

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research维奈克拉对急性髓性白血病细胞增殖和
凋亡的影响

Effects of Venekra on proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells

吴 鹏^{1,2}, 夏宏林², 任创创²,
杨 鹏¹(1. 安徽医科大学 第一附属医院 输血科, 安徽
合肥 230022; 2. 安徽医科大学 附属宿州医院 检
验科, 安徽 宿州 234000)WU Peng^{1,2}, XIA Hong - lin²,
REN Chuang - chuang², YANG Peng¹(1. Department of Blood Transfusion,
The First Affiliated Hospital of Anhui
Medical University, Hefei 230022, Anhui
Province, China; 2. Department of
Clinical Laboratory, Suzhou Hospital,
Anhui Medical University, Suzhou
234000, Anhui Province, China)作者简介: 吴鹏(1986 -), 女, 硕士研究生, 副主
任检验技师, 主要从事临床检验诊断
学方面的研究通信作者: 杨鹏, 主任技师, 硕士生导师
MP: 15255197007

E - mail: yangpeng00812@163.com

摘要:目的 研究维奈克拉(Vene)通过调控微小RNA-410-3p(miR-410-3p)/高迁移率族蛋白B1(HMGB1)轴对急性髓性白血病(AML)细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将THP1细胞随机分为对照组(正常培养)、实验组(100 nmol·L⁻¹ Vene处理)、inh-NC组(实验组+转染inh-miR-410-3p阴性对照)、inh-miR-410-3p组(实验组+转染inh-miR-410-3p)、inh-NC联合sh-NC组(inh-NC组+转染sh-HMGB1阴性对照)、inh-miR-410-3p联合sh-NC组(inh-miR-410-3p组+转染sh-HMGB1阴性对照)、sh-HMGB1组(inh-miR-410-3p组+转染sh-HMGB1)。用实时荧光定量聚合酶链反应检测miR-410-3p和HMGB1 mRNA的相对表达水平,用免疫荧光实验检测HMGB1的阳性表达情况,用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)法检测细胞增殖情况,用蛋白质印迹法检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)的蛋白相对表达水平。**结果** 对照组、实验组、inh-NC组、inh-miR-410-3p组、inh-NC联合sh-NC组、inh-miR-410-3p联合sh-NC组、sh-HMGB1组的细胞中miR-410-3p相对表达水平分别为1.00±0.15、3.76±0.31、3.64±0.33、1.69±0.20、1.00±0.17、0.42±0.06、0.89±0.07, HMGB1 mRNA相对表达水平分别为1.00±0.13、0.62±0.07、0.65±0.06、0.93±0.11、1.00±0.15、1.93±0.21、1.14±0.16; 对照组、实验组、inh-NC组、inh-miR-410-3p组的HMGB1相对荧光水平分别为1.00±0.16、0.55±0.07、0.58±0.08、0.82±0.14; inh-NC联合sh-NC组、inh-miR-410-3p联合sh-NC组、sh-HMGB1组的细胞增殖率分别为(11.46±1.95)%、(37.82±5.31)%、(16.14±3.05)%, Bcl-2蛋白相对表达水平分别为1.00±0.14、4.17±0.39、1.33±0.18, Bax蛋白相对表达水平分别为1.00±0.16、0.32±0.08、0.91±0.13。对照组的上述指标与实验组比较, inh-miR-410-3p组的上述指标与inh-NC组比较, inh-miR-410-3p联合sh-NC组的上述指标与inh-NC联合sh-NC组比较, sh-HMGB1组的上述指标与inh-miR-410-3p联合sh-NC组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均P<0.001)。**结论** Vene可以通过调控miR-410-3p/HMGB1轴抑制AML细胞的增殖、诱导AML细胞的凋亡。

关键词: 维奈克拉; 急性髓性白血病; 微小RNA; 高迁移率族蛋白B1; B淋巴细胞瘤-2; 细胞凋亡

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.03.012

中图分类号: R979.1 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)03-0355-06

Abstract: Objective To investigate the effect of venetoclax (Vene) on cell proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia (AML) by regulating the microRNA-410-3p (miR-410-3p)/high mobility group protein B1 (HMGB1) axis. **Methods** THP1 cells were randomly divided into control group (normal culture), experimental group

(100 nmol · L⁻¹ Vene treatment), inh - NC group (experimental group + transfection of inh - miR - 410 - 3p negative control), inh - miR - 410 - 3p group (experimental group + transfection of inh - miR - 410 - 3p), inh - NC combined with sh - NC group (inh - NC group + transfection of sh - HMGB1 negative control), inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group (inh - miR - 410 - 3p group + transfection of sh - HMGB1 negative control), sh - HMGB1 group (inh - miR - 410 - 3p group + transfection of sh - HMGB1). The relative expression levels of *miR* - 410 - 3p and *HMGB1* mRNA were detected by real - time quantitative polymerase chain reaction; immunofluorescence assay was used to detect the positive expression of HMGB1; 5 - ethynyl - 2' - deoxyuridine (EdU) was used to detect cell proliferation; Western blot was used to detect the relative expression levels of B lymphocytoma - 2 (Bcl - 2) and Bcl - 2 associated X protein (Bax). **Results** The relative expression levels of *miR* - 410 - 3p in the control group, experimental group, inh - NC group, inh - miR - 410 - 3p group, inh - NC combined with sh - NC group, inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group and sh - HMGB1 group were 1.00 ± 0.15, 3.76 ± 0.31, 3.64 ± 0.33, 1.69 ± 0.20, 1.00 ± 0.17, 0.42 ± 0.06, 0.89 ± 0.07, respectively; the relative expression levels of *HMGB1* mRNA were 1.00 ± 0.13, 0.62 ± 0.07, 0.65 ± 0.06, 0.93 ± 0.11, 1.00 ± 0.15, 1.93 ± 0.21, 1.14 ± 0.16, respectively. The relative fluorescence levels of HMGB1 in the control group, experimental group, inh - NC group and inh - miR - 410 - 3p group were 1.00 ± 0.16, 0.55 ± 0.07, 0.58 ± 0.08, 0.82 ± 0.14, respectively. The cell proliferation rates of inh - NC combined with sh - NC group, inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group and sh - HMGB1 group were (11.46 ± 1.95)%, (37.82 ± 5.31)%, (16.14 ± 3.05)%, respectively; the relative expression levels of Bcl - 2 protein were 1.00 ± 0.14, 4.17 ± 0.39, 1.33 ± 0.18, respectively; the relative expression levels of Bax protein were 1.00 ± 0.16, 0.32 ± 0.08, 0.91 ± 0.13, respectively. The differences of above indexes were statistically significant between control group and the experimental group, between inh - NC group and the inh - miR - 410 - 3p group, between inh - NC combined with sh - NC group and inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group, between inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group and the sh - HMGB1 group (all $P < 0.001$). **Conclusion** Vene can inhibit the proliferation of AML cells and induce apoptosis of AML cells by regulating the *miR* - 410 - 3p/HMGB1 axis.

Key words: venetoclax; acute myeloid leukemia; microRNA; high mobility group protein; B - cell lymphoma - 2; cell apoptosis

急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种造血系统恶性疾病,可导致骨髓中髓系前体细胞过度积累,是成人白血病最常见的类型,存活率较低^[1]。维奈克拉(venetoclax, Vene)是B淋巴细胞瘤-2(B - cell lymphoma - 2, Bcl - 2)抑制药,可靶向抑制Bcl - 2蛋白,促进白血病细胞凋亡,已被用于治疗AML^[2]。研究表明,微小核糖核酸-410 - 3p(micro ribonucleic acid - 410 - 3p, *miR* - 410 - 3p)参与调控乳腺癌、宫颈癌等肿瘤细胞的恶性生物学行为,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[3]。高迁移率族蛋白B1(high mobility group protein, HMGB1)是与肿瘤有关的调控基因,其异常表达,与白血病细胞的增殖、凋亡等生物学行为有关^[4]。本研究旨在探讨Vene通过调控*miR* - 410 - 3p/HMGB1轴对AML细胞增殖和凋亡的影响,以期为鉴别潜在的临床靶点和生物标志提供一定的参考依据。

材料与方法

1 材料

细胞 HS - 5细胞(正常人骨髓基质细胞)、THP1细胞(急性髓系白血病细胞)、HEK - 293T细胞(人胚胎肾细胞293),均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

药品与试剂 Vene,纯度:99.97%,批号:S804820,美国Selleck公司生产。杜氏改良Eagle培养基/营养混合物F - 12(Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F - 12, DMEM/F - 12)、HMGB1重组兔单抗、Bcl - 2鼠单抗、Bcl - 2相关X蛋白(Bcl - 2 - associated X protein, Bax)鼠单抗、山羊抗兔Alexa Fluor 647标记二抗、山羊抗鼠辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗、Lipofectamine™ 2000转染试剂、放射免疫沉淀(radio

immunoprecipitation assay, RIPA) 蛋白裂解液, 美国赛默飞世尔科技公司提供; miR-410-3p 模拟物 (miR-410-3p mimics)、miR-410-3p 抑制物 (miR-410-3p inhibitor, inh-miR-410-3p)、HMGB1 抑制物 (short hairpin HMGB1, sh-HMGB1)、各自阴性对照 (NC mimics, inh-NC, sh-NC)、双荧光素酶报告载体和所有引物, 均由上海生工生物工程股份有限公司生产; TRNzol Universal 总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取试剂, 北京天根生化科技有限公司生产; 二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白法检测试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司生产; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒、细胞活力检测试剂-8 (cell counting kit-8, CCK-8), 均由上海碧云天生物技术有限公司生产; TB Green Premix Ex Taq™ II、PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒, 均由日本 Takara Bio 公司生产。

仪器 LightCycler 96 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪, 瑞士罗氏公司产品; GFM-200 生物荧光显微镜, 上海光密仪器有限公司产品; CL750 蛋白质印迹显影仪、Varioskan LUX 全能酶标仪, 均为美国赛默飞世尔科技公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养

所有细胞均在 DMEM/F-12 培养基 (含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液)、37℃、5% CO₂ 条件下培养, 每隔 1 d 更换培养液。

2.2 细胞分组与处理方法

将对数生长期的 THP1 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中, 用 Lipofectamine™ 2000 细胞转染试剂分别转染 inh-NC、inh-miR-410-3p、inh-NC + sh-NC、inh-miR-410-3p + sh-NC、inh-miR-410-3p + sh-HMGB1, 6 h 后用新鲜培养基代替转染细胞的培养上清液继续孵育, 收集转染 24 h 后的 THP1 细胞用于后续实验。

THP1 细胞分为对照组 (正常培养)、实验组 ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 处理)、inh-NC 组 (实验组 + 转染 inh-NC)、inh-miR-410-3p 组 (实验组 + 转染 inh-miR-410-3p)、inh-NC 联合 sh-NC 组 (inh-NC 组 + 转染 sh-NC)、inh-miR-410-3p 联合 sh-NC 组 (inh-miR-410-3p 组 + 转染 sh-NC)、sh-HMGB1 组 (inh-miR-410-3p 组 +

转染 sh-HMGB1)。HS-5 细胞正常培养, 记作 HS-5 组。

2.3 双荧光素酶报告基因检测 miR-410-3p 和 HMGB1 的靶向关系^[5]

Starbase 预测 HMGB1 和 miR-410-3p 的靶向关系, 双荧光素酶报告实验验证 miR-410-3p 和 HMGB1 的靶向关系, 构建 HMGB1 的野生型 (wild type, WT) 质粒和突变型 (mutant type, MUT) 质粒。将对数生长期的 HEK-293T 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中, 用 Lipofectamine™ 2000 细胞转染试剂, 将 HMGB1 WT 和 HMGB1 MUT 分别与 NC mimics 和 miR-410-3p mimics 共转染至 HEK-293T 细胞, 转染 48 h 后通过双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性。

2.4 qRT-PCR 法检测 miR-410-3p 和 HMGB1 mRNA 的相对表达水平^[6]

用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂从各组细胞中提取总 RNA, 用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒将其反转录为 cDNA, 用 TB Green Premix Ex Taq™ II 定量, 以 U6 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 miR-410-3p 和 HMGB1 mRNA 相对表达水平。

2.5 CCK-8 实验检测各处理组 THP1 细胞的活力^[7]

将各组细胞接种于 96 孔板 (每孔 1×10^6 个细胞) 中, 按照方法“2.2”处理以及分别用 0、10 和 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 处理, 按照 CCK-8 试剂盒说明书, 取生长状态良好、细胞分布及密度均一的孔, 每孔加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{L}$ 并于 37℃ 孵育 2 h, 用酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的光密度并进行分析。

2.6 免疫荧光实验检测细胞中 HMGB1 的阳性表达情况^[8]

细胞用含 0.3% 曲拉通 X-100 (Triton X-100) 的 PBS 透化, 暴露于 10% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 并与 HMGB1 重组兔单抗 (1:500) 在 4℃ 下孵育过夜。用山羊抗兔 Alexa Fluor 647 标记二抗 (1:5 000) 在 37℃ 下孵育细胞 1 h, 用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染料将细胞核染色 10 min, 并在荧光显微镜下观察。

2.7 EdU 实验检测各组 THP1 细胞的增殖率^[9]

按照 EdU 试剂盒说明书, 将接种到 96 孔板中的

细胞(每孔 1×10^6 个细胞)在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EdU 缓冲液中 37°C 培养 2 h, 用 4% 甲醛固定 0.5 h, 并用 0.1% Triton X-100 室温孵育 20 min, 最后进行避光染色, 用荧光显微镜观察并计算细胞增殖率。

2.8 蛋白质印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 的蛋白相对表达水平^[10]

用 RIPA 细胞裂解液处理细胞, 然后从各组细胞中提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 取蛋白 $50 \mu\text{g}$ 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳分离(12%的分离胶), 完毕后转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 用含 5% BSA 和含吐温的 Tris 缓冲盐溶液(tris buffered saline with Tween, TBST)封闭培养 2 h, 分别加入 Bcl-2 一抗(1:500)、Bax 一抗(1:500) 4°C 过夜孵育, 次日冲洗后加入山羊抗鼠 HRP 标记二抗(1:5000), 室温孵育 2 h 后 TBST 洗膜。用凝胶成像系统, 以 GAPDH 为内参, 用 Image J 软件分析条带的灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验。

结 果

1 HMGB1 是 miR-410-3p 的直接靶标

THP1 细胞分为对照组(正常培养)、实验组($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 处理)、inh-NC 组(实验组+转染 inh-NC)、inh-miR-410-3p 组(实验组+转染 inh-miR-410-3p)、inh-NC 联合 sh-NC 组(inh-NC 组+转染 sh-NC)、inh-miR-410-3p 联合 sh-NC 组(inh-miR-410-3p 组+转染 sh-NC)、sh-HMGB1 组(inh-miR-410-3p 组+转染 sh-HMGB1)。HS-5 细胞和 THP1 细胞正常培养, 分别记作 HS-5 组和对照组。

通过 Starbase 在线网站对 miR-410-3p 的靶基因进行预测和分析, 发现 HMGB1 是 miR-410-3p 的潜在靶标(图 1)。双荧光素酶活性检测结果显示, NC mimics 组的 HMGB1 WT 和 HMGB1 MUT 荧光活性分别为 2.37 ± 0.18 和 2.29 ± 0.20 , miR-410-3p mimics 组的 HMGB1 WT 和 HMGB1 MUT 荧光活性分别为 1.64 ± 0.11 和 2.32 ± 0.17 ; miR-410-3p mimics 组

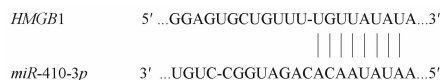


图 1 Starbase 预测微小 RNA-410-3p(miR-410-3p)/高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的靶向关系及结合位点关系图

Figure 1 Plot of Starbase's prediction of the targeting and binding sites of microRNA-410-3p(miR-410-3p)/high mobility group protein B1(HMGB1)

与 NC mimics 组比较, HMGB1 WT 荧光活性显著降低($P < 0.001$), HMGB1 MUT 荧光活性无显著差异($P > 0.05$)。qRT-PCR 实验结果显示, HS-5 组的 miR-410-3p 和 HMGB1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 和 1.00 ± 0.16 , 对照组的 miR-410-3p 和 HMGB1 mRNA 相对表达水平分别为 0.31 ± 0.06 和 2.19 ± 0.31 ; 对照组与 HS-5 组比较, miR-410-3p 相对表达水平显著降低, HMGB1 mRNA 相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$)。

2 Vene 抑制 THP1 细胞的活力

CCK-8 细胞活力实验结果显示, $0, 10, 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 药物浓度条件下, THP1 细胞的活力分别为 $(100.00 \pm 19.25)\%$ 、 $(86.11 \pm 14.82)\%$ 、 $(61.19 \pm 8.43)\%$, 与 $0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 药物浓度相比, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 药物浓度条件下的 THP1 细胞的活力显著下降($P < 0.001$), $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vene 药物浓度条件下的 THP1 细胞的活力无显著性差异($P > 0.05$)。

3 Vene 通过促进 miR-410-3p 下调 HMGB1 表达

qRT-PCR 实验结果显示, 对照组、实验组、inh-NC 组、inh-miR-410-3p 组的 miR-410-3p mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 3.76 ± 0.31 、 3.64 ± 0.33 、 1.69 ± 0.20 , HMGB1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 0.62 ± 0.07 、 0.65 ± 0.06 、 0.93 ± 0.11 ; 实验组与对照组比较, miR-410-3p mRNA 相对表达水平显著升高, HMGB1 mRNA 相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$); inh-miR-410-3p 组与 inh-NC 组比较, miR-410-3p mRNA 相对表达水平显著降低, HMGB1 mRNA 相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$)。免疫荧光结果显示, 对照组、实验组、inh-NC 组、inh-miR-410-3p 组的 HMGB1 相对荧光水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.55 ± 0.07 、 0.58 ± 0.08 和 0.82 ± 0.14 ; 实验组与对照组比较, HMGB1 相对荧光水平显著降低($P < 0.001$); inh-miR-410-3p 组与 inh-NC 组比较, HMGB1 相对荧光水平显著升高($P < 0.001$), 见图 2。

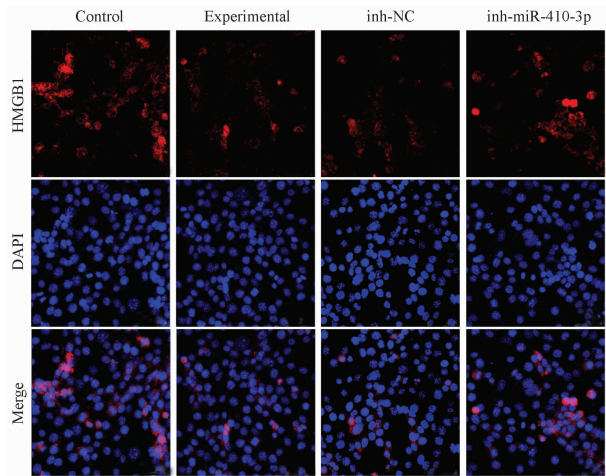


图2 免疫荧光检测各处理组细胞 HMGB1 的阳性表达情况 (×200)

Figure 2 Immunofluorescence was used to detect the positive expression of HMGB1 in each treatment group(×200)
Control group:THP1 cells were cultured normally;Experimental group: 100 nmol · L⁻¹ Vene treatment; inh - NC group: inh - NC was transfected on base of the experimental group; inh - miR - 410 - 3p group: inh - miR - 410 - 3p was transfected on the base of experimental group; DAPI:4',6 - diamidino - 2 - phenylindole.

表1 各组细胞的基因相对表达水平、增殖率及凋亡蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 The relative gene expression levels, proliferation rates and relative expression levels of apoptotic proteins of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Item	inh - NC combined with sh - NC	inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC	sh - HMGB1
miR - 410 - 3p mRNA	1.00 ± 0.17	0.42 ± 0.06 ***	0.89 ± 0.07 ###
HMGB1 mRNA	1.00 ± 0.15	1.93 ± 0.21 ***	1.14 ± 0.16 ###
Proliferation rate(%)	11.46 ± 1.95	37.82 ± 5.31 ***	16.14 ± 3.05 ###
Bcl - 2 protein	1.00 ± 0.14	4.17 ± 0.39 ***	1.33 ± 0.18 ###
Bax protein	1.00 ± 0.16	0.32 ± 0.08 ***	0.91 ± 0.13 ###

Inh - NC combined with sh - NC group:Sh - NC was transfected in the inh - NC group; inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group:Sh - NC was transfected in the inh - miR - 410 - 3p group; sh - HMGB1 group: sh - HMGB1 was transfected in the inh - miR - 410 - 3p group; Compared with the inh - NC combined with sh - NC group, *** $P < 0.001$; Compared with the inh - miR - 410 - 3p combined with sh - NC group, ### $P < 0.001$.

讨 论

AML 的生物学不良风险和耐药性的增加是早期较短缓解期、较低生存率及较高死亡率的主要原因^[11], 因此为开发更加有效的监测与治疗方案, 探索新的 AML 预测、诊断及治疗靶点的生物标志物是极为关键。
miRNA 可通过调控下游靶基因的表达, 参与癌细胞行为调控^[12], 其已被证明是癌症诊断和预后的工具, 具有致癌或肿瘤抑制作用, miR - 410 - 3p 与多种肿瘤的发生发展有关^[13], 但与 AML 的相关性尚不清楚。本研究结果显示, 对照组细胞与 HS - 5 组相比,

4 Vene 通过 miR - 410 - 3p/HMGB1 轴抑制 THP1 细胞的增殖

qRT - PCR 实验结果显示, inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组与 inh - NC 联合 sh - NC 组相比, 细胞 miR - 410 - 3p 的相对表达水平显著下降, HMGB1 mRNA 相对表达水平显著上升; sh - HMGB1 组与 inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组相比, 细胞 miR - 410 - 3p 的相对表达水平显著上升, HMGB1 mRNA 相对表达水平显著下降(均 $P < 0.001$)。EdU 实验结果显示, inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组与 inh - NC 联合 sh - NC 组相比, 细胞增殖率显著升高; sh - HMGB1 组与 inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组相比, 细胞增殖率显著降低(均 $P < 0.001$)。蛋白质印迹结果显示, inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组与 inh - NC 联合 sh - NC 组相比, 细胞 Bcl - 2 蛋白相对表达水平显著上升, Bax 蛋白相对表达水平显著下降; sh - HMGB1 组与 inh - miR - 410 - 3p 联合 sh - NC 组相比, 细胞 Bcl - 2 蛋白相对表达水平显著下降, Bax 蛋白相对表达水平显著上升(均 $P < 0.001$), 见表 1。

miR - 410 - 3p 的相对表达水平显著下调; 实验组与对照组相比, 细胞中 miR - 410 - 3p 的相对表达水平显著上升, 说明 Vene 能促进 miR - 410 - 3p 上调。本研究通过生物信息学分析发现, HMGB1 可能是 miR - 410 - 3p 的下游靶点, 双荧光素酶报告基因实验证实, HMGB1 与 miR - 410 - 3p 靶向结合。本研究通过上调 miR - 410 - 3p 得到 HMGB1 mRNA 和蛋白相对荧光水平降低的结果, 提示 HMGB1 可以被 miR - 410 - 3p 靶向负调控。HMGB1 作为一种关键的抗凋亡和促自噬蛋白, 在包括 AML 在内的许多癌症的化疗和放疗后过表达和释放。有研究表明, HMGB1 不仅通过抑制细胞凋亡和促进细胞增殖, 而且通过充当骨髓分化的负调节因子参与 AML 的发展和进展^[14]。本研究显示在

Vene 药物作用条件下,抑制 THP1 细胞内 *miR-410-3p* 的表达后, *HMGB1* 的表达水平显著升高, THP1 细胞的增殖率明显提高,而敲低 *HMGB1* 的表达,可显著降低 THP1 细胞的增殖率。这与赵健衡等^[3]得到的研究结果:舒芬太尼可上调 *miR-410-3p* 的表达,靶向负调控下游基因表达,抑制宫颈癌细胞的生物学行为相一致。上述结果提示, Vene 可通过调控 *miR-410-3p*/*HMGB1* 轴抑制细胞增殖。

Vene 是一种选择性 Bcl-2 口服抑制药,可特异性靶向结合 Bcl-2 蛋白,降低 Bcl-2 的表达,影响线粒体外膜通透性,导致细胞凋亡的快速启动^[15]。Bcl-2 家族蛋白是调控细胞凋亡的关键分子,通过阻止线粒体释放细胞色素 c 和其他凋亡因子,发挥抗凋亡功能^[16],研究证明 Bcl-2 在白血病干细胞中过度表达,与化疗耐药和较低的生存率有关,靶向抑制 Bcl-2 可以抑制白血病干细胞的发展^[17]。Bcl-2 是细胞凋亡的抑制因子, Bax 是细胞凋亡的促进因子,二者是细胞凋亡发生水平的标志^[18]。王京京等^[19]研究发现,紫檀芪通过上调 *miR-340-5p* 表达,靶向下调髓细胞白血病-1 表达,抑制胆囊癌细胞增殖,降低 Bcl-2 蛋白表达,提高 Bax 的蛋白表达,促进胆囊癌细胞凋亡,从而减弱其恶性进展。本研究显示,下调 *miR-410-3p* 的表达,会明显提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的相对表达水平,降低 Bax 蛋白的表达,而当敲低 *HMGB1* 的表达后,上述指标表达水平发生明显逆转,这与王京京等^[19]的研究结果相类似。推测 Vene 可能通过上调 *miR-410-3p* 靶向负调控 *HMGB1* 的表达从而促进 THP1 细胞凋亡,延缓 ALM 的发展进程。

本研究结果显示, Vene 能够通过调控 *miR-410-3p*/*HMGB1* 轴抑制 THP1 细胞增殖,促进 THP1 细胞凋亡,提示 *miR-410-3p* 可能作为潜在的生物标志物在 AML 治疗中发挥重要作用。

参考文献:

[1] 邢增文,王文芳,石丹妮,等. *circ-BAX.3* 和 *circ-BAX.11* 抑制急性髓细胞性白血病细胞作用的机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(18): 3359—3365.

[2] D C D, H A W. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs[J]. *Blood*, 2020, 135(2): 85—96.

[3] 赵健衡,张帮健,王丽,等. 舒芬太尼通过调控 *miR-410-3p*/TIAM1 轴影响宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J]. 中国药师, 2021, 24(7): 267—272.

[4] 刘利茹. *miR-34a* 通过靶向 *HMGB1* 促进急性髓性白血病细胞凋亡并抑制自噬的分子机制[D]. 河南 新乡: 新乡医学院, 2019.

[5] 刘园园,张培培,陈忠美. *circSAMD4A* 靶向 *miR-410-3p* 对缺氧缺糖诱导的神经细胞损伤的影响[J]. 河北医药, 2022, 44(10): 1460—1464, 1469.

[6] 申利平,彭薇,郑戈. *lncRNA DLEU2* 通过调节 *miR-410-3p* 表达对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及迁移、侵袭的影响[J]. 西部医学, 2020, 32(10): 1447—1453.

[7] 杨春燕,王海燕,黄倩,等. *lncRNA CYTOR/miR-193b-3p*/*HMGB1* 轴调控 T 细胞急性淋巴细胞白血病细胞 MOLT-4 增殖与凋亡的作用研究[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(21): 90—97, 102.

[8] 苏依曼,叶嘉莉,邱文粤,等. 积雪草酸通过抑制 *HMGB1*/TLR4/NF- κ B 通路减轻脂多糖诱导肉鸡肾细胞焦亡[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(4): 1777—1786.

[9] 宋慧娟,徐振华,何东宁. 载脂蛋白 C1 表达对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(1): 128—135.

[10] 康亚伟,钦东煜,罗广立. 桦木酸通过 JAK2/STAT3 信号通路对白血病细胞增殖和凋亡的影响[J]. 实用癌症杂志, 2023, 38(11): 1750—1753.

[11] 练佳仪. 长链非编码 RNA MIR22HG 在急性髓性白血病中表达及其功能研究[D]. 广东 广州: 暨南大学, 2022.

[12] 张雅峰. *miR-410-3p* 在乳腺癌中的作用及机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2017.

[13] 李永艳,潘晓彦,李栋. *miR-410-3p* 靶向 PTEN/Akt/mTOR 信号通路调控垂体瘤细胞的生物学活性[J]. 脑与神经疾病杂志, 2022, 30(5): 289—294.

[14] YUAN S, LIU Z, XU Z, et al. High mobility group box 1 (*HMGB1*): A pivotal regulator of hematopoietic malignancies[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 91.

[15] 张瑞婷,姚锦. 维奈克拉及联合用药治疗急性髓细胞白血病的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2024, 40(1): 137—142.

[16] 阎丽杰,王文,董孝媛,等. 维奈克拉联合去甲基化药物治疗急性髓系白血病的临床研究[J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50(12): 636—642.

[17] LAGADINOU E D, SACH A, CALLAHAN K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 329—341.

[18] 韩芳,侯献敏. 湿润烧伤膏对糖尿病足创面组织中 MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax 水平的影响[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2024, 36(2): 85—89.

[19] 王京京,李全福,张立广,等. 紫檀芪调控微小 RNA-340-5p/髓细胞白血病-1 轴对胆囊癌 SD 细胞生物学行为的影响实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2024, 53(3): 322—326, 330.

(收稿日期 2024-07-29)