

文章编号: 1001-6325(2021)06-0871-05

miR-26a 调控 *PTEN* 基因降低小鼠慢性淋巴白血病细胞的耐药性

毛洪宾^{1*}, 何明²

(1. 开封市人民医院 临床药学科, 河南 开封 475000; 2. 河南大学第一附属医院 临床药学科, 河南 开封 475001)

摘要:目的 观察微小 RNA-26a(miR-26a)通过第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(*PTEN*)对慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞耐药性的调控作用。方法 实验分为 4 组:对照组(L1210 细胞),耐药组(L1210/DDP 细胞)、NC 组(转染空载质粒+L1210/DDP 细胞)和抑制剂组(转染 miR-26a-inhibitor 质粒+L1210/DDP 细胞)。RT-qPCR 检测 miR-26a 和 *PTEN* mRNA 表达;双荧光素酶实验检测 miR-26a 对 *PTEN* 的靶向性;MTT 法检测细胞对顺铂(DDP)耐药性;流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot 检测细胞中 *PTEN*、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)蛋白表达。结果 miR-26a 能够抑制细胞中 *PTEN* 表达($P<0.05$)。miR-26a 可靶向作用于 *PTEN*。抑制 miR-26a 表达可降低细胞对 DDP 的半数抑制浓度(IC_{50})值,提高细胞凋亡率,上调 PI3K 蛋白表达及 p-AKT/AKT($P<0.05$)。结论 抑制 miR-26a 表达可通过上调 *PTEN* 表达降低细胞耐药作用。

关键词:慢性淋巴细胞白血病;耐药性;微小 RNA-26a;第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因
中图分类号:R733.72 文献标志码:A

Effect of miR-26a on drug resistance of chronic lymphocytic leukemia cells by regulating *PTEN* gene

MAO Hong-bin^{1*}, HE Ming²

(1. Department of Clinical Pharmacy, Kaifeng People's Hospital, Kaifeng 475000;

2. Department of Clinical Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: Objective To observe the regulation of microRNA-26a (miR-26a) on the drug resistance of chronic lymphocyte leukemia (CLL) cells through the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (*PTEN*). **Methods** The experiment was divided into 4 groups: control group (L1210 cells), resistance group (L1210/DDP cells), NC group (transfected with empty plasmid+L1210/DDP cells), inhibitor group (transfected with miR-26a-inhibitor plasmid+L1210/DDP and inhibitor group (transfected with miR-26a-inhibitor plasmid+L1210/DDP cells). miR-26a and *PTEN* mRNA expression were detected by RT-qPCR. Dual luciferase experiment was used to detect the targeting of miR-26a to *PTEN*. MTT method was used to detect cell resistance to cisplatin (DDP). Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rates. Western blot was used to detect of *PTEN*, phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K), serine-threonine protein kinase (AKT) protein expressions in cells. **Results** miR-26a inhibited the expression of *PTEN* in cells ($P<0.05$). miR-26a targeted *PTEN*. Inhibiting the expression of miR-26a reduced the IC_{50} value of cells to DDP, increased the rates of apoptosis, and up-regulated the expression of PI3K protein and p-AKT/AKT ($P<0.05$). **Conclusions** Inhibiting the expression of miR-26a can reduces the effect of cell resistance through up-regulating the expression of *PTEN*.

Key words: chronic lymphocyte leukemia; drug resistance; microRNA-26a; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

收稿日期:2020-04-27 修回日期:2020-10-13

* 通信作者 (corresponding author): pei2611@sohu.com

慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)是临床常见的一种白血病,以外周血淋巴细胞增高及骨髓成熟淋巴细胞浸润为主要特征^[1]。患者在化疗过程中对药物的敏感性降低,继而产生耐药性,如何避免耐药现象出现是治疗 CLL 的关键^[2]。微小 RNA(microRNA)参与多种生理病理过程,与肿瘤细胞的化疗敏感性和耐药性有关,miR-26a 能够调节化疗药物的敏感性^[3]。第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是一种抑癌基因,其表达降低是肾癌预后不良的有效指标^[4]。PTEN 参与 CLL 细胞对氟达拉滨耐药,且 miR-26a 可通过调节 PTEN 表达参与肿瘤细胞生理病理过程,但两者在 CLL 耐药性中报道较少^[5]。本研究通过观察 miR-26a 调控 PTEN 对小鼠 L1210 细胞系和小鼠耐顺铂(cisplatin, DDP) L1210/DDP 细胞亚系耐药性的影响,探讨其可能作用机制,旨在为临床治疗 CLL 提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系:小鼠淋巴细胞白血病 L1210 细胞系(中国科学院上海细胞库)。小鼠耐 DDP 淋巴细胞白血病 L1210/DDP 细胞亚系(上海奥陆生物科技有限公司)。

1.1.2 药物、主要试剂:注射用 DDP(山东齐鲁制药厂);DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)(Gibco 公司);MTT 试剂(Sigma Aldrich 公司);pcDNA-miR-26a-inhibitor 质粒、pcDNA-miR-26a-inhibitor-NC 质粒(广州锐博生物科技有限公司);LipofectamineTM 2000 转染试剂(Invitrogen 公司);野生型和突变型 PTEN 重组质粒(上海生工生物工程股份有限公司);兔抗小鼠 PTEN、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine protein kinase, AKT)多抗、p-AKT 多抗和山羊抗兔 IgG-HRP(Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及分组处理:将 L1210 细胞接种于质量分数 10% FBS 及 1%青链霉素的 DMEM 培养基,于体积分数 5% CO₂ 培养箱内 37 °C 常规培养;L1210/DDP 细胞接种于 DDP 终浓度为 0.1 mg/L 的

DMEM 培养基,实验前 1 周撤药,取对数增殖期细胞用于后续实验。

将细胞分为对照组(L1210 细胞)、耐药组(L1210/DDP 细胞)、NC 组(pcDNA-miR-26a-inhibits-NC 质粒+L1210/DDP 细胞)和抑制剂组(pcDNA-miR-26a-inhibits 质粒+L1210/DDP 细胞)。按照 LipofectamineTM 2000 说明书将其进行转染,继续培养 24 h。

1.2.2 RT-qPCR 检测细胞中 miR-26a、PTEN mRNA 表达量:取稳定转染的各组细胞,提取总 RNA,反转录 cDNA,进行 PCR 扩增。扩增条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 20 s,70 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。miR-26a 上游引物:5'-AATC GAATTCGCTGAGTCAGA-3';下游引物:5'-CATAAG GCGTCGAGTGCAACC-3'。U6 上游引物:5'-ACTG CATGCCATTGCAGTC-3';下游引物:5'-ACCGTG AACTTGCCCTGCAA-3'。PTEN 上游引物:5'-AGGT TCAGCTAGCTATGGCA-3';下游引物:5'-CAGCCTA AACTGCTAGCTAA-3'。β-actin 上游引物:5'-AGC AGCAGTTATACTAGCA-3';下游引物:ACTAGCTAG CATCATGCAA-3'。miR-26a 以 U6 为内参,PTEN 以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-26a、PTEN mRNA 表达水平。

1.2.3 miR-26a 与 PTEN 靶向性的检测:预测 miR-26a 3'UTR 与 PTEN 之间的结合位点,分别构建野生型重组质粒 pMir-PTEN-WT 和突变型重组质粒 pMir-PTEN-MUT,分为野生型 NC 组、野生型+miR-26a 组、突变型 NC 组、突变型+miR-26a 组,利用 LipofectamineTM 2000 将 miR-26a-mimics/miR-26a-mimics-NC 与 pMir-PTEN-WT/pMir-PTEN-MUT 质粒共转染 L1210 细胞,按试剂盒说明书操作,计算相对荧光素酶活性。

1.2.4 耐药性的检测:取稳定转染的各组细胞,接种于 96 孔板,待细胞汇合至 70%左右时,加入含 DDP(0.02、0.2、2、20 和 200 g/mL)的 DMEM 培养基,48 h 后,每孔加入 MTT(5 g/L)溶液 20 μL,继续培养 2 h 后弃上清液,加入 DMSO 150 μL/孔,充分振荡 10 min,用酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度(A)值,计算细胞抑制率,细胞抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%,绘制细胞抑制率曲线,根据曲线拟合方程求出 L1210 细胞、L1210/DDP

细胞对 DDP 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率:取稳定转染的各组细胞, PBS 洗涤, 2 500 r/min 离心 5 min, 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μ L AnnexinV-FITC 混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 10 μ L PI 染色 5 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 Western blot 检测细胞中 PTEN、PI3K、AKT 蛋白相对表达量:取稳定转染的各组细胞, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性, 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 溶液洗膜, 分别加入 1 : 1 000 稀释的 PTEN、PI3K、AKT、p-AKT 和 β -actin 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1 : 4 000), 室温孵育 2 h, 加入 ECL 化学发光试剂, 显影、定影、拍照, 分析各目标蛋白条带吸光度值, 以目的蛋白条带吸光度值与内参 β -actin 条带吸光度值表示目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据, 计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本计量资料比较采用单因素方差分析, 两两样本比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 细胞耐药对 miR-216、PTEN mRNA 表达的影响

L1210/DDP 细胞中 miR-26a mRNA 表达明显降低, PTEN mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 细胞耐药对 miR-26a、PTEN mRNA 表达的影响

Table 1 Effect of inhibiting cell resistance on the expression of miR-26a and PTEN mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

group	miR-26a	PTEN
control	1.02 \pm 0.13	0.24 \pm 0.03
resistance	0.74 \pm 0.07*	0.46 \pm 0.05*

* $P < 0.05$ compared with control group.

2.2 转染 miR-26a 对 miR-26a、PTEN mRNA 表达的影响

与 NC 组比较, 耐药组、抑制剂组 miR-26a mRNA

表达降低, PTEN mRNA 表达升高, 且抑制剂组 miR-26a mRNA 表达低于耐药组, PTEN mRNA 表达高于耐药组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 转染 miR-26a 对 miR-26a、PTEN mRNA 表达的影响

Table 2 Effect of miR-26a transfection on the expression of miR-26a, PTEN mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

group	miR-26a	PTEN
NC	0.98 \pm 0.11	0.22 \pm 0.02
resistance	0.74 \pm 0.07*	0.46 \pm 0.05*
inhibitor	0.31 \pm 0.03*#	0.75 \pm 0.08**

* $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with resistance group.

2.3 miR-26a 靶基因验证

生物信息预测显示, miR-26a 与 PTEN 存在连续结合位点 (图 1)。

野生型 NC 组、野生型 + miR-26a 组、突变型 NC 组、突变型 + miR-26a 组相对荧光素酶活性分别为: (1.31 \pm 0.15)、(0.73 \pm 0.08)、(1.29 \pm 0.14) 和 (1.32 \pm 0.13)。与野生型 + miR-26a 组比较, 野生型 NC 组、突变型 NC 组、突变型 + miR-26a 组相对荧光素酶活性显著升高 ($P < 0.05$)。野生型 NC 组、突变型 NC 组、突变型 + miR-21 组相对荧光素酶活性无差异 (图 1)。

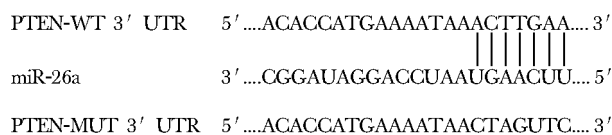


图 1 miR-26a 与 PTEN 的结合位点

Fig 1 Binding site of miR-26a and PTEN

2.4 细胞抑制率及对 DDP 的 IC_{50} 值比较

不同浓度 DDP 处理细胞后, 耐药组细胞抑制率降低, 抑制组细胞抑制率升高 ($P < 0.05$) (图 2)。

对照组、NC 组、耐药组、抑制组细胞对 DDP 的 IC_{50} 值分别为: (1.12 \pm 0.13) g/mL、(1.07 \pm 0.12) g/mL、(6.35 \pm 0.65) g/mL 和 (0.16 \pm 0.02) g/mL。与对照组、NC 组比较, 耐药组细胞 IC_{50} 值升高, 抑制组细胞 IC_{50} 值降低 ($P < 0.05$); 且抑制组细胞 IC_{50} 值低于耐药组 ($P < 0.05$)。对照组和 NC 组细胞 IC_{50} 值无差异。

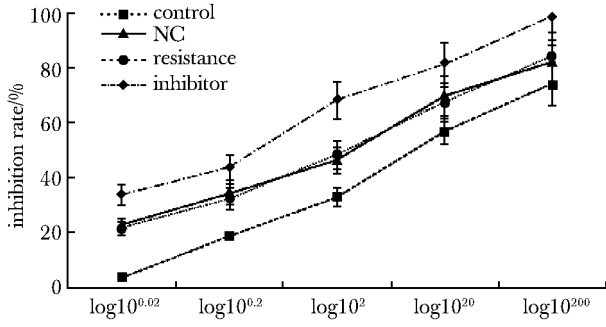


图2 细胞抑制率比较

Fig 2 Comparison of cytostatic rate

2.5 细胞凋亡率比较

对照组、NC组、耐药组、抑制组细胞凋亡率分别为：(66.28±6.79)%、(64.68±6.64)%、(8.57±1.13)%和(84.26±8.45)%。与对照组、NC组比较，耐药组细胞凋亡率降低，抑制组细胞凋亡率升高(P<0.05)，耐药组细胞凋亡率低于抑制组(P<0.05)。

对照组、NC组细胞凋亡无差异(图3)。

2.6 细胞中PTEN、PI3K、AKT蛋白水平比较

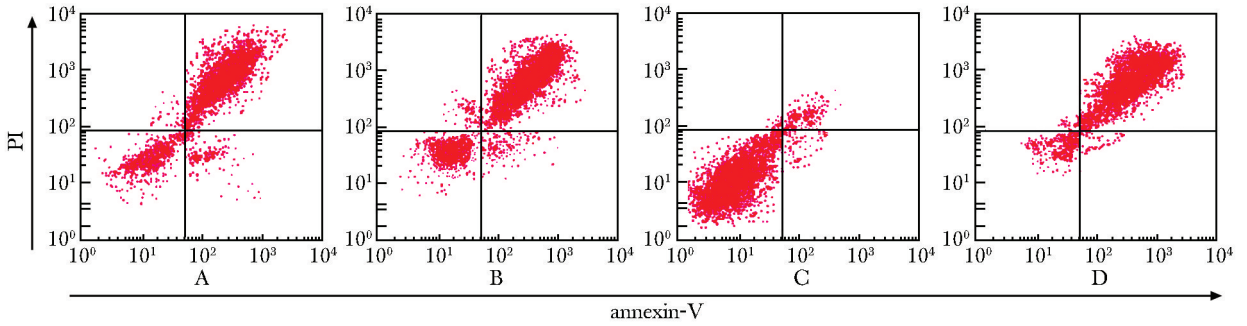
与对照组、NC组比较，耐药组、抑制组PTEN蛋白表达升高，PI3K蛋白表达及p-AKT/AKT降低(P<0.05)；抑制组较耐药组PTEN蛋白表达升高，PI3K蛋白表达及p-AKT/AKT降低(P<0.05)(表3,图4)。

表3 蛋白表达水平比较

Table 3 Comparison of protein expression levels (x̄±s, n=5)

group	PTEN	PI3K	P-AKT/AKT
control	0.24±0.03	1.06±0.13	0.92±0.11
NC	0.22±0.02*	1.09±0.12*	0.95±0.10*
resistance	0.46±0.05*#	0.64±0.07**	0.71±0.07**
inhibitor	0.75±0.08**▲	0.32±0.03**▲	0.26±0.03**▲

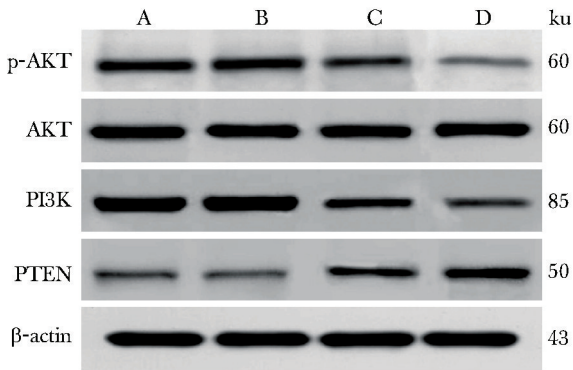
*P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with NC group; ▲P<0.05 compared with resistance group.



A. control group; B. NC group; C. resistance group; D. inhibitor group

图3 细胞凋亡率比较

Fig 3 Comparison of apoptosis rates



A. control group; B. NC group; C. resistance group; D. inhibitor group

图4 细胞中各蛋白表达

Fig 4 Expression of various proteins in cells

3 讨论

miRNA与血液肿瘤耐药性关系密切,其通过调控靶基因表达,抑制或激活下游信号通路,导致肿瘤细胞对药物的敏感度发生改变,引起肿瘤细胞多药耐药,造成化疗效果不佳甚至失败。

miR-26a通过调节靶蛋白表达,导致乳腺癌及非小细胞肺癌细胞对药物的敏感性,影响化疗效果[6-7]。本研究中耐药组细胞miR-26a mRNA表达较高,细胞抑制率和凋亡率较低,对DDP的IC₅₀值维持在较高水平,抑制miR-26a表达后,细胞抑制率和凋亡率明显升高,对DDP的IC₅₀值明显降低,提示过表达miR-26a可增强L1210/DDP细胞对DDP

的耐药性。PTEN 是体内重要的抑癌因子,具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶双重活性,在多种肿瘤中表现缺失或低表达,参与肿瘤发生发展过程^[8]。PTEN 可以作为 miRNA 的靶基因,参与人肺腺癌及非小细胞肺癌细胞对化疗药物的耐药性^[9-10]。本研究抑制组细胞中 PTEN 表达较耐药组明显升高,荧光素酶报告结果证实 miR-26a 与 PTEN 存在靶向性,提示抑制 miR-26a 可通过靶向上调 PTEN,降低 L1210/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。

PI3K/Akt 信号通路是肿瘤发生发展过程中的重要信号通路,在许多肿瘤组织中过度表达和活化,通过翻译或转录水平引起肿瘤细胞失控性增殖,或下调肿瘤抑制蛋白 p53 的表达,还可抑制细胞凋亡进程参与肿瘤发生发展过程。PI3K/Akt 信号通路与肿瘤耐药关系密切,过度活化的 AKT 通过抑制凋亡信号激活酶活性导致肿瘤细胞产生耐药,与 DDP、阿霉素多种

化疗药物耐药有关,严重影响化疗效果,抑制 PI3K/Akt 通路可以逆转肿瘤细胞耐药^[11]。PTEN 是 PI3K/Akt 通路的主要抑制分子,通过 PI3K 抑制下游 AKT 活化。抑制 PTEN 表达可以激活 PI3K/Akt 信号通路,介导乳腺癌细胞的耐药性^[12]。过表达 PTEN 通过抑制 PI3K/Akt 通路,增强胃肠道间质瘤细胞的化学敏感性^[13]。本研究抑制组 PTEN 蛋白显著升高,PI3K、p-Akt 蛋白水平显著降低,提示上调 PTEN 可以抑制 PI3K/Akt 通路,miR-26a 通过靶向调节 PTEN 表达,进而影响 PI3K/Akt 信号通路激活,从而使 L1210/DDP 细胞耐药性发生改变。

综上所述,L1210/DDP 细胞中过表达 miR-26a 通过靶向抑制 PTEN,激活 PI3K/Akt 信号通路,提高细胞对 DDP 的耐药性,抑制 miR-26a 表达可以降低细胞耐药性,体内实验尚需进一步研究探讨,以期为临床治疗 CLL 提供参考。

参考文献:

- [1] Kipps TJ, Fraser G, Coutre SE, *et al.* Long-term studies assessing outcomes of ibrutinib therapy in patients with del (11q) chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2019, 19:715-722.
- [2] Liu YL, Yan ZX, Xia Y, *et al.* Ligustrazine reverts anthracycline chemotherapy resistance of human breast cancer by inhibiting JAK2/STAT3 signaling and decreasing fibrinogen gamma chain (FGG) expression [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10:939-952.
- [3] Liu J, Li X, Wang M, *et al.* A miR-26a/E2F7 feedback loop contributes to tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53:1601-1612.
- [4] 徐芝立, 卢莉莉, 梁长春, 等. 肾透明细胞癌中 PTEN 分子的表达与预后关系 [J]. *世界中医药*, 2016, 11: 2222-2223.
- [5] 邹志建, 孙鸿丽, 沈云峰, 等. miR-214 介导慢性淋巴细胞白血病对氟达拉滨耐药的作用研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27:1395-1401.
- [6] Tormo E, Adam-Artigues A, Ballester S, *et al.* The role of miR-26a and miR-30b in HER2⁺ breast cancer trastuzumab resistance and regulation of the CCNE2 gene [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:41309. doi: 10.1038/srep41309.
- [7] Xu S, Wang T, Yang Z, *et al.* miR-26a desensitizes non-small cell lung cancer cells to tyrosine kinase inhibitors by targeting PTPN13 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7:45687-45701.
- [8] 吴玉婷, 马茜, 汤步富, 等. 氯化锂对第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因缺失肿瘤的疗效分析 [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99:2362-2366.
- [9] Ding S, Zheng Y, Xu Y, *et al.* miR-21/PTEN signaling modulates the chemo-sensitivity to 5-fluorouracil in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12:2339-2352.
- [10] Sun H, Zhou X, Bao Y, *et al.* Involvement of miR-4262 in paclitaxel resistance through the regulation of PTEN in non-small cell lung cancer [J]. *Open Biol*, 2019, 9: 180227. doi: 10.1098/rsob.180227.
- [11] Dong C, Chen Y, Ma J, *et al.* Econazole nitrate reversed the resistance of breast cancer cells to Adriamycin through inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10:263-274.
- [12] Liu T, Guo J, Zhang X. miR-202-5p/PTEN mediates doxorubicin-resistance of breast cancer cells via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20: 989-998.
- [13] Xu Y, Cheng M, Mi L, *et al.* miR-22-3p enhances the chemosensitivity of gastrointestinal stromal tumor cell lines to cisplatin through PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018, 17:318-325.