

胸部肿瘤专题

· 基础研究 ·

## miRNA-409-3p/Beclin-1 信号轴在小细胞肺癌化疗耐药的作用及分子机制研究\*

韩忠诚, 苏莹, 张玲玲, 柳江<sup>△</sup>, 徐腾飞

830000 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院 肿瘤科(韩忠诚、苏莹、张玲玲、柳江); 848000 新疆和田, 新疆维吾尔自治区人民医院皮山医院 全科医疗科(徐腾飞)

**[摘要]** 目的: 探讨 miRNA-409-3p/Beclin-1 信号轴在小细胞肺癌耐药中的作用机制。方法: qRT-PCR 检测用于分析基因表达情况; Western blot 检测蛋白表达情况; mimic NC、miRNA-409-3p mimic、pcDNA3.1 质粒和 pcDNA3.1-Beclin-1 质粒分别转染依托泊苷(VP16)和顺铂(DDP)耐药的小细胞肺癌细胞系 SBC-5/EP; 荧光素酶活性分析实验用于检测基因靶向关系; GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白实验用于检测细胞自噬; 克隆形成实验和流式细胞术实验用于检测细胞的增殖和凋亡; MTT 法用于检测细胞对 VP16-DDP 的敏感性。结果: 在 VP16-DDP 耐药的小细胞肺癌组织和小细胞肺癌细胞(SBC-5/EP)中, miRNA-409-3p 表达量低, Beclin-1 表达量高; 荧光素酶活性分析实验显示 miRNA-409-3p 靶向作用于 Beclin-1; miRNA-409-3p mimic 可抑制 SBC-5/EP 细胞自噬和增殖, 促进细胞凋亡, 提高 SBC-5/EP 细胞对 VP16-DDP 的敏感性, 抑制 PI3KC3 和 Vps15 蛋白表达。pcDNA3.1-Beclin-1 可逆转 miRNA-409-3p mimic 对 SBC-5/EP 细胞自噬和增殖的抑制作用、对细胞凋亡的促进作用、对 VP16-DDP 药物敏感性的提高作用, 以及对 PI3KC3 和 Vps15 蛋白表达的抑制作用。结论: miRNA-409-3p 通过靶向作用于 Beclin-1 而抑制 VP16-DDP 耐药的小细胞肺癌细胞的自噬和增殖, 促进细胞凋亡, 提高耐药的小细胞肺癌细胞对 VP16-DDP 的药物敏感性, 可能与 PI3KC3/Vps15 信号通路相关。

**[关键词]** miRNA-409-3p; Beclin-1; 细胞自噬; VP16-DDP 耐药; PI3KC3/Vps15 信号通路; 小细胞肺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R734.2; Q74 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.09.002

**引文格式:** Han ZC, Su Y, Zhang LL, et al. Molecular mechanism of miRNA-409-3p/Beclin-1 signal axis in chemotherapy resistance in small cell lung cancer[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(9): 729-738. [韩忠诚, 苏莹, 张玲玲, 等. miRNA-409-3p/Beclin-1 信号轴在小细胞肺癌化疗耐药的作用及分子机制研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(9): 729-738.]

### Molecular Mechanism of miRNA-409-3p/Beclin-1 Signal Axis in Chemotherapy Resistance in Small Cell Lung Cancer

Han Zhongcheng, Su Ying, Zhang Lingling, Liu Jiang, Xu Tengfei

People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang, China (Han Zhongcheng, Su Ying, Zhang Lingling, Liu Jiang); Department of General Medicine, People's Hospital of Pishan County, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Hetian 848000, Xinjiang, China (Xu Tengfei)

**Corresponding author:** Liu Jiang, E-mail: liujiang@cscs.org.cn

This study was supported by grants from Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (NO. 2019D01C100).

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism of miRNA-409-3p/Beclin-1 signal axis in chemoresistant small cell lung cancer. **Methods:** qRT-PCR was used to analyze gene expressions; western blot was used to detect protein expressions; mimic NC, miRNA-409-3p mimic, plasmid pcDNA3.1 and plasmid pcDNA3.1-Beclin-1 were transfected into etoposide combined with cisplatin (VP16-DDP)-

**[收稿日期]** 2020-05-21 **[修回日期]** 2020-07-13

**[基金项目]** \* 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(编号:2019D01C100)

**[通讯作者]** <sup>△</sup>柳江, E-mail: liujiang@cscs.org.cn

resistant small cell lung cancer cell line (SBC-5/EP); luciferase activity assay was used to detect the targeting relationship between genes; GFP-LC3 dot formation was used to detect cell autophagy; clone formation experiment and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis; MTT was used to detect the sensitivity of VP16-DDP. **Results:** In VP16-DDP-resistant small cell lung cancer tissues and cell line (SBC-5/EP), the expression level of miRNA-409-3p was down-regulated, while that of Beclin-1 was up-regulated. Luciferase activity assay showed that miRNA-409-3p targeted Beclin-1. miRNA-409-3p mimic inhibited autophagy and proliferation, promoted apoptosis, improved the sensitivity of VP16-DDP and inhibited the expression of PI3KC3 and Vps15 proteins in the SBC-5/EP cell. miRNA-409-3p mimic inhibits cell autophagy and proliferation, promotes cell apoptosis, increases the sensitivity to VP16-DDP and inhibits the expressions of PI3KC3 and Vps15; and the foregoing could be reversed by pcDNA3.1-Beclin-1. **Conclusion:** miRNA-409-3p negatively regulates Beclin-1 to inhibit the autophagy and proliferation of VP16-DDP-resistant small cell lung cancer cells, promotes apoptosis, and improves the sensitivity of VP16-DDP-resistant small cell lung cancer cells, which may involve PI3KC3/Vps15 signaling pathway.

[**Key words**] miRNA-409-3p; Beclin-1; Autophagy; VP16-DDP resistance; PI3KC3/Vps15 signaling pathway; Small cell lung cancer; Cell proliferation; Apoptosis

肺癌是目前世界范围内严重的公共健康卫生问题。小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 约占所有确诊肺癌的 17%, 其恶性程度高, 转移速度快, 患者 5 年生存率低于 10%<sup>[1]</sup>。目前, 化疗依旧是 SCLC 治疗的重要手段, 而依托泊苷 (VP16) 和顺铂 (DDP) 的药物联合 (VP16-DDP) 则是临床应用最广的化疗方案<sup>[2]</sup>。临床研究显示, SCLC 患者在治疗期间耐药速度快, 且耐药患者早期复发率高, 5 年生存率低于 5%<sup>[3]</sup>。因此, 探究 SCLC 对 VP16-DDP 的耐药机制, 提高 VP16-DDP 的治疗效果, 是临床亟待解决的重要问题。近年研究发现, miRNA 与肿瘤化疗耐药密切相关。例如, 申利等<sup>[4]</sup>发现 miRNA-409-3p 可增加宫颈癌对 DDP 化疗的敏感性; Cheng 等<sup>[5]</sup>发现 miRNA-409-3p 通过阻断 Fip200 介导的自噬, 增强卵巢癌细胞对 DDP 的化疗敏感性。这些研究提示, miRNA-409-3p 与肿瘤自噬及化疗耐药密切相关。但 miRNA-409-3p 在 SCLC 细胞自噬及耐药机制中的作用尚未见报道。Tan 等<sup>[6]</sup>研究发现, miRNA-409-3p 通过靶向 Beclin-1 影响结肠癌细胞的自噬作用和对奥沙利铂的药物敏感性。Beclin-1 是哺乳动物特有的自噬相关蛋白, 包括 N 端 BH3 结构域、中心卷曲螺旋结构域 (coiled-coil domain, CCD) 和进化保守结构域 (evolutionarily conserved domain, ECD)。其中 CCD 域可与 Beclin-1 调节自噬相关基因中的激活分子相互作用, 而 ECD 和 CCD 域则与 Beclin-1 下游通路 PI3KC3/Vps15 相互作用, 以此调控肿瘤的自噬及发生发展<sup>[7]</sup>。研究显示, Beclin-1 在耐药 SCLC 细胞中表达显著增高<sup>[8]</sup>, 且 DDP 治疗后 Beclin-1 表达上调, 导致肿瘤细胞自噬活性增强, 进而提高了肿瘤细胞的耐药性<sup>[9]</sup>。这说明 Beclin-1 与 SCLC 细胞的耐药密切相关。因此, 本研究通过

探究 miRNA-409-3p 与 Beclin-1 在 VP16-DDP 耐药 SCLC 细胞中的表达, 阐明 miRNA-409-3p 与 Beclin-1 的靶向关系及 SCLC 的耐药机制, 以期为克服 SCLC 耐药提供实验参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样本、细胞株及主要试剂

15 例耐药肿瘤组织样本和 15 例药物敏感性肿瘤组织样本, 均来自我院于 2017 年 5 月至 2019 年 5 月收治的 SCLC 病例。所有患者均以 4~8 疗程 EP 方案化疗为主 (VP16:100 mg/m<sup>2</sup>, DDP:60 mg/m<sup>2</sup>)。SCLC 患者根据 RECIST 1.1 实体瘤疗效判定标准判断治疗敏感性: 完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、稳定 (stable disease, SD) 和进展 (progressive disease, PD)。化疗结束 6 个月后, 判定化疗效果。VP16-DDP 化疗敏感患者是化疗结束后 6 个月未出现肿瘤复发 (CR + PR + SD); VP16-DDP 化疗耐药患者为肿瘤在化疗过程中出现进展, 或化疗结束后 6 个月出现肿瘤复发。所有患者年龄在 45~65 岁, 其中男性 23 例, 女性 7 例。术后病理诊断皆为 SCLC, 术前未行化疗或放疗, 且所有患者均已签署知情同意书。本研究试验获得本院伦理委员会的批准 (批号: KY2019051518)。组织样本均保存于 -80℃。人 SCLC 细胞系 SBC-5 购自中国科学院上海细胞生物研究所。DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。Trizol 试剂购自上海联迈生物工程有限公司。GFP-LC3 慢病毒质粒购自上海兴拓生物医药科技有限公司。mimic NC 和 miRNA-409-3p mimic 由 Genepharma 公

司合成。pcDNA3.1 质粒购自云舟生物科技有限公司。Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司。CCK8 检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自中国晶彩生物科技有限公司。双荧光素酶活性检测试剂盒北京平皓生物技术有限公司。Beclin-1 抗体、LC3I、LC3II、P26、PI3KC3 和 Vps15 抗体购自 Abcam 公司,二抗(羊抗兔)购自美国 CST 公司。3-MA(PI3KC3 抑制剂)购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 细胞培养、转染及分组

SBC-5 细胞用含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下于培养箱中培养。人 SCLC VP16-DDP 耐药细胞株为本课题组采用逐步升高药物浓度的方法构建:体外逐步增加 VP16 (初始作用浓度:0.05 μg/mL)与 DDP(初始作用浓度:0.01 μg/mL)维持作用浓度,连续诱导培养 SBC-5 细胞 13 个月,VP16-DDP 耐药的 SBC-5 细胞可稳定耐受 1.5 μg/mL 的 VP16 和 1.25 μg/mL 的 DDP。耐药细胞命名为 SBC-5/EP,与亲本细胞相对应。SBC-5/EP 细胞用含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下于培养箱中培养,每 1 ~ 2 d 更换培养基,并加入相应浓度药物。将

Beclin-1 基因序列克隆进入 pcDNA3.1 载体。SBC-5/EP 细胞转染前一天胰酶消化计数,以每孔 3.5 × 10<sup>6</sup> 个 SBC-5/EP 细胞接种于 6 孔板内过夜培养。根据 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书将 40 ng 的 miRNA-409-3p mimic (mimic 组)、mimic NC (mimic NC 组)分别转染 SBC-5/EP 细胞,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h,更换新鲜培养基。将 45 ng 的 pcDNA3.1 空载体和 pcDNA3.1-Beclin-1 质粒分别转染 SBC-5/EP 细胞(已转染 miRNA-409-3p mimic),分别标记为 mimic pc 组和 mimic-pc-Beclin-1 组,将转染的细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后,更换新鲜培养基。将 5 mM 的 3-MA 作用 mimic-pc-Beclin-1 组细胞 20 h,更换新鲜培养基,标记为 mimic-pc-Beclin-1-3-MA 组。

### 1.3 qRT-PCR

Trizol 试剂提取细胞的 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 含量。反转录实验流程根据 qRT-PCR 试剂盒说明进行。将逆转录产物进行 qRT-PCR 检测,反应体系为:cDNA 模板 2 ng,上下游引物各 0.4 μL (表 1),SYBR Primix Ex Taq™ 5 μL,ddH<sub>2</sub>O 补充至 10 μL。扩增结果根据 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 miRNA-409-3p 和 Beclin-1 mRNA 的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1. Primer Sequences in qRT-PCR

| Target       | Primer sequence   | Length of product (bp) |
|--------------|---|------------------------|
| miRNA-409-3p | Forward:5'-TGGTACTCGGGGAGAGCTTA-3'<br>Reverse:5'-TGATAGGCAAAGGGGTTCA-3'       | 93                     |
| Beclin-1     | Forward:5'-ATGGAAGGCTCTAAGACGTCCA-3'<br>Reverse:5'-TGATTTGTAAAATTGTGAGGACA-3' | 365                    |
| β-actin      | Forward:5'-CCGTGCCCTGAGGCTCTTT-3'<br>Reverse:5'-GATCTGTCTTCTTCTCTC-3'         | 246                    |

### 1.4 Western blot

蛋白提取裂解液裂解细胞,利用 BSA 法检测细胞蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量蛋白后转膜。利用 5% 脱脂牛奶 4 °C 封闭 1 h,加鼠抗人的 Beclin-1、LC3I、LC3II、P62、PI3KC3 和 Vps15 抗体(1:3000)摇床 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 5 min,4 次,加入 HRP 标记的兔抗鼠二抗(1:2 000)37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min,4 次。显影曝光,通过 Image-Pro Plus 系统分析蛋白条带灰度值。

### 1.5 克隆形成实验

胰酶消化细胞,完全培养基重悬细胞后计数。以每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔板内,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,每 3 天更换培养基

并观察细胞,且在 6 孔板底部对单克隆细胞标记。培养 9 天后观察细胞,弃上清,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 1 mL 4% 多聚甲醛,4 °C 固定细胞 1 h,PBS 洗涤细胞 3 次,加入 1 000 μL 结晶紫染色液作用细胞 2 min,ddH<sub>2</sub>O 洗涤细胞 3 次,晾干后拍照且计数。

### 1.6 荧光素酶活性分析实验

Beclin-1 的 3'UTR WT/MUT 分别克隆至荧光素酶报告载体 pmirGLO 载体。miRNA-409-3p mimic 和 mimic NC 分别与 pmirGLO-Beclin-1-WT 或 pmirGLO-Beclin-1-MUT 共转染 HuH-6 细胞。48 h 后收取处理细胞,通过荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶的活性。

### 1.7 GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白实验

慢病毒 GFP-LC3 质粒转染细胞 24 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 3.7% 的甲醛中固定 20 min, PBS 洗涤 3 次, 甘油固定细胞, 荧光显微镜下观察细胞荧光斑点。

### 1.8 流式细胞术

将转染细胞胰酶消化离心, 收集细胞后预冷的 PBS 洗涤细胞。避光条件下, 加入 FITC-Annexin V 和碘化丙钠, 静置 15 min, 加入 Binding Buffer 混匀置于冰上, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡。

### 1.9 MTT 实验

胰酶消化 SBC-5 细胞、未转染的 SBC-5/EP 细胞和已转染的 SBC-5/EP 细胞, 培养基重悬细胞计数。以  $3 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板, 待细胞生长融合至 65% 时, 按 1.2 方法进行细胞转染。培养 72 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT 溶液, 在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 4 h 后, 弃上清, 每孔加入 150  $\mu$ L 的 DMSO, 振荡 10 min 使结晶物溶解。置于自动酶标仪内, 检测在 490 nm 波长的吸光度。

### 1.10 统计学处理

实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 实验均重复三次, 数据表示均为平均值  $\pm$  标准差。利用 GraphPad Prism 6 软件制图。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA-409-3p 和 Beclin-1 在 VP16-DDP 耐药 SCLC 组织和 SCLC 细胞 SBC-5 细胞中的表达情况

qRT-PCR 实验结果显示, VP16-DDP 耐药的 SCLC 组织中 miRNA-409-3p 的表达显著低于 VP16-DDP 敏感的 SCLC 组织 ( $P < 0.01$ ), 见图 1A; VP16-DDP 耐药的 SCLC 组织中 Beclin-1 的表达显著高于 VP16-DDP 敏感的 SCLC 组织 ( $P < 0.01$ ), 见图 1B。我们建立了 VP16-DDP 耐药的 SBC-5 细胞 (SBC-5/EP)。SBC-5/EP 细胞中 miRNA-409-3p 的表达显著低于 SBC-5 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 1C; SBC-5/EP 细胞中 Beclin-1 的表达显著高于 SBC-5 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 1D。Western blot 实验结果显示, SBC-5/EP 细胞中 Beclin-1 的蛋白表达水平显著高于 SBC-5 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 1E。

### 2.2 SBC-5/EP 细胞自噬作用增强

Western blot 实验结果显示, SBC-5/EP 细胞中的 LC3II/LC3I 的比值升高, P62 蛋白表达显著低于

SBC-5 细胞 ( $P < 0.01$ ), 见图 2A。MTT 检测结果显示, SBC-5/EP 细胞的 IC<sub>50</sub> 值明显高于 SBC-5 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白实验显示, SBC-5 细胞中出现绿色斑点, 而 SBC-5/EP 细胞中出现明亮的绿色荧光小点, 表明 SBC-5/EP 细胞自噬增强, 见图 2C。克隆形成实验结果显示, SBC-5/EP 细胞的增殖能力显著高于 SBC-5 细胞 ( $P < 0.05$ ), 见图 2D。

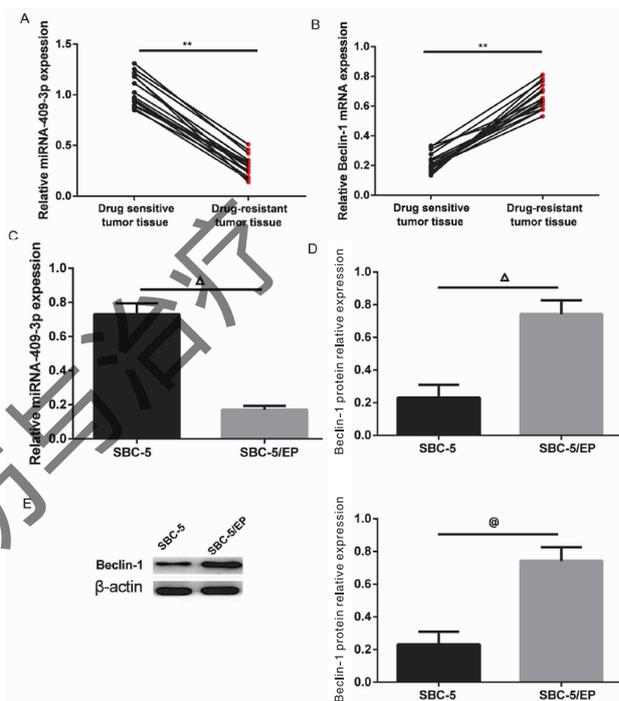


图 1 miRNA-409-3p 和 Beclin-1 在耐药小细胞肺癌组织和耐药 SBC-5/EP 细胞系中的表达

Figure 1. Expression of miRNA-409-3p and Beclin-1 in Drug-Resistant Small Cell Lung Cancer and Drug-Resistant SBC-5/EP Cell Line

A. Expression of miRNA-409-3p in drug-resistant small cell lung cancer and drug-sensitive small cell lung cancer (compared with drug-sensitive small cell lung cancer,  $**P < 0.01$ ); B. Expression of Beclin-1 in drug-resistant small cell lung cancer and drug-sensitive small cell lung cancer (compared with drug-sensitive small cell lung cancer,  $**P < 0.01$ ); C. Expression of miRNA-409-3p in drug-resistant SBC-5/EP cell line and drug-sensitive SBC-5/EP cell line (compared with the SBC-5 cell,  $\Delta P < 0.05$ ); D. Expression of Beclin-1 in drug-resistant SBC-5/EP cell line and drug-sensitive SBC-5/EP cell line (compared with SBC-5 cell,  $\Delta P < 0.05$ ); E. The level of Beclin-1 protein in drug-resistant SBC-5/EP cell line and drug-sensitive SBC-5/EP cell line (compared with the SBC-5 cell,  $\odot P < 0.05$ ).

### 2.3 miRNA-409-3p 靶向抑制 Beclin-1 的表达

通过将 miRNA-409-3p mimic 和 mimic NC 分别转染 SBC-5/EP 细胞,检测 miRNA-409-3p 对 Beclin-1 表达的影响。qRT-PCR 及 Western blot 实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p 抑制 Beclin-1 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ),见图 3A、3B。通过靶基因预测网站 TargetScan 进行生物学信息预测,结果显示 miRNA-409-3p 与 Beclin-1 mRNA 的

3' UTR 之间存在互补配对序列,见图 3C。为了证实 miRNA-409-3p 靶向调控 Beclin-1 表达,构建 Beclin-1 野生型及突变型质粒进行双荧光素酶报告基因实验,结果显示与 mimic NC 组相比,转染 miRNA-409-3p mimic 的野生型组 SBC-5/EP 细胞的荧光素酶活性显著降低 ( $P < 0.05$ ),而较转染 miRNA-409-3p mimic 的突变型组 SBC-5/EP 细胞的荧光素酶活性无显著改变,见图 3D。

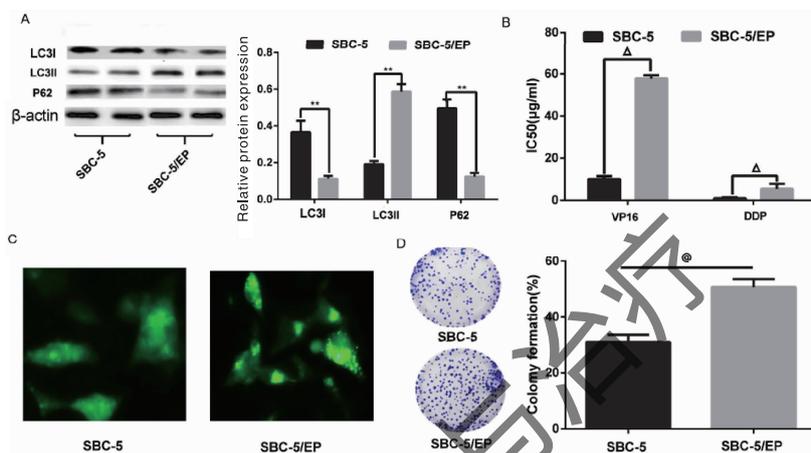


图2 VP16-DDP耐药的SBC-5细胞自噬作用增强

Figure 2. Enhanced Autophagy in VP16-DDP-Resistant SBC-5 Cells

A. Western blot was used to detect the effect of VP16-DDP on autophagy-related protein LC3I, LC3II and P62 (compared with the SBC-5 cell,  $**P < 0.01$ ); B. MTT assay was used to detect the effect of VP16-DDP on cell viability (compared with the SBC-5 cell,  $^{\Delta}P < 0.05$ ); C. GFP-LC3 dot formation was used to detect the effect of VP16-DDP on punctate GFP+ cells; D. Colony formation assay was used to detect the effect of VP16-DDP on cell proliferation (compared with the SBC-5 cell,  $^{\textcircled{R}}P < 0.05$ ).

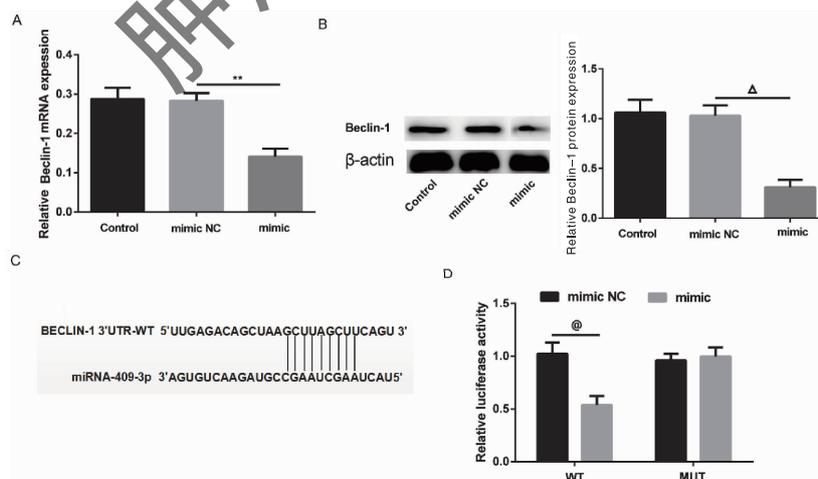


图3 miRNA-409-3p 靶向抑制 Beclin-1 的表达

Figure 3. Inhibition of Beclin-1 via Targeted miRNA-409-3p

Panel A and B show miRNA-409-3p mimic and miRNA-409-3p NC transfected SBC-5/EP cell, respectively. Total RNA and cell lysates were extracted at 24 hours after transfection and were used to detect the expression of Beclin-1 at both mRNA and protein levels by qRT-PCR and western blot (compared with mimic NC,  $**P < 0.05$ ). Panel C shows the binding site between miRNA-409-3p and Beclin-1 predicted by TargetScan. In panel D, luciferase activity assay demonstrated that miRNA-409-3p targeted Beclin-1's 3' UTR-WT (compared with the wild-type SBC-5/EP cell in the mimic NC group,  $**P < 0.01$ ).

### 2.4 miRNA-409-3p 抑制自噬调节 SBC-5/EP 细胞对 VP16-DDP 的耐药性

Western blot 实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic 组的 LC3II/LC3I 的比值降低,P62 蛋白表达升高( $P < 0.01$ ),见图 4A。GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白实验显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic 组的 SBC-5/EP 细胞出现绿色荧光斑点,表明自噬降低,见图 4B。克隆形成实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic

抑制 SBC-5/EP 细胞的增殖( $P < 0.05$ ),见图 4C;流式细胞术实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic 促进 SBC-5/EP 细胞凋亡,见图 4D;Western blot 实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic 促进 SBC-5/EP 细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-9 表达( $P < 0.05$ ),见图 4E。MTT 实验结果显示,与 mimic NC 相比,miRNA-409-3p mimic 降低了 SBC-5/EP 细胞的 IC50 值( $P < 0.05$ ),见图 4F。

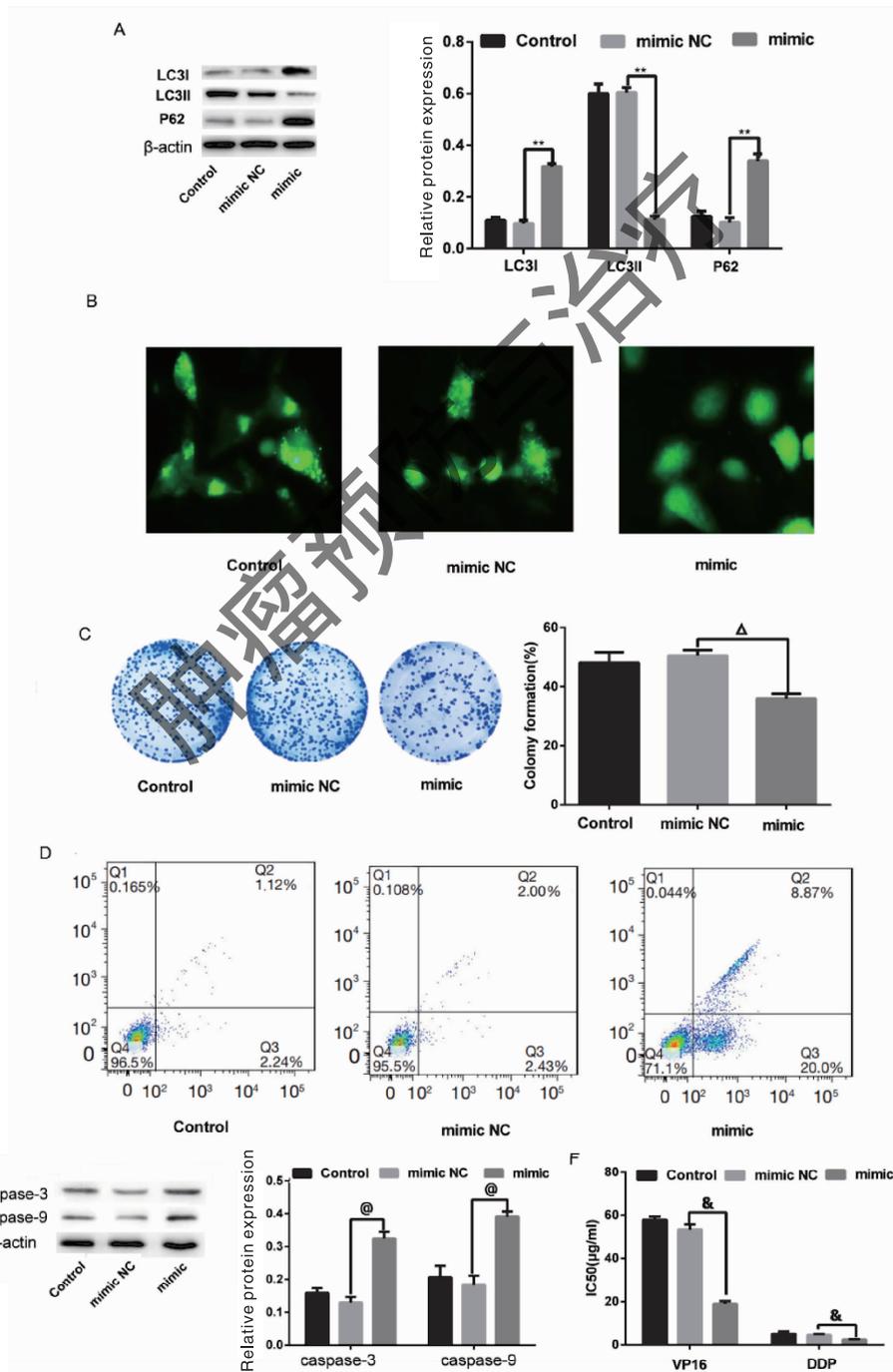


图 4 miRNA-409-3 抑制 SBC-5/EP 细胞的自噬对 VP16-DDP 耐药性的影响

Figure 4. Effect of miRNA-409-3p on Drug Resistance of VP16-DDP by Inhibiting Autophagy of SBC-5/EP Cells

A. Effect of miRNA-409-3p on autophagy-related proteins (LC3II and P62) detected by Western blot (compared with mimic NC,  $^{**}P < 0.01$ ); B. Effect of miRNA-409-3p on punctate GFP+ cells detected by GFP-LC3 dot formation; C. Effect of miRNA-409-3p on cell proliferation detected by colony formation assay (compared with mimic NC,  $^{\Delta}P < 0.05$ ); D. Effect of miRNA-409-3p on apoptosis detected by flow cytometry; E. Expressions of apoptotic proteins (caspase-3 and caspase-9) analyzed by Western blot (compared with mimic NC,  $^{\textcircled{a}}P < 0.05$ ); F. Effect of miRNA-409-3p on cell viability detected by MTT assay (compared with mimic NC,  $^{\textcircled{\&}}P < 0.05$ ).

### 2.5 miRNA-409-3p/Beclin-1 对 SBC-5/EP 细胞的自噬和 VP16-DDP 耐药性的影响

Western blot 实验结果显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 组 LC3II/LC3I 的比值升高, P62 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),见图 5A。GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白实验显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 组的 SBC-5/EP 细胞中出现明亮的绿色荧光小点,表明自噬增强,见图 5B。克隆形成实验结果显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 促进

SBC-5/EP 细胞的增殖( $P < 0.05$ ),见图 5C。流式细胞术实验结果显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 抑制 SBC-5/EP 细胞凋亡,见图 D; Western blot 实验结果显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 抑制 SBC-5/EP 细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-9 的表达( $P < 0.05$ ),见图 E。MTT 实验结果显示,与 mimic pc 相比, mimic pc-Beclin-1 提高了 SBC-5/EP 细胞对 VP16 和 DDP 的耐药性( $P < 0.05$ ),见图 5F。

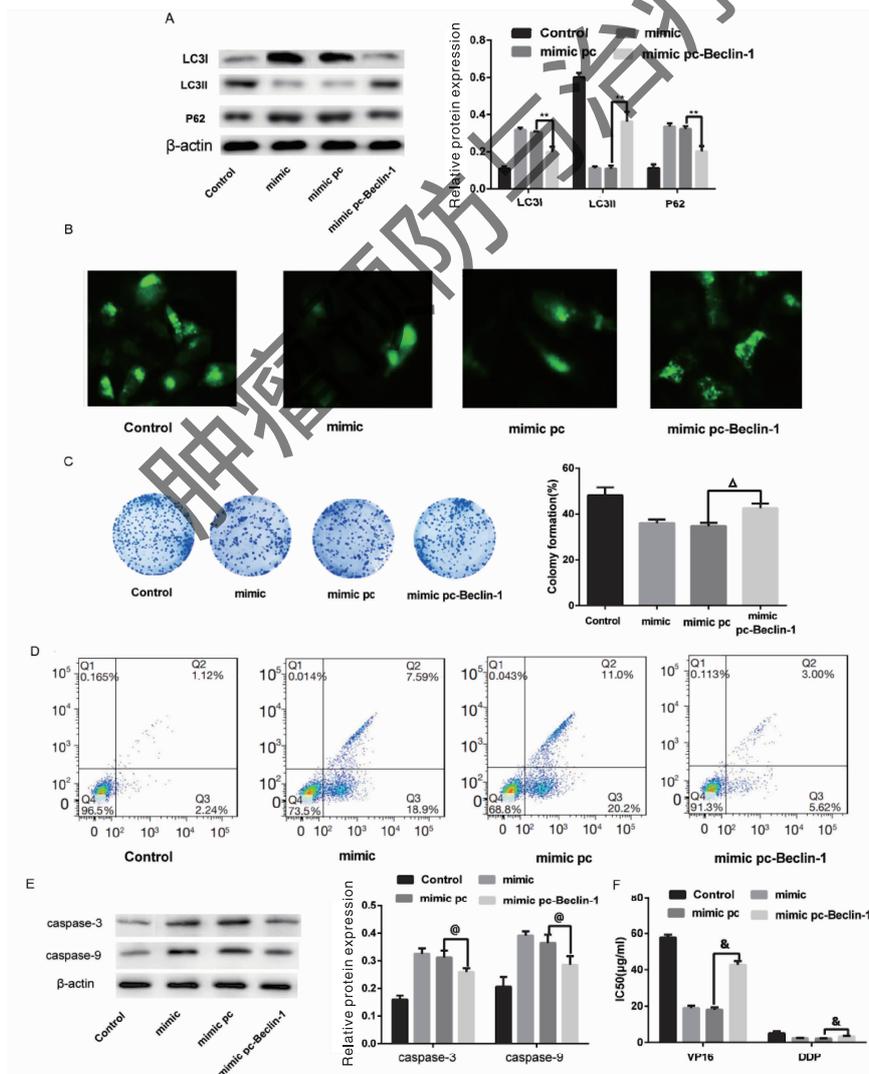


图 5 miRNA-409-3p/Beclin-1 对 SBC-5/EP 细胞的自噬和 VP16-DDP 耐药性的影响

Figure 5. Effect of miRNA-409-3p/Beclin-1 on Autophagy and VP16-DDP Resistance of SBC-5/EP Cells

A. Effect of miRNA-409-3p/Beclin-1 on autophagy-related protein LC3I, LC3II and P62 detected by Western blot (compared with

mimic pc, \*\* $P < 0.01$ ); B. Fluorescence of GFP-LC3 fusion protein from control, mimic, mimic pc and mimic pc-beclin-1 groups; C. Effect of miRNA-409-3p/Beclin-1 on cell proliferation detected by colony formation assay (compared with mimic pc,  $\Delta P < 0.05$ ); D. Effect of miRNA-409-3p/Beclin-1 on apoptosis detected by GFP-LC3 dot formation (compared with mimic pc); E. Expressions of apoptotic proteins (caspase-3 and caspase-9) analyzed by Western blot (compared with mimic pc,  $\textcircled{P} < 0.05$ ); E. Effect of miRNA-409-3p/Beclin-1 on cell viability detected by MTT assay (compared with mimic pc,  $\textcircled{P} < 0.05$ ).

### 2.6 miRNA-409-3p/Beclin-1 对 SBC-5/EP 细胞的 PI3KC3/Vps15 信号通路的影响

Western blot 实验结果显示,与 mimic NC 相比, miRNA-409-3p mimic 抑制 SBC-5/EP 细胞中的 PI3KC3 和 Vps15 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 mimic

pc 相比, mimic pc-Beclin-1 促进 SBC-5/EP 细胞中的 PI3KC3 和 Vps15 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 mimic pc-Beclin-1 组相比, mimic pc-Beclin-1-3-MA 可抑制 SBC-5/EP 细胞中的 PI3KC3 和 Vps15 蛋白的表达, 见图 6。

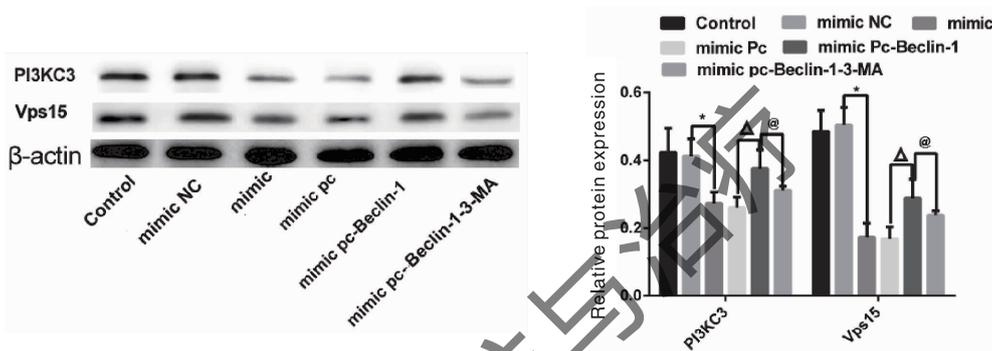


图 6 miRNA-409-3p/Beclin-1 调控 PI3KC3/Vps15 信号通路  
Figure 6. PI3KC3/Vps15 Signaling Pathway Regulated by miRNA-409-3p/Beclin-1

Western blot results showed that Beclin-1 reversed the effect of miRNA-409-3p on PI3KC3/Vps15 signaling pathway (compared with mimic NC, \* $P < 0.05$ ; compared with mimic pc,  $\Delta P < 0.05$ , compared with mimic pc-Beclin-1,  $\textcircled{P} < 0.05$ ).

### 3 讨论

肺癌是死亡率最高的恶性肿瘤之一,其组织学类型分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和 SCLC。与 NSCLC 相比, SCLC 具有较高核质比,且核染色质颗粒细小<sup>[10]</sup>。临床研究显示, SCLC 患者发生癌细胞的转移几率较高,且 SCLC 的病理特征与临床结果之间的关系复杂,致使 SCLC 的治疗进展缓慢<sup>[11]</sup>。目前,化疗仍然是 SCLC 治疗策略的基础。其中 VP16 + DDP 是 SCLC 治疗的一线化疗药物<sup>[2]</sup>。但临床研究显示,由于耐药性的出现,接受二次化疗的患者治疗效果并不理想。而且不同患者在临床表现、预后、治疗反应、耐受性等方面存在个体差异,导致化疗耐药表型形成的机制尚不明确<sup>[12]</sup>。因此,寻找 VP16-DDP 的耐药机制一直是 SCLC 研究领域的热点。

研究显示,耐药机制包括多种因素,例如多药耐药蛋白家族的调控、细胞凋亡、自噬、细胞内药物代谢酶系统、肿瘤干细胞、miRNA 调控网络、稳态变

化、DNA 损伤修复等表观遗传调控<sup>[13]</sup>。Wang 等<sup>[14]</sup>研究发现, Etk 与 PFKFB4 的相互作用可调节自噬,从而影响调节小细胞肺癌的化疗耐药性; Yu 等<sup>[15]</sup>研究发现,内质网应激通过促进细胞自噬和凋亡,可逆转小细胞肺癌细胞的化疗耐药性。本研究发现, VP16-DDP 耐药的 SCLC 细胞 SBC-5 自噬活性增强,导致耐药的 SBC-5 细胞的增殖能力提高,细胞凋亡能力降低,对 VP16-DDP 的敏感性降低。这说明, SBC-5 细胞的 VP16-DDP 耐药机制可能与细胞自噬相关。

自噬是化疗后维持细胞内环境稳定的促生存反应,与多种癌症的耐药发展相关<sup>[16]</sup>。近年研究发现, miRNA 可改变 SCLC 细胞的自噬及凋亡,进而影响 SCLC 对化疗药物的敏感性。例如,张云等<sup>[17]</sup>研究发现, miR-200b 在多药耐药细胞株 H69AR 中呈低表达,上调其表达通过改变 H69AR 细胞的自噬,降低细胞对 ADM、DDP 和 VP-16 等化疗药物的耐药性; 申利等<sup>[4]</sup>研究发现, miRNA-409-3 p 与宫颈癌细胞增殖及顺铂化疗敏感性相关; Cheng 等<sup>[5]</sup>发现 miRNA-

409-3p 通过调控卵巢癌细胞自噬,影响肿瘤细胞对 DDP 的化疗敏感性。本研究发现,miRNA-409-3p 在 VP16-DDP 耐药的 SCLC 组织和 SBC-5 细胞中低表达,上调 miRNA-409-3p 可抑制 SBC-5/EP 细胞自噬,促进 SBC-5/EP 细胞的凋亡,抑制 SBC-5/EP 细胞的增殖,提高 SBC-5/EP 细胞对 VP16-DDP 的药物敏感性,表明 miRNA-409-3p 可通过抑制自噬增加 SBC-5/EP 细胞对 VP16-DDP 的敏感性。最新研究显示,miRNA-409-3p 靶向 Fip200 可调节卵巢癌细胞对顺铂的敏感性<sup>[5]</sup>,miRNA-409-3p 靶向 Beclin-1 介导的自噬使结肠癌细胞对奥沙利铂敏感<sup>[18]</sup>。这些研究提示,miRNA-409-3p 可通过靶向 mRNA,影响肿瘤细胞的药物敏感。本研究结果显示,miRNA-409-3p 可靶向抑制 Beclin-1 的表达。

Beclin-1 是自噬调控的核心分子,分布在细胞质膜、细胞质和细胞核内<sup>[19]</sup>。研究发现,Beclin-1 与肺腺癌的 DDP 耐药性相关<sup>[20]</sup>;沉默 *Beclin-1* 基因可增加人肺癌细胞 A549 对 DDP 的敏感性,促进细胞凋亡<sup>[21]</sup>。这些研究提示,Beclin-1 在肿瘤细胞耐药机制中扮演重要角色。本研究发现,Beclin-1 在 VP16-DDP 耐药的 SBC-5/EP 中的高表达,且过表达 Beclin-1 可逆转 miRNA-409-3p 对 SBC-5/EP 细胞自噬及 VP16-DDP 的药物敏感性的影响。这说明,miRNA-409-3p 通过 Beclin-1 调节 SBC-5/EP 细胞自噬及 VP16-DDP 的药物敏感性。Kang 等<sup>[7]</sup> 研究显示,Beclin-1 通过与辅因子 PI3KC3 相互作用,调节脂质激酶蛋白表达,促进 Beclin-1/Vps15 核心复合物的形成,从而诱导肿瘤细胞自噬。任爽等<sup>[22]</sup> 研究发现,Beclin-1/PI3K 信号通路与肺癌的阿霉素耐药性相关。这些研究提示,Beclin-1/PI3KC3/Vps15 信号通路可能参与调控肿瘤细胞的自噬与耐药性。本研究发现,上调 Beclin-1 可逆转 miRNA-409-3p 对 PI3KC3/Vps15 信号通路蛋白的抑制作用,且通路蛋白抑制剂 3-MA 可改变 miRNA-409-3p/Beclin-1 轴对 PI3KC3/Vps15 信号通路蛋白的影响。这不仅表明 Beclin-1/PI3KC3/Vps15 信号通路与小细胞肺癌的 VP16-DDP 耐药性相关,而且说明 miRNA-409-3p 负向调控 Beclin-1,可抑制 PI3KC3/Vps15 信号通路的激活。

综上所述,本文初步探究了 miRNA-409-3p 与 Beclin-1 在 VP16-DDP 耐药的 SCLC 中的作用,验证了 miRNA-409-3p 与 Beclin-1 的靶向关系,以及通过靶向 Beclin-1 而调控 SBC-5/EP 细胞自噬及 VP16-DDP 的药物敏感性。本研究不仅丰富了 Beclin-1 在

SCLC 的 VP16-DDP 耐药机制中的作用,而且还为 VP16-DDP 耐药 SCLC 的分子靶向治疗和化疗药物敏感性研究提供了新的策略。

**作者声明:** 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:** 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:** 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:** 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

#### [参考文献]

- [1] 潘辉,张亚雷,肖大凯,等.基于 SEER 数据库构建小细胞肺癌术后患者生存预测模型[J]. 肿瘤预防与治疗,2019,32(6): 516-523.
- [2] Pan B, Chen Y, Song H, et al. Mir-24-3p downregulation contributes to VP16-DDP resistance in small-cell lung cancer by targeting ATG4A[J]. *Oncotarget*, 2015,6(1):317-331.
- [3] Zimm RL, Gardner EE, Dobromilskaya I, et al. Combination treatment with ABT-737 and chloroquine in preclinical models of small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013,12:16.
- [4] 申利,魏军成. miRNA-409-3p 表达水平对宫颈癌细胞增殖及顺铂化疗敏感性的影响[J]. 实用肿瘤学杂志,2019,36(4): 125-128.
- [5] Cheng Y, Ban R, Liu W, et al. MiRNA-409-3p enhances cisplatin-sensitivity of ovarian cancer cells by blocking the autophagy mediated by Fip200[J]. *Oncol Res*, 2018,10(17):327-334.
- [6] Tan S, Shi H, Ba M, et al. miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy[J]. *Int J Mol Med*, 2016,37(4):1030-1038.
- [7] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2011,18(4): 571-580.
- [8] 杨翔. miRNA-30a-5p/Beclin-1 信号轴在人小细胞肺癌化疗耐药表型形成中的作用及分子机制研究[D]. 上海:第二军医大学,2017.
- [9] Zou Z, Wu L, Ding H, et al. MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2012,287(6):4148-4156.
- [10] Wang Y, Zou S, Zhao Z, et al. New insights into small-cell lung cancer development and therapy[J]. *Cell Biol Int*, 2020,44(8): 1564-1576.
- [11] Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, et al. The chal-

- length of drug resistance in cancer treatment: A current overview [J]. Clin Exp Metastasis, 2018, 35(4): 309-318.
- [12] Yang X, Bai F, Xu Y, *et al.* Intensified beclin-1 mediated by low expression of mir-30a-5p promotes chemoresistance in human small cell lung cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3): 1126-1139.
- [13] Wu Q, Yang Z, Nie Y, *et al.* Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches [J]. Cancer Lett, 2014, 347(2): 159-166.
- [14] Wang Q, Zeng F, Sun Y, *et al.* Etk Interaction with PFKFB4 modulates chemoresistance of small-cell lung cancer by regulating autophagy[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(4): 950-962.
- [15] Yu XS, Du J, Fan YJ, *et al.* Activation of endoplasmic reticulum stress promotes autophagy and apoptosis and reverses chemoresistance of human small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Oncotarget, 2019, 10(41): 4252.
- [16] 鲁文育, 周新民, 徐海平, 等. 小细胞肺癌患者化疗前后 NSE、ProGRP 含量与化疗所致癌细胞凋亡的相关性[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(7): 983-986.
- [17] 张云, 罗萍, 冷平, 等. 自噬抑制剂硫酸羟氯喹对去势抵抗性前列腺癌化疗敏感性的影响[J]. 四川大学学报: 医学版, 2019, 50(3): 38-42.
- [18] Tan S, Shi H, Ba M, *et al.* miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4): 1030-1038.
- [19] 李佩佩. miR-137 在小细胞肺癌获得性多药耐药中的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.
- [20] Li BX, Li CY, Peng RQ, *et al.* The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers[J]. Autophagy, 2009, 5(3): 303-6.
- [21] 周昆, 闫焱, 李冰, 等. 榄香烯对肺腺癌耐药株 SPC-A-1/顺铂耐药性的逆转作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(1): 119-122.
- [22] 任爽, 秦艳茹, 张岩, 等. 自噬相关基因 Beclin 1 沉默对人肺癌 A549 细胞顺铂耐药性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(10): 2809-2810.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《肿瘤预防与治疗》文章荐读: 中国肿瘤健康教育现状与对策分析

恶性肿瘤已成为严重威胁我国居民健康的重大疾病。由于我国居民应对肿瘤的能力较弱, 如何科学有效、可持续地开展肿瘤健康教育以提高居民应对肿瘤的能力将是未来肿瘤防治工作的重点。随着肿瘤健康教育工作的不断开展, 居民的肿瘤防治知识和意识有所提高, 某些危险行为也有所改善。《中国肿瘤健康教育现状与对策分析》回顾分析了我国肿瘤健康教育工作的现状及存在的问题, 并提出相应的对策和建议, 以期从事肿瘤健康教育的相关从业人员提供指导。

阅读该文请登陆本刊网站 [www.zlyfzl.cn](http://www.zlyfzl.cn), 或点击推荐文章链接 [http://125.71.214.100:801/Jwk\\_zlyf/CN/Y2019/V32/I11/955](http://125.71.214.100:801/Jwk_zlyf/CN/Y2019/V32/I11/955) 查看。

本刊编辑部