

论著·临床研究

## 长链非编码 RNA linc00467 在儿童急性髓系白血病中的表达及耐药中的作用研究

饶春宝<sup>1</sup> 雒东<sup>1</sup> 林子添<sup>1</sup> 谢明玉<sup>2</sup> 胡媛<sup>2</sup> 彭琪<sup>2</sup> 江华<sup>3</sup> 张振洪<sup>2</sup> 陆小梅<sup>1,2</sup>

(1. 东莞市儿科研究所遗传与感染性疾病重点实验室, 广东 东莞 523327;

2. 东莞市儿童医院科研中心, 广东 东莞 523327;

3. 广州市妇女儿童医疗中心血液肿瘤科, 广东 广州 510000)

**[摘要]** **目的** 研究长链非编码 RNA linc00467 在儿童急性髓系白血病 (AML) 中的表达及功能。

**方法** 采集 2016 年 5 月至 2018 年 6 月确诊的 5 例儿童 AML 病例的骨髓标本, 以进行骨髓检查提示为正常的 3 例儿童骨髓标本作为对照。通过实时荧光定量 PCR 检测并比较 linc00467 在两组样本中的表达量。通过慢病毒系统在 AML 细胞 (HL-60) 中过表达 linc00467 (linc00467 过表达组), 以表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的空载体转入 AML 细胞作为对照 (GFP 对照组); 通过慢病毒系统将干扰序列插入 AML 细胞中 (sh-linc00467 干扰组), 以插入随机序列作为对照 (sh-NC 对照组)。检测各组细胞增殖情况及对阿霉素耐药性的影响。**结果** 与对照组儿童相比, linc00467 在儿童 AML 中表达上调。过表达与干扰 linc00467 表达对细胞增殖无明显影响 ( $P>0.05$ )。相比于 GFP 对照组, 过表达 linc00467 在 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿霉素浓度作用下均可增强 HL-60 细胞活性 ( $P<0.05$ )。相比于 sh-NC 对照组, 干扰 linc00467 的表达在 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿霉素浓度作用下均可降低 HL-60 细胞活性 ( $P<0.05$ )。与未处理组相比, 阿霉素处理 HL-60 细胞后 linc00467 表达量升高 ( $P<0.05$ )。**结论** linc00467 有促进 AML 细胞对阿霉素耐药的生物学功能, 为 AML 新的治疗药物开发提供了依据。  
[中国当代儿科杂志, 2020, 22(7): 734-738]

**[关键词]** 急性髓系白血病; 长链非编码 RNA; linc00467; 阿霉素; 耐药; 儿童

### Expression of long non-coding RNA linc00467 in childhood acute myeloid leukemia and its role in drug resistance

RAO Chun-Bao, LUO Dong, LIN Zi-Tian, XIE Ming-Yu, HU Yuan, PENG Qi, JIANG Hua, ZHANG Zhen-Hong, LU Xiao-Mei. Key Laboratory of Genetics and Infectious Diseases, Dongguan Institute of Pediatrics, Dongguan, Guangdong 523327, China (Lu X-M, Email: luxm@dgp-institute.com)

**Abstract: Objective** To study the expression and function of long non-coding RNA linc00467 in childhood acute myeloid leukemia (AML). **Methods** Bone marrow samples were collected from 5 children with AML who were diagnosed from May 2016 to June 2018. Normal bone marrow samples based on bone marrow examination were collected from 3 children as controls. Quantitative real-time PCR was used to measure the expression of linc00467 in the two groups. A lentivirus system was used to achieve overexpression of linc00467 in AML cells (HL-60) (linc00467 overexpression group), and empty vector expressing green fluorescent protein (GFP) was transfected into AML cells to establish a GFP control group. A lentivirus system was used to insert an interfering sequence into AML cells (sh-linc00467 interfering group), and a random sequence was inserted to establish an sh-NC control group. Cell proliferation and resistance to doxorubicin were observed for all groups. **Results** Compared with the normal control group, the children with AML had a significant increase in linc00467 ( $P=0.018$ ). Overexpression and interference with linc00467 expression had no significant effect on cell proliferation. Compared with the GFP control group, the linc00467 overexpression group had a significant increase in the viability of HL-60 cells at the adriamycin concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

[收稿日期] 2020-02-03; [接受日期] 2020-05-19

[基金项目] 广东省自然科学基金 (2017A030310588); 东莞市社会科技发展重点项目 (2017507150100445; 20185071501001628)。

[作者简介] 饶春宝, 男, 博士, 助理研究员。

[通信作者] 陆小梅, 女, 主任技师, 教授。Email: luxm@dgp-institute.com。

( $P < 0.05$ ). Compared with the sh-NC control group, the sh-linc00467 interfering group had a significant reduction in the viability of HL-60 cells at the adriamycin concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $P < 0.05$ ). Compared with the untreated group, the adriamycin treatment group had a significant increase in the expression of linc00467 in HL-60 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** This study reveals the biological function of linc00467 to promote the resistance to adriamycin in AML, which provides a basis for developing new therapeutic drugs for AML.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(7): 734-738]

**Key words:** Acute myeloid leukemia; Long non-coding RNA; Linc00467; Adriamycin; Drug resistance; Child

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是髓系造血干/祖细胞恶性疾病, 以骨髓和外周血中原始和幼稚髓系细胞异常增生为主要特征。近年来儿童 AML 的总体生存率可达 60% 左右, 但是难以进一步提高<sup>[1]</sup>。目前, 化疗和造血干细胞移植是 AML 治疗的常用方法, 然而耐药性的出现严重影响其治疗效果, 耐药性复发是导致 AML 患者死亡的最主要原因<sup>[2]</sup>。因此, 深入研究儿童 AML 的耐药机制具有重要的医学价值。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 最早是由 Okazaki 等<sup>[3]</sup>在测序过程中发现的一类转录本长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子。目前许多研究已证实 lncRNAs 与白血病的发生、发展、临床表现和预后有密切联系, 在靶向分子治疗和预后评价方面具有良好的应用前景<sup>[4-6]</sup>。lnc RNA linc00467 全长 711 bp, 含有 6 个外显子。据报道, linc00467 在神经母细胞瘤<sup>[7]</sup>、肺腺癌<sup>[8]</sup>、肝癌<sup>[9]</sup>、宫颈癌<sup>[10]</sup>、结直肠癌<sup>[11]</sup>等多种肿瘤中发挥作用。本课题组前期通过生物信息学方法, 分析 TCGA 肿瘤数据库中 AML 患者 linc00467 的表达水平及预后, 发现 linc00467 高表达的患者其生存期要显著低于 linc00467 低/中表达的患者。然而, linc00467 在白血病中的具体功能作用目前尚未见文献报道。本研究对 linc00467 在儿童 AML 中的表达及在增殖与耐药中的作用进行了初步的探索。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

采集 2016 年 5 月至 2018 年 6 月于广州市妇女儿童医疗中心确诊的 5 例儿童 AML 病例的骨髓标本, 其中男 3 例, 女 2 例, 年龄 4~8 岁。本研究已获得广州市妇女儿童医疗中心伦理委员会批准 (2015012608) 及监护人书面知情同意。另采集 2018 年 1~6 月在东莞市儿童医院儿童血液科进行骨髓检查提示为正常的 3 例儿童骨髓标本作为

对照, 其中男 2 例, 女 1 例, 年龄 4~6 岁。本研究获得东莞市儿童医院伦理委员会批准及监护人书面知情同意。人 AML 细胞 HL-60 购买自中国典型培养物保藏中心细胞库, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 培养于 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中。

### 1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液购买自北京索莱宝科技有限公司, TRIzol、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 购买自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 购买自宝生物工程(大连)有限公司, 阿霉素购买自华中海威(北京)基因科技有限公司, CCK-8 购自于同仁化学研究所, LipoJet™ 转染试剂购买自思科生物科技有限公司。实时荧光定量 PCR 引物合成自上海生工生物工程有限责任公司, 内参 GAPDH 正向引物: 5'-CATCCATGACAACCTTTGGTATC-3', 反向引物: 5'-CCATCAGCCACAGTTTC-3'; linc00467 正向引物: 5'-CTGGTTGTTTCAGCACCTTCG-3', 反向引物: 5'-GGATCGGTGCTGCTTTTGGT-3'。

### 1.3 骨髓单个核细胞的采集与储存

运用淋巴细胞分离液, 按照试剂说明书进行, 主要操作步骤如下: (1) 每个患者常规抽取骨髓液 4 mL 于肝素抗凝管中。(2) 取一空管, 加入淋巴细胞分离液 3 mL, 沿管壁缓慢加入等量骨髓标本, 1500 r/min 离心 20 min。(3) 吸取分离界面层的单个核细胞于 1 mL EP 管中, 加入 1 mL 0.84% 氯化铵, 混匀, 静置 10 min 以充分裂解残余红细胞, 1500 r/min 离心 5 min。(4) 弃上清, 加入 1 mL 生理盐水, 将细胞洗涤 1 次, 1500 r/min 离心 5 min。(5) 重复步骤(4) 1 次, 弃上清, 储存于 -80℃ 冰箱中或者直接提取总 RNA。

### 1.4 linc00467 表达水平检测

采用 TRIzol 法进行总 RNA 的提取。采用 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 进行

cDNA 合成。实时荧光定量 PCR 采用 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, 在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 反应体系: PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 10 μL, 上、下游引物各 0.6 μL, cDNA 模板 0.3 μL, 灭菌去离子水 8.5 μL。反应条件: UDG 酶激活, 50 °C 2 min; 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 / 延伸 1 min, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法比较基因相对表达量。

### 1.5 慢病毒介导的基因过表达与基因干扰

慢病毒包装系统为三质粒系统, 组成为 psPAX2、pMD2.G、PHBLV 系列质粒。

**1.5.1 基因过表达** 分为绿色荧光蛋白 (GFP) 对照组和 linc00467 过表达组。主要步骤如下:

(1) 载体构建。linc00467 基因序列参见 NCBI 参考序列 NR\_026761.2, 人工合成 linc00467 基因序列后插入基因过表达慢病毒载体 pHBLV-CMV-MCS-3flag-ZsGreen-T2A PURO 的多克隆位点, 应用表达 GFP 的空载体即为 GFP 对照组。(2) 慢病毒包装。按照 psPAX2 10 μg、pMD2.G 5 μg、PHBLV 系列质粒 10 μg、LipoJet™ 转染试剂 75 μL 的体系, 在转染前 1 d 接种于 T75 瓶培养中的 293T 细胞。转染 6 h 后换新鲜培养基。转染 72 h 后收集病毒上清, 置于 -80 °C 备用。(3) 病毒感染目的细胞。将  $30 \times 10^4$  HL-60 接种于 6 孔板, 于接种当天加入 8 μg/mL Polybrene 和 100 μL 病毒液, 感染 24 h 后换成新鲜正常培养基, 感染 48 h 后添加 10 μg/mL 嘌呤霉素进行感染阳性细胞的筛选。

**1.5.2 基因干扰** 分为 sh-NC 对照组和 sh-linc00467 干扰组。主要步骤如下: (1) 载体构建。sh-NC-F: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', sh-NC-R: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; sh-linc00467-F: 5'-CAGGGAGGUUAAUAGACATT-3', sh-linc00467-R: 5'-UGUCUAUUAACCUCUCC-UGTT-3'。将 siRNA 双链退火后插入 pHBLV-U6-ShRNA-CMV-ZsGreen-PGK-PURO 载体的多克隆位点。(2) 慢病毒包装与病毒感染目的细胞的方法与基因过表达中的方法一致。

### 1.6 白血病细胞 HL-60 的增殖实验

将  $3 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板, 置于培养箱内孵育, 分别在 24、48、72 h 后进行细胞计数,

绘制细胞生长曲线。

### 1.7 白血病细胞 HL-60 的阿霉素耐药检测

将 HL-60 细胞接种于 96 孔板, 分成 6 组, 每组 5 个孔, 每个孔 100 μL 培养基,  $1.5 \times 10^4$  个细胞。接种细胞后立即加入阿霉素, 阿霉素终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μg/mL。24 h 后 CCK-8 检测细胞存活率。

### 1.8 阿霉素处理细胞后 linc00467 表达检测

将  $3 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板, 对照组不加药, 实验组分别加入终浓度为 0.03、0.06、0.12 μg/mL 的阿霉素, 置于细胞培养箱中培养 24 h、48 h 后进行总 RNA 的提取和逆转录, 实时荧光定量 PCR 检测 linc00467 的表达。

### 1.9 统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间的比较应用两样本 *t* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 生存分析进行。相关性分析采用 Microsoft Excel 的 CORREL 函数。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 linc00467 在儿童 AML 患者中的表达

经实时荧光定量 PCR 检测, 本研究中 AML 患儿的 linc00467 表达水平 ( $11.7 \pm 4.8$ ) 明显高于对照组 ( $1.2 \pm 0.6$ )。

### 2.2 过表达 linc00467 对白血病细胞耐药性的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示 linc00467 过表达组 linc00467 相对表达量 ( $5.67 \pm 0.34$ ) 明显高于 GFP 对照组 ( $1.07 \pm 0.17$ ) ( $t = -22.379$ , *P* < 0.01)。细胞生长曲线显示过表达 linc00467 对细胞增殖无明显影响 (*P* > 0.05)。细胞耐药性实验结果显示, 相比于 GFP 对照组, linc00467 过表达组呈现明显增强的阿霉素耐药性 (*P* < 0.05)。见图 1。

### 2.3 干扰 linc00467 表达对白血病细胞耐药性的影响

通过慢病毒基因干扰系统在 HL-60 细胞中干扰 linc00467 的表达, 通过实时荧光定量 PCR 法检测 linc00467 的干扰水平, sh-NC 对照组 linc00467 的表达水平为  $0.98 \pm 0.16$ , 明显高于 sh-linc00467

干扰组 ( $0.19 \pm 0.04$ ) ( $t=10.64, P<0.01$ )。细胞生长曲线显示 linc00467 基因干扰在接种后 24 h、72 h 检测对细胞增殖无明显影响, 在 48 h 检测到轻微抑制细胞增殖 ( $P<0.05$ )。细胞耐药性实验结果显示, 相比于 sh-NC 对照组, linc00467 干扰组细胞对阿霉素耐药性明显降低 ( $P<0.05$ )。见图 2。

## 2.4 阿霉素对 HL-60 细胞 linc00467 表达的影响

采用实时荧光定量 PCR 对阿霉素处理后的 HL-60 细胞进行 linc00467 表达的检测, 结果表明, 与未经阿霉素处理的对照组比较, 不同剂量阿霉素处理 HL-60 细胞不同时间均可显著上调 linc00467 的表达 ( $P<0.01$ ), 见图 3。

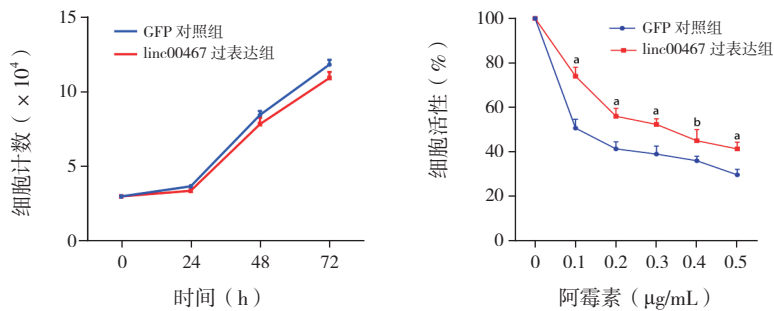


图 1 过表达 linc00467 对白血病细胞增殖及阿霉素耐药性的影响 左图为 GFP 对照组及 linc00467 过表达组细胞生长曲线, 两组不同时间点细胞计数比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。右图为 GFP 对照组及 linc00467 过表达组细胞的阿霉素耐药性检测, a 示与 GFP 对照组比较,  $P<0.01$ ; b 示与 GFP 对照组比较,  $P<0.05$ 。

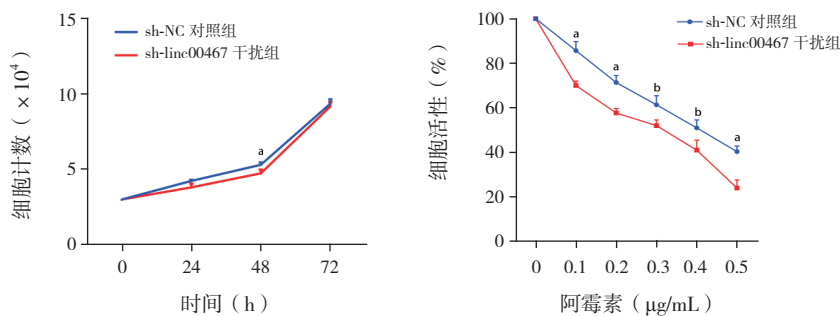


图 2 干扰 linc00467 表达对白血病细胞增殖及阿霉素耐药性的影响 左图为 sh-NC 对照组及 sh-linc00467 干扰组细胞生长曲线, a 示与 sh-NC 对照组比较,  $P<0.05$ 。右图为 sh-NC 对照组及 sh-linc00467 干扰组细胞的阿霉素耐药性检测, a 示与 sh-NC 对照组比较,  $P<0.01$ ; b 示与 sh-NC 对照组比较,  $P<0.05$ 。

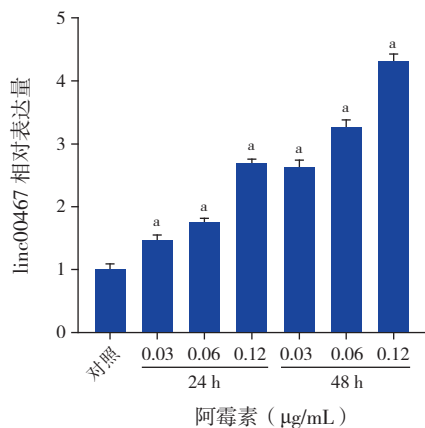


图 3 阿霉素处理促进 linc00467 的表达 a 示与对照组比较,  $P<0.01$ 。

## 3 讨论

常规化疗仍然是治疗 AML 的主要方法, 然而耐药现象的出现严重影响 AML 的治疗效果, AML 耐药问题亟需更多的临床科研工作者去探索。本研究表明 lncRNA linc00467 在儿童 AML 中表达上调; 本研究还通过基因过表达、基因干扰等技术证实 linc00467 可增强 AML 细胞的阿霉素耐药性。此外, 本研究进一步发现阿霉素处理能够上调 AML 细胞 linc00467 的表达水平, 这一正反馈调节可能加速 AML 患者耐药性的产生。

目前对于 linc00467 的研究并不多, 既往研究



提示 linc00467 与多种肿瘤密切相关, 如促进肺癌细胞的增殖与迁移<sup>[12-13]</sup>, 促进肝癌的进展<sup>[14-15]</sup>, 但都限于实体瘤中, 鲜有 linc00467 与白血病的相关报道, 本研究揭示了 linc00467 可能具有促进白血病患者对治疗药物耐药的作用。

linc00467 促进白血病细胞对阿霉素耐药的具体分子机制有待于进一步的研究。最近的研究表明, 某些 lncRNA 通过直接与蛋白质结合而发挥其功能作用<sup>[16-17]</sup>。通过查阅 starBase 数据库 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 发现, linc00467 与 RNA 结合蛋白 IGF2BP2、IGF2BP3 具有潜在的结合能力。而 IGF2BP2 是一种细胞自主性因子, 其高表达与 AML 耐药性相关<sup>[18]</sup>。因此 linc00467 可能通过其结合蛋白 IGF2BP2 调控 AML 细胞耐药, 但这一假设尚需进一步的实验证实。本课题组将继续收集儿童 AML 样本, 将这些样本分成初发组、非耐药组及耐药组, 比较 linc00467 在各组样本中的表达差异, 并深入研究其耐药机制。

综上, 本研究发现了一个在儿童 AML 中高表达的 lncRNA linc00467, linc00467 表达水平可能与 AML 患者预后密切相关。linc00467 增强白血病细胞对阿霉素的耐药性, 同时, 阿霉素可上调白血病细胞 linc00467 的表达。本研究揭示了 AML 患者对阿霉素耐药的一种新的机制, 为 AML 的治疗和新药开发提供了依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] 王妮娜. 儿童急性髓系白血病靶向治疗进展 [J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(7): 832-836.
- [2] Ramos NR, Mo CC, Karp JE, et al. Current approaches in the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia[J]. J Clin Med, 2015, 4(4): 665-695.
- [3] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs[J]. Nature, 2002, 420(6915): 563-573.
- [4] Chen L, Hu N, Wang C, et al. HOTAIRM1 knockdown enhances cytarabine-induced cytotoxicity by suppression of glycolysis through the Wnt/ $\beta$ -catenin/PFKP pathway in acute myeloid leukemia cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 680: 108244.
- [5] Wang D, Zeng T, Lin Z, et al. Long non-coding RNA SNHG5 regulates chemotherapy resistance through the miR-32/DNAJB9 axis in acute myeloid leukemia[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109802.
- [6] Sun H, Sun Y, Chen Q, et al. LncRNA KCNQ1OT1 contributes to the progression and chemoresistance in acute myeloid leukemia by modulating Tspan3 through suppressing miR-193a-3p[J]. Life Sci, 2020, 241: 117161.
- [7] Atmadibrata B, Liu PY, Sokolowski N, et al. The novel long noncoding RNA linc00467 promotes cell survival but is down-regulated by N-Myc[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88112.
- [8] Ding H, Luo Y, Hu K, et al. Linc00467 promotes lung adenocarcinoma proliferation via sponging miR-20b-5p to activate CCND1 expression[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 6733-6743.
- [9] Jiang W, Cheng X, Wang T, et al. LINC00467 promotes cell proliferation and metastasis by binding with IGF2BP3 to enhance the mRNA stability of TRAF5 in hepatocellular carcinoma[J]. J Gene Med, 2020, 22(3): e3134.
- [10] Li GC, Xin L, Wang YS, et al. Long intervening noncoding 00467 RNA contributes to tumorigenesis by acting as a competing endogenous RNA against miR-107 in cervical cancer cells[J]. Am J Pathol, 2019, 189(11): 2293-2310.
- [11] 李雪芹, 袁维堂, 刘佃温. 结直肠癌中长链非编码 RNA LINC00467 表达特征与预后分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(17): 1206-1208.
- [12] Yang J, Liu Y, Mai X, et al. STAT1-induced upregulation of LINC00467 promotes the proliferation migration of lung adenocarcinoma cells by epigenetically silencing DKK1 to activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(1): 118-126.
- [13] Wang X, Liu H, Shen K, et al. Long intergenic non-coding RNA 00467 promotes lung adenocarcinoma proliferation, migration and invasion by binding with EZH2 and repressing HTRA3 expression[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(1): 640-654.
- [14] Cai K, Li T, Guo L, et al. Long non-coding RNA LINC00467 regulates hepatocellular carcinoma progression by modulating miR-9-5p/PPARA expression[J]. Open Biol, 2019, 9(9): 190074.
- [15] Zheng Y, Nie P, Xu S. Long noncoding RNA linc00467 plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by regulating the miR-18a-5p/NEDD9 axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(5-6): 3135-3144.
- [16] Zhang A, Zhao JC, Kim J, et al. LncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer[J]. Cell Rep, 2015, 13(1): 209-221.
- [17] Yang F, Huo XS, Yuan SX, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis[J]. Mol Cell, 2013, 49(6): 1083-1096.
- [18] Kühnl A, Kaiser M, Neumann M, et al. High expression of IGF2BP2 is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2011, 35(12): 1585-1590.

( 本文编辑: 万静 )