

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.19.002

lncRNA XIST-miR137-ATG5 调节细胞自噬功能在肠癌细胞 5- 氟胞嘧啶耐药性中的作用 *

李 吉 徐 莹 褚以恣 蒯 榕 周 璐 张海芹

(上海交通大学医学院附属同仁医院(上海市同仁医院)内窥镜室 上海 200336)

摘要 目的:本文旨在研究长链非编码 RNA XIST-miR137-ATG5 的相互作用,同时探讨其调节细胞自噬功能与肠癌细胞 5- 氟胞嘧啶敏感性的关系。**方法:**实时聚合酶链反应(real time PCR)检测 XIST 与 miR-137 在肠癌细胞中的表达;采用脂质体转染法将 si-XIST, miR-137 转染入肠癌 SW480 及 HCT116 细胞中。采用 CCK-8 检测瞬时转染 si-XIST 对肠癌细胞增殖及 5-FU 敏感性的影响;并利用双荧光素酶报告实验检测 miR-137 与 XIST, miR-137 与 ATG5 相互关系。Western blot 方法检测 XIST- miR137-ATG5 对细胞自噬的影响。**结果:**与正常结肠细胞 FHC 比较, XIST 在结肠癌细胞系明显高表达, miR-137 在结肠癌细胞系明显低表达。与阴性对照组比较,转染 si-XIST 后, SW480 及 HCT116 细胞增殖能力明显受到抑制,对 5-FU 的敏感性增强,且抑制自噬蛋白 Beclin-1 及 LC3II/LC3 I 的表达。miR-137 可与 XIST, ATG5 3'UTR 结合,抑制 XIST 和 ATG5 的表达及功能。在结肠癌 SW480 细胞中共转染 miR-137 inhibitor 或过表达 ATG5 可逆转 XIST 沉默引起的 5-FU 耐药,同时可逆转因 XIST 沉默引起的自噬蛋白表达的抑制。**结论:**LncRNA XIST 或可通过调控 miR137-ATG 促进结肠癌细胞 SW480 自噬从而提高其对 5-FU 的耐药,针对其这一机制,可为将来针对结肠癌的靶向治疗提供一定的实验基础。

关键词:microRNA; XIST; 结肠癌; 细胞自噬; 化疗敏感性

中图分类号:R-33; R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)19-3609-07

LncRNA XIST-miR137-ATG5 Mediate Cell Autophagy to Attenuate 5-FU Resistance in Colorectal Cancer Cells to 5-FU*

LI Ji, XU Ying, CHU Yi-min, KUAI Rong, ZHOU Lu, ZHANG Hai-qin

(Digestive Endoscopy Center, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200336, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the interaction of long noncoding RNA X-inactive specific transcript (XIST) -miR137-ATG5 and explore the relationship between its function of autophagy mediating and 5-FU sensitivity in colorectal cancer cells. **Methods:** The relative expressions of XIST and miR-137 in colorectal cancer cell lines were detected by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The lipofection assay was utilized in XIST and miR-137 transfection experiments. CCK-8 assay was used to detect cell viability and the 5-FU sensitivity in colorectal cancer cells. Moreover, luciferase reporter system was used to determine binding ability between miR-137 and XIST or ATG5. Additionally, indicating protein expressions were determined by western blotting. **Results:** We found that XIST expression was increased in CRC cells comparing to normal colon cell FHC, which showed a negative correlation with miR-137 expression. In addition, XIST knockdown noticeably inhibited the proliferation of CRC cells and enhanced 5-FU sensitivity. It revealed that XIST knockdown suppressed the expression of Beclin-1 and ratio of LC3II/I. miR-137 was validated to target XIST and 3'UTR of ATG5, playing an important role in restraining the expression and function of XIST and ATG5. Inhibition of miR-137 or over-expression of ATG5 could effectively reverse elevated 5-FU sensitivity upon XIST knockdown in SW480. **Conclusion:** It is suggested that LncRNA XIST could target miR-137 promoting autophagy to facilitate 5-FU chemoresistance in CRC and XIST-miR137-ATG5 may serve as a potential therapeutic target for patients with colorectal cancers.

Key words: microRNA; XIST; Colorectal cancer; Autophagy; Chemoresistance

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)19-3609-07

前言

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,为第 3 位最常见恶性肿瘤,其死亡率占恶性肿瘤第 4

* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会青年项目(20174Y0084);上海交通大学医工(理)交叉基金项目(ZH2018QNB24)

作者简介:李吉(1980-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:消化道肿瘤分子靶向治疗临床研究,

电话:18121226585, E-mail: li_li1900@126.com, LJ1723@shtrhospital.com

(收稿日期:2020-02-28 接受日期:2020-03-23)

位^[1]。目前,基于氟尿嘧啶和铂类药物的化疗依然是结肠癌的标准治疗方案但其在结肠癌患者中不断上升的耐药性问题限制了其在临床上的应用^[1]。微小 RNA(microRNA,长度在 19~25nt 的短链非编码 RNA)和长链非编码 RNA(lncRNA,长度大于 200nt 的非编码 RNA)为代表的非编码 RNA 在结直肠癌的发生发展及治疗中发挥重要作用^[2,3]。有研究报道 lncRNA 通过吸附 miRNA 作用于自噬相关基因从而肿瘤细胞对化疗,激素治疗等治疗方法抵抗提供有利环境^[4,5]。长链非编码 RNA XIST (lncRNA-X-inactive specific transcript, XIST) 是 XIST 基因的转录产物,其在肿瘤中高表达且作为癌基因参与肿瘤进展的调控,有多篇文献报道其通过与 miR-137 结合产生交互作用,共同参与靶向基因的调控,对肿瘤的发生发展过程产生重要影响^[6-8]。本研究拟以人结肠癌细胞系为研究对象,检测其 XIST, miR-137 的表达及其与自噬相关基因的相互作用,揭示其对结肠癌细胞化疗敏感性的影响,将为结肠癌的靶向诊断治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人结肠癌细胞株 HCT-116、HT29、SW480、LS174T、SW620、DLD-1 购自中国科学院上海生命科学院细胞库;人正常结肠上皮细胞 FHC 购自上海沪震生物科技有限公司;DMEM 高糖培养基,DMEM-F12 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清、细胞用青霉素/链霉素和 EDTA 胰酶购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂购自日本同仁化学研究所;总 RNA 分离提取试剂 TRIzol、转染试剂 lipofectamine™ 3000 购自美国 invitrogen 公司;反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 检测试剂购于宝日医生物技术(北京)有限公司;4%多聚甲醛购自生工生物工程(上海)股份有限公司;结晶紫染色液、蛋白提取 RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测试剂盒,鼠抗人 b-actin 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记抗体(HRP)抗鼠及抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。ECL 化学发光试剂盒购自德国 Millipore 公司。荧光素酶报告系统质粒购自美国 Promega 公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,靶向 lncRNA XIST 的小干扰 RNA 及阴性对照 si-NC、has-mir-137 mimics 购自上海吉玛制药技术有限公司,序列见表 1 和表 2。

表 1 siRNA 序列

Table 1 Sequences of small interfering RNAs(siRNAs)

siRNA	siRNA Sequence(5'-3')
si-NC	GTTCTCCGAACGTGTCACGT
si-XIST	GCTGCAGCCATATTTCTACT

si-NC: Negative control siRNA.

表 2 microRNA 序列

Table 2 Sequences of microRNAs

microRNA	microRNA Sequence(5'-3')
mimics NC	UUUGUACUACAAAAUACUG
miR-137 mimics	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG

mimics NC: mimics Negative control.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 人结肠癌细胞株 HCT-116、HT29、SW480、LS174T、SW620、DLD-1 贴壁培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液,人结肠上皮细胞株 FHC 贴壁培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养液,放置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。将处于对数生长期的 SW480 细胞以 1.5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板中(2 mL 培养基/孔),于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 24 h。当细胞融合度达 30%~50%时,按照转染试剂 lipofectamine™ 3000 说明书的要求进行细胞转染。转染设计为 2 组,即处理组 (si-XIST, miR-137 mimics 或 pcDNA-3.1(+)-ATG5)和阴性对照组 (si-NC, mimics NC 或 pcDNA-3.1(+))。转染 6 h 后,将培养基换为新鲜完全培养基继续培养,并进行后续实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测人结肠细胞各细胞株 lncXIST 及 mir-137 表达水平的检测 肠癌细胞 FHC, HCT116, HT29, SW480, SW620, Ls174t, DLD-1 或转染 24 h 后的各组细胞,即处理组 (si-XIST 或 miR-137 mimics)和阴性对照组 (si-NC 或 mimics NC) 采用 TRIzol 进行细胞裂解,抽提总 RNA,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒进行逆转录实验,获得各样品 cDNA。将 cDNA 稀释 10 倍后作为模板,b-actin 或 U6 为内参,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书提供的方法在 ABI 7900 实时荧光定量 PCR 仪进行 qPCR 检测。qPCR 引物见表 3。qPCR 反应条件为:第一步,95℃ 30s;第二步,95℃ 5 s、60℃ 30 s,40 个循环。实时荧光定量 PCR 的结果以 2^{-ΔΔCt} 表示目的基因 RNA 的相对表达水平,ΔΔCt=[处理组 Ct_{靶基因}-处理组 Ct_{b-actin}]-[阴性对照组 Ct_{靶基因}-阴性对照组 Ct_{b-actin}]。设阈值 2^{-ΔΔCt}>1.5 时提示为高表达。

表 3 PCR 引物序列

Table 3 Sequences of PCR Primers

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
β-actin	AGAGCTACGAGCTGC-CTGAC	AGCACTGTGTTGGCG-TACAG
XIST	ACGCTGCATGTGTCCT-TAG	GAGCCTCTTATAGCT-GTTTG

1.2.3 CCK-8 法检测结肠癌细胞株的增殖活性 检测转染对肠癌细胞的影响。收集肠癌细胞 SW480, HCT116 转染 8h 后的各组细胞,即处理组 (si-XIST 或 miR-137 mimics)和阴性对照组 (si-NC 或 mimics NC)以 1500 个/孔的细胞密度分别接种于 96 孔平底细胞培养板中,每孔用完全培养基将体积补充为 100 μL/孔,每组设 5 个重复孔;细胞分别继续培养 1 d,2 d,3 d,4 d 和 5d 后,加入 10 μL/孔 CCK-8 试剂继续培养 1 h,使用酶联免疫检测仪在波长 450 nm 处检测各孔吸光度值并进行统计。

检测 5-FU 对肠癌细胞的作用。收集肠癌细胞 SW480, HCT116 转染后 8h 的各组细胞,即处理组 (si-XIST, miR-137 mimics 或 pcDNA-3.1-ATG5)和阴性对照组 (si-NC, mimics NC

或 pcDNA-3.1(+)),以 3000 个/孔的密度分别接种于 96 孔细胞培养每孔用完全培养基将体积补充为 100 μ L/孔,每组设 5 个重复孔;细胞接种 12 小时后,分别更换含 5 μ g/mL,10 μ g/mL,15 μ g/mL 5-FU 的培养基,继续培养 48 h,加入 10 μ L/孔 CCK-8 试剂继续培养 1 h,使用酶联免疫检测仪在波长 450 nm 处检测各孔吸光度值并进行统计。

1.2.4 蛋白质印迹(western blot)技术检测人结肠细胞株蛋白水平的表达 收集各组转染 48h 后的细胞,即处理组(si-XIST, miR-137 mimics 或 pcDNA-3.1-ATG5)和阴性对照组(si-NC, mimics NC 或 pcDNA-3.1(+))采用 RIPA 蛋白裂解液进行细胞总蛋白提取,并使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行各组蛋白定量,取蛋白 50 μ g/孔上样用 10%SDS-PAGE 分离,转移至 PVDF 膜 1h 后,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别使用一抗 β -actin, LC1/LC3 ATG5, Beclin 1 (1:1000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 10 min,洗三次后,再加入 HRP 标记点羊抗兔、羊抗鼠(1:2000)室温孵育 1 h,经 ECL 发光液反应后,暗室曝光,以 β -actin 为内参进行比较。

1.2.5 双荧光素酶报告实验 本实验采用双荧光素酶报告系统检测 lncXIST 靶向结合 miR-137 及 miR-137 靶向结合 ATG5 3'UTR。将野生型 ATG5 3'UTR 和突变型 ATG5 3'UTR 及野生型 lncXIST 和突变型 lncXIST 克隆至 pGL3-Promoter 质粒萤火虫荧光素酶下游,将待测细胞铺于 12 孔板中,当细胞融合度达 80%时,按照转染试剂 lipofectamineTM 3000 说明书建议将质粒和 microRNA 共转染至贴壁细胞,并将海肾荧光素酶表达质粒共转染至细胞中作为内参。转染 48 h 后,按照 Promega 双荧光素酶报告系统试剂盒说明书进行检测。

1.3 统计学方法

应用 Graphpad Prism 8.0 软件对实验结果进行分析,所有实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA XIST 在不同结肠癌细胞中的表达情况及对结肠癌细胞增殖及对 5-fu 耐药和自噬蛋白的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,以人结肠上皮细胞株 FHC 为阴性对照,lncRNA XIST 在结肠癌细胞系 HCT116,HT29, SW480,SW620,Ls174T,DLD-1 中均高表达,其中在 SW480 细胞中的表达最高,且差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 1A。siRNA 转染 24 h 后,与阴性对照组比较,si-XIST 组的 SW480 和 HCT 116 细胞中 XIST 的 RNA 表达水平均明显降低($t = 22.25, P < 0.01$; $t = 21.86, P < 0.01$),差异有统计学意义,见图 1B。CCK8 检测结果显示,siRNA 转染结肠癌细胞株 SW480 和 HCT 116 后 1 d,2 d 各组细胞的增殖能力无明显差异;在 siRNA 转染后 3 d,4 d 和 5 d 时,si-XIST 组细胞的增殖明显受到抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1C)。SW480 和 HCT 116 细胞在含 5-FU (5,10 和 15 μ g/mL)中培养 24 h 后,si-NC 和 si-XIST 组细胞存活率不同,差异有统计学意义,见图 1D($P < 0.01$)。western blot 结果显示,siRNA 转染 48 h 后,与阴性对照组比较,si-XIST 组的 SW480 和 HCT 116 细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-3 表达明显上升,自噬相关蛋白 Beclin-1,LC3

II/LC3I 明显降低,见图 1E。

2.2 miR-137 与 lncRNA XIST 相互作用及对结肠癌细胞 SW480 自噬相关蛋白的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,以人结肠上皮细胞株 FHC 为阴性对照,miR-137 在结肠癌细胞系 HCT116,HT29, SW480,SW620,Ls174T,DLD-1 中均低表达,其中在 SW480 细胞中的表达最低,且差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图 2A。microRNA mimics 转染 24 h 后,与阴性对照组比较,SW480 和 HCT 116 细胞中 miR-137 mimics 组的 XIST 的 RNA 表达水平均明显降低($t = 18.7, P < 0.05$),差异有统计学意义,见图 2B。且在 SW480 和 HCT 116 细胞中 miR-137 的表达增高($t = 9.316, P < 0.01$; $t = 7.323, P < 0.01$),已有文献报道在神经胶质瘤及肺癌细胞中,XIST 可与 miR-137 结合并影响 miR-137 在肿瘤细胞中的功能^[8,9]。本研究利用生物信息学技术手段,结合 Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn>)等数据库预测 XIST 序列中有已知 miR-137 结合位点,并利用双荧光素酶报告实验进行验证,结果显示 miR-137 直接调控 XIST 的表达,如图 2D。同时,有文献报道^[10],miR-137 可靶向结合自噬相关基因 ATG5 3'UTR,通过 Starbase(<http://starbase.sysu.edu.cn>)数据库预测其结合位点,并利用双荧光素酶报告实验进行验证,结果显示 miR-137 直接调控 ATG5 的表达,如图 2E。采用 western blot 方法进一步对 ATG5 蛋白表达进行检测,发现转染 miR-137 mimics 之后,ATG5 的蛋白表达明显降低,如图 2F。实验结果表明,XIST-miR-137-ATG5 或可共同调节细胞功能。

2.3 lncRNA XIST 通过调控 miR137-ATG 抑制结肠癌细胞 SW480 自噬从而提高其对 5-fu 的敏感性

通过在结肠癌细胞系 SW480 中共转染 microRNA inhibitor,siRNA 和 pcDNA3.1 质粒进行分组。CCK-8 结果显示,在结肠癌 SW480 细胞中共转染 miR-137 inhibitor 或过表达 ATG5 可逆转 XIST 沉默引起的 5-FU 耐药,见图 3A。western blot 结果显示,在结肠癌细胞 SW480 中沉默 miR-137 或过表达 ATG5,可逆转因 XIST 沉默引起的自噬蛋白表达的降低,见图 3B。

3 讨论

结肠癌是发生于结肠部位的肿瘤,好发于直肠至乙状结肠交界,发病率位居消化道肿瘤第三位^[11]。国家癌症中心于 2013 年公布了我国 2003-2005 年肿瘤生存数据显示,我国结直肠癌患者的 5 年相对生存率位 47.2%,仍远低于发达国家水平。目前结肠癌治疗方法主要包括根治性手术治疗、化学药物治疗以及分子靶向治疗等^[12]。然而,随着肿瘤细胞对化疗等治疗手段耐药性的不断上升,临床治疗亟需新的药物敏感分子靶标出现。随着全基因组研究技术的蓬勃发展,关于非编码 RNA 与肿瘤关系的研究方兴未艾。lncRNA 是长度在 200 nt~100 kb 之间、缺乏蛋白质编码能力的 RNA 分子。其可在表观遗传学水平、转录水平和转录后水平等多层面调控基因的表达,是细胞生长、分化、侵袭和药物作用的关键调节剂^[13,14]。lncRNA-XIST 是位于 X 染色体失活中心 XIST 基因的转录产物,是 X 染色体失活过程的关键性起始物¹⁵。有研究发现 XIST 在结肠癌、膀胱癌和胃癌中等肿瘤中表达失调,并通过扮演癌基因的角色参

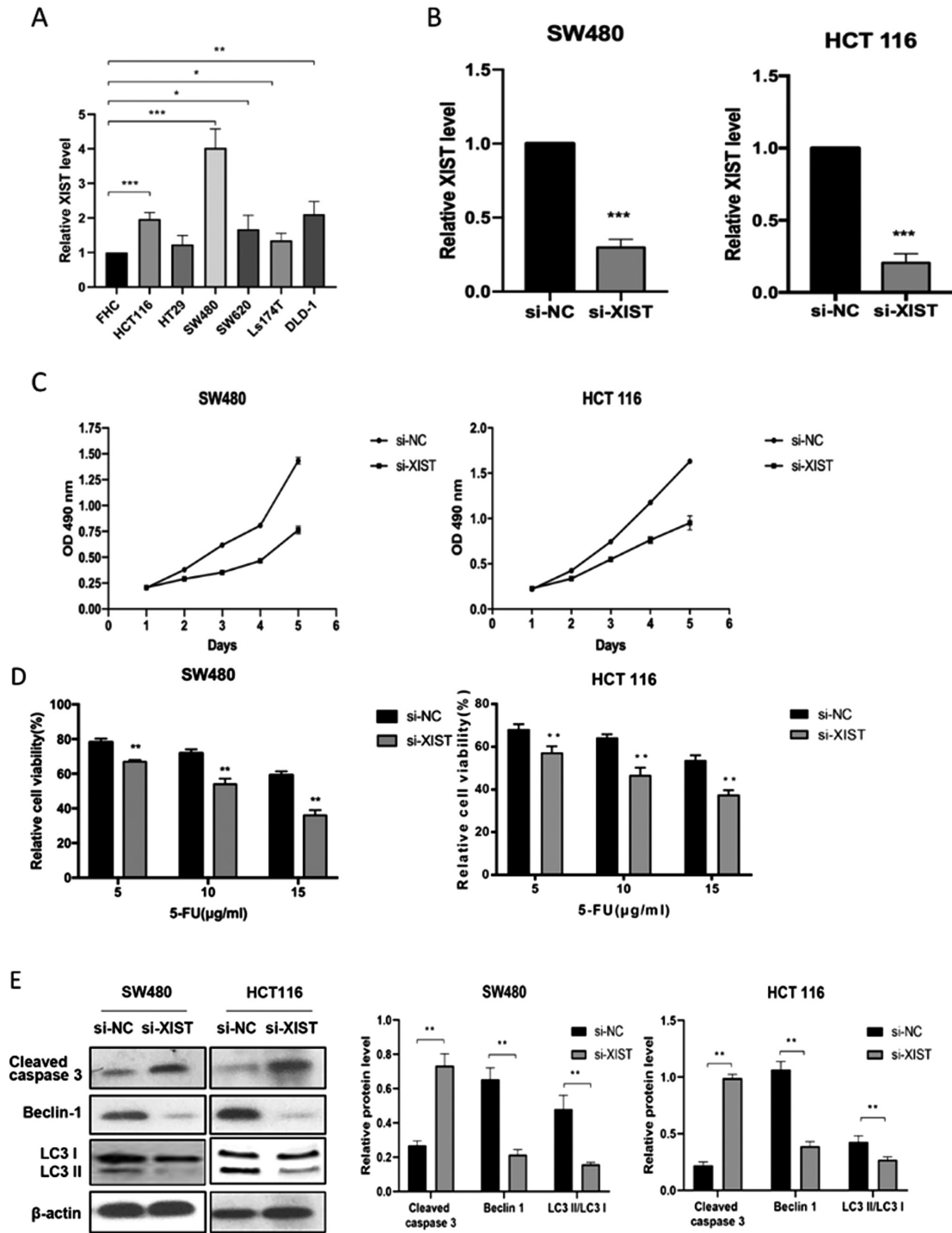


图1 lncRNA XIST 在不同结直肠癌细胞中的表达情况及对结肠癌细胞增殖及对 5-fu 耐药和自噬蛋白的影响

A lncRNA XIST 在不同细胞系中 RNA 表达水平;B 转染小干扰 RNA 后,SW480 和 HCT116 细胞中 XIST 的 RNA 水平;C 转染小干扰 RNA 对 SW480 和 HCT116 细胞的增殖的影响;D 转染小干扰 RNA 对 SW480 和 HCT116 细胞 5-FU 药物敏感性的影响;E 转染小干扰 RNA 对 SW480 和 HCT116 细胞凋亡和自噬相关蛋白表达的影响。

Fig.1 The relative expression of XIST in different colorectal cancer cell lines and knockdown of it downregulated the proliferation, elevated sensitivity to 5-fluorouracil(5-FU) and attenuated autophagy of SW480 and HCT116.

A The relative expression of XIST in different colorectal cancer cell lines; B The relative expression of XIST in SW480 and HCT 116 after small interfere RNA transfection; C The cell viability of SW480 and HCT 116 after small interfere RNA transfection; D The sensitivity of 5-fluorouracil(5-FU) in SW480 and HCT 116 after small interfere RNA transfection; E The relevant protein expression of apoptosis and autophagy pathway in SW480 and HCT 116 after small interfere RNA transfection.

与肿瘤发生发展过程的调控^[16-18]。Yang^[19]等人发现 XIST 靶向结合 miR-93-5p 参与 HIF-1A/AXL 信号通路的调控促进肠癌

细胞的侵袭功能。在最近的一项乳腺癌研究中,XIST 被证实可作为一个与 PD-L1 治疗相关的免疫标志物用于乳腺癌的诊疗^[20]。

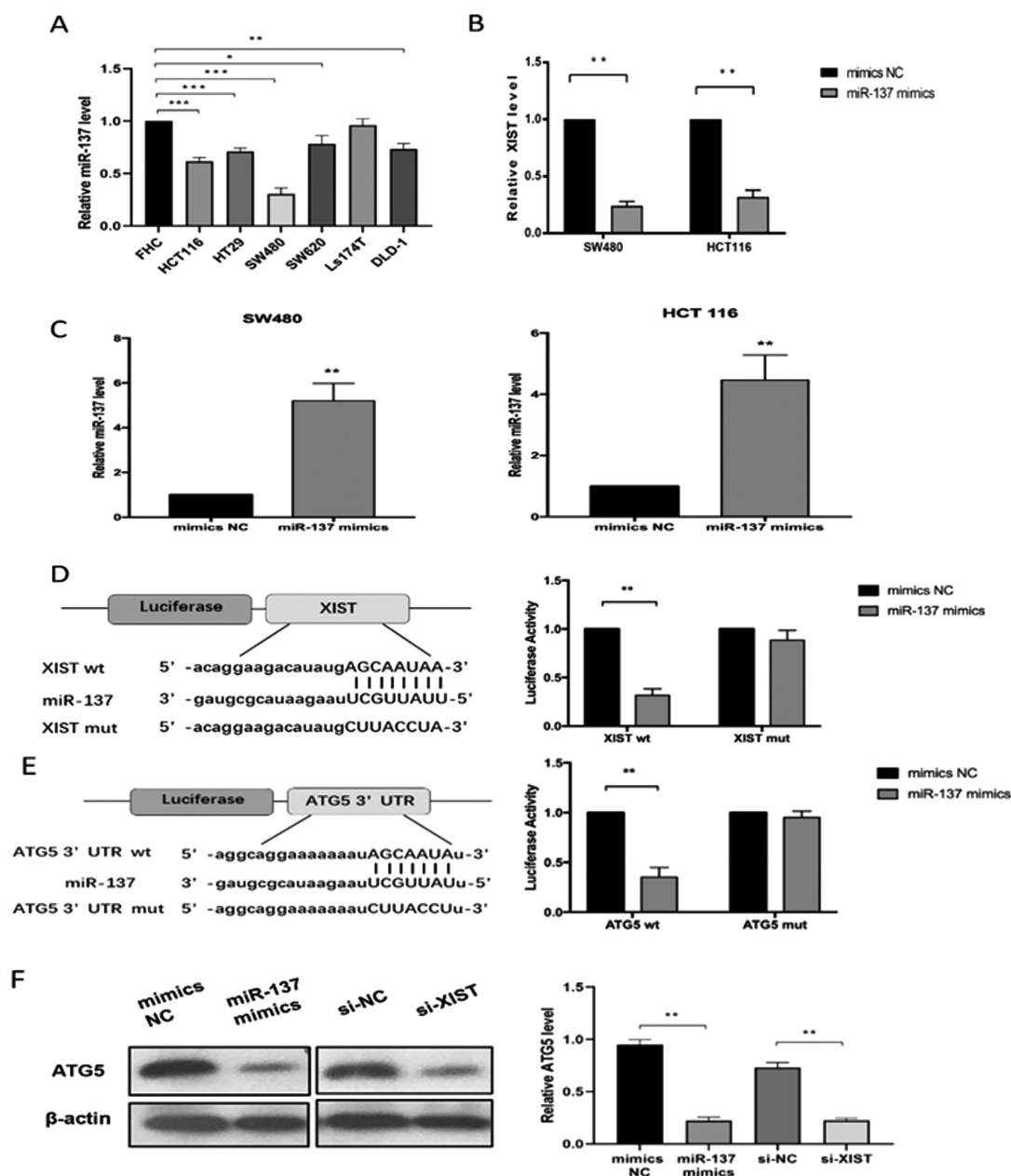


图2 miR-137在各肠癌细胞中的表达,miR-137与lncRNA XIST相互作用及对结直肠癌细胞SW480自噬相关蛋白的影响

A miR-137在不同细胞系中RNA表达水平;B转染microRNA mimics后,SW480和HCT116细胞中XIST的RNA水平;C转染microRNA mimics,SW480和HCT116细胞中miR-137的RNA水平;D miR-137与XIST的相互作用;E miR-137与ATG5的相互作用;F转染小干扰RNA或转染microRNA mimics对SW480自噬相关蛋白表达的影响。

Fig.2 The relative expression of XIST in different colorectal cancer cell lines, miR-137 targeted XIST and ATG5 and inhibited the expression of XIST and ATG5

A The relative expression of miR-137 in different colorectal cancer cell lines; B The relative expression of XIST in SW480 and HCT116 after microRNA mimics RNA transfection; C The relative expression of miR-137 in SW480 and HCT116 after microRNA mimics RNA transfection; D The interaction between miR-137 and XIST; E The interaction between miR-137 and ATG5 F The relevant protein expression of autophagy pathway ATG5 in SW480 and HCT116 after small interfere RNA or microRNA mimicstransfection.

上述研究表明,XIST对不同类型癌症的下游靶点有广泛的调控作用,但缺乏其与耐药相关机制被报道,XIST在结直肠癌中的作用机制更是有待深入研究,以期对结直肠癌的诊疗提供相关依据。本研究发现,长链非编码RNA XIST在肠癌细胞中均高表达,且与miR-137在肠癌中低表达趋势一致。进一步在结直肠癌细胞中敲减XIST的表达,发现细胞增殖能力受到抑制,同时可提高肠癌细胞对5-FU的敏感性,对自噬相关蛋白分析发

现,降低细胞中XIST的表达同时抑制了自噬相关蛋白表达,或抑制细胞的自噬功能。针对XIST与自噬功能的关系研究,Sun^[21]等人研究发现,沉默XIST可通过抑制非小细胞肺癌的自噬从而提高癌细胞对化疗的敏感性,这一现象与本研究XIST的作用一致,可通过沉默XIST抑制肿瘤细胞的自噬,从而提高其对化疗药物的敏感性,此外,本研究对这一机制进行深入研究发现XIST通过与miR-137的吸附进行相互作用靶向调控

miR-137/ATG5 从而提高肠癌细胞的自噬功能提高其对 5-FU 的耐药性,此研究对 XIST 对肿瘤耐药性给予了详细的补充。并且目前关于 XIST 在结肠癌细胞自噬与耐药的文献报道仍较少,探索结肠癌治疗中 XIST-自噬-耐药的机制是否有其他信号通路共同参与这一调控仍需深入挖掘。

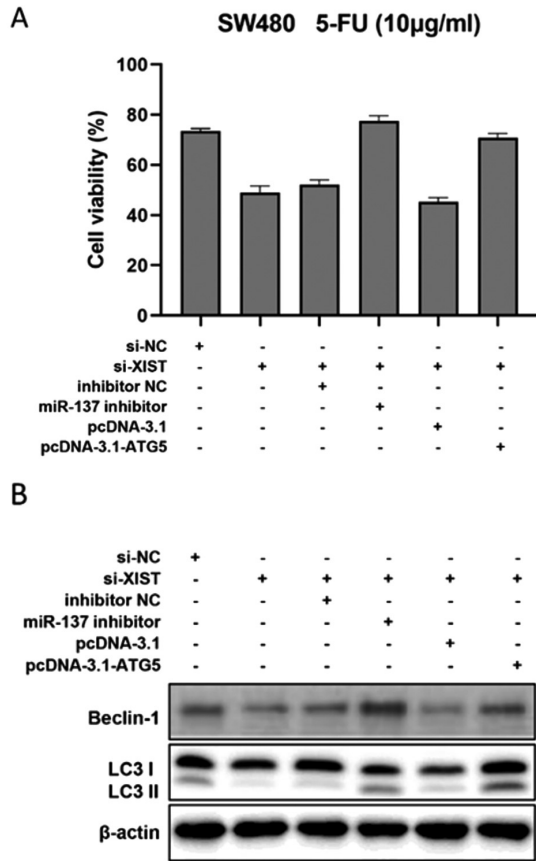


图3 LncRNA XIST通过调控 miR137-ATG抑制结直肠癌细胞SW480自噬从而提高其对5-fu的敏感性

A 通过共转染相应的小干扰RNA, microRNA mimics和过表达质粒, 肠癌细胞SW480对5-FU的敏感性情况;B通过共转染相应的小干扰RNA, microRNA mimics和过表达质粒,肠癌细胞SW480自噬相关蛋白的表达情况。

Fig.3 XIST affected proliferation and autophagy in SW480 dependent on miR-137/ATG5

A The 5-FU sensitivity of SW480 cells co-transfected with indicated plasmids or nucleic acids. B Representative image of autophagy protein in SW480 co-transfected with indicated plasmids or nucleic acids.

miRNA在转录后基因的调控中扮演至关重要的角色。其与lncRNA均为关键的基因表达调控分子,目前他们的相互作用对肿瘤发生发展的影响已经成为肿瘤学研究的热点内容。因此,开展研究验证miRNA-lncRNA可能为肿瘤的防治提供新的思路。有大量文献报道XIST/miR-137参与非小细胞肺癌^[8],结肠癌^[2],胶质瘤^[9]等肿瘤的发展进程。此外有文献报道miR-137通过靶向调控自噬相关基因ATG5抑制前列腺癌自噬并提高其对化疗药物的敏感性^[10]。在本研究中,通过利用生物信息学手段进行microRNA相关数据库的检索,并采用双荧光素酶报告系统验证,本研究发现miR-137可结合XIST并在肠癌细胞中进行了表达水平的验证。并且,采用同样的方法,本

研究证实miR-137可靶向结合ATG5 3'UTR,并且过表达miR-137可有效降低肠癌细胞中ATG5蛋白的表达。为进一步验证XIST/miR-137/ATG5在结肠癌自噬-耐药的关系,本研究通过CCK-8和western blot实验发现在结肠癌SW480细胞中共转染miR-137 inhibitor或过表达ATG5可逆转XIST沉默引起的5-FU耐药,同时可逆转因XIST沉默引起的自噬蛋白表达的抑制。提示LncRNA XIST或可通过调控miR137-ATG抑制结直肠癌细胞SW480自噬从而提高其对5-fu的敏感性。

自噬是依赖溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的过程,是细胞在缺氧、营养缺失、放化疗损伤时维持细胞生存重要方式^[23]。有研究发现,在自噬过程中,自噬相关基因(Autophagy Related Genes, ATGs)通过调控清除部分内容物或受损细胞器,从而达到缓解代谢压力促进细胞存活,为肿瘤细胞对化疗、放疗、激素治疗等治疗方法抵抗提供有利环境^[24,25]。ATG5是自噬相关基因家族的重要一员,有研究显示,ATG5表达的缺失会导致细胞自噬功能减低,干扰脂类物质的代谢,造成脂类大量蓄积,阻碍能量循环,进而干扰药物疗效^[26-28]。因此,ATG5是影响化疗疗效的关键分子靶点。W, Zhang^[27]等人发现采用微小miR-153-3p可抑制ATG5的表达从而提高非小细胞肺癌对吉非替尼(Gefitinib)的敏感性。M. Luo^[29]发表的文献中指出miR-216b可通过靶向调控ATG5影响维罗非尼(Vemurafenib)在黑色素瘤中的疗效。以上研究表明,非编码RNA对ATG5的调控是影响细胞自噬-耐药通路的重要机制。为此,在本研究中,我们通过实验验证XIST/miR-137/ATG5在结肠癌自噬-耐药通路中的重要调控作用,该研究有望为结直肠癌治疗提供新的实验基础和临床价值^[30]。

目前,lncRNA/miRNA/靶基因之间的交互作用是肿瘤耐药机制研究的热点。本研究以细胞自噬为切入点,阐述基因间相互作用对肿瘤耐药的影响。本研究结果对结肠癌-自噬-耐药三者关系提供了重要的实验补充,期望为肿瘤靶向治疗提供新的靶点,同时为结肠癌的防治提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] McQuade RM, Stojanovska V, Bornstein J, et al. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches[J]. Current medicinal chemistry, 2017, 24 (15): 1537-1557
- [2] Wu X, Wang F, Li H, et al. LncRNA-PAGBC acts as a microRNA sponge and promotes gallbladder tumorigenesis [J]. EMBO reports , 2017, 18(10): 1837-1853
- [3] 李正龙, 李鑫恒, 郑汪洋, 等. 长链非编码RNA HULC与消化系统肿瘤的相关性研究及作用机制 [J] 现代生物医学进展, 2019, 19 (01): 193-196
- [4] Xiong H, Ni Z, He J, et al. LncRNA HULC triggers autophagy via stabilizing Sirt1 and attenuates the chemosensitivity of HCC cells[J]. Oncogene, 2017, 36(25): 3528-3540
- [5] Li C, Zhao Z, Zhou Z, et al. Linc-ROR confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells via inducing autophagy and modulating the miR-124/PTBP1/PKM2 axis [J]. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2016, 78(6): 1199-1207
- [6] Sun Y, Lv B, Zhang X. Knock-down of LncRNA-XIST induced glioma cell death and inhibited tumorigenesis by regulating miR-137/SLC1A5 axis-mediated ROS production [J]. Naunyn-Schmiedeberg's

- archives of pharmacology, 2020[Epub ahead of print]
- [7] Li H, Cui J, Xu B, et al. Long non-coding RNA XIST serves an oncogenic role in osteosarcoma by sponging miR-137 [J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2019, 17(1): 730-738
- [8] Wang X, Zhang G, Cheng Z, et al. Knockdown of LncRNA-XIST Suppresses Proliferation and TGF-beta1-Induced EMT in NSCLC Through the Notch-1 Pathway by Regulation of miR-137 [J]. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2018, 22(6): 333-342
- [9] Wang Z, Yuan J, Li L, et al. Long non-coding RNA XIST exerts oncogenic functions in human glioma by targeting miR-137 [J]. *American journal of translational research*, 2017, 9(4): 1845-1855
- [10] Wang ZC, Huang FZ, Xu HB, et al. MicroRNA-137 inhibits autophagy and chemosensitizes pancreatic cancer cells by targeting ATG5 [J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2019, 111: 63-71
- [11] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2016, 66(4): 271-89
- [12] Zhu J, Tan Z, Hollis-Hansen K, et al. Epidemiological Trends in Colorectal Cancer in China: An Ecological Study [J]. *Digestive diseases and sciences*, 2017, 62(1): 235-243
- [13] Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm[J]. *Cancer research*, 2017, 77(15): 3965-3981
- [14] Peng W X, Koirala P, Mo Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667
- [15] Deng C, Hu X, Wu K, et al. Long non-coding RNA XIST predicting advanced clinical parameters in cancer: A Meta-Analysis and case series study in a single institution [J]. *Oncology letters*, 2019, 18(3): 2192-2202
- [16] Song H, He P, Shao T, et al. Long non-coding RNA XIST functions as an oncogene in human colorectal cancer by targeting miR-132-3p [J]. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 2017, 22(3): 696-703
- [17] Hu Y, Deng C, Zhang H, et al. Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and metastasis through regulating miR-139-5p mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway in bladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 94554-94568
- [18] Ma L, Zhou Y, Luo X, et al. Long non-coding RNA XIST promotes cell growth and invasion through regulating miR-497/MACC1 axis in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4125-4135
- [19] Yang LG, Cao MZ, Zhang J, et al. LncRNA XIST modulates HIF-1A/AXL signaling pathway by inhibiting miR-93-5p in colorectal cancer [J]. *Molecular genetics & genomic medicine*, 2020: e1112 [Epub ahead of print]
- [20] Salama EA, Adbeltawab RE, El Tayebi, et al. XIST and TSIX: Novel Cancer Immune Biomarkers in PD-L1-Overexpressing Breast Cancer Patients[J]. *Frontiers in oncology*, 2019, 9: 1459[Epub ahead of print]
- [21] Sun W, Zu Y, Fu X, et al. Knockdown of lncRNA-XIST enhances the chemosensitivity of NSCLC cells via suppression of autophagy [J]. *Oncology reports*, 2017, 38(6): 3347-3354
- [22] Liu X, Cui L, Hua D. Long Noncoding RNA XIST Regulates miR-137-EZH2 Axis to Promote Tumor Metastasis in Colorectal Cancer[J]. *Oncology research*, 2018, 27(1): 99-106
- [23] Levy J M M, Towers C G, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nature reviews. Cancer*, 2017, 17(9): 528-542
- [24] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chinese journal of cancer*, 2017, 36(1): 52
- [25] Lin L, Xia L, Tang D, et al. Analysis of autophagy-related genes and associated noncoding RNAs and transcription factors in digestive system tumors[J]. *Future oncology (London, England)*, 2019[Epub ahead of print]
- [26] Maan M, Peters JM, Dutta, M, et al. Lipid metabolism and lipophagy in cancer [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, 504(3): 582-589
- [27] Zhang W, Dong YZ, Du X, et al. MiRNA-153-3p promotes gefitinib-sensitivity in non-small cell lung cancer by inhibiting ATG5 expression and autophagy[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2019, 23(6): 2444-2452
- [28] Singh R, Kaushik S, Wang, Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131-1135
- [29] Luo M, Wu L, Zhang K, et al. miR-216b enhances the efficacy of vemurafenib by targeting Beclin-1, UVRAG and ATG5 in melanoma[J]. *Cellular signalling*, 2018, 42: 30-43
- [30] Li X, He S, Ma B, Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Molecular cancer*, 2020, 19(1): 12