

UCA1/miR-122-5p/CPEB1 轴促进肺腺癌的顺铂耐药发生机制研究

吴玲玲 陈姝慧 胡天奇 周辰康 仇鲁男 王瑜敏

【摘要】 目的 探讨尿路上皮癌胚抗原 1(UCA1)/miR-122-5p/pcDNA-胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白 1(CPEB1)轴促进肺腺癌的顺铂耐药发生机制研究。方法 通过实时荧光反转录定量 PCR(RT-qPCR)检测 UCA1 相关 miRNA 分子,并通过细胞转染获得 miR-122-5p 和 CPEB1 相关细胞株。通过双荧光素酶报告实验分别验证 UCA1 与 miR-122-5p、CPEB1 与 miR-122-5p 的结合。药物敏感性实验获得顺铂药物半抑制浓度(IC₅₀);通过肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库分析 CPEB1 在肺腺癌中的表达情况以及与免疫细胞功能的关系。结果 miR-122-5p 在肺腺癌细胞中的表达水平明显升高,并通过双荧光素酶报告实验验证 UCA1 与 miR-122-5p 结合,构建 miR-122-5p 抑制物和模拟物转染肺腺癌细胞株,发现 miR-122-5p 抑制后,顺铂 IC₅₀ 浓度下降,而 miR-122-5p 过表达后,顺铂 IC₅₀ 浓度升高。CPEB1 在肺腺癌细胞中的表达水平明显降低,双荧光素酶报告实验证实 CPEB1 是与 miR-122-5p 结合,CPEB1 过表达后,顺铂 IC₅₀ 浓度减低;对 TCGA 数据库分析显示肺腺癌组织 CPEB1 mRNA 明显低于癌旁组织,ROC 曲线分析显示 CPEB1 表达水平能较好地用于诊断肺腺癌(AUC=0.849),进一步分析显示 CPEB1 表达水平与肺腺癌患者的免疫功能如 T 细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞存在密切关联。结论 UCA1 与 miR-122-5p 存在结合位点,后者可影响肺腺癌的顺铂耐药,并与靶基因 CPEB1 结合;肺腺癌中 CPEB1 呈低表达,降低肺腺癌顺铂药物的敏感性。UCA1/miR-122-5p/CPEB1 轴有望为干预肺腺癌顺铂耐药的靶点。

【关键词】 尿路上皮癌胚抗原 1;miR-122-5p;胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白 1;肺腺癌;顺铂耐药;机制

The mechanism of UCA1/miR-122-5p/CPEB1 axis promoting cisplatin resistance in lung adenocarcinoma

WU Lingling, CHEN Shuhui, HU Tianqi, ZHOU Chenkang, QIU Lunan, WANG Yumin

Author's address: Department of Center of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Corresponding author: WANG Yumin, E-mail: wym0577@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism of urothelial carcinomagen1 (UCA1)/miR-122-5p/CPEB1 axis promoting cisplatin resistance in lung adenocarcinoma (LAD). **Methods** UCA1-related miRNA molecules were screened by real-time fluorescence reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), and miR-122-5p and CPEB1-related cell lines were obtained by cell transfection. The binding of UCA1 to miR-122-5p and CPEB1 to miR-122-5p was verified by dual luciferase reporter assays. Cisplatin drug IC₅₀ concentrations were detected by drug sensitivity assay. The TCGA database was used to analyze the expression of CPEB1 in lung adenocarcinoma, immune cell function and its relationship with clinical data. **Results** The expression of miR-122-5p was significantly elevated in LAD cells and the binding of UCA1 to miR-122-5p was verified by dual luciferase reporter assay. MiR-122-5p inhibitor or mimics were transfected to LAD cells; and cisplatin IC₅₀ decreased after miR-122-5p inhibition, whereas cisplatin IC₅₀ increased after miR-122-5p overexpression. The expression level of CPEB1 in LAD cells was significantly decreased. Dual luciferase assay confirmed that CPEB1 bound to miR-122-5p. After overexpression of CPEB1, cisplatin IC₅₀ was decreased. TCGA database showed that the expression of CPEB1 mRNA in LAD tissues was significantly lower than that in adjacent tissues; the expression level of CPEB1 was closely

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2024.46.8.2023-1675

基金项目:国家自然科学基金项目(81672088);温州市科技局基础性科研项目(Y20180501)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院医学检验中心

通信作者:王瑜敏, E-mail: wym0577@163.com

related to the cellular functions such as T, B lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes, natural killer cells, macrophages, neutrophil cells, dendritil cells and mast cells in patients with LAD. ROC curve showed that the expression level of CPEB1 could be used for the diagnosis of LAD (AUC=0.849). **Conclusion** UCA1 binds to miR-122-5p and target gen CPEB1, which can affect cisplatin resistance in LAD; indicating that UCA1/miR-122-5p/CPEB1 axis may be a potential target for reversing drug resistance.

【Key words】 Urothelial carcinoembryonic antigen 1; MiR-122-5p; Cytosolic polyadenyl element binding protein 1; Lung adenocarcinoma; Cisplatin resistance; Mechanism

在全球,肺癌的发病率和死亡率居各种癌症之首^[1]。2016年中国恶性肿瘤流行数据显示,恶性肿瘤死亡第1位是肺癌,发病率和死亡率分别位列男性肿瘤首位,女性肿瘤第2位和第1位^[2]。非小细胞肺癌(non-small-cell carcinoma, NSCLC)在肺癌中最为多见,肺腺癌是NSCLC中最常见的类型,占肺癌的40%,占NSCLC的50%。目前肺腺癌的发病率在全球范围呈不断上升趋势,由于肺腺癌具有早期出现远处转移的生物学特点,多数患者确诊时已属晚期。以顺铂为基础的联合化疗在肺腺癌的综合治疗方案中占有重要地位^[3]。但随着顺铂的应用,不可避免会引起肿瘤细胞对其产生耐药性,使化疗效果明显降低^[4]。据美国癌症协会调查显示,90%以上肿瘤患者的死亡在不同程度上与肿瘤耐药性产生有关,癌细胞一旦对顺铂产生耐药,会对阿霉素、长春碱、氟尿嘧啶、丝裂霉素等众多一线化疗药物形成多药耐药,其危害尤为严重^[5]。本研究团队前期已采用高通量长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)芯片技术比较肺腺癌顺铂耐药株A549/DDP细胞与顺铂敏感株A549细胞,获得了肺腺癌顺铂耐药株差异性lncRNA表达谱,筛选并初步鉴定出一些与肺腺癌顺铂耐药相关的lncRNA分子,其中通过lncRNA芯片及实时荧光反转录定量PCR(real-time fluorescence reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)检测结果均证实了尿路上皮癌胚抗原1(urothelial carcinoembryonic antigen 1, UCA1)为这些候选基因中明显上调的lncRNA分子。UCA1首先被证实在膀胱癌组织呈高表达^[6],在其他癌症也显示为高表达。UCA1经常与miRNA进行互作^[7],而是否通过与相关miRNA分子进行竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)调控肺腺癌对顺铂耐药的机制?本研究拟在前期工作的基础上,根据miRNA预测网站预测的交集,获得UCA1调控相关miRNA分子,重点针对UCA1相关miR-122-5p分子进行研究,旨在探讨UCA1通过miR-122-5p参与调控肺腺癌顺铂耐药的机制,现将

结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基(批号:C11875500BT)、DMEM培养基(批号:12800017)、opti-MEM培养基(批号:31985-070)购自美国Gibco公司(规格:500 mL/瓶)。顺铂注射液购自江苏豪森药业集团有限公司(批号:SL2138596,规格:6 mL:30mg×5支)。FBS购自美国Gibco公司(批号:16000-044)。miR-122-5p模拟物、miR-122-5p模拟物阴性对照(NC)、miR-122-5p抑制剂、miR-122-5p抑制剂NC、质粒pcDNA-胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白1(cytosolic polyadenyl element binding protein 1, CPEB1)、对照载体pcDNA-3.1均购自广州锐博生物科技有限公司(规格:50 μg/支)。Lipofectamine 3000购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(批号:16000-044)。miDETECT A Track™ miRNA qPCR试剂盒购自锐博生物科技有限公司(批号:C10710)。双荧光素酶报告分析系统试剂盒购自美国Promega公司(批号:ZY130595)。RprimeScript™ RT Master Mix、TB Green™ Premix Ex Taq™ II试剂盒购自日本Takara公司(批号:RR036A、RR420A)。Trizol试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司(批号:ALH005,规格:200 mL/瓶);氯仿、异丙醇购自天津大茂化学试剂厂(批号:S19382、N32930,规格:10 mg/瓶)。CCK-8试剂盒购自日本同仁公司(批号:C0038,规格:2 mL/瓶)。pmiRGLO-UCA1-野生型(WT)/突变型(Mut)载体、pmiRGLO-CPEB1-3'UTR-WT/Mut载体均购自锐博生物科技有限公司。311型CO₂培养箱购自美国赛默飞公司;ABI 7500 PCR仪器购自美国ABI公司;Nano-drop 2000仪器购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 细胞培养 肺腺癌细胞(HCC827、A549、H1299)和正常人支气管上皮细胞(BEAS-2B)系购自中国科学院细胞库。其中A549(顺铂敏感细胞株)、H1299和HCC827细胞保存在含有10%FBS的RPMI 1640培养基中, BEAS-2B细胞保存在含有10%FBS的DMEM培养

基中,并在 37℃、5%CO₂条件下培养。所有培养物均经过常规检测,未发现支原体或真菌污染。A549/DDP 细胞(顺铂耐药细胞株)购自中国科学院细胞库,在培养基加入 1 μg/mL 顺铂,以保持其抗药性。A549 过表达UCA1 及 A549 过表达 NC 细胞系前期已经构建完毕,可用于直接培养。所有细胞系均按照建议在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养,并置于 37℃、5%CO₂ 的 311 型 CO₂ 培养箱中。

1.3 转染 准备 miR-122-5p 模拟物、miR-122-5p 模拟物 NC、miR-122-5p 抑制剂、miR-122-5p 抑制剂 NC、pcDNA-CPEB1、对照载体 pcDNA-3.1 等质粒。转染前 1 天,以 50% 的细胞密度分别将 A549、A549/DDP 细胞株接种到 12 孔板中,待细胞数量增加达到实验要求后待用。转染前 2 h,将含有 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基换为 opti-MEM 培养基;制备聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)和上述质粒的转染复合物,上述质粒的瞬时转染浓度为 50 nmol/L;分别用 50 μL opti-MEM 培养基稀释 2 μL PEI 和 1.25 μL 上述质粒,随后将稀释好的 PEI 和上述质粒混匀,置于室温孵育 15 min。将 100 μL 上述质粒转染复合物加入细胞株培养基中,十字混匀摇匀,转染 8 h 后更换为 500 μL 含有 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基。获得构建 A549 miR-122-5p 模拟物 NC 细胞株、A549 miR-122-5p 模拟物细胞株、A549/DDP miR-122-5p 抑制物 NC 细胞株、A549/DDP miR-122-5p 抑制物细胞株、A549 CPEB1 过表达 NC 细胞株、A549 CPEB1 过表达细胞株;通过 RT-qPCR 验证转染效率。

1.4 总 RNA 提取和 qPCR 检测UCA1 相关 miRNA 分子

1.4.1 细胞总 RNA 提取 收集 A549 和 A549/DDP 的各处理组细胞沉淀于 1.5 mL 的 EP 管中,加入 1 mL 的 Trizol,混匀后置于冰上充分裂解细胞 10 min。向每个 EP 管加入 200 μL 氯仿于冰上静置 10 min 后离心 15 min。吸取上层水相溶液 400 μL 至新的 EP 管,按同等体积比加入预冷的异丙醇,颠倒混匀后冰上静置 15 min 后离心 15 min。吸去上清液,留 RNA 沉淀,加入 1 mL 75% 乙醇轻柔吹洗,离心 5 min。吸干乙醇,开盖 5 min 使乙醇充分挥发,加入 15 μL RNase-free 水使其溶解。

1.4.2 RNA 浓度检测 使用 Nano drop 2000 仪器,开机选择 RNA 浓度测定程序,用 2 μL DEPC 水调零后进行检测;取 1 μL RNA 样品进行测定, A₂₆₀/A₂₈₀ 值位于 1.8~2.0 表示 RNA 提取合格,保存于 -20℃ 用于后续实验。

1.4.3 RNA 反转录为 cDNA 按 RprimeScript™ RT Mas-

ter Mix 试剂盒说明书,配制反转录体系。PCR 仪设定以下程序:反转录 37℃, 15 min;RNA 酶失活 85℃, 5 s;反应终止 4℃, 30 min;将样本置于 PCR 仪中进行反转录反应得到 cDNA,保存于 -20℃ 待用。用于检测 miRNA 的 RNA 样本反转录采用 miDETECT A Track™ miRNA qPCR Kit, 操作步骤按 miDETECT A Track™ miRNA qPCR 试剂盒说明书,配制 Poly(A) Tailing 体系,混匀后于 37℃ 反应 1 h, 4℃ 保存备用。

1.4.4 RT-qPCR 稀释引物前先进行瞬时离心使其沉于管底,按照管身的说明加入相应体积 ×10 的去离子水,得到 10 μmol/L 的工作引物浓度,并置于 -20℃ 冰箱保存;按 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书制备 10 μL 荧光定量 PCR 体系;采用 PCR 仪为 ABI Q5 PCR 仪,设定 PCR 反应程序:95℃ 预变性 30 s;40 个循环包括:95℃ 变性 5 s, 55℃ 退火和延伸 34 s。以 β-肌动蛋白(β-actin)和 U6 作为内部参考,结果分析采用 2^{-ΔΔC_t} 法,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
CPEB1-F	GGTGTCTCTCCCAAAGGGTATG	203
CPEB1-R	TGGGCTCCGGACAAAAGTTAC	
β-actin-F	GACGGCTACCCGATCTCGGCAT	176
β-actin-R	ACGGCTTTCCAGCGCATCCGCA	
U6-F	AGAGAAGATCGGCATGCTTACTG	213
U6-R	ACCTGAGCGCATTGTC CGAGG	

注:CPEB1 为胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白 1;β-actin 为 β-肌动蛋白

1.5 双荧光素酶报告实验 构建含有 miR-122-5p 结合位点的 WT 和 Mut 序列UCA1 和 CPEB1 的质粒,并克隆到含有 pmiRGLO 启动子的双荧光素酶报告质粒中,得到 pmiRGLO-UCA1-WT/Mut 和 pmiRGLO-CPEB1-3'UTR-WT/Mut 双荧光素酶报告载体。具体实验分组为:miR-122-5p 模拟物 NC, miR-122-5p 模拟物,UCA1 WT+miR-122-5p 模拟物 NC,UCA1 WT +miR-122-5p 模拟物,UCA1 Mut+miR-122-5p 模拟物 NC,UCA1 Mut+miR-122-5p 模拟物;CPEB1 WT+miR-122-5p 模拟物 NC,CPEB1 WT +miR-122-5p 模拟物,CPEB1 Mut+miR-122-5p 模拟物 NC,CPEB1 Mut +miR-122-5p 模拟物。将 A549 细胞接种到 24 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 的 311 型 CO₂ 培养箱中培养 24 h,将 miR-122-5p 模拟物或模拟物 NC 与构建的报告载体 pmiRGLO-UCA1-WT/Mut 或 pmiRGLO-CPEB1-3'UTR-WT/Mut 共

转染 48 h,最后用双荧光素酶报告分析系统试剂盒评价相对荧光素酶活性。

1.6 顺铂敏感性试验 将 A549 和 A549/DDP 细胞接种在 96 孔板中(2×10^3 个/孔),并培养至细胞贴满。随后,用不同浓度顺铂(0、1、2、4、8、10 $\mu\text{g/mL}$)培养基代替 RPMI 1640 培养基培养细胞 48 h,用 10% CCK-8 替换每个孔中的培养液并培养 1 h。用微孔板阅读器在 450 nm 处测量吸光度(A),并计算细胞活力,细胞活力(%)=(A 加-A 空白)/(A0 加药-A 空白) $\times 100\%$,其中 A 加是指不同顺铂浓度(1、2、4、8、10 $\mu\text{g/mL}$)后细胞株的吸光度值,A 空白是指没加细胞株,没加药物的培养基吸光度值,A0 加药是指加入顺铂马上检测的吸光值。使用 GraphPad Prism 8.0 软件计算顺铂的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.7 公共数据库进行生物信息学分析 从肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)公共数据库中下载肺癌及正常肺样本的基因组数据,其中肺癌 535 例,匹配的正常肺样本 59 个;肺癌组与正常组之间 CPEB1 基因表达水平差异比较采用两独立样本 t 检验。绘制 ROC 曲线评价 CPEB1 基因诊断肺癌的效能,并计算 AUC。采用 Kaplan-Meier 法绘制低表达组和高表达组患者的生存曲线,总生存期比较采用 log-rank 检验。选择与 CPEB1 基因表达相关的免疫细胞,以 CPEB1 基因表达高低来分组,比较免疫细胞浸润的差异。

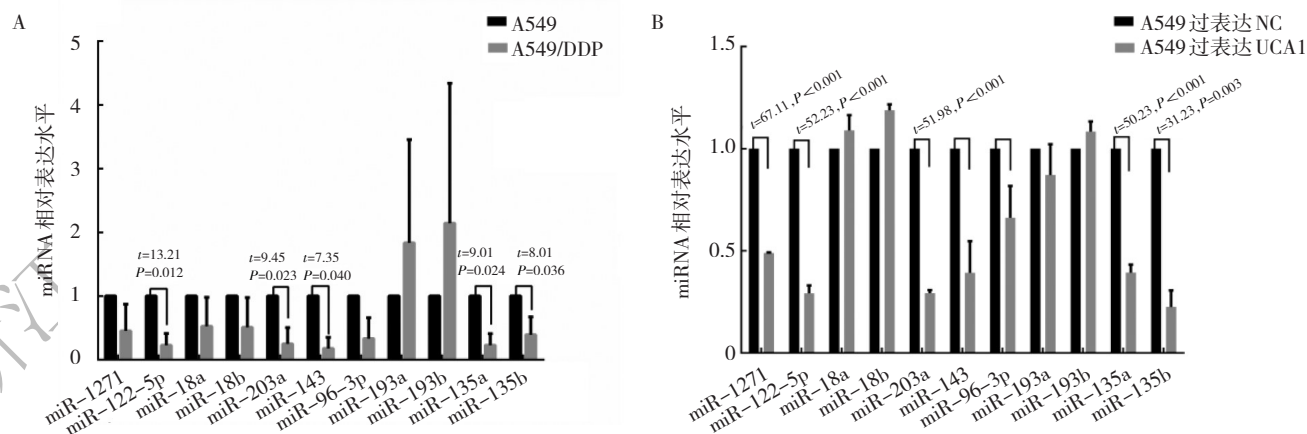
1.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,配对样本比较采用配对样本 t 检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UCA1 与多个 miRNA 发生互作关系 根据 miRNA 预测网站 <http://www.microrna.org/microrna/home.do> 和 <http://www.mircode.org/> 预测的交集,获得 UCA1 调控相关 miRNA(包括 miR-143、miR-18a、miR-18b、miR-96-3p、miR-1271、miR-135a、miR-135b、miR-122-5p、miR-193a、miR-193b、miR-203a)。进一步通过 RT-qPCR 检测获得 miR-122-5p、miR-203a、miR-143、miR-135a、miR-135b 作为 UCA1 互作 miRNA 分子参与肺腺癌的顺铂耐药发生,见图 1。

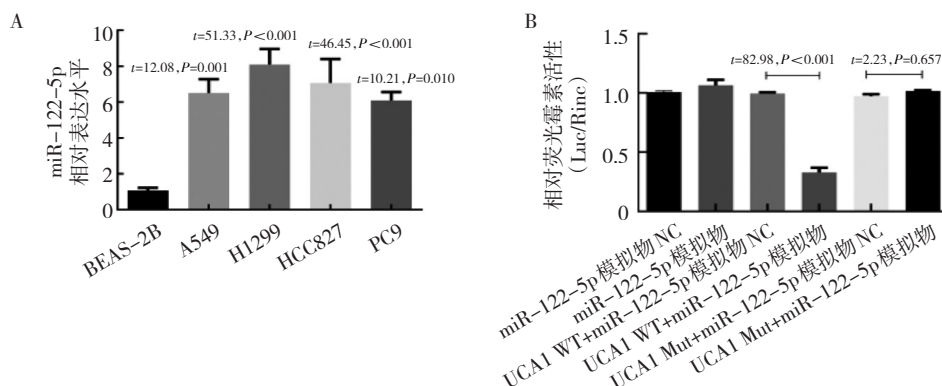
2.2 检测肺腺癌细胞及 BEAS-2B 细胞中 miR-122-5p 的表达水平 双荧光素酶报告实验结果表明,miR-122-5p 在肺腺癌细胞中的表达水平明显升高,见图 2A。与 miR-122-5p 模拟物 NC、miR-122-5p 模拟物、UCA1 WT+miR-122-5p 模拟物 NC、UCA1 Mut+miR-122-5p 模拟物 NC、UCA1 Mut miR-122-5p 模拟物相比较,UCA1 WT+miR-122-5p 模拟物共转染组的相对荧光素酶活性明显下降,见图 2B,表明 miR-122-5p 和 UCA1 具有结合位点。

2.3 miR-122-5p 对肺癌细胞株顺铂敏感性的影响 RT-qPCR 结果显示成功构建了 miR-122-5p 抑制物转染的细胞株,见图 3A;miR-122-5p 抑制后,顺铂 IC_{50} 浓度从 5.1 $\mu\text{g/mL}$ 下降到 2.3 $\mu\text{g/mL}$,提示 miR-122-5p 敲低后能提高顺铂的药物敏感性,见图 3B。成功构建了 miR-122-5p 模拟物转染的细胞株,见图 3C;miR-122-5p 过表达后,顺铂 IC_{50} 浓度从 2.3 $\mu\text{g/mL}$ 升高到 4.8 $\mu\text{g/mL}$,提示 miR-122-5p 过表达能减低顺铂的药物敏感性,促进顺铂耐药,见图 3D。



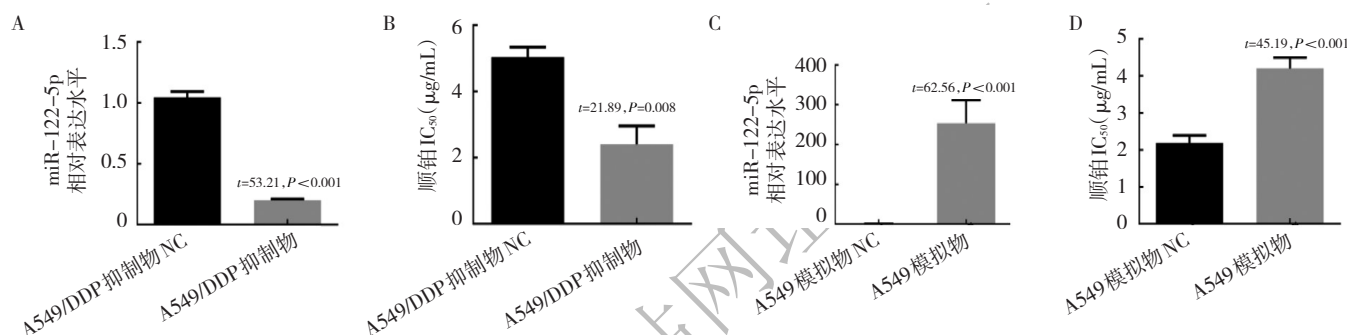
注:UCA1 为尿路上皮癌胚抗原 1;NC 为阴性对照

图 1 UCA1 互作 miRNA 分子表达水平比较结果(A: A549/DDP 和 A549 细胞株的差异 miRNA 表达情况;B: UCA1 过表达后差异 miRNA 的表达情况)



注:NC为阴性对照;UCA1为尿路上皮癌胚抗原1;WT为野生型;Mut为突变型

图2 肺癌细胞及BEAS-2B细胞中miR-122-5p表达水平的比较(A:miR-122-5p在肺腺癌细胞株的表达情况;B:miR-122-5p模拟物或模拟物NC与构建的报告载体pmiRGLO-UCA1-WT/Mut共转染后荧光素酶活性比较)



注:UCA1为尿路上皮癌胚抗原1;IC₅₀为半抑制浓度

图3 miR-122-5p对肺癌细胞株顺铂敏感性的影响(A:miR-122-5p抑制物转染A549/DDP细胞株后miR-122-5p表达水平的比较;B:miR-122-5p抑制物转染A549/DDP细胞株后顺铂IC₅₀的变化;C:miR-122-5p模拟物转染A549细胞株后miR-122-5p表达水平的比较;D:miR-122-5p模拟物转染A549细胞株后顺铂IC₅₀的变化)

2.4 miRNA 荧光素酶发现 miR-122-5p 与 CPEB1 存在结合 进一步通过 https://www.targetscan.org/vert_71/ 和 <https://www.mirbase.org/> 网站预测,发现 miR-122-5p 与 CPEB1 可能存在结合。随后检测肺腺癌细胞及 BEAS-2B 细胞中 CPEB1 的表达水平,发现 CPEB1 在肺腺癌细胞中的表达水平明显降低,见图 4A。双荧光素酶报告实验结果表明,与 miR-122-5p 模拟物 NC、miR-122-5p 模拟物、CPEB1 WT+miR-122-5p 模拟物 NC、CPEB1 Mut+miR-122-5p 模拟物 NC、CPEB1 Mut miR-122-5p 模拟物组比较,CPEB1 WT+miR-122-5p 模拟物组的相对荧光素酶活性明显下降,见图 4B,表明 miR-122-5p 和 CPEB1 具有结合位点。

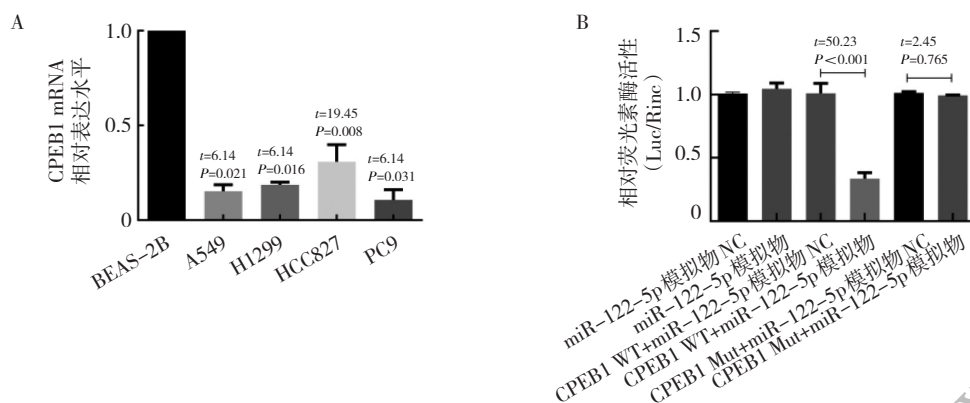
2.5 CPEB1 对肺腺癌细胞株顺铂敏感性的影响 RT-qPCR 结果显示成功构建了 CPEB1 过表达细胞株,见图 5A;CPEB1 过表达后,顺铂 IC₅₀ 浓度从 5.2 μg/mL 下降到 2.5 μg/mL,见图 5B,提示 CPEB1 过表达能提高顺

铂的药物敏感性,降低顺铂耐药。

2.6 CPEB1 在肺腺癌表达及与免疫细胞功能的相关性 TCGA 公共数据库分析显示肺腺癌组织 CPEB1 mRNA 明显低于癌旁组织,见图 6A、B;ROC 曲线分析显示 CPEB1 表达水平能较好地用于诊断肺腺癌 (AUC=0.849, 95%CI:0.810~0.888),见图 6C,高 CPEB1 水平与低 CPEB1 水平患者的生存预后差异无统计学意义,见图 6D;CPEB1 表达水平与肺腺癌患者的细胞功能如 T 细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞存在密切相关,见图 6E。

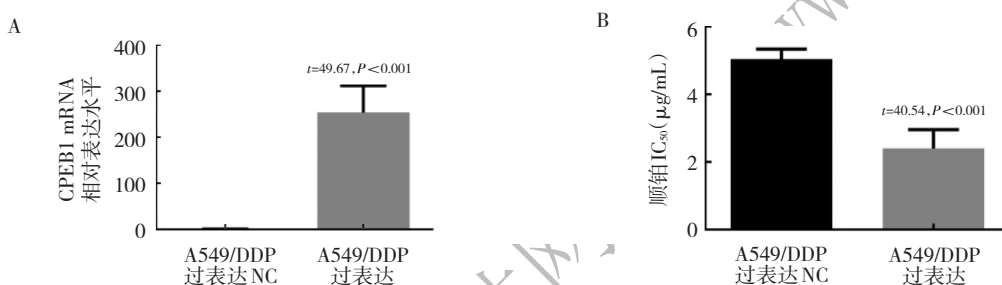
3 讨论

近年来国内外研究表明,顺铂主要通过抑制肿瘤细胞 DNA 合成^[8]、诱导凋亡^[9]而发挥作用。顺铂化疗抵抗极其复杂,是一个多基因参与的复杂事件,目前



注:NC为阴性对照;CPEB1为胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白1;WT为野生型;Mut为突变型

图4 miR-122-5p与CPEB1的双荧光素酶活性实验(A:CPEB1在肺腺癌细胞株的表达情况;B:miR-122-5p模拟物或NC与构建的报告载体CPEB1 WT及CPEB1 Mut共转染后相对荧光素酶活性的比较)



注:NC为阴性对照;CPEB1为胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白1;IC₅₀为半抑制浓度

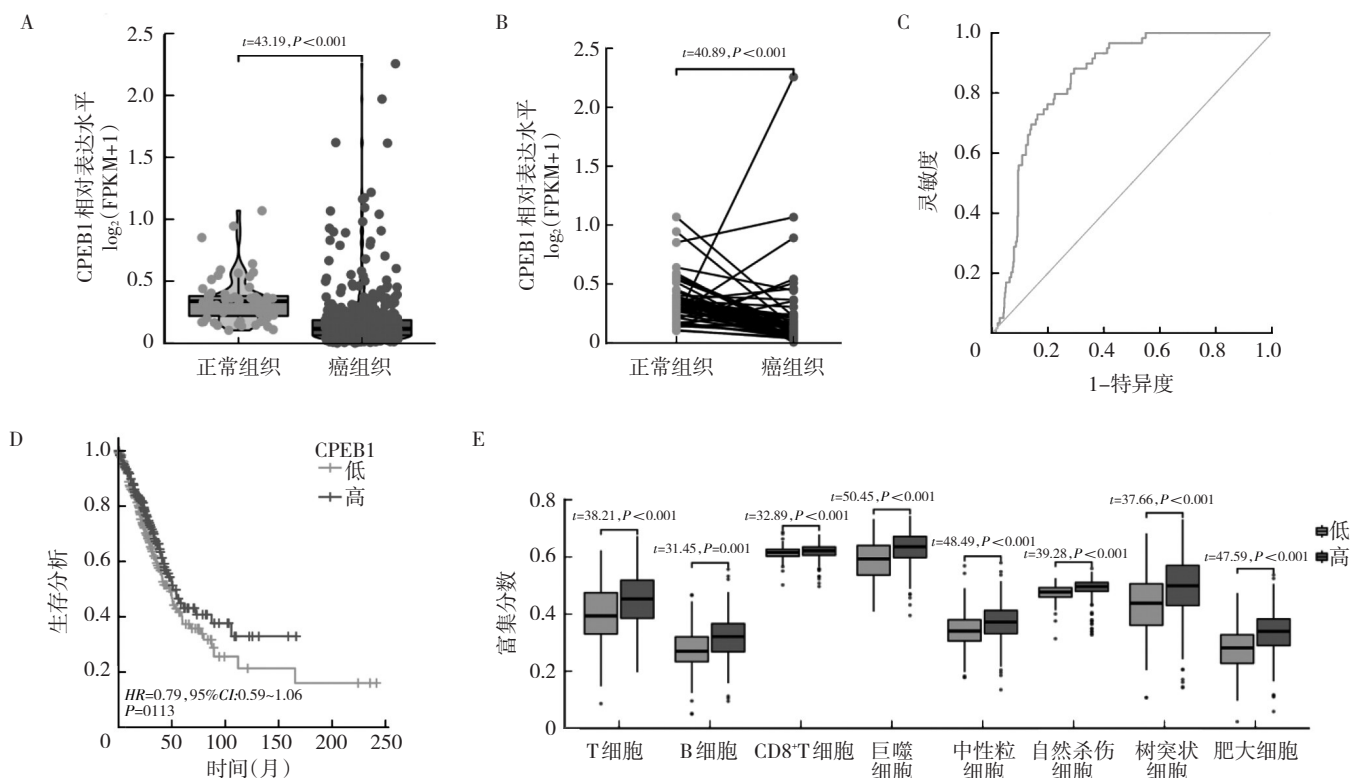
图5 CPEB1对肺腺癌细胞株顺铂敏感性的影响(A:CPEB1过表达质粒转染A549/DDP细胞株后CPEB1表达水平的比较;B:CPEB1过表达后A549/DDP细胞株后顺铂IC₅₀的变化)

认为主要通过如下几种机制^[10]来实现:(1)改变细胞内药物转运;(2)降低药物活性干扰药物作用机制;(3)影响DNA损伤修复,目前相关基因如乳腺癌相关基因1、切除修复交叉互补基因等;(4)主要信号通路(PDK/Akt、MAPK/Erk、Wnt等)的遗传和表观遗传学改变,使药物作用凋亡受阻。然而,令人遗憾的是,尽管以往包括基因组学和蛋白质组学研究取得了不少进展,但顺铂化疗抵抗机制仍尚未阐明。

有研究发现,UCA1可通过与miRNA进行互作,参与顺铂耐药机制^[11]。目前文献报道UCA1通过CREB调节膀胱癌细胞中的miR-196a-5p促进顺铂/吉西他滨耐药^[12]。UCA1表达失调可能通过调节microRNA-495/NRF2信号通路参与顺铂治疗NSCLC化疗耐药的发生^[13]。本研究通过筛选到UCA1的多个相关miRNA,表明UCA1可与miRNA互作参与肺腺癌的顺铂耐药机制;结合相关文献^[14],笔者初步选定miR-122-5p作为后续的研究对象,发现miR-122-5p在肺腺癌细胞

中的表达水平明显升高,并通过双荧光素酶报告实验以验证UCA1与miR-122-5p结合,构建miR-122-5p抑制物和模拟物转染肺腺癌细胞株,发现miR-122-5p抑制后,顺铂IC₅₀浓度下降,而miR-122-5p过表达后,顺铂IC₅₀浓度升高,提示miR-122-5p能降低顺铂的药物敏感性,促进肺腺癌顺铂耐药。

本研究通过https://www.targetscan.org/vert_71/和<https://www.mirbase.org/>网站预测,发现miR-122-5p与靶基因CPEB1可能存在结合。CPEB1是指一种序列特异性的RNA结合蛋白,可以调节mRNA多聚腺苷酸化和翻译以及肿瘤的发生^[15]。进一步发现CPEB1在肺腺癌细胞中的表达水平明显降低,双荧光素酶报告实验证实CPEB1是与miR-122-5p结合;构建CPEB1过表达质粒染肺腺癌细胞株,CPEB1过表达后,顺铂IC₅₀浓度减低,提示CPEB1过表达能提高顺铂的药物敏感性,减低顺铂耐药,表明CPEB1参与肺腺癌顺铂耐药机制。有报道显示,CPEB1降低会导致体内乳腺癌细



注: CPEB1 为胞质多聚腺苷酸元件结合蛋白 1

图 6 数据库 CPEB1 mRNA 表达情况(A: CPEB1 在肺腺癌组织的表达情况; B: CPEB1 在肺腺癌组织的表达情况; C: ROC 曲线分析 CPEB1 用于肺腺癌的诊断效能; D: 高 CPEB1 水平与低 CPEB1 水平患者生存预后的比较; E: CPEB1 表达水平与肺腺癌患者的细胞功能相关性)

胞肺转移^[16]。本研究对公共数据库分析显示肺腺癌组织 CPEB1 mRNA 明显低于癌旁组织, ROC 曲线分析显示 CPEB1 表达水平能较好地用于诊断肺腺癌(AUC=0.849), 分析显示 CPEB1 表达水平与肺腺癌患者的细胞功能如 T 细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞存在密切关联。

综上所述, UCA1 与 miR-122-5p 存在结合位点, 后者可影响肺腺癌的顺铂耐药, 并与靶基因 CPEB1 结合; 肺腺癌中 CPEB1 呈低表达, 降低肺腺癌顺铂药物的敏感性。UCA1/miR-122-5p/CPEB1 轴有望为干预肺腺癌顺铂耐药的靶点。

4 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world-wide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] Zheng RS, Zhang SW, Sun KX, et al. Cancer statistics in China, 2016[J]. Chinese J Oncol, 2023, 45(3):212-220. DOI:10.3760/

cma.j.cn112152-20220922-00647.

- [3] Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(21): 3552-3559. DOI:10.1200/JCO.2007.13.9030.
- [4] Bunn PA, Kelly K. New combinations in the treatment of lung cancer: a time for optimism[J]. Chest, 2000, 117(4 Suppl 1): 138S-143S. DOI:10.1378/chest.117.4_suppl_1.138s.
- [5] Choi MK, Kim DD. Platinum transporters and drug resistance [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(12):1067-1073. DOI:10.1007/BF02969293.
- [6] Fan Y, Shen B, Tan M, et al. Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling[J]. FEBS J, 2014, 281(7):1750-1758. DOI:10.1111/febs.12737.
- [7] Wei Y, Sun Q, Zhao L, et al. LncRNA UCA1-miR-507-FOXO1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma[J]. Med Oncol, 2016, 33(8):88. DOI: 10.1007/s12032-016-0804-2.
- [8] Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1291-1295. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-2238.

- [9] Wangpaichitr M, Wu C, You M, et al. Inhibition of mTOR re-stores cisplatin sensitivity through down-regulation of growth and anti-apoptotic proteins[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1-3):124-127. DOI:10.1016/j.ejphar.2008.06.028.
- [10] Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, et al. Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2005, 4(1):25. DOI:10.1186/1476-4598-4-25.
- [11] Pan J, Li X, Wu W, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(1):64-76. DOI:10.1016/j.canlet.2016.08.015.
- [12] Li C, Fan K, Qu Y, et al. Deregulation of UCA1 expression may be involved in the development of chemoresistance to cisplatin in the treatment of non-small-cell lung cancer via regulating the signaling pathway of microRNA-495/NRF2[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4):3721-3730. DOI:10.1002/jcp.29266.
- [13] Cheng YH, Chen KH, Sung YT, et al. Intrarenal arterial transplantation of dexmedetomidine preconditioning adipose stem-cell-derived microvesicles confers further therapeutic potential to attenuate renal ischemia/reperfusion injury through miR-122-5p/erythropoietin/apoptosis axis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9). DOI:10.3390/antiox11091702.
- [14] Qiu F, Ou DF, Tan HX, et al. The circCDK17/miR-122-5p/ASF1B axis regulates the progression of cervical cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(3):359-371. DOI:10.14670/HH-18-527.
- [15] Nagaoka K, Fujii K, Zhang H, et al. CPEB1 mediates epithelial-to-mesenchyme transition and breast cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2016, 35(22):2893-2901. DOI:10.1038/nc.2015.350.
- [16] Xu M, Fang S, Song J, et al. CPEB1 mediates hepatocellular carcinoma cancer stemness and chemoresistance[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):957. DOI:10.1038/s41419-018-0974-2.
- (收稿日期:2023-07-27)
(本文编辑:严玮雯)

(上接第 788 页)

- [19] Fincham GS, James S, Spickett C, et al. Posterior vitreous detachment and the posterior hyaloid membrane[J]. *Ophthalmology*, 2018, 125(2):227-236. DOI:10.1016/j.ophtha.2017.08.001.
- [20] Henrich PB, Monnier CA, Halfter W, et al. Nanoscale topographic and biomechanical studies of the human internal limiting membrane[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(6):2561-2570. DOI:10.1167/iovs.11-8502.
- [21] 林铁柱, 惠延年. 飞蚊症的 YAG 激光治疗[J]. *国际眼科杂志*, 2023, 23(3):412-415. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.12.
- [22] Serpetopoulos CN, Korakitis RA. An optical explanation of the entoptic phenomenon of 'clouds' in posterior vitreous detachment[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 1998, 18(5):446-451.
- [23] Milston R, Madigan MC, Sebag J. Vitreous floaters: etiology, diagnostics, and management[J]. *Surv Ophthalmol*, 2016, 61(2):211-227. DOI:10.1016/j.survophthal.2015.11.008.
- [24] Huang KH, Weng TH, Chen YJ, et al. Iatrogenic posterior lens capsule rupture and subsequent complications due to Nd:YAG laser vitreolysis for vitreous floaters: a case report[J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 2018, 49(11):e214-e217. DOI:10.3928/23258160-20181101-21.
- [25] Koo EH, Haddock LJ, Bhardwaj N, et al. Cataracts induced by neodymium-yttrium-aluminum-garnet laser lysis of vitreous floaters[J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(6):709-711. DOI:10.1136/bjophthalmol-2016-309005.
- [26] O'Day R, Cugley D, Chen C, et al. Bilateral posterior capsule injury after Nd:YAG laser vitreolysis: unintended consequence of floaters treatment[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2018, 46(8):956-958. DOI:10.1111/ceo.13190.
- [27] Noristani R, Schultz T, Dick HB. Cataract formation after YAG laser vitreolysis: importance of femtosecond laser anterior capsulotomies in perforated posterior capsules[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2016, 26(6):e149-e151. DOI:10.5301/ejo.5000854.
- [28] Hahn P, Schneider EW, Tabandeh H, et al. Reported complications following laser vitreolysis[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2017, 135(9):973-976. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2017.2477.
- [29] Yang X, Shi C, Liu Q, et al. Spontaneous remission of vision degrading myodesopsia of posterior vitreous detachment type [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2023, 261(6):1571-1577. DOI:10.1007/s00417-022-05948-4.
- [30] Lin T, Wang D, Shen L. An energy efficiency assessment of Yttrium-aluminum-garnet laser in vitro[J]. *Lasers Med Sci*, 2024, 39(1):97. DOI:10.1007/s10103-024-04041-y.
- [31] Hayashi S, Yoshida M, Hayashi K, et al. Progression of posterior vitreous detachment after cataract surgery[J]. *Eye (Lond)*, 2022, 36(10):1872-1877. DOI:10.1038/s41433-021-01732-6.
- [32] Bjerrum SS, Mikkelsen KL, La Cour M. Risk of pseudophakic retinal detachment in 202,226 patients using the fellow non-operated eye as reference[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(12):2573-2579. DOI:10.1016/j.ophtha.2013.07.045.
- (本文由浙江省医学会推荐)
(收稿日期:2023-12-19)
(本文编辑:严玮雯)