

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00274

## miR-15a/miR-16-1 增强 Raji 细胞对阿糖胞苷的敏感性

湛 琴,何冬梅\*

暨南大学医学院血液病研究所,广州 510632

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸能否增强 Raji 细胞对阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) 的敏感性。**方法** 将化学合成的 miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸利用脂质体 2000 转染入 Raji 细胞后,联合 Ara-C, CCK8 法检测 Ara-C 的 IC50 值变化;锥虫蓝细胞计数法检测细胞增殖活性;Hoechst 染色观察细胞的凋亡形态;流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法测凋亡率。**结果** miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸转染 Raji 细胞后,再加入 Ara-C, 24 h Ara-C 的 IC50 值分别为 10.41 和 10.86, 明显低于单用 Ara-C 组 (15.43) 和随机序列联用 Ara-C 组 (14.92,  $P < 0.05$ )。锥虫蓝拒染法结果显示,转染后各时间点 miR-15a/miR-16-1 + Ara-C 组较单用 miR-15a/miR-16-1 组、单用 Ara-C 组及随机序列 + Ara-C 组明显抑制了 Raji 细胞的生长, Hoechst 染色可见大量凋亡细胞;流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测显示,miR-15a + Ara-C 组早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 20.93% 和 25.27%, miR-16-1 + Ara-C 组早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 20.69% 和 23.13%, 均明显高于 miR-15a 组、miR-16-1 组、Ara-C 组及随机序列 + Ara-C 组 ( $P < 0.05$ ), 后四者的早期凋亡率分别为 6.99%、4.73%、10.88% 和 14.39%, 晚期凋亡率分别为 10.08%、10.64%、11.83% 和 11.93%。**结论** miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸可增强 Raji 细胞对 Ara-C 的敏感性。

**[关键词]** miR-15a; miR-16-1; 寡核苷酸; 淋巴瘤; Raji 细胞; 阿糖胞苷; 药物敏感性

**[中图分类号]** R 733.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0274-04

### MiR-15a and miR-16-1 enhance sensitivity of Raji cells to Ara-C

CHEN Qin, HE Dong-mei\*

Institute of Hematology, Medical College, Ji'nan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To study whether miR-15a and miR-16-1 can enhance the sensitivity of Raji cells to cytarabine (Ara-C). **Methods** MiR-15a and miR-16-1 oligonucleotides were transfected into Raji cells with Lipofectamine™ 2000, and then the cells were treated with Ara-C. The IC50 values of Ara-C was detected by CCK8 assay. The growth of Raji cells was measured by trypan blue dye exclusion method. The apoptotic cells were observed by Hoechst dyeing; Annexin V/PI double dyeing and flow cytometry (FCM) were used to examine the cell apoptotic rate. **Results** After transfection of miR-15a or miR-16-1 into Raji cells, the IC50 values of Ara-C were 10.41 and 10.86, respectively, which were significantly lower than that of the untransfected group (15.43) and scrambled oligonucleotides (SODN) transfection group (14.92,  $P < 0.05$ ). Trypan blue dye exclusion assay showed that miR-15a/miR-16-1 transfection group had obviously decreased the cell growth compared to miR-15a, miR-16-1 group, untransfected group and SODN transfected group; Hoechst dyeing demonstrated plenty of apoptotic cells. Annexin V/PI double dyeing assays by FCM indicated that the cell apoptotic rates in earlier period and late period were 20.93% and 25.27% in the miR-15a + Ara-C group, and 20.69% and 23.13% in the miR-16-1 + Ara-C group, which were obviously higher than those in miR-15a group (6.99%, 10.08%), miR-16-1 group (4.73%, 10.64%), Ara-C group (10.88%, 11.83%) and control group (14.39%, 11.93%). **Conclusion** MiR-15a and miR-16-1 oligonucleotides can enhance the sensitivity of Raji cells to Ara-C.

**[Key words]** miR-15a; miR-16-1; oligonucleotide; lymphoma; Raji cell; cytarabine; drug sensitivity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):274-278]

MicroRNA (miRNA) 是 22 个左右核苷酸组成的内源性 RNA, 通过切割 mRNA 或翻译抑制两种机制, 在转录后水平对基因表达进行负性调控。它广泛参与细胞的生长、发育、分化、增殖和凋亡<sup>[1]</sup>, 因

此其表达水平的异常可能引起细胞增殖、分化、凋亡等的紊乱, 从而导致肿瘤的发生和发展。我们前期的研究表明, 转染 miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸入人淋巴瘤细胞株 Raji, 可负性调控 Bcl-2 的表达, 进

**[收稿日期]** 2009-10-12 **[接受日期]** 2010-01-25

**[基金项目]** 广东省自然科学基金 (04010446), 国务院侨办重点学科建设基金 (51205002). Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (04010446) and Key Subject of Overseas Chinese Affairs Office of the State Council (51205002).

**[作者简介]** 湛 琴, 硕士, 讲师。

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 020-85220262, E-mail: thedm@jnu.edu.cn

而诱导 Raji 细胞的凋亡<sup>[2]</sup>。本实验转染 miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸并联合 Ara-C, 探讨 miR-15a 和 miR-16-1 能否提高 Raji 细胞对 Ara-C 的敏感性, 以期望为临床治疗淋巴瘤提供新的方向。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞由本实验室保存。根据 MIRBase(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna>)提供的 miRNA 基因序列, 获取人 miR-15a (5'-uag cag cac aua aug guu ugu g-3') 和 miR-16-1 (5'-uag cag cac gua aau auu ggc g-3') 的序列, 采用 BLAST 软件进行分析, 确定随机对照序列 (scrambled oligonucleotides, SODN), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。脂质体 2000 转染试剂盒 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品。CCK8 和 Hoechst 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究, Annexin V/PI 双染试剂盒购自美国 BD 公司, RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品, 精制小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 阿糖胞苷购自苏州尤利特生物医药科技有限公司。

1.2 细胞培养 将 Raji 细胞接种于含体积分数 10% 的新生牛血清, 无青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 在含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱 37℃ 连续培养, 每 2、3 d 换液传代培养, 使细胞维持对数生长。

1.3 转染 采用无血清培养液按照脂质体 2000 转染试剂盒分别转染 0.6 μmol/L miR-15a 和 miR-16-1 寡核苷酸入 Raji 细胞, 并联合 Ara-C, 培养 4 h 后, 向每孔加入含 10% 小牛血清的培养基。继续培养以备用。

1.4 锥虫蓝细胞计数法 将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中, 按照上述步骤进行转染, Ara-C 的浓度为 10 μg/ml, 以下同, 分别于 24、48 和 72 h 收获细胞, 常规锥虫蓝 (0.5%) 染色, 用血球计数板计数活细胞数目, 实验重复 3 次。

1.5 Hoechst 染色试剂盒观察凋亡细胞形态 收集经上述处理 48 h 的细胞, 离心收集细胞样品于 1.5 ml 离心管内, 加入 0.5 ml 固定液, 混匀, 固定 10 min。离心去固定液, PBS 洗 2 遍。滴加至载玻片上, 晾干。均匀滴上 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min, 晾干。PBS 洗 2 遍。滴 1 滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上盖玻片, 荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。

1.6 Annexin V/PI 双染法 离心收集上述处理后 48 h 的各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心去上清, 195 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC 5 μl, 避光孵育 10 min, 离心去上清, 190 μl

Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 10 μl 碘化丙啶染色液, 冰浴避光放置, 随即进行流式细胞仪检测, 用 MULTICYCLE 软件分析处理结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间数据比较采用完全随机区组设计的单因素方差分析, 组间的比较选用可进行多个样本均数间每两个均数比较的 *q* 检验, IC<sub>50</sub> 值计算采用 Probit 单位概率法。

## 2 结果

2.1 转染 miR-15a 或 miR-16-1 寡核苷酸入 Raji 细胞后 Ara-C IC<sub>50</sub> 值的变化 转染 miR-15a 的 Raji 细胞在 0、5、10、20、40、80 μg/ml 浓度的 Ara-C 作用 24 h, 细胞活力明显低于相应 Ara-C 浓度作用下, 转染 SODN 的 Raji 细胞活力; 转染 miR-15a 或 miR-16-1 寡核苷酸入 Raji 细胞, 再加入 Ara-C, 24 h Ara-C 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 10.41 和 10.86, 明显低于单用 Ara-C 组 (15.43) 和 SODN 联用 Ara-C 组 (14.92) (*P* < 0.05), 而转染 SODN 入 Raji 细胞后, Ara-C 的 IC<sub>50</sub> 值未见明显降低 (*P* > 0.05)。

2.2 锥虫蓝拒染法检测细胞生长抑制情况 终浓度为 0.6 μmol/L 的 miR-15a/miR-16-1 寡核苷酸转染 Raji 细胞后, 分别加入 10 μg/ml Ara-C 后的细胞数较单用 miR-15a、单用 miR-16-1、单用 Ara-C 及 SODN + Ara-C 组明显降低, miR-15a/miR-16-1 寡核苷酸作用 24 h 时开始发挥作用, 且随着作用时间的增加, 其效果逐渐增强 (图 1)。

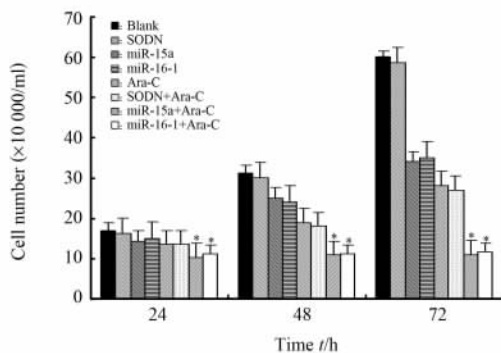


图 1 miR-15a 和 miR-16-1 联合 Ara-C 对 Raji 细胞的生长抑制作用  
Fig 1 Inhibitory effects of miR-15a/miR-16-1 plus Ara-C on growth of Raji cells

SODN: Scrambled oligonucleotides. \* *P* < 0.05 vs the other groups. *n* = 5,  $\bar{x} \pm s$

2.3 Hoechst 染色检测凋亡细胞形态 经转染 miR-15a/miR-16-1 寡核苷酸并联合 Ara-C 组经 Hoechst 染色后均可见大量凋亡细胞: 核膜完整, 体积变小, 核质固缩; 而其他组未见或仅见少量凋亡细胞 (图 2)。

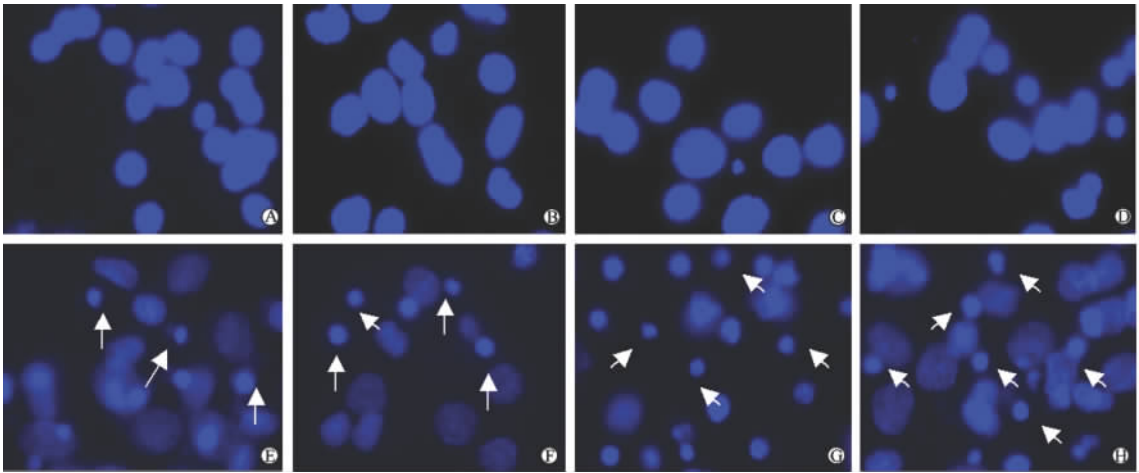


图2 miR-15a/miR-16-1+Ara-C处理48h的Raji细胞的凋亡形态

Fig 2 Morphology of apoptotic Raji cells at 48 h in different groups(Hoechst staining)

A; Blank; B; Scrambled oligonucleotides; C; miR-15a; D; miR-16-1; E; Ara-C; F; Scrambled oligonucleotides + Ara-C; G; miR-15a+ Ara-C; H; miR-16-1+ Ara-C. Arrows in E-H indicate apoptosis cells. Original magnification: ×400

2.4 细胞凋亡率分析 见表1、图3。miR-15a或miR-16-1寡核苷酸与Ara-C联用时的细胞凋亡率最高,与单用miR-15a或miR-16-1寡核苷酸、单用Ara-C、SODN联用Ara-C组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而SODN+Ara-C组与单用Ara-C组之间、miR-15a与miR-16-1之间比较细胞凋亡率未见统计学差异( $P > 0.05$ )。

表1 各组Raji细胞在作用48h后的凋亡率

Tab 1 Apoptosis rate of Raji cells at 48 h in different groups ( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	The early apoptosis rate	The late apoptosis rate
Blank	0.25 ± 0.3	0.65 ± 0.1
Scrambled oligonucleotides	0.96 ± 0.1	2.26 ± 0.2
miR-15a	6.99 ± 0.4	10.08 ± 0.3
miR-16-1	4.73 ± 0.5	10.64 ± 0.4
Ara-C	10.88 ± 0.3	11.83 ± 0.2
Scrambled oligonucleotides+Ara-C	14.39 ± 0.5	11.93 ± 0.4
miR-15a+Ara-C	20.93 ± 0.6*	25.27 ± 0.5*
miR-16-1+Ara-C	20.69 ± 0.8*	23.13 ± 0.7*

\*  $P < 0.05$  vs the other groups

### 3 讨论

miRNA发挥重要的基因表达调控功能,广泛参与细胞增殖、凋亡、分化及细胞周期调控等生物学过程。王芳等<sup>[3]</sup>证实miR-21反义寡核苷酸可以抑制U373MG细胞对替尼泊苷VM-26的耐受性。美国Blower研究组对miRNA与肿瘤耐药之间的关系进行了较为系统的研究<sup>[4-5]</sup>,结果提示miRNA在肿瘤细胞的药物敏感性或耐药性上扮演重要角色。

Bcl-2蛋白表达的降低可增强肿瘤细胞对阿糖胞

苷、甲氨蝶呤及环磷酰胺等多种化疗药物的敏感性<sup>[6-8]</sup>。miR-15a和miR-16-1可以靶向作用于Bcl-2 mRNA,负性调控Bcl-2蛋白的表达<sup>[9]</sup>。Ara-C是DNA多聚酶抑制剂,通过对DNA多聚酶的抑制,而影响DNA的复制。Ara-C是治疗急性白血病首选且非常有效的化疗药物,是核苷类抗代谢药物的典范,其杀灭白血病细胞的能力与其诱导肿瘤细胞的凋亡有关<sup>[10]</sup>。miR-15a和miR-16-1寡核苷酸是否可增强Raji细胞对Ara-C的敏感性尚未见报道。本实验结果发现,转染miR-15a/miR-16-1的Raji细胞,在不同浓度Ara-C作用下,细胞活力的抑制明显强于对照组,Ara-C的IC<sub>50</sub>值明显降低。经转染miR-15a/miR-16-1的Raji细胞在使用Ara-C后可见大量凋亡小体,并且miR-15a/miR-16-1联用Ara-C组的细胞凋亡率明显增高,较单用Ara-C或随机序列联用Ara-C组的细胞凋亡率差异有统计学意义。

我们前期研究<sup>[2]</sup>表明,化学合成的miR-15a和miR-16-1寡核苷酸分别转染入表达Bcl-2的Raji淋巴瘤细胞,模拟体内miR-15a/miR-16-1的高表达,可诱导Raji细胞凋亡。因而,以上的结果提示miR-15a/miR-16-1可能通过下调Bcl-2的表达,而增强Raji细胞对Ara-C的敏感性。Lin等<sup>[11]</sup>发现,与普通的胃癌细胞株SGC7901相比,多耐药胃癌细胞株SGC7901/VCR中miR-15b和miR-16表达显著上调,利用反义技术抑制miR-15b和miR-16的表达后,可明显增加SGC7901/VCR对化疗药多柔比星、长春新碱、VP-16和顺铂的敏感性。最新的研究表明,miR-15和miR-16可以靶向作用于Bcl-2、CCND1、WNT3A、c-Myb、CCND3、CCNE1、CDK6等基因<sup>[12-15]</sup>。

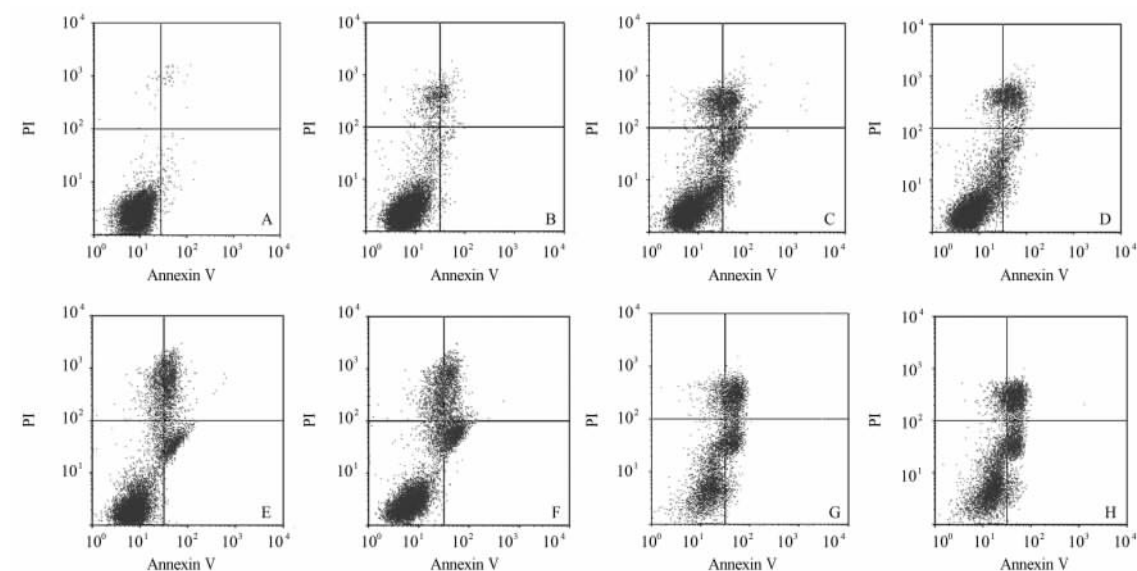


图3 转染 48 h 后 Raji 细胞凋亡形态

Fig 3 Apoptosis rates of Raji cells at 48 h in different groups

Results are from a representative experiment (Annexin V/PI). A: Blank; B: Scrambled oligonucleotides; C: miR-15a; D: miR-16-1; E: Ara-C; F: Scrambled oligonucleotides + Ara-C; G: miR-15a + Ara-C; H: miR-16-1 + Ara-C

对于同样的靶基因, miR-15a/miR-16-1 在不同的细胞系中可能产生的效应也不同。如在 A549 细胞株中, miR-16 的过表达并不引起细胞凋亡<sup>[15]</sup>, 这可能是由于不同细胞株对于靶基因的敏感性不同所致。我们的实验结果中, miR-15a/miR-16-1 增强 Raji 细胞对 Ara-C 的敏感性除了可能与 Bcl-2 下调有关外, 是否与 miR-15 和 miR-16 的其他靶基因有关有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 857-866.
- [2] 谌琴, 何冬梅, 张涓, 郭敏. miR-15a 和 miR-16-1 诱导人淋巴瘤 Raji 细胞株的凋亡 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2008, 29: 567-572.
- [3] 王芳, 孟颖, 刘民, 李欣, 刘悦, 汤华. MicroRNA-21 反义寡核苷酸可以抑制 U373MG 细胞对替尼泊昔 VM-26 的耐受性 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24: 674-678.
- [4] Blower P E, Verducci J S, Lin S, Zhou J, Chung J H, Dai Z, et al. MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 1483-1491.
- [5] Blower P E, Chung J H, Verducci J S, Lin S, Park J K, Dai Z, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 1-9.
- [6] He D, Fang B. Small hairpin RNA targeting at Bcl-2 increases cytarabine-induced apoptosis in Raji cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41: 131-136.
- [7] 房宝英, 何冬梅, 张涓, 刘革修. Bcl-2 短发夹状 RNA 增强甲氨喋呤对人淋巴瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 260-264.

Fang B Y, He D M, Zhang H, Liu G X. Small interfering RNA

targeting Bcl-2 enhances the inhibitory effects of MTX on transplanted human lymphoma in nude mice [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 260-264.

- [8] Beh C W, Seow W Y, Wang Y, Zhang Y, Ong Z Y, Ee P L, et al. Efficient delivery of Bcl-2-targeted siRNA using cationic polymer nanoparticles: downregulating mRNA expression level and sensitizing cancer cells to anticancer drug [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 41-48.
- [9] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13944-13949.
- [10] Kanno S, Shouji A, Hirata R, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 353-365.
- [11] Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 372-379.
- [12] Zhao H, Kalota A, Jin S, Gewirtz A M. The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells [J]. *Blood*, 2009, 113: 505-516.
- [13] Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik S E, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5166-5171.
- [14] Liu Q, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 5391-5404.
- [15] Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities [J]. *Nat Med*, 2008, 14: 1271-1277.

[本文编辑] 尹茶