

HOTAIR 在急性髓细胞性白血病中的表达及其对柔红霉素耐药的作用机制

陈玲琳¹, 熊术道¹, 高申孟²

摘要 目的 探究长链非编码 RNA(LncRNAs) HOTAIR 在急性髓细胞白血病(AML)中的表达,以及 AML 细胞对柔红霉素(DNR)耐药的分子机制。方法 qRT-PCR 检测 AML 细胞株、AML 患者骨髓标本、对照组骨髓标本 HOTAIR 的表达水平。选取 U937 细胞和 THP1 细胞为研究对象,构建 HOTAIR 基因的 shRNA 载体,分别转染两株细胞,qRT-PCR 检测 HOTAIR 基因表达水平,Western blot 检测 P-糖蛋白的表达。DNR(0.1 μmol/L)处理细胞株,CCK-8 试验检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 AML 细胞株与 AML 患者骨髓中,HOTAIR 的表达水平明显高于对照组;成功下调 HOTAIR 在 U937 细胞和 THP1 细胞中表达,P-糖蛋白水平随之降低,成功下调 HOTAIR 的 U937 细胞和 THP1 细胞联合 DNR 有利于抑制细胞增殖、促进细胞凋亡。结论

AML 中,HOTAIR 的异常表达参与对 DNR 的耐药机制形成。

关键词 急性髓细胞性白血病;HOTAIR;P-糖蛋白;柔红霉素中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1676-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.006

急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一组由染色体易位和(或)体细胞突变等多种遗传异常引起的造血系统恶性肿瘤^[1]。长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNAs)是非编码 RNA 的一种,是转录本长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNAs^[2]。HOX 转录反义 RNA(HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)是第 1 个被发现具有反式作用的 LncRNAs 基因^[3]。研究表明,HOTAIR 表达水平上调不但与多种肿瘤包括乳腺癌^[4]、宫颈癌^[5]、AML^[6] 等的发生相关,还与肿瘤细胞的耐药密切相关^[7]。与柔红霉素(daunorubicin, DNR)联合

用药是 AML 化疗的重要方案,研究^[8]表明临床上 DNR 耐药情况递增。因此,了解 AML 对 DNR 耐药机制有助于改善疾病的治疗。而有关 HOTAIR 与 AML 耐药的相关研究未见报道。该研究选取 U937 和 THP1 耐药细胞株为研究对象,以 shRNA 作为病毒载体下调细胞中的 HOTAIR 表达,同时检测 AML 细胞对 DNR 的耐药,探讨相关的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 AML 细胞株(HL60、THP1、U937、KG1、Kasumi-1、NB4、HEL、Kasumi-3、U937、THP1)及 293T 细胞株为温州医科大学附属第一医院内科实验室保种。AML 患者来源的骨髓单个核细胞 50 例(AML 原代细胞)、正常捐献者骨髓单个核细胞 10 例均来源于 2017 年 5 月~2018 年 10 月温州医科大学附属第一医院血液科,标本采集前通过温州医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准及患者知情同意。分型标准参照 French-American-British(FAB)标准,明确诊断为 AML。RPMI 1640 培养液、DMEM 培养液、青霉素链霉素溶液购自美国 Gibco 公司;PCR 引物购自上海尼桑生物科技有限公司;Actin 抗体与 P-糖蛋白抗体购自美国 Bio-Rad 公司;qRT-PCR 仪、RT-PCR 试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司;DNR 购自美国 MedChemExpress 公司;流式 AnnexinV/PI 试剂购自美国 Becton-Dickinson 公司;流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司;optiMEN、X-gene 9 购自瑞士罗氏公司;sh-NC 载体、sh-HOTAIR 载体购自美国 Promega 公司。

1.2 细胞培养 293T 细胞培养使用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基;U937 细胞、THP1 细胞使用含 10% 胎牛血清 1640 培养基;37 °C、5% CO₂ 条件下培养,每 48 h 换液、传代 1 次。

1.3 病毒包被 取 470 μl optiMEN、30 μl X-gene 9、sh-NC 载体、sh-HOTAIR 载体以及辅助质粒 Gap-pol 和 VSVG,共同转入 293T 细胞,培养 6 h 后弃上清液,加入新鲜完全培养液。收集培养后 48、72 h

2020-08-31 接收

基金项目:浙江省自然科学基金(编号:LY19H080001)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院血液科,合肥 230601

²温州医科大学附属第一医院内科实验室,温州 325000

作者简介:陈玲琳,女,硕士研究生;

熊术道,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xshdao@ahmu.edu.cn

上清液。两次上清液以 2 000 r/min 离心 10 min, 0.45 μ m 过滤器过滤, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.4 载体转染 U937 与 THP1 细胞以 5×10^5 /ml 浓度 0.5 ml 铺 6 孔板, 分别加入 sh-NC、sh-HOTAIR 病毒上清液 3 ml, 1 500 r/min 离心 2 h, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 48 h 后, 加入嘌呤霉素筛选 7 d。

1.5 Western blot 检测 P-糖蛋白 载体转染后细胞经计数取等量活细胞, 离心弃上清加含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提蛋白, 用 BAC 试剂盒进行蛋白定量, 加 5 \times 蛋白上样缓冲液混匀变性。10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质 140 V \times 40 min, 电泳后转移到聚偏二氟乙烯膜 220 mA \times 1.5 h, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 清洗后各自孵育 P-糖蛋白 (1 : 2 000) 与 Actin (1 : 5 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜。弃一抗, TBST 清洗 3 次, 室温孵育相应 HRP-标记的相应二抗 1 h, TBST 清洗 3 次, 加 ECL 试剂并上机显影。

1.6 qRT-PCR 检测 HOTAIR 的表达 标本用 TRIzol 提取总 RNA 经过逆转录得到相应 cDNA, 以 GAPDH (上游引物: 5'-GGTCGGAGTCAACG-GATTG-3', 下游引物: 5'-ATGAGCCCCAGCCT-TCTCCAT-3') 为内参, 40 个循环 qRT-PCR 对其中的 HOTAIR (上游引物: 5'-AAAAGAGAGGGGTGG-GAAGG-3', 下游引物: 5'-CCGAAAT-CAGGGCAGAATG-3') 的表达进行检测, 上述引物由上海尼桑生物科技有限公司设计合成。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值分析结果。

1.7 细胞增殖抑制实验 将转染后细胞接种于 96 孔板, 密度为 10^4 个/孔, 体积为 100 μ l。每孔的 DNR 终浓度为 0.1 μ mol/L, 重复 3 孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后, 每孔加 10 μ l CCK-8 试剂, 避光孵育 2 h, 450 nm 检测各组吸光度。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡 将转染后的细胞接种于 6 孔板中, 加 DNR 终浓度为 0.1 μ mol/L 为实验组, 不加药组对照组, 每株细胞重复 3 孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后, 加试剂避光孵育后检测。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOTAIR 在 AML 标本及细胞株中表达 选取 AML 细胞系、AML 患者骨髓单个核细胞、正常捐献者骨髓。提 RNA 逆转录, qRT-PCR 检测 HOTAIR 的表达。实验结果表明, 与对照组 (10.70 ± 2.85)

比较, AML 细胞系 HOTAIR (30.50 ± 8.39) 表达上调, 差异有统计学意义; 与对照组 (10.77 ± 3.20) 比较, AML 原代细胞 HOTAIR 的表达 (43.60 ± 6.39) 上调, 差异有统计学意义。见图 1。

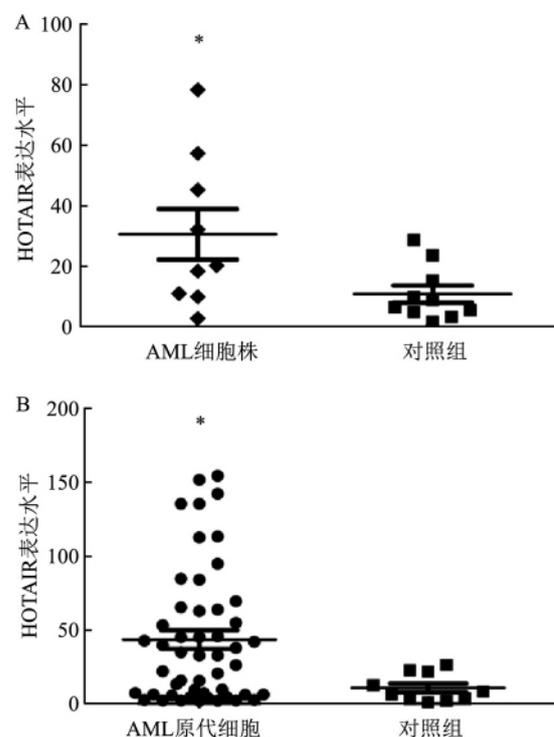


图 1 HOTAIR 在不同细胞中的表达

A: AML 细胞株和对照液中 HOTAIR 的各自表达水平; B: AML 原代细胞和对照液中 HOTAIR 的各自表达水平; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 DNR 对 AML 细胞增殖影响 终浓度为 0.1 μ mol/L 的 DNR 处理 24 h 后, sh-HOTAIR + THP1 组比 sh-NC + THP1 组增殖显著下降 ($t = 37.25$, $P < 0.001$), sh-HOTAIR + U937 组比 sh-NC + U937 组增殖显著下降 ($t = 29.47$, $P < 0.001$) (图 2), 提示在相

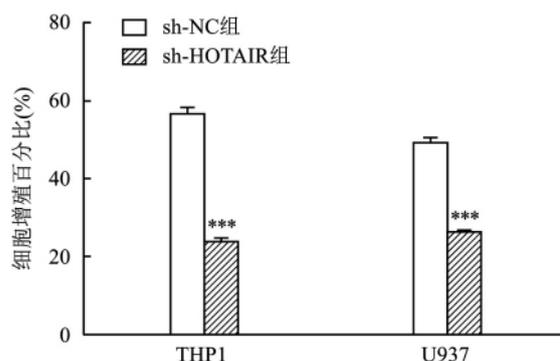


图 2 DNR 对不同细胞增殖的影响

与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$

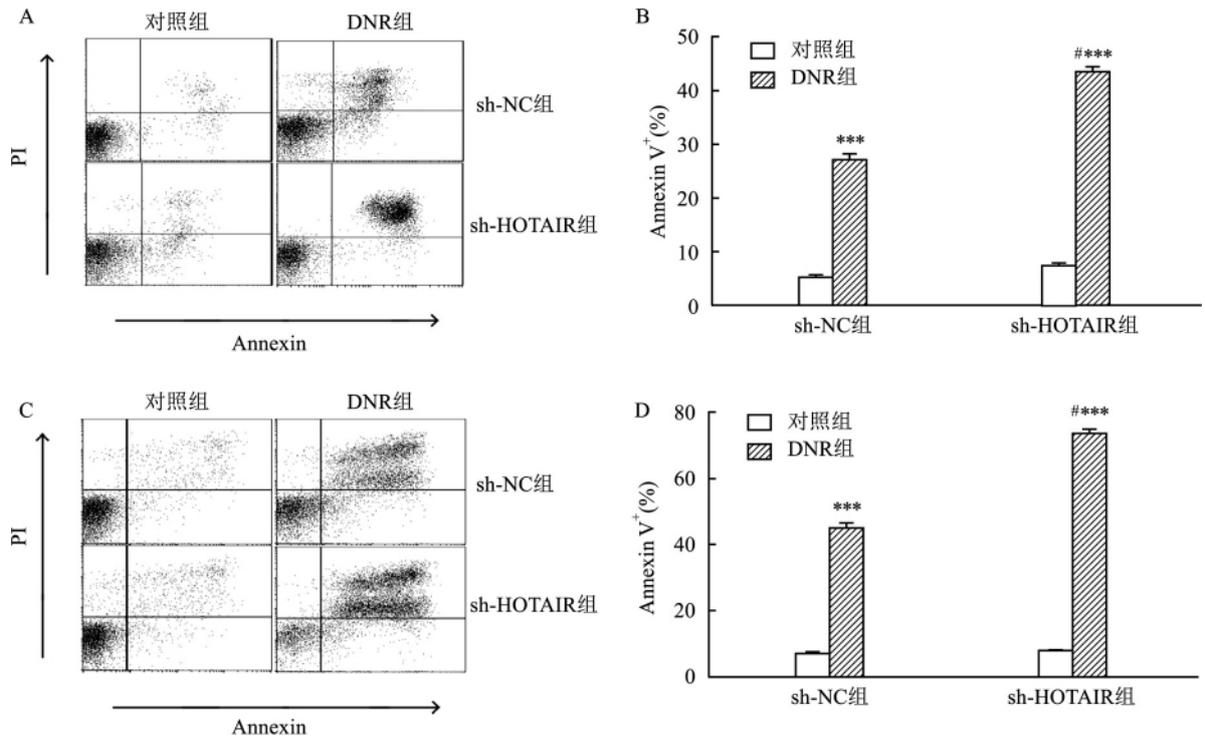


图3 沉默 HOTAIR 促进 DNR 对 AML 细胞凋亡

A: THP1 细胞 sh-NC 组与 sh-HOTAIR 组流式检测细胞凋亡; B: THP1 细胞 sh-NC 组与 sh-HOTAIR 组流式检测细胞凋亡统计图; C: U937 细胞 sh-NC 组与 sh-HOTAIR 组流式检测细胞凋亡; D: U937 细胞 sh-NC 组与 sh-HOTAIR 组流式检测细胞凋亡统计结果图; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 DNR + sh-NC 组比较: # $P < 0.05$

同的药物浓度下, sh-HOTAIR 组增殖低, HOTAIR 表达与药物敏感相关。

2.3 DNR 对 AML 细胞凋亡影响 转染好的细胞分两组, 不加药为对照组, 另一组加终浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ DNR 组。THP1 细胞, DNR + sh-NC 组细胞凋亡率高于对照 sh-NC 组 ($t = 18.77, P < 0.001$), DNR + sh-HOTAIR 组细胞凋亡率高于对照 sh-HOTAIR 组 ($t = 30.77, P < 0.001$), DNR + sh-HOTAIR 组细胞凋亡率高于 DNR + sh-NC 组 ($t = 10.75, P < 0.05$); U937 细胞, DNR + sh-NC 组细胞凋亡率高于对照 sh-NC 组 ($t = 28.60, P < 0.001$), DNR + sh-HOTAIR 组细胞凋亡率高于对照 sh-HOTAIR 组 ($t = 40.49, P < 0.001$), DNR + sh-HOTAIR 组细胞凋亡率高于 DNR + sh-NC 组 ($t = 15.33, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 干扰 HOTAIR 影响 P-糖蛋白的表达 HOTAIR 在 AML 中表达上调, 为研究其是否参与耐药, 本研究进一步沉默 HOTAIR 的表达 (图 4), 与 sh-NC + THP1 组 (56.30 ± 0.15) 比较, sh-HOTAIR + THP1 组 (23.88 ± 0.34) HOTAIR 表达显著下调; 与 sh-NC + U937 组 (49.99 ± 0.76) 比较, sh-HOTAIR +

U937 组 (25.81 ± 0.25) HOTAIR 表达显著下调; 观察 HOTAIR 对耐药蛋白 P-糖蛋白表达的影响, Western blot 结果表明, THP1 细胞, 与 sh-NC 组比较, sh-HOTAIR 组 P-糖蛋白表达明显下降 ($t = 87.21, P < 0.001$); U937 细胞, 与 sh-NC 组比较, sh-HOTAIR 组 P-糖蛋白表达明显下降 ($t = 81.39, P < 0.001$)。提示 P-糖蛋白表达与 HOTAIR 表达水平相关 (图 5)。

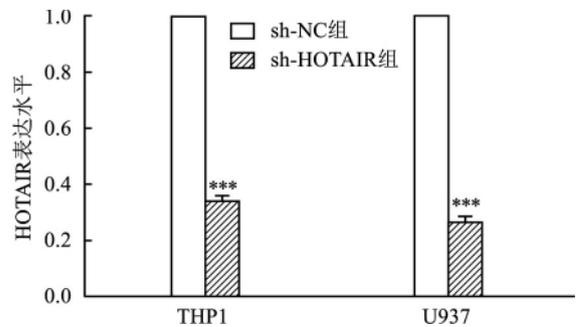


图4 沉默 HOTAIR 对 THP1、U937 细胞 HOTAIR 表达影响与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

AML 是常见的血液系统肿瘤, 除了早幼粒细胞

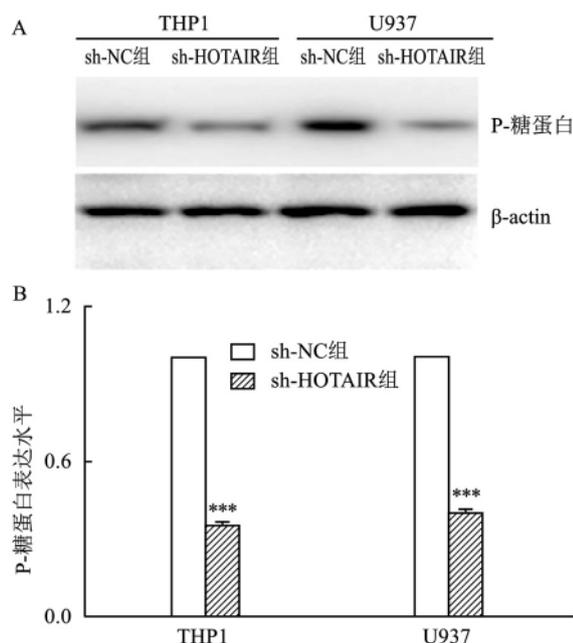


图5 sh-HOTAIR对细胞P-糖蛋白表达的影响

A: Western blot 法检测干扰 HOTAIR 表达对 P-糖蛋白相对表达水平的影响; B: 干扰 HOTAIR 表达对 P-糖蛋白相对表达量的影响; 与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$

白血病(M3)外,其他类型的AML目前仍无法治愈^[9],其中复发、耐药是AML重要死亡原因之一。DNR是AML化疗方案中的重要药物,然而,关于AML对DNR的耐药机制,尚未完全阐明。本研究显示HOTAIR在AML细胞表达明显上调,沉默HOTAIR表达及联合DNR不仅有利于抑制细胞增殖、促进细胞凋亡,而且可明显下调P-糖蛋白的表达。表明HOTAIR可能参与了AML的发生发展及耐药形成。本研究结果可能为AML的发生发展机制及药物靶向治疗提供新的研究基础及思路。

研究表明HOTAIR在AML中异常表达且与肿瘤耐药相关。本研究对原代AML细胞及其相关细胞株的研究显示HOTAIR在AML细胞表达明显上调,与Wu et al^[10]研究相似。

HOTAIR参与肿瘤耐药研究得到越来越多的关注。Cheng et al^[11]研究表明沉默HOTAIR胃癌细胞对顺铂的半数抑制浓度显著下降。Yang et al^[12]研究表明HOTAIR在非小细胞肺癌中表达上调并促进细胞对克唑替尼的耐药。抑制HOTAIR的表达促进慢性粒细胞白血病细胞对伊马替尼的敏感^[7],上述研究表明HOTAIR可能对细胞耐药起着关键作用。本研究显示,在终浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的DNR作用下,敲低HOTAIR表达,可以抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。表明敲低LncRNAs HOTAIR可有效提高

THP1与U937细胞对DNR的药物敏感性,提示HOTAIR可能参与了AML耐药。

人P-糖蛋白存在于正常组织胃肠道、肝脏和肾脏上皮细胞以及大脑的毛细血管、睾丸和卵巢中,P-糖蛋白充当了大脑、睾丸和卵巢的屏障,促进各器官排泄功能。P-糖蛋白由耐药基因MDR1编码,定位于细胞膜上,是ATP结合盒式(ATP binding cassette, ABC)膜转运蛋白超家族的成员,通过ATP释放能量将细胞内的药物泵出,降低胞内的药物浓度^[13]。Kong et al^[14]研究表明,上调肝癌细胞中HOTAIR表达,细胞的P-糖蛋白表达上升,诱导了肝癌细胞对药物耐药。本研究结果表明,沉默THP1与U937细胞中HOTAIR表达,细胞P-糖蛋白表达也相应下降;P-糖蛋白对DNR外排作用降低,致使细胞增殖下降。同样,在终浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的DNR作用下,敲低HOTAIR的表达,P-糖蛋白表达下降,DNR被泵出细胞的量减少,滞留细胞内的时间延长,对白血病细胞的作用增强,可以促进白血病细胞凋亡^[15]。因此,下调HOTAIR表达并协同DNR作用,进而促进细胞凋亡、抑制细胞增殖。

综上所述,本研究表明HOTAIR在AML中表达上调,抑制HOTAIR表达,可以下调P-糖蛋白的表达,促进AML耐药细胞株对DNR的敏感性,进而抑制AML细胞增殖,促进其发生凋亡。HOTAIR表达异常,参与了AML对DNR耐药作用及其机制,研究结果为AML对DNR耐药干预提供了新的潜在靶点。

参考文献

- [1] Meyer S C, Levine R L. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(9): e382-94.
- [2] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. Science, 2007, 316(5830): 1484-8.
- [3] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by non-coding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7): 1311-23.
- [4] Gupta R A, Shah N, Wang K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-6.
- [5] Lee M, Kim H J, Kim S W, et al. The long non-coding RNA HOTAIR increases tumour growth and invasion in cervical cancer by targeting the Notch pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44558-71.
- [6] Zhang Y Y, Huang S H, Zhou H R, et al. Role of HOTAIR in the diagnosis and prognosis of acute leukemia[J]. Oncol Rep,

- 2016 ,36(6) :3113 –22.
- [7] Wang H , Li Q , Tang S , et al. The role of long noncoding RNA HOTAIR in the acquired multidrug resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Hematology* ,2017 ,22(4) :208 –16.
- [8] Liu Y , Lei P , Qiao H , et al. miR-9 enhances the chemosensitivity of AML cells to daunorubicin by targeting the EIF5A2/MCL-1 axis [J]. *Int J Biol Sci* ,2019 ,15(3) :579 –86.
- [9] Lagunas-Rangel F A , Chavez-Valencia V , Gomez-Guijosa M A , et al. Acute myeloid leukemia-genetic alterations and their clinical prognosis [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* ,2017 ,11(4) :328 –39.
- [10] Wu S , Zheng C , Chen S , et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Oncol Lett* ,2015 ,10(4) :2410 –4.
- [11] Cheng C , Qin Y , Zhi Q , et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting the PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin signaling pathways by up-regulating miR-34a [J]. *Int J Biol Macromol* ,2018 ,107(Pt B) :2620 –9.
- [12] Yang Y , Jiang C , Yang Y , et al. Silencing of LncRNA-HOTAIR decreases drug resistance of non-small cell lung cancer cells by inactivating autophagy via suppressing the phosphorylation of ULK1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2018 ,497(4) :1003 –10.
- [13] Ambudkar S V , Kimchi-Sarfaty C , Sauna Z E , et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism [J]. *Oncogene* ,2003 ,22(47) :7468 –85.
- [14] Kong J , Qiu Y , Li Y , et al. TGF-beta1 elevates P-gp and BCRP in hepatocellular carcinoma through HOTAIR/miR-145 axis [J]. *Biopharm Drug Dispos* ,2019 ,40(2) :70 –80.
- [15] Megias-Vericat J E , Martinez-Cuadron D , Lopez J M , et al. Differences in ex-vivo chemosensitivity to anthracyclines in first line acute myeloid leukemia [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis* ,2019 ,11(1) :e2019016.

Expression of HOTAIR in acute myeloid leukemia and its mechanism of resistance to daunorubicin

Chen Linglin¹ , Xiong Shudao¹ , Gao Shenmeng²

(¹Dept of Hematology ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601;

²Dept of Internal Medicine ,The First Hospital of Wenzhou Medical University ,Wenzhou 325000)

Abstract Objective To investigate the expression of long noncoding RNA (LncRNAs) HOTAIR in acute myeloid leukemia (AML) and the function and molecular mechanism of resistance to daunorubicin (DNR) in AML cells. **Methods** The qRT-PCR was used to detect leukemia cell lines , primary acute myeloid leukemia cells , the normal expression level of control cells HOTAIR. U937 cells and THP1 cells were selected as research objects. The sh-NC plasmid and sh-HOTAIR plasmid of hairpin RNA (shRNA) were constructed and transfected into these two cells , respectively. The expression of HOTAIR in the cells was detected by qRT-PCR. P-glycoprotein (P-gp) expression in transfected cells was detected by Western blot ,DNR (0.1 μmol/L) was applied to each cell ,CCK8 assay was used to detect cell proliferation , and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** The expression of HOTAIR in the normal control group was significantly lower than that in the leukemia cell line and the acute myeloid leukemia primary cells; The expression of HOTAIR in U937 cells and THP1 cells was successfully down-regulated , and the level of P-glycoprotein was also decreased. The expression of HOTAIR in U937 cells and THP1 cells was successfully down-regulated , combined with DNR was more conducive to inhibit cell proliferation and promote apoptosis. **Conclusion** The abnormal expression of HOTAIR in AML is involved in the formation of resistance to DNR.

Key words AML; HOTAIR; P-glycoprotein; daunorubicin