

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2503192

论著·实验研究

## miR-100-5p 对急性髓系白血病细胞增殖及凋亡的影响及其分子机制

樊小如<sup>1</sup> 杨莹<sup>2</sup> 孙寅<sup>2</sup> 杜聪梅<sup>2</sup>

(1.滕州市中心人民医院新生儿科, 山东滕州 277500; 2.滕州市中心人民医院儿科, 山东滕州 277500)

**[摘要]** **目的** 探讨微小 RNA (miRNA, miR) -100-5p 靶向 Tribbles 同源蛋白 1 (Tribbles pseudokinase 1, TRIB1) 对急性髓系白血病细胞增殖及凋亡活性的影响。**方法** 收集 16 例健康体检儿童 (对照组) 和 16 例 AML 患儿 (AML 组) 外周血。将 HL-60 细胞分为空白组、mimic NC 组、miR-100-5p mimic 组、si-NC 组、si-TRIB1 组、miR-100-5p mimic+TRIB1 过表达质粒阴性对照 (OE-NC) 组、miR-100-5p mimic+TRIB1 过表达质粒 (OE-TRIB1) 组。采用实时荧光定量 PCR 检测外周血和 HL-60 细胞中 miR-100-5p、TRIB1 mRNA 表达; 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色、CCK-8 法检测 HL-60 细胞增殖; 流式细胞术检测 HL-60 细胞凋亡; Western blot 法检测 HL-60 细胞中 TRIB1、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、p53、程序性死亡受体-1 (programmed cell death protein 1, PD-1)、程序性死亡受体-配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 蛋白表达; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-100-5p 与 TRIB1 靶向关系。**结果** 与对照组比较, AML 组外周血中 miR-100-5p 表达降低, TRIB1 mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ )。与空白组、mimic NC 组比较, miR-100-5p mimic 组 miR-100-5p 表达、细胞凋亡率、p53 蛋白表达升高, TRIB1 mRNA 表达、EdU 阳性率、光密度 (optical density, OD)<sub>450</sub> 值及 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ); 与空白组、si-NC 组比较, si-TRIB1 组 TRIB1 mRNA 表达、EdU 阳性率、OD<sub>450</sub> 值及 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达降低, 细胞凋亡率、p53 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ); 与 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较, miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 TRIB1 mRNA 表达、EdU 阳性率、OD<sub>450</sub> 值及 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达升高, 细胞凋亡率、p53 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ); TRIB1-WT + miR-100-5p mimic 组荧光素酶活性低于 TRIB1-WT + mimic NC 组 ( $P<0.05$ )。**结论** 过表达 miR-100-5p 可通过下调 TRIB1 抑制 HL-60 细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2026, 28 (1): 99-106]

**[关键词]** 微小 RNA-100-5p; Tribbles 同源蛋白 1; 急性髓系白血病; 增殖; 凋亡; HL-60 细胞

### Effects of miR-100-5p on proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells and the underlying molecular mechanism

FAN Xiao-Ru, YANG Ying, SUN Yin, DU Cong-Mei. Department of Pediatrics, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou, Shandong 277500, China (Du C-M, Email: d4zx7l@163.com)

**Abstract: Objective** To investigate whether miR-100-5p regulates the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia (AML) cells by targeting Tribbles pseudokinase 1 (TRIB1). **Methods** Peripheral blood was collected from 16 healthy children (control group) and 16 children with AML (AML group). HL-60 cells were divided into seven groups: blank, mimic negative control (mimic NC), miR-100-5p mimic, small interfering RNA negative control (si-NC), si-TRIB1, miR-100-5p mimic + TRIB1 overexpression plasmid negative control (OE-NC), and miR-100-5p mimic + TRIB1 overexpression plasmid (OE-TRIB1). The expression of miR-100-5p and TRIB1 mRNA in peripheral blood and HL-60 cells was detected by quantitative real-time PCR. Cell proliferation was assessed by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

[收稿日期] 2025-03-31; [接受日期] 2025-08-28

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202006010355)。

[作者简介] 樊小如, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 杜聪梅, 女, 主治医师。Email: d4zx7l@163.com。

(EdU) staining and the cell counting kit-8 (CCK-8) assay ( $OD_{450}$ ). Apoptosis was analyzed by flow cytometry. Protein levels of TRIB1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53, programmed cell death protein 1 (PD-1), and programmed death-ligand 1 (PD-L1) were determined by Western blot. The targeting relationship between miR-100-5p and TRIB1 was validated by a dual-luciferase reporter assay. **Results** Compared with the control group, miR-100-5p expression was decreased and TRIB1 mRNA expression was increased in the peripheral blood of the AML group ( $P<0.05$ ). Compared with the blank and mimic NC groups, the miR-100-5p mimic group showed higher miR-100-5p expression, apoptosis rate, and p53 protein, and lower TRIB1 mRNA expression, EdU-positive rate,  $OD_{450}$  value, and TRIB1, PCNA, PD-1, and PD-L1 proteins ( $P<0.05$ ). Compared with the blank and si-NC groups, the si-TRIB1 group exhibited reduced TRIB1 mRNA expression, EdU-positive rate,  $OD_{450}$  value, and TRIB1, PCNA, PD-1, and PD-L1 proteins, together with increased apoptosis rate and p53 protein ( $P<0.05$ ). Compared with the miR-100-5p mimic and miR-100-5p mimic + OE-NC groups, the miR-100-5p mimic + OE-TRIB1 group had elevated TRIB1 mRNA expression, EdU-positive rate,  $OD_{450}$  value, and TRIB1, PCNA, PD-1, and PD-L1 proteins, and reduced apoptosis rate and p53 protein ( $P<0.05$ ). Compared with the TRIB1-WT + mimic NC group, luciferase activity was decreased in the TRIB1-WT + miR-100-5p mimic group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Overexpression of miR-100-5p inhibits proliferation and induces apoptosis of HL-60 cells by downregulating TRIB1.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2026, 28(1): 99-106]

**Key words:** MiR-100-5p; Tribbles pseudokinase 1; Acute myeloid leukemia; Proliferation; Apoptosis; HL-60 cell

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种也可发生于儿童的血液系统肿瘤, 具有高度异质性, 其特征是未分化髓系原始细胞在骨髓和外周血中积聚, 导致细胞无限增殖以及细胞凋亡受到抑制<sup>[1-3]</sup>。近年来化疗和其他药物治疗取得了重大进展, 在一定程度上改善了 AML 临床结果, 但由于耐药性的快速发展和治疗后的高复发率, AML 患儿的长期生存率仍然很低<sup>[4]</sup>。因此, 探索影响 AML 细胞增殖、凋亡的分子机制对于 AML 的治疗意义重大。越来越多的研究表明, 微小 RNA (microRNA, miR) -100-5p 通过抑制蛋白质的翻译或者促进 mRNA 的降解, 来参与多种生理和病理过程<sup>[5]</sup>。如过表达 miR-100-5p 通过靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制 AML 细胞增殖<sup>[6]</sup>; 上调 miR-100 可抑制儿童急性淋巴细胞白血病细胞增殖并促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。但关于 miR-100-5p 影响 AML 细胞增殖及凋亡具体分子机制尚不清楚。Tribbles 同源蛋白 1 (Tribbles pseudokinase 1, TRIB1) 作为一种假激酶, 通过影响蛋白稳定性、细胞周期进程等方式在肿瘤发生、发展中发挥复杂作用<sup>[8]</sup>。研究显示, TRIB1 过表达通过调节同源框 A9 基因转录促进 AML 细胞增殖, 抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>, 且 miR-100-5p 与 TRIB1 可结合并影响乳腺癌进展<sup>[10]</sup>, 但 miR-100-5p 影响 AML 细胞增殖及凋亡是否有 TRIB1 参与尚不清楚。本研究旨在探究 miR-100-5p 对 AML 细胞增殖及凋亡的影响及分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 外周血收集及细胞来源

收集 2022 年 6 月—2024 年 6 月在滕州市中心医院就诊的 16 例 AML (WHO 分型 M1 型 2 例、M2 型 6 例、M3 型 4 例、M4 型 2 例、M5 型 2 例。未经过任何形式的治疗) 患儿的外周血作为 AML 组, 另取同期在本院进行体检的 16 例健康儿童的外周血作为对照组。收集的外周血标本经离心获得血清后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。本研究已获得参与者监护人的书面知情同意, 并通过本院伦理委员会批准 (伦理审批号: 2021-0015)。

人源髓系白血病细胞系 HL-60 购自上海弘顺生物科技有限公司。

### 1.2 主要试剂

miR-100-5p 模拟物 (miR-100-5p mimic; 序列为 5'-AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG-3') 及模拟物阴性对照 (mimic negative control, mimic NC; 序列为 5'-UUCUCCGAACGUCACGUTT-3')、TRIB1 小干扰 RNA (small interfering RNA-TRIB1, si-TRIB1; 序列为 5'-GACTCAGAAATAGGAACTTCA-3') 及小干扰 RNA 阴性对照 (small interfering RNA-negative control, si-NC; 序列为 5'-GACTCAGTTTTACCTTCTTCA-3') 由广州基迪奥生物科技有限公司合成, TRIB1 过表达 (over expression-TRIB1, OE-TRIB1) 质粒及其阴性对照 (over expression-negative control, OE-NC) 质粒由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。其余试剂包括 PrimeScript RT 试剂盒 (北京智杰方

远科技公司), SYBR Green PCR Master Mix (美国MCE公司), 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 试剂盒 (上海东寰生物公司), CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海泽叶生物科技有限公司), 兔源一抗 TRIB1、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、GAPDH、p53、程序性死亡受体-1 (programmed cell death protein 1, PD-1)、程序性死亡受体-配体1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 及二抗 (英国Abcam公司)。

### 1.3 细胞分组

HL-60 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下悬浮培养。细胞分为空白组、mimic NC 组、miR-100-5p mimic 组、si-NC 组、si-TRIB1 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组、miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组。空白组 HL-60 细胞正常培养; mimic NC 组、miR-100-5p mimic 组、si-NC 组、si-TRIB1 组 HL-60 细胞分别转染 50 nmol/L mimic NC、50 nmol/L miR-100-5p mimic、30 nmol/L si-NC、30 nmol/L si-TRIB1 24 h; miR-100-5p mimic+OE-NC 组 HL-60 细胞转染 50 nmol/L miR-100-5p mimic 和 2 μg/mL pcDNA 24 h; miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 HL-60 细胞转染 50 nmol/L miR-100-5p mimic 和 2 μg/mL pcDNA-TRIB1 24 h。通过 qRT-PCR 法检测各转染组 HL-60 细胞中 miR-100-5p 及 TRIB1 mRNA 表达水平, 评估是否转染成功。

### 1.4 外周血及 HL-60 细胞中 miR-100-5p 及 TRIB1 mRNA 表达检测

采用 TRIzol 试剂裂解外周血样本或细胞, 加入氯仿后离心分相; 收集上层水相, 经异丙醇沉淀 RNA、75% 乙醇洗涤后, 将 RNA 溶解于去离子水。随后, 使用 PrimeScript RT 试剂盒进行反转录, 合成 cDNA。最后, 采用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR 扩增, 设置标准程序 (95℃ 预变性, 40 个循环的 95℃ 变性/60℃ 退火延伸), 并通过熔解曲线验证扩增特异性。通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 miR-100-5p (以 U6 为内参) 的相对表达量及 TRIB1 mRNA (以 GAPDH 为内参) 的相对表达量。引物序列为: miR-100-5p 正向引物: 5'-GTGTTCAAGCCTAGATGCCCAA-3', 反向引物: 5'-GCATCTAGGCTTGAACACGCC-3'; TRIB1 正向引物: 5'-TTAGTTCCTTCTTCTGCTA-3', 反向引物:

5'-AGTCATTATCTGGTTGGTA-3'; U6 正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'; GAPDH 正向引物: 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3', 反向引物: 5'-TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG-3'。

### 1.5 EdU 染色检测细胞增殖

各组 HL-60 细胞以 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板, 与 50 μmol/L EdU 溶液共孵育 1 h 后, 加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛, 室温固定 20 min。加入 0.5% Triton X-100 孵育 10 min 后, 用 4',6-二氨基-2-苯基吲哚对细胞核进行染色 20 min。PBS 洗涤 3 次后, 采用倒置荧光显微镜对染色细胞进行成像, 并计算 EdU 阳性率。EdU 阳性率 (%) = (EdU 阳性细胞数/总细胞数) × 100%。

### 1.6 CCK-8 检测细胞增殖

HL-60 细胞以 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔体积为 200 μL。待细胞贴壁后, 按 1.3 所述分组处理后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 2 h, 于 450 nm 波长检测光密度 (optical density, OD) 值。OD<sub>450</sub> 值越大, 表明细胞增殖能力越强。

### 1.7 细胞凋亡率检测

HL-60 细胞以 6 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度接种于 12 孔板, 培养 12~16 h, 待细胞进入对数生长期并适应环境后收集, PBS 洗涤 2 次。重悬细胞于 100 μL 1 × Binding Buffer, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI (50 μg/mL), 室温避光孵育 15 min。随后加入 400 μL Binding Buffer 混匀, 立即上机行流式细胞术检测, 计算细胞凋亡率。凋亡率 (%) = [Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> (早期凋亡) 细胞数 + Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> (晚期凋亡/坏死) 细胞数] / 总细胞数 × 100%。

### 1.8 Western blot 检测 TRIB1、PCNA、p53、PD-1、PD-L1 蛋白表达

采用 RIPA 裂解缓冲液提取各组 HL-60 细胞总蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品 (30 μg) 行 12% SDS-PAGE 分离, 转至 PVDF 膜。随后, 将膜在含 5% 脱脂牛奶的 PBS 中封闭 1 h, 分别与一抗 TRIB1 (1: 3 000)、PCNA (1: 2 000)、p53 (1: 4 000)、PD-1 (1: 3 000)、PD-L1 (1: 2 000)、GAPDH (1: 5 000) 于 4℃ 孵育过夜。次日经二抗 (1: 5 000) 孵育 1 h 后。用 ECL 试剂盒显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。蛋白相对表达量 = 目标蛋白灰度值 /

GAPDH 灰度值。

### 1.9 双萤光素酶报告基因实验

通过 miRNA 靶点预测工具 starbase 网站 (<https://starbase.sysu.edu.cn>) 鉴定 miR-100-5p 在 TRIB1 3'UTR 区的结合位点, 设计 TRIB1 野生型 (TRIB1-WT) 序列和 TRIB1 突变型 (TRIB1-MUT) 序列, 克隆至 pGL3-Basic 载体的萤光素酶基因下游, 通过酶切鉴定载体构建成功。将构建成功的双萤光素酶报告基因载体分别与 50 nmol/L miR-100-5p mimic (TRIB1-WT+miR-100-5p mimic 组、TRIB1-MUT+miR-100-5p mimic 组) 或 50 nmol/L mimic NC (TRIB1-WT+mimic NC 组、TRIB1-MUT+mimic NC 组) 共转染至 HL-60 细胞, 转染 24 h 后弃去培养基, 每孔加入 100 μL 1 × Passive Lysis Buffer, 室温裂解 15 min。取 20 μL 裂解液, 使用双萤光素酶报告基因检测系统进行检测: 先加入 100 μL Luciferase Assay Reagent II 检测萤火虫萤光素酶活性并记录数据, 再加入 100 μL Stop & Glo® Reagent 淬灭并检测海肾萤光素酶活性。最后计算萤火虫萤光素酶/海肾萤光素酶萤光值比值。

### 1.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间比较采用两样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 健康儿童、AML 患儿 miR-100-5p 及 TRIB1 mRNA 表达比较

与对照组比较, AML 组患儿外周血中 miR-100-5p 表达降低 (分别为  $0.23 \pm 0.04$ 、 $1.00 \pm 0.00$ ;  $t=77.000$ ,  $P<0.001$ ), TRIB1 mRNA 表达升高 (分别为  $1.75 \pm 0.19$ 、 $1.00 \pm 0.00$ ;  $t=15.789$ ,  $P<0.001$ )。

### 2.2 上调 miR-100-5p 或沉默 TRIB1 对 HL-60 细胞 miR-100-5p 及 TRIB1 mRNA 表达的影响

与空白组、mimic NC 组比较, miR-100-5p mimic 组 miR-100-5p 表达升高, TRIB1 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ); 与空白组、si-NC 组比较, si-TRIB1 组 TRIB1 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ); 与 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组

比较, miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 TRIB1 mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组 HL-60 细胞 miR-100-5p 及 TRIB1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

分组	miR-100-5p	TRIB1 mRNA
空白组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
mimic NC 组	1.011 ± 0.012	0.983 ± 0.032
miR-100-5p mimic 组	2.881 ± 0.263 <sup>a,b</sup>	0.356 ± 0.043 <sup>a,b</sup>
si-NC 组	0.994 ± 0.021	1.011 ± 0.033
si-TRIB1 组	1.023 ± 0.031	0.284 ± 0.030 <sup>a,d</sup>
miR-100-5p mimic+OE-NC 组	2.938 ± 0.343	0.382 ± 0.051
miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组	2.954 ± 0.269	0.796 ± 0.094 <sup>c,e</sup>
<i>F</i> 值	169.300	286.600
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: a 示与空白组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 mimic NC 组比较,  $P<0.05$ ; c 示与 miR-100-5p mimic 组比较,  $P<0.05$ ; d 示与 si-NC 组比较,  $P<0.05$ ; e 示与 miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较,  $P<0.05$ 。[miR-100-5p] 微小 RNA-100-5p; [TRIB1] Tribbles 同源蛋白 1。

### 2.3 上调 miR-100-5p 或沉默 TRIB1 对 HL-60 细胞增殖的影响

miR-100-5p mimic 组 EdU 阳性率、OD<sub>450</sub> 值低于 mimic NC 组和空白组 ( $P<0.05$ ); si-TRIB1 组 EdU 阳性率、OD<sub>450</sub> 值低于 si-NC 组和空白组 ( $P<0.05$ ); 与 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较, miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 HL-60 细胞 EdU 阳性率、OD<sub>450</sub> 值升高 ( $P<0.05$ )。见表 2、图 1。

表 2 各组 HL-60 细胞 EdU 阳性率及 OD<sub>450</sub> 值比较

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	EdU 阳性率 (%)	OD <sub>450</sub> 值
空白组	35.6 ± 2.0	1.21 ± 0.13
mimic NC 组	36.0 ± 1.9	1.18 ± 0.11
miR-100-5p mimic 组	15.6 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	0.51 ± 0.07 <sup>a,b</sup>
si-NC 组	35.9 ± 1.8	1.20 ± 0.15
si-TRIB1 组	12.2 ± 0.8 <sup>a,d</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>a,d</sup>
miR-100-5p mimic+OE-NC 组	15.9 ± 0.8	0.53 ± 0.07
miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组	26.7 ± 1.4 <sup>c,e</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>c,e</sup>
<i>F</i> 值	327.400	73.540
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: a 示与空白组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 mimic NC 组比较,  $P<0.05$ ; c 示与 miR-100-5p mimic 组比较,  $P<0.05$ ; d 示与 si-NC 组比较,  $P<0.05$ ; e 示与 miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较,  $P<0.05$ 。[EdU] 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷; [OD] 光密度。

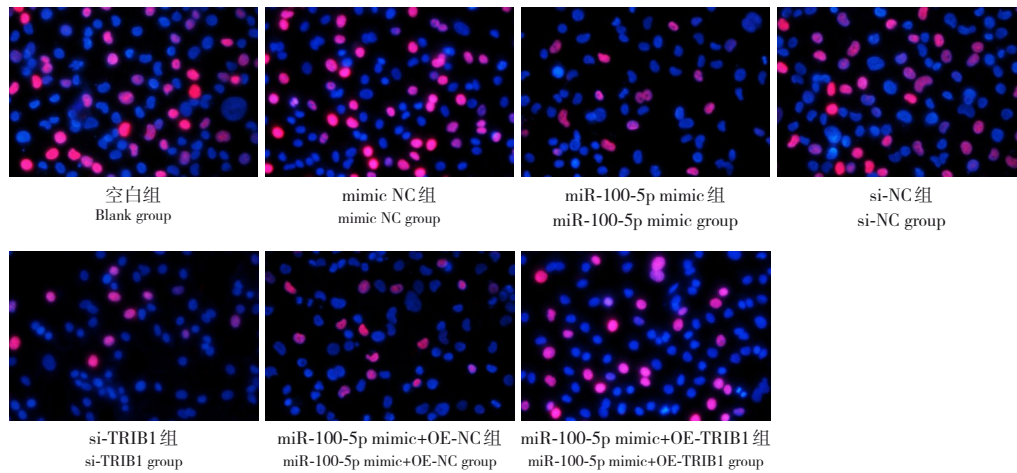


图 1 HL-60 细胞增殖的 EdU 染色检测 ( $\times 200$ ) 红色荧光为 EdU 阳性细胞, 蓝色荧光为细胞核。miR-100-5p mimic 组 EdU 阳性细胞比例低于 mimic NC 组、空白组; si-TRIB1 组 EdU 阳性细胞比例低于 si-NC 组、空白组; miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 EdU 阳性细胞比例较 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组升高。

#### 2.4 上调 miR-100-5p 或沉默 TRIB1 对 HL-60 细胞凋亡的影响

miR-100-5p mimic 组 ( $30.0\% \pm 1.6\%$ ) 细胞凋亡率高于 mimic NC 组 ( $8.0\% \pm 0.5\%$ ) 和空白组 ( $8.0\% \pm 0.4\%$ ) ( $P < 0.05$ ); si-TRIB1 组 ( $32.3\% \pm 1.8\%$ ) 细胞凋亡率高于 si-NC 组 ( $7.9\% \pm 0.5\%$ )

和空白组 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组 ( $28.8\% \pm 1.5\%$ ) 比较, miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 ( $15.6\% \pm 0.9\%$ ) 细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ ); 7 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ( $F = 566.100$ ,  $P < 0.001$ )。见图 2。

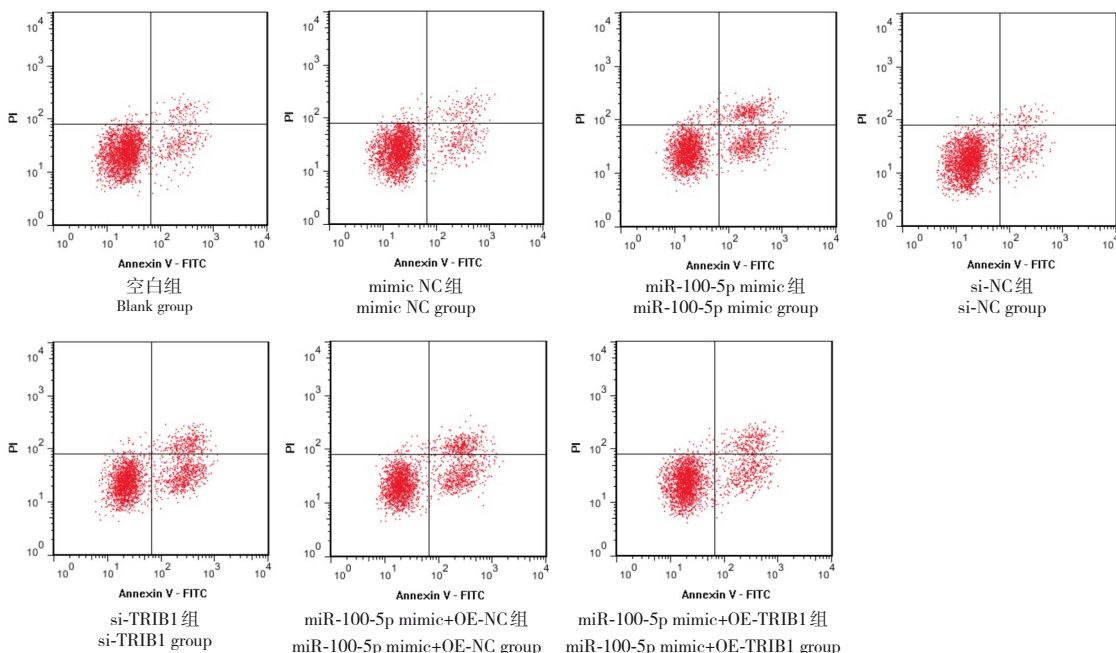


图 2 HL-60 细胞凋亡的流式细胞术检测 右下象限 (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 代表早期凋亡细胞; 右上象限 (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 代表晚期凋亡或坏死细胞; 左上象限 (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) 通常代表机械损伤或死亡的细胞; 左下象限 (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) 代表存活且未发生凋亡的正常细胞。细胞凋亡率 (%) = 右下象限细胞占比 + 右上象限细胞占比。si-TRIB1 组细胞凋亡率高于 si-NC 组、空白组; miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组细胞凋亡率低于 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组。

### 2.5 上调 miR-100-5p 或沉默 TRIB1 对 HL-60 细胞中 TRIB1、PCNA、p53、PD-1、PD-L1 蛋白表达的影响

与空白组、mimic NC 组比较，miR-100-5p mimic 组 HL-60 细胞中 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达降低，p53 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )；与空白组、si-NC 组比较，si-TRIB1 组 HL-60 细胞

中 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达降低，p53 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )；与 miR-100-5p mimic 组、miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较，miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组 HL-60 细胞中 TRIB1、PCNA、PD-1、PD-L1 蛋白表达升高，p53 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )，见表 3、图 3。

表 3 各组 HL-60 细胞 TRIB1、PCNA、p53、PD-1、PD-L1 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分组	TRIB1	PCNA	p53	PD-1	PD-L1
空白组	1.86 ± 0.19	1.21 ± 0.15	0.43 ± 0.05	1.011 ± 0.142	0.769 ± 0.081
mimic NC 组	1.89 ± 0.22	1.18 ± 0.16	0.45 ± 0.06	0.993 ± 0.114	0.781 ± 0.091
miR-100-5p mimic 组	0.71 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.96 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.364 ± 0.045 <sup>ab</sup>	0.253 ± 0.030 <sup>ab</sup>
si-NC 组	1.83 ± 0.18	1.16 ± 0.17	0.44 ± 0.06	1.021 ± 0.136	0.794 ± 0.092
si-TRIB1 组	0.52 ± 0.06 <sup>ad</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>ad</sup>	1.13 ± 0.12 <sup>ad</sup>	0.196 ± 0.022 <sup>ad</sup>	0.116 ± 0.021 <sup>ad</sup>
miR-100-5p mimic+OE-NC 组	0.73 ± 0.08	0.45 ± 0.06	0.94 ± 0.10	0.387 ± 0.051	0.271 ± 0.040
miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组	1.39 ± 0.17 <sup>ce</sup>	0.91 ± 0.11 <sup>ce</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>ce</sup>	0.679 ± 0.084 <sup>ce</sup>	0.418 ± 0.062 <sup>ce</sup>
F 值	95.150	71.670	70.830	81.390	117.200
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与空白组比较， $P < 0.05$ ；b 示与 mimic NC 组比较， $P < 0.05$ ；c 示与 miR-100-5p mimic 组比较， $P < 0.05$ ；d 示与 si-NC 组比较， $P < 0.05$ ；e 示与 miR-100-5p mimic+OE-NC 组比较， $P < 0.05$ 。[TRIB1] Tribbles 同源蛋白 1；[PCNA] 增殖细胞核抗原；[PD-1] 程序性细胞死亡蛋白 1；[PD-L1] 程序性细胞死亡配体 1。

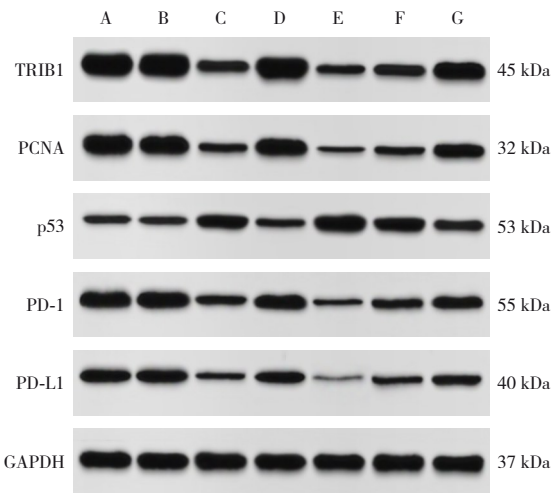


图 3 Western blot 检测 HL-60 细胞 TRIB1、PCNA、p53、PD-1、PD-L1 蛋白表达条带图 A: 空白组；B: mimic NC 组；C: miR-100-5p mimic 组；D: si-NC 组；E: si-TRIB1 组；F: miR-100-5p mimic+OE-NC 组；G: miR-100-5p mimic+OE-TRIB1 组。

### 2.6 miR-100-5p 靶向调控 TRIB1 验证

TRIB1 与 miR-100-5p 可结合，见图 4。TRIB1-WT+miR-100-5p mimic 组萤光素酶活性低于 TRIB1-WT+mimic NC 组 (分别  $0.336 \pm 0.062$ 、 $1.011 \pm 0.032$ ； $t=23.698$ ， $P < 0.001$ )；与 TRIB1-MUT+mimic

NC 组 ( $0.989 \pm 0.034$ ) 比较，TRIB1-MUT+miR-100-5p mimic 组 ( $0.992 \pm 0.028$ ) 萤光素酶活性差异无统计学意义 ( $t=0.167$ ， $P=0.871$ )。

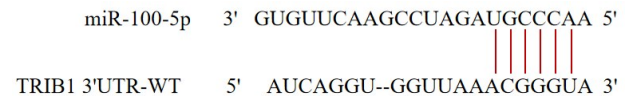


图 4 miR-100-5p 与 TRIB1 存在结合位点图

## 3 讨论

AML 是由于未成熟髓系细胞的异常增殖和细胞凋亡受损，导致造血系统受到抑制所致<sup>[11]</sup>。目前，AML 的主要治疗方法还不能明显改善 AML 患儿预后<sup>[12]</sup>。因此，深入探究调控 AML 细胞增殖与凋亡的分子机制具有重要意义。

miRNA 在进化上具有保守性，其异常表达存在于 AML 等多种恶性肿瘤中，并可影响肿瘤细胞的生物学行为<sup>[13]</sup>。miR-100-5p 作为 miR-100 家族的重要成员在进化上高度保守，其在多种肿瘤中存在异常表达，且可调控肿瘤细胞生物学行为<sup>[14]</sup>。例如，过表达 miR-100-5p 可抑制甲状腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡<sup>[15]</sup>；过表达 miR-100-5p 可在体

外和体内抑制脊索瘤生长<sup>[16]</sup>；miR-100上调可抑制急性淋巴细胞白血病细胞增殖<sup>[17]</sup>。本研究检测了健康儿童及AML患儿外周血中miR-100-5p表达水平，结果显示，与对照组比较，AML组患儿外周血miR-100-5p表达降低，提示其在AML组患儿体内呈异常下调状态，且可能与AML患儿预后不良相关，有待大样本临床研究进一步验证。以人髓系白血病细胞系HL-60为研究对象进行过表达转染实验，结果表明，上调miR-100-5p表达可抑制HL-60细胞增殖并诱导凋亡。此外，PCNA可环绕DNA并固定DNA聚合酶以维持DNA持续合成，进而增强细胞增殖能力<sup>[18]</sup>；p53作为序列特异性转录因子，其表达上调可触发细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究发现，与空白组、mimic NC组比较，miR-100-5p mimics组HL-60细胞中PCNA蛋白表达降低，p53蛋白表达升高。提示miR-100-5p有望成为AML干预的潜在有效靶点。

miRNA可通过直接靶向mRNA的3'-非翻译区下调基因表达，并破坏mRNA稳定性<sup>[20-21]</sup>。为进一步探究过表达miR-100-5p抑制HL-60细胞增殖并诱导细胞凋亡的分子机制，本研究证实TRIB1为miR-100-5p的靶基因。TRIB1作为致癌基因，在多种恶性肿瘤中高表达并推动肿瘤恶性进展<sup>[22]</sup>。例如，在唐氏综合征Ts1Cje小鼠模型中，TRIB1过表达可促进AML发生发展<sup>[23]</sup>；敲低TRIB1能抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖和克隆形成，并促进细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究结果显示，AML患儿外周血中TRIB1 mRNA呈高表达状态；敲低TRIB1后，HL-60细胞增殖能力减弱，凋亡能力增强；且过表达miR-100-5p可下调HL-60细胞中TRIB1 mRNA及蛋白表达。据此推测，上调miR-100-5p可能通过下调TRIB1表达抑制HL-60细胞增殖，促进细胞凋亡。为验证该推测，本研究进一步实验结果显示，过表达TRIB1逆转了过表达miR-100-5p对HL-60细胞增殖及凋亡的影响，证实上调miR-100-5p可能通过降低TRIB1表达抑制HL-60细胞增殖，促进细胞凋亡。此外，PD-1作为重要免疫抑制分子，可通过与PD-L1相互作用促进肿瘤相关巨噬细胞和其他免疫细胞极化为促肿瘤表型，促进肿瘤细胞免疫逃逸和癌症进展<sup>[25]</sup>；已有研究表明，TRIB1缺失可进一步增强慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染小鼠中PD-1通路阻断效果<sup>[26]</sup>。本研究中各组HL-60细胞PD-1、PD-L1蛋白表达变化说明上调miR-100-5p通过下调TRIB1抑制HL-60细胞增殖，

促进细胞凋亡的机制可能与PD-1、PD-L1有关。另有研究报道，TRIB1可通过调控MEK1/ERK通路参与髓系白血病发生发展<sup>[27]</sup>，提示上调miR-100-5p可能通过调控TRIB1-MEK1/ERK通路发挥上述作用，后续需设计实验验证具体机制。

综上所述，上调miR-100-5p可通过下调TRIB1表达抑制HL-60细胞增殖，促进细胞凋亡，本研究为AML治疗提供了潜在新靶点。但本研究存在一定局限性：其一，尽管观察到AML患儿中miR-100-5p低表达和TRIB1高表达的显著趋势，但尚未系统分析两者表达水平与临床预后指标及治疗反应的相关性；其二，研究所用HL-60细胞系源自成人AML-M2/M3患者，而临床样本来自儿童AML（涵盖M1-M5亚型）。尽管HL-60细胞广泛用于AML机制研究，但其成人来源、特定分子特征及M2/M3亚型背景，可能与儿童AML生物学特性存在差异，这可能影响miR-100-5p/TRIB1通路的调控机制的适用性。未来研究需在更多儿童AML原代细胞或代表性细胞模型中验证本研究发现，以增强结论的说服力。

作者贡献声明：樊小如负责论文设计、查阅文献、文章起草；杨莹、孙寅负责数据收集和整理、数据分析；杜聪梅负责论文审校和修改。

利益冲突声明：所有作者声明无利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] Zhang H, Tao Y, Ding X, et al. Roles of the hsa\_circ\_0013880/USP32/Rap1b axis in the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2023, 55(3): 382-393. PMID: 36951484. PMCID: PMC10160239. DOI: 10.3724/abbs.2023037.
- [2] Tseng S, Lee ME, Lin PC. A review of childhood acute myeloid leukemia: diagnosis and novel treatment[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(11): 1614. PMID: 38004478. PMCID: PMC10674205. DOI: 10.3390/ph16111614.
- [3] Shao X, Zhong L, Chu X, et al. ZNF460-regulated COMMD7 promotes acute myeloid leukemia proliferation via the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Int J Med Sci, 2023, 20(4): 520-529. PMID: 37057209. PMCID: PMC10087627. DOI: 10.7150/ijms.80047.
- [4] Rasche M, Zimmermann M, Steidel E, et al. Survival following relapse in children with acute myeloid leukemia: a report from AML-BFM and COG[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(10): 2336. PMID: 34066095. PMCID: PMC8151466. DOI: 10.3390/cancers13102336.

- [5] Wei X, Feng Y, Fu Y, et al. miR-100-5p is upregulated in multiple myeloma and involves in the pathogenesis of multiple myeloma through targeting MTMR3[J]. *Hematology*, 2023, 28(1): 2196857. PMID: 37014739. DOI: 10.1080/16078454.2023.2196857.
- [6] 徐婧, 刘威, 田丽, 等. miR-100-5p 靶向 mTOR 对急性髓样白血病细胞增殖的影响[J]. *解剖科学进展*, 2022, 28(5): 511-514. DOI: 10.16695/j.cnki.1006-2947.2022.05.001.
- [7] 唐燕来, 黄礼彬, 王丽娜, 等. miR-100 及 miR-99a 影响儿童急性淋巴细胞白血病细胞增殖和凋亡的研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2015, 30(2): 133-137. DOI: 10.7504/ek20150206014.
- [8] Shi G, Holgersson K, Xin Z, et al. TRIB1 facilitates the proliferation and migration of ovarian cancer cells by inducing EMT progression[J]. *Histol Histopathol*, 2024: 18868. PMID: 39807763. DOI: 10.14670/HH-18-868. Epub ahead of print.
- [9] Yoshino S, Yokoyama T, Sunami Y, et al. Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9[J]. *Blood*, 2021, 137(1): 75-88. PMID: 32730594. PMCID: PMC7976434. DOI: 10.1182/blood.2019004586.
- [10] Bhushan L, Kandpal RP. EphB6 receptor modulates micro RNA profile of breast carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22484. PMID: 21811619. PMCID: PMC3139643. DOI: 10.1371/journal.pone.0022484.
- [11] Du F, Jin T, Wang L. Mechanism of action of decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia by regulating LINC00599 [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2023, 2023: 2951519. PMID: 36874552. PMCID: PMC9977558. DOI: 10.1155/2023/2951519.
- [12] Huang Z, Shen Y, Fan X, et al. Yinzhihuang injection induces apoptosis and suppresses tumor growth in acute myeloid leukemia cells[J]. *PLoS One*, 2023, 18(10): e0289697. PMID: 37816017. PMCID: PMC10564230. DOI: 10.1371/journal.pone.0289697.
- [13] Ghazaryan A, Wallace JA, Tang WW, et al. miRNA-1 promotes acute myeloid leukemia cell pathogenesis through metabolic regulation[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1192799. PMID: 37229187. PMCID: PMC10203238. DOI: 10.3389/fgene.2023.1192799.
- [14] Li X, Ren Y, Liu D, et al. Role of miR-100-5p and CDC25A in breast carcinoma cells[J]. *PeerJ*, 2022, 9: e12263. PMID: 35036112. PMCID: PMC8734459. DOI: 10.7717/peerj.12263.
- [15] Ma P, Han J. Overexpression of miR-100-5p inhibits papillary thyroid cancer progression via targeting FZD8[J]. *Open Med (Wars)*, 2022, 17(1): 1172-1182. PMID: 35859793. PMCID: PMC9263890. DOI: 10.1515/med-2022-0490.
- [16] Zhang H, Yang K, Ren T, et al. miR-100-5p inhibits malignant behavior of chordoma cells by targeting IGF1R[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 4129-4137. PMID: 32606920. PMCID: PMC7293400. DOI: 10.2147/CMAR.S252185.
- [17] Li XJ, Luo XQ, Han BW, et al. MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(8): 2189-2198. PMID: 24030073. PMCID: PMC3798962. DOI: 10.1038/bjc.2013.562.
- [18] Yuan Z, Georgescu R, Yao NY, et al. Mechanism of PCNA loading by Ctf18-RFC for leading-strand DNA synthesis[J]. *Science*, 2024, 385(6708): eadk5901. PMID: 39088616. PMCID: PMC11349045. DOI: 10.1126/science.adk5901.
- [19] Zhao Y, Ma R, Wang C, et al. CAPG interference induces apoptosis and ferroptosis in colorectal cancer cells through the P53 pathway[J]. *Mol Cell Probes*, 2023, 71: 101919. PMID: 37468079. DOI: 10.1016/j.mcp.2023.101919.
- [20] Wang X, He Y, Mackowiak B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases[J]. *Gut*, 2021, 70(4): 784-795. PMID: 33127832. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322526.
- [21] Li M, Xiao Y, Liu M, et al. MiR-26a-5p regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion via inhibiting hydroxysteroid dehydrogenase like-2 in cervical cancer cell[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 876. PMID: 35948893. PMCID: PMC9367141. DOI: 10.1186/s12885-022-09970-x.
- [22] Kim T, Johnston J, Castillo-Lluya S, et al. TRIB1 regulates tumor growth via controlling tumor-associated macrophage phenotypes and is associated with breast cancer survival and treatment response[J]. *Theranostics*, 2022, 12(8): 3584-3600. PMID: 35664073. PMCID: PMC9131267. DOI: 10.7150/thno.72192.
- [23] Yoshino S, Tanaka M, Sunami Y, et al. Trib1 promotes the development of acute myeloid leukemia in a Ts1Cje mouse model of Down syndrome[J]. *Leukemia*, 2022, 36(2): 558-561. PMID: 34381180. DOI: 10.1038/s41375-021-01384-1.
- [24] Zhang LJ, Wang F, Qi PY, et al. miR-513b-5p inhibits the proliferation and promotes apoptosis of retinoblastoma cells by targeting TRIB1[J]. *Open Med (Wars)*, 2021, 16(1): 1364-1371. PMID: 34589612. PMCID: PMC8435558. DOI: 10.1515/med-2021-0343.
- [25] Lin X, Kang K, Chen P, et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 108. PMID: 38762484. PMCID: PMC11102195. DOI: 10.1186/s12943-024-02023-w.
- [26] McClory SE, Bardhan O, Rome KS, et al. The pseudokinase Trib1 regulates the transition of exhausted T cells to a KLR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> effector state, and its deletion improves checkpoint blockade[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(8): 112905. PMID: 37527035. PMCID: PMC10540077. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112905.
- [27] Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, et al. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis[J]. *Blood*, 2010, 116(15): 2768-2775. PMID: 20610816. DOI: 10.1182/blood-2009-10-246264.

(本文编辑: 杨丹)

©《中国当代儿科杂志》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议