

网络出版时间: 2020-3-30 17:08 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0845.003.html

miR-146a-5p 靶向 IRAK1、TRAF6 抑制小细胞肺癌耐药

梁雪^{1,2}, 吕磊^{2,3}, 钱立庭^{2,4}, 李明^{2,5}, 韩丹丹^{2,5}

摘要 目的 初步探讨 miR-146a-5p 在小细胞肺癌(SCLC)耐药机制中的作用。方法 通过 qRT-PCR 检验 SCLC 耐药细胞株(H69-AR)和敏感细胞株(H69)中 miR-146a-5p 表达水平,探究 miR-146a-5p 与 SCLC 耐药的相关性;分别通过慢病毒载体以稳定转染 miR-146a-5p mimic 或 miR-146a-5p inhibitor 使其细胞中的 miR-146a-5p 上调或抑制,再利用 CCK-8 法和划痕实验验证 miR-146a-5p 对 SCLC 细胞株的生物学影响;查阅相关文献以及应用目前生物学最权威软件预测 miR-146a-5p 的靶基因,应用 Western blot、qRT-PCR 检测 miR-146a-5p 与预测靶基因两者之间的关系。结果 H69-AR 相对 H69 细胞株的 miR-146a-5p 表达水平为(1:22.70),差异有统计学意义($P < 0.05$);生物学信息数据库预测 miR-146a-5p 可能靶基因为白介素 1 受体相关激酶 1 (IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6);H69-AR 相对 H69 细胞株中 mIRAK1、mTRAF6 的表达水平差异分别为(4.92:1.00)、(2.76:1.00),差异有统计学意义($P < 0.05$);H69-AR 细胞株转染 miR-146a-5p mimic 后,与对照组比较,细胞抑制率上升,迁移速度减缓,同时 mIRAK1、mTRAF6 表达水平分别减少为(1.00:14.55)、(1:3.20),并且 IRAK1、TRAF6 蛋白表达也分别减少为(0.24:1.00)、(0.31:1.00),差异有统计学意义($P < 0.05$);H69 细胞株转染 miR-146a-5p inhibitor 后,与对照组相比,细胞抑制率下降,迁移速度增快,同时 mIRAK1、mTRAF6 表达水平分别增加为(10.86:1.00)、(4.64:1.00),IRAK1、TRAF6 蛋白表达也分别增加为(4.76:1.00)、(3.96:1.00),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 miR-146a-5p 通过靶向 IRAK1 和 TRAF6 基因抑制 SCLC 耐药。

关键词 miR-146a-5p;白介素 1 受体相关激酶 1;肿瘤坏死因子受体相关因子 6;小细胞肺癌

中图分类号 R 734.2

2019-12-28 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:81602230);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:1704a0802157)

作者单位:¹新乡医学院 新乡 453000

²新乡医学院附属安徽省肿瘤医院,合肥 230031

³安徽省肿瘤医院表观实验室,合肥 230031

中国科学技术大学第一附属医院西区⁴放疗科、⁵检验科,合肥 230031

作者简介:梁雪,男,硕士研究生;

钱立庭,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:money2004@sina.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0333-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.003

肺癌是全球癌症死亡原因之一,近十几年,它的发生率与病死率一直稳居所有癌症的榜首^[1],而小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)多年来约占整个肺癌的 10%~15%^[2],相比较非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),它的恶性程度高、增殖时间短、病情发展快,且更容易转移^[3],目前化疗仍然是 SCLC 最主要治疗手段之一,5 年生存率不足 10%,其中多药耐药(multidrug resistance, MDR)产生就是 SCLC 治疗中遇到的最大困境^[4]。

miRNAs 是一种保守的、约 19~25 个核苷酸的非编码 RNA,有关专家估算 miRNAs 至少可以调控 3/5 编码的基因^[5],研究^[6]已经证明 miRNAs 在癌症的发生发展、侵袭、转移、耐药等过程发挥着极其重要的作用。近几来,如 Xu et al^[7]报道了 miR-146a-5p 在雄激素依赖性前列腺癌细胞凋亡中发挥重要作用。Liu et al^[8]发现在前列腺癌中 FOXP3 通过调控 miR-146a-5p 过表达发挥抑癌的作用。Yuwen et al^[9]认为血清外泌体 miR-146a-5p 可作为预测顺铂(cisplatin, CDDP)治疗肺癌疗效和实时监测耐药的新的生物学标志物。以往对肺癌耐药 miRNAs 的研究主要集中在 NSCLC 耐药相关 miRNAs 的检测和表达研究,如 Zhang et al^[10]发现 miR-181c 通过 Wnt 信号通路靶向调控 WIF1 促进 NSCLC 对铂类耐药;Kwon et al^[11]发现 miRNA-428 通过靶向 BRM270 抑制 NSCLC 耐药形成。但关于 miR-146a-5p 在 SCLC 中的研究尚未见报道,因此,临床需要可靠的预测 SCLC 耐药的标志物,为克服 SCLC 耐药提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 本研究所用 SCLC 耐药细胞株(H69-AR)和敏感细胞株(H69)均来自中国科学技术大学生命科学院实验室馈赠。H69-AR 细胞株培养于含 20% FBS、1% 青霉素-链霉素的 RPMI1640

培养基中;H69 为悬浮细胞株培养于含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基中;2 种细胞株均放置在 37 °C、5% CO₂, 饱和湿度条件下的培养箱里培养,H69-AR 细胞株每天换液 1 次,H69 细胞株每 3~4 d 换液 1 次。

1.1.2 主要试剂 miRNA 的 qRT-PCR 试剂盒 (Buiqe-Loop™miRNA qRT-PCR Starter Kit) 以及 mRNA 的 qRT-PCR 试剂盒 (riboSCRIPT™mRNA qRT-PCR Starter Kit) 均购自中国广州锐博生物科技有限公司,批号:201906060008;has-miR-146a-5p inhibitor、has-miR-146a-5p mimic、has-miR-146a-5p negative control 均购自上海吉玛有限公司;慢病毒滴度均为 5×10^9 TU/ml 购自上海制药有限公司;一抗兔抗白介素受体 1 相关激酶 (interleukin-1 receptor-related kinase 1,IRAK1)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-related factor 6,TRAF6)、GAPDH 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;二抗为抗兔 IgG-HRP 购自上海碧云天生物公司;CCK-8 试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪(上海 ABI 公司);qRT-PCR 仪(加拿大 Funglyn Biotech 公司);荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);二氧化碳恒温细胞培养箱(美国 ThermoFisher 公司);超净化工作台(深圳创美实业有限公司);全自动 Western blot 成像工作站、电泳仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 miRNA qRT-PCR 细胞中总的 RNA 是用 TRIzol 提取,按照广州锐博生物科技有限公司生产的 miRNA 试剂盒 (Buiqe-Loop™miRNA qRT-PCR Starter Kit) 说明书进行 10 μ l 体系反转录反应合成 cDNA,反应程序为:42 °C、60 min→70 °C、10 min;然后继续使用 miRNA 试剂盒进行 20 μ l 体系 miRNA qRT-PCR 反应,反应程序为:1 × 95 °C、10 min→40 × 95 °C、2 s;60 °C、20 s;70 °C、10 s(收集信号)→1 × (70~95) °C(熔解曲线分析);反应引物合成序列为:

miR-146a-5p ForwardPrimer 5'-GGGTGAGAACTGAATTCCA-3',ReversePrimer 5'-CAGTGCCTGTCTGGAGT; U6 snRNA ForwardPrimer 5'-TCCGATCGTGAAGCGTTC-3',ReversePrimer 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';相对表达用 U6 (small nuclear RNA,snRNA) 作参照,结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。

按照广州锐博生物科技有限公司生产的 mRNA 试剂盒 (riboSCRIPT™mRNA qRT-PCR Starter Kit) 进

行 10 μ l 体系反转录反应合成 cDNA,反应程序为:42 °C、60 min;70 °C、10 min;然后继续使用 mRNA 试剂盒进行 20 μ l 体系 mRNA qRT-PCR 反应,反应程序为:1 × 95 °C、10 min→40 × 95 °C、5 s;60 °C、30 s;72 °C、30 s(收集信号);反应引物合成序列为:

IRAK1 Forward Primer 5'-CCTGGAAGGCAGAAAAGTTGG-3',Reverse Primer 5'-CGCAAGAGGACATCTCGTTAC-3';TRAF6 Forward Primer 5'-GAACACCCAGTCACACATGAGAA-3';Reverse Primer 5'-GAAATTCCGGACCTCTGAGATATAC-3',GAPDH Forward Primer 5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3',Reverse Primer 5'-GCCTGCTTACCACCTTCT-3';相对表达用 GAPDH 作为参照,相对结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。

1.2.2 构建慢病毒载体 根据 GenBank 中检索到的序列,委托上海吉玛有限公司合成:has-miR-146a-5p inhibitor: AACCCATGGAATTCAGTTCTCA; has-miR-146a-5p mimic: TGAGAACTGAATTCATGGGTT; has miR-146a-5p negative control (NC): TTCTCCGAACGTGTACCGT。

1.2.3 H69-AR 细胞株慢病毒转染 分 H69-AR NC(对照组)和 H69-AR mimic(实验组);以每孔 2×10^5 个/ml、含 20% FBS RPMI1640 完全培养基接种于 24 孔板中,24 h 后,用 miR-146a-5p mimic 或 miR-146a-5p NC (1×10^9 TU/ml) 慢病毒载体按 1:100 与含 20% FBS RPMI1640 完全培养基混合稀释转染;利用 qRT-PCR 和荧光显微镜进行细胞转染效率检测,建立稳定转染的 H69-AR mimic 细胞株及 H69-AR NC 细胞株。

1.2.4 H69 细胞株慢病毒载体转染 分 H69 NC(对照组)和 H69 inhibitor(实验组),配制成每孔 4×10^5 个/ml 细胞数、终浓度 5 μ g/ml Polybrene、miR-146a-5p inhibitor 或 miR-146a-5p NC (1×10^9 TU/ml) 慢病毒原液按 1:20 与含有 10% FBS RPMI1640 完全培养基混合稀释转染;应用 qRT-PCR 和荧光显微镜进行细胞转染效率检测,建立稳定转染的 H69 inhibitor 细胞株及 H69 NC 细胞株。

1.2.5 细胞划痕实验 将转染后 H69-AR mimic 和 H69-AR NC 都稀释成 5×10^5 个/ml 悬液 500 μ l 分别加入 24 孔板,待细胞贴壁铺满皿底约 70% 时,用 10 μ l 枪头在单层细胞呈“—”字型垂直于 24 孔板内表面划竖线,倒置显微镜下拍照,之后用不含有小牛血清的 RPMI1640 培养 24、48 h,在同一位置,荧光显微镜下拍照。

1.2.6 CCK-8 细胞增殖 - 毒性实验检测细胞抑制率 以每孔 2×10^5 个/ml 100 μ l 加入 96 孔板中, 每孔分别加入 10、20、40、80、100 μ g/ml 不同浓度的 CDDP, 另设对照组(有细胞 + CCK8, 不加药物)和空白对照组(无细胞 + CCK8, 不加药物)。在培养箱培养 72 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μ l 混匀, 再培养 1 ~ 4 h 后, 最后室温下使用酶标仪在 450 nm 波长检测吸光度(optical density, OD)值。计算 CDDP 对细胞的抑制率: 抑制率 = (对照组 OD 值 - 加药组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.7 Western blot 实验验证 miR-146a-5p 对靶基因的调控 提取转染后细胞总蛋白, 使用上海碧云天生物科技公司 BCA 试剂盒对总蛋白定量, 制作 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 取 20 μ l 总蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭; PVDF 膜分别与一抗兔抗 IRAK1、TRAF6、GAPDH(1:1 500)摇床上 4 h; 与二抗抗兔 IgG-HRP(1:2 000)室温下 1 h; 全自动 Western blot 成像显影拍照, Gel-Pro 软件分析灰度结果, 以 GAPDH 作为蛋白内参。

1.3 统计学处理 所有结果以及图形分别利用 Excel2016、PowerPoint、Gel-Pro、GraphPad Prism 7.0 软件处理和统计分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间相比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所有实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 H69-AR 和 H69 细胞株中 miR-146a-5p 的表达比较 通过 qRT-PCR 检验 H69-AR 和 H69 细胞株中 miR-146a-5p 的表达情况, 结果显示, H69-AR 相比 H69 细胞株中 miR-146a-5p 的表达下调(22.71 : 1.00), 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 10.66$)。见图 1。

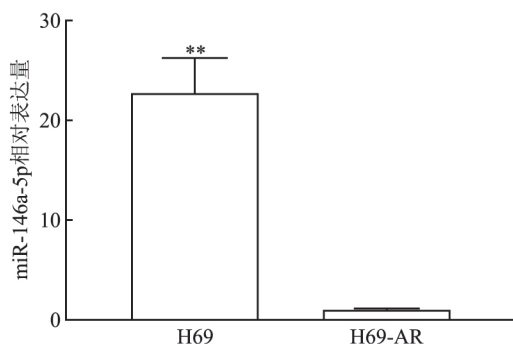


图1 qRT-PCR 检测 miR-146a-5p H69 与 H69-AR 的表达
与 H69-AR 比较: ** $P < 0.01$

2.2 IRAK1 和 TRAF6 是 miR-146a-5p 潜在的靶基因 查阅了大量文献以及应用目前公认的 TargetScan 生物学软件进行分析, 初步选定 IRAK1、TRAF6 为 miR-146a-5p 潜在的靶基因。通过 qRT-PCR 检测结果显示, H69-AR 细胞中 mIRAK1、mTRAF6 的表达水平与 H69 比较上调(4.92 : 1.00)、(2.76 : 1.00), 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 19.03$)、($P < 0.05$, $t = 3.75$), 见图 2A、B。慢病毒转染成稳定 H69-AR mimic, 见图 2C、D。以及转染成稳定 H69 inhibitor, 见图 2E、F。转染 H69-AR mimic 后细胞中 mIRAK1、mTRAF6 的表达水平与对照组(H69-AR NC)比较下调(1 : 00 : 14.55)、(1 : 00 : 3.20), 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 12.38$)、($P < 0.01$, $t = 4.24$), 见图 3A、B。H69 inhibitor 细胞中 mIRAK1、mTRAF6 的表达水平与对照组(H69NC)比较上调(10.86 : 1.00)、(4.64 : 1.00), 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 16.62$)、($P < 0.01$, $t = 4.77$), 见图 3C、D。

2.3 CCK-8 细胞增殖 - 毒性实验检测 miR-146a-5p 对 CDDP 在 SCLC 中的抑制率 CCK-8 实验方法检测细胞抑制和增殖情况, 实验结果显示, 在不同浓度 CDDP 的 H69 组均高于 H69-AR 组的细胞抑制率, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4A。为了进一步检测 miR-146a-5p 对 CDDP 的影响, 向转染后 H69-AR mimic、H69-AR NC、H69 inhibitor、H69 NC 的细胞中加入不同浓度的 CDDP, 实验结果显示, 不同浓度 CDDP 的 H69-AR mimic 组均高于对照组 NC 的细胞抑制率, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4B。不同浓度 CDDP 的 H69 inhibitor 组均低于 NC 组的细胞抑制率, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4C。此结果说明 miR-146a-5p 抑制 SCLC 对 CDDP 的耐药。

2.4 细胞划痕实验观察 miR-146a-5p 对 SCLC 细胞迁移的影响 转染后 H69-AR mimic 细胞和 NC 细胞, 用不含小牛血清的培养基培养 24、48 h 后荧光显微镜下拍照, H69-AR mimic 组与 NC 组比较迁移速率明显减缓, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 Western blot 实验检测 miR-146a-5p 对 IRAK1、TRAF6 蛋白表达的影响 通过 Western blot 实验检测转染后 IRAK1、TRAF6 蛋白表达情况。见图 6。H69-AR mimic 与 NC 比较细胞中 IRAK1、TRAF6 蛋白表达均下调; H69 inhibitor 与 NC 比较细胞中 IRAK1、TRAF6 的表达水平均上调。

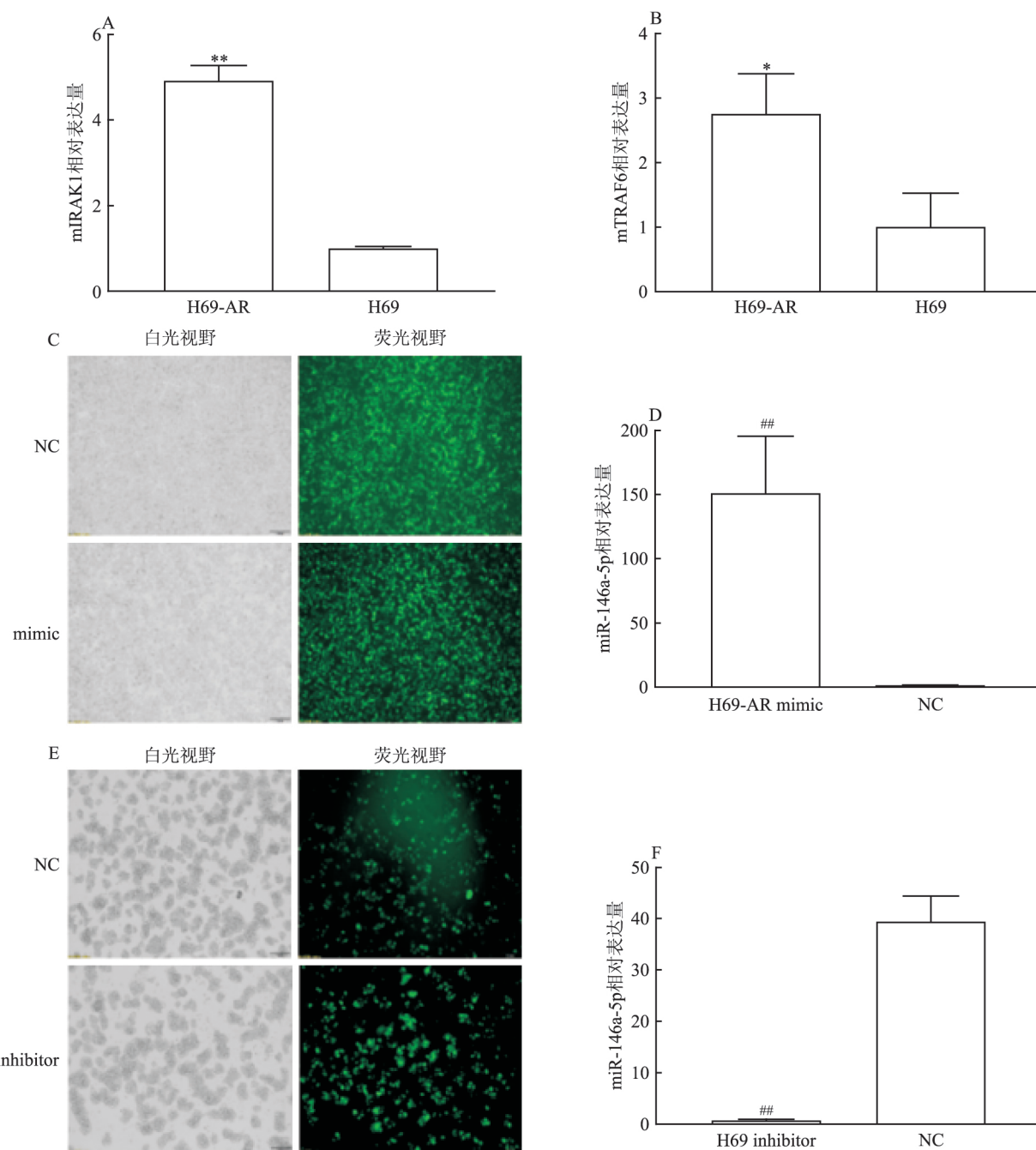


图2 mIRAK1、mTRAF6 分别在 H69-AR 和 H69 细胞中的差异表达和 has-miR-146a-5p 慢病毒分别在 H69-AR 和 H69 细胞中转染情况

A: mIRAK1 在 H69-AR 和 H69 细胞株的表达; B: mTRAF6 在 H69-AR 和 H69 细胞株的表达; C: H69-AR 与 NC 细胞 72 h 侵染图片 $\times 100$; D: miR-146a-5p 在 H69-AR mimic 组和 NC 组中的表达; E: H69 与 NC 细胞 72 h 侵染图片 $\times 100$; F: miR-146a-5p 在 H69 inhibitor 组和 NC 组中的表达; 与 H69 细胞株比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

本研究课题前期通过选取 2 对化疗敏感和化疗耐药血浆标本(同一患者耐药前后),采用超高速离心法提取血浆外泌体,再通过高通量测序技术筛选出 SCLC 耐药前后外泌体内显著差异的 miRNAs,结果显示 SCLC 耐药后外泌体中 miR-146a-5p 表达水

平较耐药前显著下调,结果提示 miR-146a-5p 可能跟 SCLC 耐药有关。本研究首先使用 qRT-PCR 检测了 H69-AR 和 H69 细胞中 miR-146a-5p 的表达水平,结果显示 H69-AR 相比 H69 细胞株中 miR-146a-5p 的表达水平下调,与之前在血浆中高通量测序结果一致。然后通过慢病毒载体稳转染使其 H69-AR 细胞中 miR-146a-5p 过表达以及使其 H69 细胞中

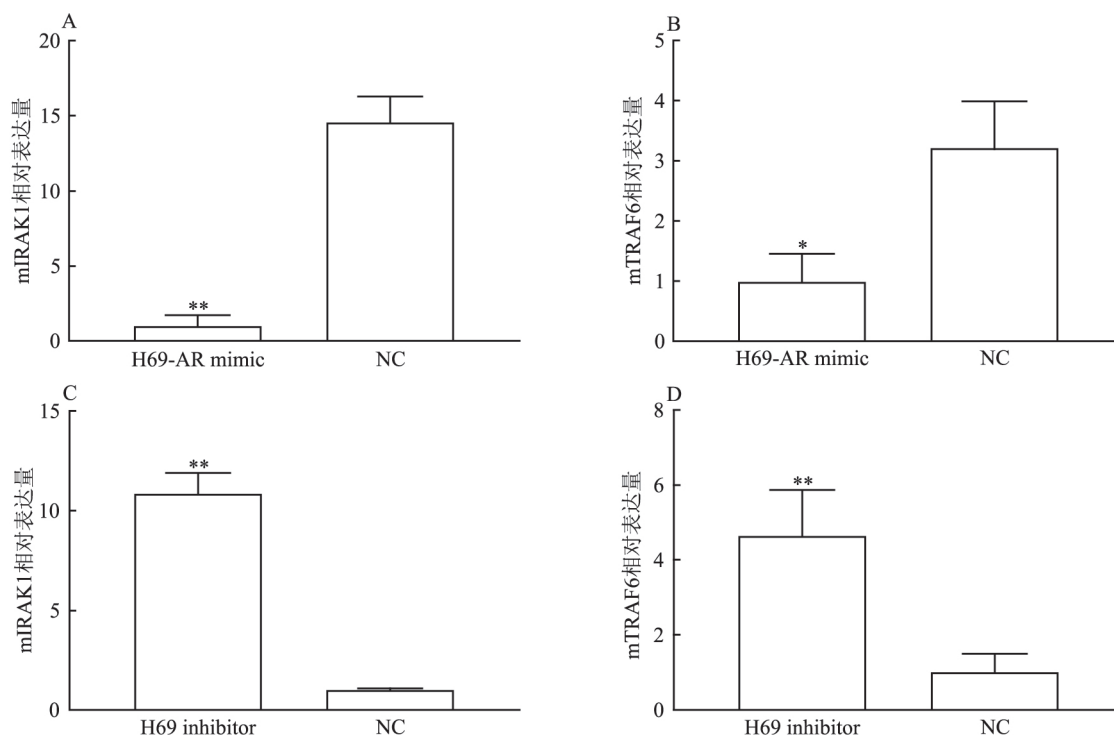


图3 miRAK1、mTRAF6 分别在 H69-AR mimic 和 H69 inhibitor 细胞中的差异表达

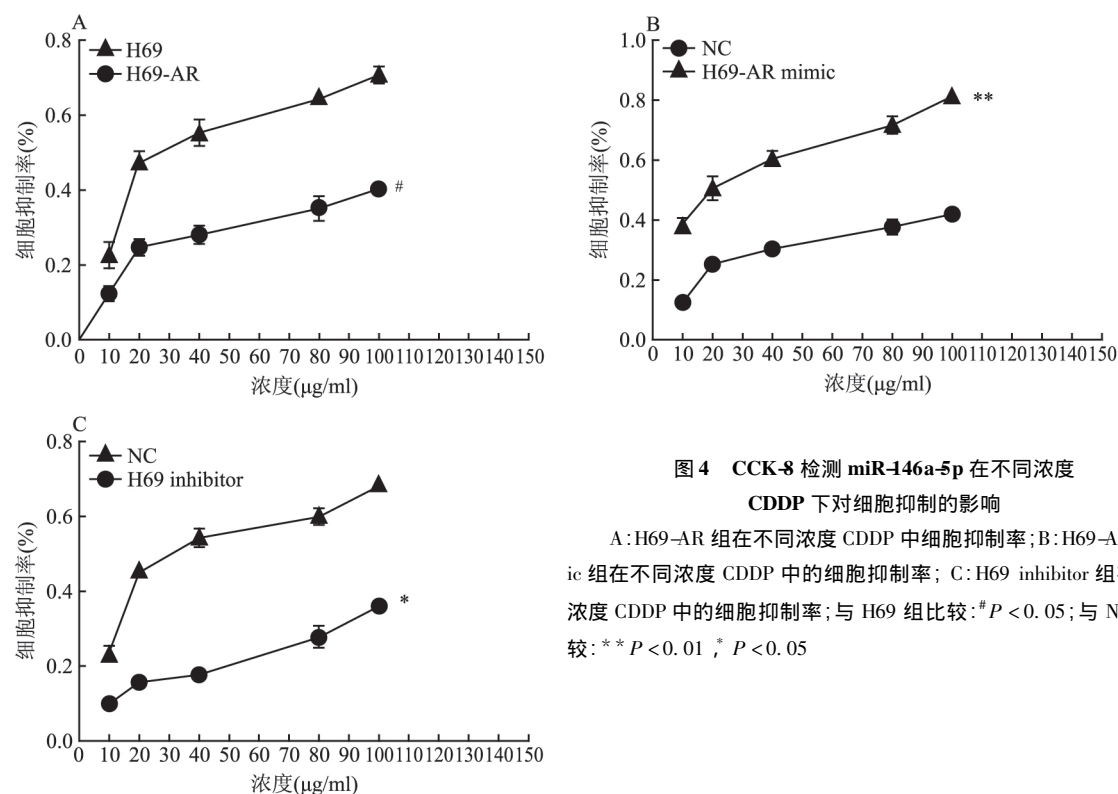
与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 

图4 CCK-8 检测 miR-146a-5p 在不同浓度 CDDP 下对细胞抑制的影响

A: H69-AR 组在不同浓度 CDDP 中细胞抑制率; B: H69-AR mimic 组在不同浓度 CDDP 中的细胞抑制率; C: H69 inhibitor 组在不同浓度 CDDP 中的细胞抑制率; 与 H69 组比较: # $P < 0.05$; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

miR-146a-5p 低表达,通过 CCK-8、划痕实验检测到转染过表达后可以抑制肿瘤的增殖速率、迁移、转染,低表达后结果正好与之相反,说明 miR-146a-5p 可以起到类似抑癌基因作用抑制 SCLC 耐药或是使

其 SCLC 重新敏化。

利用生物信息学软件以及查阅相关大量文献发现 miR-146a-5p 的潜在靶基因为 IRAK1、TRAF6。IRAK1 是白介素1受体相关激酶家族中重要的一

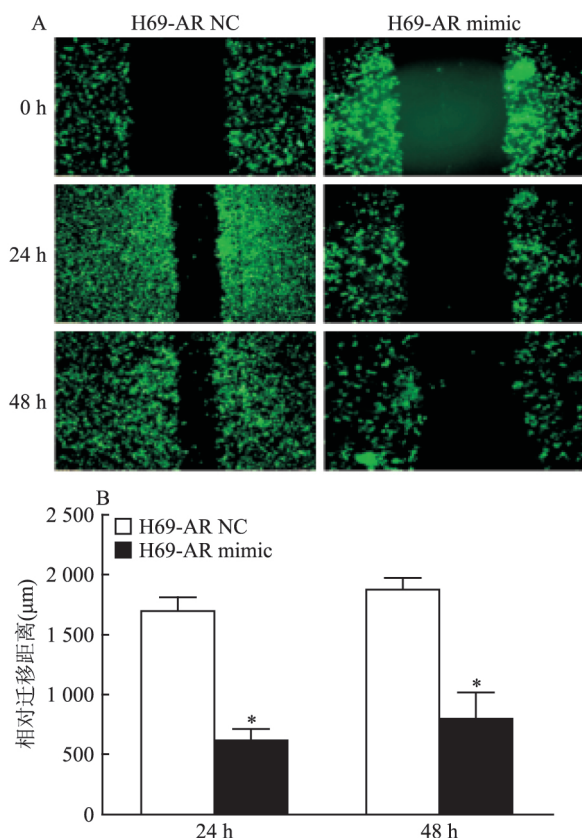


图5 H69-AR mimic 与 NC 在

24、48 h 时间下观察细胞划痕迁移情况

A: H69-AR 组与 NC 组分别在 0、24、48 h 迁移情况 $\times 100$; B: H69-AR 组在 24、48 h 迁移距离; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$

员,它不仅是一种调控炎症的信号分子,同时也是托尔样受体信号通路的信号分子,当缺失激活托尔样受体信号通路时,可能与癌症、自身免疫性、和败血症等疾病等相关^[12]。TRAF6 是肿瘤坏死因子家族信号通路里非常重要的一种信号分子^[13],TRAF6 参与了肺癌、骨肉瘤、食管癌、结直肠癌和乳腺癌等多种癌症的进展^[14]。本研究结果显示,H69-AR 细胞相比 H69 细胞中 mTRAF6、mIRAK1 表达水平均下调,又通过慢病毒载体转染,结果显示,TRAF6、IRAK1 在 H69-AR mimic 细胞中蛋白表达低于对照组细胞中蛋白表达;TRAF6、IRAK1 在 H69 inhibitor 细胞中蛋白表达高于对照组细胞中蛋白表达,以上这些结果说明 miR-146a-5p 表达水平与 mTRAF6、mIRAK1 表达水平以及他们的蛋白表达都呈负相关,由此可以认为 miR-146a-5p 与 IRAK1、TRAF6 存在负调控关系,同时也提示 miR-146a-5p、TRAF6、IRAK1 可能共同参与了 SCLC 耐药。蒋亮等^[15]在前列腺肿瘤细胞中利用双荧光素酶报告基因实验,已证实 miR-146a-5p 可以直接结合在 IRAK1 和

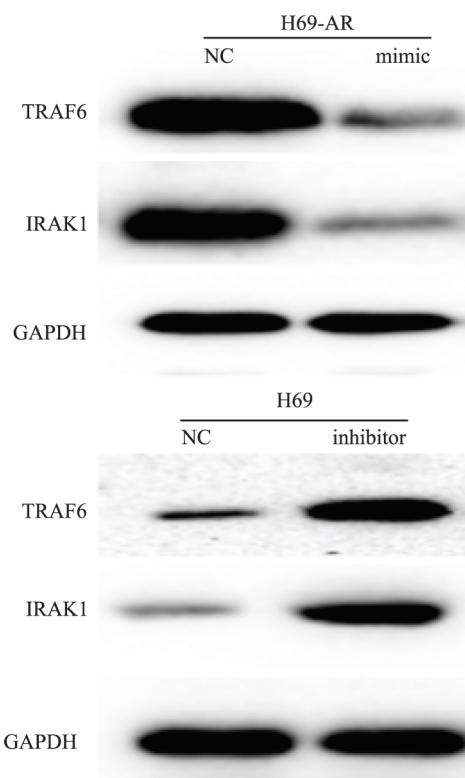


图6 转染 H69-AR mimic、H69-AR NC、H69 inhibitor、H69 NC 细胞后,IRAK1 和 TRAF6 的蛋白表达

TRAF6 基因的 3'-UTR 区域,抑制荧光素酶的表达。关于在 SCLC 细胞中 miR-146a-5p 与 IRAK1、TRAF6 的靶点如何结合,今后还需要应用双荧光素酶报告基因检测进一步证实。

参考文献

- [1] Barnes H, See K, Barnett S, et al. Surgery for limited-stage small-cell lung cancer [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 4: CD011917.
- [2] Niu Y, Ma F, Huang W, et al. Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2 [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):5.
- [3] Sun Y, Zhou Y, Bai Y, et al. A long non-coding RNA HOTTIP expression is associated with disease progression and predicts outcome in small cell lung cancer patients [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):162.
- [4] Peng J, Wang Q, Liu H, et al. EPHA3 regulates the multidrug resistance of small cell lung cancer via the PI3K/BMX/STAT3 signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9):11959-71.
- [5] Zhang S, Ng M K. Gene-microRNA network module analysis for ovarian cancer [J]. *BMC Syst Biol*, 2016, 10(Suppl 4):117.
- [6] Zhang X, Li D, Li M, et al. MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(2):257-67.

- [7] Xu B , Huang Y , Niu X , et al. Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1 [J]. *Prostate* , 2015 , 75 (16) :1896 – 903.
- [8] Liu R , Yi B , Wei S , et al. FOXP3-miR-146-NF- κ B axis and therapy for precancerous lesions in prostate [J]. *Cancer Res* , 2015 , 75 (8) :1714 – 24.
- [9] Yuwen D L , Sheng B B , Liu J , et al. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* , 2017 , 21 (11) :2650 – 8.
- [10] Zhang H , Hu B , Wang Z , et al. miR-181c contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells by targeting Wnt inhibition factor 1 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* , 2017 , 80 (5) :973 – 84.
- [11] Kwon T , Chandimali N , Huynh D L , et al. BRM270 inhibits cancer stem cell maintenance via microRNA regulation in chemoresistant A549 lung adenocarcinoma cells [J]. *Cell Death Dis* , 2018 , 9 (2) :244.
- [12] Zhu J , Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways—therapeutic opportunities [J]. *Mediators Inflamm* , 2010 :781235.
- [13] Sun H , Li X , Fan L , et al. TRAF6 is upregulated in colon cancer and promotes proliferation of colon cancer cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol* , 2014 , 53 :195 – 201.
- [14] Liu R , Liu C , Chen D , et al. FOXP3 controls an miR-146/NF- κ B negative feedback loop that inhibits apoptosis in breast cancer cells [J]. *Cancer Res* , 2015 , 75 (8) :1703 – 13.
- [15] 蒋亮, 刘春辉, 徐斌, 等. miR-146a 通过抑制 ROCK1 基因的表达促进去势抵抗性前列腺癌细胞的凋亡 [J]. *东南大学学报(医学版)* 2015 , 34 (3) : 357 – 60.

MiR-146a-5p targets IRAK1 and TRAF6 to inhibit drug resistance in small cell lung cancer

Liang Xue^{1,2}, Lü Lei^{2,3}, Qian Liting^{2,4}, et al

(¹Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000; ²Anhui Provincial Cancer Hospital Affiliated to Xinxiang Medical University, Hefei 230031; ³Epigenetic Laboratory of Anhui Cancer Hospital, Hefei 230031;

⁴Radiotherapy Dept, Western Region, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230031)

Abstract Objective To explore the role of miR-146a-5p in the drug resistance mechanism of small cell lung cancer (SCLC). **Methods** The expression levels of miR-146a-5p in drug-resistant SCLC cell lines (H69-AR) and sensitive cell lines (H69) were tested by qRT-PCR to explore the correlation between miR-146a-5p and SCLC drug resistance. MiR-146a-5p was upregulated or inhibited by lentivirus vector stably transfected with miR-146a-5p mimic or miR-146a-5p inhibitor, respectively. The biological effects of miR-146a-5p on SCLC cell lines were verified by CCK-8 method and Nick experiment. The target gene of miR-146a-5p was predicted by searching related literatures and using the most authoritative software in biology. The correlation between miR-146a-5p and the predicted target genes was detected by western-blot, real-time quantitative qPCR and other methods. **Results** The expression level of miR-146a-5p in H69-AR compared with H69 cell line was (1 : 22.70) ($P < 0.05$). The potential target genes of miR-146a-5p were predicted by biological software to be interleukin-1 receptor-related kinase 1 (IRAK1) and tumor necrosis factor receptor-related factor 6 (TRAF6). The expression levels of mIRAK1 and mTRAF6 in H69-AR relative to H69 cells were significantly different (4.92 : 1.00 and 2.76 : 1.00) ($P < 0.05$). After transfection of miR-146a-5p mimic in H69AR cell line, compared with the control group, the cell inhibition rate increased, the migration rate slowed down, and the expression levels of mIRAK1 and mTRAF6 decreased to (1.00 : 14.55) and (1 : 3.20), respectively. The expressions of IRAK1 and TRAF6 decreased to (0.24 : 1.00) and (0.31 : 1.00) ($P < 0.05$). After transfection of miR-146a-5p inhibitor in H69 cell line, compared with the control group, the cell inhibition rate decreased and the migration rate increased. At the same time, the expression levels of mIRAK1 and mTRAF6 increased to (10.86 : 1.00) and (4.64 : 1.00), respectively while the expressions of IRAK1 and TRAF6 increased to (4.76 : 1.00) and (3.96 : 1.00), respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-146a-5p inhibits SCLC resistance by IRAK1 and TRAF6 genes.

Key words miR-146a-5p; interleukin-1 receptor-related kinase 1; tumor necrosis factor receptor-related factor 6; small cell lung cancer