

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.003

· 基础研究 ·

miR-103 靶向 PTEN 并激活 PI3K/AKT 通路促进肺癌细胞 A549 对达沙替尼耐药

孙红文^{1a}, 周小婷², 鲍亚男^{1a}, 熊国胜^{1a}, 崔岳^{1a}, 周华^{1b} (1. 昆明医科大学第一附属医院 a. 胸外科; b. 肿瘤放疗科, 云南 昆明 650032; 2. 福建医科大学附属第二临床医学院, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-103 靶向 PTEN 并激活 PI3K/AKT 信号通路促进肺癌细胞对达沙替尼 (dasatinib, DASA) 耐药的机制。**方法:** 收集 2014 年 4 月至 2018 年 1 月昆明医科大学第一附属医院胸外科收治的资料完整的肺癌 DASA 耐药组织和不耐药组织各 35 例。采用 qPCR 实验检测 miR-103 在肺癌 DASA 耐药组织和细胞中的表达水平, 同时, 采用 CCK-8、Transwell 和 Wb 实验检测敲降 miR-103 对 A549/DASA 细胞增殖、迁移和上皮间质转化 (EMT) 的影响, 双荧光素酶报告基因验证 miR-103 与 PTEN 的靶向关系。进一步采用 CCK-8、Transwell 和 Wb 实验检测 miR-103 通过 PTEN-PI3K/AKT 信号通路对 A549/DASA 细胞恶性生物学行为的影响。**结果:** miR-103 在肺癌 DASA 耐药组织和 A549/DASA 细胞中均高表达 (均 $P < 0.01$)。敲降 miR-103 可显著抑制 A549/DASA 细胞的增殖、迁移和 EMT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外, 双荧光素酶报告基因证实 miR-103 靶向作用 PTEN 并下调其表达水平 ($P < 0.01$)。进一步实验显示, 过表达 miR-103 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/AKT 信号通路进而显著促进 A549/DASA 细胞增殖、迁移和 EMT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 从而上调 A549/DASA 细胞对 DASA 的耐药性。**结论:** miR-103/PTEN/PI3K/AKT 信号通路与肺癌 DASA 耐药性存在调控关系, 敲降 miR-103 可逆转 A549/DASA 对 DASA 耐药。

[关键词] 肺癌; A549 细胞; 达沙替尼; miR-103; PTEN; PI3K/AKT

[中图分类号] R734.2; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0266-07

miR-103 targets PTEN to promote dasatinib resistance in lung cancer A549 cells via activating PI3K/AKT pathway

SUN Hongwen^{1a}, ZHOU Xiaoting², BAO Yanan^{1a}, XIONG Guosheng^{1a}, CUI Yue^{1a}, ZHOU Hua^{1b} (1a. Department of Thoracic Surgery; 1b. Department of Oncology Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan, China; 2. The Second Clinical Medical College of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of miR-103 targeting PTEN (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten) and activating PI3K/AKT signaling pathway to promote dasatinib (DASA) resistance in lung cancer cells. **Methods:** DASA-resistant tissues and non-resistant tissues (35 samples for each) from patients treated in Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University from April 2014 to January 2018 were collected for this study. Expression of miR-103 was detected in DASA-resistant tissues and cell lines of lung cancer by quantitative Real-time polymerase chain reaction (qPCR). The effect of miR-103 knock-down on the proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transition (EMT) of A549/DASA cells were measured by CCK-8 assay, Transwell and Wb, respectively. Subsequently, the dual luciferase reporter gene assay was used to verify whether PTEN was a target gene of miR-103. CCK-8, Transwell and Wb assay were further used to investigate the effect of miR-103 on malignant biological behaviors of A549/DASA cells via regulating PTEN-PI3K/AKT signaling pathway. **Results:** miR-103 was highly expressed in DASA-resistant tissues and A549/DASA cells ($P < 0.01$). Knockdown of miR-103 significantly inhibited the proliferation, invasion and EMT of A549/DASA cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Additionally, dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 810600103); 云南省教育厅科学研究基金资助 (No. 2013Y3002); 云南省科技计划项目联合专项基金 (No. 2010CD150)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 810600103), the Scientific Research Foundation of Education Department of Yunnan Province (No. 2013Y3002), and the Joint Special Fund for Science and Technology Planning of Yunnan Province (No. 2010CD150)

[作者简介] 孙红文 (1968-), 男, 硕士, 主任医师, 主要从事胸部肿瘤的基础和临床研究, E-mail: shong9984@126.com

[通信作者] 周华 (ZHOU Hua, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事胸部肿瘤的基础和临床研究, E-mail: ynhua-zhou@163.com

103 directly targeted PTEN and down-regulated its expression ($P<0.01$). Mechanistically, over-expression of miR-103 targeted and down-regulated PTEN to promote cell viability, invasion and EMT via activating PI3K/AKT pathway ($P<0.05$ or $P<0.01$), and further up-regulated the DASA-resistance in A549/DASA cells. **Conclusion:** miR-103/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway plays a certain role in regulating DASA resistance of lung cancer, and knockdown of miR-103 expression may reverse the resistance of A549/DASA cells to DASA.

[Key words] lung cancer; A549 cell; dasatinib (DASA); miR-103; PTEN; PI3K/AKT

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 266-272. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.003]

近年来,肺癌已经成为全球及中国病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。目前,化疗和分子靶向治疗是临床上用于治疗肺癌及延长患者生存期的主要手段,但是肺癌细胞对化疗药物和分子靶向治疗药物存在耐受性,所以预期疗效无法达到^[2-3]。为此,深入探索肺癌化疗和分子靶向治疗耐药相关的异常表达基因、信号通路及其分子机制,将有助于识别潜在的肺癌耐药性治疗靶点。MicroRNA(miRNA)与多种恶性肿瘤细胞化疗和分子靶向治疗耐药性密切相关,miR-103 曾被报道参与调控结直肠癌^[4]、非小细胞肺癌^[7]和胃癌^[8]发生发展进程。生物信息学数据库 Star-Base 预测显示,PTEN 是 miR-103 的靶基因之一。此外,PTEN 被证实通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路参与调控恶性肿瘤细胞增殖、迁移和 EMT,进而调控肿瘤放疗和化疗耐药性以及发病进程^[9-10]。然而,miR-103 通过 PTEN-PI3K/AKT 通路调控肺癌达沙替尼(dasatinib, DASA)耐药性的作用机制尚未见相关文献报道。为此,本研究拟探讨 miR-103 通过 PTEN-PI3K/AKT 信号通路调控肺癌细胞 DASA 耐药性的分子机制,这将有助于揭示肺癌 DASA 耐药性的潜在治疗分子靶点。

1 材料与方法

1.1 临床资料、细胞及主要试剂

收集 2014 年 4 月至 2018 年 1 月昆明医科大学第一附属医院胸外科收治的资料完整的肺癌 DASA 耐药组织和不耐药组织各 35 例,经手术切除或 CT 下粗针穿刺获取的样本迅速保存于液氮中。本研究经昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准。所有患者对本研究均签署知情同意书,患者年龄 22~75 岁,平均(51.2±5.6)岁。病理分级:G1 5 例、G2 13 例、G3 17 例、G4 35 例。按照 2018 年美国国立综合癌症网络(NCCN)指南临床分期标准分期:I+II 期 17 例、III+IV 期 53 例。

人肺癌 DASA 耐药细胞株(A549/DASA)和其亲代细胞 A549 均由本实验室保存,细胞株采用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中常规培养,其中 DASA 耐药细胞培养基中含有 1 mg/L 的 DASA。

DMEM 和胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司,青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,CCK-8 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,Transwell 小室购自美国康宁公司,miR-103 inhibitor/mimic 和 PTEN 的过表达载体 pcDNA-PTEN (PTEN)由上海吉玛制药技术有限公司提供,RNA 提取试剂盒和定量 PCR 试剂盒 SYBR premix Ex Taq™ 购自日本 TaKaRa 公司,双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自 Promega 公司,蛋白提取试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒,均购自美国 Bio-Rad 公司,蛋白印迹一抗(抗 PTEN 抗体、抗 E-cadherin 抗体、抗 N-cadherin 抗体和抗 Vimentin 抗体)和二抗[羊抗兔 IgG(H+L)]均购于购自美国 CST 公司。

1.2 细胞转染

选取对数生长期的 A549/DASA 细胞,胰酶消化后,再利用 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/ml。然后,将细胞接种到 6 孔板,每孔添加 2 ml 细胞悬液,并于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,随后进行 miR-103 mimic/inhibitor 和 pcDNA-PTEN 转染,其转染方法参考 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书,转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.3 CCK-8 法检测转染后 A549/DASA 细胞增殖活性

将处于对数生长期的转染后 A549/DASA 细胞接种于 96 孔板,每孔含细胞 1×10^4 个,每孔含培养基 100 μl。于待检测前 1 h,向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1~4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度(D)值。实验重复 3 次。

1.4 Transwell 实验检测转染后 A549/DASA 细胞迁移能力

分别将各处理组细胞用胰酶消化处理后,接种于 Transwell 小室 24 孔板内,上室加 100 μl(细胞密度为 1×10^5 个/ml)细胞悬液,下室加 250 μl 含 10% 胎牛血清的培养基,37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,取出小室,棉签擦去微孔膜上室的细胞,PBS 小心冲洗小室上下面 2 遍,4% 的多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 15 min,结晶紫染色 15 min,PBS 冲洗小室,干燥后置于 100 倍的倒置显微镜

观察。重复实验3次。

1.5 qPCR 实验检测样本组织和细胞miR-103和PTEN mRNA 表达水平

采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 取 2 μ g 逆转录为 cDNA。取 2 μ l 逆转录产物进行 PCR 反应, 以 U6 为内参基因(引物序列见表 1)。按试剂盒说明建立终体积为 20 μ l 的 PCR 反应体系 2 μ l 逆转录产物、10 μ l SYBR Green Mix、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l。PCR 反应条件: 第 1 步, 95 $^{\circ}$ C 5 min; 第 2 步, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 进行 40 个循环; 第 3 步, 78 $^{\circ}$ C 20 s(收集荧光强度)。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。实验重复 3 次。

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequence of primers

Gene	Sequence
U6	F: 5'-CAGGGGCCATGCTAAATCTTC-3' R: 5'-CTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3'
GAPDH	F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3' R: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
PTEN	F: 5'-ACCAGGACCAGAGGAAACCT-3' R: 5'-GCTAGCCTCTGGATTTGACG-3'
miR-103	F: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3' R: 5'-GCGAGCACAGMTTMTACGAC-3'

1.6 Wb 实验检测 PTEN 和 EMT 相关蛋白的表达水平

提取各组经处理的细胞和组织后加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白, 依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。然后 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min。再将等量蛋白进行 SDS-PAGE 分离并转至 PVDF 膜。经 5% 的 BSA 封闭 1 h 后加入抗 PTEN(1:500)、抗 E-cadherin 抗体(1:1 000)、抗 N-cadherin 抗体(1:1 000)和抗 Vimentin 抗体的一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。第 2 天加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1.5 h。最后加入发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照, 并统计灰度值计算相对表达量。实验重复 3 次。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-103 和 PTEN 的靶向关系

首先将 miR-103 的候选靶基因 PTEN 3' UTR 靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体 pcDNA-EGFP-pre-miR-103 与其靶基因 PTEN 验证载体 pmirGLO-miR-103-PTEN 3' UTR 共转染到 293T 细胞, 并设置空质粒载体与 miR-103 表达载体共转染对照。具体方法为: 在 24 孔板种, 对于每孔细胞, 转染 pmir-GLO-miRNA-基因 3' UTR 200 ng、pcDNA-EGFP-pre-miRNA 600 ng 及阴性对照

30 pmol/L。50 μ l Opti-MEM I 培养基稀释 2 μ l LipofectamineTM 2000 试剂后室温孵育 5 min; 混合需转染的 DNA 和稀释的 LipofectamineTM 2000, 室温孵育 20 min 后直接将复合物加到含 0.4 ml Opti-MEM I 培养基的细胞中, 轻轻摇动培养板混匀; 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养 8 h 后换 0.5 ml 含 10% 胎牛血清, 不含抗生素的正常 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h, 收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书, 采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值, 并以海肾荧光值作为内参。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件和 GraphPad Prism 5.0 作图软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

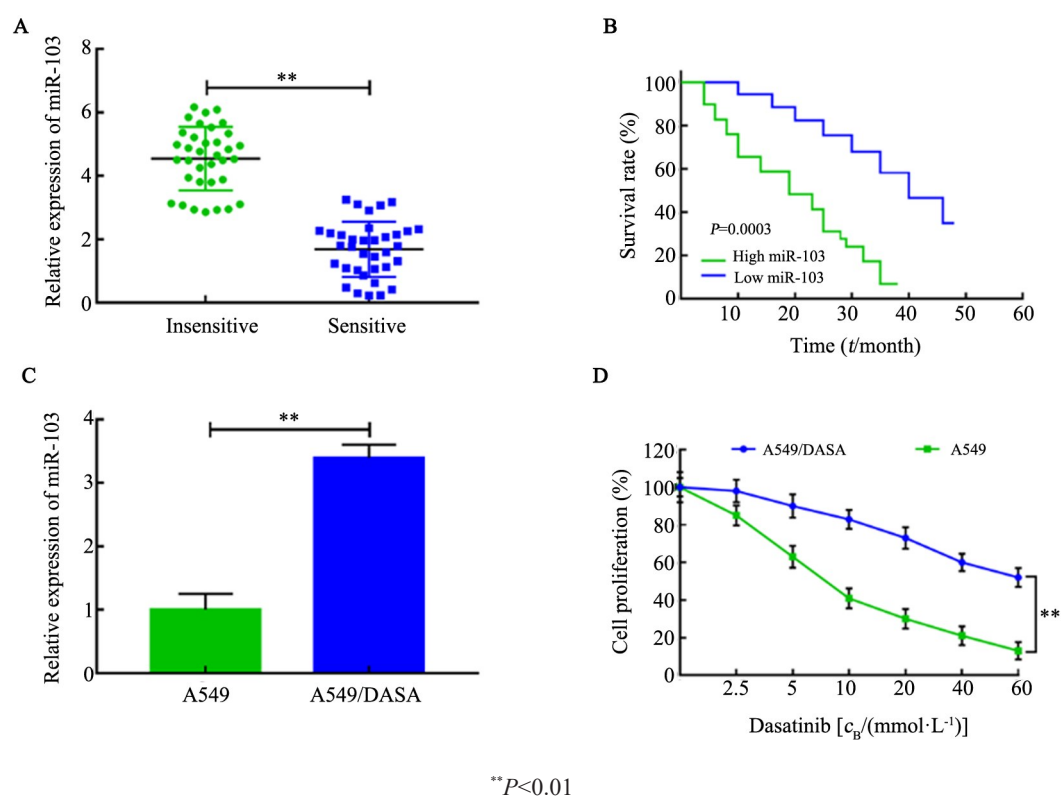
2.1 miR-103 在肺癌 DASA 耐药组织和细胞中均呈高表达

qPCR 实验检测结果显示, miR-103 在 DASA 耐药患者组织中的表达水平明显高于不耐药患者 ($P < 0.01$, 图 1A)。同时, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析发现, miR-103 表达上调的患者生存率低, 预后较差 ($P < 0.01$, 图 1B)。此外, miR-103 在肺癌 DASA 耐药细胞 A549/DASA 中的表达水平显著高于 A549 细胞 ($P < 0.01$, 图 1C)。同时, CCK-8 法检测结果表明, 随着 DASA 作用浓度的递增, A549/DASA 细胞增殖活性明显高于 A549 细胞 ($P < 0.01$, 图 1D), 且 A549/DASA 细胞的 IC₅₀ 值(63.44 nmol/L)明显高于 A549 细胞(8.82 nmol/L)。由此可知, miR-103 的高表达可能与肺癌 DASA 耐药性有关。

2.2 敲降 miR-103 可显著抑制 A549/DASA 细胞增殖、迁移和 EMT

qPCR 实验检测结果证实, 敲降 miR-103 后 A549/DASA 细胞中 miR-103 的表达水平明显低于对照组 ($P < 0.01$, 图 2A)。CCK-8 法检测结果显示, 与对照组比较, 敲降 miR-103 可以显著抑制 A549/DASA 细胞增殖活性 ($P < 0.01$, 图 2B)。同时, Transwell 检测结果表明, 与对照组比较, 敲降 miR-103 可显著抑制 A549/DASA 细胞侵袭迁移能力 ($P < 0.01$, 图 2C、D)。Wb 实验检测结果(图 2E、F)进一步证实, 敲降 miR-103 可显著促进 A549/DASA 细胞中上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达 ($P < 0.01$), 下调间质细胞标志物(N-cadherin 和 Vimentin)的表达 ($P < 0.05$)。由此可知, 敲降 miR-103 可显著抑制 A549/DASA 细胞增殖、迁移和

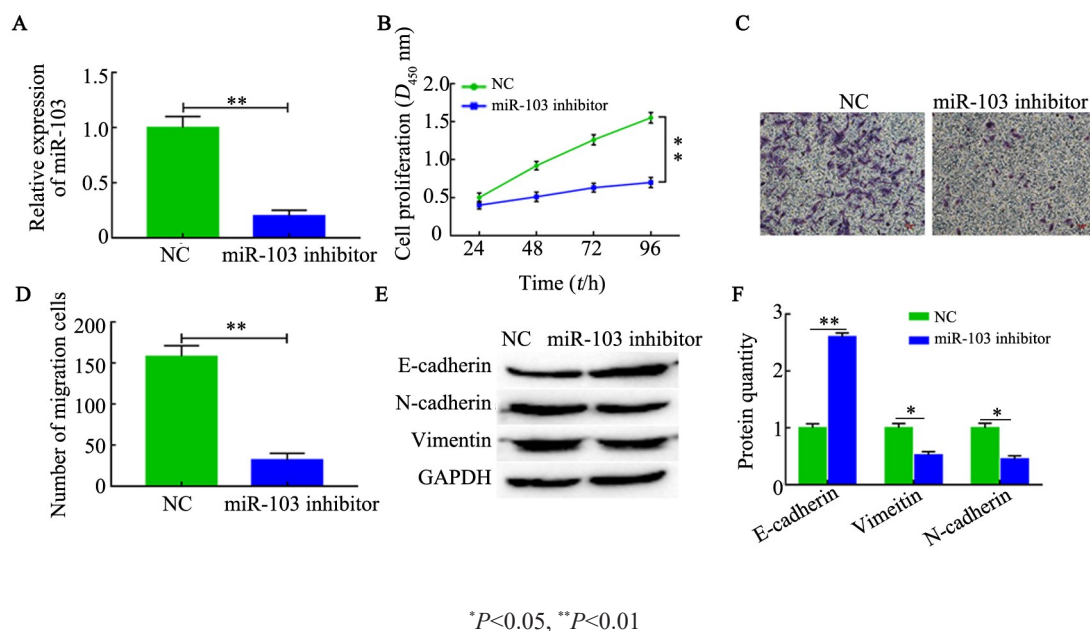
EMT。



A: Detection of microRNA-103 expression in DASA-resistant tissues by qPCR; B: Kaplan-Meier survival curve analysis of miR-103 expression; C: Expression of miR-103 in DASA-resistant lung cancer cell line A549/DASA; D: Effect of DASA concentration on proliferation of A549/DASA cells

图1 miR-103在肺癌DASA耐药组织和细胞中的表达水平

Fig.1 The expression of miR-103 in dasatinib-resistant tissues and cell lines of lung cancer



A: Effects of knockdown of miR-103 on its expression in A549/DASA cells by qPCR; B: Effects of miR-103 knockdown on the proliferation of A549/DASA cells detected by CCK-8 assay; C and D: Effects of miR-103 knockdown on migration of A549/DASA cells by Transwell($\times 100$); E and F: Effects of miR-103 knockdown on the expressions of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in A549/DASA cells by Wb

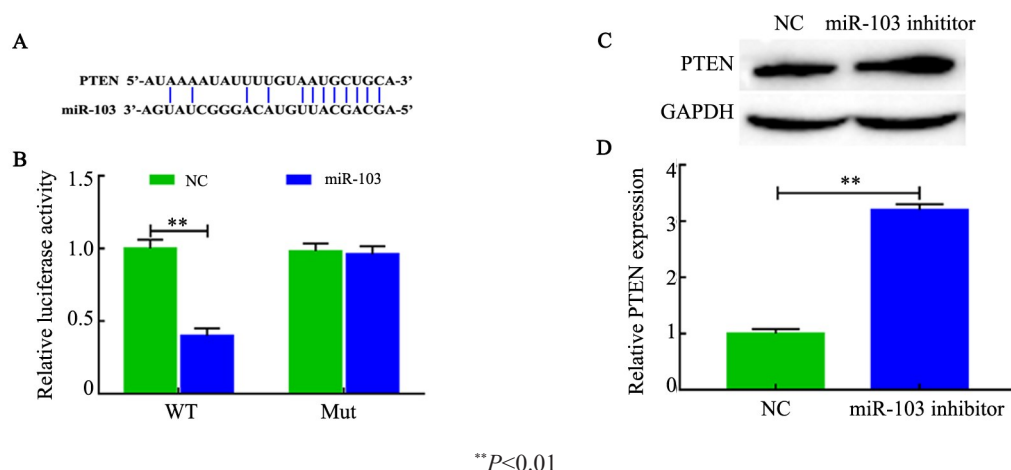
图2 敲降miR-103对A549/DASA细胞增殖、迁移和EMT的影响

Fig. 2 The effect of miR-103 knockdown on the proliferation, invasion and EMT of A549/DASA cells

2.3 miR-103 靶向调控 PTEN

通过借助生物信息学数据库 TargetScan 对 miR-103 的靶基因进行了预测,发现 miR-103 可以结合 PTEN 的 3'UTR(图 3A);双荧光素酶报告基因验证结果显示,在 PTEN 野生型细胞中转入 miR-103 mimic 后荧光素酶活性显著下降 ($P<0.01$,图 3B),在

PTEN 突变型细胞中转入 miR-103 mimic 后荧光素酶活性无明显变化。同时, Wb 检测结果显示, 敲降 miR-103 可显著促进 PTEN 蛋白在 A549/DASA 细胞中的表达水平 ($P < 0.01$, 图 3C、D)。由此可知, PTEN 是 miR-103 的靶基因, 并且 miR-103 可负调控 PTEN 的表达。



A: miR-103 can target 3'UTR of PTEN; B: Luciferase activity was decreased significantly after transfecting wild-type PTEN cells into miR-103 mimic; C and D: Down-regulation of miR-103 significantly increased the expression of PTEN protein in A549/DASA cells by Wb

图3 miR-103对PTEN表达的调控作用

Fig. 3 The regulation effect of miR-103 on PTEN expression

2.4 miR-103 通过 PTEN-PI3K/AKT 信号通路影响 A549/DASA 细胞生物学行为

为了进一步明确 miR-103 通过靶向调控 PTEN 对 A549/DASA 细胞增殖、迁移和 EMT 的影响。首先,通过 Wb 实验检测在 A549/DASA 细胞中转染 pcDNA-PTEN 或同时转染 pcDNA-PTEN 和 miR-103 mimics 对 PTEN 和 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响,结果(图 4A)显示,与对照组比较,在 A549/DASA 细胞过表达 PTEN 后可显著抑制 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),上调 PTEN 蛋白的表达水平($P<0.01$);但 PI3K 和 AKT 的表达水平与对照组没有明显差异(均 $P>0.05$),且同时过表达 PTEN 和 miR-103 后 p-AKT、p-PI3K 和 PTEN 的表达水平与对照组没有明显差异(均 $P>0.05$)。进一步 CCK-8 法和 Transwell 实验检测结果显示,过表达 PTEN 可显著抑制 A549/DASA 细胞增殖和迁移能力(均 $P<0.01$,图 4B~D)。而同时过表达 miR-103 或添加 IGF-1 后 A549/DASA 细胞增殖和迁移能力与对照组没有明显差异(均 $P>0.05$)。此外,Wb 实验检测结果(图 4E)显示,与对照组比较,过表达 PTEN 可显著抑制 Vimentin 和 N-cadherin 蛋白的表达(均 $P<0.01$),促进 E-cad-

herin 的表达 ($P<0.01$); 而同时过表达 miR-103 或添加 IGF-1 后 A549/DASA 细胞中 Vimentin 和 N-cadherin 蛋白的表达水平明显高于仅过表达 PTEN 组 ($P<0.01$)。由此可知, 过表达 miR-103 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/AKT 信号通路进而促进 A549/DASA 细胞增殖、迁移和 EMT, 从而上调 A549/DASA 细胞对 DASA 的耐药性。

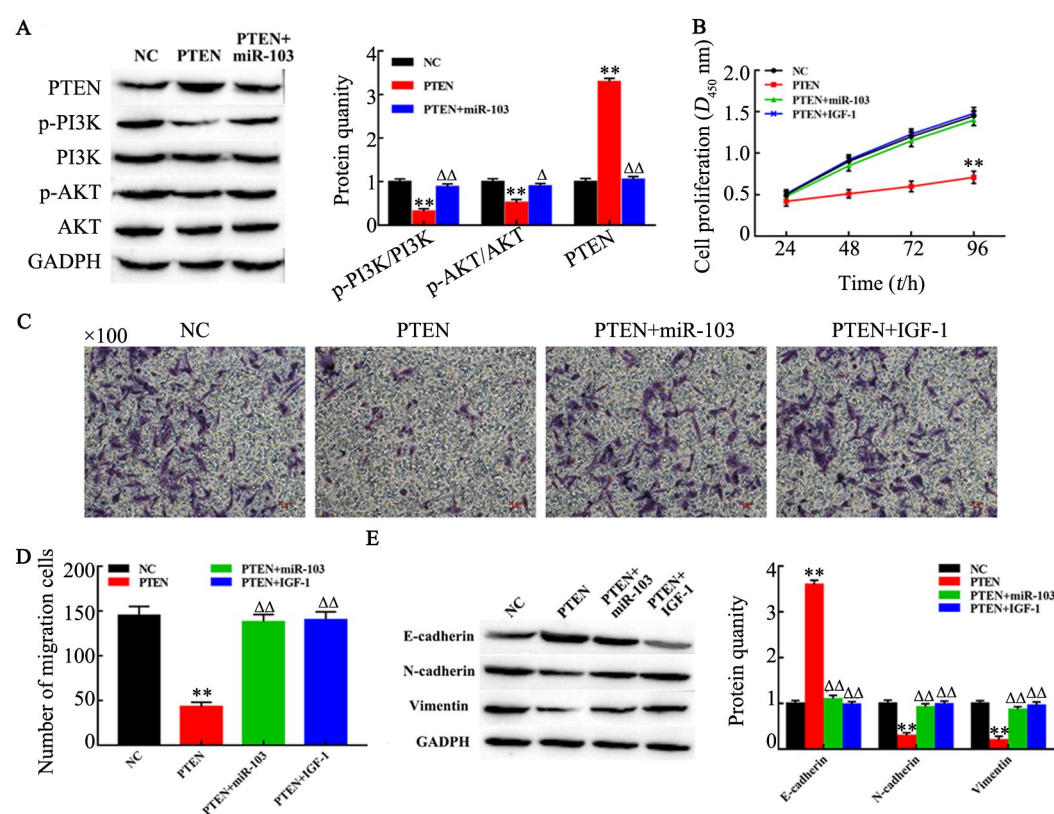
3 讨论

有研究^[11-12]报道,miRNA已被证实 in 肿瘤的发生发展进程和化疗耐药中发挥了重要调控作用,如WANG等^[13]研究发现,敲降miR-328通过靶向上调PTEN抑制非小细胞肺癌顺铂耐药细胞增殖和迁移能力,进而增强非小细胞肺癌对顺铂治疗的敏感性。SHEN等^[14]研究证实,miR-21/PTEN分子轴参与调控非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药性。WANG等^[15]研究显示,敲降miR-221通过靶向PTEN下调肺癌细胞对顺铂耐药性。ZHANG等^[16]研究表明,miR-130b通过靶向下调PTEN诱导肺癌细胞对顺铂产生耐受性。上述研究进展提示,miRNA可通过靶向调控PTEN介导肺癌细胞对化疗药物耐药性。同时,本研究同

样证实,miR-103 可靶向负调控 PTEN,且敲降 miR-103 通过靶向上调 PTEN 抑制 A549/DASA 细胞增殖、迁移和 EMT,进而增强 A549/DASA 细胞对 DASA 的敏感性。

随着研究的不断深入,PI3K/AKT 信号通路在多种恶性肿瘤化疗耐药中起着十分重要的作用,且阻断 PI3K/AKT 通路可逆转肿瘤细胞耐药性,恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[9,17]。如 WU 等^[18]研究发现,活化的 PI3K/AKT 信号通路通过正调控多药耐药相关蛋白(ABC 超家族)促进化疗药物的流失,引起肿瘤细胞耐受性。有研究^[19]发现,过表达 miR-22 通过阻断 PI3K/AKT 上调舌鳞状细胞癌细胞对顺铂的敏感性,而使用 PI3K/AKT 信号通路激动剂 IGF-1 可显著处理肿瘤细胞对顺铂的耐受性。本研究同样证实,miR-103 通过阻断 PI3K/AKT

信号通路促进肺癌细胞对 DASA 的敏感性。同时,TANG 等^[19]研究证实,miR-133a 通过靶向下调 PI3K/AKT 受体(ERFR、FGFR1、IGF-1 和 MET),进而阻断 PI3K/AKT 通路抑制前列腺癌发生骨转移。此外,也有多项研究证实,PI3K/AKT 信号通路可通过调控抗凋亡相关蛋白,引起肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药性^[20]。SEO 等^[21]发现,采用 PI3K/AKT 信号通路阻断剂 NVP-BEZ235,可显著抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,进而促进肾癌细胞凋亡。有研究^[22-24]发现,阻断 PI3K/AKT 信号通路可引起促凋亡蛋白 caspase-3/9 的表达,造成 Cyt C 从线粒体释放到细胞质中,从而导致乳腺癌耐药细胞凋亡。由此可知,PI3K/AKT 信号通路在恶性肿瘤细胞耐药性具有重要的调控作用。



** $P < 0.01$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PTEN group

A: Over-expression of PTEN inhibited the expression of p-PI3K and p-AKT; B-D: Over-expression of PTEN significantly inhibited proliferation and migration of A549/DASA cells; E: Over-expression of PTEN can significantly inhibit the expression of Vimentin and N-cadherin proteins by Wb

图4 miR-103通过PTEN-PI3K/AKT分子轴对A549/DASA细胞生物学行为的影响

Fig. 4 miR-103 regulated biological behaviors of A549/DASA cells via regulating PTEN/PI3K/AKT axis

综上所述,本研究揭示了miR-103的异常表达与肺癌DASA耐药性密切相关。此外,敲降miR-103通过靶向上调PTEN并阻断PI3K/AKT信号通路抑制A549/DASA细胞增殖、迁移和EMT,进而增强A549/DASA细胞对DASA的敏感性,从而揭示肺癌DASA

耐药性的潜在的治疗分子靶点。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/

- caac.21262.
- [2] WANG M, YUANG C, CHANG A. Molecular mechanism of action and potential biomarkers of growth inhibition of synergistic combination of afatinib and dasatinib against gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(23): 16533-16546. DOI: 10.18632/oncotarget.24814.
 - [3] BEAUCHAMP E M, WOODS B A, DULAK A M, et al. Acquired resistance to dasatinib in lung cancer cell lines conferred by DDR2 gatekeeper mutation and NF1 loss[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(2): 475-482. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-13-0817.
 - [4] ZHANG Y, QU X, LI C, et al. miR-103/107 modulates multidrug resistance in human gastric carcinoma by downregulating Cav-1[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2277-2285. DOI: 10.1007/s13277-014-2835-7.
 - [5] WAN L, TIAN Y, ZHANG R, et al. MicroRNA-103 confers the resistance to long-treatment of adriamycin to human leukemia cells by regulation of COP1[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5): 3843-3852. DOI: 10.1002/jcb.26431.
 - [6] CHEN H Y, LIN Y M, CHUANG H C, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6788-6793. DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-3079.
 - [7] YANG D, WANG J J, LI J S, et al. miR-103 functions as a tumor suppressor by directly targeting programmed cell death 10 in NSCLC[J]. *Oncol Res*, 2017, 26(4): 519-528. DOI: 10.3727/096504017x15000757094686.
 - [8] ZHENG J, LIU Y, QIAO Y, et al. miR-103 promotes proliferation and metastasis by targeting KLF4 in gastric cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): pii: E910[2019-01-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445396>. DOI: 10.3390/ijms18050910.
 - [9] PEREZ-RAMIREZ C, CANADAS-GARRE M, MOLINA M A, et al. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer[J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(16): 1843-1862. DOI: 10.2217/pgs.15.122.
 - [10] ZHANG R, LI G, ZHANG Q, et al. Hirsutine induces mPTP-dependent apoptosis through ROCK1/PTEN/PI3K/GSK3 β pathway in human lung cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 598-605. DOI: 10.1038/s41419-018-0641-7.
 - [11] ZHU J, ZHU WWU W. MicroRNAs change the landscape of cancer resistance[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1699(2): 83-89. DOI: 10.1007/978-1-4939-7435-1_6.
 - [12] MACDONAGH L, GRAY S G, FINN S P, et al. The emerging role of microRNAs in resistance to lung cancer treatments[J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(2): 160-169. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.12.009.
 - [13] WANG C, WANG S, MA F, et al. miRNA328 overexpression confers cisplatin resistance in nonsmall cell lung cancer via targeting of PTEN[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 11(1): 625-632. DOI: 10.3892/mmr.2018.9478.
 - [14] SHEN H, ZHU F, LIU J, et al. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103305[2019-01-11]. http://med.wanfangdata.com.cn/Paper/Detail/PeriodicalPaper_PM25058005. DOI: 10.1371/journal.pone.0103305.
 - [15] WANG N, ZHU C, XU Y, et al. Negative regulation of PTEN by microRNA-221 and its association with drug resistance and cellular senescence in lung cancer cells[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 7908950. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29876362>. DOI: 10.1155/2018/7908950.
 - [16] ZHANG Q, ZHANG B, SUN L, et al. MicroRNA-130b targets PTEN to induce resistance to cisplatin in lung cancer cells by activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(4): 194-202. DOI: 10.1002/cbf.3331.
 - [17] FUMAROLA C, BONELLI M A, PETRONINI P G, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(3): 197-207. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.011.
 - [18] WU Q, CHEN Y, CUI G, et al. Wortmannin inhibits K562 leukemic cells by regulating PI3k/AKT channel in vitro[J]. *J Hua Zhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(4): 451-456. DOI: 10.1007/s11596-009-0412-x.
 - [19] TANG Y, PAN J, HUANG S, et al. Downregulation of miR-133a-3p promotes prostate cancer bone metastasis via activating PI3K/AKT signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 160-166. DOI: 10.1186/s13046-018-0813-4.
 - [20] LI Q, LAI Z, YAN Z, et al. Hedyotis diffusa Willd inhibits proliferation and induces apoptosis of 5-FU resistant colorectal cancer cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 358-365. DOI: 10.3892/mmr.2017.7903.
 - [21] SEO B R, MIN K J, CHO I J, et al. Curcumin significantly enhances dual PI3K/AKT and mTOR inhibitor NVP-BEZ235-induced apoptosis in human renal carcinoma Caki cells through down-regulation of p53-dependent Bcl-2 expression and inhibition of Mcl-1 protein stability[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95588[2019-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743574>. DOI: 10.1371/journal.pone.0095588.
 - [22] 何平, 王平, 熊隆信. miR-429 通过下调 PTEN 并激活 PI3K/AKT 信号通路促进胰腺癌 PANC-1 细胞对卡培他滨耐药[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(12): 1251-1258. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.007.
 - [23] 赵家义, 韩一平. PI3K-AKT-mTOR 信号通路抑制剂与肿瘤免疫治疗[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(12): 1424-1430. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.015.
 - [24] CHEN J, WANG W, WANG H, et al. Combination treatment of ligustrazine piperazine derivate DLJ14 and adriamycin inhibits progression of resistant breast cancer through inhibition of the EGFR/PI3K/AKT survival pathway and induction of apoptosis[J]. *Drug Discov Ther*, 2014, 8(1): 33-41. DOI: 10.5582/ddt.8.33.

[收稿日期] 2018-12-06

[修回日期] 2019-02-01

[本文编辑] 王映红