

miR-203a-5p靶向FABP4对慢性髓系白血病K562 细胞增殖、凋亡与细胞周期的影响

齐姗姗¹ 武纪生¹ 霍志刚¹ 魏玉芳¹ 王旭旭¹ 贾震宇¹ 杨林杰² 毕俊芳^{3*}

(¹石家庄市中医院肿瘤科, 石家庄 050051; ²广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 530021;

³石家庄市中医院中西医结合科, 石家庄 050051)

摘要 该研究探讨miR-203a-5p靶向FABP4对慢性髓系白血病K562细胞增殖、凋亡与细胞周期的影响。将K562细胞分为control组、miR-NC组、miR-203a-5p mimic组、miR-203a-5p mimic+pc-NC组、miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组。qRT-PCR检测细胞中miR-203a-5p、FABP4 mRNA表达水平; MTT法和Edu染色检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期; Western blot检测细胞中Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、PCNA、FABP4蛋白表达水平; 荧光素酶活性实验验证miR-203a-5p和FABP4的关系; 裸鼠移植瘤实验检测上调miR-203a-5p表达对肿瘤生长的影响。与control组和miR-NC组比较, miR-203a-5p mimic组K562细胞miR-203a-5p表达水平、细胞凋亡率、G₀/G₁期细胞比例、Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平升高, FABP4 mRNA表达水平, D₄₉₀值(24、48 h), 细胞增殖率, S期和G₂/M期细胞比例, Bcl-2、PCNA和FABP4蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较, miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组K562细胞凋亡率、G₀/G₁期细胞比例、Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平降低, FABP4 mRNA表达水平, D₄₉₀值(24、48 h), 细胞增殖率, S期和G₂/M期细胞比例, Bcl-2、PCNA和FABP4蛋白表达水平升高($P<0.05$); miR-203a-5p和FABP4存在靶向关系; 上调miR-203a-5p表达可抑制裸鼠肿瘤生长, 降低FABP4和PCNA表达水平($P<0.05$)。该研究得出上调miR-203a-5p表达可抑制FABP4表达, 进而抑制K562细胞增殖, 阻滞细胞周期, 并促进细胞凋亡。

关键词 miR-203a-5p; FABP4; 慢性髓系白血病; K562细胞; 增殖; 凋亡; 细胞周期

Effects of miR-203a-5p on Proliferation, Apoptosis, and Cell Cycle of Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells by Targeting FABP4

QI Shanshan¹, WU Jisheng¹, HUO Zhigang¹, WEI Yufang¹, WANG Xuxu¹, JIA Zhenyu¹, YANG Linjie², BI Junfang^{3*}

(¹Department of Oncology, Shijiazhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050051, China;

²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ³Department of Integrative Chinese and Western Medicine, Shijiazhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract This study was to investigate the effects of miR-203a-5p on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of chronic myeloid leukemia K562 cells by targeting FABP4. K562 cells were assigned into control group,

收稿日期: 2024-10-28

接受日期: 2025-01-06

河北省卫生健康委科研基金(批准号: 20240283)、石家庄市科学技术研究与发展计划(批准号: 221460333)和河北省中医药管理局科研计划(批准号: 2023152)资助的课题

*通信作者。Tel: 15832188745, E-mail: xymmx80@163.com

Received: October 28, 2024

Accepted: January 6, 2025

This work was supported by the Research Fund of Hebei Provincial Health Commission (Grant No.20240283), the Shijiazhuang Science and Technology Research and Development Plan (Grant No.221460333) and the Research Plan of Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.2023152)

*Corresponding author. Tel: +86-15832188745, E-mail: xymmx80@163.com

miR-NC group, miR-203a-5p mimic group, miR-203a-5p mimic+pc-NC group, and miR-203a-5p mimic+pc-FABP4 group. qRT-PCR was applied to detect the mRNA expression levels of miR-203a-5p and *FABP4* in cells. MTT assay and Edu staining were applied to detect cell proliferation. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis and cell cycle. Western blot was applied to detect the expression levels of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, PCNA, and FABP4 proteins in cells. Luciferase activity experiment verified the relationship between miR-203a-5p and *FABP4*. The nude mouse transplant tumor experiment was applied to detect the effect of upregulating miR-203a-5p expression on tumor growth. Compared with the control group and miR-NC group, the expression level of miR-203a-5p, apoptosis rate, G₀/G₁ phase cell ratio, the protein expression levels of Bax and cleaved caspase-3 in K562 cells were higher in the miR-203a-5p mimic group, the expression level of *FABP4* mRNA, *D*₄₉₀ (24, 48 h) values, cell proliferation rate, proportions of S and G₂/M phase cells, the protein expression levels of Bcl-2, PCNA, and FABP4 were lower ($P < 0.05$). Compared with the miR-203a-5p mimic+pc-NC group, the apoptosis rate, G₀/G₁ phase cell ratio, the protein expression levels of Bax and cleaved caspase-3 in K562 cells were lower in the miR-203a-5p mimic+pc-FABP4 group, the expression level of *FABP4* mRNA, *D*₄₉₀ (24, 48 h) values, cell proliferation rate, proportions of S and G₂/M phase cells, the protein expression levels of Bcl-2, PCNA, and FABP4 were higher ($P < 0.05$). There was a targeted relationship between miR-203a-5p and *FABP4*. Upregulation of miR-203a-5p expression could inhibit tumor growth in nude mice and reduce the expression levels of FABP4 and PCNA ($P < 0.05$). This study concluded that up-regulation of miR-203a-5p expression could inhibit FABP4 expression, thereby inhibiting K562 cell proliferation, blocking cell cycle, and promoting cell apoptosis.

Keywords miR-203a-5p; FABP4; chronic myeloid leukemia; K562 cells; proliferation; apoptosis; cell cycle

慢性髓系白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种血液系统恶性肿瘤,患者血液中粒细胞恶性增殖,且细胞发育不良,无正常粒细胞功能,威胁患者生命健康^[1]。CML患者的治疗主要为酪氨酸激酶抑制剂如伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼等药物治疗或干细胞移植治疗,可极大提高CML患者生存率,但仍有部分患者对酪氨酸激酶抑制剂耐药,且长期服用这些药物有一定副作用^[2-3]。因此探究CML的发病机制和新的靶点并从分子角度干预治疗CML是目前医学工作者的研究热点。miRNA是一类单链小分子非编码RNA,具有调节基因表达的作用,通过与其下游靶基因互补结合,可参与调控细胞生理代谢过程,研究显示,miRNA的表达异常与肿瘤的发生发展有关^[4]。研究显示上调miR-203a-5p表达可抑制多发性骨髓瘤细胞增殖,阻滞细胞周期,抑制肿瘤生长^[5]。miR-203a-5p过表达可调控伊马替尼耐药K562细胞中谷胱甘肽代谢,降低K562细胞耐药性,抑制CML进展^[6]。推测miR-203a-5p参与调控肿瘤细胞恶性生物学行为。FABP4是一种脂类伴侣蛋白,参与脂质在细胞中的代谢,研究显示FABP4可促进癌细胞恶性生物学行为^[7]。FABP4在直肠癌组

织和细胞中高表达,沉默FABP4表达可抑制直肠癌细胞恶性生物学行为^[7]。FABP4可增强乳腺癌细胞脂肪分解,促进乳腺癌细胞迁移^[8]。推测FABP4参与肿瘤进展,生物信息学预测分析发现miR-203a-5p和*FABP4*存在靶向结合位点。miR-203a-5p是否可调控FABP4影响CML进展尚无报道。因此本研究探讨miR-203a-5p是否可调控FABP4表达来影响慢性髓系白血病K562细胞增殖、凋亡与细胞周期。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 慢性髓系白血病K562细胞购自上海康郎生物科技有限公司;12只SPF级BALB/c裸鼠购自广西医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、MTT和Edu试剂盒购自武汉福来德生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒、胰蛋白酶和qRT-PCR试剂盒购自上海威奥生物科技有限公司;FABP4、 β -actin、Bcl-2、cleaved caspase-3、Bax、PCNA一抗及二抗购自英国Abcam公司;miR-203a-5p模拟物miR-203a-5p mimics及其阴性对照miR-NC、FABP4过表达质粒pc-FABP4)及

其阴性对照 pc-NC、慢病毒空载 (LV-NC)、过表达 miR-203a-5p 慢病毒 (LV-miR-203a-5p) 组购自上海吉凯基因医学科技有限公司; SEDIB 型 qRT-PCR 仪器购自北京好亿科技发展有限公司; 星曜-200B 全波长多功能酶标仪购自南京炯创科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 验证 miR-203a-5p 与 FABP4 的靶向关系 构建 FABP4 野生型和突变型质粒 (FABP4-WT 和 FABP4-MUT) (图1), 将 miR-NC 和 miR-203a-5p mimic 分别与两种质粒共转染于 K562 细胞, 48 h 后, 检测荧光素酶活性。

1.2.2 细胞分组与转染 将对数生长期的 K562 细胞分为 control 组、miR-NC 组、miR-203a-5p mimic 组、miR-203a-5p mimic+pc-NC 组、miR-203a-5p mimic+pc-FABP4 组; miR-NC 组转染 miR-NC, miR-203a-5p mimic 组转染 miR-203a-5p mimic, miR-203a-5p mimic+pcDNA 组转染 miR-203a-5p mimic 和 pcDNA, miR-203a-5p mimic+pcDNA-FABP4 组转染 miR-203a-5p mimic 和 pcDNA-FABP4, 用 Lipofectamine 2000 试剂分别将对应质粒转染到 K562 细胞, 48 h 后进行后续实验, control 组正常培养。

1.2.3 qRT-PCR 检测细胞中 miR-203a-5p 和 FABP4 的表达量 提取细胞中总 RNA 并将其逆转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 扩增 cDNA。引物 miR-203a-5p: 正向 5'-GTG CAG GGT CCG AGG TAA TGT CTT-3', 反向 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; FABP4: 正向 5'-GCC AGG AAT TTG ACG AAG TCA C-3', 反向 5'-TTC TGC ACA TGT ACC AGG ACA C-3'; U6: 正向 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; GAPDH: 正向 5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3', 反向 5'-AAT GGT CGT TGA GGG CAA TG-3'。以 U6 和 GAPDH 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-203a-5p、FABP4 的相对表达量。

1.2.4 MTT 法、Edu 染色检测细胞增殖 MTT 法:

将细胞以 5×10^4 个/孔接种到 96 孔板中培养, 在 24 h 和 48 h 时于各孔中加入 20 μ L 的 MTT 溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 再加入 150 μ L 的 DMSO 溶液, 溶解后酶标仪测定吸光度 (D) 值 (490 nm 处)。

Edu 染色: 将细胞接种到 24 孔板 (5×10^4 个/孔) 中, 培养 36 h 后于各孔中加入适量 Edu 孵育 2 h (37 $^{\circ}$ C), 按照 Edu-555 增殖检测试剂盒步骤进行 Edu 及 DAPI 染色, 荧光显微镜拍照, ImageJ 软件分析图像, 细胞增殖率 = Edu 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 细胞凋亡和细胞周期检测 细胞凋亡实验: 4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 5 min 收集各组 K562 细胞, 重悬后加入 24 孔板, 用 5 mL 的 Annexin V-FITC 试剂与 5 mL 的 PI 试剂染色, 室温孵育 15 min (避光), 上机 (流式细胞仪) 检测细胞凋亡。

细胞周期实验: 4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 5 min 收集各组 K562 细胞, 用冷 PBS 清洗, 用 70% 乙醇固定过夜 (4 $^{\circ}$ C), 再 4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 5 min 收集细胞, PBS 清洗, 加入 RNase 溶解酶 5 mL, 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h, 加入 PI 染色液室温避光孵育 0.5 h, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 蛋白表达检测 4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g 离心 5 min 收集各组 K562 细胞, 裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白质, 定量分析蛋白, 将蛋白热水浴变性后电泳并转膜, 室温封闭 2 h; 加入 Bax、PCNA、Bcl-2、FABP4、 β -actin、cleaved caspase-3 (稀释比例 1:1 500) 兔抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后加入二抗 (稀释比例 1:5 000) 室温孵育, 用 ECL 染色, Image-Pro Plus 分析蛋白质灰度值。

1.2.7 裸鼠移植瘤实验 将 12 只 BALB/c 裸鼠随机分为慢病毒空载 (LV-NC) 组、过表达 miR-203a-5p 慢病毒 (LV-miR-203a-5p) 组, 分别皮下注射 200 μ L (2×10^7 个) LV-NC 和 LV-miR-203a-5p 转染的 K562 细胞, 观察移植瘤生成情况, 30 天后处死裸鼠, 切下肿瘤, 称重, qRT-PCR 检测肿瘤组织中 miR-203a-5p 和 FABP4 基因表达水平, 免疫组化检测肿瘤组织中 FABP4 和 PCNA 蛋白表达情况。本研究已通过广西

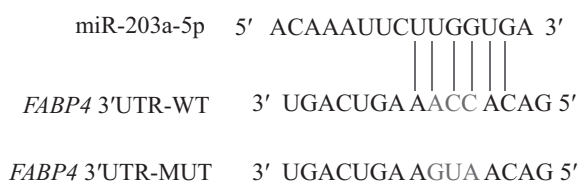


图1 miR-203a-5p 和 FABP4 互补核苷酸序列

Fig.1 Complementary nucleotide sequences of miR-203a-5p and FABP4

医科大学第一附属医院医学实验动物伦理委员会审核批准(批准号: 2023-D006-01)。

1.2.8 免疫组织化学染色法 用4%多聚甲醛4 °C固定肿瘤组织, 石蜡包埋切片, 脱蜡后过氧化氢室温孵育15 min, 柠檬酸修复, 山羊血清封闭, 加入一抗PCNA(1:200) 4 °C孵育过夜, 加入二抗(1:500)室温孵育2 h, DAB显色为棕黄色, 苏木精复染, 脱水透明, 封片, 显微镜观察, 细胞核成棕褐色或棕黄色为阳性细胞, 细胞增殖指数(PI)=阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.3 统计分析

数据分析用Graphpad Prism 8.0.1, 数据用($\bar{x}\pm s$)表示, 单因素方差分析多组间差异, SNK-*q*检验组内两两差异, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FABP4和miR-203a-5p靶向关系验证

miR-203a-5p与FABP4的结合位点(TargetScan

网站预测)如图2所示。miR-203a-5p mimic+FABP4-WT组细胞荧光素酶活性低于miR-NC+FABP4-WT组($P<0.05$)。见表1。

2.2 上调miR-203a-5p表达对各组K562细胞中miR-203a-5p和FABP4表达水平的影响

miR-203a-5p mimic组K562细胞miR-203a-5p表达水平高于control组和miR-NC组, FABP4 mRNA表达水平低于control组和miR-NC组($P<0.05$); miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组K562细胞FABP4 mRNA表达水平高于miR-203a-5p mimic+pc-NC组($P<0.05$)。见表2。

2.3 上调miR-203a-5p表达对各组K562细胞增殖能力的影响

miR-203a-5p mimic组K562细胞 D_{490} 值(24、48 h)和细胞增殖率低于control组和miR-NC组($P<0.05$); miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组K562细胞 D_{490} 值(24、48 h)和细胞增殖率高于miR-203a-5p



图2 FABP4和miR-203a-5p的结合位点

Fig.2 Binding sites of FABP4 and miR-203a-5p

表1 荧光素酶活性比较

Table 1 Comparison of luciferase activities

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity
miR-NC+FABP4-WT	1.04±0.06
miR-203a-5p mimic+FABP4-WT	0.39±0.04*
miR-NC+FABP4-MUT	1.01±0.07
miR-203a-5p mimic+FABP4-MUT	1.08±0.09

$n=6$; * $P<0.05$, 与miR-NC+FABP4-WT组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with miR-NC+FABP4-WT group.

表2 各组K562细胞中miR-203a-5p和FABP4基因表达水平比较

Table 2 Comparison of miR-203a-5p and FABP4 gene expression levels in K562 cells of each group

分组 Groups	miR-203a-5p	FABP4 mRNA
Control	1.00±0.01	1.01±0.01
miR-NC	1.01±0.02	1.00±0.01
miR-203a-5p mimic	1.92±0.11**	0.38±0.03**
miR-203a-5p mimic+pc-NC	1.89±0.09	0.39±0.03
miR-203a-5p mimic+pc-FABP4	1.91±0.08	0.76±0.05*

$n=6$; * $P<0.05$, 与control组比较; ** $P<0.05$, 与miR-NC组比较; * $P<0.05$, 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with miR-NC group; * $P<0.05$ compared with miR-203a-5p mimic+pc-NC group.

mimic+pc-NC组($P<0.05$)。见图3和表3。

2.4 上调miR-203a-5p表达对各组K562细胞凋亡的影响

miR-203a-5p mimic组 K562细胞凋亡率高于 control组和 miR-NC组 ($P<0.05$); miR-203a-5p

mimic+pc-FABP4组 K562细胞凋亡率低于 miR-203a-5p mimic+pc-NC组($P<0.05$)。见图4和表4。

2.5 上调miR-203a-5p表达对各组K562细胞周期的影响

miR-203a-5p mimic组 K562细胞 G₀/G₁期细胞比

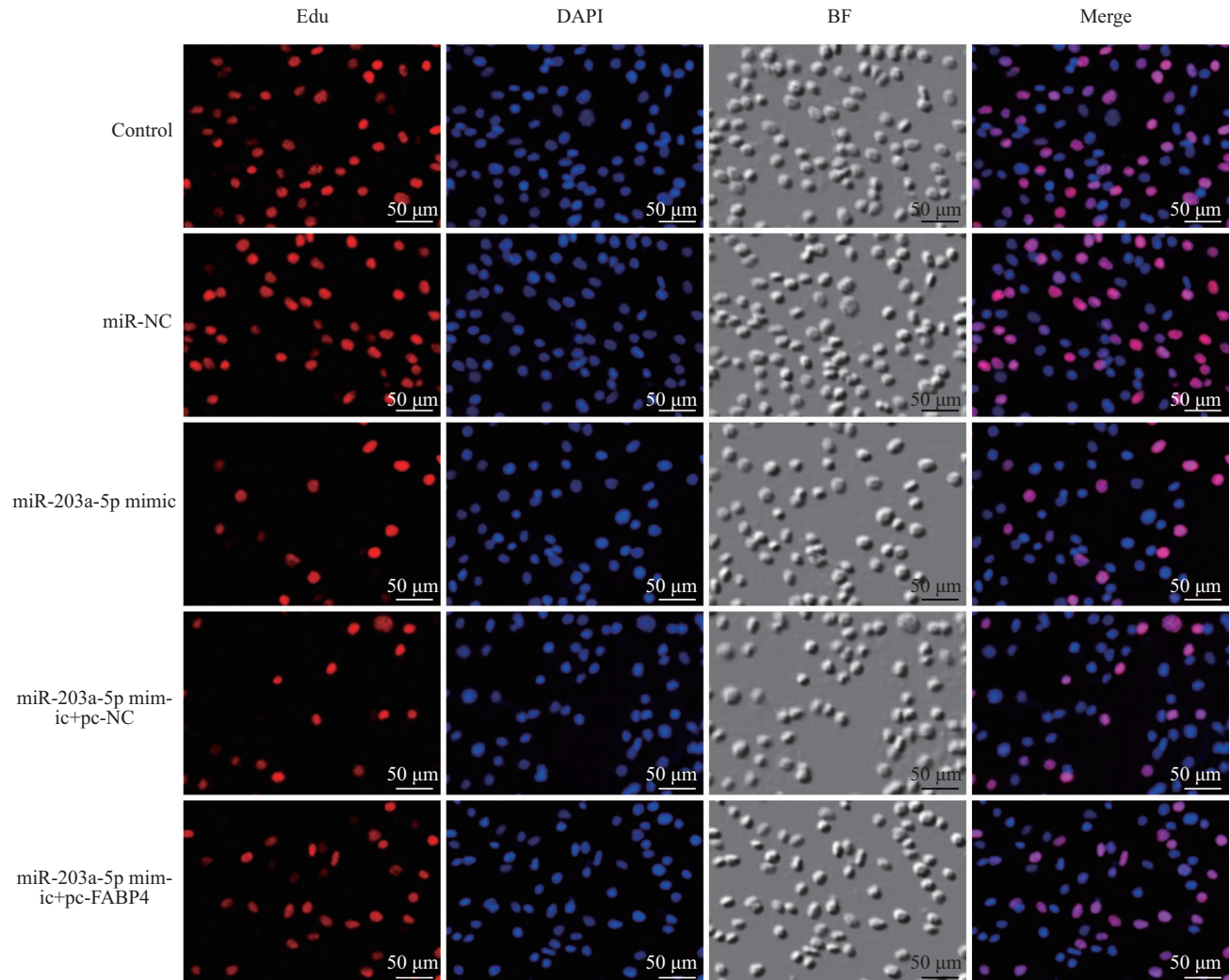


图3 Edu染色结果

Fig.3 Edu staining results

表3 各组K562细胞 D_{490} 值和增殖率比较

Table 3 Comparison of D_{490} value and proliferation rate of K562 cells in each group

分组 Groups	增殖率/% Proliferation rate /%	D_{490}	
		24 h	48 h
Control	62.78±5.39	0.40±0.02	0.76±0.05
miR-NC	61.43±4.86	0.41±0.03	0.78±0.06
miR-203a-5p mimic	23.81±2.57* [#]	0.24±0.02* [#]	0.46±0.03* [#]
miR-203a-5p mimic+pc-NC	22.53±2.64	0.25±0.03	0.45±0.03
miR-203a-5p mimic+pc-FABP4	48.36±5.12 ^{&}	0.34±0.03 ^{&}	0.64±0.04 ^{&}

$n=6$; * $P<0.05$, 与control组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-NC组比较; [&] $P<0.05$, 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; [#] $P<0.05$ compared with miR-NC group; [&] $P<0.05$ compared with miR-203a-5p mimic+pc-NC group.

例高于control组和miR-NC组, S期和G₂/M期细胞比例低于control组和miR-NC组($P<0.05$); miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组K562细胞G₀/G₁期细胞比例低于miR-203a-5p mimic+pc-NC组, S期和G₂/M期细胞比例高于miR-203a-5p mimic+pc-NC组($P<0.05$)。见图5和表5。

2.6 上调miR-203a-5p表达对各组K562细胞Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、PCNA和FABP4蛋白表达的影响

miR-203a-5p mimic组K562细胞Bax和cleaved

caspase-3蛋白表达水平高于control组和miR-NC组, Bcl-2、PCNA和FABP4蛋白表达水平低于control组和miR-NC组($P<0.05$); miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组K562细胞Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平低于miR-203a-5p mimic+pc-NC组, PCNA、Bcl-2和FABP4蛋白表达水平高于miR-203a-5p mimic+pc-NC组($P<0.05$)。见图6和表6。

2.7 上调miR-203a-5p表达对裸鼠移植瘤生长的影响

LV-miR-203a-5p组裸鼠移植瘤质量、FABP4

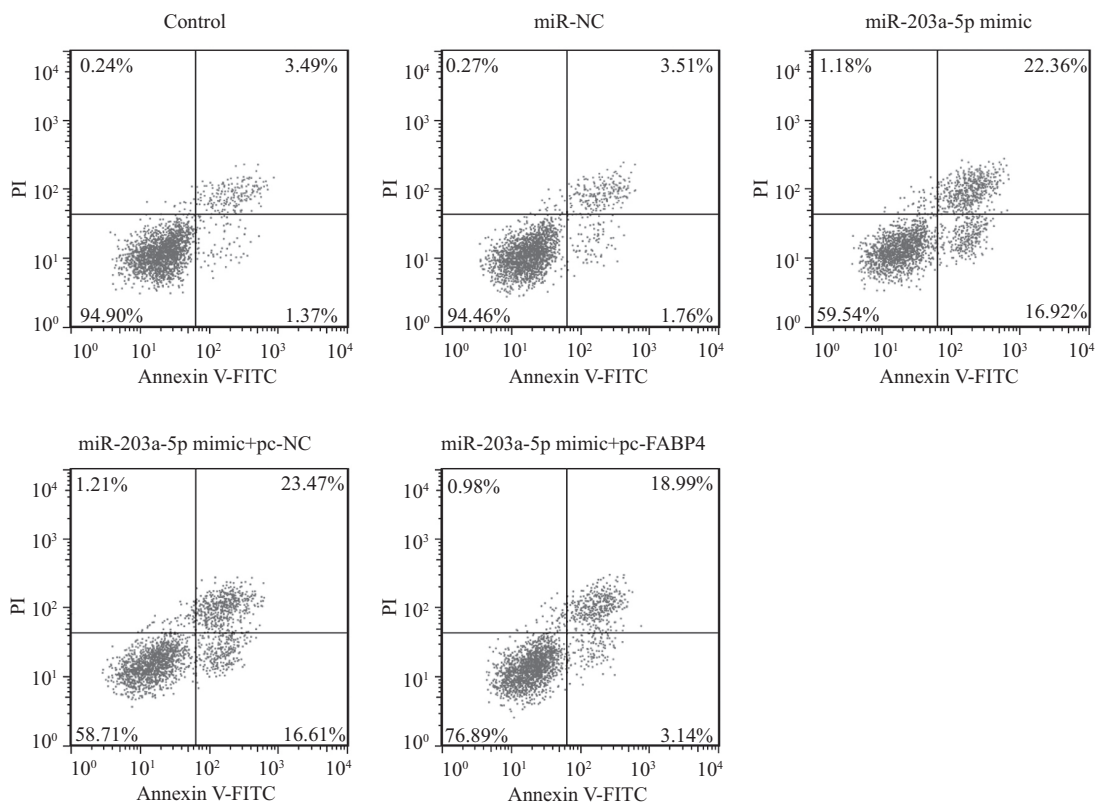


图4 各组细胞凋亡结果

Fig.4 Apoptosis results in each group

表4 各组K562细胞凋亡率比较

Table 4 Comparison of apoptosis rates of K562 cells in each group

分组	凋亡率/%
Groups	Apoptosis rate /%
Control	4.78±0.62
miR-NC	5.06±0.73
miR-203a-5p mimic	38.54±4.16*#
miR-203a-5p mimic+pc-NC	39.27±4.28
miR-203a-5p mimic+pc-FABP4	21.63±2.57 [△]

$n=6$; * $P<0.05$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与miR-NC组比较; [△] $P<0.05$, 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with miR-NC group; [△] $P<0.05$ compared with miR-203a-5p mimic+pc-NC group.

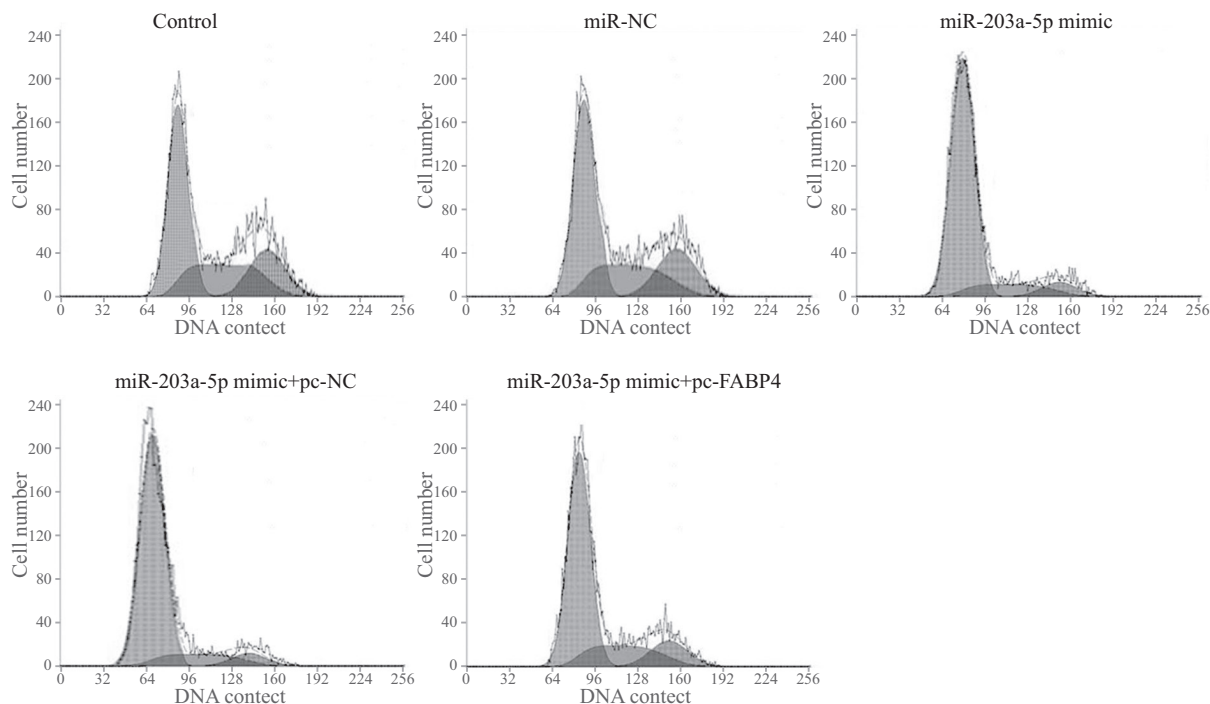


图5 各组细胞周期图

Fig.5 Cell cycle of each group

表5 上调miR-203a-5p对各组K562细胞周期的影响

Table 5 Effects of up-regulation of miR-203a-5p on K562 cell cycle in each group

组别 Groups	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	43.38±3.26	25.74±1.82	30.88±2.31
miR-NC	44.67±3.24	23.36±2.24	31.97±2.46
miR-203a-5p mimic	81.53±5.27*#	9.78±0.87*#	8.69±0.73*#
miR-203a-5p mimic+pc-NC	82.46±5.63	9.38±0.81	8.16±0.67
miR-203a-5p mimic+pc-FABP4	61.82±4.57 [⊗]	18.72±1.73 [⊗]	19.46±1.59 [⊗]

n=6; *P<0.05, 与control组比较; #P<0.05, 与miR-NC组比较; [⊗]P<0.05, 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较。

n=6; *P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with miR-NC group; [⊗]P<0.05 compared with miR-203a-5p mimic+pc-NC group.

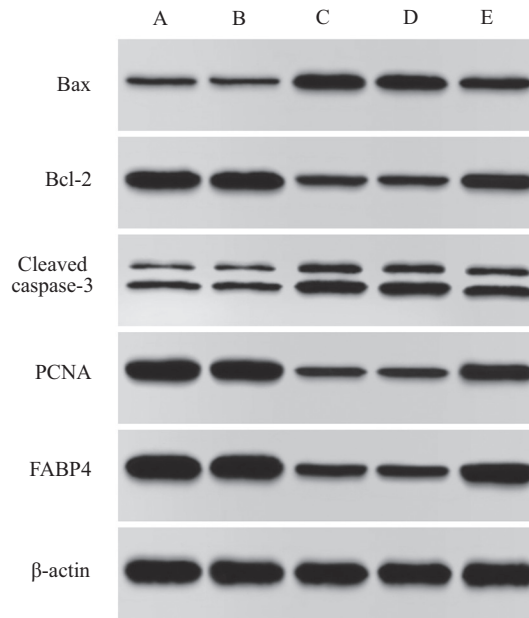
mRNA表达水平、FABP4阳性率和PCNA阳性率低于LV-NC组, miR-409-3p表达水平高于LV-NC组 ($P<0.05$)。见图7、图8和表7。

3 讨论

CML是一种来源于造血干细胞的克隆性骨髓增生性疾病^[9]。CML的特点是外周血白细胞数量持续进行性增多, 并出现不同分化阶段的粒细胞, 尤其是中性粒细胞增加^[10]。目前, 传统的CML化疗药物无法特异性靶向肿瘤组织, 引起副作用和不良反应, 导致肿瘤细胞对治疗的敏感性降低, 形成早期耐药^[11]。研究显示, CML的发生机制与基因表达异常有关, 因此探究CML发生的分子机制并从分子角度干预可能

是治疗CML的一种有效手段。miRNA是一种含有20~22个碱基的非编码RNA, 研究显示, miRNA通过与mRNA的碱基互补配对调控mRNA的表达, 进而参与调控细胞增殖和凋亡过程^[12]。miR-203a-5p在皮肤、肺组织和脑组织中均有表达, 在多种肿瘤中转录水平降低, 提高其表达水平可抑制肿瘤细胞恶性生物学行为, 研究表明miR-203a-5p可降低伊马替尼耐药CML细胞的耐药性, 进而提高CML的治疗效果^[13]。过表达miR-203a-5p可抑制口腔鳞状癌细胞恶性生物学行为^[14]。推测miR-203a-5p有抑制肿瘤细胞恶性生物学行为的特性。

CML是一种骨髓造血干细胞恶性增殖形成的肿瘤, 骨髓造血干细胞具有很强的增殖能力, PCNA



A: control组; B: miR-NC组; C: miR-203a-5p mimic组; D: miR-203a-5p mimic+pc-NC组; E: miR-203a-5p mimic+pc-FABP4组。

A: control group; B: miR-NC group; C: miR-203a-5p mimic group; D: miR-203a-5p mimic+pc-NC group; E: miR-203a-5p mimic+pc-FABP4 group.

图6 各组K562细胞中Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、PCNA、FABP4蛋白表达

Fig.6 Expression of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, PCNA, and FABP4 in K562 cells of each group

表6 各组K562细胞Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、PCNA和FABP4蛋白表达比较

Table 6 Comparison of protein expression of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, PCNA, and FABP4 in K562 cells of each group

组别 Groups	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase-3	PCNA	FABP4
Control	0.86±0.10	0.19±0.03	0.27±0.04	1.03±0.12	1.18±0.14
miR-NC	0.89±0.11	0.18±0.03	0.26±0.03	1.01±0.12	1.21±0.15
miR-203a-5p mimic	0.31±0.05*#	0.76±0.09*#	0.94±0.12*#	0.39±0.05*#	0.46±0.06*#
miR-203a-5p mimic+pc-NC	0.32±0.05	0.75±0.09	0.92±0.12	0.37±0.05	0.48±0.07
miR-203a-5p mimic+pc-FABP4	0.68±0.09 ^{&}	0.42±0.06 ^{&}	0.51±0.07 ^{&}	0.78±0.09 ^{&}	0.97±0.12 ^{&}

$n=6$; * $P<0.05$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与miR-NC组比较; & $P<0.05$, 与miR-203a-5p mimic+pc-NC组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with miR-NC group; & $P<0.05$ compared with miR-203a-5p mimic+pc-NC group.

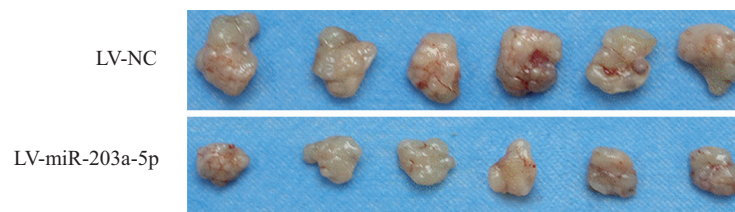


图7 各组裸鼠肿瘤形态

Fig.7 Tumor morphology of nude mice in each group

是一种细胞核增殖抗原,只存在于正常增殖细胞和肿瘤细胞中,可促进细胞DNA合成,启动细胞增殖,反映细胞增殖的状态^[15]。细胞增殖分为几个周期,G₀期是细胞静止期;G₁期主要是合成DNA复制所需要的mRNA和蛋白质;S期主要是DNA复制期;G₂期

是细胞快速增长以及有丝分裂期之前的蛋白质合成期;M期是细胞有丝分裂期。细胞周期受到胞内多种信号调控,当某种信号缺失时,细胞周期被阻滞,细胞增殖受到抑制^[16]。本研究结果显示,与control组和miR-NC组比较,miR-203a-5p mimic组K562细胞

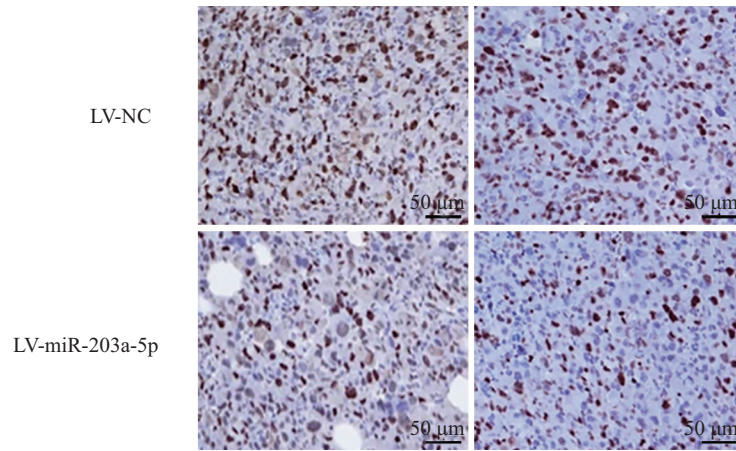


图8 各组裸鼠肿瘤组织FABP4和PCNA蛋白表达情况

Fig.8 FABP4 and PCNA protein expression in tumor tissue of nude mice in each group

表7 上调miR-203a-5p表达对裸鼠移植瘤生长的影响

Table 7 Effects of upregulation of miR-203a-5p expression on the growth of transplanted tumor in nude mice

组别 Groups	移植瘤质量/g Transplanted tumor weight /g	miR-203a-5p	FABP4 mRNA	FABP4阳性率/% Positive rate of FABP4 /%	PCNA阳性率/% PCNA positive rate /%
LV-NC	0.94±0.11	1.00±0.01	1.00±0.01	53.38±5.67	38.46±3.51
LV-miR-203a-5p	0.42±0.05*	1.78±0.03*	0.45±0.03*	26.93±2.84*	15.28±1.72*

$n=6$; * $P<0.05$, 与LV-NC组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with LV-NC group.

S期和G₂/M期细胞比例、PCNA蛋白表达水平明显降低, G₀/G₁期细胞比例明显升高, 提示过表达miR-203a-5p可阻滞细胞周期, 抑制细胞增殖。细胞增殖实验也进一步证实过表达miR-203a-5p可降低K562细胞D₄₉₀值(24、48 h)和细胞增殖率。cleaved caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白可调控细胞凋亡过程, cleaved caspase-3蛋白是细胞凋亡通路下游凋亡蛋白酶, 可以激活激酶级联反应, 诱导细胞凋亡, 是细胞凋亡的标志蛋白^[17]。Bax蛋白可激活多种凋亡蛋白表达, 诱导细胞结构破坏, 促进细胞凋亡; Bcl-2蛋白可抑制多种凋亡蛋白表达, 减轻细胞结构损伤, 抑制细胞凋亡^[18]。本研究结果显示, 与control组和miR-NC组比较, miR-203a-5p mimic组K562细胞Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平升高, Bcl-2蛋白表达水平降低, 通过细胞凋亡实验进一步证实miR-203a-5p mimic组K562细胞凋亡率明显升高。裸鼠移植瘤实验结果也表明, 上调miR-203a-5p表达可抑制裸鼠肿瘤生长, 降低PCNA表达水平。这提示上调miR-203a-5p表达可抑制K562细胞增殖, 促进细胞凋亡并阻滞细胞周期。

为进一步探究miR-203a-5p调控K562细胞的作用机制, 本研究进一步探究miR-203a-5p的下游靶

mRNA, 生物信息学预测发现miR-203a-5p与FABP4存在靶向结合位点。FABP4是一种脂肪酸结合蛋白, 可与脂肪酸结合, 参与脂肪酸的转运和代谢, 研究显示, FABP4高表达可促进多种肿瘤细胞恶性生物学行为^[19]。徐文婷等^[19]研究表明抑制FABP4表达可抑制乳腺癌细胞增殖, 并促进细胞凋亡。ZUO等^[20]研究表明下调FABP4表达可抑制结肠直肠癌细胞恶性生物学行为。本研究结果显示, 上调miR-203a-5p表达后, FABP4表达水平降低, K562细胞活性被抑制。本研究证实miR-203a-5p和FABP4存在靶向调控关系。回复实验结果显示, 过表达FABP4可减弱上调miR-203a-5p表达对K562细胞活性的抑制作用。这提示上调miR-203a-5p表达可能通过抑制FABP4表达来抑制K562细胞生物学活性。

综上所述, 上调miR-203a-5p表达可降低FABP4表达水平, 抑制K562细胞增殖, 阻滞细胞周期, 并促进细胞凋亡。miR-203a-5p可能是治疗CML的一个靶点, 后续还需进一步验证。

参考文献 (References)

- [1] CROSS N C P, ERNST T, BRANFORD S, et al. European leu-

- kemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2023, 37(11): 2150-67.
- [2] KANTARJIAN H M, JABBOUR E J, LIPTON J H, et al. A review of the therapeutic role of bosutinib in chronic myeloid leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2024, 24(5): 285-97.
- [3] CHEN N, MENG Z, SONG J, et al. miR-506 in patients with chronic myeloid leukemia and its effect on apoptosis of K562 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8): 9413-20.
- [4] 郭佳丽, 潘晨华, 李依, 等. 慢性髓系白血病干细胞差异微小RNA筛选及其靶基因生物信息学分析[J]. *临床内科杂志(GUO J L, PAN C H, LI Y, et al. Screening of differential microRNAs from stem cells of chronic myeloid leukemia and bioinformatics analysis of target genes [J]. Journal of Clinical Internal Medicine*, 2018, 41(3): 194-6.
- [5] 张越, 陈婷婷, 周合冰, 等. miR-203a-5p靶向调控JAG1对多发性骨髓瘤细胞增殖、周期调控的作用及机制研究[J]. *中国实验血液学杂志(ZHANG Y, CHEN T T, ZHOU H B, et al. Effect and mechanism of JAG1 targeted regulation by miR-203a-5p on proliferation and cycle regulation of multiple myeloma cells [J]. Chinese Journal of Experimental Hematology*, 2023, 31(3): 801-9.
- [6] SINGH P, YADAV R, VERMA M, et al. Antileukemic activity of hsa-miR-203a-5p by limiting glutathione metabolism in imatinib-resistant K562 cells [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(12): 6428-38.
- [7] GAO Y, WANG Y, WANG X, et al. FABP4 regulates cell proliferation, stemness, apoptosis, and glycolysis in colorectal cancer via modulating ROS/ERK/mTOR pathway [J]. *Discov Med*, 2023, 35(176): 361-71.
- [8] YOREK M, JIANG X, LIU S, et al. FABP4-mediated lipid accumulation and lipolysis in tumor associated macrophages promote breast cancer metastasis [J]. *bioRxiv*, 2024, 7(2): 601733-42.
- [9] ÖZMEN D, ALPAYDIN DD, SALDOĞAN M A, et al. A safety review of tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2024, 23(4): 411-23.
- [10] SUN J, HU R, HAN M, et al. Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(1): 175-81.
- [11] HE J, HAN Z, AN Z, et al. The miR-203a regulatory network affects the proliferation of chronic myeloid leukemia K562 cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(4): 616711-20.
- [12] YANG D, ZHANG P, YANG Z, et al. miR-4461 inhibits liver cancer stem cells expansion and chemoresistance via regulating SIRT1 [J]. *Carcinogenesis*, 2024, 45(7): 463-74.
- [13] SINGH P, YADAV R, VERMA M, et al. Analysis of the inhibitory effect of hsa-miR-145-5p and hsa-miR-203a-5p on imatinib-resistant K562 cells by GC/MS metabolomics method [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2023, 34(10): 2117-26.
- [14] ZHANG Y, WANG F, YU Y. LncRNA HOXD-AS1 promotes oral squamous cell carcinoma by sponging miR-203a-5p [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(4): 1505-12.
- [15] CHEN S, PAN C, HUANG J, et al. ATR limits Rad18-mediated PCNA monoubiquitination to preserve replication fork and telomerase-independent telomere stability [J]. *EMBO J*, 2024, 43(7): 1301-24.
- [16] WESTON W A, BARR A R. A cell cycle centric view of tumour dormancy [J]. *Br J Cancer*, 2023, 129(10): 1535-45.
- [17] QIANG L, HOFFMAN M T, ALI L R, et al. Transforming growth factor- β blockade in pancreatic cancer enhances sensitivity to combination chemotherapy [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 874-90.
- [18] MARGAWATI H, YUSTISIA I, HARDJO M, et al. GLUT5, GLUT7, and GLUT11 expression and Bcl-2/Bax ratio on breast cancer cell line MCF-7 treated with fructose and glucose [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24(11): 3917-24.
- [19] 徐文婷, 张卓一, 贾韩静, 等. 他莫昔芬与FABP4抑制剂对抑制乳腺癌细胞增殖的协同效应及机制研究[J]. *中国妇幼保健(XU W T, ZHANG Z Y, JIA H J, et al. Synergistic effect and mechanism of Tamoxifen and FABP4 inhibitors on the proliferation of breast cancer cells [J]. China Maternal and Child Health Care*, 2022, 37(21): 4032-5.
- [20] ZUO Q, XU Q, LI Z, et al. TRIM3 inhibits colorectal cancer cell migration and lipid droplet formation by promoting FABP4 degradation [J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(2): 239-50.