

NOTCH1对T-ALL抑癌基因ID4的负调控作用

刘娟¹, 燕莞瑶², 楼一层¹

NOTCH1 Down-regulates Tumor Suppressor Gene ID4 in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia

LIU Juan¹, YAN Wanyao², LOU Yiceng¹

1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: LOU Yiceng, E-mail: louyiceng@163.com



Abstract: Objective To explore the expression level of inhibitor of DNA binding 4(ID4) in T-cell acute lymphoblastic leukemia(T-ALL), and to determine the correlation and mechanism between NOTCH1 and ID4. **Methods** The expression levels of ID4 in T-ALL patients and normal donors, as well as the correlation of NOTCH1 and ID4, were analyzed from the databases of Oncomine and Pieters R. ID4 mRNA and protein levels were detected by qRT-PCR and Western blot after NOTCH1 inhibition or activation, which were adopted to verify the correlation. MicroRNA-342 (miR-342) was predicted to target ID4 with the approach of bioinformatics, and the dual luciferase reporter system was carried out to verify the prediction. ID4 mRNA and protein levels were detected by qRT-PCR after overexpressing or silencing miR-342. MiR-342 expression level was detected by qRT-PCR and Western blot after NOTCH1 inhibition or activation. **Results** ID4 expression level in T-ALL patients was significantly lower than that in normal donors($P<0.01$); ID4 was negatively regulated by NOTCH1($P<0.05$); The dual luciferase reporter system validated ID4 as a specific target gene of miR-342; Down-regulation of miR-342 resulted in sharp increase of ID4 mRNA and protein ($P<0.05$), and up-regulation of miR-342 resulted in sharp decrease of ID4 mRNA and protein ($P<0.05$); NOTCH1 inhibition could down-regulate the expression of miR-342, and NOTCH1 activation could up-regulate the expression of miR-342. **Conclusion** NOTCH1 activates the negatively regulatory role of miR-342 for ID4, then down-regulates tumor suppressor gene ID4 expression, and may contribute to the pathogenesis of T-ALL.

Key words: T-cell acute lymphoblastic leukemia(T-ALL); NOTCH1; MicroRNA-342; inhibitor of DNA binding 4(ID4)

摘要: 目的 研究DNA结合抑制因子4 (inhibitor of DNA binding 4, ID4) 在急性T淋巴细胞白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 中的表达水平, 探讨NOTCH1与ID4的相关性及其调控机制。 **方法** 通过Oncomine和Pieters R数据库分析T-ALL患者与正常捐献者中ID4的表达差异及T-ALL患者中NOTCH1与ID4的相关性, 用qRT-PCR和Western blot检测阻断NOTCH1或激活NOTCH1后ID4的表达变化进行验证。用生物信息学的方法特异预测出microRNA-342 (miR-342) 靶向ID4, 通过双荧光素酶报告体系进行验证。过表达或沉默miR-342后, qRT-PCR和Western blot检测ID4的表达变化。阻断NOTCH1或激活NOTCH1, qRT-PCR检测miR-342的表达变化。 **结果** ID4在T-ALL患者中的表达较正常组显著下调 ($P<0.01$); ID4受NOTCH1负调控 ($P<0.05$); 双荧光素酶报告系统验证预测结果正确; 过表达miR-342后, ID4的表达受到显著抑制 ($P<0.05$), 沉默miR-342后, ID4的表达明显上调 ($P<0.05$); NOTCH1信号的阻断能够抑制miR-342的表达, NOTCH1信号的激活能够上调miR-342的表达。 **结论** NOTCH1通过激活miR-342对ID4的负调控作用从而下调抑癌基因ID4的表达, 促进T-ALL的发生。

关键词: 急性T淋巴细胞白血病; NOTCH1; MicroRNA-342; DNA结合抑制因子4

中图分类号: R392.12; R733.71 **文献标识码:** A

0 引言

急性T淋巴细胞白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 是一类严重威胁人类健康的血液系统恶性疾患, 在儿童及成人发病率较高。目前主要采取联合化疗来治疗T-ALL^[1-2], 但患者死亡率仍很高而且容易复发。因此迫切需要新的治疗策略提高T-ALL的生存率。

收稿日期: 2015-09-08; 修回日期: 2015-12-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30870249, 81173509)

作者单位: 1. 430070 武汉, 武汉理工大学化学化工与生命科学学院; 2. 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院药学院

通信作者: 楼一层, E-mail: louyiceng@163.com

作者简介: 刘娟 (1989-), 女, 硕士在读, 主要从事急性T淋巴细胞白血病的致病机制研究

NOTCH信号通路与肿瘤的关系最早发现于急性T淋巴细胞白血病^[3]。T-ALL发生时NOTCH会被异常地和组成性地激活^[4-5]，NOTCH信号通路的激活释放出NOTCH的细胞内肽段/细胞内活化形式（intracellular notch, ICN）^[6-7]，ICN在造血干细胞中表达的增加引起T-ALL。有研究报道，大约有55% T-ALL患者带有NOTCH1获得性功能突变，说明NOTCH1的异常激活是T-ALL的重要发病机制。 γ 分泌酶抑制剂Compound E（GSI）能够有效抑制NOTCH1的激活，但GSI作用不专一，除了阻断NOTCH1信号通路的激活，同时还阻断了其他NOTCH信号通路，出现明显不良反应。因此，寻找靶向NOTCH1下游靶基因的药物是今后T-ALL治疗的重要方向。HES1作为已发现的直接受NOTCH1信号通路正调控的基因，对NOTCH1信号通路过度激活所致T-ALL的发生与维持具有至关重要的作用，HES1的表达水平反映NOTCH1的细胞内活化形式ICN1的活性^[8-9]，因而HES1作为NOTCH1信号通路效应分子。

微小RNA（microRNA, miRNA）是长度20~24 nt的非编码小RNA，通过与mRNA特异性结合实行转录后负性调节基因表达。新近研究发现miRNA确定在T淋巴细胞分化和发展的各阶段发挥着重要的生理功能，并且参与了各类癌症包括T-ALL的形成和恶性发展^[10-12]。

DNA结合抑制因子4（inhibitor of DNA binding 4, ID4）与肿瘤的发生和干细胞的分化关系密切，该基因的表达缺失与多种急性白血病的发生密切相关。在多种白血病细胞中沉默ID4基因会促进白血病的发生，因而ID4基因是一个明确的抗白血病基因^[13-14]，但是调控机制仍然不十分明确。本研究旨在探索ID4在T-ALL中的表达情况以及NOTCH1与ID4的相关性，并深入探究NOTCH1与ID4之间的调控机制，为遏制T-ALL发生发展提供新的可行方案。

1 材料和方法

1.1 试剂

胎牛血清购自美国Gibco公司；RPMI 1640培养液购自美国Hyclone公司；细胞转染试剂盒V购自瑞士Lonza公司； γ 分泌酶抑制剂Compound E（GSI）购自德国Merck公司；二甲基亚砜（DMSO）购自美国Sigma公司；氯仿、无水乙醇和异丙醇购自天津天力化学试剂有限公司；Trizol、miRNA分离试剂盒和miRNA反转录试剂盒均购自美国Life Technologies公司；反转录试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司；SYBR Green购自美国BIO-RAD公司；RIPA裂解液购自上海Beyotime公司；ID4一抗（兔源多克隆抗体）

购自英国Abcam公司；HRP标记的二抗购自美国Cell Signaling公司；PGL3质粒及Dual-luciferase检测试剂盒购自美国Promega公司；miR-342抑制体（miR-342 inhibitor）、miR-342抑制体阴性对照（无关序列，miR-342 inhibitor NC）、miR-342模拟物（miR-342 mimics）及miR-342模拟物阴性对照（无关序列，miR-342 mimics NC）均由上海吉玛生物公司设计合成。

1.2 细胞株与细胞培养

人源急性T淋巴细胞白血病细胞株Jurkat细胞、PCDH-ICN质粒包装慢病毒感染后经嘌呤霉素筛选得到过表达ICN的Jurkat细胞及与其配对的对照组PCDH质粒包装慢病毒感染后经嘌呤霉素筛选得到的Jurkat细胞均来源于Warren S Pear实验室。其培养液是含有10%小牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、1 mmol/L丙酮酸钠、非必需氨基酸和 β -巯基乙醇的RPMI 1640。5%CO₂、37℃培养。

1.3 生物信息学miRNA靶基因预测

使用目前公认的miRNA靶基因预测数据库TargetScan、picTar、RNA22、PITA和miRanda共同预测可以靶向ID4的miRNA。对将预测出来的miRNA序列与靶基因ID4 3'UTR进行碱基互补比对并计算结合稳定性。

1.4 双荧光素酶报告系统验证

为证明miR-342特异作用于ID4 3'UTR区域，构建含有ID4 mRNA的3'UTR（PGL3/ID4）及其3'UTR突变体（PGL3/mut）的双荧光报告基因系统。方法是针对ID4 3'UTR预测结合miR-342区域，设计PCR引物，将PCR产物连在骨架质粒PGL3中海肾（Renilla）的下游，导入感受态细胞后摇菌，进行克隆筛选后送苏州金唯智生物科技有限公司基因测序，结果经比对正确后再摇菌小提得到目的质粒PGL3 /ID4。在Jurkat细胞中共转染miR-342 inhibitor、miR-342 mimics和PGL3/ID4，只转PGL3 /ID4作为对照，24 h后使用Dual-luciferase检测试剂盒读取萤火虫（firefly）信号和海肾（Renilla）荧光信号，以Renilla/firefly相对荧光值作比较。对确认有效的ID4 3'UTR区域，利用重叠PCR原理设计引物制造结合区域点突变，余过程如上。经苏州金唯智生物科技有限公司测序明确的miR结合区域点突变后，提取得到PGL3/mut，共转染验证是否miR-342还能结合并调控Renilla表达。

1.5 核转染(nucleofection)实验

根据Lonza Cell Line Nucleofector Kit V 试剂盒说明书，用核转染仪4D-Nucleofector（Lonza）分别将miR-342 inhibitor、miR-342 inhibitor NC、miR-342 mimics及miR-342 mimics NC转入Jurkat

细胞,方法如下:细胞计数仪计数细胞,锥虫蓝拒染实验检测细胞存活率后将 1×10^6 细胞用1.5 ml RPMI 1640完全培养液接种于12孔培养板,37℃、5%CO₂培养箱中预热。细胞移至1.5 ml EP管中,室温下800 r/min离心5 min,弃上清液,细胞用100 μ l预热到室温的核转染液(Nucleofector Solution 82 μ l+Supplement 18 μ l)混悬,并加入30 nmol/L miR-342 inhibitor/miR-342 inhibitor NC/miR-342 mimics/miR-342 mimics NC,转移到Lonza核转染杯的底部,避免产生气泡,盖上杯盖。将核转染仪的程序设置为CL-120,并将核转染杯放入杯孔中,按“X”键开始程序。结束后立即拿出转染杯,并用Lonza标准吸管吸出移至含有1.5 ml完全培养液的12孔板中。48 h后收集转染后的细胞,进行后续实验。

1.6 总RNA的提取及qRT-PCR检测

利用Trizol提取细胞总RNA,取1 μ g总RNA做反转录反应。PCR扩增程序如下:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共进行40个循环。PCR引物分别为:18 s上游引物:5'-GCGCCGCTAGAGGTGAAAT-3',下游引物:5'-GGCGGGTCATGGGAATAAC-3';HES1上游引物:5'-TCAACACGACACCGGATAAA-3',下游引物:5'-TCAGCTGGCTCAAGACTTTCA-3';ID4上游引物:5'-TGAACAAGCAGGGCGACAG-3',下游引物:5'-CCCTCTCTAGTGCTCCTGGCT-3'。

1.7 miRNA的提取及qRT-PCR检测

利用miRNA分离试剂盒提取细胞miRNA,取1 μ g miRNA利用miRNA反转录试剂盒做反转录反应。PCR扩增程序如下:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共进行40个循环。miR-342的特异性反转录引物及PCR引物均由上海吉玛生物公司设计合成。

1.8 Western blot检测ID4蛋白表达水平

收集DMSO处理组、GSI处理组及不同转染组的Jurkat细胞,加入蛋白裂解液,BCA法测定蛋白浓度。取50 μ g样品蛋白质加入等体积上样缓冲液,经SDS-PAGE后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。室温封闭1 h,加入1:1 000稀释的ID4一抗,4℃孵育过夜, β -actin作为内参照,TBST振摇漂洗5 min $\times$ 3次,然后加入HRP标记的二抗,室温孵育1 h,取出,TBST振摇漂洗5 min $\times$ 3次,化学发光法检测后分析结果,结果用Image J软件分析条带灰度值。

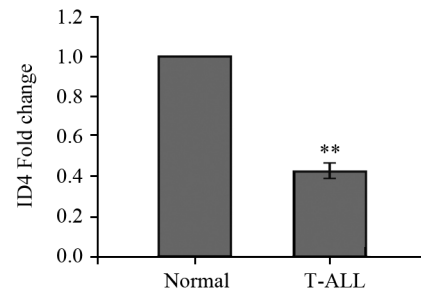
1.9 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件处理数据,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数间的比较采用*t*检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ID4在T-ALL患者中低表达

根据Oncomine数据库,ID4在T-ALL患者(174例)中的表达量为正常捐献者(74例)的(0.425 ± 0.021)倍($P < 0.01$),结果表明T-ALL患者中ID4的表达水平明显低于正常组,见图1。



**: $P < 0.01$, compared with normal donors; T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; ID4: inhibitor of DNA binding 4

图1 Oncomine数据库中ID4在T-ALL患者与正常组中表达水平的分析结果比较

Figure1 Comparison of ID4 expression levels in 174 T-ALL patients and 74 normal donors from Oncomine database

2.2 生物信息学预测在T-ALL中ID4可能受NOTCH1负调控

推测T-ALL中ID4的低表达可能与NOTCH1的过度激活有关。通过分析源于Pieters R数据库的92例T-ALL患者样本中HES1与ID4表达水平的相关性(<http://r2.amc.nl>, last accessed August 20, 2015),可知HES1与ID4呈负相关($r = -0.242$, $P = 0.02$),见图2,由此间接表明ID4可能受NOTCH1负调控。

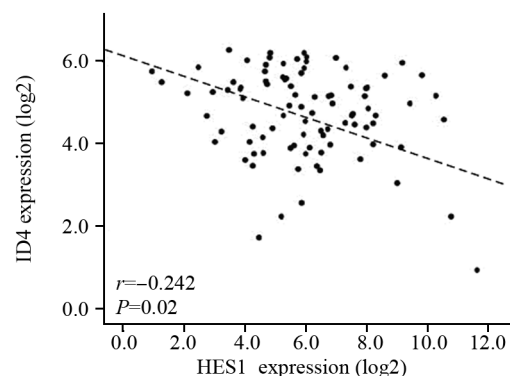


图2 源于Pieters R数据库的92例T-ALL患者中HES1与ID4表达水平的相关性

Figure2 Correlation between HES1 and ID4 expression levels of 92 T-ALL patients from Pieters R database

2.3 在T-ALL中验证NOTCH1负调控ID4

将Jurkat细胞分别用1 μ mol/L可阻断NOTCH1信号通路激活的 γ 分泌酶抑制剂Compound E (GSI)和空白对照DMSO处理48 h,qRT-PCR结果显示,与DMSO空白对照组相比,GSI组的ID4 mRNA表达水平上调至223%($t = 30.1$, $P = 0.001$),见图3A;Western blot法检测和灰度结果分析显示GSI组的ID4

表达上调至233% ($t=28.8$, $P=0.001$), 见图3B。

qRT-PCR和Western blot法检测已转染PCDH-ICN能激活NOTCH1信号通路及其对照PCDH组的Jurkat细胞中ID4的表达, 结果显示, 与PCDH对照组相比, PCDH-ICN组的ID4 mRNA表达水平下调至43% ($t=19.3$, $P=0.000$), 见图3C; ID4蛋白表达水平下调至48% ($t=9.2$, $P=0.000$), 见图3D。

2.4 miR-342直接靶向ID4

通过目前公认的miRNA靶基因预测数据库TargetScan、picTar、RNA22、PITA和miRanda共同预测到只有miR-342可以结合于ID4 mRNA 3'UTR区的第559~566号碱基, 见图4A。

构建含有ID4 mRNA 3'UTR的双荧光素酶报告载体, 称为PGL3/ID4, 见图4B, 结果表明当PGL3/ID4组与miR-342 mimics共转染后, 较对照组海肾相对荧光 (Renilla/firefly) 减少到58% ($t=11.4$, $P=0.000$); 与miR-342 inhibitor共转染后, 海肾相对荧光升高到125% ($t=15.7$, $P=0.001$); 而PGL3/mut分别与miR-342 mimics或miR-342 inhibitor共转染后海肾相对荧光基本无改变 ($P>0.05$), 见图4C, 提示miR-342可以与ID4

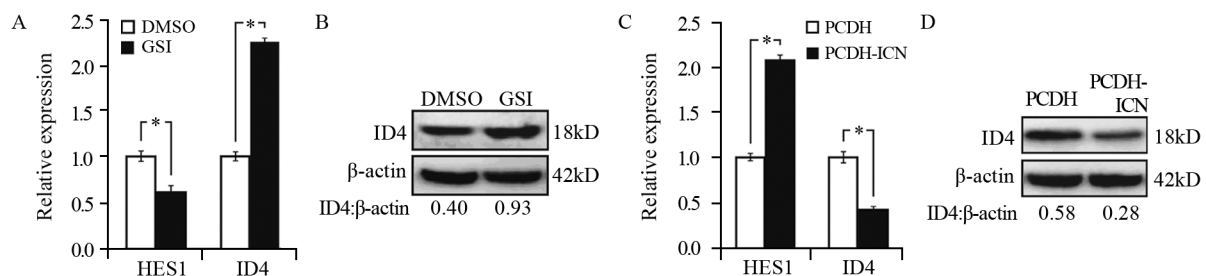
的3'UTR区相结合。

2.5 miR-342调控ID4 mRNA和蛋白的表达

将miR-342 inhibitor NC、miR-342 inhibitor、miR-342 mimics NC及miR-342 mimics转染Jurkat细胞48 h, 检测细胞中ID4的mRNA及蛋白表达水平。qRT-PCR结果显示, 与miR-342 inhibitor NC对照组相比, miR-342 inhibitor组ID4 mRNA表达水平上调至225% ($t=21.5$, $P=0.000$), 见图5A; 与miR-342 mimics NC对照组相比, miR-342 mimics组的ID4 mRNA表达水平下调至37% ($t=19.4$, $P=0.001$), 见图5B。Western blot法检测和灰度结果分析显示miR-342 inhibitor组的ID4表达相比miR-342 inhibitor NC对照组上调至233% ($t=10.7$, $P=0.001$), 见图5C; miR-342 mimics组的ID4表达相比miR-342 mimics NC对照组下调至30% ($t=18.4$, $P=0.000$), 见图5D。

2.6 NOTCH1通过miR-342调控ID4的表达

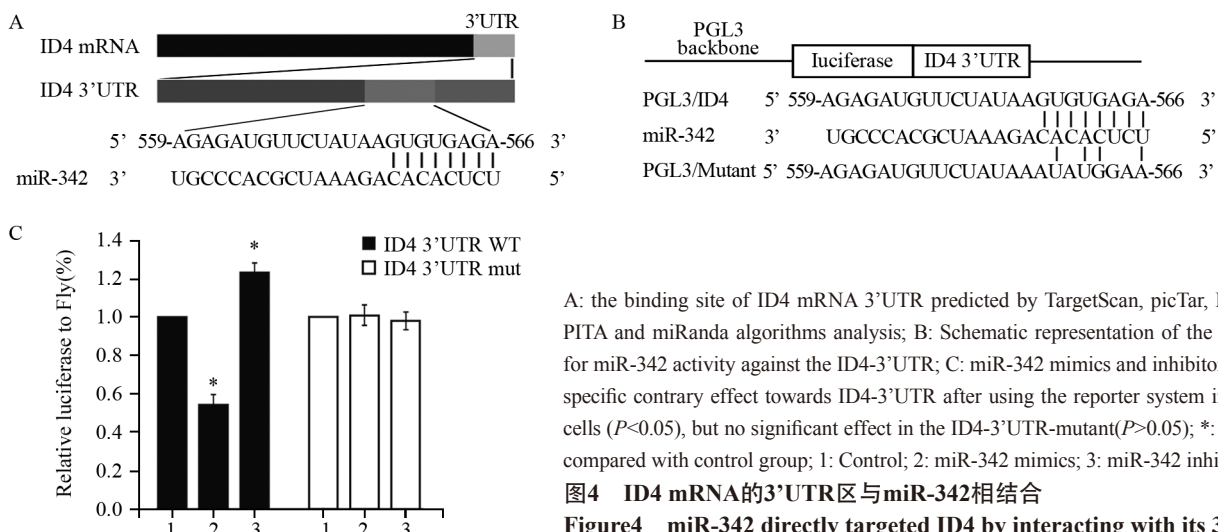
对Jurkat细胞分别用1 $\mu\text{mol/L}$ GSI和DMSO处理24 h, 再将miR-342 mimics分别转染上述GSI和DMSO处理组细胞48 h, 检测DMSO空白对照组、GSI处理组和GSI+miR-342 mimics转染组的细胞中



A: qRT-PCR results of HES1 and ID4 mRNA expression in Jurkat cells with GSI-mediated NOTCH1 inhibition; B: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells with GSI-mediated NOTCH1 inhibition; C: qRT-PCR results of HES1 and ID4 mRNA expression in Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation; D: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation; *: $P<0.05$

图3 阻断或激活NOTCH1信号通路后, Jurkat细胞中ID4的mRNA和蛋白水平表达

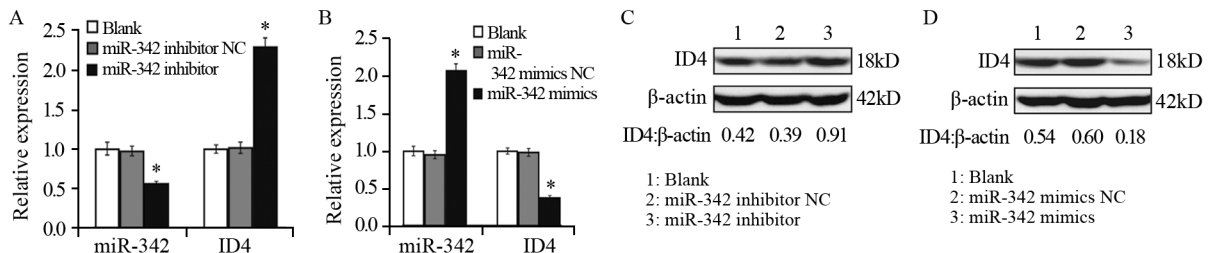
Figure3 ID4 mRNA and protein expression in Jurkat cells with GSI-mediated NOTCH1 inhibition or PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation



A: the binding site of ID4 mRNA 3'UTR predicted by TargetScan, picTar, RNA22, PITA and miRanda algorithms analysis; B: Schematic representation of the reporter for miR-342 activity against the ID4-3'UTR; C: miR-342 mimics and inhibitor caused specific contrary effect towards ID4-3'UTR after using the reporter system in Jurkat cells ($P<0.05$), but no significant effect in the ID4-3'UTR-mutant ($P>0.05$); *: $P<0.05$, compared with control group; 1: Control; 2: miR-342 mimics; 3: miR-342 inhibitor

图4 ID4 mRNA的3'UTR区与miR-342相结合

Figure4 miR-342 directly targeted ID4 by interacting with its 3'UTR



A: qRT-PCR results of miR-342 and ID4 expression in Jurkat cells transfected with miR-342 inhibitor NC or miR-342 inhibitor, *: $P < 0.05$, compared with miR-342 inhibitor NC or blank group; B: qRT-PCR results of miR-342 and ID4 expression in Jurkat cells transfected with miR-342 mimics NC or miR-342 mimics, *: $P < 0.05$, compared with miR-342 mimics NC or blank group; C: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells transfected with miR-342 inhibitor NC or miR-342 inhibitor; D: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells transfected with miR-342 mimics NC or miR-342 mimics

图5 下调miR-342或上调miR-342、Jurkat细胞中ID4的mRNA和蛋白水平表达

Figure5 ID4 mRNA and protein expression in Jurkat cells after down- or up-regulation of miR-342

miR-342的表达和ID4的mRNA及蛋白表达水平。qRT-PCR结果显示,与DMSO空白对照组相比,GSI处理组的miR-342的表达下调至59% ($t=19.8$, $P=0.000$), ID4 mRNA表达水平上调至189% ($t=27.4$, $P=0.001$); GSI+miR-342 mimics转染组的miR-342的表达仅下调至91% ($t=17.2$, $P=0.001$), ID4 mRNA表达水平仅上调至130% ($t=25.4$, $P=0.000$),见图6A; Western blot法检测和灰度结果分析显示GSI处理组相比DMSO空白对照组ID4表达上调至258% ($t=8.9$, $P=0.000$),而GSI+miR-342 mimics转染组相比DMSO空白对照组ID4表达仅上调至165% ($t=12.7$, $P=0.001$),见图6B。

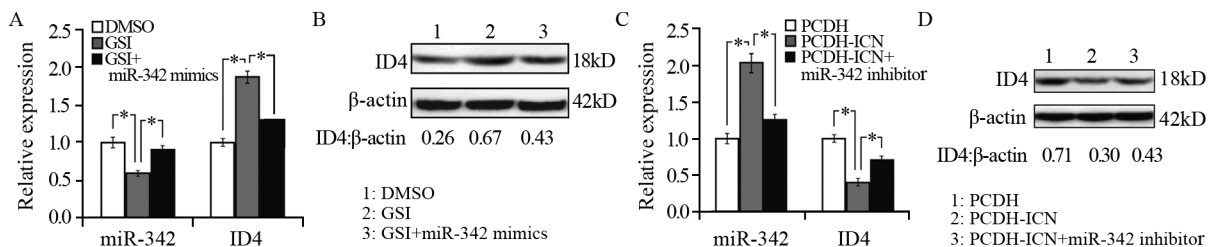
将miR-342 inhibitor分别转染上述已转染PCDH和PCDH-ICN的Jurkat细胞48 h,检测PCDH对照组、PCDH-ICN组和PCDH-ICN+miR-342 inhibitor转染组的细胞中miR-342的表达和ID4的mRNA及蛋白表达水平。qRT-PCR结果显示,与PCDH对照组相比,PCDH-ICN组的miR-342的表达上调至204% ($t=29.4$, $P=0.001$), ID4 mRNA表达水平下调至40% ($t=31.7$, $P=0.000$); PCDH-

ICN+miR-342 inhibitor转染组的miR-342的表达仅上调至126% ($t=16.9$, $P=0.000$), ID4 mRNA表达水平仅下调至71% ($t=24.3$, $P=0.000$),见图6C; Western blot法检测和灰度结果分析显示PCDH-ICN组相比PCDH对照组ID4表达下调至42% ($t=10.6$, $P=0.001$),而PCDH-ICN+miR-342 inhibitor转染组相比PCDH对照组ID4表达仅下调至61% ($t=13.7$, $P=0.000$),见图6D。

3 讨论

大部分T-ALL患者都会发生NOTCH信号通路的激活突变,这表明异常激活的NOTCH信号通路在该病的发生中发挥了重要作用。NOTCH信号通路通过调节靶基因的表达来调节致癌或抑癌基因信号,而且有研究表明microRNAs (miRNAs)也参与了NOTCH调节靶基因表达的过程^[15-16]。因此针对介导NOTCH调控靶基因的miRNA的深入探索,对于揭示T-ALL发生的分子机制和研究抗T-ALL药物靶点有重要意义。

本研究发现了ID4在T-ALL患者中低表达,并



A: qRT-PCR results of miR-342 and ID4 expression in Jurkat cells with GSI-mediated NOTCH1 inhibition or miR-342 mimics-transfected Jurkat cells treated with GSI for 24h; B: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells with GSI-mediated NOTCH1 inhibition or miR-342 mimics-transfected Jurkat cells treated with GSI for 24h; C: qRT-PCR results of miR-342 and ID4 expression in Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation or miR-342 inhibitor-transfected Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation; D: Western blot results of ID4 protein expression in Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation or miR-342 inhibitor-transfected Jurkat cells with PCDH-ICN-mediated NOTCH1 activation; *: $P < 0.05$

图6 miR-342介导NOTCH1对ID4 mRNA和蛋白水平表达的负调控作用

Figure6 miR-342 mediated negative regulation effect of NOTCH1 on ID4 mRNA and protein expression

且NOTCH1负调控ID4。通过生物信息学方法发现miR-342直接靶向ID4,接着通过构建双荧光素酶报告系统验证了miR-342特异结合ID4 3'-UTR区域调控基因表达,上调miR-342后mRNA和蛋白水平检测ID4显著下调,下调miR-342后mRNA和蛋白水平检测ID4显著上调。结合李三中^[17]报道的基因芯片结果,即以构建特异性NOTCH阻断小鼠为基础,通过高通量筛选出miR-342是NOTCH信号下游的microRNA之一,我们推测在T-ALL中,NOTCH1信号通路可能参与了miR-342的调控。

本实验证实了上面的推测,在T-ALL中阻断NOTCH1信号通路后,与对照组相比,miR-342表达下调,ID4 mRNA和蛋白水平均上调;激活NOTCH1信号通路后,与对照组相比,miR-342表达上调,ID4 mRNA和蛋白水平均下调,这说明NOTCH1信号通路在T-ALL中可激活miR-342的表达。综上所述,本研究证明了NOTCH1通过激活miR-342对ID4的负调控作用从而下调抑癌基因ID4的表达,促进T-ALL的发生。并可以进一步推测,miR-342的表达高低对T-ALL的发生具有重要影响,miR-342可能作为新的生物学标志用于肿瘤诊断,其促进T-ALL发生的特性,为抗T-ALL新药的研发提供理论基础。

miR-342在多种肿瘤中被证实为肿瘤相关miRNA,可以影响不同的肿瘤细胞的生长、转移或耐药等。Xie等^[18]报道了miR-342通过调控RAP2B参与非小细胞肺癌细胞系的生长和侵袭;在宫颈癌中,也有报道miR-342通过靶向FOXO1抑制宫颈癌细胞的生长、转移和侵袭^[19];He等^[20]发现了miR-342能通过调控雌激素受体参与到乳腺癌的化疗耐药过程。由于miRNA和其靶基因作用关系网络复杂,一个miRNA可以调控多个靶基因,一个靶基因可以被多个miRNA调控,形成复杂的反馈调节关系,因此推测miR-342不仅可以介导NOTCH1调控ID4从而下调抑癌基因ID4的表达的过程,还有可能通过其他的作用靶点来影响T-ALL细胞的生长、耐药等恶性生物学行为。如何更全面地阐明与T-ALL相关的miRNA在T-ALL发生发展中的作用和介导NOTCH1调控靶基因复杂的调控网络,仍需进一步探索。

参考文献:

- [1] Tosello V, Ferrando AA. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy[J]. *Ther Adv Hematol*, 2013, 4(3): 199-210.
- [2] Roti G, Stegmaier K. New Approaches to Target T-ALL[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 170.
- [3] Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 262-73.
- [4] Paganin M, Ferrando AA. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood Rev*, 2011, 25(2): 83-90.
- [5] Tatarek J, Cullion K, Ashworth T, *et al.* Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL[J]. *Blood*, 2011, 118(6): 1579-90.
- [6] Arnett KL, Hass M, McArthur DG, *et al.* Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(11): 1312-7.
- [7] Zage PE, Nolo R, Fang W, *et al.* Notch pathway activation induces neuroblastoma tumor cell growth arrest[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 58(5): 682-9.
- [8] Wendorff AA, Koch U, Wunderlich FT, *et al.* Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation[J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 671-84.
- [9] Kannan S, Fang W, Song G, *et al.* Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type-specific mechanism for tumor suppression[J]. *Blood*, 2011, 117(10): 2891-900.
- [10] Jernås M, Nookaew I, Wadenvik H, *et al.* MicroRNA regulate immunological pathways in T-cells in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *Blood*, 2013, 121(11): 2095-8.
- [11] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3): 143-59.
- [12] Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, *et al.* A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL)[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 673-8.
- [13] Chen SS, Claus R, Lucas DM, *et al.* Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL[J]. *Blood*, 2011, 117(3): 862-71.
- [14] Hu HB, Hu Q. ID4 methylation patterns in childhood T line and B line lymphocytic leukemia[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2010, 12: 940-2. [胡洪波, 胡群. T系和B系急性淋巴细胞白血病ID4甲基化状态分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12: 940-2.]
- [15] Prokopi M, Kousparou CA, Epenetos AA. The Secret Role of microRNAs in Cancer Stem Cell Development and Potential Therapy: A Notch-Pathway Approach[J]. *Front Oncol*, 2014, 4:389.
- [16] Da Ros VG, Gutierrez-Perez I, Ferres-Marco D, *et al.* Dampening the signals transduced through hedgehog via microRNA miR-7 facilitates notch-induced tumorigenesis[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(5): e1001554.
- [17] Li SZ. The role of Notch signaling pathway in the mechanism of glioma pathogenesis[D]. *Di Si Jun Yi Da Xue*, 2013. [李三中. Notch信号途径在胶质瘤发病机制中的作用研究[D]. 第四军医大学, 2013.]
- [18] Xie X, Liu H, Wang M, *et al.* miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(7): 5031-8.
- [19] Li XR, Chu HJ, Lv T, *et al.* miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXO1 in human cervical cancer[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 3298-307.
- [20] He YJ, Wu JZ, Ji MH, *et al.* miR-342 is associated with estrogen receptor-alpha expression and response to tamoxifen in breast cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(3): 813-8.

[编辑: 黄园玲; 校对: 尤婷婷]