

论著·基础研究

## miR-218-2-3P 靶向 *SIN3A* 基因影响 NK/T 细胞淋巴瘤的增殖和凋亡

王佳琳, 季 迪, 陈 祥, 杨 博, 余 林

重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的**·探讨 miR-218-2-3P 在 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达情况, 及其通过靶向 *SIN3A* 基因对 NK/T 细胞淋巴瘤增殖、凋亡及周期的影响。**方法**·采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测 miR-218-2-3P 在正常人 NK 细胞和 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI、NKYS 中的表达。采用脂质体 3000 瞬时转染法向 NK92MI 细胞分别转染含无义序列的抑制剂 (inhibitor NC)、miR-218-2-3P 抑制剂 (miR-218-2-3P inhibitor) 及不含片段的转染试剂, 并采用 qPCR 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 分别检测上述 3 组即 inhibitor NC 组、miR-218-2-3P inhibitor 组及空白对照组细胞中 miR-218-2-3P 及 *SIN3A* 蛋白的表达水平。通过 CCK8 法检测 3 组细胞的增殖活力。利用流式细胞仪检测 3 组细胞的凋亡率和周期。采用双荧光素酶报告基因实验检测 *SIN3A* 是否为 miR-218-2-3P 的靶基因。向 NK92MI 细胞分别转染 miR-218-2-3P inhibitor+*SIN3A* 干扰小 RNA (si-*SIN3A*)、miR-218-2-3P inhibitor + 含无义序列的干扰小 RNA (si-NC), 并采用 CCK8 法检测该 2 组细胞的增殖活力。**结果**·与正常人 NK 细胞相比, NK92MI 细胞、NKYS 细胞中 miR-218-2-3P 的表达显著升高 (均  $P<0.05$ )。与空白对照组和 inhibitor NC 组相比, miR-218-2-3P inhibitor 组 NK92MI 细胞的增殖活力减弱 (均  $P<0.05$ )、凋亡率增加 (均  $P<0.05$ ) 且发生了 G0/G1 期细胞周期阻滞 (均  $P<0.05$ )。双荧光素酶报告基因实验显示 *SIN3A* 为 miR-218-2-3P 的靶基因。与空白对照组和 inhibitor NC 组相比, miR-218-2-3P inhibitor 组的 *SIN3A* 蛋白表达水平升高 (均  $P<0.05$ )。下调 *SIN3A* 表达, 能够恢复由转染 miR-218-2-3P inhibitor 减弱的细胞增殖活力 (均  $P<0.05$ )。**结论**·miR-218-2-3P 在 NK92MI、NKYS 细胞株中表达较高, 其可能通过靶向调控 *SIN3A* 对 NK/T 细胞淋巴瘤的增殖、凋亡及周期产生影响。

**[关键词]** NK/T 细胞淋巴瘤; miR-218-2-3P; *SIN3A* 基因; 增殖; 凋亡; 细胞周期

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.009 **[中图分类号]** R733.4 **[文献标志码]** A

### Effect of miR-218-2-3P on proliferation and apoptosis of NK/T-cell lymphoma by targeting *SIN3A*

WANG Jia-lin, JI Di, CHEN Xiang, YANG Bo, YU Lin

Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the expression of miR-218-2-3P in NK/T-cell lymphoma, and the effect of miR-218-2-3P on the proliferation, apoptosis and cycle of NK/T-cell lymphoma by targeting *SIN3A*. **Methods**·Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the expressions of miR-218-2-3P in normal NK cells and NK/T-cell lymphoma cells NK92MI and NKYS. Lipofectamine 3000 was used to transfect the inhibitor containing nonsense sequences (inhibitors NC), miR-218-2-3P inhibitor and the same dose of transfection reagent without any fragment into NK92MI cells, which were divided into three groups. qPCR and Western blotting were used to detect the expression levels of miR-218-2-3P and *SIN3A* protein in the inhibitor NC group, the miR-218-2-3P inhibitor group and the blank control group, respectively. The cell proliferation activities of the three group were measured by CCK8 method. The apoptosis rates and cell cycles of the three group were determined by flow cytometry. The double luciferase reporter gene assay was performed to detect whether *SIN3A* was a target gene of miR-218-2-3P. NK92MI cells were transfected with miR-218-2-3P inhibitor+*SIN3A* small interfering RNA (si-*SIN3A*) and miR-218-2-3P inhibitor+nonsense sequences small interfering RNA (si-NC), respectively, which were divided into two groups. The cell proliferation activities of the two groups were detected by CCK8 method. **Results**·Compared with the normal NK cells, the expressions of miR-218-2-3P in NK92MI and NKYS cells significantly increased (both  $P<0.05$ ). Compared with the blank control group and the inhibitor NC group, the proliferation activity of NK92MI cells in the miR-218-2-3P inhibitor group decreased (both  $P<0.05$ ), the apoptosis rate increased (both  $P<0.05$ ) and cell cycle arrest occurred in G0/G1 phase (both  $P<0.05$ ). The double luciferase reporter gene assay showed that *SIN3A* was the target gene of miR-218-2-3P. Compared with the blank control group and the inhibitor NC group, the *SIN3A* protein expression of the miR-218-2-3P inhibitor group was increased (both  $P<0.05$ ). The down-regulation of *SIN3A* expression could restore the proliferation activity of cells weakened by miR-218-2-3P inhibitor (both  $P<0.05$ ). **Conclusion**·miR-218-2-3P is highly expressed in the NK92MI and NKYS cell lines. miR-218-2-3P may affect the proliferation, apoptosis and cycle of NK/T-cell lymphoma through targeted regulation of *SIN3A*.

**[Key words]** NK/T-cell lymphoma; miR-218-2-3P; *SIN3A*; proliferation; apoptosis; cell cycle

**[基金项目]** 重庆市科学技术委员会科技惠民计划项目 (cstc2015jcsf10001-02-03) (Science and Technology Benefit Project of Chongqing Science and Technology Commission, cstc2015jcsf10001-02-03)。

**[作者简介]** 王佳琳 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: 861579876@qq.com。

**[通信作者]** 余 林, 电子信箱: yulincqmu@163.com。

NK/T 细胞淋巴瘤是一种非霍奇金淋巴瘤, 其生长迅速、恶性程度高且好发于鼻部。现有研究<sup>[1]</sup>表明, 多种基因的表达异常和缺失均与 NK/T 细胞淋巴瘤的发生相关。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一组小的非编码 RNA, 可通过转录后靶向其相应的 mRNA 来调节基因表达<sup>[2]</sup>。近年来, 多项研究已发现 NK/T 细胞淋巴瘤的发生与 miRNA (如 miR-155<sup>[3]</sup>、miR-221<sup>[4]</sup> 和 miR-101<sup>[5]</sup> 等) 的表达异常有关。

miR-218 是狭缝基因 (*SLIT2/SLIT3*) 家族的成员之一, 研究<sup>[6-10]</sup>发现 miR-218 在多种肿瘤中均表达下调。目前已确认, miR-218 是一种抑癌基因。该基因有 miR-218-1 和 miR-218-2 共 2 种, 其中二者具有相同的 5p 序列而在 3p 序列中存在差异; 基于此, 该基因可进一步分为 miR-218-1-3P 和 miR-218-2-3P 共 2 种<sup>[11]</sup>。Feng 等<sup>[12]</sup>发现, miR-218-2-3P 可通过靶向细胞分裂周期 27 (cell division cycle 27, *CDC27*) 促进胶质母细胞瘤的生长、侵袭和耐药; 而 miR-218-2-3P 对 NK/T 细胞淋巴瘤的作用尚不清楚。本研究分析 miR-218-2-3P 在 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 中的表达水平, 以及其对 NK/T 细胞淋巴瘤增殖、凋亡和周期的影响, 并探讨潜在的作用机制, 为 NK/T 细胞淋巴瘤发病机制的研究提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂与仪器

NK92MI 细胞系购自中国科学院昆明细胞库, NKYS 细胞系由土耳其实验室惠赠, 293T 细胞为重庆医科大学附属第一医院实验室冻存细胞, 正常人 NK 细胞从成人全血中筛选获得。1640 培养基、 $\alpha$ -MEM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、马血清 (horse serum, HHS) 均购自美国 Gibco 公司, 脂质体 3000 转染试剂 (lipofectamine 3000 transfection reagent)、TRIzol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司, 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司。miR-218-2-3P 抑制剂 (miR-218-2-3P inhibitor) (序列为 5'-CGCGGTGCTTGACAGAACCATG-3'), *SIN3A* 基因干扰小 RNA (small interfering RNA, si-*SIN3A*) (序列为 5'-CCCUCAGUUAAGAAGAAATT-3'), 荧光素酶报告基因实验的质粒包括 *SIN3A* 野生型质粒 (*SIN3A* 3'-UTR-wild type-Luc 质粒, *SIN3A*-WT 质粒)、*SIN3A* 突变型质粒 (*SIN3A* 3'-UTR-mutant-Luc 质粒, *SIN3A*-MUT 质粒) 及仅含荧光素酶基因的质粒 (Luc 质粒) 均由武汉谷歌生物科技有限公司合成; 细胞周期与凋亡检测试剂盒 (cell cycle

and apoptosis analysis kit) 购自上海七海复泰生物科技有限公司; 反转录和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 试剂盒、荧光素酶实验试剂盒均购自美国 Promega 公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天公司; 鼠抗人 *SIN3A* 抗体、鼠抗人  $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin) 抗体购自美国 CST 公司; 超敏 ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司。LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司, FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司, MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

### 1.2 细胞培养

于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中, 分别用含 12.5% FBS 和 12.5% HHS 的  $\alpha$ -MEM 培养基培养 NK92MI 细胞, 用含 10% FBS 的 1640 培养基培养 NKYS 细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 293T 细胞。定期观察细胞状态, 每隔 2 ~ 3 d 按 1:3 的比例传代。

### 1.3 细胞转染及分组

取对数生长期 (传代后的 16 ~ 24 h) 的 NK92MI 细胞按 60% ~ 70% 的融合度种植在 6 孔板中, 按照脂质体 3000 转染试剂说明书进行细胞转染。miR-218-2-3P inhibitor 转染实验分为空白对照组、含无义序列的抑制剂组 (inhibitor containing nonsense sequences, inhibitor NC 组) 以及 miR-218-2-3P 抑制剂组 (miR-218-2-3P inhibitor 组)。miR-218-2-3P 抑制剂 + *SIN3A* 基因干扰小 RNA 共转染实验分为 miR-218-2-3P 抑制剂 + 含无义序列的干扰小 RNA 组 (miR-218-2-3P inhibitor+si-NC 组) 与 miR-218-2-3P 抑制剂 + *SIN3A* 干扰小 RNA 组 (miR-218-2-3P inhibitor+si-*SIN3A* 组)。各组均在转染 48 h 后, 收集细胞进行下一步实验。考虑到 NKYS 细胞在转染实验中的转染效率不佳, 且该细胞中 miR-218-2-3P 的表达量低于 NK92MI 细胞, 因此本研究仅选择 NK92MI 进行后续实验。

### 1.4 反转录与 qPCR 检测

用 TRIzol 提取细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 扩增条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 70 °C 1 min, 共 40 个循环。设置 3 个复孔, 记录每孔的 *Ct* 值, 以 3 个复孔的平均值作为最终结果。本研究中 miRNA 的 qPCR 方法为加尾法, 以 U6 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析结果。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab 1 Primer sequences for qPCR

引物名称	上游引物	下游引物
miR-218-2-3P	5'-AGCGACTGGTCAGAGTCAAGG-3'	5'-CCTGAAGCTCCCGAGTATGGG-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACCAATTTGCGT-3'

1.5 细胞增殖检测

经转染后, 分别将 miR-218-2-3P inhibitor 转染实验及 miR-218-2-3P 抑制剂 + *SIN3A* 基因干扰小 RNA 共转染实验中的各组 NK92MI 细胞按  $3 \times 10^4$  个 / 孔接种于 96 孔板, 每孔设 3 个复孔。摇匀后, 置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养。2 d 后, 向各孔加入 10 μL CCK8 试剂, 十字摇匀后放入培养箱中继续培养 4 h。而后取出, 用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度 [ $D(450\text{ nm})$ ]。以细胞生长时间为横坐标、生长抑制率为纵坐标, 绘制生长曲线。其中, miR-218-2-3P inhibitor 转染实验的生长抑制率计算公式为:  $[1 - \text{miR-218-2-3P inhibitor 组 } D(450\text{ nm}) / \text{空白对照组或 inhibitor NC 组 } D(450\text{ nm})] \times 100\%$ ; miR-218-2-3P 抑制剂 + *SIN3A* 基因干扰小 RNA 共转染实验的计算公式为:  $[1 - \text{miR-218-2-3P inhibitor+si-SIN3A 组 } D(450\text{ nm}) / \text{miR-218-2-3P inhibitor+si-NC 组 } D(450\text{ nm})] \times 100\%$ 。

1.6 细胞凋亡、细胞周期检测

取约  $5 \times 10^5$  个转染后的空白对照组、inhibitor NC 组及 miR-218-2-3P inhibitor 组的 NK92MI 细胞于 1.5 mL 离心管中, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞 2 次; 按细胞周期与凋亡试剂盒说明书向细胞中添加试剂, 待制备好混悬液后避光冰浴 5 min, 于 0.5 h 内用 FACSCalibur 流式细胞仪进行细胞凋亡、细胞周期的检测与分析。

1.7 双荧光素酶报告基因实验检测

将 293T 细胞按  $1 \times 10^4$  个 / 孔接种至 96 孔板中, 并于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱中孵育 24 h。将 miR-218-2-3P 模拟物 + 仅含荧光素酶基因的质粒 (miR-218-2-3P mimics+Luc)、含无义序列模拟物 + 仅含荧光素酶基因的质粒 (mimics NC+Luc)、miR-218-2-3P 模拟物 + *SIN3A*-WT 质粒 (miR-218-2-3P mimics+*SIN3A*-WT)、含无义序列模拟物 + *SIN3A*-WT 质粒 (mimics NC+*SIN3A*-WT)、miR-218-2-3P 模拟物 + *SIN3A*-MUT 质粒 (miR-218-2-3P mimics+*SIN3A*-MUT) 以及含无义序列模拟物 + *SIN3A*-

MUT 质粒 (mimics NC+*SIN3A*-MUT) 分别共转染入 293T 细胞中, 继续培养 48 h, 于酶标仪荧光素酶报告基因检查系统检测上述 6 组的荧光素酶活性。

1.8 蛋白质印迹法检测

用 15 mL 离心管收集空白对照组、inhibitor NC 组及 miR-218-2-3P inhibitor 组转染后的 NK92MI 细胞,  $300 \times g$  离心 5 min 后弃去上清液, 用 PBS 洗涤 2 ~ 3 次, 并用强裂解液充分裂解细胞。于  $4\ 800 \times g$  离心 15 min 后弃去沉淀, 获得总蛋白质, 按 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度, 并行蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测。上样孔内加入适量煮沸变性的蛋白质样品, 行 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳加以分离。通过电转法将蛋白质转移至聚偏氟乙烯膜上, 于室温下用 5% 脱脂奶粉摇床封闭 2 h, 而后将膜转移至含有  $\beta$ -tubulin 抗体、*SIN3A* 抗体 (工作浓度均为 1:1 000) 的稀释液中 4 ℃ 过夜。17 h 后, 摇床上复温 1 h, 而后 TBST 洗涤 3 次 (每次 10 ~ 15 min)。再将膜与相应二抗孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次。最后, 用超敏的 ECL 化学发光试剂显影。

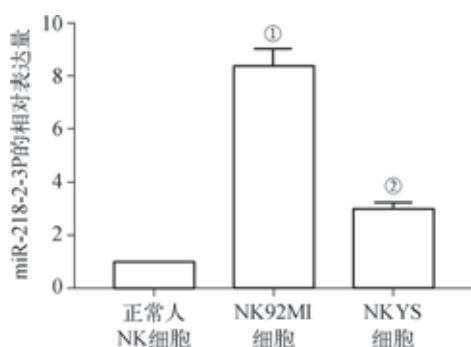
1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各实验数据间两两比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR 检测 NK/T 细胞淋巴瘤细胞系中 miR-218-2-3P 的表达情况

采用 qPCR 检测正常人 NK 细胞与 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI、NKYS 中 miR-218-2-3P 的表达情况, 结果 (图 1) 显示, 与正常人 NK 细胞相比, NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 及 NKYS 中 miR-218-2-3P 的表达均较高 (均  $P < 0.05$ )。



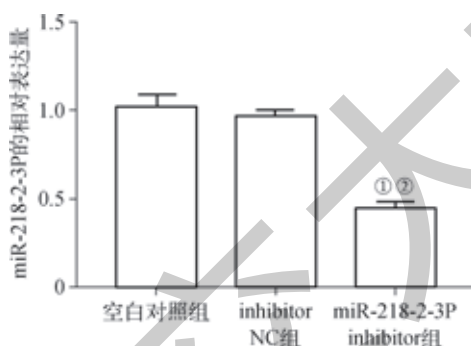
注: 以 U6 作为内参。① $P=0.000$ , ② $P=0.011$ , 与正常人 NK 细胞比较

图 1 qPCR 检测正常人 NK 细胞与 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI、NKYS 中 miR-218-2-3P 的表达情况

Fig 1 Expression levels of miR-218-2-3P in normal NK cells and NK/T-cell lymphoma cell lines NK92MI and NKYS by qPCR

## 2.2 qPCR 检测转染 miR-218-2-3P inhibitor 后 NK92MI 细胞中 miR-218-2-3P 的表达情况

针对转染 miR-218-2-3P inhibitor 48 h 后 NK92MI 细



注: ① $P=0.003$ , 与空白对照组比较; ② $P=0.005$ , 与 inhibitor NC 组比较

图 2 qPCR 检测 3 组 NK92MI 细胞中 miR-218-2-3P 的表达水平

Fig 2 Expression levels of miR-218-2-3P in NK92MI cells of the three groups by qPCR

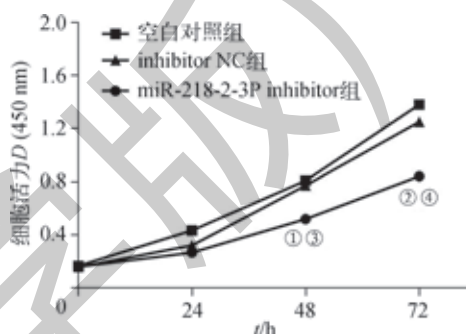
## 2.4 流式细胞术分析 NK92MI 细胞转染 miR-218-2-3P inhibitor 后细胞凋亡率的改变

采用流式细胞仪检测经转染 miR-218-2-3P inhibitor 后 NK92MI 细胞的凋亡率, 结果 (图 4) 显示, 相较于空白对照组和 inhibitor NC 组, miR-218-2-3P inhibitor 组细胞的凋亡率明显增加, 且差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。继而说明, 沉默 miR-218-2-3P 后, NK92MI 细胞的凋亡率增加。

胞中 miR-218-2-3P 的表达行 qPCR 检测, 结果 (图 2) 显示, 与空白对照组和 inhibitor NC 组相比, miR-218-2-3P inhibitor 组中 miR-218-2-3P 的表达明显降低, 差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。继而说明, miR-218-2-3P inhibitor 转染成功。

## 2.3 CCK8 法检测沉默 miR-218-2-3P 对 NK92MI 细胞增殖的影响

采用 CCK8 法检测空白对照组、inhibitor NC 组和 miR-218-2-3P inhibitor 组中 NK92MI 细胞的增殖活力。结果 (图 3) 显示, 24 h 时 3 组细胞的  $D(450\text{ nm})$  间差异无统计学意义; 继续培养到 48、72 h 后检测  $D(450\text{ nm})$  发现, 与空白对照组和 inhibitor NC 组相比, miR-218-2-3P inhibitor 组细胞的活力明显下降, 且差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。继而说明, 沉默 miR-218-2-3P 后, NK92MI 细胞的增殖活力减弱。



注: ① $P=0.026$ , ② $P=0.017$ , 与空白对照组比较; ③ $P=0.026$ , ④ $P=0.020$ , 与 inhibitor NC 组比较

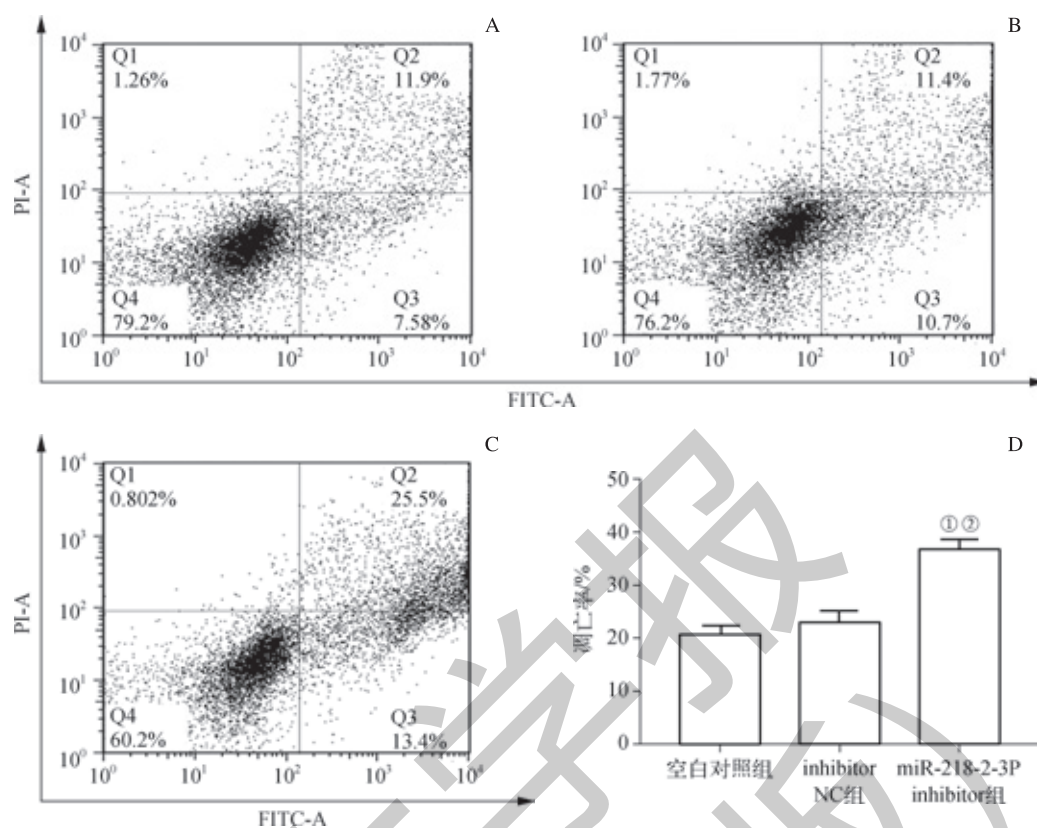
图 3 沉默 miR-218-2-3P 对 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 增殖的影响

Fig 3 Effect of miR-218-2-3P silencing on the proliferation of NK/T-cell lymphoma cell NK92MI

## 2.5 流式细胞术检测 NK92MI 细胞转染 miR-218-2-3P inhibitor 后细胞周期的变化

采用流式细胞仪检测经转染 miR-218-2-3P inhibitor 后 NK92MI 细胞的周期分布, 结果 (图 5) 显示, 相较于空白对照组和 inhibitor NC 组, miR-218-2-3P inhibitor 组细胞的 G0/G1 期占比明显增加, 且差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。继而说明, 沉默 miR-218-2-3P 后, NK92MI 细胞发生了 G0/G1 期阻滞。

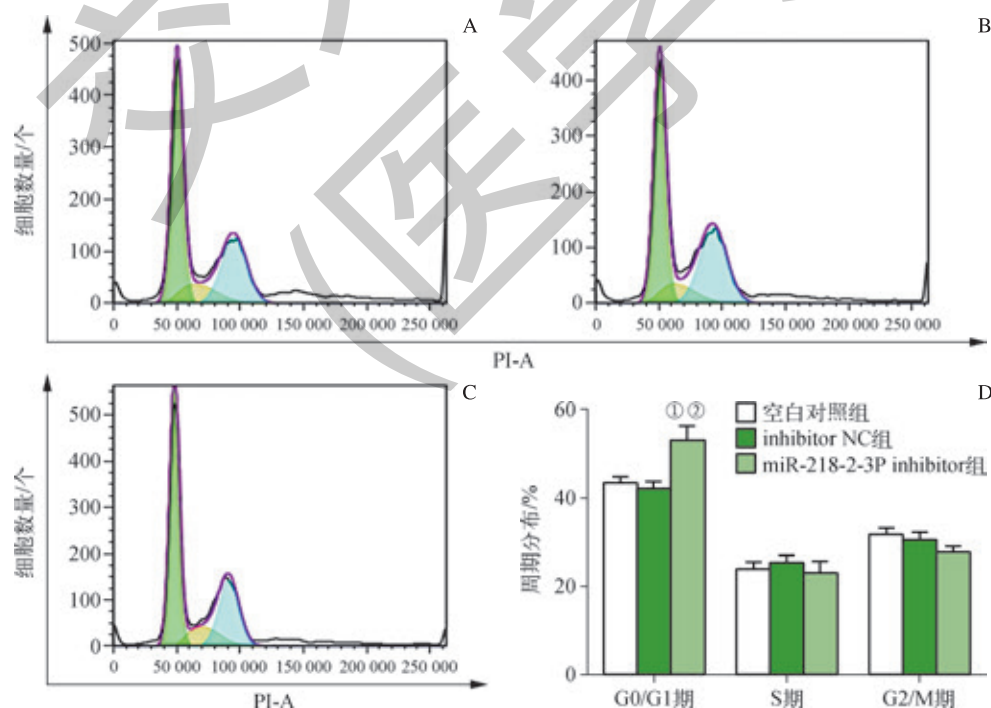




注: A ~ C. 空白对照组 (A)、inhibitor NC 组 (B) 及 miR-218-2-3P inhibitor 组 (C) 的细胞凋亡率检测; D. 3 组细胞的凋亡率统计分析。<sup>①</sup> $P=0.013$ , 与空白对照组比较; <sup>②</sup> $P=0.015$ , 与 inhibitor NC 组比较

图 4 沉默 miR-218-2-3P 对 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 凋亡的影响

Fig 4 Effect of miR-218-2-3P silencing on the apoptosis of NK/T-cell lymphoma cell NK92MI



注: A ~ C. 空白对照组 (A)、inhibitor NC 组 (B) 及 miR-218-2-3P inhibitor 组 (C) 的细胞周期分布; D. 3 组细胞周期分布的统计分析。<sup>①</sup> $P=0.034$ , 与空白对照组比较; <sup>②</sup> $P=0.028$ , 与 inhibitor NC 组比较

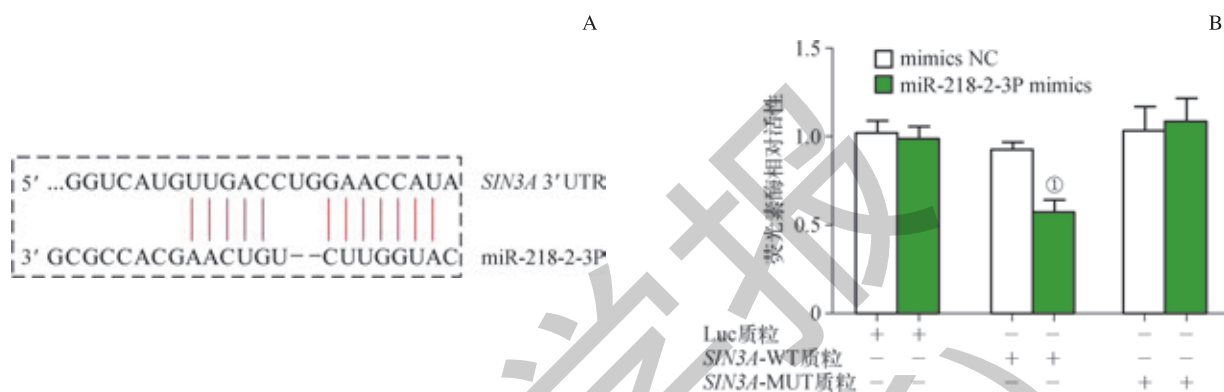
图 5 沉默 miR-218-2-3P 对 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 的细胞周期的影响

Fig 5 Effect of miR-218-2-3P silencing on the cell cycle of NK/T-cell lymphoma cell NK92MI

## 2.6 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-218-2-3P 的靶向基因

通过在线检索 TargetScan、miRDB 和 miRWalk 三大 miRNA 靶基因预测数据库的相关信息发现, *SIN3A* 可能是 miR-218-2-3P 的潜在靶基因; 同时通过 TargetScan 数据库, 我们预测出了 miR-218-2-3P 与 *SIN3A* 的 3'UTR 的结合位点 (图 6A)。随后, 本研究采用双荧光素酶报告

基因实验对 miR-218-2-3P 与 *SIN3A* 的结合位点进行分析, 结果 (图 6B) 显示: 与转染 mimics NC+*SIN3A*-WT 组相比, 转染 miR-218-2-3P mimics+*SIN3A*-WT 组的荧光素酶活性降低; 而与转染 mimics NC+*SIN3A*-MUT 组相比, 转染 miR-218-2-3P mimics+*SIN3A*-MUT 组的荧光素酶活性不变; 说明 miR-218-2-3P 与 *SIN3A* 野生型 3'UTR 相结合。继而表明, *SIN3A* 是 miR-218-2-3P 的直接靶向基因。



注: A. TargetScan 数据库预测的 miR-218-2-3P 与 *SIN3A* 基因 3'UTR 的结合位点; B. 6 组细胞内荧光素酶活性检测。①  $P=0.019$ , 与 mimics NC+*SIN3A*-WT 组比较

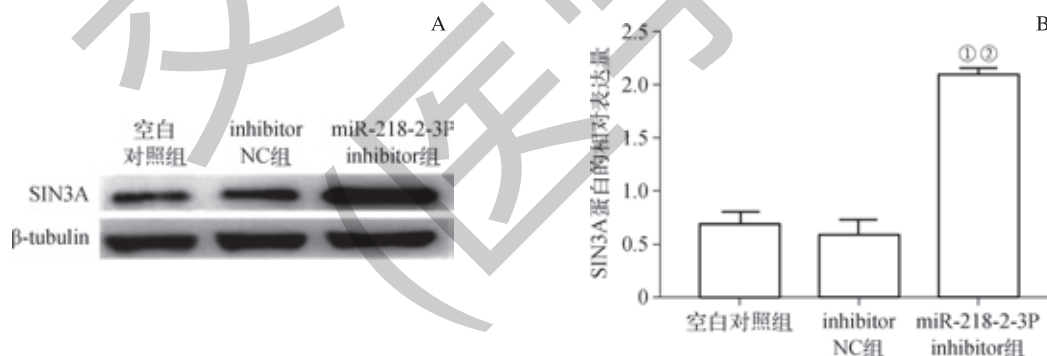
图 6 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-218-2-3P 的靶基因

Fig 6 Detection of the target gene of miR-218-2-3P by double luciferase reporter assay

## 2.7 Western blotting 检测 *SIN3A* 蛋白的表达

采用 Western blotting 检测空白对照组、inhibitor NC 组与 miR-218-2-3P inhibitor 组中 *SIN3A* 蛋白的表达水平,

结果 (图 7) 显示, 相较于 inhibitor NC 组和空白对照组, miR-218-2-3P inhibitor 组中 *SIN3A* 的表达水平有明显增高, 且差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。



注: A. 3 组 NK92MI 细胞的蛋白条带显影; B. *SIN3A* 蛋白表达的统计分析。①  $P=0.007$ , 与空白对照组比较; ②  $P=0.006$ , 与 inhibitor NC 组比较

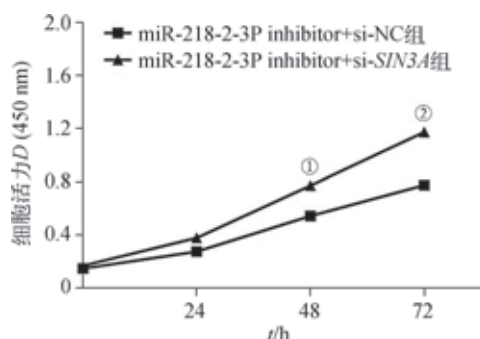
图 7 NK92MI 细胞转染 miR-218-2-3P 抑制剂对 *SIN3A* 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of miR-218-2-3P transfection on the expression of *SIN3A* protein in NK/T-cell lymphoma cell NK92MI

## 2.8 CCK8 法检测下调 *SIN3A* 表达后 NK92MI 细胞的增殖活性

通过 miR-218-2-3P inhibitor+si-*SIN3A* 共转染实验, 用 CCK8 法检测 NK92MI 细胞的增殖活力。结果 (图 8) 显示, 与 miR-218-2-3P inhibitor+si-NC 组相比, 随着转染

时间的增加, miR-218-2-3P inhibitor+si-*SIN3A* 组细胞的增殖活力有明显升高 (均  $P<0.05$ )。继而表明, 下调 *SIN3A* 的表达能明显恢复由转染 miR-218-2-3P inhibitor 减弱的细胞增殖活力。



注: ①  $P=0.036$ , ②  $P=0.029$ , 与同一时间点的 miR-218-2-3P inhibitor+si-NC 组比较

图 8 转染 miR-218-2-3P inhibitor+si-SIN3A 后对 NK92MI 细胞增殖的影响

Fig 8 Effect of miR-218-2-3P inhibitor and si-SIN3A transfection on the proliferation of NK/T-cell lymphoma cell NK92MI

### 3 讨论

NK/T 细胞淋巴瘤是一类恶性程度较高的非霍奇金淋巴瘤, 其主要的治疗方法是放射治疗 (放疗)、化学治疗 (化疗) 以及放、化疗联合治疗, 但上述治疗方法的预后均较差。因此, 深入理解该疾病的复杂的分子发病机制、寻找更有效的治疗方法十分必要。

miRNA 作为转录后调节因子, 可通过调节其下游靶基因促进或抑制肿瘤的形成。以往的大量研究发现, miR-218 可在甲状腺癌<sup>[6]</sup>、结肠癌<sup>[7]</sup>、肺癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、急性早幼粒细胞白血病<sup>[10]</sup>等多种肿瘤中表达下调, 即通过靶向调控结肠转移相关基因 1 (metastasis associated in colon cancer 1, MACC1)、白介素 -6/ 信号转导及转录激活因子 3 (interleukin-6/signal transducers and activators of transcription 3, IL-6/STAT3)、B 细胞特异性小鼠白血病病毒整合位点 -1 (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1, BMI-1) 等抑制肿瘤的生长。这些研究基本确定了 miR-218 是一种抑癌基因, 但鲜有关于 miR-218 参与 NK/T 细胞淋巴瘤的研究报道。为研究 miR-218-2-3P 对 NK/T 细胞淋巴瘤的影响, 本研究通过沉默 NK92MI 细胞中 miR-218-2-3P 的表达开展一系列细胞功能学实验发现, 与空白对照组、inhibitor NC 组相比, miR-218-2-3P inhibitor 组的 NK92MI 细胞的增殖活力有所减弱、凋亡率有所增加且细胞发生了 G0/G1 期阻滞; 上述结果说明, miR-218-2-3P 在 NK/T 细胞淋巴瘤中可能充当肿瘤促进因子。

为进一步研究 miR-218-2-3P 参与 NK/T 细胞淋巴瘤发生发展的分子调控机制, 本研究通过 TargetScan、miRDB 和 miRWalk 数据库预测并取交集, 共计挑选出 20 多个

miR-218-2-3P 的潜在靶基因; 其中我们发现, SIN3A 基因与细胞的增殖、凋亡、周期等功能相关。SIN3A 蛋白是 SIN3 转录调控蛋白家族成员之一, 是多蛋白的转录共阻遏复合物的核心组分, 可为组蛋白脱乙酰基酶 (histone deacetylases, HDAC)、甲基化 -CpG 结合蛋白 2 (methyl-CpG binding protein 2, MeCP2)、P53 蛋白等转录调控因子的组装提供平台以发挥调节转录的作用, 包括核小体重构、DNA 甲基化等<sup>[13-15]</sup>。在以往研究中, 对 SIN3A 蛋白的报道多聚焦于乳腺癌方面。Watanabe 等<sup>[16]</sup>发现, SIN3A 突变可使雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ) 的表达量升高, 从而促进乳腺癌细胞增殖; Yang 等<sup>[17]</sup>发现, 赖氨酸特异性脱甲基酶 1 (lysine-specific demethylase 1, LSD1) 与 SIN3A/HDAC 复合物协调作用可维持乳腺癌的化疗敏感性。那么 SIN3A 是否是 miR-218-2-3P 的靶基因? 通过 TargetScan 数据库, 我们找到了 miR-218-2-3P 与 SIN3A 的 3'UTR 的结合位点; 通过双荧光素酶报告基因实验发现, 向 NK92MI 细胞内转染 miR-218-2-3P mimics 后, 能够抑制 SIN3A-WT 质粒的荧光素酶活性, 但对 SIN3A-MUT 质粒的荧光素酶活性无明显影响; 继而表明, SIN3A 是 miR-218-2-3P 的直接靶向基因。同时本研究通过 Western blotting 检测发现, 转染了 miR-218-2-3P inhibitor 的 NK92MI 细胞相较于 inhibitor NC 组和空白对照组, 其 SIN3A 蛋白表达水平升高; 继而表明, miR-218-2-3P 可以靶向调控 SIN3A 的表达。研究<sup>[18]</sup>发现, SIN3A 可直接与 STAT3 相互作用促进其乙酰化, 而 SIN3A 下调则可延长活化 STAT3 的核保留时间。既往研究发现, STAT3 可通过调控髓细胞白血病序列 1 (mcl1)<sup>[19]</sup>、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)<sup>[20]</sup>、B 细胞淋巴瘤蛋白 -XL (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-XL)<sup>[21]</sup>等一系列蛋白, 在调控细胞生长、存活、细胞转化方面发挥重要作用。目前研究<sup>[22-23]</sup>表明, 激酶/信号转导及转录激活因子 3 (Janus kinase/interleukin-6/signal transducers and activators of transcription 3, JAK/STAT3) 信号通路的激活是 NK/T 细胞淋巴瘤发生的主要原因之一。我们推测, miR-218-2-3P 可能通过下调 SIN3A 的表达来减弱 SIN3A 对 STAT3 的抑制作用, 从而激活 JAK/STAT3 信号通路, 促进 NK/T 细胞淋巴瘤的发生与发展。因此, 本研究同时向 NK92MI 细胞转染 si-SIN3A 与 miR-218-2-3P inhibitor 后, 利用 CCK8 法检测细胞的增殖活力发现, 下调 SIN3A 的表达能够明显恢复由转染 miR-218-2-3P inhibitor 减弱的细胞增殖活力。

综上所述, miR-218-2-3P 在 NK/T 细胞淋巴瘤中过表达, 沉默 miR-218-2-3P 可降低 NK/T 细胞淋巴瘤细胞 NK92MI 的增殖活力、增加其凋亡率, 且使之发生 G0/G1

期细胞周期阻滞,而这些都是通过靶向调控 *SIN3A* 的表达实现的。从上述结果中可以推测 miR-218-2-3P 可能在 NK/T 细胞淋巴瘤中作为一种癌基因,而这与 miR-218 作为抑癌基因的结论不符。我们认为这可能与 Feng 等<sup>[12]</sup>发现

的 miR-218 在胶质瘤中的作用相一致,继而推测在 NK/T 细胞淋巴瘤中 miR-218-1-3P 作为抑癌基因起了主导作用从而抑制了 miR-218-2-3P 的促癌作用。而这一设想的真实性有待于在后续的研究中进行验证。

## 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Li Z, Xia Y, Feng LN, et al. Genetic risk of extranodal natural killer T-cell lymphoma: a genome-wide association study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(9): 1240-1247.
- [2] Lan H, Lu H, Wang X, et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1250941.
- [3] Zhang X, Ji W, Huang R, et al. MicroRNA-155 is a potential molecular marker of natural killer/T-cell lymphoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(33): 53808-53819.
- [4] Guo HQ, Huang GL, Guo CC, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-221 for extranodal natural killer/T-cell lymphoma[J]. *Dis Markers*, 2010, 29(5): 251-258.
- [5] Ng SB, Yan J, Huang G, et al. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4919-4929.
- [6] Han M, Chen L, Wang Y. miR-218 overexpression suppresses tumorigenesis of papillary thyroid cancer *via* inactivation of PTEN/PI3K/AKT pathway by targeting Runx2[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 6305-6316.
- [7] Ilm K, Fuchs S, Mudduluru G, et al. MACC1 is post-transcriptionally regulated by miR-218 in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(33): 53443-53458.
- [8] Yang Y, Ding L, Hu Q, et al. MicroRNA-218 functions as a tumor suppressor in lung cancer by targeting IL-6/STAT3 and negatively correlates with poor prognosis[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 141.
- [9] Liu B, Tian Y, Li F, et al. Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3178-3184.
- [10] Wang Y, Sun HH, Sui MH, et al. miR-218 inhibits acute promyelocytic leukemia cell growth by targeting BMI-1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 8078-8083.
- [11] Guan H, Wei G, Wu J, et al. Down-regulation of miR-218-2 and its host gene *SLIT3* cooperate to promote invasion and progression of thyroid cancer[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(8): E1334-E1344.
- [12] Feng Z, Zhang L, Zhou J, et al. miR-218-2 promotes glioblastomas growth, invasion and drug resistance by targeting CDC27[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6304-6318.
- [13] Yang X, Zhang F, Kudlow JE. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression[J]. *Cell*, 2002, 110(1): 69-80.
- [14] Silverstein RA, Ekwall K. Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability[J]. *Curr Genet*, 2005, 47(1): 1-17.
- [15] Moehren U, Dressel U, Reeb CA, et al. The highly conserved region of the corepressor Sin3A functionally interacts with the co-repressor Alien[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(10): 2995-3004.
- [16] Watanabe K, Yamamoto S, Sakaguti S, et al. A novel somatic mutation of *SIN3A* detected in breast cancer by whole-exome sequencing enhances cell proliferation through ER $\alpha$  expression[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16000.
- [17] Yang Y, Huang W, Qiu R, et al. LSD1 coordinates with the SIN3A/HDAC complex and maintains sensitivity to chemotherapy in breast cancer[J]. *J Mol Cell Biol*, 2018, 10(4): 285-301.
- [18] Icardi L, Mori R, Gesellchen V, et al. The Sin3a repressor complex is a master regulator of STAT transcriptional activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(30): 12058-12063.
- [19] Ma Z, Bao X, Gu J. Furostanin A-induced autophagy alleviates apoptosis and promotes cell cycle arrest *via* inactivation STAT3/Mcl-1 axis in colorectal cancer[J]. *Life Sci*, 2018, 218: 47-57.
- [20] Zhang XM, Zhou C, Gu H, et al. Correlation of RKIP, STAT3 and cyclin D1 expression in pathogenesis of gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9): 5902-5908.
- [21] Zaanani A, Okamoto K, Kawakami H, et al. The mutant *KRAS* gene up-regulates BCL-XL protein *via* STAT3 to confer apoptosis resistance that is reversed by BIM protein induction and BCL-XL antagonism[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23838-23849.
- [22] Geng L, Li X, Zhou X, et al. WP1066 exhibits antitumor efficacy in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma cells through downregulation of the STAT3 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2868-2874.
- [23] Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, et al. STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2009, 23(9): 1667-1678.

[收稿日期] 2019-04-15

[本文编辑] 邢宇洋