CA Cancer J Clin,2019,69(1):7-34.
[2] DASGUPTA P,TURRELL G,AITKEN JF,et al.Partner status and survival after cancer:A competing risks analysis[J].Cancer Epidemiol,2016,41:16-23.
[3] HSU YH,KUNG PT,WANG ST,et al.Improved patient survivals with colorectal cancer under multidisciplinary team care:A nationwide cohort study of 25,766 patients in Taiwan [J].Health Policy,2016,120(6):674-681.
[4] LACCOURREYE O,BONFILS P,MALINVAUD D,et al.Survival and laryngeal preservation tradeoff in advanced laryngeal cancer:From the otorhinolaryngology patient to the managing physician [J].Head Neck,2017,39(10):1984-1989.
[5] STEUER CE,EL-DEIRY M,PARKS JR,et al.An update on larynx cancer [J].CA Cancer J Clin,2017,67(1):31-50.
[6] LIN K,YIN A,YAO L,et al.N-myc downstream-regulated gene 2 in the nervous system:from expression pattern to function [J].Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai),2015,47(10):761-766.
[7] CHEN XL,LEI L,HONG LL,et al.Potential role of NDRG2 in reprogramming cancer metabolism and epithelial-to-mesenchymal transition [J].Histol Histopathol,2018,33(7):655-663.
[8] HU W,YANG Y,FAN C,et al.Clinical and pathological significance of N-Myc downstream-regulated gene 2(NDRG2)in diverse human cancers [J].Apoptosis,2016,21(6):675-682.
[9] LI M,LAI X,ZHAO Y,et al.Loss of NDRG2 in liver microenvironment inhibits cancer liver metastasis by regulating tumor associate macrophages polarization [J].Cell Death Dis,2018,9(2):248.
[10] GOLESTAN A,GHADERI A,MOJTAHEDI Z.Effects of NDRG2 Overexpression on Metastatic Behaviors of HCT116 Colorectal Cancer Cell Line [J].Adv Pharm Bull,2017,7(4):661-664.
[11] 兰利利.喉癌组织中NDRG1、NDRG2基因启动子区CpG岛甲基化状态及其蛋白表达[D].石家庄:河北医科大学,2012.
[12] NARDI CE,DEDIVITIS RA,Camillo de Almeida R,et al.The role of E-cadherin and beta-catenin in laryngeal cancer [J].Oncotarget,2018,9(53):30199-30209.
[13] KIM YJ,KANG HB,YIM HS,et al.NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients [J].Oncol Rep,2013,30(4):1890-1898.
[14] LIANG ZL,KANG K,YOON S,et al.NDRG2 is involved in the oncogenic properties of renal cell carcinoma and its loss is a novel independent poor prognostic factor after nephrectomy [J].Ann Surg Oncol,2012,19(8):2763-2772.
[15] LIU RR,LI MD,LI T,et al.Matrix metalloproteinase 2(MMP2) protein expression and laryngeal cancer prognosis:a meta analysis [J].Int J Clin Exp Med,2015,8(2):2261-2266.
[16] 陈应超,王玮,李兆龙,等.MTDH和MMP-9在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(1):60-63.
[17] FARAJI SN,MOJTAHEDI Z,GHALAMFARSA G,et al.N-myc downstream regulated gene 2 overexpression reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and cell invasion of A549 lung cancer cell line in vitro [J].Iran J Basic Med Sci,2015,18(8):773-779.

(收稿日期:2019-05-21,修回日期:2019-06-18)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.006 ◇药学研究◇

微小RNA-25-3p靶向下调甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5基因对乳腺癌细胞顺铂耐药性的影响

缪玖麟,王建荣,徐志敏,邱卫明,陈保华,李新建
作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九〇八医院鹰潭医疗区普通外科,江西 鹰潭 335000
通信作者:李新建,男,副主任医师,研究方向为普外、甲乳方面,E-mail:964344862@qq.com

摘要:目的 探讨微小RNA-25-3p(miR-25-3p)靶向甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5(GDPD5)对乳腺癌细胞顺铂耐药性的影响及分子机制。**方法** 本研究起止时间为2018年10月至2019年6月,人乳腺癌细胞MCF-7和乳腺癌顺铂耐药细胞MCF-7/DDP购于中国科学院上海细胞研究所,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测正常乳腺癌细胞MCF-7和乳腺癌顺铂耐药细胞MCF-7/DDP中miR-25-3p、GDPD5和谷胱甘肽巯基转移酶π(GST-π)的表达水平。四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测过表达miR-25-3p或过表达miR-25-3p联合顺铂对MCF-7/DDP细胞的增殖抑制作用,蛋白质印迹法检测GDPD5、GST-π和细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)蛋白的表达水平。双荧光素酶报告基因实验和蛋白质印迹法验证miR-25-3p和GDPD5的靶向关系。**结果** 与MCF-7细胞相比,MCF-7/DDP细胞中miR-25-3p的表达显著下调,GDPD5和GST-π的表达显著上调。过表达miR-25-3p后,MCF-7/DDP细胞存活率显著降低[(50.36±5.04)%比(100.00±10.11)%],CyclinD1相对表达水平降低(0.40±0.05)比(1.12±0.11),GST-π表达水平降低(0.35±0.04)比(1.15±0.12);且过表达miR-25-3p可降低MCF-7/DDP细胞的顺铂耐药性。miR-25-3p可靶向负性调控GDPD5的表达。过表达GDPD5可部分逆转miR-25-3p对MCF-7/DDP细胞增殖和顺铂耐药性的影响。**结论** miR-25-3p通过靶向下调GDPD5抑制MCF-7/DDP细胞存活,进而降低MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性。

关键词:乳腺肿瘤; 抗药性,肿瘤; miR-25-3p; 甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5; 顺铂; 谷胱甘肽转移酶

Effect of miR-25-3p targeted down-regulation of glycerophosphodiester phosphodiesterase domain 5 gene on cisplatin resistance of breast cancer cells

MIAO Jiulin, WANG Jianrong, XU Zhimin, QIU Weiming, CHEN Baohua, LI Xinjian

Author Affiliation: General Surgery Department, Yingtan Medical District, No. 908 Hospital of Chinese People's Liberation Army Joint Support Force, Yingtan, Jiangxi 335000, *China*

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA-25-3p (miR-25-3p) targeting glycerophosphodiester phosphodiesterase domain 5 (GDPD5) on cisplatin resistance in breast cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** The study was conducted from October 2018 to June 2019. Human breast cancer cells MCF-7 and cisplatin-resistant breast cancer cells MCF-7/DDP were purchased from Shanghai Institute of Cell Research, Chinese Academy of Sciences. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the expression level of miR-25-3p, GDPD5 and glutathione transferase (GST-π) in breast cancer cells MCF-7 and cisplatin-resistant breast cancer MCF-7/DDP cells. Methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT) assay was used to detect the inhibitory effect of over-expressing miR-25-3p or over-expressing miR-25-3p combined with cisplatin on the proliferation of MCF-7 /DDP cells, and Western blot was used to detect the expression of GDPD5, GST-π and CyclinD1 proteins. The dual luciferase reporter gene assay and Western blot were used to verify the targeting relationship between miR-25-3p and GDPD5. **Results** Compared with MCF-7 cells, the expression of miR-25-3p in MCF-7/DDP cells was significantly down-regulated, while the expression of GDPD5 and GST-π was significantly up-regulated. After overexpression of miR-25-3p, the survival rate of MCF-7/DDP cells was significantly reduced [(50.36±5.04)% *vs.* (100.00±10.11)%], and the relative expression of CyclinD1 was decreased (0.40±0.05)*vs.*(1.12±0.11); the expression of GST-π wasdecreased (0.35±0.04) *vs.*(1.15±0.12); and overexpression of miR-25-3p could reduce the cisplatin resistance of MCF-7/DDP cells. miR-25-3p negatively regulated the expression of GDPD5. Over-expression of GDPD5 partially reversed the effect of miR-25-3p on the proliferation and cisplatin resistance of MCF-7/DDP cells. **Conclusion** miR-25-3p inhibits the survival of MCF-7/DDP cells by down-regulating GDPD5, thereby reducing the resistance of MCF-7/DDP cells to cisplatin.

Key words: Breast neoplasms; Drug resistance, neoplasm; microRNA-25-3p; Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain 5; Cisplatin; Glutathione transferase

乳腺癌是一种常见的癌症,是世界范围内女性癌症相关死亡的主要原因[1]。顺铂作为一种高效广谱的抗癌药物,其通过与DNA交联,阻断DNA复制和转录,诱导肿瘤细胞凋亡,在乳腺癌的临床化疗中发挥着重要作用[2]。然而,随着顺铂在临床化疗中的长期重复使用,将不可避免地引起乳腺癌细胞对顺铂产生耐药性[3]。近年来的研究表明,微小RNA(miRNA)的异常表达与肿瘤细胞的顺铂耐药有关。如上调微小RNA-192(miR-192)[4]、微小RNA-34a(miR-34a)[5]或下调微小RNA-19a(miR-19a)[6]可提高肿瘤细胞的顺铂敏感性,逆转肿瘤细胞对顺铂的耐药性。微小RNA-25-3p(miR-25-3p)是微小RNA-106b(miR-106b)家族中的一员,研究发现,miR-25-3p通过靶向信号素4C(Sema4C)可增加宫颈癌细胞对顺铂的敏感性[7]。甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5(GDPD5)位于11q13.5位置,研究发现,GDPD5除具有渗透调节甘油磷酸胆碱的生理作用外,其还是乳腺癌肿瘤发生的阳性调控因子[8-9]。此外,有研究报道,沉默GDPD5可增加结直肠癌细胞的顺铂敏感性[10]。因此,2018年10月至2019年6月,本研究通过检测乳腺癌顺铂耐药(MCF-7/DDP)细胞中miR-25-3p和GDPD5的变化,探讨miR-25-3p及GDPD5调控乳腺癌细胞顺铂耐药的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DMEM培养基和胎牛血清,Hyclone公司;Lipofectamine™ 2000相关转染试剂和TRIzol试剂,Invitrogen公司;顺铂(DDP),齐鲁制药有限公司;四甲基偶氮唑盐比色(MTT)和二甲基亚砜(DMSO试剂),Sigma公司;蛋白质印迹法相关试剂,上海碧云天公司;引物、miR-25-3p过表达载体(miR-25-3p mimics)、miR-25-3p过表达空载体(miR-con)、GDPD5过表达载体(pcDNA-GDPD5)、GDPD5过表达载体(pcDNA-con)、miR-25-3p抑制表达空载体(anti-miR-con)、miR-25-3p抑制表达载体(anti-miR-25-3p)、GDPD5野生型荧光素酶报告载体(WT-GDPD5)和GDPD5突变型荧光素酶报告载体(MUT-GDPD5)的构建和测序,北京华大基因有限公司;β-actin抗体,Santa Cruz公司;甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5(GDPD5)、谷胱甘肽巯基转移酶π(GST-π)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)抗体和HRP标记的Ⅱ抗,Abcam公司。

1.2 细胞培养和转染 人乳腺癌细胞MCF-7和乳腺癌顺铂耐药细胞MCF-7/DDP购于中国科学院上海细胞研究所,分别培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,培养条件为37 ℃、湿度饱和、二氧化碳体积分数为5%的细胞培养箱。miR-25-3p过表达载体的转染:取对数生长期的MCF-7/DDP细胞按照每孔2×10^5细胞接种于6孔板,当细胞生长至50%~60%时,利用Lipofectamine™ 2000进行转染。设为NC组(正常培养的MCF-7/DDP细胞)、miR-con组(转染miR-con)和miR-25-3p组(转染miR-25-3p mimics)。转染48 h后,检测转染效率并进行后续实验分析。同时设置DDP干预组,用不同终浓度DDP(60、120、240、480、960 μmol/mL)处理各组细胞24 h后,检测各组细胞的生长抑制率。

为进一步验证miR-25-3p通过调控GDPD5表达影响MCF-7/DDP细胞的增殖和对顺铂的耐药性,将miR-25-3p mimics和pcDNA-GDPD5同时转入MCF-7/DDP细胞,检测MCF-7/DDP细胞的增殖情况。实验分为miR-25-3p+pcDNA-con组(miR-25-3p mimics和pcDNA-con共转染)和miR-25-3p+pcDNA-GDPD5组(miR-25-3p mimics和pcDNA-GDPD5共转染)。同时设置DDP干预组,方法同上。

1.3 qRT-PCR检测 利用TRIzol试剂分别提取MCF-7、MCF-7/DDP和各转染组细胞的总RNA,检测其浓度后,取适量RNA将其逆转录为cDNA,采用SYBR Green real-time PCR方法检测miR-25-3p(以U6为参照)、GDPD5 mRNA和GST-π mRNA(以β-actin为参照)的表达,按照$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算其相对表达量。

1.4 双荧光素酶报告基因检测 TargetScan软件预测显示,miR-25-3p与GDPD5存在部分特异性结合位点,GDPD5可能是miR-25-3p的潜在靶基因,并利用双荧光素酶报告基因实验进行验证。构建野生型WT-GDPD5和突变型MUT-GDPD5的GDPD5-3'UTR荧光素酶报告基因载体,利用Lipofectamine™ 2000将miR-25-3p mimics和miR-con分别与WT-GDPD5或MUT-GDPD5转染到MCF-7/DDP细胞,细胞培养箱常规培养48 h后,检测各组MCF-7/DDP细胞的荧光素酶活性。

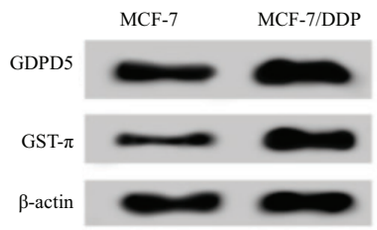
1.5 MTT法检测细胞活力 取生长良好的MCF-7/DDP细胞和各转染组MCF-7/DDP细胞,按照每孔2×10^3细胞接种于96孔板中,培养24 h后,更换细胞培养液为含DDP的培养液(DDP终浓度分别为60、120、240、480、960 μmol/mL),另分别设置不加DDP组。继续培养24 h后,每孔加入MTT溶液15 μL,培养箱孵育4 h后,弃去各孔内的细胞培养液,再向每孔加入150 μL的DMSO,继续孵育2 h后,490 nm处用酶标仪测定各孔的吸光度值,并计算细胞存活率或细胞抑制率。

1.6 蛋白质印迹法(Western Blot)检测 消化收集各组细胞,用适量的RIPA裂解液于冰上裂解30 min,12 000 r/min离心30 min收集细胞蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,并将各组蛋白稀释至相等浓度。经过SDS-PAGE电泳,常规湿法转膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,稀释的抗GDPD5、CyclinD1和GST-π蛋白的Ⅰ抗室温孵育2 h,洗膜后稀释的Ⅱ抗孵育2 h,用ECL试剂盒于暗处显影,并利用Bio-Rad凝胶成像系统获取图像,分析目的条带的灰度值。

1.7 统计学方法 采用SPSS 22.0软件进行数据处理和分析,所有数据均用$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用t检验,多组间比较进行单因素方差分析,总体有差异进一步采用LSD-t检验进行两两比较,以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-25-3p、GDPD5和GST-π在正常乳腺细胞、乳腺癌细胞和乳腺癌顺铂耐药细胞中的表达 图1和表1显示,与MCF-7细胞相比,MCF-7/DDP细胞miR-25-3p的表达显著下调,GDPD5 mRNA、GDPD5蛋白、GST-π mRNA和GST-π蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)。提示,miR-25-3p、GDPD5和GST-π的异常表达可能与乳腺癌细胞的顺铂耐药有关。



注:MCF-7为乳腺癌细胞;MCF-7/DDP为耐药性细胞;GDPD5为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白;GST-π为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π。

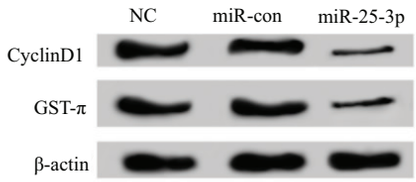
图1 蛋白质印迹法检测GDPD5、GST-π蛋白的表达量

2.2 miR-25-3p过表达对MCF-7/DDP细胞增殖的影响 图2和表2显示,与miR-con组相比,miR-25-3p组MCF-7/DDP细胞miR-25-3p的表达显著升高,表明成功构建了过表达miR-25-3p的MCF-7/DDP细胞株。与miR-con组比较,miR-25-3p组MCF-7/DDP细胞CyclinD1和GST-π蛋白的表达显著降低,细胞存活率显著降低($P<0.05$)。表明,过表达miR-25-3p可抑制MCF-7/DDP细胞增殖。

表1 用qRT-PCR检测GDPD5 mRNA的表达,蛋白质印迹法检测GDPD5、GST-π蛋白的表达量/$\bar{x}\pm s$

细胞	重复次数	miR-25-3p	GDPD5 mRNA	GST-πmRNA	GDPD5 protein	GST-πprotein
MCF-7	9	1.00±0.10	1.02±0.16	1.02±0.10	0.95±0.10	0.41±0.06
MCF-7/DDP	9	0.26±0.03	2.89±0.29	2.12±0.20	1.50±0.16	1.15±0.11
t 值		12.348	12.500	14.758	8.745	17.718
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:MCF-7为乳腺癌细胞,MCF-7/DDP为乳腺癌顺铂耐药性细胞,miR-25-3p为微小RNA-25-3p,GDPD5 mRNA为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5mRNA,GST-π mRNA为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π mRNA,GDPD5 protein为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白,GST-π protein为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π蛋白



注:NC为乳腺癌细胞未做处理组,miR-con为空载体处理组;miR-25-3p为转染miR-25-3p处理组;CyclinD1为G1/S-特异性周期蛋白-D1;GST-π为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π。

图2 蛋白质印迹法检测CyclinD1和GST-π蛋白的表达

表2 miR-25-3p过表达抑制MCF-7/DDP增殖/$\bar{x}\pm s$

组别	重复次数	miR-25-3p	CyclinD1	GST-π	细胞存活率/%
NC	9	1.00±0.10	1.10±0.11	1.12±0.11	100.00±10.16
miR-con	9	1.02±0.15	1.12±0.11	1.15±0.12	100.00±10.11
miR-25-3p	9	2.56±0.25[a]	0.40±0.05[a]	0.35±0.04[a]	50.36±5.04[a]
F 值		227.634	170.023	197.584	96.072
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:NC为乳腺癌耐药细胞未做处理组;miR-con为空载体处理组;miR-25-3p为miR-25-3p过表达转染处理组;CyclinD1为G1/S-特异性周期蛋白-D1;GST-π为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π。与miR-con组比较,[a]t=18.596,15.740,16.877,12.005,P=0.000,0.000,0.000,0.000

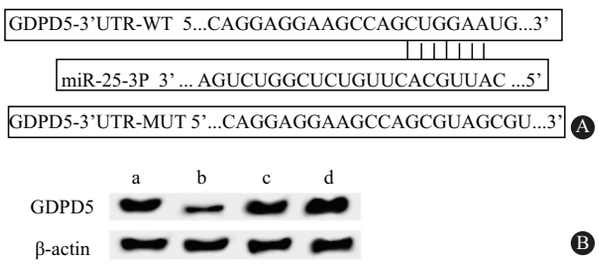
2.3 miR-25-3p过表达对MCF-7/DDP细胞顺铂的耐药性的影响 表3显示,与miR-con组比较,miR-25-3p组MCF-7/DDP细胞的生长抑制率显著增加($P<0.05$),且呈一定的剂量依赖性。这表明过表达miR-25-3p可提高MCF-7/DDP细胞对顺铂敏感性。

表3 miR-25-3p过表达联合不同浓度DDP处理对MCF-7/DDP细胞的生长抑制率/(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	DDP/(μmol/mL)				
	60	120	240	480	960
NC	12.96±1.26	20.01±1.58	40.25±2.04	56.36±3.04	66.79±4.13
miR-con	13.05±1.31	19.46±1.56	40.16±3.46	53.86±3.89	62.37±2.46
miR-25-3p	28.49±2.81[a]	38.49±2.43[a]	75.71±3.49[a]	88.41±6.19[a]	95.26±4.56[a]
F 值	192.693	292.369	400.713	159.870	195.964
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:本试验重复9次;NC为乳腺癌耐药细胞未做处理组,miR-con为空载体处理组,miR-25-3p为miR-25-3p过表达转染处理组;与miR-con组比较,t=17.050,20.628,24.486,14.873,15.787,P=0.000,0.000,0.000,0.000,0.000,[a]$P<0.05$

2.4 miR-25-3p靶向调控GDPD5的表达 TargetScan软件预测显示,见图3A,miR-25-3p和GDPD5之间存在连续结合位点。表4显示,当上调miR-25-3p表达后,转染GDPD5-WT的3'-UTR报告基因的MCF-7/DDP细胞的相对荧光素酶活性显著下降($P<0.05$),而转染GDPD5-MUT的3'-UTR报告基因的MCF-7/DDP细胞的相对荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$)。表5显示,当上调miR-25-3p表达后,MCF-7/DDP细胞GDPD5蛋白的表达量显著降低;当下调miR-25-3p表达后,MCF-7/DDP细胞GDPD5蛋白的表达量显著升高($P<0.05$)。以上结果提示,miR-25-3p可靶向负性调控GDPD5的表达。



注:GDPD5为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白,a为过表达空载体处理组,b过表达转染处理组,c为低表达空载体处理组,d为miR-25-3p低表达转染组

图3 miR-25-3p靶向GDPD5,调控GDPD5表达:A为生物信息软件预测miR-25-3p与GDPD5靶向关系,B为蛋白质印迹法检测GDPD5蛋白表达量

表4 miR-con或miR-25-3p与报告质粒共转染MCF-7/DDP细胞后双荧光素酶活性检测/$\bar{x}\pm s$

组别	重复次数	荧光素酶活性	
		WT	MUT
miR-con	9	1.01±0.11	1.03±0.11
miR-25-3p	9	0.35±0.05	1.00±0.10
t 值		16.387	0.605
P 值		0.000	0.553

注:miR-con为过表达空载体处理组,miR-25-3p为miR-25-3p过表达转染处理组,WT为GDPD5野生型报告质粒转染组,MUT为GDPD5突变型报告质粒转染组

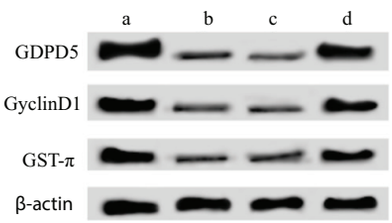
2.5 过表达GDPD5可以部分逆转miR-25-3p对MCF-7/DDP细胞增殖和顺铂耐药性的影响 图4、表6和表7显示,与miR-con组相比,miR-25-3p组MCF-7/DDP细胞GDPD5、CyclinD1和GST-π蛋白的表达量显著降低,细胞存活率显著降低,MCF-7/DDP

表5 蛋白质印迹法检测GDPD5的表达/$\bar{x}\pm s$

组别	重复次数	GDPD5
miR-con	9	1.00±0.10
miR-25-3p	9	0.42±0.05[a]
anti-miR-con	9	0.95±0.09
anti-miR-25-3p	9	1.55±0.15[b]
F 值		178.135
P 值		0.000

注:GDPD5为为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白,miR-con为过表达空载体处理组,miR-25-3p为转染过表达miR-25-3p处理组,anti-miR-con为低表达空载体处理组,anti-miR-25-3p为miR-25-3p低表达转染组。与miR-con组比较,[a]t=11.853,P=0.000,与anti-miR-con组比较,[b]t=12.262,P=0.000

细胞对顺铂的耐药性显著降低;与miR-25-3p+pcDNA-con组相比,miR-25-3p+pcDNA-GDPD5组MCF-7/DDP细胞GDPD5、CyclinD1和GST-π蛋白的表达量显著升高,细胞存活率显著升高,MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性显著升高($P<0.05$)。这表明miR-25-3p通过下调GDPD5的表达提高MCF-7/DDP细胞的顺铂敏感性。



注:GDPD5为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白,CyclinD1为G1/S-特异性周期蛋白-D1,GST-π为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π,a为空载体处理组,b为过表达miR-25-3p转染组,c为miR-25-3p过表达和pcDNA-con空载体共转染组,d为miR-25-3p和GDPD5过表达共转染组

图4 蛋白质印迹法检测GDPD5、CyclinD1和GST-π蛋白的表达

3 讨论

自从1978年顺铂首次被用于治疗睾丸癌以来,至今已有40余年。然而,由于顺铂在恶性肿瘤中的长期且重复使用,导致了严重的耐药性。肿瘤细胞

表6 过表达GDPD5可以部分逆转miR-25-3p对MCF-7/DDP细胞增殖的抑制作用/$\bar{x}\pm s$

组别	GDPD5	CyclinD1	GST-π	细胞存活率/%
miR-con	1.48±0.13	1.10±0.11	1.13±0.12	100.00±10.01
miR-25-3p	0.42±0.05[a]	0.40±0.05[a]	0.38±0.04[a]	48.24±4.82[a]
miR-25-3p+pcDNA-con	0.45±0.05	0.42±0.05	0.40±0.13	50.17±5.02
miR-25-3p+pcDNA-GDPD5	1.25±0.13[b]	0.91±0.09[b]	1.02±0.11[b]	87.16±8.72[b]
F 值	275.814	177.274	126.793	109.677
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:本试验重复9次,GDPD5为甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5蛋白,GST-π为胎盘型谷胱甘肽巯基转移酶π,CyclinD1为G1/S-特异性周期蛋白-D1,miR-con为空载体处理组,miR-25-3p为过表达miR-25-3p转染组,miR-25-3p+pcDNA-con为过表达miR-25-3p和pcDNA-con空载体共转染组,miR-25-3p+pcDNA-GDPD5为miR-25-3p和GDPD5过表达共转染组。与miR-con组比较,[a]t=22.831,18.708,15.000,14.651,均$P<0.001$,与miR-25-3p+pcDNA-con组比较,[b]t=17.231,13.096,12.400,10.470,均$P<0.001$

对顺铂的耐药主要与以下几种机制有关[11]:谷胱甘肽(GSH)及其转移酶(GST-π)的过量表达对化疗药物的解毒作用;肿瘤细胞的凋亡途径异常;肿瘤细胞增加对胞内顺铂的泵出;减少进入肿瘤细胞内的顺铂量。最近的研究表明,调控miRNAs的表达水平在一定程度上可提高顺铂抗性肿瘤细胞对顺铂的敏感性,增强顺铂的治疗效果[12-13]。

miR-25-3p定位于人基因组7号染色体,是miR-106b-25簇成员之一。有研究显示,miR-25-3p在胶质瘤组织和细胞中呈高表达,且miR-25-3p通过靶向FBXW7和DKK3促进胶质瘤细胞的增殖和迁移[14]。然而,miR-25-3p在舌鳞癌组织和细胞中呈低表达,上调miR-25-3p通过抑制cyclinD1、蛋白激酶B(AKT)、叉头转录因子O1(FOXO1)等蛋白表达,促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(p27)蛋白表

表7 各组细胞转染条件联合不同浓度DDP处理对MCF-7/DDP生长抑制率的影响/(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	DDP/(μmol/mL)				
		60	120	240	480	960
miR-con	9	12.46±1.21	18.56±1.53	38.25±2.61	50.35±3.88	63.79±4.96
miR-25-3p	9	26.13±2.06[a]	36.18±3.01[a]	72.13±3.89[a]	85.26±5.26[a]	93.26±6.01[a]
miR-25-3p+pcDNA-con	9	27.16±2.15	37.49±2.79	70.28±4.01	83.18±5.38	92.46±5.58
miR-25-3p+pcDNA-GDPD5	9	17.79±1.49[b]	25.52±1.89[b]	45.14±3.01[b]	57.12±5.46[b]	70.46±4.02[b]
F 值		140.980	128.647	228.429	112.862	76.082
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:miR-con为空载体处理组,miR-25-3p为过表达miR-25-3p转染组,miR-25-3p+pcDNA-con为过表达miR-25-3p和pcDNA-con空载体共转染组,miR-25-3p+pcDNA-GDPD5为miR-25-3p和GDPD5过表达共转染组;与miR-con组比较,[a]t=16.371,15.671,20.948,14.703,12.030,均$P<0.001$;与miR-25-3p+pcDNA-con组比较,[b]t=11.221,10.646,15.544,10.976,8.981,均$P<0.001$

达,进而抑制肿瘤细胞增殖[15]。进一步研究发现,miR-25-3p在顺铂耐药宫颈癌细胞中表达显著下调,上调miR-25-3p通过靶向Sema4C抑制顺铂耐药宫颈癌细胞异种移植瘤的生长,逆转宫颈癌顺铂耐药细胞的EMT表型,增强对顺铂的敏感性[7]。胆碱磷脂代谢异常是肿瘤的一个新特征,与肿瘤的发生、发展密切相关[16]。最近的研究表明,GDPD5在乳腺肿瘤细胞和恶性程度较高的雌激素受体阴性乳腺癌细胞中呈过表达,沉默GDPD5可改变乳腺癌模型体内磷脂代谢产物的分布[17]。同时,Cao等[18]研究发现,沉默GDPD5可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外,Feng等[10]研究表明,miR-195-5p通过靶向下调GDPD5诱导结直肠癌细胞凋亡,增加结直肠癌细胞的化学敏感性。提示miR-25-3p和GDPD5与肿瘤细胞的耐药明显相关。

本研究结果显示,MCF-7/DDP细胞中miR-25-3p的表达较对顺铂敏感的MCF-7细胞显著下调,MCF-7/DDP细胞中GDPD5的表达较对顺铂敏感的MCF-7细胞显著上调。GST-π是药物代谢的功能酶,GST-π可加速抗肿瘤药物的降解,增加肿瘤细胞的耐药性[19]。我们发现MCF-7/DDP细胞中GST-π的表达较MCF-7细胞显著上调。提示miR-25-3p、GDPD5和GST-π可能参与调控MCF-7细胞对顺铂的耐药。随后,我们用脂质体转染法上调miR-25-3p,发现过表达miR-25-3p可抑制CyclinD1和GST-π蛋白表达,抑制MCF-7/DDP细胞增殖,并提高MCF-7/DDP细胞对顺铂敏感性。TargetScan在线预测显示,GDPD5是miR-25-3p的潜在靶基因。同时蛋白质印迹法和双荧光素酶实验显示,miR-25-3p可靶向负性调控GDPD5的表达。为了进一步证实miR-25-3p通过靶向下调GDPD5表达参与对MCF-7/DDP细胞顺铂敏感性的调控,进行回复实验,发现过表达GDPD5可以部分逆转miR-25-3p对MCF-7/DDP细胞增殖、CyclinD1和GST-π蛋白表达的抑制作用,增强MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性。提示,miR-25-3p通过靶向调控下调GDPD5表达抑制细胞存活,进而降低MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性。

综上所述,miR-25-3p通过靶向下调GDPD5表达,降低MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性。上调miR-25-3p有望为顺铂耐药乳腺癌的治疗提供新的思路。

参考文献

[1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A.Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.

[2] JUNG Y, LIPPARD SJ.Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage[J].Chem Rev.2007, 107(5): 1387-1407.

[3] CATALDO A, CHEUNG DG, BALSARI A, et al.miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response[J]. Oncotarget, 2016, 7(1): 786-797.

[4] 黄娜娜.MiR-192通过靶向ERCC3和ERCC4蛋白表达逆转胃癌细胞顺铂耐药性的研究[D].合肥:安徽医科大学,2015.

[5] 刘明明,刘永侠,付子毅.miR-34a逆转非小细胞肺癌A549/DDP细胞对顺铂的耐药性及其机制[J].中国老年学杂志,2016,36(1):52-54.

[6] 崔立春,杜建飞,耿会生,等.靶向抑制miR -19a提高人宫颈癌HeLa细胞对顺铂敏感性的机制研究[J].现代肿瘤医学,2015,23(5):604-607.

[7] SONG J, LI Y.miR-25-3p reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in cisplatin-resistance cervical cancer cells[J].CancerSci, 2017, 108(1): 23-31.

[8] TOPANURAK S, FERRARIS JD, LI J, et al.High NaCl- and urea-induced posttranslational modifications that increase glycerophosphocholine by inhibiting GDPD5 phosphodiesterase[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(18): 7482-7487.

[9] MARCHAN R.GDPD5, a choline-generating enzyme and its novel role in tumor cell migration[J].Arch Toxicol, 2016, 90(12): 3143-3144.

[10] FENG C, ZHANG L, SUN Y, et al.GDPD5, a target of miR-195-5p, is associated with metastasis and chemoresistance in colorectal cancer[J].Biomed Pharmacother, 2018, 101: 945-952.

[11] 吴亚琼,方伟蓉,李运曼.肿瘤多药耐药机制及逆转药物的研究进展[J].药学与临床研究,2016,24(1):43-47.

[12] 王中显,刘琼,高巧玲,等.miR-199a靶向mTOR对卵巢癌细胞顺铂耐药的机制[J].中华医学杂志,2015,95(33):2705-2708.

[13] 张芳,李洋,吴蘅,等.MiR-192靶向负调控Bim表达诱导肺癌顺铂耐药[J].中国肺癌杂志,2014,17(5):384-390.

[14] PENG G, YANG C, LIU Y, et al.miR-25-3ppromotes glioma cell proliferation and migration by targeting FBXW7 and DKK3[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 769-778.

[15] XU JY, YANG LL, MA C, et al.MiR-25-3pattenuates the proliferation of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(9): 743-747.

[16] GLUNDE K, BHUJWALLA ZM, RONEN SM.Choline metabolism in malignant transformation[J].Nat Rev Cancer, 2011, 11(12): 835-848.

[17] WIJNEN JP, JIANG L, GREENWOOD TR, et al.Silencing of the glycerophosphocholine phosphodiesterase GDPD5 alters the phospholipid metabolite profile in a breast cancer model in vivo as monitored by (31) P MRS.[J].NMR Biomed, 2014, 27(6): 692-699.

[18] CAO MD, CHENG M, RIZWAN A, et al.Targeting choline phospholipid metabolism: GDPD5 and GDPD6 silencing decrease breast cancer cell proliferation, migration, and invasion[J].NMR Biomed, 2016, 29(8): 1098-1107.

[19] 邹明月.GST-π同工酶在肿瘤细胞顺铂耐药及迁移过程中作用比较[D].重庆:重庆医科大学,2018.

(收稿日期:2019-08-07,修回日期:2019-09-20)