

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.14.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210210.1322.002.html\(2021-02-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210210.1322.002.html(2021-02-10))

microRNA-520a 靶向 MCM3 抑制急性淋巴细胞白血病细胞增殖的研究^{*}

张 欢, 张国君[△]

(中国医科大学附属盛京医院第一血液内科, 沈阳 110022)

[摘要] **目的** 阐述在急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞中 microRNA(miR)-520a 的表达和临床意义。**方法** 在非恶性血液肿瘤患者和 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞及健康人外周血淋巴细胞、B-ALL 患者细胞中利用实时定量 PCR 检测 miR-520a 的表达情况;在人急性 B 淋巴细胞白血病细胞株(BALL-1)中转染 miR-520a 模拟物, CCK-8 观察细胞增殖能力变化, 实时定量 PCR 检测 miR-520a 的表达变化。生物信息学分析 MCM3 是 miR-520a 的靶基因并预测位点;使用双萤光素酶报告基因检测 miR-520a 对 MCM3 的转录活性影响;在 miR-520a mimics 转染组中使用 MCM3 过表达质粒进行回补实验, 观察 MCM3 蛋白和细胞增殖变化。**结果** 同正常组织/细胞相比, B-ALL 患者细胞/BALL-1 细胞系中 miR-520a 表达水平显著降低($P < 0.05$), miR-520a 过表达能够使 BALL-1 细胞增殖能力降低($P < 0.05$);miR-520a 过表达降低 MCM3 的蛋白表达水平($P < 0.05$);通过双萤光素酶实验验证 miR-520a 能够作用 MCM3 的 3'UTR 区;miR-520a mimics 能够使 BALL-1 细胞增殖能力下降, 同时过表达 MCM3 能够提高细胞增殖能力。**结论** miR-520a 可能通过下调 MCM3 的表达抑制 B-ALL 细胞增殖能力。

[关键词] 前体细胞淋巴瘤母细胞白血病淋巴瘤;细胞增殖;miR-520a;MCM3

[中图法分类号] R552 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)14-2366-05

Study on miR-520a targeting MCM3 inhibition on cell proliferation of acute B lymphoblastic leukemia cells^{*}

ZHANG Huan, ZHANG Guojun[△]

(First Department of Hematology, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110022, China)

[Abstract] **Objective** To elaborate the expression and clinical significance of miR-520a in acute B-lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells. **Methods** The expression level of miR-520a in the bone marrow lymphocytes of the patients with non-malignant blood tumor and the patients with B-ALL, peripheral blood lymphocytes of normal people and cells of the patients with B-ALL was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The miR-520a mimics were transfected into BALL-1 cells. CCK-8 was used to observe the cell proliferation ability change and the expression of miR-520a was detected by real-time quantitative PCR. The bioinformatics method was used to analyze MCM3 as the target gene of miR-520a and predict its action site; the double luciferase reporter gene system was used to detect the effect of miR-520a on MCM3 transcriptional activity; in the miR-520a mimics transfection group, the MCM3 overexpression plasmid was used to conduct the complement experiment for observing the change of MCM3 protein and cell proliferation. **Results** Compared with the normal tissues / cells, the expression level of miR-520a in bone marrow lymphocytes/BALL-1 cell lines of the patients with B-ALL was significantly decreased ($P < 0.05$), and the overexpression of miR-520a could reduce the proliferation ability of BALL-1 cells ($P < 0.05$), and the protein expression level of MCM3 was decreased by miR-520a overexpression ($P < 0.05$). The double luciferase assay verified that miR-520a could act the 3'UTR region of MCM3. miR-520a mimics could decrease the proliferation ability of BALL-1 cells, meanwhile the overexpression of MCM3 could increase the cell proliferation ability. **Conclusion** miR-520a may inhibit the proliferation of B-ALL cells by down-regulating the expression of MCM3.

[Key words] precursor cell lymphoblastic leukemia-lymphoma; cell proliferation; miR-520a; MCM3

^{*} 基金项目: 辽宁省重点研发计划联合计划项目(2020JH2/10300134); 沈阳市科学计划项目(18-014-4-20)。 作者简介: 张欢(1990—), 硕士, 主要从事白血病的发病机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhangguojun@sina.com。

成人急性淋巴细胞白血病(ALL)是一类以原幼淋巴细胞恶性增殖、分化障碍、凋亡受阻为特点的血液系统恶性肿瘤^[1-2]。miR-520a 在多种恶性肿瘤中表达下调并发挥抑癌基因功能^[4-7],但在急性淋巴细胞白血病的表达及意义国内外尚少见报道。同时 MCM3 基因在白血病、淋巴瘤、乳腺癌和卵巢癌等肿瘤中过度表达,且与肿瘤的生长、侵袭及转移相关^[8-11]。MCM3 是 miR-520a 的可能靶基因,目前尚少见 miR-520a 调控 MCM3 的相关报道。本研究通过检测急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)组织、细胞中 miR-520a 调控 MCM3 的表达及对细胞增殖的影响,以期对 B-ALL 的临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人急性 B 淋巴细胞白血病细胞株(BALL-1)购于北京北纳创联生物技术研究院;健康人外周血 B 淋巴细胞来自健康志愿者外周血。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司)在 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.1.2 骨髓标本

选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月本院初诊 B-ALL 患者 30 例,所有患者均为原发、无转移、未经过任何化疗的初次病患。该研究通过本院伦理委员会批准(2018PS231),并经患者知情同意后进行。20 例非恶性血液病患者骨髓组织作为对照。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染

将对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,培养过夜后采用 lipofectamine 3000 作为转染试剂,按照说明书进行转染。转染 12 h 观察细胞状态并更换新鲜培养基。miR-520a mimics、miR-520a inhibitor 和 miR-520a NC 均购自上海吉玛生物有限公司。空载体 pCDNA3.1 和 pCDNA3.1-MCM3 野生型质粒购自上海吉凯基因生物技术有限公司。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qPCR)

使用 TRIzol 法分别提取各组细胞 RNA,使用 miRNA 逆转录试剂盒取 0.2 μg 逆转录成 cDNA,使用 miRNA qRT-PCR TB Green[®] 试剂盒和相应引物通过 qPCR 仪进行扩增检测,结果数据采用 2^{-ΔΔCt} 方法分析。以 U6 为内参,计算 miR-520a 相对表达水平。

1.2.3 Western blot

收集各组细胞后,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白并采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加 MCM3 (Abcam 兔抗人,1:1 000)和 β-actin (Abcam 兔抗人,1:2 000)一抗

4 ℃过夜。次日 TBST 洗膜 3 次后二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,1:5 000)37 ℃孵育 1 h;洗膜后 ECL 显影,使用 Image J 软件以 β-actin 为内参进行条带灰度分析。

1.2.4 CCK-8 测细胞增殖能力

取对数生长期的细胞,接种于 96 孔板(2×10⁴ 个/mL),每组设 5 个平行孔。12 h 后,进行细胞处理实验并观察细胞,实验结束后,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液每孔加入 10 μL CCK-8 试剂和 100 μL 的 PBS 溶液,于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度(A)值。细胞增殖率=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)×100%。

1.2.5 miR-520a 靶基因预测

使用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)网站预测 MCM3 是 miR-520a 可能的目标靶基因,并找到他们之间的作用位点进行实验验证。

1.2.6 双荧光素酶报告系统

化学合成包含有与 miR520a 互补结合的靶基因 MCM3 3'-UTR 序列片段和突变的 MCM3 3'-UTR,细胞接种 24 孔板(2×10⁴ 个/mL),待细胞生长达到 60%融合后进行转染。转染分为 miR-520a mimics+空载体组、miR-520a mimics+3'-UTR 野生型组、miR-520a mimics+3'-UTR 突变型组,设 3 个复孔。转染后按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-520a 在 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞和 BALL-1 中的表达

结果显示,miR-520a 在非恶性血液肿瘤患者骨髓淋巴细胞的表达水平显著高于其在 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞中的表达(图 1A),差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-520a 在健康人外周血淋巴细胞中的表达水平显著高于其在 BALL-1 细胞系中的表达(图 1B),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 miR-520a 能够参与调控 B-ALL 细胞的增殖

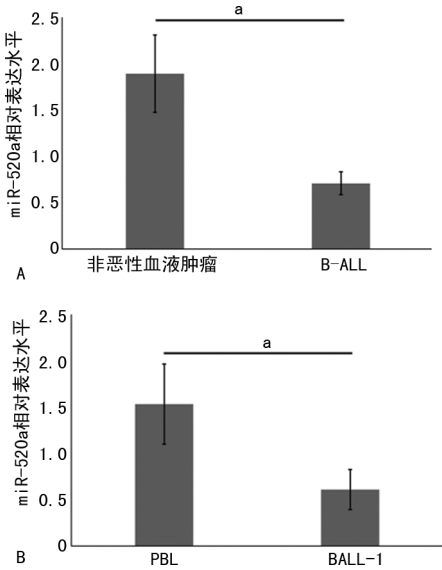
向 BALL-1 细胞中分别转染 miR-NC 和 miR-520a mimics,检测转染 48 h 后各组的 BALL-1 细胞增殖能力。与 miR-NC 组比较,miR-520a mimics 组 BALL-1 细胞的增殖活力显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 miR-520a 靶向 MCM3 基因 mRNA 3'-UTR

Targetscan 网站生物信息学预测显示,MCM3 基因 mRNA 3'-UTR 中含有与 miR-520a 互补的核苷酸序列,见图 3A;双荧光素酶报告基因检测显示,与

miR520 mimics+空载体组比较,miR-520 mimics+3'UTR 野生型组的荧光活性显著降低($P<0.05$),miR-520 mimics+3'UTR 突变型组的荧光活性无显著变化(图 3B、C)。

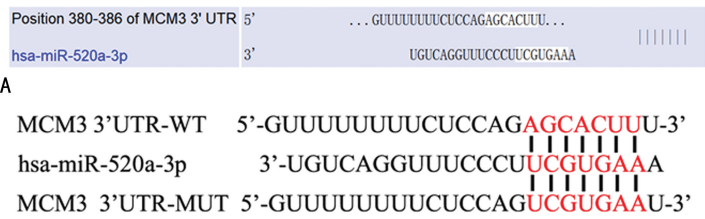
为了进一步证实 MCM3 是 miR-520a 的靶基因,使用 miR-520a mimics BALL-1 细胞。Western blot 结果显示在 miR-520a mimics 组的 MCM3 蛋白表达显著低于在 miR-NC 组的表达(图 3D)。



A:miR-520a 在非恶性血液肿瘤患者骨髓淋巴细胞(Normal lymphocyte)和 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞中的表达比较;B:miR-520a 在健康人外周血淋巴细胞(PBL)和 BALL-1 中的表达比较;^a: $P<0.05$ 。

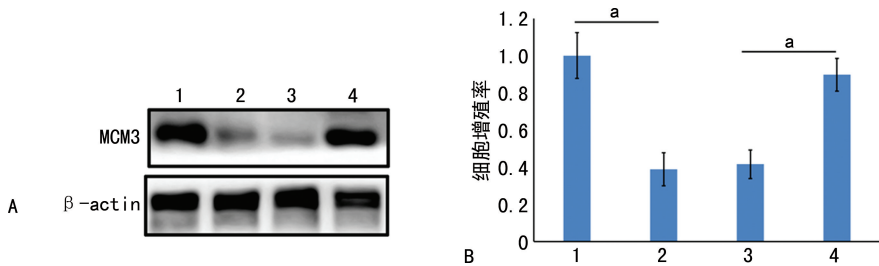
图 1 miR-520a 在 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞和 BALL-1 中的表达

2.4 MCM3 过表达能够逆转 miR-520a mimics 调控 BALL-1 细胞增殖的作用



A:通过 Targetscan 软件分析 miR-520a 靶向 MCM3 基因 mRNA 3'-UTR 及作用位点;B、C:双萤光素酶报告基因系统检测 miR-520a 与 MCM3 的 3'-UTR 结合情况;D:miR-520a mimics 转染后 MCM3 的蛋白变化;^a: $P<0.05$ 。

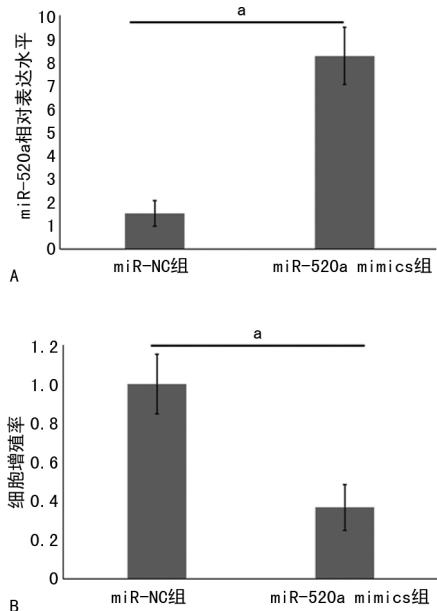
图 3 MCM3 是 miR-520a 的靶基因



A:对照组和实验组中 MCM3 蛋白表达水平;B:对照组和实验组细胞增殖能力变化;1:miR-NC 组;2:miR-520a mimics 组;3:miR-520a mimics +pCDNA3.1 组;4:miR-520a mimics+MCM3-WT 组;^a: $P<0.05$ 。

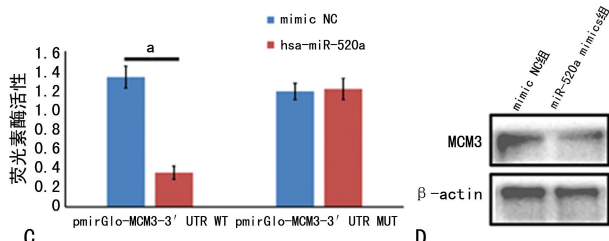
图 4 MCM3 过表达能够逆转 miR-520a mimics 调控 BALL-1 增殖的作用

与 miR-NC 组相比,miR-520a mimics 组 BALL-1 中 MCM3 的蛋白表达显著降低(图 4A),且 miR-520a mimics 组 BALL-1 细胞增殖活力显著降低(图 4B),差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-520a mimics + pCDNA3.1 组对比,miR-520a mimics + MCM3-WT 组 BALL-1 细胞中 MCM3 蛋白表达水平显著升高(图 4A),miR-520a mimics + MCM3-WT 组 BALL-1 增殖活力显著增加(图 4B),差异有统计学意义($P<0.05$)。



A:miR-520a mimics 转染 BALL-1 后 miR-520a 的表达水平变化;B:miR-520a mimics 转染 BALL-1 后细胞增殖率与 miR-NC 组比较;^a: $P<0.05$ 。

图 2 miR-520a 能够参与调控 BALL-1 的增殖



3 讨 论

肿瘤的发生、发展常与肿瘤细胞生物学特征的改变密切相关。大量研究显示,肿瘤细胞的恶性增殖是肿瘤形成及发展的关键机制。目前研究显示,人体中有许多 miRNA 在肿瘤中起着类似原癌基因或者抑癌基因的作用^[12]。现已发现 miR-520a 在乳腺癌、结肠癌、胃癌、骨肉瘤、肝癌等实体肿瘤均表现出抑癌因子的特征^[13-17]。且 miR-520a 在慢性粒细胞白血病中能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[18]。

本研究以成人 B-ALL 患者为研究对象,分析 miR-520a 在 B-ALL 群体中的表达特点,结果显示成人 B-ALL 患者骨髓淋巴细胞和 BALL-1 细胞系中 miR-520a 表现明显低表达水平,提示 miR-520a 的表达异常与 BALL 的发生、发展存在一定相关性。这与 miR-520a 在卵巢癌和乳腺癌中的低表达相一致,miR-520a 在这两种癌症中也表现出低于正常组织的表达水平^[19-20]。进一步研究发现,在 BALL-1 中上调 miR-520a 的表达可以促进细胞的增殖,表示 miR-520a 可能在 B-ALL 中发挥抑癌基因的作用。这与 miR-520a 在许多癌症中发挥的作用是一致的^[13-17]。

TargetScan 软件预测结果,miR-520a 与 MCM3 的 3'UTR 区域存在潜在结合位点。双荧光素酶报告实验显示,仅 miR-520 mimics+3'UTR 野生型组荧光素酶活性显著降低,提示 miR-520a 可能通过直接与 MCM3 的 3'UTR 区域结合抑制 MCM3 的表达,且在 BALL-1 细胞中过表达 miR-520a,能够显著下调 MCM3 的蛋白表达水平。为了进一步证实 miR-520a 对 MCM3 的靶向调控作用,在 miR-520a 过表达组中过表达 MCM3 蛋白,发现 MCM3 过表达能够逆转 miR-520a mimics 调控 BALL-1 细胞增殖的作用。这表明 miR-520a 是通过抑制靶基因 MCM3 的表达参与调控 BALL-1 细胞的增殖过程。在肝癌中 MCM3 高表达并与患者的不良预后呈正相关,可以作为一个肝癌进展的标志物^[21]。MCM3 的高表达提示结直肠癌预后不良,并促进 G₁/S 细胞周期的进展、增殖、迁移和侵袭^[22]。基因表达谱分析显示 MCM3 能反映浸润性导管癌患者的预后^[10]。高表达水平的磷酸化 MCM3 能够促进肾癌细胞增殖和抑制凋亡^[23]。这些都揭示了 MCM3 在恶性肿瘤中的促癌作用,与 MCM3 在 B-ALL 中的促癌作用相一致。

综上所述,本研究初步探讨了 miR-520a 在 B-ALL 中的作用及机制,验证了 miR-520a 靶向调控 MCM3 的表达对 BALL-1 细胞增殖的影响,为 B-ALL 的分子靶向治疗提供理论依据。然而,由于 miRNA-靶基因调控的多样性,关于 miR-520a 抑制 B-ALL 的生物学特征是否通过其他作用方式和信号通路,还需要进一步研究验证。

参考文献

- [1] JABBOUR E, O'BRIEN S, KONOPLEVA M, et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer*, 2015, 121(15): 2517-2528.
- [2] AL U O, GUPTA N, BAKHRIBAH H, et al. Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99: 189-199.
- [3] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-221.
- [4] LI J, WEI J, MEI Z, et al. Suppressing role of miR-520a-3p in breast cancer through CCND1 and CD44[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1): 146-154.
- [5] LIU Y, MIAO L, NI R, et al. microRNA-520a-3p inhibits proliferation and cancer stem cell phenotype by targeting HOXD8 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3529-3535.
- [6] ZHANG N, XING X, GU F, et al. Ropivacaine inhibits the growth, migration and invasion of gastric cancer through attenuation of WEE1 and PI3K/AKT signaling via miR-520a-3p[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5309-5321.
- [7] HONG S, CHEN S, WANG X, et al. ATAD2 silencing decreases VEGFA secretion through targeting has-miR-520a to inhibit angiogenesis in colorectal cancer[J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(6): 761-768.
- [8] HA S, SHIN S M, NAMKOONG H, et al. Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8386-8395.
- [9] JANKOWSKA-KONSUR A, KOBIERZYCKI C, REICH A, et al. Expression of MCM-3 and MCM-7 in primary cutaneous t-cell lymphomas[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(11): 6017-6026.
- [10] ZHAO Y, WANG Y, ZHU F, et al. Gene expression profiling revealed MCM3 to be a better marker than Ki67 in prognosis of invasive ductal breast carcinoma patients[J]. *Clin Exp Med*, 2020, 20(2): 249-259.
- [11] CIEPLIŃSKI K, JÓŹWIK M, SEMCZUK-SIKORA A, et al. Expression of p53 and selected prolifera-

- tive markers (Ki-67, MCM3, PCNA, and topoisomerase II α) in borderline ovarian tumors; Correlation with clinicopathological features[J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(2):171-179.
- [12] IQBAL M, ARORA S, PRAKASAM G, et al. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 70:3-20.
- [13] LIU X, SONG J, KANG Y, et al. Long noncoding RNA SOX21-AS1 regulates the progression of triple-negative breast cancer through regulation of miR-520a-5p/ORMDL3 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(11):4601-4611.
- [14] QU X, YANG L, SHI Q Q, et al. Lidocaine inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by upregulating mir-520a-3p and targeting EGFR[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(12):1974-1979.
- [15] PAN C, LIU Q, WU X. HIF1 α /miR-520a-3p/AKT1/mTOR feedback promotes the proliferation and glycolysis of gastric cancer cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:10145-10156.
- [16] LI J, SHAO W, ZHAO J. MiR-520a-3p inhibits malignant progression of epithelial ovarian cancer by targeting SUV39H1 expression[J]. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 570-578.
- [17] HUANG J, YANG J, LEI Y, et al. An ANC-CA/PRO2000-miR-520a-E2F2 regulatory loop as a driving force for the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(5):e229.
- [18] KAYMAZ B T, CETINTAS V B, AKTAN C, et al. MicroRNA-520a-5p displays a therapeutic effect upon chronic myelogenous leukemia cells by targeting STAT3 and enhances the anticarcinogenic role of capsaicin[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(9):8733-8742.
- [19] LI J, SHAO W, ZHAO J. MiR-520a-3p inhibits malignant progression of epithelial ovarian cancer by targeting SUV39H1 expression[J/OL]. [2020-11-19] (2020-12-10). *Hum Cell*, <https://link.springer.com/article/10.1007/s13577-020-00455-2>.
- [20] SUN D, ZHONG J, WEI W, et al. Long non-coding RNAs lnc-ANGPTL1-3: 3 and lnc-GJA10-12:1 present as regulators of sentinel lymph node metastasis in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5):188.
- [21] LI H T, WEI B, ZQ L, et al. Diagnostic and prognostic value of MCM3 and its interacting proteins in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6):308.
- [22] ZHOU H, XIONG Y, ZHANG G, et al. Elevated expression of minichromosome maintenance 3 indicates poor outcomes and promotes G1/S cell cycle progression, proliferation, migration and invasion in colorectal cancer[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7):BSR20201503.
- [23] GAO Z, MAN X, LI Z, et al. PLK1 promotes proliferation and suppresses apoptosis of renal cell carcinoma cells by phosphorylating MCM3[J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(6):412-423.

(收稿日期:2020-09-20 修回日期:2021-02-08)

(上接第 2365 页)

- [12] EBRAHIM A S, SABBAGH H, LIDDANE A A, et al. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(9):2013-2022.
- [13] WENG C, CHEN Y, WU Y, et al. Silencing UBE4B induces nasopharyngeal carcinoma apoptosis through the activation of caspase3 and p53[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:2553-2561.
- [14] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):460-473.
- [15] JI J, WU L W, FENG J, et al. Cafestol preconditioning attenuates apoptosis and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting ERK/PPAR γ pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84:106529.
- [16] YC M, LOU X L, YANG L Y, et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(5):1103-1113.
- [17] YAN X Y, QU X Z, XU L, et al. Insight into the role of p62 in the cisplatin resistant mechanisms of ovarian cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:128.

(收稿日期:2020-09-18 修回日期:2021-03-08)