

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.004

· 基础研究 ·

miR-140 靶向抑制 PD-L1 表达增强宫颈癌 HeLa 和 Caski 细胞对奥沙利铂的敏感性

黄翀, 刘智慧, 罗素坤, 蔡晓楠, 宋晓婕 [华中科技大学 同济医学院附属武汉儿童医院(武汉市妇幼保健院)妇科, 湖北 武汉 430016]

[摘要] **目的:** 探究 miR-140 能否通过靶向抑制程序性细胞死亡蛋白-1(programmed death-1, PD-L1)表达增强宫颈癌(cervical cancer, CC)细胞对奥沙利铂的敏感性。**方法:** 采用 qPCR 检测 miR-140 在人正常宫颈细胞、CC 细胞株及其奥沙利铂耐药细胞株中的表达情况;采用 miR-140 模拟物转染细胞, CCK-8 法检测 CC 正常细胞株及其奥沙利铂耐药细胞株的增殖情况、克隆形成实验检测细胞的克隆形成率。通过 Starbase 及 TargetScan 在线分析软件预测 miR-140 与 PD-L1 的靶向结合位点, 并通过双荧光素酶报告基因验证 miR-140 与 PD-L1 的靶向结合关系。采用 Annexin V FITC/PI 双染色法和 Wb 法分别检测过表达 miR-140 或同时过表达 PD-L1, 且在使用奥沙利铂处理后 CC 细胞的凋亡、迁移及凋亡相关蛋白的表达情况。建立裸鼠 CC 移植瘤模型, 检测 miR-140 加强肿瘤对奥沙利铂处理敏感性的效果。**结果:** miR-140 在奥沙利铂耐药性 CC 细胞中表达显著下调($P < 0.01$), 过表达 miR-140 能够明显上调奥沙利铂耐药 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性($P < 0.05$), 抑制 CC 细胞的增殖及克隆形成(均 $P < 0.01$)。miR-140 与 PD-L1 3'-UTR 靶向结合并抑制其表达。过表达 miR-140 显著促进 CC 细胞的迁移及凋亡($P < 0.01$), 过表达 miR-140 的同时过表达 PD-L1 明显减弱了 miR-140 对 CC 细胞迁移的抑制及细胞凋亡的促进作用(均 $P < 0.05$)。小鼠异体移植瘤模型验证了 miR-140 促进肿瘤对奥沙利铂的敏感性。**结论:** miR-140 通过靶向抑制 PD-L1 表达增加 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性, 上调 miR-140 或抑制 PD-L1 的表达再与奥沙利铂联合处理有可能作为奥沙利铂耐药 CC 治疗的新策略。

[关键词] miR-140; PD-L1; 宫颈癌; HeLa 细胞; Caski 细胞; 奥沙利铂

[中图分类号] R730.51; R737 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0159-07

miR-140 inhibits PD-L1 expression to enhance sensitivity of cervical cancer HeLa and Caski cells to oxaliplatin

HUANG Chong, LIU Zhihui, LUO Sukun, CAI Xiaonan, SONG Xiaojie(Department of Gynaecology, Wuhan Children's Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether miR-140 could increase the sensitivity of cervical cancer (CC) to oxaliplatin by down-regulating the expression of programmed death-1 (PD-L1). **Methods:** qPCR was used to analyze miR-140 expression in normal human cervical cells, CC cells and oxaliplatin-resistant CC cells. Cells were transfected with miR-140 mimic, and then, the proliferation of CC cells and oxaliplatin-resistant CC cells was detected by using CCK-8 assay, and the colony formation rate of CC cells was obtained by using colony formation assay. Starbase and TargetScan were used to predict the targeted binding site of miR-140 and PD-L1, and the influence of miR-140 on the expression of PD-L1 was validated by dual luciferase reporter gene assay. Annexin V FITC/PI double staining and Wb assays were used to detect the effect of over-expression of miR-140 or both over-expression of PD-L1 and miR140 on the apoptosis, migration and expression of apoptosis-related proteins in CC cells after treatment with oxaliplatin. Moreover, transplantation tumor of CC cell lines was established in nude mice to assess the effects of miR-140 on enhancing the sensitivity of tumors to oxaliplatin. **Results:** The expression of miR-140 was significantly decreased in oxaliplatin-resistant CC cells ($P < 0.01$). Over-expression of miR-140 could significantly increase the sensitivity of oxaliplatin-resistant CC cells to oxaliplatin ($P < 0.05$), and inhibit the CC cells proliferation and colony formation ($P < 0.01$). miR-140 showed targeted binding to PD-L1 3'-UTR and inhibited its expression. Over-expression of miR-140 significantly promoted CC cell migration and apoptosis ($P < 0.01$). However, co-transfection of PD-L1 counteracts the ef-

[基金项目] 湖北省自然科学基金青年基金资助项目(No. 2016CFB339);武汉市卫生健康委员会科研基金资助项目(No. WX18Q28)。Project supported by Natural Science Foundation of Hubei Province of China (No. 2016CFB339), and the Science and Research Foundation of Wuhan Municipal Health Commission (No. WX18Q28)

[作者简介] 黄翀(1978-),女,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究,E-mail: 3133787729@qq.com

[通信作者] 宋晓婕(SONG Xiaojie, corresponding author),博士,主任医师,主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究,E-mail: songxiaojie333@163.com

fects of miR-140 on cell metastasis and apoptosis (all $P < 0.05$). In addition, xenograft tumor model in mice also verified that miR-140 could promote the sensitivity of tumors to oxaliplatin. **Conclusion:** miR-140 increases the sensitivity of CC to oxaliplatin through inhibition of PD-L1 expression. Therefore, up-regulation of miR-140 or down-regulation of PD-L1 in combination with oxaliplatin may be a novel strategy for the treatment of Oxaliplatin-resistant CC.

[Key words] miR-140; PD-L1; cervical cancer; HeLa cell; Caski cell; oxaliplatin

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2):159-165. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.004]

宫颈癌(cervical cancer, CC)是常见的女性恶性肿瘤^[1],据统计,全球CC发病率和病死率居高不下,2012年宫颈癌患病人数为444 500,而病死数高达230 200^[2]。目前的治疗手段主要为外科手术、放疗、化疗或多种方法联合治疗,尽管在一定程度上取得效果,但是由于肿瘤细胞对辐射的抵抗性增强、对化疗药物的敏感性降低,导致治疗效果不佳和治疗后复发。奥沙利铂(oxaliplatin)是治疗CC的一线化疗药物,通常与其他化疗药物联合使用,然而,由于肿瘤细胞的耐药性,奥沙利铂的反应率降低。奥沙利铂耐药是由多种机制引起的,包括对WBCR22^[3]、核因子I/B^[4]及朊蛋白^[5]等蛋白的过表达和参与药物结合^[6]或影响上皮间质转化^[7]、细胞周期改变^[8]及细胞凋亡^[9]等。然而,导致奥沙利铂耐药发生的分子机制尚不完全清楚,需要再进一步研究。

PD-L1及其受体PD-1是一种免疫检查点蛋白,在抑制T细胞应答中具有一定的作用。PD-1在激活的免疫细胞中表达上调,肿瘤细胞表达PD-L1与CD8⁺T细胞PD-1结合,具有较强的抑制作用。已报道^[10-11],PD-L1的表达与铂类药物的耐药性相关,推测PD-L1的表达水平是否与CC的化疗敏感性也相关。

miRNA的异常表达与癌症化疗耐药相关,包括奥沙利铂耐药^[12-14]。miR-140是一种抗癌基因,对骨肉瘤^[15]、结肠癌^[16]及乳腺癌^[17]化疗敏感性至关重要。然而,miR-140在CC对奥沙利铂的敏感的重要性尚未被探究。本研究旨在探究miR-140能否通过靶向抑制PD-L1表达增强CC细胞对奥沙利铂的敏感性,为奥沙利铂耐药CC的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人宫颈上皮永生化细胞株H8、人宫颈癌细胞株HeLa、Caski、SiHa、C-33、ME-180均购自ATCC公司,pcDNA3.1载体及LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司,双荧光酶报告载体及luciferase assay kit购自Promega公司, Anti-PD-L1, Anti-E-cadherin, Anti-Vimentin, Anti-Bcl-2, Anti-Bax, Anti-GAPDH购自Abcam公司,山羊血清购自碧云天公司,miRNeasy mini kit, miScript Reverse Transcription Kit及miScript SYBR Green PCR Kit购自Qiagen公司,CCK-8

Kit购自Dojindo公司,Annexin V-FITC/PI购自BD公司。6周龄、雌性、体质量18~22 g的BALB/c裸鼠购自云南昆明动物研究所动物实验中心[实验动物合格证号:SYXK(滇)K2013-0013]。

1.2 细胞培养与药物处理人宫颈癌细胞株

人宫颈上皮永生化细胞株H8、人宫颈癌细胞株(HeLa、Caski、SiHa、C-33、ME-180)培养于含10% FBS及1%青霉素/链霉素的RPIM-1640培养基中。使用浓度逐级递增的奥沙利铂处理其中的HeLa及Caski细胞株从而获得HeLa/OXA及Caski/OXA耐药细胞株,奥沙利铂处理前将细胞种于6孔板中,待细胞密度为80%时使用0~80 μmol/L的奥沙利铂处理HeLa细胞,使用0~128 μmol/L的奥沙利铂处理Caski细胞,直至细胞稳定增殖且无明显死亡,整个诱导过程持续约10个月,耐药细胞株能稳定传代,显微镜下观察到与非耐药株有明显形态差别,用于后续实验。

1.3 双荧光素酶报告基因检测miR-140与PD-L1表达调控的关系

miR-140模拟物(miR-140 mimic)及无关序列(scramble)由上海吉玛基因生物科技有限公司设计并合成;野生型及突变型的PD-L1 3'-UTR序列克隆至pmir-GLO双荧光素酶报告基因载体中,将野生型及突变型的PD-L1 3'-UTR双荧光素酶载体与NC、miR-140 mimic或scramble使用Lipofectamine 2000TM脂质体混合,共转染HeLa和Caski细胞,转染8 h后裂解细胞,利用双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.4 qPCR检测miR-140在正常宫颈细胞株H8、CC细胞株及其奥沙利铂耐药细胞株中的表达

使用miRNA小提试剂盒提取细胞miRNA,用Nanodrop 1000检测RNA的浓度及纯度,采用逆转录试剂盒将miRNA进行逆转录获得cDNA,SYBR Green PCR试剂盒进行qPCR反应检测miR-140的表达水平,miR-140引物序列,F:5'-GCCTCAGTG-GTTTTACCCTA-3',R:GTGCAGGGTCCGAGGT,U6引物序列,F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',R:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。由上海生工生物工程公司合成。U6作为内参对照,每个样本设置3个重复,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示miR-140的相对表达

量。

1.5 CCK-8 法检测 miR-140 对 CC 细胞及其奥沙利铂耐药细胞的增殖能力的影响

将对数生长期的细胞以每孔 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中, 并设置 3 个重复, 细胞与 miR-140 mimic 或 scramble 共转染, 并分别用 0、2.5、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理 HeLa 及 HeLa/OXA 细胞 24 h, 使用 0、2、4、6、8、16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理 Caski 及 Caski/OXA 细胞 24 h, 每孔加入 10 μl CCK-8 试剂, 37°C 培养箱孵育 4 h 后, 用酶标仪测定波长在 450 nm 处的光密度(D)值。

1.6 克隆形成实验检测 miR-140 对 CC 细胞的克隆形成能力的影响

将对数生长期的细胞按照每孔 1×10^4 个/100 μl 接种于 24 孔板, miR-140 mimic 或 scramble 转染细胞, 并用 40 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理 HeLa、HeLa/OXA、Caski 及 Caski/OXA 细胞, 48 h 后, 10% 甲醛固定并用 0.1% 的结晶紫室温染色 30 min, 将染色液移弃, 双蒸水清洗, 将板倒扣在吸水纸上晾干, 在荧光显微镜下观察细胞在 5 个区域的集落, 结果以每个视野内细胞的平均数量表示。

1.7 流式术检测 miR-140 对 CC 细胞及其奥沙利铂耐药细胞的凋亡的影响

将细胞与 miR-140 mimic 或 scramble 共转染, 并用 40 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理 HeLa、HeLa/OXA、Caski 及 Caski/OXA 细胞, 48 h 后, 使用无 EDTA 胰酶消化细胞, 使用 PBS 洗涤, $800 \times g$ 离心 5 min, 使用 500 μl 结合缓冲液重悬, 加入 5 μl Annexin V-FITC 染色, 并加入 5 μl PI, 室温下避光染色 10 min, 使用流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。

1.8 Wb 法检测 miR-140 或 PD-L1 和奥沙利铂对 CC 细胞迁移及凋亡相关蛋白表达的影响

miR-140 mimic 或 scramble 以及 PD-L1 过表达载体转染 CC 细胞, 并用 40 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理 HeLa、HeLa/OXA、Caski 及 Caski/OXA 细胞, 48 h 后收集细胞, 使用 RIPA 裂解细胞, 并用 BCA 测定蛋白浓度及纯度, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 半干转印法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入按比例稀释的一抗 (PD-L1, 1:2 000; E-cadherin, 1:1 000; Vimentin, 1:2 000; Bcl-2, 1:2 000; Bax, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000) 4°C 过夜孵育, 次日移弃一抗, 加入 TBST 清洗 3 次, 加二抗室温孵育 1 h 后, 加入 ECL 化学发光液显色, 成像系统进行拍照, 并使用 Image J 软件分析靶带的灰度值。

1.9 小鼠异体移植瘤模型构建

实验分为 4 组, 每组 6 只, 空白对照组以转染空

载体的 HeLa/OXA 细胞注射于裸鼠左侧前肢靠近心脏位置, 并于 21 d 后通过尾静脉注射等体积的生理盐水 200 μl ; 阴性对照组以转染空载体的 HeLa/OXA 细胞注射于裸鼠左侧前肢靠近心脏位置, 并于 21 d 后通过尾静脉注射等体积的奥沙利铂 200 μl (40 $\mu\text{mol/L}$); 实验组 1 转染 miR-140 的 HeLa/OXA 细胞注射于相同部位, 并于 21 d 后通过尾静脉注射等体积生理盐水 200 μl ; 实验组 2 以转染 miR-140 的 HeLa/OXA 细胞注射于相同部位, 并于 21 d 后通过尾静脉注射等体积奥沙利铂 200 μl (40 $\mu\text{mol/L}$)。每周用游标卡尺测量小鼠肿瘤大小, 肿瘤体积计算公式: 体积 = $1/2$ 最长直径 \times 最短直径², 8 周后处死小鼠, 称量肿瘤质量。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 所有数据均为重复 3 次实验所得, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素 ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

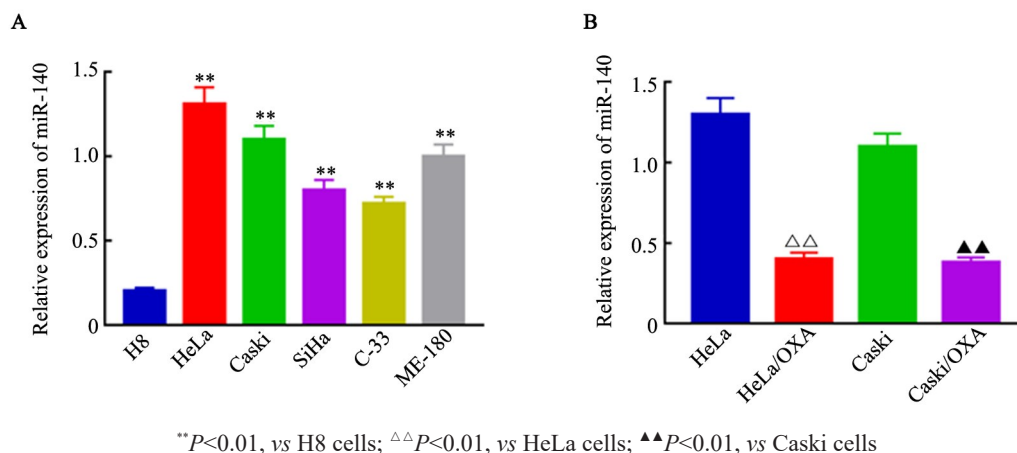
2.1 过表达 miR-140 与 CC 细胞对奥沙利铂敏感性有关

qPCR 法检测结果 (图 1A) 显示, miR-140 在 5 种 CC 细胞中表达均显著上调 (均 $P < 0.01$), 其中以 HeLa 和 CaSki 细胞表达水平最高, 故以此 2 种细胞进行后续实验。此外, 对 CC 细胞株 HeLa、HeLa/OXA、Caski 及 Caski/OXA 进行检测, 结果 (图 1B) 显示, 2 种耐药细胞中 miR-140 表达显著低于敏感细胞 ($t = 73.79, P < 0.01$; $t = 61.52, P < 0.01$), 结果表明, miR-140 的表达与 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性有关。

2.2 miR-140 对 CC 细胞活力的影响

CCK-8 法检测结果 (图 2A、B) 显示, HeLa、HeLa/OXA 和 Caski、Caski/OXA 细胞 IC_{50} 值分别为 (14.24 \pm 0.12)、(40.29 \pm 0.55) 和 (20.48 \pm 1.10)、(38.59 \pm 1.62) $\mu\text{mol/L}$ 。同时发现, 转染 miR-140 mimic 的 HeLa 或 HeLa/OXA 细胞 miR-140 表达显著上调 ($t = -79.79, P < 0.01$; $t = -193.14, P < 0.01$, 图 2C), 同样地, 转染 miR-140 mimic 的 Caski 或 Caski/OXA 细胞 miR-140 表达显著上调 ($t = -131.91, P < 0.01$; $t = -173.07, P < 0.01$, 图 2D), 表明 miR-140 mimic 转染效率高。转染 miR-140 mimic 或 scramble 后, CC 细胞分别用 0、2.5、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理, CCK-8 检测结果 (图 2E、F) 显示, miR-140 mimic 转染后显著抑制了 CC 细胞的增殖, 显著提高 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性 (均 $P < 0.05$); 克隆形成实验结果 (图 2G、H) 显示, miR-140 mimic 转染后, CC 细胞的克隆形成能力受到显著抑制 (均 $P < 0.01$), 表明 miR-140 能够增加

CC细胞对奥沙利铂的敏感性。



A,B: Statistical histograms of mRNA

图1 miR-140在人正常宫颈细胞及宫颈癌细胞中的表达水平

Fig.1 Expression level of miR-140 in normal human cervical cells and human cervical carcinoma cell line

2.3 miR-140通过抑制PD-L1的表达显著增加CC细胞对奥沙利铂的敏感性

使用 Starbase 及 TargetScan 在线分析软件预测 miR-140 的下游靶基因(图 3A),进一步采用双荧光素酶报告基因检测 miR-140 与 PD-L1 的靶向结合关系,结果(图 3A)显示,miR-140 mimic 及 PD-L1 3'-UTR 野生型及突变型载体共转染后,miR-140 mimic 明显抑制了转染 PD-L1 3'-UTR 野生型载体的细胞荧光素酶活性(HeLa: $t=32.02$, $P<0.01$; Caski: $t=40.01$, $P<0.01$),表明 miR-140 直接靶向 PD-L1 发挥作用。采用 Annexin V FITC/PI 双染方法进一步检测 HeLa/OXA 细胞的凋亡情况,结果(图 3B)显示,过表达 miR-140 明显增加了 HeLa/OXA 细胞的凋亡率;过表达 miR-140 同时使用奥沙利铂处理,HeLa/OXA 细胞的凋亡率明显高于单独使用奥沙利铂处理或单独过表达 miR-140 组;而在过表达 miR-140 同时使用奥沙利铂处理 HeLa/OXA 细胞中同时过表达 PD-L1 则在一定程度上抑制了细胞凋亡($P<0.01$)。通过 Wb 检测细胞迁移相关蛋白(E-cadherin 及 Vimentin)及凋亡相关蛋白(Bcl-2 及 Bax),结果(图 3C)显示,过表达 miR-140 或同时加入奥沙利铂处理后,Vimentin 及 Bcl-2 的表达明显受到抑制,E-cadherin 及 Bax 的表达则相反;过表达 PD-L1 则上调了 Vimentin 及 Bcl-2 的表达,E-cadherin 及 Bax 的表达则相反;同时过表达 miR-140 及 PD-L1 时,减弱 miR-140 对 Vimentin 及 Bcl-2 的抑制作用和促进 E-cadherin 及 Bax 作用($P<0.01$),结果表明,miR-140 能够促进 HeLa/OXA 细胞的凋亡,增加细胞对奥沙利铂的敏感性,加入 PD-L1 可抑制此作用,说明 miR-140 通过调控 PD-L1 的表达介导 HeLa/OXA 细胞对奥沙利铂的敏感性。

2.4 裸鼠移植瘤模型验证 miR-140 调控 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性

通过构建裸鼠移植瘤模型验证 miR-140 调控 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性,结果(图 4A)显示,过表达 miR-140 能够抑制小鼠肿瘤的生长,而过表达 miR-140 同时加入奥沙利铂处理后,小鼠的肿瘤生长受到显著抑制($P<0.01$)。qPCR 检测结果(图 4B)显示,miR-140+OXA 组裸鼠肿瘤组织中 miR-140 的表达水平显著高于其他组($P<0.01$),miR-140+OXA 组裸鼠肿瘤生长对奥沙利铂最敏感。结果表明,miR-140 能够调控 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性。

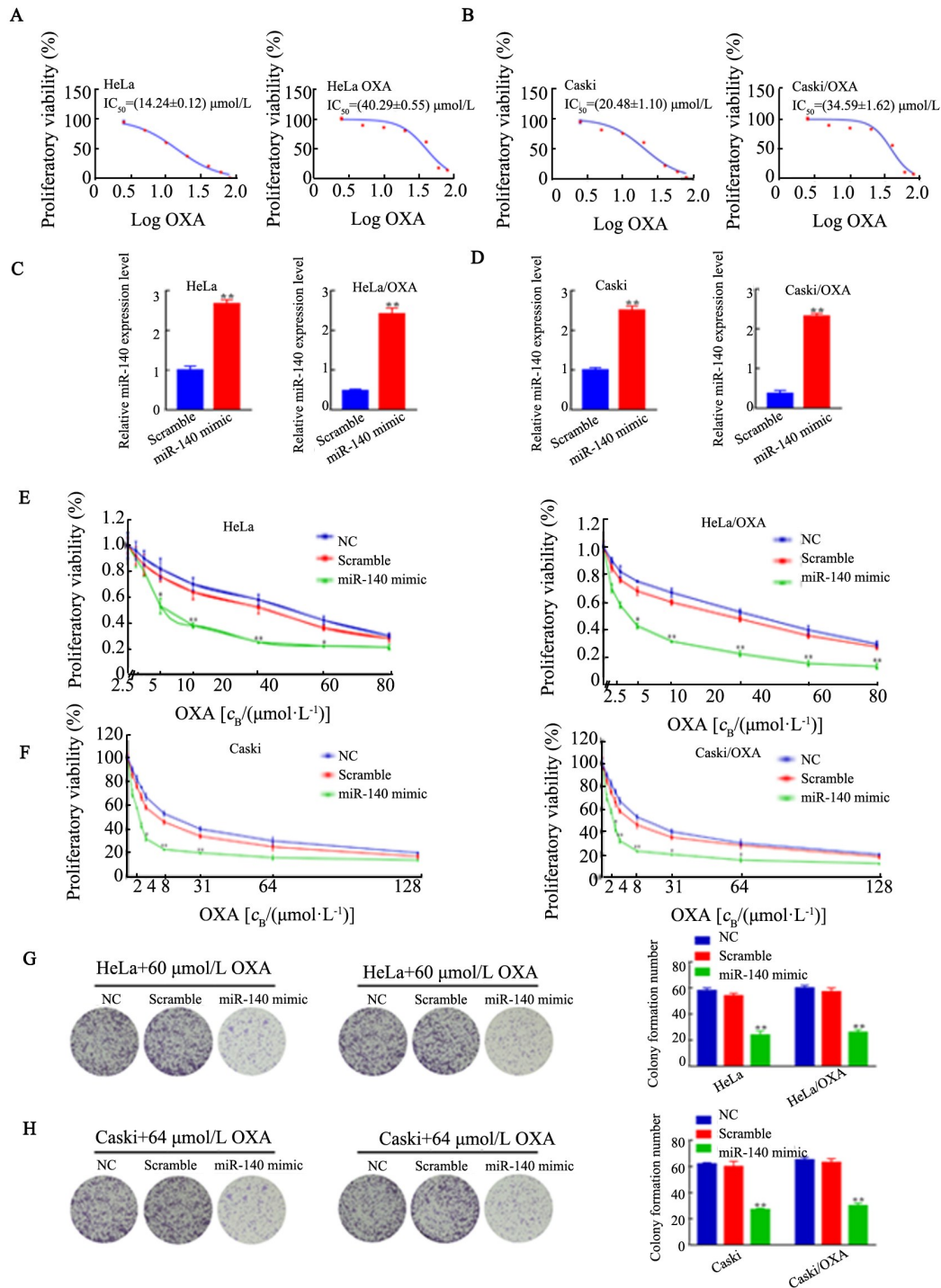
3 讨论

化疗耐药是肿瘤治疗失败的主要原因。尽管大量的研究数据^[12-14]表明,miRNA 通过调控与化疗敏感性及耐药性相关的基因影响肿瘤细胞对化疗的敏感性,但仍有大量的与化疗敏感性相关的 miRNA 是未知的,需要对化疗耐药相关的 miRNA 及其作用的分子机制做更多的研究。在本研究中,通过对正常的人宫颈细胞及 CC 细胞株中 miR-140 的表达水平进行检测发现,miR-140 在 CC 细胞株中表达显著上调,进一步对 CC 奥沙利铂耐药细胞中 miR-140 的表达水平进行检测,结果显示,miR-140 在耐药细胞中的表达水平显著低于非耐药的 CC 细胞,结果表明,miR-140 与 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性密切相关。

据报道^[18-22],miR-140 在多种实体肿瘤中通过抑制肿瘤的发生发展进程发挥抗肿瘤的作用;在肺癌中 miR-140 通过抑制肺癌细胞的迁移及侵袭发挥作用;在胃癌中通过靶向抑制 YES1 基因的表达抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭;miR-140 通过调控 Smad2 的表达及自

噬抑制结直肠癌干细胞的存活及侵袭能力,miR-140 的低表达不仅能够促进基底样乳腺癌早期癌症干细胞的形成,且可通过靶向抑制 Wnt1 表达增加多柔比星对乳腺癌干细胞的疗效^[23]。miR-140 在多种肿瘤的化疗敏感性中发挥作用^[16-19],然而 miR-140 对 CC 细胞奥沙利铂

敏感性的调控机制尚不清楚。本研究已证明 miR-140 在奥沙利铂耐药的 CC 细胞中低表达,过表达 miR-140 能够显著提高奥沙利铂耐药 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性,由此可知,miR-140 的表达水平与 CC 细胞的耐药性呈负相关。

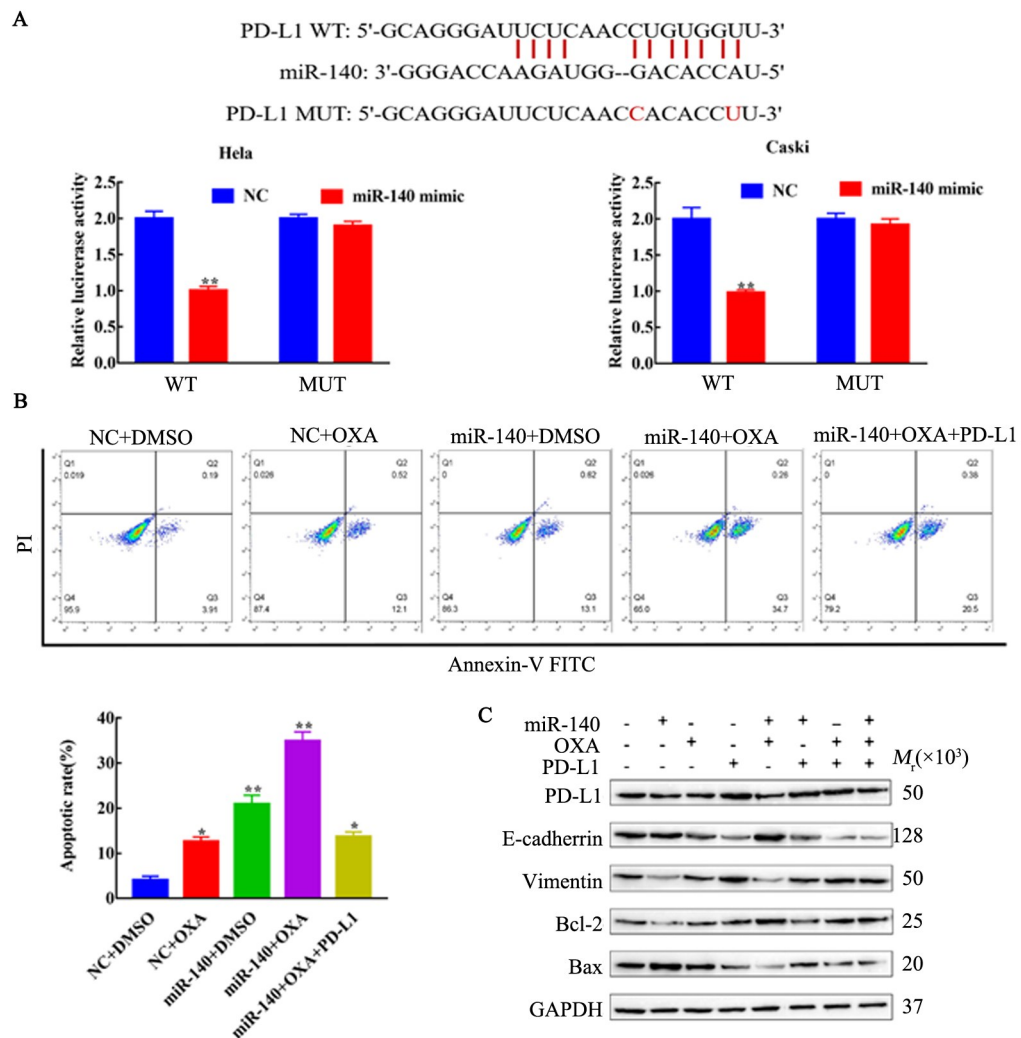


*P < 0.05, **P < 0.01, vs scramble group or NC group

A, B: Statistical curve of cell viability; C, D: Statistical histograms of mRNA; E, F: Statistical curve of cell viability; G, H: Images of colony formation and statistical histograms of colony formation count (×100)

图2 miR-140 对 CC 细胞活力的影响

Fig.2 Effect of miR-140 on the viability of CC cells



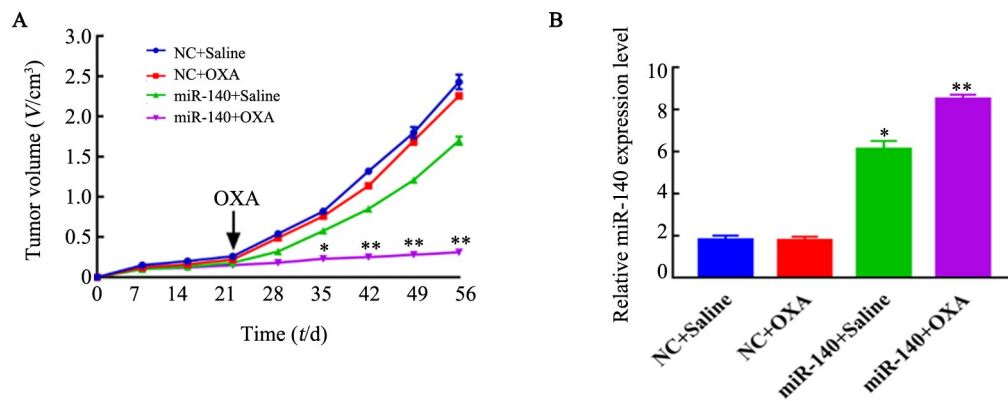
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group or NC+DMSO group

A: Schematic diagram of miR-140 binding with PD-L1 and statistical histograms of relative luciferase activity;

B: Images of apoptosis and statistical histograms of apoptosis rate; C: Bands of proteins in Wb image

图3 miR-140通过抑制PD-L1的表达增加宫颈癌细胞对奥沙利铂的敏感性

Fig.3 miR-140 increased the sensitivity of cervical cancer cells to oxaliplatin by inhibiting the expression of PD-L1



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC + Saline or NC + OXA group

A: Statistical curve of tumor volume; B: statistical histograms of mRNA.

图4 裸鼠移植瘤模型实验验证miR-140调控CC移植瘤对奥沙利铂的敏感性

Fig.4 Nude mice xenograft model experiment validated the regulation effect of miR-140 on sensitivity of CC transplant tumor to oxaliplatin

大量研究报告^[10-11]显示, PD-L1 与铂类药物的耐药性相关, PD-L1 作为 miR-140 的直接靶基因, 参与 CC 细胞对奥沙利铂的耐药性调控, 本研究证实, miR-140 显著增加 CC 细胞的凋亡, 而同时过表达 PD-L1 后 miR-140 的促凋亡作用显著受到抑制; 通过 WB 检测凋亡相关蛋白的表达结果也显示过表达 PD-L1 后能够显著的抑制 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性, 且能够恢复 miR-140 对 CC 细胞对奥沙利铂的敏感性的调控作用。

综上, miR-140 在奥沙利铂耐药性 CC 细胞中表达下调, miR-140 通过抑制 PD-L1 的表达负调控 CC 细胞对奥沙利铂的耐药性, 并通过 miR-140 抑制 PD-L1 表达调控 CC 细胞的凋亡, 上调 miR-140 或抑制 PD-L1 的表达与奥沙利铂联合, 有可能成为奥沙利铂耐药的 CC 治疗的新策略。

[参考文献]

- [1] PIMPLE S, MISHRA G, and SHASTRI S. Global strategies for cervical cancer prevention[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(1): 4-10. DOI: 10.1097/gco.0000000000000241.
- [2] MUKAMA T, NDEJJO R, MUSABYIMANA A, et al. Women's knowledge and attitudes towards cervical cancer prevention: a cross sectional study in Eastern Uganda[J]. *BMC Womens Health*, 2017, 17(1): 9-17. DOI: 10.1186/s12905-017-0365-3.
- [3] ZHAO H, SU W, KANG Q, et al. Natural killer cells inhibit oxaliplatin-resistant colorectal cancer by repressing WBCR22 via upregulating microRNA-146b-5p[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(5): 824-834. eCollection 2018[2018-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992516/>.
- [4] KASHIWAGI E, IZUMI H, YASUNIWA Y, et al. Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2): 382-386. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01784.x.
- [5] LEE J, YOON Y, HAN Y, et al. Melatonin promotes apoptosis of oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells through inhibition of cellular prion protein[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4): 1993-2000. DOI: 10.21873/anticancer.12437.
- [6] LEE J, AHN J, CHOI M, et al. Gemcitabine-oxaliplatin plus prednisolone is active in patients with castration-resistant prostate cancer for whom docetaxel-based chemotherapy failed[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(10): 2472-2478. DOI: 10.1038/bjc.2014.204.
- [7] WEN Q, CHEN Z, CHEN Z, et al. EphA2 affects the sensitivity of oxaliplatin by inducing EMT in oxaliplatin-resistant gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47998-48011. DOI: 10.18632/oncotarget.18208.
- [8] MONTOPOLI M, RAGAZZI E, FROLDI G, et al. Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by curcumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells[J]. *Cell Prolif*, 2009, 42(2): 195-206. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2009.00585.x.
- [9] JENG L, KUMAR VELMURUGAN B, CHEN M, et al. Fisetin mediated apoptotic cell death in parental and Oxaliplatin/irinotecan resistant colorectal cancer cells in vitro and in vivo[J]. *J. Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7134-7142. DOI: 10.1002/jcp.26532.
- [10] PUJADE-LAURAIN E, FUJIWARA K, DYCHTER S, et al. Avelumab (anti-PD-L1) in platinum-resistant/refractory ovarian cancer: JAVELIN Ovarian 200 Phase III study design[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(21): 2103-2113. DOI: 10.2217/fon-2018-0070.
- [11] WANGPAICHITR M, KANDEMIR H, LI Y, et al. Relationship of metabolic alterations and PD-L1 expression in cisplatin resistant lung cancer[J]. *Cell Dev Biol*, 2017, 6(2): 1-12. DOI: 10.4172/2168-9296.1000183.
- [12] FANKHAUSER C, SCHÜFFLER P, GILLESSEN S, et al. Comprehensive immunohistochemical analysis of PD-L1 shows scarce expression in castration-resistant prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(12): 10284-10293. DOI: 10.18632/oncotarget.22888.
- [13] JIN Y, CHEN Q, XU K, et al. Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemo-resistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1/2): 161-170. DOI: 10.1007/s11010-016-2816-9.
- [14] TAN S, SHI H, BA M, et al. miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 1030-1038. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2492.
- [15] TANAKA S, HOSOKAWA M, UEDA K, et al. Effects of decitabine on invasion and exosomal expression of miR-200c and miR-141 in oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(9): 1272-1279. DOI: 10.1248/bpb.b15-00129.
- [16] MENG Y, GAO R, MA J, et al. MicroRNA-140-5p regulates osteosarcoma chemoresistance by targeting HMGN5 and autophagy[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 416-429. DOI: 10.1038/s41598-017-00405-3.
- [17] SONG B, WANG Y, XI Y, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(46): 4065-4074. DOI: 10.1038/onc.2009.274.
- [18] NANDY S, SUBRAMANI R, RAJAMANICKAM V, et al. microRNA alterations in ALDH positive mammary epithelial cells: a crucial contributing factor towards breast cancer risk reduction in case of early pregnancy[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 644-657[2018-08-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4167510>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-644.
- [19] FLAMINI V, JIANG W, and CUI Y. Therapeutic role of miR-140-5p for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4319-4327. DOI: 10.21873/anticancer.11825.
- [20] FANG Z, YIN S, SUN R, et al. miR-140-5p suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer by regulating YES1 [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 139-150. DOI: 10.1186/s12943-017-0708-6.
- [21] ZHAI H, FESLER A, BA Y, et al. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19735-19746. DOI: 10.18632/oncotarget.3771.
- [22] LI Q, YAO Y, EADES G, et al. Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(20): 2589-2600. DOI: 10.1038/onc.2013.226.
- [23] WU D, ZHANG J, LU Y, et al. miR-140-5p inhibits the proliferation and enhances the efficacy of doxorubicin to breast cancer stem cells by targeting Wnt1[J/OL]. *Cancer Gene Ther*, 2018[Epub ahead of print] [2018-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=30032164>. DOI: 10.1038/s41417-018-0035-0.

[收稿日期] 2018-09-10

[修回日期] 2019-01-12

[本文编辑] 阮芳铭