

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.005

· 基础研究 ·

miR-125a-5p 通过靶向 APAF1 增强非小细胞肺癌细胞吉非替尼耐药性

李彦明^a, 郝雁冰^a, 杨继雷^b, 李传贵^c, 陈万生^a, 孙忠哲^d, 容宇^a(河北北方学院附属第一医院 a. 胸外科; b. 老年科; c. CT室; d. 病理科, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-125a-5p 在诱导非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞吉非替尼(gefitinib, Gef)耐药中的作用及其机制。**方法:** 选用人 NSCLC 耐药细胞株 A549/GR 和 NSCLC 细胞株 A549, 将 miR-125a-5p mimic、miR-125a-5p inhibitor、pcDNA3.1-APAF1、空载体 pcDNA3.1 转染至 A549/GR 细胞。用 qPCR 检测细胞中 miR-125a-5p 的表达水平, 用 MTT 法、Transwell 小室法和流式细胞术检测 Gef 对细胞增殖、迁移和凋亡的影响。用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-125a-5p 与细胞凋亡蛋白酶活化因子 1(apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1) 的靶向关系, 用 Western blotting 检测 A549/GR 细胞中 APAF1 蛋白水平, 用比色法测定细胞中 caspase-3 及 caspase-9 表达水平。**结果:** A549/GR 细胞中 miR-125a-5p 表达水平显著高于 A549 细胞($P<0.01$)。敲降 miR-125a-5p 显著增强 Gef 对 A549/GR 细胞增殖、迁移的抑制作用(均 $P<0.05$), 并促进细胞凋亡($P<0.01$)。双荧光素酶报告基因实验证实 miR-125a-5p 靶向 APAF1, 并负调控其表达。进一步实验显示, miR-125a-5p 通过靶向下调 APAF1 缓解 Gef 对 A549/G 细胞增殖、迁移的抑制作用及凋亡的促进作用(均 $P<0.05$), 减弱 Gef 引起的凋亡相关蛋白 caspase-3 及 caspase-9 表达的上调(均 $P<0.05$)。**结论:** miR-125a-5p 促进 NSCLC 细胞 Gef 耐药, 其机制是通过靶向 APAF1 而促进细胞的增殖、迁移并抑制凋亡。

[关键词] 吉非替尼; 非小细胞肺癌; A549/GR 细胞; 获得性耐药; miR-125a-5p; 蛋白酶活化因子 1; 增殖; 迁移; 凋亡

[中图分类号] R730.54; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0622-07

miR-125a-5p promotes the resistance to gefitinib in non-small cell lung carcinoma cells by targeting APAF1

LI Yanming^a, HAO Yanbing^a, YANG Jilei^b, LI Chuangui^c, CHEN Wansheng^a, SUN Zhongzhe^d, RONG Yu^a (a. Thoracic Surgery; b. Geriatrics; c. CT Scan Room; d. Pathology Department, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of miR-125a-5p in inducing the gefitinib (Gef)-resistance of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells and its possible mechanism. **Methods:** Human NSCLC drug-resistant cell line A549/GR and NSCLC cell line A549 were chosen for this study. miR-125a-5p mimic, miR-125a-5p inhibitor, pcDNA3.1-APAF1 and empty vector pcDNA3.1 were transfected into A549/GR cells. The expression level of miR-125a-5p in cell lines was detected by qPCR. MTT, Transwell and Flow cytometry were used to detect the effects of Gef on proliferation, migration and apoptosis of cell lines, respectively. The targeting relationship between miR-125a-5p and APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1) was verified by Dual-luciferase reporter gene system. In addition, the expression of APAF1 protein in A549/GR cells was detected by Western blotting. The expression levels of caspase-3 and caspase-9 were assessed by colorimetry. **Results:** Expression level of miR-125a-5p was upregulated significantly in Gef-resistant A549/GR cells ($P<0.01$). And the influences of Gef on A549/GR cells were enhanced by knockdown of miR-125a-5p, including inhibiting cell proliferation and migration (all $P<0.05$) and inducing apoptosis ($P<0.01$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-125a-5p targeted APAF1 and negatively regulated its expression. Furthermore, by targetedly downregulating APAF1, miR-125a-5p alleviated the inhibition of proliferation and migration (all $P<0.05$) and promotion of apoptosis ($P<0.05$) of A549/GR cells caused by Gef, and attenuated Gef-induced upregulation of apoptosis-related proteins caspase-3 and caspase-9 (all $P<0.05$). **Conclusion:** miR-125a-5p promotes Gef-resistance of A549/GR cells, and the underlying mechanisms are promotion of proliferation, migration and inhibition of apoptosis of non-small cell lung cancer cells by targeting APAF1.

[Key words] gefitinib (Gef); non-small cell lung cancer (NSCLC); A549/GR cell; acquired drug-resistance; miR-125a-5p; apoptotic peptidase activating factor 1(APAF1); proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 622-628. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.005]

[作者简介] 李彦明(1981-),男,学士,主治医师,主要从事肺癌、食管癌及胸部创伤的治疗研究, E-mail:aba58551@163.com

[通信作者] 郝雁冰(HAO Yanbing, corresponding author),学士,副主任医师,主要从事胸部肿瘤和胸部创伤的研究, E-mail:1052550187@qq.com

肺癌为病死率最高的恶性肿瘤,中国是肺癌高发国家,其发病率及病死率呈逐年上升趋势,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占比超过85%^[1]。吉非替尼(gefitinib, Gef)属于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,广泛用于NSCLC的靶向治疗。虽然Gef治疗初期疗效显著,但在用药6~12个月后多出现继发性耐药^[2-3],导致治疗效果不理想,是NSCLC患者预后不良的重要因素。微小RNA(microRNA, miRNA)作为基因表达的转录调控因子,在肺癌的发生^[4]和多药耐受^[5]中起关键作用。例如,miR-124a通过靶向USP14增强NSCLC细胞对Gef的敏感性^[6]; miR-125a-5p通过促进NSCLC细胞的上皮间质转化促进其厄洛替尼耐药^[7]。细胞凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1)是细胞色素C依赖性凋亡信号通路中的核心促凋亡因子之一,在多种肿瘤中表达显著下调,提示其为一抑癌基因。生物信息学分析结果表明,APAF1是miR-125a-5p的潜在靶标,但目前关于miR-125a-5p通过靶向APAF1途径,对于NSCLC细胞Gef耐药性的影响报道甚少。本研究通过观察miR-125a-5p在NSCLC细胞Gef耐药中的作用,初步确定其作用靶标,阐明其分子机制,为克服NSCLC治疗中Gef耐药性提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人NSCLC吉非替尼耐药细胞株A549/GR(货号:XB-4151)及Gef敏感NSCLC细胞株A549(货号:XB-0298)购于上海奥陆生物科技有限公司。

10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素和RPMI 1640培养液购自HyClone公司,Gef购自AstraZeneca公司,逆转录试剂盒购自TaKaRa公司,Lipofectamine™ 2000购自Gibco公司,TRIzol和胰蛋白酶购自美国Invitrogen公司,双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自Applied Biosystems公司,Platinum SYBR SuperMix试剂购自Promega公司,BCA蛋白提取试剂盒和SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒均购自Bio-Rad公司,RIPA裂解液购自Beyotime公司,Annexin-V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自eBioscience公司,Transwell小室购自Corning公司,APAF1、β-actin蛋白一抗及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的APAF1二抗、ECL显色剂、活化caspase-9比色法检测试剂盒和活化caspase-3比色法检测试剂盒购自Abcam公司,miR-125a-5p mimic、miR-125a-5p inhibitor、pcDNA3.1-

APAF1均由上海吉玛公司提供。

1.2 细胞培养、转染及分组

A549细胞及A549/GR细胞均采用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养液在37 °C、5%CO₂培养箱中常规培养。用胰酶消化对数生长期A549/GR细胞,RPMI 1640培养基调整密度为1×10⁵个/ml。将细胞接种至6孔板(2 ml细胞悬液/孔),置于37 °C、5%CO₂培养箱培养24 h。分为以下4组:空载体组、miR-125a-5p inhibitor组、pcDNA3.1-APAF1组、pcDNA3.1-APAF1+miR-125a-5p mimic组,按Lipofectamine™ 2000转染说明将miR-125a-5p mimic、miR-125a-5p inhibitor、pcDNA3.1-APAF1、空载体pcDNA3.1转染至A549/GR细胞中。

1.3 qPCR检测A549/GR细胞中miR-125a-5p的表达水平

收集待测转染前后细胞,应用TRIzol一步法试剂盒提取细胞总RNA,取1 μg总RNA逆转录制备cDNA。取2 μl逆转录产物进行PCR检测。PCR引物序列:miR-125a-5p F为5'-CGGGCTCACAAAGT-CAGGCTC-3', R为5'-CAGCCACAAAAGAGCACAAT-3';U6 F为5'-CAGGGGCCATGCTAAATCTTC-3', R为5'-CTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3'。PCR反应体系为20 μl,其中含2 μl逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、6 μl dH₂O、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μl。PCR热循环参数:95 °C 5 min,94 °C变性30 s,60 °C退火30 s;共45个循环。以U6为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-125a-5p的相对表达水平。

1.4 MTT法检测A549/GR细胞的增殖能力

调整各组细胞密度至1×10⁵个/ml接种于96孔板(100 μl细胞悬浮液/孔)中,每组细胞设置3个复孔,于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。待细胞贴壁后,加入不同浓度的Gef(以RPMI 1640培养液溶解至浓度为10⁻³、10⁻²、10⁻¹、1、2、4、6、8 μmol/ml,对照组加等量培养液),分别于贴壁0、24、48、72、96 h取样,加入20 μl MTT(5 mg/ml),培养箱内孵育4 h。离心,弃去上清液,每孔加入200 μl培养液,摇床上充分摇匀至结晶完全溶解。最后,在酶标仪上测量波长在530 nm处的光密度(D)值,计算增殖率=100%×(D_{Nh}-D_{0h})/D_{0h}。

1.5 Transwell小室法检测A549/GR细胞的迁移能力

取对数生长期待测细胞,胰蛋白酶消化,无血清培养基悬浮并调整细胞密度至1×10⁵个/ml,于Transwell上室每孔接种200 μl细胞液,下室加入600 μl含10%血清的RPMI 1640培养液,每组设3个复孔。37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h后,取出小

室,用 2.5% 戊二醛固定 15 min,并以 0.5% Triton X-100 处理 3 min,苏木精中染色 15 min。将培养小室倒置,显微镜下($\times 40$)观察、拍照,统计迁移细胞数。

1.6 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 A549/GR 细胞的凋亡水平

取对数生长期待测细胞接种于 6 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,再与 500 μ l 预冷的结合缓冲液及 5 μ l 膜联蛋白 V-FITC 于暗房室温下孵育 15 min。上机检测 5 min 前加入 2.5 μ l PI 进行染色,最后经流式细胞仪检测并分析细胞凋亡水平。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-125a-5p 的靶基因

全 cDNA 扩增 APAF1 的 3'UTR(miR-125a-5p 结合靶点),克隆至 pMIR-Report 荧光素酶载体中得到野生型质粒 APAF1 WT-luc。再将 APAF1 上结合序列突变,克隆至相同荧光素酶载体中得到突变型质粒 APAF1 MUT-luc。将 APAF1 WT-luc、APAF1 MUT-luc、miR-125a-5p mimic 以及相应阴性对照转染至细胞,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 48 h 后,收集细胞使用裂解缓冲液裂解细胞,按照荧光素酶报告基因系统说明书指导对细胞样品进行检测,实验结果所得数据为海肾荧光素酶与萤火虫荧光素酶的比值。

1.8 Western blotting (WB) 检测 A549/GR 细胞 APAF1 的表达水平

收集转染 48 h 后的 A549/GR 细胞,经 RIPA 裂解后 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。每组取等量蛋白上样,进行 SDS-PAGE、转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h。切取所需蛋白条带,加入 APAF1 一抗(1:1 000)于 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗多余一抗,加入 HRP 标记的 APAF1 二抗(1:2 000),室温下摇床孵育 1 h,

回收二抗。加入 TBST 洗涤,使用 ECL 进行显色。使用 Bio-Rad 成像系统采集图像,以 β -actin 为内参,进行定量分析。

1.9 比色法测定 A549/GR 细胞中 caspase-3 和 caspase-9 的表达水平

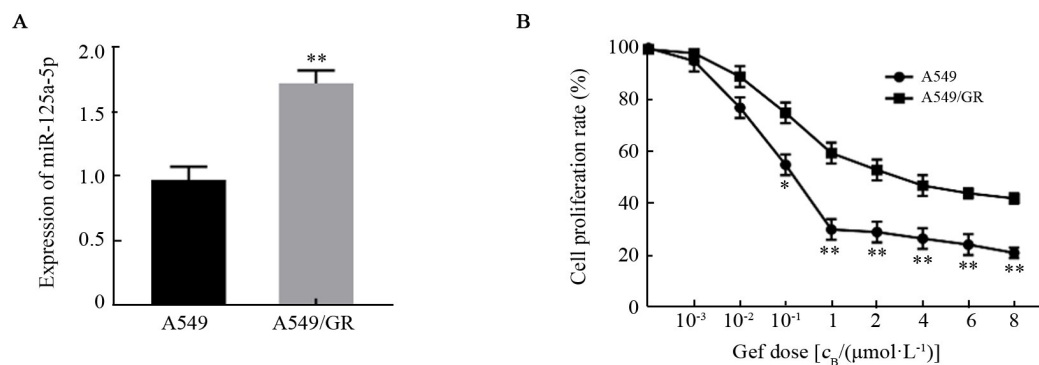
取待测细胞重悬,将 3×10^6 细胞加入 50 μ l 预冷细胞裂解缓冲液,冰上孵育 10 min。4 $^{\circ}$ C 下 10 000 \times g 离心 1 min。取上清液按试剂盒操作说明分别加入 caspase-3 和 caspase-9 底物 DEVD- ρ -nitroanilide 和 LEHD- ρ -nitroanilide,37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h,于酶标仪波长 405 nm 处测定 D 值。

1.10 统计学处理

1.3~1.9 实验均重复 3 次。采用 SPSS20.0 统计软件对实验数据进行统计分析,GraphPad Prism 7 对实验数据进行相关图片的绘制。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125a-5p 在 Gef 耐药细胞 A549/GR 中高表达 qPCR 检测结果(图 1A)显示,与 A549 细胞比较,A549/GR 细胞中 miR-125a-5p 水平显著上调($t=9.18$, $P < 0.01$)。同时,MTT 检测结果(图 1B)显示,在递增浓度的 Gef 作用下,A549/GR 细胞增殖率均显著高于 A549 细胞($c_B=10^{-1} \mu\text{mol/L}$: $t=3.67$, $P < 0.05$; $c_B=1 \mu\text{mol/L}$: $t=6.12$, $P < 0.01$; $c_B=2 \mu\text{mol/L}$: $t=9.03$, $P < 0.01$; $c_B=4 \mu\text{mol/L}$: $t=7.34$, $P < 0.01$; $c_B=6 \mu\text{mol/L}$: $t=6.27$, $P < 0.01$; $c_B=8 \mu\text{mol/L}$: $t=7.66$, $P < 0.01$),且 A549/GR 细胞的半数抑制剂量($IC_{50}=2.682 \mu\text{mol/L}$)高于 A549 细胞($IC_{50}=0.037 \mu\text{mol/L}$)。结果表明,miR-125a-5p 高表达可能与 NSCLC 细胞 Gef 耐药性有关。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A549 group

A: The expression level of miR-125a-5p in cells was measured by qPCR;

B: The proliferation of A549 and A549/GR cells was measured by MTT assay

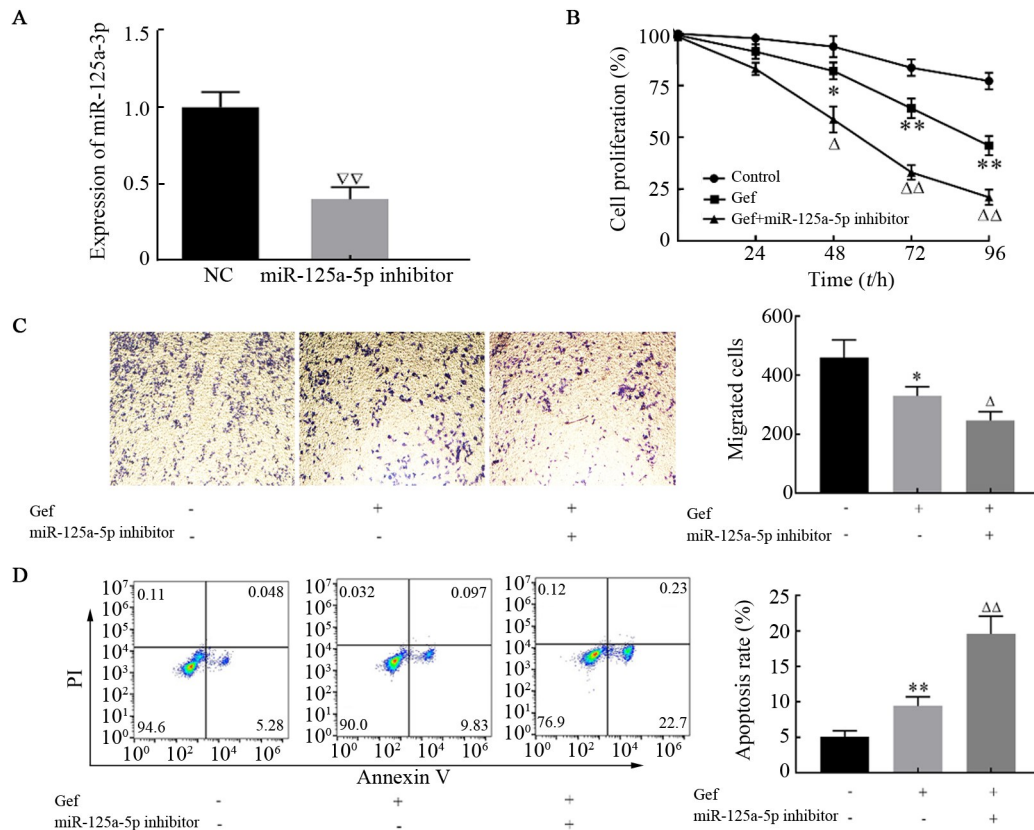
图1 A549/GR和A549细胞中miR-125a-5p水平及细胞的增殖率

Fig.1 Expression level of miR-125a-5p and proliferation rates in A549 and A549/GR cells

2.2 敲降miR-125a-5p上调A549/GR细胞Gef敏感性

qPCR检测结果(图2A)显示,与空载体(NC)组比较,miR-125a-5p inhibitor组A549/GR细胞中miR-125a-5p表达水平显著下降($t=8.11, P<0.01$)。MTT、Transwell和Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测结果(图2B~D)显示,与空白对照(Ctrl)组比较,2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gef显著抑制A549/GR细胞的增殖(48 h: $t=3.23, P<0.05$; 72 h: $t=5.51, P<0.01$; 96 h: $t=8.75,$

$P<0.01$)和迁移($t=3.33, P<0.05$),并诱导其凋亡($t=4.87, P<0.01$)。此外,与Ge组比较,Gef处理同时敲降miR-125a-5p组细胞增殖(48 h: $t=4.39, P<0.05$; 72 h: $t=8.13, P<0.01$; 96 h: $t=7.21, P<0.01$)和迁移数($t=3.27, P<0.05$)均显著下调,而凋亡水平($t=6.27, P<0.01$)显著上调。上述结果表明,敲降miR-125a-5p通过抑制细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡,提高A549/GR细胞的Gef敏感性。



$\nabla\nabla P<0.01$ vs NC group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs Gef group

A: The expression level of miR-125a-5p in A549/GR was measured by qPCR; B: The proliferation of A549/GR cells was measured by MTT assay; C: The migration of A549/GR cells was measured by Transwell assay ($\times 40$);

D: The cell apoptosis of A549/GR cells was measured by Flow cytometry

图2 敲降miR-125a-5p对A549/GR细胞miR-125a-5p表达、增殖、迁移和凋亡的影响

Fig.2 Effects of miR-125a-5p knockdown on miR-125a-5p expression, proliferation, migration and apoptosis of A549/GR cells

2.3 miR-125a-5p靶向负调控APAF1表达

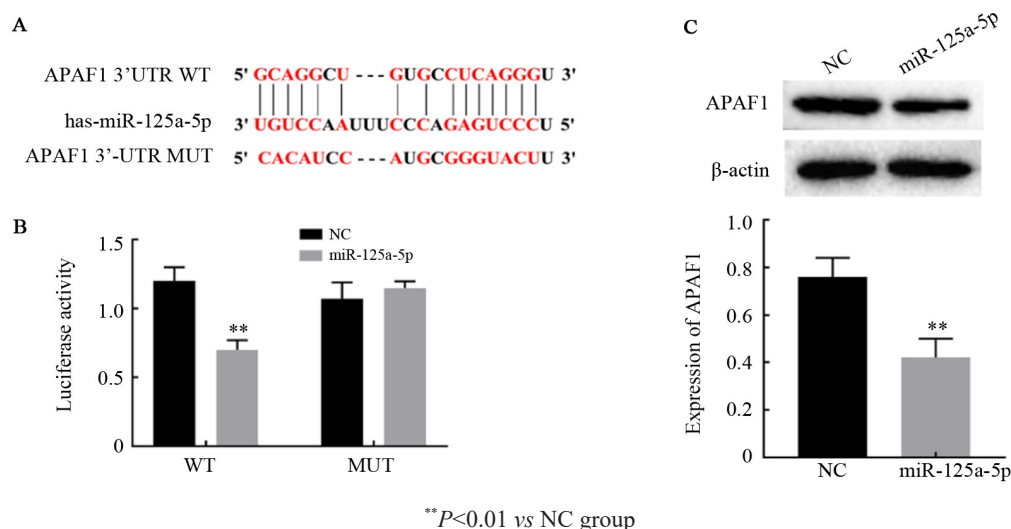
生物信息学数据库StarBase V3.0预测APAF1是miR-125a-5p的候选靶基因,其结合序列见图3A。双荧光素酶报告基因实验结果(图3B)显示,过表达miR-125a-5p显著降低野生型报告基因APAF1WT-luc荧光素酶活性($t=6.10, P<0.01$),而对突变型载体APAF1MUT-luc荧光素酶活性无显著影响($t=1.07, P>0.05$)。随后,WB实验结果(图3C)显示,与对照组比较,过表达miR-125a-5p致使A549/GR细胞中APAF1表达水平明显下调($t=5.20, P<0.01$)。上述结果表明,miR-125a-5p靶向APAF1并负调控其表达。

2.4 敲降miR-125a-5p通过上调APAF1增加A549/GR细胞Gef敏感性

WB实验结果(图4A)显示,转染pcAPAF1后,A549/GR细胞中APAF1蛋白水平显著高于对照组($t=5.05, P<0.01$),而同时转染pcAPAF1和miR-125a-5p mimic后细胞APAF1蛋白水平与对照组比较差异无统计学意义。MTT、Transwell和Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测结果(图4B~D)显示,仅过表达APAF1明显上调2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gef对A549/GR细胞增殖(48 h: $t=4.66, P<0.05$; 72 h: $t=7.60, P<0.05$; 96 h: $t=7.48, P<0.05$)和迁移($t=4.33, P<0.05$)的抑制作用,并

促进细胞凋亡($t=7.79, P<0.01$)。而同浓度 Gef 对同时过表达 miR-125a-5p 和 APAF1 组细胞的增殖(48 h: $t=1.69, P>0.05$; 72 h: $t=2.09, P>0.05$; 96 h: $t=1.80, P>0.05$)、迁移($t=0.47, P>0.05$)和凋亡($t=0.66, P>0.05$)的影响与对照组比较差异无统计学意义。比色法检测结果(图 4E)显示,仅过表达 APAF1 显著增加 caspase-3($t=9.19, P<0.01$)和 caspase-9($t=18.32, P<0.01$)

蛋白的活性;而同时过表达 APAF1 和 miR-125a-5p 组细胞中 caspase-3($t=3.25, P>0.05$)和 caspase-9($t=3.56, P>0.05$)蛋白活性均与对照组比较差异无统计学意义。结果表明,敲降 miR-125a-5p 通过靶向上调 APAF1 表达,抑制 A549/GR 细胞增殖和迁移,并且增加 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性,促进细胞凋亡,从而增加 A549/GR 细胞 Gef 敏感性。



A: The binding site of miR-125a-5p and APAF1 was verified by microRNA database; B: The luciferase activity was detected by dual luciferase reporter gene assay; C: The expression of APAF1 was measured by WB assay

图3 miR-125a-5p 靶向下调 APAF1

Fig.3 miR-125a-5p targeted and downregulated APAF1

3 讨论

NSCLC 由于潜伏期长,确诊时多为中晚期,无法接受手术治疗,放、化疗是多数 NSCLC 患者治疗的重要手段,但不良反应多且严重,治疗效果仍不理想。分子靶向药物对于 NSCLC 治疗具有高效且毒副作用小的优势^[8]。Gef 属于 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI),是目前常用于治疗 NSCLC 的分子靶向药物。但由于原发性的耐药,患者本身药物敏感性的差异导致疗效与预期有出入,且长期基于 Gef 治疗的患者也多对药物产生继发性的多药耐受^[9]。目前,药物耐受成为 EGFR-TKI 治疗的瓶颈,也是影响 NSCLC 患者治疗效果的重要因素。

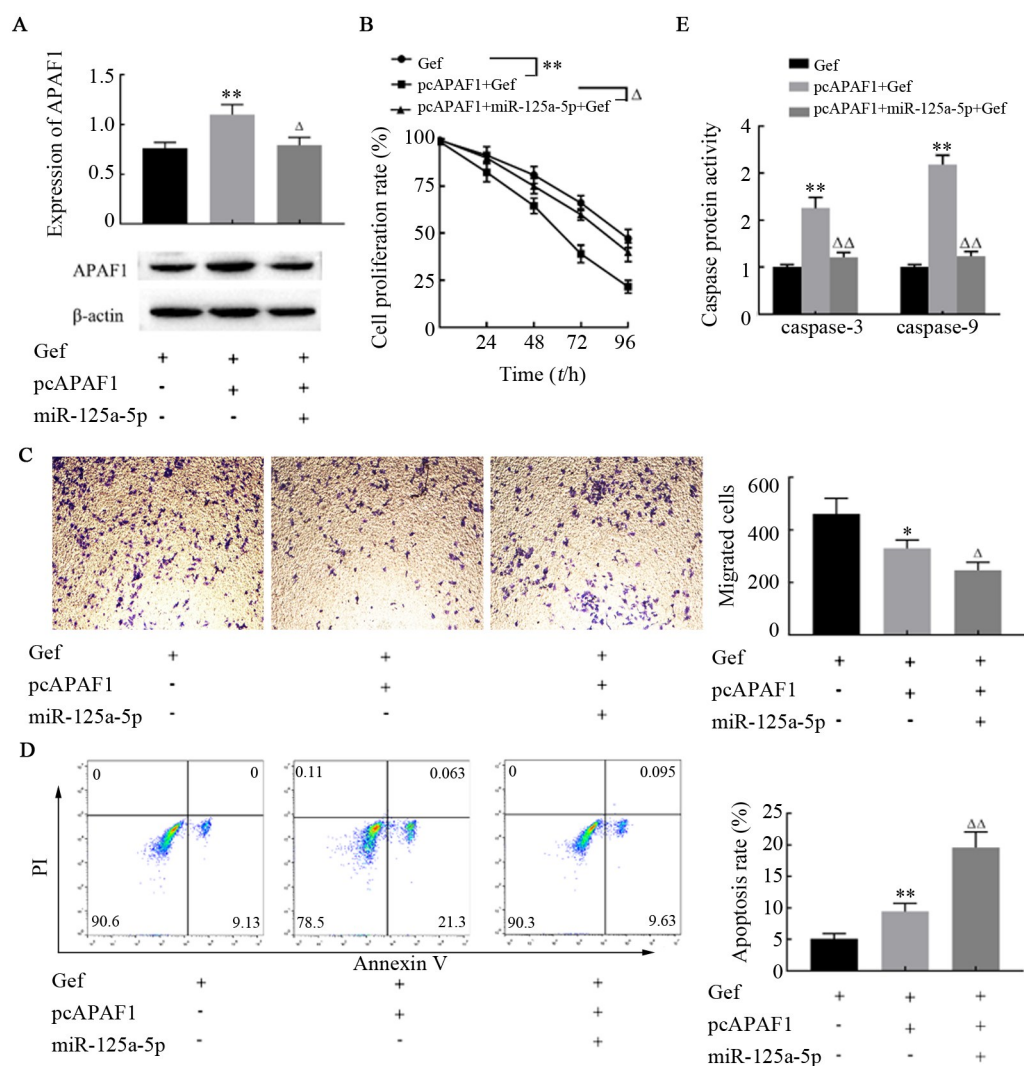
miRNA 在许多肿瘤中存在表达水平或加工异常以及突变现象,影响了靶基因蛋白水平,参与多种肿瘤的耐药形成^[10-11],并且可影响肿瘤细胞对 Gef 敏感性^[12]。已有研究表明,miR-125a-5p 与多种人类肿瘤的耐药过程相关,例如,miR-125a-5p 表达失调与黑色素瘤细胞对厄洛替尼耐药^[13],以及肺癌细胞放射耐受^[14]及顺铂耐受^[15]过程相关。同时 miR-125a 及 miR-

125b 还通过直接调控 EGFR 家族成员,增加乳腺癌细胞对 Gef 和拉帕替尼的敏感性^[16]。本研究通过观察 A549/GR 细胞在 Gef 作用下,其 miR-125a-5p 表达对细胞增殖、迁移和凋亡行为的影响,探讨了 miR-125a-5p 对 NSCLC Gef 敏感性的调控作用,并确定 APAF1 为 miR-125a-5p 促进 Gef 耐药的靶分子之一。

APAF1 作为凋亡激活剂主要参与线粒体凋亡途径的信号转导,在三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸(dATP)和 ATP 的联合作用下,APAF1 被细胞色素 C 所激活,活化后的 APAF1 进一步激活 caspase-9 和 caspase-3,从而启动凋亡级联,发起细胞凋亡^[17]。APAF1 是确切的抑癌基因^[18],在多种恶性肿瘤中表达异常。诱导凋亡是肿瘤治疗中一个非常重要的目标,细胞凋亡是发生在多细胞生物中的一种程序性死亡的过程,受到多基因的精确调控,在整个生命周期中处于稳定状态。因此,凋亡受阻和肿瘤的进展有着密切的关系,是肿瘤耐药的重要原因^[19]。例如,APAF1 受 miR-484 负调控与 A549 细胞的恶性生物学行为相关^[20]; miR-300 通过下调 APAF1 表达促进 NSCLC 对于放射耐受^[14]; ZHU 等^[21]研究发现,敲降 PRRX1 下调 APAF1 表达,可能通过抑制 caspase-3 通路促进 A549 细胞的

抗凋亡能力和顺铂耐药。本研究结果也表明,miR-125a-5p/APAF1 分子轴对 caspase-3 和 caspase-9 活化具有

调控作用,进一步揭示了 NSCLC 细胞抑制凋亡小体的生成,从而显著减轻 Gef 的杀伤效应的分子机制。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Gef group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Gef+miR-125a-5p group

A: The expression of APAF1 in A549/GR cells was detected by WB assay; B: The proliferation of A549/GR cells was measured by MTT assay; C: The migration of A549/GR cells was measured by Transwell assay ($\times 40$); D: The cell apoptosis of A549/GR cells was measured by Flow cytometry; E: The activities of caspase-3 and caspase-9 were assessed by colorimetry

图4 敲降miR-125a-5p通过靶向上调APAF1对A549/GR细胞APAF1, caspase-3 and caspase-9表达和增殖、克隆形成及凋亡的影响

Fig.4 Effects of miR-125a-5p knockdown on the expressions of APAF1, caspase-3 and caspase-9, and the proliferation, clone formation and apoptosis of A549/GR cells by targetedly up-regulating APAF1

综上所述,miR-125a-5p通过抑制APAF1依赖的细胞凋亡途径,促进NSCLC细胞增殖和迁移,并抑制细胞凋亡,从而诱导Gef耐药性产生。而敲降miR-125a-5p能够有效缓解NSCLC细胞的Gef耐受。

[参考文献]

[1] HIRSCH F R. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311. DOI:10.1016/S0140-6736(16)30958-8.
 [2] RIELY G J. Clinical course of patients with non-small cell lung

cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(3): 839-844. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-05-1846.
 [3] JACKMAN D, PAO W, RIELY G J, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer[J/OL]. J Clin Oncol, 2010, 28(2): 357-360[2019-12-07]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870288/. DOI:10.1200/JCO.2009.24.7049.
 [4] VANNINI I, FANINI F, FABBRI M. MicroRNAs as lung cancer biomarkers and key players in lung carcinogenesis[J]. Clin Biochem, 2013, 46(10/11): 918-925. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2013.01.024.
 [5] ENGELMAN J A, ZEJNULLAHU K, MITSUDOMI T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activat-

- ing ERBB3 signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043. DOI:10.1126/science.1141478.
- [6] YU F, LIU J B, WU Z J, et al. Tumor suppressive microRNA-124a inhibits stemness and enhances gefitinib sensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting ubiquitin-specific protease 14[J]. *Cancer Lett*, 2018, 427: 74-84. DOI:10.1016/j.canlet.2018.04.022.
- [7] 王菲. NSCLC-TKIs 耐药中 miR-125a-5p 与上皮间质转化关系的研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2017.
- [8] 王晓栋. 化疗诱导损伤相关分子模式强化 CIK 对肺癌 A549 细胞的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(7): 674-679. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.003.
- [9] 吴海霞. 桦木酸通过抑制 STAT3 的活化提高胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(9): 948-954. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.003.
- [10] 莫益俊. 微小 RNA 与肿瘤耐药[J]. *肿瘤研究与临床*, 2011, 23(4): 283-287. DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2011.04.025.
- [11] ZHENG T S, WANG J B, CHEN X, et al. Role of microRNA in anticancer drug resistance[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(1): 2-10. DOI: 10.1002/ijc.24782.
- [12] ZHONG M, MA X, SUN C J, et al. MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 184(3): 431-438. DOI:10.1016/j.cbi.2010.01.025.
- [13] DENG W G, KWON J, EKMEKCIOGLU S, et al. IL-24 gene transfer sensitizes melanoma cells to erlotinib through modulation of the Apaf-1 and Akt signaling pathways[J/OL]. *Melanoma Res*, 2011, 21(1): 44-56[2019-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2945428/>. DOI:10.1097/CMR.0b013e3283382155.
- [14] HE J P, FENG X, HUA J R, et al. MiR-300 regulates cellular radiosensitivity through targeting p53 and apaf1 in human lung cancer cells[J/OL]. *Cell Cycle*, 2017, 16(20): 1943-1953[2019-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5638365/>. DOI: 10.1080/15384101.2017.1367070.
- [15] ZANG Y S, ZHONG Y F, FANG Z, et al. MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(11): 773-778. DOI:10.1038/cgt.2012.60.
- [16] SCOTT G K, GOGA A, BHAUMIK D, et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1479-1486. DOI:10.1074/jbc.m609383200.
- [17] WU C C, LEE S, MALLADI S, et al. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 Homo- and heterodimers with distinct activities[J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13565[2019-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123071/>. DOI: 10.1038/ncomms13565.
- [18] TAN L J, KWOK R P, SHUKLA A, et al. Trichostatin A restores Apaf-1 function in chemoresistant ovarian cancer cells[J/OL]. *Cancer*, 2011, 117(4): 784-794[2019-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3033976/>. DOI:10.1002/ncr.25649.
- [19] JOHNSTONE R W, RUEFLI A A, LOWE S W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. *Cell*, 2002, 108(2): 153-164. DOI:10.1016/s0092-8674(02)00625-6.
- [20] LI T, DING Z L, ZHENG Y L, et al. MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 96: 153-164. DOI:10.1016/j.biopha.2017.09.102.
- [21] ZHU H B, SUN G Y, DONG J H, et al. The role of PRRX1 in the apoptosis of A549 cells induced by cisplatin[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 396-402[2019-12-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340676/>.

[收稿日期] 2020-02-05

[修回日期] 2020-05-10

[本文编辑] 党瑞山