

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.03.011

# LncRNA PVT1 调控 miR - 1207 - 5p / FMNL2 对 HL - 60 细胞凋亡及化疗敏感性的影响\*

郭毅刚, 宋 斌, 胡 平, 张荣耀, 陈 旭, 易 琼, 万楚成<sup>△</sup>

(湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院, 湖北 十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨长链非编码 RNA 浆细胞瘤转化迁移基因 1(LncRNA PVT1)对 HL - 60 细胞生物学行为及柔红霉素敏感性的影响。方法 将 HL - 60 细胞分为对照组、miR - NC 组、PVT1 - siRNA 组、miR - 1207 - 5p inhibitor 组和 miR - 1207 - 5p mimic 组。除对照组细胞不处理外,其余各组细胞分别将 miR - NC, PVT1 - siRNA, miR - 1207 - 5p inhibitor, miR - 1207 - 5p mimic 转染到 HL - 60 细胞中。采用萤光素酶检测试剂分析 LncRNA PVT1 对微小 RNA - 1207 - 5p(miR - 1207 - 5p)和同源形成素样蛋白 2(FMNL2)的调控作用, CCK - 8 法检测细胞存活率,改良 Matrigel Boyden 室测定法测定细胞侵袭性,划痕实验检测细胞迁移力,流式细胞术检测细胞凋亡率, MTT 法检测细胞对柔红霉素敏感性,实时逆转录定量聚合酶链式反应(RT - qPCR)法检测 miR - 1207 - 5p 和 FMNL2 mRNA 表达水平,免疫印迹(Western blot)法检测 FMNL2 蛋白表达水平。结果 萤光素酶分析结果显示, LncRNA PVT1 与 miR - 1207 - 5p、miR - 1207 - 5p 与 FMNL2 均存在靶向调节作用;与对照组比较, PVT1 - siRNA 组 LncRNA PVT1 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), miR - 1207 - 5p 表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。与对照组比较, miR - 1207 - 5p inhibitor 组细胞存活率、迁移率、侵袭数均显著降低,细胞凋亡率、FMNL2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ); miR - 1207 - 5p mimic 组细胞存活率、迁移率、侵袭数均显著升高,细胞凋亡率、FMNL2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较,相同质量浓度(0, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )柔红霉素作用下 PVT1 - siRNA 组 HL - 60 细胞活力均显著升高( $P < 0.05$ )。结论 沉默 LncRNA PVT1 可使 miR - 1207 - 5p 表达增加,从而抑制 FMNL2 表达,导致 HL - 60 细胞恶性生物学行为概率升高,同时降低细胞对柔红霉素的敏感性。

**关键词:**白血病;长链非编码 RNA 浆细胞瘤转化迁移基因 1;微小 RNA - 1207 - 5p / 同源形成素样蛋白 2 通路;柔红霉素

中图分类号:R965

文献标志码:A

文章编号:1006 - 4931(2023)03 - 0044 - 06

## Effect of LncRNA PVT1 on Apoptosis and Chemosensitivity of HL - 60 Cells by Regulating miR - 1207 - 5p / FMNL2

GUO Yigang, SONG Bin, HU Ping, ZHANG Rongyao, CHEN Xu, YI Qiong, WAN Chucheng

(Taihe Hospital · Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of the long non - coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (LncRNA PVT1) on the biological behavior and the sensitivity to daunorubicin of HL - 60 cells. **Methods** HL - 60 cells were divided into the control group, miR - NC group, PVT1 - siRNA group, miR - 1207 - 5p inhibitor group and miR - 1207 - 5p mimic group. Except for the control group, the other groups were transfected with miR - NC, PVT1 - siRNA, miR - 1207 - 5p inhibitor and miR - 1207 - 5p mimic, respectively, and the control group was given no treatment. The regulatory effects of LncRNA PVT1 on the microRNA - 1207 - 5p (miR - 1207 - 5p) and formin - like 2 (FMNL2) were analyzed by the luciferase reporter gene assay kit, the survival rate of cells was detected by the CCK - 8 method, the invasiveness of cells was detected by the modified Matrigel Boyden chamber assay, the migration of cells was detected by the scratch test, the apoptosis rate of cells was detected by the flow cytometry, the sensitivity of cells to daunorubicin was detected by the MTT method, the expression levels of miR - 1207 - 5p and FMNL2 mRNA were detected by the real - time reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR), and the expression level of FMNL2 protein was detected by the Western blot. **Results** The results of luciferase analysis showed that LncRNA PVT1 had targeted regulatory effects on miR - 1207 - 5p, and miR - 1207 - 5p had targeted regulatory effects on FMNL2. Compared with those in the control group, the expression level of LncRNA PVT1 significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and the expression level of miR - 1207 - 5p significantly increased ( $P < 0.05$ ) in the PVT1 - siRNA group. Compared with those in the control group, the survival rate, migration rate and invasion number in the miR - 1207 - 5p inhibitor group significantly decreased, and the apoptosis rate, FMNL2 mRNA and protein expression levels in the miR - 1207 - 5p inhibitor group significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the control group, the survival rate, migration rate and invasion number in the miR - 1207 - 5p mimic group significantly increased, and the apoptosis rate, FMNL2 mRNA and protein expression levels in the miR - 1207 - 5p mimic group significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with that in the control group, the viability of HL - 60 cells in the PVT1 - siRNA

\*基金项目:湖北省卫生健康委员会 2021~2022 年度卫生健康科研项目[WJ2021F031]。

第一作者:郭毅刚,男,硕士研究生,主治医师,研究方向为急性白血病的复发耐药机制及临床诊治,(电子信箱)guoyig2022@163.com。

<sup>△</sup>通信作者:万楚成,男,大学本科,主任医师,研究方向为急性白血病及淋巴瘤的原发耐药,(电子信箱)youasme@yeah.net.com。

group increased significantly with the same mass concentration (0, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of daunorubicin ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The silence of LncRNA PVT1 can increase the expression of miR - 1207 - 5p, thereby inhibiting the expression of FMNL2, which leads to an increase in the probability of malignant biological behavior of HL - 60 cells, and a decrease in the sensitivity to daunorubicin.

**Key words:** leukemia; long non - coding RNA plasmacytoma variant translocation 1; microRNA - 1207 - 5p / formin - like 2 pathway; daunorubicin

急性髓性白血病是一种恶性克隆性疾病,占白血病患者人数的60%<sup>[1]</sup>。肿瘤发展过程中,基因改变导致细胞转化为癌前细胞群,最终形成具有侵袭和转移能力的肿瘤<sup>[2]</sup>。临床主要采用化学治疗,但耐药影响疗效<sup>[3]</sup>。有效、灵敏的治疗靶点在急性髓性白血病的治疗过程中显得尤为重要<sup>[4]</sup>。微小RNA(miR)是一种小型非编码RNA,参与细胞分化、迁移、凋亡等一系列过程,并可能与肿瘤患者的临床病理特征或预后有关<sup>[5-6]</sup>。其表达受多种因素影响,包括长链非编码RNA(LncRNAs)。LncRNAs是一类长度超过200个核苷酸的非蛋白质编码转录物,通过与miRNAs、mRNAs、蛋白质的相互作用发挥病理功能,长链非编码RNA浆细胞瘤转化迁移基因1(LncRNA PVT1)异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[7]</sup>。同源形成素样蛋白2(FMNL2)与多种癌症转移密切相关,可与miRNA或LncRNAs相互作用,参与肿瘤细胞的增殖和转移<sup>[8]</sup>。目前,关于LncRNA PVT1对miR - 1207 - 5p / FMNL2的调控作用尚未见报道。为此,本研究中探讨了LncRNA PVT1和miR - 1207 - 5p对HL - 60细胞增殖、侵袭、迁移及凋亡的影响。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与细胞

仪器: BSC - 1100 II B2 - X型生物安全柜, BKQ - B75型高压蒸汽灭菌锅, 博科300L型CO<sub>2</sub>细胞培养箱, 均购自中国博科公司; 5320R型4℃离心机(德国徕卡公司); 伯乐Mini - PRO TEAN型电泳仪(美国伯乐公司); EVOS M7000型倒置显微镜(意大利赛默飞公司); LAS 4000型成像系统, Bio - Rad微孔板阅读器, 均购自美国GE Healthcare公司; BD FACSCanto II型流式细胞仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

试剂: RPMI 1640培养基(批号为315484), 胎牛血清(FBS, 批号为310549), 胰蛋白酶(批号为315497), 柔红霉素(批号为948712), 均购自美国Sigma公司; Amplite 荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国AATBioquest公司, 货号AAT - 12519); Lipofectamine 3000转染试剂盒(南京建成生物有限公司, 批号为915482); V - 荧光素异硫氰酸酯(FITC)凋亡试剂盒(美国Sun - Shine公司, 批号为396765); 细胞计数试剂盒8(CCK - 8, 批

号123594), RNA提取试剂盒(批号为9451894), RNA反转录试剂盒(批号3201549), 实时逆转录定量聚合酶链反应(RT - qPCR)试剂盒(批号为3021948), 购自上海优宁维生物有限公司; FMNL2蛋白抗体(批号为661259),  $\beta$  - actin蛋白抗体(批号549258), 均购自美国Abcam公司; 山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物有限公司, 批号为614948)。

细胞: HL - 60细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

于液氮罐中取HL - 60细胞株1支, 进行细胞复苏, 将复苏后的细胞置RPMI1640培养基中, 采用细胞培养皿进行分装, 于培养箱(5%CO<sub>2</sub>, 37℃)中培养24h后更换培养基, 细胞覆盖率达70%时在培养皿中加入胰蛋白酶, 进行细胞传代。

#### 1.2.2 细胞分组、转染及荧光素酶的报告基因检测

将HL - 60细胞分为对照组、miR - NC组、PVT1 - siRNA组、miR - 1207 - 5p inhibitor组和miR - 1207 - 5p mimic组。对照组细胞不处理; miR - NC组、PVT1 - siRNA、miR - 1207 - 5p inhibitor组和miR - 1207 - 5p mimic组按Lipofectamine 3000转染试剂盒说明书方法分别将miR - NC, PVT1 - siRNA, miR - 1207 - 5p inhibitor, miR - 1207 - 5p mimic转染到HL - 60细胞, 48h后用双荧光素酶检测试剂分析miR - 1207 - 5p和FMNL2野生型/突变型(wt / mut) 荧光素酶活性。

#### 1.2.3 CCK - 8法检测细胞存活率

取对数生长期的HL - 60细胞, 在培养皿中加入1 mL胰蛋白酶轻微吹打2 min, 使细胞完全悬浮。将悬浮的细胞转移到1.5 mL离心管中离心(转速为2 000 r / min) 10 min, 弃去上清液, 加入1 mL RPMI 1640培养基, 轻轻吹打, 使细胞充分悬浮, 将细胞悬液转移至96孔板中, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 培养箱中培养24 h, 弃去96孔板中的培养基, 每孔依次加入新的RPMI 1640培养基, 各组6个复孔, 培养24 h, 弃去培养液, 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 培养液和10  $\mu\text{L}$  CCK - 8溶液, 持续培养3 h, 于450 nm波长处使用Bio - Rad型微孔板阅读器读取吸光度, 重复3次, 计

算细胞存活率。

#### 1.2.4 改良 Matrigel Boyden 室测定法测定细胞侵袭性

将对数生长期的 HL-60 细胞,按  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于有基质胶的滤膜上,滤膜的下室仓中放入 10% FBS,作为趋化剂,培养箱中培养 24 h,取出滤膜并染色,使用 EVOS M7000 型倒置显微镜对滤膜上的细胞计数。计数时,每个滤膜随机选择 5 个视野,重复 6 次,取平均值。

#### 1.2.5 划痕实验检测细胞迁移力

将对数生长期的 HL-60 细胞按  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板内,置培养箱中培养 48 h。划痕实验时吸头垂直孔壁划痕,并加入无血清培养基,划痕完成后培养 48 h,使用 EVOS M7000 型倒置显微镜观察,并分析相对迁移率。

#### 1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

使用 FITC 凋亡试剂盒,将 HL-60 细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,用  $1 \times$  结合缓冲液在  $1 \times 10^6$  个/mL 浓度下悬浮于 400  $\mu$ L V-FITC 溶液中,暗室温孵育 15 min,然后加入 PI 10  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪分析细胞,重复 6 次。

#### 1.2.7 MTT 法检测细胞对柔红霉素敏感性

将对数生长期的 HL-60 细胞,按  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板,置培养箱中常规培养 24 h。以不同质量浓度(0, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu$ g/mL)的柔红霉素处理细胞 48 h,每个剂量设置 6 个复孔,处理结束后,每孔加质量浓度为 5 g/L 的 MTT 试剂 20  $\mu$ L,4 h 后加入 150  $\mu$ L 二甲苯亚砷,采用酶标仪于 490 nm 波长处测量光密度(OD),并计算细胞增殖活力。

#### 1.2.8 总 RNA 提取及 RT-qPCR

取出培养皿放入无菌操作台,弃去培养皿中的培养液。根据 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,并利用反转录试剂盒得到 cDNA, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。RT-qPCR 体系:SYBR Green qPCR SuperMix 16.25  $\mu$ L,特异性引物 2.0  $\mu$ L,模板 cDNA 3.25  $\mu$ L,DEPC 水补足至 30  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C, 10 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 s; 60  $^{\circ}$ C, 30 s; 70  $^{\circ}$ C, 30 s; 共 40 个循环。设置 6 个复孔,根据公式( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )计算、分析 Cdc42 和 PAK1 mRNA 表达,引物序列见表 1。

#### 1.2.9 免疫印迹(Western blot)法检测细胞相关蛋白表达

取培养皿,放入无菌操作台,弃去培养皿中的培养液,加入 1 mL PBS 和 100  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液,使细胞悬浮,超声细胞破碎仪作用 2 min 破碎细胞,离心(转速 3 000 r/min, 4  $^{\circ}$ C) 20 min,取上清液,置新的 1.5 mL EP 管中。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、转膜和封闭后用特异性抗体 FMNL2 和

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers

基因	引物序列
LncRNA PVT1	F: 5' - AGCATCGATCGAGTCAAAAAGCT - 3' R: 5' - CGATCAGGATAGCGAAAT - 3'
miR - 1207 - 5p	F: 5' - ATCGGTCAGCATCGGTCA - 3' R: 5' - TTCAGTCAGCAAGAC - 3'
FMNL2	F: 5' - ATCGAGCGAGAGCTAGCTAA - 3' R: 5' - GCTAGCTACGTAATCG - 3'
GAPDH	F: 5' - GCTATAGCTGCTATTCTAGG - 3' R: 5' - CTATGATCTGAAGCAAGTCG - 3'

$\beta$ -actin(稀释浓度 1:5 000)在 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育 12 h,孵育后的条带 1% 吐温清洗 3 次,山羊抗兔二抗(稀释浓度 1:500)孵育 2 h, LAS 4000 型成像系统成像并观察结果。

#### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以  $\bar{X} \pm s$  表示,通过单因素方差分析,并采用 LSD-t 法进行多重比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

#### 2 结果

##### 2.1 LncRNA PVT1 对 miR - 1207 - 5p 和 miR - 1207 - 5p 对 FMNL2 的靶向作用

检索生物信息学网站 www. Targetscan. org,发现 LncRNA PVT1 与 miR - 1207 - 5p、miR - 1207 - 5p 与 FMNL2 均有潜在的结合位点。萤光素酶分析结果显示,LncRNA PVT1 可明显增加 miR - 1207 - 5p 的萤光素酶活性,miR - 1207 - 5p 可明显增加 FMNL2 - wt 的萤光素酶活性,表明 LncRNA PVT1 与 miR - 1207 - 5p、miR - 1207 - 5p 与 FMNL2 存在靶向调节作用。详见表 2 和图 1。

表 2 萤光素酶报告基因实验结果( $\bar{X} \pm s$ )

Tab. 2 Results of luciferase reporter gene assay ( $\bar{X} \pm s$ )

组别	LncRNA PVT1 - wt	LncRNA PVT1 - mut	FMNL2 - wt	FMNL2 - mut
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
miR - NC 组	1.05 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.05
miR - 1207 - 5p inhibitor 组	1.02 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.07 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
miR - 1207 - 5p mimic 组	1.49 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	1.03 $\pm$ 0.11	1.46 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	1.02 $\pm$ 0.08
F 值	15.068	9.041	16.275	8.021
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 miR - NC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 miR - 1207 - 5p inhibitor 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。表 3 至表 7 同。

Note: Compared with those in the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with those in the miR - NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with those in the miR - 1207 - 5p inhibitor group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (for Tab. 2 - 7).

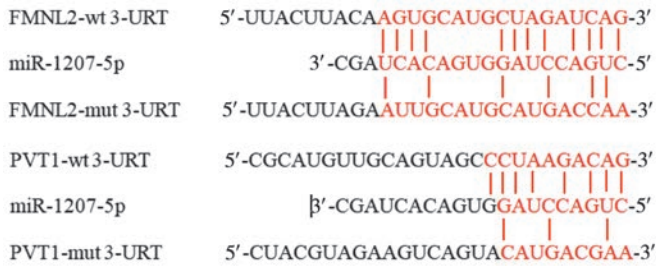


图1 Targetscan预测miR-1207-5p与LncRNA PVT1和FMNL mRNA的互补配对序列

Fig. 1 Prediction of the complementary pairing sequences of miR-1207-5p with LncRNA PVT1 and FMNL mRNA by the Targetscan

### 2.2 LncRNA PVT1对miR-1207-5p表达的影响

与对照组比较,转染PVT1-siRNA后,LncRNA PVT1表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),miR-1207-5p表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。详见表3。

表3 转染LncRNA PVT1对miR-1207-5p表达水平的影响( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

Tab. 3 Effects of transfection of LncRNA PVT1 on the expression level of miR-1207-5p ( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

组别	LncRNA PVT1( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	miR-1207-5p( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
miR-NC组	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.04
PVT1-siRNA组	0.52 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.11 <sup>ab</sup>
F值	12.053	17.063
P值	<0.001	<0.001

### 2.3 转染miR-1207-5p对细胞存活率、迁移率及侵袭力的影响

与对照组比较,miR-1207-5p inhibitor组细胞存

活率、迁移率和侵袭均数显著降低( $P < 0.05$ ),miR-1207-5p mimic组细胞存活率、迁移率和侵袭数均显著升高( $P < 0.05$ );对照组和miR-NC组无显著差异( $P > 0.05$ )。详见表4和图2。

表4 转染miR-1207-5p对细胞存活率、迁移率和侵袭力的影响( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

Tab. 4 Effects of transfection of miR-1207-5p on the survival rate, migration rate and invasiveness of cells ( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

组别	细胞存活率(%)	细胞迁移率(%)	细胞侵袭数(个)
对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	151.78 ± 11.27
miR-NC组	99.14 ± 8.26	98.79 ± 6.33	152.33 ± 10.82
miR-1207-5p inhibitor组	59.83 ± 5.10 <sup>ab</sup>	73.86 ± 6.19 <sup>ab</sup>	97.92 ± 7.09 <sup>ab</sup>
miR-1207-5p mimic组	147.19 ± 10.22 <sup>abc</sup>	136.54 ± 10.88 <sup>abc</sup>	207.58 ± 12.94 <sup>abc</sup>
F值	32.064	26.481	38.552
P值	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 转染miR-1207-5p对细胞凋亡率的影响

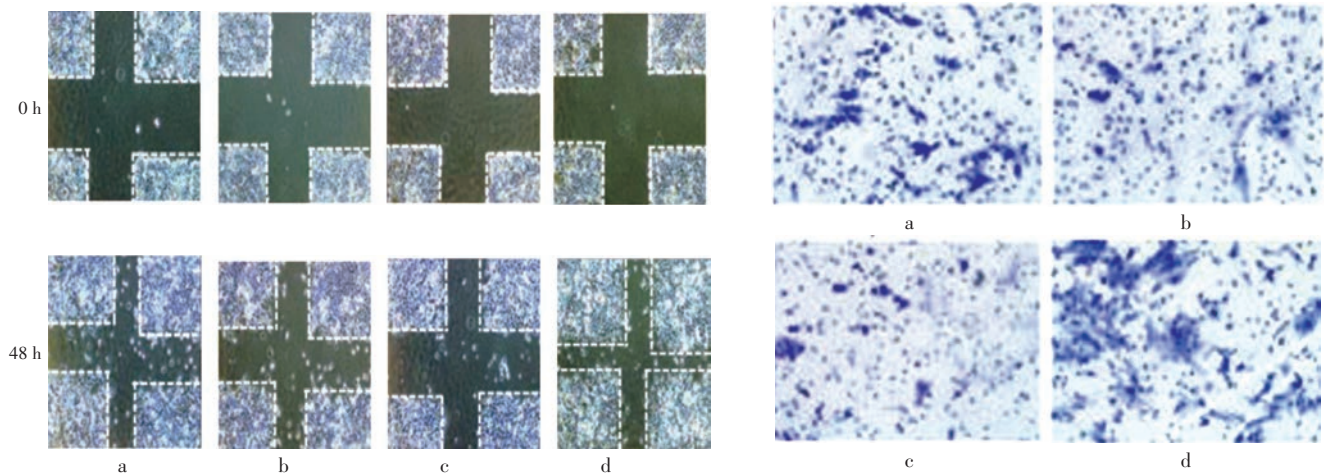
与对照组比较,miR-1207-5p inhibitor组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),miR-1207-5p mimic组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ );对照组和miR-NC组无显著差异( $P > 0.05$ )。详见图3和表5。

### 2.5 干扰LncRNA PVT1对HL-60细胞柔红霉素敏感性的影响

与对照组比较,同质量浓度柔红霉素作用下,PVT1-siRNA组HL-60细胞的活力显著升高( $P < 0.05$ )。详见表6。

### 2.6 FMNL2 mRNA和蛋白表达水平

与对照组比较,miR-1207-5p inhibitor组细胞FMNL2 mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ),

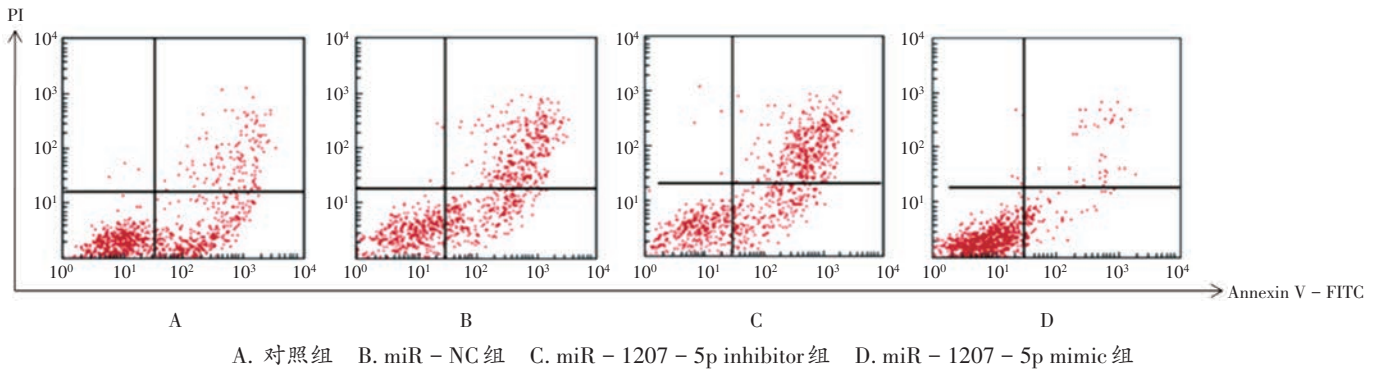


A. 迁移率 B. 侵袭力  
a. 对照组 b. miR-NC组 c. miR-1207-5p inhibitor组 d. miR-1207-5p mimic组

图2 转染miR-1207-5p对细胞的影响( $\times 400$ )

A. Migration rate B. Invasiveness  
a. Control group b. miR-NC group c. miR-1207-5p inhibitor group d. miR-1207-5p mimic group

Fig. 2 Effects of transfection of miR-1207-5p on the cells ( $\times 400$ )



A. 对照组 B. miR - NC组 C. miR - 1207 - 5p inhibitor组 D. miR - 1207 - 5p mimic组

图3 转染miR - 1207 - 5p对细胞凋亡的影响

A. Control group B. miR - NC group C. miR - 1207 - 5p inhibitor group D. miR - 1207 - 5p mimic group

Fig. 3 Effects of transfection of miR - 1207 - 5p on the apoptosis

表5 转染miR - 1207 - 5p对细胞凋亡率的影响( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

Tab. 5 Effects of transfection of miR - 1207 - 5p on the apoptosis rate ( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

组别	细胞凋亡率(%)
对照组	11.07 ± 1.12
miR - NC组	12.22 ± 1.08
miR - 1207 - 5p inhibitor组	24.13 ± 2.05 <sup>ab</sup>
miR - 1207 - 5p mimic组	5.26 ± 0.51 <sup>abc</sup>
F值	43.228
P值	< 0.001

表6 干扰LncRNA PVT1对HL - 60细胞柔红霉素敏感性的影响( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

Tab. 6 Effects of interfering the expression of LncRNA PVT1 on the sensitivity of HL - 60 cells to daunorubicin ( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

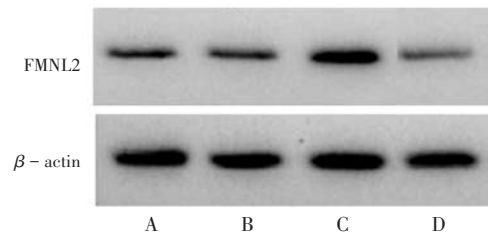
组别	0 μg/mL	0.5 μg/mL	1 μg/mL	2 μg/mL	4 μg/mL	8 μg/mL
对照组	97.12 ± 4.53	82.37 ± 3.13	72.78 ± 3.11	61.22 ± 3.08	50.16 ± 3.87	39.29 ± 3.19
PVT1 - siRNA组	94.59 ± 4.87	88.29 ± 3.26 <sup>a</sup>	81.09 ± 3.35 <sup>a</sup>	70.37 ± 3.15 <sup>a</sup>	59.23 ± 3.92 <sup>a</sup>	50.16 ± 3.88 <sup>a</sup>
t值	0.653	3.208	3.872	3.583	4.031	5.275
P值	0.582	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

miR - 1207 - 5p mimic组细胞FMNL2 mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ );对照组和miR - NC组无显著差异( $P > 0.05$ )。详见表7和图4。

表7 各组细胞FMNL2 mRNA和蛋白表达水平比较( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

Tab. 7 Comparison of FMNL2 mRNA and protein expression levels in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 6$ )

组别	FMNL2 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	FMNL2/ $\beta$ -actin
对照组	1.00 ± 0.00	0.53 ± 0.06
miR - NC组	0.98 ± 0.07	0.56 ± 0.04
miR - 1207 - 5p inhibitor组	1.42 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>ab</sup>
miR - 1207 - 5p mimic组	0.62 ± 0.05 <sup>abc</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>abc</sup>
F值	14.273	19.035
P值	< 0.001	< 0.001



A. 对照组 B. miR - NC组 C. miR - 1207 - 5p inhibitor组 D. miR - 1207 - 5p mimic组

图4 各组细胞FMNL2免疫印迹图

A. Control group B. miR - NC group C. miR - 1207 - 5p inhibitor group D. miR - 1207 - 5p mimic group

Fig. 4 Western blot of FMNL2 in each group

### 3 讨论

急性髓性白血病具有无限增殖、分化等特点,因造血干细胞堆积而抑制造血功能<sup>[9]</sup>。病程进展缓慢,早期无明显临床症状,易错过最佳治疗时间。当细胞迅速增殖和扩散,患者出现系列异常临床症状时,多已进展至晚期<sup>[10]</sup>。目前,临床主要通过手术和化疗等进行治疗,但会出现耐药,难以达到预期效果<sup>[11]</sup>。迫切需要寻找有效、新颖的检测方法,提高疾病早期的发现率,帮助预后的预测及个性化治疗。

白血病是涉及多基因、多因素、多途径的复杂疾病,分子机制在很大程度上仍未知<sup>[12]</sup>。非编码RNA参与癌症的发展,其中的miR通过调控靶基因的表达来发挥作用<sup>[13]</sup>。几乎每种癌症中都存在异常的miR谱,miR位于肿瘤基因组和肿瘤相关基因组的不稳定区域<sup>[14]</sup>。对miR在肿瘤发病机制、侵袭和转移中的作用认识取得了很大进展,但临床用于疾病诊断和治疗的miR很少。在结肠癌组织中可发现miR - 1207 - 5p的异常表达,提示miR - 1207 - 5p参与了恶性肿瘤的进展<sup>[15]</sup>。通过检测白血病患者和健康人群血清中的miR水平,两者在某些miR的表达水平上存在显著差异,提示miR可能作为致/抑癌基因参与了白血病的发生<sup>[16]</sup>。多种LncRNAs

在白血病细胞中表达异常,异常表达的LncRNAs可引起下游靶分子上调或下调,导致肿瘤细胞生物学改变,同时发现LncRNAs与淋巴结转移和肿瘤分期显著相关<sup>[17]</sup>。本研究中分别采用LncRNA PVT1和miR-1207-5p转染HL-60细胞,探讨LncRNA PVT1和miR-1207-5p对HL-60细胞增殖、侵袭、迁移及凋亡的影响。结果显示,转染PVT1-siRNA可升高miR-1207-5p的表达水平,萤光素酶报告提示低表达PVT1可靶向升高miR-1207-5p的表达,高表达miR-1207-5p可升高HL-60细胞增殖、侵袭及迁移水平,凋亡降低,提示miR-1207-5p可能是一种促白血病基因。MTT试验结果发现,同质量浓度柔红霉素作用下,PVT1-siRNA组HL-60细胞的活力显著升高,提示LncRNA PVT1的低表达可引起柔红霉素敏感性降低,可能会降低患者的化疗效果。

生物信息学分析和双萤光素酶报告基因分析证实,FMNL2是miR-1207-5p的下游结合基因,过表达miR-1207-5p可下调FMNL2。有研究显示,FMNL2在多种肿瘤中均为抑癌基因,高表达FMNL2可抑制肿瘤的发生与发展<sup>[18]</sup>。FMNL2在大多数癌症中的作用和作用机制仍有待发现。本研究中,转染miR-1207-5p inhibitor和miR-1207-5p mimic后检测细胞内FMNL2转录及翻译水平,发现HL-60细胞转染miR-1207-5p mimic后可导致细胞内FMNL2表达水平降低,升高细胞增殖、迁移及侵袭水平,同时抑制细胞凋亡,提示FMNL2在白血病中起疾病抑制作用,miR-1207-5p表达抑制FMNL2的水平,减弱疾病抑制作用。

综上所述,HL-60细胞中低表达LncRNA PVT1可靶向上调miR-1207-5p水平,上调的miR-1207-5p可通过抑制FMNL2的表达以促进细胞的增殖、侵袭和迁移,同时降低细胞凋亡水平和对柔红霉素的敏感性,不利于疾病的治疗。

#### 参考文献

[1] SUN K, ZHENG R, ZHANG S, et al. Patterns and trends of cancer incidence in children and adolescents in China, 2011 - 2015: A population - based cancer registry study[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(13): 4575 - 4586.

[2] FANG H, YABE M, ZHANG X, et al. Myelodysplastic syndrome with t(6;9) (p22;q34.1) / *DEK - NUP214* better classified as acute myeloid leukemia? A multicenter study of 107 cases[J]. *Mod Pathol*, 2021, 34(6): 1143 - 1152.

[3] IRINA B, BARBARA M, PETER K, et al. CALR - mutated essential thrombocythemia evolving to chronic myeloid leukemia with coexistent CALR mutation and BCR - ABL translocation [J]. *Blood*, 2021, 125(14): 2309 - 2311.

[4] BEWERSDORF JP, SHALLIS RM, GOWDA L, et al. Clinical

outcomes and characteristics of patients with TP53 - mutated acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes: a single center experience[J]. *Leuk Lymphoma*, 2020, 61(9): 2180 - 2190.

[5] SEO HA, MOENG S, SIM S, et al. MicroRNA - Based Combinatorial Cancer Therapy: Effects of MicroRNAs on the Efficacy of Anti - Cancer Therapies [J]. *Cells*, 2019, 9(1): 29 - 38.

[6] ZHAO M, MEI Q, LI X, et al. CUL4B / miR - 33b / C - MYC axis promotes prostate cancer progression [J]. *Prostate*, 2019, 79(5): 480 - 488.

[7] HUANG J, WANG J, HE H, et al. Close interactions between lncRNAs, lipid metabolism and ferroptosis in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(15): 4493 - 4513.

[8] DIMCHEV V, LAHMANN I, KOESTLER SA, et al. Induced Arp2 / 3 Complex Depletion Increases FMNL2 / 3 Formin Expression and Filopodia Formation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 634708.

[9] CHEN CC, LI B, MILLMAN SE, et al. Vitamin B<sub>6</sub> Addiction in Acute Myeloid Leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2021, 37(1): 71 - 84.

[10] PATEL KK, ZEIDAN AM, SHALLIS RM, et al. Cost - effectiveness of azacitidine and venetoclax in unfit patients with previously untreated acute myeloid leukemia [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(4): 994 - 1002.

[11] DAENTHANASANMAK A, LIN Y, ZHANG M, et al. Enhanced efficacy of JAK1 inhibitor with mTORC1 / C2 targeting in smoldering / chronic adult T cell leukemia [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(1): 100913 - 100922.

[12] SEDA V, VOJACKOVA E, ONDRISOVA L, et al. FoxO1 - GAB1 Axis Regulates Homing Capacity and Tonic AKT Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia [J]. *Blood*, 2021, 138(9): 758 - 772.

[13] GAO Y, WANG Y, WANG X, et al. miR - 335 - 5p suppresses gastric cancer progression by targeting MAPK10 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 71 - 79.

[14] HUA YT, XU WX, LI H, et al. Emerging roles of MiR - 133a in human cancers [J]. *J Cancer*, 2021, 12(1): 198 - 206.

[15] WANG X, WU X. The role of MicroRNA - 1207 - 5p in colorectal cancer [J]. *Clinical Lab*, 2017, 63(11): 1875 - 1882.

[16] CHEN Y, CHEN Y, CUI X, et al. Down - regulation of MALAT1 aggravates polycystic ovary syndrome by regulating MiR - 302d - 3p - mediated leukemia inhibitory factor activity [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119076 - 119084.

[17] LI L, WANG Y, SONG G, et al. HOX cluster - embedded anti-sense long non - coding RNAs in lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 450: 14 - 21.

[18] YAN Y, SU M, QIN B. CircHIPK3 promotes colorectal cancer cells proliferation and metastasis via modulating of miR - 1207 - 5p / FMNL2 signal [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(4): 839 - 846.

(收稿日期: 2022 - 04 - 12; 修回日期: 2022 - 09 - 19)