

# miR-34b-5p 上调抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤的侵袭及 RhoA/ROCK 信号通路

李敬东, 韩效林, 杨 翠, 高攀科, 陈小双, 梁勇会

**摘要** 目的 研究 miR-34b-5p 过表达对弥漫大 B 细胞淋巴瘤的生长和运动以及 RhoA/ROCK 信号通路的影响。方法 选择弥漫大 B 细胞淋巴瘤系中 SU-DHL-4 细胞进行研究。建立空白对照组、空载体转染组、miR-34b-5p 转染组, 采用 qRT-PCR 检测 miR-34b-5p 的表达量, 采用菌落形成实验、流式细胞术和 Transwell 试验检测细胞增殖、凋亡及侵袭能力; 采用 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin Vimentin、RhoA 和 ROCK 蛋白的表达量。结果 在转染 miR-34b-5p 的细胞内, miR-34b-5p 的表达量上调。miR-34b-5p 过表达能抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 减轻细胞侵袭, 抑制 RhoA/ROCK 信号通路。结论 miR-34b-5p 过表达可以抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤的生长和运动以及 RhoA/ROCK 信号通路。

**关键词** miR-34b-5p; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 增殖; 凋亡; 侵袭; RhoA/ROCK 信号通路

**中图分类号** R 733.41

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0186-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.004

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 是一种高度异质性的恶性淋巴瘤。治疗 DLBCL 的标准方案是每 21 天进行 1 次利妥昔单抗、泼尼松、阿霉素、长春新碱和环磷酰胺的化学免疫疗法 (rituximab, prednisone, doxorubicin, vincristine and cyclophosphamide, R-CHOP)<sup>[1-2]</sup>。根据国际预后指数 (international prognostic index, IPI) 判断预后, 对于 IPI 风险评分低级的患者, R-CHOP 的治愈率超过 80%, 但在 IPI 风险评分高和中级的患者中, 预后仍不理想<sup>[3]</sup>。同时由于耐药性的快速出现, 导致有 30% ~ 40% 的患者复发<sup>[4]</sup>。先前研究<sup>[5]</sup>表明, 微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 能够参与调节癌细胞的恶性生物学行为。已经确定 miR-34 是关键的抑癌基因, 其靶基因参与了耐药机

制的形成, 同时耐药癌细胞中低水平的 miR-34 被升高, 化疗药物的敏感性被恢复<sup>[6]</sup>。并且研究表明在甲状腺癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>和炎症相关肠癌<sup>[9]</sup>中 miR-34b-5p 表达量均下降。该研究主要检测 miR-34b-5p 过表达是否对 SU-DHL-4 细胞增殖、侵袭、凋亡及 RhoA/ROCK 信号通路有影响。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养与处理** DLBCL SU-DHL-4 细胞购自中国科学院的细胞库, 并用含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 进行培养于 37 °C 生长。miR-34b-5p mimic 和 mimic-NC 根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine 2000 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 转染到 SU-DHL-4 细胞。

**1.2 总 RNA 提取、反转录和荧光定量** 使用 TRIzol 从 SU-DHL-4 细胞提取总 RNA, 提取的总 RNA 首先去除基因组中的 DNA, 然后进行反转录, 以上步骤按照产品说明书进行操作。荧光定量检测反应体系: 5 μl 的 SYBR Premix, 各 0.5 μl 的上游引物和下游引物, 3 μl 的 RNase Free dH<sub>2</sub>O, 1 μl 的 cDNA。程序: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。扩增完成后进行溶解曲线分析: 95 °C 维持 10 s, 65 °C 处理 1 s, 此后从 65 °C 开始, 每 1 个循环温度增加 0.5 °C, 时间为 1 s。

**1.3 菌落形成实验** 将 SU-DHL-4 细胞转染 miR-34b-5p mimic 和 miR-NC 进行处理, 在无毒培养基中培养大约 14 d。用冷的甲醇-冰醋酸固定细胞, 并用结晶紫染色。

**1.4 流式细胞术** 流式细胞仪检测 SU-DHL-4 细胞凋亡, 采用 Annexin V-荧光素 (Annexin V-luciferin, AV) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 流式细胞术检测不同处理 SU-DHL-4 细胞的凋亡率。刺激后, 用 PBS 洗涤细胞, Annexin V-FITC 和 PI 在室温黑暗中孵育 15 min。流式细胞术使用 FACScan 流式细胞仪 (美国

2020-07-25 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (编号: 201602152)

作者单位: 新乡医学院第一附属医院血液科, 新乡 453100

作者简介: 李敬东, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail:

xykljd2020@163.com

Beckman Coulter 公司) 进行流式分析, 数据使用 FlowJo 软件 (美国 Ashland 公司) 进行分析。

**1.5 Western blot** SU-DHL-4 细胞处理后, 将细胞用裂解缓冲液裂解在 4 ℃ 并以 14 000 r/min 离心 15 min。蛋白质浓度由 BCA 蛋白定量检测盒 (中国上海碧云天生物有限公司) 测量。取 20 μg 总蛋白在 12% SDS-PAGE 并转移至 PVDF 膜。将膜在 37 ℃ 下用 1 h 封闭 5% 的牛血清白蛋白, 然后与抗 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、RhoA 和 ROCK 在 4 ℃ 过夜。用 TTBS 洗涤后缓冲液 (含 Tween-20 的 Tris 缓冲盐水), 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (二抗) 37 ℃ 反应 1 h; 洗膜后 ECL 曝光成像并应用 quantity one 软件分析蛋白条带的灰度值。

**1.6 Transwell 实验** 用不含血清的 DMEM 将接种  $5 \times 10^4/200 \mu\text{l}$  SU-DHL-4 细胞在 transwell 室上部。下腔室充满 500 μl 10% FBS DMEM。孵育 24 h 后, 将下腔室中的细胞固定在 95% 乙醇中, 然后用苏木精染色。在倒置显微镜下计算细胞的侵袭数量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组之间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-34b-5p 过表达对 DLBCL SU-DHL-4 细胞增殖的影响** SU-DHL-4 细胞分别转染 mimic-NC 和 miR-34b-5p mimic, RT-qPCR 检测 miR-34b-5p mRNA 的表达量。结果表明, 转染 miR-34b-5p 组中 miR-34b-5p 的表达量上调  $[(0.99 \pm 0.06) \text{ vs } (65.13 \pm 11.31)]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 9.474$ ,  $P < 0.01$ )。菌落形成实验结果表明, miR-34b-5p 的过表达能抑制 SU-DHL-4 细胞的增殖  $[(55.74 \pm 9.12) \% \text{ vs } (11.42 \pm 6.19) \%]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 10.273$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。提示 miR-34b-5p 过表达能抑制 DLBCL SU-DHL-4 细胞增殖。

**2.2 miR-34b-5p 过表达对 DLBCL SU-DHL-4 细胞凋亡的影响** 通过流式细胞术检测细胞的凋亡, 结果表明在细胞转染 miR-34b-5p 组中细胞凋亡率上调  $[(4.91 \pm 1.71) \% \text{ vs } (28.80 \pm 4.52) \%]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 9.860$ ,  $P < 0.01$ )。通过 Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白的含量, 结果表明 Bax / Bcl-2 的比值在细胞转染 miR-34b-5p 组中上调  $[(0.04 \pm 0.02) \text{ vs } (5.82 \pm 0.61)]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 8.387$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2。提示 miR-34b-

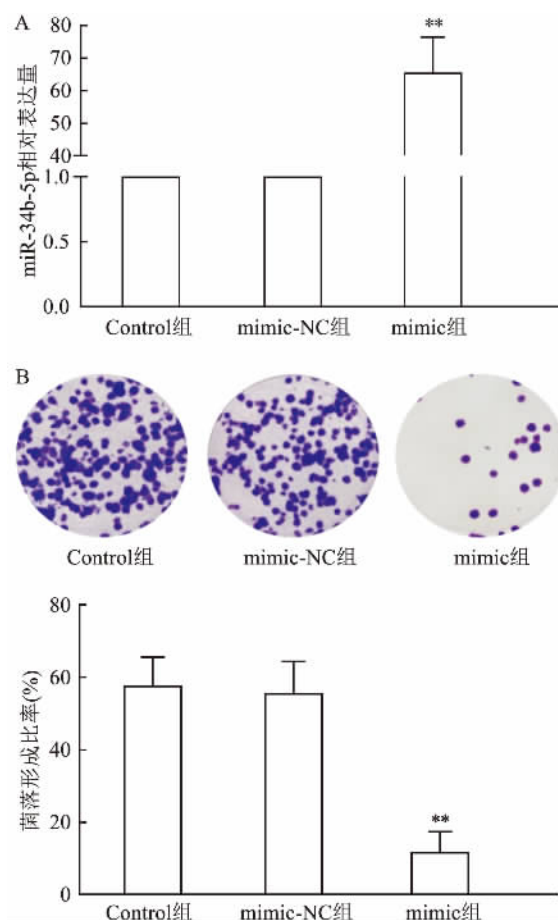


图1 菌落形成实验检测 SU-DHL-4 细胞增殖

A: qRT-PCR 检测 miR-34b-5p mRNA 的转录表达量; B: 菌落形成实验检测细胞增殖; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

5p 过表达能够促进 DLBCL SU-DHL-4 细胞凋亡。

**2.3 miR-34b-5p 过表达对 DLBCL SU-DHL-4 细胞侵袭的影响** 通过 Transwell 检测细胞侵袭力, 结果表明在细胞转染 miR-34b-5p 组中细胞侵袭下调  $[(43.74 \pm 8.55) \text{ vs } (9.19 \pm 6.01)]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 6.503$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。提示 miR-34b-5p 过表达对抑制 DLBCL SU-DHL-4 细胞侵袭。

**2.4 miR-34b-5p 过表达对 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 表达的影响** miR-34b-5p 过表达时 E-cadherin 基因的蛋白表达水平升高  $[(0.05 \pm 0.02) \text{ vs } (0.54 \pm 0.09)]$ , 差异有统计学意义 ( $t = 4.935$ ,  $P < 0.05$ ), 而 N-cadherin 和 Vimentin 基因的蛋白表达水平下降 [N-cadherin:  $(0.32 \pm 0.07) \text{ vs } (0.06 \pm 0.04)$ ; Vimentin:  $(0.41 \pm 0.08) \text{ vs } (0.04 \pm 0.02)$ ], 差异有统计学意义 (N-cadherin:  $t = 4.851$ ,  $P < 0.05$ ; Vimentin:  $t = 9.236$ ,  $P < 0.05$ )。见图 4。提示 miR-34b-5p 过表达能够抑制 DLBCL SU-DHL-4 细胞侵袭。

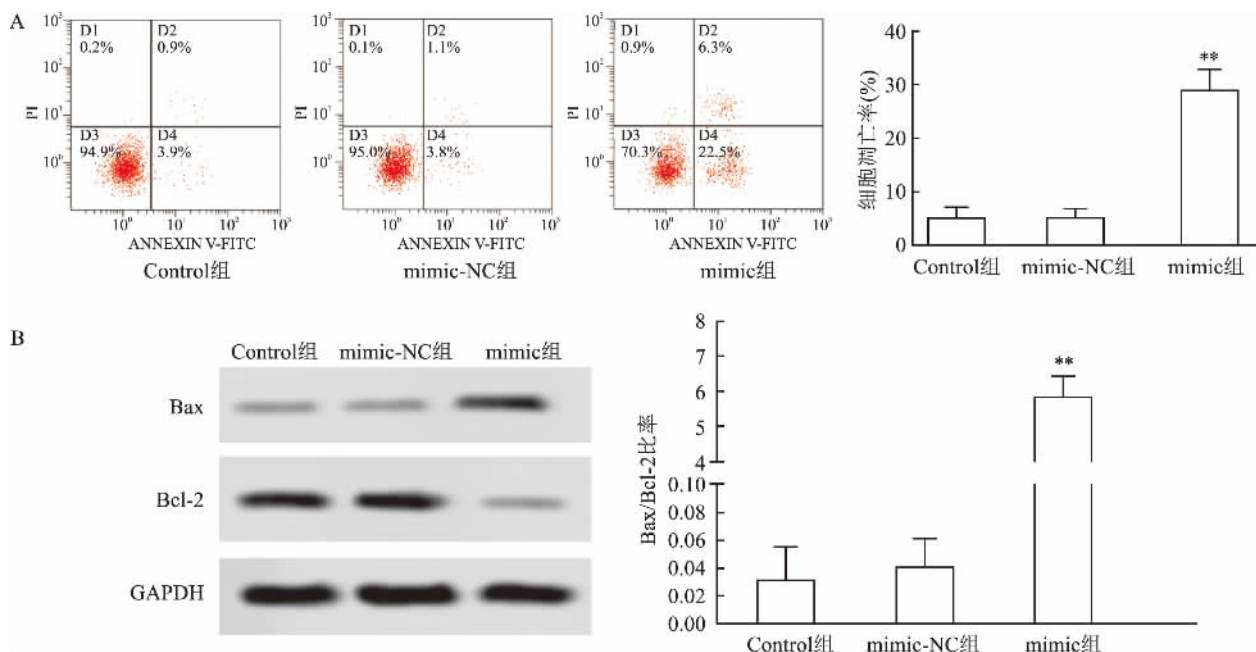


图2 细胞凋亡检测

A: 流式细胞术检测 SU-DHL-4 细胞的凋亡状态; B: Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达量; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

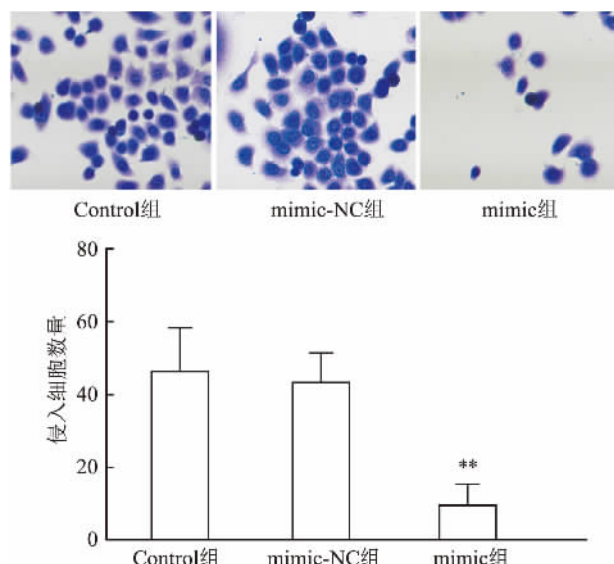


图3 Transwell 试验

与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.5 miR-34b-5p 过表达对 RhoA/ROCK 信号通路的影响** 结果表明 miR-34b-5p 过表达时 RhoA 和 ROCK 蛋白的表达水平下降 [RhoA: ( $0.88 \pm 0.09$ ) vs ( $0.03 \pm 0.01$ ); ROCK: ( $0.93 \pm 0.13$ ) vs ( $0.07 \pm 0.04$ )], 差异有统计学意义 (RhoA:  $t = 11.091$ ,  $P < 0.05$ ; ROCK:  $t = 28.622$ ,  $P < 0.05$ )。见图 5。提示 miR-34b-5p 过表达能够抑制 RhoA/ROCK 信号通路。

### 3 讨论

DLBCL 是一种恶性淋巴瘤,影响所有年龄段的患者,临床表现广泛。R-CHOP 治疗方案在治疗 DLBCL 上取得一定的成果,但同时也出现一些棘手的问题,比如耐药性产生导致预后不良、严重病患治愈率差等。目前,miRNA 在诊断和治疗 DLBCL 扮演着很重要的角色。研究表明 miR-214 过表达可通过靶向目的基因 PD-L1 抑制 OCI-Ly3 细胞活力和侵袭性并诱导细胞凋亡,从而抑制 DLBCL 的进展。同时,miR-214 通过调节 IL-10、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的表达,靶向目的基因 PD-L1 来调节 DLBCL 的免疫反应<sup>[10]</sup>。最重要是研究表明 miR-34b 基因甲基化可能导致该基因转录表达沉默,是 DLBCL 发生发展的促进因素<sup>[11]</sup>。本研究通过在 SU-DHL-4 细胞转染 miR-34b-5p,结果表明 miR-34b-5p 的过表达能抑制 SU-DHL-4 细胞的增殖和侵袭,并诱导细胞凋亡,从而抑制 DLBCL 的发展进程。

E-cadherin 是 calcium-dependent 跨膜糖蛋白,位于上皮组织,是细胞黏附分子和信号转导因子的组成部分,可以直接与蛋白复合物或与肌动蛋白细胞骨架结合形成  $\beta$ -连环蛋白,从而预防和减少肿瘤细胞黏附。N-cadherin 也是 cadherin 家族中重要的组成部分。Vimentin 也是一种细胞骨架蛋白,在正常的上皮细胞中不表达,但广泛分布于成纤维细胞、

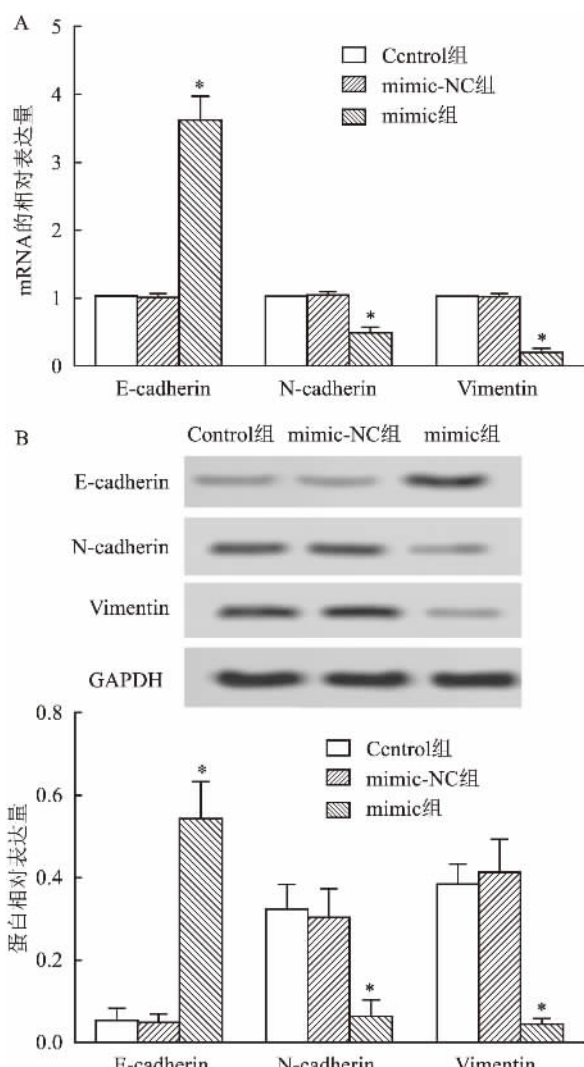


图4 膜蛋白测定

A: qRT-PCR 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的转录表达量; B: Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白的表达量; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$

内皮细胞和间质细胞的淋巴细胞中。研究发现, Vimentin 在多种上皮性肿瘤中存在异常表达, 并与癌细胞的分化、侵袭和转移密切相关<sup>[12]</sup>。本研究结果表明 miR-34b-5p 过表达导致 E-cadherin 基因和蛋白的表达水平升高, 而 N-cadherin 和 Vimentin 基因的蛋白的表达水平下降。miR-34b-5p 过表达可抑制 SU-DHL-4 细胞分化、侵袭和转移。

ROCK 是 GTPase 蛋白 RhoA 的下游效应子。ROCK 家族是由 ROCK1 和 ROCK2 组成的, 在肌动蛋白细胞骨架的组织中起着核心作用, 并参与多种基本的细胞功能, 例如收缩、黏附、迁移、增殖和凋亡等<sup>[13]</sup>。Rho/ROCK 信号通路在癌症侵袭和转移中起着关键作用。已知 Rho 家族的 GTPase 蛋白可以

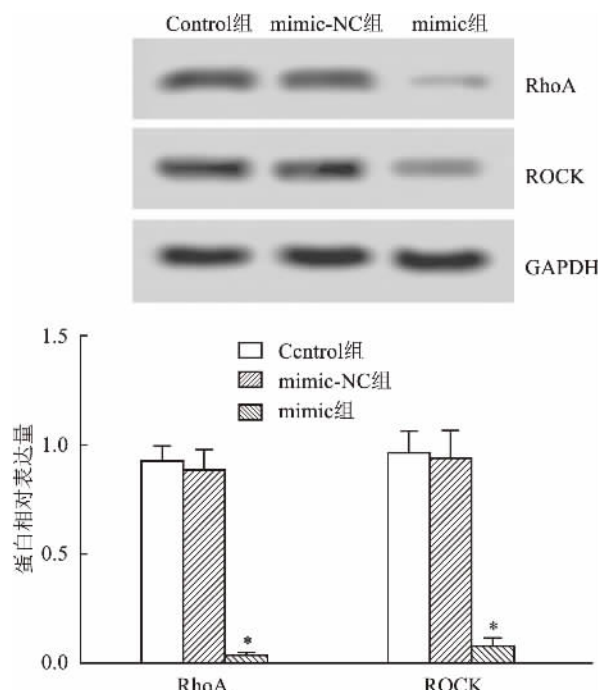


图5 RhoA 和 ROCK 信号蛋白测定

A: Western blot 检测 RhoA、ROCK 蛋白的表达量; B: RhoA、ROCK 蛋白的表达的柱状图; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$

重组细胞骨架并通过激活 ROCK 从而调节细胞迁移<sup>[14]</sup>。研究表明, 运用溶血磷脂酸协同激活 Rho / ROCK 信号通路从而刺激卵巢癌发展进程<sup>[15]</sup>。本研究结果表明 miR-34b-5p 过表达时 RhoA 和 ROCK 蛋白的表达水平下降, 说明该通路未被激活, 从而减轻 SU-DHL-4 细胞的侵袭力。

综上所述, 本研究发现 miR-34b-5p 过表达抑制 SU-DHL-4 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡, 同时抑制 RhoA/ROCK 信号通路。因此, miR-34b-5p 有望成为治疗 DLBCL 的新靶点。本研究仅为体外细胞试验和机制的初步探讨, 体内试验有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma [J]. The New England Journal of Medicine, 2002, 346(4): 235-42.
- [2] Moccia A A, Thieblemont C. Curing diffuse large B-cell lymphomas in elderly patients [J]. Eur J Intern Med, 2018, 58: 14-21.
- [3] Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International

- Trial (MINT) Group [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(5): 379–91.
- [4] Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte [J]. *Blood*, 2010, 116(12): 2040–5.
- [5] Larrabeiti-Etxebarria A, Lopez-Santillan M, Santos-Zorroza B, et al. Systematic review of the potential of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(2): 144.
- [6] Ghandadi M, Sahebkar A. MicroRNA-34a and its target genes: key factors in cancer multidrug resistance [J]. *Curr Pharm Design*, 2016, 22(7): 933–9.
- [7] Marof H, Islam F, Dong L, et al. Liposomal delivery of miR-34b-5p induced cancer cell death in thyroid carcinoma [J]. *Cells*, 2018, 7(12): 265.
- [8] Dong L, Chen F, Fan Y, et al. MiR-34b-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting ARHGAP1 in breast cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(1): 269–80.
- [9] Yang C, Lu W, He H, et al. Inflammation and DNA methylation-dependent down-regulation of miR-34b-5p mediates c-MYC expression and CRL4(DCAF4) E3 ligase activity in colitis-associated cancer [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(3): 674–88.
- [10] Sun J R, Zhang X, Zhang Y. MiR-214 prevents the progression of diffuse large B-cell lymphoma by targeting PD-L1 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 68.
- [11] 王丽丽, 陈云昭, 胡文浩, 等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 miR-34b 基因甲基化改变及其意义 [J]. *农垦医学*, 2010, 32(4): 292–6.
- [12] Zhou J, Tao D, Xu Q, et al. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 3150–4.
- [13] Wei L, Surma M, Shi S, et al. Novel insights into the roles of Rho kinase in cancer [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016, 64(4): 259–78.
- [14] Genda T, Sakamoto M, Ichida T, et al. Cell motility mediated by rho and Rho-associated protein kinase plays a critical role in intra-hepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 1999, 30(4): 1027–36.
- [15] Jeong K J, Park S Y, Cho K H, et al. The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion [J]. *Oncogene*, 2012, 31(39): 4279–89.

## Up-regulation of miR-34b-5p inhibits invasion of diffuse large B lymphoma and RhoA/ROCK signaling pathway

Li Jingdong, Han Xiaolin, Yang Cui, et al

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100)

**Abstract** *Objective* To study the effect of miR-34b-5p Up-regulation on the invasion of diffuse large B cell lymphoma and the RhoA/ROCK signaling pathway. *Methods* SU-DHL-4 cells were selected for study in diffuse large B lymphoma lines. A blank control group, an empty vector transfection group, and a miR-34b-5p transfection group were established. The expression of miR-34b-5p was detected by qRT-PCR. Cell proliferation, apoptosis and invasive were tested by colony formation assay, flow cytometry and Transwell test respectively. Western blot was used to detect the proteins expression levels of E-cadherin, N-cadherin Vimentin, RhoA and ROCK. *Results* miR-34b-5p expression was significantly up-regulated in cells transfected with miR-34b-5p. miR-34b-5p overexpression inhibited SU-DHL-4 cells proliferation, enhanced SU-DHL-4 cells apoptosis, reduced SU-DHL-4 cells invasion, and inhibited the RhoA/ROCK signaling pathway. *Conclusion* miR-34b-5p overexpression inhibits the growth and motility of diffuse large B cell lymphoma and the expression of RhoA/ROCK signaling pathway.

**Key words** miR-34b-5p; diffuse large B cell lymphoma; proliferation; apoptosis; invasion; RhoA/ROCK signaling pathway