

DNA 损伤激活的长链非编码 RNA 促进多发性骨髓瘤细胞增殖及耐药研究^{*}

许超平 常伟 刘晓倩 刘仕明 肖颖^{*}

武汉科技大学附属武汉市普仁医院血液内科,湖北武汉 430081

摘要 目的:探讨 DNA 损伤激活的长链非编码 RNA(NORAD)对多发性骨髓瘤(MM)细胞增殖及对硼替佐米(BTZ)化疗耐药性的影响。方法:应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测健康人和骨髓瘤患者、不同 MM 细胞系中 NORAD 表达差异,并分析其与 MM 患者生存率关系;运用慢病毒转染技术,干扰细胞系中 NORAD 的表达,检测其表达差异;定量 PCR(qPCR)检测骨髓瘤细胞系中人类非编码 RNA-144a-3p(hsa-miR-144a-3p)的表达;采用双荧光酶素报告验证 NORAD 和 hsa-miR-144a-3p 的结合;通过 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)实验进一步验证 LncRNA 和 miRNA 的结合;细胞计数试剂 8(CCK8)法检测各细胞处理后细胞活性。细胞克隆试验检测细胞增殖能力。结果:MM 患者细胞系中 NORAD 常高表达,提示预后差,生存期短;敲除 NORAD 基因后,MM 耐药细胞系对 BTZ 药物敏感性增加。MM 患者 hsa-miR-144a-3p 高表达,在骨髓瘤细胞系中加用 miR-144a-3p 类似物时细胞增殖能力下降;NORAD 低表达可显著抑制细胞增殖,细胞对药物敏感性增强。细胞克隆形成实验也证实 NORAD 低表达可抑制癌细胞增殖。结论:NORAD 高表达可增强 MM 对 BTZ 化疗耐药性,NORAD 可直接与 hsa-miR-144a-3p 结合,上调其在 MM 细胞中的表达,进一步调控癌细胞增殖,同时调控患者对 BTZ 药物敏感性。

关键词 多发性骨髓瘤;间充质干细胞;DNA 损伤激活的长链非编码 RNA;硼替佐米;化疗耐药

中图分类号 R733.3

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20230612

Long non-coding RNA NORAD promotes the proliferation and resistance in multiple myeloma cell lines XU Chao-

ping, CHANG Wei, LIU Xiao-qian, LIU Shi-ming, XIAO Yin^{*}. Department of Hematology, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430081, China

Corresponding author: XIAO Yin, E-mail: 463131477@qq.com

Abstract Objective: To explore the effects of LncRNA NORAD on proliferation and BTZ chemotherapy resistance of multiple myeloma (MM) cells. Method: RT-PCR was used to detect the difference of NORAD expression in healthy people, MM, and different MM cell lines. The relationship between NORAD expression and MM patients' production was analyzed. The lentivirus transfection technique was used to interfere with the expression of NORAD in cell lines. The expression of hsa-miR-144a-3p was detected by qPCR. The binding of NORAD and hsa-miR-144a-3p was verified by double fluorescence report. The binding of LncRNA and miRNA was further verified by RIP experiment. The CCK8 assay method was used to detect the cell activity after treatment. Cell cloning test was used to detect cell proliferation. Results: High expression of NORAD in MM patients and cell lines suggests poor prognosis and short survival. After NORAD gene was knocked out, the sensitivity of MM drug-resistant cell line to BTZ increased. The high expression of hsa-miR-144a-3p in myeloma patients was detected by qPCR, and the cell proliferation ability decreased when miR-144a-3p analogues were added to myeloma cell lines. Low expression of NORAD could significantly inhibit cell proliferation and enhance drug sensitivity of cells. Cell clonogenesis experiment also confirmed that low expression of NORAD could inhibit the proliferation of cancer cells. Conclusions: High expression of NORAD can enhance the resistance of MM to BTZ. NORAD can directly bind to hsa-miR-144a-3p and upregulate its expression in MM cells. hsa-miR-144a-3p can further regulate the proliferation of cancer cells and regulate the drug sensitivity of patients to BTZ.

Key words Multiple myeloma; Mesenchymal stem cells; NORAD; Bortezomib; Chemoresistance

^{*} 基金项目:武汉市卫生计生委科研项目资助项目(No:WX18Z35)

^{*} 通信作者:肖颖, E-mail:463131477@qq.com, 湖北省武汉市青山区本溪街 1 号

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者常因耐药而复发,在临床上仍不能治愈。目前临床上常用的一线化疗方案为含硼替佐米(Bortezomib, BTZ)的方案^[1],因此探究骨髓瘤细胞对 BTZ 产生耐药性的分子生物学机制十分必要。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是>200 个核苷酸的 RNA 转录物,调节基因表达并在表观遗传修饰、转录和转录后水平中起调节作用^[2]。DNA 损伤激活的非编码 RNA(non-coding RNA-activated by DNA damage, NORAD)是位于细胞核中具有促癌作用的 lncRNA,与多种肿瘤的发生发展密切相关。本研究旨在探究 NORAD 调控骨髓瘤硼替佐米耐药相关机制。

材料与方法

试剂 胎牛血清(北京百奥莱博科技有限公司);RPMI-1640 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司);无血清培养基(Opti-MEMI, 语纯生物)逆转录试剂盒(TransGen 公司);RT-PCR 试剂盒、Western Blot 试剂盒(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)、PEG 储存液(上海梵态生物科技有限公司)、BTZ 1 mg(美国,西安杨森制药有限公司分包,国药准字 J20140065);Hsa-miR-144a-3p 的类似物、抑制剂及对照组 miRNA(中国 Ribobio 公司);慢病毒载体(北京华越洋生物)。

临床骨髓瘤标本收集 收集 2017 年 7 月-2021 年 6 月武汉市普仁医院血液科原发性 MM 标本和复发 MM 标本各 37 例,所有标本被置于 -80℃ 储存。本研究经医院伦理委员会批准,并根据赫尔辛基宣言中制定的指南进行操作。

细胞培养 人 MM 细胞系 U266、MM. 1S、H929、RPMI8226、HEK293T 购自中国科学院细胞库(中国上海),所用骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)均从骨髓瘤患者骨髓中分离所得;MM 细胞生长培养基采用 RPMI1640 加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),MSCs 生长培养基采用改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)低糖培养基加 10% FBS,以上细胞均放置于 37℃, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

BTZ 耐药细胞建立 采用 BTZ 浓度梯度递增法,建立骨髓瘤细胞系 H929 和 MM. 1S 的 BTZ 耐药细胞系。待骨髓瘤细胞系 H929 和 MM. 1S 转态最佳且进入对数生长期时,于细胞培养液中加入终浓度为 5 ng/mL 的 BTZ 进行药物干预,置于 37℃,

5% CO₂ 恒温培养箱中培养,2~3 d 换液,待细胞生长恢复正常,再次加入药物,使 BTZ 终浓度为 5 ng/mL,反复以该浓度的 BTZ 刺激 3 次,待细胞生长恢复增加浓度至 10 ng/mL,以此逐步递增药物浓度,最终 BTZ 终浓度为 160 ng/mL,获得 BTZ 耐药的 H929-R 和 MM. 1S-R 细胞株。

细胞转染 取无污染、生长状态良好的 HEK293T 细胞,胰酶消化后调整浓度,将 5×10^4 个细胞均匀铺至 6 孔板中。用慢病毒载体 VSV-G 和 pMD2 转染 pCDH 载体及 pCDH-sh-NORAD 载体,用脂质体转染试剂转染 HEK293T 细胞。按说明书计算每孔所需病毒体积。将 500 μ L 无血清培养基(Opti-MEMI)和 1×10^4 个细胞慢病毒混合,加入等体积无血清培养基高糖培养液混匀,转移至 6 孔板中。12 h 后更换培养液并观察细胞状态。

RNA 提取及定量 RT-PCR 检测 取对数生长期的 HEK293T 细胞接种于 96 孔培养板中,细胞密度为每孔悬浮液 2.5×10^4 /mL,然后 500 转/min,低速离心 5 min,收集细胞沉淀,预冷 PBS 洗 2 遍,加入适量 Trizol,混匀后置于冰上裂解 30 min,将裂解液转入 EP 管。加 200 μ L 氯仿至含有裂解液的 EP 管中,混匀,冰上静置 30 min。4℃ 下以 14 000 转/min 离心 15 min,取上清,转移至无菌 EP 管,加入 0.5 mL 异丙醇,颠倒混匀,冰上静置 10 min。4℃ 下以 14 000 转/min 离心 15 min,弃上清,加入 75% 乙醇重悬,并于 4℃ 下以 14 000 转/min 离心 5 min。弃乙醇,室温下晾干,加入适量 DEPC 水重悬,采用紫外分光光度计(日本 Takara 公司)在 260 nm 处检测 RNA 的纯度。按照逆转录以及 PCR 试剂盒的操作步骤进行反转录及实时荧光定量 PCR 反应。引物系列:NORAD 上游:5'-TCCTGTTTACAGCGAGGCAA-3',下游:5'-CCATCTCCATCAACCCAGAAG-3'; miR-144a-3p:5'-TACAGTATAGATGATGTACT-3'; GAPDH 上游:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAA-3',下游:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'; U6:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min,40 次扩增(96℃ 变性 30 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min),72℃ 延伸 10 min。 β -actin 为内部参照。在琼脂凝胶上对 PCR 产物进行电泳分析,用 Opticon Monitor 3 软件对 PCR 电泳结果进行分析。重复 3 次后计算平均值。

CCK-8 法检测细胞活力 将细胞消化离心,完全培养基重悬。细胞计数后将细胞数调整为 1 000 个/100 μ L,吸取 100 μ L 悬液加至 96 孔板中继

续培养。待细胞贴壁后,添加 CCK-8 检测液,37℃ 孵育 2 h,酶标仪(美国 ThermoScientific 公司)检测实验孔在 450 nm 处吸光度。Graphpad 软件分析结果。

克隆形成实验检测细胞克隆情况 分别取各组细胞以 200 个/孔密度接种于 6 孔板中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养 12 d,用 PBS 小心洗涤细胞 3 次,甲醇固定 20 min,Giemsa 染液染色 20 min,流水缓慢洗去染色液。镜下计数 > 50 个细胞的克隆数,计算克隆形成率。克隆形成率(%) = (细胞克隆数/接种细胞数) × 100%。

Western Blot(WB)法检测 采用 WB 法检测骨髓瘤细胞系中 FOSB 的表达水平,用组织蛋白抽提试剂盒提取组织蛋白,采用 BCA 法检测蛋白的浓度,将其制成含等量蛋白的蛋白组织样品。加入蛋白上样缓冲液并煮沸后,制作 12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,半干转膜仪转膜。在室温下将膜在 5% 的牛奶中封闭 1 h,加入一抗在 4℃ 的 Tris-HCL 缓冲盐溶液中孵育过夜,用磷酸缓冲液洗涤 3 次后,用 HRP 标记的二抗(1:1000)孵育,化学发光法检测,并用 Quantity one 软件(美国 BioRad 公司)进行图像分析。

细胞集落形成试验 蛋白酶消化后制备单细胞悬液,以 1×10^3 /孔的密度接种到 6 孔板。细胞贴壁生长 24 h 后,4% 多聚甲醛固定 15 min。0.5% 结晶紫染色,10 min 后洗去多余染液,并拍照和计数。计算各组的细胞克隆形成率 = (克隆形成数/接种细胞数) × 100%。

慢病毒细胞转染 取无污染、生长良好的 MM. 1S, H929 细胞,胰酶消化后调整浓度,将 6×10^6 个细胞均匀铺至 6 孔板中。构建慢病毒表达载体 pCDH 空白对照组、pCDH-sh-NORAD,按说明书计算每孔所需病毒体积。将 500 μL Opti-MEMI 和一定量慢病毒混合,加入等体积无血清 DMEM 高糖培养液混匀,转移至选定的孔中。12 h 后观察细胞状态并更换培养液。48 h 后加入适量嘌呤霉素,重复 3 代。

miR-144a-3p 类似物和抑制剂的转染 根据说明书使用核糖体转染法转染 riboFECT™ CP,使用 5 μL 的 20 μM miRNA 类似物稀释在加入 12 μL 的 riboFECT™ CP 缓冲液中,孵育 15 min,然后将 riboFECT™ CP 加载到 1 863 μL DMEM 培养基中,当细胞密度达到 50% 时转染到 6 孔板中,37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h,然后收集细胞。

双荧光素酶检测 将荧光素酶报告载体 NORAD 与 hsa-miR-144a-3p 共转染 H929 细胞。以转染 pRL-TK 作为标准内质控。转染 36 h 后,收获细胞。按试剂盒说明书检测转染细胞荧光素酶活性。

RNA 结合蛋白免疫沉淀 使用 LncRNA 与 miRNA 共培养骨髓瘤细胞系 MM. 1S,加用空白对照为 MS2 对照组,实验组为 MS2-NORAD,加入目标抗体 NORAD 时相应的 NORAD-RNA 沉淀,再使用 RT-PCR 方法鉴定 2 组浓度。

统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,独立样本采用 *t* 检验;活性细胞资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 分析方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

NORAD 在 MM 患者中的表达 与对照细胞比较,MM 患者骨髓浆细胞中 NORAD 的表达水平更高,见图 1A。在不同的 MM 细胞系中,NORAD 的表达始终高于正常浆细胞(P 均 < 0.01),见图 1B。高表达 NORAD 的骨髓瘤患者比低表达患者的总体生存率较短,见图 1C。

NORAD 在 MM 和 BTZ 耐药细胞系中的表达 本研究利用慢病毒转染技术,转染空白质粒对照组或 pCDH-sh-NORAD,建立稳定的 NORAD 敲除细胞系,RT-PCR 分析结果显示敲除 LncRNA 后细胞 MM. 1S 及 H929 中 NORAD 表达明显受抑制($P < 0.01$),见图 2A;CCK-8 试验结果显示与对照组比

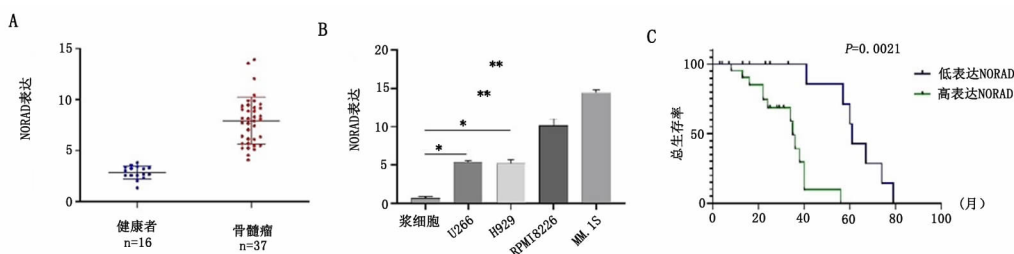


图1 NORAD 在 MM 中的表达

较,sh-NORAD 细胞活力显著降低,表明 NORAD 低表达可显著增强 MM 细胞对 BTZ 化疗敏感性,降低细胞增殖,见图 2B;耐药性 MM. 1S、H929 细胞活力强,且对 BTZ 敏感性降低,见图 2C;CCK8 检测发现与对照组比较,MM. 1S-R-sh-NORAD 及 H929-R-sh-NORAD 细胞活力显著降低,表明 NORAD 低表达可显著增强 MM 细胞对 BTZ 化疗敏感性,减少细胞增殖,见图 2D;细胞克隆形成试验结果显示 NORAD 敲除可抑制细胞增殖($P < 0.01$),见图 2E。

NORAD 可作为 hsa-miR-144a -3p 的靶点 Starbase 分析平台检索 NORAD 与 miRNA 的关系,发现 hsa-miR-144a -3p 可通过多个位点与靶向 NORAD 结合,见图 3A。紧接着采用双荧光素酶报告基因验证 NORAD 与 hsa-miR-144a-3p 的结合,结果显示 NORAD 序列中产生了包含潜在结合位点和特定突变的荧光素酶报告子结构,见图 3B。shRNA NORAD 干预 MM. 1S、H929 细胞后,细胞中 hsa-miR-144a-3p 表达上调($P < 0.01$),见图 3C。通过 RIP 试验进一步验证 LncRNA 与 miRNA 的结合,表明与 MS2 对照组比较,miRNA 在 MS2-NORAD 共沉淀中明显表达,见图 3D。qPCR 检测发现 MM 患者骨髓中 hsa-miR-144a-3p 表达显著增高($P < 0.01$),见图 3E;qPCR 检测 MM. 1S、H929 细胞系给药 miRNA 类似物,miRNA 抑制剂干预后细胞中 hsa-miR-144a-3p 的表达差异,见图 3F;通过 CCK8 试验检测 MM. 1S、H929 细胞对药物 BTZ 的化疗敏感性,结果发现 MM. 1S、H929 在加入空白对照、miR-144a-3p 类似物时增殖能力下降,而加入 miR-144a-3p 抑制剂时细胞增殖能力上调,见图 3G;细胞克隆形成试

验检测细胞增殖取得相似的结果,见图 3H。

讨 论

LncRNA 可通过多种作用机制参与基因表达调控^[3]。有研究证实,LncRNA 与肿瘤细胞发展机制有关^[4~6]。有报告显示,NORAD 参与多种肿瘤中耐药及疾病进展,如介导膀胱癌对吉西他滨耐药^[7],促进前列腺癌的增殖及转移^[8]以及促进肺癌细胞的增殖及迁移等^[9]。本研究中,在 MM 患者骨髓浆细胞中 NORAD 呈高表达,且 NORAD 在多种骨髓瘤细胞系中表达上调,且 NORAD 的表达水平与 MM 患者的生存率呈负相关。在骨髓瘤细胞系中,使用干扰 RNA 敲除 NORAD 基因,可显著抑制 NORAD 表达及 MM 细胞增殖。研究显示,抑制 NORAD 表达可促进骨髓瘤细胞凋亡,诱导细胞周期 G1 期停滞,该研究证实 NORAD 可通过 BMP6/P-ERK1/2 轴影响多发性骨髓瘤的发生和发展^[10]。LncRNAs 作为细胞通讯的重要部分参与了多种生物学过程,包括 mRNA 翻译、染色质修饰等。尽管 LncRNAs 和 miRNAs 都是 MM 病程进展中的重要功能成分,但其作用的分子机制还不清楚^[11],本研究发现 NORAD 可直接上调 miRNA 在 MM 细胞中的表达,调控癌细胞增殖及对 BTZ 药物敏感性。

本研究表明 NORAD 的高表达是 MM 细胞对 BTZ 耐药性增强的机制。此外,本研究表明 NORAD 可以通过调节 hsa-miR-144a-3p 信号通路促进 MM 细胞增殖和抑制凋亡,以期寻找 MM 肿瘤细胞耐药的潜在治疗靶点。

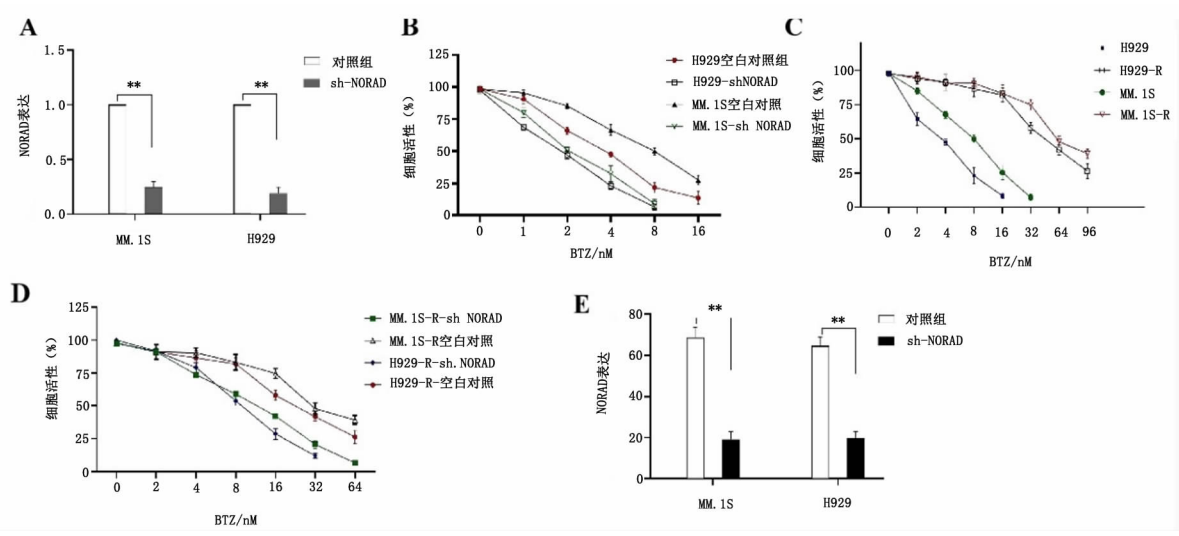


图 2 NORAD 在 MM 细胞和 TMZ 耐药细胞系中的表达

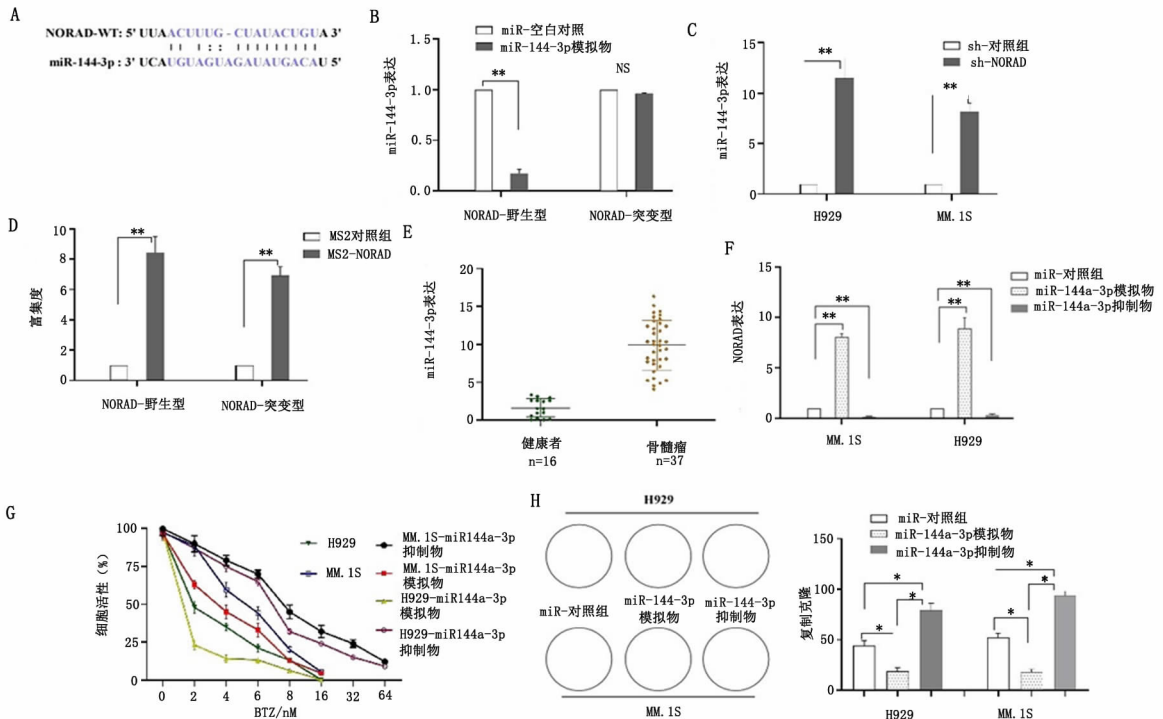


图3 NORAD 可作为 hsa-miR-144a-3p 的靶点

参考文献

- 1 吴倩君. 以蛋白尿首发的多发性骨髓瘤继发系统性淀粉样变性1例并文献复习[J]. 内科急危重症杂志, 2022, 28(4): 340-342.
- 2 马艳飞, 戴振宇, 王迪, 等. 硼替佐米治疗复发多发性骨髓瘤致肿瘤溶解综合征1例[J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(3): 252-253.
- 3 Mondal P, Meeran SM. microRNAs in cancer chemoresistance: The sword and the shield[J]. Noncoding RNA Res, 2021, 6(4): 200-210.
- 4 Sallam T, Jones M, Thomas BJ, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA[J]. Nat Med, 2018, 24(3): 304-312.
- 5 Ren H, Yang X, Yang Y, et al. Upregulation of lncRNA BCYRN1 promotes tumor progression and enhances EpCAM expression in gastric carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 9(4): 4851-4861.
- 6 Chiu HS, Somvanshi S, Patel E, et al. Pan-Cancer Analysis of lncRNA Regulation Supports Their Targeting of Cancer Genes in Each Tumor Context[J]. Cell Rep, 2018, 23(1): 297-312.
- 7 Han Q, Zhang W, Meng J, et al. lncRNA-LET inhibits cell viability, migration and EMT while induces apoptosis by up-regulation of TIMP2

- in human granulosa-like tumor cell line KGN[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100: 250-256.
- 8 Yang Y, Zhang G, Li J, et al. Long noncoding RNA NORAD acts as a ceRNA mediates gemcitabine resistance in bladder cancer by sponging miR-155-5p to regulate WEE1 expression[J]. Pathol Res Pract, 2021, 228: 153676.
- 9 Zhang Y, Li Y. Long non-coding RNA NORAD contributes to the proliferation, invasion and EMT progression of prostate cancer via the miR-30a-5p/RAB11A/WNT/ β -catenin pathway[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 571.
- 10 Li J, Xu X, Wei C, et al. Long noncoding RNA NORAD regulates lung cancer cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion by the miR-30a-5p/ADAM19 axis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(1): 1-13.
- 11 Ma T, Chen Y, Yi ZG, et al. NORAD promotes multiple myeloma cell progression via BMP6/P-ERK1/2 axis[J]. Cell Signal, 2022, 100: 110474.
- 12 Gowda PS, Wildman BJ, Trotter TN, et al. Runx2 Suppression by miR-342 and miR-363 Inhibits Multiple Myeloma Progression[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(7): 1138-1148.

(2022-07-19 收稿 2023-10-30 修回)