

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 06. 008

miR-199a-3p 通过调控 BRCA1 影响小细胞肺癌细胞对阿帕替尼敏感性的研究^{*}

张 静,李唯源[△],胡国志,郭艺航

河北省唐山中心医院肿瘤科,河北唐山 063000

摘 要:目的 探讨 miR-199a-3p 通过调控人乳腺癌易感基因 1(BRCA1)影响小细胞肺癌(SCLC)细胞对阿帕替尼敏感性的机制。方法 选择人 SCLC 细胞系 H446、H1688 以及正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 进行培养,构建阿帕替尼耐药 SCLC 细胞系(H446/APA 和 H1688/APA),将 H446/APA 和 H1688/APA 细胞分为未转染和转染(转染的核酸分子包括 miR-199a-3p mimics、miR-NC、sh-BRCA1、sh-NC)。采用反转录实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测正常支气管上皮细胞 BEAS-2B、H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 及转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-NC 的 H446/APA、H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平。采用蛋白质印迹法检测正常支气管上皮细胞 BEAS-2B、H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 及转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞中 BRCA1 蛋白表达水平。采用噻唑蓝溴化四唑(MTT)法测定 H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 及转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞对阿帕替尼的半数最大抑制浓度(IC₅₀)值,测定转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞活力。通过集落形成测定分析转染不同核酸分子的 H446/APA 和 H1688/APA 细胞集落数。通过流式细胞术检测转染不同核酸分子的 H446/APA 和 H1688/APA 细胞的凋亡率。通过 Transwell 实验测定转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞的迁移和侵袭情况。通过双荧光素酶报告基因检测系统测定荧光素酶报告基因载体的荧光素酶活性,分析 miR-199a-3p 与 BRCA1 之间的联系。结果 与正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 相比,人 SCLC 细胞系 H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平平均降低($P<0.05$),而 BRCA1 蛋白表达水平平均升高($P<0.05$)。与对应的亲代细胞相比,H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平平均降低($P<0.05$),并且 BRCA1 蛋白表达水平平均升高($P<0.05$)。转染不同核酸分子的同一细胞系(H446/APA、H1688/APA)中:转染 miR-199a-3p mimics 的细胞中 miR-199a-3p 表达水平均明显高于转染 miR-NC 的细胞($P<0.05$);转染 miR-199a-3p mimics 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞凋亡率、细胞迁移数、细胞侵袭数与转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞相比,差异均无统计学意义($P>0.05$);转染 miR-NC、转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数均高于转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞($P<0.05$),细胞凋亡率均低于转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞($P<0.05$);与转染 miR-NC 的细胞相比,转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),而细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数明显降低($P<0.05$),但转染 miR-NC 与转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。荧光素酶基因报告结果显示,转染 miR-199a-3p mimics 的 H446/APA、H1688/APA 细胞中含有 WT-BRCA1 报告基因质粒的荧光素酶活性均低于转染 miR-NC 的同一细胞系($P<0.05$)。结论 miR-199a-3p 可通过靶向调控 BRCA1 水平而增强 SCLC 细胞对阿帕替尼的敏感性,为改善 SCLC 的化疗效果提供潜在的靶点。

关键词:miR-199a-3p; 小细胞肺癌; 阿帕替尼; 化疗耐药; 敏感性; 机制
中图法分类号:R734.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2025)06-0760-08

Study on miR-199a-3p regulating BRCA1 to influence the sensitivity
of small cell lung cancer cells to apatinib^{*}

ZHANG Jing,LI Weiyuan[△],HU Guozhi,GUO Yihang

Department of Oncology,Tangshan Central Hospital,Tangshan,Hebei 063000,China

^{*} 基金项目:河北省青年科技课题(20181033)。
作者简介:张静,女,副主任医师,主要从事肿瘤肺癌方向的研究。 [△] 通信作者,E-mail:liweiyuan198903@163.com。

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which miR-199a-3p regulates breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) to affect the sensitivity of small cell lung cancer (SCLC) cells to apatinib. **Methods** Human SCLC cell lines (H446, H1688) and normal bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were cultured. Apatinib-resistant SCLC cell lines (H446/APA and H1688/APA) were established. The resistant cells were divided into untransfected and transfected cells (transfected with miR-199a-3p mimics, miR-NC, sh-BRCA1 or sh-NC). Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to measure miR-199a-3p expression levels in BEAS-2B, H446, H1688, H446/APA, H1688/APA, and miR-199a-3p mimics-transfected, miR-NC-transfected H446/APA and H1688/APA cells. Western blotting was performed to detect BRCA1 protein expression in normal bronchial epithelial cells BEAS-2B, H446, H1688, H446/APA, H1688/APA, and H446/APA, H1688/APA cells transfected with different nucleic acid molecules. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of apatinib were determined by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay in H446, H1688, H446/APA, H1688/APA and H446/APA, H1688/APA cells transfected with different nucleic acid molecules to determine the cell viability of H446/APA, H1688/APA cell transfected with different nucleic acid molecules. The number of colonies of H446/APA and H1688/APA cells transfected with different nucleic acid molecules was analyzed by colony formation assay. The apoptosis rate of H446/APA and H1688/APA cells transfected with different nucleic acid molecules was detected by flow cytometry. Migration and invasion of H446/APA and H1688/APA cells transfected with different nucleic acid molecules were determined by Transwell assay. The luciferase activity of luciferase reporter gene vectors was determined by dual luciferase reporter gene assay system to analyze the association between miR-199a-3p and BRCA1. **Results** Compared with BEAS-2B cells, miR-199a-3p expression levels in H446, H1688, H446/APA and H1688/APA cells were significantly reduced ($P < 0.05$), while BRCA1 protein levels were elevated significantly ($P < 0.05$). Compared with the corresponding parental cells, miR-199a-3p expression levels in both H446/APA and H1688/APA cells were decreased ($P < 0.05$), and BRCA1 protein expression levels were increased ($P < 0.05$). In the same cell lines (H446/APA, H1688/APA) transfected with different nucleic acid molecules, miR-199a-3p expression level in cells transfected with miR-199a-3p mimics were significantly higher than those in cells transfected with miR-NC ($P < 0.05$); the differences in BRCA1 protein level, IC_{50} value, cell viability, number of colonies, apoptosis rate, number of migration and number of invasion between cells transfected with miR-199a-3p mimics and cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-NC were not statistically significant ($P > 0.05$); the BRCA1 protein level, IC_{50} value, cell viability, number of colonies, number of migration and number of invasion in cells transfected with miR-NC and cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 were higher than those in cells transfected with miR-199a-3p mimics and cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-NC ($P < 0.05$), while the apoptosis rates were lower than those in cells transfected with miR-199a-3p mimics and cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-NC ($P < 0.05$); compared with cells transfected with miR-NC, the apoptosis rate of cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 increased obviously ($P < 0.05$), while the number of colonies, number of migration and number of invasion of H446/APA and H1688/APA cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 decreased obviously ($P < 0.05$), but the differences in BRCA1 protein levels, IC_{50} values and cell viability between cells transfected with miR-NC and cells transfected with miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 were not statistically significant ($P > 0.05$). The results of luciferase gene reporter showed that the luciferase activities of H446/APA and H1688/APA cells transfected with miR-199a-3p mimics containing WT-BRCA1 reporter gene plasmid were lower than those of the same cell lines transfected with miR-NC ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-199a-3p could enhance the sensitivity of SCLC cells to apatinib by targeting BRCA1 levels, providing a potential target for improving chemotherapy efficacy in SCLC.

Key words: miR-199a-3p; small cell lung cancer; apatinib; chemoresistance; sensitivity; mechanism

小细胞肺癌(SCLC)是一种具有高度侵袭性和致命性的肺癌亚型,其特征是肿瘤抑制因子 RB1 和 p53 双等位基因失活^[1]。早期 SCLC 患者可通过手术进行治疗,但并不适合转移性和晚期患者。对于无法进行手术的患者,化疗是其常用的治疗方式。阿帕替尼是一种口服小分子酪氨酸激酶抑制剂,可通过抑制肿瘤血管生成,发挥治疗肿瘤的作用^[2]。有研究报道阿帕替尼对晚期 SCLC 患者有一定的临床获益,且安全可控^[3],但与其他分子靶向药物一样,先天性或获得性耐药性仍然是阿帕替尼临床应用的障碍^[4]。因此,为了确定有效的治疗靶点以提高 SCLC 对阿帕替尼的敏感性,有必要探索阿帕替尼耐药的分子机制。微小 RNA(miRNA)是长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA,可通过抑制目标 miRNA 在转录后的水平来参与调节多个细胞过程^[5-6]。miRNA 表达模式的改变与许多疾病相关,如癌症、心脏病、神经系统疾病等^[7-8]。此外,miRNA 被认为是潜在的化疗增敏生物标志物^[9]。miRNA-199a-3p(miR-199a-3p)在多种肿瘤中异常表达,并参与癌细胞生长、侵袭和凋亡等生物学过程。有研究发现 miR-199a-3p 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中下调,其过表达可抑制细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡,并且 miR-199a-3p 可增加吉非替尼在 NSCLC 中的敏感性^[10]。然而,miR-199a-3p 是否可提高 SCLC 对阿帕替尼的敏感性尚未可知。人乳腺癌易感基因 1(BRCA1)定位在人体第 17 号染色体长臂上,是一种重要的肿瘤抑制基因。除了乳腺癌和卵巢癌之外,BRCA1 还增加了对结直肠癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌和胃癌的易感性^[11]。本研究探讨了 miR-199a-3p 通过调控 BRCA1 影响小细胞肺癌细胞对阿帕替尼敏感性的机制,旨在阐述阿帕替尼治疗 SCLC 的作用机制,以改善临床药物治疗效果。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人 SCLC 细胞系 H446、H1688 以及正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 均购自美国典型培养物保藏中心。本研究通过本院医学伦理委员会审批通过(伦理审批号:2022-RE-406)。

1.2 主要试剂与仪器 Transwell 试剂盒、DMEM、胎牛血清(PBS)购于美国 Gibco 公司,RIPA 试剂、BCA 蛋白试剂盒、ECL 发光试剂盒、胰蛋白酶、Lipofectamine™ 2000 购于美国 Thermo Scientific 公司,BRCA1、GAPDH 一抗和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗购于英国 Abcam 公司,PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒购于东京 TaKaRa 公司,Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司,双荧光素酶报告

基因检测试剂盒购于北京 Solarbio 公司,四甲基嘧啶蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司,阿帕替尼购自美国 Selleck 公司。7500 实时 PCR 系统购于美国 Applied Biosystems 公司,FACS Canto II 流式细胞仪购于美国 BD 公司,多功能酶标仪购于美国 BioTek 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞处理 将人 SCLC 细胞系 H446、H1688 以及正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 置于含 10% PBS 的 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 环境下培养。阿帕替尼耐药 SCLC 细胞(H446/APA 或 H1688/APA)由亲代细胞(原细胞)H446 或 H1688 细胞逐渐暴露于浓度不断增加的阿帕替尼(5~250 nmol/L)中建立。

1.3.2 细胞转染 建立过表达序列(miR-199a-3p mimics)、阴性对照(miR-NC)、靶向抑制序列(sh-BRCA1)、阴性对照 RNA(sh-NC),采用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒对 H446/APA、H1688/APA 细胞进行转染,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 耐药性和细胞活力测定 通过 MTT 法测定阿帕替尼耐药性和细胞活力。为了分析阿帕替尼耐药性,用不同剂量的阿帕替尼(0、4、8、12、16、20、24、28、32 nmol/L)处理未转染或转染的 H446/APA、H1688/APA 细胞 48 h。随后,在指定时间点,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)再孵育 4 h,然后加入 150 μL 二甲基亚砷溶解。最后,使用酶标仪测量 490 nm 处的细胞吸光度,进而计算阿帕替尼在细胞中的 50% 生长抑制浓度(IC₅₀ 值)。在细胞转染后的 48 h 使用 MTT 进行测定细胞活力。

1.3.4 集落形成测定 将转染不同核酸分子的 H446/APA 或 H1688/APA 细胞(5×10^2 个细胞/孔)引入 6 孔板中,然后在 37℃ 下孵育 2 周。弃去培养基后,将这些细胞在 4% 多聚甲醛中固定 30 min 后用 0.1% 结晶紫染色。最后,用显微镜对可见菌落进行成像。

1.3.5 细胞凋亡检测 将转染不同核酸分子的 H446/APA 或 H1688/APA 细胞使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,在结合缓冲液中重悬后,依次加入 Annexin V-FITC 与 PI,室温避光孵育 10 min,使用流式细胞仪进行检测。

1.3.6 Transwell 检测细胞迁移及侵袭情况 将转染不同核酸分子的 H446/APA 或 H1688/APA 细胞以 5×10^4 个细胞/孔添加到无血清 DMEM 培养的上室,下室加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。约 24 h 后,将附着于底面的细胞用甲醇固定 30 min 后用 0.1% 结晶紫染色。然后,用倒置显微镜(100×)分析迁移的细胞。对于侵袭测定,将细胞(1×10^6 个细

胞/孔)加入铺有 Matrigel 基质胶的上室中,随后的测试程序与迁移一致。

1.3.7 反转录实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

通过 TRIzol 试剂从正常支气管上皮细胞 BEAS-2B、H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 及转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-NC 的 H446/APA、

H1688/APA 细胞中提取总 RNA,然后使用 Prime-Script™ RT Master Mix 试剂盒合成 cDNA。然后,在 7500 实时 PCR 系统上,使用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 分析。采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算 miR-199a-3p 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	正向 5'-3'	反向 3'-5'
miR-199a-3p	GGATGCGATCCATGATACAG	GATCAGTGCATCCCACTGGAGA
U6	AGTAGACTCACTATAGCACG	CGTGCCTACTGTGACCGTAGAG

1.3.8 蛋白质印迹法(WB)分析 使用 RIPA 缓冲液从正常支气管上皮细胞 BEAS-2B、H446、H1688、H446/APA、H1688/APA 及转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞中提取总蛋白后,通过 10% SDS-PAGE 分离处理后的样品(50 μg),并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,然后用 5%脱脂牛奶封闭 1 h;将膜与一抗 BRCA1 (1 : 1 000,ab16780)和 GAPDH 一起孵育,4 ℃过夜;用二抗辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔进一步检测 1 h。根据 ECL 检测试剂盒进行可视化检测。

1.3.9 双荧光素酶报告基因检测 PCR 扩增含有 miR-199a-3p 结合位点的 BRCA1 的 3'UTR 序列,建立具有野生型 BRCA1 (WT-BRCA1)和突变型 BRCA1 (MUT-BRCA1)。然后,使用 lipofectamine 2000 转染试剂将荧光素酶报告载体分别与 miR-NC 或 miR-199a-3p mimics 共转染到 H446/APA 或 H1688/APA 细胞中。最后通过双荧光素酶报告基因检测系统测定荧光素酶报告基因载体的荧光素酶活性。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行数据处理和统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 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,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿帕替尼在未转染的各细胞中的 IC₅₀ 值比较 阿帕替尼在 H446/APA、H1688/APA 细胞中的 IC₅₀ 值分别为(18.62±1.63)μm、(18.98±1.75)μm,在 H446/APA、H1688/APA 细胞的亲代细胞 H446、H1688 中的 IC₅₀ 值分别为(8.14±1.07)μm、(9.03±0.96)μm;4 种细胞的 IC₅₀ 值比较,差异有统计学意义($F = 107.700, P < 0.05$);阿帕替尼在 H446、H1688 细胞中的 IC₅₀ 值分别低于 H446/APA、H1688/APA 细胞,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 未转染的各细胞中 miR-199a-3p、BRCA1 蛋白表达水平比较 结果显示,与正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 相比,人 SCLC 细胞系 H446、H1688、H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平均明显降低($P < 0.05$);与相应的亲代细胞 H446、H1688 相比,H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平均明显降低($P < 0.05$)。WB 分析结果显示,与正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 相比,人 SCLC 细胞系 H446、H1688、H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 BRCA1 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$);与相应的亲代细胞 H446、H1688 相比,H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 BRCA1 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

表 2 各细胞中 miR-199a-3p 及 BRCA1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

细胞	miR-199a-3p	BRCA1 蛋白
BEAS-2B	1.12±0.09	1.03±0.03
H446	0.51±0.08 *	1.95±0.09 *
H1688	0.49±0.08 *	2.03±0.09 *
H446/APA	0.28±0.07 * #	2.79±0.10 * #
H1688/APA	0.21±0.06 * #	2.86±0.11 * #
<i>F</i>	131.300	42.900
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 BEAS-2B 比较,* $P < 0.05$;与相应亲代细胞 H446、H1688 比较,# $P < 0.05$ 。

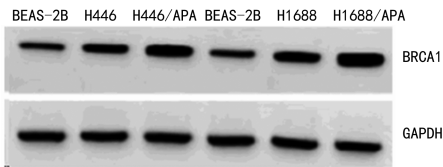


图 1 未转染的各细胞中 BRCA1 蛋白表达 WB 图

2.3 转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-NC 的 H446/APA、H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达

水平比较 转染不同核酸分子的同一细胞系(H446/APA、H1688/APA)中,转染 miR-199a-3p mimics 的细胞中 miR-199a-3p 表达水平均明显高于转染 miR-NC 的细胞($P<0.05$)。见表 3。

表 3 转染 miR-199a-3p mimics、miR-NC 的 H446/APA、H1688/APA 细胞中 miR-199a-3p 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)		
转染	H446/APA	H1688/APA
转染 miR-NC	1.02±0.0	1.03±0.05
转染 miR-199a-3p mimics	2.61±0.09	2.74±0.10
<i>t</i>	−41.05	−37.46
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.4 转染不同核酸分子的 H446/APA 和 H1688/APA 细胞 BRCA1 蛋白表达水平、细胞凋亡率、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数比较 转染不同核酸分子的同一细胞系(H446/APA、H1688/APA)中,转染 miR-199a-3p mimics 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞凋亡率、细胞迁移数、细胞侵袭数与转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞相比,差异均无统计学意义($P>0.05$);转染 miR-NC、转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞

侵袭数均高于转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞($P<0.05$),而细胞凋亡率均低于转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 的细胞($P<0.05$);与转染 miR-NC 的 H446/AP、H1688/AP 细胞相比,转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞凋亡率升高($P<0.05$),而细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数均降低($P<0.05$),但转染 miR-NC 与转染 miR-199a-3p mimics+sh-BRCA1 的细胞中 BRCA1 蛋白水平、IC₅₀ 值、细胞活力比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4~5 和图 2~5。

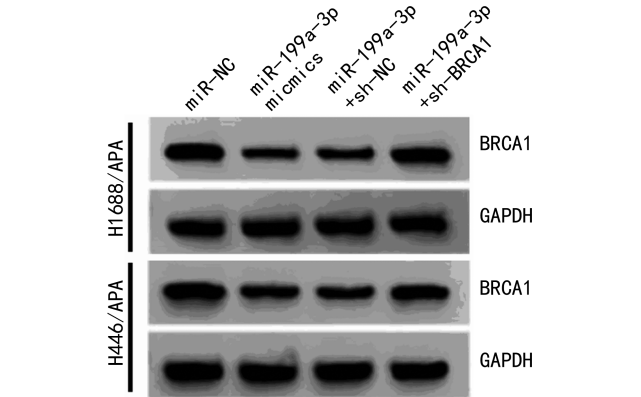


图 2 转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞 BRCA1 蛋白表达 WB 图

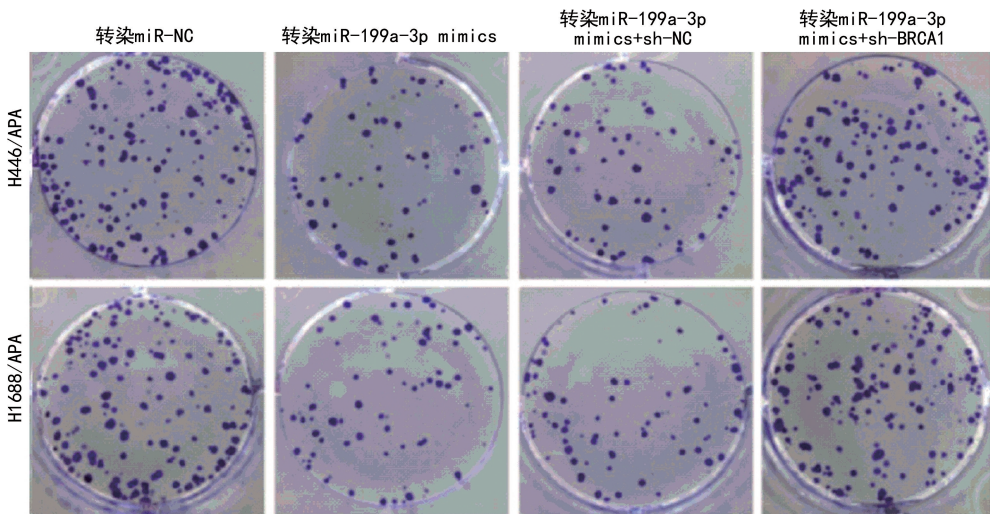


图 3 转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞集落情况

表 4 转染不同核酸分子的 H446/APA 细胞 BRCA1 蛋白表达水平、细胞凋亡率、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	BRCA1 蛋白 (/GAPDH)	IC ₅₀ 值 (μ m)	细胞活力 (%)	细胞集落数 (个)	细胞凋亡率 (%)	细胞迁移数 (个)	细胞侵袭数 (个)
转染 miR-199a-3p mimics	0.49±0.07	11.23±0.98	54.24±4.63	42.69±5.53	18.64±4.32	53.89±5.28	50.26±4.74
转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC	0.51±0.06	12.94±2.25	51.36±5.62	48.95±4.37	22.41±2.93	52.96±4.83	45.80±3.58
转染 miR-NC	1.04±0.08*	18.62±1.63*	97.10±2.12*	102.06±7.13*	7.15±2.03*	129.63±11.75*	120.96±9.31*

续表 4 转染不同核酸分子的 H446/APA 细胞 BRCA1 蛋白表达水平、细胞凋亡率、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	BRCA1 蛋白 (/GAPDH)	IC ₅₀ 值 (μm)	细胞活力 (%)	细胞集落数 (个)	细胞凋亡率 (%)	细胞迁移数 (个)	细胞侵袭数 (个)
转染 miR-199a-3p mimics + sh-BRCA1	0.98 $\pm$ 0.10 [*]	18.25 $\pm$ 4.96 [*]	88.69 $\pm$ 9.83 [*]	97.35 $\pm$ 7.02 ^{*#}	13.71 $\pm$ 1.43 ^{*#}	100.87 $\pm$ 8.14 ^{*#}	87.69 $\pm$ 6.74 ^{*#}
F	84.210	10.060	85.480	156.700	31.250	132.600	178.400
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 比较,^{*} $P<0.05$;与转染 miR-NC 比较,[#] $P<0.05$ 。

2.5 转染 miR-NC、转染 miR-199a-3p mimics 的 H446/APA、H1688/APA 细胞荧光素酶活性比较

荧光素酶基因报告结果显示:转染 miR-199a-3p mimics 的 H446/APA、H1688/APA 细胞中含有 WT-BRCA1 报告基因质粒的荧光素酶活性均低于转染 miR-NC 的同一细胞系($P<0.05$);转染 miR-199a-3p mimics 和转染 miR-NC 的 H446/APA 或 H1688/APA 细胞中含有 MUT-BRCA1 报告基因质粒的荧光素酶活性比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。

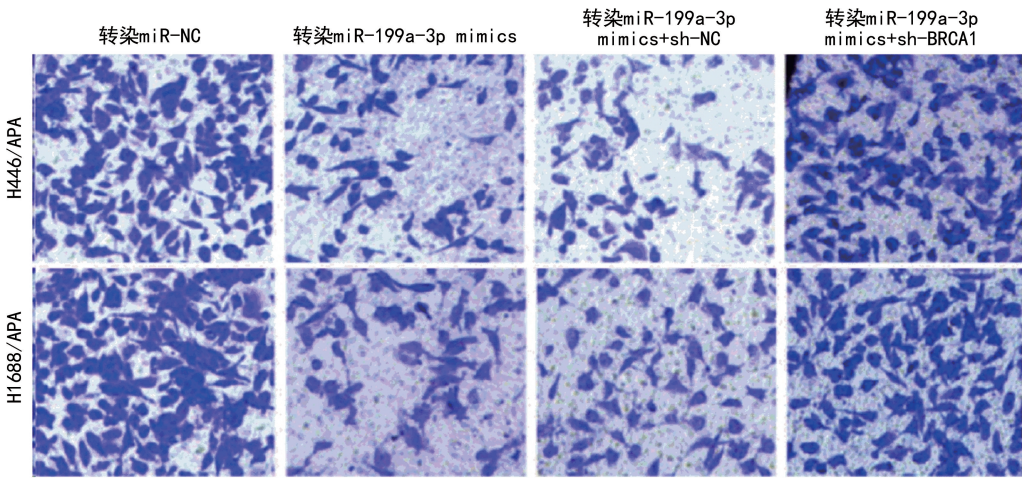


图 4 转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞迁移情况(结晶紫染色,100 $\times$)

表 5 转染不同核酸分子的 H1688/APA 细胞 BRCA1 蛋白表达水平、细胞凋亡率、IC₅₀ 值、细胞活力、细胞集落数、细胞迁移数、细胞侵袭数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	BRCA1 蛋白 (/GAPDH)	IC ₅₀ 值 (μm)	细胞活力 (%)	细胞集落数 (个)	细胞凋亡率 (%)	细胞迁移数 (个)	细胞侵袭数 (个)
转染 miR-199a-3p mimics	0.45 $\pm$ 0.07	12.50 $\pm$ 0.99	49.32 $\pm$ 5.03	51.78 $\pm$ 5.37	21.75 $\pm$ 4.51	51.70 $\pm$ 5.09	51.87 $\pm$ 4.69
转染 miR-199a-3p mimics + sh-NC	0.49 $\pm$ 0.06	11.73 $\pm$ 2.02	50.54 $\pm$ 5.33	51.69 $\pm$ 3.88	22.12 $\pm$ 3.26	53.69 $\pm$ 4.79	52.88 $\pm$ 4.03
转染 miR-NC	0.98 $\pm$ 0.09 [*]	18.98 $\pm$ 1.75 [*]	96.89 $\pm$ 2.41 [*]	148.36 $\pm$ 7.85 [*]	8.17 $\pm$ 1.94 [*]	131.85 $\pm$ 11.56 [*]	131.08 $\pm$ 11.50 [*]
转染 miR-199a-3p mimics + sh-BRCA1	0.86 $\pm$ 0.10 [*]	19.56 $\pm$ 4.48 [*]	89.79 $\pm$ 9.67 [*]	101.45 $\pm$ 7.60 ^{*#}	14.56 $\pm$ 1.58 ^{*#}	103.52 $\pm$ 8.17 ^{*#}	107.32 $\pm$ 7.13 ^{*#}
F	63.310	17.200	93.860	223.000	65.200	173.300	317.700
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与转染 miR-199a-3p mimics、转染 miR-199a-3p mimics+sh-NC 比较,^{*} $P<0.05$;与转染 miR-NC 比较,[#] $P<0.05$ 。

表 6 转染 miR-NC、转染 miR-199a-3p mimics 的的 H446/APA、H1688/APA 细胞荧光素酶活性比较

转染	H446/APA		H1688/APA	
	WT-BRCA1	MUT-BRCA1	WT-BRCA1	MUT-BRCA1
转染 miR-NC	1.01 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.06
转染 miR-199a-3p mimics	0.28 $\pm$ 0.04 ^a	0.93 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.07 ^a	0.98 $\pm$ 0.07

注:与同细胞转染 miR-NC 比较,^a $P<0.05$ 。

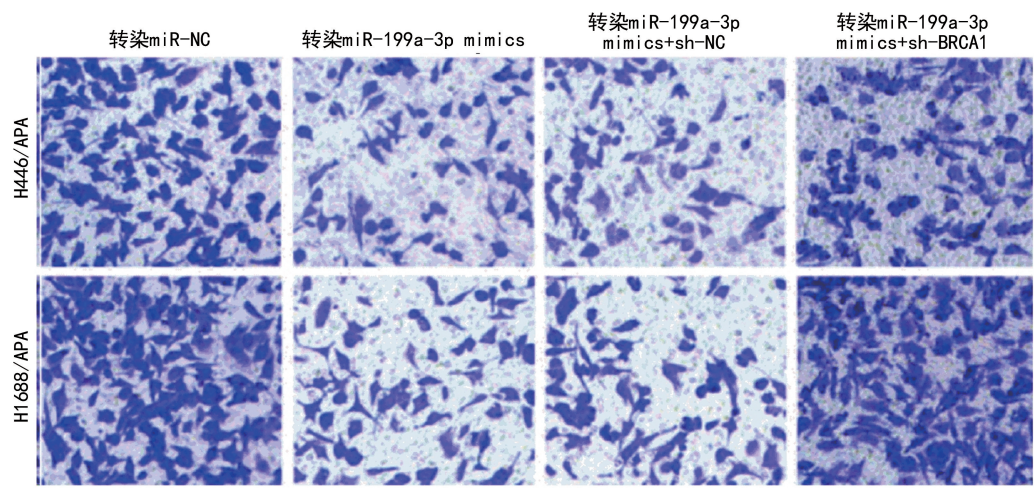


图 5 转染不同核酸分子的 H446/APA、H1688/APA 细胞侵袭情况(结晶紫染色,100×)

3 讨 论

化疗耐药性的发生被普遍认为是肿瘤治疗的主要障碍,会导致复发和预后不良^[12-13]。目前,对于化疗耐药性产生的机制并未完全阐明,临床上也缺乏有效的增敏剂。因此,探寻化疗耐药的分子机制及寻找用于增敏的靶点一直是研究的热点之一。miRNA 参与超过 30% 的人类基因表达的转录后调节,从而影响几乎每个细胞过程,并且 miRNA 表达的变化在包括癌症在内的人类病理学中发挥着关键作用^[14]。如今,miRNA 在肿瘤进展和耐药性中的重要作用引起了广泛关注^[15]。有研究发现,miR-302a 通过靶向 NFIB 和 CD44 抑制结直肠癌的转移和西妥昔单抗耐药性^[16],miR-142-3p 可以通过靶向高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)来抑制自噬并增强乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性^[17],miR-199a-3p 是一种与肿瘤发生高度相关的 miRNA,参与并调控多种癌细胞的生物学行为^[18]。然而,SCLC 细胞中 miR-199a-3p 与阿帕替尼耐药性之间的关联仍不清楚。

在本研究中,不同浓度的阿帕替尼处理细胞 48 h 后,通过 MTT 测定评估 IC₅₀ 值,结果显示阿帕替尼在 H446/APA 或 H1688/APA 细胞中的 IC₅₀ 值明显高于其亲代细胞中的 IC₅₀ 值,说明 H446/APA 和 H1688/APA 细胞对阿帕替尼产生了耐药性。另外笔者还发现,与亲代细胞相比,阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞中 miR-199a-3p 表达水平降低,提示可通过调控 miR-199a-3p 表达水平影响 SCLC 细胞对阿帕替尼的耐药性。本研究发现,miR-199a-3p 过表达可引起阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞活力和细胞集落数下降,细胞凋亡增加,细胞迁移和侵袭数降低。表明 miR-199a-3p 过表达降低了阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞对阿帕替尼的耐药性,miR-199a-3p 过表达可能是克服 SCLC 患者对阿帕替尼耐药的有效方法。阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞中 miR-199a-3p 表达下调,推测 miR-

199a-3p 可能参与了 SCLC 细胞对阿帕替尼耐药的过程。随后,本研究结果表明 miR-199a-3p 过表达可提高阿帕替尼耐药性以及 SCLC 细胞对阿帕替尼的敏感性。

有研究表明,miR-199a-3p 可通过下调 BRCA1 表达调控三阴性乳腺癌细胞恶性生长并增强其对顺铂和维利帕尼的敏感性^[12]。笔者发现转染 miR-199a-3p mimics 的 H446/APA 和 H1688/APA 细胞中 BRCA1 蛋白表达受到了抑制。本研究荧光素酶报告基因测定确定了 miR-199a-3p 与 BRCA1 之间存在靶向调控关系,miR-199a-3p 可能是通过调控 BRCA1 的表达,从而提高阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞对阿帕替尼的敏感性。BRCA1 在维持基因组稳定性和细胞正常生理功能方面发挥重要作用。BRCA1 在各种细胞过程中发挥着关键作用,包括通过不同途径进行 DNA 修复、细胞周期调控、诱导凋亡、转录激活^[19]。在肿瘤中,功能正常的 BRCA1 可以抑制肿瘤的发生、发展,但当 BRCA1 突变时将增加乳腺癌、卵巢癌、肺癌等肿瘤的风险^[20]。本研究结果显示,与亲代细胞相比,阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞中 BRCA1 蛋白表达水平升高,提示 miR-199a-3p 可直接调控阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞中 BRCA1 蛋白表达;此外,BRCA1 过表达可以消除 miR-199a-3p 过表达对阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞阿帕替尼耐药、细胞生长和转移的抑制作用。表明 BRCA1 参与 miR-199a-3p 过表达介导的阿帕替尼敏感性,且 miR-199a-3p 通过靶向 BRCA1 提高了阿帕替尼耐药性及 SCLC 细胞对阿帕替尼的敏感性,提示 BRCA1 可充当 miR-199a-3p 的潜在靶标。HASSAN 等^[21]的研究中发现 miR-199a-3p 低表达的患者对铂类药物的耐受性更强,且预后显著不良。HO 等^[12]的研究结果中同样证实了 miR-199a-3p 对三阴性乳腺癌的肿瘤抑制作用和对化疗敏感性的诱导作用,且其作用机制与抑制 BRCA1 活性

有关。

本研究也存在一些局限性。首先,未分析 miR-199a-3p、BRCA1 与阿帕替尼耐药患者临床病理特征或生存之间的联系。其次,本研究仅设计了体外细胞实验,未在体内分析 miR-199a-3p/BRCA1 轴的作用。此外,miR-199a-3p/BRCA1 轴是否能影响 SCLC 细胞对其他化疗药物的耐药性仍缺少研究。

综上所述,miR-199a-3p 可通过靶向 BRCA1 恢复阿帕替尼耐药性 SCLC 细胞对阿帕替尼的敏感性,本研究结果有利于人们了解 SCLC 细胞中阿帕替尼敏感性的机制。

参考文献

[1] HUA J, WANG X, MA L, et al. CircVAPA promotes small cell lung cancer progression by modulating the miR-377-3p and miR-494-3p/IGF1R/AKT axis[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 123.

[2] LI H, HUANG H, ZHANG T, et al. Apatinib: a novel antiangiogenic drug in monotherapy or combination immunotherapy for digestive system malignancies [J]. Front Immunol, 2022, 13: 937307.

[3] LUO H, ZHANG L, YANG B, et al. A randomized phase 2 trial of apatinib vs observation as maintenance treatment following firstline induction chemotherapy in extensive stage small cell lung cancer[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(1): 148-159.

[4] LI M, CAI O, YU Y, et al. Paeonol inhibits the malignancy of apatinib-resistant gastric cancer cells via LINC00665/miR-665/MAPK1 axis [J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153903.

[5] JO H, SHIM K, JEOUNG D. Potential of the miR-200 family as a target for developing anti-cancer therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 5881.

[6] SHEN J, WANG Q, LIANG C, et al. Novel insights into miR-944 in cancer[J]. Cancers, 2022, 14(17): 4232.

[7] SAIYED A N, VASAVADA A R, JOHAR S R K. Recent trends in miRNA therapeutics and the application of plant miRNA for prevention and treatment of human diseases [J]. Futur J Pharm Sci, 2022, 8(1): 24.

[8] 马方旭, 郭立娟, 张明洋, 等. miR-22 表达水平与非小细胞肺癌患者放化疗敏感性的关系[J]. 检验医学与临床, 2024, 21(13): 1864-1869.

[9] KARIMI E, DEGHANI A, AZARI H, et al. Molecular mechanisms of miR-214 involved in cancer and drug resistance[J]. Curr Mol Med, 2023, 23(7): 589-605.

[10] LIU X, WANG X, CHAI B, et al. miR-199a-3p/5p regulate tumorigenesis via targeting Rheb in non-small cell lung cancer[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(10): 4187.

[11] HU X, YANG D, LI Y, et al. Prevalence and clinical significance of pathogenic germline BRCA1/2 mutations in Chinese non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Biol Med, 2019, 16(3): 556.

[12] HO J C, CHEN J, CHEUK I W, et al. MicroRNA-199a-3p promotes drug sensitivity in triple negative breast cancer by down-regulation of BRCA1[J]. Am Journal of Transl Res, 2022, 14(3): 2021-2036.

[13] LIU Y, WANG Y, LI X, et al. FOXO3a in cancer drug resistance[J]. Cancer Lett, 2022, 540: 215724.

[14] VESCARELLI E, GERINI G, MEGIORNI F, et al. MiR-200c sensitizes olaparib-resistant ovarian cancer cells by targeting neuropilin 1[J]. J Expe Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 3.

[15] HU X Y, SONG Z, YANG Z W, et al. Cancer drug resistance related microRNAs: recent advances in detection methods[J]. Analyst, 2022, 147(12): 2615-2632.

[16] SUN L, FANG Y, WANG X, et al. MiR-302a inhibits metastasis and cetuximab resistance in colorectal cancer by targeting NFIB and CD44[J]. Theranostics, 2019, 9(26): 8409.

[17] LIANG L, FU J, WANG S, et al. MiR-142-3p enhances chemosensitivity of breast cancer cells and inhibits autophagy by targeting HMGB1[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(6): 1036-1046.

[18] MENG W, LI Y, CHAI B, et al. MiR-199a: a tumor suppressor with noncoding RNA network and therapeutic candidate in lung cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8518.

[19] XU X, QIAO W, LINKE S P, et al. Genetic interactions between tumor suppressors Brcal and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis[J]. Nat Genets, 2001, 28(3): 266-271.

[20] SANCHIS-BORJA M, FALLET V, FABRE E, et al. Characterization of lung cancers in patients with BRCA germline variants: a multicenter series[J]. Lung Cancer, 2022, 173: 67-70.

[21] HASSAN A A, ARTEMENKO M, TANG M K S, et al. Ascitic fluid shear stress in concert with hepatocyte growth factor drive stemness and chemoresistance of ovarian cancer cells via the c-Met-PI3K/Akt-miR-199a-3p signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(6): 537.