

引用本文:高娟,邢海洲.miR-218-5p靶向B细胞淋巴瘤因子3表达影响白血病K562细胞的增殖和凋亡[J].安徽医药,2022,26(4):660-665.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.04.005.



◇ 药学研究 ◇

miR-218-5p靶向B细胞淋巴瘤因子3表达影响白血病K562细胞的增殖和凋亡

高娟,邢海洲

作者单位:郑州大学第一附属医院血液病实验室,河南 郑州 450052

通信作者:邢海洲,男,副主任医师,研究方向为恶性血液病、造血干细胞等,Email:595646187@qq.com

摘要: **目的** 探讨微小RNA-218-5p(miR-218-5p)靶向B细胞淋巴瘤因子3(BCL3)基因对白血病细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 反转录及荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)检测正常人骨髓细胞和白血病骨髓细胞中miR-218-5p和BCL3的表达水平。以白血病细胞K562为研究对象,分别构建过表达miR-218-5p或沉默BCL3的K562细胞株,噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blotting检测细胞增殖抗原(Ki67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)和活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-3)的表达水平。双荧光素酶报告基因实验和Western blotting验证miR-218-5p和BCL3的靶向调控关系。**结果** 与正常人骨髓细胞相比,白血病骨髓细胞中miR-218-5p的表达水平(1.00±0.13)比(0.44±0.18)显著降低,BCL3的表达水平(1.04±0.32)比(4.76±1.38)、(0.26±0.05)比(0.78±0.13)显著升高。过表达miR-218-5p或沉默BCL3均可显著抑制K562细胞Cyclin D1(0.69±0.08)比(0.34±0.05)、(0.65±0.07)比(0.18±0.04)和Ki67表达(0.68±0.07)比(0.23±0.04)、(0.54±0.06)比(0.24±0.04),促进Cleaved-Caspase-3表达(0.38±0.04)比(0.89±0.11)、(0.17±0.04)比(0.56±0.07),抑制细胞增殖[(98.72±12.38)%比(69.79±7.62)%]、[(97.48±11.49)%比(65.73±6.86)%],促进细胞凋亡[(7.26±0.85)%比(24.46±2.67)%]、[(6.63±0.85)%比(26.46±2.81)%]。BCL3是miR-218-5p的靶基因,miR-218-5p可负性调控BCL3的表达。过表达BCL3可部分逆转miR-218-5p对K562细胞增殖和凋亡的影响。**结论** miR-218-5p通过靶向BCL3抑制白血病细胞增殖,促进细胞凋亡。

关键词: 白血病; 微小RNA-218-5p; B细胞淋巴瘤因子3; 细胞增殖; 凋亡

Effect of miR-218-5p on the proliferation and apoptosis of leukemia K562 cells by targeting BCL3

GAO Juan, XING Haizhou

Author Affiliation: Hematology Laboratory, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of micro-218-5p (miR-218-5p) on the proliferation and apoptosis of leukemia cells by targeting B-cell lymphoma factor 3 (BCL3) gene. **Methods** The expression levels of miR-218-5p and BCL3 in normal human bone marrow cells and leukemia bone marrow cells were detected by qRT-PCR and Western blot. The K562 cell lines over-expressing miR-218-5p or silencing BCL3 were constructed. Cell proliferation was detected by MTT assay, apoptosis was detected by flow cytometry, the expression levels of Ki67, Cyclin D1 and Cleaved Caspase-3 were detected by Western blot. The dual luciferase reporter gene assay and Western blot were used to verify the targeted and regulatory relationship between miR-218-5p and BCL3. **Results** Compared with normal human bone marrow cells, the expression level of miR-218-5p (1.00±0.13) vs. (0.44±0.18) in leukemia bone marrow cells was significantly decreased, while the expression level of BCL3 (1.04±0.32) vs. (4.76±1.38), (0.26±0.05) vs. (0.78±0.13) was significantly increased. Over-expression of miR-218-5p or silencing BCL3 significantly inhibited the expression level of Cyclin D1 (0.69±0.08 vs. 0.34±0.05), (0.65±0.07 vs. 0.18±0.04) and Ki67 (0.68±0.07) vs. (0.23±0.04), (0.54±0.06) vs. (0.24±0.04) in K562 cells, promoted the expression of Cleaved-Caspase-3 (0.38±0.04) vs. (0.89±0.11), (0.17±0.04) vs. (0.56±0.07), inhibited cell proliferation [(98.72±12.38)% vs. (69.79±7.62)%], [(97.48±11.49)% vs. (65.73±6.86)%] and promoted apoptosis [(7.26±0.85)% vs. (24.46±2.67)%], [(6.63±0.85)% vs. (26.46±2.81)%]. BCL3 was a target gene of miR-218-5p, and miR-218-5p negatively regulated the expression of BCL3. The over-expression of BCL3 partially reversed the effect of miR-218-5p on proliferation and apoptosis of K562 cells. **Conclusion** miR-218-5p inhibits leukemia cell proliferation and promotes apoptosis by targeting BCL3.

Key words: Leukemia; miR-218-5p; BCL3; Cell proliferation; Apoptosis

白血病是一类常见的造血干细胞恶性克隆性疾病,主要表现为克隆性白血病细胞增殖失控、分

化障碍、凋亡受阻进而导致其在骨髓和其他造血组织中大量累积,浸润其他非造血组织和器官,同时抑制正常造血功能。因此,如何有效的抑制白血病细胞的增殖促进其凋亡对白血病的治疗意义重大。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类具有18~22个核苷酸的非编码小RNA,在白血病的诊断、预后和治疗中发挥着重要作用^[1-2]。微小RNA-218-5p(miR-218-5p)是近年的研究热点miRNA,研究发现,miR-218-5p在白血病病人中表达下调,过表达miR-218通过靶向SNX4抑制白血病细胞增殖和侵袭,但miR-218-5p在白血病中的作用机制尚未完全阐明^[3-4]。生物信息学分析显示,B细胞淋巴瘤因子3基因(B-cell CLL/lymphoma 3, BCL3)能够和miR-218-5p相互作用,BCL3最初发现于B淋巴细胞白血病,研究发现BCL3在白血病病人体内表达显著上调^[5]。但miR-218-5p能否靶向BCL3参与对白血病细胞增殖和凋亡的调控尚未可知。因此,通过以下研究,以探讨miR-218-5p对白血病K562细胞增殖和凋亡的影响,初步探讨其作用机制,以期对白血病的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要材料和试剂 人慢性髓原白血病细胞K562购于中国科学院细胞库;RPMI-1640培养基、胎牛血清、青链霉素双抗、噻唑蓝(MTT)试剂盒购于美国Gibco公司;Lipofectamine™ 2000购于美国Invitrogen公司,总RNA提取试剂盒购于上海生工生物工程有限公司;模拟物阴性对照(miR-con)、miR-218-5p模拟物(miR-218-5p mimics)、干扰对照(si-con)、干扰BCL3(si-BCL3)、空载体(pcDNA)、过表达BCL3(pcDNA-BCL3)、抑制物对照(anti-miR-con)、抑制物miR-218-5p(anti-miR-218-5p)、BCL3野生型荧光素酶载体(WT-BCL3)以及BCL3突变型荧光素酶载体(MUT-BCL3)的构建由上海吉玛制药有限公司提供;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物技术有限公司;B细胞淋巴瘤因子3(BCL3)兔多克隆抗体、细胞增殖抗原(Ki67)兔多克隆抗体、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)兔单克隆抗体、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-3)兔多克隆抗体购于美国Abcam公司;山羊抗兔Ⅱ抗购于广西锐博生物科技技术有限公司。

1.1.2 样本收集 白血病骨髓样本20例来源于2016年1月至2018年1月郑州大学第一附属医院的住院病人,所有病人均在其初诊时采集其骨髓标本。另取同时期10例正常骨髓捐献者骨髓标本为对照组。本研究在术前病人或其近亲属均签署知情同意书,本研究

符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组 将K562细胞接种于含有10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的RPMI-1640培养基,于37℃、二氧化碳体积分数为5%的细胞培养箱进行细胞培养。按照1:3比例传代培养,选取对数期细胞进行后续研究。按照每孔 5×10^3 个K562细胞接种于96孔板,按照Lipofectamine™ 2000使用说明分别将miR-con、miR-218-5p mimics、si-con、si-BCL3转染至K562细胞,依次标记为miR-con组、miR-218-5p组、si-con组、si-BCL3组,转染6h更换培养液,转染48h用胰蛋白酶消化收集细胞,进行后续实验分析。此外,正常培养的K562细胞标记为NC组(对照组)。为进一步验证miR-218-5p是通过调控BCL3表达影响白血病细胞的增殖和迁移,进行回复实验,将miR-218-5p mimics分别与pcDNA或pcDNA-BCL3共转染K562细胞,分别标记为miR-218-5p+pcDNA组和miR-218-5p+pcDNA-BCL3组检测K562细胞的增殖和凋亡变化。

1.2.2 RT-qPCR检测 取转染48h的各组K562细胞,按照TRIzol总RNA提取试剂盒提取各组细胞的总RNA,检测总RNA纯度后,采用一步法RT-PCR试剂盒将RNA反转录为cDNA,最后将cDNA进行实时荧光定量PCR,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算miR-218-5p和BCL3 mRNA的相对表达水平。引物序列如下:miR-218-5p正向引物5'-TTGCGGATGGTTCCGTCAGCA-3',反向引物5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3';U6正向引物5'-CTCGCTTCGGCAGCA-3',反向引物5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';BCL3正向引物5'-GAAAACAACAGCCTTAGCATGGT-3',反向引物5'-CTGCGGAGTACATTTGCG-3'; β -actin正向引物5'-CCAACCGCGAGAA-GATGA-3',反向引物5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖活力 转染48h时,各取一组K562细胞,向每孔内加入终浓度为5 mg/mL的MTT试剂20 μ L,培养箱孵育4h,向每孔内加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ L,培养箱继续孵育2h至结晶充分溶解,用酶标仪于波长490 nm处测定各孔的吸光度值,计算细胞存活率。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 转染48h后,胰蛋白酶消化细胞,用预冷的PBS液洗涤细胞2次,离心收集细胞。加入适量的1×结合缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度约为 1×10^6 个/毫升,取100 μ L细胞悬液加入流式管内,加入5 μ L Annexin V-FITC,室温避光,轻轻地混匀10 min,再加入5 μ L的PI,室温避

光孵育 5 min, 补加 PBS 液至 500 μ L, 混匀后, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 转染 48 h 后, 收集各组细胞, 加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min, 离心收集上清液即为细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取适量蛋白样品, 煮沸 5 min 使其充分变性, 随后进行上样和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 利用湿法转膜装置将细胞蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。室温条件 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; I 抗溶液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 二抗室温条件孵育 1 h; 凝胶成像系统曝光后分析目的条带的灰度值。

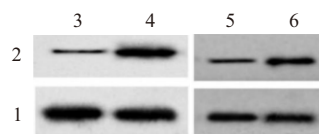
1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 采用生物信息学软件 targetsan 进行靶基因预测显示, BCL3 的 3'-UTR 含有与 miR-218-5p 的互补配对的核苷酸序列, BCL3 是 miR-218-5p 的潜在靶基因。利用 Lipofectamine™ 2000 将 BCL3 野生型荧光素酶报告基因载体 WT-BCL3 和突变型荧光素酶报告基因载体 MUT-BCL3 分别与 miR-218-5p mimics 或 miR-con 共转染 K562 细胞, 转染 48 h 后, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒分析各组细胞的荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对计量资料进行统计学处理, 两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验进行分析, 多组间数据比较用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-218-5p 和 BCL3 白血病骨髓细胞和正常人骨髓细胞中的表达 图 1、表 1、表 2 显示, 与正常人骨髓细胞相比, 白血病骨髓细胞中 miR-218-5p 的表达水平显著降低, BCL3 mRNA 和 BCL3 蛋白的表达水平显著升高; 与人正常骨髓基质细胞 HS-5 比较, K562 细胞中 miR-218-5p 的表达水平显著降低, BCL3 mRNA 和 BCL3 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.001$)。

2.2 miR-218-5p 抑制白血病 K562 细胞增殖和诱导细胞凋亡 图 2、表 3 显示, 与 NC 组和 miR-con 组比



注: 1— β -肌动蛋白(β -actin); 2—B 细胞淋巴瘤因子 3 基因(BCL3); 3—正常人骨髓细胞(Normal); 4—白血病骨髓细胞; 5—人正常骨髓基质细胞(HS-5); 6—白血病 K562 细胞。

图 1 蛋白质印迹法检测白血病骨髓细胞和正常人骨髓细胞中 BCL3 表达

表 1 检测白血病骨髓细胞和正常人骨髓细胞中 miR-218-5p 和 BCL3 表达 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-218-5p	BCL3 mRNA	BCL3 protein
Normal	9	1.00 $\pm$ 0.13	1.04 $\pm$ 0.32	0.26 $\pm$ 0.05
Cancer	9	0.44 $\pm$ 0.18	4.76 $\pm$ 1.38	0.78 $\pm$ 0.13
<i>t</i> 值		7.57	7.88	11.20
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: miR-218-5p 为微小-218-5p, BCL3 mRNA 为 B 细胞淋巴瘤因子 3 基因 mRNA, BCL3 protein 为 B 细胞淋巴瘤因子 3 基因蛋白, Normal 为正常人骨髓细胞, Cancer 为白血病骨髓细胞。

表 2 检测人正常骨髓基质细胞 HS-5 和白血病 K562 细胞中 miR-218-5p 和 BCL3 表达 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-218-5p	BCL3 mRNA	BCL3 protein
HS-5	9	1.00 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.13	0.16 $\pm$ 0.05
K562	9	0.23 $\pm$ 0.05	5.67 $\pm$ 0.75	0.68 $\pm$ 0.05
<i>t</i> 值		22.44	18.33	22.06
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: miR-218-5p 为微小-218-5p, BCL3 mRNA 为 B 细胞淋巴瘤因子 3 基因 mRNA, BCL3 protein 为 B 细胞淋巴瘤因子 3 基因蛋白, HS-5 为人正常骨髓基质细胞, K562 为白血病细胞。

较, miR-218-5p 组白血病 K562 细胞 miR-218-5p 的表达水平显著升高($P < 0.001$), 表明过表达 miR-218-5p 的 K562 细胞株构建成功。与 NC 组和 miR-con 组比较 miR-218-5p 组白血病 K562 细胞 Cyclin D1 和 Ki67 蛋白的表达水平显著降低, Cleaved-Caspase-3 的表达水平显著升高, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高($P < 0.001$)。提示, 过表达 miR-218-5p 抑制白血病 K562 细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

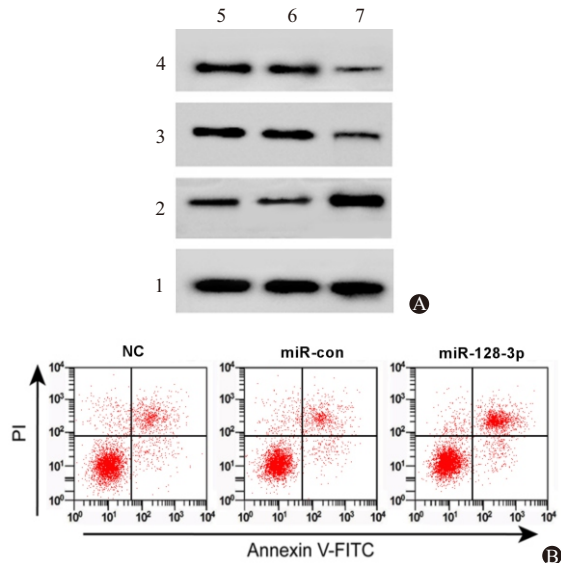
2.3 miR-218-5p 靶向 BCL3 调控其表达 生物信

表 3 上调 miR-218-5p 表达对白血病 K562 细胞增殖和细胞凋亡的影响 $\bar{x} \pm s$

Groups	重复次数	miR-218-5p	Ki67	Cyclin D1	Cleaved Caspase-3	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
NC	9	1.00 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.08	0.67 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.06	100.00 $\pm$ 11.36	5.38 $\pm$ 0.76
miR-con	9	0.94 $\pm$ 0.08	0.68 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.04	98.72 $\pm$ 12.38 ^①	7.26 $\pm$ 0.85
miR-218-5p	9	5.21 $\pm$ 0.87	0.23 $\pm$ 0.04 ^①	0.34 $\pm$ 0.05 ^①	0.89 $\pm$ 0.11 ^①	69.79 $\pm$ 7.62 ^①	24.46 $\pm$ 2.67 ^①
<i>F</i> 值		208.70	154.95	75.59	127.82	23.15	354.18
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: NC 为对照组, miR-con 为模拟物阴性对照, miR-218-5p 为 miR-218-5p 模拟物, Ki67 为细胞增殖抗原, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, Cleaved Caspase-3 为活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。

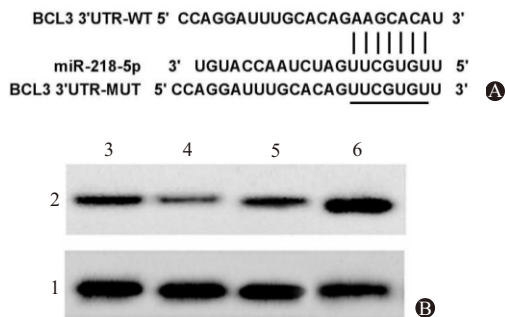
①与 miR-con 组比较, $P < 0.001$ 。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-3);3—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);4—细胞增殖抗原(Ki67);5—对照组(NC);6—模拟物阴性对照(miR-con);7—miR-218-5p模拟物(miR-218-5p)。

图2 蛋白质印迹法检测白血病K562细胞Ki67、Cyclin D1、Cleaved Caspase-3表达(A)和流式细胞术检测白血病K562细胞凋亡(B)

息学软件 targetsan 在线预测显示,miR-218-5p 和 BCL3 的 3'-UTR 存在部分连续的特异性结合位点,见图3。表4显示,与 miR-con 和 WT-BCL3 共转染组比较,miR-218-5p 和 WT-BCL3 共转染组 K562 细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.001$);与 miR-con 和 MUT-BCL3 共转染组比较,miR-218-5p 和 MUT-BCL3 共转染组 K562 细胞荧光素酶活性变化无统计学意义。表5显示,与 miR-con 组比较,miR-218-5p 组 K562 细胞 BCL3 蛋白的表达水平显著降低;与 anti-miR-con 组比较,anti-miR-218-5p 组 K562 细胞 BCL3 蛋白的表达水平显著升高($P<0.001$)。以上结果提示,BCL3 是 miR-218-5p 的靶基因,miR-218-5p 可靶向负性调控 BCL3 表达。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—B细胞淋巴瘤因子3(BCL3);3—模拟物阴性对照(miR-con);4—miR-218-5p模拟物(miR-218-5p);5—抑制物对照(anti-miR-con);6—抑制物miR-218-5p(anti-miR-218-5p)。

图3 miR-218-5p 与 BCL3 互补的核苷酸序列(A)及 miR-218-5p 调控 BCL3 表达(B)

表4 双荧光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-BCL3	MUT-BCL3
miR-con	9	1.00±0.14	1.11±0.15
miR-218-5p	9	0.61±0.08	1.15±0.13
<i>t</i> 值		7.26	0.61
<i>P</i> 值		<0.001	0.554

注:WT-BCL3 为 BCL3 野生型荧光素酶载体,MUT-BCL3 为 BCL3 突变型荧光素酶载体。

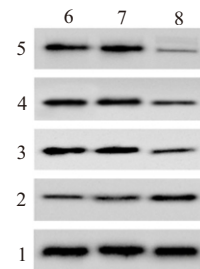
表5 miR-218-5p 调控 BCL3 的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	BCL3
miR-con	9	0.63±0.08
miR-218-5p	9	0.27±0.04 ^①
anti-miR-con	9	0.58±0.05
anti-miR-218-5p	9	1.13±0.18 ^②
<i>F</i> 值		106.32
<i>P</i> 值		<0.001

注:BCL3 为 B 细胞淋巴瘤因子 3,miR-con 为模拟物阴性对照,miR-218-5p 为 miR-218-5p 模拟物,anti-miR-con 为抑制物对照,anti-miR-218-5p 为抑制物 miR-218-5p。

①与 miR-con 组比较, $P<0.001$ 。②与 anti-miR-con 组比较, $P<0.001$ 。

2.4 沉默 BCL3 表达抑制白血病 K562 增殖和诱导细胞凋亡 图4、表6显示,与 NC 组和 si-con 组比较,si-BCL 组 K562 细胞 BCL3 的表达水平显著降低,表明沉默 BCL3 的 K562 细胞株构建成功。与 NC 组和 si-con 组比较,si-BCL 组 K562 细胞 Cyclin D1 和 Ki67 蛋白的表达水平显著降低,Cleaved-Caspase-3 的表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.001$)。提示,沉默 BCL3 抑制白血病 K562 细胞增殖,诱导细胞凋亡。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-3);3—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);4—细胞增殖抗原(Ki67);5—B细胞淋巴瘤因子3(BCL3);6—对照组(NC);7—干扰对照(si-con);8—干扰 BCL3(si-BCL3)。

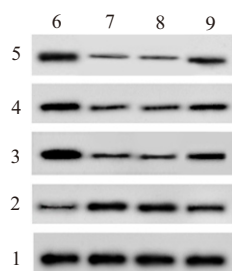
图4 蛋白质印迹法检测沉默 BCL-3 表达对白血病 K562 细胞 BCL3、Ki67、Cyclin D1 和 Cleaved Caspase-3 表达的影响

2.5 过表达 BCL3 部分逆转 miR-218-5p 对白血病细胞 K562 增殖和凋亡的影响 图5、表7显示,与 miR-con 组比较,miR-218-5p 组 K562 细胞 BCL3、Ki67 和 Cyclin D1 蛋白的表达水平显著降低,Cleaved

Caspase-3 蛋白的表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高;与 miR-218-5p+pcDNA 组比较,miR-218-5p+pcDNA-BCL3 组 K562 细胞 BCL3、Ki67 和 Cyclin D1 蛋白的表达水平显著升高,Cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.001$)。提示,过表达 BCL3 能够部分逆转 miR-218-5p 对白血病细胞 K562 增殖和凋亡的影响。

3 讨论

白血病是一种常见的血液系统恶性肿瘤,近年



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-3);3—细胞周期蛋白 D1(CyclinD1);4—细胞增殖抗原(Ki67);5—B 细胞淋巴瘤因子 3(BCL3);6—模拟物阴性对照(miR-con);7—miR-218-5p 模拟物(miR-218-5p);8—miR-218-5p 模拟物+空载体(miR-218-5p+pcDNA);9—干扰 BCL3(si-BCL3);10—miR-218-5p 模拟物+过表达 BCL3(miR-218-5p+pcDNA-BCL3)。

图5 蛋白质印迹法检测过表达 BCL3 部分能逆转 miR-218-5p 对白血病 K562 细胞 BCL3、Ki67、Cyclin D1 和 Cleaved Caspase-3 表达的影响

来其发病率呈升高趋势^[6]。骨髓移植作为白血病病人最有效的治疗手段,却存在供体难求、费用昂贵、并发症导致的死亡风险高等特点^[7-8]。因此,探索新的白血病治疗策略势在必行。

近年来,大量的研究表明,miRNA 在白血病的发生发展中发挥关键作用。miR-148b 在急性髓系白血病病人及细胞系中的表达水平显著降低,过表达 miR-148b 可引起细胞周期 G0 至 G1 期阻滞,细胞增殖受到抑制,细胞凋亡率增加^[9];miR-320c 在白血病病人中显著低表达,miR-320c 表达水平升高是白血病病人预后良好的独立因素,过表达 miR-320c 可通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT) 信号通路抑制白血病细胞活性和克隆形成能力,诱导细胞凋亡,发挥抑癌基因作用^[10]。近年来,miR-218-5p 被报道在多种人类恶性肿瘤中具有抑癌基因作用。miR-218-5p 在胃癌组织中表达降低,miR-218-5p 低表达与胃癌晚期、淋巴结转移和预后不良有关,过表达 miR-218-5p 在体内可抑制胃癌细胞的增殖,诱导细胞 G1 期停滞,抑制肿瘤生长和转移^[11];miR-218-5p 在前列腺癌中表达下调,过表达 miR-218-5p 抑制前列腺癌裸鼠异种移植瘤的生长,抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移,促进癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[12]。在白血病中,miR-218-5p 也是一种潜在的肿瘤抑制因子,但 miR-218-5p 影响白血病进展的机制尚未完全阐明。为探讨 miR-218-5p 在白血

表6 沉默 BCL3 表达对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

Groups	重复次数	BCL3	Ki67	Cyclin D1	Cleaved Caspase-3	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
NC	9	0.63±0.07	0.56±0.07	0.72±0.08	0.14±0.02	100.00±10.78	5.14±0.75
si-con	9	0.65±0.08	0.54±0.06	0.65±0.07	0.17±0.04	97.48±11.49	6.63±0.85
si-BCL3	9	0.11±0.03 ^①	0.24±0.04 ^①	0.18±0.04 ^①	0.56±0.07 ^①	65.73±6.86 ^①	26.46±2.81 ^①
F 值		207.44	85.90	180.49	214.83	33.36	416.61
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:NC 为对照组,si-con 为干扰对照,si-BCL3 为干扰 BCL3,BCL3 为 B 细胞淋巴瘤因子 3,Ki67 为细胞增殖抗原,CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1,Cleaved Caspase-3 为活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。

①与 si-con 组比较, $P<0.001$ 。

表7 过表达 BCL3 表达部分逆转 miR-218-5p 对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

Groups	重复次数	BCL3	Ki67	Cyclin D1	Cleaved Caspase-3	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
miR-con	9	0.73±0.08	0.68±0.07	0.87±0.07	0.17±0.04	100.00±11.49	6.63±0.85
miR-218-5p	9	0.21±0.04 ^①	0.26±0.03 ^①	0.23±0.04 ^①	0.57±0.07 ^①	65.29±6.96 ^①	24.28±2.47 ^①
miR-218-5p+pcDNA	9	0.18±0.03	0.23±0.04	0.21±0.03	0.52±0.06	62.64±7.12	25.83±2.65
miR-218-5p+ pcDNA-BCL3	9	0.56±0.06 ^②	0.59±0.07 ^②	0.53±0.07 ^②	0.35±0.05 ^②	88.35±9.42 ^②	12.14±0.75 ^②
F 值		208.70	152.78	281.37	93.98	36.91	218.15
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:miR-con 为模拟物阴性对照,miR-218-5p 为 miR-218-5p 模拟物,miR-218-5p+pcDNA 为 miR-218-5p 模拟物+空载体,miR-218-5p+pcDNA-BCL3 为 miR-218-5p 模拟物+过表达 BCL3,BCL3 为 B 细胞淋巴瘤因子 3,Ki67 为细胞增殖抗原,CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1,Cleaved Caspase-3 为活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。

①与 miR-con 组比较, $P<0.001$ 。②与 miR-218-5p+pcDNA 组比较, $P<0.001$ 。

病中的作用机制,本研究首先对白血病人骨髓细胞和正常人骨髓细胞 miR-218-5p 的表达水平进行检测,结果显示 miR-218-5p 在白血病人骨髓细胞中表达下调,与相关研究结论相吻合^[13]。选取 K562 细胞进行功能实验发现,过表达 miR-218-5p 可显著抑制 Cyclin D1 和 Ki67 蛋白表达,促进 Cleaved-Caspase-3 表达,抑制白血病 K562 细胞增殖,诱导细胞凋亡。提示,上调 miR-218-5p 是白血病的潜在治疗靶点。

为进一步揭示 miR-218-5p 调控白血病细胞增殖和凋亡的分子机制,采用生物学信息软件进行预测靶基因,发现 BCL3 的 3'-UTR 存在 miR-218-5p 的部分结合位点。随后采用双荧光素酶报告基因证实 BCL3 是 miR-218-5p 的靶基因,Western blotting 检测显示 miR-218-5p 可负性调控 BCL3 表达。BCL3 是一种原癌基因,BCL3 的表达失调与乳腺癌和非小细胞肺癌等实体肿瘤的进展有关^[14-15]。BCL3 在宫颈癌组织中表达上调,BCL3 阳性表达与不良预后特征及生存率降低有关,下调 BCL3 抑制宫颈癌模型小鼠异种移植瘤的生长^[16];BCL3 在卵巢癌中呈高表达,BCL3 可促进程序性死亡配体 1 表达,增强卵巢癌细胞的存活、增殖和迁移能力^[17];此外,BCL3 高表达与急性髓系白血病人生存期短密切相关^[5]此外,BCL3 的表达水平与胶质瘤病人的总生存期显著相关,BCL3 高表达预示肿瘤复发风险增加和预后较差^[18]。本研究显示,BCL3 在白血病人骨髓细胞中表达上调,沉默 BCL3 可抑制白血病 K562 细胞增殖,诱导细胞凋亡,与过表达 miR-218-5p 抑制 BCL3 的作用一致。进一步研究发现,过表达 BCL3 可逆转 miR-218-5p 对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响。提示 miR-218-5p 在白血病中起抑癌基因作用,通过靶向下调 BCL3 表达来影响白血病细胞的增殖和凋亡。然而,miR-218-5p 下游靶基因众多^[19-20],后续将对其他靶基因进行研究,全面揭示 miR-218-5p 对白血病细胞增殖和凋亡的调控作用。

综上所述,miR-218-5p 在白血病中表达下调,BCL3 表达上调,miR-218-5p 通过靶向调控 BCL3 表达抑制白血病细胞增殖、促进细胞凋亡。本研究的发现为白血病的临床治疗指明了方向,miR-218-5p 有望成为白血病的分子治疗靶点。

参考文献

- [1] 郭娟,徐之良. miRNA 在儿童急性淋巴细胞白血病发病机制及其临床应用中的研究进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2018, 23(5): 268-272.
- [2] 陈诚,陈国占. miRNA 在急性早幼粒细胞白血病中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(12): 1926-1928.
- [3] 王妍妍. miR-215 和 miR-218 在急性髓系白血病中的表达及其临床意义的研究[D]. 镇江:江苏大学, 2015.

- [4] 赖思含,吕素娟,刘英,等. miR-218 调控 SNX4 蛋白对急性淋巴 E6-1 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 空军医学杂志, 2018, 34(2): 97-100.
- [5] NIU Y, YANG X, CHEN Y, et al. BCL3 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in acute myeloid leukemia of FAB subtype M2[J]. Pathol Oncol Res, 2019, 25(2): 541-548.
- [6] PELCOVITS A, NIROULA R. Acute myeloid leukemia: a review [J]. R I Med J (2013), 2020, 103(3): 38-40.
- [7] PULGAR F, VELEZ D, VALDEOLIVAS N, et al. Post-bone-marrow-transplant leukemia cutis [J]. Dermatol Online J, 2013, 19(2): 6.
- [8] KEESLER DA, MARTIN AST, BONFIM C, et al. Bone marrow versus peripheral blood from unrelated donors for children and adolescents with acute leukemia[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2018, 24(12): 2487-2492.
- [9] 王晓雪,富威,梁颖,等. miR-148b 在急性髓系白血病患者及细胞系中的表达与生物学功能[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(3): 340-344.
- [10] 余梦霞. miR-320c 在急性髓系白血病中的临床意义及其机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
- [11] DENG M, ZENG C, LU X, et al. miR-218 suppresses gastric cancer cell cycle progression through the CDK6/Cyclin D1/E2F1 axis in a feedback loop[J]. Cancer Letters, 2017, 403(1): 175-185.
- [12] ZHANG G, HE X, REN C, et al. Long noncoding RNA PCA3 regulates prostate cancer through sponging miR-218-5p and modulating high mobility group box 1[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 13097-13109.
- [13] 金爱琴,倪红兵,孙宝兰,等. microRNA-218 在急性淋巴细胞白血病细胞 CCRF-CEM 中的作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 103-108.
- [14] CHEN X, CAO X, SUN X, et al. Bcl-3 regulates TGFβ signaling by stabilizing Smad3 during breast cancer pulmonary metastasis [J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2508. DOI: 10.1038/cddis.2016.405.
- [15] DIMITRAKOPOULOS FI, ANTONACOPOULOU AG, KOTTOUROU A, et al. Variant of BCL3 gene is strongly associated with five-year survival of non-small-cell lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 2015, 89(3): 311-319.
- [16] ZHAO H, WANG W, ZHAO Q, et al. BCL3 exerts an oncogenic function by regulating STAT3 in human cervical cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 6619-6629.
- [17] ZOU Y, UDDIN MM, PADMANABHAN S, et al. The proto-oncogene Bcl3 induces immune checkpoint PD-L1 expression, mediating proliferation of ovarian cancer cells [J]. J Biol Chem, 2018, 293(40): 15483-15496.
- [18] 王莹,李曦,张隆伯,等. BCL3 基因表达:一个新的胶质瘤预后预测因子[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(2): 159-164.
- [19] YANG Q, LI J, HU Y, et al. MiR-218-5p suppresses the killing effect of natural killer cell to lung adenocarcinoma by targeting SHMT1 [J]. Yonsei Med J, 2019, 60(6): 500-508.
- [20] 黄庆文. miR218-5p 通过靶向 TFF1 并依赖 Erk1/2 途径调控胃癌细胞增殖[D]. 厦门:厦门大学, 2015.

(收稿日期:2019-09-27,修回日期:2019-12-04)