网络出版时间:2021-05-14 15:18 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.015.html

基于转录组测序的 ATPR 诱导 NB4 细胞分化过程中 lncRNA 的初步鉴定与分析

冯钰斌[1,2],胡 爽[1],李兰兰[1],徐小玲[1],张梅菊[1],彭晓清[1],陈飞虎[1]

摘要 **目的** 为了探究新型维甲酸衍生物 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(ATPR)诱导人急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞分化的潜在作用机制。**方法** 分别用 ATPR 和全反式维甲酸(ATRA)诱导 NB4 细胞分化,然后用基因芯片技术对处理后的细胞进行长链非编码 RNA(lncRNA)和 mRNA 表达谱分析。**结果** 与 ATRA 组比较,有 775 个 lncRNA 和 904 个 mRNA 在 ATPR 组被筛选出,且顺式调控基因分析了一些关键 lncRNA 的染色体定位。反式分析结果表明相关转录因子能调节 lncRNA 的表达。**结论** lncRNA 在 ATPR 诱导 NB4 细胞分化过程中起到重要的调节作用。

关键词 ATPR;NB4 细胞;基因芯片技术;lncRNA
中图分类号 R 737.9
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)06-0915-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.015

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia,APL)属于急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)的 M3 分型,临床上主要采用诱导分化治疗,全反式维甲酸(all trans retinoic acid,ATRA)是临床治疗的首选药物,但维甲酸综合征[1]、耐药性[2]等都是其副作用。为了避免这些副作用,课题组前期对 ATRA 进行结构改造,得到了很多 ATRA 衍生物,经过前期的药效学筛选,发现 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯(4-amino-2-trifluoromethylphenyl retinate,ATPR)具有较强的抗肿瘤活性[3-5]。

长链非编码 RNA(long-chain non-coding RNA,lncRNA)主要是通过顺式或反式作用调节来发挥基因表达的作用[6-7]。lncRNA 不仅可以调节上皮间质转化过程,还可以充当 microRNA 海绵来调节信号通路[8]。lncRNA 比 mRNA 的特异性更高,所以 lncRNA 更有可能被开发成肿瘤诊断和预后的标志物[9]。该研究以 NB4 细胞为研究对象,运用基因芯片技术筛选出 ATPR 与 ATRA 分别作用于 NB4 细胞后差异表达的 lncRNA 和 mRNA,以此探讨 ATPR 对 NB4 细胞作用的可能机制及分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 委托合肥新星药业有限公司合成纯度达到 99.66% 的 ATPR(图 1),用无水乙醇将其溶解成浓度为 20 mmol/L 的母液,-20 ℃ 避光保存备用;阳性药 ATRA 购自美国 Sigma 公司;NB4 细胞株购自中科院上海细胞库;RPMI 1640 购自 Hyclone 公司;小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

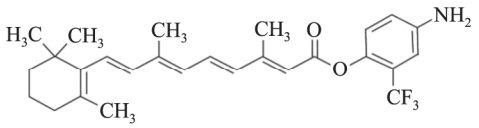

图 1 ATPR 分子式

1.2 细胞培养与加药处理 为了得到对数生长期的细胞,在温度为 37 ℃、CO_2 浓度为 5% 的培养箱中培养细胞,待满足生长条件后,随机将细胞分为两组,用终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的 ATRA 和 ATPR 分别处理细胞,培养 72 h 后收集细胞。

1.3 lncRNA 和 mRNA 基因芯片表达谱 委托上海欧易生物科技有限公司代为完成基因芯片表达谱的构建与分析。具体方法参考文献[9]。

1.4 统计学处理 采用 Feature Extraction 软件处理原始图像,提取原始数据。采用 Genespring 软件进行 quantile 标准化和后续处理。标准化后的数据进行过滤,用于比较的每组样本中至少有一组 100% 标记为“*P*”的探针留下进行后续分析。利用 *t* 检验的 *P* 值和倍数变化值(Fold change,FC)进行差异 mRNA 和差异 lncRNA 筛选,筛选的标准为上调或者下调 FC≥2.0 且 $P\leq0.05$。对差异 lncRNA

2021-03-02 接收
基金项目:安徽省科技重大专项项目(编号:17030801020);安徽省高校自然科学研究项目(编号:KJ2019A0272)
作者单位:[1]安徽医科大学药学院,合肥 230032
[2]中国科学技术大学第一附属医院药剂科,合肥 230031
作者简介:冯钰斌,男,博士研究生;
彭晓清,女,讲师,责任作者,E-mail:pengxiaoqing@ahmu.edu.cn;
陈飞虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:chenfeihu@ahmu.edu.cn

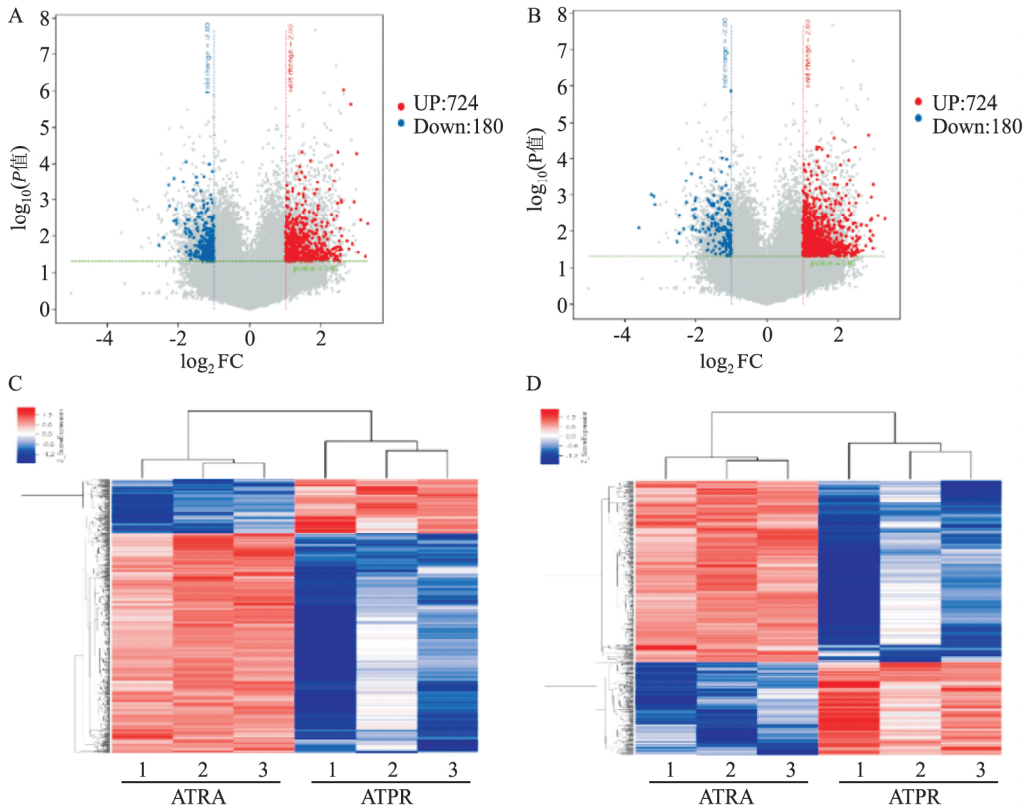

图 2　两组差异表达的 lncRNA 和 mRNA 的火山图和热图分析

A: lncRNA 差异表达火山图; B: mRNA 差异表达火山图; C: lncRNA 差异表达热图; D: mRNA 差异表达热图; 红色: 高表达; 蓝色: 低表达

进行 GO 和 KEGG 富集分析,以判定差异 lncRNA 主要影响的生物学功能或者信号通路。最后,对差异 mRNA 和差异 lncRNA 进行非监督层次聚类,利用热图和火山图的形式展示差异基因在不同样本间的表达模式。

2　结果

2.1　两组 lncRNA 和 mRNA 的表达分析　与 ATRA 组比较,利用基因芯片在 ATPR 组筛选出很多差异表达的 lncRNA(FC > 2,P < 0.05) ,在这些差异表达的 lncRNA 中,有 511 个是上调的,其余 264 个是下调的。紧接着对差异表达的标准化数据进行分析,制成火山图 (图 2A) 和热图 (图 2C) 。筛选出的排名前 10 的上调和前 10 的下调的 lncRNA 已经列出,见表 1。结果显示,在所有上调的 lncRNA 转录物中, lnc-COPS4 的上调倍数最大,FC 达到了 32.88,而 lnc-ZNF569 的下调倍数最大,FC 达到了 -9.65。依据相同的筛选标准 (FC > 2,P < 0.05) ,有 904 个异常表达的 mRNA 转录本被发现,其中上调的有 724 个,下调的有 180 个 (图 2B、D) 。上调倍数最多和下调倍数最多的 mRNA 转录物分别是 SDC2 和 ARG1,FC 达到了 24.89 和 -13.26。

表 1　基因芯片结果中上调和下调前 10 位 lncRNA

上调 lncRNA	FC	下调 lncRNA	FC
lnc-COPS4	32.88	lnc-ZNF569	-9.65
lnc-AMPH	19.54	lnc-DYDC1	-8.54
RMDN2-AS1	15.28	lnc-SNX20	-8.65
lnc-PML	14.73	lnc-ADORA1	-7.77
lnc-CACNG5	9.87	lnc-RNASE3	-7.43
N4BP2L2-IT	8.24	lnc-AC087650.1	-6.57
lnc-C9orf152	6.77	lnc-SUMF1	-6.10
lnc-AEBP2	5.87	lnc-TNFRSF8	-5.32
lnc-ACOX3	5.32	lnc-LRP1B	-5.13
lnc-EIF4E2	5.01	lnc-ATP6V1E2	-5.05

2.2　差异表达的 lncRNA 的功能分析　为了研究差异表达 lncRNA 的功能,我们采用 GO 分析和 KEGG 通路注释对前 200 个差异表达 lncRNA 的功能进行预测分析。GO 分子功能分析结果显示,排名前列的涉及一些发病机制的功能途径,如 poly (A) RNA binding、receptor activity、protein binding、MAP kinase tyrosine phosphatase activity、heparin binding 等(图 3A) 。GO 分析的生物过程结果显示这些差异表达的 lncRNA 富集结果如下: positive reg-

ulation of inflammatory response、blood coagulation、immune response 和 blood vessel morphogenesis 等(图 3B)。KEGG 信号通路富集分析结果表明这些差异 lncRNA 可能涉及到很多信号通路,排名第 1 的是 Protein processing in endoplasmic reticulum,大概会有 16 个 lncRNA 参与其中。富集结果同样表明 lncRNA 富集的"化学致癌"和"剪接体"可能参与了白血病的发生发展,其中最为经典的"Notch 信号通路",同样可能参与了白血病的发生(图 3C)。

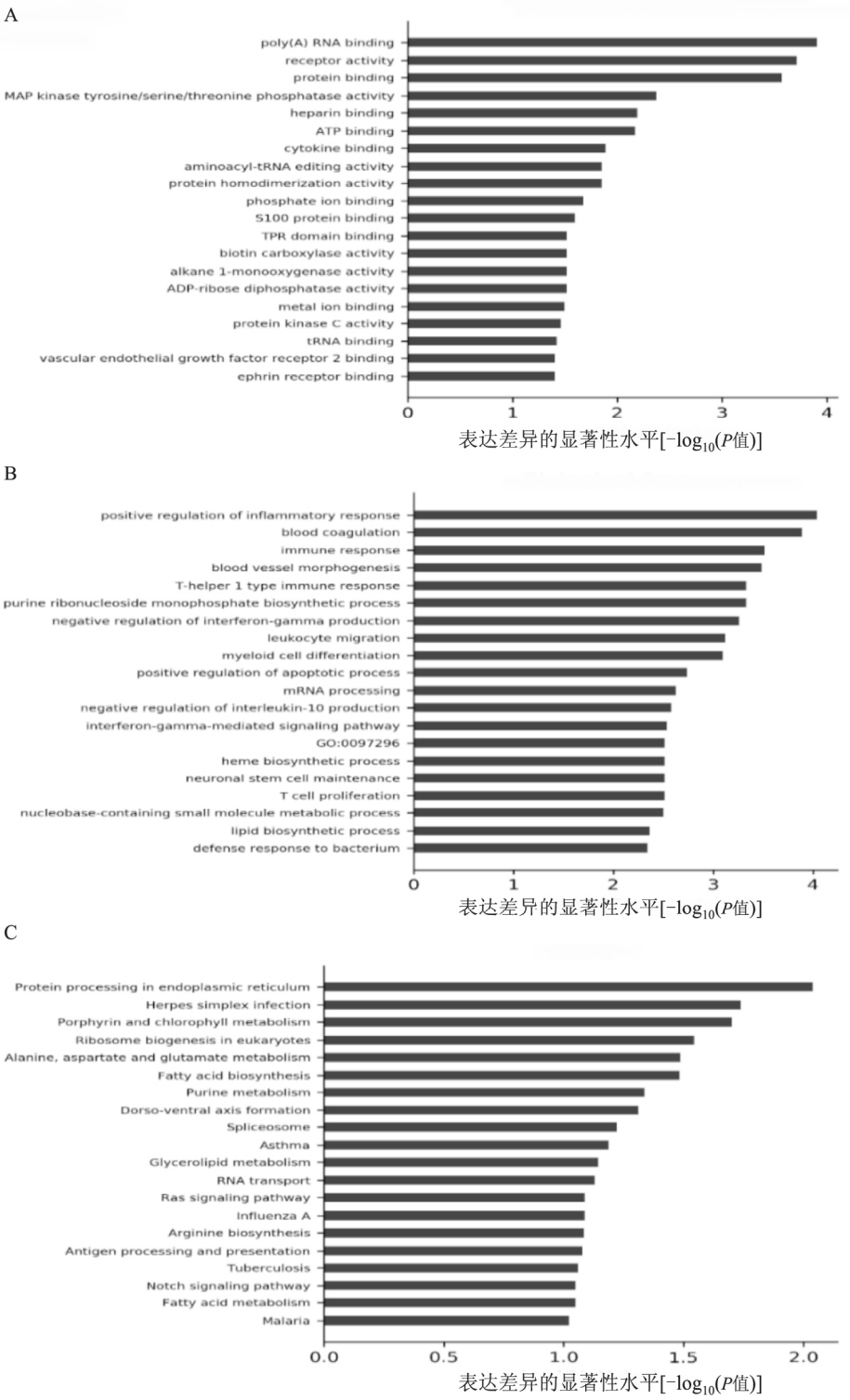

图 3 GO 和 KEGG 分析差异表达前 200 位 lncRNA 高度富集的通路

A: 分子功能; B: 生物过程; C: KEGG 通路富集分析

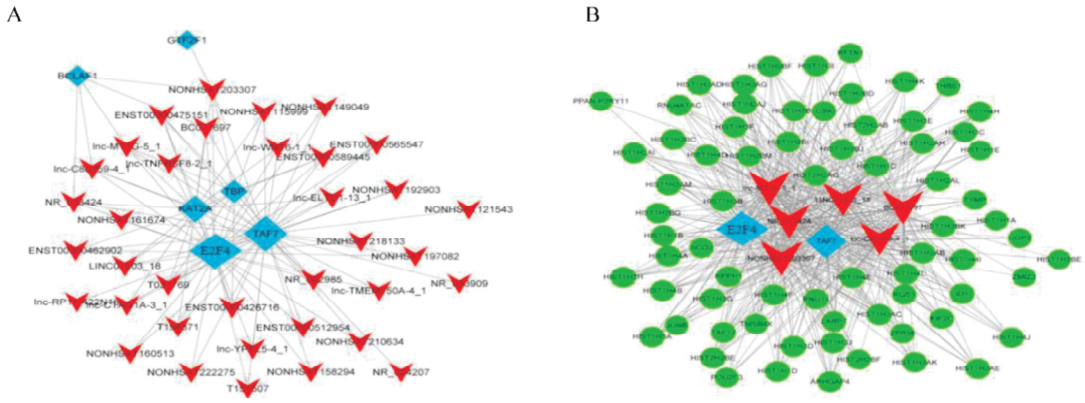

图4　差异表达 lncRNA 顺式和反式调节预测分析

A：lncRNA-转录因子网络调控视图；B：lncRNA-转录因子-mRNA 网络调控视图

2.3　ATPR 组中 lncRNA 的顺式调节与反式调节

lncRNA 主要通过调节染色体的结构来发挥功能，最为经典的是除了顺式调控的方式调节自身转录，还可以通过调节自身近端的基因表达来发挥作用。为了探究筛选的差异表达 lncRNA 的功能，以期找到潜在的 lncRNA 的顺式调控基因，课题组筛选了这些差异表达 lncRNA 上游和下游 100 kb 范围内的染色体相关基因。根据以上介绍的标准，发现很多新的 lncRNA 可以顺式调控基因的表达。

lncRNA 参与一些生物途径可能与转录因子有关。Pearson 相关分析预测与前 200 个差异表达的 lncRNA 所相关的转录因子。进一步计算转录因子与 lncRNA 的相关性，发现 TAF7、E2F4、KAT2A、TBP、BCLAF1 和 GTF2F1 是最丰富的转录因子。为了进一步探索 lncRNA 的转录调节功能，通过 Cytoscape 软件对前 100 对 lncRNA-转录因子调控制作更为直观的可视化核心网络图，按照 *P* 值从小到大排序，二元关系网络图使用前 100 行的调控关系作图(图4A)，三元关系网络图取前 10 行的调控关系作图(图4B)。该图显示这些转录因子可以调节很多 lncRNA 的表达。

3　讨论

ATRA 对肿瘤细胞的增殖具有很好的抑制作用，并且还可以诱导其分化。但是 ATRA 具有很多副作用，如耐药、维甲酸综合征等，这大大限制了它的使用。为了避免这些副作用，本课题组前期对 ATRA 进行结构改造，合成了一系列的维甲酸衍生物，经过前期的药效学筛选，发现 ATPR 可以在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖并且诱导其分化，如 K562 细胞[4]、NB4 细胞[5]。lncRNA 由于不具有编码任何蛋白质的能力，一直被认为是基因转录的副产物或者噪音，但有研究[10]表明 lncRNA 与肿瘤的发生发展密切相关。因此 lncRNA 的研究逐渐成为白血病基因组学的新领域，lncRNA 是否可以成为 ATPR 治疗白血病的新靶点有待深入研究。这对于白血病的治疗具有重要意义。

本研究通过分析基因芯片测序 ATRA 和 ATPR 作用于 NB4 细胞后的基因表达谱，经筛选得到一批差异表达的 lncRNA，其可能成为白血病治疗的新靶点。经进一步的研究表明，与 ATRA 比较，ATPR 可能是通过 poly (A) RNA binding、receptor activity、protein binding、MAP kinase tyrosine phosphatase activity、heparin binding 等生物学过程发挥作用。KEGG 信号通路富集分析结果显示，Notch 信号通路与 ATPR 在白血病治疗中的表观遗传机制密切相关，提示 ATPR 很有可能通过 Notch 信号通路治疗白血病。同时，为了进一步探究这些 lncRNA 在白血病中的调控方式，利用 Cytoscape 软件构建相关 lncRNA 的可视化网络图来分析其反式调控情况，结果显示，E2F4、TAF7、KAT2A、TBP、BCLAF1、GTF2F1 等转录因子对相关 lncRNA 具有一定的调控作用，这些转录因子在 ATPR 对白血病的治疗过程中发挥重要作用。

E2F4 作为转录抑制因子，是属于 E2F 转录因子家族的一员，它在细胞周期阻滞过程中发挥非常重要作用[11]。Feng et al[12]研究也表明 E2F4 与白血病的发生发展密切相关。Khaleel et al[13]发现 E2F4 高表达会加重乳腺癌患者的病情，缩短存活期。研究[14]结果还显示转录因子 TAF7 在调节转

录起始过程中也发挥重要作用。但是其仍需在癌症领域进行更深层次探究。基于此,本课题组后续将研究在 ATPR 治疗白血病过程中,相关转录因子和 lncRNA 之间的调控机制。

综上所述,ATPR 可以通过改变 lncRNA 的表达水平来调节细胞生长增殖、诱导细胞分化和凋亡等过程。这些 lncRNA 可能与 ATPR 抑制 NB4 细胞增殖并诱导其分化及其耐药机制有关。

参考文献

[1] Dhar A K,Barman P K. Retinoic acid proteomics syndrome-cardiac complication [J]. J Assoc Physicians India,2012,60:63 - 5.

[2] Tomita A,Kiyoi H,Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As2O3) in acute promyelocytic leukemia [J]. Int J Hematol,2013,97(6):717 - 25.

[3] 阮晶晶,陈飞虎,徐 佼,等. 新型维甲酸衍生物诱导 NB4 细胞分化的初步研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(11):1237 - 42.

[4] 阮晶晶,陈飞虎,徐 佼,等. 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯对 K562 细胞分化和细胞周期的影响 [J]. 中国药理学通报,2009,25(9):1238 - 43.

[5] 雷 静,陈飞虎,葛金芳,等. 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 诱导分化作用及可能的机制研究 [J]. 中国药理学通报,2015,31(7):973 - 9.

[6] Wang X,Arai S,Song X,et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA binding proteins in cis to inhibit transcription [J]. Nature,2008,454(7200):126 - 30.

[7] Tsai M C,Spitale R C,Chang H Y. Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression [J]. Cancer Res,2011,71(1):3 - 7.

[8] Dey B K,Mueller A C,Dutta A. Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation,development,and disease [J]. Transcription,2014,5(4):e944014.

[9] 余志龙,戎泽印,罗 再,等. 基于高通量测序对人胃癌组织长链非编码 RNA 差异表达的分析 [J]. 上海交通大学学报(医学版),2019,39(9): 955 - 62.

[10] Prensner J R,Chinnaiyan A M. The emergence of lncRNAs in cancer biology [J]. Cancer Discovery,2011,1(5): 391 - 407.

[11] Hsu J,Sage J. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease [J]. Cell cycle,2016,15(23):3183 - 90.

[12] Feng Y B,Li L L,Du Y,et al. E2F4 functions as a tumour suppressor in acute myeloid leukaemia *via* inhibition of the MAPK signalling pathway by binding to EZH2 [J]. J Cell Mol Med,2020,24(3):2157 - 68.

[13] Khaleel S S,Andrews E H,Ung M,et al. E2F4 regulatory program predicts patient survival prognosis in breast cancer [J]. Breast Cancer Research,2014,16(6):486.

[14] Gegonne A,Weissman J D,Zhou M,et al. TAF7: a possible transcription initiation check-point regulator [J]. Proc Nat Acad of Sci USA,2006,103(3):602 - 7.

Preliminary identification and analysis of lncRNA during differentiation of NB4 cells induced by ATPR based on transcriptome sequencing

Feng Yubin[1,2],Hu Shuang[1],Li Lanlan[1],et al

([1]*School of Pharmacy,Anhui Medical University,Hefei* 230032; [2]*Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei* 230031)

Abstract ***Objective*** To explore the potential mechanism of differentiation of human acute promyelocytic leukemia NB4 cells induced by a new retinoic acid derivative 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinoate (ATPR). ***Methods*** After the differentiation of NB4 cells induced by ATPR and all *trans* retinoic acid (ATRA),we analyzed the long-chain non-coding RNA (lncRNA) and mRNA expression profile of the treated cells with gene chip technology. ***Results*** The results showed that 775 lncRNAs and 904 mRNAs were screened in the ATRA group compared with the ATRA group,and the chromosomal location of some key lncRNAs was analyzed by cis regulatory genes. The results of *trans* analysis showed that the related transcription factors could regulate the expression of lncRNA. ***Conclusion*** In conclusion,lncRNA plays an important role in the differentiation of NB4 cells induced by ATPR.

Key words ATPR; NB4 cells; gene chip technology; lncRNA