

本文引文格式:黄彩霞,张志文,吴龙俊云,等. LncGAS5 对肺癌细胞顺铂耐药性的调控机制[J].
右江民族医学院学报,2023,45(1):22-27,38.

【论著与临床报道】

LncGAS5 对肺癌细胞顺铂耐药性的调控机制

黄彩霞¹, 张志文¹, 吴龙俊云¹, 李也鹏²

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)生长阻滞特异性转录因子 5(GAS5)对肺癌细胞顺铂(DDP)耐药性的影响和调控机制。方法 采用 CCK8 法检测 A549、A549/DDP 细胞转染 sg-lncGAS5 后进行顺铂处理之后,对细胞存活率的影响。通过平板克隆形成实验检测 A549、A549/DDP 细胞经脂质体转染构建 lncGAS5 过表达模型,再用顺铂处理之后细胞的增殖能力的变化。通过 QPCR 实验技术定量检测 lncRNA GAS5 的表达量。通过生物信息学预测和双荧光素酶实验检测 293T 细胞中 GAS5 与 miR-152-3p mimics 之间的靶向互作关系。结果 在 A549 和 A549/DDP 细胞中感染 sg-lncGAS5 后,与 NC 组相比,sg-lncGAS5 组细胞存活率上调,差异有统计学意义($P < 0.001$)。在 A549 细胞中,OE-lncGAS5 组与 OE-NC 组相比克隆形成数减少($P < 0.001$),sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,克隆形成数增多($P < 0.001$);A549/DDP 细胞中,OE-lncGAS5 组与 OE-NC 组相比,克隆形成数减少($P < 0.001$),sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,克隆形成数增多($P < 0.001$)。根据 QPCR 检测结果显示,在 A549 和 A549/DDP 细胞中感染 sg-lncGAS5 病毒后,细胞中 lncGAS5 的表达下调($P < 0.001$)。根据双荧光素酶检测结果显示,与 GAS5-WT+miR-152-3p mimics NC 组的相对荧光强度(19.42 ± 0.38)相比,GAS5-WT+miR-152-3p mimics 组的相对荧光强度(15.80 ± 0.26)降低($P < 0.001$)。结论 转染 sg-lncGAS5 后,A549 和 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性下降;上调 lncRNA GAS5 表达可抑制 A549 和 A549/DDP 细胞增殖,增强 A549 和 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性,其调控机制可能与靶向调控 miR-152-3p 表达有关。

关键词:生长阻滞特异性转录因子 5;长链非编码 RNA;肺肿瘤;顺铂;耐药性

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)01-0022-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.004

Regulatory mechanism of LncGAS5 in cisplatin resistance of lung cancer cells

Huang Caixia¹, Zhang Zhiwen¹, Wu Longjunyun¹, Li Yepeng²

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence and regulatory mechanism of long chain non-coding RNA (lncRNA) growth arrest-specific transcript 5 (GAS5) in cisplatin (DDP) resistance of lung cancer cells.

Methods The CCK8 method was used to detect the effect of cisplatin treatment on the survival rate of A549 and A549/DDP cells transfected with sg-lncGAS5. Plate clone formation assay was employed to test the model of lncGAS5 overexpression constructed by liposome transfection in A549 and A549/DDP cells. The changes of proliferative capacity of the cells retreated with cisplatin were observed. The expression of lncRNA GAS5 was quantitatively detected by QPCR experimental technique. The targeted interaction relationship between GAS5 and miR-152-3p mimics in 293T cells was examined by bioinformatic prediction and dual-luciferase assay. **Results** Compared with the NC group, the sg-lncGAS5 group had up-regulated survival rate of cells after being

基金项目:广西自然科学基金面上项目(2020GXNSFAA259024);2021 年广西壮族自治区医疗卫生重点(培育)学科(自治区级);右江民族医学院附属医院重点培育学科-肿瘤内科(桂卫科教发[2022]4 号)

第一作者简介:黄彩霞(1994-),女,在读硕士研究生,研究方向:肺癌,E-mail:2543134772@qq.com

通讯作者简介:李也鹏(1976-),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:肺癌及免疫性疾病,E-mail:liyep28@hotmail.com

infected with sg-lncGAS5 in A549 and A549/DDP cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). In terms of A549 cells, the OE-lncGAS5 group had decreased number of clone formation in comparison with the OE-NC group ($P < 0.001$); the sg-lncGAS5 group had increased number of clone formation in comparison with the sg-NC group ($P < 0.001$). In terms of A549/DDP cells, the OE-lncGAS5 group had decreased number of clone formation in comparison with the OE-NC group ($P < 0.001$), while the sg-lncGAS5 group had increased number of clone formation in comparison with the sg-NC group ($P < 0.001$). According to the results of QPCR detection, the expression of lncGAS5 was down-regulated in A549 and A549/DDP cells after they were infected with sg-lncGAS5 virus ($P < 0.001$). According to the results of dual-luciferase assay, the GAS5-WT+miR-152-3p mimics group had a decrease of relative fluorescence intensity (15.80 ± 0.26) in comparison with the GAS5-WT+mimics NC group (19.42 ± 0.38) ($P < 0.001$). **Conclusion** The sensitivity of A549 and A549/DDP cells to cisplatin decreases after being transfected with sg-lncGAS5. Up-regulation of lncRNA GAS5 expression can inhibit the proliferation of A549 and A549/DDP cells and enhance the sensitivity of A549 and A549/DDP cells to cisplatin. The regulatory mechanism may be associated with the targeted regulation of miR-152-3p expressions.

Key words: growth arrest-specific transcript 5; long non-coding RNA; lung tumor; cisplatin; drug resistance

GLOBOCAN 2020 数据库显示,肺癌仍是导致癌症死亡的首要原因,估计有 1 796 144 人死于肺癌,占总体癌症死亡的 18.0%^[1]。目前顺铂仍是肺癌治疗的重要化疗药物,但其耐药性问题亦是临床用药时最大挑战之一^[2],尽管目前已经有关于研究克服顺铂化疗耐药的报道,但肺癌对顺铂耐药的具体潜在机制仍较少。因此,继续深入探索肺癌顺铂耐药的相关调控机制以克服顺铂耐药性显得尤为重要。长链非编码 RNA(lncRNA)是一种不具备编码蛋白质功能、长度超过 200 个核苷酸的 RNA,在多种细胞中发挥重要作用。生长阻滞特异性转录因子 5(growth arrest-specific transcript 5, GAS5)属于长链非编码 RNA,位于人类基因组 1 号染色体上,在细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物过程中起重要调控作用,GAS5 在大多数肿瘤组织中低表达,其与肿瘤发生、发展及预后密切相关^[3],探讨 GAS5 在肺癌中的作用机制,有望成为肺癌诊治的新思路。目前研究已表明 lncRNA-miRNA 的相互作用可调节基因的表达^[4],lncRNA 可以被沉默、下调表达及与 miRNA 相结合及调节蛋白表达来逆转顺铂耐药^[5-6]。本研究通过体外培养 A549 和 A549/DDP 细胞并经脂质体转染构建 lncGAS5 过表达模型等,探究 lncRNA GAS5 对肺癌细胞顺铂耐药性的影响及作用机制,以期为克服临床肺癌顺铂耐药提供有效靶点。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人肺癌细胞 A549、顺铂耐药细胞株(A549/DDP)购自上海北诺生物科技有限责任公司,293T 细胞源自国家实验细胞资源共享平台;A549、A549/DDP 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基,在 37 °C 饱和湿度、含 5% CO₂ 的培养

箱中培养。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 培养液(500 毫升/瓶,批号:C1199500BT)、胎牛血清(批号:42F71 80K)、胰酶(批号:25200072)、Opti-MEM 培养基(批号:31985070)、细胞冻存液购于美国 Gibco 公司,抗生素(批号:87020101100)购于 Genview 公司,Lipo 汉恒(批号:HB-LF-1000)购于汉恒生物公司,CCK8(批号:C0038)、4%多聚甲醛(批号:P0099-100 mL)、结晶紫(批号:C0121)购于上海碧云天生物技术有限公司,DMSO(批号:D2660)、DEPC 水(批号:40718)购于美国 Sigma 公司,Trizol 购于天根生化科技(北京)有限公司,氯仿购于福州市广博胶业有限公司,Perfect-Start Green qPCR SuperMix(批号:AQ601-04)购于北京全式金生物技术有限公司,异丙醇、无水乙醇购于国药集团化学试剂有限公司,DDP 购于右江民族医学院附属医院药房,1.5 mL EP 管、八连管及盖子、200 μ L EP 管购于上海百赛生物技术股份有限公司,6、24、96 孔细胞培养板购于美国 Coring 公司,oligidT 购于擎科生物有限公司(批号:E00381)、dNTPs(批号:GD1102)、RevertAid Reverse Transcriptase(批号:EP0441)、细胞培养瓶购于 Thermo Fisher 公司,双荧光素酶检测试剂盒(批号:E1910)购于 promega 公司,Lipofectamine3000(批号:L3000015)购于 Invitrogen 公司。实时荧光定量 PCR 仪购于 ABI 公司,超微量核酸分析仪购于杭州奥盛仪器有限公司,反渗透超纯水机购于科尔顿公司,PCR 仪购于北京东林昌盛科技有限公司,荧光素酶检测仪(Lux-T020)购于广东宝莱特医用科技股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 A549、A549/DDP 细胞用含 10%

胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养基,在 37 °C 饱和湿度、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞融合度为 70% 左右时,进行传代,用于后续实验研究。

1.3.2 细胞转染及铺板 取处于对数生长期的细胞,按密度为 3×10^5 个/孔,接种于 6 孔板中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜,待细胞长至 50%~60% 汇合度进行转染,用 125 μ L 不含血清的培养基孵育 4 μ g 的目的片段;125 μ L 不含血清的培养基孵育 8 μ L Lip-汉恒,静置 5 min;将含质粒和含有脂质体的培养基混合,混匀后室温静置 20 min,弃去板中原有培养基,加入无血清培养基,加入混合液,4~6 h 后换含血清的培养基培养 48 h,待质粒转染 48 h 后,再给顺铂处理 24 h,用于后续实验。

1.3.3 CCK8 实验检测细胞活力 细胞培养及转染同前,取生长状态良好的 A549、A549/DDP 细胞,以 6×10^3 个/孔接种至 96 孔板内,分为 Control、sg-NC、sg-lncGAS5 3 组,待细胞稳定后用顺铂处理 24 h,药物浓度:0 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、30 μ g/mL、40 μ g/mL、50 μ g/mL、60 μ g/mL。各组细胞在检测时间点时,每孔加 1/10 体积 CCK8,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。通过酶标仪测定各孔 450 nm 波长处光吸收值(OD 值),记录结果,根据 OD 值计算细胞活性,通过 Graphpad 软件计算并绘制细胞存活率曲线图。相对存活率=(实验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) \times 100%。

1.3.4 平板克隆实验检测细胞增殖情况 取处于对数生长期的肺癌细胞,按实验需要接种于 6 孔板中,密度为 3×10^5 个/孔,分为 Control 组、OE-NC 组、OE-lncGAS5 组、sg-NC 组、sg-lncGAS5 组,细胞转染方法同前。形成肉眼可见克隆团时,终止培养,用甲醇固定细胞,苏木精染色,计数细胞克隆团数目,显微镜下观察 ≥ 50 个细胞的集落数。将 6 孔板倒置于一张白纸上,放置在明亮处,用普通照相机拍照。

1.3.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测细胞中 LncRNA GAS5 表达 细胞培养及转染方法同前,实验分组:Control 组、LV-sg-NC 组、LV-sg-lncGAS5 组,待质粒转染 48 h 后,再给药(DDP 30 μ g/mL)处理 24 h,消化收集各组细胞,向细胞样本中加入 500 μ L Trizol,采用氯仿和异丙醇试剂提取细胞中总的 RNA,采用反转录试剂盒将其合成 cDNA。以 cDNA 作为扩增模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增反应。以 GAPDH 基因为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各个目的基因的相对表达量。引物设计:LncRNA GAS5(上游 5'-TTTCGAGGTATGGTGCTGGG-3'、5'-下游 CTGTGTGCCAATGGCTTGAG-3'),内参

GAPDH(下游 5'-GCTGTAGCCAAATCGTTGT-3'、上游 5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGA-3')。

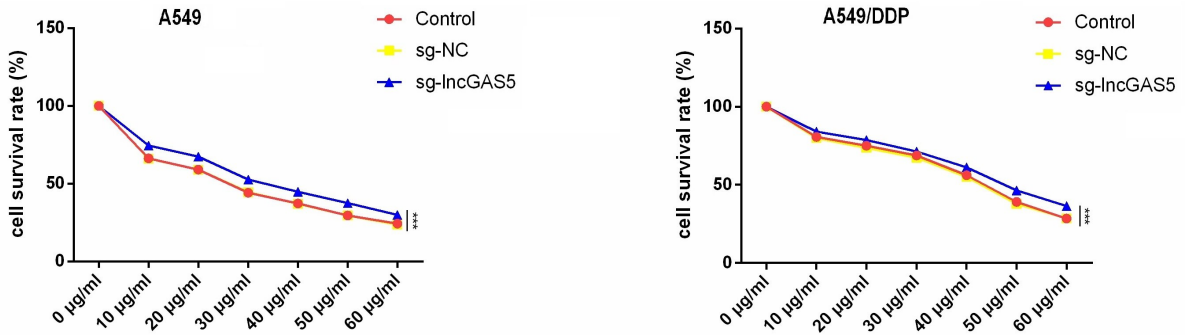
1.3.6 双荧光素酶实验检测 293T 细胞中 GAS5 与 miR-152-3p mimics 之间的靶向互作关系 根据生物信息学预测 GAS5 可能是 miR-152-3p 的靶基因,通过双荧光素酶报告基因实验验证 GAS5 可能是 miR-152-3p 的靶向关系。miR-152-3p 基因及相应对照组的 mimics 由上海吉玛制药技术有限公司合成,实验所需基因载体由华安平康生物科技有限公司合成。PH 常规培养 293T 细胞后,处于对数生长期时,按照密度为 3×10^4 个细胞/孔接种到 24 孔板中,分为 Control 组、GAS5-WT + mimics NC 组、GAS5-WT + miR-152-3p mimics 组、GAS5-Mut + mimics NC 组、GAS5-Mut + miR-152-3p mimics 组,细胞贴壁后采用 Lip 2000 将对应的质粒转入各组细胞中,转染 48 h 后,采用双荧光素酶报告基因试剂盒检测各组细胞荧光素酶活性。设置 3 个平行重复孔。计算两种荧光素酶比值(报告基因:内参基因),并比较不同组别的比值差异。

1.3.7 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 22.0 进行数据分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间均值的比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 检测细胞增殖能力的结果 如图 1 所示,A549 和 A549/DDP 细胞转染 sg-lncGAS5 后,与 NC 组相比,sg-lncGAS5 组细胞存活率上调。如表 1 所示,与 NC 组相比,sg-lncGAS5 组细胞的顺铂 IC₅₀ 升高,说明转染 sg-lncGAS5 后 A549 和 A549/DDP 细胞的顺铂化疗敏感性下降,促进了肺癌细胞的顺铂化疗耐药性。

2.2 平板克隆形成实验检测细胞增殖能力的结果 A549、A549/DDP 细胞经脂质体转染构建 lncGAS5 过表达模型,再用顺铂处理,通过平板克隆形成实验检测其增殖能力的变化如表 2 及图 2、图 3 所示,在 A549 细胞中,与 OE-NC 组相比,OE-lncGAS5 组克隆形成数减少($P < 0.001$),sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,克隆形成数增多($P < 0.001$);A549/DDP 细胞中,OE-lncGAS5 组与 OE-NC 组相比,克隆形成数减少($P < 0.001$),sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,克隆形成数增多($P < 0.001$)。结果提示:在 A549 和 A549/DDP 细胞中,OE-lncGAS5 组与 OE-NC 组相比,能够抑制细胞的增殖;sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,能够促进细胞的增殖。表明上调 lncGAS5 能抑制 A549 和 A549/DDP 细胞,反之,则促进细胞增殖。



Control:空白对照组,sg-NC:转染对照组,sg-lncGAS5:转染目的基因 lncGAS5 组。
 浓度为 0 μg/mL 的存活率为 100%;*** P<0.001。

图 1 A549、A549/DDP 各组细胞增殖曲线

表 1 肺癌细胞转染 sg-lncGAS5 后对顺铂化疗敏感性的影响结果

组别	n	IC50/(μg · mL ⁻¹)	
		A549	A549/DDP
Control 组	3	22.94±0.07	40.15±0.14
sg-NC 组	3	22.89±0.23	38.98±0.12
sg-lncGAS5 组	3	31.84±0.17 ^{ab}	48.32±0.61 ^{ab}
F		2756.315	573.824
P		<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。②与 Control 组相比,a: P<0.001;与 sg-NC 组相比,b: P<0.001。

表 2 A549 和 A549/DDP 各组细胞克隆形成情况

组别	n	克隆数	克隆形成率/%
A549			
Control 组	3	89.33±2.52	22.33±0.63
OE-NC 组	3	89.00±3.61	22.25±0.90
OE-lncGAS5 组	3	66.33±2.08 ^{bd}	16.58±0.52 ^{bd}
sg-NC 组	3	82.33±3.51 ^{ace}	20.58±0.89 ^{ace}
sg-lncGAS5 组	3	107.67±2.52 ^{bdf}	26.92±0.63 ^{bdf}
A549/DDP			
Control 组	3	115.33±2.52	28.83±0.63
OE-NC 组	3	113.33±4.16	28.33±1.04
OE-lncGAS5 组	3	76.33±1.52 ^{bd}	19.08±0.38 ^{bd}
sg-NC 组	3	106.67±1.53 ^{acf}	26.66±0.38 ^{acf}
sg-lncGAS5 组	3	125.00±2.00 ^{adfh}	31.25±0.50 ^{adfh}

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。②与 Control 组相比,a: P<0.05,b: P<0.001;与 OE-NC 组相比,c: P<0.05,d: P<0.001;与 OE-lncGAS5 组相比,e: P<0.05,f: P<0.001;与 sg-NC 组相比,g: P<0.05,h: P<0.001。

2.3 qPCR 实验技术定量检测在 A549 和 A549/DDP 细胞中 lncRNA GAS5 表达量 在 A549 和 A549/DDP 细胞中感染 sg-lncRNA GAS5 病毒后,与 LV-sg-NC 组相比,LV-sg-lncRNA GAS5 组的 lncGAS5 的表达降低(P<0.001),见图 4。

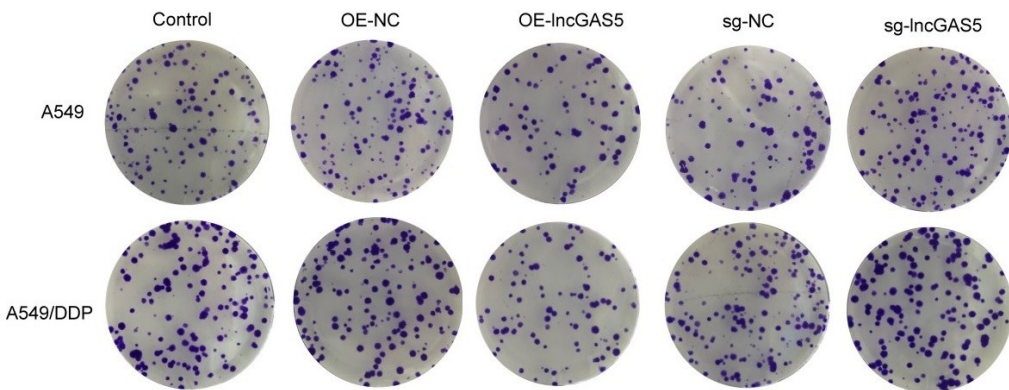
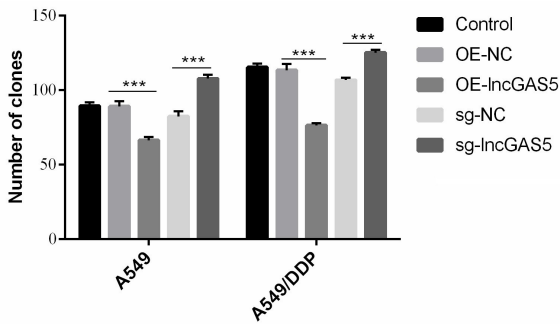


图 2 A549、549/DDP 各组细胞克隆形成结果图

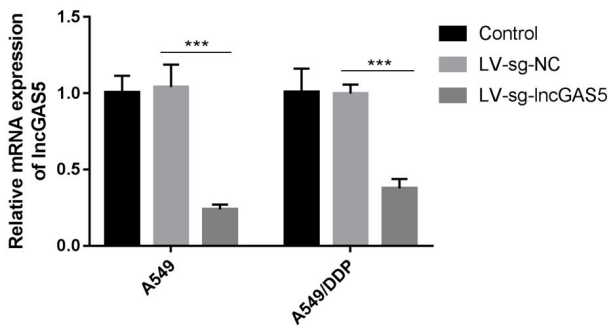
2.4 双荧光素酶实验检测 293T 细胞中 GAS5 与 miR-152-3p mimics 之间的靶向互作关系的结果 根据生物信息学预测(<https://cm.jefferson.edu/data-tools-downloads/rna22-full-sets-of-predictions/>、<http://starbase.sysu.edu.cn/>等),GAS5 可能是 miR-152-3p 的靶基因。根据双荧光素酶检测结果显示,与 GAS5-WT+mimics NC 组的相对荧光强度(19.42±

0.38)相比,GAS5-WT+miR-152-3p mimics 组的相对荧光强度(15.80±0.26)降低(P<0.001),提示 miR-152-3p 可与 GAS5 的基因序列相结合而减弱 GAS5 基因的表达量,表明 GAS5 与 miR-152-3p 之间可能存在着靶向关系,GAS5 可能是受 miR-152-3p 直接调控的靶基因,见图 5。



Control: 空白对照组, OE-NC: 过表达载体对照组, OE-lncGAS5: 过表达目的基因 lncGAS5 组, sg-NC: 转染对照组, sg-lncGAS5: 转染目的基因 lncRNA 组。*** $P < 0.001$ 。

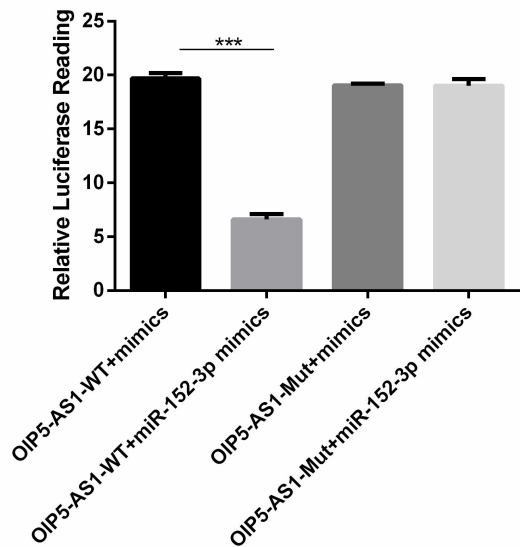
图 3 各组细胞克隆形成数柱状图



Control: 空白对照组, LV-sg-NC: 慢病毒转染对照组, LV-sg-lncGAS5: 慢病毒转染目的基因 lncGAS5 组。

*** $P < 0.001$ 。

图 4 基因表达检测结果



GAS5-WT + mimics: GAS5 野生型 + miRNA 模拟物组, GAS5-WT + miR-152-3p mimics: GAS5 野生型 + miR-152-3p miRNA 模拟物, GAS5-Mut + mimics: GAS5 突变型 + miRNA 模拟物组, GAS5-Mut + miR-152-3p mimics: GAS5 突变型 + miR-152-3p miRNA 模拟物组。*** $P < 0.001$ 。

图 5 双荧光素酶检测结果

3 讨论

肺癌目前仍是全人类癌症死亡率最大的疾病,发病率亦排癌症发病率中的第二,预计到 2050 年的肺癌发病人数可能达到 380 万,严重危害人类的生存^[7-8]。肺癌患者因诊断条件及早期无明显症状等而往往误了最佳治疗时间,尤其是错失手术的最佳时间,从而化疗成为肺癌不可或缺的临床治疗方式,而顺铂等铂类药物是重要的化疗药物,但往往因药物敏感性较低或耐药性问题而治疗效果不佳。因此,目前寻求逆转肺癌顺铂化疗耐药的方式尤为重要,深入探索导致肺癌顺铂耐药的分子机制等,可为肺癌化疗提供有效靶点克服顺铂耐药。本研究通过体外培养 A549 和 A549/DDP 细胞并经脂质体转染再加 DDP 处理等而构建细胞模型,探索肺癌顺铂化疗耐药的可能作用机制。

lncRNA 是非编码蛋白 RNA,而人类绝大部分基因组为非编码蛋白基因,它们不编码蛋白质,但在多个层面参与基因调控,其与肿瘤的增殖、侵袭等有关。lncRNA GAS5 的高表达可抑制细胞增殖、促进细胞凋亡;而 GAS5 的低表达可促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[4]。FU Y H 等^[9]发现, lncRNA GAS5 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的相对表达量明显低于癌旁正常组织,而增殖指数和表皮生长因子受体(Ki67、EGFR)过度表达,表明 lncRNA GAS5、Ki67 和 EGFR 的表达与肿瘤的进展、转移和预后有关。AL MOURGI M 等^[10]表明, GAS5 的下调与 NSCLC 患者的不良预后相关。YANG X H 等^[11-13]证实了 lncRNA GAS5 在降低非小细胞肺癌顺铂耐药性中的作用, GAS5 通过 miR-217/磷酸赖氨酸磷酸组氨酸无机焦磷酸性磷酸酶(LHPP)轴降低 NSCLC 的顺铂耐药性,通过抑制 miR-221-3p 和上调 IRF2 来调节 NSCLC 的进展, lncRNA GAS5 可通过影响 EMT 过程抑制肺癌的侵袭和迁移。这些表明 lncRNA GAS5 在肺癌的发生发展过程及肺癌顺铂化疗耐药中有重要作用,故本研究通过 CCK8 检测 A549、A549/DDP 细胞转染 sg-lncGAS5 后进行顺铂处理之后的细胞存活率及药物敏感性的影响; A549、A549/DDP 细胞经脂质体转染构建 lncGAS5 过表达模型,再用顺铂处理,通过平板克隆形成实验检测其增殖能力的变化,并通过 QPCR 实验技术定量检测 lncRNA GAS5 表达量。研究发现,与 NC 组相比, sg-lncGAS5 组细胞存活率显著上调,顺铂敏感性下降; OE-lncGAS5 组与 OE-NC 组相比,能够抑制细胞的增殖; sg-lncGAS5 组与 sg-NC 组相比,能够促进细胞的增殖;在 A549 和 A549/DDP 细胞中感染 sg-lncGAS5 病毒后,细胞中 lncGAS5 的表达下调。表明 lncRNA GAS5 过表达能抑制 A549、A549/DDP 细胞的增殖;降低 lncRNA GAS5

表达则会促进 A549、A549/DDP 细胞的增殖,提高细胞的存活率。提示 lncRNA GAS5 在 A549、A549/DDP 细胞中是下调的,过表达 lncRNA GAS5 可提高 A549、A549/DDP 细胞的顺铂化疗敏感性,反之,则会促进 A549、A549/DDP 细胞的顺铂化疗耐药性。

陈望等^[14]发现了 miR-152-3p 在肺癌患者血浆中浓度相对水平明显低于健康人群,对肺癌诊断有一定的作用。据一些功能实验表明^[15-17],miR-152-3p 被确定为 LINC01089 的功能靶点,miR-152-3p 可以逆转 LINC01089 的功能,LINC01089 的下调通过调节 miR-152-3p/PTEN 轴促进了 NSCLC 的进展;miR-152-3p 可能通过下调神经细胞黏附分子 1 (NCAM1) 来抑制 A549 细胞的增殖。此外,DNA 甲基转移酶 3B (DNMT3B)通过调节 miR-152-3p 核心区域的甲基化水平负向调节 miR-152-3p 的表达,从而介导肺癌细胞的增殖;miR-152-3p 可能是 LncRNA 前列腺癌基因表达标志物 1 (PCGEM1)的靶基因,并介导 PCGEM1 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响,PCGEM1/miR-152-3p 轴可能为 NSCLC 治疗提供新的治疗靶点。已有研究发现了 lncRNA 能通过靶向 miR-152-3p 调控膀胱癌、结直肠癌、胃癌等肿瘤的进展^[18-21]。这些均表明了 miR-152-3p 与相关 lncRNA 在胃癌、膀胱癌等存在靶向关系,miR-152-3p 在肺癌发生发展中起重要作用,对肺癌诊断及治疗有一定的价值;但 lncRNA GAS5 与 miR-152-3p 在肺癌耐药中是否存在靶向调控关系尚未明了,故探究其在肺癌中的相关作用机制以寻求逆转肺癌细胞耐药的作用靶点尤为重要,且根据生物信息学预测 GAS5 可能是 miR-152-3p 的靶基因,因此,本研究通过双荧光素酶实验检测 293T 细胞中 GAS5 与 miR-152-3p mimics 之间是否存在靶向互作关系,结果表明 GAS5 与 miR-152-3p 之间存在着靶向关系。

综上所述,转染 sg-lncRNA GAS5 后,肺癌细胞对顺铂的敏感性下降;lncRNA GAS5 过表达可显著抑制 A549 和 A549/DDP 细胞增殖,增强 A549 和 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性,其调控机制可能与靶向调控 miR-152-3p 表达有关,这可能成为 NSCLC 治疗的新靶点。但本研究未探索 lncRNA GAS5 过表达后对 A549、A549/DDP 细胞中的耐药蛋白表达的影响及在相关通路中的影响,未进一步研究 miR-152-3p 的表达与 lncRNA GAS5 表达水平的相关性等,有待后续进一步深入探索。

参考文献:

[1] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(3):63-69.

- [2] 赵茂媛. Aspirin 通过抑制肺癌细胞干性克服顺铂耐药[D]. 北京:北京协和医学院,2021.
- [3] 李明凯,詹浩炼,吴灵飞. 长链非编码 RNA GAS5 在肿瘤中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2019,27(3):175-182.
- [4] 程康文. 长链非编码 RNA Gas5 通过 miR-182-5p 对结直肠癌细胞增殖、凋亡影响的研究[D]. 南京:南京医科大学,2018.
- [5] ZHANG H D, LUO Y, XU W L, et al. Silencing long intergenic non-coding RNA 00707 enhances cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant non-small-cell lung cancer cells by sponging miR-145[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(6): 6261-6268.
- [6] 刘祯,曾治平,罗耀玲. LncRNA 与非小细胞肺癌顺铂耐药的研究进展[J]. 江西医药,2022,57(3):319-321.
- [7] HUANG J J, DENG Y Y, TIN M S, et al. Distribution, risk factors, and temporal trends for lung cancer incidence and mortality: a global analysis[J]. *Chest*, 2022, 161(4): 1101-1111.
- [8] SHARMA R. Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050[J]. *Int J Clin Oncol*, 2022, 27(4): 665-675.
- [9] FU Y H, LIU L R, ZHAN J B, et al. LncRNA GAS5 expression in non-small cell lung cancer tissues and its correlation with Ki67 and EGFR[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4900-4907.
- [10] AL MOURGI M, EL ASKARY A, GHARIB A F, et al. Circulating long non-coding RNA GAS5: a non-invasive molecular marker for prognosis, response to treatment and survival in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Invest*, 2021, 39(6-7): 505-513.
- [11] YANG X H, MENG L F, ZHONG Y A, et al. The long intergenic noncoding RNA GAS5 reduces cisplatin-resistance in non-small cell lung cancer through the miR-217/LHPP axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(2): 2864-2884.
- [12] MA J, MIAO H Y, ZHANG H Y, et al. LncRNA GAS5 modulates the progression of non-small cell lung cancer through repressing miR-221-3p and up-regulating IRF2[J]. *Diagn Pathol*, 2021, 16(1): 46.
- [13] ZHU L H, ZHOU D S, GUO T X, et al. LncRNA GAS5 inhibits invasion and migration of lung cancer through influencing EMT process[J]. *J Cancer*, 2021, 12(11): 3291-3298.
- [14] 陈望,刘和录,刘琼,等. 血浆 miR-152-3p 作为肺癌诊治指标的临床价值[J]. 海南医学,2017,28(12):1959-1961.

(下转第 38 页)

2021,48(1):113-114.

- [5] 曹方瑞. 灵芝酸 A 药代动力学及灵芝潜在药物相互作用研究[D]. 北京:北京协和医学院,2017.
- [6] 邢康康,刘艳,贺宗毅,等. 灵芝酸研究进展[J]. 食用菌学报,2017,24(3):96-103.
- [7] 袁旭,李政,王晓天,等. 中药及其有效成分在抗癫痫中的作用与机制[J]. 中国中药杂志,2019,44(1):9-18.
- [8] YUE W,LIU Y X,ZANG D L,et al. Inhibitory effects of succinic acid on chemical kindling and amygdala electrical kindling in rats[J]. Acta Pharmacol Sin,2002,23(9):847-850.
- [9] 卢淑卿. 钙感受器在灵芝酸 A 干预癫痫大鼠模型脑组织中的表达研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学,2020.
- [10] 赵蓓莹. 单一延长刺激引起大鼠海马髓鞘及突触囊泡相关蛋白表达变化的研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2021.
- [11] BUCHER M,FANUTZA T,MIKHAYLOVA M. Cytoskeletal makeup of the synapse:shaft versus spine[J]. Cytoskeleton (Hoboken),2020,77(3-4):55-64.
- [12] AVILA J,SOUSA M M,SAYAS C L. Editorial:shaping

the brain by neuronal cytoskeleton:from development to disease and degeneration[J]. Front Cell Neurosci,2020,14:12.

- [13] 宋兆莹,宫瑾,王颖,等. 海人酸致痫 SD 大鼠海马神经元树突棘的可塑性变化[J]. 大连医科大学学报,2019,41(5):389-395.
- [14] 农雪娟,覃丽娜,黄瑜,等. 灵芝三萜联合外源性 GM1 对癫痫大鼠认知功能和海马突触结构的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2022,31(10):918-925.
- [15] LI Y,ZHAO L,GU B Y,et al. Aerobic exercise regulates Rho/cofilin pathways to rescue synaptic loss in aged rats [J]. PLoS One,2017,12(2):e0171491.
- [16] 岑丽兰,杨茜. eEF2K 在癫痫突触可塑性的研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2022,44(1):99-103.
- [17] 农雪娟,金佳熹,周冰玉,等. 灵芝三萜对癫痫大鼠学习记忆损伤的效果[J]. 中国康复理论与实践,2020,26(4):440-446.

收稿日期:2022-10-19;修回日期:2022-11-16

(上接第 27 页)

- [15] YANG B,HUANG S Q,CHEN H M,et al. DNMT3B regulates proliferation of A549 cells through the miRNA-152-3p/NCAM1 pathway [J]. Oncol Lett,2022,23(1):11.
- [16] LOU J,HUANG J H,LIU X N,et al. LncRNA PCG-sEM1 contributes to the proliferation,migration and invasion of non-small cell lung cancer cells via acting as a sponge for miR-152-3p[J]. CURR PHARM DESIGN,2021,27(46):4663-4670.
- [17] ZHANG H X,ZHANG H,LI X Y,et al. LINC01089 functions as a ceRNA for miR-152-3p to inhibit non-small lung cancer progression through regulating PTEN [J]. Cancer Cell Int,2021,21(1):143.
- [18] YANG Y,GONG P F,YAO D W,et al. LncRNA HCG18 promotes clear cell renal cell carcinoma pro-

gression by targeting miR-152-3p to upregulate RAB14 [J]. Cancer Manag Res,2021,13(null):2287-2294.

- [19] MA P,LI L H,LIU F,et al. HNF1A-induced lncRNA HCG18 facilitates gastric cancer progression by upregulating DNAJB12 via miR-152-3p[J]. Onco Targets Ther,2020,13:7641-7652.
- [20] SUN L B,ZHAO S F,ZHU J J,et al. Long noncoding RNA UCID sponges miR-152-3p to promote colorectal cancer cell migration and invasion via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncol Rep,2020,44(3):1194-1205.
- [21] ZHANG C,WANG W,LIN J,et al. lncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation,migration and invasion[J]. Int Braz J Urol,2019,45(3):549-559.

收稿日期:2022-10-14;修回日期:2022-10-24