

网络出版时间: 2020-5-8 15:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.007.html>

miR-223-3p 对肺鳞癌细胞顺铂敏感性的影响

冯坤丽, 罗朋, 王保龙

摘要 目的 研究 miR-223-3p 对肺鳞癌细胞顺铂(CDDP)敏感性的影响。方法 通过分别升高或降低(miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor、NC-inhibitor)肺鳞癌 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 的含量后, qRT-PCR 检测细胞内 miR-223-3p 基因表达水平; CCK-8 法检测细胞半数抑制浓度(IC₅₀); 流式细胞仪检测细胞加入 CDDP 药物刺激后凋亡率的变化(分别设计四组不同的处理: miR-223-3p mimics + CDDP、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor + CDDP、NC-inhibitor); Transwell 实验检测 SK-MES-1 细胞迁移能力的变化; Western blot 法检测 SK-MES-1 细胞中 Bax、ZEB1 和 E-cadherin 的变化。结果 CCK-8 实验结果表明, miR-223-3p mimics 组的 IC₅₀ 低于对照组的 IC₅₀, miR-223-3p inhibitor 组的 IC₅₀ 高于对照组的 IC₅₀; 流式细胞术凋亡检测结果显示, miR-223-3p mimics + CDDP(80 μmol/L) 组细胞凋亡率增加, 而 miR-223-3p inhibitor + CDDP(80 μmol/L) 组细胞凋亡率减少; Western blot 证实, 同时分别升高或降低肺鳞癌细胞内的 miR-223-3p 含量后, ZEB1 蛋白相应的降低和升高, 且 Bax、E-cadherin 蛋白相应的升高和降低。结论 miR-223-3p 作为抑癌基因影响肺鳞癌细胞对 CDDP 的敏感性, 可作为治疗肺鳞癌 CDDP 耐药的重要分子靶标。

关键词 miR-223-3p; 肺鳞癌; 顺铂; 耐药

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0687-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.007

在中国, 非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC) 大约占肺癌病例的 85%^[1], 是肺癌的主要形式。经各种临床手段治疗的肺鳞癌患者的 5 年生存率仍然很低, 其中肺鳞癌主要以顺铂(cis-platin, CDDP) 化疗为主, 容易产生耐药性^[2]。miR-NAs 已知可以调控多种基因的表达, 进而影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[3]。研究^[4]显示, miRNA

既可以作为癌基因, 也可以作为抑癌基因, 并且在大多数恶性肿瘤中都表达异常。前期通过构建肺鳞癌患者来源的移植瘤(patient derived tumor xenograft, PDX) 模型筛选出在肺鳞癌组织中下调的 miR-223-3p^[5], 为鉴定 miR-223-3p 在肺鳞癌 CDDP 耐药中的调控作用, 采用瞬时转染分别上调和下调 miR-223-3p 的表达, 研究 miR-223-3p 影响肺鳞癌 CDDP 耐药性的分子机制, 以期探究肺鳞癌诊断和治疗的新型标志物。

1 材料与方法

1.1 材料 肺鳞癌 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞株(上海生命科学研究院); DMEM 高糖培养基(加拿大, Wisent); RPMI 1640 培养基(北京全式金生物, Transgen Biotech); 胎牛血清(澳洲, Gibco); 非编码 RNA 引物、miR-223-3p inhibitor、mimics 及其阴性对照(NC) 组(合肥通用生物、上海吉玛公司合成); qRT-PCR 检测试剂盒(南京诺唯赞、日本 Takara 公司); CCK-8 检测试剂盒(日本同仁公司); CDDP(上海 Sigma 公司); 细胞凋亡检测(南京诺唯赞公司); 细胞总蛋白提取试剂(南京贝博公司); ZEB1、E-Cadherin 和 Bax 抗体(武汉 Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 37 °C、5% CO₂ 的培养环境下, 用 DMEM 高糖培养基培养 SK-MES-1 细胞, RPMI 1640 培养基培养 NCI-H520 细胞。待培养皿内细胞密度达 90% 时进行传代, 通常按照 1:3 或 1:2 进行细胞传代。

1.2.2 细胞瞬时转染 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明进行实验步骤, 将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 分别转染于 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞中。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-223-3p 表达 细胞作相应处理后, 利用 TRIzol 提取各组细胞 RNA, 运用 Takara 逆转录和 qRT-PCR 试剂盒检测 miR-223-3p 表达, 以 U48 作为内参, 以 2^{-ΔΔCT} 计算 miR-223-3p 相对表达量。

2020-01-22 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085QH220); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1604a0802072)

作者单位: 安徽医科大学附属安徽省立医院检验科, 合肥 230001

作者简介: 冯坤丽, 女, 硕士研究生;

王保龙, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wbl196555@163.com

1.2.4 CCK-8 法检测细胞对 CDDP 药物敏感性变化 将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 转染 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞, 分别于转染 24 h 细胞贴壁后更换培养基, 分别向培养基加入 0、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的 7 个不同浓度梯度 CDDP, 平行设置 5 个复孔。自动酶标仪测定双波长 450 630 nm 处的吸光度 (A) 值, 最终由 Graphpad 软件计算出细胞半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC_{50})。

1.2.5 细胞凋亡检测 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 分别转染 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞, 转染 24 h 后, 分别在培养基中加入终浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP, 12 h 后收集细胞, 采用 Annexin V FITC/PI 双染法, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (早期细胞凋亡数 + 晚期细胞凋亡数) / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 肺鳞癌 SK-MES-1 细胞株 (具有迁移能力) 的 Transwell 迁移实验 待测细胞培养至融合度达 90% 左右, 0.25% 胰酶消化液消化细胞, 用无血清培养基重悬细胞并将细胞浓度调整为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。在 24 孔板底部和上部分别加入 600 μl 含 10% 血清的培养基和 100 μl 细胞悬液, 继续在温箱孵育, 每隔一段时间镜下观察, 如 24、48、72 h, 用直尺测量细胞愈合度。

1.2.7 Western blot 检测转染后 SK-MES-1 细胞 BCL2 同源的水溶性相关蛋白 (Bax)、E 盒结合锌指蛋白 1 (ZEB1) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达变化 将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 转染 SK-MES-1 细胞, 作用 72 h 后提取总蛋白, 离心收集蛋白上清液, BCA 法进行浓度测定, 蛋白煮沸变性后可放 -80°C 保存。以 25 μg 的蛋白量上样并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 聚偏二氟乙烯膜上电转 90 min 后室温封闭 2 h, 再分别加入 ZEB1 (1 : 1 000)、E-cadherin (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000) 和 β -actin (1 : 6 000) 抗体 4°C 孵育过夜。TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min。加入羊抗兔/羊抗鼠二抗 (武汉 Proteintech 公司, 1 : 6 000 稀释), 以 β -actin 作为内参, 分析蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 以上实验均重复至少 3 次以上, 所得数据用表示 2 个独立样本之间均值的比较, 采用的统计推断方法为 t 检验, 样本统计量 t 值大小用

SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因干扰与过表达效率验证 通过 qRT-PCR 定量检测 miR-223-3p 的表达量, 差异有统计学意义 (miR-223-3p mimics 组 $t = -31.00$, $P < 0.05$; miR-223-3p inhibitor 组 $t = 15.000$, $P < 0.05$)。见图 1。

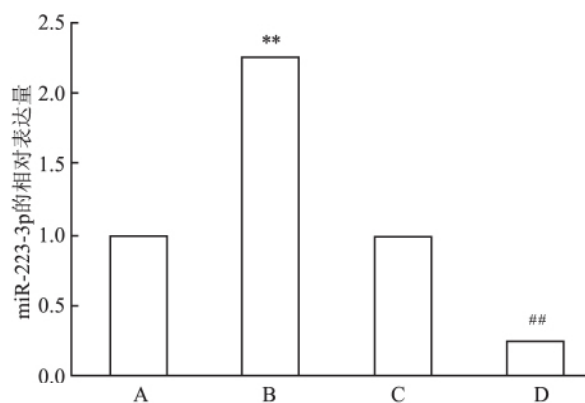


图1 NCI-H520 转染后 miR-223-3p 的基因表达量

A: NC-mimics; B: miR-223-3p mimics; C: NC-inhibitor; D: miR-223-3p inhibitor; 与 NC-mimics 比较: ** $P < 0.05$; 与 NC-inhibitor 比较: ## $P < 0.05$

2.2 升高 miR-223-3p 表达增加 SK-MES-1 和 NCI-H520 肺鳞癌细胞的 CDDP 敏感性 将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 转染 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞株, 分别升高和降低细胞内 miR-223-3p 的表达水平, 结果显示升高细胞内 miR-223-3p 的表达可以增加肺鳞癌细胞对 CDDP 药物的敏感性, 差异有统计学意义 (SK-MES-1 miR-223-3p mimics 组 $t = 99.000$, $P < 0.01$; miR-223-3p inhibitor 组 $t = -111.000$, $P < 0.01$; NCI-H520 miR-223-3p mimics 组 $t = 50.000$, $P < 0.05$; miR-223-3p inhibitor 组 $t = -33.000$, $P < 0.05$)。见表 1、图 2。

表1 肺鳞癌细胞对不同浓度 CDDP 敏感性的影响 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	SK-MES-1	NCI-H520
NC-mimics	9.3 $\pm$ 1.5	12.3 $\pm$ 1.5
miR-223-3p mimics	6.8 $\pm$ 2.1	4.6 $\pm$ 1.1
NC-inhibitor	9.0 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 1.2
miR-223-3p inhibitor	14.6 $\pm$ 1.4	14.6 $\pm$ 1.4

2.3 干扰 miR-223-3p 后 CDDP 诱导肺鳞癌细胞

凋亡率减少 将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 分别转染 SK-MES-1 和 NCI-H520 细胞株,在相同剂量 CDDP 药物 (80 $\mu\text{mol/L}$) 的诱导下,作用 12 h,流式细胞术检测细胞凋亡,miR-223-3p mimics + CDDP 组细胞凋亡

增加,而 miR-223-3p inhibitor + CDDP 组细胞凋亡减少。见图 3。

2.4 下调肺鳞癌 SK-MES-1 细胞中 miR-223-3p 表达 细胞的迁移能力增加 分别将 miR-223-3p mimics、NC-mimics、miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor

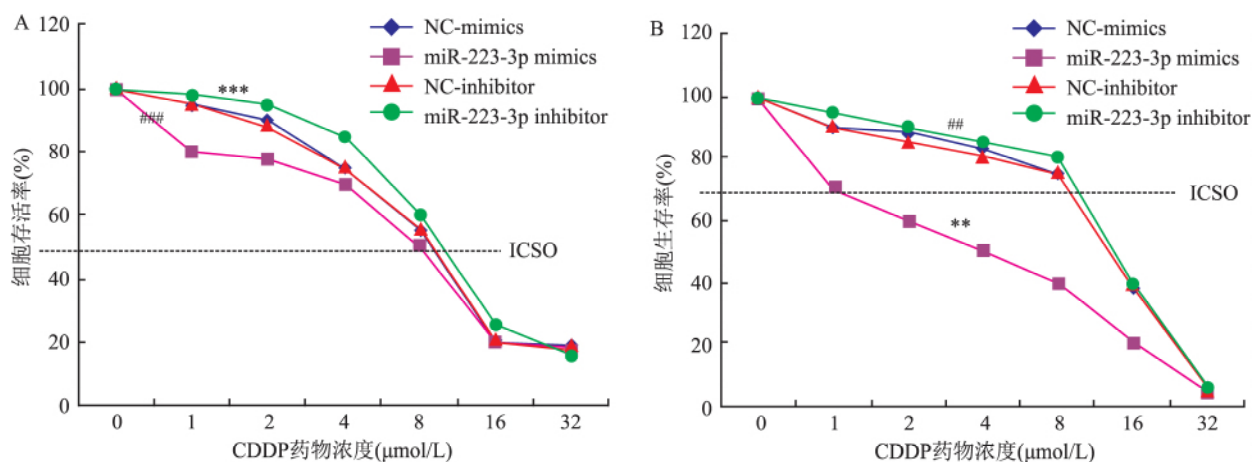


图2 不同细胞株转染后细胞生存率的比较

A: SK-MES-1; B: NCI-H520; 与 NC-mimics 比较: *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与 NC-inhibitor 比较: ### $P < 0.01$, ## $P < 0.05$

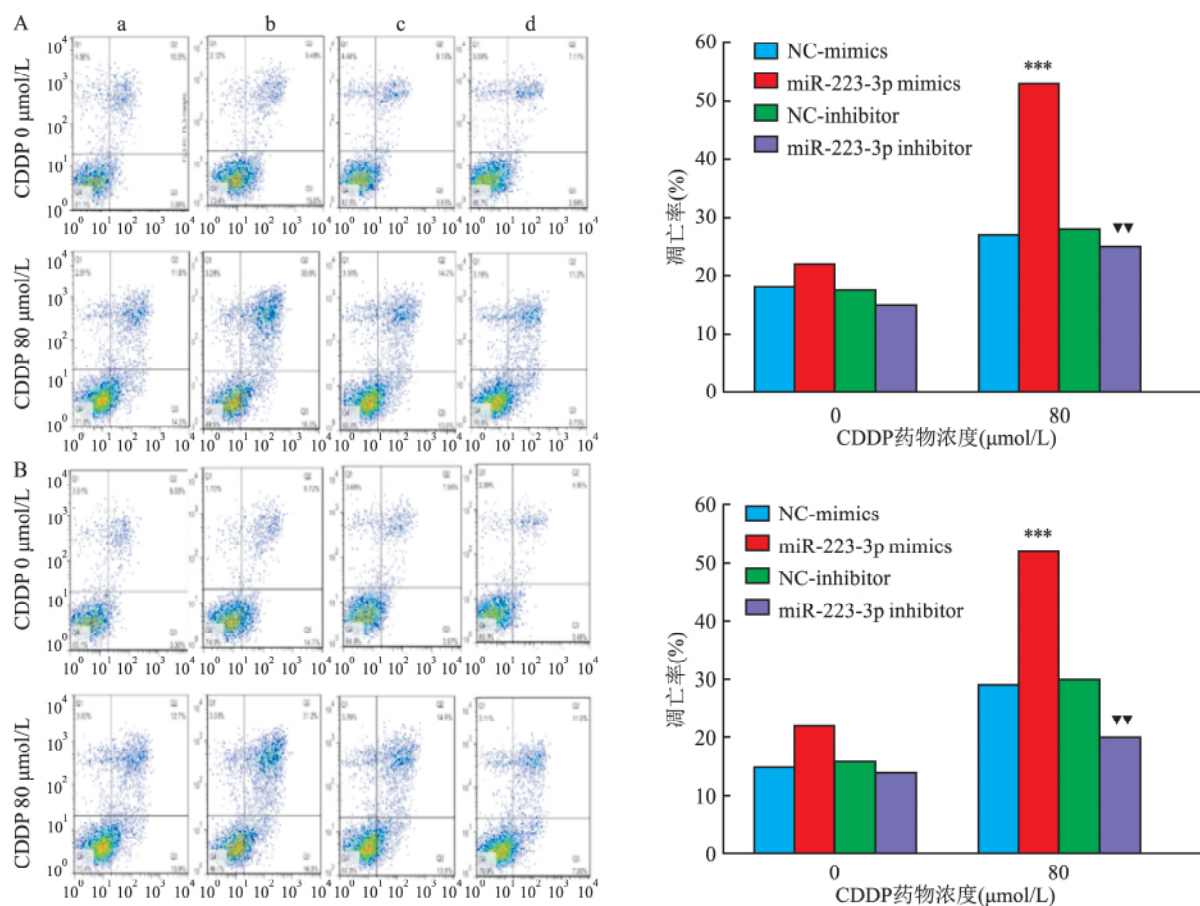


图3 不同细胞株转染后分别加入相同剂量的 CDDP 流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化

A: SK-MES-1; B: NCI-H520; a: NC-mimics; b: miR-223-3p mimics; c: NC-inhibitor; d: miR-223-3p inhibitor; 与 NC-mimics 比较: *** $P < 0.01$; 与 NC-inhibitor 比较: ▼▼ $P < 0.05$

转染 SK-MES-1 细胞后, Transwell 实验结果显示, miR-223-3p mimics 组和 NC mimics 组比较, 镜下可见细胞迁移能力减弱, 细胞愈合宽度 miR-223-3p mimics 组高于 NC mimics 组; 同样, miR-223-3p inhibitor 组和 NC inhibitor 组相比较, 细胞迁移能力增强, 细胞愈合宽度 miR-223-3p inhibitor 组低于 NC inhibitor 组, 结果表明下调 miR-223-3p 的表达可以增强肺鳞癌细胞的迁移能力。见图 4。差异有统计学意义(miR-223-3p mimics $t = -13.000$, $P < 0.05$; miR-223-3p inhibitor $t = 29.000$, $P < 0.05$)。

2.5 肺鳞癌 SK-MES-1 细胞株过表达 miR-223-3p 促进上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) Western blot 结果显示, miR-223-3p mimics 组相对于 NC-mimics 组, 表现为抑癌作用, ZEB1 蛋白表达量降低 ($t = 18.333$, $P < 0.05$), E-cadherin 和 Bax 蛋白表达量增加 ($t = -39.000$, $P < 0.05$; $t = -29.000$, $P < 0.05$); 而 miR-223-3p inhibitor 和 NC-inhibitor 组相比较, 表现为促进肿瘤细胞增殖迁移, ZEB1 蛋白表达量增加 ($t = -99.000$, $P < 0.01$), E-cadherin 和 Bax 蛋白表达

量减少 ($t = 21.500$, $P < 0.05$; $t = 69.000$, $P < 0.01$)。见图 5。说明下调 miR-223-3p 的表达可以促进肺鳞癌细胞的迁移能力, 可能通过促进上皮间质转化, 进而诱导肺鳞癌细胞耐药的产生。

3 讨论

肺癌是世界病死癌症中最常见的癌症之一^[6]。随着我国工业化发展造成的环境污染加重, 肺癌患病率不断上升。肺癌中约 85% 为 NSCLC, 目前肺鳞癌最主要的治疗手段包括使用铂类药物进行化疗, 然而肺鳞癌天然耐药, 具体的耐药机制尚不清楚^[7]。近年来, 大量文献^[8-10]报道, 化疗药物 CD-DP、卡铂等耐药都与 EMT 息息相关, EMT 可促进肿瘤细胞的侵袭以及转移, 目前已经成为肿瘤侵袭转移以及癌症耐药相关分子机制研究领域的热点^[11]。在 EMT 过程中, 最主要的生物标记分子 E-cadherin 表达会减少, 另外还涉及其他分子标记物的表达变化, 如波形蛋白、神经钙粘素、 β -联蛋白及 ZEB1 蛋白等^[11]。通过 EMT, 上皮细胞失去了与基底膜的连接, 从而获得了更高的侵袭迁移能力^[12]。随着不断

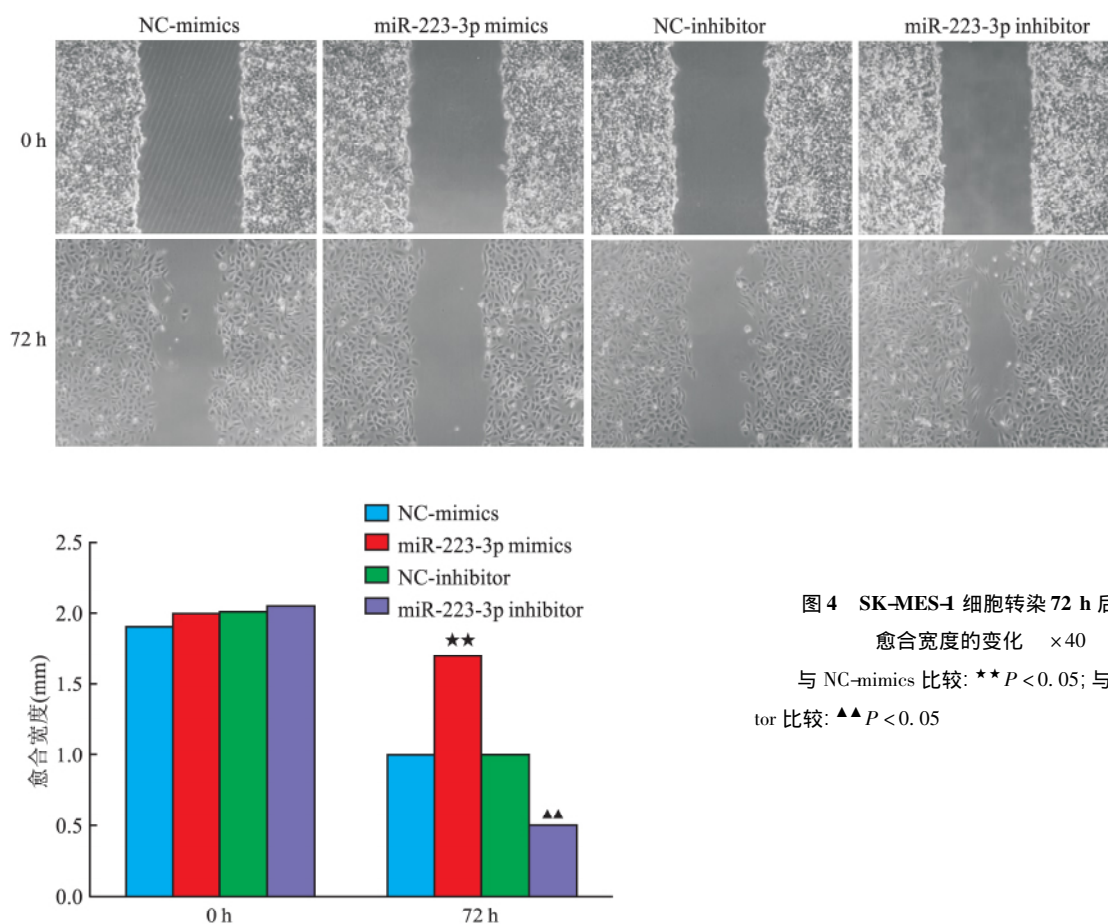


图4 SK-MES-1 细胞转染 72 h 后细胞愈合宽度的变化 $\times 40$
与 NC-mimics 比较: ** $P < 0.05$; 与 NC-inhibitor 比较: ** $P < 0.05$

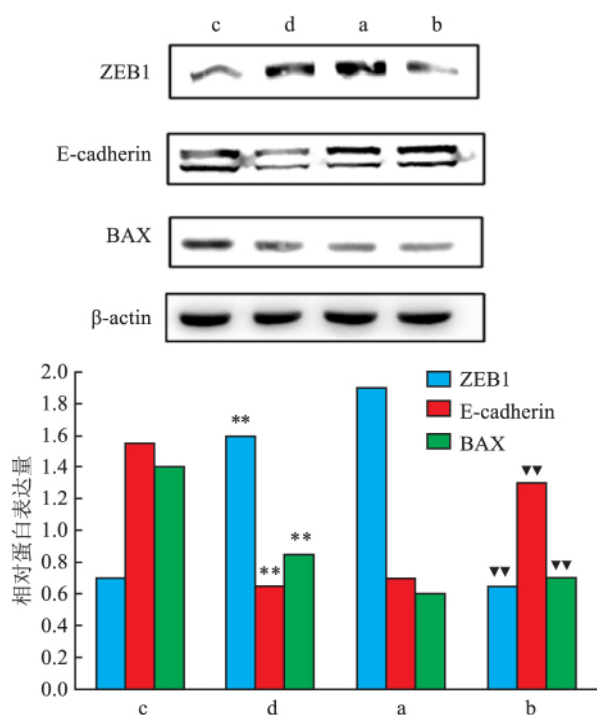


图5 Western blot 法检测 SK-MES-1 细胞中 ZEB1、BAX 和 E-cadherin 蛋白的表达

a: NC-mimics; b: miR-223-3p mimics; c: NC-inhibitor; d: miR-223-3p inhibitor; 与 NC-inhibitor 比较: ** $P < 0.01$; 与 NC-mimics 比较: ** $P < 0.01$

兴起的新型检测技术,包括高通量测序、miRNA 基因芯片检测等,研究^[13]发现 miRNAs 的差异表达水平会直接或间接的影响肿瘤分子耐药。在慢粒急变细胞系中发现阿霉素耐药株比其亲本细胞株抑制肿瘤细胞增长需要更高的阿霉素浓度,通过基因芯片技术检测两者的 miRNA 差异表达水平发现耐药株与亲本株相比,其中的 miR-221 表达上调,而 let-7f、miR-424 则显著下调,提示这些差异表达的 miRNA 可能影响白血病治疗中的阿霉素耐药机制研究。也有研究^[14]报道食道鳞状上皮细胞癌中 miR-27a 显著下调,耐药株与亲本株相比 P-gp 蛋白表达也下调,从而说明食道癌中差异表达的 miR-27a 通过影响 P-gp 蛋白的表达来促进肿瘤耐药。Pan et al^[15]发现乳腺癌细胞中差异表达的 miR-328 通过作用于靶蛋白 ABCG2 的 3'-UTRs,抑制 ABCG2 的表达来提高肿瘤细胞的化疗敏感性。但是,目前相关的 miRNAs 的分子研究还未成熟,依然在探索阶段,亟需进一步了解 miRNAs 的功能为临床诊治肺鳞癌患者提供更有效的信息。

为了研究 miR-223-3p 对肺鳞癌细胞 CDDP 敏

感性的影响,课题前期通过构建 PDTX 模型,基因芯片分析成瘤组和未成瘤组的肿瘤组织,筛选出差异明显、争议较大且对肿瘤的发生发展有重要影响的 miR-223-3p。为进一步探究 miR-223-3p 在肺鳞癌细胞 CDDP 耐药中的作用,通过分别升高或降低肺鳞癌 NCI-H520 和 SK-MES-1 细胞内 miR-223-3p 的含量后,CCK-8 实验证实了升高细胞内 miR-223-3p 的表达可以增加肺鳞癌细胞对 CDDP 药物的敏感性。在相同剂量 CDDP 药物的诱导下,流式细胞术结果表明这种耐药性与化疗药物诱导的凋亡相关,上调 miR-223-3p 的表达可以导致肺鳞癌细胞凋亡比率增加。此外,Western blot 结果显示 EMT 相关蛋白 ZEB1 表达下降,E-cadherin 表达显著增高,表明 miR-223-3p 可能通过诱导 EMT 形成,进而影响肺鳞癌细胞 CDDP 耐药性。然而,具体的分子机制尚有待进一步深入探索研究。

综上所述,通过构建 PDTX 模型、基因芯片技术在肺鳞癌成瘤与未成瘤组织中筛选出肺鳞癌 CDDP 耐药相关的差异表达的 miR-223-3p,为下一步研究其在肺鳞癌耐药中的机制奠定了基础。肺鳞癌组织中低表达 miR-223-3p 通过诱导 EMT 形成进而促进 CDDP 耐药性,其有望成为肺鳞癌靶向治疗的新的分子标志物。

参考文献

- [1] Yu T, Zhao Y, Hu Z, et al. MetaLnc9 facilitates lung cancer metastasis via a PKG1-activated AKT/mTOR pathway [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): 5782-94.
- [2] Gandara D R, Hammerman P S, Sos M L, et al. Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2236-43.
- [3] Chen Z J, Le H B, Zhang Y K, et al. Lung resistance protein and multidrug resistance protein in non-small cell lung cancer and their clinical significance [J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(5): 1693-700.
- [4] Zhang L, Lin J, Ye Y, et al. Serum microRNA-150 predicts prognosis for early-stage non-small cell lung cancer and promotes tumor cell proliferation by targeting tumor suppressor gene SRCIN1 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103(6): 1061-73.
- [5] Keenan J, Murphy L, Henry M, et al. Proteomic analysis of multidrug-resistance mechanisms in adriamycin-resistant variants of DLKP, a squamous lung cancer cell line [J]. *Proteomics*, 2009, 9(6): 1556-66.
- [6] Fitzmaurice C, Allen C, Barber R M, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived

- with disability , and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups , 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncol* , 2017 , 3(4) : 524 – 48.
- [7] Yao Y , Fucai H , Binbin S. Clinical research of drug resistance test in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Chin J Clinicians* , 2014 , 8(11) : 2142 – 5.
- [8] Previati M , Lanzoni I , Corbacella E , et al. RNA expression induced by cisplatin in an organ of Corti-derived immortalized cell line [J]. *Hear Res* , 2004 , 196(1 – 2) : 8 – 18.
- [9] Cornelison R , Llana D C , Landen C N. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini-review [J]. *Int J Mol Sci* , 2017 , 18(10) : E2171.
- [10] Begemann D , Anastos H , Kyprianou N. Cell death under epithelial-mesenchymal transition control in prostate cancer therapeutic response [J]. *Int J Urol* , 2018 , 25(4) : 318 – 26.
- [11] Yeung K T , Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Mol Oncol* , 2017 , 11(1) : 28 – 39.
- [12] Luo M , Li Z , Wang W , et al. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression [J]. *Cancer Lett* , 2013 , 333(2) : 213 – 21.
- [13] 曹翊雄 , 戴崇文 , 张广森. K562 细胞及其耐药细胞株 K562/A02 细胞白血病耐药相关 microRNA 筛选 [J]. *中华血液学杂志* , 2010 , 31(6) : 361 – 5.
- [14] Zhang H , Li M , Han Y , et al. Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dig Dis Sci* , 2010 , 55(9) : 2545 – 51.
- [15] Pan Y Z , Morris M E , Yu A M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol* , 2009 , 75(6) : 1374 – 9.

The role of miR-223-3p on drug resistance to cisplatin in lung squamous cell carcinoma

Feng Kunli , Luo Peng , Wang Baolong

(Dept of Clinical Laboratory , Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-223-3p on cisplatin sensitivity of lung squamous cell carcinoma. **Methods** After increasing or decreasing (miR-223-3p mimics , NC-mimics , miR-223-3p inhibitor , NC-inhibitor) the content of miR-223-3p in lung squamous carcinoma NCI-H520 and SK-MES-1 cells , the changes of miR-223-3p in cells were detected by qRT-PCR , half inhibitory concentration (IC₅₀) was detected by CCK-8 assay , apoptosis was detected by flow cytometry (four different treatments were designed: miR-223-3p mimics + CD- DP , NC-mimics , miR-223-3p inhibitor + CDDP , NC-inhibitor) , the migration ability of SK-MES-1 cells was detected by Transwell assay , the proteins of Bax , ZEB1 and E-cadherin in SK-MES-1 cells were detected by Western blot. **Results** The results of CCK-8 experiment showed that the IC₅₀ of the miR-223-3p mimics group was lower than that of the control group , and the IC₅₀ of the miR-223-3p group was higher than that of the control group. Flow cytometry apoptosis detection results showed that the apoptosis rate of miR-223-3p mimics + cisplatin (CD- DP) group increased , while the apoptosis rate of miR-223-3p inhibitor + cisplatin (CDDP) group decreased. Western blot confirmed that ZEB1 protein , Bax and E-cadherin protein increased and decreased respectively after the content of miR-223-3p in lung squamous cell carcinoma was increased or decreased. **Conclusion** miR-223-3p affects the sensitivity of lung squamous cell carcinoma cells to cisplatin as an anticancer gene , and it can be an important molecular target for the treatment of cisplatin resistance in lung squamous cell carcinoma.

Key words miR-223-3p; lung squamous carcinoma; cisplatin; drug resistance