

网络出版时间: 2022-04-01 11:08 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1418.012.html

# miR-1285 通过 YAP 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制

张红霞, 吴广胜

**摘要** 目的 探讨 miR-1285 通过转录共激活因子 Yes 相关蛋白 1 (YAP1) 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制。方法 构建 miR-1285 的质粒, 使 K562 细胞过表达 miR-1285 及敲低 miR-1285, 分为 miR-1285 mimics、mimics control、miR-1285 inhibitor、inhibitor control 四组; 采用 qRT-PCR 法定量分析四组中 miR-1285 的表达量, 验证转染效率, 利用 CCK8、Annexin V-FITC 方法检测四组 K562 细胞的凋亡、增殖情况; 使用 Western blot 检测 YAP 及其下游分子表皮生长因子受体 (EGFR) 等变化, 检测凋亡相关分子 BAX、Bcl-2 蛋白表达变化。结果 敲低 miR-1285 后, 可促进 K562 细胞的增殖, 抑制凋亡, YAP 的表达升高, 下游分子 EGFR 表达相应升高, 凋亡相关分子 BAX 降低, 而 Bcl-2 表达升高; 而过表达 miR-1285 后, K562 细胞增殖减弱, 凋亡增加, YAP 表达降低, 下游分子 P-EGFR 表达降低, 凋亡分子 BAX 表达升高, 而 Bcl-2 表达降低。结论 miR-1285 可通过抑制 YAP 的表达从而抑制慢性粒细胞白血病 K562 细胞的增殖、促进凋亡, 有望成为治疗慢性粒细胞白血病的靶向分子。

**关键词** miR-1285; YAP; 增殖; 凋亡

**中图分类号** R 557.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0569-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.012

慢性粒细胞性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种骨髓增生性肿瘤, 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI) 作为 CML 治疗的临床一线用药, 仍有许多患者对 TKIs 发生耐药<sup>[1]</sup>。CML 与 Wnt、Notch、Hippo 等信号通路的失调相关<sup>[2]</sup>。转录共激活因子 Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 是 Hippo 信号通路中的癌基因, 在肿瘤发生中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。YAP 参与了

癌症恶性行为的维持<sup>[4-6]</sup>, 有研究<sup>[7]</sup>显示抑制 YAP 的表达, CML 细胞生长减慢增加药物的敏感性, 另有研究<sup>[8]</sup>表明 YAP 的磷酸化水平与 CML 细胞生长成正比。

近年来微小 RNA (microRNA, miRNA) 在调控基因表达、肿瘤发生及发展发挥了重要作用<sup>[9]</sup>。miR-1285 也称为 miR-1285-1, miR-1285-3p, 位于 7q21-q22 中<sup>[10]</sup>。miR-1285 在多种癌症中发挥抑癌作用<sup>[11]</sup>, 而在 CML 中的作用尚不清楚。CML 中许多 microRNA 处于失衡状态, 多项研究<sup>[12]</sup>证明这些 microRNA 在调节白血病细胞的增殖、侵袭和转移方面发挥了重要作用, 但是否会作用于 YAP 这条通路尚无有力证据。因此该研究主要侧重于 miR-1285 通过靶向 YAP 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞的增殖、凋亡以及对其作用机制的初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒 (Thermo Fisher 公司), CCK8 检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒 (Abcam 公司), RIPA 细胞裂液 (BOSTER 公司), 1% 青链霉素、10% 胎牛血清 (Gibco 公司), 质粒 (上海 Genescript 公司), 具体序列见表 1。

表 1 质粒序列

| 名称                 | 序列                                                    |
|--------------------|-------------------------------------------------------|
| miR-1285 mimics    | F: UCUGGGAACAAAGUGAGACCU<br>R: GUCUCACUUUGUUGCCCAGAUU |
| mimics control     | F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT<br>R: ACGUGACGUUGCGAGAATT    |
| miR-1285 inhibitor | AGGUCUCACUUUGUUGCCCAGA                                |
| inhibitor control  | CAGUACUUUUGUGUAGUACAA                                 |

**1.2 K562 细胞的制备** 慢性粒细胞白血病 K562 细胞购于武汉普诺赛公司, 使用含 1% 青链霉素 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 于 37 °C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 每隔 24 h 进行更换培养基处理并 1:2 传代。选择对数期生长的细胞进行下一步实验细胞。质粒的转染使用 Lippo-

2022-03-07 接收

基金项目: 石河子大学 2021 年兵团财政科技计划项目 (编号: 2021CA002); 石河子大学 2021 年度自主资助支持校级科研项目 (编号: ZZZC202186)

作者单位: 石河子大学医学院第一附属医院血液科, 石河子 832000

作者简介: 张红霞, 女, 副主任医师;

吴广胜, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hematology@126.com

fectamine 3000 作为载体。

**1.3 CCK-8 法检测 K562 细胞增殖情况** 按  $5 \times 10^5$  /ml 密度将 K562 细胞种植在 24 孔板中并设置空白组,培养 12 h 后,每组设置 3 个对照组,将质粒与 K562 细胞共培养 48 h 与 72 h 后,每孔加入 25  $\mu$ l CCK-8 试剂,避光 37  $^{\circ}$ C 条件中孵育 1.5 h,测定酶标仪在 450 nm 吸光度时的吸光度(A)值,以此来计算细胞的增殖率。计算方法:增殖率 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**1.4 流式细胞仪检测 K562 细胞凋亡情况** 按  $5 \times 10^5$  /ml 密度将 K562 细胞种植在 6 孔板中,按照 1.3 项处理后的 K562 细胞使用预冷的 PBS 冲洗干净后,加入胰酶消化后收集细胞,离心获得沉淀,使用 PBS 重悬细胞后分装,分别加入 PI 和 Annexin V-FITC 抗体后,设置对照组,避光情况下上机检测。

**1.5 实时荧光定量 PCR 检测 K562 细胞中 miR-1285 的表达水平** 按照 1.3 项处理后的 K562 细胞,TRIzol 法提取细胞中总 RNA,调平后逆转录成 cDNA,反应条件:37  $^{\circ}$ C 2 min,42  $^{\circ}$ C 60 min,70  $^{\circ}$ C 5 min,4  $^{\circ}$ C 保存。将所得 cDNA 进行实时荧光定量 PCR,所用 PCR 引物序列见表 1。扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 10 min,95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,循环次数 40 次。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算公式得出 mRNA 的表达量。

**1.6 Western blot 法测定蛋白表达量** 按照 1.3 项处理后的 K562 细胞加入 RIPA 细胞裂解液,获取 K562 细胞中总蛋白样品,用 BCA 法检测上样蛋白浓度,调整蛋白浓度后使各组浓度一致,然后使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法分离蛋白并转移至 PVDF 膜,加入兔抗鼠单克隆抗体 YAP、P-EGFR、EGFR、BAX、Bcl-2、GAPDH(稀释比 1:800)于 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育 24 h 后,充分去除一抗并于常温条件下加入山羊抗兔二抗(稀释比 1:20 000)孵育 2 h,化学发光法检测各分子的蛋白表达情况,使用 Image J 软件处理灰度值并计算相对蛋白表达量。

**1.7 统计学处理** 使用 SPSS 21.0 进行统计分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组之间的差异用  $t$  检验进行比较,多组之间差异比较采用方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,所有实验至少独立进行 3 次。

## 2 结果

**2.1 转染质粒后 K562 细胞内 miR-1285 mRNA 的表达量** 在转染后 48 h 检测细胞内 miR-1285 的表达量,与 mimics control 组比较,miR-1285 mimics 组

表达升高,与 inhibitor control 组比较,miR-1285 inhibitor 组表达下降( $P < 0.05$ )。而 mimics control 组与 inhibitor control 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 1。

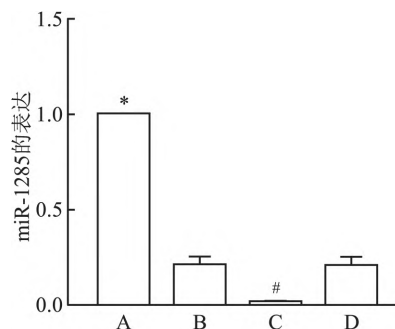


图 1 不同处理组 miR-1285 表达情况

A: mimics 组; B: mimics control 组; C: inhibitor 组; D: inhibitor control 组; 与 mimics control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor control 组比较: #  $P < 0.05$

**2.2 过表达 miR-1285 后抑制 K562 细胞增殖** 转染质粒 48 h 与 miR-1285 inhibitor 组比较,miR-1285 inhibitor 组、mimics control 组、inhibitor control 组均可促进 K562 细胞增殖( $P < 0.05$ );而通过过表达 miR-1285,miR-1285 mimics 组较 mimics control 组增殖减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在相同的培养环境下,miR-1285 inhibitor 组细胞增殖明显高于 inhibitor control 组( $P < 0.05$ ),见图 2。

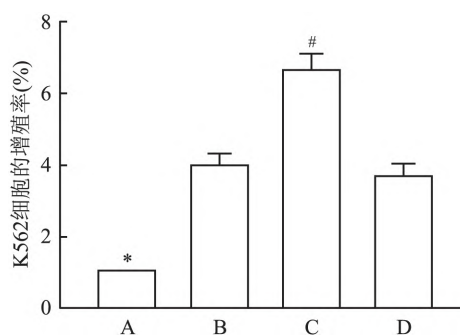


图 2 不同处理组 K562 细胞增殖情况

A: mimics 组; B: mimics control 组; C: inhibitor 组; D: inhibitor control 组; 与 mimics control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor control 组比较: #  $P < 0.05$

**2.3 过表达 miR-1285 后促进 K562 细胞凋亡** 如图 3 所示,与 mimics control 组比较,miR-1285 mimics 组凋亡增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而与 inhibitor control 组比较,miR-1285 inhibitor 组的凋亡比例降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );通过

质粒转染的方法将 miR-1285 过表达后,与敲低组比较,K562 细胞的凋亡增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

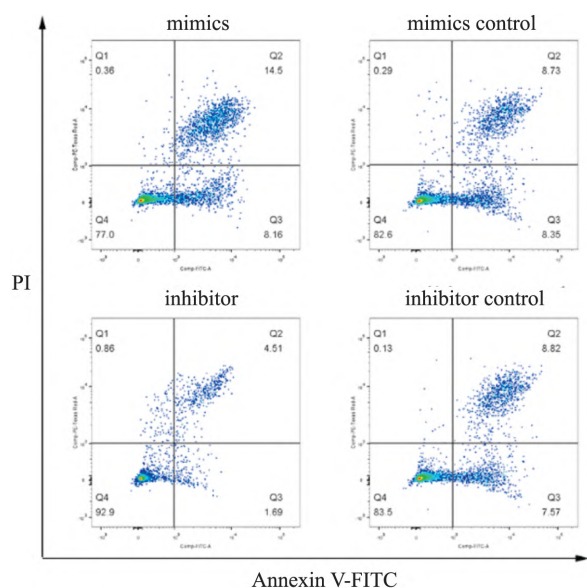


图3 不同处理组 K562 细胞凋亡情况

A: mimics 组; B: mimics control 组; C: inhibitor 组; D: inhibitor control 组; 与 mimics control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor control 组比较: #  $P < 0.05$

## 2.4 凋亡相关分子 BAX、Bcl-2 的蛋白表达

Western blot 结果显示,与 mimics control 组比较, mimics 组 BAX 升高,而 Bcl-2 降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而与 inhibitor control 组比较,miR-1285 inhibitor 组的 BAX 表达降低,而 Bcl-2 表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

## 2.5 YAP 及 EGFR 下游相关分子的蛋白表达

Western blot 结果显示,过表达 miR-1285 后,YAP 的表达下降,而敲低 miR-1285 会使 YAP 的表达上升;与 mimics control 组比较,miR-1285 mimics 组的 YAP、P-EGFR 表达量下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 inhibitor control 组比较,miR-1285 inhibitor 组的 YAP、P-EGFR 表达量升高,差异有统计学意义

( $P < 0.05$ )。各组之间 EGFR 未见明显变化,见图 5。

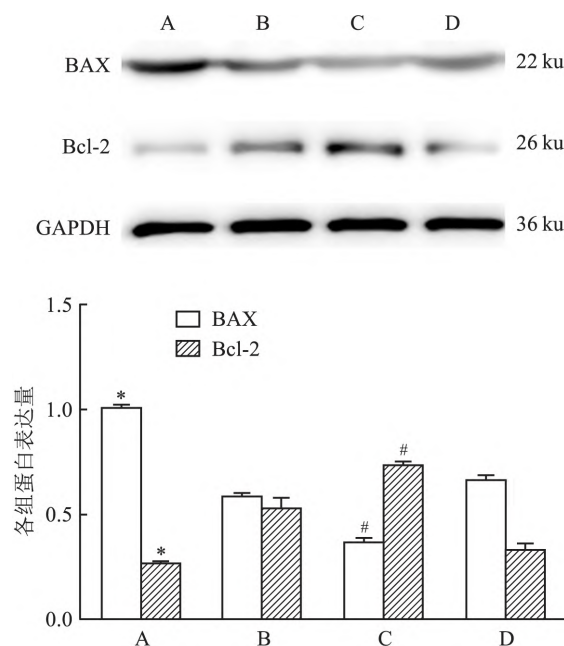


图4 不同处理组 K562 凋亡相关蛋白 BAX、Bcl-2 表达情况

A: mimics 组; B: mimics control 组; C: inhibitor 组; D: inhibitor control 组; 与 mimics control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor control 组比较: #  $P < 0.05$

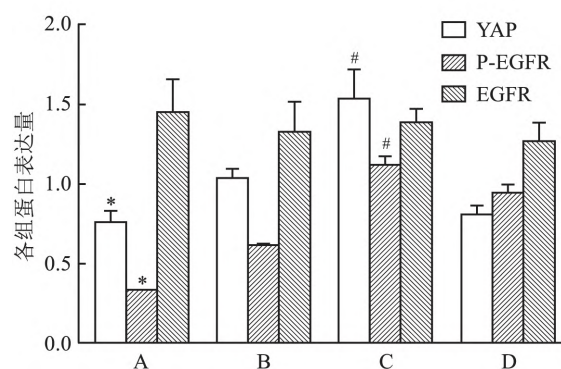
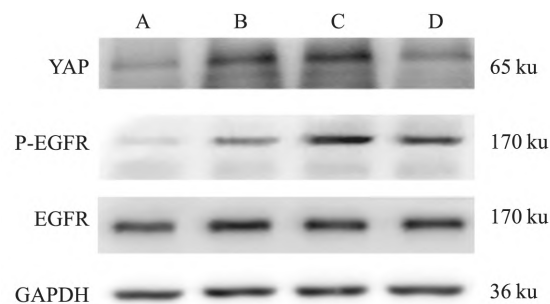


图5 不同处理组 K562 细胞中 YAP、EGFR、P-EGFR 的表达情况

A: mimics 组; B: mimics control 组; C: inhibitor 组; D: inhibitor control 组; 与 mimics control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor control 组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

近年来关于 microRNA 的研究逐渐增多,其中在抑制肿瘤方面有较多发现。有研究<sup>[13]</sup>显示在 CML 中使用 YAP 抑制剂维替泊芬可抑制其凋亡,促进增殖。本研究显示使用 miR-1285 质粒后,使 miR-1285 表达增加时,K562 细胞增殖减弱,而凋亡增加;相同条件下使 miR-1285 下调后,K562 细胞出现增殖明显而抑制凋亡。这与 Huang et al<sup>[14]</sup>在胰腺癌中发现 miR-1285 过表达后其抑制恶性生物学行为,可能是抑制了 YAP 的表达;而使 miR-1285 降低时,可得到相反的结果。

通过过表达或敲低 miR-1285,可以观察到 K562 细胞中 miR-1285 表达升高及降低,与对照组相比,差异有统计学意义,证明可有效建立细胞模型。当过表达 miR-1285 后,与 inhibitor 组相比,K562 细胞凋亡增加,而使 miR-1285 表达降低时,细胞凋亡降低,可能是由于过表达 miR-1285 后可抑制 YAP 的表达从而使 K562 细胞增殖减弱,进而凋亡增加,当使 miR-1285 表达降低后对 YAP 的抑制作用减弱,YAP 表达增加,促进 K562 细胞的增殖,抑制凋亡。这与相关研究<sup>[13]</sup>结果一致。CCK-8 法检测结果显示,过表达 miR-1285 后,K562 细胞增殖减弱,而敲低 miR-1285 后,可促进 miR-1285 的增殖,增殖结果与流式结果相一致;其原因也与上述一致,可能是由于抑制或促进 YAP 的表达进而影响了 K562 细胞的增殖。

对凋亡相关分子 BAX 与 Bcl-2 进行测定,结果显示 mimics 组 BAX 表达量升高,且明显高于其余三组,差异有统计学意义;当抑制 miR-1285 后,BAX 的表达量较对照组下降,明显低于 mimics 组;而与之对应的促增殖因子 Bcl-2 在 mimics 组中表达明显低于三组,而在 inhibitor 组中 Bcl-2 表达高于其余三组,差异均有统计学意义;说明 miR-1285 可通过一系列信号通路作用于 K562 细胞的线粒体通路从而影响增殖与凋亡,过表达 miR-1285 后,细胞增殖能力减弱,可能是因为抑制了 Bcl-2 而促进 BAX 的表达,通过线粒体通路来影响细胞增殖情况。而敲低 miR-1285 后,这种抑制作用减弱,对线粒体凋亡通路影响较小,因此促进细胞增殖。然而这种是通过何种机制来发挥作用的不得而知。

有研究<sup>[15]</sup>显示 miR-1285 可通过 YAP 信号通路可调控卵巢癌的增殖、侵袭及转移。而另有一项研究<sup>[7]</sup>证明 YAP 抑制剂可作用于 K562 细胞介导

Hippo 信号通路抑制增殖、促进凋亡。miRNA 在 CML 中的研究较少,但 YAP 对 CML 的作用已有大量研究<sup>[16]</sup>证实,因此笔者猜想 miR-1285 是否也能作用于 YAP 进而影响 K562 细胞的生物学行为,对增殖、凋亡有何影响。本研究结果显示使 miR-1285 过表达后可抑制 YAP 的表达,通过对下游分子检测 P-EGFR 表达也下降,而非磷酸化的 EGFR 未见明显变化;当使 miR-1285 敲低后,这种抑制作用会减弱,相比对照组 YAP 的表达升高,下游分子 P-EGFR 的表达随之升高,而相应的非磷酸化 EGFR 表达不变,发生这种情况的原因可能是由于 miR-1285 作用于 YAP 使表达降低,进而抑制对下游分子的激活作用,使下游分子呈现出非磷酸化,而使 miR-1285 表达降低后,这种抑制作用会降低,影响其他分子对 YAP 的抑制作用,使 YAP 表达升高,再通过一系列信号通路影响 K562 细胞的线粒体凋亡通路,抑制 BAX 的表达,使 Bcl-2 的表达升高,促进增殖,抑制凋亡。

综上所述,YAP 的表达异常参与了多种肿瘤细胞及血液系统疾病的生物学行为进程,与疾病的预后和转归均密切相关。miR-1285 又可以通过作用于 YAP 使 YAP 表达异常,在 CML 细胞的增殖、凋亡方面发挥了重要作用。为后期研究 microRNA 在 CML 的作用机制提供思路,为后期靶向治疗提供新方向,可设计针对于 CML 的 microRNA,为该病后期治疗提供一种新的靶向药物。

### 参考文献

- [1] Braun T P, Eide C A, Druker B J. Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 530-42.
- [2] 曹真睿,陈晓鹏,胡晶. 经典 Wnt 途径在慢性髓系白血病中的研究进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(1): 350-3.
- [3] Moya I M, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 211-26.
- [4] Huang C, Yuan W, Lai C, et al. EphA2-to-YAP pathway drives gastric cancer growth and therapy resistance [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(7): 1937-49.
- [5] 邢孔芸,陈玉蓉,李庆,等. YAP 基因对 HPV 感染宫颈癌细胞 TGF- $\alpha$  及 EGFR 表达的调节作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1735-40.
- [6] 程如玉,韩瑞,王尚华,等. YAP, E-cadherin 和 Vimentin 在口腔鳞癌中的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12): 1964-7.
- [7] Li H, Huang Z, Gao M, et al. Inhibition of YAP suppresses CML cell proliferation and enhances efficacy of imatinib *in vitro* and *in*

- vivo[J]. *J Exp Clin Cancer Res* ,2016 ,35( 1) : 134.
- [8] Moriyama K ,Hori T. BCR-ABL induces tyrosine phosphorylation of YAP leading to expression of Survivin and Cyclin D1 in chronic myeloid leukemia cells[J]. *Int J Hematol* ,2019 ,110( 5) : 591 -8.
- [9] Lu T X ,Rothenberg M E. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol* ,2018 ,141( 4) : 1202 -7.
- [10] Hu X H ,Dai J ,Shang H L , et al. miR-1285-3p is a potential prognostic marker in human osteosarcoma and functions as a tumor suppressor by targeting YAP1 [J]. *Cancer Biomark* ,2019 ,25( 1) : 1 -10.
- [11] Gao X ,Wang Y ,Zhao H , et al. Plasma miR-324-3p and miR-1285 as diagnostic and prognostic biomarkers for early stage lung squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget* ,2016 ,7( 37) : 59664 -75.
- [12] Alves R ,Gonçalves A C ,Jorge J , et al. MicroRNA signature re-fine response prediction in CML [J]. *Sci Rep* ,2019 ,9( 1) : 9666.
- [13] 卢洪飞 ,张敏鸿 ,杨建琼 ,等. YAP 抑制剂对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖 ,凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志* ,2021 ,41( 1) : 144 -7.
- [14] Huang H ,Xiong G ,Shen P , et al. MicroRNA-1285 inhibits malignant biological behaviors of human pancreatic cancer cells by negative regulation of YAP1 [J]. *Neoplasia* ,2017 ,64( 3) : 358 -66.
- [15] Zhang Y ,Ruan F. LncRNA LEF1-AS1 promotes ovarian cancer development through interacting with miR-1285-3p [J]. *Cancer Manag Res* ,2020 ,12: 687 -94.
- [16] Marsola A ,Simões B P ,Palma L C , et al. Expression of Hippo signaling pathway and Aurora kinase genes in chronic myeloid leukemia[J]. *Med Oncol* ,2018 ,35( 3) : 26.

## Study of miR-1285 on the proliferation , apoptosis and mechanism of chronic myeloid leukemia K562 cells through YAP

Zhang Hongxia , Wu Guangsheng

( *Dept of Hematology , The First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College , Shihezi 832000* )

**Abstract Objective** To study the miR-1285 through Yes-associated protein 1( YAP1) on the proliferation , apoptosis and mechanism of chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Methods** The plasmid of miR-1285 was constructed to make K562 cells overexpress miR-1285 and knock down miR-1285. They were divided into four groups: miR-1285 mimics , mimics control , miR-1285 inhibitor , and inhibitor control; qRT-PCR was used to quantitatively analyze the expression of miR-1285 of these four groups. The expression level of miR-1285 in the group was used to verify the transfection efficiency. The apoptosis and proliferation of the four groups were detected by CCK-8 and Annexin V-FITC; the changes of YAP and its downstream molecule epidermal growth factor receptor ( EGFR) were detected by Western blot , and apoptosis related molecules BAX , Bcl-2 protein expression was detected. **Results** After knock down miR-1285 , it can promote the proliferation of K562 cells and inhibit apoptosis. The expression of YAP increased , the expression of downstream molecule EGFR increased correspondingly , the expression of apoptosis-related molecule BAX decreased , and the expression of Bcl-2 increased; After expressing miR-1285 , K562 cell proliferation decreased , apoptosis increased , YAP expression decreased , downstream molecule P-EGFR expression decreased , apoptosis molecule BAX expression increased , and Bcl-2 expression decreased. **Conclusion** miR-1285 can inhibit the proliferation and promote apoptosis of K562 cells of chronic myelogenous leukemia by inhibiting the expression of YAP. It is expected to become a targeted molecule for the treatment of chronic myelogenous leukemia.

**Key words** miR-1285; YAP; proliferation; apoptosis