

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.004

· 基础研究 ·

lncRNA PVT1 在结直肠癌组织和细胞中的表达及其对顺铂化疗敏感性的影响及机制

熊万成^{1a}, 郝玉玲^{1b}, 平贯芳^{1b}, 王二辉², 赫鹏^{1a}(1. 新乡医学院 第一附属医院 a. 普外科; b. 药学部, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院 公共卫生学院 营养与仪器卫生系, 河南 新乡 453003)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)浆细胞瘤转化迁移基因1(plasmacytoma variant translocation 1, PVT1)对结直肠癌(colorectal cancer, CRC)顺铂(cisplatin, DDP)化疗敏感性的调控作用及其机制。 **方法:** 收集2006年4月至2011年3月新乡医学院第一附属医院112例接受手术切除、经病理确诊CRC患者的癌及癌旁组织标本,从中分别选择各30例顺铂敏感、顺铂耐药癌及癌旁组织;人CRC细胞系HT29、SW480、HCT116、RKO和LoVo与正常结肠上皮细胞株NCM460,构建顺铂耐药LoVo/DDP及RKO/DDP细胞。用脂质体2000分别将siPVT1和siNC、LV-PVT1和LV-NC转染或感染LoVo和RKO细胞或者LoVo/DDP及RKO/DDP细胞。qPCR检测CRC组织及细胞中lncRNA PVT1的表达水平。CCK-8法、流式细胞术、WB实验分别检测敲降PVT1或过表达PVT1对CRC细胞的增殖、凋亡及凋亡相关蛋白的表达影响。构建无胸腺裸鼠CRC皮下移植动物模型,观察对移植瘤体细胞生长及顺铂耐药的影响。 **结果:** PVT1 mRNA在CRC组织及细胞中lncRNA PVT1高表达,其表达水平与顺铂耐药呈正相关。敲除PVT1后,显著降低顺铂耐药的CRC细胞的增殖能力并促进其凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、降低耐药相关分子MDR1和MRP1及抗凋亡相关分子Bcl-2的表达而增加了促凋亡相关分子Bax和活化的caspase-3的表达。过表达PVT1后,则促进细胞增殖并减少其凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。体内实验表明,在CRC细胞中过表达PVT1促进顺铂耐药的形成($P < 0.05$)。 **结论:** 敲降lncRNA PVT1表达可显著抑制CRC耐药细胞株的增殖并促进其凋亡,过表达PVT1可明显促进CRC细胞和动物移植瘤体的生长。PVT1通过抑制MDR1和MRP1的表达,调控内源性凋亡通路,进而增强CRC细胞对顺铂的敏感性。

[关键词] 浆细胞瘤转化迁移基因1;结直肠癌;RKO细胞;LoVo细胞;顺铂耐药;LoVo/DDP细胞;RKO/DDP细胞;增殖;凋亡
[中图分类号] R730.5; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)07-0743-08

Expression of lncRNA PVT1 in colorectal cancer tissues and cells and its effect on chemo-sensitivity to cisplatin and the possible mechanisms

XIONG Wancheng^{1a}, XI Yuling^{1b}, PING Guanfang^{1b}, WANG Erhui², HE Peng^{1a}(1a. Department of General Surgery, 1b. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China; 2. Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regulatory effects and possible mechanism of long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (lncRNA PVT1) on chemotherapy sensitivity to cisplatin (DDP) of colorectal cancer (CRC). **Methods:** A total of 112 pairs of matched cancer and adjacent non-cancerous tissues were obtained from the CRC patients who underwent surgical resection in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University between April 2006 and March 2011. All specimens were confirmed by pathological examinations. Tumor tissues and corresponding adjacent non-cancerous tissues from 30 cisplatin-sensitive CRC patients and 30 cisplatin-resistant patients were selected. Human CRC cell lines (HT29, SW480, HCT116, RKO and LoVo) and normal colonic epithelial cell line NCM460 were also collected for this study; and DDP-resistant RKO/DDP and LoVo/DDP cell lines were constructed. siPVT1, siNC, LV-PVT1 and LV-NC were transfected into LoVo and RKO cells or LoVo/DDP and RKO/DDP cells using lipofectamineTM2000. The expression of lncRNA PVT1 in CRC tissues and cells was tested by Real-time qPCR. CCK-8 assay, flow cytometry and WB were performed to test the effect of PTV1 knockout or enforcement on cell proliferation, apoptosis and expressions of apoptosis-related proteins, respectively. The CRC subcutaneous transplanted xenograft model was established on athymic nude mice to study the effect of

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(No.16B330001)。Project supported by the Key Scientific Research Program of Institutions of Higher Learning in Henan Province (No.16B330001)

[作者简介] 熊万成(1984-),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的临床治疗研究,E-mail:wanchengxiong2011@163.com

[通信作者] 赫鹏(HE Peng, corresponding author),硕士,主任医师,主要从事胃肠肿瘤的临床治疗研究,E-mail:hepeng163001@163.com

PVT1 over-expression on tumor growth and DDP resistance. **Results:** PVT1 was highly expressed in the cancer tissues and CRC cells, and its expression was positively associated with cisplatin resistance of CRC. After knockdown of PVT1, the proliferation of cisplatin-resistant CRC cells was significantly suppressed, while the apoptosis was significantly enhanced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Mechanically, the levels of drug resistance-associated molecules, including MDR1 and MRP1, as well as the expression of anti-apoptotic Bcl-2 were significantly downregulated whereas the levels of pro-apoptotic Bax and cleaved caspase-3 were increased in PVT1-silenced DDP-resistant CRC cells. Over-expression of PVT1 reversely increased proliferation and decreased apoptosis of CRC cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In addition, PVT1 over-expression in CRC cells significantly promoted DDP-resistance *in vivo* ($P < 0.05$). **Conclusion:** Collectively, knockdown of PVT1 expression can significantly suppress cell proliferation and promote apoptosis of DDP-resistant CRC cells. Over-expression of PVT1 can significantly promote the growth of CRC cells *in vitro* and transplanted xenograft *in vivo*. PVT1 regulates endogenous apoptosis pathways and further promotes the sensitivity of CRC cells to cisplatin chemotherapy *via* inhibiting the expressions of MDR1 and MRP1.

[Key words] plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1); colorectal cancer; RKO cell; LoVo cell; RKO/DDP cell; LoVo/DDP cell; cisplatin-resistance; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(7): 743-750. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.004]

含铂方案是结直肠癌(colorectal cancer, CRC)化疗的重要方案,但对顺铂耐药是CRC治疗失败的主要原因之一^[1]。因此,阐明CRC对顺铂耐药的内在机制及其CRC治疗的新靶点势在必行。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是近年来发现的一种具有重要生物学功能的RNA,越来越多的研究^[2-3]表明,lncRNA能够通过多种方式发挥其调控作用,尤其是在癌症的发生发展中发挥了重要的作用。lncRNA浆细胞瘤转化迁移基因1(plasmacytoma variant translocation gene 1, PVT1)可以调控胰腺癌化疗敏感性的癌细胞^[4]。胃癌和卵巢癌中的顺铂耐药细胞也有PVT1的过表达^[5-6]。结合以上报道,本研究围绕PVT1是否影响CRC细胞对顺铂的耐药,通过体外过表达和回复PVT1实验及体内裸鼠荷瘤实验,共同探讨其对结直肠癌顺铂化疗敏感性的调控作用及相关机制,为顺铂耐药CRC的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本及实验动物

收集2006年4月至2011年3月新乡医学院第一附属医院普外科112例接受手术切除、经病理确诊CRC患者的癌及癌旁组织标本,从中分别选择30例顺铂敏感、30例顺铂耐药的CRC癌及癌旁组织。所有患者术前均未接受放疗或化疗,术前均告知患者并签署知情同意书,研究方案得到新乡医学伦理委员会批准。

6周龄、雄性无胸腺裸鼠购自中国科学院动物研究所,实验动物合格证号:SCXK京2016-0002。所有动物实验均获新乡医学院动物研究委员会批准,并按国际指导原则进行动物研究。

1.2 细胞系及主要试剂

人CRC细胞系HT29、SW480、HCT116、RKO和LoVo与正常结肠上皮细胞株NCM460购自美国

ATCC细胞库,顺铂耐药LoVo/DDP及RKO/DDP细胞自行构建^[5]。

PCR试剂盒购自Sigma公司,TRIzol试剂购自Ambion公司,逆转录试剂盒Prime Script™ RT-PCR kit、SsoFast EvaGreen试剂及Lipofectamine™ 2000转染试剂购于大连TaKaRa公司。PVT1特异性小干扰RNA(siPVT1): 5' - CCCAACAGGAGGACAGC UUTT-3'、反义5' - AAGCUGUCCUCCUGUUGGG TT-3'和阴性对照siRNA(siNC)由广州锐博生物科技有限公司合成,PVT1过表达慢病毒载体(LV-PVT1)和阴性对照(LV-NC)购自上海吉玛制药有限公司,SYBRGreen核酸荧光染料购自TaKaRa公司,MRP1、Bax、Bcl-2、裂解(cl)-caspase 3、caspase 3和GAPDH的抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠IgG二抗购自Sigma公司,CCK-8检测试剂盒以及TUNEL检测试剂盒购自碧云天公司,细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

1.3 细胞培养与转染或感染

将CRC细胞系HT29、SW480、HCT116、RKO和LoVo与正常结肠上皮细胞株NCM460,以及顺铂耐药LoVo/DDP及RKO/DDP细胞置于DMEM培养基中,辅以10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素在37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱培养。亲代的LoVo和RKO细胞持续暴露于顺铂12个月,通过增加顺铂浓度从0.5 μg/ml直到细胞获得10 μg/ml的耐药性。每次实验之前,LoVo/DDP和RKO/DDP细胞需在无药物的DMEM培养基中持续传代培养2周,每次增加顺铂浓度需根据细胞状态进行调整。最终获得状态良好、稳定传代的细胞系,用于后续实验。

RKO、LoVo、RKO/DDP和LoVo/DDP依照说明书采用脂质体2000进行转染siPVT1或siNC。转染

48 h后采用qPCR测定转染效率。LoVo和RKO细胞以每个细胞为200 PFU的感染倍数转染LV-PVT1和LV-NC。这些稳定表达的细胞使用G418筛选(500 mg/ml)4周。在随后的体外实验中,依据细胞系分为LoVo组和RKO组。在两个组系中,依据转染或感染质粒和药物处理的不同又依次分为空白对照组、顺铂组、LV-NC+顺铂和LV-PVT1+顺铂组。体内实验分组依据感染质粒和药物处理的不同分为空白对照组、顺铂组、LV-NC+顺铂和LV-PVT1+顺铂组。

1.4 qPCR检测人CRC组织及细胞系中PVT1 mRNA的表达

用TRIzol试剂从CRC组织和细胞中提取总RNA,从总RNA中按照逆转录试剂盒说明书方法合成cDNA。PCR引物序列:PVT1 F为CAGCACTCTGGACGGAC, R为CAACAGGAGAAGCAAACA;MDR1 F为ACCAAGCGCTCCGATACA, R为TCATTGGCGAGCC TGGTAGTC;MRP1 F为GGACCTGGACTTCGTTC TCA, R为CGTCCAGACTTCATCCG;GAPDH F为ACCACAGTCCATGCCATCAC, R为TCACCACCC TGTTGCTGTA。利用SYBRGreen核酸荧光染料通过ABI 7500 qPCR系统进行qPCR检测。以逆转录合成的cDNA为模板,95 °C变性、57 °C退火、72 °C延伸共进行25个循环进行扩增。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算并鉴定目的基因的mRNA的表达水平。

1.5 CCK-8法检测CRC细胞的增殖能力

运用CCK-8检测试剂盒进行细胞增殖能力的检测。在96孔板中接种细胞后,置于培养箱中培养。按照前文所述分组分别处理细胞,然后根据处理的不同时间(0、24、48、72、96 h),向每孔中加入10 μ l CCK-8溶液。将培养板在培养箱内继续孵育2 h,用酶标仪测定波长在450 nm处的光密度(D)值。

1.6 Annexin-V-FITC/PI染色流式细胞术检测CRC细胞的凋亡率

用(FITC)凋亡检测试剂盒在流式细胞仪上检测细胞凋亡。按照说明书处理后,收集细胞并离心,细胞以 1×10^6 /ml的密度进行孵育。100 μ l细胞悬液采用10 μ l Annexin-V-FITC孵育15 min,避光条件下加入PI复染30 min后,上流式细胞仪进行检测,分析细胞凋亡情况。双参数图中,Annexin-V及PI均为阴性的是正常细胞,Annexin-V阳性的为早期凋亡细胞,Annexin-V及PI均为阳性的为晚期凋亡细胞。细胞的凋亡率=早期凋亡细胞百分比+晚期凋亡细胞百分比。

1.7 WB检测CRC细胞中凋亡相关蛋白的表达

用RIPA缓冲液按照指示从各组培养细胞中提取蛋白质,裂解液以10 000 \times g离心20 min,收集上清液用于WB分析。用BCA法测定蛋白浓度(以牛血清

白蛋白为标准)。分离等量的蛋白质行SDS-PAGE、转膜、室温中5%脱脂奶粉封闭1 h。加入MRP1(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:2 000)、cl-caspase 3(1:2 000)、caspase 3(1:1 000)和GAPDH(1:5 000)抗体,在4 °C孵育过夜。次日,加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:10 000)孵育2 h,发光液曝光显影。

1.8 CRC细胞无胸腺裸鼠异种移植瘤模型的建立及观察

将细胞密度 5×10^6 的LV-NC或LV-PVT1感染的RKO细胞接种于雄性无胸腺裸鼠皮下,构建裸鼠CRC细胞皮下异体移植瘤模型。一旦肿瘤大小达60 mm³,将植入未转染细胞的小鼠分为生理盐水组、顺铂组(5 mg/kg),植入LV-NC或LV-PVT1转染细胞的动物给予顺铂(5 mg/kg)。包括空白对照组、顺铂组、LV-NC+顺铂和LV-PVT1+顺铂组,每组5只小鼠。给予顺铂组小鼠腹腔注射顺铂,每周注射2次,共6次。细胞植入6周后,处死动物并解剖肿瘤进行测量和计算体积[计算公式:体积=1/2(长度 \times 宽²)]。移植瘤组织常规固定、包埋及切片,用于TUNEL分析。

1.9 TUNEL法检测移植瘤组织中细胞凋亡

将制备好的石蜡切片脱蜡水化后,用Proteinase K工作液在常温下处理组织20 min。制备TUNEL反应混合液,处理组用50 μ l TdT+450 μ l荧光素标记的dUTP液混匀;而阴性对照组仅加50 μ l荧光素标记的dUTP液,阳性对照组先加入100 μ l DNase 1,反应在室温下孵育30 min。待玻片干后,加50 μ l TUNEL反应混合液(阴性对照组仅加50 μ l荧光素标记的dUTP液)于标本上,加盖玻片或封口膜在暗湿盒中室温反应60 min。DAB染色后,再用苏木精或甲基绿复染冲洗,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。最后,用光学显微镜进行计数(200~500个细胞)并拍照。

1.10 统计学处理

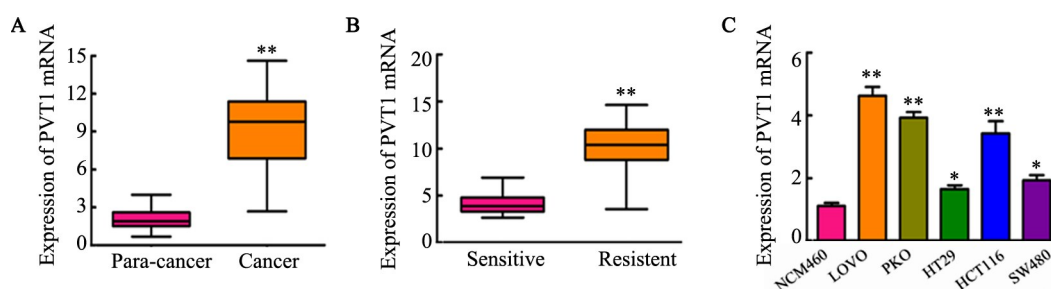
qPCR、细胞增殖、流式细胞术、WB实验均重复3次。采用SPSS20.0软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PVT1 mRNA在CRC组织及细胞中高表达

qPCR检测结果(图1)显示,PVT1 mRNA在CRC组织表达水平显著高于癌旁组织($P < 0.01$,图1A);在顺铂耐药患者组织中PVT1表达水平显著高于顺铂敏感患者($P < 0.01$,图1B)。在CRC细胞系HT29、SW480、HCT116、RKO和LoVo细胞中PVT1 mRNA

表达水平显著高于 NCM460 细胞 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 图 1C), 以 LoVo 和 RKO 细胞 PVT1 表达水平最高, 所以这两种细胞用于后续实验。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Para-cancer or Sensitive or NCM460 group

A: Expression of PVT1 mRNA in cancer and para-cancer tissues; B: Expression of PVT1 mRNA in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant CRC tissues; C: Expression of PVT1 mRNA in HT29, SW480, HCT116, RKO, LoVo and NCM460 cells

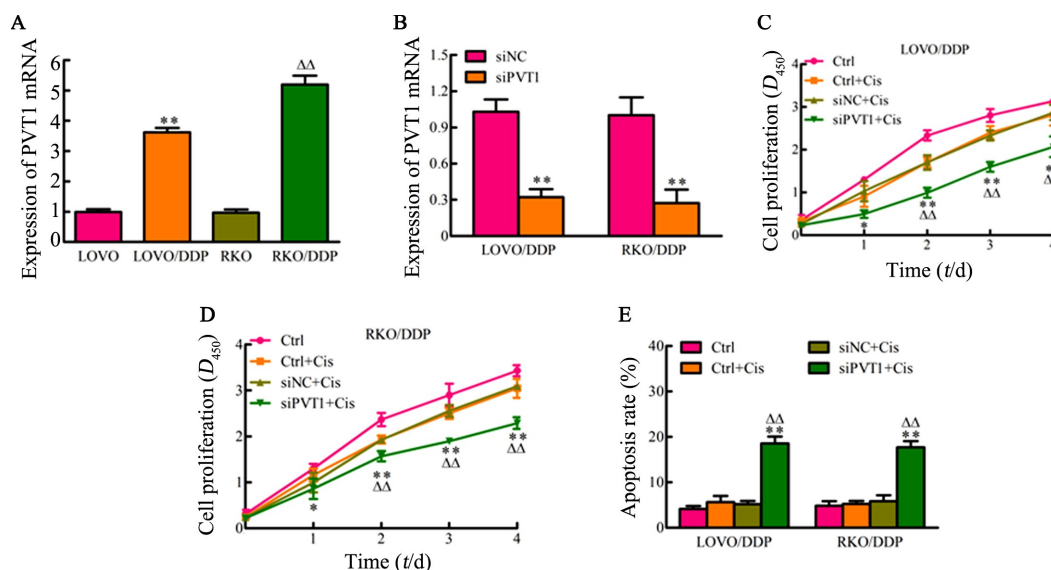
图1 CRC组织和细胞中PVT1 mRNA的表达

Fig.1 Expression of PVT1 mRNA in CRC tissues and cells

2.2 敲除 PVT1 降低 CRC 耐药细胞的增殖能力并促进其凋亡

qPCR 检测结果 (图 2A) 显示, LoVo/DDP 和 RKO/DDP 细胞 PVT1 mRNA 表达水平显著高于 LoVo 和 RKO 细胞 (均 $P < 0.01$); 与 siNC 组比较, LoVo/DDP 与 RKO/DDP 细胞 siPVT1 转染组中 PVT1 mRNA 的表达水平显著降低 (均 $P < 0.01$, 图 2B)。CCK-8 法检测结果 (图 2C、D) 显示, 顺铂治疗组、siNC+顺铂治疗组 LoVo/DDP 和

RKO/DDP 细胞的增殖能力与对照组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。敲除 PVT1 后, 与 siNC 转染组、顺铂治疗组及空白对照组细胞比较, siPVT1 组 LoVo/DDP 和 RKO/DDP 细胞的增殖能力显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)、细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$, 图 2E)。上述结果表明, 敲除 PVT1 可抑制顺铂耐药 CRC 细胞的增殖, 并诱导其凋亡, 继而影响 CRC 细胞的顺铂耐药性。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LoVo or RKO or Ctrl or siNC or Ctrl+Cis group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Other group

A: Expression of PVT1 mRNA in normal and cisplatin-resistant CRC cells; B: Expression of PVT1 mRNA in cisplatin-resistant CRC cells transfected with siPVT1; C and D: Cell proliferation was detected by CCK-8 assay;

E: Cell apoptosis was measured by flow cytometry assay

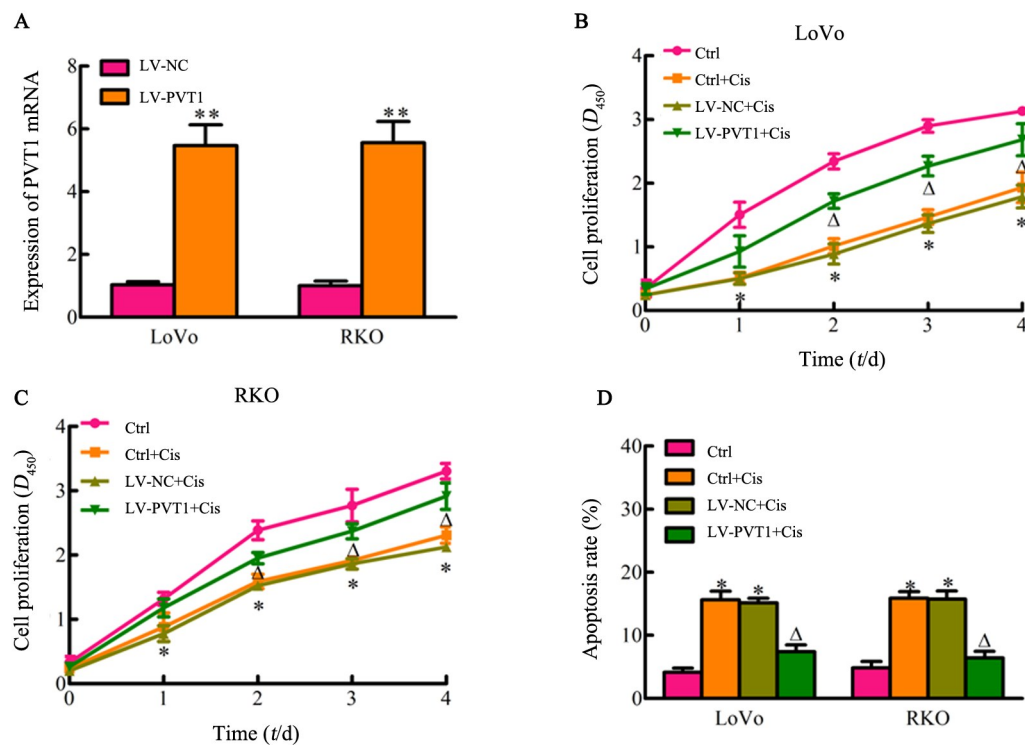
图2 敲除 PVT1 对 CRC 细胞耐药 PVT1 mRNA 表达、细胞增殖与凋亡的影响

Fig.2 Effects of siPVT1 on expression of PVT1 mRNA, cell proliferation and apoptosis in cisplatin-resistant CRC cells

2.3 PVT1 过表达促进CRC细胞的顺铂耐药性

qPCR 检测结果(图 3 A)显示, LV-PVT1 感染 LoVo 和 RKO 细胞可导致 PVT1 表达显著上调(均 $P < 0.01$)。CCK-8 法检测结果(图 3B、C)显示, 顺铂(或 LV-NC+顺铂)治疗的 LoVo 和 RKO 细胞的增殖能力较空白组细胞明显降低(均 $P < 0.05$); 顺铂处理的 PVT1 感染的 RKO 和 LoVo 细胞的增殖能力较 LV-NC

转染的细胞明显增加(均 $P < 0.05$)。流式细胞术检测结果(图 3D)显示, 顺铂可明显诱导非感染的或 LV-NC 转染的 LoVo 和 RKO 细胞的凋亡(均 $P < 0.05$), 但不影响 PVT1 过表达的细胞。上述结果表明, 顺铂明显的抑制 LoVo 和 RKO 细胞的增殖、促进其凋亡。此外, PVT1 过表达可部分逆转顺铂诱导的 CRC 细胞凋亡, 进而促进 CRC 细胞的耐药性。



** $P < 0.01$ vs LV-NC group; * $P < 0.05$ vs Ctrl or siNC or Ctrl+Cis group; ^Δ $P < 0.01$ vs Other group

A: Expression of PVT1 mRNA in LoVo and RKO cells transfected with LV-NC or LV-PVT1; B and C: The proliferation ability of cells in different groups was detected by CCK-8 assay; D: Cell apoptosis was measured by flow cytometry assay

图3 PVT1 过表达对CRC细胞PVT1 mRNA 表达、细胞增殖与凋亡的影响

Fig.3 Effects of PVT1 over-expression on PVT1 mRNA level, cell proliferation and apoptosis in each group of CRC cells

2.4 PVT1 通过抑制内源性凋亡途径促进CRC细胞的顺铂耐药

为研究 PVT1 是如何增强 CRC 细胞的顺铂耐药, 首先用 qPCR 和 WB 实验检测多药耐药相关基因 MDR1 和 MRP1 的表达。qPCR 检测结果(图 4A、B)显示, 与 LV-NC 感染组比较, 感染 LV-PVT1 的 LoVo 和 RKO 细胞中, MDR1 及 MRP1 mRNA 的表达水平显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 LoVo/DDP 和 RKO/DDP 细胞中, 敲低 PVT1 可明显抑制 MDR1 及 MRP1 mRNA 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。WB 检测结果(图 4C)印证了 qPCR 的结果($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时, WB 实验也检测了内源性凋亡通路相关蛋白的表达, 结果如图 4D 所示, LoVo/DDP 与 RKO/DDP 细胞中 PVT1 敲低可提高促凋亡蛋白 Bax 和 cl-caspase-3 水平(均 $P < 0.01$)、降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达(均 $P <$

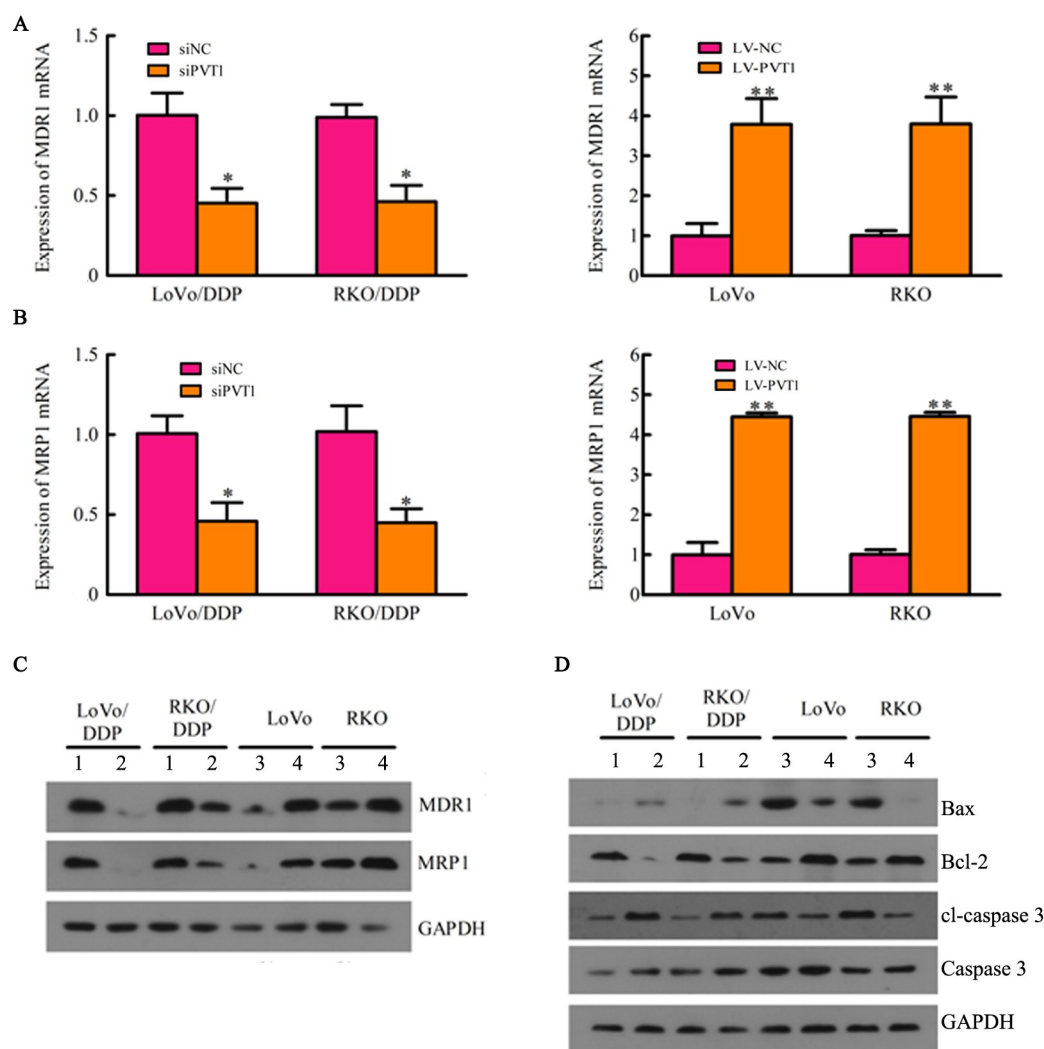
0.01)。但在 LoVo 和 RKO 细胞中 PVT1 过表达可逆转以上所述蛋白的表达(均 $P < 0.01$)。实验结果表明, PVT1 通过抑制 CRC 中多药耐药相关蛋白 MDR1 和 MRP1 的表达以及内源性凋亡通路增强 CRC 细胞的顺铂耐药。

2.5 在体内 PVT1 过表达可增强CRC细胞的顺铂耐药性

成功构建无胸腺裸鼠 CRC 细胞异种移植动物模型。裸鼠皮下注射未感染或感染 LV-NC 或 LV-PVT1 的 RKO 细胞, 顺铂治疗结果显示, 顺铂组和 LV-NC+顺铂治疗组裸鼠肿瘤明显小于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 5A)。同时, PVT1 过表达可显著降低顺铂对肿瘤增殖的抑制作用, 肿瘤质量和肿瘤体积显示了类似的结果($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 5B、C)。TUNEL 分析结果表明, 顺铂治疗组可导致更多的未转染的或

LV-NC 转染的 RKO 细胞的凋亡, 然而, PVT1 过表达可显著减少顺铂引起的细胞凋亡(均 $P < 0.01$, 图 5D)。

上述结果提示, PVT1 过表达可增强体内 CRC 细胞的顺铂耐药性。



* $P < 0.05$ vs siNC group; ** $P < 0.01$ vs LV-NC group

A and B: mRNA expressions of MDR1 and MRP1 in LoVo and RKO cells transfected with siPVT1 or siNC, LV-NC or LV-PVT1;

C and D: WB was performed to detect the protein expression of MDR1, MRP1, Bax, Bcl-2, caspase-3 and cl-caspase-3

图 4 PVT1 通过抑制内源性凋亡通路增加 CRC 细胞的顺铂耐药

Fig.4 PVT1 enhanced cisplatin resistance of CRC cells through inhibiting intrinsic apoptosis pathway

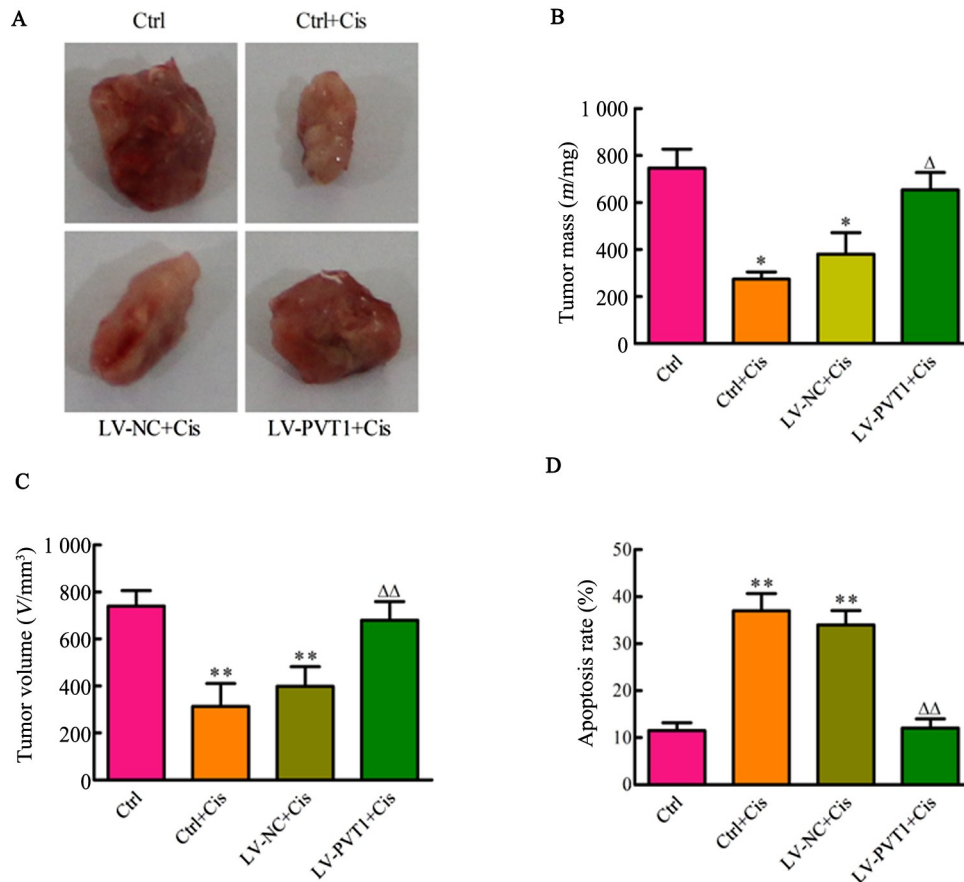
3 讨论

CRC 是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率均较高^[7]。化疗是晚期 CRC 患者的主要治疗方法, 顺铂广泛应用于各种类型的肿瘤包括 CRC 的化疗^[8]。然而, CRC 细胞慢性顺铂暴露可导致顺铂耐药和化疗失败^[9]。有研究显示, 一些 lncRNA 参与许多肿瘤的耐药形成。例如, lncRNA AK126698 通过 Wnt 途径调控肺癌 A549 细胞对顺铂的耐药性^[10]; CRC 中 lncRNA TUG1 通过 miR186/CPEB2 轴介导甲氨蝶呤耐药^[11]; lncRNA PVT1 在急性淋巴细胞白血病中作为癌基因发挥作用^[12]; lncRNA MALAT1 在 CRC 中通过调控 EZH2 与奥沙利铂耐药有关^[13]; lncRNA PVT1 在宫颈癌细胞顺铂耐药中起重要作用^[14]。在胃癌和卵巢癌中, PVT1 在顺铂耐药组织和细胞中过度表达, 敲除 PVT1 基因可逆转顺铂耐药, 反之 PVT1 过表达可增强这些细胞的顺铂耐药性。最新的研究^[15]表明, PVT1/miR-216b/Beclin-1 轴通过调节非小细胞肺癌的凋亡和自噬调控其顺铂耐药性。另外, 一些较为大家共知的参与药物耐药的基因(包括 MDR1 和 MRP1)在顺铂耐药的胃癌细胞较顺铂敏感的细胞中高表达。本研究结果显示, 顺铂耐药的 CRC 组织和细胞中 PVT1 表达增高; 在 LoVo 和 RKO 细胞中, 敲降 LVOV/DDP 和 RKO/DDP

上述结果提示, PVT1 过表达可增强体内 CRC 细胞的顺铂耐药性。

细胞中 PVT1 可抑制细胞增殖、凋亡抗性和降低 MDR1 和 MRP1 的表达, 而 PVT1 过表达可促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 上调 MDR1 和 MRP1 的水平; 体

内实验表明, RKO 细胞中 PVT1 过表达可增强 CRC 顺铂的耐药性。研究结果证明, CRC 中 PVT1 可促进细胞顺铂的耐药性。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs Ctrl+Cis or LV-NC+Cis group

A: Representative photos of xenograft tumors; B and C: Tumor mass and volume;

D: Fluorescence TUNEL assay was carried out to determine cell apoptosis

图5 体内 PVT1 过表达增强 CRC 细胞的顺铂耐药

Fig. 5 Over-expression of PVT1 enhanced cisplatin resistance of CRC cells *in vivo*

许多化疗药物通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用^[14-17]。越来越多的研究支持这一假说, 细胞凋亡失败是产生药物抗性的重要原因^[18]。有研究^[19]显示, Bax、Bcl-2 和 caspase 3 蛋白在细胞内源性凋亡途径中起重要作用, 参与 CRC 细胞的多药耐药。在顺铂耐药的卵巢癌细胞中敲除 PVT1 基因可增加 caspase 3 表达水平^[6]。在 CRC 细胞中 PVT1 具有抗凋亡活性^[20]。为进一步研究 PVT1 对 CRC 细胞顺铂耐药形成的机制, 本课题研究了 PVT1 在 CRC 细胞中对上述耐药相关蛋白的影响。结果发现, 在 LoVo/DDP 和 RKO/DDP 细胞中沉默 PVT1 可上调促凋亡蛋白 Bax 和 cl-caspase 3 的表达、下调凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达, 而 PVT1 过表达可逆转 LoVo 和 RKO 细胞中上述蛋白质的表达。结果提示, PVT1 通过抑制内源性凋亡信号转导通路促进 CRC 细胞顺铂耐药的形成。

总之, 本研究证明了 PVT1 是一个 CRC 肿瘤顺铂耐药的阳性调控因子。敲除顺铂耐药 CRC 细胞中 PVT1 基因, 可抑制细胞增殖和凋亡抵抗, PVT1 过表达可促进 CRC 细胞的增殖并抑制细胞凋亡。PVT1 通过抑制 CRC 细胞内的凋亡信号通路而增强其顺铂耐药性。体内试验表明, PVT1 过表达可促进顺铂耐药的形成。这些发现可能有助于提高 CRC 细胞对化疗药物的敏感性, 改善现有治疗策略, 为 CRC 的有效治疗提供崭新的视角。

[参考文献]

- [1] FUERTES M A, CASTILLA J, ALONSO C, et al. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002, 2(4): 539-551.
- [2] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(6): 354-361. DOI: 10. 1016/j.

- teb.2011.04.001.
- [3] YAN B, WANG Z H. Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(S1): S-34-S-41. DOI:10.1089/dna.2011.1544.
- [4] YOU L, CHANG D, DU H Z, et al. Genome-wide screen identifies PVT1 as a regulator of Gemcitabine sensitivity in human pancreatic cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 1-6. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.02.027.
- [5] ZHANG X W, BU P, LIU L, et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(3): 227-232. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.04.121.
- [6] LIU E L, LIU Z, ZHOU Y X, et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways[J/OL]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 20565-20572[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4723819/>.
- [7] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21387.
- [8] RABIK C A, DOLAN M E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J/OL]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(1): 9-23[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855222/>. DOI:10.1016/j.ctrv.2006.09.006.
- [9] MARIN J J, SANCHEZ D E, MEDINA F, CASTAÑO B, et al. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer[J]. *Drug Metab Rev*, 2012, 44(2): 148-172. DOI:10.3109/03602532.2011.638303.
- [10] YANG Y, LI H, HOU S C, et al. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65309[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3669360/>. DOI:10.1371/journal.pone.0065309.
- [11] LI C F, GAO Y J, LI Y C, et al. TUG1 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer via miR-186 / CPEB2 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 552-557. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.03.042.
- [12] YAZDI N, HOUSHMAND M, ATASHI A, et al. Long noncoding RNA PVT1: potential oncogene in the development of acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Turk J Biol*, 2018, 42(5): 405-413. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6438125/>. DIO: 10.3906/biy-1801-46.
- [13] LI P L, ZHANG X, WANG H Y, et al. MALAT1 is associated with poor response to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients and promotes chemoresistance through EZH2[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(4): 739-751. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-16-0591.
- [14] IDEN M, FYE S, LI K G, et al. The lncRNA PVT1 contributes to the cervical cancer phenotype and associates with poor patient prognosis[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156274[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4883781/>. DOI:10.1371/journal.pone.0156274.
- [15] CHEN L, HAN X, HU Z, et al. The PVT1/miR-216b/Beclin-1 regulates cisplatin sensitivity of NSCLC cells via modulating autophagy and apoptosis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 83(5): 921-931. DIO: 10.1007/s00280-019-03808-3.
- [16] MAKIN G, HICKMAN J A. Apoptosis and cancer chemotherapy[J]. *Cell Tissue Res*, 2000, 301(1): 143-152. DOI:10.1007/s004419900160.
- [17] ABRAHA A M, KETEMA E B. Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment[J/OL]. *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(8): 583-591[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4980648/>. DOI:10.4251/wjgo.v8.i8.583.
- [18] HICKMAN J A. Apoptosis and chemotherapy resistance[J]. *Eur J Cancer*, 1996, 32A(6): 921-926.
- [19] LIN G L, TING H J, TSENG T C, et al. Modulation of the mRNA-binding protein HuR as a novel reversal mechanism of epirubicin-triggered multidrug resistance in colorectal cancer cells[J / OL]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185625[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5624618/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0185625.
- [20] TAKAHASHI Y, SAWADA G, KURASHIGE J, et al. Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers[J/OL]. *Br J Cancer*, 2014, 110(1): 164-171[2019-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887297/>. DOI:10.1038/bjc.2013.698.

[收稿日期] 2019-02-26

[修回日期] 2019-06-03

[本文编辑] 党瑞山