

miR-28-5p 通过抑制 FSP1 介导的铁死亡逆转肺腺癌细胞顺铂耐药的机制

王晓丹¹, 宋国庆², 姜丹²

摘要 目的 研究 miR-28-5p 对顺铂(DDP)耐药的 A549 肺腺癌细胞系(A549/DDP)的影响,并探讨其作用机制是否与铁死亡抑制蛋白 1(FSP1)介导的铁死亡有关。方法 选择 A549 肺腺癌细胞和 A549/DDP 细胞作为研究对象。采用 RT-qPCR 法检测细胞中 miR-28-5p 的表达水平。通过 CCK-8 法和集落形成实验测定细胞增殖。miR-28-5p 的靶基因通过荧光素酶报告基因和蛋白质印迹分析进行鉴定和验证。使用 miR-28-5p 模拟物或 FSP1 过表达质粒转染 A549/DDP,评估细胞增殖情况,并采用透射电子显微镜评估线粒体形态,以及试剂盒测定细胞活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平。建立了基于细胞系的异种移植模型,在体内评估 miR-28-5p 对肿瘤生长的影响。结果 与 A549 细胞相比, A549/DDP 细胞中 miR-28-5p 的表达水平降低($P < 0.001$)。与 A549 细胞比较, A549/DDP 细胞的细胞活力($F = 49.542, P < 0.001$)和集落形成能力($t = 4.412, P < 0.01$)增加。与 miR-NC 组相比, miR-28-5p 组 A549/DDP 细胞的细胞活力($t = 4.612, P < 0.01$)和集落数($t = 4.503, P < 0.01$)均降低。在 pGL3-FSP1 3'-UTR-WT 载体存在情况下,用 miR-28-5p 模拟物转染的细胞中荧光素酶活性降低($P < 0.01$)。此外,过表达 miR-28-5p 细胞中 FSP1 的表达水平被抑制。与载体 + miR-28-5p 组相比, FSP1 + miR-28-5p 组细胞活力、集落形成、细胞线粒体长度、GSH 增加($P < 0.01$)且细胞凋亡、ROS 产生、MDA 形成降低($P < 0.05$)。体内实验显示,与 miR-NC + DDP 组相比, miR-28-5p + DDP 组裸鼠体内形成的肿瘤大小和质量减少($P < 0.05$),并且 Ki-67 和 FSP1 蛋白表达降低($P < 0.05$)。结论 miR-28-5p 逆转肺腺癌细胞顺铂的耐药机制可能与抑制 FSP1 介导的铁死亡有关。

关键词 miR-28-5p; 肺癌; 铁死亡抑制蛋白 1; 铁死亡; 顺铂
中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0630-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.018

近年来,含铂方案化疗仍然是治疗肺癌的主要

选择^[1-2]。然而,癌细胞对顺铂的耐药性严重影响了该药疗效。深入研究肺癌对顺铂耐药的潜在机制,提高化疗成功率十分必要。研究^[3]结果显示,转铁蛋白受体蛋白 1 在 88% 肺癌中高表达,表明肺癌细胞可能通过增强转铁蛋白与受体的作用来增加铁的摄入量。铁死亡是一种新型的调节性细胞死亡,由铁依赖性脂质过氧化引起。这种新形式的调节性细胞死亡的主要特征是细胞体积减少和线粒体膜密度增加^[4]。近年研究^[5]表明,铁死亡过程与顺铂耐药性密切相关。非编码 RNA,如微 RNA(miRNA),已被表征为癌症各种生物致病过程中表观遗传调控的重要参与者。研究^[6-7]表明,miR-28-5p 在包括肺癌在内的肿瘤中发挥抑制肿瘤生长、转移作用。此外,研究^[8-9]证实,miR-28-5p 介导癌细胞的铁死亡。然而,miR-28-5p 在调节顺铂耐药性中的作用仍有待探索。该研究分析 miR-28-5p 在体内外对肺腺癌细胞系 A549 顺铂耐药的影响,并进一步探讨其是否通过介导癌细胞的铁死亡参与顺铂耐药。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和转染 A549 和 A549/DDP 肺癌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞在 RPMI-1640 培养基中培养,该培养基含 10% (V/V) 胎牛血清和 5 mg/ml 青链霉素(美国 Invitrogen 公司)。铁死亡抑制蛋白 1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)过表达质粒(pcDNA3.1-FSP1)和空载体(pcDNA3.1)自武汉淼灵质粒平台获得。miR-28-5p 模拟和阴性对照 miRNA(miR-NC)购自广州 Ribobio 公司。使用 Lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司)进行细胞转染。

1.2 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)测定 将细胞以 5×10^3 /孔的密度接种到 96 孔板中,每组 3 个复孔。接下来,用或不用 DDP 处理细胞(在各种浓度下,高达 32 $\mu\text{mol/L}$) 48 h,通过使用 CCK-8(上海 Beyotime 公司)中提供的试剂培养细胞,然后在 450 nm 处记录微孔板孔的吸光度,以确定活细胞的相对数量。

2023-02-27 接收

基金项目: 辽宁省自然科学基金(编号: 20180530020)

作者单位: 中国医科大学附属盛京医院¹ 第二胸外科、² 第一、第二乳腺肿瘤外科 沈阳 110000

作者简介: 王晓丹,女,护士;

宋国庆,男,硕士,副教授,责任作者, E-mail: zzyx1213@163.com

1.3 RNA 提取和 RT-qPCR 分析 使用总 RNA 提取试剂盒(北京 Solarbio 公司)从细胞中提取总 RNA。然后使用 iScript cDNA 合成试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)对 RNA 样本进行反转录,并在 CFX96 实时系统(Bio-Rad)上使用 SYBR Green Supermix(Bio-Rad)进行定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)扩增。miR-28-5p 的定量使用针对 miRNA 设计的 Bulge-loop miRNA RT-qPCR 引物(广州 RiboBio 公司)进行。U6 用于使 miR-28-5p 水平正常化。GAPDH 用于使 FSP1 水平正常化。所使用的引物序列如下: miR-28-5p,(正向) 5'-GCCGTTG-GAGGCGTG-3',(反向) 5'-AGTGCAGGGTCCGAGG-TATT-3'; U6,(正向) 5'-GAAGCGCGGCCACGAG-3',(反向) 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'; GAPDH,(正向) 5'-CCTGCCACCCACAAT-3',(反向) 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'; FSP1,(正向) 5'-CCCGATACCGAGGTGGTTTG-3',(反向) 5'-TCTTCGTTATCCCTGGCTCCTG-3'。

1.4 细胞集落形成实验 将 500 个细胞/孔接种到 6 孔板的孔中,使用 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 14 d 后,用甲醇固定集落,然后用结晶紫溶液染色,并计数集落数量。

1.5 流式细胞术分析 使用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司)评估培养细胞的凋亡。将细胞接种于 24 孔板中并培养 48 h,直到细胞融合度达到近 80%。然后,将细胞用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 溶液染色 15 min,再使用 FACS 细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)进行分析,以确定细胞凋亡分数。

1.6 蛋白质印迹分析 使用 RIPA 裂解缓冲液(上海 Beyotime 公司)在冰上从细胞中分离总蛋白。收集上清液,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 10 min 后,使用二辛可宁酸蛋白质测定(美国 Pierce 公司)检测蛋白质浓度。蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,将膜用 PBS 洗涤两次,随后与一抗抗 FSP1(1:500)、抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(1:10 000)(英国 Abcam 公司)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。将膜用 Tris 缓冲液-吐温缓冲液洗涤 3 次,然后与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000,英国 Abcam 公司)在室温下孵育 1 h。使用增强型化学发光试剂(美国 PerkinElmer 公司)显示信号。使用 Image J 软件计算条带强度,并将其归一化为 GAPDH 的条带强度。

1.7 荧光素酶报告基因检测 FSP1 的 pGL3 荧光素酶报告质粒由上海 Genomeditech 公司设计。使用 Lipofectamine 3000 试剂将报告质粒或载体对照和 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 共转染到 A549/DDP 细胞中。48 h 后,使用双荧光素酶测定系统(美国 Promega 公司)检测荧光素酶活性。

1.8 细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平测定 首先用 20 $\mu\text{mol/L}$ 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(上海 Beyotime 公司)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理细胞 30 min,然后使用 FlexStation 3 微孔板读取器(美国 Molecular Devices 公司)在激发和发射波长分别为 485、535 nm 时测量 ROS 水平,以确定细胞 ROS 的水平。使用 GSH 检测试剂盒(上海 Beyotime 公司)测量细胞内 GSH 水平。通过使用脂质过氧化测定试剂盒(上海 Beyotime 公司)测量它们的 MDA 水平来分析细胞中脂质过氧化的程度。

1.9 透射电子显微镜 使用 FEIG2 透射电子显微镜(美国 Hillsboro 公司)研究线粒体形态。细胞首先固定在 2.5% 戊二醛中,然后在环境温度下固定在 0.1 mol/L 四氧化锇(在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 7.4)中 2 h。之后,在进一步脱水、渗透和包埋后,获得超薄切片(65 nm)并用透射电子显微镜观察。测量并计算了线粒体长度(沿长轴)。每种处理条件至少检查 90 个线粒体。

1.10 体内肿瘤发生模型 建立了基于细胞系的异种移植模型,用于在体内评估癌细胞的肿瘤发生能力。参照文献^[10]方法,6 周龄的雌性 BALB/c-nu/nu 裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,在标准无病原体条件下饲养,培养环境:湿度为 40%~70%,温度为 20~22 $^{\circ}\text{C}$,12 h/12 h 光暗循环。动物实验经中国医科大学附属盛京医院动物实验伦理委员会审核批准(批号:FYWZLL2214),并严格遵循实验动物使用 3R 原则。将小鼠分为 3 组:对照组、miR-NC + DDP 组和 miR-28-5p + DDP 组,每组 6 只。对照组将约 3×10^6 A549/DDP 细胞在 PBS 溶液皮下注射到小鼠体内,miR-NC + DDP 组(转染 miR-NC)和 miR-28-5p + DDP 组(转染 miR-28-5p)将约 3×10^6 A549/DDP 细胞皮下注射到小鼠体内。所有小鼠在标准条件下饲养 30 d,在此期间每只小鼠灌胃顺铂 2 mg/(kg·d)。随后,将小鼠安乐死并切除皮下植入的肿瘤,然后测量体积和质量。采用经典方法测量肿瘤体积:用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和与之垂直的最短径(b)根据公式计算肿瘤体

积: 肿瘤体积(V) = $ab^2/2$ (a 、 b 以 mm 为单位)。将肿瘤组织用 10% 甲醛溶液固定。然后将组织包埋在石蜡中并切成 5 μm 的切片。将切片脱蜡、再水化并在水浴中加热以进行抗原修复。在室温下用 1% 牛血清白蛋白封闭切片 2 h 后, 将它们与针对 FSP1 (1 : 400)、Ki-67 (1 : 400) (英国 Abcam 公司) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜, 然后使用 Dako Real EnVision 检测系统(丹麦 Dako 公司)进行可视化。在光学显微镜(日本 Nikon 公司)下观察图像。

1.11 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 Student's t 检验; 多组资料之间的比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549/DDP 细胞中 miR-28-5p 表达情况

CCK-8 分析检测了顺铂耐药细胞经 0 ~ 32 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理后的细胞活力和集落形成能力。结果显示, 与 A549 细胞比较, A549/DDP 细胞的细胞活力 ($F = 49.542$, $P < 0.001$) 和集落形成能力 ($t = 4.412$, $P = 0.004$) 增加(图 1A ~ C)。此外, 与 A549

细胞比较, A549/DDP 细胞中 miR-28-5p 的表达水平降低($t = 9.671$, $P < 0.001$) (图 1D)。

2.2 miR-28-5p 作用 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性的影响 用 miR-NC 或 miR-28-5p 模拟物转染 A549/DDP 细胞通过 PCR 测定评估转染效率, 结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-28-5p 组 A549/DDP 细胞中 miR-28-5p 上调($t = 34.529$, $P < 0.001$) (图 2A)。与 miR-NC 组相比, miR-28-5p 组 A549/DDP 细胞的细胞活力($t = 4.612$, $P < 0.01$) 和集落数($t = 4.503$, $P < 0.01$) 均降低(图 2B ~ D)。这些结果表明 miR-28-5p 可能是肺癌细胞系 A549 中对顺铂敏感的关键调节剂。

2.3 miR-28-5p 在 A549/DDP 细胞中靶向 FSP1 情况 使用两种公开可用的算法(TargetScan 和 mi-Randa) 预测其基因靶标, 之后选择 FSP1 作为推定靶标来研究 miR-28-5p 调节顺铂耐药性的分子机制。PCR 和 Western blot 分析显示, A549/DDP 细胞中的 FSP1 表达水平上调($P < 0.05$) (图 3A、B)。为了进一步证实 miR-28-5p 和 FSP1 基因之间的相互作用, 将含有潜在 miRNA 结合位点的 FSP1 3'UTR 克隆到 pGL3 载体中以生成 pGL3-FSP1 3'UTR-WT (图 3C)。在用 pGL3-FSP1 3'UTR-WT 或 pGL3-FSP1 3'UTR-MT 和 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 共

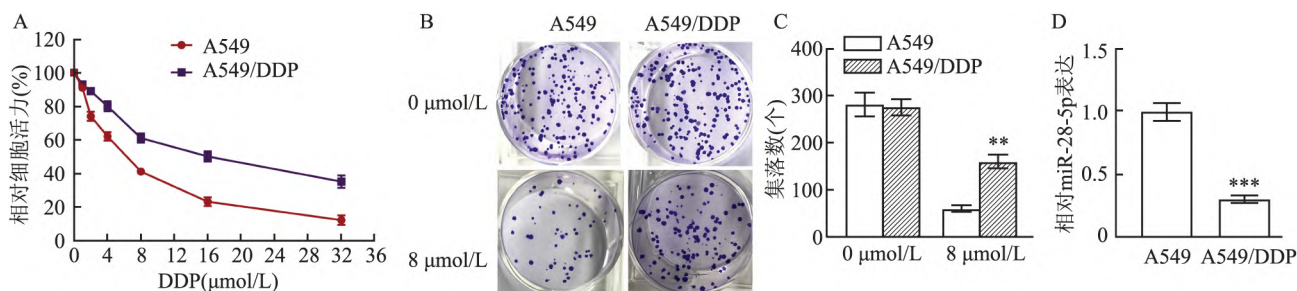


图 1 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性分析

A: CCK-8 分析顺铂耐药细胞经 0 ~ 32 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理后的细胞活力; B、C: 顺铂耐药细胞经 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理后的集落形成图片、直方图分析 $\times 20$; D: PCR 分析 A549 细胞和 A549/DDP 细胞中 miR-28-5p 表达; 与 A549 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

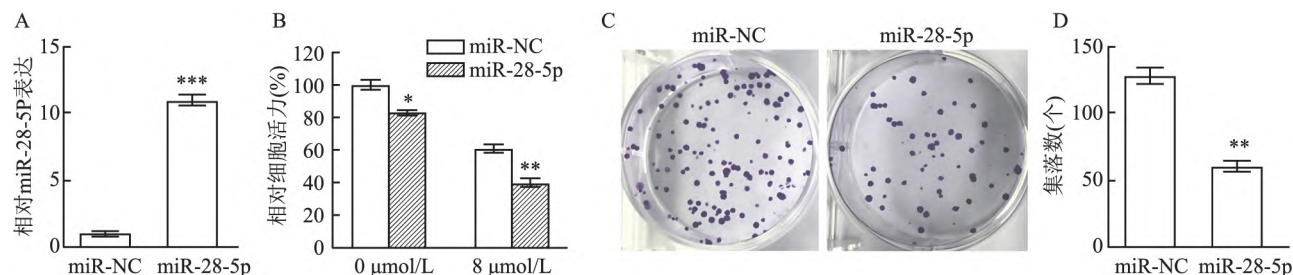


图 2 miR-28-5p 增加了 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性

A: 用 miR-28-5p 模拟物或阴性对照 miR-NC 转染的 A549/DDP 细胞中相对 miR-28-5p 表达水平; B: 用 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 转染的 A549/DDP 细胞, 并用或不用 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 48 h 的活力; C、D: 用 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 转染并用 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 14 d 的 A549/DDP 细胞集落形成图片、直方图分析 $\times 20$; 与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

转染细胞后,测定细胞荧光素酶活性。结果显示,在 pGL3-FSP1 3'UTR-WT 载体存在的情况下,用 miR-28-5p 模拟物转染的细胞中荧光素酶活性降低($t = 4.765$, $P < 0.01$) (图 3D)。此外,与 miR-NC 组相比,miR-28-5p 组细胞中 FSP1 的表达水平降低($t = 3.315$, $P < 0.05$) (图 3E、F)。

2.4 FSP1 过表达对 miR-28-5p 介导的 A549/DDP 细胞铁死亡对顺铂敏感性的影响 为了研究 FSP1 在顺铂耐药中的作用,首先用 pcDNA3.1 和 miR-NC、pcDNA3.1 和 miR-28-5p 模拟物,或 FSP1 过表达质粒和 miR-28-5p 共转染 A549/DDP 细胞模拟,并通过 PCR 和蛋白质印迹分析验证转染效率(图 4A、B)。与 pcDNA3.1 + miR-NC 组比较,pcDNA3.1 + miR-28-5p 组 FSP1 表达降低($t = 4.640$, $P < 0.01$);与 pcDNA3.1 + miR-28-5p 组比较,FSP1 表达升高($t = 5.030$, $P < 0.01$)。CCK-8 等方法检测显示,与 pcDNA3.1 + miR-28-5p 组相比,FSP1 + miR-28-5p 组细胞活力($t = 4.462$, $P < 0.01$)、集落形成($t = 4.835$, $P < 0.01$)、细胞线粒体长度($t = 5.026$, $P < 0.01$)、相对 GSH 水平($t = 4.776$, $P < 0.01$)增加,并且细胞凋亡分数($t = 4.607$, $P < 0.01$)、相对 ROS 水平($t = 4.532$, $P < 0.01$)、相对 MDA 水平($t = 4.016$, $P < 0.01$)降低。见图 4C ~ J。

2.5 miR-28-5p 过表达抑制动物模型中肺癌的顺铂耐药 体内肿瘤发生模型研究 miR-28-5p 表达改

变对肺癌顺铂耐药的影响,与 miR-NC + DDP 组相比,miR-28-5p + DDP 组裸鼠体内形成的肿瘤大小($t = 3.842$, $P < 0.05$)和质量($t = 5.024$, $P < 0.05$)减少,并且 Ki-67、FSP1 蛋白表达降低($t = 3.567$ 、 4.715 , $P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

目前,肺癌化疗中顺铂耐药的分子和生物学机制仍不清楚。本研究显示,miR-28-5p 通过与 FSP1 基因的直接相互作用抑制了机体细胞的活力并增加了铁死亡。FSP1 是一种有效的铁死亡抵抗因子^[11]。因此,miR-28-5p 可能通过抑制 FSP1 介导的铁死亡抑制了 A549/DDP 细胞的活力。

越来越多的证据^[12]表明,miRNA 在肿瘤细胞对多种药物(包括顺铂)的耐药性中发挥着重要作用。研究表明 miR-28-5p 可能在不同的癌症类型中起到肿瘤抑制或诱导的作用。Fazio et al^[13]发现 miR-28-5p 在前列腺癌细胞中充当肿瘤抑制物,影响细胞增殖、存活、迁移和侵袭。Wu et al^[14]证实 miR-28-5p 通过负调控结构特异性识别蛋白 1 促进结直肠癌进展。本研究探索 miR-28-5p 在肺癌顺铂耐药中的作用,结果显示 A549/DDP 细胞中的 miR-28-5p 表达水平低于 A549 细胞,表明这种 miRNA 可能是 A549 细胞产生顺铂耐药性的一种机制。此外,miR-28-5p 模拟物增强了 A549/DDP 细胞对

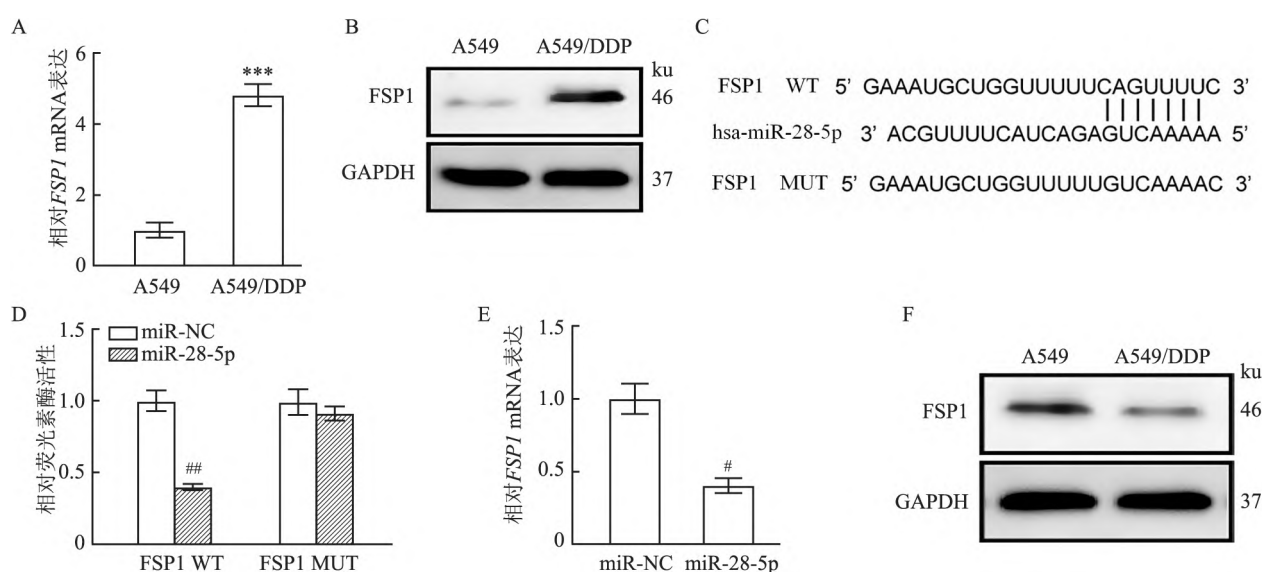


图3 miR-28-5p在A549/DDP细胞中靶向作用FSP1情况

A、B: A549、A549/DDP 细胞中的 FSP1 mRNA 和蛋白质表达水平; C: FSP1 的 3'UTR 的推定 miR-28-5p 结合序列; D: 用 FSP1 野生型或突变型 3' UTR 报告质粒和 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 共转染的 A549/DDP 细胞中的相对荧光素酶活性。E、F: 用 miR-28-5p 模拟物或 miR-NC 转染的 A549/DDP 细胞中的 FSP1 mRNA 和蛋白质表达水平; 与 A549 组比较: *** $P < 0.001$; 与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

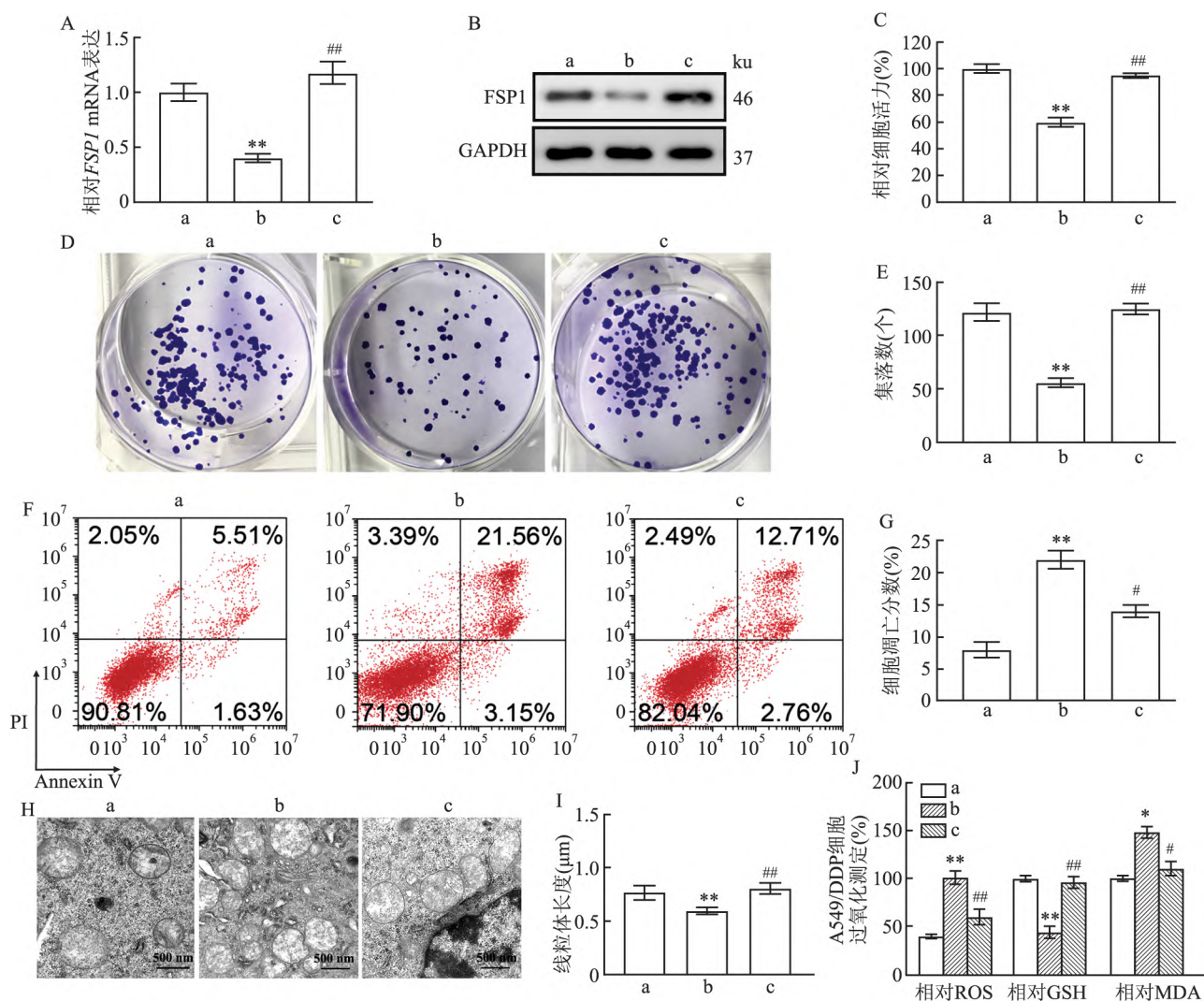


图4 FSP1 过表达对 miR-28-5p 介导的 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性的影响

A、B: PCR、蛋白质印迹分析 A549/DDP 细胞中 FSP1 表达水平; C: CCK-8 法测定 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 48 h 后细胞的活力; D、E: 集落形成实验测量用 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 14 d 的细胞的增殖能力 $\times 20$; F、G: 流式细胞术分析 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 48 h 后的细胞凋亡分数; H、I: 使用透射电子显微镜检查 8 $\mu\text{mol/L}$ DDP 处理 48 h 后细胞线粒体的形态、长度分析 $\times 10\,000$; J: 过氧化物 ROS、GSH、MDA 水平测定; a: pcDNA3.1 + miR-NC 组; b: pcDNA3.1 + miR-28-5p 组; c: FSP1 + miR-28-5p 组; 与 pcDNA3.1 + miR-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3.1 + miR-28-5p 组: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

DDP 处理的敏感性,降低了细胞的活力和增殖,并促进了它们的凋亡。本研究结果与先前研究报道的 miR-28-5p 在肺癌细胞中的作用一致;如 Ma et al^[6]发现 miR-28-5p 通过调节 HIF-1 α 水平介导非小细胞肺癌的进展;Wang et al^[15]证实, circRNA-002178 可以通过外泌体递送到 CD8⁺ T 细胞中,并通过海绵 miR-28-5p 以诱导肺腺癌中 PD1 表达。这些结果表明 miR-28-5p 在控制细胞生长和凋亡方面的功能可能与顺铂敏感性的维持有关。

本研究使用两种公开可用的算法预测 miR-28-5p 的基因靶标为 FSP1,并且用 miR-28-5p 模拟物转染的 A549/DDP 细胞中 FSP1 mRNA 和蛋白质表达

水平降低。FSP1 在保护细胞免受膜脂质过氧化方面起着至关重要的作用。研究^[16]表明, FSP1 在体外作为 NADH 依赖性辅酶 Q 氧化还原酶发挥作用;减少的辅酶 Q 可作为自由基清除抗氧化剂,足以抑制脂质过氧化和铁死亡。Bersuker et al^[11]从 CTRP 癌症治疗反应数据库中挖掘的数据表明, FSP1 表达与对多种 GPX4 抑制剂(包括 RSL3、ML210 和 ML162)的抗性呈正相关,甚至比胱氨酸转运蛋白 SLC7A11/xCT 还要多。此外,表达低水平 FSP1 的肺癌细胞系对 RSL3 最敏感,表达高水平 FSP1 的细胞系最具抗性。在高抗性 H460 细胞系中敲除 FSP1 导致对 RSL3 的敏感性增加 100 倍^[10]。因此,

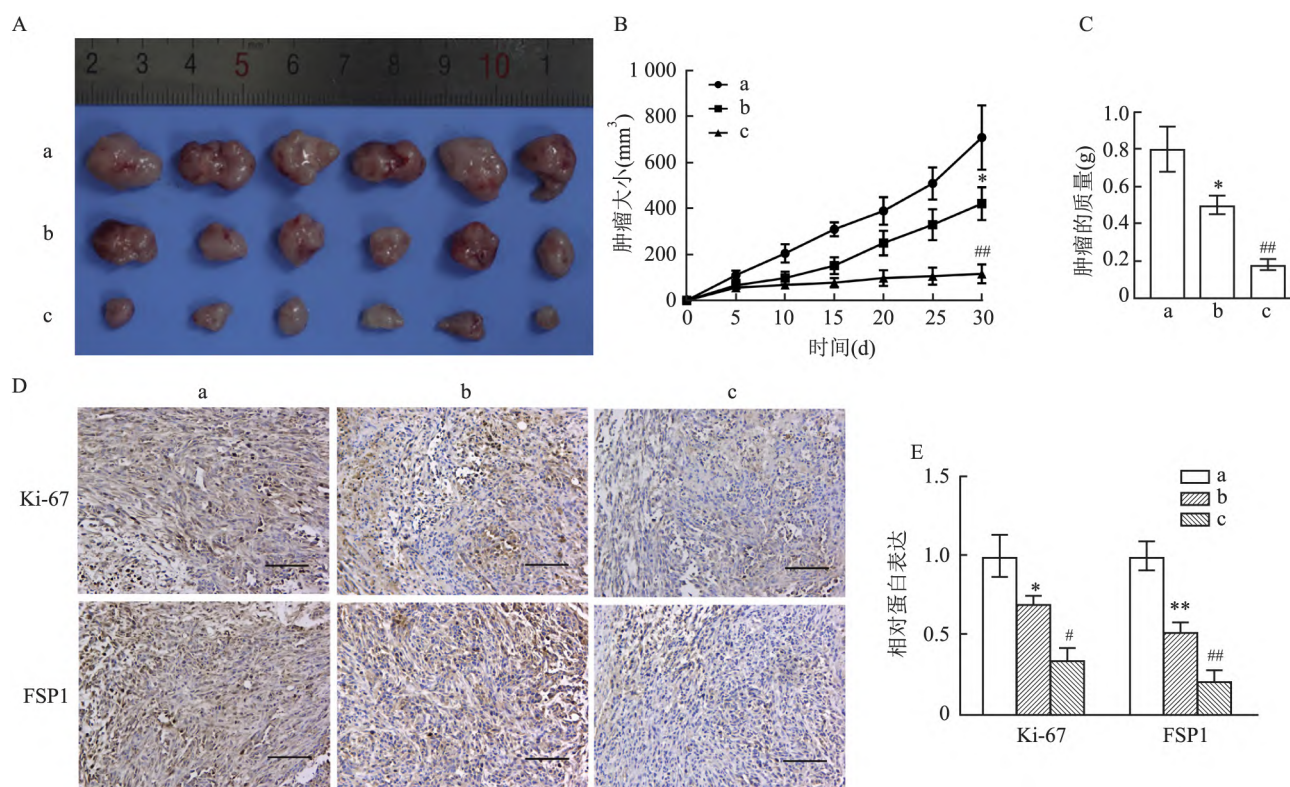


图5 miR-28-5p 过表达抑制体内肿瘤发生模型中的 A549/DDP 对顺铂耐药性

A: 在用顺铂处理下用 miR-28-5p 模拟物转染的 A549/DDP 细胞注射的裸鼠中形成的肿瘤; B、C: 在用顺铂处理下转染 miR-28-5p 模拟物的 A549/DDP 细胞注射的裸鼠中形成的肿瘤的大小、质量; D、E: 通过免疫组织化学检测 A549/DDP 细胞形成的肿瘤中 Ki-67、FSP1 表达 $\times 200$; a: Control 组; b: miR-NC + DDP 组; c: miR-28-5p + DDP 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 miR-NC + DDP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

FSP1 是多种癌症中铁死亡抗性的生物标志物。本研究扩展了先前发现,并表明 FSP1 在 A549/DDP 细胞中的表达高于 A549 细胞。此外,通过在细胞中过表达这种酶,进一步证实了其在确保顺铂耐药性方面的关键作用; miR-28-5p 可以直接抑制 FSP1。以上研究表明 miR-28-5p 通过抑制 FSP1 增强了 A549/DDP 细胞中顺铂诱导的铁死亡。

综上所述,该研究揭示了 miR-28-5p 通过与 FSP1 基因的直接相互作用抑制了 A549/DDP 细胞的活力并增加了铁死亡以逆转肺腺癌细胞顺铂耐药的机制。研究提示可能通过恢复肿瘤细胞中 miR-28-5p/FSP1 介导的铁死亡以抗癌。

参考文献

- [1] 高冬青,王家林. 肺癌危险因素研究现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(21): 85-90.
- [2] Gridelli C, Morabito A, Cavanna L, et al. Cisplatin-based first-line treatment of elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: joint analysis of MILES-3 and MILES-4 phase III trials[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(25): 2585-92.
- [3] Forciniti S, Greco L, Grizzi F, et al. Iron metabolism in cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2257.
- [4] 李春燕,孙传政,宋鑫. 肿瘤细胞死亡的一种新形式——铁死亡[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(11): 1208-14.
- [5] Cai Z, Zhang F, Chen W, et al. miRNAs: a promising target in the chemoresistance of bladder cancer[J]. OncoTargets and therapy, 2019, 12: 11805.
- [6] Ma X, Wang C, Chen J, et al. circACFG1 sponges miR-28-5p to promote non-small-cell lung cancer progression through modulating HIF-1 α level[J]. Open Med (Wars), 2021, 16(1): 703-17.
- [7] Han Q, Li J, Xiong J, et al. Long noncoding RNA LINC00514 accelerates pancreatic cancer progression by acting as a ceRNA of miR-28-5p to upregulate Rap1b expression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 151.
- [8] Xia X, Fan X, Zhao M, et al. The relationship between ferroptosis and tumors: a novel landscape for therapeutic approach[J]. Curr Gene Ther, 2019, 19(2): 117-24.
- [9] Sharma A, Flora S J S. Positive and negative regulation of ferroptosis and its role in maintaining metabolic and redox homeostasis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9074206.
- [10] Liu D, Li W, Zhong F, et al. METTL7B is required for cancer cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 178.

- [11] Bersuker K, Hendricks J M, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688 – 92.
- [12] 张潘红, 李莲莲, 张秀美, 等. microRNA 对肺癌化疗耐药性影响的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(7): 79 – 84.
- [13] Fazio S, Berti G, Russo F, et al. The miR-28-5p targetome discovery identified SREBF2 as one of the mediators of the miR-28-5p tumor suppressor activity in prostate cancer cells [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 354.
- [14] Wu W, He K, Guo Q, et al. SSRP1 promotes colorectal cancer progression and is negatively regulated by miR-28-5p [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3118 – 29.
- [15] Wang J F, Zhao X H, Wang Y B, et al. circRNA-002178 act as a ceRNA to promote PDL1/PD1 expression in lung adenocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 32.
- [16] Shimada K, Skouta R, Kaplan A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(7): 497 – 503.

miR-28-5p reverses cisplatin resistance in lung adenocarcinoma cells by inhibiting FSP1-mediated ferroptosis

Wang Xiaodan¹, Song Guoqing², Jiang Dan²

(¹Dept of Second Thoracic Surgery, ²Dept of First and Second Breast Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110000)

Abstract Objective To study the effect of miR-28-5p on cisplatin (DDP)-resistant A549 lung adenocarcinoma cell line (A549/DDP), and to explore whether its mechanism is related to ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1)-mediated ferroptosis. **Methods** The A549 lung adenocarcinoma cell line and A549/DDP cells were selected as the research objects. RT-qPCR method was used to detect the expression level of miR-28-5p in the cells. Cell proliferation was measured by CCK-8 method and colony formation assay. The target gene of miR-28-5p was identified and verified by luciferase reporter gene and Western blot analysis. A549/DDP was transfected with miR-28-5p simulant or FSP1 overexpression plasmid to evaluate cell proliferation, mitochondrial morphology was evaluated by transmission electron microscope, and the levels of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were measured by kit. A cell line-based xenograft model was established to evaluate the effect of miR-28-5p on tumor growth *in vivo*. **Results** Compared with A549 cells, the expression level of miR-28-5p in A549/DDP cells was significantly reduced ($P < 0.001$). Compared with A549 cells, the cell viability ($F = 49.542$, $P < 0.001$) and colony forming ability ($t = 4.412$, $P < 0.01$) of A549/DDP cells increased significantly. Compared with miR-NC group, the cell viability ($t = 4.612$, $P < 0.01$) and colony number ($t = 4.503$, $P < 0.01$) of A549/DDP cells in miR-28-5p group significantly decreased. The luciferase activity decreased in the cells transfected with the miR-28-5p mimic, being significantly more so in the presence of the pGL3-FSP1 3'UTR-WT vector. In addition, the expression of FSP1 in cells overexpressing miR-28-5p was significantly suppressed. Compared with the Vector + miR-28-5p group, the FSP1 + miR-28-5p group significantly increased cell viability and colony formation, cell mitochondrial length and GSH ($P < 0.01$), and significantly increased cell apoptosis, ROS production and MDA formation decrease ($P < 0.05$). *In vivo* experiments showed that compared with the miR-NC + DDP group, the size and weight of tumors formed in the miR-28-5p + DDP group were significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression of Ki-67 and FSP1 protein was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of miR-28-5p reversing cisplatin resistance in lung adenocarcinoma cells may be related to the inhibition of FSP1-mediated ferroptosis.

Key words miR-28-5p; lung cancer; ferroptosis suppressor protein 1; ferroptosis; cisplatin