

MicroRNA-10b通过调控锌指蛋白KLF4 阻滞白血病细胞分化

谭 诗 张慧娟 王 娟 陈莎娜 全 静 鲜敬荣 张 伶*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室、重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 探讨microRNA-10b(miR-10b)通过调节锌指蛋白Krüppel-like factor 4(KLF4)的表达对急性白血病细胞分化的影响。Real-time PCR及Western blot分别检测不同分化程度的白血病细胞系中miR-10b与KLF4的表达; 1,25-二羟基维生素D₃(1,25D₃)诱导人白血病细胞系HL60向单核系分化, 检测此过程中miR-10b及KLF4的表达变化; 利用体外合成的寡核苷酸(miR-10b mimics)转染HL60细胞, 瑞氏-吉姆萨染色观察1,25D₃诱导后细胞分化形态学的改变; 流式细胞术检测单核细胞表面标志CD14的表达。结果显示, miR-10b在分化早期的KG-1a细胞中表达最高, 在分化晚期的U937、THP-1细胞中表达最低($P<0.01$), 而KLF4的表达与之相反; 1,25D₃诱导HL60向单核系分化过程中, miR-10b表达呈时间依赖性降低, KLF4表达则逐渐增高; HL60细胞中过表达miR-10b后可抑制1,25D₃诱导的细胞分化形态特征的改变及CD14的表达($P<0.05$)。提示miR-10b通过负调控KLF4的表达阻滞白血病细胞HL60单核系的分化。

关键词 miR-10b; KLF4; 急性髓系白血病; 细胞分化

MicroRNA-10b Blocks the Differentiation of Leukemia Cells Through Regulating the Zinc Finger Protein KLF4

Tan Shi, Zhang Huijuan, Wang Juan, Chen Shana, Quan Jing, Xian Jingrong, Zhang Ling*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract We aimed to explore the effect of microRNA-10b (miR-10b) on the differentiation of leukemia cells through regulating the expression of zinc finger protein Krüppel-like factor 4 (KLF4). The expression of miR-10b and KLF4 in leukemia cell lines at different levels of differentiation was detected by Real-time PCR and Western blot, respectively. Leukemia cell line HL60 was induced with 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ (1,25D₃) to differentiate along the monocytic lineage. The expression of miR-10b and KLF4 was examined during 1,25D₃-induced differentiation of HL60. The synthesized miR-10b mimics was transfected into HL60 cells. The morphological changes of cells treated with 1,25D₃ were observed under light microscope following Wright-Giemsa staining, and the monocyte surface marker CD14 was analyzed by flow cytometry. miR-10b was detected at the highest levels of expression in KG-1a cells displaying early differentiation phenotypes and at the lowest in more mature U937 and THP-1 cells ($P<0.01$),

收稿日期: 2012-11-15 接受日期: 2012-12-13

国家自然科学基金(批准号: 81271913)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485223, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

Received: November 15, 2012 Accepted: December 13, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271913)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485223, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-04 15:35 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130305.1122.001.html

while the KLF4 exhibited an opposite expression pattern. miR-10b was decreased in a time-dependent manner in HL60 cells during induction with 1,25D3, whereas the KLF4 was increased. Enforced expression of miR-10b in HL60 cells inhibited the 1,25D3-induced morphological changes and the expression of CD14 ($P<0.05$). Our data indicate that miR-10b suppresses monocytic differentiation of HL60 cells via targeting to KLF4.

Key words miR-10b; KLF4; acute myeloid leukemia; cell differentiation

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病, 其一个主要特征是骨髓造血细胞分化成熟障碍。正常造血细胞的分化及白血病细胞分化阻滞受多因素的调节, microRNA(miRNA)调控作为主要的表观遗传学机制之一, 在此过程中发挥了重要的作用^[1-2]。miRNA是一类长约19-25 bp的单链非编码小RNA, 主要在转录后水平调控靶基因的表达, 参与多种生物学过程的调节, 如细胞的分化、增殖、凋亡等。近年来, 随着对白血病细胞miRNA表达谱的深入研究发现, miR-10b在核型正常的白血病细胞中异常高表达^[3-4], 提示miR-10b在白血病的发生发展中可能发挥着重要的调控作用。已知KLF4作为miR-10b的靶基因之一, 可促进人食管癌细胞的侵袭转移^[5], 而近年来研究发现, KLF4是单核细胞分化的一个关键调控因子^[6-7], 干扰KLF4的表达可阻滞白血病细胞单核系的分化。然而, miR-10b及其下游靶基因KLF4在白血病分化调控中的作用目前尚不清楚, 为此本课题旨在通过观察miR-10b/KLF4对HL60细胞单核系分化的影响, 从而揭示miR-10b在白血病分化阻滞中的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

寡核苷酸miR-10b mimics及其阴性对照NC(上海吉玛制药技术有限公司); Lipofectamine™ 2000转染试剂、Opti-MEM培养基、引物(Invitrogen公司); 胎牛血清、RPMI1640(Gibco公司); RNA提取试剂TRIzol、RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司); 瑞氏-

吉姆萨(Wright-Giemsa)染液(南京凯基生物科技发展有限公司); 1,25-二羟基维生素D3(Sigma公司); 藻红蛋白PE标记鼠抗人CD14抗体及同型对照(北京四正柏生物科技有限公司); 鼠抗人KLF4单克隆抗体(Santa Cruz公司); 鼠抗人β-actin单克隆抗体、山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); Pro-light HRP化学发光检测试剂盒(Millipore公司)。

1.2 细胞培养与转染

HL60细胞用含20%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基, 培养于含5% CO₂的37 °C恒温培养箱中, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

转染前, 用Opti-MEM培养基将HL60细胞重悬, 按4×10⁶/孔接种于6孔板中, 1 000 r/min离心20 min。将100 pmol miR-10b mimics/NC与5 μL Lipofectamine™ 2000分别加入250 μL Opti-MEM培养基中轻轻混匀, 室温静置5 min, 再将两种溶液混合, 室温静置20 min后缓慢加入6孔板中培养, 转染6 h后加入1 mL RPMI 1640完全培养基培养48 h。

HL60细胞转染miR-10b mimics/NC, 换液后12 h, 加入100 nmol/L 1,25D3诱导向单核系分化。

1.3 Real-time PCR

收集细胞, Trizol抽提RNA, 反转录合成cDNA, 所用特异性反转录引物: 内参U6 RT引物: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; miR-10b RT引物: 5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC CAC AAA-3'。以RT-PCR产物为模板, 进行Real-time PCR检测。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 94 °C变性10 s, 55.8 °C

表1 Real-time PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

基因 Genes	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')
has-miR-10b	GGA TAC CCT GTA GAA CCG AA	CAG TGC GTG TCG TGG AGT
U6 snRNA	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

退火20 s, 72 °C延伸30 s, 循环40次。实验重复3次。以U6 snRNA为相对定量的内参, Real-time PCR反应引物见表1。所得结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其相对定量值。

1.4 Western blot

收集对数生长期细胞, 提取细胞总蛋白, Bradford法测蛋白浓度。取100 μ g细胞蛋白提取液, 12%的分离胶分离蛋白质, 通过半干转膜仪将蛋白转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭5 h, 与鼠抗人KLF4单克隆抗体(1:500稀释) 4 °C孵育过夜, 与二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG, 1:1 000稀释)室温孵育1.5 h, TBST洗涤后用化学发光进行显色。以 β -actin作为内参, 采用Quantity One软件对Western blot条带进行分析。

1.5 Wright-Giemsa染色

收集100 nmol/L 1,25D3诱导72 h的细胞, 0.01 mol/L PBS洗涤2次, 涂片并使其自然干燥, Wright-Giemsa染色5 min, 双蒸水漂洗, 乙醇分色, 晾干后光学显微镜观察细胞形态。每张涂片计数400个细胞, 细胞核出现不规则形呈扭曲或折叠者确定为分化的细胞, 计算诱导分化率, 公式为: 诱导分化率(%)=(分化的细胞数/400)×100%, 观察HL60细胞过表达miR-10b后, 1,25D3诱导细胞分化率的改变。

1.6 流式细胞仪检测CD14的表达

收集100 nmol/L 1,25D3诱导72 h的细胞, 制成($1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$)/mL单细胞悬液, 用预冷的0.01 mol/L PBS(含0.2%的牛血清白蛋白BSA)洗涤2次, 1 000 r/min离心5 min, 与PE标记的鼠抗人CD14抗体4 °C暗盒孵育40 min, 0.01 mol/L PBS洗涤2次后, 经流式细胞仪进行检测。

1.7 统计学处理

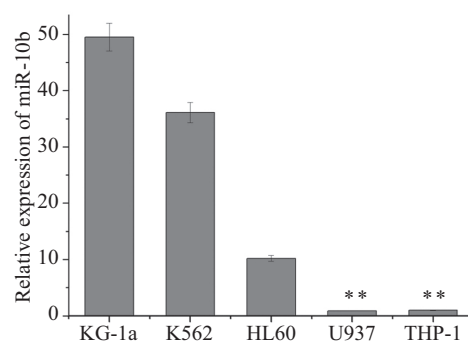
应用SPSS 13.0统计学软件进行结果分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 资料之间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

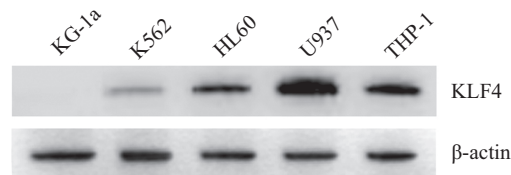
2.1 miR-10b及KLF4在不同分化程度的白血病细胞系中的表达

miR-10b在分化早期的KG-1a细胞中表达最高, 其次为K562和HL60细胞, 而在分化晚期的U937、THP-1细胞中表达最低($P < 0.01$, 图1A); miR-10b的靶基因KLF4的蛋白表达量则与白血病细胞的分化程度呈正相关(图1B)。

(A)



(B)



五个不同分化程度的白血病细胞系中miR-10b(A)及KLF4(B)的表达。 ** $P < 0.01$, 与KG-1a组比较。

The expression of miR-10b(A) and the protein levels of KLF4(B) in five leukemia cell lines at different stages of differentiation. ** $P < 0.01$ compared with KG-1a group.

图1 miR-10b及KLF4在不同分化程度的白血病细胞系中的表达

Fig.1 Expression of miR-10b and KLF4 in leukemia cell lines at different stages of differentiation

2.2 miR-10b及KLF4在白血病细胞诱导分化过程中的表达变化

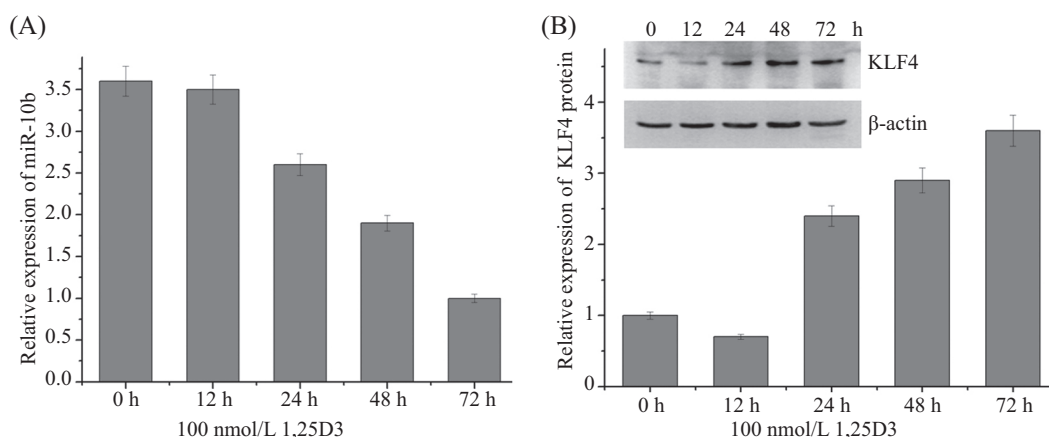
HL60细胞经100 nmol/L 1,25D3诱导后, 在12~72 h内miR-10b的表达量呈现时间依赖性下降(图2A), 而其靶基因KLF4的表达则随诱导时间的延长逐渐升高(图2B)。

2.3 过表达miR-10b抑制白血病细胞中KLF4的表达

转染100 pmol miR-10b mimics 48 h后, HL60细胞中miR-10b的表达水平显著增高, 成功实现了miR-10b过表达($P < 0.01$, 图3A)。同时, Western blot检测结果显示, HL60细胞中过表达miR-10b后, KLF4的蛋白表达水平明显下降(图3B)。

2.4 过表达miR-10b阻滞白血病细胞向单核系的分化

经100 nmol/L 1,25D3诱导72 h后, 各组细胞出现不同程度的单核细胞分化特征, 主要表现为核质比降低, 细胞核出现凹陷、扭曲、折叠等不规则形状。其中, 过表达miR-10b组(HL60/miR-10b)细胞分

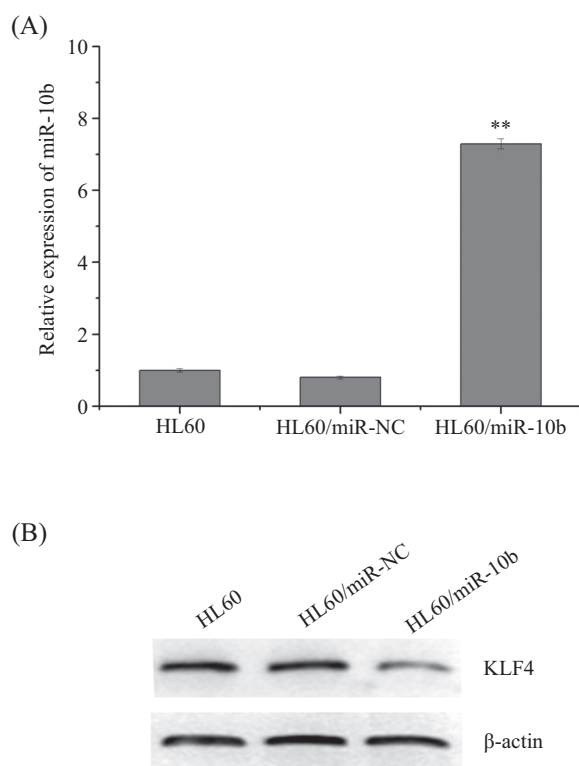


A: 1,25D3诱导HL60向单核系分化的过程中, miR-10b表达呈时间依赖性降低; B: KLF4的蛋白表达水平逐渐增高。

A: miR-10b was decreased in a time-dependent manner in HL60 cells during induction with 1,25D3; B: the expression of KLF4 protein was increased in HL60 cells during 1,25D3-induced monocytic differentiation.

图2 miR-10b及KLF4在1,25D3诱导HL60单核系分化过程中的表达变化

Fig.2 Changes of miR-10b and KLF4 expression in HL60 cells during 1,25D3-induced monocytic differentiation



A: HL60细胞中转染miR-10b mimics后miR-10b表达显著增高; B: HL60细胞中过表达miR-10b后KLF4的表达受抑制。** $P<0.01$, 与HL60组及HL60/miR-NC组比较。

A: miR-10b was significantly increased in HL60 cells after over-expression of miR-10b; B: the KLF4 was inhibited after enforced expression of miR-10b in HL60 cells. ** $P<0.01$ compared with HL60 group and HL60/miR-NC group.

图3 HL60细胞系中过表达miR-10b后抑制KLF4的表达

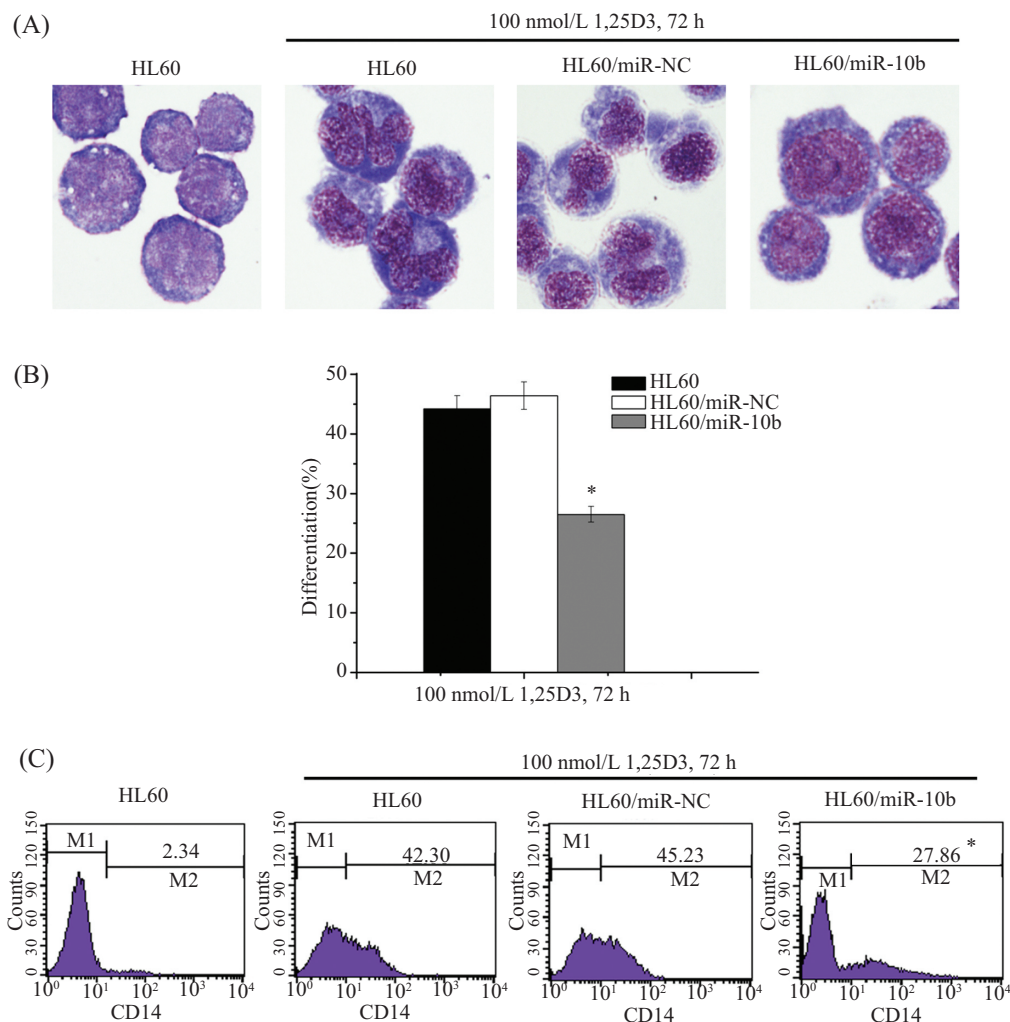
Fig.3 KLF4 expression is inhibited in HL60 cells transfected with miR-10b mimics

化特征的改变不如未转染对照组(HL60)和阴性对照组(HL60/miR-NC)变化显著(图4A); 同时, 与上述两对照组相比, 过表达miR-10b组的诱导分化率明显降低($P<0.05$, 图4B)。流式检测1,25D3诱导后各组细胞CD14的表达情况, 结果显示, HL60/miR-10b组CD14阳性细胞百分比为27.86%, 明显低于两对照组($P<0.05$, 图4C)。

3 讨论

MicroRNA介导的转录后调控是真核生物基因表达调控网络的重要组成部分, 可与转录因子等作用影响细胞的生长发育及分化^[8]。近年来研究发现, 多种miRNA均可参与调控正常造血细胞及白血病细胞的分化, 与白血病的发生发展密切相关^[9-11]。miR-10b作为miRNA重要的一员, 最早是由Ma^[12]通过体内实验发现其能促进乳腺癌的侵袭转移。最近有芯片数据显示, miR-10b在正常核型的白血病细胞中异常高表达, 但是miR-10b在白血病发生发展中的潜在调控机制却鲜有报道。

本研究发现, miR-10b在处于分化早期的KG-1a白血病细胞系中呈高表达, 在K562及HL60细胞中表达次之, 而在分化晚期的单核细胞白血病细胞系U937、THP-1中几乎不表达, 此现象提示miR-10b可能在白血病细胞的分化过程中发挥调控作用。进一步利用1,25D3诱导HL60细胞模拟体外单核系分化过程^[2], 发现在白血病诱导分化过程中miR-10b的表



A: HL60细胞中过表达miR-10b后抑制1,25D3诱导的细胞分化形态特征的改变(Wright-Giemsa染色, 1 000×); B: 1,25D3处理后各组细胞的诱导分化率; C: 流式检测各组细胞CD14的表达情况。* $P < 0.05$, 与HL60组及HL60/miR-NC组比较。

A: enforced expression of miR-10b inhibited the 1,25D3-induced changes in morphology of HL60 cells(Wright-Giemsa staining, 1 000×); B: the percentage of differentiated cells after 1,25D3 treatment; C: miR-10b suppressed the expression of monocyte surface marker CD14, which was detected by flow cytometry. * $P < 0.05$ compared with cells in HL60 group and HL60/miR-NC group.

图4 miR-10b阻滞1,25D3诱导的HL60单核系分化

Fig.4 miR-10b blocks 1,25D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells

达呈时间依赖性降低,表明miR-10b可能参与了白血病细胞的分化过程。最后,为了明确miR-10b对白血病细胞分化的调控作用,在HL60中转染miR-10b mimics观察其对细胞分化的影响,结果发现,过表达miR-10b能抑制1,25D3诱导的细胞分化形态特征的改变及单核细胞表面标志CD14的表达。因此,通过上述三方面的研究表明,miR-10b在白血病细胞的分化阻滞中发挥了重要作用。

那么,miR-10b可能通过什么途径阻滞白血病细胞的分化呢? 锌指转录蛋白基因KLF4作为miR-10b的靶基因近年来被认为是单核系分化的一个重

要调控因子,当HL60细胞中过表达KLF4时能促进细胞向成熟的单核细胞分化,而将KLF4干扰后则能阻滞佛波酯诱导的分化^[6-7]。我们在实验中发现,5个不同分化程度的白血病细胞系中,KLF4的蛋白表达与白血病细胞的分化程度呈正相关;同时,1,25D3诱导HL60细胞分化过程中KLF4的表达随诱导时间的延长逐渐增加;若在HL60细胞中过表达miR-10b后则能抑制KLF4的表达,同时阻滞1,25D3诱导的白血病细胞单核系分化,进一步证实了miR-10b可能是通过靶向KLF4从而阻滞白血病细胞的体外分化。

综上所述,本研究首次提出了miR-10b在白血

病细胞分化阻滞中的重要作用, 为探索miR-10b促进白血病的发生发展提供了潜在的理论依据, 此结论还需在临床患者标本中进一步验证, 此外, 针对沉默miR-10b的诱导分化治疗也是日后值得深入研究的方向。

参考文献 (References)

- 1 Navarro F, Lieberman J. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *J Immunol* 2010; 184(11): 5939-47.
- 2 Palma CA, Tonna EJ, Ma DF, Lutherborrow MA. MicroRNA control of myelopoiesis and the differentiation block in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med* 2012; 16(5): 978-87.
- 3 Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, *et al.* Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2010; 85(5): 331-9.
- 4 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, *et al.* MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111(6): 3183-9.
- 5 Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, *et al.* MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem* 2010; 285(11): 7986-94.
- 6 Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, *et al.* The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J* 2007; 26(18): 4138-48.
- 7 Schuetz A, Nana D, Rose C, Zocher G, Milanovic M, Koenigsmann J, *et al.* The structure of the Klf4 DNA-binding domain links to self-renewal and macrophage differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(18): 3121-31.
- 8 Agirre X, Martínez-Climent JÁ, Otero MD, Prósper F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* 2012; 26(3): 395-403.
- 9 Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(4): 352-8.
- 10 Zheng YS, Zhang H, Zhang XJ, Feng DD, Luo XQ, Zeng CW, *et al.* MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2012; 31(1): 80-92.
- 11 Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Wegrzyn J, Rouhi A, Petriv O, Hansen CL, *et al.* MicroRNA-146a disrupts hematopoietic differentiation and survival. *Exp Hematol* 2011; 39(2): 167-78.
- 12 Ma L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2010; 12(5): 210.