

LncRNA MALAT1对骨肉瘤细胞阿霉素耐药性的影响机制研究[△]

梁福东*,狄淑芳,罗伟,齐江华,刘利兵[#](甘肃省肿瘤医院骨软一科,兰州 730050)

中图分类号 R979.1+4;R738.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)06-0698-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.06.10



摘要 目的 探讨长链非编码RNA(LncRNA)肺腺癌转移相关转录本1(MALAT1)与骨肉瘤(OS)细胞阿霉素(DOX)耐药性的关系及作用机制。方法 将MG-63和MG-63/DOX细胞用不同浓度DOX(0、0.01、0.05、0.1、1 μmol/L)处理后,以CCK-8法检测其存活率和半数抑制浓度(IC₅₀);采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测MG-63和MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1表达。将MG-63/DOX细胞分为Control(对照)组、敲低LncRNA MALAT1的阴性对照(sh-NC)组、sh-MALAT1组、sh-MALAT1+抑制(anti)-NC组、sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组。检测各组MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1、miR-154-5p、细胞周期素D1(CCND1)mRNA相对表达量,采用CCK-8法、划痕实验、Transwell实验、流式细胞仪分别检测敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响;采用Western blot法检测MG-63/DOX细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、CCND1蛋白的表达;采用双荧光素酶报告基因实验检测LncRNA MALAT1与miR-154-5p、miR-154-5p与CCND1之间的相互作用。结果 与0 μmol/L DOX比较,0.01、0.05、0.1、1 μmol/L DOX均能降低MG-63和MG-63/DOX细胞(0.01 μmol/L DOX除外)的存活率($P<0.05$),IC₅₀分别为0.07、0.13 μmol/L。sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞存活率、迁移数、侵袭数、划痕愈合率、LncRNA MALAT1 mRNA表达、CCND1 mRNA和蛋白表达、PCNA蛋白表达均显著低于sh-NC组、Control组,细胞凋亡率和miR-154-5p表达显著高于sh-NC组、Control组($P<0.05$);相较于sh-MALAT1组,sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组的上述生物学作用均被逆转($P<0.05$)。在转染MALAT1-野生型(WT)和CCND1-WT的MG-63/DOX细胞中,miR-154-5p模拟物(mimic)组的荧光素酶活性均显著低于其阴性对照组($P<0.05$)。结论 敲低LncRNA MALAT1可以抑制OS细胞的DOX耐药性,其机制可能是通过靶向miR-154-5p/CCND1轴实现的。
关键词 长链非编码RNA;肺腺癌转移相关转录本1;微小RNA-154-5p;细胞周期蛋白D1;骨肉瘤;阿霉素;耐药性

Effect mechanism of LncRNA MALAT1 on doxorubicin resistance in osteosarcoma cells

LIANG Fudong, DI Shufang, LUO Wei, QI Jianghua, LIU Libing (First Department of Orthopaedics, Gansu Cancer Hospital, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the relationship of long non-coding RNA (LncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) and doxorubicin (DOX) resistance in osteosarcoma (OS) cells. **METHODS** MG-63 and MG-63/DOX cells were treated with different concentrations of DOX (0, 0.01, 0.05, 0.1, 1 μmol/L), and survival rates and half maximal inhibitory concentration were determined using CCK-8 assay. The expressions of LncRNA MALAT1 in MG-63 and MG-63/DOX cells were detected by real-time quantitative fluorescence PCR. MG-63/DOX cells were divided into Control group, knocking down LncRNA MALAT1 negative control (sh-NC) group, sh-MALAT1 group, sh-MALAT1+anti-NC group, and sh-MALAT1+anti-miR-154-5p group. The expressions of LncRNA MALAT1, miR-154-5p and cyclin D1 (CCND1) mRNA in MG-63/DOX cells of each group were detected. The effects of knocking down LncRNA MALAT1 on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of MG-63/DOX cells were detected by CCK-8 assay, scratch test, Transwell experiment and flow cytometry, respectively. The expression of proliferating cell nuclear protein (PCNA) and CCND1 protein in MG-63/DOX cells was detected by Western blot assay. Interactions between LncRNA MALAT1 and miR-154-5p, miR-154-5p and CCND1 were detected by dual luciferase reporter gene experiment. **RESULTS** Compared with 0 μmol/L DOX, 0.01, 0.05, 0.1 and 1 μmol/L DOX could reduce the survival rates of MG-63 and MG-63/DOX cells (except for 0.01 μmol/L DOX) ($P<0.05$), IC₅₀ were 0.07 and 0.13 μmol/L, respectively. The survival rate, cell migration number and invasion number of MG-63/DOX cells, scratch closure rate, mRNA expressions of LncRNA MALAT1, mRNA and protein expressions of CCND1, and PCNA protein expression in sh-MALAT1 group were significantly lower than sh-NC group and Control group; the apoptosis rate and miR-154-5p expression were significantly higher than sh-NC group and Control group ($P<0.05$). sh-MALAT1+anti-miR-154-5p group was able to reverse the aforementioned biological effects in sh-MALAT1 group ($P<0.05$). In MG-63/DOX cells transfected with both MALAT1-wild type (WT) and CCND1-WT, the luciferase activity in the miR-154-5p mimic group was significantly lower than mimic negative control group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Knocking down LncRNA MALAT1 can inhibit the DOX resistance of OS cells, and its mechanism may be targeting the miR-154-5p/CCND1 axis.

KEYWORDS long non-coding RNA; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; miR-154-5p; cyclin D1; osteosarcoma; doxorubicin; drug resistance

[△]基金项目 甘肃省自然科学基金资助项目(No.24JRRA1149)

*第一作者 主治医师,硕士。研究方向:骨与软组织肿瘤的诊治。

E-mail:15193122021@163.com。

[#]通信作者 主治医师,硕士。研究方向:骨与软组织肿瘤的诊治。

E-mail:59472913@qq.com

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是儿童和青少年最常见的原发性恶性骨肿瘤,其主要发生在长骨干骺端,如股骨、胫骨和肱骨,容易侵袭局部组织并进一步发展为全身转移^[1]。OS的治疗方法包括手术切除和化疗。研究显示,非转移性OS患者的5年生存率达70%^[2],但OS患者仍面临化疗耐药、局部复发、肺转移等诸多挑战。化疗耐药可分为原发性耐药和获得性耐药,阿霉素(doxorubicin, DOX)为OS的常用化疗药物,约50%的OS患者因DOX获得性耐药而影响了治疗效果^[3]。因此,了解OS细胞DOX化疗耐药的分子机制对开发新的治疗方法并最终改善OS患者的预后至关重要。

目前已发现有多种RNA[如长链非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)等]参与调控OS的进展、转移和化学耐药性^[4]。肺腺癌转移相关转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)在哺乳动物中广泛表达并具有进化保守性,研究显示,LncRNA MALAT1是OS的潜在治疗靶点^[5]。有报道发现,LncRNA MALAT1可以调控乳腺癌的进展和DOX耐药性^[6],但其能否调节OS的耐药性尚不清楚。miR-154-5p可在多种癌症中发挥抑癌基因作用,相关研究显示,miR-154-5p在DOX耐药OS细胞中表达下调^[7]。细胞周期素D1(cyclin D1, CCND1)位于人11q13染色体上,可参与包括OS在内的多种癌症细胞周期和肿瘤增殖的调控^[8]。本研究团队前期利用Starbase网站分析发现,LncRNA MALAT1与miR-154-5p、miR-154-5p与CCND1之间存在潜在的结合位点。基于此,本研究拟探讨LncRNA MALAT1靶向miR-154-5p/CCND1轴与OS细胞DOX耐药性的关系及可能的作用机制,以期克服OS的化疗耐药性,进而提高其治疗效果。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括DMi1型倒置显微镜(德国Leica公司)、MSFLO型流式细胞仪(杭州谱育科技发展有限公司)、9003021型实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)仪[凯杰企业管理(上海)有限公司]、Multi-skan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、RCCS-4HD型细胞培养仪(美国Synthecon公司)。

1.2 主要药品与试剂

DOX(货号51410ES10,纯度≥98%)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;敲低LncRNA MALAT1(sh-MALAT1)及其阴性对照(sh-NC)、抑制miR-154-5p(anti-miR-154-5p)及其阴性对照(anti-NC)质粒均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;DMEM培养基(货号iCell-0003)购自镜像绮点(上海)细胞技术有限公司;总RNA提取试剂盒(TRIZOL法)、含脱氧核糖核酸酶I逆转录试剂盒(货号分别为EZB-TZ1-L、RT3C)均购自上海海方生物技术有限公司;RT-qPCR检测试剂盒

(货号QPG-023)购自上海吉玛制药技术有限公司;CCK-8细胞增殖检测试剂盒(货号HB-CCK-8)购自汉恒生物工程(上海)有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(货号70-APCC101)购自杭州联科生物技术股份有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒(货号KL1DBE095)购自上海康朗生物科技有限公司;特超敏ECL化学发光检测试剂盒(货号EUL002)购自广州博鹭腾生物科技有限公司;荧光素酶报告基因测试盒(货号SLLU-200)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、兔源增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、兔源CCND1、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(货号分别为ab226408、ab201673、ab16663、ab9482)均购自英国Abcam公司;PCR引物由苏州艾比拓生物技术有限公司设计、合成。

1.3 细胞来源

OS亲代细胞MG-63、耐DOX的OS细胞MG-63/DOX(货号分别为AM7868、AM7872)均购自美国典型菌种保藏中心。

2 方法

2.1 MG-63和MG-63/DOX细胞对DOX的敏感性检测

分别将悬浮在200 μL培养基(含细胞 5×10^3 个)中的MG-63和MG-63/DOX细胞接种于96孔板,分别加入0、0.01、0.05、0.1、1 μmol/L的DOX处理(采用浓度梯度筛选确定浓度),作为实验组,选择未经任何处理的正常细胞作为对照组,没有细胞只有培养基等其他成分的作为空白组,在37 °C、5%CO₂条件下孵育24 h后,每孔加入体积为10 μL的CCK-8试剂,于37 °C下孵育2 h,使用酶标仪于450 nm波长处检测光密度(optical density, OD),每组设3个复孔,每次2个平行,计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC₅₀),细胞存活率(%)=(实验组OD-空白组OD)/(对照组OD-空白组OD)×100%。

2.2 MG-63和MG-63/DOX细胞LncRNA MALAT1表达检测

采用RT-qPCR法检测。使用Trizol试剂提取MG-63和MG-63/DOX细胞的总RNA,合成cDNA,LncRNA MALAT1以GAPDH为内参,配置20 μL的反应体系:定量酶10 μL,cDNA 1 μL,正、反向引物各1 μL,去离子水7 μL;反应条件:98 °C变性10 s,57 °C退火30 s,68 °C延伸45 s,共35个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算MG-63和MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1的相对表达量。引物序列及产物长度见表1。

表1 qRT-PCR引物序列及产物长度

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	产物长度/bp
LncRNA MALAT1	GACGGAGGTGAGATGAAGC	ATTCGGGGCTCTGTAGTCTCT	84
miR-154-5p	GCCTTCGCTCAACTGAATG	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTC	93
CCND1	GGATGCTGGAGGTCTGCGA	AGAGGCCACGAACATGCAAG	146
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTACCAATTTCGG	96
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCCGAGTCA	AATGAAGGGTCAATTGATGG	109

2.3 miR-154-5p/CCND1轴与LncRNA MALAT1靶向关系的验证

2.3.1 细胞分组与转染

将10%胎牛血清加入含0.1 μmol DOX(根据“2.1”项下结果确定)的DMEM培养基,培养MG-63/DOX细胞,每2~3 d进行换液。取对数生长期的MG-63/DOX细胞分为Control组(正常培养)、sh-NC组、sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组、sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组,分别转染相应质粒。

2.3.2 LncRNA MALAT1、miR-154-5p、CCND1 mRNA检测

采用“2.2”项下方法检测各组MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1、miR-154-5p(内参U6)、CCND1 mRNA(内参GAPDH)的相对表达量,以验证转染效率。

2.3.3 MG-63/DOX细胞增殖检测

采用CCK-8法检测。根据“2.3.1”项下方法将MG-63/DOX细胞进行分组,再按“2.1”项下操作检测各组细胞的增殖情况,并计算细胞存活率。

2.3.4 MG-63/DOX细胞迁移和侵袭检测

(1)采用划痕实验检测。根据“2.3.1”项下方法进行分组,接种500个MG-63/DOX细胞于6孔板至80%~90%融合时,用10 μL移液器枪头取细胞悬浮液在培养皿中间划痕,于0、24 h在显微镜下观察细胞的形态变化,并计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(初始划痕宽度-细胞迁移距离)/初始划痕宽度×100%。

(2)采用Transwell实验检测。根据“2.3.1”项下方法将MG-63/DOX细胞进行分组。在侵袭实验上室预涂Matrigel基质胶,收集转染的MG-63/DOX细胞,将细胞重悬于200 μL无血清培养基中,以 2×10^4 个/孔加入上室,下室加入500 μL含20%胎牛血清的培养基,孵育36 h后,固定上室膜并染色,在显微镜下随机选择5个视野,统计迁移或侵袭细胞数。

2.3.5 MG-63/DOX细胞凋亡检测

采用流式细胞仪检测。根据“2.3.1”项下方法将MG-63/DOX细胞进行分组。收集细胞,重悬调整密度为 1.0×10^6 个/mL,加入100 μL含有Annexin V-FITC/PI的溶液中,室温孵育20 min后,加入500 μL孵育缓冲液,检测细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

2.3.6 MG-63/DOX细胞中PCNA、CCND1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。根据“2.3.1”项下方法将MG-63/DOX细胞进行分组。采用改良的RIPA裂解液和苯甲基磺酰氟裂解细胞,提取蛋白质,采用BCA法检测蛋白浓度,再用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到聚偏氟乙烯膜上与GAPDH(稀释度1:1 000)、PCNA(稀释度1:5 000)、CCND1(稀释度1:500)特异性抗体共同孵育,再加入二抗(稀释度1:1 000),室温孵育1 h。采用Image J软件分析,以目标蛋

白与GAPDH条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.3.7 LncRNA MALAT1、miR-154-5p、CCND1相互作用检测

采用双荧光素酶报告基因实验检测。将LncRNA MALAT1-野生型(wild type, WT)和LncRNA MALAT1-突变型(mutated type, MUT)、CCND1-MUT和CCND1-WT片段分别克隆到pmirGLO载体中,再与miR-154-5p模拟物(mimic)和其阴性对照(mimic-NC)共转染到MG-63/DOX细胞中,48 h后检测荧光素酶活性,以分析LncRNA MALAT1与miR-154-5p、miR-154-5p与CCND1之间的相互作用。

2.4 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行数据分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较使用LSD-*t*检验;两组间比较采用独立样本*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 不同浓度DOX中MG-63和MG-63/DOX细胞存活率比较

与0 μmol/L DOX组比较,0.01、0.05、0.1、1 μmol/L DOX组MG-63细胞和MG-63/DOX细胞(0.01 μmol/L DOX组除外)存活率均显著降低($P<0.05$),详见表2。经计算,DOX对MG-63细胞的 IC_{50} 为0.07 μmol/L,对MG-63/DOX细胞的 IC_{50} 为0.13 μmol/L。

表2 不同浓度DOX中MG-63和MG-63/DOX细胞存活率比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

DOX浓度/(μmol/L)	MG-63细胞	MG-63/DOX细胞
0	100	100
0.01	84.52±9.08 ^a	91.85±9.49
0.05	63.59±8.16 ^a	76.54±8.27 ^a
0.1	39.28±7.43 ^a	53.85±7.32 ^a
1	21.32±6.27 ^a	32.59±6.34 ^a

a:与0 μmol/L组比较, $P<0.05$ 。

3.2 MG-63和MG-63/DOX细胞LncRNA MALAT1 mRNA表达检测结果

MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1 mRNA相对表达量显著高于MG-63细胞(2.36 ± 0.35 vs. 1.00 ± 0.32 , $P<0.05$)。

3.3 敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞中DOX耐药相关mRNA表达的影响

sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞中LncRNA MALAT1、CCND1 mRNA相对表达量显著低于Control组、sh-NC组,miR-154-5p相对表达量显著高于Control组、sh-NC组($P<0.05$);sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞中CCND1 mRNA相对表达量显著高于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组,miR-154-5p相对表达量显著低于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组MG-63/DOX细胞DOX耐药相关mRNA及蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LncRNA MALAT1 mRNA	miR-154-5p	CCND1 mRNA	PCNA/GAPDH	CCND1/GAPDH
Control组	0.99 ± 0.13	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.20	1.18 ± 0.18	0.94 ± 0.21
sh-NC组	1.03 ± 0.14	0.93 ± 0.31	0.98 ± 0.20	1.21 ± 0.18	0.91 ± 0.19
sh-MALAT1组	0.32 ± 0.10 ^{ab}	2.05 ± 0.42 ^{ab}	0.47 ± 0.15 ^{ab}	0.43 ± 0.12 ^{ab}	0.25 ± 0.08 ^{ab}
sh-MALAT1+anti-NC组	0.28 ± 0.09	2.09 ± 0.43	0.48 ± 0.15	0.41 ± 0.12	0.28 ± 0.09
sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组	0.31 ± 0.10	1.31 ± 0.36 ^{cd}	0.86 ± 0.17 ^{cd}	0.92 ± 0.14 ^{cd}	0.79 ± 0.16 ^{cd}

a: 与Control组比较, $P < 0.05$; b: 与sh-NC组比较, $P < 0.05$; c: 与sh-MALAT1组比较, $P < 0.05$; d: 与sh-MALAT1+anti-NC组比较, $P < 0.05$ 。

3.4 敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞增殖的影响

sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞存活率显著低于Control组、sh-NC组($P < 0.05$)；sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞存活率显著高于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P < 0.05$)。结果见表4。

表4 各组MG-63/DOX细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡相关指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	存活率/%	划痕愈合率/%	迁移数/个	侵袭数/个	凋亡率/%
Control组	100	41.76 ± 5.26	113.59 ± 12.57	81.34 ± 8.26	0.49 ± 0.13
sh-NC组	98.74 ± 10.09	41.94 ± 4.32	114.82 ± 12.16	79.25 ± 8.03	0.44 ± 0.11
sh-MALAT1组	56.34 ± 8.25 ^{ab}	19.34 ± 3.62 ^{ab}	72.47 ± 10.28 ^{ab}	46.58 ± 5.41 ^{ab}	34.52 ± 3.59 ^{ab}
sh-MALAT1+anti-NC组	55.29 ± 8.09	18.49 ± 3.51	71.34 ± 10.05	44.51 ± 5.37	35.31 ± 3.67
sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组	82.57 ± 9.32 ^{cd}	36.58 ± 4.74 ^{cd}	94.28 ± 11.34 ^{cd}	67.57 ± 7.25 ^{cd}	12.48 ± 1.84 ^{cd}

a: 与Control组比较, $P < 0.05$; b: 与sh-NC组比较, $P < 0.05$; c: 与sh-MALAT1组比较, $P < 0.05$; d: 与sh-MALAT1+anti-NC组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞迁移的影响

划痕实验结果显示, sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞划痕愈合率显著低于Control组、sh-NC组($P < 0.05$)；sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞划痕愈合率显著高于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P < 0.05$)。结果见表4、图1。

Transwell实验结果显示, sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞迁移数和侵袭数均显著低于Control组、sh-NC组($P < 0.05$)；sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞迁移数和侵袭数均显著高于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P < 0.05$)。结果见表4。

3.6 敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞凋亡的影响

sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞凋亡率显著高于Control组、sh-NC组($P < 0.05$)；sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞凋亡率显著低于sh-MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P < 0.05$)。结果见表4、图2。

3.7 敲低LncRNA MALAT1对MG-63/DOX细胞中PCNA、CCND1蛋白表达的影响

sh-MALAT1组MG-63/DOX细胞中PCNA、CCND1蛋白相对表达量均显著低于Control组、sh-NC组($P < 0.05$)；sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组MG-63/DOX细胞中PCNA、CCND1蛋白相对表达量均显著高于sh-

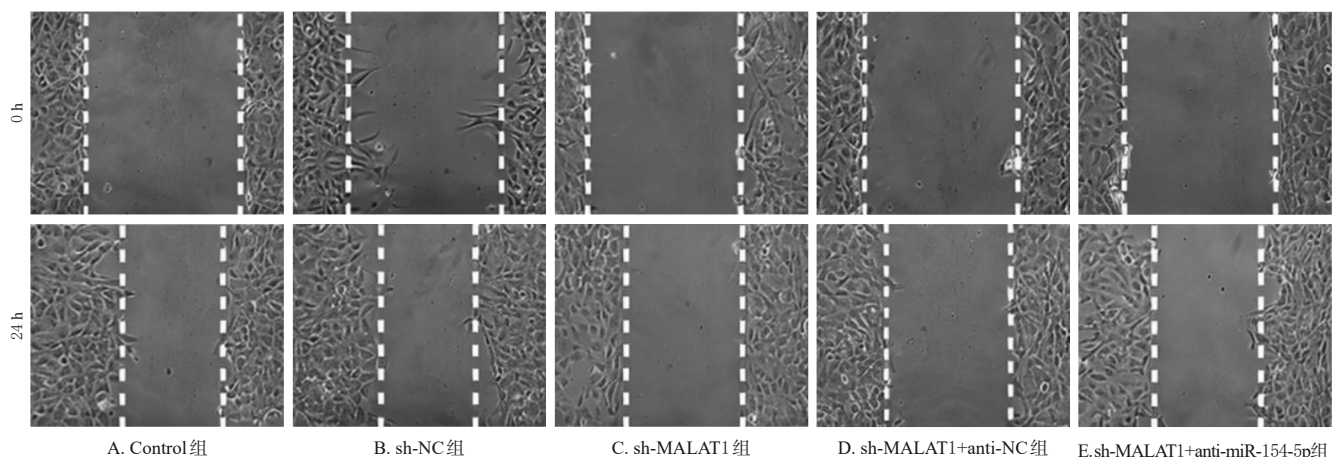


图1 MG-63/DOX细胞迁移的划痕实验图

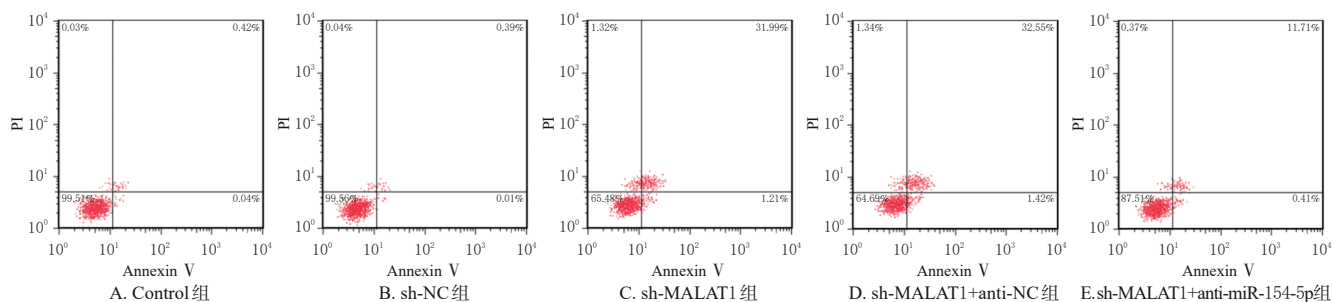
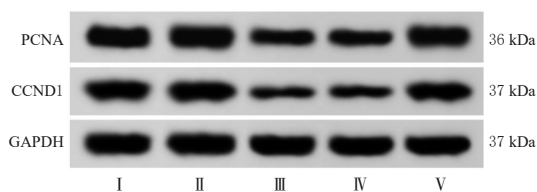


图2 MG-63/DOX细胞凋亡流式图

MALAT1组、sh-MALAT1+anti-NC组($P<0.05$)。结果见表3、图3。



I: Control组; II: sh-NC组; III: sh-MALAT1组; IV: sh-MALAT1+anti-NC组; V: sh-MALAT1+anti-miR-154-5p组。

图3 MG-63/DOX细胞中PCNA、CCND1蛋白表达电泳图

3.8 荧光素酶活性检测结果

在转染MALAT1-WT和CCND1-WT的MG-63/DOX细胞中,与mimic-NC组比较,miR-154-5p mimic组的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。结果见表5。

表5 两组荧光素酶活性比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MALAT1-WT	MALAT1-MUT	CCND1-WT	CCND1-MUT
mimic-NC组	1.00±0.14	0.98±0.29	1.00±0.16	1.00±0.33
miR-154-5p mimic组	0.33±0.10 ^a	0.91±0.27	0.46±0.14 ^a	1.05±0.36

a: 与mimic-NC组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

OS由产生类骨质或未成熟骨骼的间充质细胞组成,具有恶性程度高、侵袭性强、易复发、易早期远处转移的特点,约40%的OS患者在最初诊断时已经发生转移^[9]。DOX是OS患者常用的化疗药物之一,DOX可以破坏DNA的合成和复制,通过多种方式诱导癌细胞死亡^[10]。研究发现,长期使用DOX等化疗药物可导致耐药性的产生^[11]。OS对DOX的耐药是一个多因素过程,其作用机制尚不清晰。本研究通过探讨OS细胞对DOX耐药的分子机制,以期改善OS患者的治疗效果和预后。

4.1 敲低LncRNA MALAT1通过抑制OS细胞对DOX的耐药性

LncRNA凭借其一级序列和空间结构,可以与DNA、RNA和蛋白质相互作用,在各种生物过程和疾病中发挥调控作用^[12]。LncRNA MALAT1在OS中发挥致癌基因作用,Yang等^[13]研究显示,LncRNA MALAT1表达上调与OS患者较低的生存率有关,LncRNA MALAT1过表达可通过靶向miR-873-5p/Rho相关蛋白激酶信号轴,促进OS细胞的增殖、迁移、侵袭,抑制OS细胞凋亡。Li等^[14]研究显示,骨髓间充质干细胞来源的细胞外囊泡可通过调控LncRNA MALAT1/miR-143/神经膜蛋白2/Wnt/ β -连环蛋白轴在体外促进OS细胞的增殖、侵袭和迁移,在体内促进裸鼠肿瘤生长。Yue等^[6]研究显示,抑制LncRNA MALAT1可上调miR-570-3p表达,从而抑制耐DOX乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提高乳腺癌细胞对DOX的敏感性。本研究发现,在DOX耐药OS细胞中敲低LncRNA MALAT1可以抑制DOX耐药OS细胞的增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡,提示敲低LncRNA MALAT1可能通过抑制DOX耐药OS细胞的恶性生物学行为,抑制OS的进展,增强化疗

敏感性,进而提高OS的治疗效果。

4.2 敲低LncRNA MALAT1通过上调miR-154-5p的表达抑制OS细胞的DOX耐药性

miRNA是一组内源性的非编码RNA,LncRNA与编码RNA共享miRNA反应元件,LncRNA可以海绵化miRNA并促进其靶标mRNA的翻译^[15]。Tian等^[16]研究显示,OS组织中的miR-154-5p表达下调,过表达miR-154-5p可抑制E2F转录因子5的表达,进而抑制OS细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。Zhou等^[17]研究显示,过表达circ-ATAD1可抑制miR-154-5p的表达,从而促进OS细胞的侵袭和迁移。本研究团队前期利用Starbase网站分析发现,LncRNA MALAT1与miR-154-5p之间存在靶向结合位点。本研究结果表明,LncRNA MALAT1可以靶向负调控miR-154-5p;敲低LncRNA MALAT1导致miR-154-5p表达上调,而抑制miR-154-5p则可以逆转敲低LncRNA MALAT1对DOX耐药OS细胞生物学的作用,提示敲低LncRNA MALAT1可能通过上调miR-154-5p表达抑制DOX耐药OS细胞的恶性生物学行为,提高OS细胞对DOX的敏感性。

4.3 miR-154-5p通过靶向负调控CCND1抑制OS细胞的DOX耐药性

CCND1是一种效应基因,在真核细胞中普遍存在,其主要功能是调节细胞从G1期向S期转变进而参与细胞周期进程,在多种癌症组织中呈高表达^[18]。Xin等^[19]研究显示,过表达CCND1和细胞分裂周期蛋白34(cell division cyclin 34,CDC34)能促进OS细胞增殖,调节细胞周期;体内外实验均显示,过表达的miR-671-5p可以靶向负调控CCND1和CDC34的表达,抑制OS细胞的增殖,导致细胞周期停滞,可作为OS治疗干预的新靶点。Yang等^[20]研究显示,LncRNA FLVCR-AS1可通过下调miR381-3p、上调CCND1的表达来促进OS生长。Li等^[21]研究显示,在对DOX耐药的OS细胞中,CCND1的转录水平显著高于原始细胞,LncRNA人浆细胞瘤转化迁移基因1(plasmacytoma variant translocation gene 1,PVT1)在OS细胞中的过表达伴随着CCND1的上调,进而促进OS细胞对DOX产生耐药性,且LncRNA PVT1诱导的耐药性可以通过敲低CCND1来有效减弱。此外,既往研究表明,LncRNA MALAT1可以靶向负调控miR-154-5p,通过降低miR-154-5p表达,并上调水通道蛋白9的表达来促进慢性收缩性损伤大鼠神经性疼痛的进展^[22]。本研究结果显示,miR-154-5p与CCND1之间存在靶向结合位点,miR-154-5p可以靶向负调控CCND1,敲低LncRNA MALAT1可使CCND1 mRNA和蛋白表达下调,而抑制miR-154-5p则可使CCND1表达上调,提示LncRNA MALAT1可能通过海绵化miR-154-5p促进CCND1高表达,促进OS细胞对DOX耐药,LncRNA MALAT1/miR-154-5p/CCND1轴可作为OS化疗耐药性的潜在治疗靶点。

综上所述,敲低LncRNA MALAT1可以抑制OS细胞的DOX耐药性,其机制可能是通过靶向miR-154-5p/CCND1轴实现的。然而,本研究局限于细胞实验,后续将增加动物实验进行深入研究。

参考文献

- [1] WANG X, ZHOU T J, YANG X, et al. DDRGK1 enhances osteosarcoma chemoresistance via inhibiting KEAP1-mediated NRF2 ubiquitination[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(14): e2204438.
- [2] GUAN H P, XU H, CHEN J S, et al. Circ_0001721 enhances doxorubicin resistance and promotes tumorigenesis in osteosarcoma through miR-758/TCF₄ axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 336.
- [3] 叶天宝,张振宇,王伯仁,等. 多柔比星对人骨肉瘤细胞P-糖蛋白表达的影响[J]. *锦州医科大学学报*, 2022, 43(3): 53-56.
- YE T B, ZHANG Z Y, WANG B R, et al. Effect of doxorubicin on P-glycoprotein expression in human osteosarcoma cells[J]. *J Jinzhou Med Univ*, 2022, 43(3): 53-56.
- [4] WAN D Q, QU Y, ZHANG L, et al. The LncRNA LINC00691 functions as a ceRNA for miRNA-1256 to suppress osteosarcoma by regulating the expression of ST5[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 13171-13181.
- [5] LIU J X, SHANG G N. The roles of noncoding RNAs in the development of osteosarcoma stem cells and potential therapeutic targets[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 773038.
- [6] YUE X, WU W Y, DONG M, et al. LncRNA MALAT1 promotes breast cancer progression and doxorubicin resistance via regulating miR-570-3p[J]. *Biomed J*, 2021, 44(6 Suppl. 2): S296-S304.
- [7] FEI D, YUAN H P, ZHAO M M, et al. LncRNA FGD5-AS1 potentiates autophagy-associated doxorubicin resistance by regulating the miR-154-5p/WNT5A axis in osteosarcoma[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(11): 1937-1946.
- [8] NICULESCU Ş A, GRECU D C, SIMIONESCU C E, et al. Immunoexpression of Ki67, p53 and cyclin D1 in osteosarcomas[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2021, 62(3): 743-750.
- [9] SHOAIB Z, FAN T M, IRUDAYARAJ J M K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(2): 201-217.
- [10] LI R, RUAN Q, ZHENG J, et al. LINC01116 promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma by epigenetically silencing miR-424-5p and inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 632206.
- [11] GODEL M, MORENA D, ANANTHANARAYANAN P, et al. Small nucleolar RNAs determine resistance to doxorubicin in human osteosarcoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4500.
- [12] LIN C S, MIAO J F, HE J L, et al. The regulatory mechanism of LncRNA-mediated ceRNA network in osteosarcoma[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8756.
- [13] YANG F, WANG M, SHI J L, et al. LncRNA MALAT1 regulates the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma cells by targeting miR-873-5p/ROCK1[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2023, 33(2): 67-79.
- [14] LI F J, CHEN X, SHANG C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles promote proliferation, invasion and migration of osteosarcoma cells via the LncRNA MALAT1/miR-143/NRSN2/Wnt/β-catenin axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 737-749.
- [15] 范金柱,从飞,张文韬,等. Circ_0001461靶向抑制miR-30a-5p对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(8): 1413-1418.
- FAN J Z, CONG F, ZHANG W T, et al. The effect of circ_0001461 targeting inhibition of miR-30a-5p on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells[J]. *Prog Mod Biomed*, 2022, 22(8): 1413-1418.
- [16] TIAN Q, GU Y F, WANG F F, et al. Upregulation of miRNA-154-5p prevents the tumorigenesis of osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109884.
- [17] ZHOU J H, XU L, YANG P, et al. Circ-ATAD1 is overexpressed in osteosarcoma (OS) and suppresses the maturation of miR-154-5p to increase cell invasion and migration[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 699.
- [18] VALLA M, KLÆSTAD E, YTTERHUS B, et al. CCND1 amplification in breast cancer-associations with proliferation, histopathological grade, molecular subtype and prognosis[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2022, 27(1): 67-77.
- [19] XIN C F, LU S T, LI Y, et al. miR-671-5p inhibits tumor proliferation by blocking cell cycle in osteosarcoma[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(9): 996-1004.
- [20] YANG G, HE F, DUAN H, et al. LncRNA FLVCR-AS1 promotes osteosarcoma growth by targeting miR381-3p/CCND1[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 163-172.
- [21] LI Z, TIAN J M, CHU Y, et al. Long non-coding RNA PVT1 (PVT1) affects the expression of CCND1 and promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma cells[J]. *J Bone Oncol*, 2023, 43: 100512.
- [22] WU J P, WANG C G, DING H Y. LncRNA MALAT1 promotes neuropathic pain progression through the miR-154-5p/AQP9 axis in CCI rat models[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 291-303.

(收稿日期:2024-09-27 修回日期:2025-02-18)
(编辑:舒安琴)