

## uc. 477 + 在小鼠 B 淋巴瘤细胞中的表达研究

郭俊荣, 张欣, 花逸婷, 孙敏敏, 朱明明, 华婧, 张艳青

(扬州大学医学院 江苏省非编码 RNA 基础与临床转化重点实验室, 江苏 扬州, 225001)

**摘要:** 目的 根据超保守 RNA uc. 477 + 在小鼠正常 B 细胞与小鼠 B 淋巴瘤细胞中的表达差异, 探讨 uc. 477 + 对小鼠 B 淋巴瘤细胞增殖的影响。方法 从 C57BL/6 野生型小鼠脾脏中分选出正常 B 细胞, RT-PCR 检测 uc. 477 + 在小鼠正常 B 细胞与 B 淋巴瘤细胞中的表达。将 uc. 477 + 基因片段构建到 pMSCV-PIG 逆转录病毒表达载体上, 过表达质粒 477-pMSCV-PIG 和空载体质粒 pMSCV-PIG 经 293T 包装成逆转录病毒感染小鼠淋巴瘤细胞 38B9, 倒置荧光显微镜和流式细胞术检测感染率。细胞计数和细胞周期检测 uc. 477 + 过表达后 38B9 细胞株和空载体 38B9 细胞株的增殖变化。结果 uc. 477 + 在小鼠 B 淋巴瘤细胞中的表达显著高于小鼠正常 B 细胞。稳定过表达 uc. 477 + 38B9 细胞株和空载体 38B9 细胞株构建成功。uc. 477 + 过表达 38B9 细胞株比空载体 38B9 细胞株增殖能力强。结论 超保守 RNA uc. 477 + 在小鼠 B 淋巴瘤细胞中的表达显著高于小鼠正常 B 细胞中的表达。uc. 477 + 能促进小鼠 B 淋巴瘤细胞增殖。

**关键词:** 超保守 RNA; B 淋巴瘤细胞; 38B9 细胞; 细胞增殖; 非编码 RNA

中图分类号: R 733 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2020)02-033-05 DOI: 10.7619/jcmp.202002010

## Expression of uc. 477 + in mouse B lymphoma cells

GUO Junrong, ZHANG Xin, HUA Yiting, SUN Minmin,  
ZHU Mingming, HUA Jing, ZHANG Yanqing

(Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research,  
School of Medicine of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001)

**ABSTRACT: Objective** According to the differential expression of ultra-conserved RNA uc. 477 + in mouse normal B cells and mouse B lymphoma cells, we designed this study order to explore the effect of uc. 477 + on the proliferation of mouse B lymphoma cells. **Methods** Normal B cells were sorted from the spleens of C57BL/6 mice, and the expression of uc. 477 + was examined by RT-PCR in normal B cells and B lymphoma cells of mouse. The uc. 477 + gene fragment was inserted into the pMSCV-PIG retroviral expression vector. Overexpression plasmid 477-pMSCV-PIG and empty vector plasmid pMSCV-PIG were packaged into retroviruses via 293T to infect mouse lymphoma cells 38B9, and fluorescence microscopy and flow cytometry were used to examine infection rate. The proliferation change of the 38B9 cell line with uc. 477 + over-expression and the 38B9 cell line with empty vector was examined by cell counting and cell cycle. **Results** The expression of uc. 477 + in mouse B lymphoma cells was significantly higher than that in normal mouse B cells. Stable over-expression of uc. 477 + 38B9 cell line and empty vector 38B9 cell line were successfully constructed. Proliferation ability of the uc. 477 + over-expressing 38B9 cell line was more stronger than the empty vector 38B9 cell line. **Conclusion** The expression of uc. 477 + in B lymphoma cells was significantly higher than that in normal B cells of mouse. The uc. 477 + can promote the proliferation of B lymphoma cells.

**KEY WORDS:** ultra-conserved RNA; B lymphoma cell; 38B9 cell line; cell proliferation; non-coding RNA

在人类基因组中, 已经发现了 481 个超保守区域 (UCRs), 长度范围为 200 ~ 779 个碱基对。

收稿日期: 2019-11-15 录用日期: 2019-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81302041); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20130454); 扬州大学研究生学术科技创新基金(XKYCX19-160)

通信作者: 张艳青, E-mail: brightlyq@163.com

这些 UCRs 在人类、大鼠和小鼠基因组中高度保守<sup>[1-2]</sup>。鉴于 UCRs 的高度保守的特征,推测这些 UCRs 对哺乳动物细胞具有重要的生物学功能,如一些转录后的超保守区与染色质重构、基因转录及转录后处理有关<sup>[3-4]</sup>,且发现转录后的超保守 RNA 在肿瘤组织中差异表达<sup>[5]</sup>。目前,研究<sup>[6-7]</sup>报道超保守 RNA uc.477+ 在结直肠癌、前列腺癌中表达异常。此外,研究<sup>[8-9]</sup>发现长链非编码 RNA(lncRNA)与 MYC 基因家族在肿瘤中存在相互作用。

淋巴瘤是起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,根据瘤细胞分为非霍奇金淋巴瘤(NHL)与霍奇金淋巴瘤(HL),非霍奇金淋巴瘤占 90.0%,其中临床大多数 NHL 为 B 细胞型,占总数 70.0%~85.0%。近年来研究<sup>[9]</sup>表明,原癌基因 c-myc 过表达是 B 细胞淋巴瘤的重要分子特征。前期转录组芯片检测发现,当激活含有 Myc-雌激素(MycER)融合基因的小鼠 B 淋巴瘤细胞的 Myc 时,细胞内 uc.477+ 的表达发生变化,但 uc.477+ 对小鼠 B 淋巴瘤的影响尚不清楚。本研究探讨 uc.477+ 对 B 细胞淋巴瘤的作用,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂仪器

小鼠 B 淋巴瘤细胞 38B9 细胞株、人胚肾细胞 293T 由本实验室提供,小鼠正常 B 细胞分选自 C57BL/6 野生型小鼠脾脏。RPMI、DMEM 高糖培养基、10% 胎牛血清均购自 Hyclone 公司。分选 B 细胞 CD19 磁珠抗体购自美国 BD 公司,TRIzol 和 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 均购自 Invitrogen 公司,引物和 polybrene 来自上海生工生物工程技术服务有限公司。PI 购自碧云天公司,逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自 TakaRa 公司,荧光定量 8 连管和 PCR 仪购自罗氏公司。荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, BD FACSVerser 流式细胞仪器购自碧迪医疗器械有限公司。细胞培养箱购自美国 Thermo 公司。

### 1.2 引物设计

所用引物由 Pubmed 数据库的 Primer-BLAST 设计,由上海生工生物工程合成。实时荧光定量 PCR 引物序列(5' to 3')如下:①  $\beta$ -actin 上游引物: ACCACACCTTCTACAATGAG, 下游引物: ACCACCAGAGGCATACAG; ② uc.477+ 上游引物: GACTACAAGACCACCATCTG, 下游引物:

TCGGGATGTCCTAGCCATTT。

### 1.3 磁珠分选小鼠脾脏 B 细胞

取 1 只 C57BL/6 野生型小鼠,颈椎脱臼致死取出脾脏,研磨均匀后经 70 目尼龙网过滤,离心后加 1 mL 红细胞裂解液吹打,静置裂解红细胞,洗脱红细胞,加 3 mL PBS 重悬细胞,再加 20  $\mu$ L CD19 磁珠抗体,混匀后 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min。利用磁珠分选架收集 CD19 阳性细胞。取 200  $\mu$ L CD19 阳性细胞悬液加 1  $\mu$ L CD19 流式抗体室温避光孵育 20 min,补加 300  $\mu$ L PBS 后流式检测分选率。分选的小鼠 B 细胞备用。

### 1.4 荧光定量检测 uc.477+ 在 38B9 细胞和正常 B 细胞中的表达

TRIzol 提取细胞总 RNA,取 1  $\mu$ g 38B9 细胞和 1  $\mu$ g B 细胞的 RNA 分别逆转录成 cDNA,5 倍稀释待用。cDNA 2  $\mu$ L, SYBR II 10  $\mu$ L, primer F 和 primer R 各 0.5  $\mu$ L, RNase free H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L 加入 8 连管,每个样本加 3 个复孔,  $\beta$ -actin 做内参。条件:变性为 95  $^{\circ}$ C 下 100 s,退火延伸为 95  $^{\circ}$ C 下 15 s, 60  $^{\circ}$ C 下 30 s, 40 个循环;溶解曲线为 95  $^{\circ}$ C 下 15 s, 60  $^{\circ}$ C 下 30 s, 95  $^{\circ}$ C 下 15 s;冷却为 37  $^{\circ}$ C 下 30 s。

### 1.5 建立 uc.477+ 过表达 38B9 细胞株和空载体 38B9 细胞株

将 uc.477+ 基因片段构建到 pMSCV-PIG 逆转录病毒表达载体上,用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 将重组的 uc.477-pMSCV-PIG 和 pMSCV-PIG 质粒分别转染至 293T 细胞,收 36、48、60 h 病毒,病毒液用 0.45  $\mu$ m 过滤器过滤后置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。病毒液加 1% polybrene 感染 38B9 细胞,培养 48 h 后采用 0.6  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素筛选,获得稳定感染细胞株,荧光显微镜和流式细胞术检测感染率。

### 1.6 细胞计数和流式检测 uc.477+ 过表达后 38B9 细胞株和空载体 38B9 细胞株的增殖及细胞周期变化

细胞计数:将处于对数生长期的 uc.477+ 过表达 38B9 细胞和空载体 38B9 细胞分成两组,每组取  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 60 mm 培养皿中,每组取 3 个复孔,分别计数 24、48、72 h 每组 3 个复孔的细胞数,绘制生长曲线,比较增殖趋势。

细胞周期:2 组分别收集  $1 \times 10^6$  个细胞,每组取 3 个复孔,75% 酒精固定 48 h 后,加入 100  $\mu$ L RNase、100  $\mu$ L 质量浓度为 100  $\mu$ g/ $\mu$ L 的 PI,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 h 内流式细胞仪分

析细胞周期。

### 1.7 统计学处理

采用 Graph Pad Prism5 和 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量数据均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,2 组间比较采用两独立样本的 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 磁珠分选小鼠脾脏 B 细胞

细胞磁珠分选后,将分选的阳性细胞用 CD19 流式抗体孵育标记,流式细胞仪检测结果显示阳性细胞比例达 95.2%,说明 B 细胞分选成功。

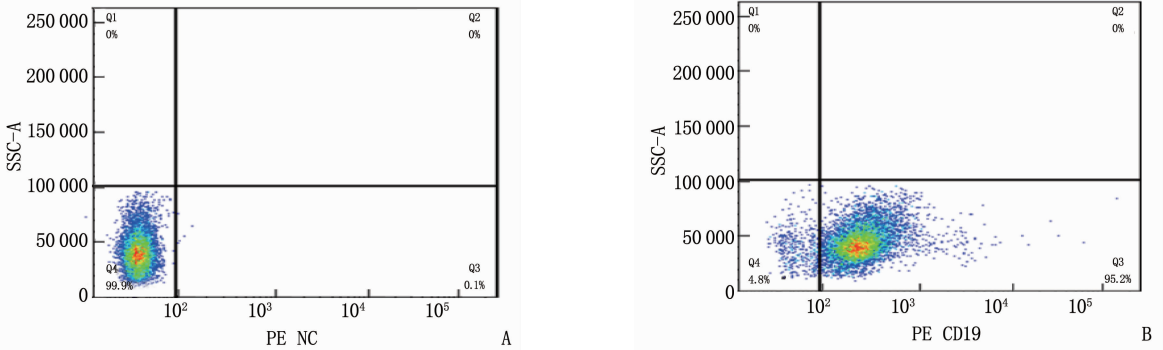
见图 1。

### 2.2 小鼠 B 淋巴瘤细胞中 uc.477 + 表达水平高于小鼠正常 B 细胞

RT-PCR 结果显示,小鼠 B 淋巴瘤细胞中 uc.477 + 表达水平,高于小鼠正常 B 细胞,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

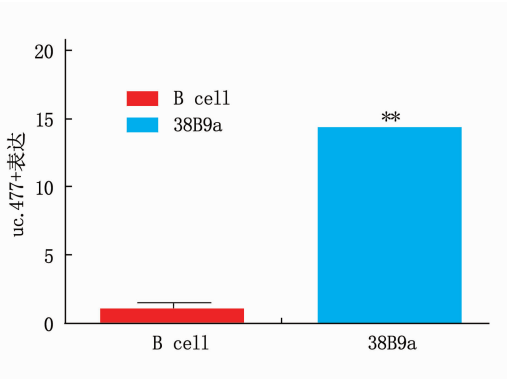
### 2.3 逆转录病毒感染 38B9 细胞感染效率鉴定

将重组的 477-pMSCV-PIG 和 pMSCV-PIG 质粒感染 38B9 细胞,荧光显微镜可见绿色蛋白荧光,见图 3;流式检测感染率分别达 91.2% 和 93.7%,见图 4;感染后的 RT-PCR 检测 uc.477 + 的表达量增加,说明成功构建稳转细胞株,见图 5。



A: B 细胞 CD19(-); B: B 细胞 CD19(+).

图 1 流式验证磁珠分选 B 细胞的分选率



与 B 细胞比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 uc.477 + 在小鼠淋巴瘤细胞中高表达

### 2.4 uc.477 + 对 38B9 细胞增殖及细胞周期的影响

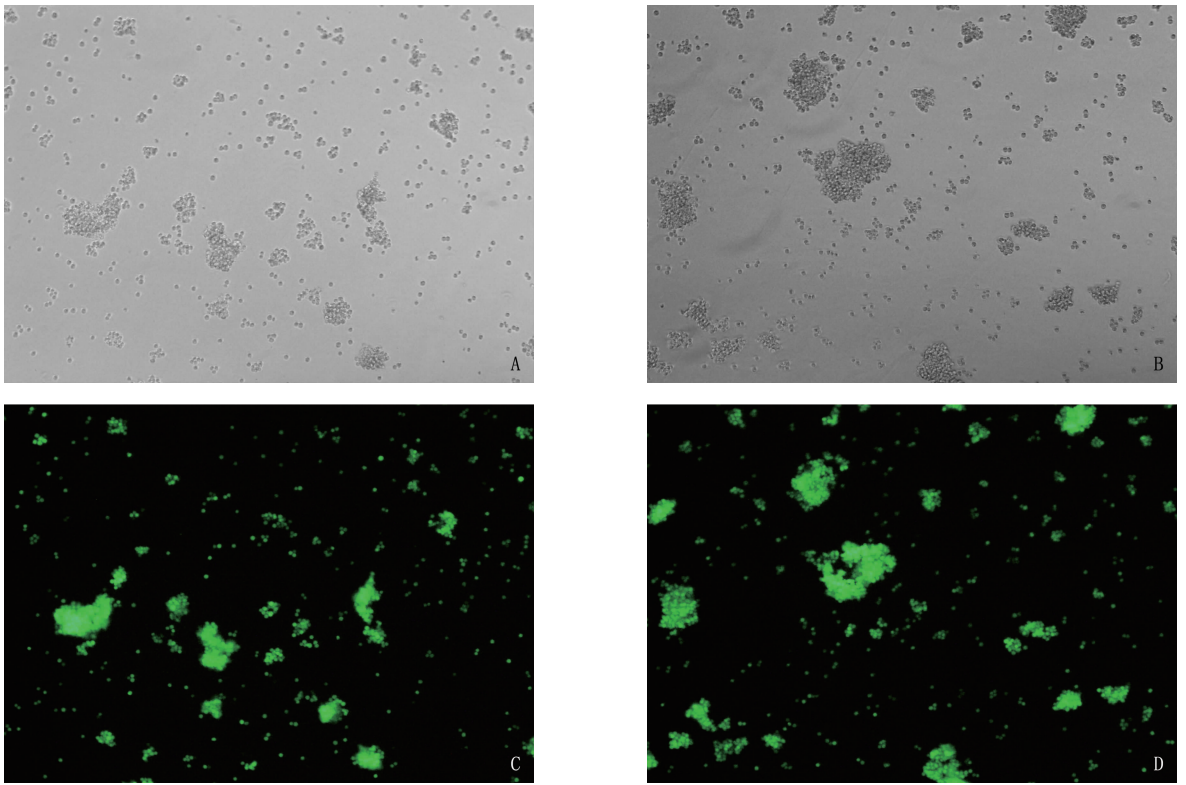
细胞计数实验发现过表达 uc.477 + 的 38b9 细胞增殖速度比感染空载体 38b9 增殖速度显著增快 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。细胞周期实验发现过表达 uc.477 + 组细胞位于 S 期和  $G_2$  期多于 MSCV 组,说明过表达 uc.477 + 能促进 38b9 增殖。见图 6。

## 3 讨论

研究<sup>[10-11]</sup>表明,非编码 RNA (包括 miRs、

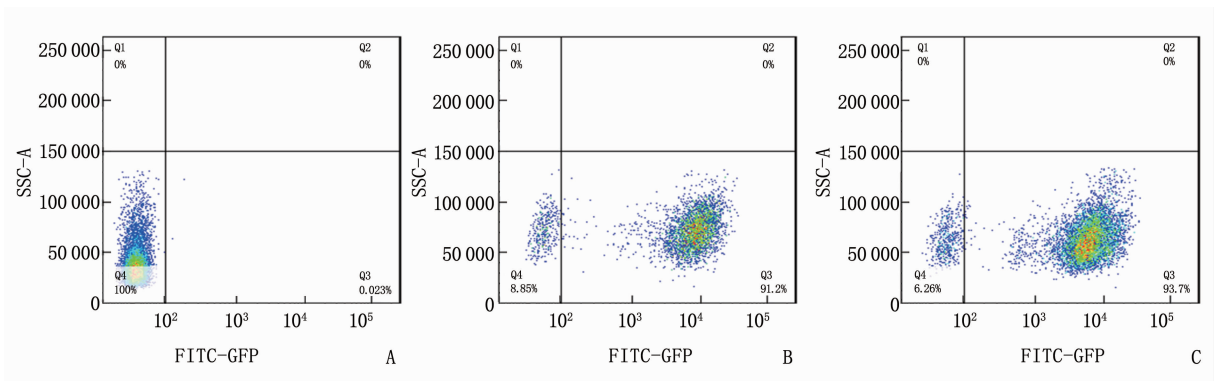
ucRNAs、lncRNAs、snoRNAs) 异常表达会引起基因组的扩增、缺失、突变和表观遗传沉默。因此,非编码 RNA 在肿瘤发生、发展中起到很关键的作用。超保守区域通常位于癌基因相关的脆弱位点,研究报道 T-UCRs 的表达水平在人类的胃癌<sup>[12]</sup>、膀胱癌<sup>[13]</sup>、肝癌<sup>[14]</sup>、肺癌<sup>[15]</sup>、淋巴细胞白血病<sup>[16]</sup>等多种疾病中均发生显著改变。本研究的超保守 RNA uc.477 + 在结直肠癌<sup>[7]</sup>、前列腺癌<sup>[6]</sup>中表达量显著增高。本研究首次检测 uc.477 + 在小鼠普通 B 细胞与 B 淋巴瘤细胞中的表达,发现在 B 淋巴瘤细胞中 uc.477 + 的表达显著增加,提示其可能在 B 淋巴瘤细胞的发生、发展中发挥一定的作用。

最新研究<sup>[17]</sup>发现,myc 在 B 细胞淋巴瘤的发生、发展过程中起到非常重要的作用,尤其是源于生发中心的 B 细胞淋巴瘤,MYC 的表达量与生发中心 B 细胞的分裂能力呈正比,当 myc 被激活过表达时,会导致 B 细胞突变成为 B 细胞淋巴瘤细胞。前期转录组芯片检测发现,当激活含有 MycER 融合基因的小鼠 B 淋巴瘤细胞的 Myc 时,细胞内 uc.477 + 的表达发生变化。通过 RT-PCR



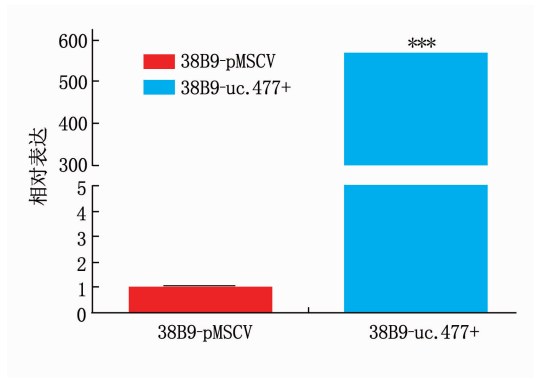
A: 38B9-pMSCV 白光图; B: 38B9-uc.477+ 白光图; C: 38B9-pMSCV 荧光图; D: 38B9-uc.477+ 荧光图。

图 3 倒置荧光显微镜观察病毒感染率(放大倍数 10 倍)



A: 38B9 荧光率; B: 38B9-pMSCV 荧光率; C: 38B9-uc.477+ 荧光率。

图 4 流式细胞仪检测病毒感染率



与 38B9-pMSCV 比较, \* \* \*  $P < 0.001$ 。

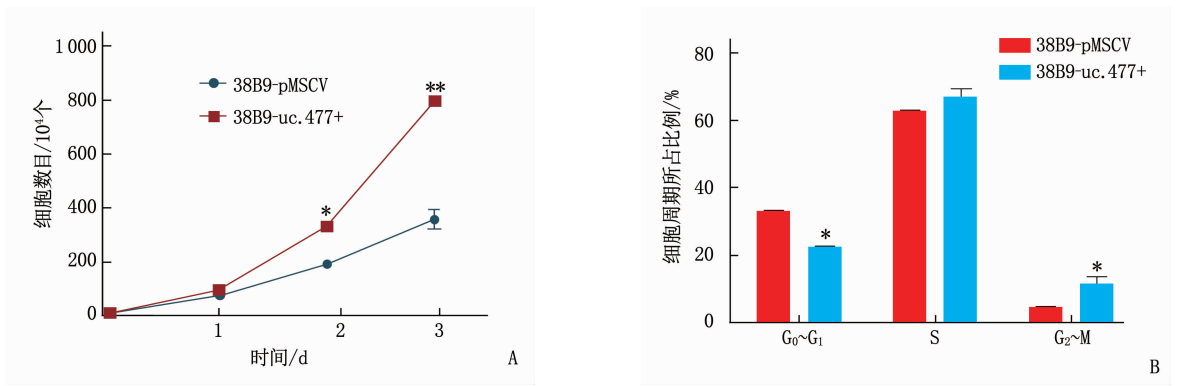
图 5 uc.477+ 与病毒感染 38B9 细胞后过表达

证实 uc.477+ 在小鼠 B 淋巴瘤中高表达,这种差

异表达提示其可能参与 B 细胞淋巴瘤的发展,作者通过构建稳定过表达 uc.477+ 的 B 细胞淋巴瘤细胞系,观察细胞生长及检测其细胞周期变化,证实了 uc.477+ 能促进 B 细胞淋巴瘤细胞的增殖。但是, uc.477+ 这种促 B 细胞淋巴瘤细胞增殖的作用是否参与 c-Myc 对细胞增殖的调控并不清楚。同时, uc.477+ 促细胞增殖的效应是通过何种功能蛋白发挥作用也需要进一步研究。

参考文献

[1] Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, et al. Ultraconserved elements in the human genome [J]. Science, 2004, 304 (5675): 1321 - 1325.



A: 过表达 uc.477 + 后促进 38B9 细胞生长,与 38B9-uc.477 + 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;

B: 过表达 uc.477 + 后细胞 S 期和 G<sub>2</sub> 期比例增加,与 38B9-MSCV 比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 6 uc.477 + 对 38B9 细胞增殖及细胞周期的影响

- [2] Baira E, Greshock J, Coukos G, et al. Ultraconserved elements: genomics, function and disease [J]. RNA Biol, 2008, 5(3): 132 - 134.
- [3] Calin G A, Liu C G, Ferracin M, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas [J]. Cancer Cell, 2007, 12(3): 215 - 229.
- [4] Pauli A, Rinn J L, Schier A F. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2): 136 - 149.
- [5] Sana J, Hankeova S, Svoboda M, et al. Expression levels of transcribed ultraconserved regions uc.73 and uc.388 are altered in colorectal cancer [J]. Oncology, 2012, 82(2): 114 - 118.
- [6] Qian X X, Peng J C, Xu A T, et al. Noncoding transcribed ultraconserved region (T-UCR) uc.261 participates in intestinal mucosa barrier damage in Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(12): 2840 - 2852.
- [7] Hudson R S, Yi M, Volfvsky N, et al. Transcription signatures encoded by ultraconserved genomic regions in human prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2013, 12: 13 - 19.
- [8] Tang J Y, Yan T T, Bao Y J, et al. LncRNA GLCC1 promotes colorectal carcinogenesis and glucose metabolism by stabilizing c-Myc [J]. Nat Commun, 2019, 10: 3499 - 3507.
- [9] Xiao Z D, Han L, Lee H, et al. Energy stress-induced lncRNA FILNC1 represses c-Myc-mediated energy metabolism and inhibits renal tumor development [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 783 - 789.
- [10] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861 - 874.
- [11] Prensner J R, Chinnaiyan A M. The emergence of lncRNAs in cancer biology [J]. Cancer Discov, 2011, 1(5): 391 - 407.
- [12] Pang L, Li Q, Zhang Y Q, et al. Transcribed ultraconserved noncoding RNA uc.160 Acts as a negative regulator in gastric cancer [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(9): 2822 - 2833.
- [13] Sekino Y, Sakamoto N, Ishikawa A, et al. Transcribed ultraconserved region Uc.63 + promotes resistance to cisplatin through regulation of androgen receptor signaling in bladder cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 41(5): 3111 - 3118.
- [14] Bo C W, Li N, Li X L, et al. Long noncoding RNA uc.338 promotes cell proliferation through association with BMI1 in hepatocellular carcinoma [J]. Hum Cell, 2016, 29(4): 141 - 147.
- [15] Zhou J, Wang C H, Gong W J, et al. Uc.454 inhibited growth by targeting heat shock protein family A member 12B in non-small-cell lung cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 12: 174 - 183.
- [16] Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, et al. MicroRNAs and non-coding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications [J]. Leukemia, 2008, 22(6): 1095 - 1105.
- [17] Finkin S, Hartweg H, Oliveira T Y, et al. Protein amounts of the MYC transcription factor determine germinal center B cell Division capacity [J]. Immunity, 2019, 51(2): 324 - 336.

(上接第 32 面)

- [8] Bartel D P. Metazoan MicroRNAs [J]. Cell, 2018, 173(1): 20 - 51.
- [9] Wang T, Wu F, Yu D N. MiR-144/451 in hematopoiesis and beyond [J]. ExRNA, 2019, 1: 16 - 27.
- [10] Xu P, Palmer L E, Lechauve C, et al. Regulation of gene expression by miR-144/451 during mouse erythropoiesis [J]. Blood, 2019, 133(23): 2518 - 2528.
- [11] Yu D N, dos Santos C O, Zhao G W, et al. MiR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta [J]. Genes Dev, 2010, 24(15): 1620 - 1633.
- [12] Fang X, Shen F Y, Lechauve C, et al. miR-144/451 represses the LKB1/AMPK/mTOR pathway to promote red cell precursor survival during recovery from acute Anemia [J]. Haematologica, 2018, 103(3): 406 - 416.