

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.002

miR-216b-5p 靶向 ATG5 介导自噬逆转食管癌 Eca109 细胞的顺铂耐药性

邱善婷, 李晓燕, 陈哲聪, 高梦源, 金舒怡, 陈文虎(杭州医学院 基础医学与法医学院, 浙江 杭州 310059)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-216b-5p 对食管癌 Eca109 细胞顺铂(DDP)耐药性的影响及其作用机制。**方法:** 采用 qPCR 法检测 miR-216b-5p 在食管癌细胞 TE-1、KYSE-150、Eca109 和耐药细胞 Eca109/DDP 中的表达水平。利用脂质体转染技术分别将 miR-216b-5p mimic 及 mimic NC、自噬相关蛋白 5(ATG5) 过表达质粒转染到 Eca109/DDP 细胞中, 用 CCK-8、EdU 法和 FCM 分别检测转染后细胞的增殖和凋亡; mRFP-eGFP-LC3 双荧光标记实验检测 mRFP-eGFP-LC3 慢病毒感染后各组细胞自噬发生情况, WB 法检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin 1 和 P62 表达。用荧光素酶报告基因实验验证 miR-216b-5p 与 ATG5 的靶向关系, WB 法检测 ATG5 的表达。建立裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤模型, 观察 miR-216b-5p 过表达对移植瘤生长的影响。**结果:** miR-216b-5p 在 TE-1、KYSE-150、Eca109 和 Eca109/DDP 细胞中均呈低表达(均 $P < 0.05$)。过表达 miR-216b-5p 可显著抑制 Eca109/DDP 细胞的增殖并诱导凋亡(均 $P < 0.05$), 减少细胞中自噬小体数量($P < 0.05$), 下调 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin 1 蛋白水平、上调 P62 蛋白水平(均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验证实 miR-216b-5p 靶向并负调控 ATG5 的表达($P < 0.05$), 过表达 ATG5 可使 miR-216b-5p mimic 对 Eca109/DDP 细胞增殖、自噬的抑制作用和凋亡的诱导作用明显减弱(均 $P < 0.05$), 自噬相关蛋白 P62 表达降低、LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin 1 表达升高(均 $P < 0.05$)。荷瘤实验结果表明, miR-216b-5p 过表达可显著抑制裸鼠移植瘤的生长($P < 0.05$)。**结论:** miR-216b-5p 过表达可逆转食管癌 Eca109/DDP 细胞对 DDP 的耐药性, 其机制可能与靶向负调控 ATG5 表达并影响细胞自噬有关。

[关键词] 食管癌; Eca109/DDP 细胞; miR-216b-5p; 自噬; 增殖; 凋亡; 顺铂耐药

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0552-08

miR-216b-5p mediates autophagy to reverses cisplatin resistance of esophageal cancer Eca109 cells by targeting ATG5

QIU Shanting, LI Xiaoyan, CHEN Zhecong, GAO Mengyuan, JIN Shuyi, CHEN Wenhui (School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310059, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-216b-5p on cisplatin (DDP) resistance in esophageal cancer Eca109 cells and its mechanism. **Methods:** The expression levels of miR-216b-5p in esophageal cancer cells TE-1, KYSE-150, Eca109 and drug resistant Eca109/DDP cells were detected by qPCR. The miR-216b-5p mimics, mimic NC and autophagy related protein 5 (ATG5) over-expressed plasmids were transfected into Eca109/DDP cells by liposome transfection technique. The proliferation and apoptosis of transfected Eca109/DDP cells were detected by CCK-8, EdU methods and flow cytometry, respectively. The occurrence of autophagy in each group of cells after transfection with mRFP-eGFP-LC3 lentivirus was examined by mRFP-eGFP-LC3 dual fluorescent labeling assay, and the expression of autophagy-related markers, LC3, Beclin 1 and P62, was detected by WB. The targeting relationship between miR-216b-5p and ATG5 was verified by luciferase reporter gene assay, and the expression of ATG5 was detected by Western blotting. A nude mouse Eca109/DDP cell transplanted tumor model was established to observe the effect of miR-216b-5p over-expression on the growth of transplanted tumor. **Results:** miR-216b-5p was lowly expressed in TE-1, KYSE-150, Eca109 and Eca109/DDP cells (all $P < 0.05$). Over-expression of miR-216b-5p significantly inhibited the proliferation and induced apoptosis of Eca109/DDP cells (both $P < 0.05$), reduced the number of autophagosomes in transfected cells ($P < 0.05$), and down-regulated LC3 II/LC3 I ratio and Beclin 1 protein level, but up-regulated P62 protein level (all $P < 0.05$). Luciferase reporter gene assay confirmed that miR-216b-5p negatively regulated ATG5 expression ($P < 0.05$). Over-expression of ATG5 could significantly weaken the effects of miR-216b-5p mimic on suppressing proliferation, autophagy and inducing apoptosis of Eca109/DDP cells (all $P < 0.05$), and reduce the expression of autophagy related protein P62, but increase the LC3 II/LC3 I ratio and Beclin 1 protein level (all $P < 0.05$). The tumor bearing experiments showed that over-expression of miR-216b-5p could significantly inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice ($P < 0.05$).

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(No. 2021ZB078); 浙江省大学生创新创业项目(No. 202113023001); 浙江省医药卫生科技计划项目(No. 2022RC124); 杭州医学院基本科研业务费项目(No. KYQN202001, No. KYYB202003)

[作者简介] 邱善婷(2001—)女, 本科生, 主要从事肿瘤耐药的分子机制研究, E-mail: 1827737107@qq.com

[通信作者] 陈文虎, E-mail: chenwenhu@hmc.edu.cn

Conclusion: Over-expression of miR-216b-5p can reverse DDP resistance in Eca109/DDP cells, and the mechanism may be related to its negative regulation of autophagy-related gene ATG5 to affect cell autophagy.

[Key words] esophageal cancer; Eca109/DDP cell; miR-216b-5p; autophagy; proliferation; apoptosis; cisplatin (DDP) resistance

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 552-559. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.002]

食管癌是临床最常见、最具侵袭性的恶性肿瘤之一。在中国平均每年约有 30 万新发食管癌病例, 由于食管癌早期缺少明显的症状和体征, 多数患者初诊时已属晚期, 导致食管癌生存率低、病死率高^[1-2]。顺铂(cisplatin, DDP)被广泛用作包括食管癌在内的多种肿瘤的治疗剂, 其不良反应的存在和耐药性的产生显著限制了 DDP 的疗效^[3-4]。因此, 深入探讨食管癌细胞 DDP 耐药的机制, 将有助于临床上对食管癌的治疗。近年来, 随着对肿瘤耐药机制研究的不断深入, miRNA 参与肿瘤耐药的机制受到研究者的广泛关注^[5-6]。例如, 过表达 miR-216b-5p 可靶向抑制 TrkB 蛋白水平增强 PC3-DR 细胞对多西他赛的化疗敏感性^[7]。lncRNA IDH1-AS1 通过竞争性结合 miR-216b-5p 调控细胞自噬而促进前列腺癌细胞的增殖和抑制凋亡^[8]。研究结果^[9-11]证实, 自噬相关蛋白 5 (autophagy associated protein 5, ATG5) 在多种类型的肿瘤细胞中高表达并增强肿瘤细胞的自噬及耐药性。目前尚未见有关 miR-216b-5p 通过调控 ATG5 表达参与食管癌细胞 DDP 耐药的作用机制的研究报道。本研究在细胞水平探讨 miR-216b-5p 是否通过靶向 ATG5 介导自噬来影响食管癌 Eca109 细胞 DDP 耐药及其调控机制, 旨在为临床治疗 DDP 耐药的食管癌提供实验依据和新的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物及主要试剂

人食管癌细胞 TE-1、KYSE-150 和 Eca109 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, Eca109/DDP 细胞和人食管上皮细胞 HET-1A 购自浙江美森细胞科技有限公司。雄性 BALB/c 裸鼠 (16~24 g) 购自上海斯莱克公司 [实验动物合格证号: SCXK(沪)2022-0004]。

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和 Lipo2000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher 公司, RIPA 细胞裂解液和 BCA 蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 转染细胞专用模拟物 (miR-216b-5p mimic、NC mimic)、动物体内专用模拟物 (Agomir miR-216b-5p mimic、Agomir NC) 购自上海吉玛基因公司, 荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司, ATG5 相关质粒购自上海吉凯生物技术有限公司, 双荧光 mRFP-eGFP-LC3 慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司, TRIzol、miRNA 逆转录试剂盒、SYBR GREEN 试剂盒及相关 PCR 引物

均购自日本 TaKaRa 公司, ATG5、P62、Beclin 1、LC3B 和 GAPDH 抗体和 HRP 标记的羊抗兔二抗均购自美国 Abcam 公司, CCK-8 试剂盒、EdU 细胞增殖检测试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司。

1.2 细胞培养与分组转染

HET-1A、TE-1、KYSE-150 和 Eca109 细胞培养在含 10%FBS、1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每 1~2 d 更换 1 次培养基。

将 Eca109/DDP 细胞分为空白对照组、NC mimic 组、miR-216b-5p mimic 组、miR-216b-5p mimic+OE-ATG5 组。将 Eca109/DDP 细胞以 5×10⁵ 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 按照 Lipo2000 转染试剂说明书分别将 NC mimic、miR-216b-5p mimic、miR-216b-5p mimic 联合 ATG5 过表达质粒转染至 Eca109/DDP 细胞, 空白对照组细胞为未转染细胞。转染 6 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 换成普通培养基, 继续培养 48 h。通过 qPCR 法检测转染效率。

1.3 qPCR 法检测食管癌细胞中 miR-216b-5p 的表达水平

收集各组食管癌细胞, 用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 测定其纯度和浓度, 按照逆转录试剂盒说明书用逆转录酶将其合成 cDNA。使用 SYBR Green 试剂盒进行 qPCR 检测。miR-216b-5p 的上游引物为 5'-GGGGAAATCTCTGCAGGCAA-3', 下游引物为 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。qPCR 反应条件: 95 °C 预处理 5 min; 95 °C 10 s、95 °C 5 s、60 °C 20 s, 共 40 个循环。反应结束后, 以 U6 为内参对照, 以 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-216b-5p 的相对表达量。

1.4 CCK-8 法检测 DDP 杀伤食管癌细胞的 IC₅₀ 值

取对数生长期 Eca109/DDP 细胞, 以每孔 4×10³ 个细胞接种于 96 孔板, 置于培养箱中过夜培养。次日各组细胞分别加入不同浓度梯度的 DDP (0、2、4、8、16、32 μmol/L), 每组设置 6 个复孔, 继续培养 48 h。每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱中处理 3 h, 使用酶标仪测量 450 nm 处的光密度 (D) 值, 使用 GraphPad 软件计算 IC₅₀ 值。

1.5 EdU 法检测食管癌细胞的增殖能力

取各组对数生长期 Eca109/DDP 细胞, 以每孔

2×10^5 个接种于 24 孔板, 置于培养箱中培养过夜。加入 EdU 液, 37°C 培养 2 h。4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次后行 DAPI 染色, 荧光显微镜下观察并统计细胞的增殖情况。

1.6 FCM 检测食管癌细胞的凋亡水平

取各组对数生长期 Eca109/DDP 细胞, 以每孔 2×10^5 个接种于 24 孔板, 置于培养箱中过夜培养。经胰酶消化, PBS 洗涤, 根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书, 加入 500 μL 缓冲液重悬细胞, 再分别加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液与 10 μL PI 染色液, 混匀后室温下处理 15 min, 以 FCM 检测细胞的凋亡水平。

1.7 WB 法检测食管癌细胞中 LC3 I、LC3 II、P62、Beclin 1 和 ATG5 等蛋白的表达

收集各组细胞, 用 BCA 试剂盒测定提取的总蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭 2 h。加入稀释度均为 1:1 000 的 LC3 I、LC3 II、P62、Beclin 1、ATG5 和 GAPDH 一抗, 4°C 下反应过夜。加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(稀释度为 1:4 000), 室温下处理 2 h, 通过 ECL 化学发光法显色。采集图像, 使用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.8 激光共聚焦显微镜观察 mRFP-eGFP-LC3 慢病毒感染后食管癌细胞的自噬体数量变化

取各组对数生长期 Eca109/DDP 细胞, 以每孔 2×10^5 个接种于 24 孔板, 于培养箱中过夜培养。用 mRFP-eGFP-LC3 慢病毒感染 Eca109/DDP 细胞 24 h 后, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次, 在激光共聚焦显微镜下观察细胞自噬情况并拍照, 对细胞内自噬体数量进行统计分析。

1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-216b-5p 与 ATG5 的靶向结合关系

PCR 扩增含 miR-216b-5p 结合位点的 ATG5 序

列, 构建 ATG5 的野生型(ATG5 WT)载体。采用基因突变技术将结合位点突变后, 构建 ATG5 突变型(ATG5 MUT)载体。分别将 ATG5 WT、ATG5 MUT 与 NC mimic 或 miR-216b-5p mimic 共转染至 Eca109/DDP 细胞, 转染 6 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 48 h。收集细胞, 按照试剂盒说明书裂解细胞, 离心后收集上清液, 检测荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性为内参, 计算相对萤火虫荧光素酶活性。

1.10 裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤模型建立及观察

取对数生长期 Eca109/DDP 细胞 2×10^6 个, 悬浮于 100 μL PBS 中, 接种到裸鼠的右腋部皮下, 实验分为 PBS 组、DDP+Agomir miR-216b mimic 和 DDP+Agomir NC 组(3 只/组)。每周用游标卡尺测量皮下移植瘤长度(L)和宽度(W), 并按照公式 $(L \times W^2)/2$ 计算皮下移植瘤的体积。35 d 后, 安乐死处理裸鼠, 剥离移植瘤, 称质量。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据处理, 用 GraphPad Prism 7 软件绘制相关图片。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-216b-5p 在食管癌细胞中均呈低表达

qPCR 法检测结果(图 1)显示, 食管癌 Eca109、KYSE-150、TE-1 细胞中 miR-216b-5p 的表达水平显著低于 HET-1A 细胞(均 $P < 0.05$, 图 1A); 与 Eca109 细胞相比, Eca109/DDP 细胞中 miR-216b-5p 的表达水平更显著降低($P < 0.05$, 图 1B)。结果表明, 食管癌细胞中 miR-216b-5p 均呈低表达, 而在 Eca109/DDP 细胞中表达水平更低。

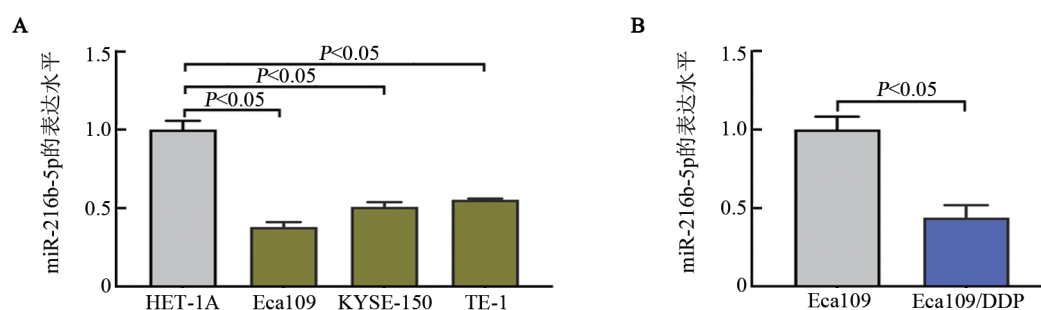


图 1 qPCR 法检测 miR-216b-5p 在各食管癌细胞(A)和 Eca109/DDP 细胞(B)中的表达

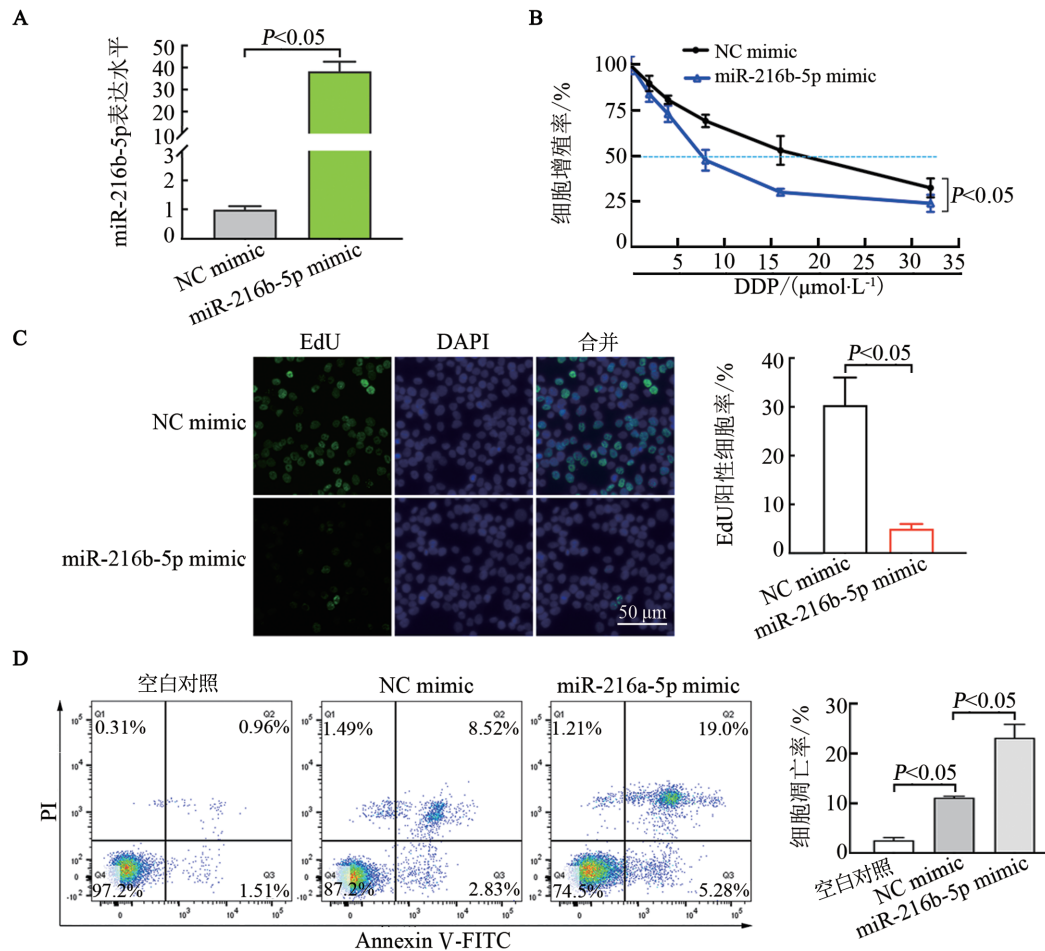
2.2 过表达 miR-216b-5p 可显著增强 Eca109/DDP 细胞 DDP 敏感性

qPCR 法检测结果(图 2A)显示, 与 NC mimic 组

比较, miR-216b-5p mimic 组 Eca109/DDP 细胞中 miR-216b-5p 表达显著升高($P < 0.05$), 表明转染成功。CCK-8 法检测结果(图 2B)显示, 过表达 miR-216b-5p

可显著抑制 Eca109/DDP 的增殖能力 ($P < 0.05$), 其 IC_{50} 值为 $8.55 \mu\text{mol/L}$ 。EdU 实验结果 (图 2C) 显示, 过表达 miR-216b-5p 可显著抑制细胞增殖 ($P < 0.05$)。FCM 检测结果 (图 2D) 显示, 过表达 miR-216b-5p 可

显著促进 Eca109/DDP 细胞凋亡 ($P < 0.05$)。结果表明, 过表达 miR-216b-5p 可增强 Eca109/DDP 细胞 DDP 敏感性。



A: qPCR法检测 miR-216b-5p mimic 的转染效率; B: CCK-8 法检测细胞的增殖能力;

C: EdU 法检测细胞增殖能力 ($\times 100$); D: FCM 检测细胞凋亡水平。

图 2 转染 miR-216b-5p 增强 Eca109/DDP 细胞的 DDP 敏感性

2.3 过表达 miR-216b-5p 可显著抑制 Eca109/DDP 细胞自噬

激光共聚焦显微镜观察结果 (图 3A、3B) 显示, 过表达 miR-216b-5p 显著减少 Eca109/DDP 细胞中自噬小体数量 ($P < 0.05$)。WB 实验结果 (图 3C) 显示, 过表达 miR-216b-5p 可下调 Eca109/DDP 细胞 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin 1 蛋白水平、上调 P62 蛋白水平 (均 $P < 0.05$), 细胞自噬水平降低。结果表明, 过表达 miR-216b-5p 可显著抑制 Eca109/DDP 细胞的自噬。

2.4 miR-216b-5p 靶向调控 ATG5 的表达

通过 TargetScan 数据库预测, 结果 (图 4A) 发现, ATG5 是 miR-216b-5p 的下游潜在靶基因, miR-216b-5p 可结合 ATG5 的 3'UTR。双荧光素酶报告基因实验结果 (图 4B) 显示, 过表达 miR-216b-5p 可以明显下调

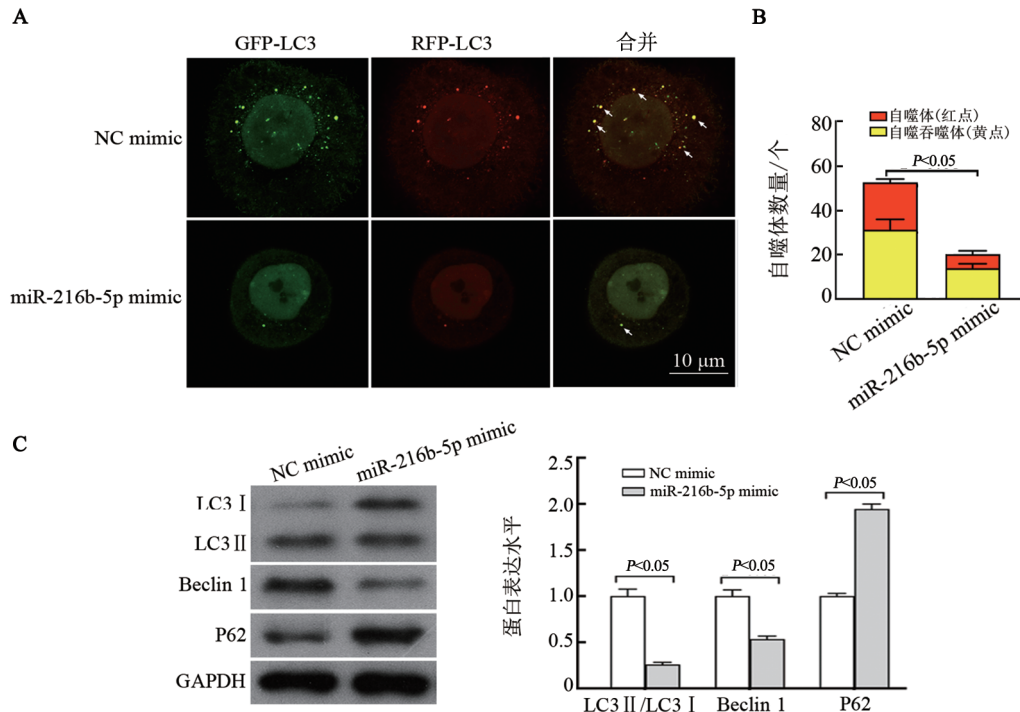
ATG5 WT 细胞的荧光强度 ($P < 0.05$), 而 ATG5 MUT 细胞的荧光强度与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。WB 结果 (图 4C) 显示, 过表达 miR-216b-5p 可显著下调 ATG5 蛋白水平 ($P < 0.05$)。结果表明, miR-216b-5p 可直接靶向负调控 ATG5 的表达。

2.5 miR-216b-5p 靶向 ATG5 介导自噬逆转 Eca109/DDP 细胞 DDP 耐药性

激光共聚焦显微镜观察结果 (图 5A) 显示, 过表达 ATG5 可逆转 miR-216b-5p mimic 对 Eca109/DDP 细胞自噬的抑制作用 ($P < 0.05$)。WB 结果 (图 5B) 显示, 过表达 ATG5 可逆转 miR-216b-5p mimic 导致的 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin 1 蛋白水平下调及 P62 蛋白水平上调 (均 $P < 0.05$)。CCK-8 法实验结果 (图 5C) 显示, 过表达 ATG5 可逆转 miR-216b-5p mimic 对细胞增殖活力及 IC_{50} 值的影响 (均 $P < 0.05$)。EdU 实验

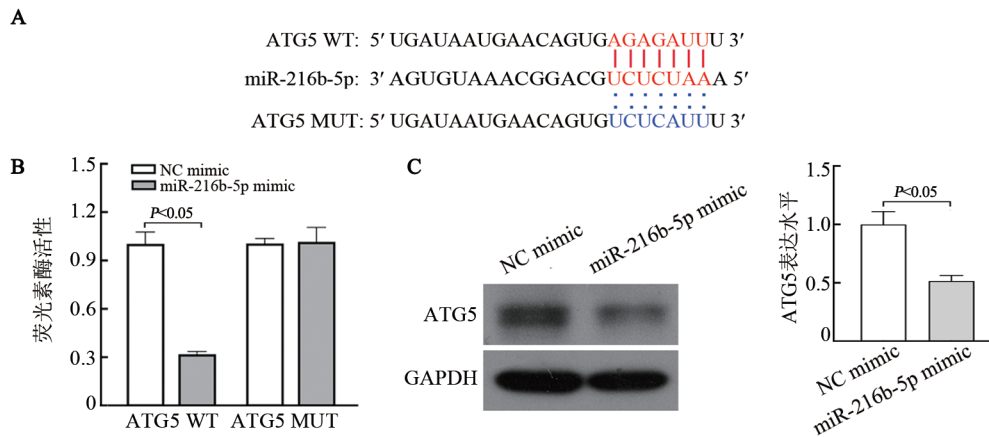
结果(图 5D)显示,过表达 ATG5 可逆转 miR-216b-5p mimic 导致的细胞增殖抑制($P<0.05$)。FCM 检测结果(图 5E)显示,过表达 ATG5 可逆转 miR-216b-5p

mimic 对细胞凋亡的促进作用($P<0.05$)。结果表明,miR-216b-5p 可通过靶向负调控 ATG5 的表达来介导细胞自噬,从而逆转 Eca109/DDP 细胞 DDP 耐药性。



A: 激光共聚焦显微镜下观察 mRFP-GFP-LC3 的荧光自噬小体($\times 630$),箭头示自噬小体;B: mRFP-GFP-LC3 双荧光自噬体数量统计分析;C: WB 法检测 Eca109/DDP 细胞中自噬相关蛋白表达。

图 3 过表达 miR-216b-5p 抑制 Eca109/DDP 细胞的自噬



A: TargetScan 数据库预测 miR-216b-5p 与 ATG5 的结合位点;B: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-216b-5p 与 ATG5 靶向关系;C: WB 法检测 Eca109/DDP 细胞中 ATG5 的表达。

图 4 miR-216b-5p 直接靶向负调控 ATG5 表达

2.6 miR-216b-5p 过表达显著降低裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤 DDP 耐药性

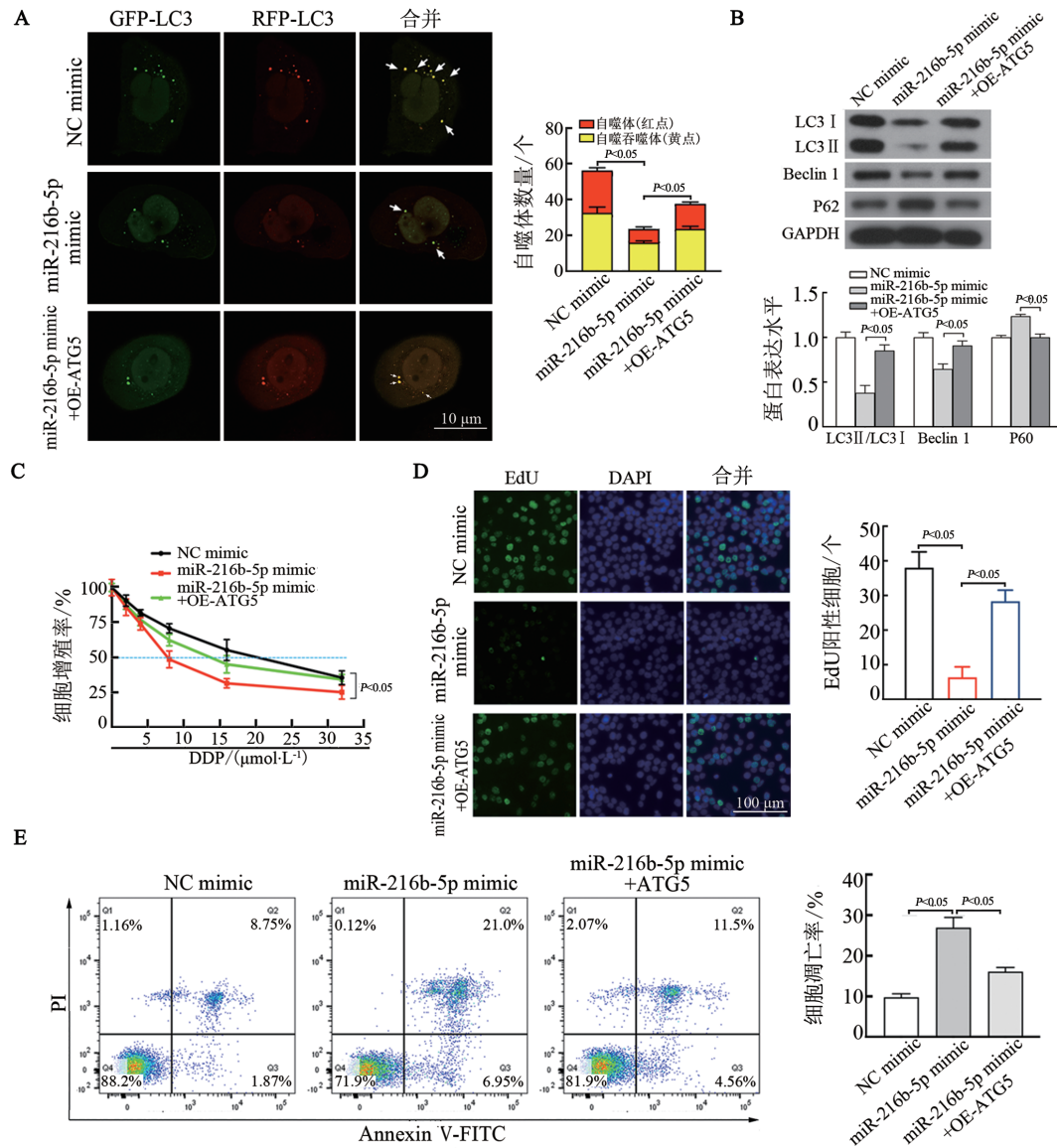
裸鼠荷瘤实验结果(图 6)显示,在 DDP 处理下, Agomir miR-216b-5p mimic 组裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤的体积和质量均显著小于对照组和 Agomir NC 组(均 $P<0.05$),表明 miR-216b-5p 过表达明显降低裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤 DDP 耐药性。

3 讨论

食管癌是消化系统常见恶性肿瘤之一,目前其治疗以手术及放、化疗为主^[12]。DDP 是治疗局部进展期及转移性食管癌的一线药物,其抗肿瘤作用是诱导 DNA 损伤和线粒体凋亡,最终杀死肿瘤细胞^[13-14]。食管癌患者的早期治疗效果显著,但其产生的耐药

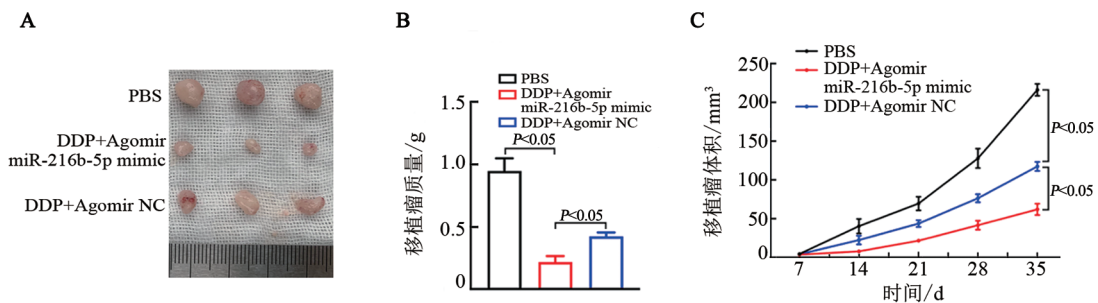
是导致治疗失败的重要原因,其主要机制包括促进药物排出细胞内和减少药物蓄积、增强药物灭活及 DNA 修复、产生保护性细胞自噬、抑制细胞凋亡信号

转导等作用^[15-17]。因此,深入挖掘食管癌治疗中 DDP 耐药的相关机制对提高临床化疗药物的敏感性具有重要意义。



A和B:ATG5 过表达可部分逆转 miR-216b-5p 过表达对 Eca109/DDP 细胞自噬的抑制作用;C和D:ATG5 过表达部分缓解 miR-216b-5p 过表达对 Eca109/DDP 细胞增殖的抑制作用;E:ATG5 过表达促进 Eca109/DDP 细胞凋亡。

图5 过表达 ATG5 部分逆转 miR-216b-5p 过表达对 Eca109/DDP 细胞自噬和 DDP 敏感性的影响



A和B:miR-216b-5p 过表达可显著抑制小鼠移植瘤的生长;C:裸鼠移植瘤的生长曲线。

图6 miR-216b-5p 过表达显著降低裸鼠 Eca109/DDP 细胞移植瘤对 DDP 的耐药性

近年来,关于 miRNA 参与肿瘤耐药机制的研究 越来越深入。研究结果^[18]显示,大约 50% 的 miRNA

与肿瘤有关。如 miR-216b-5p 靶向调控 BTN3A2 促进胶质瘤迁移^[19], miR-216b-5p 调控 ZNF146 促进结直肠癌进展^[20]。此外, miR-216b-5p 在肿瘤耐药中也发挥重要作用, 如 miR-216b-5p 的失调与上皮性癌化疗耐药相关^[21]。本研究发现, miR-216b-5p 在各食管癌细胞和 Eca109/DDP 细胞中均呈低表达, 过表达 miR-216b-5p 可显著增强 Eca109/DDP 细胞的 DDP 敏感性。

ATG5 属于自噬相关蛋白之一, 在应激情况下, 肿瘤细胞的自噬效应被激活或增加, 为其提供能量或再生原料, 从而提高细胞的生存能力^[22-23]。已有研究表明, 在宫颈癌^[24]、乳腺癌^[25]、胃癌^[26]等多种肿瘤中, 化疗会激活自噬, 从而导致化疗耐药性的产生。铂类药物通过抑制 DNA 的复制和转录, 使 DNA 出现断裂和编码等错误以杀死肿瘤细胞^[27]。DDP 耐药后的多种肿瘤受到自噬的调控, 如在睾丸癌中沉默 ATG5 及 ATG7 可抑制睾丸癌细胞的自噬和增殖; 如在肺鳞癌中沉默 ATG5 可抑制癌细胞的自噬, 肺腺癌 A549/DDP 细胞也受到 ATG5 等自噬蛋白的调控^[28-29]。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实 ATG5 是 miR-216b-5p 的靶基因, 过表达 ATG5 可使 miR-216b-5p mimic 对 Eca109/DDP 细胞增殖、自噬的抑制和诱导凋亡的作用明显减弱。同时, 自噬相关蛋白 P62 表达降低、LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin 1 蛋白水平升高。

综上所述, 本研究证实在食管癌 Eca109/DDP 细胞中过表达 miR-216b-5p 能够通过靶向抑制 ATG5 的表达来下调细胞的自噬水平, 从而逆转 Eca109/DDP 细胞 DDP 耐药性, 阐明了 miR-216b-5p 在食管癌细胞自噬调控中的作用和分子机制, 为食管癌 DDP 耐药提供了新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] ALSOP B R, SHARMA P. Esophageal cancer[J]. *Gastroenterol Clin N Am*, 2016, 45(3): 399-412. DOI: 10.1016/j.gtc.2016.04.001.
- [2] UHLENHOPP D J, THEN E O, SUNKARA T, *et al.* Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2020, 13(6): 1010-1021. DOI: 10.1007/s12328-020-01237-x.
- [3] CHEN S H, CHANG J Y. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: from tumor cell to microenvironment[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4136[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6747329/>. DOI: 10.3390/ijms20174136.
- [4] WANG L D, ZHAO X Y, FU J F, *et al.* The role of tumour metabolism in cisplatin resistance[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 691795. DOI: 10.3389/fmolb.2021.691795.
- [5] HE B X, ZHAO Z Y, CAI Q D, *et al.* miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer[J/OL]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7415433/>. DOI: 10.7150/ijbs.47203.
- [6] JIAO X Q, QIAN X L, WU L Y, *et al.* MicroRNA: the impact on cancer stemness and therapeutic resistance[J/OL]. *Cells*, 2019, 9(1): 8[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016867/>. DOI: 10.3390/cells9010008.
- [7] XING Z S, LI S L, XING J S, *et al.* Silencing of LINC01963 enhances the chemosensitivity of prostate cancer cells to docetaxel by targeting the miR-216b-5p/TrkB axis[J/OL]. *Lab Invest*, 2022, 102(6): 602-612[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9162921/>. DOI: 10.1038/s41374-022-00736-4.
- [8] ZHANG N, LI Z Y, BAI F D, *et al.* PAX5-induced upregulation of IDH1-AS1 promotes tumor growth in prostate cancer by regulating ATG5-mediated autophagy[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 734[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769014/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1932-3.
- [9] LI Y J, LEI Y H, YAO N, *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Cancer Commun*, 2017, 36(1): 1-10. DOI: 10.1186/s40880-017-0219-2.
- [10] YE X, ZHOU X J, ZHANG H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2334[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6199349/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02334.
- [11] ZHENG S, ZHONG Y F, TAN D M, *et al.* MiR-183-5p enhances the radioresistance of colorectal cancer by directly targeting ATG5 [J/OL]. *J Biosci*, 2019, 44(4): 92[2023-02-06]. <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/044/04/0092>.
- [12] KATO H, NAKAJIMA M. Treatments for esophageal cancer: a review[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 61(6): 330-335. DOI: 10.1007/s11748-013-0246-0.
- [13] DASARI S, TCHOUNWOU P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146684/>. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [14] TCHOUNWOU P B, DASARI S, NOUBISSI F K, *et al.* Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy[J/OL]. *J Exp Pharmacol*, 2021, 13: 303-328[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7987268/>. DOI: 10.2147/JEP.S267383.
- [15] GALLUZZI L, SENOVILLA L, VITALE I, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. *Oncogene*, 2012, 31(15): 1869-1883. DOI: 10.1038/onc.2011.384.
- [16] KARTALOU M, ESSIGMANN J. Mechanism of resistance to cisplatin[J]. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*, 2001, 478(1/2): 23-43. DOI: 10.1016/S0027-5107(01)00141-5.
- [17] MAKOVEC T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy [J/OL]. *Radiol Oncol*, 2019, 53(2): 148-158[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6572495/>. DOI: 10.2478/raon-2019-0018.
- [18] REDDY K B. MicroRNA (miRNA) in cancer[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 38[2023-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25960691/>. DOI: 10.1186/s12935-015-0185-1.
- [19] 周丹丹, 王玉, 张立英, 等. MiR-216b-5p 靶向调控 BTN3A2 促进胶质瘤细胞 LN-229 的迁移及侵袭能力[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(1): 109-117. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2020.10.1355.

- [20] ZHU S, CHEN C Y, HAO Y Y. LncRNA KCNQ1OT1 acts as miR-216b-5p sponge to promote colorectal cancer progression via up-regulating ZNF146[J]. *J Mol Histol*, 2021, 52(3): 479-490. DOI: 10.1007/s10735-020-09942-0.
- [21] PEI M L, ZHAO Z X, SHUANG T. Dysregulation of lnc-SNHG1 and miR-216b-5p correlate with chemoresistance and indicate poor prognosis of serous epithelial ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 1-14. DOI: 10.1186/s13048-020-00750-4.
- [22] MATHEW R, KARANTZA-WADSWORTH V, WHITE E. Role of autophagy in cancer[J/OL]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12): 961-967 [2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866167/>. DOI: 10.1038/nrc2254.
- [23] CHANGOTRA H, KAUR S, YADAV S S, *et al.* ATG5: a central autophagy regulator implicated in various human diseases[J]. *Cell Biochem Funct*, 2022, 40(7): 650-667. DOI: 10.1002/cbf.3740.
- [24] PENG X, GONG F, CHEN Y, *et al.* Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1- α -mediated signaling[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(8): e1367[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4454295/>. DOI: 10.1038/cddis.2014.297.
- [25] COCCO S, LEONE A, PIEZZO M, *et al.* Targeting autophagy in breast cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7836[2023-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33105796/>. DOI: 10.3390/ijms21217836.
- [26] SPIRINA L V, AVGUSTINOVICH A V, AFANAS'EV S G, *et al.* Molecular mechanism of resistance to chemotherapy in gastric cancers, the role of autophagy[J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(7): 713-721. DOI: 10.2174/1389450120666191127113854.
- [27] 秦艳强, 晋佳路, 李娜, 等. 冬凌草甲素逆转黑色素瘤细胞顺铂耐药的作用及机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(3): 217-222. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.005.
- [28] 朱晨露, 杜家如, 姚言雪, 等. 沉默 ATG5 及 ATG7 可抑制顺铂介导的耐顺铂睾丸癌细胞的自噬和增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(5): 657-663. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.05.04.
- [29] WU T, WANG M C, JING L, *et al.* Autophagy facilitates lung adenocarcinoma resistance to cisplatin treatment by activation of AMPK/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 6421-6431[2023-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4686226/>. DOI: 10.2147/DDDT.S95606.

[收稿日期] 2023-02-08

[修回日期] 2023-05-12

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超