

网络出版时间:2024-11-18 16:06:13 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1540.001

◇基础医学研究◇

MicroRNA-141-5p/ABCG1 逆转慢性粒细胞白血病 K562 细胞对伊马替尼的耐药性

许 晗,许婷婷,汪万杰,鲍 静

(安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022)

摘要 目的 探究 miR-141-5p 在慢性粒细胞白血病(CML)的作用机制及其对甲磺酸伊马替尼(IM)耐药性的影响。方法 qRT-PCR 检测 IM 耐药和敏感患者 miR-141-5p mRNA 水平;Western blot 法分别检测 K562 和 K562/G01 细胞转染前后 MMP-3、MMP-9、Bcl-2 等蛋白的表达情况;CCK-8 检测 K562 和 K562/G01 细胞活性;荧光素酶实验检测 miR-141-5p 与 ABCG1 的结合情况;裸鼠成瘤验证 miR-141-5p 在体内对肿瘤的影响。结果 miR-141-5p 在 IM 耐药的 CML 患者和 K562/G01 细胞中下调,且 miR-141-5p 的过表达可以抑制 IM 耐药 CML 细胞的生长并促进其凋亡。对荷瘤小鼠的研究表明,miR-141-5p 在体内抑制肿瘤生长。miR-141-5p 可以直接靶向作用于 IM 耐药 CML 细胞中的 ABCG1 调控 CML 发生。结论 miR-141-5p 和 ABCG1 形成竞争性内源性 RNA(ceRNA)网络,在 IM 耐药性中发挥作用,从而抑制 CML 的进展。

关键词 慢性粒细胞白血病;miR-141-5p;伊马替尼;ABCG1;耐药;K562

中图分类号 R 733.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1887-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.001

慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)是一种骨髓增生性疾病,可通过费城(Philadelphia, Ph)染色体的存在进行细胞遗传学识别,Ph 染色体的形成是 9 号染色体和 22 号染色体长臂之间相互易位的结果^[1]。易位产生的断裂点簇区(recombinant breakpoint cluster region, BCR)和原癌基因 ABL 基因的融合产生嵌合癌基因 BCR-ABL,其编码的蛋白显著增强酪氨酸激酶活性,从而激活导致 CML 发生的下游信号通路^[2]。酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)通过竞争性结合酪氨酸激酶催化剂位点上的 ATP 结合位点,使酪氨酸激酶失活,从而实现 CML 的靶向治疗^[3]。伊马替尼(imatinib, IM)是第一种用于治疗 CML 的酪氨酸激酶抑制剂,可提高总体生存^[4]。但对伊马替尼的耐药性已成为慢性粒细胞白血病治疗的临床障碍^[5]。因此,探索 IM 耐药性的新机制和 CML 治疗的靶点

迫在眉睫。之前的研究^[6]显示 miR-141-5p 抑制 K562 细胞的增殖。该研究探讨了 miR-141-5p 与 CML IM 耐药性的关系及其控制 IM 耐药性的机制,为提高 IM 的疗效提供新的理论依据,为耐药干预提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 收录安徽医科大学第一附属医院 50 例接受 IM 治疗的 CML 患者外周血标本。根据以下标准将患者分为 IM 耐药组和敏感组:IM 治疗 6 个月后 BCR-ABL 大于 10% 或治疗 12 个月后 BCR-ABL 大于 1% 的患者纳入耐药组,反之纳入敏感组。所有患者均已进行骨髓细胞形态学分析、染色体核型分析和融合基因检查,符合 CML 的诊断和分析标准并签署知情同意书,安徽医科大学伦理委员会批准本实验(20200040)。

1.1.2 实验动物 30 只雌性 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,体质量(20±2)g,饲养于 SPF 级实验室中,室温保持在 22~24℃,湿度保持在 50%~55%,光线控制为明暗交替(12 h 明与 12 h 暗),垫料与饮用水均经高压灭菌处理。

1.1.3 主要试剂与仪器 K562 细胞购自上海细胞生物学研究所;K562/G01 细胞购自中国医学科学

2024-10-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2008085MH296);安徽医科大学科学研究基金项目(编号:2020xkj186);安徽省教育厅高校科研计划重点项目(编号:2022AH051178)

作者简介:许 晗,女,硕士研究生;

鲍 静,女,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者,Email:baojing@ahmu.edu.cn

院血液学研究所。PVDF 膜购自美国 Millipore 生物公司; Lipofectamine 2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 生物公司。基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、细胞凋亡调控因子 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、B 淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、caspase-3、ATP 结合盒转运蛋白 G1 (ATP-binding cassette G1, ABCG1) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购自美国 Abcam 生物公司。QPCR 仪购自美国伯乐公司 (CFX Connect); Bio-shine ChemiQ 化学发光凝胶成像系统购自美国伯乐公司 (ChemiDoc)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞均在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内。取对数生长期的细胞, 加入不同浓度 (1、2、4 μmol/L) 的 IM, 24 h 后收集细胞用于后续实验。

1.2.2 荧光素酶报告基因测定 基于 TargetScan 的结果, 构建了含有 pmirGLO 野生型 (wide type, WT) 和 pmirGLO-突变体 (mutant, MUT) 的 ABCG1 基因的 3'UTR 片段。将人慢性髓系白血病细胞 (K562 细胞) 与 miR-141-5p 模拟物 + ABCG1 WT/MUT 共转染 48 h, PBS 洗涤 2 次。最后, 通过双荧光素酶报告基因测定系统观察荧光素酶活性。

1.2.3 qRT-PCR TRIzol 法提取细胞总 RNA, 使用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 使用 SYBR Premix Ex Taq II 进行 qRT-PCR。所有操作严格按照试剂盒说明书执行。RT-qPCR 涉及的引物如表 1 所示。

表 1 qRT-qPCR 的序列

Tab. 1 The sequence primers for qRT-qPCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
miR-141-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGG	CGACGTAACACTGTCTGG
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
ABCG1	CAGGGACCTTTCCTATTCCG	GGCCACCAACTCACCCTAT
GAPDH	TCCGTGTTCCACGAGAACT	GAAGCATTTGCGGTGGACGAT

1.2.4 细胞转染 取对数生长期的 K562 和 K562/G01 细胞, 以 1×10^5 个/ml 的细胞密度分别接种至 6 孔细胞培养板, 利用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 miR-141-5p mimics, miR-141-5p inhibitor, ABCG1 过表达质粒及其对照, IM 治疗 24 h 后检测对细胞的影响, 包括增殖、凋亡、迁移和侵袭。

1.2.5 CCK-8 检测细胞活性 取对数生长期的 K562 和 K562/G01 细胞接种到 96 孔板中。向每个孔中加入 CCK-8 (10 μl) 溶液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h; 酶标仪 450 nm 波长测出同一时间点吸光度 (absorbance, A) 值, 用测得的 A 值进行细胞增殖影响的分析。

1.2.6 软琼脂集落形成试验检测细胞增殖 在 24 孔板中的软琼脂上培养转染后的细胞 3 周。4% 多聚甲醛和 0.1% 结晶紫染色固定细胞 15 min 和 20 min, 随机选择 10 个视场进行计数、拍照和统计分析。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞转染 48 h 后, 离心收集细胞, 加入 200 μl 结合缓冲液和 5 μl Annexin V-FITC 试剂并混合, 将混合物在室温下的暗室中保持 15 min 后加入 5 倍体积的碘化丙啶, 孵育 15 min 后流式细胞仪分析结果。

1.2.8 Western blot 实验 将细胞置于 RIPA 裂解缓冲液中充分裂解, 于 4 °C、12 000 r/min 将刮棒刮取的细胞离心 5 min 得到细胞总蛋白。使用 BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度, 将蛋白样品煮沸 10 min 后, 在 SDS-PAGE 凝胶上分离。转移至 PVDF 膜上, 使用脱脂牛奶常温封闭 1 h, 加入一抗, 4 °C 条件下与 PVDF 膜孵育过夜。次日, 加入二抗与 PVDF 膜在室温下孵育 1 h, ECL 显影。一抗 MMP-3 (1 : 1 000), MMP-9 (1 : 1 000), Bax (1 : 1 000), Bcl-2 (1 : 1 000), caspase-3 (1 : 1 000), ABCG1 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 10 000), 山羊抗兔 (1 : 4 000) 和山羊抗鼠 (1 : 4 000) 作为二抗。

1.2.9 肿瘤异种移植实验 miR-141-5p agomir 或对照 agomir 转染后, 胰蛋白酶消化 K562/G01 细胞并制成细胞悬浮液。随后, 将细胞悬浮液 (1×10^7 个/只小鼠) 皮下接种到 BALB/c 裸鼠左侧腋下。接种 3 d 后, 将成功接种的裸鼠随机分为两组 (每组 6 只), 每天喂食 IM 或生理盐水 (100 mg/kg), 记录每周肿瘤大小和体积。上述动物实验经安徽医科大学伦理委员会批准进行 (20190657)。

1.2.10 免疫组织化学 对肿瘤组织切片进行脱水和闭合, 而后将切片与抗 Ki67 工作溶液在 4 °C 下孵育过夜。切片在常温下用生物素标记的二抗处理 30 min 之后, DAB 染色。最后, 对切片进行脱水、清理、密封和显微镜检查。

1.2.11 TUNEL 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 ~ 60 min, PBS 洗涤 2 次, 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS, 冰上孵育 2 min, 用抗荧光淬灭封片液封片后

荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理 统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验用于比较两组均数。采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线评估 miR-141-5p 检测对 CML 诊断的预测价值, 使用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析。每个实验独立重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IM 耐药性 CML 中 miR-141-5p 的表达明显下调 qRT-PCR 结果显示在 IM 耐药组患者的 miR-141-5p 表达远低于 IM 敏感组 (图 1A)。此外, miR-141-5p 在 IM 耐药性细胞株 K562/G01 细胞中的表达水平远低于正常 K562 细胞 (图 1B)。通过 ROC 曲线分析评估 miR-141-5p 对 CML 的诊断潜力, 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.839 ($P < 0.001$; 95% CI: 0.728 ~ 0.949), 这表明 miR-141-5p

在预测 CML 方面具有敏感性和特异性 (图 1C)。根据 Kaplan-Meier 分析, miR-141-5p 的低表达与较差的总生存率有关 (图 1D)。

2.2 miR-141-5p 过表达增强 K562/G01 细胞对伊马替尼的敏感性 CCK-8 结果显示, 在 IM 诱导的环境下, K562 细胞表现出比 K562/G01 细胞更低的存活率, 且随着 IM 浓度的增加, 尤其是在 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 IM 浓度下, 这种趋势更加明显 (图 2A)。为了研究 miR-141-5p 过表达与 CML 和 IM 敏感性之间的关系, 用 miR-141-5p mimics 及其对照转染 K562 和 K562/G01 细胞。q-PCR 结果证明转染成功 (图 2B)。之后, 功能学实验显示 miR-141-5p mimics 降低了 K562 和 K562/G01 细胞的活力并抑制了增殖, 但 IM 仅影响 K562 细胞, 对 K562/G01 细胞没有影响。miR-141-5p mimics 与 IM 共同作用后对 K562 细胞的抑制作用大于 miR-141-5p mimics 或 IM 单独对 K562/G01 细胞中细胞存活和增殖的影响 (图

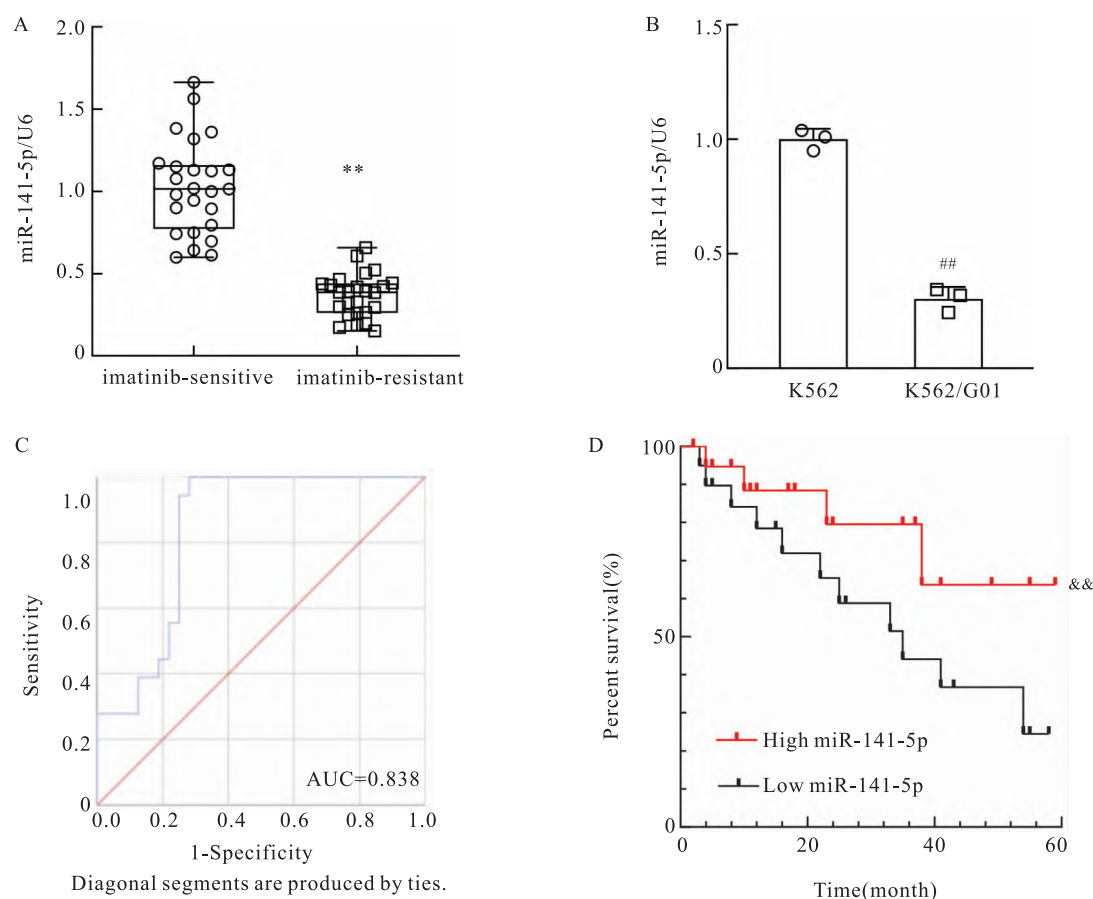


图1 miR-141-5p 在 IM 耐药 CML 血清中的表达明显下调

Fig. 1 The expression of miR-141-5p was significantly downregulated in the serum of IM resistant CML

A: The expression levels of miR-141-5p in IM-sensitive and IM-resistance CML patients; B: MiR-141-5p expression in K562 and K562/G01 cells; C: ROC of MiR-141-5p in CML patients; D: Survival analysis based on IM-resistance CML with high-level or low-level miR-141-5p; ** $P < 0.01$ vs imatinib-sensitive; ## $P < 0.01$ vs K562 cell; && $P < 0.01$ vs Low miR-141-5p.

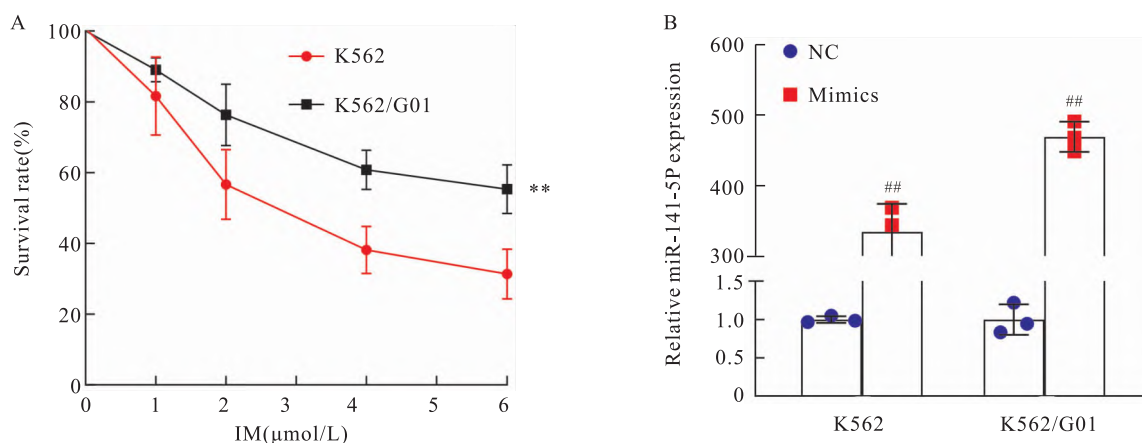


图2 miR-141-5p的表达

Fig.2 The expression of miR-141-5p

A: Cell survival rate under different concentration IM measured using CCK-8 assay; B: The transfection efficiency detected using PCR assay; ** $P < 0.01$ vs K562, ## $P < 0.01$ vs NC.

3A、B),在迁移和侵袭相关蛋白 MMP-3 和 MMP-9 的检测中观察到类似的结果(图 3C)。此外,相比于 miR-141-5p mimics 或 IM 单独作用时的促凋亡作用,miR-141-5p mimics 和 IM 联合使用进一步促进了 K562 细胞的凋亡,但对 K562/G01 细胞的凋亡率几乎没有差异(图 3D)。表明 miR-141-5p 可以抑制 K562/G01 的生长并促进其凋亡。

2.3 miR-141-5p 在体内降低 K562/G01 细胞对 IM 的耐药性 接下来,通过使用裸鼠异种移植模型进一步验证 miR-141-5p 降低 CML 细胞生长。皮下植入已用 miR-141-5p agomir 预处理的 K562/G01 细胞于 BALB/c 小鼠中,而后分为 IM 处理组和空白对照组。同对照组相比,miR-141-5p agomir 组的肿瘤生长明显减少,而 IM 治疗组的差异很小,表明 miR-141-5p agomir 与 IM 共同作用后对肿瘤生长的抑制作用不大于单独的 miR-141-5p agomir(图 4A、B)。根据 IHC 和 TUNEL 测定,miR-141-5p 的过表达显著抑制了增殖相关蛋白 Ki-67 的表达和促进细胞凋亡,而 IM 在增殖或凋亡中的作用相当有限;miR-141-5p agomir 和 IM 的组合具有与 miR-141-5p agomir 相似的效果(图 4C、D)。这些结果进一步证明了 miR-141-5p 在体内降低了 K562/G01 细胞的 IM 耐药性。

2.4 ABCG1 是 miR-141-5p 的直接靶标 在线数据库表明 ABCG1 被预测为 miR-141-5p 的靶标之一(图 5A)。通过荧光素酶报告基因测定评估 miR-141-5p 和 ABCG1 在 K562 细胞中之间的相关性,揭示 miR-141-5p mimics 显著降低了由 ABCG1 WT 驱

动的荧光素酶活性,而对 ABCG1 MUT 驱动的荧光素酶活性没有显著影响(图 5B)。此外,在 miR-141-5p mimics 组中,K562 和 K562/G01 细胞中 ABCG1 蛋白和 mRNA 水平降低,而在抑制剂组中升高(图 5C、D),这表明 miR-141-5p 负调控 ABCG1 表达。同样,在 CML 患者中,IM 耐药性表现出比 IM 敏感组更高的 ABCG1 表达,且 miR-141-5p 水平和 ABCG1 水平呈负相关性(图 5E、F)。

2.5 miR-141-5p 通过靶向 ABCG1 调节 CML 细胞的 IM 敏感性 使用 qRT-PCR 和 Western blot 确定转染的有效性(图 6)。当 ABCG1 过表达时,在 IM 处理条件下观察到 miR-141-5p mimics 对 K562 和 K562/G01 细胞活力和增殖的抑制作用的部分逆转(图 7A、B)。在 miR-141-5p mimics 的作用下,IM 诱导的 K562 或 K562/G01 细胞中 MMP-3 和 MMP-9 表达的抑制被 ABCG1 过表达逆转(图 7C)。此外,流式细胞术实验显示,ABCG1 的上调逆转了在 IM 诱导的 K562 和 K562/G01 细胞中 miR-141-5p mimics 参与的对细胞死亡的促进作用(图 7D)。上述数据表明 miR-141-5p 通过靶向 ABCG1 调节 CML 细胞的 IM 敏感性。

3 讨论

CML 是一种发生在骨髓系统中的获得性恶性造血干细胞疾病。作为首批合成 TKI 之一,IM 已被证明在 CML 治疗中非常有效^[7]。然而,越来越多的 CML 患者对 IM 表现出原发性或继发性耐药性,这会影响预后和生活质量^[8]。因此,探索 IM 耐药性

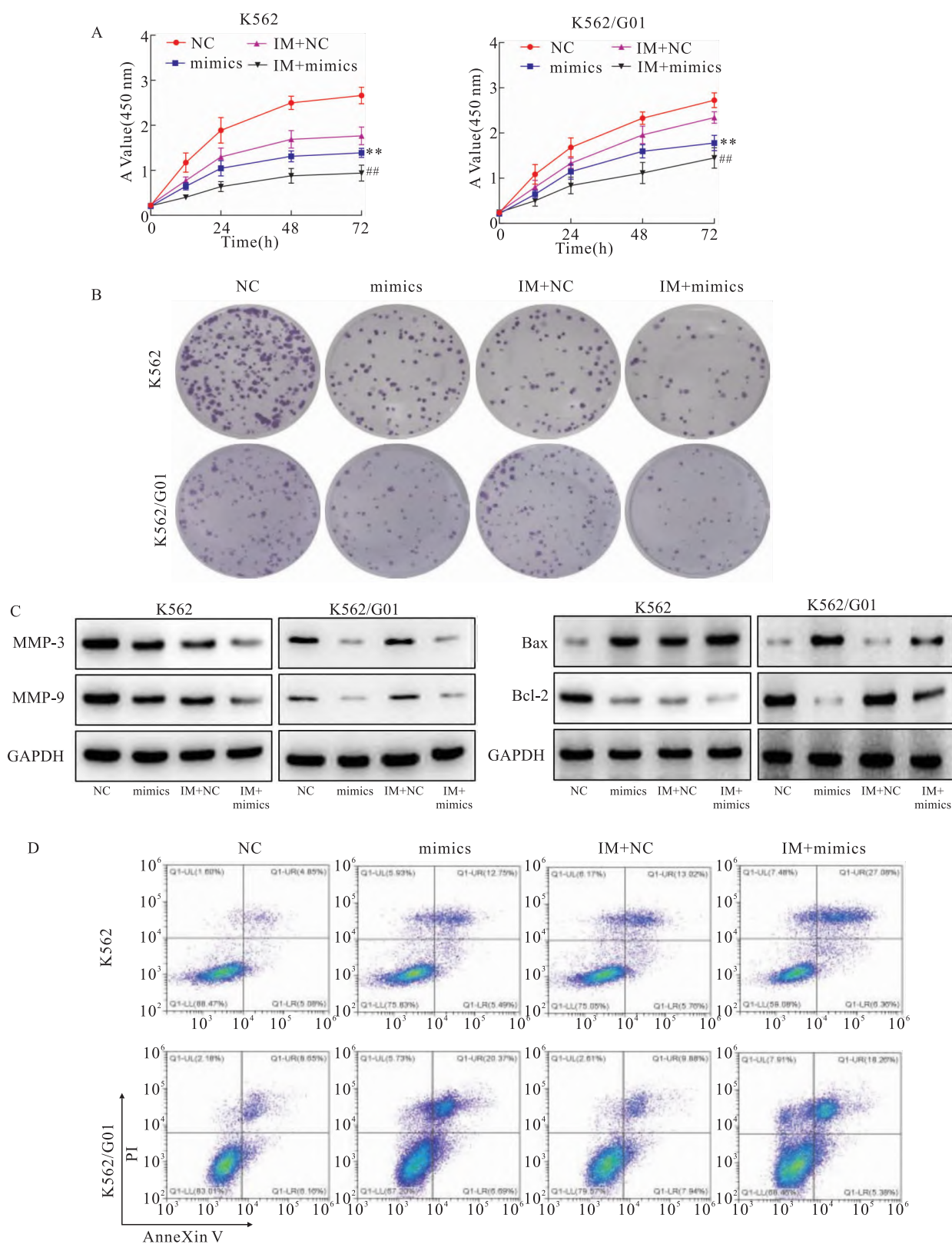


图3 miR-141-5p的过表达增强了K562/G01细胞中伊马替尼的敏感

Fig. 3 Overexpression of miR-141-5p enhanced the sensitivity of imatinib in K562/G01 cells

A: Cell viability characterized by CCK-8 method; B: Cell proliferation assessed by colony formation assay; C: The migration and invasion-related and cell apoptosis-related proteins tested by western blot analysis; D: Cell apoptosis tested by flow cytometry assay; * $P < 0.01$ vs NC; ## $P < 0.01$ vs IM + NC.

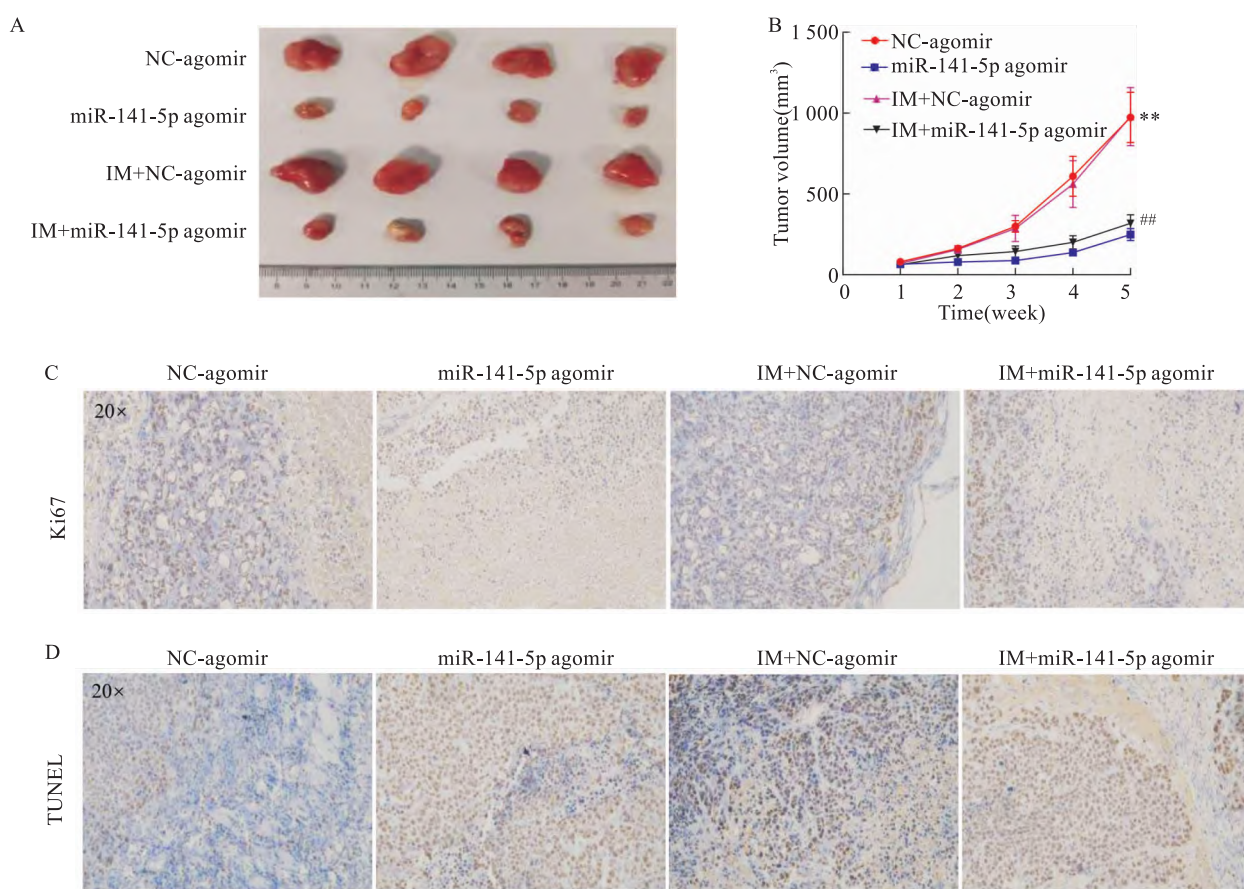


图4 miR-141-5p 在体内降低 K562/G01 细胞的 IM 耐药性

Fig.4 miR-141-5p reduces IM resistance in K562/G01 cells *in vivo*

A: Images of tumors in different group; B: Tumor volumes of mice; C: The protein level of Ki67 measured by immunohistochemistry; D: Cell apoptosis measured by TUNEL assay; ** $P < 0.01$ vs IM + NC-agomir; ## $P < 0.01$ vs IM + miR-141-5p agomir.

的机制并为 CML 患者的临床应用提供耐药性干预靶点至关重要。在之前的一项研究中,miR-141-5p 在 CML 患者和 CML K562 细胞中低表达^[6],而在本研究中,IM 耐药的 CML 患者的 miR-141-5p 表达水平明显低于 IM 敏感患者,且当 ABCG1 的表达受到具有抗肿瘤特性的 miR-141-5p 的调节时,IM 耐药的 CML 患者更容易受到 IM 的影响。

研究^[9]表明,miRNA 可作为肿瘤临床诊断的标志物,并为临床癌症诊断和治疗提供新的思路。研究^[10]表明 miRNA 在慢性粒细胞白血病中发挥着重要作用,如过度表达的 miR-155 可促进 CML 细胞凋亡^[11]。miRNA-141 是 miR-200 家族的一个成员,其在前列腺癌起着肿瘤抑制基因的作用^[12]。本研究的功能试验表明,在 IM 诱导的环境中,K562 细胞的存活率低于 K562/G01 细胞,且随着 IM 浓度的增加,这种趋势更加明显。miR-141-5p 过表达显著改善了 IM 对 K562 细胞活力、增殖、迁移、侵袭和凋亡

的影响,而 miR-141-5p-mimics 同 IM 组合对 K562/G01 细胞活力、增生、迁移、入侵和凋亡的作用与单独表达 miR-141-5p-mimics 相似,表明该 miRNA 的过表达增强了 K562/G01 细胞中的 IM 敏感性。此外,在体内也观察到类似的结果。

许多研究表明,miRNA 通过结合信使核糖核酸 3'UTR 上的互补序列来限制靶基因的表达并阻止其翻译,从而与信使核糖核酸竞争,从而在肿瘤发生、侵袭、转移和耐药性方面具有重要意义^[13]。更重要的是,miR-141-5p 的机制在具有 IM 耐药性的 CML 的分子水平上被清楚地揭示。TargetScan 数据库显示 ABCG1 是 miR-141-5p 的一个作用靶点,其表达水平与 miR-141-5p 的表达呈负相关,参与 CML 细胞增殖迁移。挽救实验表明,miR-141-5p 通过靶向 ABCG1 调节 CML 细胞的 IM 敏感性。

课题组重点关注了 miRNA 和 ABCG1 对 IM 耐药性的影响,而其具体作用机制有待进一步研究。

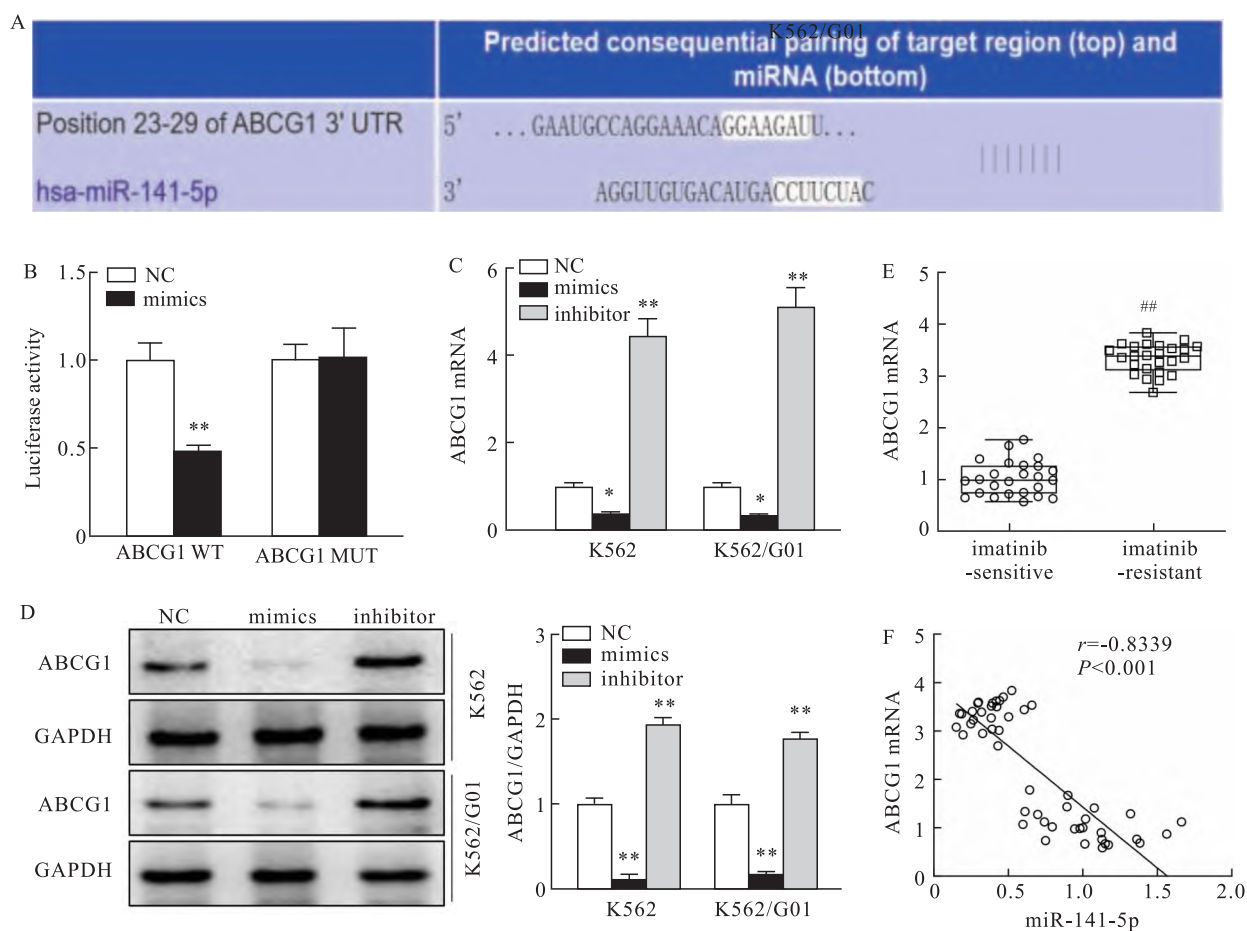


图5 ABCG1 是 miR-141-5p 的直接靶标

Fig. 5 ABCG1 was one direct target of miR-141-5p

A; Bioinformatics software was used to predict the binding sites between miR-141-5p and ABCG1; B; Luciferase reporter gene assay demonstrated the interaction between miR-141-5p and ABCG1; C; mRNA levels of ABCG1 in cells treated with miR-141-5p mimics and inhibitor; D; ABCG1 protein levels in cells treated with miR-141-5p mimics and inhibitor; E; mRNA levels of ABCG1 in IM-sensitive and IM-resistant; F; Pearson correlation analysis revealed the relationship between miR-141-5p and ABCG1; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC; ## $P < 0.01$ vs imatinib-sensitive.

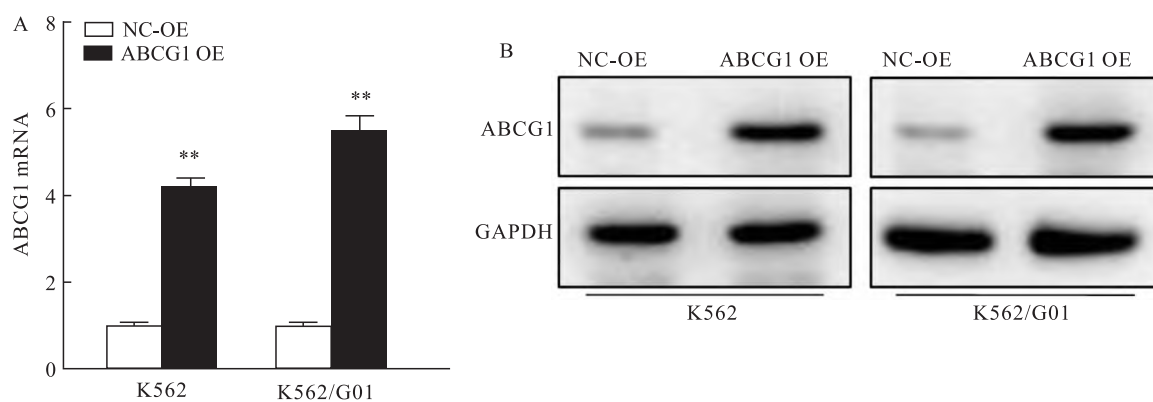


图6 ABCG1 的表达

Fig. 6 The expression of ABCG1

A. The mRNA levels of ABCG1 in K562 and K562/G01 cells that were induced by ABCG1 OE; B. The protein levels of ABCG1 in K562 and K562/G01 cells that were induced by ABCG1 OE; ** $P < 0.01$ vs NC-OE.

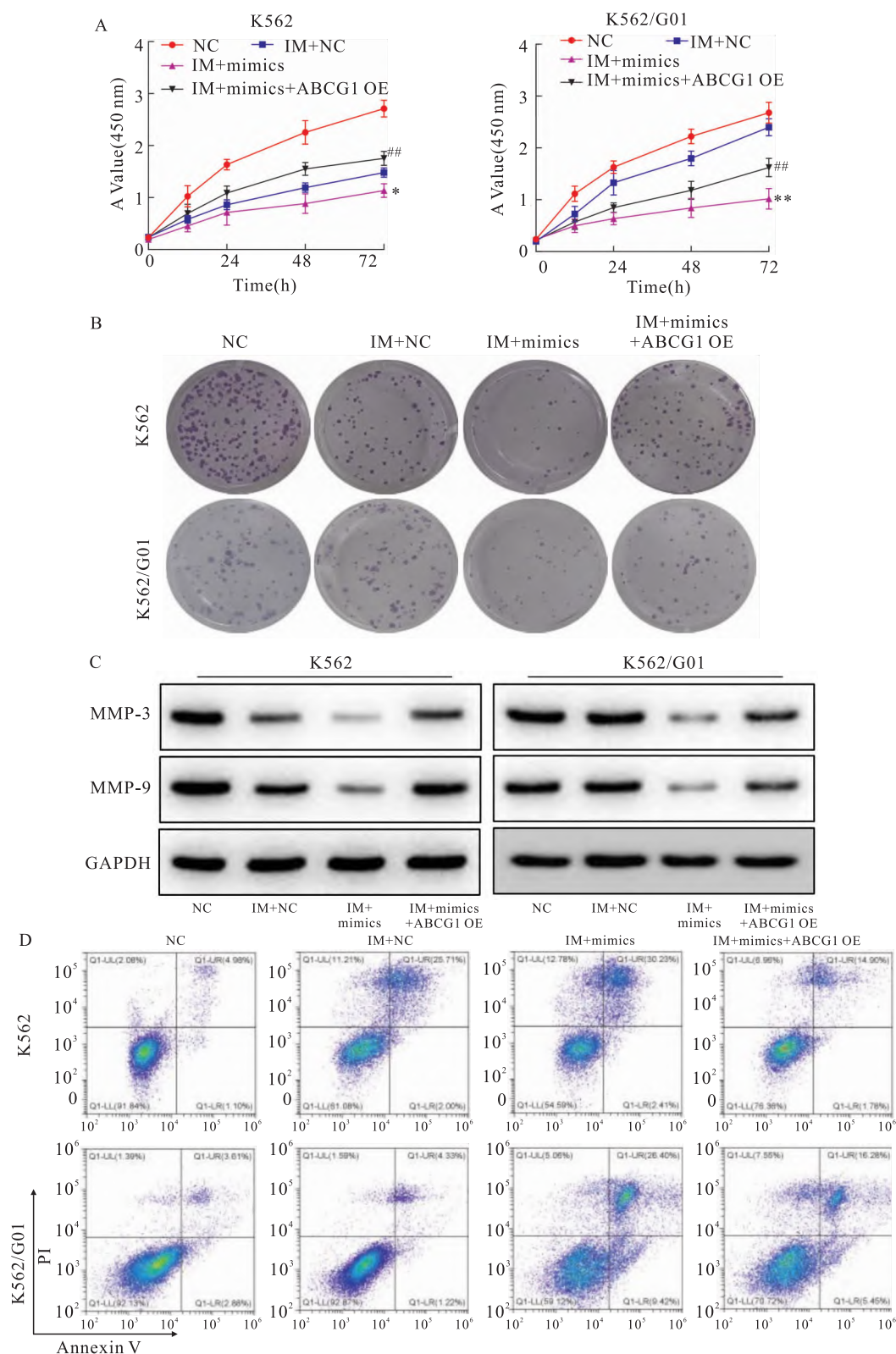


图7 miR-141-5p通过靶向ABCG1调节CML细胞的IM敏感性

Fig. 7 miR-141-5p modulates IM sensitivity of CML cells by targeting ABCG1

A: Cell viability characterized by CCK-8 assay; B: Cell proliferation assessed by colony formation assay; C: The protein expression of ABCG1 in K562 and K562/G01 cells censored by Western blot assay; D: Cell apoptosis tested by flow cytometry assay; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs IM + NC; ## $P < 0.01$ vs IM + mimics.

如前所述,ABC 转运蛋白可以通过调节外排泵影响细胞对 IM 的耐药性^[14]。然而,除此之外,是否还有更重要的影响机制尚不清楚,这将是进一步研究的方向。

综上所述,通过靶向 ABCG1 表达,miR-141-5p 通过影响 IM 耐药性 CML 细胞的增殖、迁移和侵袭,在 CML 细胞中发挥主要作用。因此,miR-141-5p/ABCG1 轴对 IM 耐药性 CML 细胞的存活和致癌性至关重要,并有望代表 CML 的潜在生物标志物。

参考文献

- [1] Rudich A, Garzon R, Dorrance A. Non-coding RNAs are implicit in chronic myeloid leukemia therapy resistance[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12271. doi:10.3390/ijms232012271.
- [2] Osman A E G, Deininger M W. Chronic myeloid leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions[J]. Blood Rev, 2021, 49: 100825. doi:10.1016/j.bre.2021.100825.
- [3] Cifteler R, Haznedaroglu I C. Tailored tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment of chronic myeloid leukemia (CML) based on current evidence[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(24): 7787–98. doi:10.26355/eurrev_202112_27625.
- [4] Vener C, Banzi, Ambrogio F, et al. First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: A systematic review and meta-analysis[J]. Blood Adv, 2020, 4(12): 2723–35. doi:10.1182/bloodadvances.2019001329.
- [5] Ozkan T, Hekmatshoar Y, Karabay A Z, et al. Assessment of azithromycin as an anticancer agent for treatment of imatinib sensitive and resistant CML cells[J]. Leuk Res, 2021, 102: 106523. doi:10.1016/j.leukres.2021.106523.
- [6] Bao J, Li X, Li Y, et al. MicroRNA-141-5p acts as a tumor suppressor via targeting RAB32 in chronic myeloid leukemia[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1545. doi:10.3389/fphar.2019.01545.
- [7] Senapati J, Sasaki K, Issa G C, et al. Management of chronic myeloid leukemia in 2023 - common ground and common sense[J]. Blood Cancer J, 2023, 13(1): 58. doi:10.1038/s41408-023-00823-9.
- [8] Claudiani S, Apperley J F. The argument for using imatinib in CML[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2018, 2018(1): 161–7. doi:10.1182/asheducation-2018.1.161.
- [9] 张红霞, 王奎, 吴广胜. miR-381-3p 在急性髓系白血病中的表达及对白血病细胞增殖和凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1164–70. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.017.
- [9] Zhang H X, Wang K, Wu G S. The expression of miR-381-3p in acute myeloid leukemia and its effect on the proliferation and apoptosis of leukemia cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(7): 1164–70. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.017.
- [10] Tang X, Ren H, Guo M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19: 910–28. doi:10.1016/j.csbj.2021.01.018.
- [11] 任影丽, 陈治东, 孙蓓蓓, 等. miR-155 对慢性髓细胞白血病细胞凋亡及热休克蛋白表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(1): 34–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.006.
- [11] Ren Y L, Chen Z D, Sun B B, et al. Effects of miR-155 on apoptosis of chronic myeloid leukemia cells and expression of heat shock proteins[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(1): 34–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.006.
- [12] Sharma N, Baruah M M. The microRNA signatures: Aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2019, 21(2): 126–44. doi:10.1007/s12094-018-1910-8.
- [13] Rykova E, Ershov N, Damarov I, et al. SNPs in 3'UTR miRNA target sequences associated with individual drug susceptibility[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13725. doi:10.3390/ijms232213725.
- [14] Zhang H, Wang Y, Yang H, et al. TCF7 knockdown inhibits the imatinib resistance of chronic myeloid leukemia K562/G01 cells by neutralizing the Wnt/ β -catenin/TCF7/ABC transporter signaling axis[J]. Oncol Rep, 2021, 45(2): 557–68. doi:10.3892/or.2020.7869.

MicroRNA-141-5p/ABCG1 reverses imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells

Xu Han, Xu Tingting, Wang Wanjie, Bao Jing

(Dept of Hematology, Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the mechanism of miR-141-5p and its effect on Imatinib (IM) resistance in CML. **Methods** qRT-PCR was used to detect miR-141-5p mRNA levels in IM resistant and sensitive patients. Western blot was used to detect the expression of proteins such as MMP-3, MMP-9, and Bcl-2 before and after transfection in K562 and K562/G01 cells. CCK-8 was used to detect of K562 and K562/G01 cell activity; Flow cytometry assay was used to detect the binding of miR-141-5p with ABCG1; Nude mice were used to validate the effect of miR-141-5p on tumors *in vivo*. **Results** The results showed that miR-141-5p was downregulated in IM-

网络出版时间:2024-11-18 16:08:48 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1540.002

GPR108 缺失对脂多糖诱发脓毒症小鼠的炎症反应

张银涛¹, 杨 萍¹, 臧丹丹², 涂珍珍³, 徐如月¹, 周海胜^{1,2}

(安徽医科大学¹ 生物化学教研室、² 科研实验中心、³ 临床免疫研究所, 合肥 230032)

摘要 目的 探究 G 蛋白偶联受体 108 (GPR108) 的缺失对脂多糖 (LPS) 诱导的脓毒症小鼠所产生全身性炎症反应的影响。方法 雄性 C57BL/6 小鼠和 GPR108 基因敲除鼠随机分为 4 组: WT 组、WT-LPS 组、KO 组、KO-LPS 组。观察不同组小鼠的生理特征, 肝脏、肺组织的形态变化。提取骨髓来源的巨噬细胞流式检测其 M1 极化情况, 同时检测其肝脏、肺组织、巨噬细胞及血清的白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平。结果 KO-LPS 组小鼠肝脏、肺组织损伤表现明显, KO-LPS 组小鼠较 WT-LPS 组小鼠骨髓源性巨噬细胞向 M1 极化的数量明显多; 同时, KO-LPS 组小鼠在组织水平、细胞水平、血清水平检测 IL-6 的表达均明显高于 WT-LPS 组小鼠 ($P < 0.05$)。结论 在 LPS 诱导的脓毒症小鼠全身性炎症感染时, GPR108 缺失加重全身炎症反应。GPR108 对 LPS 诱导的脓毒症小鼠的炎症反应具有抑制作用。

关键词 脓毒症; G 蛋白偶联受体 108; 巨噬细胞; 脂多糖; 白细胞介素-6

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1896-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.002

脓毒症是由宿主感染反应失调引发的全身炎症反应性综合征, 是烧伤、创伤以及外科手术常见的并发症, 脓毒症常伴发多器官功能损伤, 其中, 肺及肝脏是脓毒症病情发展过程中最容易发生损伤的器官^[1]。宿主反应失调在脓毒症的发展中尤为重要, 其中免疫细胞的重塑起着重要作用。当发生脓毒症感染, 机体表现出促炎宿主反应, M1 巨噬细胞的过度活化, 从而导致大量的白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,

TNF- α) 等细胞因子产生引发细胞因子风暴^[2]。大多数脓毒症是由革兰阴性细菌感染引起的, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌的细胞壁主要成分, 也是诱发脓毒症的主要内毒素。LPS 通过活化 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), 诱发生机体产生包括 IL-6、TNF- α 在内的多种细胞因子, 从而发生炎症反应, 并导致肝脏、肺脏等多器官的损伤。有研究^[3]显示人体对于 LPS 反应的差异性与 TLR4 的突变有关。G 蛋白偶联受体 108 (G protein-coupled receptor 108, GPR108) 是 G 蛋白偶联受体超家族成员, 最初在人肺组织中获得 cDNA 序^[4]。前期研究^[5]表明, GPR108 是 TLRs 的负性调控分子, 在参与 TLR 介导的免疫应答保持平衡状态具有重要的作用。其调控的分子机制是抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B) 信号通路及

2024-08-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82071832); 安徽医科大学
研究生科研与实践创新项目 (编号: YJS20230003)

作者简介: 张银涛, 男, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

resistant CML patients and IM-resistant CML cells and overexpression of miR-141-5p could inhibit the growth of IM-resistant CML cells and promote their apoptosis. Research on tumor bearing mice had shown that miR-141-5p inhibits tumor growth *in vivo*. Finally, it was found that miR-141-5p could directly target ABCG1 in IM-resistant CML cells to regulate CML occurrence. **Conclusion** miR-141-5p and ABCG1 form a competing endogenous RNA (ceRNA) network to function in IM resistance, thus facilitating CML progression.

Key words chronic myeloid leukemia; miR-141-5p; imatinib; ABCG1; drug resistance; K562

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085MH296); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2020xkj186); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051178)

Corresponding author Bao Jing, E-mail: baojing@ahmu.edu.cn