DOI:10.16016/j.1000-5404.202105091

miRNA-495 靶向 STYX 调节 MLL-AF9 的急性髓系白血病细胞的增殖和凋亡

杨 瑞[1*],宁 婧[1*],景丽娟[2],王海楠[1],崔丽娟[1] 750004 银川,宁夏医科大学总医院:血液科[1],医学实验中心[2]

[**摘要**] **目的** 探究 miRNA-495 对混合谱系白血病基因(mixed lineage leukemia, MLL)基因重排的急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)增殖和凋亡的影响。**方法** 收集 2017 年 8 月至 2019 年 5 月于宁夏医科大学总医院血液科就医确诊为 AML 的 10 例 MLL-AF9 白血病患者[男性 6 例,女性 4 例,年龄(39.37±2.71)岁];10 例急性髓系白血病患者[男性 5 例,女性 5 例,年龄(41.12±1.92)岁];同时间段于外科门诊就医患者 10 例[男性 6 例,女性 4 例,年龄(42.31±3.21)岁]。根据是否转染 miRNA-495 mimic 分组为 miRNA-495 组和 Control 组,通过 RT-qPCR 检测各组 miRNA-495 的表达;CCK-8 检测各组转染 THP-1 细胞的增殖情况;RT-qPCR 和 Western blot 检测各组转染 THP-1 细胞增殖相关因子(Ki-67 和 PCNA)和细胞凋亡相关因子(Bcl-2、Bax 和 Caspase-3)的表达;TargetScan 预测 miRNA-495 的靶基因并用双荧光素酶报告实验验证;RT-qPCR 和 Western blot 检测 miRNA-495 组(转染 miRNA-495)、Control 组、丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸相互作用蛋白(Serine/threonine/tyrosine interacting protein,STYX)组(转染 STYX)和 miRNA-495+STYX 组(转染 miRNA-495 和 STYX)中 STYX 的表达。**结果** miRNA-495 在 MLL-AF9 的 AML 患者中表达下调[MLL-AF9 患者相对表达量(0.25±0.08),95%*CI*:−0.86~−0.65,$P<0.01$,$P<0.001$];miRNA-495 可以抑制 THP-1 细胞增殖($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$);miRNA-495 可以诱导 THP-1 细胞的凋亡($P<0.05$,$P<0.001$);miRNA-495 靶向结合 STYX($P<0.01$,$P<0.001$);STYX 过表达可以逆转 miRNA-495 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的作用($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$)。**结论** miRNA-495 通过靶向 STYX 调控 MLL 基因重排的急性髓系白血病细胞的增殖和凋亡。

[**关键词**] 急性髓系白血病;MLL-AF9;miRNA-495;STYX 基因;细胞增殖
[**中图法分类号**] R394.3; R730.23; R733.71 [**文献标志码**] A

MiRNA-495 regulates proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells with MLL gene rearrangement by targeting STYX

YANG Rui[1], NING Jing[1], JING Lijuan[2], WANG Hainan[1], CUI Lijuan[1] [1]Department of Hematology, [2]Medical Laboratory Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of miRNA-495 on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia (AML) cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangement. **Methods** Ten patients diagnosed with AML with MLL-AF9 fusion gene positive (6 males, 4 females, mean age of 39.37±2.71 years), and 10 cases of AML (5 males, 5 females, mean age of 41.12±1.92 years) admitted in our hospital from August 2017 to May 2019 were enrolled in this study, and another 10 patients (6 males, 4 females, mean age of 42.31±3.21 years) who attended the surgical outpatient department during the same period were also collected as the control. THP-1 cells (containing MLL-AF9 fusion gene) were divided into miRNA-495 and control groups based on transfection with miRNA-495 or not, and the expression of miRNA-495 in each group was detected by RT-qPCR; CCK-8 assay was used to determine the proliferation of transfected THP-1 cells in each group; RT-qPCR and Western blotting were performed to measure the

[**基金项目**] 宁夏医科大学校级课题一般项目(XM2019089)
[**通信作者**] 崔丽娟,E-mail:cuilijuan7511@163.com
* 同等贡献者

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

expression of proliferation-related factors (Ki-67 and PCNA) and apoptosis-related factors (Bcl-2, Bax and Caspase-3). The target genes of miRNA-495 were predicted by TargetScan and then verified by dual-luciferase reporter assay. Finally, RT-qPCR and Western blotting were adopted to detect the expression of serine/threonine/tyrosine interacting protein (STYX) in groups as follows: miRNA-495 group, control group, STYX group (transfected with STYX) and miRNA-495+STYX group (transfected with miRNA-495 and STYX). **Results** MiRNA-495 expression was down-regulated in AML patients with MLL-AF9 fusion gene, with relative expression of 0.25±0.08 (95% *CI* = −0.86~−0.65, $P<0.001$); miRNA-495 inhibited cell proliferation ($P<0.001$) and induced apoptosis of THP-1 cells, and it targetedly bound to STYX ($P<0.001$). In addition, STYX overexpression reversed the effects of miRNA-495 on THP-1 cell proliferation and apoptosis. **Conclusion** MiRNA-495 regulates the proliferation and apoptosis of AML cells with MLL gene rearrangement by targeting STYX.

[**Key words**] acute myeloid leukemia; MLL-AF9; miRNA-495; serine/threonine/tyrosine interacting protein; cell proliferation

Supported by the General Project of Ningxia Medical University (XM2019089). YANG Rui and NING Jing contributed equally to the article. Corresponding author: CUI Lijuan, E-mail: cuilijuan7511@163.com

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)是一类髓系造血干祖细胞的恶性克隆性疾病,发病时骨髓中异常的原始细胞及幼稚细胞大量增殖并抑制正常造血,可广泛浸润肝、脾、淋巴结等各种脏器,表现为贫血、出血、感染和浸润等征象[1]。混合谱系白血病基因(mixed lineage leukemia, MLL)定位于11号染色体的长臂2区3带(11q23),11q23位点常见异常有断裂、易位、融合、重复、缺失等[2-3]。伴MLL基因重排的白血病具有恶性程度高、不易缓解、容易复发、预后差的临床特征[2]。微小RNA(microRNAs,miRNAs)是一类长度约为18~25个核苷酸,具有在转录后水平调控基因表达功能的内源性非编码RNA,是表观遗传学中的重要一员[1]。近年来,许多研究发现miRNAs在正常组织和肿瘤组织间表达存在差异,这些差异表达的miRNAs与AML的发生发展有着密切的联系[4-5]。

miRNA-495是位于人类染色体14q32.31位点上的一个非编码RNA分子,已有研究发现miRNA-495是胚胎发育和肿瘤发生发展的重要调控因子之一,主要参与调控间充质干细胞分化及多种肿瘤的增殖、迁移、侵袭等生物学行为[6-10]。本研究希望通过研究miRNA-495从而探究MLL基因重排的AML发生发展。因此,本研究通过检测miRNA-495在不同骨髓样本中的表达,从而探究miRNA-495对MLL基因重排的AML中的发生发展作用的机制。为AML未来的靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 样本来源 2017年8月至2019年5月于我院确诊为急性白血病的患者275例,所有患者均经过骨髓常规、免疫分型、融合基因和染色体等分型确诊。经过多重巢式PCR检测筛选后,其中有10例MLL-AF9融合基因阳性AML患者(男性6例,女性4例),年龄(39.37±2.71)岁;10例急性髓系白血病患者(男性5例,女性5例),年龄(41.12±1.92)岁。NC组病例来源:同时间段于我院外科就诊患者10例(男性6例,女性4例),年龄(42.31±3.21)岁。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会批准(批件号:2019-491),符合赫尔辛基宣言,所有样本和信息经受试者同意采集,并签署知情同意书。

1.1.2 实验材料来源 RPMI-1640培养基购自美国Life Technologies公司。所有引物由上海生工生物技术有限公司设计合成。反转录病毒MSCV-PIG/-miR495载体和pMSCVneo/-STYX载体均由云周生物科技(广州)有限公司提供。所有抗体购自美国Abcam公司。实验所用载体和SYBR荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司。cDNA Synthesis Kit购自Thermo Fisher公司。荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司。AnnexinVFITC细胞凋亡检测试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品。CCK-8为日本同仁化学研究所产品。荧光定量PCR仪(Quant Studio 7 Flex)购自美国Applied Biosystems公司。酶标仪购自美国Bio-Rad公司。流式细胞仪(分析型COULTER-XL.MCL)购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AML细胞系人单核细胞白血病细胞THP-1(含有MLL-AF9融合基因)培养于含10%血清+1%双抗青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。

1.2.2 细胞分组转染 根据 THP-1 细胞的转染情况分为 Control 组、miRNA-495 组、丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸相互作用蛋白(Serine/threonine/tyrosine interacting protein,STYX)组、miRNA-495+STYX 组。Control 组:将反转录病毒 MSCV-PIG 载体和 pMSCVneo 载体,共转染到 THP-1 细胞中。miRNA-495 组:将反转录病毒 MSCV-PIG-miRNA-495 载体和 pMSCVneo 载体,共转染到 THP-1 细胞中。STYX 组:将反转录病毒 MSCV-PIG 载体和 pMSCVneo -STYX 载体,共转染到 THP-1 细胞中。miRNA-495 +STYX 组:将反转录病毒 MSCV-PIG-miRNA-495 载体和 pMSCVneo -STYX 载体,共转染到 THP-1 细胞中。

1.2.3 CCK-8 检测细胞增殖 将各组细胞制成浓度为 1×10^9/L 的细胞悬液,以每孔 100 μL 在 96 孔板上进行接种,每组做 3 个重复,并于培养箱中常规培养。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,充分混匀后,培养 4 h,使用酶标仪进行检测,测定 450 nm 吸光度 D(450)值。

1.2.4 靶基因预测及双荧光素酶报告实验验证 MiRNA 靶点预测数据库 TargetScan(www.targetscan.org)鉴定 miRNA-495 与靶向结合位点。构建野生型质粒(WT)和突变型质粒(MUT),将质粒与载体共转染至 THP-1 细胞,培养 48 h。测定细胞荧光素酶活性,海肾荧光素酶的荧光值作为内参,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 荧光实时定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-qPCR) 首先用 Trizol 试剂提取总 RNA,随后用试剂盒,将总 RNA 反转录为 cDNA。反应条件:25 ℃,5 min;42 ℃,60 min;85 ℃,5 min。-20 ℃保存。反应体系(20 μL):ddH_2O,6 μL;10 mmol/L dNTP mix,2 μL;RT primer,1 μL;RNase inhibitor,1 μL;M-MuLV Reverse Transcriotase,1 μL;总 RNA,5 μL。将获得的 cDNA 作为模板,采用 SYBR 荧光定量试剂盒荧光定量 PCR 仪(Quant Studio 7 Flex)进行扩增。反应体系(10 μL):RNase Free ddH_2O,2 μL;SYBR Green,5 μL;上游引物,1 μL;下游引物,1 μL;cDNA 模板,1 μL。反应条件(40 个循环):95 ℃,5 min;95 ℃,10 s;60 ℃,30 s;72℃,40 s。U6 作为 miRNA 的内参,GAPDH 基因为其他基因的内参。每个样本所得的 Ct 值以相对表达量 $2^{-\triangle Ct}$ 表示(△Ct=目的基因 Ct-内参基因 Ct)。实验组对于对照组的相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法。引物序列见表 1。

1.2.6 免疫印迹试验(Western blot) 将收集的细胞加入 RIPA 裂解液,13 518×g 离心 10 min,提取总蛋白。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转移法至 PVDF 膜上。使用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入特异性一抗 4 ℃过夜。第 2 天,加入二抗室温下孵育 1 h。用化学发光成像系统成像分析。β-actin 是内参。

1.3 统计学方法

每组实验均独立重复 3 次,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,使用 graphPad prism 软件绘制图像。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,MLL-AF9 与 NC 病例组织之间、miRNA-495 与 Control 组之间、STYX 与 Control 组之间、miRNA-495+STYX 与 miRNA-495 组之间都采用 t 检验,P<0.05 表示差异具有统计学意义。

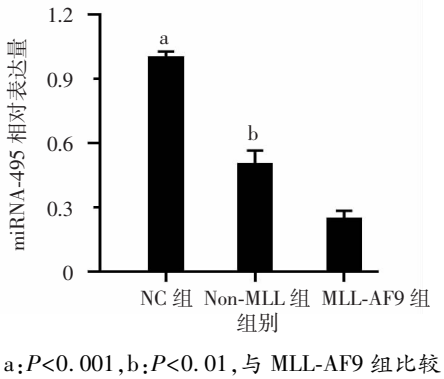
表 1 RT-qPCR 试验引物序列

基因	引物序列(5'→3')
miRNA-495	上游:AAACAAACATGGTGCA
	下游:GAGCAGGCTGGAGAA
Ki-67	上游:CGGCATTGACCATGAGC
	下游:TTAGGCATGAACTGAGT
PCNA	上游:AAGCCGAAACCAGCTAGACTTTC
	下游:TGGCGGAGTGGCAACAA
Bcl-2	上游:AACATCGCCCTGTGGATGAC
	下游:GACTTCACTTGTGGCCCAGAT
Bax	上游:TCGGGAGATGCTCATTGGAC
	下游:GACTCAGATGCCGAAGTGTG
Caspase-3	上游:GGAACCATCATACATGGAAGCG
	下游:TCACCATGGCTCAGAAGCAC
STYX	上游:TGCTATGAAAAGCAAGCTACCTG
	下游:CCCATTTGTAAGCTCCCATCAA
*U*6	上游:CTCGCTTCGGCAGCACA
	下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	上游:ACGGATTTGGTCGTATTGGGCG
	下游:CTCCTGGAAGATGGTGATGG

2 结果

2.1 miRNA-495 在 MLL-AF9 的 AML 患者中表达下调

RT-qPCR 检测 miRNA-495 在骨髓样本中的表达结果如图 1 所示,相较于正常和非 MLL 重排患者,miRNA-495 在 MLL-AF9 基因重排患者中表达明显下调(相对表达量 Non-MLL 组为 0.50±0.14,MLL-AF9 组为 0.25±0.08,NC *vs* MLL-AF9 95% *CI*:-0.86~-0.65,P<0.001;Non-MLL *vs* MLL-AF9 95% *CI*:-0.43~-0.08,P<0.01)。基于以上结果,推测 miRNA-495 可能与急性骨髓白血病的发生发展有关。



a:P<0.001,b:P<0.01,与 MLL-AF9 组比较

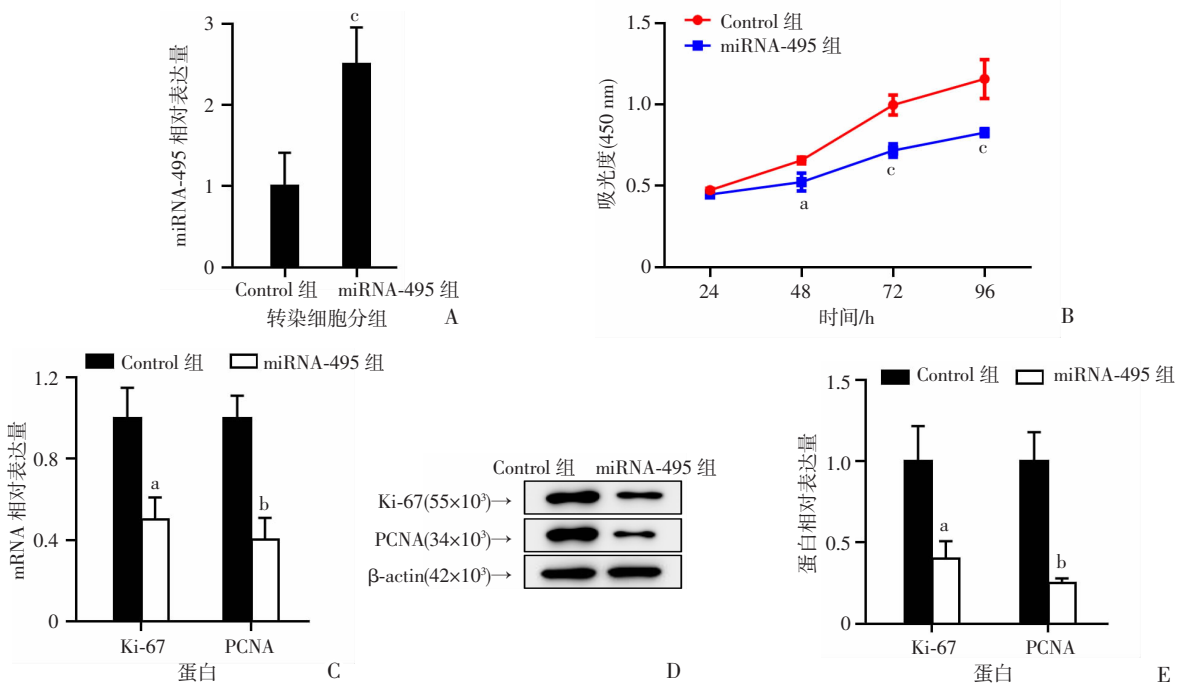
图 1 RT-qPCR 检测 miRNA-495 在不同骨髓样本中的表达 (n=10,$\bar{x}\pm s$)

2.2　miRNA-495 可以抑制 THP-1 细胞增殖

通过 RT-qPCR 检测各转染 THP-1 细胞中 miRNA-495 的表达结果显示,转染 miRNA-495 的 THP-1 细胞 miRNA-495 表达明显高于 Control 组($P<0.001$,图 2A)。CCK-8 法检测 THP-1 细胞的增殖情况结果显示:转染 24 h 后,转染 miRNA-495 的 THP-1 细胞增殖水平明显低于 Control 组($P<0.001$,图 2B)。研究还检测了增殖相关因子 Ki-67 和 PCNA 的表达水平,RT-qPCR 结果显示 miRNA-495 组的细胞增殖相关因子表达均显著低于 Control 组($P<0.01$),Western blot 实验显示出相似结果($P<0.05$,$P<0.01$,图 2C~E)。基于以上结果,推测 miRNA-495 可以通过抑制增殖相关因子的表达,从而抑制 THP-1 细胞增殖。

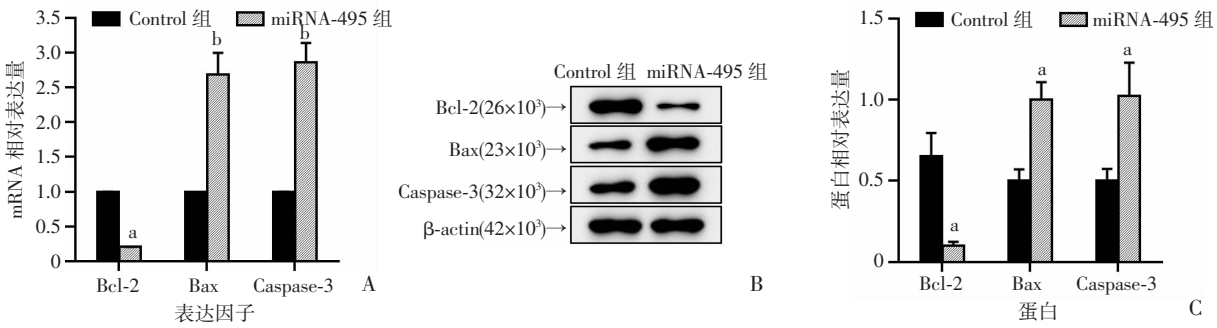
2.3　miRNA-495 可以诱导 THP-1 细胞的凋亡

为确定 miRNA-495 是否是通过诱导细胞凋亡而抑制细胞增殖,采用流式细胞术检测了各组细胞的凋亡情况。结果如图 3A 所示,miRNA-495 组的 THP-1 细胞凋亡率高于 Control 组。研究同时检测了凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达,RT-qPCR 结果显示 miRNA-495 组中 Bax 和 Caspase-3 的表达显著高于 Control 组,而 Bcl-2 则呈现显著低表达($P<0.05$,$P<0.001$,图 3A)。Western blot 实验也有相似结果($P<0.05$,图 3C)。



A:RT-qPCR 检测转染后 THP-1 细胞 miRNA-495 的表达;B:CCK-8 检测转染各组 THP-1 细胞增殖情况;C:RT-qPCR 检测各组 THP-1 细胞增殖相关因子 Ki-67、PCNA 的 mRNA 表达;D、E:Western blot 检测各组 THP-1 细胞增殖相关因子 Ki-67、PCNA 的蛋白表达与定量分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 Control 组比较

图 2　miRNA-495 抑制 THP-1 细胞增殖　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:RT-qPCR 检测各组 THP-1 细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达;B、C:Western blot 检测各组 THP-1 细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的蛋白表达　a:$P<0.05$,b:$P<0.001$,与 Control 组比较

图 3　miRNA-495 诱导 THP-1 细胞的凋亡　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.4　miRNA-495 靶向结合 STYX

采用 TargetScan 检测 miRNA-495 靶向结合 STYX 基因,并通过双荧光素酶报告基因实验验证了这一结果($P<0.001$,图 4A、B)。通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测了 STYX 在各组细胞中的转录和翻译水平,发现 miRNA-495 组中 STYX 基因表达下调($P<0.01$,图 4C),在 Western blot 实验也呈现相同的结果($P<0.01$,图 4D)。因此,miRNA-495 靶向结合 STYX 基因,并且呈现负调控。

2.5　STYX 过表达可以逆转 miRNA-495 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的影响

为了进一步确定 STYX 基因的作用,检测各组细胞中 STYX 的蛋白表达。结果显示:miRNA-495 组相较于 Control 组 miRNA-495 表达下调,而 STYX 组则相反,相较于 STYX 组,miRNA-495+STYX 组表达下调($P<0.05$,$P<0.001$,图 5A)。RT-qPCR 和 Western blot 实验检测了各组增殖相关因子 Ki-67 和 PCNA 在转录和翻译水平的表达,结果显示,miRNA-495+STYX 组中增殖相关因子的表达均高于 miRNA-495 组($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$,图 5B、C)。检测各组的凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的转录和翻译水平表达,结果显示:miRNA-495+STYX 组 Bax 和 Caspase-3 的表达均低于对照组,而 Bcl-2 则明显高于 miRNA-495 组($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$,图 5D、E)。以上结果提示 STYX 逆转了 miRNA-495 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的作用。

3　讨论

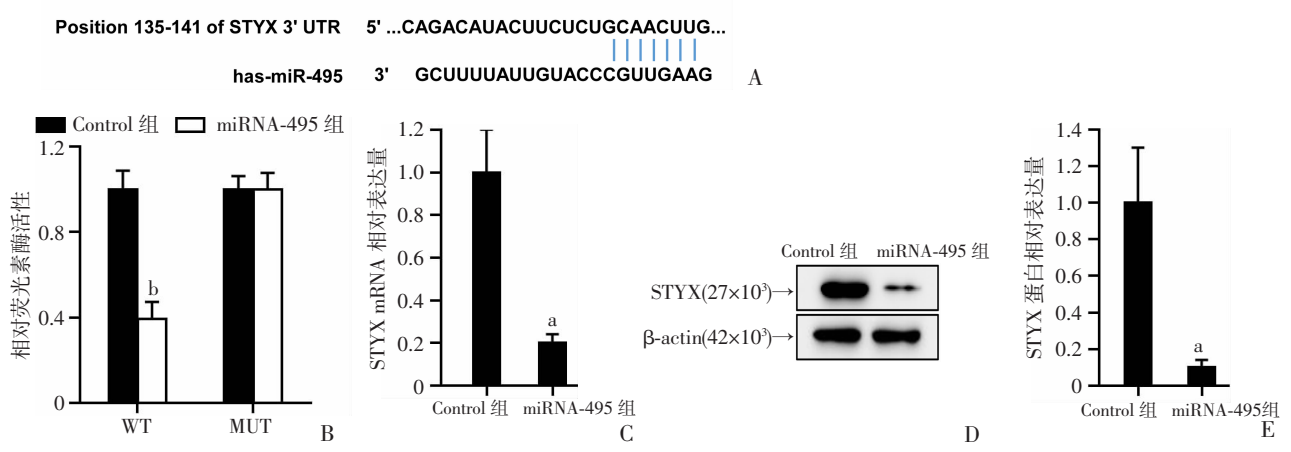
AML 是成人最常见的血液系统恶性肿瘤之一,在恶性肿瘤所致的死亡率中居于前十[1]。然而,AML 的病因及发病机制十分复杂,至今尚不清楚。AML 在临床表现、免疫分型、细胞形态学、分子生物学、细胞遗传学等各个方面都具有高度的异质性[1]。

3.1　miRNA-495 在 MLL-AF9 的 AML 患者中的抑癌作用

miRNAs 是一类广泛存在于真核细胞中的一种重要的调控因子,其通过与靶基因 mRNA 特异性的结合而导致靶 mRNA 降解或抑制其翻译,在转录后调控基因的表达,广泛参与个体发育、细胞分化、增殖、凋亡、衰老、应激等生物学过程[11]。研究发现,miRNA-495 在多种肿瘤中可作为一种抑癌基因或者原癌基因发挥作用,如非小细胞肺癌、恶性胶质瘤、胃癌和白血病、乳腺癌等[12]。然而,miRNA-495 在 MLL 基因重排的 AML 中却很少有研究。本研究通过检测 miRNA-495 在不同骨髓样本中的表达,发现相较于正常组和非 MLL 基因重排患者,miRNA-495 在 MLL 基因重排的 AML 中有着显著的表达下调。这一结果也与 miRNA-495 在肾细胞癌中的表达结果相似[12]。白血病常被人称作血癌,miRNA-495 在癌症中可作为抑癌基因,而在 MLL 基因重排的 AML 中也呈现下调,这或许与它作为抑癌基因发挥作用有关。

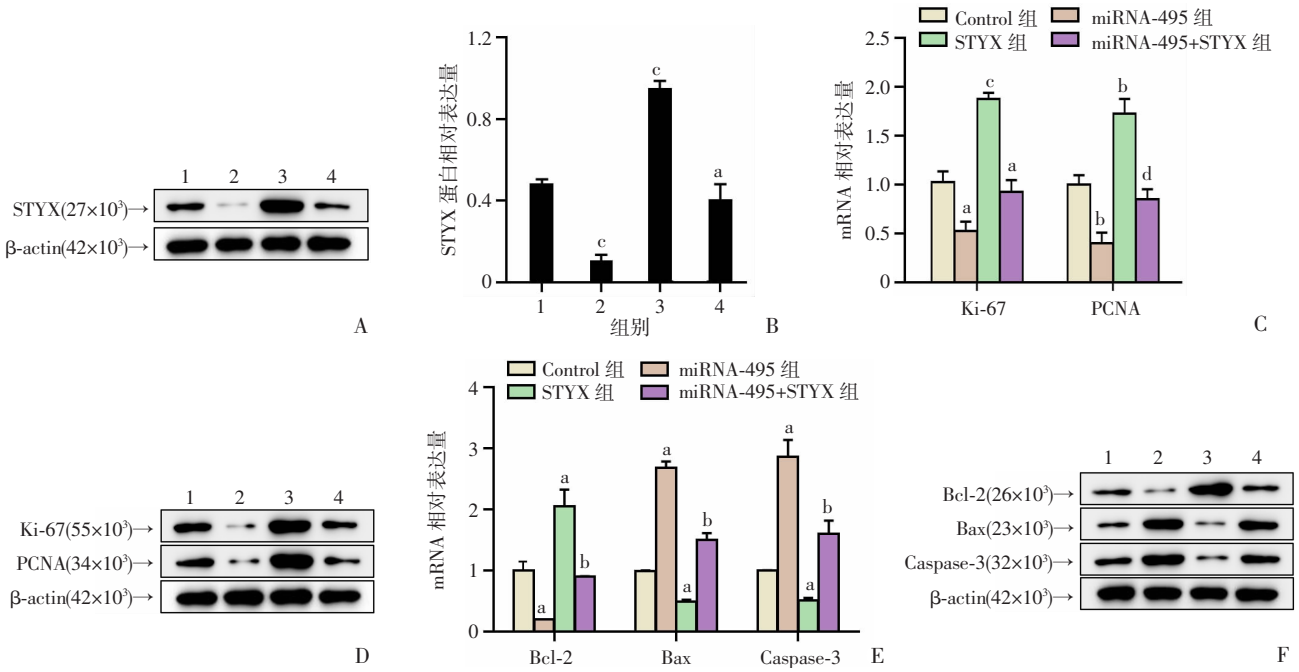
3.2　miRNA-495 过表达可以抑制 THP-1 细胞增殖并诱导细胞凋亡

现有文献表明,超过半数的急性髓系白血病存在细胞遗传学的异常,多表现为克隆性染色数量、结构或二者兼有的异常以及一些能够调控细胞增殖、分化、凋亡等功能的基因异常[13]。miRNA-495 可以通过下调 PCNA 从而抑制人血管内皮细胞增殖[14]。但是在对 LPS 刺激的人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLC)的增殖研究中发现,过表达 miRNA-495-3p 可显著促进 hPDLC 细胞的增殖[15]。在本研究中,



A:TargetScan 数据库预测 miRNA-495 靶向结合 STYX;B:双荧光素酶报告实验验证 miRNA-495 靶向结合 STYX;C:RT-qPCR 检测各组 THP-1 细胞中 STYX 的 mRNA 表达;D、E:Western blot 检测各组 THP-1 细胞中 STYX 的蛋白表达　a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 Control 组比较

图 4　miRNA-495 靶向结合 STYX　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1: Control 组;2: miR-495 组; 3:STYX 组; 4: miRNA-495+PBX3 组

A、B:Western blot 检测各组 THP-1 细胞中 STYX 的蛋白表达 a:$P<0.05$,与 miRNA-495 组比较;c:$P<0.001$,与 Control 组比较; C:RT-qPCR 检测细胞增殖相关因子 Ki-67 和 PCNA 的 mRNA 表达 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 Control 组比较; d:$P<0.05$,与 miRNA-495 组比较;D:Western blot 检测细胞增殖相关因子 Ki-67 和 PCNA 的蛋白表达;E:RT-qPCR 检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 表达 a:$P<0.05$, c:$P<0.001$,与 Control 组比较; b:$P<0.01$,与 miRNA-495 组比较; F: Western blot 检测细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的蛋白表达

图 5 过表达 STYX 可以逆转 miRNA-495 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

通过 CCK-8 检测各转染细胞 THP-1 细胞增殖情况,并检测了细胞增殖相关因子 Ki-67 和 PCNA 的转录和翻译水平的表达。结果发现,转染 miRNA-495 的 THP-1 细胞的增殖低于对照组,并且细胞增殖相关因子均表达下调。因此,本研究推断 miRNA-495 的过表达会抑制 THP-1 细胞的增殖。随后,本研究还检测了 miRNA-495 对 THP-1 细胞凋亡的影响,结果发现,转染 miRNA-495 的 THP-1 细胞中细胞凋亡相关因子转录和翻译表达均增加。因此,推断 miRNA-495 过表达可以诱导 THP-1 细胞凋亡。根据细胞增殖和细胞凋亡的结果,推测 miRNA-495 有可能是通过诱导细胞凋亡,从而抑制细胞的增殖。有研究展现了相反的结果,miRNA-495 可以抑制高糖诱导的视神经节细胞凋亡。miRNA-495 不但可以调节癌细胞的增殖和凋亡,而且可以在 THP-1 细胞中发挥同样作用。基于上述证据,提示 miRNA-495 过表达可以抑制 THP-1 细胞的增殖并诱导细胞凋亡。

3.3 miRNA-495 靶向结合 STYX 调控 THP-1 细胞的增殖凋亡

根据前文中提到的 miRNAs 通过作用于靶基因从而参与细胞增殖和凋亡等过程。本研究通过检测发现,miRNA-495 靶向结合 STYX 基因。丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸相互作用蛋白(STYX)是蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPs)家族的一个蛋白[16]。STYX 过表达可以促进结直肠癌(CRC)细胞增殖,并抑制 CRC 细胞凋亡[17]。还有研究表明 STYX 通过结合 F-box 和 WD40 域蛋白 7(FBXW7,也叫 hCDC4,Fbw7)蛋白来抑制结乳腺癌的细胞凋亡[18]。大多数研究都证明 STYX 是一个潜在的致癌基因。本研究结果发现 STYX 的表达会促进细胞增殖相关因子的表达,同时还会减弱促细胞凋亡相关因子表达,增加抑制细胞凋亡因子的表达。STYX 的表达引起的结果,与 miRNA-495 表达引起的结果完全相反。而在此之前并没有任何研究提示 STYX MLL 基因重排之间存在关联。基于 STYX 基因是 miRNA-495 的靶向结合基因,推测 STYX 的表达会促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,而 miRNA-495 则与之作用相反。当 miRNA-495 和 STYX 同时表达时,STYX 可以逆转 miRNA-495 对 THP-1 细胞增殖和凋亡的作用。基于上述证据,推测 STYX 可能是 THP-1 细胞中引起病变的关键基因,而 miRNA-495 可作为重要的调控因子,以抑制其表达。

综上所述,miRNA-495 可以通过靶向沉默 STYX,从而抑制 THP-细胞增殖并诱导细胞凋亡,为以

miRNA-495 为靶点开发新药,对 MLL 基因重排的 AML 的治疗具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] 颜金花. miR-217 在急性髓系白血病中的临床意义及其机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
YAN J H. Clinical significance and mechanism of miR-217 in acute myeloid leukemia[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.

[2] 刘之茵, 张苏江, 陈玉宝, 等. MLL 基因重排在急性白血病亚型分布及疗效分析[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(3): 177-181. DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806.2021.03.007.
LIU Z Y, ZHANG S J, CHEN Y B, *et al*. Distribution and efficacy of MLL gene rearrangement in acute leukemia subtypes[J]. J Clin Hematol, 2021, 34(3): 177-181. DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806.2021.03.007.

[3] 李昱瑛. MLL 重排白血病人源化小鼠模型的建立及系别转换的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
LI Y Y. Establishment of humanized mouse model of MLL rearranged leukemias and lineage switch determination[D]. Changchun: Jilin University, 2017.

[4] 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.
YU M X. The clinical significance and mechanism of miR-320c in acute myeloid leukemia[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.

[5] 胡超. miR-550-1 在急性髓系白血病中的抑癌作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
HU C. The anti-tumor function and mechanism of miR-550-1 in acute myeloid leukemia[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.

[6] CHU H Y, CHEN X D, WANG H Q, *et al*. MiRNA-495 regulates proliferation and migration in NSCLC by targeting MTA3[J]. Tumor Biol, 2014, 35(4): 3487-3494. DOI: 10.1007/s13277-013-1460-1.

[7] NIE S, LI K Q, HUANG Y, *et al*. MiRNA-495 mediates metabolic shift in glioma cells via targeting Glut1[J]. J Craniofacial Surg, 2015, 26(2): e155-e158. DOI: 10.1097/SCS.0000000000001385.

[8] HWANG-VERSLUES W W, CHANG P H, WEI P C, *et al*. MiRNA-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1[J]. Oncogene, 2011, 30(21): 2463-2474. DOI: 10.1038/onc.2010.618.

[9] LI Z, ZHANG G, LI D, *et al*. Methylation-associated silencing of miRNA-495 inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly targeting PRL-3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(1): 344-350. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.083.

[10] 叶敏婷. miRNA-495 调控 TSPAN12 在小细胞肺癌耐药和增殖中的作用研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
YE M T. Investigation of role for TSPAN12 in chemoresistance and proliferation of SCLC under regulation of miRNA-495[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2015.

[11] 王娜. MiR-34b 在儿童急性白血病中的表达、甲基化调控及临床意义的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
WANG N. The expression, methylated regulation and clinical significances of miR-34b in pediatric acute leukemia[D]. Suzhou: Soochow University, 2013.

[12] 吕蔡. miRNA-495 靶向 SATB1 基因对肾细胞癌调控作用的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2015.
LYU C. MicroRNA-495 suppresses human renal cell carcinoma malignancy by targeting SATB1[D]. Wuhan: Wuhan University, 2015.

[13] 刘静. MLL-AF6、MLL-AF9 及 MLL-AF10 与急性髓系白血病的临床研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
LIU J. The clinical study of MLL-AF6, MLL-AF_9 and MLL-AF10 In acute myeloid leukemia[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2015.

[14] 郑华峰, 陶晶, 张斌, 等. miRNA-495 通过下调 PCNA 抑制人血管内皮细胞增殖的作用研究[J]. 中国心血管病研究, 2016(4): 374-379. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2016.04.023.
ZHENG H F, TAO J, ZHANG B, *et al*. MiRNA-495 inhibits human vascular endothelial cells proliferation by down-regulating PCNA[J]. Chin J Cardiouasc Res, 2016, 14(004): 374-379. DOI:10.3969/j.issn.1672-5301.2016.04.023.

[15] 张帆, 余国玺, 王力锋. miRNA-495-3p 对 LPS 刺激人牙周膜细胞增殖及炎性因子表达的影响[J]. 口腔生物医学, 2017, 8(2): 86-89. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8603.2017.02.007.
ZHANG F, YU G X, WANG L F. Effect of miRNA-495-3p onthe proliferation of hPDLC and the production of inflammatory cytokines induced by LPS[J]. Oral Biomed, 2017, 8(2): 86-89. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8603.2017.02.007.

[16] TOMAR V S, BARAL T K, NAGAVELU K, *et al*. Serine/threonine/tyrosine-interacting-like protein 1 (STYXL1), a pseudo phosphatase, promotes oncogenesis in glioma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 515(1): 241-247. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.093.

[17] HE D, MA Z, FANG C, *et al*. Pseudophosphatase STYX promotes tumor growth and metastasis by inhibiting FBXW7 function in colorectal cancer[J]. Cancer Lett, 2019, 454: 53-65. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.04.014.

[18] REITERER V, FIGUERAS-PUIG C, LE GUERROUE F, *et al*. The pseudophosphatase STYX targets the F-box of FBXW7 and inhibits SCFFBXW7 function[J]. EMBO J, 2017, 36(3): 260-273. DOI: 10.15252/embj.201694795.

(**收稿**:2021-05-21;**修回**:2021-06-02)

(编辑 栾 嘉)