

LncRNA MEG3 对脑胶质瘤细胞替莫唑胺获得性耐药的影响

朱君¹,朱正春¹,秦学金¹,张迪¹,郝玉巧²,李佳³,仲飞^{1,4}

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA 母系表达基因 3 (LncRNA MEG3) 对胶质瘤细胞替莫唑胺 (TMZ) 获得性耐药的影响。方法 构建 TMZ 耐药胶质瘤细胞 U87 (U87/TMZ), qRT-PCR 法检测 LncRNA MEG3 表达水平, MTT 法检测细胞增殖能力。用脂质体法使 U87/TMZ 细胞中 LncRNA MEG3 过表达 (pcDNA-MEG3 组), 转染空载体作为空载体组 (pcDNA 组), 同时以常规培养的 U87/TMZ 细胞作为空白组 (Control 组), 并用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TMZ 处理。采用 qRT-PCR 评估质粒转染效果; Western blot 法检测 LncRNA MEG3 相关蛋白表达; 细胞克隆实验检测 LncRNA MEG3 对细胞增殖的影响; Transwell 实验检测 LncRNA MEG3 对细胞侵袭的影响; 流式细胞术检测 LncRNA MEG3 对细胞凋亡的影响, 并构建小鼠移植瘤动物模型进行体内实验。结果 U87/TMZ 细胞中 LncRNA MEG3 表达水平低于 U87 ($P < 0.01$), 并且 U87/TMZ 的细胞活力高于 U87 ($P < 0.01$)。过表达 LncRNA MEG3 联合 TMZ 后, 与 Control 组和 pcDNA 组比较, pcDNA-MEG3 组上调了 LncRNA MEG3 mRNA 及 p53 蛋白表达, 下调了 MDM2 蛋白表达, 且 pcDNA-MEG3 组增殖和侵袭能力降低, 凋亡能力增加 ($P < 0.01$)。构建小鼠移植瘤动物模型, 与 pcDNA 组相比, pcDNA-MEG3 组肿瘤体积和质量降低 ($P < 0.01$)。结论 过表达 LncRNA MEG3 能减弱 TMZ 耐药胶质瘤细胞的耐药性。

关键词 脑胶质瘤; LncRNA MEG3; 替莫唑胺; 耐药

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1621-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.020

脑胶质瘤是源自神经上皮的恶性肿瘤, 其恶性程度、致死率、复发率以及对化疗的耐药性均较高^[1]。2014 年至 2018 年期间, CBTRUS 统计报告有

83 029 人死于中枢神经系统肿瘤, 其中最常见是胶质母细胞瘤^[2]。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 为基础的化疗对脑胶质瘤有确切疗效^[3]。但是对于 TMZ 耐药的脑胶质瘤, 很难预防其进展或复发^[4]。因此, 阐明 TMZ 耐药的发生机制在临床上对改善胶质瘤的化疗效果有极其重要的意义。LncRNA 被归类为具有调控作用的非编码 RNA^[5]。有研究^[6]证明 LncRNA 在癌症的起始、进展和化疗耐药过程中起到重要作用。LncRNA MEG3 是 LncRNAs 中的一种, 参与多种肿瘤耐药性的调控^[7], 但是其是否参与调控胶质瘤的耐药性鲜有报道, 现以 U87/TMZ 细胞为研究对象, 观察 LncRNA MEG3 对其耐药性的影响, 以期临床逆转胶质瘤耐药研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人脑胶质瘤细胞株 U87 购自上海科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 替莫唑胺 (货号: T2577-25MG) 购自美国 Sigma 公司; U-87 MG 细胞专用培养基 (货号: CM-0238) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胰酶消化液 (货号: SH30042.01B) 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (货号: 11011-8611) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; RNA 提取试剂盒 (货号: 15596018)、qRT-PCR 试剂盒 (货号: CS11733046)、脂质体 Lipofectamine 2000 (货号: 11668) 购自美国 Invitrogen 公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013C)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: P0012)、ECL 液 (货号: P0018AS)、MTT 检测试剂盒 (货号: C0009S) 及细胞凋亡检测试剂盒 (货号: C1062M) 购自碧云天生物技术有限公司; Matrigel 基质胶 (货号: 356234) 购自美国 BD 公司; Transwell 小室 (货号: 3421) 购自 Corning 公司; 抗体购自 Abcam 公司, 一抗: MDM2 抗体 (货号: ab259265)、p53 抗体 (货号: ab32389)、GADPH 抗体 (货号: ab263962); 二抗: 辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG (货号: ab97126)、羊抗兔 IgG (货号: ab97051), 所有引物由上海生物工程技术服

2022-08-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085MH284)

作者单位: 安徽医科大学附属阜阳医院¹ 肿瘤科、³ 神经外科, 阜阳 236000

² 安徽汉库医学诊断有限公司质量部, 阜阳 236000

⁴ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 朱君, 女, 硕士研究生;

仲飞, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhongfei@ahmu.edu.cn;

李佳, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 94138282@qq.com

务有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 QP-80 二氧化碳培养箱(中国济南鑫贝西生物技术有限公司);TS100 型倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);CFX Connect™ 实时荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);全自动酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter FC500 公司)。

1.2 方法

1.2.1 胶质瘤细胞株 U87 的培养 用 U-87 MG 细胞专用培养基(MEM + 10% FBS + 1% P/S Solution)培养细胞,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2.2 获得性 TMZ 耐药胶质瘤细胞的构建 将 U87 细胞(1×10^5 /ml)暴露于初始浓度为 5 μg/ml 的 TMZ 中 15 ~ 20 d。观察细胞生长情况,U87 细胞生长至对数期后,倍增 TMZ 浓度继续诱导,直至 TMZ 浓度达 160 μg/ml,每个梯度浓度(5、10、20、40、80、160 μg/ml)培养 15 ~ 20 d。最终获得耐药细胞 U87/TMZ。

1.2.3 细胞转染 将 U87/TMZ 细胞以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板,融合度达 70% ~ 80% 时,用脂质体 Lipofectamine 2000 转染 pcDNA-MEG3 至 U87/TMZ 中作为 LncRNA MEG3 过表达组,转染 pcDNA 至 U87/TMZ 中作为 LncRNA MEG3 空载体组,以常规培养的 U87/TMZ 作为空白组。设置组别如下:pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组、Control 组。转染 48 h 后观察,然后用 10 μg/ml TMZ 继续处理细胞用于后续实验。

1.2.4 qRT-PCR 检测细胞中 LncRNA MEG3 的表达 取对数生长期的 U87 和 U87/TMZ 细胞,根据试剂盒操作步骤,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,然后逆转录成 cDNA。后续 cDNA 被用作检测基因表达的模板进行 PCR 扩增反应。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 LncRNA MEG3 的表达。LncRNA MEG3 引物序列 F:5'-GGGCATTAAGCCCTGACCTT-3', R:5'-CCTTGGGGAGGGAAACACTC-3';内参 GAPDH 引物序列 F:5'-ATGTTGCAACCGGAAG-GAA-3',R:5'-AGGAAAAGCATCACCCGGAG-3'。

1.2.5 Western blot 检测 U87/TMZ 细胞中 LncRNA MEG3 相关蛋白表达变化 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组、Control 组细胞转染成功后,再用 10 μg/ml TMZ 处理 48 h,用 RIPA 裂解细胞,从三组细胞中提取蛋白质,并用 BCA 法进行蛋白定量。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转移到 PVDF 膜上,并用封闭

液室温封闭 2 ~ 3 h,一抗孵育 12 h,一抗浓度为:MDM2 (1 : 400)、p53 (1 : 400)、GAPDH (1 : 1 000),二抗孵育 2 h,二抗浓度为:抗羊(1 : 5 000)、抗兔(1 : 3 000)。ECL 发光检测,以 GAPDH 作为内参,分析结果。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖 将所需细胞培养至对数期,以 9×10^3 个/孔传代至 96 孔板中。次日,加入含梯度浓度(5、10、20、40、80 μg/ml) TMZ 处理 48 h。处理结束后加入 MTT 溶液 20 μl,4 h 后加入二甲亚砜(DMSO)150 μl,用酶标仪检测 490 nm 下的吸光度。

1.2.7 细胞克隆实验检测细胞增殖情况 收集 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组、Control 组细胞,调整细胞密度,接种至 6 孔板中,在含 10 μg/ml TMZ 的培养基中培养。2 ~ 3 周后用 4% 多聚甲醛固定细胞,GIMS A 染色 10 ~ 30 min,洗去染液后拍照进行图像分析。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭 将基质胶与无血清培养基以 1 : 3 的比例配置,每个 Transwell 小室中加入 50 μl,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中凝固。收集 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组、Control 组细胞,用含有 10 μg/ml TMZ 无血清培养基培养细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,在上室加入 100 μl 细胞悬液,24 孔板底部中加入 600 μl 含 10% 血清培养液,常规培养 48 h,再用甲醇固定 30 min,适当风干后,结晶染液染色 15 min,在显微镜下计数。

1.2.9 流式细胞技术检测细胞凋亡 收集 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组、Control 组细胞,调整细胞密度,用 10 μg/ml TMZ 处理细胞,然后分装到 5 ml 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min。按照试剂盒说明书用 PBS 洗涤 2 次后加入 binding buffer(500 μl),加入 Annexin-FITC(5 μl)和 Propidium iodide(5 μl)混合,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.10 动物实验 4 周龄 BALB/c 雌性裸鼠 12 只,购自上海灵畅生物科技有限公司,饲养于 SPF 级动物房,温度(23 ± 2) °C,湿度 50% ~ 56%。该实验相关内容经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准。收集 2×10^6 个 U87/TMZ 细胞(pcDNA-MEG3 组和 pcDNA 组细胞),接种于裸鼠右侧腋窝。在注射 U87/TMZ 细胞 25 d 后,每天向小鼠体内注射 5 mg/kg TMZ。实验结束后,吸入麻醉处死小鼠,记录肿瘤体积和重量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 进行统计学分

析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U87 细胞和 U87/TMZ 细胞的增殖能力

MTT 实验结果显示,U87 细胞与 U87/TMZ 细胞用 5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ TMZ 处理 48 h 后,细胞抑制率逐渐升高。与 U87 细胞相比,U87/TMZ 细胞的抑制率下降($P < 0.01$),见图 1。

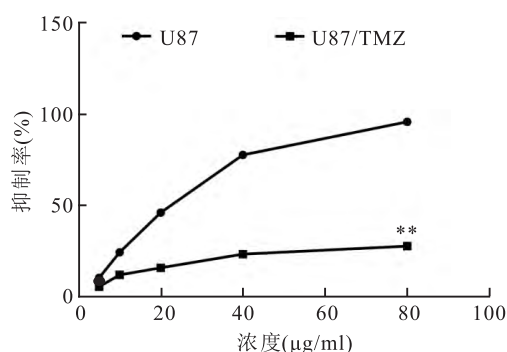


图 1 不同浓度 TMZ 对 U87 和 U87/TMZ 细胞生长抑制率的影响与 U87 细胞比较:** $P < 0.01$

2.2 LncRNA MEG3 在 U87 细胞和 U87/TMZ 细胞中的表达 qRT-PCR 结果显示,在 mRNA 水平上,U87/TMZ 细胞中 LncRNA MEG3 的表达量低于 U87 细胞($t = 61.85$, $P < 0.01$),见图 2。

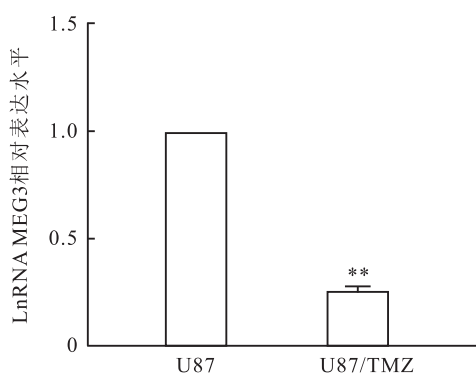


图 2 U87 和 U87/TMZ 细胞 LncRNA MEG3 表达情况与 U87 细胞比较:** $P < 0.01$

2.3 U87/TMZ 细胞中 LncRNA MEG3 基因表达变化 qRT-PCR 检测结果显示,与 pcDNA 组和 Control 组比较,pcDNA-MEG3 组 LncRNA MEG3 mRNA 的表达水平较高($F = 602.4$, $P < 0.01$),见图 3。

2.4 U87/TMZ 细胞 LncRNA MEG3 相关蛋白表达变化 Western blot 结果显示,与 Control 组和 pcDNA 组相比,pcDNA-MEG3 组的 MDM2 蛋白表达降低($F = 28.1$, $P < 0.01$),p53 蛋白表达升高($F = 22.14$, $P < 0.01$),见图 4。

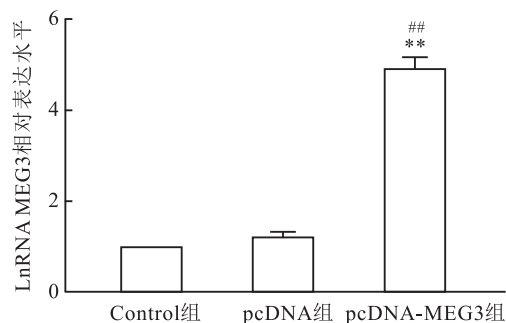


图 3 转染后各组 U87/TMZ 细胞 LncRNA MEG3 的表达情况与 Control 组比较:** $P < 0.01$;与 pcDNA 组比较:** $P < 0.01$

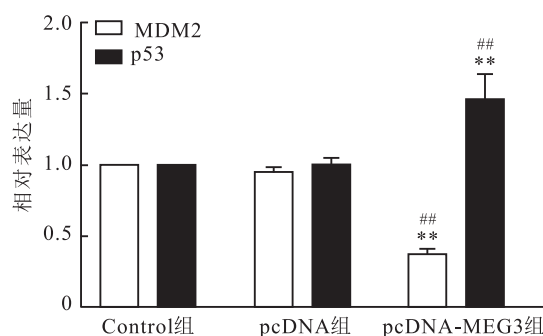
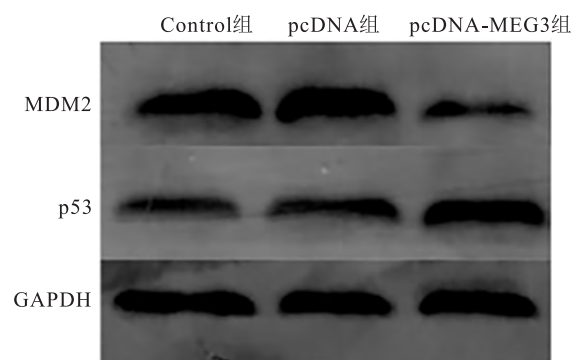


图 4 转染后各组 U87/TMZ 细胞 MDM2、p53 蛋白的表达情况与 Control 组比较:** $P < 0.01$;与 pcDNA 组比较:** $P < 0.01$

2.5 LncRNA MEG3 过表达联合 TMZ (10 $\mu\text{g/ml}$) 对 U87/TMZ 细胞增殖的影响 细胞克隆实验结果显示,与 Control 组和 pcDNA 组比较,pcDNA-MEG3 组的细胞增殖速度降低($F = 389$, $P < 0.01$),见图 5。

2.6 LncRNA MEG3 过表达联合 TMZ (10 $\mu\text{g/ml}$) 对 U87/TMZ 细胞侵袭的影响 Transwell 实验

结果显示,与 Control 组和 pcDNA 组比较,pcDNA-MEG3 组的细胞侵袭能力降低 ($F = 594.4, P < 0.01$),见图 6。

2.7 LncRNA MEG3 过表达联合 TMZ (10 $\mu\text{g/ml}$) 对 U87/TMZ 细胞凋亡率的影响 流式细胞术检测结果显示,与 Control 组和 pcDNA 组比较,pcDNA-MEG3 组的细胞凋亡率升高 ($F = 477.6, P < 0.01$),见图 7。

2.8 LncRNA MEG3 过表达联合 TMZ 对小鼠移植瘤生长的影响 与 pcDNA 组相比,pcDNA-MEG3 组的肿瘤生长减弱。肿瘤切除后,pcDNA-MEG3 组肿瘤体积小于 pcDNA 组 ($P < 0.01$),pcDNA-MEG3 组肿瘤质量小于 pcDNA 组 ($t = 12.02, P < 0.01$),见图 8。综上所述,LncRNA MEG3 的过表达在体外和体内都逆转了 TMZ 耐药胶质瘤细胞的化疗耐药性。

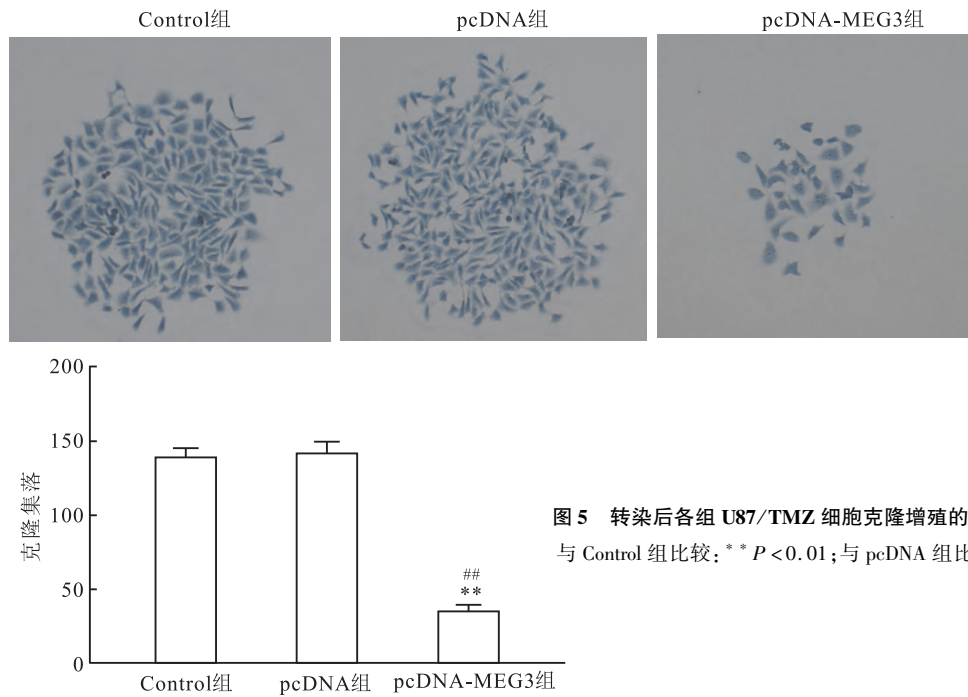


图5 转染后各组 U87/TMZ 细胞克隆增殖的影响情况 $\times 40$ 与 Control 组比较: $** P < 0.01$; 与 pcDNA 组比较: $## P < 0.01$

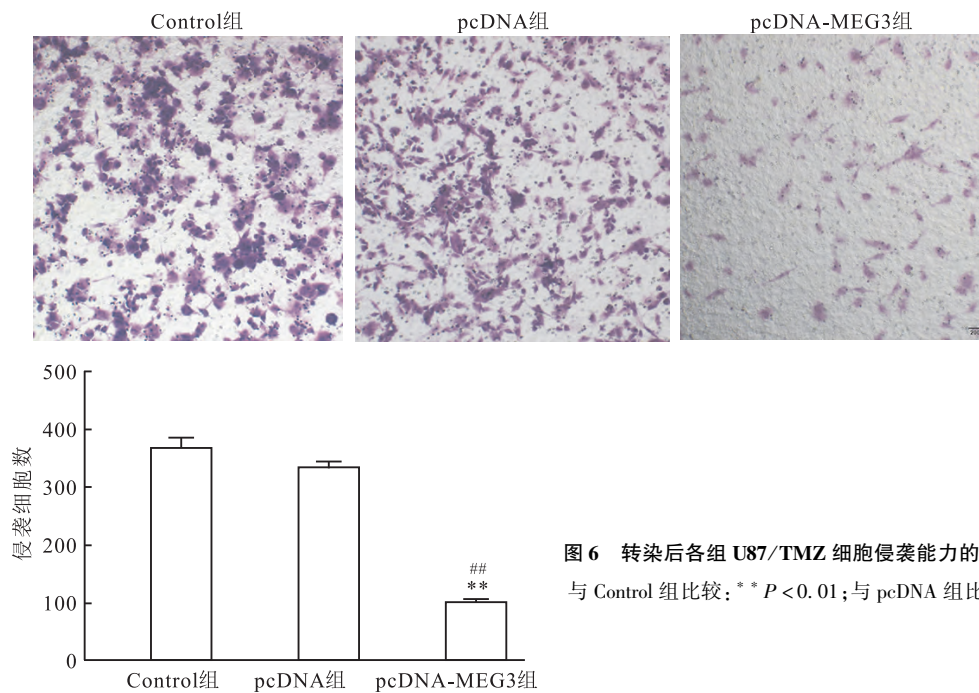


图6 转染后各组 U87/TMZ 细胞侵袭能力的影响情况 $\times 40$ 与 Control 组比较: $** P < 0.01$; 与 pcDNA 组比较: $## P < 0.01$

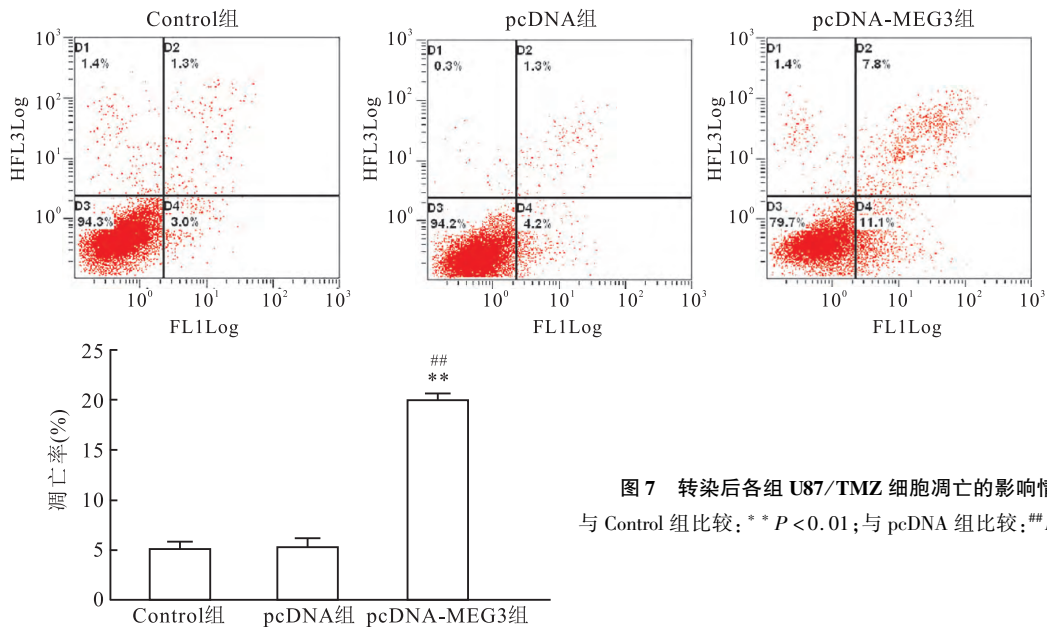


图7 转染后各组 U87/TMZ 细胞凋亡的影响情况
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 pcDNA 组比较: ## $P < 0.01$

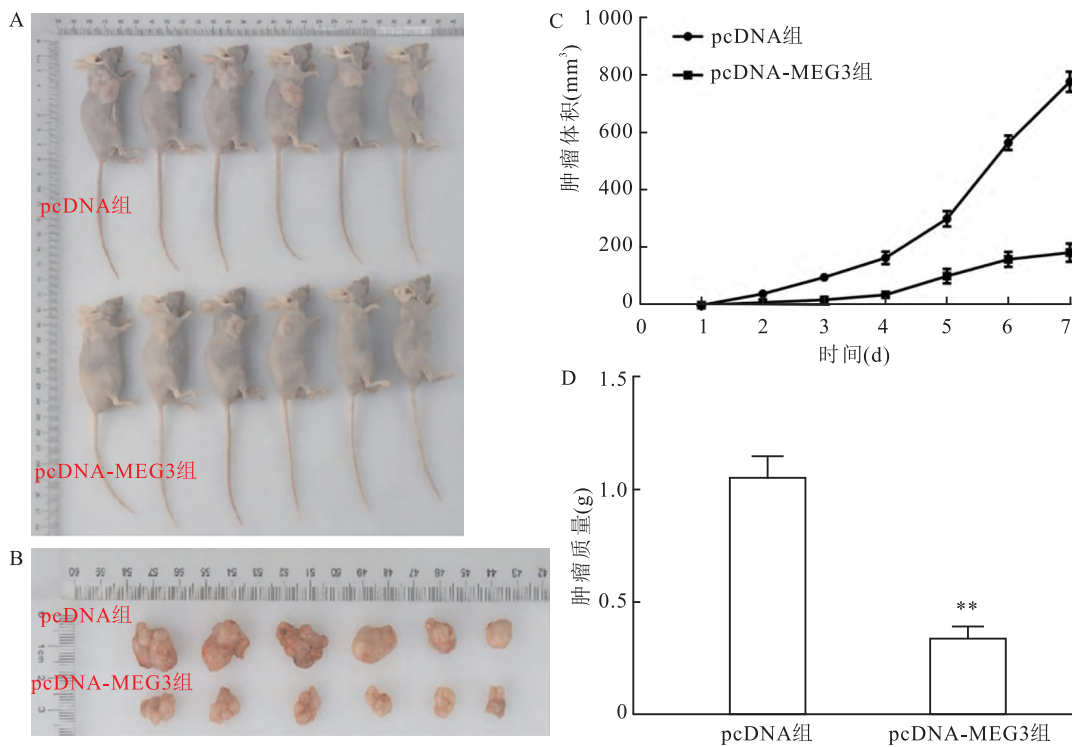


图8 小鼠体内成瘤情况

A: 右侧腋下原位移植瘤图; B: 裸鼠肿瘤形态和大小; C: 移植瘤的体积生长曲线; D: 两组移植瘤的质量; 与 pcDNA 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

化疗是癌症治疗中的主要治疗手段之一,90%的化疗失败都与肿瘤耐药相关^[8]。肿瘤细胞可由于内在因素(如突变、易位、表观遗传因素)和外在因素(如缺氧、pH、激素、抗肿瘤药物)而产生耐药

性^[9]。笔者推测 LncRNA MEG3 可能参与 TMZ 在胶质瘤中的耐药性调控。本研究通过 MTT 法检测胶质瘤细胞和 TMZ 耐药胶质瘤细胞的细胞活力,采用 qRT-PCR 法检测 LncRNA MEG3 在胶质瘤细胞和 TMZ 耐药胶质瘤细胞表达量,发现 TMZ 耐药胶质瘤细胞的细胞活力和 LncRNA MEG3 表达水平更低。

构建 LncRNA MEG3 过表达的 TMZ 耐药胶质瘤细胞,并设置空载体和对照组;Western blot 法分析各组细胞 LncRNA MEG3 相关蛋白表达;细胞克隆实验、Transwell 实验、流式细胞术检测各组细胞增殖、侵袭、凋亡能力,发现 LncRNA MEG3 过表达组的 LncRNA MEG3 mRNA 及 p53 蛋白表达水平均有上调,MDM2 蛋白表达下调,过表达的 LncRNA MEG3 能抑制细胞的增殖、侵袭和凋亡能力。小鼠实验进一步表明,LncRNA MEG3 的过表达逆转了 TMZ 耐药的胶质瘤细胞的化疗耐药性。

已有文献^[10-14]报道 LncRNA MEG3 在肿瘤抑制中发挥重要作用,并参与了多种肿瘤的耐药性调控,包括结直肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等。本研究表明 LncRNA MEG3 在 TMZ 耐药胶质瘤细胞中表达降低,其过表达可逆转对 TMZ 的耐药性。因此,LncRNA MEG3 可能成为 TMZ 耐药胶质瘤化疗的一个预后分子标志物和潜在靶点。有文献^[15]报道胶质瘤化疗耐药可能与细胞铁死亡、凋亡、焦亡等死亡机制相关。然而,LncRNA MEG3 在胶质瘤耐药中的确切生物学行为及其具体分子机制还需进一步研究,为今后胶质瘤的临床基因治疗和新型抗肿瘤药物的研发提供新的思路 and 理论依据。

参考文献

[1] 孙立波,卞尔保,程 梦,等. 长链非编码 RNA FAS-AS1 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021,56(11): 1745-9.

[2] Ostrom Q T, Cioffi G, Waite K, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014—2018[J]. *Neuro Oncol*, 2021,23(12 Suppl 2): iii1-105.

[3] McDuff S G R, Dietrich J, Atkins K M, et al. Radiation and chemotherapy for high-risk lower grade gliomas: Choosing between temozolomide and PCV[J]. *Cancer Med*, 2020,9(1): 3-11.

[4] Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response[J]. *Pharmacol T-*

her, 2018,184:13-41.

[5] Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, et al. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells[J]. *Mol Immunol*, 2019,112: 82-92.

[6] 王 琪, 罗 朋, 王保龙. 长链非编码 RNA uc002ktr.3 在肺鳞癌顺铂耐药中的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 869-73.

[7] Chen Y, Li Z, Chen X, et al. Long non-coding RNAs: From disease code to drug role[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021,11(2): 340-54.

[8] Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(9): 3233.

[9] Delou J M A, Souza A S O, Souza L C M, et al. Highlights in resistance mechanism pathways for combination therapy[J]. *Cells*, 2019,8(9):1013.

[10] Li L, Shang J, Zhang Y, et al. MEG3 is a prognostic factor for CRC and promotes chemosensitivity by enhancing oxaliplatin-induced cell apoptosis[J]. *Oncol Rep*, 2017,38(3): 1383-92.

[11] Xia H, Qu X L, Liu LY, et al. LncRNA MEG3 promotes the sensitivity of vincristine by inhibiting autophagy in lung cancer chemotherapy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018,22(4): 1020-7.

[12] Ma L, Wang F, Du C, et al. Long non-coding RNA MEG3 functions as a tumour suppressor and has prognostic predictive value in human pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018,39(3): 1132-40.

[13] Zhang J, Liu J, Xu X, et al. Curcumin suppresses cisplatin resistance development partly via modulating extracellular vesicle-mediated transfer of MEG3 and miR-214 in ovarian cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017,79(3): 479-87.

[14] Zhu M, Wang F, Mi H, et al. Long noncoding RNA MEG3 suppresses cell proliferation, migration and invasion, induces apoptosis and paclitaxel-resistance via miR-4513/PBLD axis in breast cancer cells[J]. *Cell Cycle*, 2020,19(23): 3277-88.

[15] Chen Q, Wang W, Wu Z, et al. Over-expression of lncRNA TMEM161B-AS1 promotes the malignant biological behavior of glioma cells and the resistance to temozolomide via up-regulating the expression of multiple ferroptosis-related genes by sponging hsa-miR-27a-3p[J]. *Cell Death Discov*, 2021,7(1): 311.

The influence of LncRNA MEG3 in temozolomide resistance of glioma cells

Zhu Jun¹, Zhu Zhengchun¹, Qin Xuejin¹, Zhang Di¹, Xi Yuqiao², Li Jia³, Zhong Fei^{1,4}

¹Dept of Oncology, ³Dept of Neurosurgery, Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000;

²Dept of Quality, Anhui Hanku Medical Diagnosis Technology Co. LTD, Fuyang 236000;

⁴Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of LncRNA MEG3 in temozolomide (TMZ) resistance of glioma cells.

(下转第 1632 页)

- cations of chimeric antigen receptor-modified NK-92 cells in tumor immunotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 317.
- [9] Törnroos H, Hägerstrand H, Lindqvist C. Culturing the human natural killer cell line NK-92 in interleukin-2 and interleukin-15 - implications for clinical trials[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(1): 107 - 12.
- [10] Wang W, Jiang J, Wu C. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects [J]. *Cancer Lett*, 2020, 472: 175 - 80.
- [11] Wendel P, Reindl L M, Bexte T, et al. Arming immune cells for battle: A brief journey through the advancements of T and NK cell immunotherapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1481.
- [12] Teng K Y, Mansour A G, Zhu Z, et al. Off-the-shelf prostate stem cell antigen-directed chimeric antigen receptor natural killer cell therapy to treat pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1319 - 33.

Effect of CAR-NK-92 targeting MSLN on ovarian cancer

Ge Yao^{1,2}, Liu Qi², Wang Chunyan², Liu Shupeng², Cheng Zhongping^{1,2}

(¹Anhui Medical University, Shanghai Clinical College, Shanghai 200072; ²Dept of Obstetrics and Gynecology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072)

Abstract Objective To explore the killing effect of chimeric antigen receptor NK-92 (CAR-NK-92) cells targeting mesothelin (MSLN) on ovarian cancer cells. **Methods** The expression of MSLN in primary ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines was detected by immunohistochemical analysis and immunofluorescence, respectively. The CAR-NK-92 cells targeting MSLN were constructed by lentiviral transfection, the transfection efficiency was detected by flow cytometry, and the killing effect of CAR-NK-92 on ovarian cancer was verified *in vivo* and *in vitro*. **Results** MSLN was highly expressed in primary ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. Flow cytometry showed that the purity of CAR-NK-92 targeting MSLN was about 70%. The experiments found that MSLN-CAR-NK-92 cells had a strong anti-ovarian cancer effect *in vivo* and *in vitro*, and could release more cytokines interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Conclusion** MSLN-CAR-NK-92 has strong anti-ovarian cancer effects *in vivo* and *in vitro*, providing a new potential treatment option for ovarian cancer patients.

Key words natural killer cells; chimeric antigen receptor; mesothelin; ovarian cancer

(上接第 1626 页)

Methods TMZ-resistant glioma cells U87(U87/TMZ) were constructed, qRT-PCR was used to detect the LncRNA MEG3 expression level, and MTT was used to detect the cell proliferation ability. The LncRNA MEG3 in U87/TMZ was overexpressed by liposome method (pcDNA-MEG3 group), the empty vector was transfected as the empty vector group (pcDNA group), and the conventionally cultured U87/TMZ was used as the blank group (Control group), then treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TMZ. The plasmid transfection effect was analyzed by qRT-PCR. The expression of LncRNA MEG3-related protein was confirmed by Western blot. The cell cloning experiment detects the effect of LncRNA MEG3 on cell proliferation. The effect of LncRNA MEG3 on cell invasion was tested by Transwell. The effect of LncRNA MEG3 on cell apoptosis was detected by flow cytometry. And mouse transplant tumor animal model was constructed for *in vivo* experiments. **Results** Compared with U87, the expression level of LncRNA MEG3 in U87/TMZ was lower ($P < 0.01$), and the cell viability of U87/TMZ was higher than that of U87 ($P < 0.01$). After overexpression of MEG3 combined with TMZ, compared with the Control group and the pcDNA group, the pcDNA-MEG3 group up-regulated the expression of MEG3 mRNA and p53 protein, and down-regulated the expression of MDM2 protein, and the proliferation and invasion ability of the pcDNA-MEG3 group decreased while the apoptosis ability increased ($P < 0.01$). The construction of mouse transplant tumor animal model showed that the tumor volume and mass of the pcDNA-MEG3 group were reduced compared with the pcDNA group ($P < 0.01$). **Conclusion** Overexpression of LncRNA MEG3 can attenuate the drug resistance of TMZ-resistant glioma cells.

Key words glioma; LncRNA MEG3; temozolomide; drug resistance