

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.004

· 基础研究 ·

lncRNA GAS6-AS2靶向miR-125a-3p调控肺癌 A549 细胞紫杉醇敏感性

彭文^a, 范长玲^b, 张浩^a (海南省儋州市人民医院 a. 胸心外科; b. 病理科, 海南 儋州 571799)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) GAS6-AS2 对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭及紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 敏感性的影响及其分子机制。 **方法:** 用 qPCR 法检测肺癌 A549 和 A549/PTX 细胞中 GAS6-AS2 和 miR-125a-3p 的表达水平。用脂质体转染技术, 分别将 si-NC、si-GAS6-AS2、miR-NC、miR-125a-3p、pcDNA、pcDNA-GAS6-AS2、si-GAS6-AS2+anti-miR-NC、si-GAS6-AS2+anti-miR-125a-3p 等转染入 A549/PTX 细胞, 同时用不同浓度 (1、5、10、20、40 nmol/L) PTX 处理 A549 和 A549/PTX 细胞, WB 法检测细胞中增殖、迁移与侵袭相关蛋白 cyclin D1、p21、MMP2 和 MMP9 的表达水平, MTT 法检测 PTX 对 A549/PTX 细胞的增殖抑制作用, Transwell 小室法检测细胞的迁移和侵袭能力。用双荧光素酶报告基因实验验证 GAS6-AS2 和 miR-125a-3p 之间的调控关系。 **结果:** GAS6-AS2 在 A549/PTX 细胞中表达水平显著高于 A549 细胞 ($P<0.01$), miR-125a-3p 在 A549/PTX 细胞中表达水平显著低于 A549 细胞 ($P<0.01$)。不同浓度 PTX 处理后 A549/PTX 细胞的增殖抑制率显著低于 A549 细胞 (均 $P<0.01$), 且呈浓度依赖性。抑制 GAS6-AS2 或过表达 miR-125a-3p 联合 PTX 处理均可抑制 A549/PTX 细胞的迁移和侵袭能力, 增强 PTX 对细胞的增殖抑制, 上调 p21 表达量, 下调 cyclin D1、MMP2 和 MMP9 表达量 (均 $P<0.01$)。GAS6-AS2 靶向负调控 miR-125a-3p 的表达。干扰 miR-125a-3p 可逆转抑制 GAS6-AS2 对 A549/PTX 细胞增殖、迁移、侵袭和 PTX 敏感性的作用 (均 $P<0.01$)。 **结论:** 抑制 GAS6-AS2 通过靶向 miR-125a-3p 抑制肺癌 A549/PTX 细胞的增殖、迁移和侵袭, 增强细胞 PTX 敏感性, GAS6-AS2 是肺癌潜在的分子靶点。

[关键词] 长链非编码 RNA GAS6-AS2; miR-125a-3p; 肺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 紫杉醇敏感性

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)01-0023-08

lncRNA GAS6-AS2 regulates paclitaxel sensitivity in lung cancer A549 cells by targeting miR-125a-3p

PENG Wen^a, FAN Changling^b, ZHANG Hao^a (a. Department of Cardiothoracic Surgery; b. Department of Pathology, Danzhou People's Hospital, Danzhou 571799, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and molecular mechanism of lncRNA GAS6-AS2 on the proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells and its sensitivity to paclitaxel (PTX). **Methods:** qPCR was used to detect the levels of GAS6-AS2 and miR-125a-3p in lung cancer A549 and A549/PTX cells. Si-NC, si-GAS6-AS2, miR-NC, miR-125A-3p, pcDNA, PCDNA-GAS6-AS2, si-GAS6-AS2+anti-miR-GAS6-AS2 and si-GAS6-AS2+anti-miR-125A-3p were transfected into A549/PTX cells by liposomal transfection. A549 and A549/PTX cells were treated with PTX of different concentrations (1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L, 40 nmol/L). WB was used to detect the expression levels of proliferation, migration and invasion related proteins (cyclin D1, p21, MMP2 and MMP9). MTT assay was used to determine the inhibitory effect of PTX on A549/PTX cell proliferation. Transwell assay was applied to detect cell migration and invasion ability of cells. Dual-luciferase reporter gene system was performed to verify the relationship between GAS6-AS2 and miR-125a-3p. **Results:** The expression level of GAS6-AS2 in A549/PTX cells was significantly higher than that in A549 cells ($P<0.01$), and the expression level of miR-125a-3p in A549/PTX cells was significantly lower than that in A549 cells ($P<0.01$). The inhibitory rates of PTX at different concentrations on A549/PTX cells were significantly lower than that on A549 cells ($P<0.01$), in a concentration-dependent manner. GAS6-AS2 knockdown or miR-125a-3p over-expression combined with PTX treatment could inhibit A549/PTX cell migration and invasion, enhance inhibition rate of PTX on cell proliferation, promote the expression of p21 protein, and suppress the expressions of cyclin D1, MMP2 and MMP9 (all $P<0.01$). GAS6-AS2 targeted and negatively regulated the expression of miR-125a-3p. Interfering miR-125a-3p reversed the effects of

[基金项目] 海南省卫健委科研资助项目 (No. 1605320273A2001)。Project supported by Commission of Health and Family Planning of Hainan Province (No. 1605320273A2001)

[作者简介] 彭文 (1985-), 男, 学士, 主治医师, 主要从事胸部肿瘤的临床研究, E-mail: gaamm84@163.com

[通信作者] 张浩 (ZHANG Hao, corresponding author), 硕士, 主任医师, 主要从事胸部肿瘤的临床研究, E-mail: zzhh1279@163.com

GAS6-AS2 knockdown on proliferation, migration, invasion and PTX sensitivity of A549/PTX cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** GAS6-AS2 knockdown inhibits proliferation, migration and invasion of A549/PTX cells and enhances sensitivity of cells to PTX by targeting miR-125a-3p; thus, it can be used as a potential molecular target for lung cancer.

[Key words] lncRNA GAS6-AS2; miR-125a-3p; lung cancer; proliferation; migration; invasion; paclitaxel sensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(1): 23-30. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.01.004]

肺癌是世界上发病率和病死率最高的肿瘤,它具有复发率高和易转移等特点,紫杉醇(paclitaxel, PTX)是晚期肺癌治疗的常用化疗药物,但越来越多的患者表现出显著的耐药性^[1]。研究肺癌细胞PTX耐药机制,为肺癌的治疗提供更有效的化疗增敏方法是目前临床与基础研究的重点。研究^[2]发现,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在耐药和药敏肺癌细胞中表达异常,可能导致患者对药物的耐药性。lncRNA GAS6-AS2在膀胱癌、黑色素瘤组织和细胞中均表达上调,其表达水平与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡有关^[3-4]。LncBase Predicted v.2 预测发现,miR-125a-3p与GAS6-AS2之间存在互补的结合位点。miR-125a-3p在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中低表达^[5],过表达miR-125a-3p可增加胰腺导管腺癌细胞对吉西他滨(gemcitabine)药物的化疗敏感性^[6]。但GAS6-AS2和miR-125a-3p在肺癌PTX耐药细胞A549/PTX中的表达、两者间关系及其对A549/PTX细胞药物敏感性影响的机制目前尚未明了。因此,本项目主要研究GAS6-AS2和miR-125a-3p对肺癌A549/PTX细胞增殖、侵袭、迁移或PTX敏感性的影响及其作用机制,以期对肺癌PTX耐药性提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

肺癌细胞株A549和肺癌PTX耐药株A549/PTX购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

PTX购自上海源叶生物科技有限公司, si-GAS6-AS2和阴性对照si-NC、miR-NC、miR-125a-3p mimics(miR-125a-3p)、pcDNA、pcDNA-GAS6-AS2及空载体均购自上海吉玛制药技术有限公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和高糖RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司, RNA提取试剂TRIzol、MTT细胞增殖检测试剂盒购自Sigma-Aldrich公司, Transwell小室购自美国Corning公司, Lipofectamine™ 2000转染试剂、实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒、逆转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, 双荧光素酶报告系统购自美国Promega公司, cyclin D1、p21、MMP2、MMP9和GAPDH抗体、羊抗兔IgG二抗购自英国Abcam公司, BCA蛋白检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

细胞培养: 将A549和A549/PTX细胞培养于含10% FBS、1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中, 置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

细胞转染与分组: 按照 2×10^5 个细胞/孔密度将对数生长期A549/PTX细胞接种于6孔板, 根据Lipofectamine™ 2000将si-NC、si-GAS6-AS2、miR-NC、miR-125a-3p、pcDNA、pcDNA-GAS6-AS2、si-GAS6-AS2+anti-miR-NC、si-GAS6-AS2+anti-miR-125a-3p等各组载体或片段转染入A549/PTX细胞, 分别记为si-NC组、si-GAS6-AS2组、miR-NC组、miR-125a-3p组、pcDNA组、pcDNA-GAS6-AS2组、si-GAS6-AS2+anti-miR-NC组、si-GAS6-AS2+anti-miR-125a-3p组。转染48 h后收集细胞, 检测各组细胞的转染效率。

1.3 qPCR法检测肺癌细胞中GAS6-AS2和miR-125a-3p的表达水平

用TRIzol试剂提取A549和A549/PTX细胞总RNA, 逆转录试剂盒合成cDNA, 按照qPCR说明书的方法进行反应。引物序列: miR-125a-3p F为5'-ACACTCCAGCTGGGACAGGTGAGGTTCTTG-3', R为5'-CTCAACTGGTGTCTGTCGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGGCTCCCA-3'; GAS6-AS2 F为5'-GC-GATGGGGTAAAAGGAGG-3', R为5'-TCACGAGG TCAGGAGATTG-3'; GAPDH F为5'-ACCCACTCC TCCACCTTTGA-3', R为5'-CTGTTGCTGTAGCCA AATTCGT-3'。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算GAS6-AS2和miR-125a-3p的相对表达量。

1.4 MTT法检测肺癌细胞的增殖抑制率

将PTX处理或/和转染后的A549和A549/PTX细胞按照每孔 2×10^3 个细胞接种96孔板, 过夜后加入不同浓度(1、5、10、20、40 nmol/L)的PTX, 培养48 h后加入5 g/L的MTT溶液(20 μl/孔), 培养4 h后弃上清, 加入DMSO(150 μl/孔), 室温震荡5 min后, 于酶标仪上测定波长在490 nm处的光密度(D)值, 检测细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(对照组D值-实验组D值)/对照组D值 $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell小室法检测肺癌细胞的迁移及侵袭能力

细胞迁移实验: 用无血清RPMI 1640培养基稀释各转染组细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个细胞/ml。Transwell上室内加入100 μl细胞悬液, 下室内加入500 μl含10%FBS的RPMI 1640培养基。培养48 h后, 用棉签拭去上室的细胞, 用4%多聚甲醛溶液固

定细胞后, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 在光学显微镜($\times 200$)下观察并计数穿膜细胞数。

细胞侵袭实验: 取适量采用无血清培养基按 1:8 比例稀释的 Matrigel 基质胶均匀铺于上层小室, 室温固化 30 min 备用, 其他实验步骤同迁移实验。

1.6 WB 法检测肺癌细胞中增殖、迁移与侵袭相关蛋白的表达水平

收集各组 A549/PTX 细胞, 加入细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 取 30 μ g 蛋白样品上样, 进行 SDS-PAGE、转膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 分别加入以 1:1 000 稀释的 cyclin D1、MMP2 和 MMP9 以及 p21 (1:2 000) 和 GAPDH (1:3 000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日, 加入羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 500) 室温孵育 1 h 后, 加入 ECL 发光剂显影、拍照。以 GAPDH 为内参, 用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 GAS6-AS2 与 miR-125a-3p 的靶向关系

利用 LncBase Predicted v.2 预测 GAS6-AS2 与 miR-125a-3p 之间的互补结合位点。根据 1.2 的方法将构建的 GAS6-AS2 的野生型 (WT-GAS6-AS2) 和突变型 (MUT-GAS6-AS2) 报告载体分别与 miR-NC 或

miR-125a-3p 共转染 A549/PTX 细胞, 转染 48 h 后, 收集细胞应用双荧光素酶检测系统检测荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

qPCR 法、MTT 法、Transwell 小室法、WB 法等实验均重复 3 次。采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立成功转染 si-GAS6-AS2、miR-125a-3p 等质粒的 A549/PTX 细胞系

在荧光显微镜下观察 si-NC、si-GAS6-AS2、miR-NC、miR-125a-3p、pcDNA、pcDNA-GAS6-AS2、si-GAS6-AS2+anti-miR-NC 和 si-GAS6-AS2+anti-miR-125a-3p 组大多数细胞内都出现绿色荧光, 分布于细胞质中 (图 1)。各组细胞的转染效率分别为 $(82.33 \pm 2.51)\%$ 、 $(80.20 \pm 3.01)\%$ 、 $(81.53 \pm 3.11)\%$ 、 $(84.43 \pm 3.71)\%$ 、 $(84.88 \pm 2.66)\%$ 、 $(85.51 \pm 4.01)\%$ 、 $(88.21 \pm 4.21)\%$ 和 $(86.14 \pm 3.11)\%$ 。

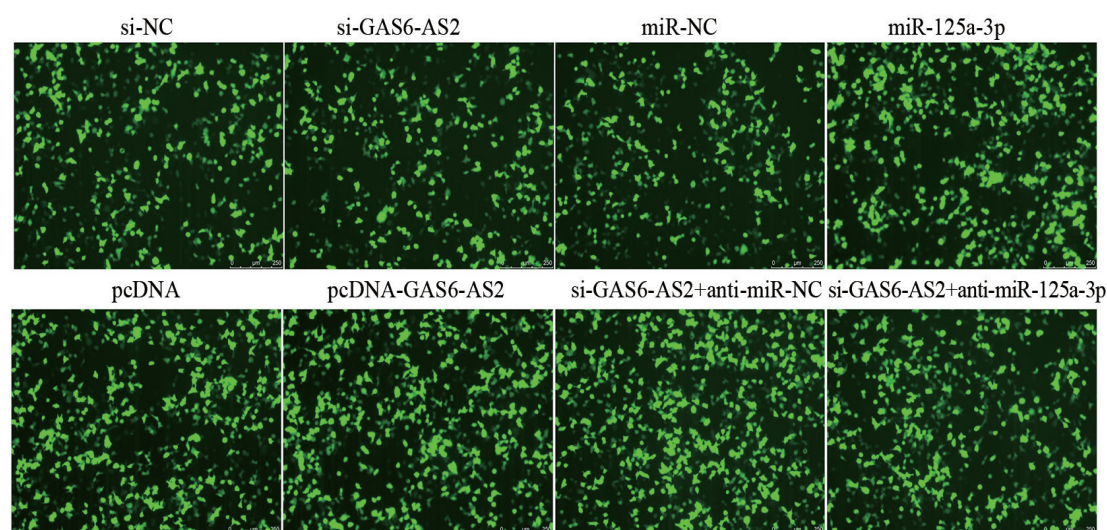


图 1 各实验组细胞的载体或片段的转染结果($\times 200$)

Fig.1 Vector or fragment transfection results in cells of each experimental group ($\times 200$)

2.2 A549/PTX 细胞中 GAS6-AS2 高表达、miR-125a-3p 低表达

qPCR 法检测结果 (图 2) 显示, 与 A549 细胞相比, GAS6-AS2 在 A549/PTX 细胞中的表达水平显著升高 ($t=18.341$, $P < 0.01$; 图 2A), miR-125a-3p 在 A549/PTX 细胞中表达水平显著降低 ($t=18.832$, $P < 0.01$; 图 2B)。

2.3 不同浓度 PTX 对 A549 和 A549/PTX 细胞的增殖抑制作用

用不同浓度 (1、5、10、20、40 nmol/L) 的 PTX 分别处理后, MTT 实验结果 (图 3) 显示, 随着浓度的升高, PTX 对 A549 细胞和 A549/PTX 细胞的增殖抑制率逐渐升高, 40 nmol/L PTX 作用时 A549/PTX 细胞增殖抑制率显著低于 A549 细胞 [$(37.15 \pm 3.64)\%$ vs

(81.69 ± 8.14)%, $t=14.985$, $P<0.01$], A549/PTX 细胞的 IC_{50} 显著低于 A549 细胞 [(14.44 ± 1.38) vs (78.89 ± 6.22) nmol/L, $t=30.347$, $P<0.01$]。实验结果表明, PTX 对

A549/PTX 细胞的增殖抑制率显著低于 A549 细胞, 所以, 后续实验选择对 A549/PTX 细胞增殖抑制率在 10% 左右的 PTX 浓度 (5 nmol/L)。

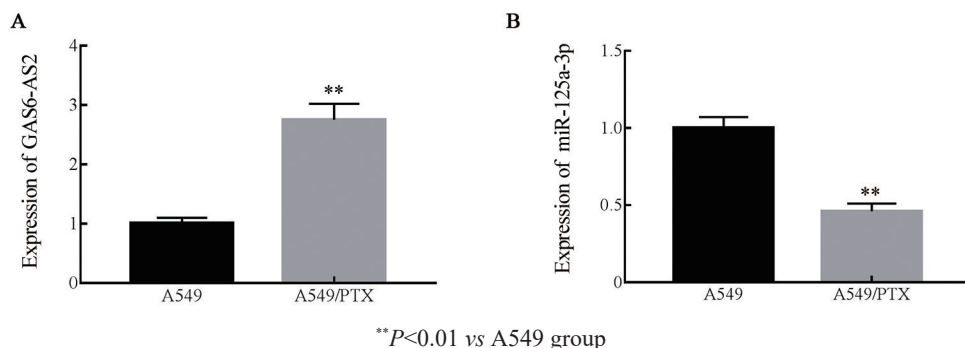


图2 A549/PTX 细胞中 GAS6-AS2(A) 和 miR-125a-3p(B) 的表达

Fig.2 Expression of GAS6-AS2 (A) and miR-125a-3p (B) in A549/PTX cells

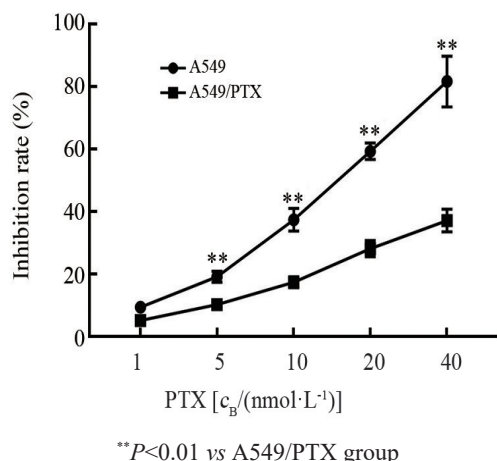


图3 不同浓度 PTX 对 A549 和 A549/PTX 细胞抑制率的影响
Fig.3 Effects of paclitaxel at different concentrations on inhibition rates of A549 and A549/PTX cells

2.4 抑制 GAS6-AS2 联合 PTX 显著降低 A549/PTX 细胞的增殖、迁移及侵袭能力

抑制 GAS6-AS2 表达联合 PTX (5 nmol/L) 处理后, 与 PTX+si-NC 组相比, PTX+si-GAS6-AS2 组 A549/PTX 细胞中 GAS6-AS2 mRNA 表达水平显著降低 ($t=14.946$, $P<0.01$; 图 4A)、细胞增殖抑制率显著升高 ($t=22.178$, $P<0.01$; 图 4B)、迁移和侵袭细胞数均显著降低 ($t=13.843$ 、 14.049 , 均 $P<0.01$; 图 4C), 细胞中 cyclin D1、MMP-2 和 MMP-9 表达水平显著降低 ($t=18.336$ 、 15.801 、 18.336 , 均 $P<0.01$)、p21 含量升高 ($t=18.120$, $P<0.01$; 图 4D)。实验结果表明, 抑制 GAS6-AS2 能够显著增强 PTX 对 A549/PTX 细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

2.5 过表达 miR-125a-3p 联合 PTX 显著抑制 A549/PTX 细胞的增殖、迁移及侵袭能力

过表达 miR-125a-3p 联合 PTX (5 nmol/L) 处理

后, 与 PTX+miR-NC 组相比, PTX+miR-125a-3p 组 A549/PTX 细胞中 miR-125a-3p 表达水平显著升高 ($t=19.184$, $P<0.01$; 图 5A), 细胞的增殖抑制率显著升高 ($t=18.942$, $P<0.01$; 图 5B)、迁移及侵袭细胞数均显著降低 ($t=11.426$ 、 11.826 , 均 $P<0.01$; 图 5C), 细胞中 cyclin D1、MMP2 和 MMP9 表达水平显著降低 ($t=14.758$ 、 13.081 、 13.787 , 均 $P<0.01$), p21 表达水平显著升高 ($t=16.151$, $P<0.01$; 图 5D)。实验结果表明, 过表达 miR-125a-3p 可显著抑制 A549/PTX 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 增强 A549/PTX 细胞的 PTX 药物敏感性。

2.6 GAS6-AS2 靶向调控 miR-125a-3p 的表达

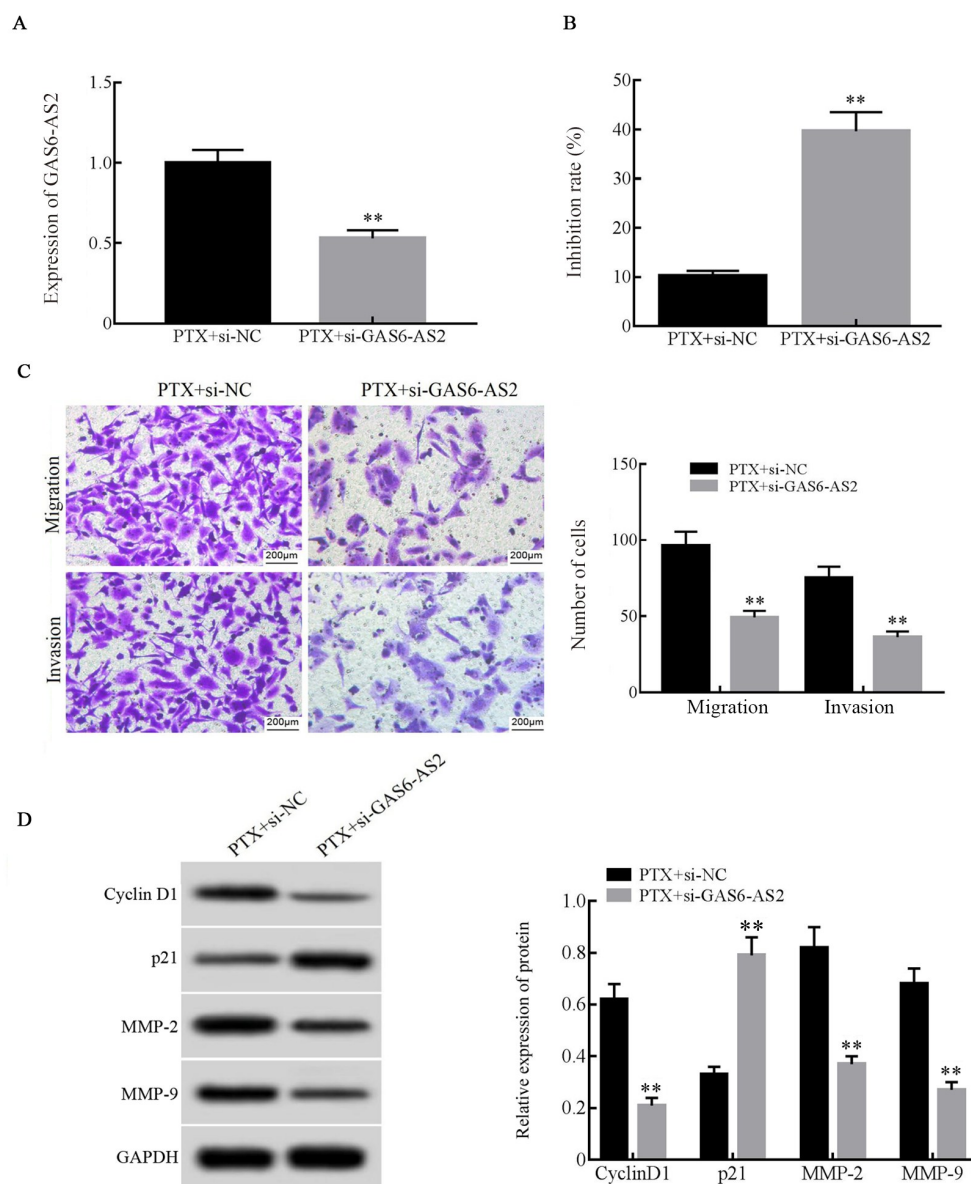
通过 LncBase Predicted v.2 预测发现, GAS6-AS2 与 miR-125a-3p 存在互补结合位点 (图 6A)。双荧光素酶报告基因实验结果 (图 6B) 表明, 与 miR-NC 组相比, miR-125a-3p 组的 WT-GAS6-AS2 的相对荧光素酶活性显著降低 ($t=18.581$, $P<0.01$), 而 MUT-GAS6-AS2 的相对荧光素酶活性无明显变化 ($t=0.282$, $P>0.05$)。WB 实验结果 (图 6C) 发现, 过表达 GAS6-AS2 可降低 A549/PTX 细胞中 miR-125a-3p 表达水平 ($t=18.783$, $P<0.01$); 抑制 GAS6-AS2 可上调 miR-125a-3p 表达水平 ($t=17.664$, $P<0.01$)。研究结果表明, GAS6-AS2 对 miR-125a-3p 具有靶向负调控作用。

2.7 干扰 miR-125a-3p 表达逆转抑制 GAS6-AS2 对 A549/PTX 细胞 PTX 敏感性的影响

与 PTX+si-GAS6-AS2+anti-miR-NC 组相比, PTX+si-GAS6-AS2+anti-miR-125a-3p 组 A549/PTX 中 miR-125a-3p 表达水平显著降低 ($t=12.793$, $P<0.01$; 图 7A), 细胞增殖抑制率显著降低 ($t=15.422$, $P<0.01$; 图 7B), 迁移及侵袭细胞数均显著增多 ($t=11.376$ 、

10.315, 均 $P < 0.01$; 图 7C), cyclin D1、MMP2 和 MMP9 表达水平升高 ($t=14.920$ 、 14.561 、 15.435 , 均 $P < 0.01$), p21 表达水平显著降低 ($t=14.561$, $P < 0.01$; 图 7D)。

结果表明, 干扰 miR-125a-3p 逆转了抑制 GAS6-AS2 对 A549/PTX 细胞增殖、迁移、侵袭和 PTX 药物敏感性的作用。



** $P < 0.01$ vs PTX+si-NC group

图4 抑制 GAS6-AS2 表达联合 PTX 对 A549/PTX 细胞 GAS6-AS2 表达(A)、增殖(B)、迁移及侵袭(C)及相关蛋白表达(D)的影响
Fig.4 Effects of GAS6-AS2 knockdown combined with PTX on GAS6-AS2 expression (A), proliferation (B), migration and invasion (C) and related protein expressions (D) in A549/PTX cells

3 讨论

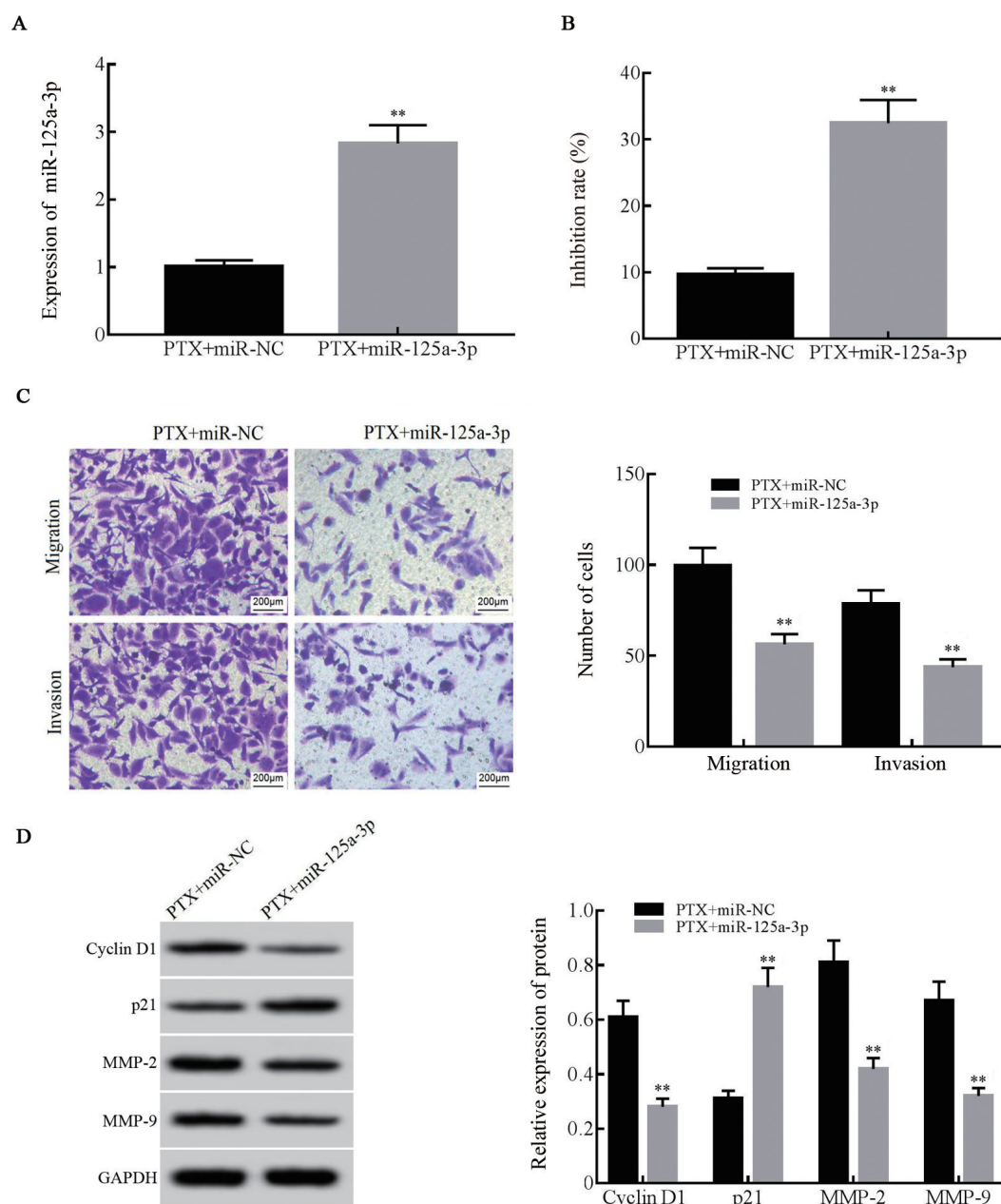
研究^[7-9]表明, 多种 lncRNA 与肺癌细胞的耐药性有关, 包括 HOTAIR、XIST 和 RP11-513G11.1 等 lncRNA 均可通过不同的途径调控肺癌细胞的耐药性。研究 lncRNA 在肺癌 PTX 耐药中调控机制可发现肺癌新的化疗增敏靶点, 对延长患者生存时间具有重要意义。

最近的研究^[3-4]发现, GAS6-AS2 在膀胱癌和黑色

素瘤中是一种致癌 lncRNA, 在肿瘤组织和细胞中高表达, 促进肿瘤细胞增殖和转移。GAS6-AS2 在乳腺癌组织和细胞中表达上调, 其表达与患者肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期和短生存期相关, 敲减其表达可靶向 miR-493 上调岩藻糖基转移酶 4 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[10]。GAS6-AS2 的转录和表达增加可促进 GAS6 配体及其 TAM (TYRO3-AXL-MER2K) 受体的上调, 从而促进细胞存活和急性髓细胞性白血病细胞对阿糖胞苷 (Ara-C)

的耐药性^[11]。GAS6-AS2 在肺癌中的表达水平和其与肺癌细胞耐药性是否有关尚不清楚。本研究发现,与正常肺癌 A549 细胞相比,GAS6-AS2 在 A549/PTX 细胞中表达水平显著上调,同一浓度 PTX 对 A549/PTX 细胞的增殖抑制率显著低于 A549 细胞,A549/PTX 细胞对 PTX 的 IC_{50} 显著高于 A549 细胞,结果说明 GAS6-AS2 表达上调可能与 A549 细胞 PTX 耐药性相关。进一步分析发

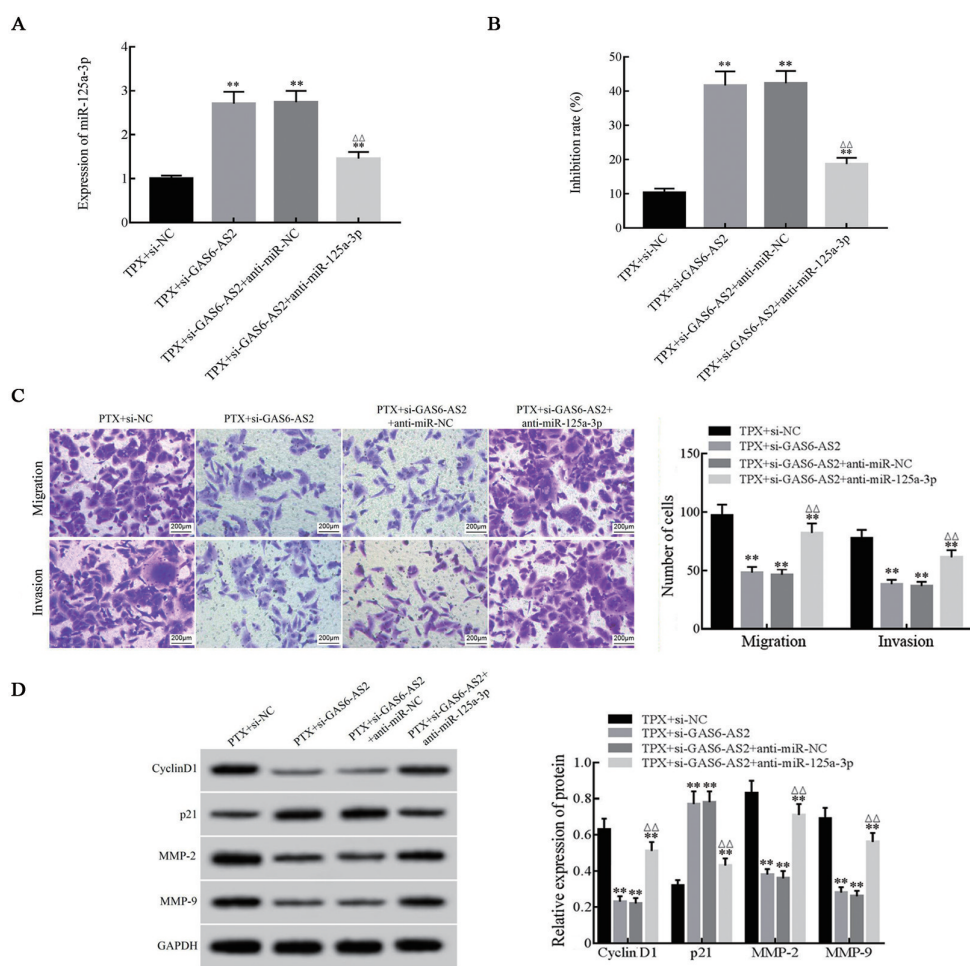
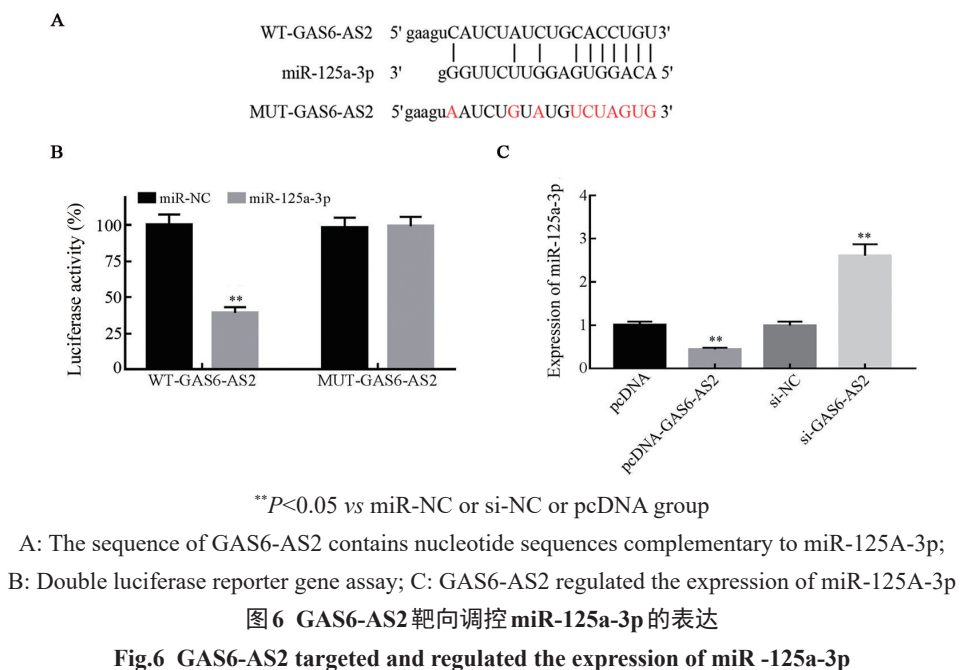
现,抑制 GAS6-AS2 显著增强 PTX 对 A549/PTX 细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用,上调抗增殖蛋白 p21 表达,下调促增殖蛋白 cyclin D1、促侵袭蛋白 MMP2 和 MMP9 的表达,说明抑制 GAS6-AS2 可能通过影响 A549/PTX 细胞增殖、迁移和侵袭进而提高其对 PTX 的敏感性,是肺癌潜在的化疗增敏靶点。



** $P < 0.01$ vs PTX+si-NC group

图5 miR-125a-3p 过表达联合 PTX 对 A549/PTX 细胞 GAS6-AS2 表达(A)、增殖(B)、迁移及侵袭(C, 结晶紫染色法)及相关蛋白表达(D)的影响

Fig.5 Effects of miR-125a-3p over-expression combined with PTX on GAS6-AS2 expression (A), proliferation (B), migration and invasion (C, crystal violet staining) and related protein expressions (D) in A549/PTX cells



本研究通过 LncBase Predicted v.2 预测发现, miR-125a-3p 与 GAS6-AS2 存在结合位点,可能参与 GAS6-AS2 对肺癌的致癌和耐药机制。miR-125a-3p 在多种肿瘤中表达异常,是 miR-125a 的成熟形式,在 NSCLC 细胞中表达下调,过表达 miR-125a-3p 通过下调转移相关基因 1 (metastasis-associated gene 1, MTA1) 抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭^[12]。miR-125a-3p 在耐药前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 组织和细胞 PC-3 中的表达显著下调,增加了 PC-3 细胞对多西紫杉醇 (docetaxel, DOX) 的耐药性,而上调 miR-125a-3p 可调控 MTA1 诱导 PCa 细胞凋亡并有效降低了化疗耐药细胞 PC-3R 中的 DOX 耐药性^[13]。miR-125a-3p 在化疗耐药性乳腺癌组织和细胞中表达降低,敲除其可促进癌细胞增殖并抑制 DOX 诱导的细胞死亡,其过表达可能通过调控 BRCA1 信号减弱乳腺癌细胞对 DOX 的化疗耐药性^[14]。上述研究均提示 miR-125a-3p 表达下调与肿瘤细胞的耐药性有关。本研究结果显示,miR-125a-3p 在 A549/PTX 细胞中表达水平显著低于 A549 细胞,过表达 miR-125a-3p 显著增强 PTX 对 A549/PTX 细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用,提高其对 PTX 的敏感性,说明 miR-125a-3p 低表达在肺癌 PTX 耐药性中发挥重要作用。通过双荧光素酶报告基因实验发现, GAS6-AS2 靶向负调控 miR-125a-3p 的表达,干扰 miR-125a-3p 可逆转抑制 GAS6-AS2 对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭和 PTX 药物敏感性的影响,进一步证实了在肺癌中两者之间存在靶向调控关系。

综上所述,肺癌 A549/PTX 细胞中 GAS6-AS2 表达上调,miR-125a-3p 表达下调, GAS6-AS2 靶向 miR-125a-3p 调控 A549/PTX 细胞增殖、迁移、侵袭和 PTX 药物敏感性。GAS6-AS2 有望成为肺癌治疗的潜在化疗增敏靶点。

【参考文献】

- [1] LIN J J, SHAW A T. Resisting resistance: targeted therapies in lung cancer[J/OL]. Trends Cancer, 2016, 2(7): 350-364[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091655/>. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.05.010.
- [2] WANG L R, MA L N, XU F, et al. Role of long non-coding RNA in drug resistance in non-small cell lung cancer[J/OL]. Thorac Cancer, 2018, 9(7): 761-768[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6026617/>. DOI:10.1111/1759-7714.12652.
- [3] RUI X, WANG L, PAN H, et al. LncRNA GAS6-AS2 promotes bladder cancer proliferation and metastasis via GAS6-AS2/miR-298/CDK9 axis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 865-876. DOI: 10.1111/jcmm.13986.
- [4] WEN L, ZHENG Y, WEN X, et al. Increased expression of long noncoding RNA GAS6-AS2 promotes proliferation and inhibits apoptosis of melanoma cells via upregulating GAS6 expression[J]. IUBMB Life, 2019, 71(10): 1503-1514. DOI:10.1002/iub.2071.
- [5] HOU L K, LUO P, MA Y S, et al. MicroRNA-125a-3p downregulation correlates with tumorigenesis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J/OL]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4441-4448[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5649526/>. DOI:10.3892/ol.2017.6809.
- [6] LIU G D, JI L D, KE M J, et al. miR-125a-3p is responsible for chemosensitivity in PDAC by inhibiting epithelial-mesenchymal transition via Fyn[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 523-531[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29990840/>. DOI:10.1016/j.biopha.2018.06.114.
- [7] YANG Y, JIANG C Y, YANG Y, et al. Silencing of lncRNA-HOTAIR decreases drug resistance of non-small cell lung cancer cells by inactivating autophagy via suppressing the phosphorylation of ULK1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(4): 1003-1010. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.02.141.
- [8] SUN J, PAN L M, CHEN L B, et al. LncRNA XIST promotes human lung adenocarcinoma cells to cisplatin resistance via let-7i/BAG-1 axis[J/OL]. Cell Cycle, 2017, 16(21): 2100-2107[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731406/>. DOI:10.1080/15384101.2017.1361071.
- [9] 李文, 张玉高, 石敏, 等. LncRNA RP11-513G11.1 在小细胞肺癌患者化疗耐药和预后测评中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(11): 1166-1170. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.11.014.
- [10] LI W F, JIN X T, ZHAO Y M, et al. Long noncoding RNA GAS6-AS2 sponges microRNA-493, thereby enhancing the malignant characteristics of breast cancer cells via upregulation of FUT4[J/OL]. Pathol Res Pract, 2020, 216(2): 152772[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC31839366/>. DOI:10.1016/j.prp.2019.152772.
- [11] BESTER A C, LEE J D, CHAVEZ A, et al. An integrated genome-wide CRISPRa approach to functionalize lncRNAs in drug resistance[J/OL]. Cell, 2018, 173(3): 649-664. e20[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6061940/>. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.052.
- [12] ZHANG H, ZHU X, LI N, et al. miR-125a-3p targets MTA1 to suppress NSCLC cell proliferation, migration, and invasion[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(7): 496-503. DOI: 10.1093/abbs/gmv039.
- [13] LIU J Z, YIN F Y, YAN C Y, et al. Regulation of docetaxel sensitivity in prostate cancer cells by hsa-miR-125a-3p via modulation of metastasis-associated protein 1 signaling[J/OL]. Urology, 2017, 105: 208. e11-208. e17[2020-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28088556/>. DOI: 10.1016/j.urology.2017.01.001.
- [14] XU X, LV Y G, YAN C Y, et al. Enforced expression of hsa-miR-125a-3p in breast cancer cells potentiates docetaxel sensitivity via modulation of BRCA1 signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 479(4): 893-900. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.09.087.

【收稿日期】 2020-07-16

【修回日期】 2020-11-25

【本文编辑】 党瑞山