

MiR-192靶向负调控Bim表达诱导肺癌顺铂耐药

张芳 李洋 吴衡 齐康 尤嘉琮 李雪冰 祖玲玲 潘振华 王玉丽 李永文 李颖 王珉 沈旺 周清华

【摘要】背景与目的 顺铂是非小细胞肺癌化疗的一线药物，但获得性耐药限制了其疗效的发挥。本研究的目的是筛选鉴定与肺癌顺铂耐药相关的microRNAs，探讨其与肺癌顺铂耐药的影响及分子机制。方法 应用miRNA芯片及RT-PCR筛选鉴定A549与A549/DDP肺癌细胞间的差异表达miRNAs，将差异表达miR-192转染A549和A549/DDP细胞株，CCK-8检测miR-192对半数抑制浓度（half inhibition concentration, IC₅₀）的影响，流式细胞术检测细胞凋亡，生物软件预测及双荧光素酶报告基因法寻找miR-192的靶基因，RT-PCR及Western blot检测靶基因表达水平在转染前后的变化。结果 MiR-192在A549/DDP中显著高表达，表达量是A549细胞表达量的37.59±0.35倍。在低表达miR-192的A549细胞中过表达miR-192，细胞对顺铂的IC₅₀显著增高，顺铂引起的细胞凋亡率显著降低；反之，在高表达miR-192的A549/DDP中抑制miR-192的表达，顺铂的IC₅₀显著降低，顺铂引起的细胞凋亡率显著增加。miR-192可靶向作用促凋亡基因Bim的3'-UTR，并在转录后水平负向调控Bim的表达。结论 MiR-192通过靶向负调控促凋亡基因Bim表达，诱导肺腺癌细胞株A549产生顺铂耐药，并减少顺铂引起的细胞凋亡。

【关键词】 肺肿瘤；miRNA芯片；RT-PCR；miR-192；Bim

MiR-192 Confers Cisplatin Resistance by Targeting Bim in Lung Cancer

Fang ZHANG, Yang LI, Heng WU, Kang QI, Jiacong YOU, Xuebing LI, Lingling ZU, Zhenhua PAN, Yuli WANG, Yongwen LI, Ying LI, Min WANG, Wang SHEN, Qinghua ZHOU

Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Fang ZHANG and Yang LI contributed equally to this work.

Corresponding author: Qinghua ZHOU, E-mail:zhouqh135@163.com

【 Abstract 】 Background and objective Cisplatin is the first-line drug for the chemotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC), but the acquired chemoresistance restricted the effect of its treatment. The aim of this study is to validate the miRNAs related to the Cisplatin resistance in lung cancer and elucidate the molecular mechanisms. **Methods** We performed miRNA microarray and RT-PCR to obtain the aberrant differential expressed miRNAs between A549 and its paired Cisplatin-resistant cell line A549/DDP cells, and then we investigated the biological functions of miR-192, which is the aberrant differential expressed miRNA. After transfection of the miR-192 into A549 cells, we measured the half inhibition concentration (IC₅₀), cell apoptosis of the transfectant cells, and then we used biological softwares and dual-luciferase report assay to explore the target gene of the miR-192, which was further validated by RT-PCR and Western blot. **Result** MiR-192 was highly over-expressed in A549/DDP cells, whose quantity was 37.59±0.35 fold higher than that in A549 cells. Overexpression of miR-192 in A549 cells significantly conferred resistance to Cisplatin and inhibited apoptosis. By contrast, down-expression of miR-192 in A549/DDP cells remarkably restrained the Cisplatin resistance and induced apoptosis. MiR-192 binded to Bim 3'-UTR and negatively

本研究受国家自然科学基金重点项目（No.30430300）、国家“863”重大项目（No.2012AA02A201, 2012AA02A502）、国家“973”重大项目（No.2010CB529405）、国家自然科学基金项目（No.81000950）、国家自然科学基金项目（No.81201852）、中瑞国际合作项目（No.09ZCZDSF04100）、天津市科技支撑计划重点项目（No.06YFSZSF05300）和天津市创新体系建设项目（No.07SYSYSF05000, No.07SYSYJC27900）资助

张芳和李洋为共同第一作者

作者单位：300052 天津，天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室，天津市肺癌研究所，天津医科大学总医院（通讯作者：周清华，E-mail:zhouqh135@163.com）

regulated Bim expression at the post-transcriptional level in lung adenocarcinoma cells. **Conclusion** Our data suggested that miR-192 induced Cisplatin-resistance and inhibited cell apoptosis in lung cancer via negative targeting Bim expression.

【 Key words 】 Lung neoplasms; miRNA microarray; RT-PCR; miR-192; Bim

This work was partly supported by the grants from the Key Project from National Natural Science Foundation of China (to Qinghua ZHOU)(No.30430300), National "863" Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2012AA02A201, No.2012AA02A502), the National "973" Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2010CB529405), National Natural Science Foundation of China (to Jiacong YOU)(No.81000950), National Natural Science Foundation of China (to Yang LI)(No.81201852), China-Sweden Cooperative Foundation (to Qinghua ZHOU)(No.09ZCZDZF04100), Tianjin Scientific Innovation System Program (to Qinghua ZHOU)(No.07SYSYSF05000, No.07SYSYJC27900) and Major Project of Tianjin Sci-Tech Support Program (to Qinghua ZHOU)(No.06YFSZSF05300).

肺癌是发病率和死亡率增长最快、对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一，且仍然呈不断上升趋势^[1]。化疗在肺癌的综合治疗中占有重要地位，但肿瘤对化疗药物产生耐药常常导致化疗失败，也是肿瘤复发、转移的主要原因。顺铂是非小细胞肺癌晚期治疗的一线化疗药物，但顺铂耐药是影响其疗效的主要障碍之一，因此克服和干预肿瘤细胞耐药是临床亟待解决的科学问题。

微小RNA (microRNA, miRNA) 是生物体内源性长度约为22个-25个核苷酸的非编码小RNA，通过靶向作用于蛋白编码基因的3'-UTR区，影响目的基因的表达，从而影响细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生物学行为^[2]。研究^[3,4]报道证实miRNA可以发挥癌基因或者抑癌基因的功能，在肿瘤细胞的诊断、分期、进展、侵袭、预后等都发挥着重要的作用。迄今，有关miRNA在肺癌细胞顺铂耐药过程中所发挥的作用及其分子机制仍不清楚。

本研究选取肺腺癌细胞系A549及其耐顺铂细胞系A549/DDP作为研究对象，通过miRNA芯片等筛选出可能与肺腺癌耐药相关的miRNA，并探讨miRNA在肺癌细胞化疗耐药过程中所起的作用及其分子机制，以期能为逆转肺癌耐药提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肺腺癌A549和A549/DDP细胞株由本实验室提供；顺铂、维拉帕米购自Sigma公司；Cell counting kit-8 (CCK-8) 购自DOJINDO公司；miRNeasy mini-Kit购自Qiagen公司；MiR-192 mimic和miR-192 inhibitor购自GenePharma公司；Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent购自Life Technologies公司；Hoechst33342和PI购自BD公司；FITC/Annexin V凋亡检测试剂盒购自BD公司；双荧光素酶报告基因载体pMIR-GLO和双荧光素酶报告分析试剂盒购自Promega公司；质粒小提试剂盒及胶回收试

剂盒购自Axygen；TaKaRa MutanBEST Kit，感受态细胞 (*E. coli* DH5α Competent Cells)，限制性内切酶 (*Sac*I、*Xba*I)，M-MLV逆转录酶，实时荧光定量PCR试剂盒购自Takara；质粒测序由北京华大基因公司完成；蛋白裂解液RIPA购自碧云天公司；兔抗人Bim单抗购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 MiRNA芯片及Real-time PCR筛选miRNA 收集A549细胞和A549/DDP细胞，miRNeasy mini-Kit抽提RNA，紫外分光光度仪和变性琼脂糖凝胶电泳法对RNA进行质检，将RNA送与上海博豪公司进行miRNA芯片杂交检测，将检测结果进行图像分析扫描及统计学分析，筛选出表达差异较为明显的miRNA (差异倍数在2倍及以上)。用miRNeasy mini-Kit提取小分子RNA，用SYBR® Premix Ex Taq™ 逆转录合成cDNA，应用ABI Prism 7900HT实时定量系统进行PCR定量检测。MiRNA特异性的RT引物和PCR上下游引物序列如表1所示。反转录条件: 16 °C、30 min, 42 °C、60 min, 85 °C、5 min, 4 °C终止反应；PCR条件: 95 °C、30 s, 一个循环；95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40个循环；95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s, 一个循环。每管10 μL体系，设置3个平行样，U6作为内参。样本经过3次独立重复实验，所得数据使用比较CT值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 进行定量分析。样品目的基因的相对表达率 (relative expression, RQ) 采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算， $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct \text{ sample} = Ct_{\text{sample}} - Ct_{U6 \text{ sample}}$, $\Delta Ct \text{ control} = Ct_{\text{control}} - Ct_{U6 \text{ control}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}$)。

1.2.2 细胞转染 将处于对数生长期的A549和A549/DDP细胞接种于6孔板中，当细胞密度达到40%-50%时，应用lipofectamin 2000转染试剂将miR-192 mimic、miR-192 inhibitor及各自的对照 (negative control, NC) 分别转染到A549和A549/DDP细胞中，并设置各自的空白对照

(vehicle)组。6 h后换成完全培养基继续培养, 转染24 h后检测转染效率。转染序列如下: miR-192 mimic: sense 5'-CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3', anti-sense 5'-CUGUCAAUUCAUAGGUCAGUU-3'; mimics的NC: sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', anti-sense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; miR-192 inhibitor: 5'-GGCUGUCAAUUCAUAGGUCAG-3'; inhibitor的NC: 5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'。

1.2.3 CCK-8检测半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC_{50}) 转染24 h后, 0.25%胰酶消化细胞, 制成 5×10^4 /mL单细胞悬液, 将细胞接种于96孔板, 每孔100 μ L (即5,000个细胞/孔)。接种24 h, 待细胞贴壁且恢复生长活性后, 弃去培养基, 加入含顺铂终浓度为0 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL、32 μ g/mL、64 μ g/mL RPMI-1640培养基, 每孔100 μ L, 每个浓度设置5个复孔。继续培养48 h后, 每孔加入CCK-8溶液10 μ L, 轻轻振荡混合均匀, 在37°C培养箱中继续培养1 h后, 在酶联免疫吸附仪上采用450 nm波长测量每孔吸光度 (optical density, OD) 值。取5个孔的平均吸光度值, 重复5次独立实验后取平均值。根据数据绘制细胞生长抑制率曲线, 并计算顺铂对细胞的 IC_{50} 。抑制率计算公式为: 生长抑制率 = $(1 - OD_{\text{用药物组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$, 以最小二乘法进行曲线拟合, 得到 IC_{50} 值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 转染24 h后, A549细胞6孔板每孔加入终浓度为2 μ g/mL的顺铂, A549/DDP细胞每孔加入终浓度为8 μ g/mL的顺铂。继续培养48 h后, 1 \times PBS洗两遍细胞, 0.25%胰酶消化, 用10% RPMI-1640终止消化后, 将细胞收集到EP管中, 1,000 rpm, 4°C离心5 min后, 去上清, 用1 \times PBS洗两遍后, 用FITC/Annexin V凋亡检测试剂盒进行染色, 首先, 每个样本中加入500 μ L 1 \times buffer, 吹打成单细胞悬液, 后加入Annexin V和PI各5 μ L, 37°C避光染色20 min后, 用FACSAria™ 流式细胞检测染色细胞, WinMDI 2.9软件进行分析。

1.2.5 双荧光素酶报告基因 通过miRanda、TargetScan、PicTar和RNA22等生物学软件预测Bim为miR-192的靶基因之一。通过PCR扩增miR-192作用于Bim的3'-UTR区, 同时用TaKaRa MutanBEST Kit突变靶基因Bim 3'-UTR区中的miR-192的靶点, 使miR-192与Bim脱靶, 通过质粒构建的方法, 将含miR-192作用靶点的Bim 3'-UTR区和已经将miR-192作用靶点突变的mutant-Bim3'-UTR区连接到双荧光素酶报告质粒pMIR-GLO的SacI、XbaI两酶切位点之间, 构建双荧光素酶报告基因质粒。构建的含Bim 3'

-UTR和mutant-Bim3'-UTR的质粒送华大基因测序。构建成功的质粒转化感受态大肠杆菌DH5 α , 转化产物涂于含氨苄青霉素 (Amp) 的LB琼脂板上, 37°C培养过夜。待LB琼脂板长出菌落后, 挑取单菌落至于液体LB培养基中摇菌扩增。应用质粒小提试剂盒提取质粒, 测定质粒浓度后, 进行细胞转染。扩增Bim 3'-UTR的上游引物序列为5'-GGGGAGCTCGCAATAAACACACACAAAATAG-3', 下游引物序列为5'-GCCTCTAGACACATCACACAGAAAAAGAATC-3', 构建mutant-Bim 3'-UTR的上游引物序列为5'-TTGCAGATATTACTTATCAACTGAGCCAAAT-3', 下游引物序列为5'-CGAATCTAATAAATACTCACAATATATAC-3'。取对数生长的细胞接种48孔板, 24 h后进行质粒转染, 按照lipofectamine 2000说明书进行转染, 每孔加入250 μ L无血清培养基, 培养基中含终浓度为1 μ g/mL的pMIR-GLO质粒, 0.2 μ g/mL的pRL-SV40质粒, 100 nmol/L的miR-192 mimic或miR-192 inhibitor。在转染后48 h, 用Promega公司的双报告分析系统按说明书来测量海肾萤光素酶活性。

1.2.6 Real-time PCR和Western blot检测细胞转染后Bim表达水平 MiR-192 mimic和miR-192 inhibitor分别转染A549和A549/DDP细胞48 h后, 收集细胞, 提取RNA, 用RT-PCR检测转染前后细胞内Bim基因mRNA水平的变化。同时, 转染48 h后, 收集细胞, 加入RIPA裂解细胞, 提取总蛋白, BCA试剂盒进行蛋白定量, 进行SDS-PAGE电泳, 将电泳分离的蛋白电转移至NC膜上, 5%脱脂牛奶封闭, 分别加入1:2,000兔抗人Bim抗体, 4°C过夜孵育, TBST洗3次, 每次10 min。加入辣根过氧化物酶偶联的抗兔 (1:2,000稀释) 二抗, 37°C, 孵育1 h, TBST缓冲液充分洗膜3次, 每次10 min, 发光压片显色, 以 β -actin作为内参, Image J软件分析结果。

1.2.7 统计学分析 所有实验重复3次, 采用SPSS 20.0统计软件分析数据。数据均用Mean \pm SD表示, 统计学方法采用方差分析, 两独立样本均值比较采用t检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA质检、芯片和RT-PCR结果 提取RNA后, 用紫外分光光度计结果显示A260/A280分别为2.03和2.01, 表明所提取的总RNA纯度较高。RNA变性琼脂糖凝胶电泳结果显示28S和18S核糖体RNA亮而浓, 28S带密度大约是18S带的2倍, 表明提取的总RNA完整性好 (图1A)。质检结果表明, 总RNA样品符合芯片质量要求。芯片

表 1 引物序列

Tab 1 Sequence of primers

Genes	Primers	Sequence (5' -3')
miR-192	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACGGGCTGT
	Forward primer	GGGGCTGACCTATGAATTGA
	Reverse primer	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
U6	RT primer	AACGCTTCACGAATTTGCGT
	Forward primer	CTCGCTTCGGCAGCACCA
	Reverse primer	CAGTGCAGGGTCCGAGGT

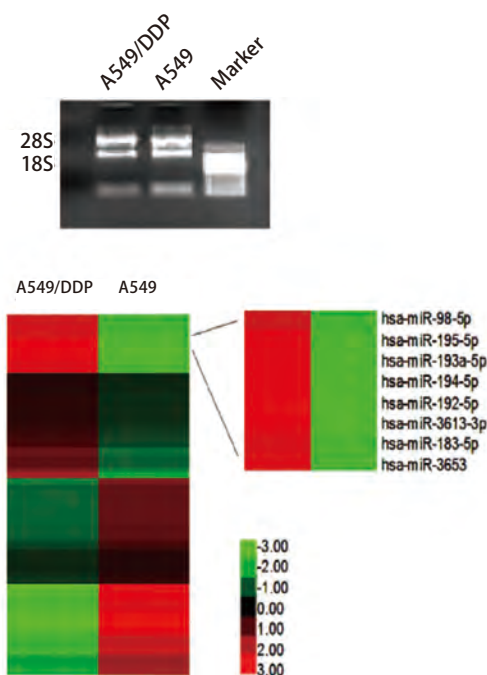


图 1 RNA质控后应用miRNA芯片检测结果。A: 琼脂凝胶电泳检测RNA完整性; B: A549和A549/DDP中差异表达的miRNAs部分芯片结果。

Fig 1 Quality tested RNA was measured by miRNA microarray. A: The integrity of RNA was examined with agarose gel electrophoresis; B: Part of differentially expressed miRNAs between A549 and A549/DDP cells were listed as above.

结果及RT-PCR验证结果显示, 107条miRNA差异表达(差异倍数 ≥ 2 倍)于A549及其顺铂耐药株A549/DDP, 其中miR-192是在A549/DDP细胞株中表达上调最明显的miRNA之一(表达量是A549细胞的99.01倍)(图1B)。采用RT-PCR验证miRNA芯片结果显示, A549/DDP细胞株中miR-192表达量是A549细胞株表达量的 37.59 ± 0.35 倍($P < 0.05$)。miR-192转染细胞后, RT-PCR检测转染效率结果显示, 在转染了miR-192 mimic的A549细胞与NC组比较, miR-192表达水平提高到 234.21 ± 5.45 倍($P < 0.05$); 同时, 在转染了miR-192 inhibitor的A549/

DDP细胞与NC组比较, miR-192表达水平减低了 0.025 ± 0.0025 倍($P < 0.05$)。

2.2 MiR-192转染前后细胞IC₅₀结果 A549细胞转染miR-192 mimic后, 顺铂作用于细胞的IC₅₀值为(15.22 ± 0.91) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 较转染NC组IC₅₀ [(3.42 ± 0.90) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 明显提高($P < 0.05$); 而转染了miR-192 inhibitor的A549/DDP细胞, 顺铂作用于细胞的IC₅₀值为(7.28 ± 1.10) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 较转染NC组IC₅₀ [(12.51 ± 1.00) $\mu\text{g}/\text{mL}$] 明显降低($P < 0.05$) (图2)。结果表明, miR-192的过表达使细胞对顺铂的耐受性提高, miR-192可以诱导细胞对顺铂的耐药。

2.3 MiR-192转染对细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示, 转染miR-192 mimic的A549细胞凋亡率为(6.45 ± 0.87)%, 转染miR-NC组的细胞凋亡率为(27.52 ± 0.85)%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 转染miR-192 inhibitor的A549/DDP细胞凋亡率为(44.46 ± 0.70)%, 而转染miR-NC组的细胞凋亡率为(31.41 ± 4.95)%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明miR-192过表达可以减少由顺铂作用而引起的细胞凋亡(图3)。

2.4 双荧光素酶报告基因结果 在共转染了Bim 3'-UTR双荧光素酶报告基因载体和miR-192 mimic的A549细胞中, 检测到细胞中荧光素酶活性显著下调, 而在共转染了Bim 3'-UTR双荧光素酶报告基因载体和miR-192 inhibitor的A549/DDP细胞中, 荧光素酶活性显著上调。同时, 当miR-192 mimic或miR-192 inhibitor与mutant-Bim 3'-UTR双荧光素酶报告基因载体共转染细胞时, 没有观察到荧光素酶活性的改变。这些结果表明, miR-192在肺腺癌细胞中通过靶向作用于3'-UTR区负向调节Bim基因的表达(图4)。

2.5 MiR-192对靶基因Bim表达的影响 RT-PCR结果显示, 转染miR-192后, 细胞内Bim基因mRNA表达水平无明显改变。Western blot结果显示, 相较于转染NC的细胞,

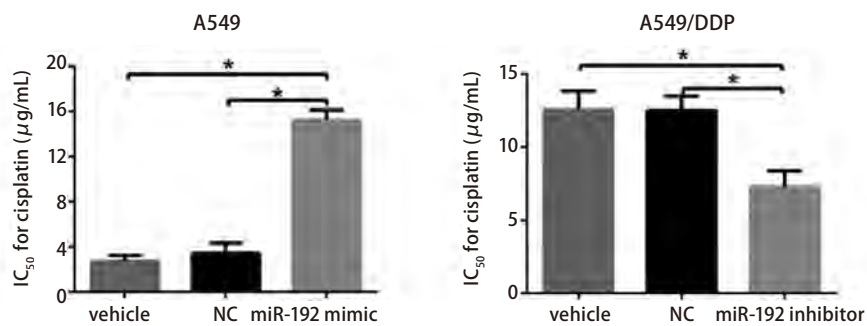


图2 CCK-8检测细胞转染后IC₅₀结果。*P<0.05。

Fig 2 Half inhibition concentration (IC₅₀) or cisplatin of cells after transfection was measured by CCK-8 assay. *P<0.05; NC: negative control.

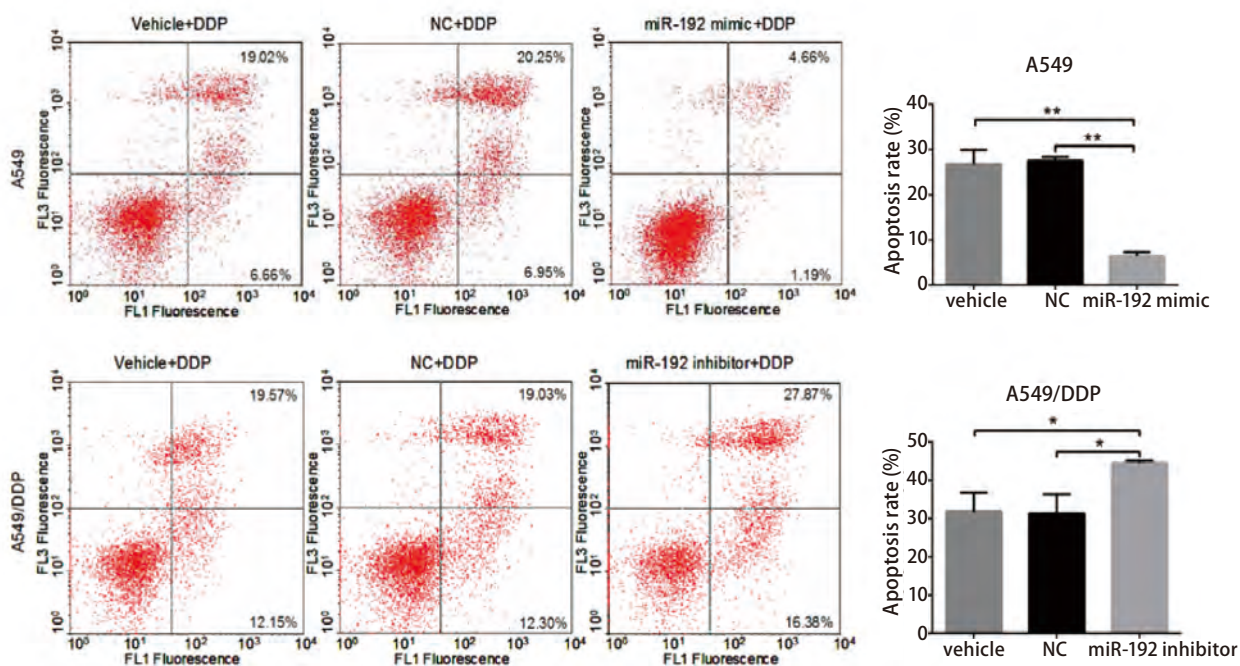


图3 流式细胞术测细胞转染后凋亡结果。*P<0.05; **P<0.01。

Fig 3 Apoptosis rate of cells after transfection was detected by FCM assay. *P<0.05; **P<0.01.

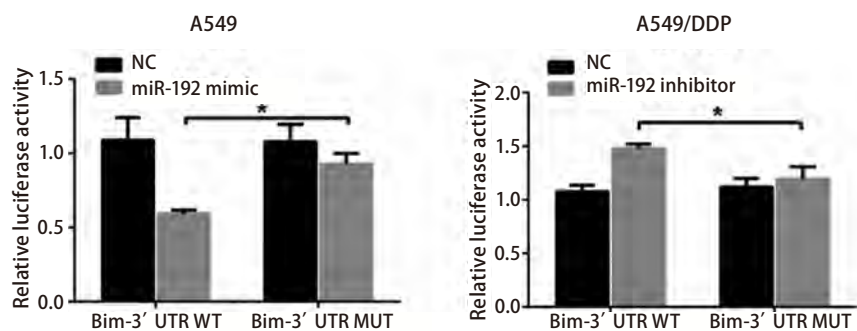


图4 双荧光素酶报告基因结果。*P<0.05。

Fig 4 Dual luciferase reporter assays in A549 and A549/DDP cells. *P<0.05.

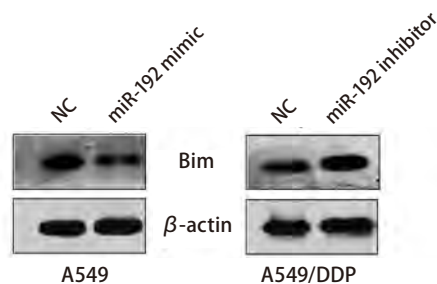


图5 Western blot检测Bim蛋白表达结果
Fig 5 The protein level of Bim was analyzed by Western blot

转染miR-192 mimic的A549细胞中Bim蛋白表达下调；相较于转染NC的细胞，转染miR-192 inhibitor的A549/DDP细胞中Bim蛋白表达上调（图5）。此结果表明，miR-192通过转录后水平负向调控Bim的表达而发挥作用。

3 讨论

MiRNA芯片技术是一种快速有效分析miRNA表达谱的方法，具有较高灵敏度和特异性。结合RT-PCR检测，能基本准确地找到A549及其耐药细胞株A549/DDP细胞中差异表达的miRNAs。研究^[5]报道miRNAs差异表达于不同的耐药肿瘤细胞中，发挥着诱导或者逆转肿瘤细胞耐药的功能。miR-34a的过表达可以靶向负性调节SIRT1基因的表达而诱导细胞凋亡，从而逆转前列腺癌细胞对喜树碱类化疗药物的耐药。MiR-200c在食管癌细胞中可以调节Akt通路从而影响癌细胞在顺铂作用下的细胞凋亡和耐药性^[6]。我们的实验结果表明miR-192显著高表达于肺腺癌顺铂耐药株A549/DDP细胞中，我们推测miR-192可能与肺癌顺铂耐药有关。有报道了miR-192具有调节细胞生长，细胞周期、细胞凋亡等生物学功能，它的差异表达可以用来辅助临床肿瘤诊断、分期、侵袭、转移和预后等^[7-10]。此外，miR-192可以通过调节P53而影响细胞的周期分布从而影响结肠直肠癌细胞对5-Fu的耐药^[11]。本研究结果表明miR-192的过表达可以抑制顺铂作用于细胞而引起的细胞凋亡、诱导肺癌细胞对顺铂的耐药。为了进一步探索miR-192诱导肺癌细胞顺铂耐药的机制，我们通过生物软件预测和双荧光素酶报告基因法找到了Bim为miR-192的靶基因之一。Bim为Bcl2家族的一员，是一个促凋亡基因。Bcl-2家族蛋白是细胞凋亡过程中最重要的调控因子，根据它们对细胞凋亡调控的作用可分为两大类：一类是抗凋亡蛋白，

如Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w和Mcl-1等，大多数成员含有四个BH（Bcl-2 homology domain）结构域，即有BH1-BH4；第二类则是促细胞凋亡蛋白，如Bax、Bak等，通常含有三个结构域（即BH1-BH3）。在促凋亡蛋白中，有些分子仅含有一个BH3结构域，如Bim、Bid、Bad、Bike等，BH3结构域是它们的核心功能区。Bim可促进许多肿瘤细胞的死亡，如肺癌、乳腺癌、骨肉瘤和黑色素瘤细胞等，很多化疗药物通过调节Bim表达来发挥杀灭肿瘤细胞的功能^[12]。Bim的表达水平与顺铂耐药相关，研究^[13]报道在卵巢癌顺铂敏感细胞株中通过促进Bim蛋白的降解诱导细胞对顺铂的耐药。随着对miRNA的深入研究的发展，有研究报道了miRNA可以通过靶向作用于Bim来调节癌细胞的生物学行为，Romano等^[14]报道了在非小细胞肺癌细胞中miR-494可以通过靶向下调Bim的表达而调节TRAIL诱导的细胞凋亡。Yan等^[15]发现抑制miR-17-5p的表达，其靶基因Bim蛋白表达水平上调，从而导致胰腺癌细胞对吉西他滨的化疗耐药。我们的实验结果表明，miR-192可以靶向作用于Bim基因的3'-UTR区，并负向调节Bim的表达，导致肺腺癌细胞在顺铂作用下的细胞凋亡率降低。

本研究表明，miR-192通过靶向负性调节促凋亡基因Bim的表达，减少肺癌细胞在顺铂作用下的细胞凋亡率，从而诱导肺癌细胞对顺铂的耐药，阐明了肺癌顺铂耐药性产生的机制之一，提示miR-192可以作为抑制肺癌顺铂耐药的靶点，抑制肺癌细胞内miR-192的表达可能是在未来临床治疗中逆转肺癌顺铂耐药的一种新方法。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- 2 Tsuchiya S, Okuno Y, Tsujimoto G. MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer. J Pharmacol Sci, 2006, 101(4): 267-270.
- 3 Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA, 2008, 14(11): 2348-2360.
- 4 Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768-1771.
- 5 Fujita Y, Kojima K, Hamada N, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1): 114-119.
- 6 Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, et al. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through

- activation of the akt signaling pathway. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 3029-3038.
- 7 Luzna P, Gregar J, Uberall I, *et al.* Changes of microRNAs-192, 196a and 203 correlate with Barrett's esophagus diagnosis and its progression compared to normal healthy individuals. *Diagn Pathol*, 2011, 6: 114.
- 8 Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, *et al.* Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*, 2010, 18(4): 367-381.
- 9 Jin Z, Selaru FM, Cheng Y, *et al.* MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer *in vivo* and suppress ALCAM expression *in vitro*. *Oncogene*, 2011, 30(13): 1577-1585.
- 10 Feng S, Cong S, Zhang X, *et al.* MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(15): 6669-6678.
- 11 Boni V, Bitarte N, Cristobal I, *et al.* miR-192/miR-215 influence 5-Fluorouracil resistance through cell cycle-mediated mechanisms complementary to its post-transcriptional thymidilate synthase regulation. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(8): 2265-2275.
- 12 Akiyama T, Dass CR, Choong PF. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(12): 3173-3180.
- 13 Wang J, Zhou JY, Wu GS. Bim protein degradation contributes to cisplatin resistance. *J Biol Chem*, 2011, 286(25): 22384-22392.
- 14 Romano G, Acunzo M, Garofalo M, *et al.* miR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(41): 16570-16575.
- 15 Yan HJ, Liu WS, Sun WH, *et al.* miR-17-5p inhibitor enhances chemosensitivity to gemcitabine via upregulating Bim expression in pancreatic cancer cells. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3160-3167.

(收稿: 2014-03-28 修回: 2014-04-15)

(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Zhang F, Li Y, Wu H, *et al.* MiR-192 Confers Cisplatin Resistance by Targeting Bim in Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(5): 384-390. [张芳, 李洋, 吴衡, 等. 胸MiR-192靶向负调控 Bim表达诱导肺癌顺铂耐药. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(5): 384-390.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.05.04.

· 启事 ·

《转化医学电子杂志》征稿启事

《转化医学电子杂志》是经国家新闻出版广电总局批准, 中国人民解放军总后勤部主管, 第四军医大学出版社主办的专业电子学术期刊。杂志国际标准刊号: ISSN 2095-6894, 国内统一刊号: CN 61-9000/R。

本刊以全国各级医疗机构临床医护人员、医教科研人员及医药卫生管理者为主要读者对象, 开展学术交流, 服务军队和地方医学事业发展。现面向全国高等医学院校、卫生管理部门、医疗单位征集优秀学术论文。欢迎广大医学教育者、卫生管理人员、医学科研人员、医务工作者踊跃投稿, 我刊对老作者本人及推荐的稿件优先录用。本刊具有容稿量大、刊登周期短、信息时效高等特点。本刊免收审稿费, 凡刊登的稿件均赠当期杂志和光盘, 酌付稿酬。目前开设的主要栏目: 专家视野(述评)、基础与转化医学、预防与转化医学、生物医学工程与转化医学、临床与转化医学、短篇报告、医学教育、综述、转化医学动态与资讯、转化医学多媒体课件等。

投稿方式: 登录<http://www.ejotm.com>注册后在线投稿;

联系方式: 陕西省西安市新寺路569号第四军医大学唐都医院《转化医学电子杂志》编辑部。邮编: 710038, 联系电话: 029-84778169; E-mail: zhyxdzzz@126.com

热忱欢迎广大医务工作者踊跃投稿!