【基础研究】

微小 RNA-19a-3p 对人白血病叉头蛋白 O1-Kruppel 样因子 2-鞘氨醇 -1- 磷酸受体 1 通路的影响探析

拓进宝[1]，宋　超[1]，王丽萍[2*]
（1. 延安大学附属医院血液科，陕西延安 716000；2. 延安大学附属医院医学检验科，陕西延安 716000）

摘要：目的 探究微小 RNA（miR）-19a-3p 对人白血病叉头蛋白 O1（FoxO1）-Kruppel 样因子（Kruppel like factor，KLF）2-鞘氨醇 -1- 磷酸受体 1（sphingosine-1-phosphate receptor 1，S1P1）通路的影响。**方法** 选取人白血病 T 淋巴细胞，对细胞进行常规传代培养并分为实验组及对照组。实验组通过转染小干扰 RNA 敲低 miR-19a-3p 的表达，对照组不进行任何刺激。检测 miR-19a-3p 表达水平，细胞中 FoxO1、KLF2、S1P1 的表达情况及细胞增殖水平，对比两组相关指标表达情况。**结果** 传代培养后，实验组及对照组细胞 miR-19a-3p 表达分别为（2.44±0.21）、（1.53±0.15），差异有统计学意义（$P<0.05$）。敲低后，实验组 FoxO1（35.33±0.89）、KLF2（1.92±0.48）、S1P1（1.45±0.15）表达水平显著高于对照组 FoxO1（1.33±0.29）、KLF2（0.66±0.19）、S1P1（0.41±0.09），差异有统计学意义（$P<0.05$）。两组细胞增殖情况未见明显差异，但实验组较对照组细胞凋亡抑制解除。**结论** miR-19a-3p 在淋巴瘤组织中呈现高表达且对人白血病 FoxO1-KLF2-S1P1 通路有抑制作用，且抑制 miR-19a-3p 的高表达可帮助激活 FoxO1-KLF2-S1P1 通道的正向调控。

关键词：微小 RNA-19a-3p；人白血病叉头蛋白 O1；Kruppel 样因子 2；鞘氨醇-1-磷酸受体 1；细胞通路
中图分类号：R733.7　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2022）02-0140-04
DOI：10.13683/j.wph.2022.02.006

The effects of micro RNA-19a-3p on the FoxO1-Kruppel-like factor 2-sphingosine-1-phosphate receptor 1 pathway of human leukemia forkhead protein

TA Jinbao[1], SONG Chao[1], WANG Liping[2*]
(*1. Department of Hematology and Immunology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China; 2. Medical Laboratory, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To explore the effect of micro RNA（miRNA, miR）-19a-3p on human leukemia forkhead protein O1（FoxO1）-Kruppel-like factor（KLF）2- sphingosine-1-phosphate receptor 1（S1P1）pathway. ***Methods*** Human leukemia T lymphocytes were selected for routinely subcultured and were divided into experimental group and control group. The expression of miR-19a-3p in the experimental group was knocked down by transfection small interfering RNA, but the control group did not do any stimulation. The expression level of miR-19a-3p, expression of FoxO1, KLF2, S1P1 in cells and the cell proliferation level were detected, and the expression of related indicators between the two groups were compared. ***Results*** After subculture, the expressions of miR-19a-3p in the two groups were（2.44±0.21）and（1.53±0.15）, with statistical significance（$P<0.05$）. After knockdown, the expression level of FoxO1（35.33±0.89）, KLF2（1.92±0.48）, S1P1（1.45±0.15）in the experimental group were significantly higher than those in the control group FoxO1（1.33±0.29）, KLF2（0.66±0.19）, S1P1（0.41±0.09）, and the difference were statistically significant（$P<0.05$）. There was no significant difference in cell proliferation between the two groups, but compared with the control group, the inhibition of cell apoptosis

收稿日期：2021-09-04
作者简介：拓进宝，硕士研究生，主治医师，研究方向：血液病。
通信作者：王丽萍，主管检验师，研究方向：检验诊断。

was lifted. ***Conclusion*** miR-19a-3p is highly expressed in lymphoma and has an inhibitory effect on the FoxO1-KLF2-S1P1 pathway. Inhibiting the high expression of miR-19a-3p is beneficial to activate the positive regulation of FoxO1-KLF2-S1P1 pathway.

Key words: micro RNA-19a-3p; FoxO1; Kruppel-like factor 2; sphingosine-1-phosphate receptor 1; cell pathway

微小 RNA（micro RNA，miRNA，miR）是一类由 19 ～ 25 个核苷酸组成的高度保守的非编码 RNA，在人体中参与了一系列重要的生命过程 [1-2]。近年来，越来越多的报道提示 miRNA 可参与调控包括淋巴瘤在内的多种肿瘤的进展、转移及肿瘤细胞对药物的敏感性 [3-6]。叉头蛋白 O1（FoxO1）是一种参与细胞凋亡、DNA 修复、肿瘤进程等生命过程的广泛转录因子 [7]，Kruppel 样因子（Kruppel like factor，KLF）2 是一种受到 FoxO1 调控的转录因子，主要对血管内皮细胞起到稳定和保护作用 [8]。鞘氨醇 -1- 磷酸受体 1（sphingosine-1-phosphate receptor 1，S1P1）是人体成熟 T 细胞进入外周的关键分子，是 T 细胞成熟的重要标志 [9]。

目前，动物实验已证明 FoxO1-KLF2-S1P1 通路的存在，且该通路与胸腺细胞的分化及迁出有关 [10]。然而，针对 miR-19a-3p 对 FoxO1 及其衍生下游分子形成的通路影响的相关报道较少，故本研究旨在探究 miR-19a-3p 对人白血病 FoxO1-KLF2-S1P1 通路的影响，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 细胞资料

选取深圳豪地华拓生物公司的人白血病 T 淋巴单克隆细胞进行本研究。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

于 37 ℃、5% 二氧化碳的无菌环境中进行细胞培养，选用 10% 胎牛血清（美国 Biological Industries 公司）、青霉素及链霉素（规格：100 U/ml，北京雷根生物技术有限公司）的 DMEM 培养液进行常规无菌培养，采用胰蛋白酶（0.25%）乙二胺四乙酸混合液（常州贝源鑫生物科技有限公司）进行细胞传代，2 代后进行后续检测。

1.2.2 转染与检测

先通过 miRNAs 目标靶基因数据库获得 hsa-miR-19a-3p 的基因序列 UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA 并进行合成。将细胞采用胰蛋白酶消化后，用标准磷酸钙转染方法将 miR-19a-3p（上海吉玛制药技术有限公司）共转染到细胞上，转染后 10 d 内，观察稳定转染细胞，加入 1.5 μg/ml 的嘌呤霉素，然后进行定量聚合酶链式反应检测。采用 MTT 比色法对细胞生长期的细胞进行活动实验，于 24 h、48 h、72 h、96 h 用酶标仪测定 D_{490} 值。提取细胞总蛋白后，采用蛋白质印迹法检测细胞中 FoxO1、KLF2、S1P1 的表达情况，蛋白质印迹法的蛋白样品上样保持一致，一抗孵育时用含 5% 牛血清白蛋白溶液的 TBST 溶液稀释，β- 肌动蛋白稀释比例为 1 ∶ 5 000、FoxO1 稀释比例为 1 ∶ 5 000、p-FoxO1 稀释比例为 1 ∶ 800、KLF2 稀释比例为 1 ∶ 500、S1P1 稀释比例为 1 ∶ 10 000，4 ℃孵育过夜，孵育结束后洗膜，然后用含 5% 牛血清白蛋白溶液的 TBST 溶液稀释二抗，二抗稀释比例 1 ∶ 10 000，室温孵育 2 h 后洗膜，加入增强型化学发光试剂进行曝光显色。

1.3 统计与方法

采用 SPSS22.00 数据处理软件进行数据分析，计量资料如符合正态分布，以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，采用 t 检验。计数资料以 n（%）表示，行 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验前后细胞 miR-19a-3p 表达情况

实验组癌细胞中 miR-19a-3p 表达水平（2.44±0.21），对照组为（1.53±0.15），实验组癌细胞的 miR-19a-3p 高于对照组，差异有统计学意义

（$P < 0.05$）。

2.2 两组细胞活性对比

通过基因敲低后，两组细胞的增殖情况差异较小，差异无统计学意义（$P > 0.05$），但敲低表达 miR-19a-3p 可诱导细胞凋亡，见表 1。

表 1 两组细胞各时间段 D_{450} 值情况比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 1 Comparison of D_{450} values between the two groups at each time（$\bar{x}\pm s$）

	24 h	48 h	72 h	96 h
实验组	0.25±0.02	0.31±0.08	0.52±0.09	1.21±0.07
对照组	0.28±0.05	0.53±0.11	0.75±0.05	0.73±0.04

2.3 两组细胞 FoxO1、KLF2、S1P1 的表达情况对比

实验组 FoxO1 表达（35.33±0.89）显著高于对照组 FoxO1（1.33±0.29）。实验组 FoxO1 的下游产物 KLF2、S1P1 表达分别为（1.92±0.48）、（1.45±0.15），对照组为（0.66±0.19）、（0.41±0.09），两组各项相比差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。

3 讨论

肿瘤作为全球主要公共健康问题之一，一直以来在我国有着较高的发病率和死亡率 [11]。肿瘤的发病和进展与机体基因的表达、细胞凋亡及免疫功能异常有关 [12-13]。miRNA 在 T 细胞不同亚群及不同发育阶段的表达谱存在一定差异，其在 T 细胞活化、增殖及存活方面发挥着重要的调控作用，是肿瘤免疫介导中的重要因子。miRNA 作为具有促癌或抑癌功能的内源性非编码单链 RNA，可能通过多种信号途径参与肿瘤增殖。研究表明，miR-19a-3p 是一种在多种肿瘤细胞中异常表达的 miRNA[14]；高表达的 miR-19a-3p 可通过蛋白激酶 B 信号通路调节细胞黏附分子 2，影响肾癌细胞的增殖和迁移机制 [15]。miR-19a-3p 还可通过调节 FOS 相关抗原 1/ 白介素 -6/ 信号转导子及转录激活子 3 信号通路逆转肿瘤相关巨噬细胞表型，从而抑制乳腺癌转移 [16]。FoxO1 是叉头蛋白类中的一种，作为广泛转录因子影响基因表达，并对大多数肿瘤具有明确抑制作用。FoxO 类蛋白可通过介导 Wnt/β- 连环蛋白信号通路促进结直肠癌细胞的增殖 [17]。因此，分析癌细胞 miR-19a-3p 水平、FoxO1 蛋白及其下游蛋白表达具有重要意义。

本研究结果显示，癌细胞中 miR-19a-3p 表达量高于对照组，且通过基因敲低后，两组细胞增殖情况对比差异不大，但敲低表达 miR-19a-3p 可诱导细胞凋亡。同时，癌细胞中 FoxO1 及下游产物 KLF2、S1P1 表达均高于对照组。FoxO1 蛋白作为一种转录因子，在机体内具有调节肿瘤的进展和分化的作用，且广泛参与各种肿瘤细胞生物学功能的改变，通过癌细胞的基因通路调节以影响癌细胞的周期和其他生物学功能。FoxO1 表达水平与肿瘤发生率呈现负相关，其可能原因是 FoxO1 的表达可激活细胞内靶性基因，影响细胞增殖、凋亡、转化 [18]。T 细胞经活化后可产生白介素 -2、白介素 -3、干扰素 -γ 等细胞因子，从而刺激细胞因子信号传导抑制分子 3 的表达，并通过负反馈调节信号转导和转录激活因子 3 的酪氨酸磷酸化，抑制 Janus 激酶 / 信号转导和转录激活因子 3 信号通路的激活，抑制细胞凋亡，而信号转导和转录激活因子 3 是 miR-19a-3p 重要的靶基因。

S1P1 的表达需要中间物 KLF2 的参与，而 KLF2 的表达又受 FoxO1 控制，因此形成了 FoxO1-KLF2-S1P1 通路。动物实验验证了该通路的存在，且有学者发现细胞分化越接近成熟阶段，该通路活性越强 [19]。但若 S1P1 的基因缺失，则可导致大量成熟 T 细胞滞留于髓内，影响免疫功能。从 miR-19a-3p 对 FoxO1-KLF2-S1P1 表达的影响看，其作用与 FoxO1 的磷酸化类似 [20]。研究显示，FoxO1 对 KLF2、S1P1 的调节可能通过改变 T 细胞归巢、外周 T 细胞存活和稳态增殖来实现 [21]。研究显示，miR-19a-3p 的高水平表达对细胞分裂与分化无明显影响，但对机体高血糖调节及细胞凋亡存在影响，当 miR-19a-3p 表达过多时，原癌基因 *Fra-1* 表达上调，肿瘤发生和进展概率增加 [22]；当抑制 miR-19a-3p 高表达时，FoxO1、KLF2、S1P1 表达提升，FoxO1-KLF2-S1P1 通道激活。因此，我们可通过调节 miR-19a-3p 水平

影响细胞生存和凋亡，miR-19a-3p 的深入研究或可为临床治疗癌症提供一条新思路。

4 结论

miR-19a-3p 在淋巴瘤组织中呈现高表达，对人白血病 FoxO1-KLF2-S1P1 通道有抑制作用，且抑制 miR-19a-3p 的高表达有益于激活 FoxO1-KLF2-S1P1 通道正向调控。

参考文献：

[1] Alipoor SD, Mortaz E, Garssen J, *et al*. Exosomes and exosomal miRNA in respiratory diseases[J]. Mediators Inflamm, 2016, 9(25): 5628404.

[2] Ward A, Balwierz A, Zhang JD, *et al*. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(9): 1173-1182.

[3] 顾玺, 张文海. miRNA在乳腺癌化疗耐药中的作用[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(8): 538-541.

[4] Ren D, Lin B, Zhang X, *et al*. Maintenance of cancer stemness by miR-196b-5p contributes to chemoresistance of colorectal cancer cells *via* activating STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 49807-49823.

[5] Qiao FC, Gong P, Song YW, *et al*. Downregulated PITX1 modulated by miR-19a-3p promotes cell malignancy and predicts a poor prognosis of gastric cancer by affecting transcriptionally activated PDCD5[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(6): 2215-2231.

[6] Fu FQ, Wan XC, Wang D, *et al*. miRNA-19a acts as a prognostic marker and promotes prostate cancer progression *via* inhibiting VPS37A expression[J]. Oncotarget, 2018, 9(2): 1931-1943.

[7] 张洪开, 徐韬钧, 具英花, 等. PI3K和MAPK信号通路通过FoxO1转录因子诱导A549细胞周期的阻滞和凋亡的研究[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(10): 908-911.

[8] Bartoszewski R, Serocki M, Janaszak-Jasiecka A, *et al*. miR-200b downregulates Kruppel like factor 2 (KLF2) during acute hypoxia in human endothelial cells[J]. Eur J Cell Biol, 2017, 96(8): 758-766.

[9] 余思菲, 吴长有. 组织定居记忆性T细胞的免疫学特征研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(7): 1093-1100.

[10] 陶弋婧, 朱顺飞, 陈超, 等. microRNA-7基因敲减对小鼠 $CD4^+$ SP细胞胸腺发育的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(9): 1173-1177.

[11] Gu XY, Zheng RS, Xia CF, 等. 中国预期寿命与癌症发病率和死亡率的相互影响: 基于人群的聚类分析[J]. 癌症, 2019, 38(1): 23-38.

[12] 杨明明, 李娟. 细胞凋亡与癌症的治疗问题[J]. 国外医学(老年医学分册), 1998, 6: 271-273.

[13] 魏然. 癌症易感基因数据库构建及其拷贝数变异分析[D]. 合肥: 安徽大学, 2017.

[14] Zou M, Wang F, Gao R, *et al*. Autophagy inhibition of hsa-miR-19a-3p/19b-3p by targeting TGF-β R Ⅱ during TGF-β1-induced fibrogenesis in human cardiac fibroblasts[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24747.

[15] Jiang XM, Yu XN, Liu TT, *et al*. microRNA-19a-3p promotes tumor metastasis and chemoresistance through the PTEN/Akt pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 1147-1154.

[16] Yang J, Zhang Z, Chen C, *et al*. microRNA-19a-3p inhibits breast cancer progression and metastasis by inducing macrophage polarization through downregulated expression of Fra-1 proto-oncogene[J]. Oncogene, 2014, 33(23): 3014-3023.

[17] Shah R, Jones E, Vidart V, *et al*. Biomarkers for early detection of colorectal cancer and polyps: systematic review[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(9): 1712-1728.

[18] Hou T, Li Z, Zhao Y, *et al*. Mechanisms controlling the anti-neoplastic functions of FoxO proteins[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 11(16): 101-114.

[19] 张云, 赵俊涛, 刘萍萍, 等. FoxO1-KLF2-S1P1在MG患者胸腺组织的表达[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(2): 181-184.

[20] Bhansali RS, Rammohan M, Lee P, *et al*. DYRK1A regulates B cell acute lymphoblastic leukemia through phosphorylation of FoxO1 and STAT3[J]. J Clin Invest, 2021, 131(1): e135937.

[21] Gubbels Bupp MR, Edwards B, Guo C, *et al*. T cells require FoxO1 to populate the peripheral lymphoid organs[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(11): 2991-2999.

[22] Rupaimoole R, Slack FJ. microRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222.

（编辑：虞　瑛）