

引用本文:胡珍,吴庭,孙弦,等.长链非编码RNA 变异性浆细胞瘤异位1通过调控微小RNA-214-3p/人凋亡抑制蛋白X轴影响皮肤黑色素瘤细胞的顺铂耐药性[J].安徽医药,2022,26(6):1226-1231.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.040.



◇临床医学◇

长链非编码RNA 变异性浆细胞瘤异位1通过调控微小RNA-214-3p/人凋亡抑制蛋白X轴影响皮肤黑色素瘤细胞的顺铂耐药性

胡珍,吴庭,孙弦,刘睿

作者单位:武汉市第三医院皮肤科,湖北 武汉 430000

通信作者:吴庭,男,副主任医师,研究方向为皮肤黑色素瘤的发病机制,Email:123492524@qq.com

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)变异性浆细胞瘤异位1(PVT1)调控微小RNA(miR)-214-3p/人凋亡抑制蛋白X(XIAP)对皮肤黑色素瘤(CMM)细胞的顺铂(DDP)耐药性的影响。**方法** 该研究起止时间为2020年3—9月。体外培养人皮肤黑色素瘤SK-MEL-1/DDP细胞,将细胞分为空白对照组(NG组,不做处理)、阴性转染组(NC组,转染PVT1-inhibitor阴性对照)、抑制PVT1表达组(PVT1-inhibitor组,转染PVT1-inhibitor)、共转染组(PVT1-inhibitor-miR-214-3p-inhibitor组,转染PVT1-inhibitor同时转染miR-214-3p-inhibitor)。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测SK-MEL-1/DDP细胞PVT1、miR-214-3p水平;MTT法检测四组SK-MEL-1/DDP细胞增殖能力及对DDP的耐药性;流式细胞仪检测四组SK-MEL-1/DDP细胞凋亡率;蛋白质印迹法(Western blotting)检测四组SK-MEL-1/DDP细胞XIAP、细胞增殖相关核抗原Ki-67、凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平。应用TargetScan数据库预测PVT1与miR-214-3p的靶向关系,双荧光素酶报告基因实验验证。**结果** 与NG组、NC组比较,PVT1-inhibitor组SK-MEL-1/DDP细胞增殖抑制率[(22.87±3.43)%比(0.00±0.00)%、(0.08±0.01)%]、凋亡率[(40.05±6.06)%比(15.69±2.35)%、(17.01±2.55)%]、miR-214-3p及Bax表达均显著升高($P<0.05$),PVT1、药物半数抑制浓度(IC_{50})值[(15.13±0.45) μ g/L比(45.03±1.35) μ g/L、(47.81±1.33) μ g/L]、Ki-67、Bcl-2蛋白、XIAP mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与PVT1-inhibitor组比较,PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor组SK-MEL-1/DDP细胞增殖抑制率[(15.12±2.27)%比(22.87±3.43)%]、凋亡率[(27.88±4.19)%比(40.05±6.06)%]、miR-214-3p及Bax表达均显著降低($P<0.05$), IC_{50} 值[(23.98±0.72) μ g/L比(15.13±0.45) μ g/L]、Ki-67、Bcl-2蛋白、XIAP mRNA及蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。TargetScan数据库预测显示miR-214-3p是PVT1的潜在靶基因,双荧光素酶报告基因实验证实二者存在靶向关系。**结论** 下调lncRNA PVT1可靶向上调miR-214-3p表达,抑制XIAP表达,减弱CMM SK-MEL-1/DDP细胞对DDP耐药性。**关键词:** 黑色素瘤; 抗药性,肿瘤; 长链非编码RNA 变异性浆细胞瘤异位1; 微小RNA-214-3p; 人凋亡抑制蛋白X; 顺铂耐药性

LncRNA PVT1 affects cisplatin resistance of cutaneous malignant melanoma cells by regulating miR-214-3p/XIAP axis

HU Zhen, WU Ting, SUN Xian, LIU Rui

Author Affiliation: Dermatological Department, The Third Hospital of Wuhan City, Wuhan, Hubei 430000 China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (lncRNA PVT1) regulating microRNA-214-3p (miR-214-3p)/human X inhibitor of apoptosis protein (XIAP) on cisplatin (DDP) resistance of cutaneous malignant melanoma (CMM) cells. **Methods** The study period was from March 2020 to September 2020. SK-MEL-1/DDP cells were cultured *in vitro* and divided into blank control group (NG group, no treatment), negative transfection group (NC group, transfection with PVT1 inhibitor negative control), PVT1-inhibitor group (PVT1 inhibitor group, transfection with PVT1 inhibitor) and co-transfection group (PVT1-inhibitor-miR-214-3p-inhibitor group, transfection with PVT1 inhibitor and miR-214-3p-inhibitor). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the levels of PVT1 and miR-214-3p in SK-MEL-1/DDP cells; MTT assay was used to detect the proliferation and drug resistance of SK-MEL-1/DDP cells; flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of SK-MEL-1/DDP cells; Western blot was used to detect the expression levels of XIAP, cell proliferation associated nuclear antigen (Ki-67), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in SK-MEL-1/DDP cells. The TargetScan database and double luciferase reporter gene experiment were used to predict and verify the targeting relationship between PVT1 and miR-214-3p. **Results** Com-

pared with those in the NG group and NC group, the proliferation inhibition rate $[(22.87 \pm 3.43)\% \text{ vs. } (0.00 \pm 0.00)\%, (0.08 \pm 0.01)\%]$, apoptosis rate $[(40.05 \pm 6.06)\% \text{ vs. } (15.69 \pm 2.35)\%, (17.01 \pm 2.55)\%]$, miR-214-3p and Bax protein expression of SK-MEL-1/DDP cells in PVT1 inhibitor group were significantly increased ($P < 0.05$), while PVT1, half inhibitory concentration (IC_{50}) $[(15.13 \pm 0.45) \mu\text{g/L vs. } (45.03 \pm 1.35) \mu\text{g/L}, (47.81 \pm 1.33) \mu\text{g/L}]$, Ki-67, Bcl-2 protein, XIAP mRNA and protein expression were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the PVT1 inhibitor group, the proliferation inhibition rate $[(15.12 \pm 2.27)\% \text{ vs. } (22.87 \pm 3.43)\%]$, apoptosis rate $[(27.88 \pm 4.19)\% \text{ vs. } (40.05 \pm 6.06)\%]$, miR-214-3p and Bax protein expression of SK-MEL-1/DDP cells in the PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor group were significantly decreased ($P < 0.05$), IC_{50} $[(23.98 \pm 0.72) \mu\text{g/L vs. } (15.13 \pm 0.45) \mu\text{g/L}]$, while Ki-67, Bcl-2 protein, XIAP mRNA and protein expression were significantly increased ($P < 0.05$). The prediction of TargetScan database showed that miR-214-3p was a potential target gene of PVT1, and the dual luciferase reporter gene experiment confirmed that there was a targeting relationship between miR-214-3p and PVT1. **Conclusion** Down-regulation of lncRNA PVT1 can up-regulate the expression of miR-214-3p, inhibit XIAP expression, and reduce the resistance of CMM SK-MEL-1/DDP cells to DDP.

Key words: Melanoma; Drug resistance, neoplasm; Long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1; MiR-214-3p; Human X inhibitor of apoptosis protein; Cisplatin resistance

皮肤黑色素瘤(cutaneous malignant melanoma, CMM)是来源于黑色素细胞的皮肤恶性肿瘤,发病隐匿且易转移,近年来其发病率呈逐年上升趋势,给人类健康带来严重威胁^[1]。目前,CMM的主要治疗手段是手术、放化疗等。顺铂(DDP)是一线化疗药物,抗肿瘤作用已被广泛认可,但由于黑色素细胞易形成耐药性,极大地影响了CMM的治疗效果及DDP的应用^[2-3]。因此,深入探讨CMM化疗耐药相关基因及其分子调控相关机制,对寻找新型CMM化疗耐药分子靶点有较大意义。长链非编码RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)是一种反义RNA分子,不具有蛋白编码能力,能与靶基因非编码区特异性结合,调节基因转录和表达而发挥促癌或抑癌作用^[4]。变异性浆细胞瘤异位1(plasmacytoma variant translocation 1, PVT1)是lncRNAs家族一员,既往研究显示,其在CMM病人癌组织中异常高表达,且体外研究表明抑制其表达后能显著抑制CMM细胞活性,促进细胞凋亡^[5]。抑制PVT1可显著抑制结直肠癌耐药细胞株LoVo/DDP的增殖,增加其化疗敏感性^[6]。微小RNA(microRNA, miRNA/miR)是一类非编码RNA,调节基因转录、表达,参与多种生理活动^[7]。miR-214-3p作为常见的miRNA,被证实参与调控癌细胞活性^[8],PVT1在乳腺癌组织中特异性高表达,降低miR-214的表达可增加乳腺癌细胞化疗耐药性。研究显示,过表达miR-214-3p可显著抑制肺癌细胞存活能力及多药耐药性^[9]。目前,有关PVT1、miR-214-3p对CMM细胞DDP耐药性的影响及相关机制研究鲜有报道,因此本研究于2020年3—9月探讨PVT1与miR-214-3p对CMM耐药细胞生物学行为的影响,以期临床寻找新型CMM化疗耐药分子靶点提高化疗效果提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料 人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-1 细胞株

(BNCC100491)购自北纳创联(北京)生物技术研究院。RPMI 培养基(3-2001)、蛋白提取试剂盒(BC3711-50T)、转染试剂盒(Lipofectamine™3000, EF010-E)购自美国艾美捷;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2-四甲基偶氮噻唑蓝(MTT)(CS2905)、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(WK304)、核酸分离试剂(Trizol Reagent, YT526)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(KFS303-HUV)购自北京百奥莱博;兔抗人凋亡抑制蛋白X(XIAP)(201477-T36)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)(ATA25287)、细胞增殖相关核抗原Ki-67(100130-MM21)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)(FT-B3598S)、β肌动蛋白(β-actin)(ABP57456)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)(羊抗兔,SE12-0.1)二抗均购自武汉益普生物;注射用顺铂(冻干型)(货号C14330-100mg,规格10 mg)购自山东齐鲁制药。PVT1-inhibitor及miR-214-3p-inhibitor购自上海吉玛。BBD6220培养箱购自美国ThermoFisher Scientific;ELx800酶标仪、C1000定量PCR仪购自美国Bio-rad;CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞株解冻后复苏,加入含10%胎牛血清的RPMI培养基中,培养箱中培养(5%二氧化碳,37℃,饱和湿度),每2~3天换液,传代培养,利用DDP浓度梯度法建立DDP耐药细胞株SK-MEL-1/DDP细胞,以5.33 mg/L DDP溶液维持细胞耐药性,在正式实验前1周更换不含DDP的培养液培养。

1.2.2 细胞分组及处理 取对数生长期细胞株重悬,接种于24孔板(2.5×10^5 个/孔),分为四组。(1)空白对照组(NG组):只含SK-MEL-1/DDP细胞,用含10%灭活胎牛血清+90%RPMI培养液培养48 h;(2)阴性转染组(NC组):加入5 μL Lipofectamine™3000和

50 $\mu\text{mol/L}$ PVT1-inhibitor-NC, 用含 10% 灭活胎牛血清+90%RPMI 培养液培养 48 h; (3) 抑制 PVT1 表达组 (PVT1-inhibitor 组): 加入 5 μL LipofectamineTM3000 和 50 $\mu\text{mol/L}$ PVT1-inhibitor 序列, 用含 10% 灭活胎牛血清+90%RPMI 培养液培养 48 h; (4) 共转染组 (PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组): 加入 5 μL LipofectamineTM3000 和 50 $\mu\text{mol/L}$ PVT1-inhibitor 及 miR-214-3p-inhibitor 序列共转染后, 用含 10% 灭活胎牛血清+90%RPMI 培养液培养 48 h。严格按照转染试剂盒说明书操作, 收集各组细胞用于后续实验。PVT1-inhibitor 序列: 5'-ACTTTAAGTGGAG-GCTGAATCATCT-3', miR-214-3p-inhibitor 序列: 5'-ACUGCCUGUCUGUGCCUGCUGU-3'。

1.2.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 lncRNA PVT1、miR-214-3p、XIAP mRNA 水平 TRIzol 法提取培养 48 h 的细胞株总 RNA, 测定浓度。按照试剂盒说明书方法逆转录合成互补 DNA (cDNA)。引物由苏州泓迅生物设计合成。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 PVT1、miR-214-3p、XIAP mRNA 水平相对表达量。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖能力及耐药性 取转染 48 h 后的细胞株接种于 24 孔板 (2.5×10^4 个/孔), 每组 6 个复孔。细胞增殖能力检测: 各组细胞均继续培养 48 h 后向各孔加入 MTT 20 μL , 加入 150 μL 二甲基亚砷振荡。在酶标仪 490 nm 处测定各孔细胞光密度。计算细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组光密度值} / \text{对照组光密度值}) \times 100\%$ 。耐药性检测: 各组细胞分别加入 0、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/L}$ DDP 溶液^[10], 100 毫升/孔, 继续培养 48 h, 其余操作同细胞增殖能力测定方法。计算细胞增殖抑制率且用线性回归法计算药物半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 取转染 48 h 后的细胞株接种于 24 孔板 (2.5×10^5 个/孔), 按照试剂盒说明书处理细胞, 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗后离心弃上清, PBS 混匀沉淀, 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h。PBS 清洗, 加 5 μL PI+5 μL AnnexinV-FITC 混匀, 染色 30 min、稀释后上机检测。

1.2.6 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测蛋白表

达 裂解细胞并提取总蛋白, 电泳分离蛋白后转膜, 以脱脂牛奶 (5%) 封闭, 加入一抗 Ki-67、Bcl-2、Bax、XIAP (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 清洗, 加入二抗 (1:1 000) 孵育 1 h。显色、成像。分析蛋白含量。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 PVT1 对 miR-214-3p 的转录调控 TargetScan 预测 PVT1 与 miR-214-3p 存在结合位点, 扩增序列后构建含 miR-214-3p 结合位点的 PVT1 基因克隆载体, 构建 PVT1 野生型质粒 (PVT1-WT) 和突变型质粒 (PVT1-MT)。将 PVT1-WT、PVT1-MT 分别与 miR-214-3p-inhibitor-NC、miR-214-3p-inhibitor 共转染于 SK-MEL-1/DDP 细胞, 分别为 miR-214-3p-inhibitor-NC-PVT1-WT 组、miR-214-3p-inhibitor-PVT1-WT 组、miR-214-3p-inhibitor-NC-PVT1-MT 组、miR-214-3p-inhibitor-PVT1-MT 组, 具体转染步骤按“1.2.2”中进行; 培养 48 h 后按照试剂盒方法, 检测荧光素酶相对活性。

1.3 统计学方法 软件 SPSS 19.0 分析数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 SK-MEL-1/DDP 细胞 PVT1、miR-214-3p、XIAP mRNA 水平比较 与 NG 组、NC 组比较, PVT1-inhibitor 组 SK-MEL-1/DDP 细胞 PVT1、XIAP mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$), miR-214-3p 显著升高 ($P < 0.05$); 与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组 SK-MEL-1/DDP 细胞 PVT1 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), miR-214-3p 水平显著降低 ($P < 0.05$), XIAP mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组 SK-MEL-1/DDP 细胞增殖情况比较 NG 组 [(0.00 $\pm$ 0.00)%]、NC 组 [(0.08 $\pm$ 0.01)%]、PVT1-inhibitor 组 [(22.87 $\pm$ 3.43)%] 及 PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组 [(15.12 $\pm$ 2.27)%] SK-MEL-1/DDP 细胞增殖抑制率比较, $F = 184.10$, $P < 0.001$; 与 NG 组、NC 组比较, PVT1-inhibitor 组显著升高 ($P < 0.05$); 与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 引物序列

基因	正向引物 5'—3'	反向引物 5'—3'
PVT1	AAGGTGAAGTCTCGGAGTCAAC	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
XIAP	GGGAAUAGUAGCUGUCAAAATT	UUUGACAGCUACUAUUCCTT
β -actin	GCAGAAGTGCAGAGAGGAGG	GCTTGATGGAGTTGTCGGTGTA
miR-214-3p	TGGAGTTGGGGTTTCTGTA	TTCAGTGCACAGGTTCAAGC
U6	GTCAACGGATTGTGCTCTGATT	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

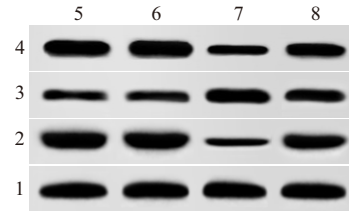
注: PVT1 为变性性浆细胞瘤异位 1, XIAP 为人凋亡抑制蛋白 X, β -actin 为 β 肌动蛋白。

2.3 各组 SK-MEL-1/DDP 细胞对 DDP 耐药性比较 NG 组 $[(45.03 \pm 1.35) \mu\text{g/L}]$ 、NC 组 $[(47.81 \pm 1.33) \mu\text{g/L}]$ 、PVT1-inhibitor 组 $[(15.13 \pm 0.45) \mu\text{g/L}]$ 及 PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组 $[(23.98 \pm 0.72) \mu\text{g/L}]$ SK-MEL-1/DDP 细胞 IC_{50} 比较,差异有统计学意义($F=1\ 418.74, P<0.001$);与 NG 组、NC 组比较, PVT1-inhibitor 组显著降低($P<0.05$);与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组显著升高($P<0.05$)。

2.4 各组 SK-MEL-1/DDP 细胞凋亡情况比较 NG 组 $[(15.69 \pm 2.35)\%]$ 、NC 组 $[(17.01 \pm 2.55)\%]$ 、PVT1-inhibitor 组 $[(40.05 \pm 6.06)\%]$ 及 PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组 $[(27.88 \pm 4.19)\%]$ SK-MEL-1/DDP 细胞凋亡率比较, $F=46.48, P<0.001$;与 NG 组、NC 组比较, PVT1-inhibitor 组显著升高($P<0.05$);与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组显著降低($P<0.05$)。

2.5 各组 SK-MEL-1/DDP 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较 与 NG 组、NC 组比较, PVT1-inhibitor 组 SK-MEL-1/DDP 细胞 Ki-67、Bcl-2 蛋白显著降低($P<0.05$), Bax 显著升高($P<0.05$);与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组 SK-MEL-1/DDP 细胞 Ki-67、Bcl-2 蛋白显著升高($P<0.05$), Bax 显著降低($P<0.05$)。见图 1, 表 3。

2.6 双荧光素酶报告基因检测 miR-214-3p 对 PVT1 的转录调控 Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) 预测结果显示, PVT1 与 miR-214-3p 基



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白;3—Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax);4—细胞增殖相关核抗原 Ki-67;5—NG 组;6—NC 组;7—PVT1-inhibitor 组;8—PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组。

图1 各组人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-1/DDP 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较

因序列存在结合位点,见图 2。荧光素酶报告基因实验结果显示,转染 PVT1 WT 的实验中,miR-214-3p-inhibitor-PVT1-WT 组荧光素酶活性(1.37 ± 0.21)显著高于 miR-214-3p-inhibitor-NC-PVT1-WT 组(1.03 ± 0.15)($t=3.23, P=0.009$)。

NG 组(0.38 ± 0.06)、NC(0.35 ± 0.05)、PVT1-inhibitor 组(1.15 ± 0.17)及 PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组(0.80 ± 0.12)PVT1 蛋白表达比较, $F=70.25, P<0.001$;与 NG 组、NC 比较, PVT1-inhibitor 组显著升高($P<0.05$);与 PVT1-inhibitor 组比较, PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组显著降低($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

CMM 是具有较强侵袭及转移能力的皮肤恶性肿瘤之一,发病率及病死率高^[11]。目前 CMM 病人主要以化疗作为术后辅助治疗手段,DDP 是临床常用

表2 各组人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-1/DDP 细胞 PVT1、miR-214-3p、XIAP mRNA 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PVT1/ β -actin	miR-214-3p/U6	XIAP mRNA
NG 组	6	0.99 ± 0.15	1.02 ± 0.15	1.00 ± 0.15
NC 组	6	1.00 ± 0.15	1.01 ± 0.16	1.02 ± 0.15
PVT1-inhibitor 组	6	0.55 ± 0.08^{①②}	1.45 ± 0.21^{①②}	0.53 ± 0.08^{①②}
PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组	6	0.53 ± 0.07^{①②}	1.20 ± 0.18^{①②③}	0.85 ± 0.13^{①②③}
F 值		29.45	8.18	18.02
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:PVT1 为变异性浆细胞瘤异位 1, β -actin 为 β -肌动蛋白, XIAP 为人凋亡抑制蛋白 X。

①与 NG 组比较, $P<0.05$ 。②与 NC 组比较, $P<0.05$ 。③与 PVT1-inhibitor 组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组人皮肤黑色素瘤 SK-MEL-1/DDP 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Ki-67/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
NG 组	6	1.18 ± 0.18	0.33 ± 0.04	0.95 ± 0.14
NC 组	6	1.20 ± 0.19	0.35 ± 0.05	0.96 ± 0.15
PVT1-inhibitor 组	6	0.57 ± 0.09^{①②}	0.97 ± 0.16^{①②}	0.30 ± 0.05^{①②}
PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor 组	6	0.85 ± 0.13^{①②③}	0.67 ± 0.11^{①②③}	0.71 ± 0.11^{①②③}
F 值		23.08	52.75	40.44
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Ki-67 为细胞增殖相关核抗原, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, β -actin 为 β -肌动蛋白, Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2。

①与 NG 组比较, $P<0.05$ 。②与 NC 组比较, $P<0.05$ 。③与 PVT1-inhibitor 组比较, $P<0.05$ 。

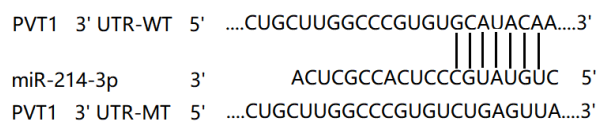
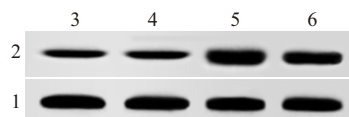


图2 miR-214-3p与变异性浆细胞瘤异位1(PVT1)基因靶向关系



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—人凋亡抑制蛋白X(XIAP);3—NG组;4—NC组;5—PVT1-inhibitor组;6—PVT1-inhibitor+miR-214-3p-inhibitor组。

图3 各组人皮肤黑色素瘤SK-MEL-1/DDP细胞XIAP蛋白表达比较

一线化疗药,其半衰期短,需持续给药以维持药物有效浓度,使得肿瘤细胞易产生原发或继发耐药性,以致化疗效果极不理想^[12]。因此研究CMM生物治疗靶标增强DDP耐药细胞敏感性,已成为临床研究热点。

lncRNA为一种非编码RNA,在基因水平调控、细胞分化和发育等过程中发挥重要作用,其表达异常可导致癌症发生^[13]。Chen等^[14]研究显示,抑制PVT1表达可显著抑制黑色素瘤细胞增殖、侵袭及转移等,可能成为黑色素瘤潜在治疗靶点。Wang等^[15]研究显示,PVT1在耐DDP的口腔鳞状细胞癌组织和细胞系中表达上调,增加癌细胞顺铂耐药性。目前认为化疗是通过多种途径介导肿瘤细胞凋亡来杀死癌细胞^[16]。ki-67蛋白是细胞增殖相关基因蛋白,在癌变组织中呈高表达,Bcl-2是一种原癌基因,能抑制细胞凋亡,Bax是人体主要的促凋亡基因^[17]。本研究以SK-MEL-1/DDP细胞为研究对象,成功转染后,结果显示,与NG组、NC组比较,PVT1-inhibitor组SK-MEL-1/DDP细胞PVT1水平、Ki-67、Bcl-2蛋白表达均显著降低,细胞增殖抑制率、凋亡率、miR-214-3p及Bax表达均显著升高。说明抑制PVT1表达可能通过上调miR-214-3p表达抑制SK-MEL-1/DDP细胞增殖并诱导细胞凋亡。与NG组、NC组比较,PVT1-inhibitor组SK-MEL-1/DDP细胞IC₅₀显著降低。与既往肿瘤相关研究^[18]中表达模式一致,提示抑制PVT1表达可能提高SK-MEL-1/DDP细胞对DDP的化疗敏感性。miR-214-3p是长度为20-23个核苷酸的单链RNA分子,是基因表达的重要调节剂,能够介导肿瘤发生^[19]。Chen等^[20]研究显示,过表达PVT1可靶向下调miR-214表达促进卵巢癌细胞增殖及转移。XIAP是凋亡抑制基因家族成员之一,能够拮抗多种凋亡诱导因素,抑制细胞凋亡^[21]。蔡松涛等^[22]研究显示,过表达微小RNA-23b-

3p可靶向下调XIAP表达抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖并促进其凋亡。Yang等^[23]研究显示,过表达miR-214-3p可靶向下调XIAP表达促进视网膜母细胞瘤细胞凋亡以降低细胞对多种化学药物敏感性。本研究预测到PVT1与miR-214-3p存在结合位点,且进一步证实,miR-214-3p-inhibitor-PVT1-WT组荧光素酶活性显著高于miR-214-3p-inhibitor-NC-PVT1-WT组,与NG组、NC组比较,PVT1-inhibitor组SK-MEL-1/DDP细胞miR-214-3p水平显著升高、XIAP mRNA及其蛋白表达显著降低;当转染miR-214-3p-inhibitor后,发现下调PVT1表达抑制SK-MEL-1/DDP细胞增殖并促进细胞凋亡能力显著降低,细胞IC₅₀明显回升,且miR-214-3p水平显著降低、XIAP mRNA和蛋白表达显著升高。说明下调PVT1表达提高SK-MEL-1/DDP细胞对DDP的化疗敏感性,可能是通过靶向上调miR-214-3p,抑制XIAP表达实现的。

综上所述,过表达PVT1可能通过靶向下调miR-214-3p表达,进而上调XIAP表达降低SK-MEL-1/DDP细胞对DDP的化疗敏感性。CMM发生及耐药机制复杂,关于PVT1与miR-214-3p/XIAP轴在SK-MEL-1/DDP细胞化疗耐药中的具体作用机制仍需深入探索。

参考文献

- [1] REYES E, URIBE C, DE VRIES E. Population-based incidence and melanoma-specific survival of cutaneous malignant melanoma in a colombian population 2000-2009[J]. Int J Dermatol, 2018, 57(1):21-27.
- [2] XIA A, LI H, LI R, et al. Co-treatment with BEZ235 enhances chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin via inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling and downregulation of ERCC1 expression[J]. Oncol Rep, 2018, 40(4):2353-2362.
- [3] DELIBERATO D, JENNISCHE M, OXLEY J, et al. Vocabulary comprehension and strategies in name construction among children using aided communication[J]. Augment Altern Commun, 2018, 34(1):16-29.
- [4] HARDIN H, HELEIN H, MEYER K, et al. Thyroid cancer stem-like cell exosomes: regulation of EMT via transfer of lncRNAs[J]. Lab Invest, 2018, 98(9):1133-1142.
- [5] WANG BJ, DING HW, MA GA. Long noncoding RNA PVT1 promotes melanoma progression via endogenous sponging miR-26b[J]. Oncol Res, 2017, 26(5):587-592.
- [6] 熊万成, 郝玉玲, 平贯芳, 等. lncRNA PVT1在结直肠癌组织和细胞中的表达及其对顺铂化疗敏感性的影响及机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(7):743-750.
- [7] NUNEZ LOPEZ YO, VICTORIA B, GOLUSINSKI P, et al. Characteristic miRNA expression signature and random forest survival analysis identify potential cancer-driving miRNAs in a broad range of head and neck squamous cell carcinoma subtypes[J].

- Rep Pract Oncol Radiother, 2018, 23(1):6-20.
- [8] 李翔, 李曾, 田珊, 等. miR-214靶向Lnc-PVT1抑制乳腺癌细胞对PD1抑制剂敏感性[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1011-1016.
- [9] 谭川, 黄杰. 肺癌患者外周血miR-214表达及对肺癌细胞凋亡和多药耐药的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(11):1073-1077.
- [10] 胡珊珊, 宋彦, 罗玉明, 等. microRNA-191-5p靶向PLCD1调控食管癌细胞顺铂耐药机制研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(3):477-480.
- [11] BANDOVKINA VA, FRANTSIYANTS EM, ROZENKO LY, et al. Chronic neurogenic pain activates growth factors in the blood of patients with cutaneous melanoma[J/OL]. J Clin Oncol, 2020, 38(15_suppl):e22082.DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e22082.
- [12] KARACHALIOU GS, CARROLL SB, PATEL NM, et al. High incidence of brain metastases (BrM) in patients with metastatic cutaneous melanoma (MCM) and mutations in the APC/ β -catenin (CTNNB1)[J]. J Clin Oncol, 2019, 38(15):9527-9527.
- [13] ZHAO Y, WANG H, WU C, et al. Construction and investigation of lncRNA-associated ceRNA regulatory network in papillary thyroid cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3):1197-1206.
- [14] CHEN L, MA D, LI Y, et al. Effect of long non-coding RNA PVT1 on cell proliferation and migration in melanoma[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3):1275-1282.
- [15] WANG L, SU N, ZHANG Y, et al. Clinical significance of serum lncRNA cancer susceptibility candidate 2 (CASC2) for chronic renal failure in patients with type 2 diabetes[J]. Med Sci Monit, 2018, 24(37):6079-6084.
- [16] YU L, XU Q, YU W, et al. LncRNA cancer susceptibility candidate 15 accelerates the breast cancer cells progression via miR-153-3p/KLF5 positive feedback loop[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(4):819-825.
- [17] CHEN L, MA D, LI Y, et al. Effect of long non-coding RNA PVT1 on cell proliferation and migration in melanoma[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3):1275-1282.
- [18] WANG F, JI X, WANG J, et al. LncRNA PVT1 enhances proliferation and cisplatin resistance via regulating miR-194-5p/HIF1 α axis in oral squamous cell carcinoma[J]. Onco Targ Ther, 2020, 13(1):243-252.
- [19] XU Y, ZHANG G, ZOU C, et al. LncRNA MT1JP suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through MT1JP/MiR-214-3p/RUNX3 axis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(6):2445-2459.
- [20] YING C, HUI D, LEWEN B, et al. LncRNA PVT1 promotes ovarian cancer progression by silencing miR-214[J]. Cancer Bio Med, 2018, 15(3):238-250.
- [21] 朱凯敏, 马春林, 李红亮, 等. 参芪抑瘤方联合顺铂对MFC荷瘤小鼠瘤组织 XIAP, PTEN 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2):418-421.
- [22] 蔡松涛, 孙京涛, 魏瑄. miR-23b-3p靶向XIAP调控类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和凋亡的机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7):1310-1315.
- [23] YANG L, ZHANG L, LU L, et al. miR-214-3p regulates multi-drug resistance and apoptosis in retinoblastoma cells by targeting ABCB1 and XIAP[J]. Onco Tar Ther, 2020, 13(77):803-811.

(收稿日期:2021-03-09,修回日期:2021-04-13)

引用本文:冯维,尚张丽,吴丽玮.长链非编码RNA淋巴细胞白血病毒缺失基因2对舌鳞癌细胞增殖和侵袭的调控作用[J].安徽医药,2022,26(6):1231-1234.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.041.

◇临床医学◇



长链非编码RNA淋巴细胞白血病毒缺失基因2对舌鳞癌细胞增殖和侵袭的调控作用

冯维¹,尚张丽²,吴丽玮³

作者单位:¹邯郸市第三医院口腔科,河北 邯郸056000;

²邯郸市口腔医院正畸科,河北 邯郸056001;

³石家庄市第三医院口腔科,河北 石家庄050011

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)淋巴细胞白血病毒缺失基因2(DLEU2)在舌鳞癌中的表达及其对癌细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 2018年5月至2019年7月收集在邯郸市第三医院进行手术治疗并经病理确诊的22例舌鳞癌组织及对应的癌旁组织标本。采用实时荧光定量PCR检测DLEU2在舌鳞癌组织和细胞中的表达情况。将体外培养的舌鳞癌细胞株CAL-27细胞分为对照组(未转染)、空载体组(空载体)和DLEU2组(转染DLEU2),采用实时荧光定量PCR检测细胞中DLEU2表达,MTT法检测细胞增殖,Transwell检测细胞侵袭。**结果** 与癌旁组织(1.00±0.00)相比,舌鳞癌组织中DLEU2表达水平(0.30±0.02)明显降低($P<0.05$);3种舌鳞癌SCC-15(0.35±0.04)、SCC-4(0.48±0.04)和CAL-27(0.26±0.03)细胞中DLEU2的表达水平较人正常口腔黏膜HOK细胞(1.00±0.00)均明显降低($P<0.05$)。与对照组相比,DLEU2组细胞中DLEU2表达水平明显升高,且细胞增殖和侵袭能力明显减弱($P<0.05$)。**结论** lncRNA DLEU2在舌鳞癌组织和细胞中低表达,上调其表达可抑制舌鳞癌CAL-27细胞增殖和侵袭。