

网络出版时间: 2020-12-25 11:11 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201224.1106.012.html>

miR-33-5p 靶向调控 JNK1/c-Jun 通路降低 口腔鳞状细胞癌多重耐药性

韩永洁¹, 王兴国², 邓璐¹, 杜蔚蔚¹

摘要 目的 探讨 miR-33-5p 调控 c-Jun 氨基末端激酶 1 (JNK1) 通路对口腔鳞状细胞癌多重耐药性的影响。方法 CAL-27 细胞分为 CAL-27 组、CAL-27/CBP 组、CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组、CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组, 卡铂 (CBP) 诱导耐药细胞株, 根据组别转染 scramble inhibitor 或 miR-33-5p inhibitor, MTT 检测细胞的多重耐药性, RT-PCR 检测 miR-33-5p 的表达, 荧光素酶报告实验检测 miR-33-5p 和 JNK1 靶向作用, Western blot 检测 JNK1/c-Jun 通路的激活以及 MDR1 的表达, 流式细胞术检测 Rh123 聚集结果。结果 与 CAL-27 组比较, CAL-27/CBP 的多重耐药性提高 ($P < 0.01$), miR-33-5p 表达水平升高 ($P < 0.01$), JNK1/c-Jun 通路活化水平降低 ($P < 0.01$), Rh123 阳性细胞百分比降低 ($P < 0.01$), MDR1 蛋白水平升高 ($P < 0.01$), 同时荧光素酶报告实验结果显示 miR-33-5p 靶向作用于 JNK1; 与 CAL-27/CBP 组比较, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞的多重耐药性降低 ($P < 0.05$), miR-33-5p 表达水平降低 ($P < 0.01$), JNK1/c-Jun 通路活化水平升高 ($P < 0.01$), Rh123 阳性细胞百分比升高 ($P < 0.01$), MDR1 蛋白水平降低 ($P < 0.01$)。结论 miR-33-5p 通过靶向调控 JNK1/c-Jun 通路降低 CAL-27/CBP 耐药细胞株的多重耐药性。

关键词 口腔鳞状细胞癌; 多重耐药性; JNK1; miR-33-5p

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0227-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.011

口腔癌是全球最常见的十种癌症之一, 尽管研究和治疗不断取得新的进展, 但在过去几年中生存率并未显著提高^[1]。化疗是治疗口腔癌的主要方法之一, 然而肿瘤细胞对化疗药物产生的耐药性是影响该方法疗效的主要难题^[2]。肿瘤多重耐药有着复杂的机制, 多重耐药基因 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 表达产生的 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是其中的关键因子^[3]。c-Jun 氨基末端激

酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK), 在诸多文献中报道了其多重耐药性的关系, 基于 JNK1 的靶向治疗有望成为新的治疗方案^[4-6]。

微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 是一种长度约为 23 个碱基的小分子单链 RNA, 对机体的基因表达调控具有重要作用, 广泛运用于恶性肿瘤的早期诊断和靶向治疗。通过生物信息学预测, miR-33-5p 与 JNK1 存在可能的靶向结合位点, 因此, 该研究拟通过人舌鳞癌细胞株 CAL-27 构建耐药细胞株, 研究 miR-33-5p 靶向 JNK1 对耐药细胞的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 人舌鳞癌细胞株 CAL-27 (中国科学院上海细胞库), 在 5% CO₂ 的 37 °C 环境温度下, 培养于 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基中。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 卡铂 (carboplatin, CBP)、顺铂 (cisplatin, DDP)、紫杉醇 (paclitaxel, PTX)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 购自齐鲁制药有限公司, Trizol 试剂、RIPA 试剂、BCA 试剂盒、MTT 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, Taqman miRNA RT 及 universal master mix 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司, lipofectamine 2000 试剂购自美国 Thermo Fisher 公司, 荧光素酶报告试剂盒购自美国 Promega 公司, Rh123 试剂购自美国 Sigma 公司, miR-33-5p mimic 及其 inhibitor、scramble inhibitor 由上海吉玛制药技术有限公司合成, 引物由北京擎科生物科技有限公司合成, 实验所用一抗购自英国 Abcam 公司, 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组与处理方法 将 CAL-27 细胞分为 CAL-27 组、CAL-27/CBP 组、CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组、CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组。除 CAL-27 组细胞外, 其余各组细胞通过

2020-08-12 接收

基金项目: 青海省卫生健康委员会课题 (编号: 2017-wjzdx-08)

作者单位: 青海省人民医院¹ 颌面外科, ² 肿瘤内科, 西宁 810007

作者简介: 韩永洁, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: han_000aaa111@163.com

CBP 诱导耐药细胞株,之后按照 lipofectamine 2000 的操作说明,将作为阴性对照的 scramble inhibitor 转染进入 CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞,将 miR-33-5p inhibitor 转染进入 CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞,转染 48 h 后进行后续检测。

1.2.2 耐药细胞株建立 使用 CBP 诱导耐药细胞株,将 CAL-27 细胞株培养于药物浓度 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养液中,3 d 后更换正常培养液培养 2 d,当细胞生长成片时递增剂量,持续加药诱导 6 个月,当细胞能够在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物浓度下正常生长传代,即为耐药细胞株 CAL-27/CBP。

1.2.3 耐药细胞形态鉴定 取对数生长期的 CAL-27、CAL-27/CBP 细胞接种于培养瓶中进行继续培养,待细胞贴壁后在显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.4 细胞生长曲线测定 将对数生长期的细胞按 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,正常条件下进行培养,每隔 24 h 对细胞计数一次,连续计数 7 d,以时间为横坐标,细胞数为纵坐标,制作生长曲线。

1.2.5 MTT 法检测细胞活力 将贴壁生长的细胞制成单细胞悬液,接种于 96 孔板,每组 3 个复孔,正常条件下培养 24 h,更换含对应浓度的化疗药物的培养基继续培养 72 h,MTT 试剂盒检测 570 nm 吸光度(A 值),计算细胞活力。细胞活力 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (阴性对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.6 RT-PCR 检测基因表达 Trizol 提取各组细胞总 RNA,反转录试剂盒合成 cDNA,通过 universal master mix 试剂盒提供的方法进行 PCR 反应,反应条件为: Stage 1: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, Stage 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环,结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算。

1.2.7 荧光素酶报告实验检测 miR-33-5p 和 JNK1 靶向关系 生物信息学网站 Targetscan 预测 miR-33-5p 和 JNK1 的靶向结合位点,构建 JNK1 pGL3 luciferase promoter 野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 载体,分别和 miR-33-5p mimic 和 mimic NC 共转染细胞,转染 48 h 后检测荧光素酶活性。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达 RIPA 溶液抽提各组细胞总蛋白,BCA 试剂盒定量,每孔 30 μg 上样量上样,10% SDS-PAGE 分离各组蛋白后转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,适量一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,第 2 天加入适量二抗孵育 2 h,滴加 ECL 显色液进行曝光显影,凝胶成像仪下拍照并分析条带灰度进行相对定量。

1.2.9 Rh123 聚集分析 各组细胞制成 200 μl 2

$\times 10^6$ 个/ml 的单细胞悬液,加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rh123 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。清洗后正常培养基重悬 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min,清洗后重悬于加入了 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI 的 PBS 缓冲液中。流式细胞仪 488 nm 激发光检测细胞 Rh123 聚集,计数 Rh123 阳性细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理实验数据,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的表示,两组间均数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAL-27/CBP 耐药细胞株的鉴定 对耐药细胞进行形态鉴定,细胞株 CAL-27 形态较为规则,细胞形态多呈圆形或椭圆形,大小均一;耐药细胞株 CAL-27/CBP 细胞大小不一,细胞形态呈多角形,部分细胞体积增大,胞质丰富,见图 1A;与 CAL-27 细胞株比较,CAL-27/CBP 细胞株生长缓慢,差异有统计学意义 ($t = 2.996, P = 0.0201$),见图 1B。

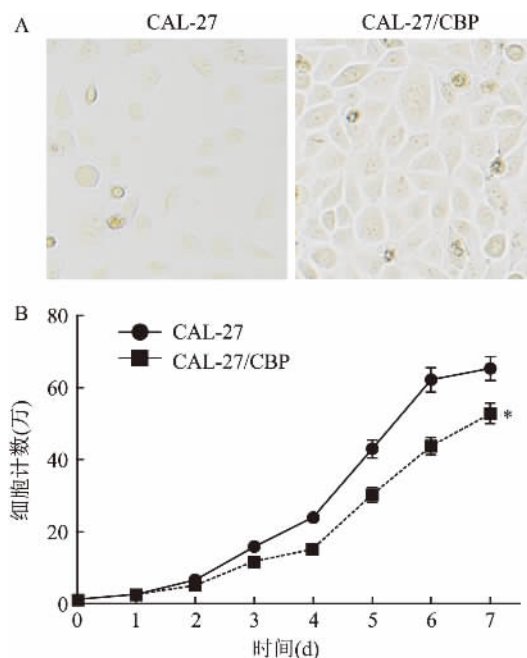


图1 CAL-27/CBP 耐药细胞株鉴定

A: CAL-27/CBP 耐药细胞株形态鉴定; B: CAL-27 和 CAL-27/CBP 细胞株生长曲线; 与 CAL-27 组比较: * $P < 0.05$

2.2 亲本细胞和耐药细胞对不同化疗药物的敏感性 用浓度梯度递增的 CBP 持续作用于 CAL-27 细胞建立了 CAL-27/CBP 细胞株,使用多种化疗药物检测 CAL-27/CBP 细胞株的多重耐药性,CAL-27/CBP 耐药细胞株对化疗药物 CBP、DDP、PTX 和 5-FU 的敏感性均低于 CAL-27 亲本细胞株,差异有统计学意义 (CBP: $t = 2.972, P = 0.0410$; DDP: $t =$

3.172, $P = 0.0338$; PTX: $t = 2.972$, $P = 0.0411$; 5-FU: $t = 3.002$, $P = 0.0399$), 见图2。

2.3 miR-33-5p 与 JNK1 的靶向作用关系 通过生物信息学数据库 Targetscan 预测了 miR-33-5p 与 JNK1 3'端 UTR 结构可能存在靶向作用关系, 见图3A。与 CAL-27 细胞株比较, CAL-27/CBP 细胞株 miR-33-5p 表达水平升高, 差异有统计学意义($t = 15.56$, $P = 0.0000$), 见图3B。荧光素酶报告实验显示, 与 JNK1 WT + mimics NC 比较, JNK1 WT + miR-33-5p 的荧光素酶活性下降, 差异有统计学意义($t = 4.704$, $P = 0.0008$); 而 JNK1 MUT + mimics NC 与 JNK1 MUT + miR-33-5p 比较无明显差异, 见图3C。

2.4 miR-33-5p 对 JNK1/c-Jun 通路的抑制作用

与 CAL-27 组比较, CAL-27/CBP 组细胞中 miR-33-5p 表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 CAL-27/CBP 组比较, CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞中 miR-33-5p 表达水平无明显差异, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞中 miR-33-5p 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$) ($F = 122.5$, $P = 0.0000$), 见图4A。与

CAL-27 组比较, CAL-27/CBP 组细胞中 JNK1、p-JNK1、c-Jun 和 p-c-Jun 蛋白水平均降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 CAL-27/CBP 组比较, CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞中 JNK1、p-JNK1、c-Jun 和 p-c-Jun 蛋白水平无明显差异, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞中 JNK1、p-JNK1、c-Jun 和 p-c-Jun 蛋白水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$) (JNK1: $F = 17.80$, $P = 0.0000$; p-JNK1: $F = 96.56$, $P = 0.0000$; c-Jun: $F = 18.46$, $P = 0.0000$; p-c-Jun: $F = 33.69$, $P = 0.0000$), 见图4B。

2.5 miR-33-5p 对 CAL-27/CBP 细胞多重耐药性的影响

对各组细胞对不同化疗药物的 IC₅₀ 进行计算, 结果见表1。与 CAL-27 组细胞比较, CAL-27/CBP 组细胞对不同化疗药物的 IC₅₀ 均增加, 差异有统计学意义; 与 CAL-27/CBP 组细胞比较, CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞对不同化疗药物的 IC₅₀ 无明显差异, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞对各化疗药物的 IC₅₀ 均下降, 差异有统计学意义。

2.6 miR-33-5p 对多重耐药基因 MDR1 表达的影响

CAL-27/CBP 组细胞 Rh123 阳性百分比低于

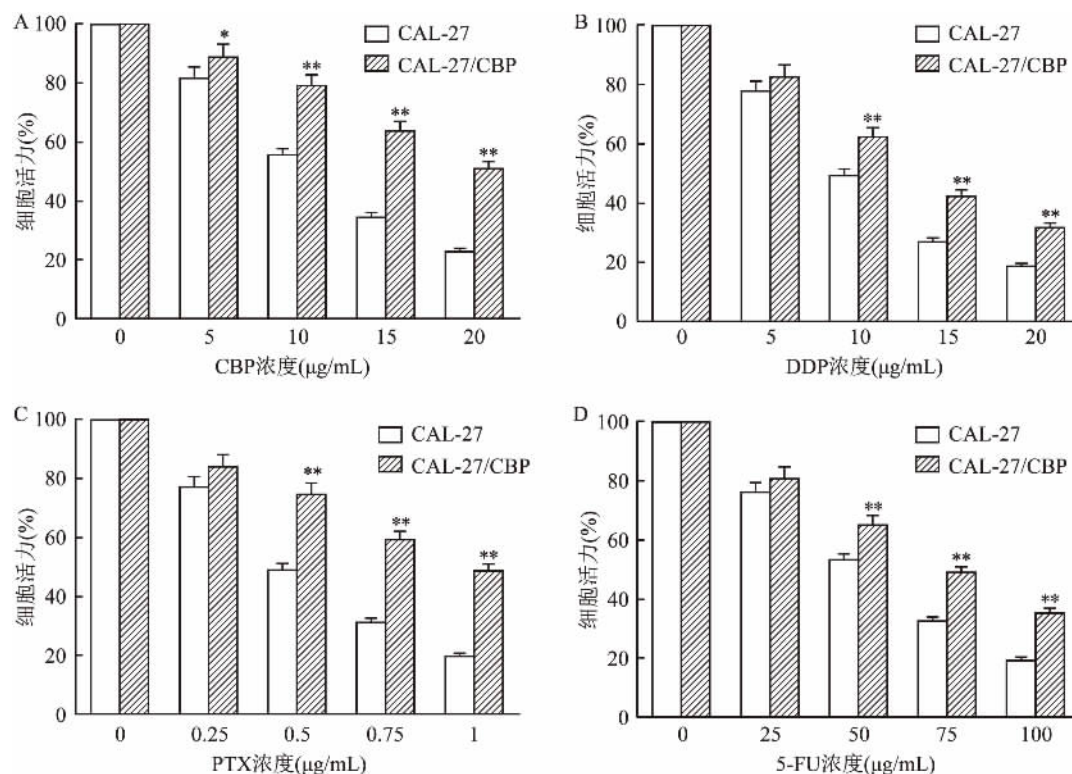


图2 MTT 检测 CAL-27、CAL-27/CBP 细胞株对多种化疗药物的敏感性

A: 细胞对 CBP 的敏感性; B: 细胞对 DDP 的敏感性; C: 细胞对 PTX 的敏感性; D: 细胞对 5-FU 的敏感性; 与 CAL-27 组比较: * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$

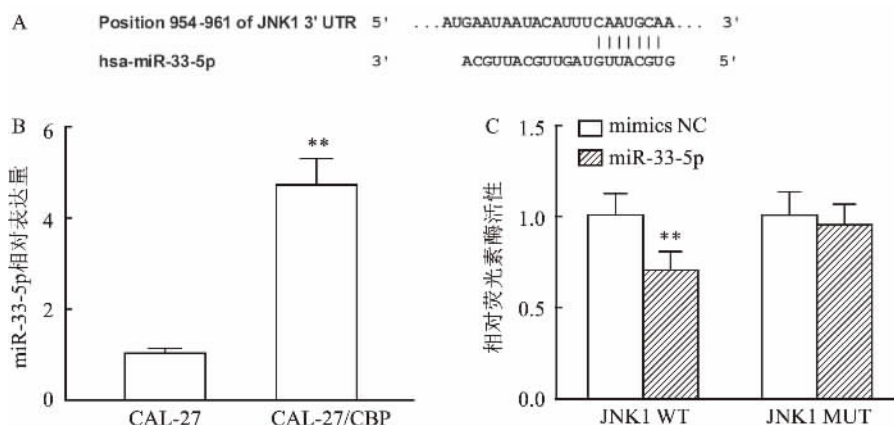


图3 miR-33-5p 和 JNK1 的靶向作用关系

A: Targetscan 预测 miR-33-5p 和 JNK1 靶向作用位点; B: RT-PCR 检测 CAL-27、CAL-27/CBP 细胞中 miR-33-5p 表达; C: 荧光素酶报告实验检测 miR-33-5p 和 JNK1 靶向作用关系; 与 CAL-27 组或 JNK1 WT + mimics NC 组比较: ** $P < 0.01$

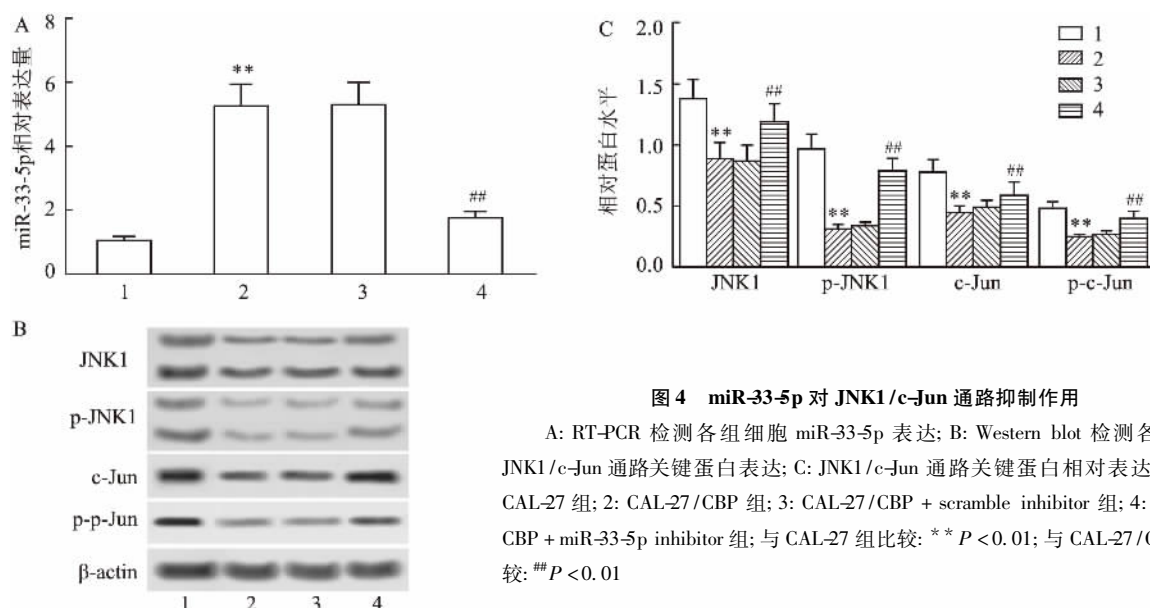


图4 miR-33-5p 对 JNK1/c-Jun 通路抑制作用

A: RT-PCR 检测各组细胞 miR-33-5p 表达; B: Western blot 检测各组细胞 JNK1/c-Jun 通路关键蛋白表达; C: JNK1/c-Jun 通路关键蛋白相对表达水平; 1: CAL-27 组; 2: CAL-27/CBP 组; 3: CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组; 4: CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组; 与 CAL-27 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CAL-27/CBP 组比较: ## $P < 0.01$

表1 各组细胞多重耐药性比较($n=3$, $\mu\text{g/ml}$)

组别	CBP	DDP	PTX	5-FU
CAL-27	10.84 ± 1.15	9.39 ± 0.80	0.48 ± 0.04	49.32 ± 3.86
CAL-27/CBP	20.80 ± 1.92 **	12.63 ± 1.22 **	0.98 ± 0.10 **	69.50 ± 6.20 **
CAL-27/CBP + scramble inhibitor	19.95 ± 1.87	12.82 ± 1.14	0.94 ± 0.11	70.32 ± 5.94
CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor	16.20 ± 1.79 #	10.04 ± 0.96 #	0.82 ± 0.05 #	58.22 ± 5.45 #
F 值	21.080	8.543	23.620	10.160
P 值	0.000 4	0.007 1	0.000 2	0.004 2

与 CAL-27 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CAL-27/CBP 组比较: # $P < 0.05$

CAL-27 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞相较于 CAL-27/CBP 组细胞 Rh123 阳性百分比无明显差异, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞相较于 CAL-27/CBP 组细胞 Rh12 阳性百分比升高, 差异有统计学意义 ($F = 332.7$, $P = 0.000 0$), 见图 5A。

与 CAL-27 组比较, CAL-27/CBP 组细胞 MDR1 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 CAL-27/CBP 组比较, CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组细胞 MDR1 蛋白水平无明显差异, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组细胞 MDR1 蛋白水平降低, 差异有统计学意义 ($F = 76.01$, $P = 0.000 0$), 见图 5B。

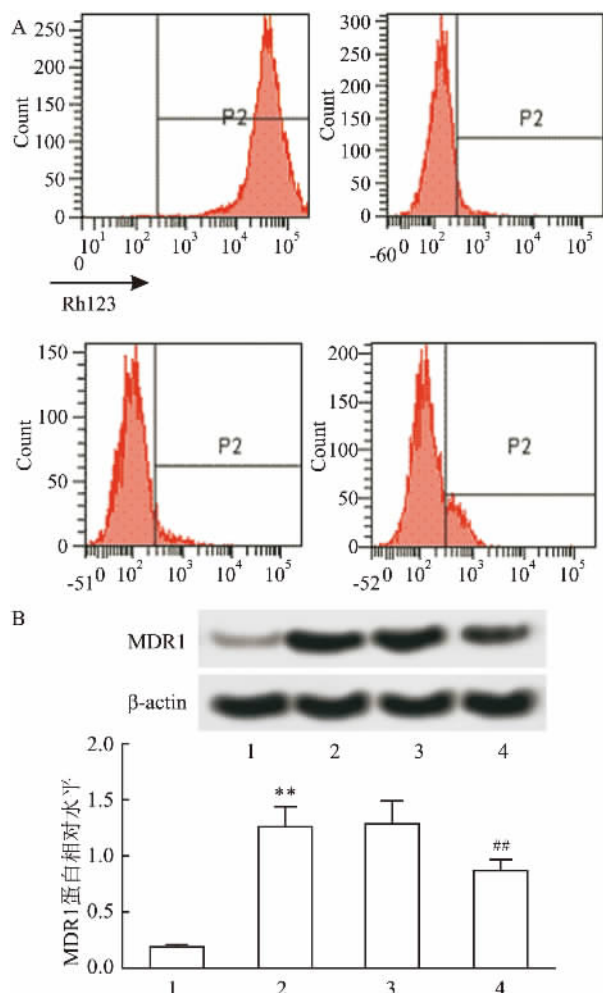


图5 miR-33-5p对多重耐药基因MDR1的调控作用

A: 流式细胞术检测各组细胞 Rh123 阳性百分比; B: Western blot 检测各组细胞 MDR1 蛋白表达; 1: CAL-27 组; 2: CAL-27/CBP 组; 3: CAL-27/CBP + scramble inhibitor 组; 4: CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor 组; 与 CAL-27 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CAL-27/CBP 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

多重耐药性是指肿瘤细胞对一种化疗药物产生抗药性后,对化学结构和作用机制不同的其他多种化疗药物产生交叉耐药的现象^[7]。随着化疗药物应用的普及,肿瘤细胞的多重耐药性已逐渐成为化疗失败的重要原因,这一特性是多基因共同作用产生的复杂机制,其中,JNK1 与这一过程有着重要联系^[6,8]。miR-33-5p 被发现在 HPV 阳性头颈部鳞状细胞癌中高表达,参与了肿瘤的发生发展过程^[9]。通过生物信息学分析预测显示,miR-33-5p 与 JNK1 可能存在靶向调控作用,而 miR-33-5p 和 JNK1 的靶向作用对口腔癌细胞多重耐药性的影响还缺乏研究报道。本研究首先通过小剂量逐步增加剂量持续给

药的方法成功建立了 CAL-27/CBP 耐药株,并检测了耐药株对 CBP、DDP、PTX、5-FU 等一系列化疗药物表现出耐药性,结果显示 CAL-27/CBP 耐药株拥有比亲本 CAL-27 细胞株更强的化疗药物耐受性。

JNK1 是一种进化上保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,属于促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族的重要成员,因其可被诸如放射线、DNA 损伤药物、活性氧及炎症细胞因子等多种环境应激因素激活,又被称为应激激活蛋白激酶^[10]。通过磷酸化 JNK1 的酪氨酸和苏氨酸残基而使其发生激活,活化的 JNK1 可作用于转录因子 c-Jun 的氨基末端使得 c-Jun 磷酸化激活。转录因子 c-Jun 作用于下游基因启动子的 AP-1 位点,调控这些基因的转录活性,而这一通路可诱导内源性凋亡相关通路的启动,进而引起细胞凋亡^[11]。启动子区包含了 AP-1 位点的 MDR1 是 JNK1/c-Jun 下游调控的基因之一,而 MDR1 基因的过度表达是肿瘤细胞多重耐药性的关键机制之一,临床化疗效果与 MDR1 表达密切相关,MDR1 表达产物 P 糖蛋白具有将摄入细胞内的药物转运出细胞的能力,从而有效降低了化疗药物对肿瘤细胞的毒害作用^[12]。研究表明 JNK1/c-Jun 通路介导的 MDR1 上游 AP-1 位点激活对该基因表达起负调控作用^[13-14],在 Choi et al 的研究中,通过激活耐药细胞株的 JNK1/c-Jun 通路,MDR1 的表达受到抑制,从而减少了 MCF-7/Dox 细胞的多重耐药性^[15]。本研究通过荧光素酶报告系统证实了 miR-33-5p 和 JNK1 的靶向作用关系,进一步研究表明,在 CAL-27/CBP 耐药株中 miR-33-5p 高表达,同时伴随着 JNK1/c-Jun 通路的失活,当通过 miR-33-5p inhibitor 抑制 miR-33-5p 的表达后,JNK1/c-Jun 通路恢复其活化状态。同时本研究观察到 CAL-27/CBP 耐药株的 MDR1 蛋白表达水平升高,并且其表达产物 P 糖蛋白对 Rh123 的转运能力也得到提高,当 miR-33-5p 表达受到抑制时,CAL-27/CBP 耐药株的多重耐药性减弱、MDR1 蛋白表达水平下降、Rh123 转运能力受到抑制,以上结果表明 miR-33-5p 可升高 CAL-27/CBP 的多重耐药性。

综上所述,本研究证实了在 CAL-27/CBP 耐药株中,miR-33-5p 可靶向作用于 JNK1,从而抑制 JNK1 的表达,抑制 JNK1/c-Jun 通路的激活,进而引起 MDR1 蛋白表达升高,MDR1 表达产物 P 糖蛋白加强了 CAL-27/CBP 耐药株的化疗药物转运出细胞的能力,从而提高了细胞的多重耐药性。本研究初

步探讨了 miR-33-5p 和 JNK1/c-Jun 通路对 CAL-27/CBP 多重耐药性的机制,然而细胞多重耐药性还存在其他机制,有待后续计划进行进一步探索。

参考文献

- [1] Rivera C. Essentials of oral cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11884–94.
- [2] Levi L E, Lalla R V. Dental treatment planning for the patient with oral cancer [J]. *Dent Clin North Am*, 2018, 62(1): 121–30.
- [3] Robey R W, Pluchino K M, Hall M D, et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 452–64.
- [4] Lin F Z, Wang S C, His Y T, et al. Celastrol induces vincristine multidrug resistance oral cancer cell apoptosis by targeting JNK1/2 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 1–8.
- [5] Zhu M M, Tong J L, Xu Q, et al. Increased JNK1 signaling pathway is responsible for ABCG2-mediated multidrug resistance in human colon cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41763.
- [6] Wu Q, Wu W, Fu B, et al. JNK signaling in cancer cell survival [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(6): 2082–104.
- [7] Mimnaugh E G, Fairchild C R, Fruehauf J P, et al. Biochemical and pharmacological characterization of MCF-7 drug sensitive and AdR multidrug-resistant human breast tumor xenografts in athymic nude mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 422: 391–402.
- [8] 陈康, 翟爱东, 努尔兰, 等. Smac 多肽对肺腺癌耐药性的作用机制研究 [J]. *临床误诊误治*, 2018, 31(6): 80–3.
- [9] Wald A I, Hoskins E E, Wells S I, et al. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus [J]. *Head Neck*, 2011, 33(4): 504–12.
- [10] Kumar A, Singh U K, Kini S G, et al. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(15): 2065–86.
- [11] Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600–4.
- [12] Li G, Guo J, Shen B Q, et al. Mechanisms of acquired resistance to trastuzumab emtansine in breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(7): 1441–53.
- [13] Ma J, Lv Z, Liu X, et al. MG-432 reverses multidrug resistance by activating the JNK signaling pathway in FaDu/T cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1820–5.
- [14] Zhou J, Liu M, Aneja R, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 445–52.
- [15] Choi Y K, Cho S G, Choi H S, et al. JNK1/2 activation by an extract from the roots of *Morus alba* L. reduces the viability of multidrug-resistant MCF-7/Dox cells by inhibiting YB-1-dependent MDR1 expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 741985.

MiR-33-5p targets the JNK1/c-Jun pathway to reduce the multidrug resistance of oral squamous cell carcinoma

Han Yongjie¹, Wang Xingguo², Deng Lu¹, et al

(¹Dept of Maxillofacial Surgery, ²Dept of Oncology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-33-5p on the regulation of c-Jun amino terminal kinase 1 (JNK1) on the multi-drug resistance of human oral squamous cell carcinoma. **Methods** CAL-27 cells were divided into CAL-27 group, CAL-27/CBP group, CAL-27/CBP + scramble inhibitor group, CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor group, carboplatin (CBP) induced drug resistance Cell line, according to the group transfected with scramble inhibitor or miR-33-5p inhibitor. MTT detected the multi-drug resistance of cells, RT-PCR detected the expression of miR-33-5p, luciferase report test detected miR-33-5p With JNK1 targeting, Western blot was used to detect the activation of the JNK1/c-Jun pathway and the expression of MDR1, and flow cytometry was used to detect the results of Rh123 aggregation. **Results** Compared with CAL-27 group, the multi-drug resistance of CAL-27/CBP increased ($P < 0.01$), the expression level of miR-33-5p increased ($P < 0.01$), and the activation level of JNK1/c-Jun pathway decreased ($P < 0.01$), the percentage of Rh123 positive cells decreased ($P < 0.01$), the level of MDR1 protein increased ($P < 0.01$), and the luciferase reported experimental results showed that miR-33-5p targeted JNK1; compared with the CAL-27/CBP group, the multi-drug resistance of cells in the CAL-27/CBP + miR-33-5p inhibitor group reduced ($P < 0.05$), the expression level of miR-33-5p reduced ($P < 0.01$), The activation level of JNK1/c-Jun pathway increased ($P < 0.01$), the percentage of Rh123 positive cells increased ($P < 0.01$), and the level of MDR1 protein decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** MiR-33-5p reduces the multi-drug resistance of CAL-27/CBP drug-resistant cell lines through targeted regulation of JNK1/c-Jun pathway.

Key words oral squamous cell carcinoma; multi-drug resistance; JNK1; miR-33-5p