

抑制 miR-21 对非小细胞肺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP 增殖和凋亡的影响及可能机制探讨

田 觅,王永生,苗立云,丁晶晶,张德平,蔡后荣*

(南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨抑制 miR-21 表达对非小细胞肺癌耐药细胞株 A549/DDP 增殖和凋亡的影响及可能的机制。方法:应用 Real-time PCR 技术分别检测人非小细胞肺癌细胞株 A549 及其耐药株 A549/DDP 中 miR-21 的表达;将 miR-21 抑制剂(miR-21 inhibitor) ASO-21 转染至 A549/DDP 中,下调其 miR-21 的表达,在不同时间点使用 MTT 检测细胞的增殖,流式细胞仪 Annexin-FITC 检测细胞凋亡;使用生物信息学和 miR 的预测软件预测 miR-21 在非小细胞肺癌中的可能靶点。结果:①miR-21 在 A549/DDP 细胞株的表达均为 A549 的 3 倍;②A549/DDP 细胞株中转染 ASO-21 孵育,加入顺铂后,与对照组相比,其凋亡增加,增殖能力明显降低;③生物信息学软件分析后发现 miR-21 在非小细胞肺癌 A549 有多个调节靶点,一些蛋白分子可以调节 miR-21 的表达,组成肿瘤细胞的调节网络而影响肺癌细胞对顺铂的敏感性。结论:抑制 miR-21 可以促进顺铂耐药细胞 A549/DDP 的凋亡增加及抑制其增殖,miR-21 可能成为逆转肺癌对顺铂耐药的新靶点。

[关键词] 肺癌;化疗;顺铂;耐药;miR-21

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-543-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140502

Effects of miR-21 inhibition on A549/DDP cisplatin resistant cell proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer

Tian Mi, Wang Yongsheng, Miao Liyun, Ding Jingjing, Zhang Deping, Cai Hourong*

(Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-21 inhibition on proliferation and apoptosis of A549/DDP cells. **Methods:** MiR-21 expression was examined in A549 and A549/DDP cell lines. The inhibitor of miR-21 (ASO-21) was transfected into A549/DDP. MTT and flow cytometry were performed to analyze the proliferation and apoptosis after transfection, respectively. Computational software and miR predicting database were used to predict the downstream effectors of miR-21 in the lung cancer cell line. **Results:** ①miR-21 expression was approximately 3 times higher in A549/DDP compared with A549 cells. ②Apoptosis was induced and proliferation was suppressed in A549/DDP cells when miR-21 was inhibited. ③Computational softwares showed that multiple genes are possible downstream targets of miR-21. Some proteins could possibly regulate miR-21. Those genes form a regulating network via miR-21, resulting in regulating cisplatin chemoresistance. **Conclusion:** MiR-21 inhibition leads to apoptosis and proliferation suppression of A549/DDP cells, and it may be a therapeutic target to reverse cisplatin resistance in lung cancer treatment.

[Key words] lung cancer; chemotherapy; cisplatin; chemoresistance; miR-21

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05):543-547]

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤,发病率逐年增高^[1],以铂类为基础的化疗方案是晚期非小细胞肺

癌(NSCLC)治疗的主要方法之一,但如同细菌容易对抗生素产生抗药性一样,肿瘤细胞也常对化疗药物产生耐药性,而且更为普遍,这是导致化学治疗失败的最主要原因之一^[2]。对顺铂的耐药是 NSCLC 治疗中急需解决的关键问题之一。

近年来研究发现 miRNA-21(miR-21)在多种

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助(81370161)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: caihourong@yahoo.com.cn

实体瘤中表达上调,如 NSCLC、胃癌、肝癌、乳腺癌等^[3]。此外,在体外细胞株以及移植瘤动物模型中发现 miR-21 和肿瘤细胞的凋亡、肿瘤生长及肿瘤细胞对化疗药物的敏感性有关。但对 miR-21 是否可以调节顺铂耐药及其机制的研究较少。有研究发现对顺铂耐药的细胞株 A549/DDP 和敏感细胞株 A549 中的 miR-21 表达有差别,且表达量相差约 1.6 倍,提示 miR-21 可能和顺铂耐药相关^[4]。国外研究也表明 miR-21 可能和 NSCLC 的转移及对多种化疗药物如多西紫杉醇的耐药相关^[5]。

本研究旨在通过分析 A549 细胞株和对顺铂耐药的 A549/DDP 细胞株中 miR-21 的表达,并将 miR-21 转染至 A549 细胞株,同时在 A549/DDP 下调 miR-21 的表达,检测在相同浓度的顺铂下细胞的增殖及凋亡情况,在细胞水平证实 miR-21 参与了 NSCLC 对顺铂的耐药,更好地了解 miR 是如何影响顺铂的敏感性,为寻找新的耐药机制提供有力依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞敏感株 A549 及其顺铂耐药株 A549/DDP 由南京大学医学院附属鼓楼医院科研处保存,用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液置于 37℃、5%CO₂ 恒温保湿培养箱内培养。miR-21 抑制剂(miR-21 inhibitor)ASO-21 及其对照(上海吉玛公司);转染试剂 Lipofectamine2000、RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国);miR-21、U6 引物由上海生工合成;qRT-PCR 试剂盒(Agilent 公司,美国);注射用顺铂(德州德药制药有限公司)用细胞培养液和 DMSO 配置成 10 mmol/L 储存于 -20℃ 冰箱,使用前稀释成工作浓度。Annexin-V/FITC 凋亡试剂盒(Biovision 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549、A549/DDP 细胞分别常规培养生长在全血清培养基中(RPMI-1640 培养液含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素),放置在 37℃、5%CO₂ 的培养箱内。

1.2.2 qRT-PCR 检测 miR-21 表达

按照试剂盒说明书对 A549、A549/DDP 行总 RNA 抽提,后各取 1 μg RNA 逆转录成 cDNA,miR-21 逆转录引物:5'-GCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG-3',5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3',按以下程序进行扩增:95℃,30 s;40 个 PCR 循环(95℃,5 s,

60℃,30 s,72℃,1 min),并建立 PCR 产物的溶解曲线。qRT-PCR 进行 3 次。数据采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行分析。

1.2.3 A549/DDP 细胞株转染

在 EP 管中分别配制 miR-21 抑制剂(5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA-3'),control(5'-CAGUACUUUUGUAGUACAA-3')与脂质体 Lipofectamine2000 的复合物:①A 液:miR-21 抑制剂及 control 各 100 μl 稀释到 100 μl 无血清的 RPMI-1640 培养液中,混匀,室温静置 5 min;②B 液:将 Lipofectamine2000 5 μl 溶于 100 μl 无血清的 RPMI-1640 培养液中,混匀;分别将两液混合备用,将上面两种混合液分别加入到用无血清培养液洗涤的 A549/DDP 细胞中(A549/DDP+miR-21 抑制剂组,A549/DDP+miR-21 control 组),于 37℃、5%CO₂ 培养箱常规培养 6~8 h,弃去培养液,换含血清的 RPMI-1640 培养液继续培养,细胞转染进行 3 次。

1.2.4 细胞药物敏感性检测采用 MTT 法

将上述两组成功转染的细胞接种于 96 孔培养板,5 × 10³ 个/孔,细胞贴壁 24 h 后加入顺铂,每组细胞设 1 个空白对照,加入顺铂后每组样本作 3 个平行孔,24、48 及 72 h 后,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl 后继续培养 4 h,每孔加 150 μl DMSO,以 570 nm 检测波长,测定各孔的吸光度值。抑制率=(1-加药组吸光度值/细胞对照组吸光度值)×100%,计算抗癌药物的半数抑制浓度(IC₅₀),MTT 实验至少进行 3 次。

1.2.5 流式细胞检测凋亡

将上述两组对数生长期的细胞接种于 6 孔板上,24 h 后予加入 28.4 μg/ml 的顺铂,48 h 后,将各孔上清液收集到对应的 10 ml 离心管中,每孔加 1 ml PBS 洗涤后同样收集到对应的离心管中,加胰酶充分消化后每孔加 1 ml PBS 洗涤并收集。离心并收集细胞,加入 500 μl 缓冲液重悬细胞使其密度为 1 × 10⁵ 个/L,加 5 μl Annexin V-FITC 室温下避光孵育 5 min,后每管加入 5 μl 的碘化丙啶(PI)室温避光孵育 5 min。流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件。配对资料比较采用 *t* 检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂耐药细胞株 A549/DDP 的 IC₅₀

根据 MTT 检测结果绘制 A549 和 A549/DDP

细胞的耐药曲线(图 1)。顺铂对 A549 细胞的 IC₅₀ 值为 (3.5 ± 0.1) μg/ml, 对 A549/DDP 的 IC₅₀ 值为 (24.8 ± 2.4) μg/ml, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 A549 细胞相比,A549/DDP 细胞对顺铂的耐受性提高了 8 倍左右,证实 A549/DDP 为耐药细胞株。

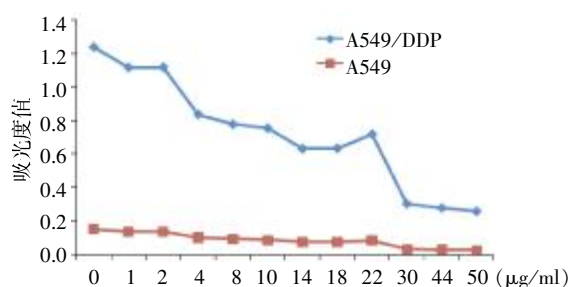


图 1 耐药细胞株 A549/DDP 和 A549 的 IC₅₀

Figure 1 IC₅₀ of resistant cell line A549/DDP and sensitive cell line A549

2.2 miR-21 在耐药细胞株中明显高表达

根据 RT-PCR 方法检测 A549 和 A549/DDP 中 miR-21 相对于 U6 的表达,检测结果见图 2。A549 细胞的 miR-21 的 Ct 值为 27.2,U6 的 Ct 值为 12.5,而 A549/DDP 细胞的 miR-21 的 Ct 值为 26.6,U6 的 Ct 值为 10.4。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析后,A549/DDP 细胞中 miR-21 约为 A549 的 3 倍左右,两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

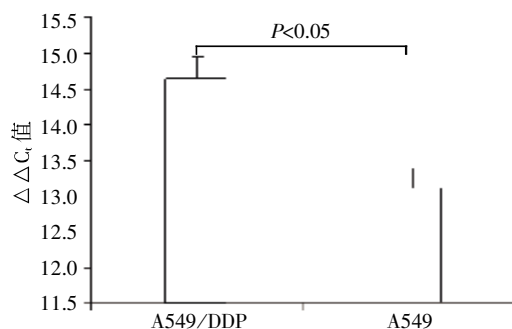


图 2 耐药细胞株中 miR-21 表达的比较

Figure 2 The expression of miR-21 in resistant cell line

2.3 下调 miR-21 后对耐药细胞株 A549/DDP 增殖的影响

对顺铂耐药的人肺腺癌细胞株 A549/DDP 分为两组,A549/DDP 对照组(只加入 28.4 μg/ml 的顺铂)和 A549/DDP 实验组(瞬时转染 miR-21 抑制剂后加入 28.4 μg/ml 的顺铂)。研究发现高浓度的顺铂对肺腺癌耐药的 A549/DDP 细胞株有抑制作用,并且这种抑制作用呈现出时间依赖性,但顺铂对 A549/DDP 实验组的抑制作用明显高于 A549/DDP 对照组,作用 24、48、72 h 后,A549/DDP 对照组细

胞存活率分别是(81.20 ± 0.87)%、(75.0 ± 0.90)%、(56.50 ± 0.05)%。A549/DDP 实验组细胞株的细胞存活率分别是 (43.30 ± 0.03)%、(32.10 ± 0.90)%、(27.60 ± 0.34)%。各时间点两组相比有统计学意义 ($P < 0.05$,图 3)。

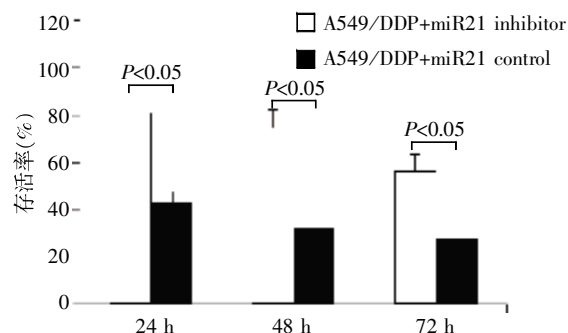


图 3 转染 miR-21 抑制剂后对耐药细胞和敏感细胞株增殖的影响

Figure 3 The effect of miR-21 inhibitor transfection on proliferation of A549/DDP and A549 cells

2.4 下调 miR-21 表达可以促进顺铂对耐药株 A549/DDP 的凋亡诱导

将 A549/DDP 细胞分为 3 组,A549/DDP 空白对照组(只加培养液),A549/DDP 对照组(只加入 28.4 μg/ml 的顺铂)和 A549/DDP 实验组(瞬时转染 miR-21 抑制剂后加入 28.4 μg/ml 的顺铂)。研究发现顺铂对耐药细胞株 A549/DDP 亦有诱导凋亡的作用,但转染 miR-21 抑制剂后,顺铂对肺腺癌 A549/DDP 细胞株的诱导凋亡作用增强。A549 对照组和 A549 实验组的凋亡率分别为 15.7%和 19.3% (图 4)。

2.5 miR-21 可能的靶点

通过 Targetscan 等 miR 靶点预测软件,结合文献,发现 miR-21 在不同肿瘤有多个调节靶点,如和肿瘤转移有关的 PDCD4 分子 tumor suppressor-P TEN 和 P53 等,并且一些蛋白分子如 STAT3 及 AP1 等可以调节 miR-21 的表达,组成肿瘤细胞的调节网络,miR-21 可能通过下游调控网络调控 A549 对顺铂的耐药(图 5)。

3 讨论

近年来新发现的一类内源性的非编码微小 RNA(microRNA,miRNA)引起了研究人员的极大兴趣,开辟了肿瘤研究的新领域。目前,人类基因组中确认的 miRNA 约有 500 个,其中至少有 200 多种与癌症的发生有关,很多 miRNA 可能扮演着癌基因和抑癌基因的角色。其中 miRNA-21 作为癌基因的

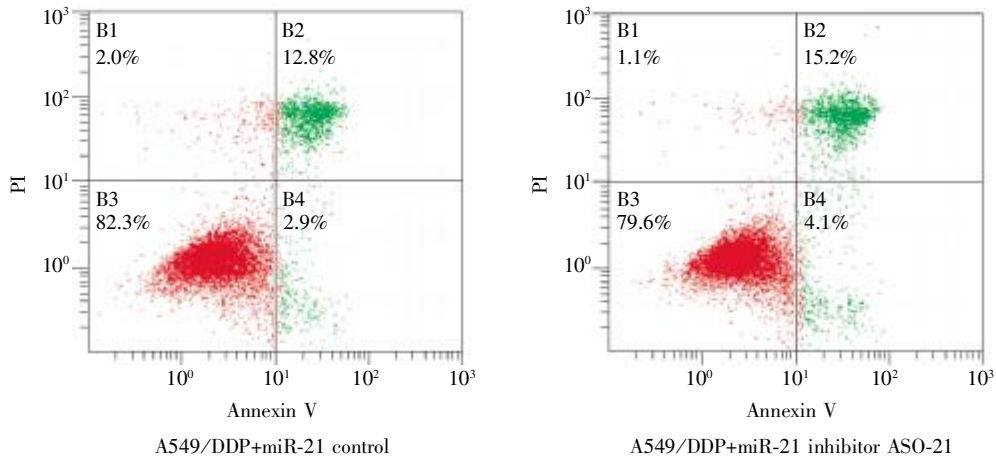


图 4 转染 miR-21 抑制剂后对耐药细胞和敏感细胞凋亡的影响
Figure 4 The effect of miR-21 inhibitor transfection on apoptosis of A549/DDP and A549 cells

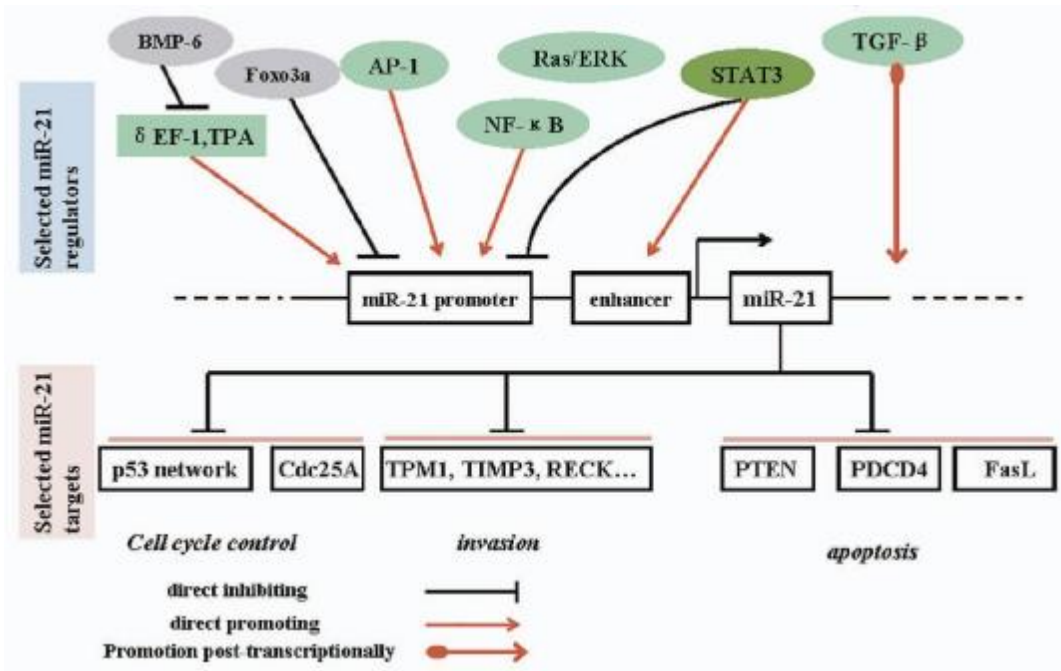


图 5 miR-21 在肿瘤细胞中可能的靶点
Figure 5 The potential targets of miR-21 in tumor cells

作用成为研究的最前沿与热点，研究发现 miRNA 21(miR-21)在多种实体瘤中表达上调,如非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌等。这表明 miRNA-21 与绝大多数肿瘤的发生、发展紧密相关^[3]。

此外,在体外细胞株以及移植瘤动物模型的实验中发现 miR-21 和肿瘤细胞的凋亡、肿瘤生长及肿瘤细胞对化疗药物的敏感性有关。但 miR-21 是否可以调节非小细胞肺癌顺铂耐药及其机制的研究较少。有研究比较对顺铂耐药的细胞株 A549/cDDP 和敏感细胞株 A549 中的 miR-21 表达有差别,其他研究也表明 miR-21 可能和肿瘤的多种化疗药物耐药

相关^[6-8]。

为了进一步探索 miR-21 在非小细胞肺癌细胞株顺铂耐药的潜在作用,我们在 A549 细胞株的基础上成功诱导了耐药细胞株 A549/CDDP,并发现在 A549/CDDP 中 miR-21 表达约是敏感细胞 A549 的 3 倍左右,提示 miR-21 可能参与了肺癌细胞对顺铂的耐药。而在耐药细胞株中抑制 miR-21 表达后,发现细胞增殖明显下降,24 h 后细胞增殖由 81.2%下降为 43.2%,而 72 h 后细胞增殖下降更为明显,由 56.6%下降为 27.6%,提示下调 miR-21 的表达可以抑制耐药细胞增殖,而同时对顺铂诱导的 A549/

DDP 凋亡分析发现, 顺铂可以诱导15.7%的 A549/DDP 细胞的凋亡, 而抑制 miR-21 的表达后, 同样剂量的顺铂可以诱导 19.3%的细胞凋亡, 提示 miR-21 可以抑制耐药细胞对顺铂诱导的凋亡。本研究在细胞水平证实 miR-21 可能参与了 NSCLC 对顺铂的耐药。miR-21 可能在细胞内有多个下游靶点, 提示 miR-21 下游调控网络有可能参与了 A549 细胞对顺铂的耐药, 但需要进一步地体内外研究探索 miR-21 参与顺铂耐药的机制。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [2] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(10): 714-726
- [3] Ma X, Choudhury SN, Hua X, et al. Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1216-1223
- [4] 陆 晓, 孙 婧, 高 雯, 等. 非小细胞肺癌耐药细胞株 A549/DDP 中 microRNA 表达的初步研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(9): 659-663
- [5] Rui W, Bing F, HaiZhu S, et al. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1) [J]. J Cell Med, 2010, 14(1-2): 206-214
- [6] Liu ZL, Wang H, Liu J, et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1-2): 35-45
- [7] Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9): 2690-2695
- [8] Shi G, Ye D, Yao X, et al. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells [J]. Acta Pharmacol Sinica, 2010, 31(7): 867-873

[收稿日期] 2013-11-27

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。