

# microRNA-1271 靶向调控白血病细胞 CYLD 蛋白的表达

张茜<sup>1</sup> 王媛媛<sup>1</sup> 刘丽萍<sup>1</sup> 倪芳<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨人白血病细胞中微小 RNA ( microRNA ) -1271 对 CYLD 蛋白表达的调控作用。方法 qRT-PCR 检测 microRNA-1271 在不同的人白血病细胞系、临床初诊未治的几种类型原代白血病细胞、正常人外周血单个核细胞中的表达差异,利用 TargetScan 信息学预测软件预测 microRNA-1271 靶向 CYLD 基因 构建携带靶基因野生型及突变型 3' 非翻译区 ( 3' UTR ) ( 缺失了整段预测的 microRNA-1271 结合序列 ) 的双荧光素酶报告基因质粒,采用脂质体 Lipofectamine 3000 包裹双荧光素酶重组质粒及 microRNA-1271 模拟物 ( mimic ) 或阴性对照 共转染 HEK293A 细胞,应用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定荧光素酶活性。FAM 标记的 microRNA-1271 抑制物和阴性对照分别核转染至人白血病细胞系 K562 细胞,Western blot 法检测 CYLD 蛋白水平的表达变化。结果 microRNA-1271 在不同人白血病细胞系以及临床初诊未治的原代白血病细胞中的表达均明显高于正常人外周血单个核细胞 双荧光素酶报告基因实验验证 CYLD 是 microRNA-1271 的潜在靶基因; K562 细胞中转染 microRNA-1271 抑制物下调 microRNA-1271 后,Western blot 法检测结果显示 CYLD 蛋白水平明显上调。结论 人白血病细胞中 microRNA-1271 的表达上调,下调 microRNA-1271 后可以促进靶基因 CYLD 蛋白的表达,microRNA-1271 有可能成为白血病治疗的新靶点。

2015-03-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 ( 编号: 31300715 ) ; 安徽省自然科学基金青年项目 ( 编号: 1308085QH136 )

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院药剂科 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学基础医学院 合肥 230032

作者简介: 张茜,女,主管药师;  
倪芳,女,副教授,责任作者,E-mail: nifang1203@126.com

**关键词** 白血病; microRNA; microRNA-1271; CYLD

**中图分类号** R 363

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2015)07-0908-04

微小 RNA ( microRNA ) 是存在于真核细胞内的大小为 18~25 个核苷酸的单链非编码 RNA, microRNA 作为调控基因表达的重要分子,可以通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区 ( 3' UTR ) 特异性结合,从而导致靶 mRNA 的降解或抑制靶 mRNA 的翻译<sup>[1]</sup>。 microRNA 在调控细胞的发育、分化、增殖与凋亡等方面都起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3~4]</sup>表明 microRNA 在临床常见类型的白血病发病过程中起重 要调控作用。前期报道<sup>[5]</sup>一个新的 microRNA ( microRNA-3666 ) 靶向调控白血病细胞中 PTEN 蛋白的表达,可能在白血病发生发展过程中起重要作用。 microRNA-1271 在白血病细胞中的调控作用及其直接调控的靶基因至今仍然缺乏报道。该研究拟初步检测 microRNA-1271 在白血病细胞中的表达水平,并进一步观察 microRNA-1271 对白血病细胞中 CYLD 基因的调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、热灭活的胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 脂质体 Lipofectamine 3000、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; Amaxa 核转染试剂盒 ( kit V ) 购自德国 Amaxa Biosystems 公司; Hsa-microRNA-1271 及内参 U6 ( RNU6B ) 特异性引物、microRNA 逆转录试剂盒、

group, as increases in Art doses, the expressions of TLR4 and NF- $\kappa$ B at mRNA and protein in the Art in low, medium and high dose groups gradually reduced ( $P < 0.05$ ); ③ Compared with the Enalapril group, the expressions of TLR4 mRNA and protein in the Art in low, medium and high dose groups increased, and the difference between the Art in high dose group and the Enalapril group had no statistical significance ( $P > 0.05$ ). Compared with the Enalapril group, the expressions of NF- $\kappa$ B mRNA and protein in the Art in low and medium dose groups increased, but decreased in the Art in high dose group. Furthermore, there was no statistical difference in the Art in medium and high dose groups when compared with the Enalapril group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Art can suppress the high expression and synthesis of TLR4 and NF- $\kappa$ B of NRK-52E cells induced by high glucose in a dose-dependent manner.

**Key words** diabetic nephropathy; artesunate; renal tubular epithelial cells; toll-like receptor-4; nuclear factor- $\kappa$ B

SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自德国 Qiagen 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、psi-CHECK-2 双荧光素酶报告基因质粒 DNA 均购自美国 Promega 公司。

**1.2 细胞培养** K562(人慢性髓原白血病细胞系)、NK-92、Jurkat 细胞采用 RPMI-1640 培养基和 10% 胎牛血清培养, HEK293A(人胚肾细胞株)采用 DMEM 培养基和 10% 胎牛血清培养, 以上细胞系均购自上海细胞库。原代白血病细胞的分离来自于白血病患者的外周血, 人外周血单个核细胞( peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的分离来自于健康人外周血。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞总 RNA 提取及荧光定量 PCR** 目的细胞总 RNA 的提取依据 TRIzol 试剂说明书操作, 按照 microRNA 逆转录试剂盒说明书操作进行细胞 cDNA 的合成, 按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增反应。应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析。

**1.3.2 microRNA 靶核苷酸序列的合成** Hsa-microRNA-1271 的成熟体序列( mimic)、Hsa-microRNA-1271 成熟体的反向互补序列, 即 microRNA-1271 抑制物( anti-microRNA-1271), 以及相应的 microRNA 阴性对照( anti-microRNA-NC) 均由上海吉玛公司设计合成。

**1.3.3 载体构建** CYLD 3' UTR 报告基因载体 psi-CHECK-2-CYLD WT-3' UTR 携带野生型( wild type, WT) 的 CYLD 3' UTR, 而 psi-CHECK-2-CYLD 突变型( mutant) 3' UTR 则携带突变了 microRNA-1271 识别元件的 3' UTR。两个载体的构建均以双荧光素酶报告基因质粒 psi-CHECK-2 为基础, 将野生型或突变型的 CYLD 3' UTR 序列插入 psi-CHECK-2 的多克隆位点, 并通过测序鉴定载体构建的正确性。

**1.3.4 报告基因活性检测** HEK293A 细胞铺板, 24 h 后用 Lipofectamine 3000 进行转染实验。microRNA-1271 mimic 或 microRNA 阴性对照( microRNA-NC) 的浓度为 20 nmol/L, 重组双荧光素酶报告基因质粒 0.2 μg, 共转染 HEK293A 细胞 48 h 后按实验需要处理细胞。

**1.3.5 核转染** 根据 Kit V 核转染试剂盒说明书, 采用第二代核转染仪, 程序设致为 T-16, 分别将 anti-microRNA-1271 及 anti-microRNA-NC 分别转入 K562 白血病细胞系 20 h 后收集细胞, 并进行后续所需的相关实验。

**1.3.6 Western blot 法检测 K562 细胞去除培养基加入适量的蛋白裂解液 提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量。10% SDS-PAGE 凝胶, 恒压电泳, 恒流 200 mA 转膜 2 h, 室温封闭 1 h, 加入 CYLD 一抗 4 °C 孵育过夜, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 化学发光法检测分析结果。**

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异采用单因素方差分析或 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 白血病细胞中 microRNA-1271 的表达** qRT-PCR 结果显示, 在人白血病细胞系以及急性髓细胞白血病( acute myeloid leukemia, AML)、慢性髓细胞白血病( chronic myelogenous leukemia, CML)、急性淋巴细胞白血病( acute lymphocytic leukemia, ALL) 等 3 种原代白血病细胞中, microRNA-1271 的表达均明显高于正常人 PBMC。见图 1。

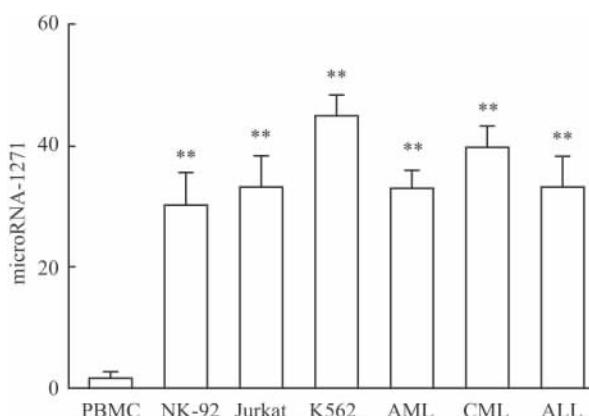


图 1 qRT-PCR 检测 microRNA-1271 在白血病细胞系及临床初诊未治的人原代白血病细胞中的表达与 PBMC 比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.2 Targetscan 在线分析软件预测 microRNA-1271 的潜在靶基因** 通过 Targetscan 在线分析软件( [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), 将 microRNA 名称 Hsa-microRNA-1271 输入检索框中, 点击 submit, 系统预测出 microRNA-1271 的可能的靶基因。显示在 CYLD 的 3' UTR 上含有一段与 microRNA-1271 的结合位点( 种子序列)。见图 2。

Position 3055-3061 of CYLD 3'UTR 5' ...UAAAAAAUUCUGUUUGCCAAU...  
Hsa-microRNA-1271 3' ACUCACGAACGAUCCACGGUUC

图 2 CYLD 3'UTR 与 microRNA-1271 的潜在结合位点

**2.3 microRNA-1271 对 CYLD 基因 3'UTR 的调控** 将 microRNA-1271 的 mimic 和携带 CYLD 3' UTR 的报告基因载体 (3' WT UTR 或 3' mutant UTR) 共转染 HEK293A 细胞, 结果显示转染 3' WT UTR 野生型载体的细胞荧光素酶活性显著下调, 而转染 3' mutant UTR 突变型载体的细胞荧光素酶活性未见变化。提示 microRNA-1271 能特异性作用于 CYLD 的 3' UTR 区域。见图 3。

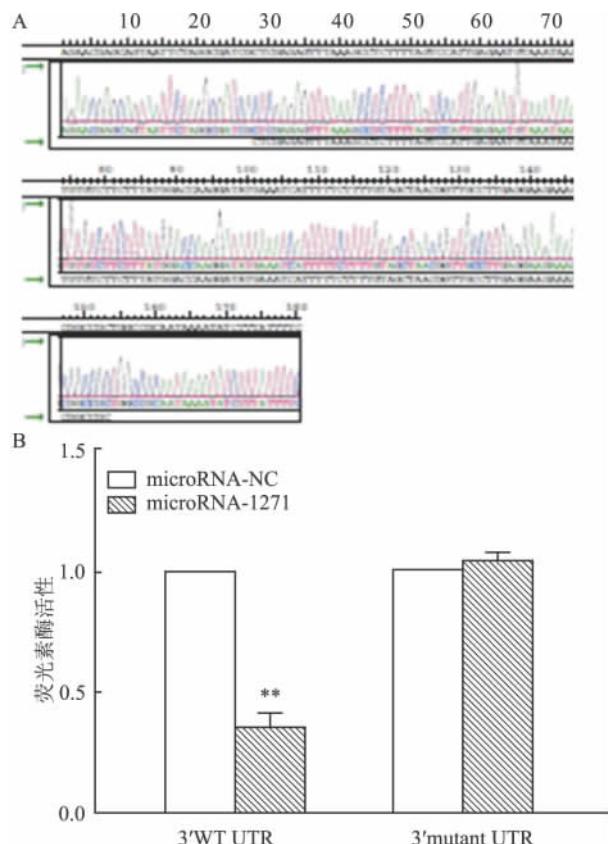


图 3 microRNA-1271 通过 CYLD 3'UTR 上的特异性识别序列进行表达调控

A: CYLD WT 3'UTR 报告基因载体构建成功的测序结果; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 microRNA-1271 靶向结合 CYLD 3' UTR; 与 3' mutant UTR 比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 microRNA-1271 抑制物转染 K562 细胞后 CYLD 表达变化** 研究显示转染 anti-microRNA-1271 组, 下调 microRNA-1271 的表达后, K562 细胞中 CYLD 蛋白水平明显上调(图 4)。

### 3 讨论

microRNA 在包括白血病在内的多种恶性肿瘤中发挥着重要作用<sup>[6-9]</sup>。因此, microRNA 的功能研究对恶性肿瘤的临床诊断和治疗具有重要价值。而

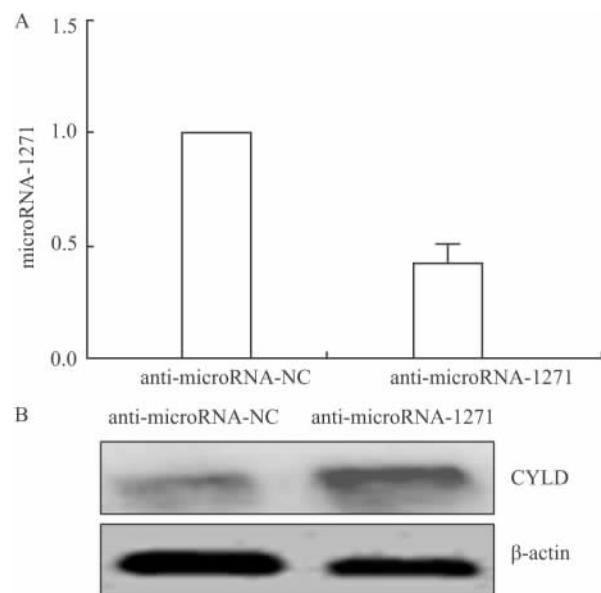


图 4 microRNA-1271 下调后 CYLD 蛋白的表达

A: qRT-PCR 检测 microRNA-1271 抑制物转染 K562 细胞后 microRNA-1271 的表达; B: Western blot 法检测 CYLD 的表达

microRNA 主要通过直接调控其下游特异性靶基因的表达发挥其生物学功能<sup>[10-11]</sup>, 因此, microRNA 靶基因的寻找及鉴定是研究其生物学功能的关键。

研究<sup>[12-13]</sup>报道 microRNA-1271 在某些实体瘤中具有重要的生物学功能。本研究为了探讨 microRNA-1271 在白血病中的作用, 首先检测了 microRNA-1271 在多种白血病细胞系以及分离的原代白血病细胞中的表达情况, 研究显示 microRNA-1271 在白血病细胞中高表达。为了进一步探讨 microRNA-1271 在白血病细胞中的重要作用, 通过生物信息学软件预测分析 microRNA-1271 的靶基因, 并首次证明 CYLD 是 microRNA-1271 的直接功能性靶基因。CYLD 是 2003 年发现的具有去泛素化酶活性的抑癌基因。研究<sup>[14]</sup>显示, 在多种实体瘤中存在 CYLD 基因的突变或低表达。近来研究<sup>[15]</sup>表明, CYLD 基因在白血病中存在不同程度的缺失或突变。本实验结果表明, 在白血病细胞中, 下调 microRNA-1271 后, CYLD 蛋白的表达水平显著上调。

综上所述, microRNA-1271 可通过靶向 CYLD 基因, 调控其蛋白表达水平, 进而可能影响白血病细胞的恶性生物学行为, 研究结果为进一步完善白血病发生发展的调控机制提供了基础, 也为白血病的治疗提供了可能的新靶点。

## 参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–97.
- [2] Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human microRNAs and indications for an involvement of microRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290–7.
- [3] Khalaj M, Tavakkoli M, Stranahan A W, et al. Pathogenic microRNA's in myeloid malignancies [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 361.
- [4] Bottoni A, Calin G A. MicroRNAs as main players in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Microrna*, 2014, 2(3): 158–64.
- [5] 倪芳, 赵华, 汪心怡, 等. MicroRNA-3666 调节白血病细胞 PTEN 基因的表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 36(4): 615–9.
- [6] Calin G A, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1793–801.
- [7] 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): 3183–9.
- [8] Garzon R, Garofalo M, Martelli M P, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(10): 3945–50.
- [9] Zhu D X, Miao K R, Fang C, et al. Aberrant microRNA expression in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(6): 730–4.
- [10] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of microRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642–55.
- [11] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–5.
- [12] Yang M, Shan X, Zhou X, et al. microRNA-1271 regulates cisplatin resistance of human gastric cancer cell lines by targeting IGF1R, IRS1, mTOR, and BCL2 [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(6): 884–91.
- [13] Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, et al. A functional screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of microRNA-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 195–204.
- [14] Massoumi R. CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer [J]. *Future Oncol*, 2011, 7(2): 285–97.
- [15] Ye H, Liu X, Lv M, et al. MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5201–14.

## microRNA-1271 regulates the expression of CYLD in leukemia cells

Zhang Qian, Wang Yuanyuan, Liu Liping, et al

(Dept of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract** **Objective** To explore the regulatory effect of microRNA-1271 on the expression of its target gene CYLD in leukemia cells. **Methods** microRNA-1271 expression levels in normal peripheral blood mononuclear cells (PB-MC) and leukemia cells were determined by quantitative real-time PCR. microRNA-1271 targeting CYLD 3'-UTR was predicted by TargetScan. 3'-UTR of CYLD was inserted into the dual luciferase reporter vector psi-CHECK2. The reporter activity was evaluated by the dual Luciferase Reporter Assay System after the luciferase promoter vector and microRNA were co-transfected into the HEK293A cell line. K562 cell lines were transfected with microRNA-1271 inhibitors (anti-microRNA-1271) or a negative control microRNA (anti-microRNA-NC), the expression of CYLD protein in the above transfected K562 cells were determined by Western blot. **Results** microRNA-1271 was up-regulated in human leukemia cell lines and primary leukemia cells compared to normal human PBMCs. The results of dual luciferase assays validate CYLD as a specific target gene of microRNA-1271. Inhibition of microRNA-1271 resulted in the upregulation of CYLD protein expression in K562 cell line. **Conclusion** microRNA-1271 is overexpressed in leukemia cells, the microRNA-1271 abnormal overexpression may play a key role in leukemia due to the down-regulation of CYLD.

**Key words** leukemia; microRNA; microRNA-1271; CYLD