

mir-15a 和 mir-16-1 诱导人淋巴瘤 Raji 细胞株的凋亡

谌 琴, 何冬梅, 张 洹, 郭 敏

(暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨 mir-15a 和 mir-16-1 诱导人淋巴瘤 Raji 细胞株的凋亡。方法: 利用 Oligofectamine 2000 脂质体法将化学合成的 mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸, 随机序列, 分别转染 Raji 细胞。采用间接免疫荧光及流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白表达情况, 半定量 RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达水平, 台盼蓝拒染法和 CCK8 法检测 mir-15a 和 mir-16-1 对 Raji 细胞的生长抑制作用, Hoechst 染色观察细胞凋亡形态, 流式细胞仪—AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡率。结果: 间接免疫荧光法显示 Raji 细胞经转染 mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸 48 h 后, Bcl-2 蛋白的表达量降低, 与空白对照组和随机序列组有显著性差异 ($P < 0.05$); RT-PCR 法显示各组间 Bcl-2 mRNA 的表达无显著性差异; 台盼蓝拒染法和 CCK8 法显示, 转染后各时间点 mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸组 Raji 细胞的生长受到抑制, Hoechst 染色可见明显凋亡细胞, 流式细胞仪—AnnexinV/PI 双染色法检测显示, mir-15a 组早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 9.74% 和 9.65%, mir-16-1 组早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 9.70% 和 9.34%, 明显高于空白对照组和随机对照组。结论: mir-15a 和 mir-16-1 可诱导淋巴瘤细胞凋亡。

[关键词] 微 RNA; 淋巴瘤; 微 RNA-15; 微 RNA-16; 细胞凋亡

[中图分类号] R733.4; R394.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0567-06

The effect of mir-15a and mir-16-1 on the apoptosis of Raji lymphomatic cells

CHEN Qin, HE Dong-mei, ZHANG Yuan, GUO Min

(Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To explore the apoptosis effects of mir-15a and mir-16-1 in inducing Raji cell line. **Methods:** mir-15a and mir-16-1 oligonucleotides、control group were all transfected into Raji cells with lipofectamine 2000. Bcl-2 protein expression of every group cells was detected by indirect immunofluorescence; Semi-quantitative RT-PCR detected the expression level of Bcl-2 mRNA; The growth inhibitory effect of Raji cells was measured by trypan blue dye exclusion method and CCK8 assay. The apoptotic cells were observed by Hoechst Method; Flow Cytometry (FCM)—AnnexinV/PI double dyeing method was used to detect the cell apoptotic rate. **Results:** After Raji cells were transfected for 48 h, Bcl-2 protein expression levels of mir-15a group and mir-16-1 group cells obviously decreased, The above two groups had obviously difference as compared with the control group and blank group ($P < 0.05$). The ex-

[收稿日期] 2008-07-15

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(04010446)

[作者简介] 谌 琴(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 反义技术与白血病的研究

通讯作者: 何冬梅, Tel: 020-85220262; E-mail: thedm@jnu.edu.cn

pression of Bcl-2 mRNA among the four groups had no obviously difference,. Trypan blue dye exclusion method and CCK8 assay showed that transfection of mir-15a and mir-16-1 decreased the cell growth at 24, 48 and 72 h post-transfection, apoptotic cells can be seen with Hoechst Method at 48 h after being transfected. FCM assays indicated that the cell apoptotic rates in earlier period and advanced stage of mir-15a group were 9.74% and 9.65%, and mir-16-1 group were 9.70% and 9.34%, which were obviously higher than blank group and control group. **Conclusion:** mir-15a and mir-16-1 can induce apoptosis of lymphomatic cells.

[Key words] microRNA; lymphoma; mir-15; mir-16; cell apoptosis

MicroRNA (miRNA) 是 22 个左右核苷酸组成的内源性 RNA, 通过切割 mRNA 或翻译抑制两种机制, 在转录后水平对基因表达进行负性调控。miRNA 是一种广泛存在的调控基因表达的小分子 RNA, 在细胞的生长、发育、分化、增殖和凋亡中起重要作用。最近研究表明, miRNA 参与肿瘤的发生与发展, 其中 Mir-155、mir-15、mir-16、mir-17-92、mir-20a、mir-21、mir-29、mir-107、mir-142、mir-181、mir-223 等与人类造血系肿瘤密切相关^[1]。Cimmino 等^[2]发现并证实在 CLL 病人中 mir-15 和 mir-16 的表达与 Bcl-2 呈负相关。Bcl-2 蛋白主要通过作用于线粒体来实现其抑制凋亡的生物学活性, 因此当 mir-15 和 mir-16 丢失或突变时, Bcl-2 蛋白的表达量上调, 细胞凋亡受阻, 因而导致肿瘤发生。本研究利用 Oligofectamine 脂质体法将化学合成的 mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸转染入高表达 Bcl-2 的人淋巴瘤 Raji 细胞, 观察其诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡的作用。

1 材料

人 Burkkit 淋巴瘤细胞株由本实验室保存。根据 MIRBase (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna>) 提供的 miRNA 基因序列, 获取人 mir-15a: 5'-uagcagcacauaaugguugug-3' 和 mir-16-1: 5'-uagcagcacguaaaauuggcg-3' 的序列, 采用 BLAST 软件进行分析, 确定随机对照序列, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。CCK8 和 Hoechst 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究, Annexin V/PI 双染试剂盒购自美国 BD 公司, 鼠抗人 Bcl-2 抗体和 CY3 标记山羊抗鼠 Bcl-2 抗体购自博士德公司, 多聚甲醛购自广州化学试剂厂, Trizol 购自奥地利 PAA 公司, DEPC 粉购自赛百盛公司, 琼脂糖粉购

自美国 Promega 公司, RT-PCR 试剂盒购自上海申能博彩公司, RPMI-1640 培养基为 GBCO 产品, 精制小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 脂质体 2000 转染试剂盒 Oligofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养

将 Raji 细胞接种于含体积分数为 10% 的新生牛血清, 无青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 在含体积分数为 5% CO₂ 的培养箱 37 ℃ 连续培养, 每 2、3 天换液传代培养, 使细胞维持对数生长。

2.2 转染

采用 Oligofectamine 2000 脂质体法进行转染实验, 实验分 4 组: mir-15a 组、mir-16-1 组、随机序列组和空白对照组, 每组复 5 孔。先用 PBS 缓冲液将细胞冲洗, 再用无血清培养液重悬细胞沉淀, 接种于 96 孔(或 24 孔板)中, 每孔细胞密度为 $10 \times 10^4/L$ ($15 \times 10^4/L$), 每孔接种细胞液 100 μL (400 μL), 再将配好的 mir-15a—脂质体复合物, mir-16-1—脂质体复合物, 随机序列—脂质体复合物, 或无血清培养液 50 μL (100 μL) 分别加入对应组, 终体积为 150 μL (500 μL)。以 96 孔板为例, 分别按下面浓度进行各组转染, 转染组每孔 mir-15a 的终浓度为 0.6 $\mu mol/L$ (0.9 μL mir-15a 溶于 24.1 μL 无血清培养液 + 1.5 μL 脂质体溶于 23.5 μL 无血清培养液), mir-16-1 组将 0.9 μL mir-15a 换成 mir-16-1, 随机序列组将 0.9 μL mir-15a 换成 0.9 μL 随机序列, 空白对照组直接加 50 μL 无血清培养液。24 孔板按比例进行调整。培养 4 h 后, 向每孔加入含体积分数为 20% 小牛血清的培养液, 分别于 24、48、72 h 收集

细胞以备用。

2.3 间接免疫荧光及流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白表达情况

将 Raji 细胞以 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5/\text{mL}$ 起始浓度接种于 6 孔板,按 Lipofectamine™ 2000 说明书方法分别转染空白对照组、随机序列组、mir-15a 组和 mir-16-1 组,继续培养 48 h;离心收集各组细胞,用体积分数为 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗后加体积分数为 3% H_2O_2 , 室温 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,加 10 g/L TritonX-100, 室温 10 min, PBS 洗后加血清室温封闭 40 min,甩去不洗,滴加鼠抗人 Bcl-2 抗体,4 ℃ 过夜,次日复温 30 min, PBS 洗,加入 20 μL Cy3 标记的羊抗鼠二抗孵育细胞,室温避光反应 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min, PBS 混匀后上机,流式细胞仪 (FCM) 测定 Bcl-2 蛋白表达的阳性率。

2.4 半定量 RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达水平

(1) RNA 抽提 Trizol 三步法提取各组 RNA,紫外分光光度仪测总 RNA 浓度及纯度。

(2) 逆转录 cDNA 合成:3 μg 总 RNA, 2 μL Random Primer (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL dNTP (2.5 $\mu\text{mol/L}$), 4 μL 5 × First-Strand Buffer, 1 μL 0.1 mol/L DTT, 0.5 μL RNasin, 1 μL MMLV (200 U), RNase-free ddH_2O 定容至 50 μL , 42 ℃ 温浴 50 min, 95 ℃ 加热 5 min。

(3) PCR 扩增条件:逆转录产物 2 μL , 上下游引物各 1 μL , 10 × Taq Buffer 5 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL , Taq (2.5 U/ μL) 1 μL , ddH_2O 定容至 50 μL , 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 ℃ 保温 5 min。

(4) 扩增引物:内对照 β -Actin 引物序列:上游 5'-TGTATGCCTCTGCTCG TACCAC-3', 下游 5'-ACACGACTACTTCGCGCTC AGGAG-3', 产物长度 592 bp; Bcl-2 引物序列:上游 5'-GTGGCCTTCTTTGAGTTCCG-3', 下游 5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAG-3', 产物长度 212 bp。

(5) 扩增产物检测:在体积分数为 3% 琼脂糖凝胶电泳, Stratagene eagleeye II 图像处理系统测量区带分子量及密度, 计算样品 Bcl-2 区带与 β -Actin 区带密度百分比, 反映各组相对丰度。

2.5 台盼蓝拒染法测细胞生长抑制率

将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中,按照上述步骤进行转染,分别于 24、48 和 72 h 收获细

胞,常规台盼蓝 (体积分数 0.5%) 染色,用血球计数板计数活细胞数目,实验重复 3 次。

2.6 CCK8 法测细胞生长抑制率

将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中,按照上述步骤进行转染,置于 37 ℃、饱和湿度、体积分数为 5% CO_2 条件下常规培养 24、48 和 72 h 后,向每孔内加入 30 μL CCK8,再置于 37 ℃ 孵育 4 h。然后直接在酶联检测仪上 450 nm 波长处测 A_{450} 值,以 A_{450} 间接反映细胞存活数量。实验重复 3 次,据此推测 mir-15a 和 mir-16-1 转染后各时间点对 Raji 细胞的抑制率。

2.7 Hoechst 染色试剂盒观察凋亡细胞形态

收集经脂质体转染 48 h 的细胞,离心收集细胞样品于 1.5 mL 离心管内,加入 0.5 mL 固定液,混匀,固定 10 min。离心去固定液, PBS 洗 2 遍。末次离心后吸去大部分液体保留约 50 μL 液体,再缓缓悬起细胞,滴加至载玻片上,晾干;均匀滴上 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,染色 5 min,晾干。PBS 洗 2 遍。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上洁净盖玻片,避免气泡;荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。

2.8 流式细胞仪—Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率

实验分组同前,各组细胞以 $15 \times 10^4/\text{mL}$ 起始密度接种于 24 孔板,每组复 3 孔,按上述培养方法转染后收集培养 48 h 的细胞, PBS 洗涤 2 次,离心去上清, 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 5 μL , 避光孵育 10 min, 离心去上清, 190 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 10 μL 碘化丙啶染色液,冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测,用 MULTICYCLE 软件分析处理结果。

2.9 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计学分析。实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间数据比较,采用完全随机区组设计的单因素方差分析,组间的比较选用可进行多个样本均数间每两个均数比较的 q 检验。

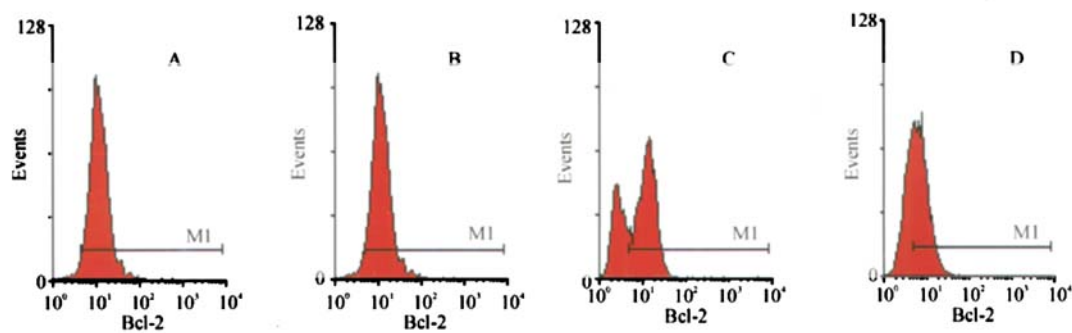
3 结果

3.1 间接免疫荧光及流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白表达情况

实验结果显示 Raji 细胞经转染 mir-15a 和 mir-16-1 48 h 后, Bcl-2 蛋白的表达量降低,与空白对照组和随机序列组比较,差异有显著性 ($P < 0.05$);而

空白对照组与随机序列组间差异无显著性($P > 0.05$),各组 Bcl-2 蛋白表达量见表 1。mir-15a 和

mir-16-1 可特异性抑制 Raji 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达(图 1)。



A: 空白对照组; B: 随机序列组; C: mir-15a 组; D: mir-16-1 组

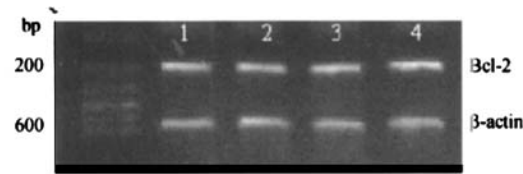
图 1 转染 mir-15a 和 mir-16-1 48 h 后流式细胞仪检测 Raji 细胞中 Bcl-2 蛋白表达情况

表 1 Raji 细胞 Bcl-2 蛋白($\bar{x} \pm s, n=3$)的表达量	
组别/荧光阳性率	Bcl-2 蛋白表达量/%
空白对照组	95.8 ± 0.6
随机序列组	94.9 ± 0.9
mir-15a 组	65.6 ± 1.1 ¹⁾
mir-16-1 组	63.8 ± 1.3 ¹⁾

1) 与空白对照组和随机对照组相比, $P < 0.05$

3.2 RT-PCR 检测转染后各组 Bcl-2 mRNA 表达水平

由 Bcl-2 扩增产物的凝胶电泳(图 2)可见,内对照 β -Actin 在各处理组均有表达, Bcl-2 扩增产物电泳区带在 210 bp 位置,与设计引物的理论值一致。各处理组 Bcl-2 表达的相对丰度依次为:空白对照组(0.985 ± 0.006),随机序列组(0.978 ± 0.009),mir-15a 组(0.974 ± 0.010),mir-16-1 组(0.989 ± 0.003)。表明 mir-15a 和 mir-16-1 是在转录后水平对 Bcl-2 mRNA 进行调控,而不是直接降解 Bcl-2 mRNA。



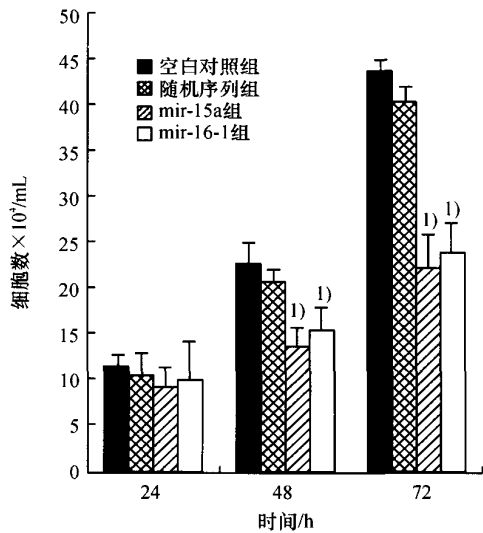
1:空白对照组; 2:随机序列组; 3:mir-15a 组; 4:mir-16-1 组

图 2 半定量 RT-PCR 测得各组细胞的 Bcl-2 mRNA 表达水平

3.3 台盼蓝拒染法检测 mir-15a 和 mir-16-1 对淋巴瘤细胞 Raji 的生长抑制作用

实验结果显示,终浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 mir-

15a 和 mir-16-1 寡核苷酸转染淋巴瘤细胞 Raji, mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸作用 48 h 时开始发挥对细胞的生长抑制作用,且随着作用时间的增加,效果逐渐增强,72 h 作用效果明显,有明显的时效关系(图 3)。



1) 与空白对照组和随机序列组相比, $P < 0.05$

图 3 不同时间 mir-15a 和 mir-16-1 对淋巴瘤细胞 Raji 的生长抑制作用

3.4 CCK8 法检测转染 mir-15a 和 mir-16-1 后对 Raji 细胞生长的影响

CCK8 结果(表 2)显示:转染 mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸的 Raji 细胞增殖能力最差,其 A 值要明显低于空白对照组和随机序列组($P < 0.05$),说明 mir-15a 抑制 Raji 细胞的生长与增殖。

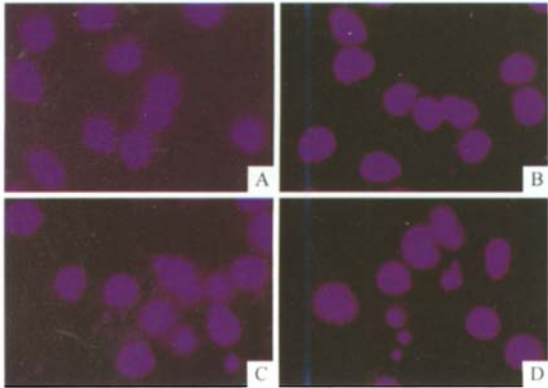
表 2 转染 mir-15a 和 mir-16-1 后各时间点 CCK8 法检测 Raji 细胞吸光度 A 值($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	1.209 ± 0.029	1.419 ± 0.018	1.599 ± 0.015
随机序列组	1.208 ± 0.021	1.417 ± 0.013	1.604 ± 0.014
Mir-15a 组	1.115 ± 0.015 ¹⁾	1.207 ± 0.038 ¹⁾	1.242 ± 0.035 ¹⁾
Mir-16-1 组	1.137 ± 0.016 ¹⁾	1.211 ± 0.040 ¹⁾	1.241 ± 0.032 ¹⁾

1) Mir-15a 和 mir-16-1 寡核苷酸组与其他组相比, $P < 0.05$

3.5 Hoechst 染色试剂盒检测转染 mir-15a 和 mir-16-1 后细胞凋亡形态

细胞经处理后 48 h, 经 Hoechst 染色(图 4)。Mir-15a 组和 mir-16-1 组可见明显的凋亡细胞:核膜完整, 体积变小, 核质固缩; 而其他组未见明显凋亡细胞。



A 空白对照组; B 随机序列组; C mir-15a 组; D mir-16-1 组
图 4 脂质体转染 mir-15a 和 mir-16-1 作用于 Raji 细胞 48 h 的形态学改变 Hoechst 染色荧光检测 ×40

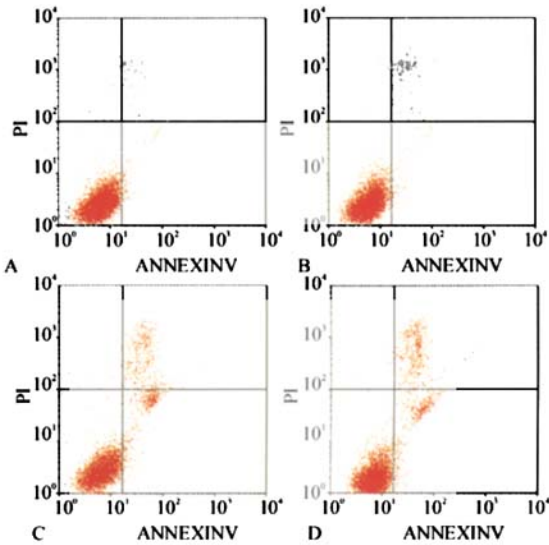
3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

转染 mir-15a 48 h 后, Raji 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 9.74% 和 9.65%, mir-16-1 组的早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 9.70% 和 9.34%, 与空白对照组和随机序列组比较差异有显著性($P < 0.05$)。而空白对照组和随机序列组的凋亡率差异无显著性($P > 0.05$), 见表 3。mir-15a 和 mir-16-1 可诱导 Raji 细胞的凋亡(图 5)。

表 3 转染 mir-15a 和 mir-16-1 后 48 h 流式细胞仪双染法检测 Raji 细胞的凋亡($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别/凋亡率	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%
空白对照组	0.7 ± 0.2	1.73 ± 0.3
随机序列组	2.18 ± 0.4	1.54 ± 0.3
mir-15a 组	9.74 ± 0.5 ¹⁾	9.65 ± 0.4 ¹⁾
mir-16-1 组	9.70 ± 0.8 ¹⁾	9.34 ± 0.6 ¹⁾

1) mir-15a, mir-16-1 组与其它组比, $P < 0.05$



A 空白对照组; B 随机序列组; C mir-15a 组; D mir-16-1 组
图 5 脂质体转染 mir-15a 和 mir-16-1 作用于 Raji 细胞 48 h 的凋亡图流式细胞仪—Annexin V/PI 双染色法检测

4 讨论

miRNA 是由 21 ~ 23 个碱基组成的内源性单链小分子 RNA, 通过切割 mRNA 或翻译抑制两种机制, 在转录后水平对基因表达进行负性调控。近年来研究显示, miRNA 与造血系肿瘤关系密切, 多种 miRNA 在造血系肿瘤中表达上调或下调。He 等^[3]发现 mir-17-92 在 B 淋巴瘤中表达增加。周珏宇等^[4]将 mir-181a 转染入人白血病 K562 细胞, 模拟体内 mir-181a 的高表达, 进而增强抑癌基因的表达, 抑制白血病细胞的增殖和生长。

Mir-15a 和 miR-16-1 位于 13q14.3, 一个 30kb 的缺失区域, 65% 的 B-CLL 这两种基因水平下调^[7]。CLL 是最常见的人类白血病, 一半以上的 CLL 病例 13q14 纯合性或杂合性丢失, 这是 CLL 最常见的染色体异常。50% 的套细胞淋巴瘤, 16 ~ 40% 的多发性骨髓瘤和 60% 的前列腺癌 13q14 丢失。表明 13q14 存在一个或多个肿瘤抑制基因, 与人类肿瘤的病原学发生有关^[5-7]。B-CLL 是西方最常见的成人白血病, 以未分化的恶性 B 细胞过表达抗凋亡蛋白 Bcl-2 为特征。mir-15 和 mir-16 靠 5' 端的 9 个碱基序列相同, 且这 9 个碱基与 Bcl-2 的 3287-3279 碱基互补^[2,8]。这表明, mir-15 和 mir-16 可以通过靶向 Bcl-2 而影响细胞生长与增殖。

Raji 细胞为人 Burkkit 淋巴瘤细胞株,以高表达 Bcl-2 为特征^[9-10]。本研究利用脂质体 2000 将化学合成的 mir-15a 和 mir-16-1 分别转染入 Raji 细胞,模拟体内 mir-15a 和 mir-16-1 的高表达。Cimmino 等^[2]检测 CLL 细胞中 Bcl-2 和 mir-15, mir-16 的表达,发现 Bcl-2 呈高表达,且与 mir-15, mir-16 的表达呈负相关。而本实验结果显示实验组 Bcl-2 蛋白表达量明显低于对照组,而各组 Bcl-2 mRNA 的表达水平未见显著差异,进一步证实了 mir-15a 和 mir-16-1 可在转录后水平对 Bcl-2 mRNA 的表达进行调控。台盼蓝拒染法和 CCK8 法显示, mir-15a 和 mir-16-1 的高表达明显抑制了 Raji 细胞的生长活性,诱导细胞凋亡。Hoechst 染色可观察到明显的凋亡细胞。流式细胞仪—AnnexinV/PI 双染色法显示, mir-15a 和 mir-16-1 组早期凋亡率和晚期凋亡率均明显高于对照组。据此可认为, mir-15a 和 mir-16-1 在体内可起到诱导细胞凋亡,进而抑制淋巴瘤生长的作用。LIN 等^[8]分析了耐药胃癌细胞株 SGC7901/VCR 与非耐药胃癌细胞株 SGC7901 中 Bcl-2 的表达,发现 SGC7901/VCR 中 Bcl-2 蛋白明显增高,而将 mir-15b 和 mir-16 转染入该细胞后, Bcl-2 蛋白量降低,且对 ADR, VCR, VP16, CDDP 等化疗药物的敏感性增强。本实验将进一步进行 mir-15a 和 mir-16-1 影响 Raji 细胞药物敏感性方面的研究, mir-15a 和 mir-16-1 可以成为肿瘤治疗的新的研究方向。

[参考文献]

- [1] WILLIAM C S CHO. OncomiRs: the discovery and progress of microRNA in cancers [J]. *Molecular Cancer* 2007, 6(60): 1-7.
- [2] GEORGE A C, CALIN D D, MASAYOSHI S, et al.

- Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [3] HE L, THOMSON J M, HEMANN M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* [J], 2005, 435 (7043): 828-833.
- [4] 周珏宇, 马文丽, 费嘉, 等. 微 R-181a 对人白血病 K562 细胞株的抑制作用及其机制的初步探讨 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(7): 796-802.
- [5] GEORGE A, CALIN, YURI P, et al. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Best Practice & Research Clin Haema*, 2007, 20(3): 425-437.
- [6] KALACHIKOV S, MIGLIAZZA A, CAYANIS E, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Genomics*, 1997, 42(3): 369-377.
- [7] AMELIA C, GEORGE A C, MULLER F, et al. Mir-15 and mir-16 induce apoptosis by targeting Bcl-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (39): 13944-13949.
- [8] LIN X, DEXIN Z, RUI D, et al. Mir-15b and mir-16 modulate multidrug resistance by targeting Bcl-2 in human gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2): 372-379.
- [9] 郭晓玲, 董作仁, 林凤茹, 等. 急性白血病患者 Bcl-2, bax 基因表达与预后和耐药的关系 [J]. *中华血液学杂志*, 2001, 14(5): 208-210.
- [10] 王福旭, 董作仁, 刘泽林, 等. Bcl-2 硫代反义寡核苷酸对 Raji 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2003, 24(2): 71-73.

[责任编辑: 朱颖嫻]