

学校编码：10384
学 号：24520131153464

分类号____密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**MicroRNA 表达异常在急性髓细胞白血病耐药机制中的
的作用研究**

**Involvement of Abnormal MicroRNA Expression in the
Mechanism of Drug Resistance with Acute Myeloid
Leukemia**

黄英丹

指导教师姓名：鹿 全 意 教 授
专 业 名 称：内 科 学
论文提交日期：2016 年 04 月
论文答辩时间：2016 年 05 月
学位授予日期：2016 年 月

答辩委员会主席：_____
评 阅 人：_____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 分析 miRNA-98 的表达异常在急性髓系白血病化疗耐药机制的作用, 通过靶向过表达 miRNA-98 的表达水平探讨以 miRNA-98 为靶点增加化疗药物敏感性的可能性并分析其可能作用的机制。评价异常表达的血清 miRNA-155 是否可作为急性髓系白血病的预后标志。

方法: 离体实验中, 采用 qRT-PCR 方法检测 K562 和其耐药株 K562/A02 中 miR-98、E2F1 基因表达情况。通过瞬时转染 miR-98 mimic 处理耐药细胞 K562/A02 48h 后, 通过 qRT-PCR 法检测 miR-98 表达情况; 通过 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测 E2F1 表达的变化, 应用 CCK8 方法检测耐药细胞的 IC50 及增殖抑制的情况。并分析转染 miR-98 mimic 后, MMP-9、ABCG2、p21、BAX 蛋白表达情况。在体实验中, 通过 qRT-PCR 的方法检测 miRNA-155 在健康人、初诊患者、耐药复发患者和完全缓解患者血清中的表达水平, 并对初诊患者进行 12 个月的随访, 分析其中未缓解者和完全缓解者 miRNA-155 的变化。

结果: 离体实验中, miR-98 在急性髓系白血病耐药株的表达水平低于其亲本细胞株; 耐药细胞株 E2F1 和 ABCG2 的表达高于亲本细胞株。上调急性髓系白血病耐药细胞株中的 miR-98 的表达, 可以增加细胞对阿霉素的敏感性和减少细胞的增殖。通过应用生物信息学我们发现 E2F1 为 miR-98 的靶基因, 经 RT-PCR 和 western blot 证实 E2F1 为 miR-98 的直接靶基因, 随后在对其机制的研究中还发现上调 miR-98 后 MMP-9、ABCG2 表达下降, p21、BAX 表达增加。在体实验中, miRNA-155 在初诊组患者中的表达明显高于健康对照组, 耐药复发患者组 miRNA-155 明显高于完全缓解组。在对初诊组患者进行 12 个月随访后发现未完全缓解者的 miRNA-155 的表达水平明显高于完全缓解者。

结论: miRNA-98 可能通过下调 E2F1、ABCG2 等相关蛋白的表达增加 AML 对化疗药物的敏感性。并且血清 miRNA-155 可作为 AML 耐药的标志物, 用于评价患者的预后。

关键词: AML; 耐药; miRNA; E2F1

ABSTRACT

Objective: To analyze the effects of miRNA-98 on drug resistance in chemotherapy of acute myeloid leukemia(AML).To explore the possibility and mechanism of increasing the sensitivity of chemotherapeutic drugs by using miRNA-98 as a target and its overexpression. To evaluate whether the abnormal expression of serum miRNA-155 can be used as the prognostic marker in AML.

Methods: In vitro,the expression of miRNA-98, E2F1 mRNA in K562 and its Resistant strain K562/A02 were measured by qRT-PCR.After 48h of transfection in K562/A02 cells with miRNA-98 mimic,the expression of miRNA-98 mRNA were detected by qRT-PCR. The mRNA and protein expression of E2F1 were detected by qRT-PCR and Western Blot,respectively. Using CCK8 method to measure the IC₅₀ and inhibition of proliferation in K562/A02. The expression of MMP9、 ABCG2、 p21 and Bax were detected by Western Blot.In vivo, qPCR was used to examine the expression of miRNA-155 in serum obtained from newly diagnosed AML patients、 refractory and relapse patients、 complete remission patients and healthy patients. Patients in newly diagnosed group were followed up for 12 months, and the expression level of miRNA-155 in the patients with non remission and complete remission were analyzed.

Results: In vitro,compared with the non resistant strains,the level of miRNA-98 expression was decreased in K562/A02, but the level of E2F1 and ABCG2 were upregulated. After 48h of k562/A02 cells transfected with miR-98 mimic,we found that the IC₅₀ and proliferation of cells were reduced.Using bioinformatics we found that E2F1 is a target gene of miR-98. Moreover, qPCR and Western Blot confirmed that E2F1 may be a direct target of miRNA-98. and the expression of MMP9 and ABCG2 were reduced,however,the expression of p21 and Bax were upregulated. In vivo,compared with the healthy group,the expression of miRNA-155 was significantly increased in serum of newly diagnosed AML patients. Compared with the patients achieved complete remission,the expression level of miRNA-155 was much higher in the serum of efractory and relapse patients. After the newly diagnosed

Abstract

AML patients were followed up for 12 months, we found that the expression level of miRNA-155 was much higher in the serum of patients unachieved complete remission than patients achieved complete remission.

Conclusion: miRNA-98 may increase the drug sensitivity of AML by down regulating the expression of E2F1, ABCG2 and other related proteins. And miRNA-155 in serum may can be used as a marker of drug resistance in AML to evaluate the prognosis of patients.

Key words: AML;drug resistance;miRNA;E2F1

目 录

论文摘要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略词表.....	VII
前言.....	1
第一部分.....	5
miR-98 表达异常在急性髓系白血病耐药机制中的作用.....	5
材料与方法.....	5
结 果.....	17
讨 论.....	20
第二部分.....	23
靶向调节 miR-98 表达逆转急性髓系白血病细胞耐药性的机制分析.....	23
材料与方法.....	23
结 果.....	25
讨 论.....	27
第三部分.....	31
血清 miR-155 作为急性髓系白血病耐药标志物的临床研究.....	31
材料与方法.....	31
结 果.....	35
讨 论.....	38
结 论.....	40
参 考 文 献.....	41
附 录.....	46
致 谢.....	47

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	II
Abbreviating Words.....	VII
Introduction.....	1
Chapter 1.....	5
The effects of miR-98 on mechanism of drug resistance in acute myeloid leukemia	5
Materials and methods.....	5
Results.....	17
Discussion.....	20
Chapter 2.....	23
The Mechanism of miR-98 on reversing drug resistance in cells of acute myeloid leukemia	23
Materials and methods.....	23
Results.....	25
Discussion.....	27
Chapter 3.....	31
The clinical research of miR-155 in serum as a marker of drug resistance in acute myeloid leukemia.....	31
Materials and methods.....	31
Results.....	35
Discussion.....	38
Conclusion.....	40

Table of Contents

References.....	41
Appendix.....	46
Acknowledgement.....	47

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
AML	acute myeloid leukemia	急性髓系白血病
CR	complete remission	完全缓解
MiRNA	MicroRNA	微小 RNA
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DOX	Doxorubicin	阿霉素
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
ECL	Enhanced chemiluminescence	化学发光自显影
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IC50	50% inhibiting concentration	半数抑制浓度
MDR	Multi-drug resistance	多药耐药
MMP	Matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
OD	Optical Density	光密度
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
WB	Western blot	蛋白免疫印迹

前言

急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种常见的造血干细胞恶性克隆性疾病,具有高度异质性,主要表现为髓系祖细胞不同程度的分化成熟障碍、恶性克隆性白血病细胞的增殖异常、凋亡受阻以及正常造血受到抑制^[1]。AML的自然发病率约为3—4/10万,占新诊断成人急性白血病的60%—70%,并呈逐年上升趋势,严重影响人类的健康。AML患者在治疗疗效和长期生存方面具有明显的异质性,影响治疗反应和长期生存的因素包括:细胞遗传学和分子遗传学、年龄、体能状况等。目前以蒽环类和阿糖胞苷为主的联合化疗治疗AML疗效并不理想。年龄<60岁患者的完全缓解率(CR)为70%~80%,但大多数患者最终复发,5年总生存(OS)约为40%;年龄>60岁且体能状况良好的患者CR率为40%~50%,但长期生存率<10%^[2,3]。近年来,随着化疗、造血干细胞移植、细胞治疗、生物免疫治疗及基因靶向治疗等多种治疗方法的发展,AML患者的完全缓解率及无复发生存率均较前有所改善,但是仍有大部分患者出现耐药和缓解后复发。因此,更好的了解急性髓性白血病耐药机制的形成,寻找有效的途径克服急性髓性白血病的耐药,对于治疗和提高急性髓性白血病患者的无复发生存率有着重要的意义。

白血病多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生是导致化疗失败的关键因素,也是造成白血病患者复发、难治的重要原因^[4]。白血病多药耐药是指白血病细胞对一种化疗药物产生耐药后,同时对不同化学结构和不同作用机理的多种化疗药物产生交叉耐药的现象。MDR产生机制十分复杂,包括药物转运体和代谢酶介导的细胞内药物浓度的降低、细胞周期阻滞、细胞凋亡抑制、DNA修复障碍、促进细胞恶性转化和的侵袭的信号通路的激活、干扰DNA甲基化和组蛋白修饰等^[5]。因此从多个角度阐明AML多药耐药的机制,寻找有效逆转多药耐药的方法,不仅是克服AML多药耐药的重要思路,也是准确评估预后、改善患者生存率的必由之路。

MicroRNA(miRNA)是近年来在真核生物中新发现的一类内源性非编码的单链小分子RNA,长度为19-25nt。miRNA本身并不编码蛋白质,而是在转录后水平通过与特异的靶mRNA的3'UTRs(untranslated regions)结合使之降解或者抑制其翻译,从而调控相关靶基因的表达^[6]。随着对miRNA功能研究

的深入，科学家们发现 miRNA 广泛参与细胞的增殖、凋亡、分化、免疫系统、个体发育以及机体代谢等一系列生命过程^[7; 8]。

近年来研究也发现 miRNA 在人类肿瘤形成及调节肿瘤耐药性方面也扮演者重要角色^[9; 10]。Zhao 等在人骨肉瘤细胞株中发现 miR-221 通过调节 PI3K/AKT 信号通路诱导细胞对顺铂的耐药^[11]。Shen 等在人肺腺癌细胞 PC-9 及其耐药株中发现沉默 miR-21 通过使 PTEN 的表达量增加及 AKt 和 ERK 信号通路失活可以恢复耐药细胞对吉非替尼的敏感性^[12]。另有研究发现 miR-181a 通过直接结合乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) mRNA 的 3' UTR 端调节 BCRP 的表达，提示 miR-181a 在 BCRP 介导的米托蒽醌耐药细胞中可以作为一个重要的调节因子^[13]。越来越多的研究都证实了 microRNA 可调控相关靶基因而影响肿瘤细胞对药物的敏感性，这些都表明 miRNA 与肿瘤耐药有着密切的关系。

miRNA 的异常表达也与多种血液肿瘤的耐药密切相关，如 yan 等发现细胞白血病/淋巴瘤与反应性增生相比，miR-181a 在 T 细胞白血病/淋巴瘤表达水平上调，他们还发现在 HEK-293T 及 Jurkat 细胞中 miR-181a 的过表达可显著增强细胞的增殖，活化 AKT 和增加细胞对阿霉素的耐药性^[14]。Marques 等发现高表达的 miRNA-34a 可以增强弥散性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)对阿霉素的敏感性^[15]。也有学者在多发性骨髓瘤的研究中发现过表达的 miRNA-202 可以增强多发性骨髓瘤细胞对硼替佐米的敏感性^[16]。越来越多的血液学专家都开始从 miRNA 水平方向研究血液肿瘤的耐药机制，从而使研究 miRNA 与血液肿瘤化疗耐药的分子机制成为目前的研究热点。

目前已经发现多个 miRNA 参与了调控急性髓系白血病多药耐药过程，如 Feng DD 等报道 miR-27a 和 miR-331-5p 在阿霉素耐药细胞 K562/DOX 中表达水平明显低与其亲本细胞株 K562，且其表达水平与 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gP)呈负相关，复发白血病患者 miR-331-5p 和 miR-27a 表达较初诊组显著降低，单独或联合转染 miR-331-5p 和 miR-27a 模拟物可增加 K562/DOX 细胞的药物敏感性，表明 miR-331-5p 和 miR-27a 低表达在白血病多药耐药与复发难治中有重要意义^[17]。Li 等在对 K562 和其耐药株 K562/A02 的研究中发现，miR-181a 在 K562/A02 对阿霉素的耐药中发挥重要作用，更进一步证实使 miR-181a 过表达，可以通过靶向调节 BCL-2 的表达，从而逆转细胞对阿霉素的耐药^[18]。Bai 等在对

K562 及其耐药株 K562/DNR 研究发现 miR-21 在 k562/DNR 中表达增高, 抑制 miR-21 的表达可以增加柔红霉素 (DNR) 的毒性作用, 在研究其机制中发现 miR-21 是通过改变 PTEN 表达量, 进而影响 k562 对药物的敏感性^[19]。由此可见, miRNA 通过靶向调节多药耐药相关基因、调控信号通路及细胞周期等多种途径在急性髓系白血病耐药中发挥重要作用。

研究发现 miRNA 在体液(如血清、血浆或尿液)中以稳定的形式循环, 许多肿瘤来源性的循环 miRNA 可作为肿瘤耐药和复发的生物学标志物^[20-23]。科学家们在对循环 miRNA 的相关研究中也发现许多异常表达的血清 miRNA 与急性髓系白血病的耐药和复发密切相关, 可作为急性髓系白血病预后指标。如 Liu 等通过 qRR-PCR 检测 176 个初诊 AML 患者和 70 个健康捐献者血清中的 miRNA-328 的表达水平, 发现相对于健康对照组, 在 AML 患者中 miRNA-328 的表达水平显著减低, 相对于治疗前, 患者血清 miRNA-328 的表达在治疗后显著提高, 此外还发现低表达 miR-328 的患者比高表达 miR-328 的患者具有更差总生存期和较短的无复发生存率^[24]。Tang 等通过检测 AML 患者骨髓和血清发现, 与健康对照组相比, miR-210 的表达水平显著上调, 当患者完全缓解后, miRNA-210 的表达明显下调, 而高表达 miR-210 表现为更差的无复发生存率和总生存率^[25]。这些都表明检测血清 miRNA 的表达可以作为 AML 的预后标志。

miRNA-155 定位于染色体 21q21.3, 其参与调控细胞的多种重要的生理过程, 诸如细胞增殖、凋亡、侵袭、耐药等^[26-28]。在许多实体肿瘤中均可检测到 miR-155 的过表达, 其中包括乳腺癌, 结肠癌, 肺癌和宫颈癌^[29-32]。在大多数类型的癌症中, miR-155 的上调意味着患者相对较差的临床预后。除了在许多实体肿瘤中 miR-155 存在差异, 在许多血液肿瘤中 miR-155 也与患者的预后密切相关。如在慢性 B 淋巴细胞白血病的研究中发现, 相比于完全缓解患者, 未达到缓解患者其血清中的 miR-155 表达明显增高, 提示 miR-155 可作为一个预后风险指标^[33]。Zhong 等在对弥漫大 B 细胞淋巴瘤的研究中也发现, 在初诊患者中 miR-155 的表达显著增高, 低表达 miR-155 的患者有更高的完全缓解率、较高的总生存率和较长的无病生存时间^[34]。也有研究表明在儿童急性髓性白血病患者骨髓单核细胞中 miR-155 表达增高, 过表达 miR-155 的患儿具有更差的预后^[35]。Marcucci G 等研究表明在正常核型的 AML 患者骨髓和血液单核细胞中 miRNA-155 的过表

达提示 AML 患者具有差的缓解率和总生存率^[36]。但上述关于 AML 和 miR-155 的研究都在骨髓单个核细胞中检测,不利于采集和检测。血清中的 miRNA 可以稳定的形式循环,且具有非侵入性和容易检测的优势。故检测 AML 患者血清中 miR-155 在表达水平可能对评估 AML 患者预后有着重要的意义。

尽管越来越多的学者着手于研究 miRNA 和 AML 化疗耐药的关系,但关于 miRNA 在 AML 耐药过程中的作用机制仍不十分明确,有待于进一步研究。因此,筛选在 AML 耐药中起关键作用的 miRNA 并阐明其具体作用机制,研究 AML 血清中 miRNA 的异常表达与临床化疗敏感性、预后的关系,可以为难治/复发 AML 的早期预警和检测提供新的生物学标记物,对于提高难治/复发 AML 诊疗水平具有重要的临床意义。

本研究的第一部分,分析了 miR-98 在白血病细胞株 K562 和耐药的 K562/A02 中表达 miR-98 水平的差异,探讨了 miR-98 参与白血病细胞耐药机制的作用。第二部分研究了通过靶向调节 miR-98 的表达水平,增加耐药的白血病细胞化疗敏感性的作用及其分子机制。第三部分根据文献和以上研究结论,选用与耐药有关的 miRNA-155 作为血清标志物,分析 AML 患者初诊组、难治复发与缓解组的 miRNA 的表达水平,并对初诊组患者进行随访,明确血清 miRNA-155 作为白血病预后标志物的可能性。为今后急性髓性白血病的治疗提供新思路。

第一部分

miR-98 表达异常在急性髓系白血病耐药机制中的作用

近年来,随着化疗、造血干细胞移植、细胞治疗、生物免疫治疗及基因靶向治疗等多种治疗方法的发展,AML 患者的完全缓解率及无复发生存率均较前有所改善。但是仍有大部分患者由于出现耐药导致化疗失败,死于疾病的复发,白血病细胞的化疗耐药仍然是影响疗效的主要问题。因此,深入了解急性髓系白血病耐药机制的形成,寻找有效的途径克服急性髓系白血病的耐药,对于治疗和提高急性髓系白血病患者的无复发生存率有着重要的意义。对多种实体肿瘤的研究发现,miRNA-98 异常表达与耐药的形成相关,miRNA-98 表达异常可能是肿瘤细胞耐药标志之一。为进一步明确 miRNA-98 异常与白血病细胞耐药的关系,我们进行以下研究。

材料与amp;方法

一 材料与设备

1 细胞株

人类髓系白血病细胞株 K562、多耐药 K562/A02 购自天津血液病研究所。

2 主要试剂

1640 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清(FBS)	美国 GIBCO 公司
双抗(青、链霉素)	美国 GIBCO 公司
逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)	美国 Thermo 公司
qRT-PCR 试剂盒 (Bioneer qPCR Master Mix kit)	韩国 Bioneer 公司
引物合成	上海生工生物工程有限公司
miRNA 提取试剂盒	中国天根生化科技有限公司
PBS 磷酸缓冲液	美国 GENMED 公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司
蛋白酶抑制剂	碧云天生物技术有限公司

CCK8 试剂盒	日本同仁公司
AP(过硫酸胺)	美国 Sigma 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
考马斯亮蓝 G-250	美国 Sigma 公司
阿霉素	美国 Sigma 公司
总 RNA 提取使用的 Trizol	美国 Invitrogen 公司
miR-98 Mimic	广州市锐博生物科技有限公司
MiR-98 Mimic 转染试剂盒 (riboFECT™ CP Transfection Kit)	广州市锐博生物科技有限公司
脱脂奶粉	中国伊利公司
5×蛋白上样缓冲液	北京 Solarbio 公司
30%丙烯酰胺	北京 Solarbio 公司
Tween-20	北京 Solarbio 公司
TEMED	上海生工生物工程有限公司
DEPC 水	上海生工生物工程有限公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
Protein Ladder	美国 Fermentas 公司
增强化学发光试剂盒(ECL)	北京普利来生物有限公司
蛋白定量试剂盒	碧云天生物技术有限公司
兔抗人 GAPDH 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology
兔抗人 E2F1 单克隆抗体	英国 Abcam
兔抗人 ABCG2 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology
HRP 标记羊抗兔 IgG	中国联科生物技术股份有限公司

3 引物合成序列

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.