

网络出版时间: 2022-06-28 9:49 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20220624.1741.020.html>

基于 miR-15a-5p/P53 信号通路探讨 EMT 与肺癌细胞阿霉素耐药的关系

魏东¹, 辛运超², 刘博³, 容宇¹, 李彦明¹, 郝雁冰¹

摘要 目的 探讨 miR-15a-5p 在肺癌细胞对阿霉素(DOX)耐药中的作用,并阐明其与 DOX 耐药之间的功能和机制联系。方法 分别采用 si-miR-15a-5p、miR-15a-5p 模拟物转染 A549、A549/DOX 抗性细胞(A549/D)。采用 MTT 法测定细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blots 检测上皮间充质转化(EMT)相关蛋白及 P53 蛋白表达,qRT-PCR 检测 miR-15a-5p 表达。通过生物信息学预测与双荧光素酶报告子分析 miR-15a-5p 潜在靶基因。采用 A549/D 细胞构建裸鼠移植瘤模型,分析 miR-15a-5p 过表达促进 DOX 的体内抗肿瘤作用。结果 MTT 分析结果显示,miR-15a-5p 的敲低提高了 A549 细胞的细胞活力(IC_{50} 值: $8.86 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$),miR-15a-5p 的过表达降低了 A549/D 细胞的细胞活力(IC_{50} 值: $1.92 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$)。并且在 A549 细胞中阻断 miR-15a-5p 减少凋亡($P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达促进凋亡($P < 0.001$)。Western blot 分析显

示转染 si-miR-15a-5p 逆转了 DOX 调节 EMT 的作用。生物信息学预测证明 P53 和 miR-15a-5p 之间存在特异性结合位点。在 A549 细胞中阻断 miR-15a-5p 减少 P53 蛋白表达($P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达增加 P53 蛋白表达($P < 0.01$)。体内实验显示,miR-15a-5p agomir 联合 DOX 可降低肿瘤体积和 N-cadherin 的表达水平,同时增强了 P53、E-cadherin 蛋白的表达水平。结论 miR-15a-5p 过表达可能通过靶向 P53 抑制 EMT 过程,增强肺癌细胞对 DOX 治疗的敏感性。

关键词 miR-15a-5p; P53; 上皮间充质转化; 非小细胞性肺癌; 耐药

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)07-1127-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.021

2022-05-14 接收

基金项目: 河北省卫健委重点科技研究计划(编号: 20200552)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 胸外科、² 耳鼻咽喉头颈外科、³ 病理科,张家口 075000

作者简介: 魏东,男,硕士,主治医师;

郝雁冰,男,本科,副主任医师,责任作者, E-mail: xx-bzx1997@163.com

非小细胞肺癌是全世界人类肿瘤相关死亡的主要原因,5 年生存率 $< 15\%$ ^[1]。单纯化疗或联合放疗为治疗晚期肺癌的一线治疗策略^[2]。然而,由于固有的或获得性的耐药性,化疗的疗效是短暂的,并且受到显著地限制,从而导致较差的生存率^[3]。阿霉素(doxorubicin, DOX)已被用于肺癌的治疗。然而,DOX 耐药性限制了其临床疗效^[4]。更好地理解

X-ray diffraction (XRD) and energy disperse spectroscopy (EDS) were employed to analyze the ingredients and elements distribution of scaffold, respectively. Additionally, the compression strength of the scaffold was tested by mechanical universal testing machine. The biocompatibility of the scaffold and the cell viability research were characterized via CCK-8 assay and Live/Dead staining, respectively, and the cell adhesion was studied by DPAI/Phalloidine fluorescence staining. qRT-PCR was employed to investigate the expression level of osteogenic-related gene such as BMP2, RUNX2 and COL1. ALP staining was carried out to measure the osteogenic differentiation effect of BMSCs. **Results** The CS- β -TCP scaffold was comprised of bulk parallel, aligned and thin lamellas with many porous structures. β -TCP particles were evenly distributed over CS framework layers and the CS- β -TCP scaffold possess excellent elastic property and biocompatibility, moreover, the cell seeded on scaffold revealed high cell viability and continuous proliferation. qRT-PCR and ALP staining results demonstrated that the CS- β -TCP scaffold could induce osteogenic differentiation of BMSC. **Conclusion** To sum up, the CS- β -TCP scaffold expressed desired mechanical and biological properties, and could induce BMSC differentiate into osteoblast, the composite scaffold provided a promising strategy for bone defect regeneration.

Key words Chitosan; β -TCP; composite scaffold; bidirectional lyophilization technique; osteogenic differentiation

揭示化疗耐药(包括 DOX 耐药)的分子机制对于肺癌患者获得更好的生存率非常重要。MicroRNAs (miRNAs) 是一种小的非编码 RNA,通过与靶向 mRNAs 的 3'非翻译区(3'-UTR)结合调节基因表达^[1]。miRNA 在肺癌进展过程中的异常表达与细胞增殖、侵袭、迁移和化疗耐药密切相关^[2]。据报道,miR-15a-5p 作为一种肿瘤抑制因子,在胃癌、甲状腺乳头状癌和前列腺癌中表达下调^[3]。最近,miR-15a-5p 被报道通过抑制组蛋白乙酰化抑制肺癌转移和脂质代谢^[4]。在多发性骨髓瘤中,miR-15a-5p 参与了外泌体相关 miRNAs 耐药性^[5]。尽管 miR-15a-5p 参与了肿瘤生长过程中的化疗耐药,但其对肺癌 DOX 耐药的作用尚不清楚。该研究探讨了 miR-15a-5p 在肺癌细胞对 DOX 耐药中的作用,并阐明其与 DOX 耐药之间的功能和机制联系。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养 人肺癌细胞系 A549 购自美国 ATCC 公司,将细胞培养在含有 10% 胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司)、100 单位/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司)。A549/DOX 抗性细胞(A549/D)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。A549/D 是通过在 DMEM 中逐渐提高 DOX 浓度(0.01 mg/L ~ 1 mg/L)来筛选出具有抗药性的细胞,将 A549/D 细胞连续暴露于 DOX(1 mg/L)下,维持细胞的耐药性。

1.2 体外转染 广州锐博生物技术有限公司合成 miR-15a-5p 模拟物、siRNA 敲低 miR-15a-5p(si-miR-15a-5p)及其相应的阴性对照(NC)寡核苷酸。使用 Lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司)进行所有转染。

1.3 细胞活力分析 将转染处理后的细胞(1×10^4 个/孔)接种到 96 孔培养板中。孵育 4 h 后,向每个孔中加入 10 μ l MTT 溶液(美国 Sigma 公司),继续孵育 4 h。离心,吸出含有 MTT 的培养基,然后加入 100 μ l DMSO。用 Mithras2LB943 全功能微孔板分析仪(美国 Berthold Technologies 公司)在 490 nm 下测量每个孔的光密度。未经处理的细胞作为对照。细胞存活率(%) = 吸光度处理组/吸光度对照组 $\times$ 100。细胞毒性表现为 DOX 抑制 50% 细胞生长的浓度(IC_{50})。

1.4 细胞凋亡测定 收集处理后细胞并用 PBS 洗涤 2 次,使用 FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 I(美国 BD Biosciences 公司)对细胞进行双重染色。然

后,用流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)分析标记细胞。

1.5 蛋白质印迹分析 用蛋白裂解缓冲液(南京 Beyotime 公司)从细胞中提取总蛋白。裂解物在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)前变性,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)。然后,在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1.5 h,在 4 $^{\circ}$ C 下与一级抗体孵育过夜。接下来,用二级抗体(南京 Beyotime 公司)进一步孵育细胞膜 1 h。最后用增强化学发光试剂(ECL,美国 Pierce 公司)观察免疫反应信号。研究中使用的主要抗体如下:抗波形蛋白(美国 Abcam 公司)、抗 E-钙粘蛋白及抗 N-钙粘蛋白(美国 ThermoFisher Scientific 公司)、抗 P53 (Abcam)和抗 GAPDH (Abcam)。

1.6 实时定量 PCR (RT-qPCR) 分析 使用 RNAeasy 迷你试剂盒(美国 Qiagen 公司)从培养细胞中提取总 RNA,并使用高容量逆转录试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)进行逆转录。然后,在 ABI7900HT 实时 PCR 系统(Applied Biosystems)上使用 GoTaq qPCR Master Mix(美国 Promega 公司)进行 qPCR 分析。所有结果均采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。miRNA 表达水平标准化为 U6。U6 和 miR-15a-5p 的引物购自上海捷瑞生物工程有限公司。用于 qPCR 的引物序列如下: miR-15a-5p (正向) 5'-ACACTCCAGCTGGGAAACCGTTACCATTAC-3', (反向) 5'-CTCAACTGGTGTCTGCGACTCGGCAATTCAGTTGAGCTTACA-3'; U6 (正向) 5'-GCTTCGGGCACATATACTA-3', (反向) 5'-AACGCTTCAATTTGC-3'。

1.7 生物信息学预测与双荧光素酶报告子分析 在荧光素酶报告实验中,用 PCR 方法从人基因组 DNA 中扩增出含有 miR-15a-5p 结合序列的 P53 基因 3'UTR 片段的野生型(WT)。为了检测 miR-15a-5p 是否调控 P53 的表达,研究合成了含有 miR-15a-5p 靶结合位点的野生型 P53 及其突变体,并将其插入 pGL3 荧光素酶载体(美国 Promega Corporation 公司)的 3'UTR 中。然后用 Lipofectamine 3000 将 WT 或突变型(MT) pGL3-P53-3'UTR 与 miR-NC、miR-15a-5p、抗 miR-NC 或抗 miR-15a-5p 联合转染。转染后 24 h 收获细胞,使用双荧光素酶报告试剂盒(美国 Promega Corporation 公司)测量荧光素酶活性,并与 Renilla 荧光素酶活性进行标准化。

1.8 裸鼠移植瘤 共 24 只雌雄各半 BALB/C 裸鼠(年龄 4 ~ 6 周;体质量: 18 ~ 24 g;上海杰思捷实验

动物有限公司,生产许可证[SCXK(沪)2018-0004],小鼠左侧皮下注射 A549/D 细胞(5×10^6)。肿瘤体积达到 50 mm^3 后,将小鼠随机分为 4 组:① PBS 组;② DOX 组(2 mg/kg,每 2 d 1 次);③ miR-15a-5p agomir 组(小鼠 2 nmol/只,每 3 d 1 次),或④ DOX 联合 miR-15a-5p agomir 组。miR-15a-5p agomir 由 miR-15a-5p 模拟物化学修饰而成。每 3 d 用游标卡尺测量一次肿瘤大小,用游标卡尺测量肿瘤结节最大轴径(A)和最小轴径(B),肿瘤体积($\text{TV} = (A \times B^2) / 2$)。第 30 天,对裸鼠进行安乐死和解剖。每组取 3 个肿瘤组织作石蜡切片。

1.9 免疫组织化学染色 肿瘤组织用 4% 福尔马林固定,石蜡包埋。组织切片(4 μm 厚)在二甲苯中脱蜡,在一系列分级乙醇中再水化,并通过煮沸回收抗原。用 10% 山羊血清(北京 Solarbio 公司)阻断内源性过氧化物酶活性 30 min,并与兔抗鼠 P53(1:1 000;美国 Abcam 公司)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第二天,切片在室温下与山羊抗兔 IgG(1:100;美国 Abcam 公司)孵育 30 min,然后与 HRP 标记的链霉亲和素反应 30 min。最后,用 3,3'-二氨基联苯胺溶液(DAB, Solarbio)显影切片,苏木精复染后,用中性香脂密封,在光学显微镜下观察切片。

1.10 统计学处理 使用 SPSS 21.0 统计软件进行计算,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用方差分析,事后检验采用 Tukey's 多重比较。相关系数用学生 t 检验计算。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-15a-5p 的过度表达使肺癌细胞对 DOX 治疗敏感 MTT 分析显示,A549/D 对 DOX 处理表现出最高的活性(IC_{50} 值: $8.63 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$),而 A549 细胞表现出最低的细胞活性(IC_{50} 值: $0.77 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$) (图 1A)。为了探讨 miR-15a-5p 在肺癌细胞化疗耐药中的作用,检测了 miR-15a-5p 在有耐药的肺癌细胞中的表达。如图 1B 所示,与 A549 细胞相比,A549/D 细胞中 miR-15a-5p 的表达降低。然后,在 A549/D 细胞中增强 miR-15a-5p 的表达,并降低其在 A549 细胞中的表达,用 RT-qPCR 证实转染效率(图 1C、D)。采用 MTT 法检测不同剂量 DOX 处理 24 h 后 si-miR-15a-5p 转染的 A549 细胞和 miR-15a-5p 模拟物转染的 A549/D 细胞的存活率情况,miR-15a-5p 的敲低提高了 A549 细胞的细胞活力(IC_{50} 值: $8.86 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$),miR-15a-5p 的过表达降低了 A549/D 细胞的细胞活力(IC_{50} 值:

$1.92 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$) (图 1E、F)。为了确定 miR-15a-5p 是否调节细胞凋亡,对肺癌细胞进行了流式细胞术分析。结果发现,在 A549 细胞中干扰 miR-15a-5p 表达减少凋亡($t = 29.406, P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达促进凋亡($t = 36.281, P < 0.001$) (图 1G、H)。

2.2 miR-15a-5p 调控肺癌细胞的上皮间充质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 研究进一步考察了 EMT 是否与肺癌细胞中 miR-15a-5p 调节的 DOX 敏感性有关。如图 2A 所示,DOX 处理使 A549 细胞中的 N-钙粘蛋白和波形蛋白表达水平降低,而 E-钙粘蛋白上调,表明肺癌细胞中的 EMT 降低。同时,DOX 诱导 A549 细胞中 miR-15a-5p 表达水平增加(图 2B)。通过转染 si-miR-15a-5p 逆转了 DOX 对 EMT 的抑制作用(图 2C)。

2.3 miR-15a-5p 与 P53 结合 为了探索 miR-15a-5p 调节 A549 细胞化疗敏感性的机制,利用预测算法,包括 TargetScan、starbase、exiqon 和 miRDB 来识别 miR-15a-5p 的潜在靶基因。生物学预测结果证明 P53 和 miR-15a-5p 之间存在特异性结合位点(图 3A-B)。为了证实 miR-15a-5p 是否能直接靶向 P53,在 A549 和 A549/D 细胞中构建了含有 P53 3' UTR 结合位点 WT 或 MT 的载体。如图 3C 和 D 所示,在 A549 细胞中,下调 miR-15a-5p 降低 WT P53 报告基因的荧光素酶活性,而在 A549/D 细胞中,过表达 miR-15a-5p 提高 WT P53 报告基因的荧光素酶活性。然而,在 A549 和 A549/D 细胞中,突变的 MT P53 组均未观察到这些作用,提示 P53 是 miR-142-3p 的靶基因。随后进行 Western blot 检测 P53 蛋白水平。如图 3E 和 F 所示,在 A549 细胞中干扰表达 miR-15a-5p 减少 P53 蛋白表达($P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达增加 P53 蛋白表达($P < 0.01$)。

2.4 miR-15a-5p 过表达促进 DOX 的体内抗肿瘤作用 通过体内实验进一步研究 miR-15a-5p 对 DOX 抗性的影响。如图 4A、B 所示,miR-15a-5p agomir 联合 DOX 可降低肿瘤体积。免疫组化染色显示,与 miR-15a-5p agomir 和 DOX 联合治疗的小鼠肿瘤切片中 P53 增加(图 4C)。Western blot 结果显示,DOX 和 miR-15a-5p agomir 联合治疗降低了肿瘤样本中 N-cadherin 的表达水平,同时增强了 P53、E-cadherin 蛋白的表达水平(图 4D)。总之,这些结果表明 miR-15a-5p 的过度表达促进了肺癌治疗的药物敏感性。

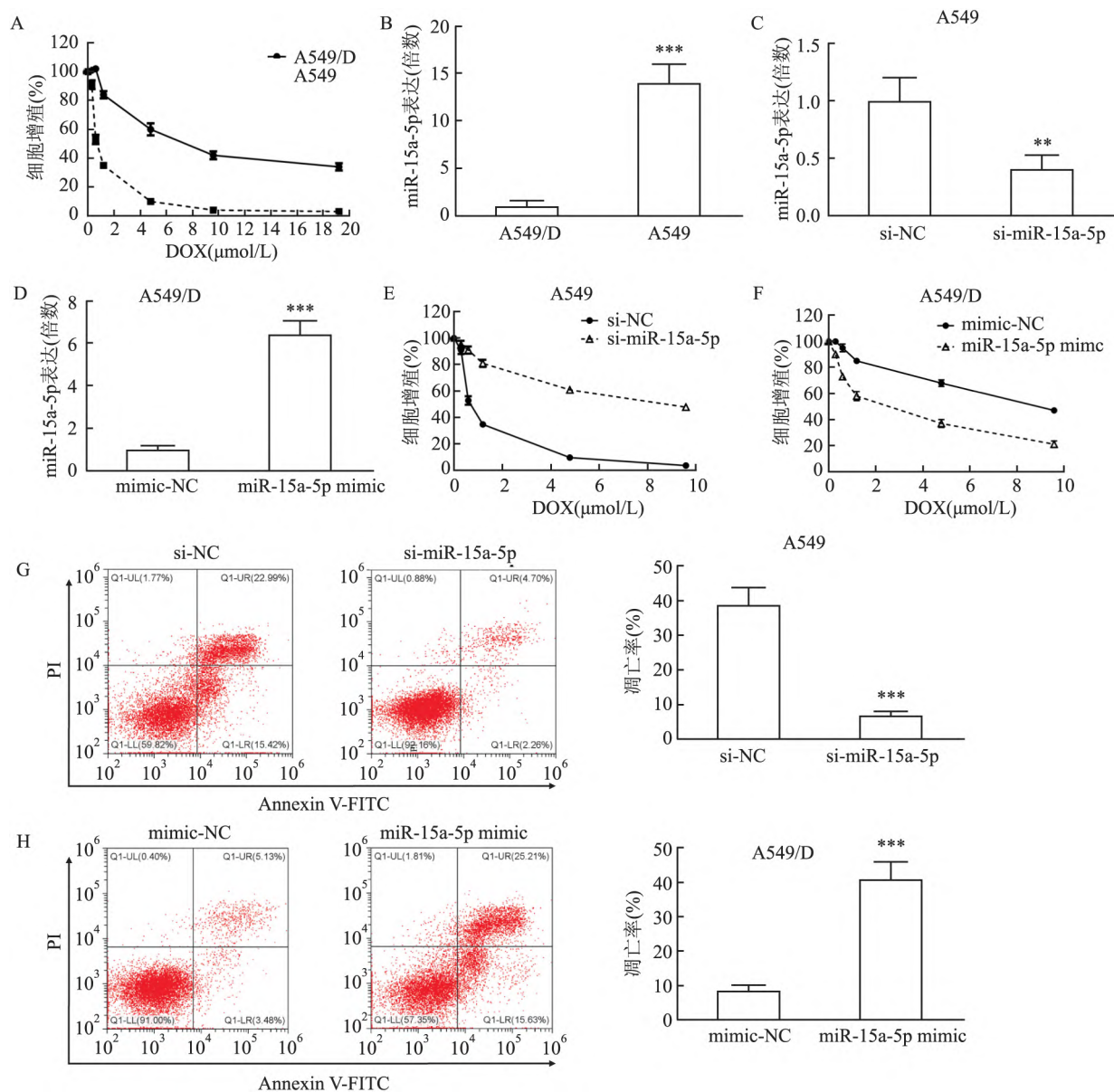


图1 miR-15a-5p的过度表达使肺癌细胞对DOX治疗敏感

A: MTT 分析 A549/D 或 A549 细胞活力; B: RT-qPCR 分析 A549/D 或 A549 细胞 miR-15a-5p 表达; C: RT-qPCR 分析 si-miR-15a-5p 转染效率; D: RT-qPCR 分析 miR-15a-5p 模拟物转染效率; E: MTT 分析 si-miR-15a-5p 对 A549 细胞活力影响; F: MTT 分析 miR-15a-5p 模拟物对 A549/D 细胞活力影响; G: 流式细胞法分析 si-miR-15a-5p 对 A549 细胞凋亡影响; H: 流式细胞法分析 miR-15a-5p 模拟物对 A549/D 细胞凋亡影响; 与 A549/D 比较: *** $P < 0.001$; 与 si-NC 组或 mimic-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

尽管 DOX 的应用提高了肺癌患者的生存率,但其耐药性限制了其广泛应用,导致治疗失败^[4]。对化疗的治疗抵抗是肺癌和其他癌症患者面临的全球性健康挑战。大量的研究工作已经被引导到寻找潜在的驱动基因和预测治疗反应和确定替代治疗。在肺癌的发展过程中,miRNA 的异常表达是常见的,这也与化疗耐药有关^[5]。然而,miRNAs 的调控作

用相当复杂,其对肺癌耐药的影响尚不清楚。miR-15a-5p 被认为在不同类型的癌症中发挥抑癌作用,如前列腺癌、胃癌和黑色素瘤等^[6-9]。因此,miR-15a-5p 有望成为肿瘤治疗的靶点。本研究发现 A549/D 细胞中 miR-15a-5p 的表达低于 A549 细胞,并且 miR-15a-5p 增强了肺癌细胞对 DOX 的敏感性,减少了 A549 细胞的增殖,促进了 A549 细胞的凋亡。这些结果表明 miR-15a-5p 是肺癌进展过程中的关键调节因子。此外,荧光素酶活性测定显示,

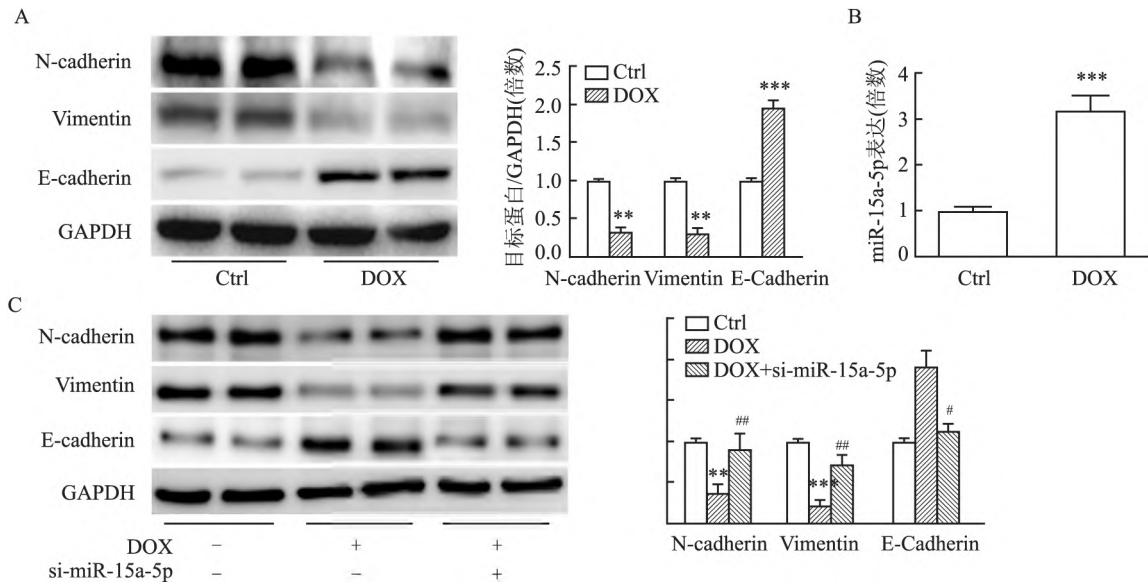


图2 miR-15a-5p 调控 DOX 治疗的肺癌细胞中的 EMT

A: Western blot 分析 DOX 对 A549 细胞 N-钙粘蛋白、波形蛋白和 E-钙粘蛋白表达影响; B: RT-qPCR 分析 DOX 对 A549 细胞中 miR-15a-5p 表达影响; C: Western blot 分析 si-miR-15a-5p 对 DOX 刺激的 A549 细胞中 N-钙粘蛋白、波形蛋白和 E-钙粘蛋白表达影响; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 DOX 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

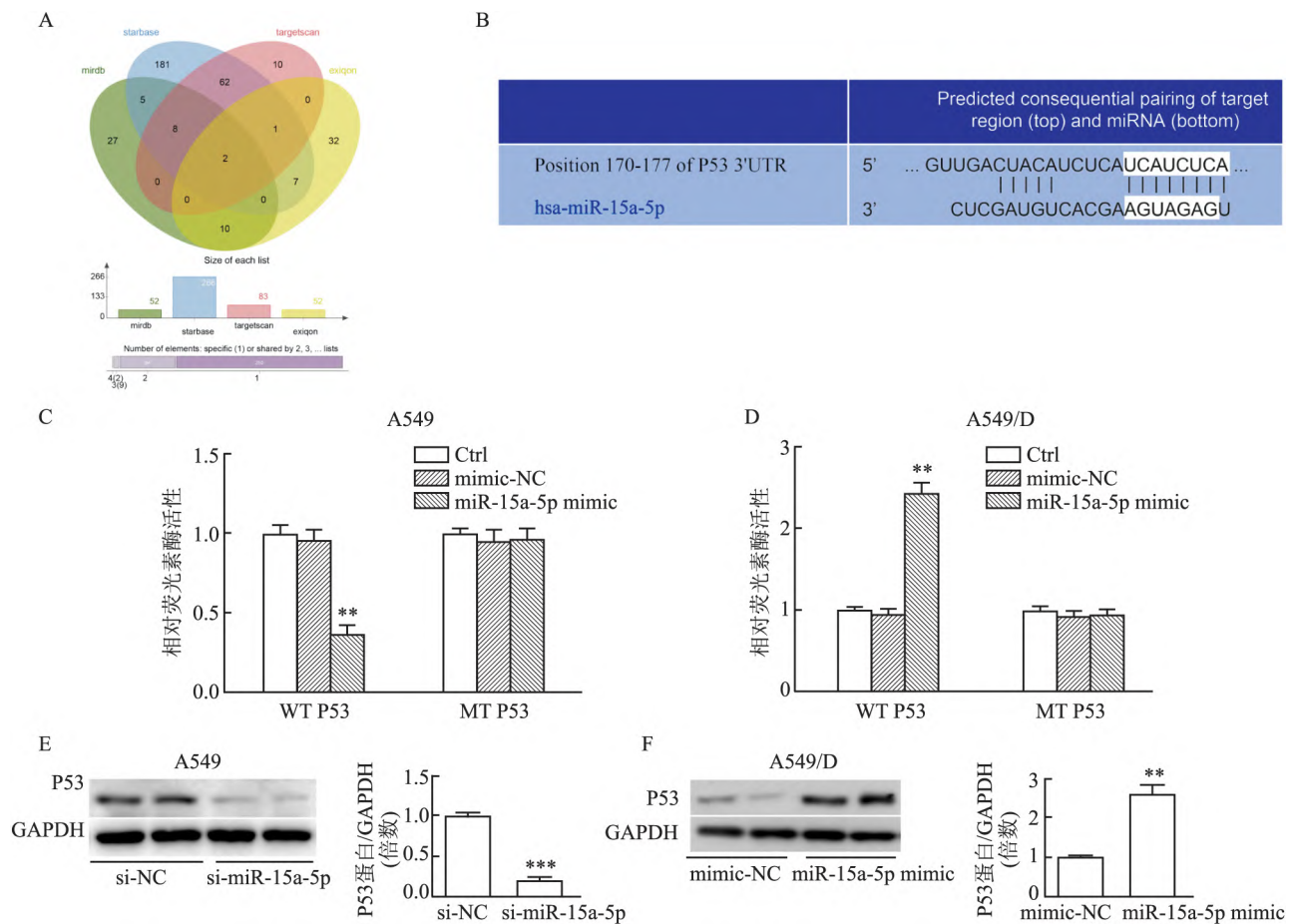


图3 miR-15a-5p 通过结合 P53 的 3' UTR 促进 P53 表达

A: 四个生物信息学预测网站预测靶向 miR-15a-5p 的候选基因的文氏图; B: P53 3' UTR 中与 miR-15a-5p 结合序列图; C: 荧光素酶报告子法测定 A549 细胞的荧光素酶活性; D: 采荧光素酶报告子法测定 A549/D 细胞的荧光素酶活性; E: Western blot 分析 si-miR-15a-5p 对 DOX 刺激的 A549 细胞中 P53 表达; F: Western blot 分析 miR-15a-5p mimic 对 DOX 刺激的 A549/D 细胞中 P53 表达; 与 si-NC 组或 mimic-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

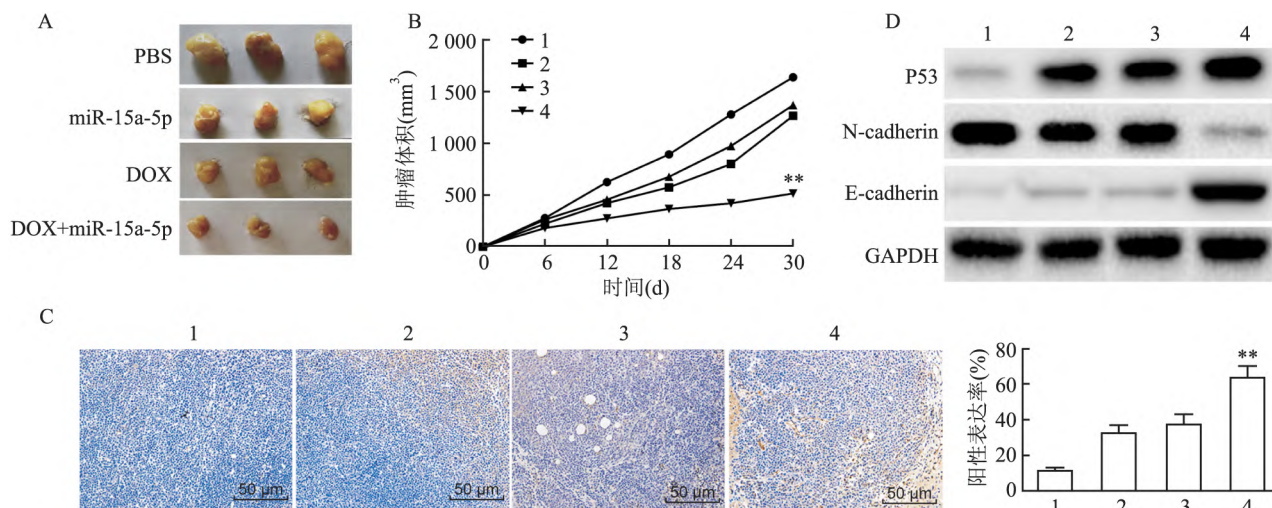


图4 miR-15a-5p 的过度表达促进了 DOX 在体内的抗肿瘤作用 ($n=6$)

A: 每组小鼠肿瘤样本的代表性图像; B: 不同时间点测量肿瘤体积; C: 肿瘤切片中 P53 的免疫组化染色及定量分析; D: Western blot 分析肿瘤标本中 P53、N-cadherin 和 E-cadherin 的表达; 与 PBS 组比较: ** $P < 0.01$; 1: PBS; 2: DOX; 3: miR-15a-5p; 4: DOX + miR-15a-5p

miR-15a-5p 的过度表达通过结合与种子区互补的 3'UTR 基序促进 P53 的表达。这些发现提示 miR-15a-5p 可能作为一个潜在的生物标志物来预测患者对 DOX 化疗的反应。

越来越多的研究表明, EMT 是上皮细胞向间充质细胞转化的生物学过程。EMT 在调节肿瘤发病机制中起着重要作用^[14]。EMT 激活在包括肺癌在内的各种类型肿瘤的进展过程发挥重要作用^[14]。异常 EMT 促使癌细胞具有高度恶性的特性, 包括侵袭、迁移以及远处转移^[14]。此外, 大量研究表明, EMT 有助于肿瘤细胞化疗耐药的发展^[11]。最近的证据表明, miR-200a、miR-200b、miR-429、miR-200c 和 miR-141 等 miRNAs 可以抑制 ZEB1/2 和 β -catenin 来中断 EMT 信号^[12]。相反, miR-221 和 miR-222 靶向 TRPS1, 导致 E-钙粘蛋白表达减少, 从而促进 EMT^[13]。在本研究中, miR-15a-5p 的过表达降低了波形蛋白和 N-钙粘蛋白的表达, 增加了 E-钙粘蛋白的表达, 提示 miR-15a-5p 通过介导 EMT 抑制肺癌细胞的 DOX 抵抗。

生物信息学分析证实 P53 是肺癌细胞中 miR-15a-5p 的一个靶基因。研究结果表明 miR-15a-5p 敲除导致肺癌细胞 P53 减少, 而 miR-15a-5p 过表达导致 P53 增加。肿瘤蛋白 P53 是目前研究最多的抑癌基因之一。P53 通过诱导细胞周期阻滞、DNA 修复或凋亡来抑制肿瘤的形成并保护 DNA 免受损伤^[14]。P53 的抑制被证明与肺癌患者的耐药性和预后有关, 增加 P53 表达可提高肺癌细胞对顺铂治

疗的敏感性^[14]。因此, P53 是调控肺癌细胞化疗耐药的关键分子。最近的研究表明, miR-125b、miR-504、miR-25 和 miR-30d 等 miRNAs 可以调节 P53 的丰度和活性, 并对 P53 产生负性调节^[15]。因此, 推测 P53 可能参与 miR-15a-5p 介导的 DOX 耐药。为此, 研究首先检测了 miR-15a-5p 对 A549 和 A549/D 细胞 P53 表达的影响。结果显示, 在 A549 细胞中阻断 miR-15a-5p 减少 P53 蛋白表达, A549/D 细胞中 miR-15a-5p 过表达增加了 P53 蛋白水平。此外, 通过体内实验证实 P53 是 miR-15a-5p 的一个功能性靶基因, 参与调控肺癌的 DOX 抗性。这些发现支持 miR-15a-5p 在肺癌化疗耐药中调节 P53 通路的主要作用。

参考文献

- 张志峰, 席维岳. 外周血肿瘤标志物早期诊断肺癌临床价值研究 [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(5): 477-9.
- 刘桂红, 刘毅, 朱蓓, 等. 局部晚期非小细胞肺癌同步放化疗联合巩固化疗 Meta 分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(5): 370-4.
- 陈力, 金玉麟, 王琳, 等. miRNA 与肺癌顺铂耐药相关性的研究进展 [J]. 复旦学报(医学版), 2018, 45(2): 245-9.
- Lv L, An X, Li H, et al. Effect of miR-155 knockdown on the reversal of doxorubicin resistance in human lung cancer A549/dox cells [J]. Oncol Lett, 2016, 11(2): 1161-6.
- Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, et al. Epigenetics and miRNAs in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 459.
- Han D, Li L, Ge X, et al. MicroRNA expression integrated analysis and identification of novel biomarkers in small cell lung cancer:

- a meta-analysis [1]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(5): 3339 – 53.
- [7] Wang Z M, Wan X H, Sang G Y, et al. miR-15a-5p suppresses endometrial cancer cell growth via Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting WNT3A [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4810 – 8.
- [8] Ni Y, Yang Y, Ran J, et al. miR-15a-5p inhibits metastasis and lipid metabolism by suppressing histone acetylation in lung cancer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161: 150 – 62.
- [9] Zhang L, Pan L, Xiang B, et al. Potential role of exosome-associated microRNA panels and in vivo environment to predict drug resistance for patients with multiple myeloma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 30876 – 91.
- [10] 杨 欣, 陈 睿, 吴 晨, 等. 过表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-5 对肺腺癌上皮-间充质转化的影响及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(10): 1800 – 2.
- [11] Chaffer C L, San Juan B P, Lim E, et al. EMT, cell plasticity and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 645 – 54.
- [12] Gong Y, Qin Z, Zhou B, et al. MicroRNA-200a Inhibits transforming growth factor β 1-Induced proximal tubular epithelial-mesenchymal transition by targeting β -Catenin [J]. *Nephron*, 2017, 137(3): 237 – 49.
- [13] Liu S, Wang Z, Liu Z, et al. miR-221/222 activate the Wnt/ β -catenin signaling to promote triple-negative breast cancer [J]. *J Mol Cell Biol*, 2018, 10(4): 302 – 15.
- [14] 丁志丹, 方泽民, 王跃斌, 等. p53 调控信号转导与转录激活因子3 信号通路对肺癌细胞增殖凋亡的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(3): 485 – 7.
- [15] Le M T N, Shyh-Chang N, Khaw S L, et al. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-425b occurs through evolving miRNA-target gene pairs [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(9): e1002242.

Study on the relationship between EMT and lung cancer cell adriamycin resistance based on miR-15a-5p/P53 signaling pathway

Wei Dong¹, Xin Yunchao², Liu Bo³, Rong Yu¹, Li Yanming¹, Hao Yanbing¹

(¹Dept of thoracic surgery, ²Dept of otolaryngology head and neck surgery,

³Dept of pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To investigate the role of miR-15a-5p in DOX resistance of lung cancer cells, and to elucidate the relationship between miR-15a-5p and DOX resistance. **Methods** miR-15a-5p inhibitor and miR-15a-5p mimics were used to transfect A549 and A549/DOX resistant cells (A549/D). MTT assay was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, Western blot was used to detect the expression of EMT related protein and P53 protein, and QRT-PCR was used to detect the expression of miR-15a-5p. The potential target genes of miR-15a-5p were analyzed by bioinformatics prediction, dual luciferase reporter. A549/D cells were used to establish the xenograft tumor model in nude mice, and the effect of miR-15a-5p overexpression on DOX in vivo was analyzed. **Results** MTT analysis showed that the knockdown of miR-15a-5p increased the cell viability of A549 cells (IC_{50} value: $8.86 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$), and the overexpression of miR-15a-5p decreased the cell viability of A549/D cells (IC_{50} value: $1.92 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$). Blocking miR-15a-5p in A549 cells reduced apoptosis ($P < 0.001$), and increasing the expression of miR-15a-5p in A549/D cells promoted apoptosis ($P < 0.001$). The role of DOX in regulating the EMT was reversed by the transfection of miR-451a inhibitor through Western blot. Bioinformatics prediction showed that there was a specific binding site between P53 and miR-15a-5p. miR-15a-5p inhibition reduced the expression of P53 protein in A549 cells ($P < 0.001$), and miR-15a-5p overexpression increased the expression of P53 protein in A549/D cells ($P < 0.01$). In vivo experiments showed that combination of agomir-miR-15a-5p and DOX could reduce the tumor volume and the expression level of N-cadherin, and enhance the expression levels of P53 and E-cadherin. **Conclusion** miR-15a-5p overexpression may inhibit EMT by targeting P53 and enhance the sensitivity of lung cancer cells to DOX therapy.

Key words miR-15a-5p; P53; epithelial mesenchymal transition; non-small cell lung cancer; drug resistance