

microRNA-138 调节 SGTA 在非霍奇金淋巴瘤细胞黏附介导的耐药中的意义

吴雅珣 何松 徐小红

【摘要】 目的 分析 microRNA-138 (miR-138) 靶向调节小谷氨酰胺三角四肽重复区蛋白 α (SGTA) 在非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 细胞黏附介导的耐药 (cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR) 的影响。方法 以 HS-5 细胞或纤连蛋白 (FN) 构建 NHL 细胞黏附模型; Western blotting 与 RQ-PCR 分析 miR-138 对 SGTA 蛋白及 mRNA 表达的影响; 双荧光素酶报告基因活性检测分析 miR-138 对 SGTA mRNA 3'UTR 活性的影响; 分别用 miR-138 下调慢病毒载体 (Lv-shmiR-138)、miR-138 过表达慢病毒载体 (Lv-miR-138)、对照慢病毒载体 (Lv-Ctrl) 感染 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞, 分析 miR-138 对细胞周期、黏附能力及 CAM-DR 的影响; 收集 35 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的石蜡组织标本, 分析 miR-138 的表达情况及其与疾病进展和耐药关系。**结果** ① NHL 细胞与 FN 或 HS-5 细胞黏附培养后 miR-138 表达水平显著高于悬浮培养组 (P 值均 < 0.05)。② 下调 miR-138 的表达可增强 SGTA 蛋白的表达水平 (P 值均 < 0.05), 而对 SGTA mRNA 的表达水平无显著影响 (P 值均 > 0.05)。③ 转染野生型 SGTA 3'UTR 载体时, 过表达 miR-138 可显著抑制荧光素酶报告基因活性 (0.73 ± 0.03 对 1.00 ± 0.02 , $t = 0.914$, $P = 0.002$); 而转染结合位点突变的突变型载体时, 过表达 miR-138 不能显著改变报告基因活性 (0.93 ± 0.04 对 1.00 ± 0.02 , $t = 1.375$, $P = 0.241$)。④ 在悬浮及黏附培养状态下, 过表达 miR-138 可显著诱导 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞 G₁ 期停滞 (P 值均 < 0.05)。⑤ 下调 miR-138 的表达对 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞的黏附能力均无显著影响 (P 值均 > 0.05)。⑥ 在悬浮培养状态下下调 miR-138 的表达时, 多柔比星诱导细胞死亡的比例显著下降, 而在黏附培养状态下下调 miR-138 的表达, 多柔比星诱导细胞死亡的比例显著上升 (P 值均 < 0.05)。⑦ miR-138 在进展及稳定患者中的表达水平显著高于完全缓解以及部分缓解患者, 差异具有统计学意义 (9.72 ± 1.11 对 3.06 ± 0.22 , $t = 9.144$, $P < 0.001$)。**结论** 在黏附微环境中 miR-138 可通过靶向抑制 SGTA 诱导细胞周期 G₁ 期停滞促进 CAM-DR 进程。

【关键词】 非霍奇金淋巴瘤; 细胞黏附介导的耐药; 微 RNAs; SGTA

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81670196); 南通市科技项目 (HS2014076、HS2015003)

MicroRNA-138 regulates cell adhesion-mediated drug resistance phenotype by targeting SGTA in non-Hodgkin's lymphoma Wu Yaxun, He Song, Xu Xiaohong*. *Department of Oncology, Nantong Cancer Hospital, Nantong 226361, China*

Corresponding author: Xu Xiaohong, Email: xuxiaohongnantong@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the effects of miR-138 on the expression of small glutamine-rich TPR-containing protein A (SGTA) and cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) phenotype in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). **Methods** The adhesion model was constructed using fibronectin (FN) or bone marrow stromal cells HS-5. The effect of miR-138 on the expression of SGTA was analyzed by Western blotting and RQ-PCR. Dual-luciferase assays were performed to probe the effects of miR-138 on SGTA 3' UTR activities. Subsequently, we investigated the effect of miR-138 on cell cycle, adhesion ability and CAM-DR. Moreover, the correlation between miR-138 expression and therapeutic response was analyzed in 35 paraffin-embedded diffuse large B cell lymphoma samples. **Results** Our data showed that adhesion of NHL cells to FN or HS-5 cells significantly increased miR-138 expression ($P < 0.05$). Knockdown of miR-138 markedly increased the protein (all $P < 0.05$) but not for mRNA (all $P > 0.05$)

levels of SGTA in NHL cell. The luciferase activity of SGTA 3' UTR was significantly suppressed by miR-138 transfected cells (0.73 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.02 , $t = 0.914$, $P = 0.002$). No change in terms of reporter activity was observed in SGTA 3'UTR mutant transfected cells (0.93 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.02 , $t = 1.375$, $P = 0.241$). Also we found that ectopic expression of miR-138 significantly induced cell cycle arrest at G₁ phase in both suspension and adherent cells (all $P < 0.05$). Knockdown of miR-138 had no effect on cell adhesion ability (all $P > 0.05$). More importantly, in suspension cells, knockdown of miR-138 significantly decreased the percentage of doxorubicin-induced cell death. However, knockdown of miR-138 dramatically increased the percentage of doxorubicin-induced cell death in FN/HS-5-adherent cells. Furthermore, the miR-138 expression was significantly higher in patients with progression of disease/stable disease than those experiencing complete response/partial response (9.72 ± 1.11 vs 3.06 ± 0.22 , $t = 9.144$, $P < 0.001$).

Conclusion MiR-138 promoted CAM-DR phenotype through cell adhesion-mediated SGTA down-regulation and cell cycle arrest.

【Key words】 Non-Hodgkin's lymphoma; Cell adhesion-mediated drug resistance; Micro RNAs; SGTA

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670196); Nantong Science and Technology Project (HS2014076, HS2015003)

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是一组起源于淋巴结和结外淋巴组织的恶性肿瘤,肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是 NHL 复发或难治的主要原因。肿瘤细胞黏附微环境成分可使肿瘤细胞在微环境中受到庇护,介导耐药性的产生,称为细胞黏附介导的耐药(cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR)^[1-2]。

小谷氨酰胺三角四肽重复区蛋白 α (SGTA)是 SGT 家族的重要成员,参与内吞、病毒复制、有丝分裂、细胞凋亡等许多过程。有研究发现 SGTA 基因表达异常与食管鳞癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤的发生、发展密切相关^[3-5]。本课题组前期研究发现 SGTA 基因与 NHL CAM-DR 有关,敲低 SGTA 基因可显著诱导 CAM-DR^[6]。但 SGTA 调节 CAM-DR 的具体机制还不清楚。我们通过生物信息学预测分析发现 microRNA-138(miR-138)可潜在靶向 SGTA。基于此,本研究我们探讨 miR-138 靶向调节 SGTA 对 NHL 细胞 CAM-DR 的影响。

对象与方法

一、材料

1. 标本:以 2011 年 3 月至 2012 年 12 月南通市肿瘤医院收治的 35 例初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)患者治疗前的石蜡包埋组织标本为研究对象。所有患者均接受以蒽环类为基础的联合化疗,其中首次完全缓解(CR)6 例,部分缓解(PR)25 例,疾病稳定(SD)3 例,疾病进展(PD)1 例。

2. 细胞株:人 DLBCL 细胞株 OCI-Ly8 细胞由复旦大学附属肿瘤医院周晓燕教授惠赠;人伯基特淋巴瘤细胞株 Daudi 细胞购自中国科学院细胞库;骨

髓基质细胞 HS-5 购自上海拜力生物科技有限公司;293T 细胞由本室保存。OCI-Ly8、Daudi 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,HS-5 细胞培养于含 10%胎牛血清的 F12 培养基中,293T 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,每 3~4 d 传代 1 次。

3. 主要试剂:SGTA、GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;RPMI 1640、F12、DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;纤连蛋白(FN)、多柔比星、钙黄绿素购自美国 Sigma-Aldrich 公司;石蜡包埋组织切片 miRNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒、M-MLV 试剂盒购自美国 Promega 公司;TRIzol 购自上海普飞生物技术有限公司;逆转录引物、miRNA PCR 引物购自广州锐博生物科技有限公司;锥虫蓝染色细胞存活率检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

二、方法

1. 黏附模型构建:HS-5 细胞或 FN 包被过夜,吸去多余液体后在含单层 HS-5 细胞或 FN 的培养皿中加入 Daudi 或 OCI-Ly8 淋巴瘤细胞,继续培养 4~6 h 后收集淋巴瘤细胞。

2. 细胞黏附率测定:Daudi、OCI-Ly8 细胞悬浮培养或与 FN/HS-5 细胞黏附培养 6 h,去除未黏附细胞后,用 PBS 洗涤 2 次;加入 5 μ mol/L 钙黄绿素孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次;继续孵育 45 min;酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值。

3. 细胞转染:细胞接种到培养板中,更换基础培养基培养 2 h,基础培养基稀释质粒, Lipofectamine 2000 溶于基础培养基中,随后将以上

两溶液混匀, 孵育 15 min 后加至各孔, 37 °C 培养 6 h 后更换含有 10% 胎牛血清的完全培养基, 转染 48 h 后用于后续实验。

4. 慢病毒感染细胞: 分别用 miR-138 下调慢病毒载体(Lv-shmiR-138)、miR-138 过表达慢病毒载体(Lv-miR-138)、对照慢病毒载体(Lv-Ctrl)感染 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞, 感染 16 h 后收集细胞, 离心去上清, 更换为完全培养基继续培养; 观察感染 72 h 时感染效率, 并进行后续实验。

5. Western blot 方法检测 SGTA 蛋白表达水平: 取 Lv-shmiR-138、Lv-Ctrl 感染 72 h 的 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞, 悬浮培养或分别与 FN、HS-5 细胞黏附培养 6 h, 收集细胞裂解后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜转印后用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 二抗室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, ECL 液显影。

6. 流式细胞术测定细胞周期: 取 Lv-miR-138、Lv-Ctrl 感染 72 h 的 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞, 继续悬浮培养或与 FN 黏附培养, 6 h 后收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 70% 乙醇固定过夜, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 RNase A 孵育 20 min, 50 μg/ml PI 进行 DNA 染色, 上流式细胞仪分析细胞 DNA 含量, 观察细胞周期。

7. 锥虫蓝拒染实验检测细胞存活率: 取 Lv-shmiR-138、Lv-Ctrl 感染 72 h 的 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞, 继续悬浮培养或与 FN、HS-5 细胞黏附培养 6 h, 以 1.0 μmol/L 多柔比星刺激细胞 72 h, 将细胞悬液与 0.4% 锥虫蓝溶液按 9:1 混匀, 3 min 内计数细胞, 计算细胞存活率。

8. RQ-PCR 检测 miR-138 及 SGTA mRNA 表达水平: 以 U6 为内参, 检测 miR-138 的表达; 以 GAPDH 为内参, 检测 SGTA mRNA 的表达。收集各组细胞, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA 后对目的基因进行扩增。miR-138 和 U6 引物为广州锐博生物科技有限公司 Bulge-Loop™ miRNA RT-PCR Primer Set 以及 U6 snRNA qPCR Primer Set 试剂盒提供。SGTA 正向引物: 5'-CCTCTCGTCCGATGCTCAG-3'; SGTA 反向引物: 5'-CACTGTCTTCTACCGTCACCC-3'。GAPDH 正向引物: 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCT-3'; GAPDH 反向引物: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'。PCR 扩增参考 Gao 等^[7]的程序进行。

9. 石蜡包埋组织 miRNA 提取: 按照石蜡包埋组织切片 miRNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书提取 miRNA。

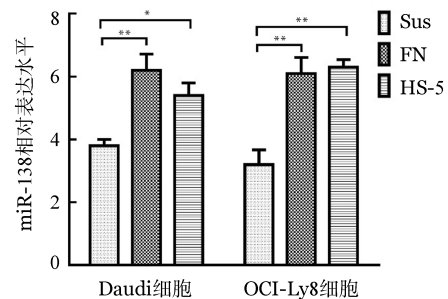
10. 双荧光素酶报告基因活性检测: 利用生物信息学方法预测 miR-138 与 SGTA 的结合位点, 将预测获得的 SGTA 3' UTR 上的 miR-138 潜在结合位点(表 1)克隆至 GV272 报告基因载体(GV272 载体购自上海吉凯基因科技有限公司), 从而构建野生型(WT)SGTA 3' UTR 荧光素酶报告载体; 利用相同的方法构建结合位点突变(表 1)的突变型(Mut)SGTA 3' UTR 荧光素酶报告载体。将构建获得的载体与 miR 质粒、Renilla 质粒共转入 293T 细胞, 以海肾荧光素酶活性为内参, 转染 48 h 后计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值。TRAF6 3' UTR 作为阳性参照 3' UTR, miR-146b 作为阳性参照 miRNA。

11. 统计学处理: 各组数据以均数±标准误表示, 组间数据比较采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 淋巴瘤细胞黏附到 FN 或 HS-5 细胞对 miR-138 表达的影响: 如图 1 所示, Daudi 细胞与 FN 或 HS-5 细胞黏附培养时 miR-138 的表达水平显著高于悬浮培养组(FN 黏附组对悬浮培养组: 6.20±0.52 对 3.80±0.20, *t* = 3.815, *P* = 0.005; HS-5 黏附组对悬浮培养组: 5.40±0.40 对 3.80±0.20, *t* = 3.577, *P* = 0.023); 与此相似, OCI-Ly8 细胞与 FN 或 HS-5 细胞黏附培养时 miR-138 表达水平也明显高于悬浮培养组(FN 黏附组对悬浮培养组: 6.10±0.51 对 3.20±0.47, *t* = 7.242, *P* = 0.001; HS-5 黏附组对悬浮培养组: 6.30±0.24 对 3.20±0.47, *t* = 10.174, *P* < 0.001)。

2. 下调 miR-138 对 SGTA 表达水平的影响: Daudi 及 OCI-Ly8 细胞感染 Lv-shmiR-138 后, miR-138 的表达水平较 Lv-Ctrl 感染组明显下降(Daudi



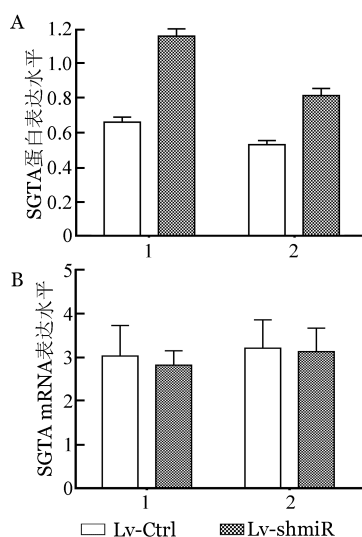
Sus: 淋巴瘤细胞悬浮培养; FN: 淋巴瘤细胞与 FN 黏附培养; HS-5: 淋巴瘤细胞与 HS-5 细胞黏附培养; **P* < 0.05, ***P* < 0.01

图 1 淋巴瘤细胞与纤连蛋白(FN)或 HS-5 细胞黏附培养对 miR-138 表达的影响(实验重复 3 次)

表1 miR-138与SGTA的结合位点

基因	结合位点
SGTA 3'UTR Mut	5'...CAGCAAGCUGAGCACAGCAACUACG...
SGTA 3'UTR(position: 235-241)	5'...CAGCAAGCUGAGCACAG <u>ACCAGCAG</u> ...
hsa-miR-138	3'...UGCCGGACUAAGUGUUGUGUCGAC...

细胞: 1.90 ± 0.40 对 6.50 ± 0.80 , $t = 5.143$, $P = 0.006$; OCI-Ly8 细胞: 1.60 ± 0.65 对 6.80 ± 0.60 , $t = 5.878$, $P = 0.004$ 。Western blotting 及 PCR 结果显示, 下调 miR-138 的表达可提高淋巴瘤细胞 SGTA 蛋白的表达水平 (P 值均 < 0.05 , 图 2A), 而对 SGTA mRNA 的表达水平无明显影响 (P 值均 > 0.05 , 图 2B)。



1: Daudi 细胞悬浮培养; 2: OCI-Ly8 细胞悬浮培养; Lv-Ctrl: 对照慢病毒载体; Lv-shmiR: miR-138 下调慢病毒载体

图2 下调 miR-138 对淋巴瘤细胞 SGTA 蛋白(A)及 mRNA(B)表达水平的影响(实验重复3次)

3. miR-138 对 SGTA mRNA 3' UTR 活性的影响: 我们通过构建野生型及突变型 SGTA 3' UTR 双荧光素酶报告基因载体分析发现, 当转染野生型 SGTA 3' UTR 载体时, 过表达 miR-138 可显著抑制荧光素酶报告基因活性 (0.73 ± 0.03 对 1.00 ± 0.02 , $t = 0.914$, $P = 0.002$), 而转染结合位点突变的突变型载体却不能显著改变报告基因活性 (0.93 ± 0.04 对 1.00 ± 0.02 , $t = 1.375$, $P = 0.241$) (图 3)。提示 miR-138 可特异性靶向结合 SGTA mRNA 3' UTR。

4. miR-138 对淋巴瘤细胞周期的影响: Lv-miR-138、Lv-Ctrl 感染 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞 72 h, Lv-miR-138 感染组 miR-138 的表达水平明显高于 Lv-Ctrl 感染组 (Daudi 细胞: 8.00 ± 0.52 对 5.70 ± 0.21 , $t = 4.101$, $P = 0.014$; OCI-Ly8 细胞: 8.40 ± 0.44 对

6.00 ± 0.37 , $t = 4.175$, $P = 0.013$)。在悬浮以及与 FN 黏附培养状态下, 过表达 miR-138 均可显著诱导 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞周期 G₁ 期停滞 (表 2)。

5. miR-138 对 NHL 细胞黏附能力的影响: Lv-shmiR-138 或 Lv-Ctrl 感染 Daudi 以及 OCI-Ly8 细胞 72 h 后构建黏附模型, 钙黄绿素染色分析显示下调 miR-138 的表达对 Daudi 以及 OCI-Ly8 细胞的黏附能力均无显著影响 (图 4)。

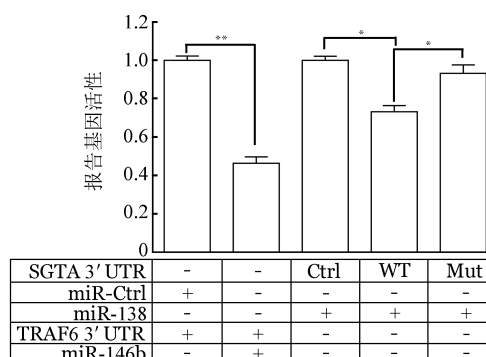
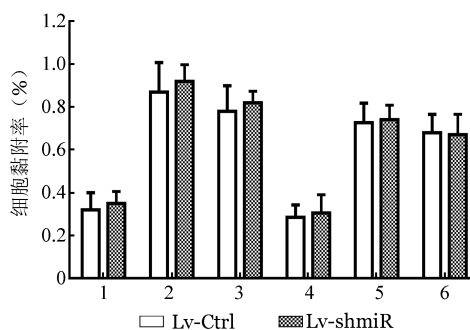


图3 miR-138 对 SGTA mRNA 3' UTR 活性的影响(实验重复3次; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)



1: Daudi 细胞悬浮培养; 2: Daudi 细胞与纤连蛋白黏附培养; 3: Daudi 细胞与 HS-5 细胞黏附培养; 4: OCI-Ly8 细胞悬浮培养; 5: OCI-Ly8 细胞与纤连蛋白黏附培养; 6: OCI-Ly8 细胞与 HS-5 细胞黏附培养; Lv-Ctrl: 对照慢病毒载体; Lv-shmiR: miR-138 下调慢病毒载体

图4 下调 miR-138 对 Daudi 及 OCI-Ly8 细胞黏附能力的影响(实验重复3次)

6. miR-138 对 CAM-DR 的影响: 锥虫蓝拒染实验显示, 在悬浮培养时 Lv-shmiR-138 感染组多柔比星诱导的细胞死亡比例显著低于 Lv-Ctrl 感染组 [Daudi 细胞: $(45.38 \pm 4.33)\%$ 对 $(69.28 \pm 5.41)\%$,

表2 过表达miR-138对Daudi及OCI-Ly8细胞G₁期细胞比例的影响(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	Lv-miR-138感染组	Lv-Ctrl感染组	t值	P值
Daudi细胞悬浮培养	52.14±4.21	35.20±3.52	3.085	0.036
Daudi细胞与FN黏附培养	67.30±4.73	48.40±3.84	3.102	0.036
OCI-Ly8细胞悬浮培养	53.50±1.05	38.20±0.82	11.484	<0.001
OCI-Ly8细胞与FN黏附培养	68.20±4.82	47.20±3.72	3.449	0.026

注:Lv-shmiR-138:miR-138过表达慢病毒载体;Lv-Ctrl:对照慢病毒载体;FN:纤连蛋白。实验重复3次

$t = 3.449, P = 0.026$; OCI-Ly8 细胞: $(33.40 \pm 9.21)\%$ 对 $(78.40 \pm 11.00)\%$, $t = 3.137, P = 0.034$ (图5); 而在黏附培养状态下, Lv-shmiR-138感染组多柔比星诱导的细胞死亡比例却显著高于Lv-Ctrl感染组 [Daudi细胞与FN黏附培养: $(63.27 \pm 7.56)\%$ 对 $(27.58 \pm 7.82)\%$, $t = 3.281, P = 0.030$; Daudi细胞与HS-5细胞黏附培养: $(58.83 \pm 9.82)\%$ 对 $(25.57 \pm 6.43)\%$, $t = 2.834, P = 0.047$; OCI-Ly8细胞与FN黏附培养: $(56.42 \pm 7.42)\%$ 对 $(28.24 \pm 6.27)\%$, $t = 2.901, P = 0.044$; OCI-Ly8细胞与HS-5黏附培养: $(61.23 \pm 6.33)\%$ 对 $(29.84 \pm 6.32)\%$, $t = 3.509, P = 0.024$] (图5)。提示miR-138在NHL细胞CAM-DR中有重要作用, 下调miR-138的表达可抑制CAM-DR。

7. miR-138表达水平对疗效的影响: 为了进一步分析基线miR-138对疗效的影响, 我们对35例初

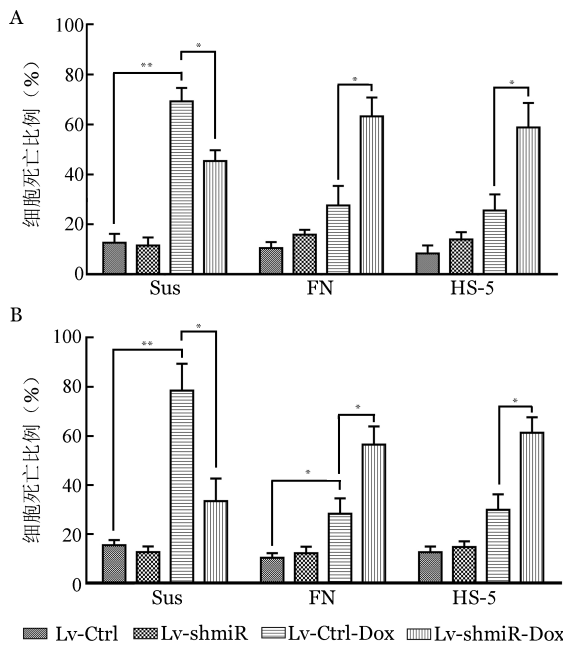
治DLBCL患者治疗前的石蜡包埋组织标本进行分析, 结果显示PD/SD患者(4例)miR-138表达水平显著高于CR/PR患者(31例), 差异有统计学意义 $(9.72 \pm 1.11$ 对 $3.06 \pm 0.22, t = 9.144, P < 0.001)$ 。

讨 论

大量研究表明, 在多发骨髓瘤、NHL等血液系统肿瘤中, 肿瘤细胞黏附到骨髓基质细胞或胞外基质将会促进耐药性的产生, 这种现象称为CAM-DR^[1-2]。CAM-DR产生的机制主要包括: ①黏附诱导细胞周期停滞于G₀/G₁期, 使肿瘤细胞处于相对静止状态, 从而使细胞周期特异性药物失效, 有利于肿瘤细胞逃脱化疗药物的杀伤作用; ②通过调节凋亡相关蛋白的表达抑制细胞凋亡, 为肿瘤细胞提供生存优势条件。其中, 细胞黏附引起p27^{Kip1}表达异常介导的细胞周期停滞是CAM-DR产生的重要原因。p27^{Kip1}是重要的细胞周期依赖性激酶抑制剂, 通过使G₁期特异性的CDK-cyclin复合物失活引起细胞周期的停滞^[8-9]。

大量研究表明, SGTA与多种肿瘤的发生、发展密切相关。在乳腺癌中, SGTA在癌组织中表达显著高于癌旁组织, 并且SGTA高表达乳腺癌患者预后较差, SGTA可能通过调节细胞周期进程促进乳腺癌的发生、发展^[10]。与此相似, SGTA在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织, SGTA的表达强度与胃癌患者的临床分期、组织学分级、浸润深度以及淋巴结转移情况密切相关^[11]。我们前期研究发现, SGTA在反应性增生淋巴组织和不同类型淋巴瘤中的表达存在差异: 在反应性增生淋巴组织中, SGTA主要表达在生发中心; 在弥漫大B细胞淋巴瘤和NK/T细胞淋巴瘤中SGTA弥漫强阳性; 而在MALT淋巴瘤中, SGTA呈弱阳性。我们还发现, 敲低SGTA基因可通过介导细胞周期停滞促进CAM-DR进程^[6]。然而, 其具体调节机制还不甚清楚。

有研究发现, miRNA表达异常与CAM-DR的产生有关。例如, 在NHL中miR-181a可通过介导Bim的下调促进CAM-DR^[12]。在肝癌、非小细胞肺



Sus: 悬浮培养; FN: 与纤连蛋白黏附培养; HS-5: 与HS-5细胞黏附培养; Lv-Ctrl: 对照慢病毒载体; Lv-shmiR: miR-138下调慢病毒载体; Lv-Ctrl-Dox: 对照慢病毒载体+1.0 μmol/L多柔比星; Lv-shmiR-Dox: miR-138下调慢病毒载体+1.0 μmol/L多柔比星。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 下调miR-138对Daudi(A)及OCI-Ly8(B)细胞黏附诱导的耐药的影响(实验重复3次)

癌、慢性髓性白血病中 miR-138 高表达可介导细胞周期 G₀/G₁ 停滞^[13-15]。我们的研究也证实在悬浮以及黏附培养状态下, 过表达 miR-138 均可显著诱导淋巴瘤细胞周期 G₁ 期停滞。且悬浮培养状态下抑制 miR-138 表达时多柔比星诱导细胞死亡的比例显著低于对照组 (P 值均 < 0.05); 而在黏附培养状态下, 抑制 miR-138 表达时多柔比星诱导细胞死亡的比例却显著高于对照组 (P 值均 < 0.05)。上述研究提示: 在黏附培养过程中抑制 miR-138 能显著抑制 CAM-DR, 增强药物敏感性。在悬浮及黏附培养过程中 miR-138 发挥的这种截然相反的作用, 可能与 miR-138 通过多种不同信号机制参与耐药性调节有关, 在黏附微环境中 miR-138 诱导细胞周期停滞可能占优势, 其可能通过诱导细胞周期 G₁ 期停滞参与 CAM-DR 进程。

近期, 瑞士学者研究发现 miR-138 高表达与胶质母细胞瘤耐药性的产生密切相关^[16]。我们对 35 例初治 DLBCL 患者治疗前的石蜡包埋组织标本进行分析, 结果显示 miR-138 在 PD/SD 患者中的表达水平显著高于 CR/PR 患者, 推测 miR-138 高表达可能是导致患者耐药的重要原因。但上述推测是否成立, 还需要后续进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kikuchi J, Koyama D, Wada T, et al. Phosphorylation-mediated EZH2 inactivation promotes drug resistance in multiple myeloma [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125 (12):4375-4390. DOI: 10.1172/JCI80325.
- [2] Lwin T, Crespo LA, Wu A, et al. Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis [J]. *Leukemia*, 2009, 23 (1):170-177. DOI: 10.1038/leu.2008.266.
- [3] Yang X, Cheng L, Li M, et al. High expression of SGTA in esophageal squamous cell carcinoma correlates with proliferation and poor prognosis [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115 (1):141-150. DOI: 10.1002/jcb.24641.
- [4] Trotta AP, Need EF, Selth LA, et al. Knockdown of the cochaperone SGTA results in the suppression of androgen and PI3K/Akt signaling and inhibition of prostate cancer cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133 (12):2812-2823. DOI: 10.1002/ijc.28310.
- [5] Zhu T, Ji Z, Xu C, et al. Expression and prognostic role of SGTA in human breast carcinoma correlates with tumor cell proliferation [J]. *J Mol Histol*, 2014, 45 (6):665-677. DOI: 10.1007/s10735-014-9586-z.
- [6] Wang Y, Huang Y, Xu X, et al. Expression of small glutamine-rich TPR-containing protein A (SGTA) in Non-Hodgkin's Lymphomas promotes tumor proliferation and reverses cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) [J]. *Leuk Res*, 2014, 38 (8):955-963. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.05.013.
- [7] Gao Y, Fan X, Li W, et al. miR-138-5p reverses gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells via negatively regulating G protein-coupled receptor 124 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446 (1):179-186. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.073.
- [8] Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, et al. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (38):4319-4327. DOI: 10.1038/sj.onc.1203782.
- [9] Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (6):1175-1182. DOI: 10.1038/sj.leu.2402924.
- [10] 周云海, 徐闻欢, 张翔, 等. 小谷氨酰胺三角四肽重复区蛋白 α 在乳腺癌组织的表达及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34 (9):1548-1551. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.09.034.
- [11] 张翔, 杜旭东, 周昱, 等. 胃癌组织中 SGTA 的表达及临床意义 [J]. *交通医学*, 2014, 28 (5):439-441.
- [12] Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a [J]. *Blood*, 2010, 116 (24):5228-5236. DOI: 10.1182/blood-2010-03-275925.
- [13] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (5):1113-1120. DOI: 10.1093/carcin/bgs113.
- [14] Li J, Wang Q, Wen R, et al. MiR-138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19 (12):2793-2805. DOI: 10.1111/jcmm.12666.
- [15] Xu C, Fu H, Gao L, et al. BCR-ABL/GATA1/miR-138 microRNA circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia [J]. *Oncogene*, 2014, 33 (1):44-54. DOI: 10.1038/onc.2012.557.
- [16] Stojcheva N, Schechtman G, Sass S, et al. MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (11):12937-12950. DOI: 10.18632/oncotarget.7346.

(收稿日期:2018-01-28)

(本文编辑:刘爽)