

let-7i-5p 在肺癌A549 耐吉西他滨增殖中的作用

张 斌^{1,2}, 杜沈霖³, 马 璇⁴, 符 甜⁵, 柯芷茵¹, 王雪纯¹, 刘勇军^{1*}, 梁爱玲^{1*} (1. 广东医科大学生物化学与分子生物学教研室, 临床生物化学教研室, 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 青岛市市立医院医学检验部, 山东青岛 266011; 3. 东莞市人民医院检验科, 广东东莞 523800; 4. 石家庄新乐市人民医院检验科, 河北石家庄 050700; 5. 湛江市中心医院检验科, 广东湛江 524001)

摘 要: 目的 研究miRNA let-7i-5p 在非小细胞肺癌细胞A549 耐吉西他滨增殖中作用。方法 在耐吉西他滨的A549 细胞(A549/G⁺)中过表达let-7i-5p, 在吉西他滨敏感的A549 细胞(A549/G⁻)中抑制let-7i-5p 表达, 分别用CCK-8、克隆形成、流式细胞术、Western-blot 检测细胞生长、凋亡、蛋白表达。结果 过表达let-7i-5p 抑制A549/G⁺ 细胞增殖、增加S 期细胞比例、上调细胞周期相关蛋白CDK6 和P21 表达($P<0.01$ 或 0.05); 而抑制let-7i-5p 表达起相反作用。结论 提高let-7i-5p 表达可降低A549/G⁺ 细胞对吉西他滨的耐药性, 并使A549/G⁺ 细胞阻滞在S 期发挥抑制细胞增殖的作用。

关键词: 非小细胞肺癌; let-7i-5p; 耐药; 吉西他滨

中图分类号: R 737

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 06-0613-08

Effect of let-7i-5p on gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer A549 cells

ZHANG Bin^{1,2}, DU Shen-Lin³, MA Xuan⁴, FU Tian⁵, KE Zhi-yin¹, WANG Xue-chun¹, LIU Yong-jun^{1*}, LIANG Ai-ling^{1*} (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Department of Clinical Biochemistry, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China; 3. Clinical Laboratory, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523058, China; 4. Clinical Laboratory, Xinle People's Hospital, Shijiazhuang 050700, China; 5. Clinical Laboratory, Zhanjiang Central People's Hospital, Zhanjiang 524045, China)

Abstract: Objective To study the role of microRNA let-7i-5p in gemcitabine resistant non-small cell lung cancer A549 cells. Methods let-7i-5p was overexpressed in gemcitabine resistant A549 cells (A549/G⁺) and downexpressed in gemcitabine sensitive A549 cells (A549/G⁻). Cell growth, apoptosis and protein expression were determined by CCK-8, clone formation, flow cytometry, and Western blot. Results Overexpression of let-7i-5p in A549/G⁺ cells suppressed proliferation, increased S phase, and upregulated cell cycle-associated proteins CDK6 and P21 ($P<0.01$ or 0.05). However, the effect of let-7i-5p downexpression was opposite in A549/G⁻ cells. Conclusion Overexpression of let-7i-5p can reduce gemcitabine resistance and inhibit proliferation via S phase blockade in A549/G⁺ cells.

Key words: non-small cell lung cancer; Let-7i-5p; drug resistance; gemcitabine

肺癌已经成为全球癌症相关死亡的主要原因^[1], 其中 80%~85% 为非小细胞肺癌(NSCLC)^[2]。目前, 放疗和化疗仍是治疗NSCLC 的主要手段。吉西他滨作为最重要的胞嘧啶核苷衍生物抗肿瘤药, 一方面作用于DNA 合成期(synthesis, S); 另一方面阻断细胞由G1 期到S 期进展, 干扰DNA 的自我复制, 促进细胞凋亡^[3]。

外泌体作为一类直径 30~150 nm 双层膜包裹的囊泡^[4], 可携带母本细胞遗传物质到受体细胞进行信息传递, 在肿瘤细胞发生、侵袭、转移及耐药方面发挥重要作用^[5]。微小RNA(miRNAs) 是一类具有调控功能的非编码RNA, 可调节mRNA 的表达, 改变靶蛋白的表达水平^[6]。肿瘤细胞的耐药也与miRNAs 的表达异常有关^[7]。

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(81071853)

作者简介: 张 斌 (1991-), 男, 硕士, 医师

通信作者: 刘勇军, 男, 博士, 教授, E-mail: liuyongjun@gdmu.edu.cn

梁爱玲, 女, 博士, 副教授, E-mail: liangailing@gdmu.edu.cn

miRNA 在肿瘤增殖、侵袭和耐药方面有重要作用,是肿瘤治疗的相关靶点^[8]。有研究显示,miRNA 一方面可以参与肿瘤细胞的耐药过程,另一方面还可以干扰上下游信号通路逆转肿瘤耐药^[9]。本课题组前期构建了对吉西他滨耐药的人类肺腺癌细胞株(A549/G⁺),分别提取了A549 敏感株(A549/G⁻)和耐药株(A549/G⁺)的外泌体,进行miRNAs 芯片检测和表达差异分析,发现let-7i-5p 是两株细胞中表达差异最大的miRNA;同时,生物信息学预测提示let-7i-5 发挥作用可能与细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6) 有关^[10]。本文旨在研究let-7i-5p 在A549/G⁺ 细胞耐受吉西他滨中所起的作用及机制,为阐明肺癌耐药机制提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

非小细胞肺癌吉西他滨敏感株A549/G⁻ 为本课题组保存;非小细胞肺癌耐吉西他滨耐药株A549/G⁺ 为本课题组诱导后保存。A549/G⁺ 细胞复苏后,常规消化并传代。let-7i-5p 及内参基因U6 为上海生工生物公司设计合成。let-7i-5p RT 引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACAGC-3';上游引物:5'-CGCGCGTGAGGTAGTAGTTTGT-3';下游引物:5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'。U6 RT 引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATCGACAAAAGC-3';上游引物:5'-AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG-3';下游引物:5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验细胞分为NC 组(转染let-7i-5p mimics NC)和let-7i-5p mimics 组(转染let-7i-5p mimics);let-7i-5p NC 组(转染inhibitor NC)和let-7i-5p inhibitor 组(转染let-7i-5p inhibitor)。

1.2.2 细胞增殖能力试验 各组细胞在含有不同浓度吉西他滨的培养基中培养至对数生长期后分别进行如下实验:首先用CCK-8 (cell counting kit-8) 进行细胞毒实验,在450 nm 波长处进行单波长测定各组细胞溶液吸光度,存活率(%)=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%,计算IC₅₀ 值;其次,进行细胞克隆形成实验,通过细胞计数计算细胞克隆形成率;使用细胞周期检测试剂盒(凯基生物科技公司)检测细胞周期的变化。在此实验的基础上,提取NC 组和let-7i-5p mimics 组细胞总RNA,交由广州锐博生物科技有限公司进行mRNA 测序,比较两组中差异表达的基因,预

测let-7i-5p 发挥作用的可能通路。

1.2.3 免疫印迹实验 转染let-7i-5p mimics 后,采用RIPA 法进行总蛋白提取,然后进行蛋白质定量测定,再经SDS-PAGE 胶进行电泳分离;随后在250 mA,120 min 将蛋白转移至PVDF 膜上,室温封闭90 min,然后进行一抗孵育[CDK6 抗体(1:1 000)、P21 抗体(1:2 000)、抗体CyclinA (1:1 000)、CDK2 抗体(1:1 000)均购自美国CST 科技有限公司]。随后与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温孵育1 h,最后加ECL 底物发光液进行曝光检测。同时设计let-7i-5p NC 组和let-7i-5p inhibitor 组,重复以上实验操作,观察实验结果并统计数据。

1.2.4 抑制P21 表达 在对A549/G⁺ 消化培养24 h 后,实验组同时转染let-7i-5p mimics 和siRNA-P21,对照组转染let-7i-5p mimics 和P21-NC,利用RT-qPCR 技术检测两组细胞中P21 的表达情况。同时为确定let-7i-5p 与P21 的关系,明确let-7i-5p 在S 期到G₂ 期的作用,在共同转染let-7i-5p 的条件下,设置一组抑制P21 的表达作为实验组(let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组),另一组作对照(let-7i-5p mimics-NC 组),比较在过表达let-7i-5p 的前提下,抑制P21 的表达,let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组与let-7i-5p mimics-NC 组细胞增殖能力以及细胞周期和细胞周期相关蛋白的变化。

1.3 统计学处理

实验数据通过采用3 次独立重复实验得出,结果用SPSS 17.0 统计软件进行分析,多样本均数比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用t 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

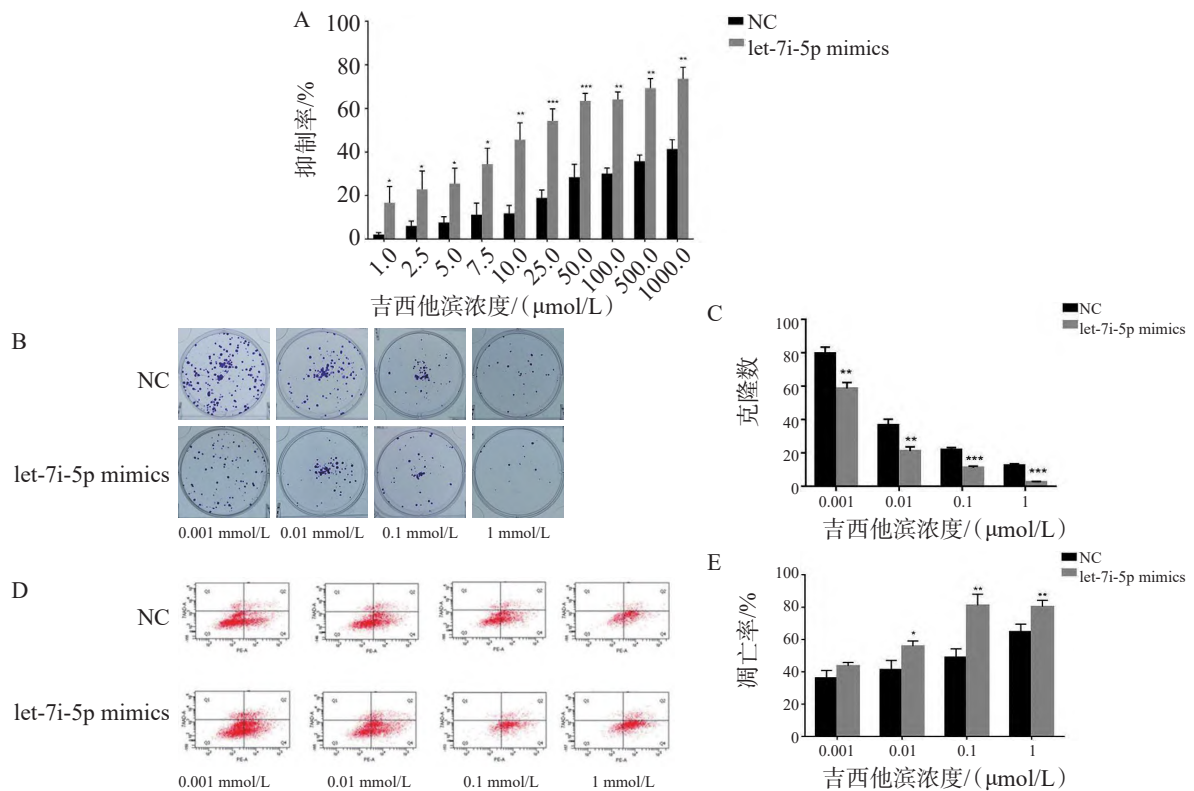
2 结果

2.1 let-7i-5p 使A549 细胞对药物的耐受性降低

同一浓度下let-7i-5p mimics 组的细胞存活率低于NC 组(图1A),IC₅₀ 值明显低于NC 组(34 μmol/L vs. 3 330 μmol/L)。转染let-7i-5p 后的细胞可降低A549/G⁺ 细胞群体依赖性和增殖能力(图1B、C)。let-7i-5p mimics 组的凋亡率高于NC 组(P<0.05,图1D、E)。同一药物浓度下,let-7i-5p inhibitor 组的细胞抑制率低于对照组let-7i-5p NC 组(P<0.05,图2)。

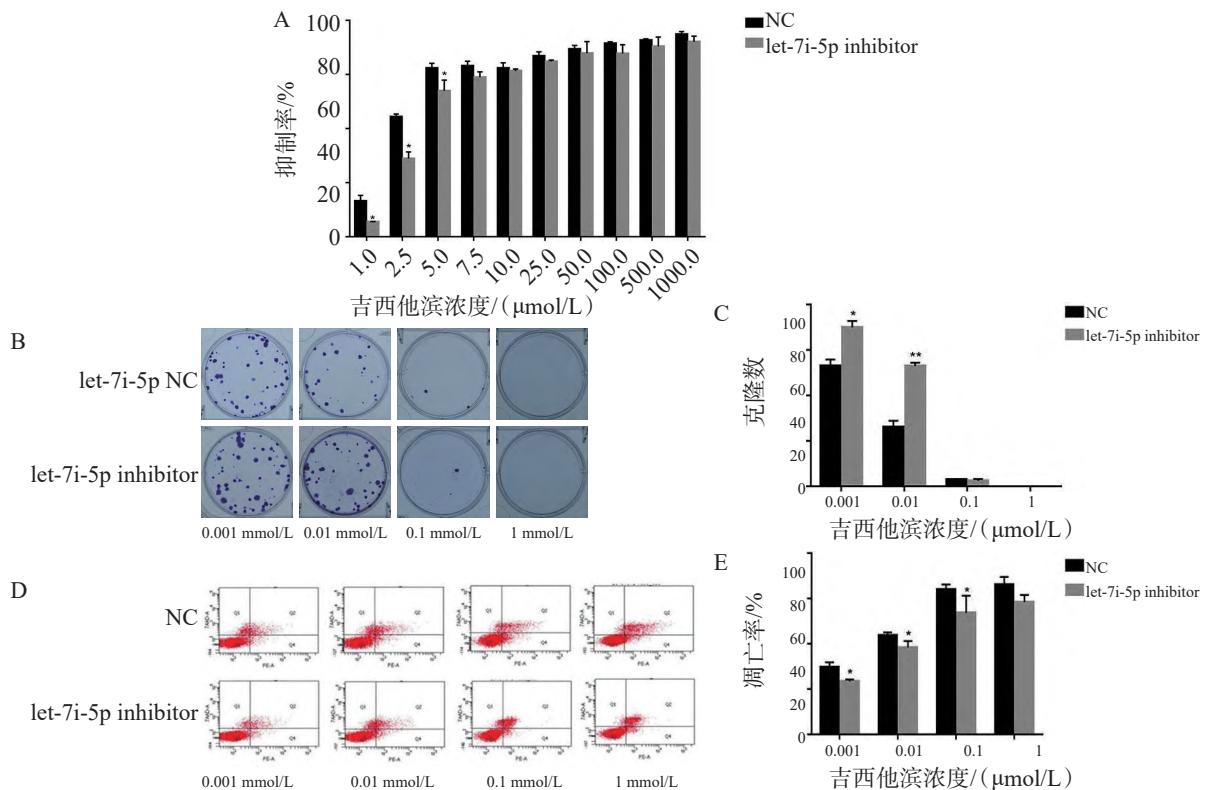
2.2 mRNA 测序显示let-7i-5p 发挥作用与细胞周期有关

与NC 组相比,转染let-7i-5p mimics 后,表达升高的基因有347 个,下调的基因有333 个;同时,KEGG 信号通路预测在细胞水平上,let-7i-5p 发挥作用与细



A: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞抑制率的比较; B: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞克隆增殖情况; C: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞增殖能力比较; D: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞凋亡情况; E: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞凋亡能力比较; let-7i-5p mimics 组与NC 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图1 不同浓度吉西他滨对let-7i-5p mimics 组和NC 组的作用比较



A: 不同药物浓度下let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞抑制率的比较; B: 不同药物浓度下let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞克隆增殖情况; C: 不同药物浓度下let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞增殖能力比较; D: 不同药物浓度下let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞凋亡情况; E: 不同药物浓度下let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞凋亡能力比较; let-7i-5p inhibitor 组与let-7i-5p NC 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图2 不同浓度吉西他滨对let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组作用的比较

胞周期通路有极大的相关性(图 3A)。差异表达的基因结果显示,与NC 组相比, let-7i-5p mimics 组CDK6 的表达升高(图 3B)。

2.3 let-7i-5p 促进细胞周期从G₁ 期向S 期转变

与对照组相比, A549/G⁺ 细胞在转染 let-7i-5p mimics 后细胞周期G₁ 期细胞比例下降, S 期细胞比例升高(图 4A、B、C); 另一方面, 与let-7i-5p NC 组相比, let-7i-5p inhibitor 组G₁ 期细胞占比轻度升高, S 期占比下降, G₂-M 期细胞占比升高($P<0.05$, 图 4D、E、F)。表明提高let-7i-5p 表达水平可促进A549/G⁺ 细胞周期从G₁ 期到S 期的进展, 阻碍S 期到G₂-M 的转变。

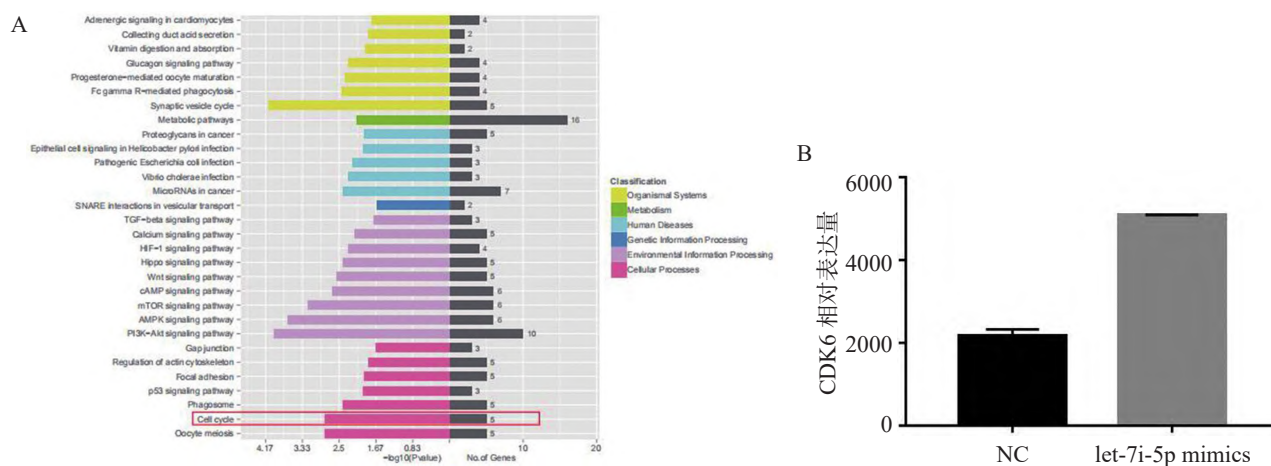
2.4 let-7i-5p 促进CDK6 和P21 的表达

let-7i-5p mimics 组的 CDK6 和 P21 蛋白表达水平明显高于 NC 组(图 5A、B); let-7i-5p mimics 组

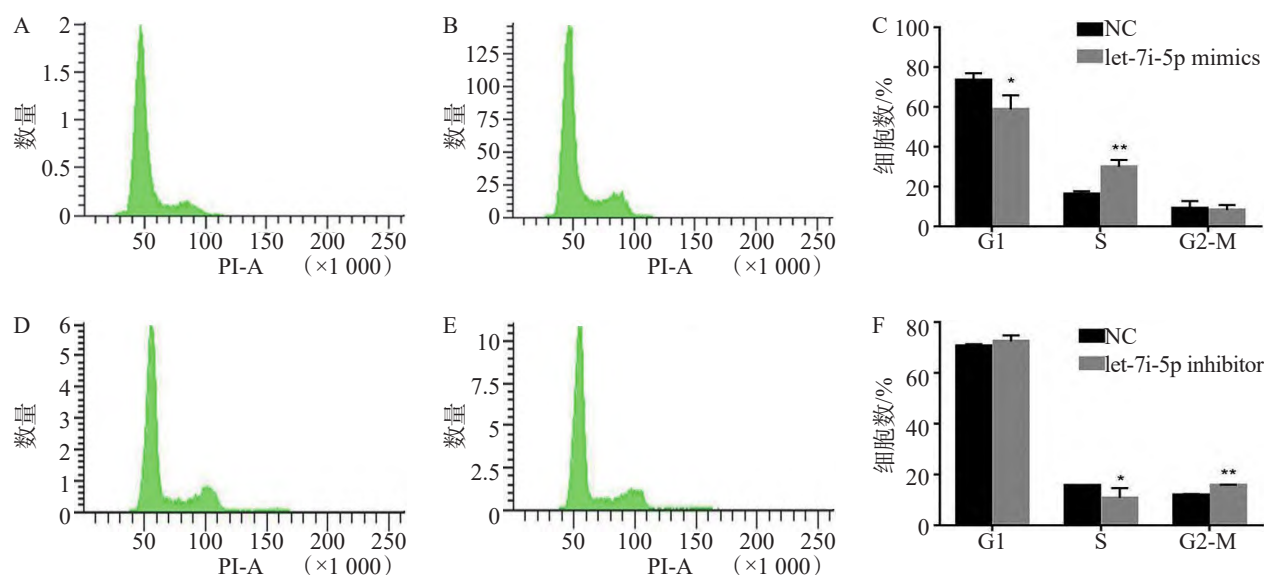
的 CyclinA 和 CDK2 蛋白表达水平明显低于 NC 组(图 5C、D), 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01 , 图 5E)。在抑制let-7i-5p 表达后, A549/G⁺ 细胞 Western-blot 结果显示let-7i-5p inhibitor 组中CDK6 和P21 表达低于NC 组, CyclinA 和CDK2 表达高于NC 组($P<0.05$ 或 0.01 , 图 5F、G)。

2.5 抑制P21 表达可抑制let-7i-5p mimics 对细胞株的致敏性

经过不同浓度梯度的吉西他滨处理后测得的 let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和 let-7i-5p mimics-NC 组的抑制率见图 6。在浓度较低时, 吉西他滨对两组的抑制率差异有统计学意义($P<0.05$, 图 6A)。let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组的 IC₅₀ 值高于 let-7i-5p mimics-NC 组 [35 $\mu\text{mol/L}$ (14~102 $\mu\text{mol/L}$) vs 117 $\mu\text{mol/L}$ (39~1 032

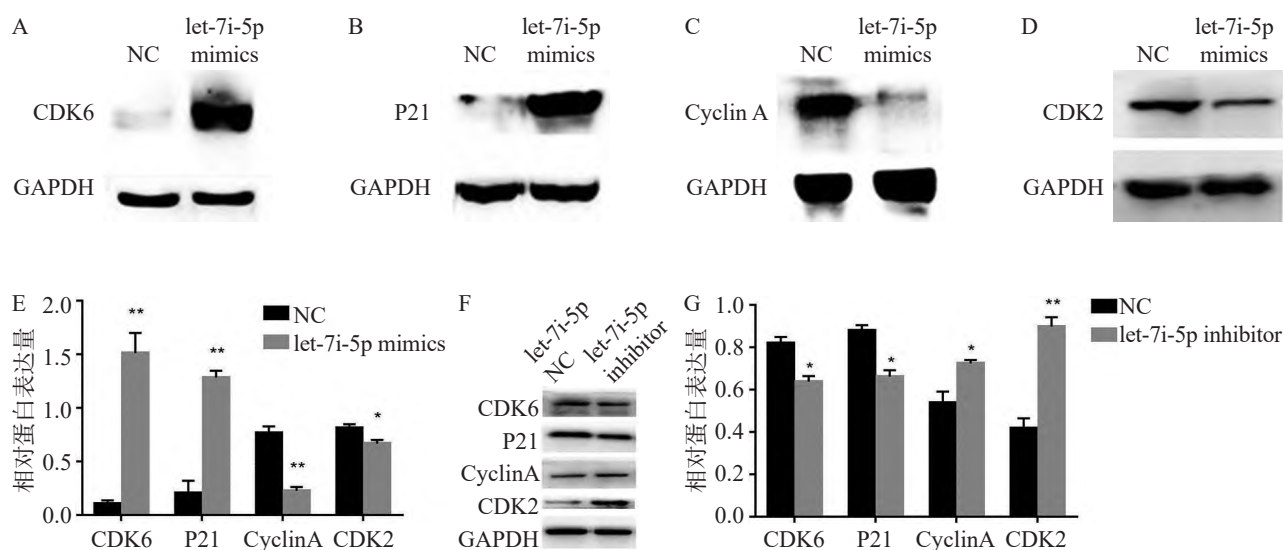


A: KEGG 信号通路预测图; B: let-7i-5p mimics 组和NC 组CDK6 的表达情况
图 3 mRNA 测序结果



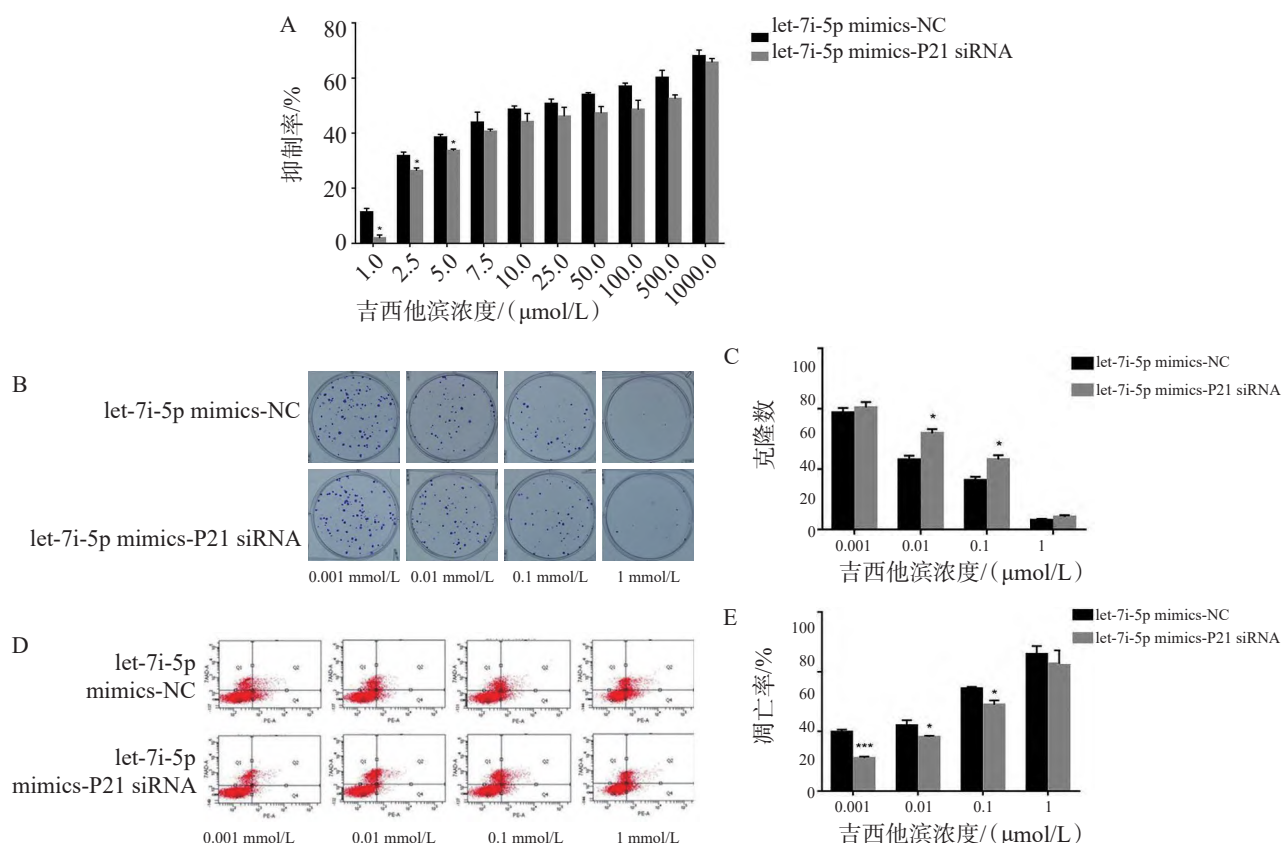
A: NC 组的细胞周期的变化; B: let-7i-5p mimics 组的细胞周期的变化; C: let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞周期变化的比较; D: let-7i-5p NC 组的细胞周期的变化; E: let-7i-5p inhibitor 组细胞周期的变化; F: let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞周期变化的比较; let-7i-5p mimics 组与NC 组比较, let-7i-5p inhibitor 组与let-7i-5p NC 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 4 let-7i-5p 对细胞周期变化的影响



A: let-7i-5p mimics 组和NC 组CDK6 的表达情况; B: let-7i-5p mimics 组和NC 组P21 的表达情况; C: let-7i-5p mimics 组和NC 组CyclinA 的表达情况; D: let-7i-5p mimics 组和NC 组CDK2 的表达情况; E: let-7i-5p mimics 组和NC 组细胞周期相关蛋白相对表达情况; F: let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞相关周期蛋白的表达; G: let-7i-5p inhibitor 组和let-7i-5p NC 组细胞相关周期蛋白的相对表达情况灰度分析; let-7i-5p mimics 组与NC 组比较, let-7i-5p inhibitor 组与let-7i-5p NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 细胞相关周期蛋白在各组的表达情况



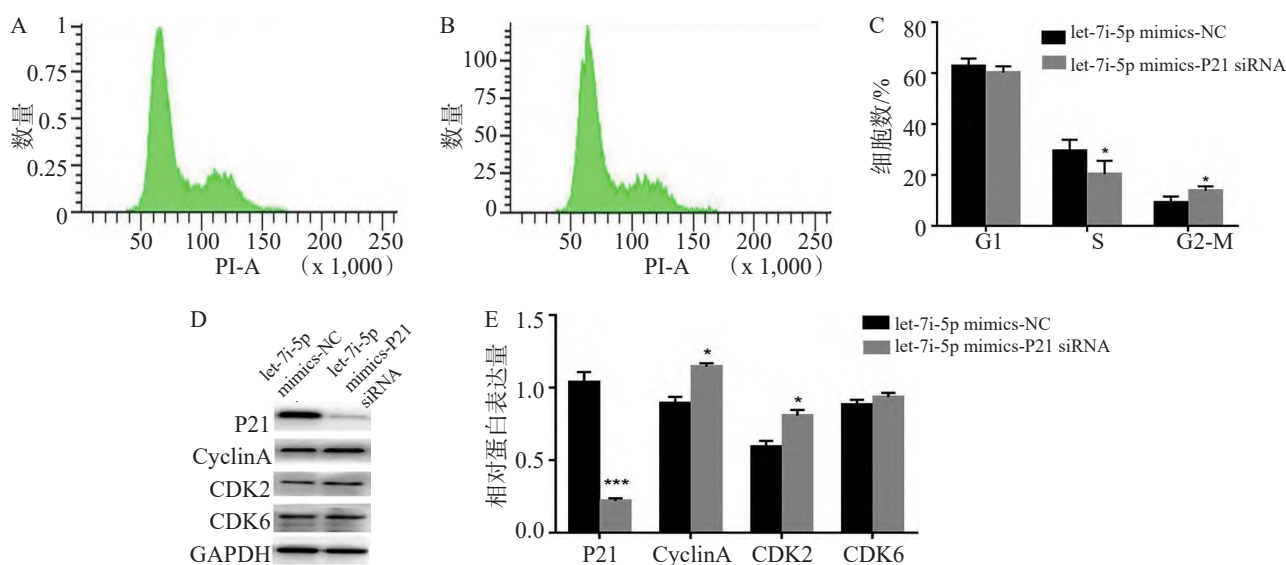
A: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组细胞抑制率的比较; B: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组细胞克隆增殖情况; C: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组细胞增殖能力比较; D: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组细胞凋亡情况; E: 不同药物浓度下let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组细胞凋亡能力比较; let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组与let-7i-5p mimics-NC 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

图6 不同浓度吉西他滨对let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和let-7i-5p mimics-NC 组的作用

$\mu\text{mol/L}$), $P<0.05$]。吉西他滨 0.001 mmol/L 时, 两组克隆数差异无统计学意义 ($P>0.05$); 吉西他滨 0.01 mmol/L 时, let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组克隆数为 let-7i-5p mimics-NC 组的 138.1% ; 吉西他滨 0.1 mmol/L 时, let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组克隆数约为 let-7i-5p mimics-NC 组的 142.6% ($P<0.05$, 图 6B、C)。流式细胞凋亡实验显示, 在药物浓度为 0.001 、 0.01 和 0.1 mmol/L 条件下, let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组的细胞凋亡率比 let-7i-5p mimics-NC 组低 ($P<0.05$, 图 6D、E)。提示转染 P21 siRNA 可以使经 let-7i-5p mimics 处理后变敏感的 A549/G⁺ 细胞重新产生耐药。

2.6 抑制P21 的表达后促进了细胞从S 期到G₂-M 期转变

流式细胞术结果显示 let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组中 S 期所占的比例少于 let-7i-5p mimics-NC 组, G₂-M 期的比例多于 let-7i-5p mimics-NC 组 ($P<0.05$, 图 7A、B、C)。Western-blot 结果表明 let-7i-5p mimics 在转染 P21 后细胞相关周期蛋白的表达有差异 (图 7D), let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组中 CDK2 和 CyclinA 的表达高于 let-7i-5p mimics-NC 组 ($P<0.05$), P21 的表达低于 let-7i-5p mimics-NC 组 ($P<0.01$), CDK6 的表达两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 7E。



A: let-7i-5p mimics-NC 组的细胞周期的变化; B: let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组的细胞周期的变化; C: let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和 let-7i-5p mimics-NC 组各周期细胞占比比较; D: let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和 let-7i-5p mimics-NC 组细胞周期蛋白的表达; E: let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和 let-7i-5p mimics-NC 组细胞周期蛋白相对表达情况灰度分析; let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组与 let-7i-5p mimics-NC 组比较: * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图 7 let-7i-5p mimics-P21 siRNA 组和 let-7i-5p mimics-NC 组细胞周期及其细胞周期蛋白表达水平比较

3 讨论

化疗是治疗肺癌最常用手段之一, 耐药是制约其疗效的主要障碍。虽然吉西他滨作为第 3 代化疗药物有比传统化疗药物具有更好的疗效, 但研究表明, 由于肿瘤细胞快速的耐药反应, 吉西他滨在治疗肺癌时的总有效率仅约 20% ^[11]。

let-7i-5p 作为 let 家族的一员, 与肿瘤的发生、发展有密切联系^[12]。研究表明, let-7i-5p 对肿瘤细胞的发生、发展起抑制作用。2018 年, Chhabra^[13] 发现 let-7i-5p 通过抑制表皮生长因子 / 磷脂酰肌醇-3-羟激酶 / SOX₂ 信号通路抑制宫颈癌肿瘤细胞的发生。Takamizawa 等^[14] 也报道了 let-7i 表达降低的非小细胞肺癌患者中, 其手术后生存期明显缩短。本文通过 CCK-8 细胞毒实验、克隆形成实验及流式细胞术等实

验表明 let-7i-5p 可以降低肺腺癌细胞 A549 对吉西他滨的耐药性, 使 A549/G⁺ 细胞对吉西他滨变得敏感。本文从过表达 let-7i-5p 和抑制 let-7i-5p 表达得出的结果都可说明这一点。

本研究对 let-7i-5p mimics 组和 NC 组进行的 mRNA 测序和 KEGG 通路分析表明, let-7i-5p 促进 A549 细胞发生耐药与细胞周期有关。同时, 两组间由于 let-7i-5p 表达水平改变引起的 CDK6 的变化可能是细胞周期发生改变的原因。细胞周期的改变又会影响细胞增殖及细胞对吉西他滨的耐受性。这为完善肺癌细胞 A549 耐吉西他滨机制提供了启示。

CDK6 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶, 具有促进 G₁ 期向 S 期进展, 缩短 DNA 复制周期, 促进细胞的增殖的作用^[15]。目前, 在肺癌、乳腺癌、头颈癌中均发现了 CDK6 的高表达^[16-17]。Shen 等^[18] 研究证实, let-7

可以通过调控CDK6的磷酸化作用,促进细胞从G₁期向S期过渡,从而加快细胞周期过程。流式细胞周期实验和Western-blot结果表明过表达let-7i-5p可提高CDK6的表达,CDK6促进了细胞周期从G₁期到S期进展。那么既然let-7i-5p促进G₁期向S期进展,为何let-7i-5p mimics组的细胞在耐吉西他滨增殖作用中的能力下降了呢?从细胞周期结果可以发现,与对照组相比,let-7i-5p mimics组细胞S期比例明显升高,而调控S期至G₂/M期的Cyclin A(细胞周期蛋白A)是细胞周期中的正性调控因子,在G₁晚期开始合成,含量在S期逐渐增加,于G₂/M期达到高峰^[19-20]。有研究证实,CyclinA在非小细胞肺癌^[21]、乳腺癌^[22]等多种肿瘤中高表达。而CDK2作为细胞周期蛋白依赖性激酶家族(CDKs)的重要成员,激活后与Cyclin A共同作用,形成CyclinA-CDK2复合物,对S期和G₂/M期过渡具有重要作用,促进了DNA复制的进行^[23]。有研究表明,抑制CyclinA-CDK2复合物的表达,可有效阻止肿瘤细胞的增殖^[24]。结合外泌体芯片miRNA差异表达分析,用差异表达最大的5种miRNAs进行生物信息学预测其下游基因,结果发现P21/CDKN1A基因具有很大的指向性。P21属于抑癌基因产物,是细胞周期的负调控蛋白^[25],可与相应的Cyclin-CDK复合物结合,使CDK失去蛋白激酶活性,阻止细胞周期的进行^[26-27]。目前已知P21可以结合作用的底物有CyclinA-CDK2^[28]、CyclinD-CDK4^[29]、CyclinE-CDK2^[30]等。

鉴于此,结合本实验结果,我们认为let-7i-5p可能是通过P21影响CyclinA-CDK2复合物的表达,间接影响细胞的周期,进而影响肿瘤细胞的增殖。为了验证上述推测,在A549/G⁺细胞中过表达let-7i-5p后,我们发现P21在let-7i-5p mimics组中是高表达的,随后又检测了CDK2及CyclinA的表达情况,结果显示,let-7i-5p mimics组中CyclinA及CDK2的表达量均低于NC组($P<0.05$),由此可见,let-7i-5p mimics组中低表达的CyclinA和CDK2阻滞了细胞周期从S期到G₂-M期的转化,使细胞复制周期停滞在S期,影响细胞的增殖。这与我们之前细胞的增殖行为的改变及流式细胞周期检测的结果都是一致的。随后,在A549/G⁻细胞中抑制let-7i-5p的表达从反方面论证了let-7i-5p对CDK6、P21的促进作用。

另一方面,在转染let-7i-5p mimics的基础上,对let-7i-5p mimics-P21 siRNA组的P21进行抑制表达,与let-7i-5p mimics-NC组相比,let-7i-5p mimics-P21 siRNA组中CCK-8增殖能力增强,平板克隆形成能力

升高,细胞凋亡率降低,原本在转染let-7i-5p mimics后对药物敏感的A549/G⁺细胞对吉西他滨的作用又表现出抵抗性。说明P21表达水平的降低,一定程度上促进了细胞的增殖与耐药。

细胞周期结果表明在抑制P21表达后,细胞S期比例降低,G₂-M期比例明显升高,说明降低P21的表达促进了细胞由S期向G₂-M期的进程。同时,Western-blot实验结果提示降低P21表达后,CDK2和CyclinA的表达水平升高;而他们表达水平升高会促进细胞周期从S期到G₂-M期的进程,促进了细胞的DNA复制,增强了细胞的增殖能力,也促进了细胞对吉西他滨的抵抗性。而Zhu等^[31]曾在研究肺癌细胞耐吉非替尼的机理中证实了P53/P21凋亡通路的激活,可以诱导细胞周期阻滞在G₂期/M期,从而增强肺癌细胞对吉非替尼的敏感性。Li等^[32]在对乳腺癌细胞增殖的研究中也发现P21的高表达可以诱导G₂/M期的阻滞,从而有效抑制肿瘤细胞的增殖。2021年,黄渊锋等^[33]研究发现细胞周期的负调控因子P21可以阻滞细胞G₂/M期,从而增强非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性。综上,在A549/G⁺细胞中let-7i-5p可以提高吉西他滨敏感性,一定程度上解释了let-7i-5p可以降低A549/G⁺细胞对吉西他滨耐受性的原因。let-7i-5p高表达引起CDK6的表达升高,促进了细胞周期从G₁期到S期的进展;同时,也促进P21表达水平升高,P21又抑制了CyclinA-CDK2复合物的表达,间接地引起了S期到G₂-M期的进展受阻,细胞周期停滞在S期,引起细胞DNA复制减慢,造成A549/G⁺在吉西他滨的作用下增殖能力的减弱,降低了A549/G⁺细胞对吉西他滨的耐受性。

总之,本实验初步证实了let-7i-5p表达水平可能通过影响细胞周期改变对A549/G⁺细胞对吉西他滨的耐药性,为肺癌耐吉西他滨机制的深入研究提供了实验依据。

参考文献:

- [1]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2]LIU X, CHO W C. Precision medicine in immune checkpoint blockade therapy for non-small cell lung cancer[J]. Clin Transl Med, 2017, 6(1): 7.
- [3]KONSTANTINOPOULOS P A, CHENG S C, WAHNER HENDRICKSON A E, et al. Berzosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in platinum-resistant high-grade serous ovarian cancer: A multicentre, open-label, randomised,

- phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(7): 957-968.
- [4] WU S, LUO M, TO K K W, et al. Intercellular transfer of exosomal wild type EGFR triggers osimertinib resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 17.
- [5] RAN J, LI Y, LIU L, et al. Apelin enhances biological functions in lung cancer A549 cells by downregulating exosomal miR-15a-5p[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(2): 243-253.
- [6] ZHAO Y, SRIVASTAVA D. A developmental view of microRNA function[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(4): 189-197.
- [7] BLOWER P E, CHUNG J H, VERDUCCI J S, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1): 1-9.
- [8] NUZZO S, CATUOGNO S, CAPUOZZO M, et al. Axl-targeted delivery of the oncosuppressor miR-137 in non-small-cell lung cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 256-263.
- [9] CAO Z, XU L, ZHAO S. Exosome-derived miR-27a produced by PSC-27 cells contributes to prostate cancer chemoresistance through p53[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(2): 345-351.
- [10] LIANG A L, DU S L, ZHANG B, et al. Screening miRNAs associated with resistance gemcitabine from exosomes in A549 lung cancer cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6311-6321.
- [11] 王运, 翟展艺, 赵冲, 等. Zeste 基因同源蛋白 2 对非小细胞肺癌吉西他滨耐药性的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37: 1481-1484.
- [12] BARH D, MALHOTRA R, RAVI B, et al. MicroRNA let-7: An emerging next-generation cancer therapeutic[J]. *Curr Oncol*, 2010, 17(1): 70-80.
- [13] CHHABRA R. Let-7i-5p, miR-181a-2-3p and EGF/PI3K/SOX2 axis coordinate to maintain cancer stem cell population in cervical cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7840.
- [14] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [15] HAMILTON E, INFANTE J R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 45: 129-138.
- [16] KOVATCHEVA M, LIU D D, DICKSON M A, et al. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 8226-8243.
- [17] SUMI N J, KUENZI B M, KNEZEVIC C E, et al. Chemoproteomics reveals novel protein and lipid kinase targets of clinical CDK4/6 inhibitors in lung cancer[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(12): 2680-2686.
- [18] SHEN T, HUANG S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(6): 631-639.
- [19] SHEN X, LIU L, YIN F, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on cell growth and mitochondrial function in TM-3 cells[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2012, 177(1): 177-186.
- [20] INGHAM M, SCHWARTZ G K. Cell-cycle therapeutics come of age[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(25): 2949-2959.
- [21] KIM D H, PARK S E, KIM M, et al. A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers[J]. *Cancer*, 2011, 117(17): 4080-4091.
- [22] LI H P, JI J F, HOU K Y, et al. Prediction of recurrence risk in early breast cancer using human epidermal growth factor 2 and cyclin A2[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(4): 431-437.
- [23] CHENG W, YANG Z, WANG S, et al. Recent development of CDK inhibitors: An overview of CDK/inhibitor co-crystal structures[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164: 615-639.
- [24] HUNG Y H, HUANG H L, CHEN W C, et al. Argininosuccinate lyase interacts with cyclin A2 in cytoplasm and modulates growth of liver tumor cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 969-978.
- [25] DING J, XIE M, LIAN Y, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 represses P21 and KLF2 expression transcription by binding with EZH2, LSD1 in colorectal cancer[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(1): e288.
- [26] WENG M S, HO Y S, LIN J K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(12): 1815-1827.
- [27] ZOHNY S F, AL-MALKI A L, ZAMZAMI M A, et al. p21(Waf1/Cip1): Its paradoxical effect in the regulation of breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2019, 26(2): 131-137.
- [28] ZHANG X, SONG X, YIN S, et al. p21 induction plays a dual role in anti-cancer activity of ursolic acid[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(5): 501-508.
- [29] LIU L, CHEN G, WANG B, et al. Effect of fanbaicao (herba potentillae discoloris) oil on the expression of p21 and CDK4 in HepG2 cells[J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(4): 496-503.
- [30] LIM S, KALDIS P. Cdk, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation[J]. *Development*, 2013, 140(15): 3079-3093.
- [31] ZHU Y, HE W, GAO X, et al. Resveratrol overcomes gefitinib resistance by increasing the intracellular gefitinib concentration and triggering apoptosis, autophagy and senescence in PC9/G NSCLC cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17730.
- [32] LI J P, YANG Y X, LIU Q L, et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 1627-1652.
- [33] 黄渊锋, 李盼, 杨明强, 等. 靶向p21 蛋白激活激酶 2 逆转非小细胞肺癌细胞吉非替尼耐药[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37: 1078-1084.