



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.12.012

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.12.012

· 临床研究 ·

PR 结构域蛋白 5 过表达对人急性髓系白血病细胞系 U937 迁移侵袭的影响及其机制

苏杰 杨小静 周雪

【摘要】 目的 探讨 PR 结构域蛋白 5 (PRDM5) 过表达对人急性髓系白血病 (AML) 细胞系 U937 迁移侵袭的影响及其机制。**方法** 收集 20 例 AML 患者 (AML 组) 和 20 例健康志愿者 (正常组), 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测其骨髓样本中微小 RNA (miR)-489-3p 和 PRDM5 mRNA 表达水平。采用脂质体转染技术将人 AML 细胞系 U937 分为 7 组: pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PRDM5 组、shNC 组、shPRDM5 组、NC 组、miR-489-3p mimics 组和 miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组, 采用划痕实验和侵袭迁移小室 (Transwell 小室) 法分别检测各组细胞的迁移和侵袭能力; 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 β -catenin 和 GSK3 β 蛋白表达水平。**结果** AML 组受试者骨髓 miR-489-3p 表达水平低于正常组, PRDM5 mRNA 表达水平高于正常组 ($P < 0.05$)。pcDNA3.1-PRDM5 组和 miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组 PRDM5 mRNA、 β -catenin 表达水平、穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率分别高于 pcDNA3.1 组、miR-489-3p mimics 组, 而 GSK3 β 表达水平分别低于 pcDNA3.1 组、miR-489-3p mimics 组 ($P < 0.05$)。shPRDM5 组和 miR-489-3p mimics 组的 PRDM5 mRNA、 β -catenin 表达水平、穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率分别低于 shNC 组和 NC 组, 而 GSK3 β 蛋白表达水平分别高于 shNC 组和 NC 组 ($P < 0.05$)。**结论** miR-489-3p 靶向 PRDM5 基因阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从而抑制人 AML 细胞系 U937 迁移侵袭。

【关键词】 人急性髓系白血病; PR 结构域蛋白 5; 微小 RNA-489-3p; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞侵袭; 细胞迁移

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Effect of PR domain-containing 5 overexpression on migration and invasion of human acute myeloid leukemia cell line U937 and its mechanism Su Jie, Yang Xiaojing, Zhou Xue. Department of Hematology, Jiangbei People's Hospital, Nanjing 210048, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of PR domain-containing 5 (PRDM5) overexpression on migration and invasion of human acute myeloid leukemia (AML) cell line U937 and its mechanism. **Methods** Twenty patients with AML (AML group) and 20 healthy volunteers (normal group) were collected. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect expression levels of microRNA (miR)-489-3p and PRDM5 mRNA in bone marrow samples. Human AML cell line U937 were divided into 7 groups by liposome transfection technology: pcDNA3.1 group, pcDNA3.1-PRDM5 group, shNC group, shPRDM5 group, NC group, miR-489-3p mimics group and miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 group. Scratch test and invasion and migration chamber (Transwell chamber) method were used to detect cell migration and invasion ability of each group respectively. Western blotting was used to detect expression levels of β -catenin and GSK3 β protein. **Results** Expression level of miR-489-3p in bone marrow of AML group was lower than that of normal group, and expression level of PRDM5 mRNA was higher than that of normal group ($P < 0.05$). Expression levels of PRDM5 mRNA, β -catenin, number of cells passing through the matrigel membrane and migration rate within 24 h in pcDNA3.1-PRDM5 group and miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 group were higher than those in pcDNA3.1 group and miR-489-3p mimics group respectively, expression level of GSK3 β was lower than those in pcDNA3.1 group and miR-489-3p mimics group respectively ($P < 0.05$). Expression levels of PRDM5 mRNA, β -catenin, number of cells passing through the matrigel membrane and migration rate

基金项目: 中石化南北公司临床医学专项科研项目 (ZX2020006)

作者单位: 210048 南京, 南京江北人民医院血液科

within 24 h in shPRDM5 group and miR-489-3p mimics group were lower than those in shNC group and NC group respectively, expression level of GSK3 β was higher than those in shNC group and NC group respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-489-3p targets PRDM5 gene blocks the Wnt/ β -catenin signal pathway, thereby inhibits the migration and invasion of human AML cell line U937.

[Key words] Human acute myeloid leukemia; PR domain-containing 5; MicroRNA-489-3p; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Cell invasion; Cell migration

急性髓系白血病(AML)是造血干细胞恶性克隆引起的造血功能异常疾病,可浸润肝脏、脾脏、淋巴结等各个脏器^[1-2]。目前治疗 AML 的方案主要为造血干细胞移植和药物治疗,但只对急性早幼粒细胞白血病有效,其余类型的 AML 均无明显疗效^[3]。因此,寻找新治疗靶点和深入研究 AML 的发病分子学机制对提高 AML 疗效至关重要。PR 结构域蛋白(PRDM)属于转录调节家族之一,主要参与细胞增殖凋亡、生长发育及代谢等过程,过表达 PRDM5 可促进 AML 细胞系 U937 的迁移和侵袭^[4]。微小 RNA(miRNA)是由 19~24 个核苷酸组成的非编码单链 RNA,可与 mRNA 序列结合并诱导其降解,调控细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等过程^[5]。在 AML 的发生发展过程中,PRDM5 和 miRNA 的作用尚不清楚,且 PRDM5 对 AML 细胞系 U937 迁徙侵袭的分子学机制仍不明确。基于此,本研究采用脂质体转染对 AML 细胞系 U937 进行过表达或沉默 PRDM5 和 miR-489-3p,探讨 PRDM5 和 miR-489-3p 对 U937 的影响、机制及与 Wnt 通路的相关性。

材料与方法

1. 材料:AML 细胞系 U937 购自中科院上海细胞库。FBS 胎牛血清、MEM 培养基和 0.05% 的胰蛋白酶(ThermoFisher scientific Inc); Lipofectamine™2000 (Merck Inc); Trizol 试剂和 BCA 试剂(ThermoFisher scientific Inc); 0.25% 甲紫溶液(索莱宝科技有限公司);侵袭迁移小室(Transwell 小室,密理博科技有限公司); PrimeScript™ RT 试剂盒(Takara bio Inc); SYBR-Green qPCR Master Mix(北京康润诚业生物科技有限公司);RIPA 缓冲液、SDS-PAGE 和 PVDF 膜(上海碧云天生物技术有限公司);鼠抗人 PRDM5、GSK3 β 、 β -catenin 和 GAPDH 单分子抗体(Cell signaling technology Inc);兔抗鼠二抗(Cell signaling technology Inc)。

2. 方法

(1)骨髓样本收集:收集 2018 年~2019 年我院收治的 40 例 AML 患者(AML 组)和 20 例健康志愿者(正常组)骨髓样本,AML 均通过骨髓细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学等方法检查确诊。本研究通过我院伦理委员会审批,所有受试者均签署知情同意书。

(2)细胞培养:U937 细胞通过常规复苏后,采用含 10% FBS 的 MEM 培养液,于 37℃ 恒温、5% CO₂ 的培养箱培养。隔天传代 1 次,实验使用的细胞为对数生长期的细胞。

(3)细胞转染和分组:将对数生长期的细胞无血清培养 12 h 后,分别将无效序列过表达质粒、含 PRDM5 过表达序列的质粒、shRNA 阴性对照质粒、PRDM5 沉默 shRNA 质粒、miRNA 过表达对照质粒、miR-489-3p 模拟物转染至 U937 细胞作为 pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PRDM5 组、shNC 组、shPRDM5 组、NC 组和 miR-489-3p mimics 组。miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组是 PRDM5 过表达质粒干预后,再用 miR-489-3p 干扰 U937 细胞。具体转染步骤参考 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书。

(4)细胞划痕实验:各组细胞长至 80%,用 10 μ l 枪头尖端在培养皿中央垂直划一道痕迹,在 0 h、24 h 观察划痕两侧细胞迁移的距离,迁移率(%) = (划痕宽度_{0h} - 划痕宽度_{24h}) / 划痕宽度_{0h} × 100%,需独立重复 3 次取平均值。

(5)Transwell 小室法检测细胞侵袭能力:各组细胞于 Transwell 小室中培养 12 h。甲醇固定 15 min,0.25% 甲紫溶液染色 30 min。在倒置显微镜下随机选取 5 个视野(×200)拍照记录迁移下室的细胞总数。

(6)实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测相关基因 mRNA 表达水平:提取各组 RNA,采用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 纯度和浓度,采用 miRNA 第一链 cDNA 合成(加尾法)试剂盒将总 RNA 逆转录扩增为 cDNA。按照荧光定量试剂盒使用步骤进行 PCR,扩增条件为:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,共计 40 个循环。分别以 GAPDH 和 U6 作为 mRNA 和 miRNA 的标准内参,基因表达结果均以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 进行统计。本实验所有 PCR 引物序列见表 1。

(7)蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达水平:提取各组总蛋白,采用 BCA 试剂检测蛋白浓度。各组蛋白上样量 20 μ g,经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,加入对应的一抗(β -catenin、GSK3 β 和 GAPDH),4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,放入二抗,室温孵育

表 1 RT-qPCR 所需的引物序列

基因	正义链引物(5′ - 3′)	反义链引物(5′ - 3′)
PRDM5	TGCTTGTGCGATCGTAAGT	CTAGTCGTAATGCTATATT
GAPDH	GCTGTATCGTTAGTCATATA	GTAAGTATATGCTATATATCT
miR-489-3p	GTTTATTTAGTCTAGTACGT	AGTCGATTAGCTAATGCTTA
U6	GATAGTCGATAGTTAGCTAG	AGATAGTAATCTTAGCTAAT

2 h。采用化学发光成像仪显影, Image J 软件分析结果, 相对蛋白表达水平以 GAPDH 标准化。

(8) 双荧光素酶报告实验: 双重荧光素酶报告基因检测使用 Dual Luciferase Reporter Assay System 试剂盒, 使用双重荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性标准化。

3. 统计学处理: 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AML 组和正常组受试者骨髓 miR-489-3p 及 PRDM5 mRNA 表达水平比较: AML 组受试者骨髓 miR-489-3p 表达水平低于正常组 (0.189 ± 0.017 比 0.528 ± 0.011 , $P < 0.05$), 而 AML 组受试者骨髓 PRDM5 mRNA 表达水平高于正常组 (0.489 ± 0.009 比 0.147 ± 0.006 , $P < 0.05$)。

2. NC 组和 miR-489-3p mimics 组 AML 细胞系 U937 miR-489-3p、PRDM5 mRNA 表达水平、侵袭能力及迁移能力比较: miR-489-3p mimics 组 AML 细胞系 U937 miR-489-3p 表达水平高于 NC 组 (1.836 ± 0.102 比 1.012 ± 0.063 , $P < 0.05$), PRDM5 mRNA 表达水平、穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率均低于 NC 组 [0.497 ± 0.039 比 1.003 ± 0.046 ; (31 ± 2) 个比 (63 ± 5) 个; (34.26 ± 6.92)% 比 (57.56 ± 10.25)%, P 均 < 0.05]。

3. pcDNA3.1 组和 pcDNA3.1-PRDM5 组、shNC 组和 shPRDM5 组 AML 细胞系 U937 PRDM5 mRNA 表达水平、侵袭能力及迁移能力比较: pcDNA3.1-PRDM5 组 AML 细胞系 U937 PRDM5 mRNA 表达水平、穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率均高于 pcDNA3.1 组 [2.231 ± 0.184 比 1.015 ± 0.141 ; (252 ± 5) 个比 (68 ± 4) 个; (86.53 ± 8.42)% 比 (59.76 ± 7.42)%, P 均 < 0.05]。shPRDM5 组 AML 细胞系 U937 PRDM5 mRNA 表达水平、穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率均低于 shNC 组 [0.237 ± 0.039 比 1.085 ± 0.071 ; (34 ± 2) 个比 (75 ± 4) 个; (36.91 ± 4.15)% 比 (58.46 ± 5.28)%, P 均 < 0.05]。

4. 双荧光素酶报告实验结果: 根据 TargetScan 的预测, miR-489-3p 3′-UTR 中的靶向位点与 PRDM5 部分互补 (图 1)。双荧光素酶活性测定结果显示, miR-489-3p-Wt 组相对荧光素酶活性低于 NC 组 (0.417 ± 0.049 比 1.021 ± 0.075 , $P < 0.05$), 但 miR-489-3p-Mut 组和 NC 组萤光素酶活性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 PRDM5 是 miR-489-3p 的靶基因。

Hsa miR-489-3p	3′-UACACUACAGUG-5′
WT PRDM5 3′UTR	5′AUGUGAUGUCAAA-3′
MUT PRDM5 3′UTR	5′AUGUGCGAUGCAA-5′

图 1 双荧光素酶报告实验结果 miR-489-3p 与 PRDM5 存在结合位点

5. miR-489-3p mimic 组和 miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组 AML 细胞系 U937 侵袭能力及迁移能力比较: miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组穿过基质胶膜的细胞数量及 24 h 内迁移率均高于 miR-489-3p mimic 组 [(121 ± 7) 个比 (31 ± 2) 个, (56.49 ± 4.52)% 比 (34.58 ± 4.13)%, P 均 < 0.05]。

6. 不同组别 AML 细胞系 U937 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达水平比较: miR-489-3p mimic 组 AML 细胞系 U937 β -catenin 蛋白表达水平低于 NC 组 (0.43 ± 0.05 比 1.02 ± 0.09), GSK3 β 蛋白表达水平高于 NC 组 (1.53 ± 0.12 比 0.96 ± 0.11), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。pcDNA3.1-PRDM5 组 AML 细胞系 U937 β -catenin 蛋白表达水平高于 pcDNA3.1 组 (1.62 ± 0.15 比 1.08 ± 0.12), GSK3 β 蛋白表达水平低于 pcDNA3.1 组 (0.47 ± 0.05 比 0.98 ± 0.09), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。shPRDM5 组 AML 细胞系 U937 β -catenin 蛋白表达水平低于 shNC 组 (0.56 ± 0.06 比 0.95 ± 0.09), GSK3 β 蛋白表达水平高于 shNC 组 (1.51 ± 0.13 比 1.07 ± 0.10), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组 AML 细胞系 U937 β -catenin 蛋白表达水平高于 miR-489-3p mimic 组 (1.73 ± 0.15 比 1.10 ± 0.12), GSK3 β 蛋白表达水平低于 miR-489-3p mimic 组 (0.46 ± 0.06 比 1.07 ± 0.09), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

白血病是常见的血液系统恶性肿瘤, 包括淋巴系白血病和髓系白血病^[6]。AML 的发生主要是髓系细胞的终末分化受阻碍, 髓系前体细胞无限制的增殖, 导致骨髓造血功能衰竭^[7-8]。PRDM5 蛋白属于一种转录调节因子, 位于人类染色体区域 4q26, 该区域具有许多活跃于几种恶性肿瘤中的抑癌基因^[9]。PRDM5 对

造血功能、细胞凋亡、迁移和侵袭均有明显作用^[10]。本研究通过 RT-qPCR 检测 AML 患者骨髓,发现 PRDM5 mRNA 表达水平明显降低。划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测结果显示,过表达 PRDM5 可抑制人 AML 细胞系 U937 的侵袭和迁移能力,而沉默 U937 中的 PRDM5 后,其侵袭和迁移能力明显被激活,表明 PRDM5 对 AML 细胞系 U937 的侵袭和迁移能力均有抑制作用。

近年来对 miRNA 功能的深入研究发现,miRNA 通过与靶基因结合,影响靶基因转录和翻译过程,从而参与多种疾病的发生发展^[11]。白血病中 miRNA 可以作为诊断的新生物标记,并为白血病提供有希望的治疗方法和新颖的药物筛选策略^[12]。本研究结果显示,AML 患者骨髓 miR-489-3p 表达水平低于对照组。过表达 miR-489-3p mimic 后,U937 的侵袭和迁移能力受到抑制,且 PRDM5 mRNA 表达水平也明显减少。TargetsCan 软件预测 miR-489-3p 与 PRDM5 有互补序列。而双荧光素酶报告实验结果显示,PRDM5 是 miR-489-3p 的靶基因。为了进一步验证 miR-489-3p 靶向 PRDM5 对 U937 侵袭和迁移能力的影响,本研究在 miR-489-3p mimic 转染 U937 后,采用 PRDM5 过表达质粒干扰,结果显示,miR-489-3p + pcDNA3.1-PRDM5 组 U937 侵袭和迁移能力高于 miR-489-3p mimic 组,表明 PRDM5 可拯救 miR-489-3p 对 AML 细胞系 U937 侵袭和迁移能力的抑制作用。综上可知,miR-489-3p 可通过靶向 PRDM5 抑制 AML 细胞系 U937 的侵袭和迁移能力。

为了进一步探究 miR-489-3p 靶向 PRDM5 调控 AML 细胞系 U937 侵袭和迁移能力的分子学机制,本研究观察了 Wnt/ β -catenin 信号通路的变化。既往研究表明,PRDM5 影响 Wnt/ β -catenin 信号的传导,抑制癌基因表达从而起到抑癌作用^[3]。过表达 miR-489-3p 后,AML 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号传导被阻碍,AML 细胞的生长从而受到抑制^[13]。本研究结果显示,过表达 miR-489-3p 后, β -catenin 蛋白表达水平降低,GSK3 β 蛋白表达水平升高,表明 miR-489-3p 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。过表达 PRDM5 后, β -catenin 蛋白表达水平升高,GSK3 β 蛋白表达水平降低,但沉默 PRDM5 后,结果与之相反,表明 PRDM5 可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路的传导。过表达 miR-489-3p

后,再过表达 PRDM5 后,U937 中 Wnt/ β -catenin 信号通路传导恢复,表明 miR-489-3p 通过靶向 PRDM5 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。

综上所述,AML 患者骨髓 miR-489-3p 和 PRDM5 呈异常表达,miR-489-3p 通过靶向抑制 PRDM5 的表达,进一步抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而降低 AML 细胞系 U937 的迁移和侵袭能力。

参 考 文 献

- [1] Pession A, Lonetti A, Bertuccio S, et al. Targeting Hedgehog pathway in pediatric acute myeloid leukemia: challenges and opportunities [J]. Expert Opin Ther Targets, 2019, 23(2): 87-91.
- [2] 梁婷, 夏思, 古学奎. 混合谱系白血病基因重排急性髓系白血病伴多发脓肿一例[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(11): 813-814.
- [3] Winer ES. Secondary Acute Myeloid Leukemia A Primary Challenge of Diagnosis and Treatment [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2020, 34(2): 449-463.
- [4] Zhou P, Chen X, Li M, et al. Overexpression of PRDM5 promotes acute myeloid leukemia cell proliferation and migration by activating the JNK pathway [J]. Cancer Med, 2019, 8(8): 3905-3917.
- [5] 蒲俊, 曾静, 胡厚祥. 血清微小 RNA-20a 和自噬相关基因 7 对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗后主要不良心血管事件的预测 [J]. 临床内科杂志, 2019, 36(9): 608-611.
- [6] 刘金霞, 任金海, 郭晓楠, 等. 急性早幼粒细胞白血病分子学缓解后无化疗维持治疗的探讨 [J]. 临床内科杂志, 2019, 36(1): 60-62.
- [7] Burnett AK, Hills RK, Russell N. Twenty five years of UK trials in acute myeloid leukaemia: what have we learned? [J]. Br J Haematol, 2020, 188(1): 86-100.
- [8] Samet JM, Cockburn M. What can be learned from mapping the occurrence of acute myeloid leukemia? [J]. Cancer, 2019, 125(11): 1771-1773.
- [9] Galli GG, Carrara M, Francavilla C, et al. Genomic and Proteomic Analyses of Prdm5 Reveal Interactions with Insulator Binding Proteins in Embryonic Stem Cells [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(22): 4504-4516.
- [10] Wang X, Chang H, Gao G, et al. Silencing of PRDM5 increases cell proliferation and inhibits cell apoptosis in glioma [J]. Int J Neurosci, 2021, 131(2): 144-153.
- [11] Wang WL, Wang HR, Ji WG, et al. MiRNA-485-5p suppresses the proliferation of acute myeloid leukemia via targeting SALL4 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(11): 4842-4849.
- [12] Shu XS, Geng H, Li L, et al. The Epigenetic Modifier PRDM5 Functions as a Tumor Suppressor through Modulating WNT/ β -Catenin Signaling and Is Frequently Silenced in Multiple Tumors [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27346.
- [13] Li C, Gao Q, Wang M, et al. LncRNA SNHG1 contributes to the regulation of acute myeloid leukemia cell growth by modulating miR-489-3p/SOX12/Wnt/ β -catenin signaling [J]. J Cell Physiol, 2020, 236(1): 653-663.

(收稿日期: 2021-03-09)

(本文编辑: 周三凤)