

◇ 药物与临床 ◇

microRNA-21 促进人肺腺癌细胞 A549 对顺铂耐药性的研究

赵洁婷¹, 钟文², 徐建平¹

(1. 安徽省胸科医院病理科, 安徽 合肥 230022; 2. 安徽省立医院病理科, 安徽 合肥 230001)

摘要:目的 研究 microRNA-21 (miR-21) 对人肺腺癌细胞 A549 对于顺铂耐药性的影响及分子机制。方法 MTT 法检测 A549 和顺铂耐药株 A549/CDDP 对于顺铂的敏感性, 以及在 A549 细胞中过表达 miR-21 和在 A549/CDDP 细胞中抑制 miR-21 表达对顺铂敏感性的影响; RT-PCR 方法检测 A549 和 A549/CDDP 中 miR-21 表达情况; Western blotting 检测 PI3K/AKT, 核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的激活情况以及在过表达 miR-21 和抑制 miR-21 表达后细胞中 AKT 信号通路的活性变化情况。结果 相对于 A549 细胞, A549/CDDP 对顺铂的敏感性有明显降低, 而细胞中 miR-21 表达则明显增多。Western blotting 结果表明: 与 A549 细胞相比, A549/CDDP 细胞 PI3K/AKT 通路被激活, NF- κ B 通路没有明显变化。过表达 miR-21 可以激活 PI3K/AKT 信号通路并提高 A549 细胞对顺铂的耐药性, 相反地, 抑制 miR-21 表达抑制了 A549/CDDP 细胞中的 AKT 通路的活化情况并降低了 A549/CDDP 细胞对顺铂的耐药性。结论 miR-21 可以促进肺癌细胞 A549 对顺铂的耐药性, 其机制与 PI3K/AKT 信号通路的激活有关。

关键词: 肺癌; microRNA-21; 耐药; PI3K/AKT**doi:** 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.06.029

microRNA-21 induces drug resistance to cisplatin in human lung cell line A549

ZHAO Jieting¹, ZHONG Wen², XU Jianping¹

(1. Department of Pathology, Anhui Chest Hospital, Hefei, Anhui 230022, China;

2. Department of Pathology, Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui 230001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of microRNA-21 (miR-21) induced-drug resistance in human lung cell line A549 cells. **Methods** The sensibility of A549 cells and A549/CDDP cells to cisplatin and the effect of miR-21 on sensibility of A549 cells or A549/CDDP cells to cisplatin was measured by MTT assay. The expression of miR-21 in A549 cells and A549/CDDP cells was detected by RT-PCR. Western blotting was used to detect the activation of AKT and NF- κ B signaling pathways. **Results** Compared to A549 cells, the resistance of A549/CDDP cells to cisplatin was significantly enhanced and the expression of miR-21 in A549/CDDP cells was also increased. The results of western blotting demonstrated that AKT signaling pathway, not NF- κ B signaling pathway was activated. MiR-21 overexpression decreased the sensibility of A549 cells to cisplatin and activated AKT signaling pathway. Conversely, inhibition of miR-21 expression increased the sensibility of A549/CDDP cell to cisplatin and suppressed the activity of AKT signaling pathway. **Conclusions** miR-21 can induce drug resistance of human lung cell line A549 to cisplatin and molecular mechanism involve in activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Lung cancer; miR-21; Drug resistance; PI3K/AKT

肺癌是全球发病率和病死率都较高的恶性肿瘤, 危害极大, 主要原因是多数肺癌病人在临床治疗过程中易对化疗药物产生耐受性。顺铂是临床上用于肺癌化疗的重要药物, 顺铂可以在肿瘤细胞内交叉联结 DNA, 形成稳定的顺铂-DNA 复合物, 抑制 DNA 复制, 从而诱发癌细胞死亡^[1-2]。但在临床

治疗中, 多数病人在使用顺铂化疗一段时间后, 便产生了耐受性, 极大限制了顺铂的作用, 影响了肺癌的治疗效果。

microRNA 主要存在于真核生物基因组的非编码区, 主要通过转录后水平调控基因的表达。近年来的研究表明 microRNA 异常表达与肿瘤的发生发展密切相关^[3]。研究发现, microRNA-21 (miR-21) 在多种肿瘤组织以及肿瘤细胞中的表达水平都异常增高, 如肺癌、大肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、前列腺癌和胆管癌等, 因此 miR-21 被公认为是致癌

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (1608085QH217)

通信作者: 徐建平, 女, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤化疗耐药机制研究, E-mail: xjpxkbl@163.com

microRNA^[4]。最新研究发现 miR-21 在肿瘤获得化疗药物耐药性也有一定作用,然而分子机制尚不清楚。本研究检测了人肺腺癌细胞株 A549 以及对应的对顺铂耐药的细胞株 A549/CDDP 中 miR-21 的表达,并通过检测相关信号通路中关键信号分子的活性变化情况,对肺癌耐药的潜在分子机制进行了探讨,以期深入理解 miR-21 和肺癌耐药的关系提供一些有益的实验依据和线索。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人肺腺癌细胞株 A549 和顺铂耐药株 A549/CDDP 由本实验室保存。细胞培养于 RPMI1640 中,含 10% 胎牛血清,在 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱中培养。

1.2 主要试剂 顺铂和四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma-Aldrich 公司,抗体 p-AKT 和 AKT 购自 Cell Signaling Technology 公司,抗体 p-p65、p65、 β -actin 购自 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗购自飒英斯生物技术有限公司,miR-21 模拟物 (miR-21 mimics) 以及抑制剂购自锐博生物技术公司,PCR 荧光试剂以及逆转录试剂盒购自 TAKALA 公司。

1.3 MTT 实验 经胰酶消化离心重悬后,A549 和 A549/CDDP 细胞以 8×10^4 mL⁻¹ 密度接种于 96 孔细胞培养板,设为空白对照组,不同浓度顺铂为加药组,设 5 个复孔。在 37 ℃,5 % CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后每孔加 10 μ L MTT 试剂,继续培养 4 h,每孔加 20 μ L 二甲基亚砷 (DMSO),充分振荡,酶标仪检测 492 nm 波长处的 OD 值,重复实验 3 次,计算细胞存活率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4 蛋白质印迹检测 A549 和 A549/CDDP 细胞用预冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次后,在冰上用 Western blotting 裂解液裂解 30 min,将细胞刮下,收集到 1.5 mL EP 管中,12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 30 min 后收集上清,测定样本蛋白浓度。8% SDS-PAGE 胶中加入等量蛋白样品,经电泳分离后,将蛋白电转至 PVDF 膜上,PBS 清洗 3 次,封闭液室温孵育条带 2 h,一抗均以 1:1 000 比例 4 ℃ 孵育过夜,加有吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤 3 次后,以 1:5 000 加入特异性二抗室温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次后,加入增强化学发光液 (ECL),在免疫印迹曝光仪上显影并拍照。

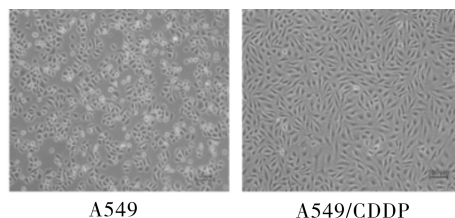
1.5 RT-PCR 实验 用 Trizol 试剂提取细胞中总 RNA,按反转录试剂盒说明书取 500 ng 总 RNA,将 microRNA 加多聚 A 尾的方法逆转录成 cDNA。以

U6 作为内参。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 10 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,共 48 个循环。读取 CT 值,按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 c-met mRNA 的相对表达量。每个实验组重复 3 次。

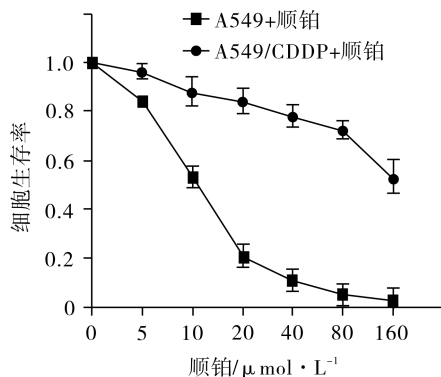
1.6 统计学方法 全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计学软件处理。组间比较采用独立样本双侧 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

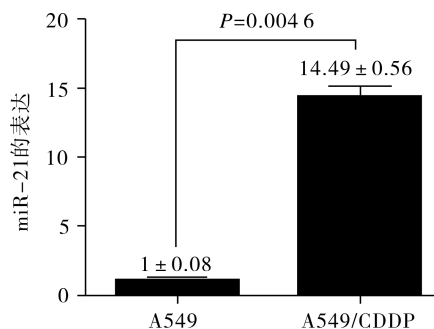
2.1 A549/CDDP 细胞中 miR-21 表达增高 观察比较 A549 和 A549/CDDP 细胞的形态 (图 1A),A549 细胞生长紧密,为圆石状,而 A549/CDDP 细胞形态变的梭长。比较两种细胞对顺铂的敏感性,MTT 结果显示,A549/CDDP 与 A549 细胞相比,对顺铂的耐受性明显增强 (图 1B)。此外,RT-PCR 结果显示,A549/CDDP 细胞中 miR-21 的表达较 A549 细胞增高,两者之间差异有统计学意义 (图 1C)。



A. A549 和 A549/CDDP 细胞的形态比较



B. MTT 试验比较 A549 和 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性



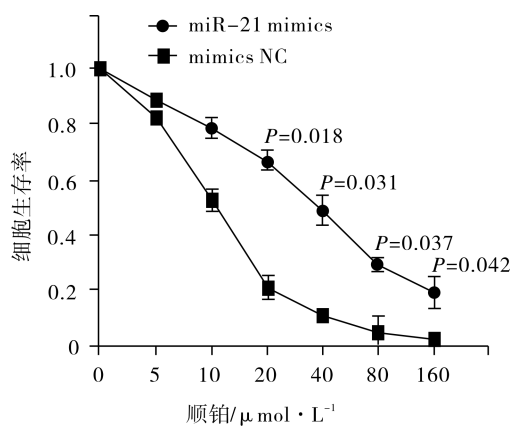
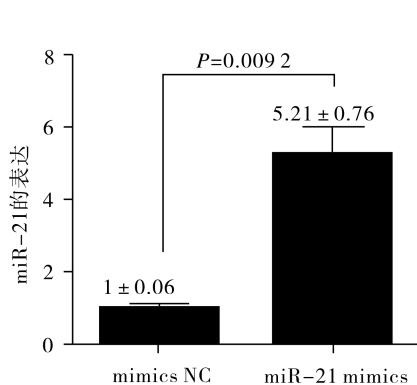
C. RT-PCR 实验检测两种细胞中 miR-21 的表达情况

图 1 A549 和 A549/CDDP 细胞的比较及 miR-21 的表达

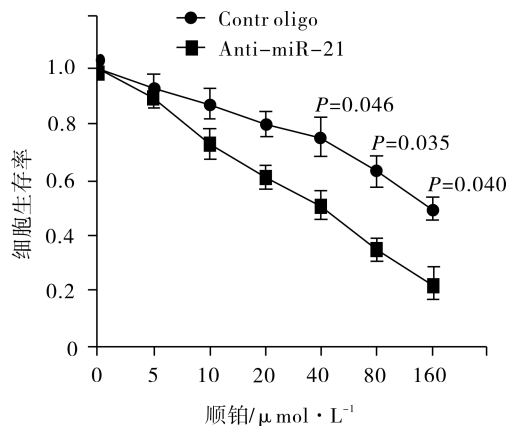
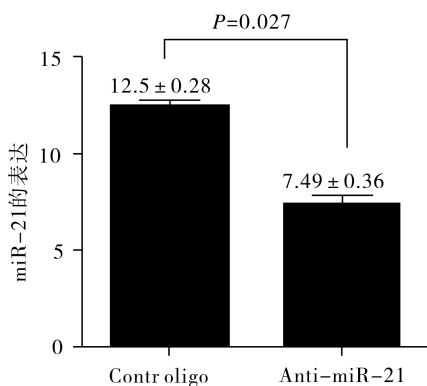
2.2 miR-21 促进肺癌细胞对顺铂的耐药性 为进一步验证 miR-21 在 A549/CDDP 细胞获得耐药性过程中的作用,我们分别对 miR-21 进行了过表达和抑制,并检测了细胞对顺铂的耐药性变化,结果显示,与过表达 mimics NC(阴性对照)相比,在 A549 细胞中过表达 miR-21 mimics 可以显著增强 miR-21 的表达并促进 A549 细胞对顺铂的耐药性(5、10、15、20、80、160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的统计值分别为: mimics NC 组为 1.0、0.88、0.79、0.67、0.49、0.29、0.19; miR-21 mimics 组为 1.0、0.82、0.53、0.21、0.11、0.049、0.027)(图 2A)。相反地,在 A549/CDDP 细胞中抑制 miR-21 的表达则显著降低了细胞对顺铂的耐药性(5、10、15、20、80、160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的统计值分别为: Control oligo 组为 1.0、0.93、0.87、0.80、0.76、0.63、0.50; Anti-miR-21 组为 1.0、0.90、0.73、0.61、0.51、0.35、0.22)(图 2B)。

2.3 miR-21 激活 PI3K/AKT 信号通路 我们进

一步分析了 miR-21 促进 A549 细胞耐药的分子机制。我们检测了 A549 细胞和 A549/CDDP 细胞中与耐药紧密相关的 PI3K/AKT 和核因子- κB (NF- κB)信号通路活性表达情况。Western blotting 结果显示(图 3A):与 A549 细胞相比,A549/CDDP 细胞中 AKT 的活性明显增强,而 NF- κB 的活性则没有明显变化,提示 PI3K/AKT 信号通路可能在 A549/CDDP 细胞获得耐药性的过程中发挥了一定作用。我们进一步检测了 miR-21 是否会对 AKT 信号通路的激活产生影响,在 A549 细胞中过表达 miR-21 以及 A549/CDDP 细胞中抑制 miR-21 表达并检测 AKT 信号通路的活化情况,结果显示(图 3B、C),过表达 miR-21 可以激活 A549 细胞中 AKT 信号通路,相反地,抑制 miR-21 表达可以抑制 A549/CDDP 细胞中 AKT 信号通路的活性。结果表明 miR-21 可以促进肺癌细胞 A549 对顺铂的耐药性,其机制与 PI3K/AKT 信号通路的激活有关。

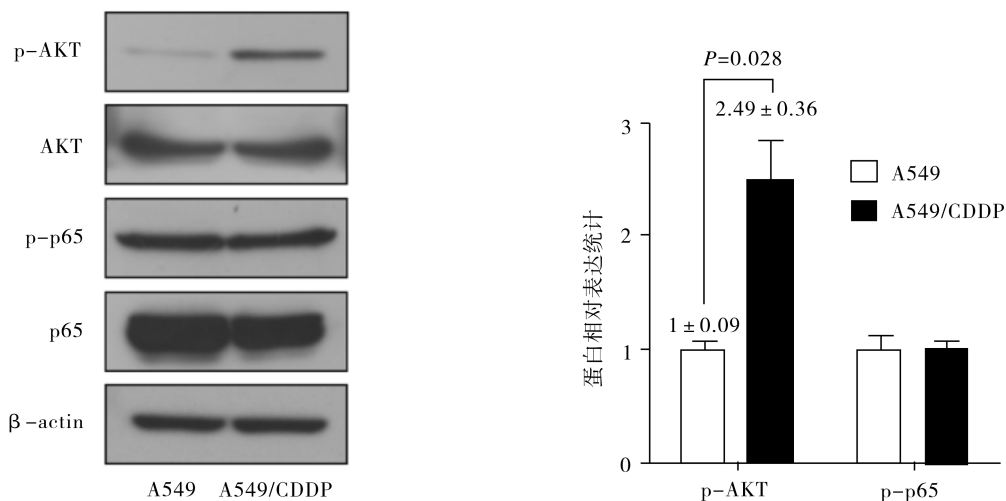
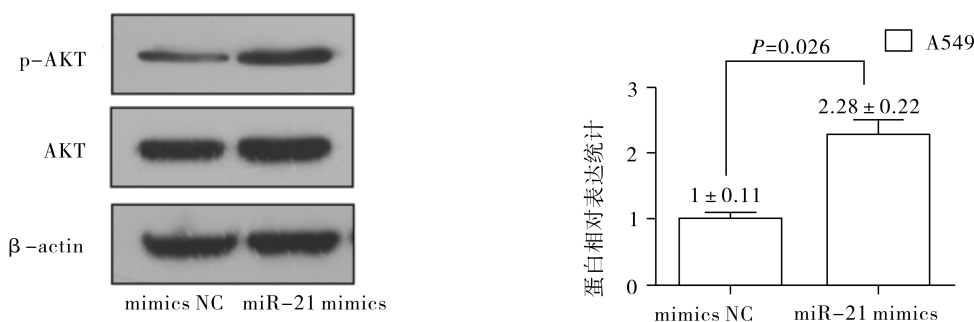


A. 在 A549 细胞中过表达 miR-21 后,RT-PCR 检测 miR-21 的表达情况(左),MTT 检测 A549 细胞对顺铂敏感性的变化(右)

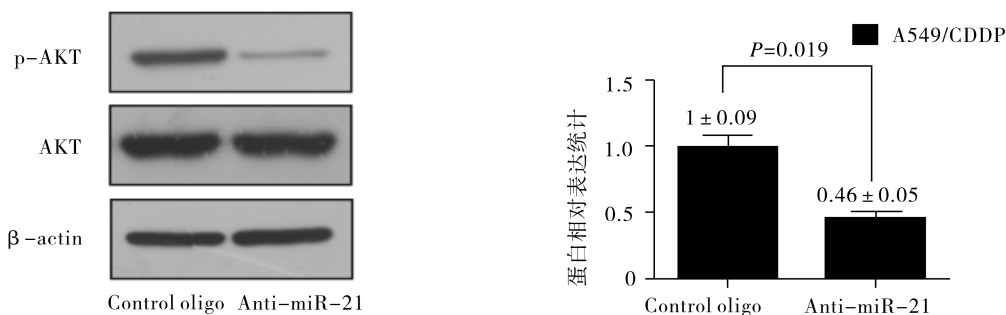


B. 在 A549/CDDP 细胞中抑制 miR-21 表达后,RT-PCR 检测 miR-21 的表达情况(左),MTT 检测 A549/CDDP 细胞对顺铂敏感性的变化(右)

图 2 miR-21 促进肺癌细胞对顺铂的耐药性

A. Western blotting 检测 A549 和 A549/CDDP 细胞中 PI3K/AKT 和 NF- κ B 信号通路的活化情况

B. Western blotting 检测过表达 miR-21 对 A549 细胞中 PI3K/AKT 信号通路活性的影响



C. Western blotting 检测抑制 miR-21 表达对 A549/CDDP 细胞中 PI3K/AKT 信号通路活性的影响

图3 miR-21 激活 PI3K/AKT 信号通路

2.4 抑制 PI3K/AKT 信号通路降低 A549/CDDP

细胞对顺铂耐药性 为进一步探讨 PI3K/AKT 信号通路在 A549/CDDP 细胞获得顺铂耐药性过程中的作用,我们使用了 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002。以同体积的 DMSO 作为对照,用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 联合不同浓度顺铂处理 A549/CDDP 细胞 24 h,结果显示,LY294002 与 DMSO 相比,可以提高 A549/CDDP 细胞对顺铂的耐药性,两组之间差异有统计学意义(5、10、15、20、80、160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的统计值 DMSO 组为 1.0、0.96、0.85、0.82、0.77、0.74、0.50;LY294002 组为 1.0、

0.89、0.68、0.69、0.52、0.46、0.29)(图4)。

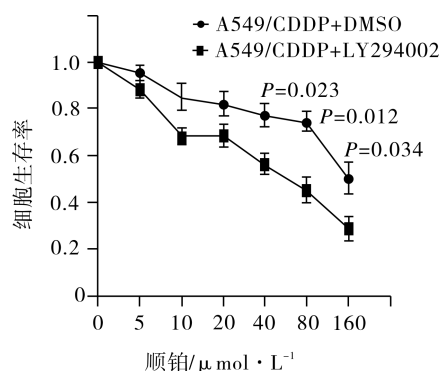


图4 LY294002 降低 A549/CDDP 细胞对顺铂的耐药性

3 讨论

肺癌是全球危害极大的恶性肿瘤,目前化疗是针对肺癌有效的治疗方法,顺铂是肺癌化疗的重要药物,然而,在治疗过程中产生的耐药性极大限制了其治疗效果,并导致治疗失败。近年来,有关肿瘤化疗耐药和 microRNA 相关的研究引起了国内外学者的浓厚兴趣,研究发现 microRNA 在促进肿瘤细胞获得化疗耐药性的过程中发挥了重要作用。其中 miR-21 的研究较为广泛。研究发现^[1], miR-21 在肿瘤的发生发展过程中发挥着非常重要的作用,在不同类型肿瘤中的表达均明显上升,与肿瘤细胞的增殖、侵袭、血管的生成和抗药性等生物学行为相关。miR-21 在恶性胶质瘤、胆管癌和乳腺癌细胞中具有抗凋亡的作用,在胆管癌细胞中, miR-21 的表达可以增加细胞对抗癌药物托伯地康和脱氧胞嘧啶核苷的敏感性^[1]。另有研究发现^[5], miR-21 间接调控乳腺癌细胞 MCF-7 中 Bcl-2 基因的表达,从而抑制肿瘤细胞凋亡和对化疗药物的敏感性。我们研究发现, miR-21 在肺癌耐药细胞 A549/CDDP 中的表达远远高于非耐药细胞 A549,而在 A549 细胞中过表达 miR-21 可以促进细胞对顺铂产生耐药性,相反地,抑制 miR-21 表达可以增加耐药细胞 A549/CDDP 对顺铂的敏感性。

肿瘤的化疗耐药是一系列复杂的、多步骤的、多因素相互作用的结果,肿瘤细胞的信号传递机制与肿瘤细胞发生化疗耐药的各个阶段都密切相关。在这些复杂的信号通路中, PI3K/AKT 和 NF- κ B 信号通路与肿瘤化疗耐药的关系密切^[6-10], 本研究发现, A549/CDDP 细胞与 A549 细胞相比,其 PI3K/AKT 通路被激活,而 NF- κ B 通路没有明显变化。近年来,越来越多的研究发现 PI3K/AKT 信号传导通路的异常激活在许多恶性肿瘤发生发展以及获得耐药性的过程中扮演了重要角色^[11-12]。Chou 等^[13]发现 PI3K-AKT 可通过激活 cAMP 应答元件结合蛋白,促进其结合在 Mcl-1 蛋白的启动子上游序列,正向调控其表达,从而发挥抗凋亡作用。Nath 等^[14]研究发现,黏蛋白 1 (MUC1) 蛋白可激活胰腺癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路,从而上调多药耐药蛋白 MRP1 的表达,并且在敲除 AKT 后, MUC1 的表达下调了,说明 MUC1 受到 PI3K/AKT 信号通路的正反馈调控。我们研究发现 AKT 信号通路在耐药细胞中被激活,过表达 miR-21 可以激活 A549 细胞中的 AKT 信号通路,而抑制 miR-21 的表达则可以抑制 AKT 信号通路活性,因此推测 PI3K/AKT 信号通路在细胞耐药中发挥重要作用。我们使用 PI3K/AKT 通路抑制剂抑制

AKT 信号通路活性并检测 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性,结果发现 PI3K/AKT 通路抑制剂可以明显提高 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性,这些结果表明 miR-21/PI3K/AKT 信号通路的活化在 A549/CDDP 细胞获得耐药性方面发挥至关重要的作用。

综上所述,我们发现 miR-21 在人肺癌耐顺铂细胞株 A549/CDDP 中表达明显高于正常细胞,并对其机制进行了探讨,发现 AKT 信号通路的活化在其中发挥了重要作用,抑制 PI3K/AKT 信号通路减弱了 A549/CDDP 细胞耐药性,表明 miR-21/PI3K/AKT 信号通路可能为肺癌的临床化疗提供可行的作用靶点和潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] SI ML, ZHU S, WU H, et al. miR-21-mediated tumor growth[J]. *Oncogene*, 2007, 26(19): 2799-2803.
- [2] 高馨, 谢鸿寿, 张明军, 等. 顺铂缓释剂瘤体内植入联合紫杉醇一线治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. *安徽医药*, 2015, 19(7): 1397-1398.
- [3] VENTURA A, JACKS T. MicroRNAs and cancer; short RNAs go a long way[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 586-591.
- [4] 毕晓军, 李健, 范连慧, 等. 表柔比星对膀胱癌细胞中 miR-21 表达的影响[J]. *安徽医药*, 2016, 20(7): 1268-1270.
- [5] WICKRAMASINGHE NS, MANAVALAN TT, DOUGHERTY SM, et al. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(8): 2584-2595.
- [6] WELDON CB, BUROW ME, ROLFE KW, et al. NF- κ B-mediated chemoresistance in breast cancer cells[J]. *Surgery*, 2001, 130(2): 143-150.
- [7] WANG W, CASSIDY J. Constitutive nuclear factor-kappa B mRNA, protein overexpression and enhanced DNA-binding activity in thymidylate synthase inhibitor-resistant tumour cells[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(4): 624-629.
- [8] 左静, 刘巍. 细胞核因子- κ B 在肿瘤化疗耐药方面的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(20): 1195-1197.
- [9] WU K, CHANG Q, LU Y, et al. Gefitinib resistance resulted from STAT3-mediated Akt activation in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(12): 2430-2438.
- [10] KOTI M, GOODING RJ, NUIN P, et al. Identification of the IGF1/PI3K/NF κ B/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 549.
- [11] 孙晓杰, 黄常志. PI3K-AKT 信号通路与肿瘤[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(3): 306-311.
- [12] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676.
- [13] CHOU CH, LAI SL, CHEN CN, et al. IL-6 regulates Mcl-1L expression through the JAK/PI3K/Akt/CREB signaling pathway in hepatocytes: implication of an anti-apoptotic role during liver regeneration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66268.
- [14] NATH S, DANESHVAR K, ROY LD, et al. MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes[J]. *Oncogenesis*, 2013, 2(6): e51.

(收稿日期: 2016-08-19, 修回日期: 2016-11-25)