

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.001

文章编号: 1005-8982(2018)12-0001-11

基础研究·论著

大黄素甲醚对白血病耐药细胞系 K562/ADM 耐药性的影响及机制研究*

杨璇, 高菲, 刘文君

(西南医科大学附属医院 儿科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 评价大黄素甲醚对慢性粒细胞白血病(CML)耐药细胞系 K562/ADM 多药耐药的逆转作用及其机制。**方法** CCK-8、克隆形成实验检测细胞的增殖变化, 流式细胞仪、Hoechst 染色检测细胞的凋亡, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)、Western blot 检测各相关基因的表达, 迁移实验检测细胞的侵袭能力。**结果** 大黄素甲醚能增强 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性, 耐药逆转倍数在 2 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下分别为 2.03 和 5.30 倍。miRNA-146a 在 K562 耐药细胞系中低于 K562 细胞, 而其在 K562/ADM 细胞中过表达能恢复细胞对 ADM 的敏感性。大黄素甲醚可以通过诱导 miRNA-146a 的表达抑制 CXCL12/CXCR4 信号通路从而能增强 ADM 抗肿瘤细胞增殖的作用。**结论** 大黄素甲醚可以通过上调 miRNA-146a 的表达抑制 CXCL12/CXCR4 信号从而逆转 K562/ADM 细胞对 ADM 的耐药性。

关键词: 大黄素甲醚; miRNA-146a; CXCR4; 白血病耐药

中图分类号: R725.5

文献标识码: A

Reverse effect of Physcion on multi-drug resistance of leukemic drug-resistant cell line K562/ADM*

Xuan Yang, Fei Gao, Wen-jun Liu

(Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the reverse effect of Physcion on multi-drug resistance of chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562 / ADM. **Methods** CCK8 and clone formation assay were used to detect cellular proliferation. Flow cytometry and Hoechst 33258 were performed to determine apoptosis. Expression of related genes was measured by qRT-PCR and Western blot. Migration assay was identified by cell invasiveness assay. **Results** Physcion increased the sensitivity of K562 / ADM cells to ADM significantly. Fold change of sensitivity induced by Physcion was 2.03 fold and 5.3 fold at concentration of 2 and 5 $\mu\text{mol/L}$, respectively. miRNA-146a in K562 / ADM cells decreased significantly when compared with K562 cells, and overexpression of miRNA-146a increased the sensitivity to ADM. Physcion-induced upregulated expression of miRNA-146a facilitated inhibition of CXCL12 / CXCR4 signaling pathway. **Conclusions** Physcion reverses the multi-drug resistance of K562/ADM cells through modulating miRNA-146a mediated CXCL12 / CXCR4 signaling pathway.

Keywords: Physcion; miRNA-146a; CXCR4; leukemia resistance

收稿日期: 2017-02-10

* 基金项目: 四川省基础研究项目 (No.: 14JC0193-LH-35)

[通信作者] 刘文君, E-mail: lwjlyfy@qq.com; Tel: 13980259012

[作者简介] 杨璇, 现在四川省自贡市第三人民医院工作

慢性粒细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是造血干细胞的恶性转化, 其发病率为 1 ~ 2/100 000^[1]。随着 CML 病程的进展其化疗耐药性也随之增加, 化疗失败是 CML 高死亡率的关键因素。因此, 发现能提高治疗效果的新方法并且克服药物的耐药性具有重要意义。微小 RNA (MicroRNAs, miRNA) 是大小为 18 ~ 25 个核苷酸, 进化高度保守的内生非编码小 RNAs。其在肿瘤中异常表达, 并且能作为癌基因通过结合目标 mRNA 的 3'-UTR 抑制 mRNA 的翻译或裂解目标 mRNAs 诱导其退化^[2]。除了实体肿瘤, miRNA 也在许多不同的血液恶性肿瘤中异常表达, 如慢性淋巴白血病、急性髓系白血病、骨髓增殖性肿瘤。对 CML, ROKAH 等^[3]发现与对照组细胞相比, 下调 K562 细胞中的 miRNA-31、miRNA-34a、miRNA-155 及 miRNA-564 后, miRNA 在 CML 发病机制中具有潜在的作用, miRNAs 可能是 CML 治疗的新靶点^[4]。大黄的药用成分是大黄素甲醚, 曾被用作泻药, 有护肝、抗炎及抗菌的特性。研究发现大黄素甲醚能够干预癌细胞的生理活动, 其中包括细胞凋亡^[5-6], 细胞生长周期^[7]及转移^[8]。然而, 大黄素甲醚在血液恶性肿瘤中的作用尚未阐明。本研究将探讨 miRNA-146a 对 CML 细胞 (K562/ADM) 耐药性的影响以及大黄素甲醚对 K562/ADM 多药耐药性的逆转效应。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人 CML 细胞系 K562 细胞和耐阿霉素细胞系 K562/ADM (由中国上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供), CCK-8 试剂盒 (购自中国碧云天公司), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒、增加通透性试剂盒 (购自 BD 公司), Hoechst33258 (购自美国 Sigma 公司), 总 miRNA 提取试剂盒、TaqMan 探针、逆转录试剂盒 (购自美国 Applied Biosystems 公司), 总 RNA 提取试剂盒 (购自中国天根生化科技有限公司), miRNA-146a mimic、miRNA-con 的慢病毒载体及 miRNA-146a inhibitor (购自德国 Qiagen 公司), Lipofectamine™ 2000 (购自美国 Invitrogen 公司), 抗鼠 CXCR4-PE 抗体 (购自美国 eBioscience 公司), CXCR4 及 β -actin 抗体 (购自中国 Abcam 公司), 辣根过氧化物酶 (购自中国 Boster 公司), Transwell 小室 (购自美国 Corning 公司)。

1.2 细胞培养

将 2 种细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清、100 u/ml 青

霉素和 100 mg/ml 链霉素双抗完全培养基中并接种在培养瓶, 维持细胞密度为 1×10^5 个/ml, 置于二氧化碳 CO₂ 体积分数为 5%, 饱和湿度 90% 的 37℃ 培养箱中连续培养。在 K562/ADM 细胞培养液中加入 5 mg/ml 的 ADM 维持细胞系的耐药性, 实验前用无 ADM 培养基至少培养 2 周。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 检测 运用药物干预 2 种细胞前, 在 96 孔板中调整细胞浓度为 5.0×10^3 个/孔, 培养 24 h。按 CCK-8 说明书用移液枪吸取 100 μ l 细胞悬液加入 96 孔板中, 同时设置对照组 (加入等量培养液) 和空白调零组, 每组设 3 个复孔, 每孔再加 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 在 450 nm 处用酶标仪测量各孔的 OD 值求得均值计算细胞增殖抑制率, 增殖抑制率 = (OD 对照组 - OD 实验组) / (OD 对照组 - OD 空白组) $\times 100\%$ 。半数抑制率计算采用 SPSS 11.0 统计学软件分析 (LOGIT 方法), 耐药逆转倍数 = 空白对照组 IC₅₀ / 逆转组 IC₅₀。

1.3.2 细胞克隆形成实验 将 K562/ADM 细胞悬浮于含有不同浓度大黄素甲醚的 RPMI 1640 琼脂糖混合物中, 并接种于底面铺有 RPMI 1640 琼脂糖固体培养基的 6 孔板中。不更换新鲜培养基, 将其置于温度为 37℃, 饱和湿度 95%、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中, 连续培养 14 d。选取超过 50 个细胞的细胞团计数并用结晶紫染色, 细胞拍照记录。

1.3.3 流式细胞术及 Hoechst 33258 检测细胞凋亡 用不同浓度的大黄素甲醚干预 K562/ADM 48 h, 收集细胞用预冷的 PBS 洗涤细胞, 加入 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 按每份 100 μ l 的细胞悬液进行分装备用。每个样本加入 2 μ l 的 Annexin V-FITC 和 2 μ l 的 PI 染色混匀后, 避光, 室温孵育 5 min; 上机前加入 400 μ l 的 Binding Buffer, 流式细胞仪对 1×10^4 个细胞进行分析。Annexin V-FITC 阳性的细胞为进行性凋亡的细胞, 而 FITC 阴性细胞为存活的细胞。

Hoechst33258 同样被用来检测凋亡细胞, 细胞与 Hoechst33258 的高亲和力表明细胞凋亡。处理后的 K562/ADM 细胞经 PBS 洗涤后每孔加入 500 μ l 预冷的乙醇固定 10 min。然后加入 1 μ mol/L Hoechst 33258 染色 10 min 后用荧光显微镜进行观察。200 个细胞在 3 个随机选择的区域被计数并计算凋亡细胞核染色的发生率。

1.3.4 miRNA-146a 下调、过表达及测定 K562/

ADM 或 K562 细胞接种在 96 孔板中孵育过夜, 然后根据 Lipofectamine™ 2000 说明书将细胞与 miRNA-146a mimic、miRNA-146a 抑制剂及空白的 miRNA-con 载体进行转染。转染效率用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 进行分析确定。

在 miRNA 检测中, 应用总 miRNA 提取试剂盒提取总 miRNA, miRNA-146a 通过探针 qRT-PCR 检测。应用总 RNA 提取试剂盒从细胞中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, qRT-PCR 法扩增目的基因和内参照基因人 GAPDH, 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司根据已发布的序列^[9]合成。应用比较 ΔCt 法对 qRT-PCR 结果进行分析。

1.3.5 siRNA 下调 CXCR4 的表达 CXCR4 siRNA 寡核苷酸序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司根据已发布的序列^[10]合成, 同时设计合成 1 条竞争序列作为对照。取对数生长期的 K562/ADM 细胞接种于 6 孔板中, 调整细胞密度为 3×10^5 个/ml, 孵育过夜, 根据 Lipofectamine™ 2000 说明书将细胞与 siRNA 载体及竞争的 siRNA 载体进行转染。转染后的细胞继续孵育 48 h 后用 Western blot 分析其下调作用进行验证。

处理后, 收集 K562/ADM 细胞加裂解液至冰上 30 min 后粉碎细胞, 收集蛋白加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上。蛋白经特殊的一抗和抗兔多克隆抗体处理后被检测, β -actin 作为内参照, 经 TBST 再次清洗后加入辣根过氧化物酶进行检测。信号检测使用化学发光底物, 结果用 Band Scan 软件进行分析。

1.3.6 细胞表面 CXCR4 的表达 在使用增加通透性的试剂盒之前先用抗鼠 CXCR4-PE 抗体固定 K562/ADM 细胞, 然后用同样的抗体对细胞进行第 2 次固定。使用 FACS Calibur 和 Flow Jo 软件对结果进行分析。

1.3.7 质粒的构建及荧光素酶活性的检测
①质粒的构建参考文献 [11]。利用人基因组特定引物通过 PCR 对包括 3'-UTR 的片段进行扩增 (正向 5'-GCTCTAGACACAGATGTA-AAAGAC-3'; 反向 5'-GCTCTAGACCACTGGTACAAAATCTTTATGTAAG-3'), 并且插入 1 个 pGL3 载体到反向荧光素酶基因的终止密码子, 从而引起 pGL3-3'-UTR/CXCR4 的构成。②荧光素酶活性的检测。293T 受体细胞暂时性地与 0.2 μ g 的 pGL3-3'-UTR/CXCR4 结构结合, 0.02 μ g 的 pRL-TK-

Renilla 荧光素质粒包含标准化的 Renilla 荧光素及 5 pmol 的 miRNA-146a 的过表达或对照质粒。转染 24 h 后溶解, 根据设备说明书用双荧光素酶分光光度计检测系统进行荧光素酶的活性测量。

1.3.8 迁移实验 K562/ADM 经不同浓度的大黄素甲醚干预 48 h 后收集细胞, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml。将细胞悬液放于上层小室, 100 ng/ml CXCL12 放在下层小室。随后孵育 8 h, 未迁移的细胞在表面被移除, 迁移细胞染色计数。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件, 计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验或方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-146a 在 K562/ADM 细胞中的表达

根据 CCK-8 分析, K562 细胞和 K562/ADM 细胞经 ADM 干预 48 h 后的 IC_{50} 分别为 0.15 和 3.50 μ mol/L, K562/ADM 细胞的耐药倍数是 K562 细胞的 23 倍多, 见表 1。与 K562 细胞比较, K562/ADM 细胞中 miRNA-146a 的表达较低, 表明 miRNA-146a 在 K562 细胞对 ADM 的获得性耐药中具有重要作用。见表 2。

2.2 下调 miRNA-146a 对 K562 细胞 ADM 抵抗性的影响

转染 miRNA-146a inhibitor 后 miRNA-146a 的表达水平降低。细胞生存实验表明下调 miRNA-146a 后的 K562 细胞的生存率高于 K562 细胞及对照组 (IC_{50} 分别为 2.80、0.15 及 0.18 μ mol/L, 见表 1)。另外, 流

表 1 ADM 干预 48 h 的 IC_{50} ($n=3$, μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)

细胞系	IC_{50}
K562/ADM	3.50 \pm 0.30
K562/ADM+NC	3.20 \pm 0.15
K562	0.15 \pm 0.06
K562+NC	0.18 \pm 0.03
K562+miRNA-146a inhibitor	0.18 \pm 0.03
K562/ADM+miRNA-146a mimic	0.42 \pm 0.05
K562/ADM+ 大黄素甲醚 (2 μ mol/L)	1.70 \pm 0.30
K562/ADM+ 大黄素甲醚 (5 μ mol/L)	0.68 \pm 0.12
F 值	93.679
P 值	0.000

式细胞术同样显示下调 miRNA-146a 能增强 K562 细胞抵抗 ADM 诱导的凋亡 (见表 3 和图 1), 总的来说, 该结果显示 miRNA-146a 与 K562 细胞对 ADM 耐药有关。

表 2 miRNA-146a 在 K562/ADM 及 K562 细胞中的表达 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

细胞系	miRNA
K562	0.98 ± 0.03
K562/ADM	0.29 ± 0.02
t 值	33.147
P 值	0.000

2.3 上调 miRNA-146a 对 K562/ADM 细胞 ADM 敏感性的影响

miRNA-146a 的作用通过应用 miRNA-146a mimic 被进一步研究。与 K562/ADM 细胞及转染空白质粒的 K562/ADM 细胞比较, 转染 miRNA-146a mimic 的 K562/ADM 细胞中的 miRNA-146a 表达增高, 见表 4 和图 2。CCK-8 检测显示 K562/ADM 细胞转染 miRNA-146a mimic 以后, 与 K562/ADM 细胞及转染空白质粒的 K562/ADM 细胞相比能增强 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性 (IC₅₀ 为 0.42、3.50 和 3.20 μmol/L, 见表 1)。相应地, 上调 miRNA-146a 能使 K562/ADM

细胞对 ADM 诱导凋亡的作用更敏感。

2.4 调节 miRNA-146a 对 K562 细胞 ADM 耐药的影响

下调或者上调 K562 细胞中的 miRNA-146a 未能引起 P-gp 或者 MRP-1 的 mRNA 的改变。相反,

表 3 miRNA-146a 在各组 K562 细胞中的 miRNA 表达及对细胞凋亡的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

细胞系	miRNA	细胞凋亡率 /%
K562	1.00 ± 0.04	16.61 ± 1.22
K562+NC	0.97 ± 0.03	14.93 ± 0.73
K562+miRNA-146a inhibitor	0.25 ± 0.06	2.62 ± 0.09
F 值	266.016	258.755
P 值	0.000	0.000

表 4 miRNA-146a 在各组 K562/ADM 细胞中的 miRNA 表达及对细胞凋亡的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

细胞系	miRNA	细胞凋亡率 /%
K562/ADM	0.97 ± 0.07	12.31 ± 1.20
K562/ADM+NC	0.95 ± 0.05	15.34 ± 2.34
K562/ADM+miRNA-146a mimic	2.69 ± 0.21	48.11 ± 6.45
F 值	174.361	73.108
P 值	0.000	0.000

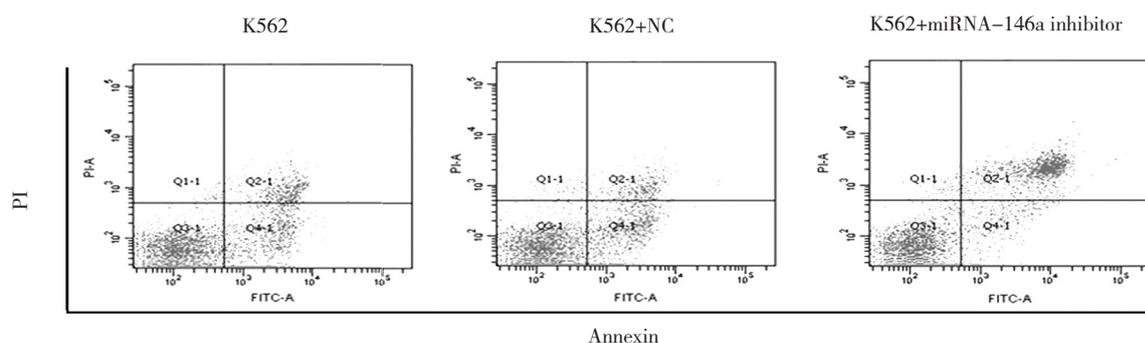


图 1 miRNA-146a inhibitor 干预后各组 K562 细胞的凋亡情况

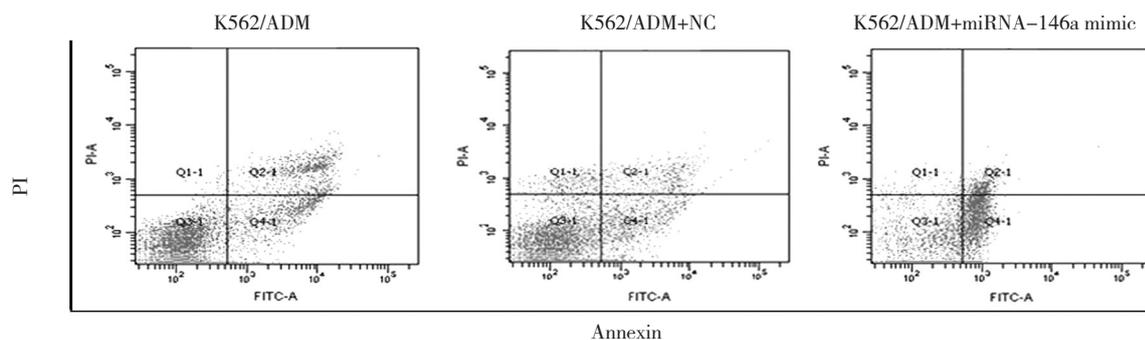


图 2 过表达 miRNA-146a 对 K562/ADM 细胞凋亡的影响

miRNA-146a 的表达与 CXCR4 mRNA 的表达呈负相关, 见表 5。另外, 流式细胞术和 Western blot 分析也显示 miRNA-146a 的表达与 CXCR4 的表达呈负相关 (见表 6 和图 3)。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示 CXCR4 siRNA 抑制 CXCR4 表达的增加是由 miRNA-146a inhibitor 引起的 (见表 7 和图 4)。另外, 通过 miRNA-146a inhibitor 的诱导下调 CXCR4 的表达能降低 K562 细胞的耐药性 (见表 8 和图 5), 表明 miRNA-146a 通过 CXCR4 在 K562 耐药细胞中发挥其功能。

2.5 大黄素甲醚对 K562/ADM 细胞 ADM 敏感性的影响

大黄素甲醚减少 K562/ADM 细胞的生存能力, 且呈剂量依赖性。当 K562/ADM 细胞受到相同剂量大

黄素甲醚干预时, 孵育 48 h 的抗恶性细胞增生的作用比 24 h 更明显。然而, 当将大黄素甲醚的干预时间延长到 72 h, 未观察到进一步的细胞抑制作用 (见表 1)。给予大黄素甲醚 2 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 干预 48 h 后并未显示出对 K562/ADM 细胞毒性作用 (生长抑制率 < 10%), 所以选择该剂量检查大黄素甲醚能否逆转 K562/ADM 细胞的耐药性。CCK-8 结果显示选用 2 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的大黄素甲醚干预细胞后能降低 K562/ADM 细胞对 ADM 的 IC_{50} , IC_{50} 分别从 3.50 $\mu\text{mol/L}$ 降到 1.70 和 0.68 $\mu\text{mol/L}$ 。结果显示, 大黄素甲醚能增强 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性, 耐药逆转倍数在 2 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下分别为 2.03 和 5.30 倍 (见表 1)。逆转耐药也可以经克隆形成实验证实, 与单独用 ADM 干预的细胞比较, 当大黄素甲醚和 ADM 联

表 5 调节 miR-146a 对细胞中 P-gp、MRP-1 及 CXCR4 表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

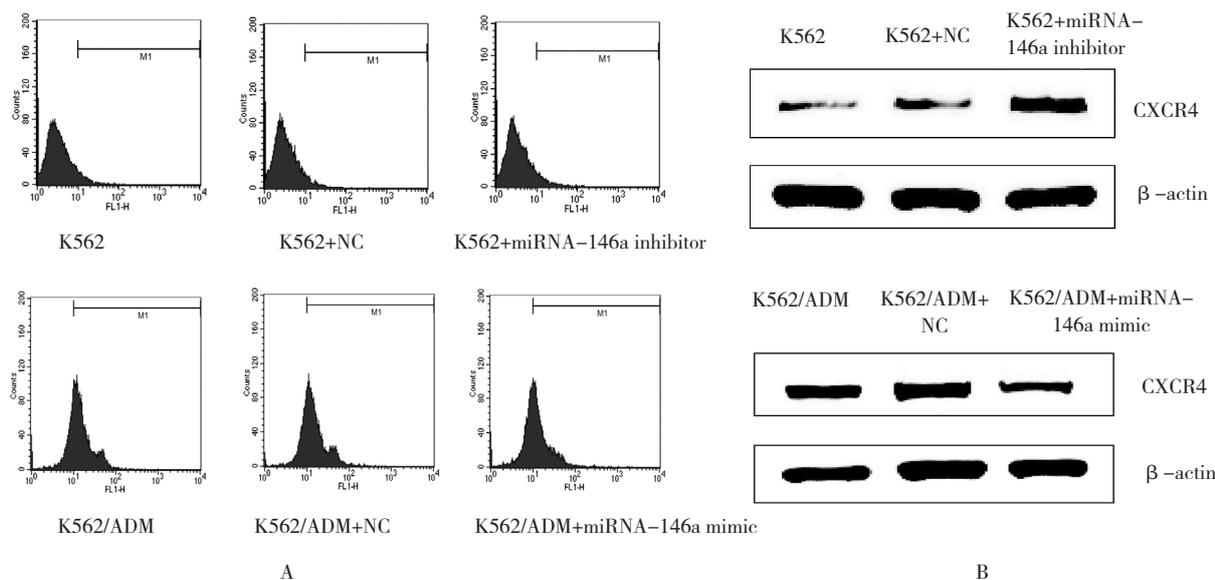
细胞系	P-gp mRNA	MRP-1 mRNA	CXCR4 mRNA
K562	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.03
K562+NC	1.02 \pm 0.05	0.98 \pm 0.04	0.97 \pm 0.03
K562+miRNA-146a inhibitor	0.96 \pm 0.04	0.95 \pm 0.03	1.96 \pm 0.12
K562/ADM	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.06	0.98 \pm 0.03
K562/ADM+NC	0.98 \pm 0.04	0.94 \pm 0.07	0.97 \pm 0.03
K562/ADM+miRNA-146a mimic	1.02 \pm 0.04	0.95 \pm 0.03	0.49 \pm 0.09
F 值	1.058	0.836	160.149
P 值	0.429	0.549	0.000

表 6 CXCR4 在各组 K562 和 K562/ADM 细胞中的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

细胞系	表面 CXCR4 的相对表达量	CXCR4 的相对蛋白表达量
K562	0.98 \pm 0.05	1.00 \pm 0.05
K562+NC	0.97 \pm 0.05	1.04 \pm 0.07
K562+miRNA-146a inhibitor	2.25 \pm 0.26	1.85 \pm 0.17
K562/ADM	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.02
K562/ADM+NC	1.03 \pm 0.07	0.96 \pm 0.05
K562/ADM+miRNA-146a mimic	0.35 \pm 0.12	0.43 \pm 0.05
F 值	74.915	89.579
P 值	0.000	0.000

表 7 miRNA-146a 调节 CXCR4 对 K562 细胞 ADM 耐药性的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	CXCR4 的 mRNA 表达	CXCR4 蛋白表达
无处理组	0.99 \pm 0.13	0.96 \pm 0.08
miRNA-146a inhibitor	1.96 \pm 0.12	2.06 \pm 0.19
miRNA-146a inhibitor+ Control siRNA	1.87 \pm 0.15	1.96 \pm 0.26
miRNA-146a inhibitor+ CXCR4 siRNA	1.29 \pm 0.13	1.19 \pm 0.16
F 值	7.831	26.696
P 值	0.009	0.000



A: CXCR4 在 K562 和 K562/ADM 细胞中的表达与细胞中 miRNA-146a 的表达的关系; B: CXCR4 在 K562 或 K562/ADM 细胞中的蛋白表达与细胞中 miRNA-146a 表达的关系

图 3 CXCR4 在 K562 或 K562/ADM 细胞中的表达及与 miRNA-146a 表达的关系

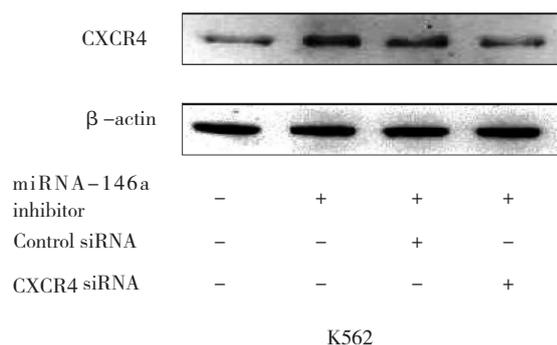


图 4 miRNA-146a inhibitor 转染的 K562 细胞中 CXCR4 的蛋白表达经 CXCR4 siRNA 降低

表 8 miRNA-146a 及 CXCR4 对 K562 细胞凋亡及活性的影响 (n=3, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活性	细胞死亡率
无处理组	98.45 ± 6.11	1.92 ± 0.21
ADM (0.1 μmol/L)	57.34 ± 6.23	16.62 ± 2.53
ADM (0.1 μmol/L) +miRNA-146a inhibitor	87.22 ± 9.42	2.64 ± 0.52
ADM (0.1 μmol/L) +miRNA-146a inhibitor+Control siRNA	82.46 ± 12.33	3.22 ± 0.64
ADM (0.1 μmol/L) +miRNA-146a inhibitor+CXCR4 siRNA	68.34 ± 9.25	13.91 ± 2.33
F 值	9.525	7.750
P 值	0.002	0.004

合作用于 K562/ADM 时, 细胞集落数及集落大为减少, 支持大黄素甲醚能增强 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性。见表 10 和图 6。流式细胞仪分析表明与单独用 ADM 干预比较, 大黄素甲醚浓度在 2 和 5 μmol/L 能增加 K562/ADM 细胞的凋亡, 见表 11 和图 7A。另外, Hoechst 染色也进一步表明通过大黄素甲醚能增强 ADM 诱导细胞凋亡的作用, 见图 7B。虽然大黄素甲醚自身不能诱导凋亡, 但是通过核凝缩能明确其对 K562/ADM 细胞的凋亡具有影响。

2.6 大黄素甲醚调节 miRNA-146a 和干预 CXCL12/CXCR4 信号对 K562/ADM 细胞耐药的影响

结果表明, 大黄素甲醚干预能导致 K562/ADM 细胞中 miRNA-146a 水平呈剂量依赖性增加, 见表 12。除此以外, 本研究结果还表明大黄素甲醚增强敏感性的作用经 miRNA-146a inhibitor 干预后几乎完全消失, 表明大黄素甲醚通过调节 miRNA-146a 逆转 K562/ADM 细胞的多药耐药 (见表 13 和图 8)。与大黄素甲醚对 miRNA-146a 的影响相一致, 大黄素甲醚干预导致 K562/ADM 细胞中趋化因子受体 CXCR4 的表达呈剂量依赖性降低 (见表 14 和图 9)。另外, 迁移试验结果显示经大黄素甲醚干预后迁移受损 (见表 15 和图 10)。大黄素甲醚通过上调 miRNA-146a 调节 CXCR4 的表达且干扰 CXCR12 与 CXCR4 的结合。

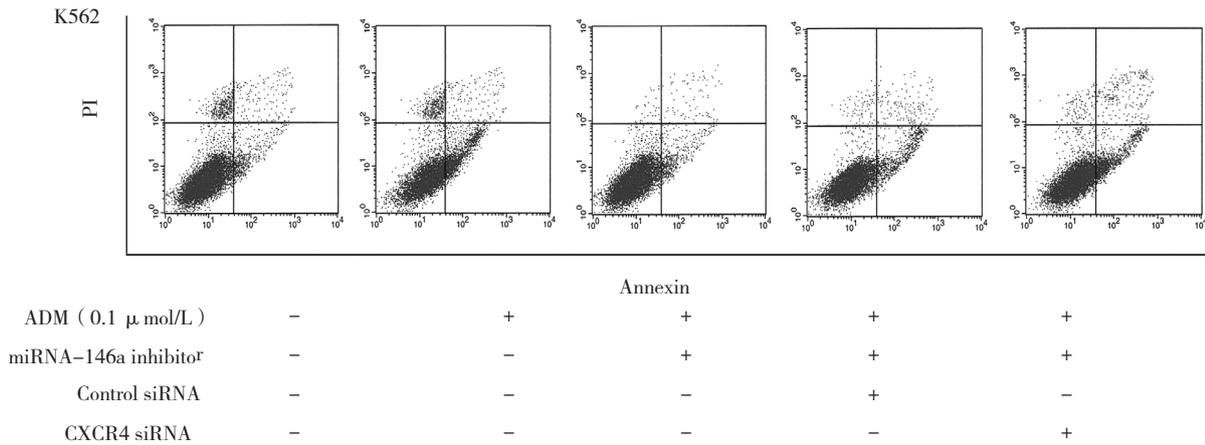


图 5 miRNA-146a 及 CXCR4 对 K562 细胞凋亡的影响

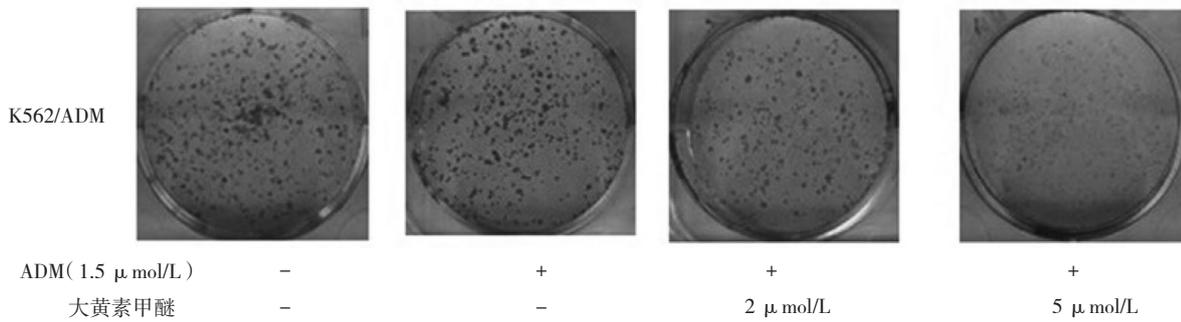


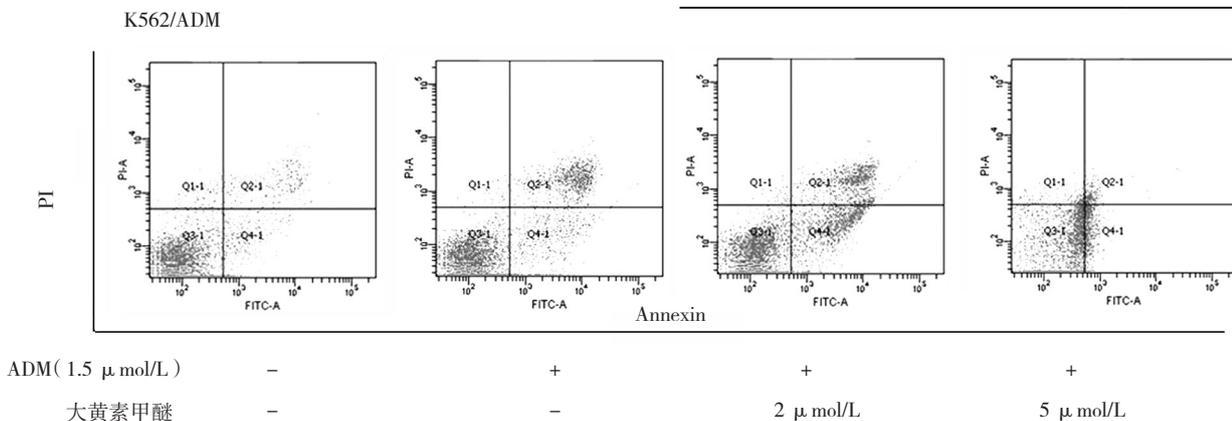
图 6 单细胞克隆实验检测大黄素甲醚联合 ADM 对 K562/ADM 细胞活性的影响

表 9 不同浓度的大黄素甲醚对 K562/ADM 细胞活性的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

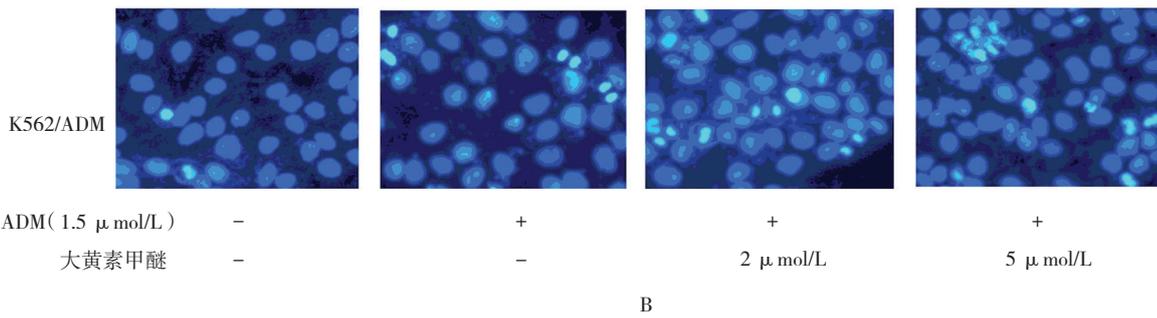
大黄素甲醚的浓度	细胞活性 /%
0 μmol/L	96.21 ± 5.01
2 μmol/L	92.03 ± 7.32
5 μmol/L	84.12 ± 6.45
10 μmol/L	77.08 ± 10.34
F 值	97.678
P 值	0.000

表 10 大黄素甲醚联合 ADM 对 K562/ADM 细胞活性的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞克隆数
无药物组	100 ± 6
ADM (1.5 μmol/L)	78 ± 9
ADM (1.5 μmol/L) + 2 μmol/L 大黄素甲醚	62 ± 8
ADM (1.5 μmol/L) 组 + 5 μmol/L 大黄素甲	42 ± 6
F 值	33.382
P 值	0.000



A



A: 流式细胞仪检测结果; B: Hoechst 33258 检测结果

图 7 大黄素甲醚联合 ADM 对 K562/ADM 细胞凋亡的影响

表 11 大黄素甲醚联合 ADM 对 K562/ADM 细胞凋亡的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞克隆数
无药物组	1.61 ± 0.23
ADM (1.5 μmol/L)	12.33 ± 1.62
ADM (1.5 μmol/L) + 2 μmol/L 大黄素甲醚	22.43 ± 3.62
ADM (1.5 μmol/L) + 5 μmol/L 大黄素甲醚	38.12 ± 5.64
F 值	68.015
P 值	0.000

表 12 大黄素甲醚干预下 K562/ADM 细胞中 miRNA-146a miRNA 的相对表达量 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

大黄素甲醚的浓度	miRNA-146a miRNA 的相对表达量
0 μmol/L	1.03 ± 0.12
2 μmol/L	1.26 ± 0.16
5 μmol/L	1.69 ± 0.21
F 值	12.011
P 值	0.008

表 13 K562/ADM 细胞中降低 miRNA-146a 后大黄素甲醚对细胞活性及凋亡的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活性率 /%	细胞凋亡率 /%
无药物组	99.61 ± 4.11	1.62 ± 0.21
ADM (1.5 μmol/L)	61.09 ± 6.54	12.62 ± 3.63
ADM (1.5 μmol/L) + 大黄素甲醚 (5 μmol/L)	21.23 ± 4.05	38.46 ± 5.25
ADM (1.5 μmol/L) + miRNA-146a inhibitor	67.34 ± 8.33	9.32 ± 1.04
ADM (1.5 μmol/L) + 大黄素甲醚 (5 μmol/L) + miRNA-146a inhibitor	53.03 ± 6.01	23.21 ± 2.13
F 值	67.886	63.231
P 值	0.000	0.000

表 14 大黄素甲醚对 K562/ADM 细胞中 CXCR4 表达的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

大黄素甲醚的浓度	CXCR4 的 mRNA 相对表达量	CXCR4 的蛋白相对表达量
0 μmol/L	0.98 ± 0.02	1.00 ± 0.03
2 μmol/L	0.72 ± 0.16	0.67 ± 0.12
5 μmol/L	0.35 ± 0.04	0.32 ± 0.09
F 值	32.685	44.474
P 值	0.001	0.000

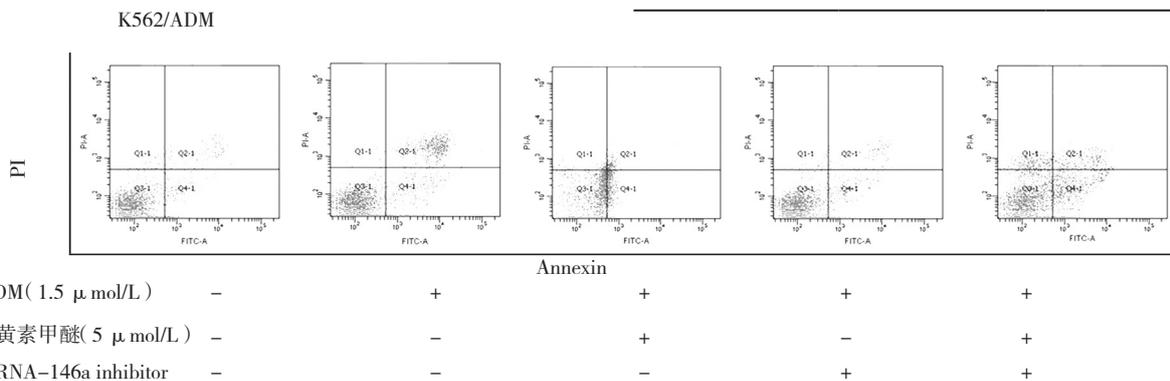


图 8 K562/ADM 细胞中降低 miRNA-146a 后大黄素甲醚对 ADM 诱导的细胞凋亡的影响

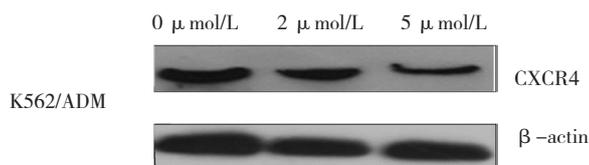


图 9 大黄素甲醚对 K562/ADM 细胞中 CXCR4 蛋白表达的影响

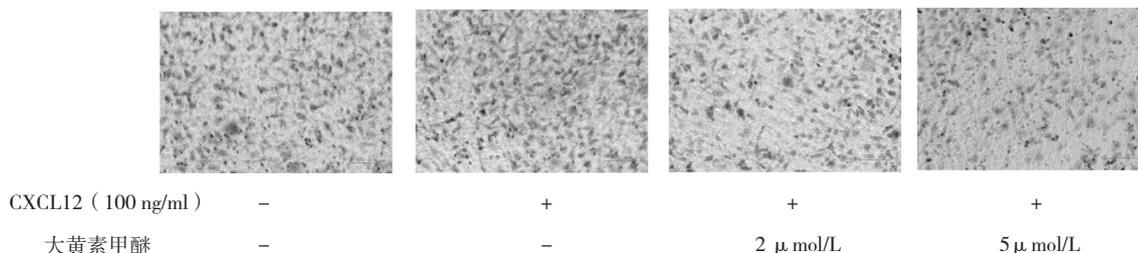


图 10 大黄素甲醚对 CXCL12 和 CXCR4 结合的影响

表 15 大黄素甲醚对 CXCL12 和 CXCR4 结合的影响

(n = 3, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞迁移率
无药物组	100 ± 6
CXCL12 (100 ng/ml)	195 ± 21
CXCL12 (100 ng/ml) + 2 μmol/L 大黄素甲醚	121 ± 16
CXCL12 (100 ng/ml) + 5 μmol/L 大黄素甲醚	106 ± 9
F 值	28.408
P 值	0.000

3 讨论

作为一组高度保守非蛋白编码的 RNAs, miRNA 能调节真核细胞中各种各样目标基因的表达, 因此在细胞增殖、凋亡、发展及分化中具有重要作用。miRNA-146a 第 1 次发现于先天免疫和炎症反应的微生物感染中, 现在已经被发现在致癌作用和实体肿瘤的发展和转移中具有重要作用^[12-13]。其在基因敲除小鼠骨髓和淋巴恶性肿瘤中已经被发现^[14]。GARZON 等已经发现 miRNA-146a 在骨髓 CD34⁺ 细胞正常的捐赠者中表达相对较高的水平, 然而在急性髓系白血病患者中低表达, 甚至在来自健康捐赠者的外周血或骨髓中的单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞中的表达水平更低^[15]。XU 等也报道, miRNA-146a 作为癌基因在急性早幼粒细胞白血病中的作用及其通过抑制 Smad4 有助于 miRNA-146a 的增高^[16]。然而, miRNA-146a 在 CML 的作用仍有待阐明。笔者的研究结果表明, miRNA-146a 在耐药 K562/ADM 细胞中的表达低于对药物较敏感的 K562 细胞, 上调 miRNA-146a 通过抑制

趋化因子受体 CXCR4 的表达能恢复 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性, 大黄素甲醚通过上调 miRNA-146a 抑制 CXCR4 表达而增加 K562/ADM 细胞对 ADM 的敏感性。

越来越多的数据表明, miRNA 因为其调节耐药相关基因的能力而参与在化疗耐药的肿瘤治疗中。miRNA-146a 与耐药性肿瘤细胞的相关性也在一些研究中被描述。与 MCF-7 敏感细胞比较, 在顺铂耐药性乳腺癌 MCF-7 细胞中 miRNA-146a 上调^[17]。在肝癌细胞的一项研究中发现, 耐 IFN-α 细胞中 miRNA-146a 的表达高于 IFN-α 敏感细胞^[10]。ZHUO 等在另一项关于肝癌细胞的研究中报道 miRNA-146a 在耐药细胞系中上调^[18]。在结直肠癌中 miRNA-146a 的高表达与西妥昔单抗耐药性和预后较差相关^[19]。然而, 相反的结果报道, miRNA-146a 被发现在耐顺铂卵巢癌 A2780 细胞中低水平表达, 尽管 miRNA-146a inhibitor 无法建立 A2780 细胞的耐药性^[20]。在非小细胞肺癌细胞中 miRNA-146a 的低表达与前期临床 TNM 分期及远处转移相关联^[21]。另外, 最近的研究表明, miRNA-146 的药物诱导能增强替莫唑胺诱导人类胶质母细胞瘤细胞凋亡的敏感性^[22]。

本研究发现, miRNA-146a 在耐 ADM 的 K562 细胞中的表达降低。此外, 在敏感的 K562 细胞中转入 miRNA-146a inhibitor 后表明细胞抵抗 ADM 诱导凋亡, 而转染 miRNA-146a mimic 的 K562/ADM 细胞则恢复其对 ADM 的敏感性。还发现 miRNA-146a 能提高 K562 细胞对 ADM 的耐药性。笔者推测 miRNA-146a 诱导耐药性的作用在不同肿瘤中有特定的作用。鉴于 miRNA-146a 在癌细胞中的目标不止 1 个信号通路,

miRNA-146a 是否促进或抗耐药可能取决于调节癌细胞的特定关键信号通路。

CXCR4 是在造血细胞和上皮癌细胞上表达的趋化因子受体,已经发现其通过调节白血病细胞和间质细胞的相互作用,从而保护白血病细胞免于自发和化疗所致的死亡。因此,CXCR4 被认为是影响急性髓系白血病生存和耐药白血病预后的一个关键因素。笔者的研究表明 miRNA-146a 与 CXCR4 的表达呈负相关。另外,通过下调 miRNA-146a 建立的 K562 细胞对 ADM 的抵抗性可以通过 CXCR4 siRNA 降低,这表明 CXCR4 是介导下调 miRNA-146a 产生 ADM 耐药结果的关键因素。除此以外,笔者发现 miRNA-146a 直接针对 CXCR4 mRNA 的 3'-UTR 并抑制其表达,与最近的一项研究是一致的^[23]。有趣的是,最近的一项研究报道 CXCR4 3'-UTR 的过表达抑制 miRNA-146a 的活性,从而提高乳腺癌 MCF-7 细胞中 CXCR4 的表达,表明通过 miRNA-146a 调节 CXCR4 可能并非想象的那样简单^[10]。然而,miRNA-146a 和 CXCR4 之间更复杂的关系及其在 K562 细胞耐药性中的作用需要进一步的研究验证。

大黄素甲醚在 2005 年作为活性成分在多孢菌属的培养中被分离出来。后来的研究发现大黄素甲醚分别在人类乳腺癌细胞和宫颈癌细胞中能够诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[6,8]。另外,ELF 等报道大黄素甲醚在裸鼠异种移植中通过抑制 6-磷酸葡萄糖脱氢酶抑制癌症细胞增殖和肿瘤生长^[24]。在本研究中,笔者为大黄素甲醚对 miRNA-146a 调节效应及其逆转耐药的能力提供第 1 个证据,支持天然化合物可以针对多个信号通路发挥抗肿瘤效应的这个概念。

总之,本研究结果表明下调 miRNA-146 和上调 CXCR4 可能与 K562/ADM 细胞的耐药性有关。另外,大黄素甲醚可以通过诱导 miR-146a 的表达抑制 CXCL12/CXCR4 信号从而逆转 K562/ADM 细胞对 ADM 的耐药性。鉴于大黄素甲醚对正常细胞的毒性较低,其可以考虑作为 1 个潜在的 CML 的候选辅助治疗剂。

参 考 文 献:

- [1] CAGNETTA A, GARUTI A, MARANI C, et al. Evaluating treatment response of chronic myeloid leukemia: emerging science and technology[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(7): 779-790.
- [2] LUO D, WILSON J M, HARVEL N, et al. A systematic evaluation of miRNA: mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 57.
- [3] ROKAH O H, GRANOT G, OVCHARENKO A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35501.
- [4] FERREIRA A F, MOURA L G, TOJAL I, et al. ApoptomiRs expression modulated by BCR-ABL is linked to CML progression and imatinib resistance[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2014, 53(1/2): 47-55.
- [5] WIJESEKARA I, ZHANG C, VAN TA Q, et al. Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Microbiol Res*, 2014, 169(4): 255-261.
- [6] CHEN X, GAO H, HAN Y, et al. Physcion induces mitochondria-driven apoptosis in colorectal cancer cells via downregulating EMMPRIN[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015(764): 124-133.
- [7] 陶毅明, 洪雪, 马义丽, 等. 芦荟大黄素联用顺铂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(20): 127-130.
- [8] HAN Y T, CHEN X H, GAO H, et al. Physcion inhibits the metastatic potential of human colorectal cancer SW620 cells in vitro by suppressing the transcription factor SOX2[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(2): 264-275.
- [9] WANG Y, MIAO H, LI W, et al. CXCL12/CXCR4 axis confers adriamycin resistance to human chronic myelogenous leukemia and oroxylin A improves the sensitivity of K562/ADM cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(3): 212-225.
- [10] TOMOKUNI A, EGUCHI H, TOMIMARU Y, et al. miR-146a suppresses the sensitivity to interferon-alpha in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(4): 675-680.
- [11] ZHENG T, CHOU J, ZHANG F, et al. CXCR4 3'UTR functions as a ceRNA in promoting metastasis, proliferation and survival of MCF-7 cells by regulating miR-146a activity[J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(10): 458-469.
- [12] RAIMO M, ORSO F, GRASSI E, et al. miR-146a exerts differential effects on melanoma growth and metastatization[J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(6): 548-562.
- [13] WANG C, GUAN S, LIU F, et al. Prognostic and diagnostic potential of miR-146a in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2016(114): 290-297.
- [14] BOLDIN M P, TAGANOV K D, RAO D S, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(6): 1189-1201.
- [15] GARZON R, VOLINIA S, LIU C G, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2008, 111(6): 3183-3189.
- [16] XU L, ZHONG H, WAN H, et al. miR-146a expression level as a novel putative prognostic marker for acute promyelocytic leukemia[J]. *Dis Markers*, 2014(2014): 150604.
- [17] POGRIBNY I P, FILKOWSKI J N, TRYNDYAK V P, et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with

- acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(8): 1785-1794.
- [18] ZHUO L, LIU J, WANG B, et al. Differential miRNA expression profiles in hepatocellular carcinoma cells and drug-resistant sublines[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2): 555-562.
- [19] HWANG W L, JIANG J K, YANG S H, et al. MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2014(16): 268-280.
- [20] LI N, YANG L, WANG H, et al. miR-130a and miR-374a function as novel regulators of cisplatin resistance in human ovarian cancer A2780 cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128886.
- [21] CHEN G, UMELO I A, LV S, et al. miR-146a inhibits cell growth, cell migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3) : e60317.
- [22] WU H, LIU Q, CAI T, et al. Induction of microRNA-146a is involved in curcumin-mediated enhancement of temozolomide cytotoxicity against human glioblastoma[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5461-5466.
- [23] ALFANO D, GORRASI A, LI SANTI A, et al. Urokinase receptor and CXCR4 are regulated by common microRNAs in leukaemia cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9): 2262-2272.
- [24] LIN R, ELF S, SHAN C, et al. 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2015(17): 1484-1496.

(王荣兵 编辑)