 0.53)\%$ 、 $(0.80 \pm 0.44)\%$ 和 $(4.53 \pm 0.90)\%$, 下调 AC002454.1 表达后 NB4 细胞凋亡率增加 ($P = 0.003$)。

6. AC002454.1 对 CDK6 蛋白表达的影响:采用 Western blot 方法检测转染后的 NB4 细胞 CDK6 表达。结果显示,下调 AC002454.1 表达后 NB4 细胞的 CDK6 蛋白表达下降 (图 5)。



A: 流式细胞术显示NB4转染组的效率为80.2%; B: 实时荧光定量PCR实验显示沉默AC002454.1基因的慢病毒载体可以下调NB4细胞的AC002454.1的表达

图2 AC002454.1 沉默病毒对NB4细胞的转染效率

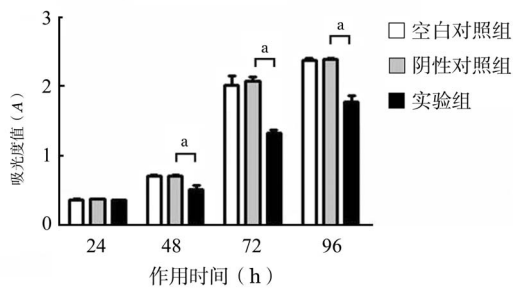


图3 下调AC002454.1表达对NB4细胞增殖的影响(实验重复3次。与阴性对照组比较, *P < 0.01)

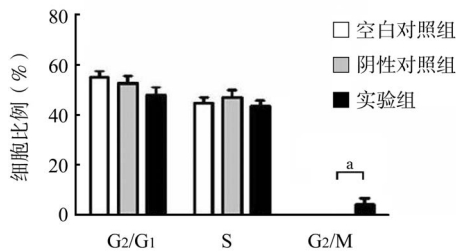
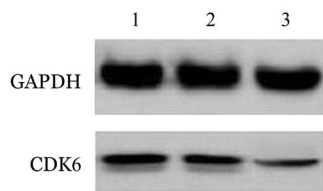


图4 下调AC002454.1表达对NB4细胞周期的影响(实验重复3次。与阴性对照组比较, *P < 0.01)



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组

图5 Western blot法检测下调AC002454.1表达后NB4细胞CDK6蛋白的表达

讨论

目前研究提示lncRNA的功能异常与人类多种肿瘤密切相关,如MALAT1是最早发现与肿瘤相关的lncRNA之一,在肺癌、膀胱癌、乳腺癌等多种肿瘤中发现MALAT1水平上调,提示MALAT1可促进肿瘤细胞增殖导致肿瘤发生^[2]。MEG3被发现具有肿瘤抑制功能,在多种正常组织尤其是脑组

织中呈现高表达,但在肺癌、肝细胞癌、脑膜瘤等肿瘤表达下降^[3]。lncRNA在白血病发生、发展过程中的作用也有较多探索。Hirano等^[4]发现,CCDC26通过调节KIT表达来控制髓样白血病细胞的生长,KIT抑制剂可能是对CCDC26有改变的AML患者有效的治疗药物。Trimarchi等^[5]发现,LUNAR1能够调控IGF1R基因的表达、IGF1信号转导和T-ALL的生长,表明LUNAR1可以作为T-ALL的生物标志物和治疗靶点。Guo等^[6]发现BGL3可以作为竞争性内源RNA结合miR-17、miR-93、miR-20a、miR-20b、miR-106a和miR-106b来交叉调节PTEN表达,同时BCR-ABL通过c-Myc依赖性DNA甲基化抑制BGL3表达,揭示了BCR-ABL介导的细胞转化关键需要肿瘤抑制因子BGL3的沉默,并且提出了用于治疗BCR-ABL阳性白血病的潜在策略。以上研究提示,lncRNA在白血病的发生、发展中发挥重要作用,可作为白血病诊断的标志物,也是白血病治疗的潜在药物靶点。本研究从基因芯片数据中选取了97个异常表达的lncRNA,对21个儿童ALL样本、22个儿童AML样本和21个对照样本进行qRT-PCR验证并比较,结果发现AC002454.1表达差异最显著。对于AC002454.1目前少有研究,仅有研究提示AC002454.1可能参与子宫内膜异位症的发病机制^[7]。本研究显示AC002454.1在AL患儿的表达显著高于对照组,尤其在AML表达更为显著,提示AC002454.1可能作为癌基因参与儿童AL的发生和发展。

本研究用沉默AC002454.1的慢病毒载体转染白血病细胞株NB4,分析AC002454.1对NB4细胞增殖和细胞周期的影响,结果显示沉默AC002454.1表达后NB4细胞增殖受到明显抑制,G₂/M期显著延长。研究表明G₂/M期阻滞的细胞非常易于凋亡,其增殖能力明显降低^[8],提示AC002454.1对NB4细胞的增殖起促进作用并可抑制其凋亡。

本研究前期对基因芯片生物信息经Pathway与GO分析均提示,儿童AL中显著上调的lncRNA在细胞周期中可能具有重要功能,我们查阅(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)网站,AC002454.1位于人类染色体7:92836483-92917187,正靠近CDK6(位于人类染色体7:92604921-92836627)。

CDK6是细胞周期素依赖激酶(Cyclin-Dependent Kinases, CDK)的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族中的一员,

CDK 主要负责哺乳动物细胞的增殖,参与细胞周期进展和细胞分化^[9]。研究表明 CDK6 可以通过结合 EYA2 蛋白并促进其降解,直接调控细胞周期,并在某些类型的细胞增殖和分化中起着重要的作用^[10]。业已证实,在人体的很多肿瘤中 CDK6、E2F-1 表达均呈组蛋白修饰长链非编码 RNA 出现异常,其与肿瘤的发生发展有密切联系。高表达的 CDK6 可以促进白血病细胞的增殖及阻碍细胞分化,从而导致了白血病的发生,CDK6 还是 MLL-AF4 融合蛋白的直接靶点,促进 MLL 基因重排的白血病细胞增殖,是 MLL 基因重排的白血病发生和进展的重要因素^[11-13]。现有研究发现,CDK4/6 抑制剂可通过抑制 Rb 磷酸化而抑制人类表皮生长因子受体 2 阳性乳腺癌细胞增殖^[14]。在造血系统疾病方面,CDK4/6 抑制剂 Pd0332991 通过阻滞细胞于 G₁ 期来抑制 Ph⁺ ALL 细胞株的增殖^[15]。

为探讨 AC002454.1 与 CDK6 间的相关性,本实验采用 Western blot 方法检测转染后 NB4 细胞的 CDK6 表达。结果显示:下调 AC002454.1 表达后 NB4 细胞的 CDK6 表达明显低于空白对照组及阴性对照组,提示下调 AC002454.1 能降低 NB4 细胞 CDK6 表达,有望作为治疗白血病的靶标之一。

综上所述,AC002454.1 在 AL 儿童表达明显高于正常儿童,说明 AC002454.1 可能参与儿童白血病的发生和发展。AC002454.1 有促进 NB4 细胞增殖和抑制其凋亡、并使其 G₂/M 期缩短影响细胞周期的功能。下调 AC002454.1 表达后 NB4 细胞的 CDK6 表达明显降低,提示 AC002454.1 可能通过增强 CDK6 表达促进白血病细胞的增殖,然而 AC002454.1 与 CDK6 相互作用机制尚不清楚,将在我们今后的研究中进一步探讨。

参考文献

- [1] Cao L, Xiao PF, Tao YF, et al. Microarray profiling of bone marrow long non-coding RNA expression in Chinese pediatric acute myeloid leukemia patients [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35 (2): 757-770. DOI: 10.3892/or.2015.4415.
- [2] Zhang X, Hamblin MH, Yin KJ. The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions [J]. *RNA Biol*, 2017, 14 (12):1705-1714. DOI: 10.1080/15476286.2017.1358347.
- [3] He Y, Luo Y, Liang B, et al. Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (42): 73282-73295. DOI: 10.18632/oncotarget.19931.
- [4] Hirano T, Yoshikawa R, Harada H, et al. Long noncoding RNA, CCDC26, controls myeloid leukemia cell growth through regulation of KIT expression [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:90. DOI: 10.1186/s12943-015-0364-7.
- [5] Trimarchi T, Bilal E, Ntziachristos P, et al. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia [J]. *Cell*, 2014, 158 (3):593-606. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.049.
- [6] Guo G, Kang Q, Zhu X, et al. A long noncoding RNA critically regulates Bcr-Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (14): 1768-1779. DOI: 10.1038/ncr.2014.131.
- [7] Wang Y, Li Y, Yang Z, et al. Genome-Wide Microarray Analysis of Long Non-Coding RNAs in Eutopic Secretory Endometrium with Endometriosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37 (6): 2231-2245. DOI: 10.1159/000438579.
- [8] Wang H, Zhang X, Teng L, et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334 (2): 350-358. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.03.011.
- [9] Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation [J]. *Development*, 2013, 140 (15):3079-3093. DOI: 10.1242/dev.091744.
- [10] Giessrigl B, Schmidt WM, Kalipciyan M, et al. Fulvestrant induces resistance by modulating GPER and CDK6 expression: implication of methyltransferases, deacetylases and the hSWI/SNF chromatin remodelling complex [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109 (10):2751-2762. DOI: 10.1038/bjc.2013.583.
- [11] Kollmann K, Heller G, Ott RG, et al. c-JUN promotes BCR-ABL-induced lymphoid leukemia by inhibiting methylation of the 5' region of Cdk6 [J]. *Blood*, 2011, 117 (15):4065-4075. DOI: 10.1182/blood-2010-07-299644.
- [12] van der Linden MH, Willekes M, van Roon E, et al. MLL fusion-driven activation of CDK6 potentiates proliferation in MLL-rearranged infant ALL [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13 (5):834-844. DOI: 10.4161/cc.27757.
- [13] Placke T, Faber K, Nonami A, et al. Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2014, 124 (1):13-23. DOI: 10.1182/blood-2014-02-558114.
- [14] Corona SP, Ravelli A, Cretella D, et al. CDK4/6 inhibitors in HER2-positive breast cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 112:208-214. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.02.022.
- [15] Nemoto A, Saida S, Kato I, et al. Specific Antileukemic Activity of PD0332991, a CDK4/6 Inhibitor, against Philadelphia Chromosome-Positive Lymphoid Leukemia [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15 (1):94-105. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1065.

(收稿日期:2019-03-29)

(本文编辑:王叶青)