

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.001

· 基础研究 ·

miR-483-3p 靶向 CD44 抑制 EGFR 突变肺癌的作用研究 *

王彩云 吕大成 李 玲 王 涛 胡梦笛 徐 璐[△]

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的: 探讨 miR-483-3p 对 CD44 表达的调控作用及采用脂质体载药系统递送 miR-483-3p 治疗表皮生长因子 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的作用。**方法:** 通过 miR-483-3p 靶基因的数据库发现 CD44 可能是 miR-483-3p 的靶基因之一, 从结构上及功能上进行验证。在 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)耐药的 NSCLC 模型中, 分别从基因及蛋白水平检测耐药模型及敏感模型中 CD44 的表达。在 HCC827GR 移植瘤模型中, 采用脂质体-鱼精蛋白-DNA (liposome-polycation-DNA, LPD)载药系统递送 miR-483-3p 进行治疗, 观察肿瘤的生长情况。**结果:** 双荧光素酶报告基因实验及 Western blot 实验结果显示 CD44 是 miR-483-3p 的靶基因之一, 且 CD44 在 EGFR-TKI 耐药模型中异常高表达 ($P<0.05$)。脂质体载药系统 LPD-miRNA-DSPE-PEG 符合静脉给药要求, Size 为 66.93 ± 21 nm, Zeta potential 为 8.7 ± 2 mV, PDI (Polydispersity Index)为 0.1, 递送 miR-483-3p 后能够抑制 HCC827GR 移植瘤的生长 ($P<0.05$)。**结论:** CD44 为 miR-483-3p 的靶基因之一, 在耐药模型中高表达, 脂质体载药系统给予 miR-483-3p 能够抑制 EGFR-TKI 耐药肿瘤的生长。

关键词: miR-483-3p; 非小细胞肺癌; EGFR 酪氨酸激酶抑制剂; CD44; 脂质体

中图分类号: R-33; Q78; R734.2; R91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)14-2601-08

Inhibitory Effect of miR-483-3p on the EGFR-mutant Lung Cancer Via Targeting CD44*

WANG Cai-yun, LV Da-cheng, LI Ling, WANG Tao, HU Meng-di, XU Lu[△]

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulation of miR-483-3p on CD44 and the treatment of miR-483-3p in EGFR (epidermal growth factor receptor) mutations non-small cell lung cancer (NSCLC) by liposome drug delivery system. **Methods:** CD44 was found to be one of the target genes of miR-483-3p in the database, and was verified structurally and functionally. In the EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (EGFR-TKI)-resistant model of NSCLC, the expression of CD44 which was detected from gene and protein levels in the resistant and sensitive models. In the xenograft model of HCC827GR, miR-483-3p was delivered for treatment by the liposome-protamine-DNA (LPD) drug delivery system to observe the growth of tumor. **Results:** Dual-Luciferase Reporter Assay System and Western Blot showed that CD44 was one of the target genes of miR-483-3p, and CD44 was abnormally highly expressed in the EGFR-TKI resistant model in vitro and in vivo ($P<0.05$). The LPD-miRNA-DSPE-PEG prepared by the liposome drug-loading system met the requirements of intravenous administration, Size: 66.93 ± 21 nm, Zeta potential: 8.7 ± 2 mV, Polydispersity Index: 0.1, which could inhibit the growth of HCC827GR-xenograft-model after delivery of miR-483-3p by LPD-miRNA-DSPE-PEG ($P<0.05$). **Conclusions:** CD44 is one of the target genes of miR-483-3p and is highly expressed in the resistant model. The liposome drug delivery system about miR-483-3p can inhibit the growth of EGFR-TKI resistant tumors.

Key words: miR-483-3p; NSCLC; EGFR-TKI; CD44; Liposome

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q78; R734.2; R91 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2601-08

前言

中国恶性肿瘤发病率约占世界 22%, 发病人数居全球第

一, 其中肺癌是中国增长最快的恶性肿瘤^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌病例的 85%, EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)作为 EGFR 突变患者的一线治

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81372522; 81773747); 上海市科委基金项目(12ZR1416000; 12140901400)

作者简介: 王彩云(1993-), 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤药理学, E-mail: 18865382782@163.com

[△] 通讯作者: 徐璐(1975-), 硕士生导师, 副研究员, 主要研究方向: 肿瘤药理学, E-mail: luxupharm@163.com, 电话: +86-21-64674721

(收稿日期: 2019-04-11 接受日期: 2019-04-30)

疗,开启了肺癌靶向治疗的新时代^[23]。常见的 EGFR-TKI 耐药机制包括 EGFR 二次突变,旁路激活,组织转化等^[4-10]。microRNA (miRNA)是一类由内源基因编码的,长度约为 20-24 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,有研究表明 microRNA 可作为细胞基因的主要调节因子,并通过靶向多个分子对肿瘤的发展发挥强大的调节作用^[11-16]。既往研究表明^[17]瘤内注射 miR-483-3p 能够有效抑制 EGFR-TKI 耐药的 NSCLC 肿瘤的生长,但瘤内注射具有一定的局限性,无法运用到临床。

本研究通过双荧光素酶报告基因实验及 Western Blot 实验,发现 CD44 是 miR-483-3p 的靶蛋白,且 CD44 在 EGFR-TKI 耐药模型中异常高表达,进一步采用脂质体-鱼精蛋白-DNA 载药系统递送 miR-483-3p 在体内模型中进行治疗,以期 miR-483-3p 治疗 EGFR-TKI 耐药的 NSCLC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和动物 人源非小细胞肺癌细胞系 HCC827 来自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,人源非小细胞肺癌细胞系 PC9 受赠于上海交通大学附属上海肿瘤研究所董强刚教授实验室。HCC827GR 及 HCC827OR 耐药细胞系由课题组构建吉非替尼/奥希替尼耐药细胞株。BALB/c 裸鼠:3 周龄,雌性,购于上海交通大学医学院实验动物中心。

1.1.2 实验试剂及仪器 RPMI 1640 培养基、POWER SYBR GREEN、Opti-MEM、Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胎牛血清(FBS)购自 Gemini 公司细胞;冻存液 cell banker2 购自日本 ZENOAQ 公司;青霉素-链霉素、0.25%胰蛋白酶购自上海源培生物科技有限公司;二硫苏糖醇(DTT)、Random Primer 购自宝日医生物技术(北京)有限公司;逆转录试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒购自江苏碧云天生物科技有限公司;CD44 Primer、GAPDH Primer、psi CHECK-2Vector-CD44-wt、psi CHECK-2Vector-CD44-mut 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;CD44-FITC 流式抗体购自美国 BD 公司;NC 及 miR-483-3p mimic (Cy5 标记)、NC 及 miR-483-3p agomir 购自上海吉玛制药技术有限公司;(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺(DOTAP)、甲氧基化-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(m-PEG2000-DSPE)购自美国 Avanti 公司;胆固醇(Chol)、鱼精蛋白(Protamine sulfate salt from salmon)、小牛胸腺 DNA (Calf thymus DNA) 购自美国 Sigma 公司;Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 购自普洛麦格生物技术有限公司。

Nano Drop 2000c、梯度 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;荧光定量 PCR 仪购自罗氏公司;高速匀浆仪购自美国 Glas-Col 公司;Odyssey 双色红外成像系统购自美国 LI-COR 公司;Zeiss LSM710 激光共聚焦显微镜购自德国 Zeiss 公司;BD Accuri® C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司;Modulus™ 单管型多功能检测仪购自美国 Promega 公司;R-200 旋转蒸发器购自瑞士 Buchi 公司,Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪购自 Malvern 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取、逆转录-聚合酶链反应(RT-qPCR) 将细胞种于六孔板中,待细胞融合度到 70-80%,弃去培养基,PBS 洗 2 次。若提取肿瘤组织的 RNA,则称取适量的冻存肿瘤组织,转移至离心管中,加入适量 RNA 裂解液,真空匀浆仪将肿瘤组织研磨至无明显组织块的混悬液,冰上充分裂解孵育 20 min 后离心,将含有肿瘤组织蛋白的上清液转移至离心管中。按照 RNA 提取试剂盒说明书操作,若组织样品中含有 RNAase,可适量在裂解液中加入 DTT,提取得到 total RNA 溶液,立即置于冰水混合物中。采用 Nano Drop 2000c 检测 RNA 纯度及浓度,260 nm 与 280 nm 的比值在 1.8-2.2 之间的样品符合实验要求。

将得到的 RNA 样品按照测定的浓度分别用 DEPC 水稀释至 30 ng/μL-100 ng/μL,剩余的 RNA 保存于 -80℃ 冰箱,按照逆转录反应体系进行配制,混匀后上机进行逆转录实验得到 cDNA,-20℃ 保存备用。根据人 CD44 和 GAPDH 的 cDNA 序列,设计的引物序列为:

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Genes	Sequences
CD44s	F: GGAGCAGCACTTCAGGAGGTTAC
	R: GGAATGTGTCTTGGTCTCTGGTAGC
CD44v6	F: CCAGGCAACTCCTAGTAGTACAACG
	R: CGAATGGGAGTCTTCTTTGGGT
CD44v9	F: AGCAGAGTAATTCTCAGAGC
	R: TGATGTCAGAGTAGAAGTTGTT
GAPDH	F: GACCCCTCATTGACCTCAAC
	R: CTTCTCCATGGTGGTGAAGA

利用得到的模板 DNA,配制 PCR 反应体系,混匀后上机进行逆转录实验得到 cDNA,-20℃ 保存备用。

1.2.2 流式细胞术检测 CD44 取细胞悬液离心,PBS 洗两遍;弃去 PBS,每管加入 100 μL PBS 及 1-2 μL 直标 FITC 抗体,重悬细胞,冰上孵育 30 min⁻¹,期间要多次摇晃离心管,防止由于细胞沉淀影响染色效果,注意此过程避光。回收一抗,PBS 洗涤 2-3 次,PBS 重悬细胞至 100 μL。用流式细胞检测仪 CytoFLEX LX 所检测荧光信号强度。

1.2.3 NSCLC 移植瘤裸鼠体内耐药模型的建立 取对数生长期 HCC827 及 PC9 细胞,消化成细胞悬液后离心,PBS 洗两遍细胞后计数,并用 PBS 稀释到合适 10⁷ 个细胞/mL,注意将细胞悬液放在冰盒上降低细胞的代谢。采用 4 周龄裸鼠,称重,肿瘤部位选择血供丰富的区域,例如腋窝中后部、腹股沟中上部。接种前将细胞悬液充分吹散,防止细胞成团。每只裸鼠两侧皮下分别注射细胞悬液 100 μL,一周后观察成瘤情况。当移植瘤体积达到 100 mm³ 时,随机分组,分为生理盐水对照组及给药组。灌胃给药,吉非替尼溶于 0.5 %羧甲基纤维素钠中,对照组给予生理盐水,实验组给予吉非替尼浓度为 12.5 mg/kg/day,每隔一天测量并记录肿瘤体积变化。当移植瘤体积达到 1000 mm³ 时,将裸鼠处死,取出肿瘤组织拍照并称重。将肿瘤组织切割分

为两部分,一部分放置于4%多聚甲醛4℃保存,剩下的冻存于-80℃冰箱。

1.2.4 阳离子脂质体法瞬时转染 miR-483-3p 将所需细胞接种在玻璃底皿中,待细胞融合度达30%-50%后转染。配制A液,用Opti-MEM稀释Lipofectamine3000或LPD-miRNA-DSPE-PEG,混匀,静置5 min。配制B液,用Opti-MEM将miR-483-3p及NC稀释到20 μM-100 μM,轻轻吹打混匀,静置5 min。将B液加入A液中,轻轻吹打混匀,室温静置20 min。将AB混合液加到皿中。6 h后,更换新鲜培养基,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养48h,采用激光共聚焦显微镜观察转染效率。

表2 miR-483-3p 序列

Table 2 miR-483-3p sequences

Genes	Sequences
miR-483-3p	sense: 5' UCACUCCUCUCCUCCGUCUU 3'
	antisense: 5' GACGGGAGGAGAGGAGUGAUU 3'
NC	sense: 5' UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 3'
	antisense: 5' ACGUGACACGUUCGGAGAATT 3'

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验 将NIH293T细胞接种于24孔板中,接种24 h后采用Lipofectamine3000将构建好的CD44双荧光素酶报告质粒及miR-483-3p mimic按照以下浓度进行转染,方法见1.2.4。对照组:NC(100 nM)+CD44 3'UTR 荧光素酶报告基因载体(2 ng),实验组:miR-483-3p mimic(100 nM)+CD44 3'UTR 荧光素酶报告基因载体(2 ng)。按照Dual-Luciferase Reporter Assay Kit说明书,进行细胞裂解及荧光素酶检测试剂的配制。使用Modulus™单管型多功能检测仪,双荧光素酶检测程序;首先在1.5 mL EP管中加入10 μL细胞裂解液,再加入15 μL荧光素酶检测缓冲液II后充分混匀,避免吹打出气泡;放入检测仪中,读取萤火虫荧光素酶活性值;将EP管取出,再加入15 μL Stop&Glo Reagent,充分混匀,注意与上一步吹打相同次数,读取海肾荧光素酶活性值;计算孔细胞海肾荧光素酶活性和其对应的萤火虫荧光素酶内参活性比值,并做图。

1.2.6 LPD (liposome-polycation-DNA)-miRNA-DSPE-PEG 的制备 采用薄膜水化法制备阳离子脂质体,将DOTAP及Chol溶解于三氯甲烷中,终浓度为10 mg/mL^[18]。分别取249 μL DOTAP及Chol(脂质终浓度为10 mM,再加入3502 μL三氯甲烷,将混合液加入500 mL圆底烧瓶中,置于37℃旋转蒸发仪60 min,使其在烧瓶底部形成均匀的薄膜;加入1 mL DEPC水,置于37℃,250 rpm摇床中水化1 h;充分水化后,超声1 min;将得到的混悬液依次通过400 nm,200 nm,100 nm,50 nm的聚碳酸酯膜^[19]。采用激光粒度仪检测脂质体粒径,粒径小于100 nm,PDI小于0.2,可进行下一步操作。取248 μL制得的脂质体,加入30 μL鱼精蛋白(1 μg/μL)及22 μL DEPC水,室温静置10 min。与此同时,取180 μL miR-483-3p agomir(20 μM),4.8 μL小牛胸腺DNA(10 μg/μL),115.2 μL DEPC水,混合,室温静置10 min后,将脂质体-鱼精蛋白混合液加入到agomir-DNA混合液中,反复快速吹打,室温静置15 min后即得LPD-miR-483-3p。每100 μL LPD-miR-483-3p加入10 μL

m-PEG2000-DSPE水溶液(20 mg/mL),在50℃水浴锅中孵育10 min即可用于静脉给药。

1.2.7 miR-483-3p 体内给药 瘤内注射:待皮下瘤体积为200 mm³时,向肿瘤部位注射50 μL miR-483-3p agomir及NC(20 μM),每隔三天给药一次,共两次。两天后取出肿瘤。系统给药:待皮下瘤体积为200 mm³时,按照裸鼠体重进行尾静脉给药,1.2 mg miRNA agomir/kg,将制得的LPD-miRNA-DSPE-PEG采用10× PBS溶液配成等渗溶液,每隔一天给药一次,共三次。一天后取出肿瘤。

1.3 统计学分析

所有数据采用GraphPad Prism6.0统计学软件进行统计分析,以mean± SEM表示,两组间比较采用t检验,多组间分析采用单因素方差分析,当P<0.05时认为组间有统计学差异。

2 结果

2.1 CD44 是 miR-483-3p 的靶蛋白

通过在TargetScan、miRanda等miRNA靶基因预测网站对miR-483-3p可能结合的靶序列进行预测,发现CD44的3'UTR具有一段与miR-483-3p同源的保守序列,推测CD44是miR-483-3p的一个靶基因(图1)。将CD44 3'UTR序列及该位点突变序列克隆到psi CHECK-2Vector形成psi CHECK-2Vector-CD44-wt及psi CHECK-2Vector-CD44-mut,并与miR-483-3p mimic一同转染到HEK293T细胞中,检测荧光素酶的活性(Renilla/Firefly),结果显示miR-483-3p过表达后,CD44的3'UTR荧光素酶活性明显下降(P<0.05),以上结果从结构水平提示CD44是miR-483-3p的靶蛋白(图2)。

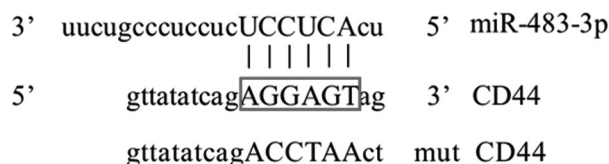


图1 CD44的3'UTR具有一段与miR-483-3p同源的保守序列

Fig.1 The 3'UTR of CD44 has a conserved sequence homologous to miR-483-3p

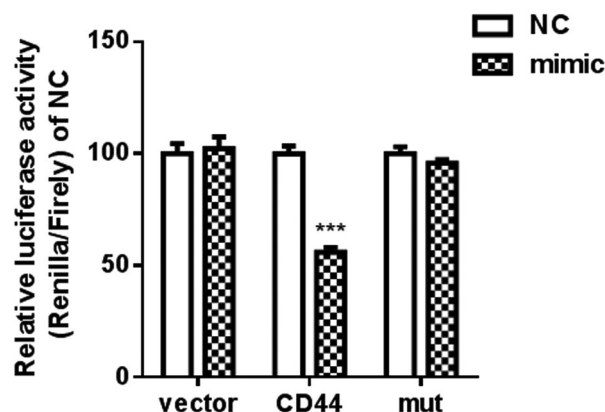


图2 双荧光素酶报告基因检测 CD44 的荧光素酶活性

Fig.2 Relative luciferase activity of CD44 in Dual-Luciferase Reporter Assay System.

Note: Data are expressed as mean± SEM, n=4. ***P<0.001, compared with NC group.

通过 RT-qPCR 及流式细胞术检测 HCC827、HCC827GR 和 HCC827OR 中 CD44 的表达,发现耐药细胞中 CD44 的表达量远远高于母细胞($P<0.05$)(图 3)。前期研究表明 EGFR-TKI 耐药的 NSCLC 细胞中,miR-483-3p 呈现低表达。随后,我们在

HCC827GR 和 HCC827OR 中过表达 miR-483-3p,发现 CD44 表达量下调(图 4),以上结果从功能上验证了 CD44 是 miR-483-3p 的靶蛋白。

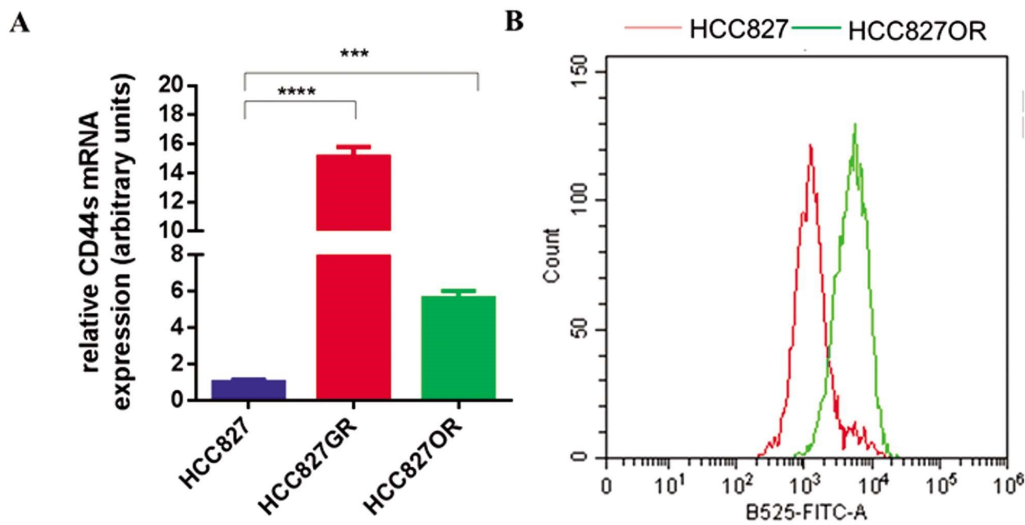


图 3 母细胞及耐药细胞 CD44 的表达比较

Fig.3 Comparison of the expression of CD44 in NSCLC cells

Note: Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n=3. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with HCC827 group.

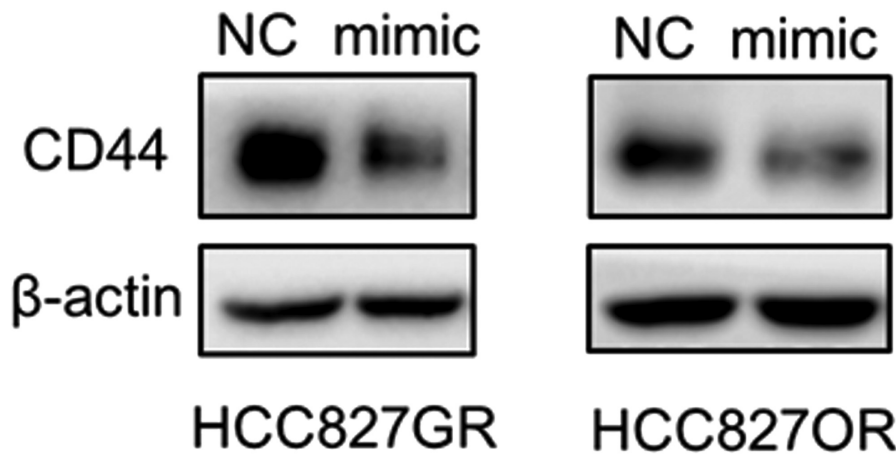


图 4 Western Blot 检测过表达 miR-483-3p 后 CD44 的表达量

Fig.4 Detection of CD44 after overexpression of miR-483-3p by Western Blot

2.2 体内耐药模型中 miR-483-3p 调节 CD44 的表达

在 HCC827 及 PC9 细胞构建的吉非替尼体内耐药模型中,Western Blot 及 RT-qPCR 检测结果显示其 CD44 蛋白表达水平比敏感肿瘤组织显著上调,尤其是三种转录子 CD44s、CD44v6、CD44v9($P<0.05$)(图 5)。对 EGFR-TKI 耐药的移植瘤模型采取瘤内注射 miR-483-3p agomir,同时继续给予吉非替尼,取瘤后检测组织中 CD44 的表达水平,结果显示给予 miR-483-3p 后 CD44 的表达显著下调(图 6)。

2.3 脂质体-鱼精蛋白-DNA 载药系统递送 miR-483-3p 的制备及疗效分析

通过薄膜水化法制备阳离子脂质体,与 miR-483-3p agomir 自组装形成 LPD,再通过后插入的方式采用 m-PEG2000-DSPE 对脂质体结构进行表面修饰保护。对制得的 LPD-miR-NA-DSPE-PEG 的粒径及电位进行测定,Size 为 66.93 ± 21 nm,

Zeta potential 为 8.7 ± 2 mV,PDI 为 0.1 左右(图 7)。随后将 miR-483-3p 进行 Cy5 荧光标记,分别用常规商品化的转染试剂 Lipofectamine 及制得的脂质体进行细胞的转染,结果显示载有 miR-483-3p 的脂质体转染效率与 Lipofectamine 相当,蓝色为细胞核,红色为 Cy5 标记的 miR-483-3p(图 8)。

将制得的脂质体可以作为递送 miR-483-3p 的载体,在采用 HCC827GR 构建的移植瘤模型中静脉给药 LPD-miR483-3p-DSPE-PEG 及 LPD-NC-DSPE-PEG。给药三次后,分析肿瘤体积变化,结果显示给予 miR-483-3p 抑制了肿瘤的生长($P<0.05$)(图 9)。

3 讨论

研究表明 miRNA 具有调节血管生成的作用,例如 miR-194 使得微血管密度、血管大小和血管生成增加,可能在

EMT 和转移中起重要作用,miR-214 通过靶向 PTEN 和增强 AKT 途径来抑制细胞凋亡,导致化疗敏感性降低^[20]。既往研究显示 miR-483-3p 通过直接靶向整合素 $\beta 3$, 抑制 NSCLC 细胞的增殖和促进细胞凋亡, 增加耐药 NSCLC 细胞对吉非替尼的

敏感性。本研究中,我们对 miR-483-3p 其他可能结合的靶序列进行预测, 发现 CD44 的 3'UTR 具有一段与 miR-483-3p 同源的保守序列,推测 CD44 是 miR-483-3p 的靶蛋白。

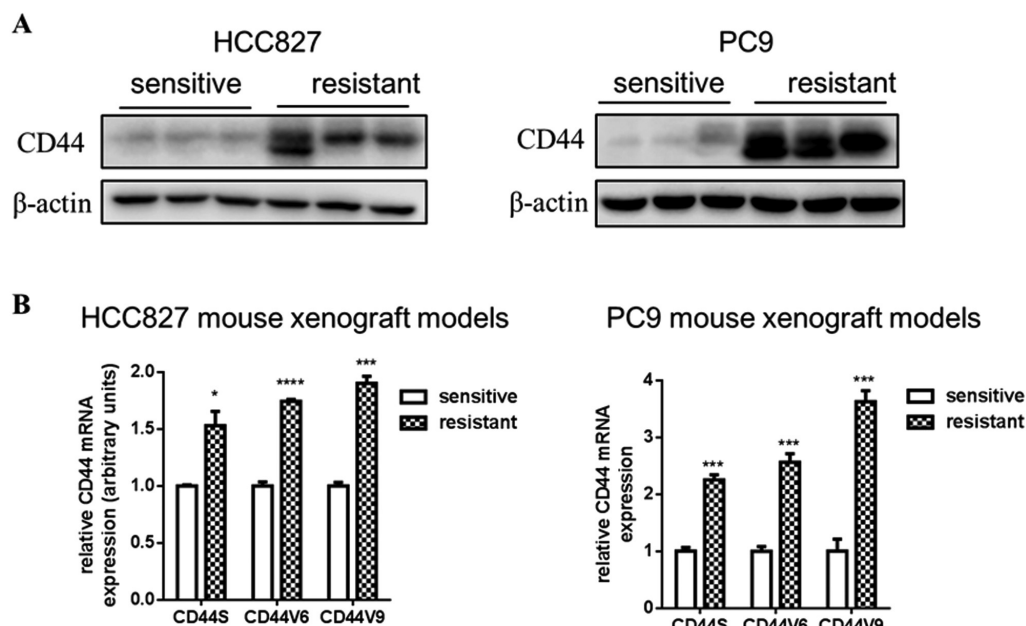


图 5 敏感组织和耐药组织中 CD44 的表达比较

Fig.5 Comparison of the expression of CD44 between sensitive and resistant tumors

Note: Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n=3. * P <0.05, *** P <0.001, **** P <0.0001, compared with sensitive group.

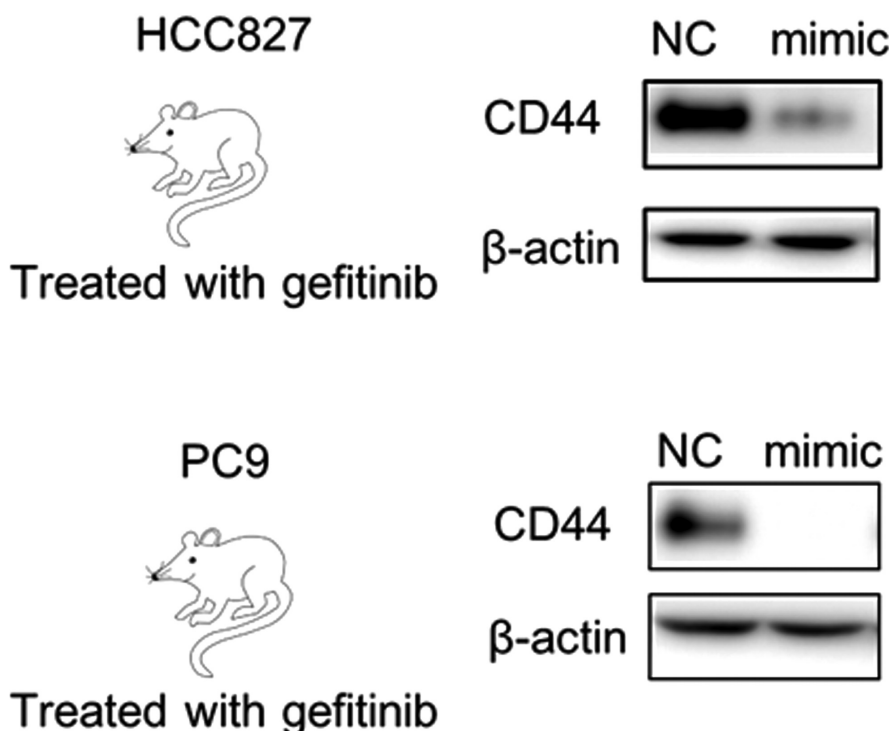


图 6 Western Blot 检测瘤内注射 miR-483-3p 后 CD44 的表达量

Fig.6 Detection of CD44 after intra-tumor injection of miR-483-3p by Western Blot

在多种实体瘤中^[21-23],CD44 被认为是突出的癌症细胞标记物。本研究从蛋白水平和转录水平比较了母细胞和耐药细胞中 CD44 表达的差异, 结果显示无论是在对第一代、第三代 EGFR-TKI 耐药的细胞模型, 还是 HCC827 及 PC9 构建的体内

耐药复发肿瘤模型, 耐药组 CD44 表达量都显著提升。从结构及功能上验证, 本研究确认 CD44 是 miR-483-3p 的靶基因。在体内耐药模型中, 瘤内注射给予 miR-483-3p agomir 后 CD44 显著下调, 进一步说明了 miR-483-3p 对 CD44 的调节作用。

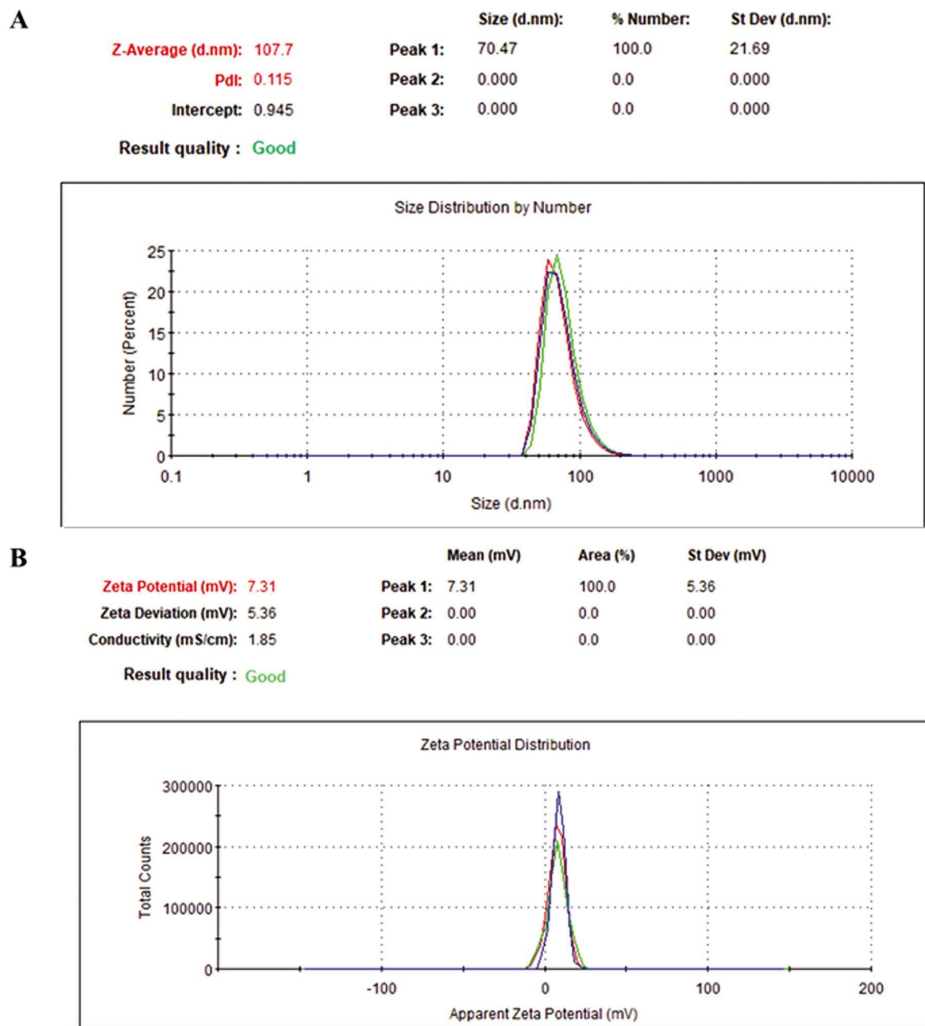


图 7 LPD-miRNA-DSPE-PEG 的粒径及电位

Fig.7 Size and Zeta potential of LPD-miRNA-DSPE-PEG

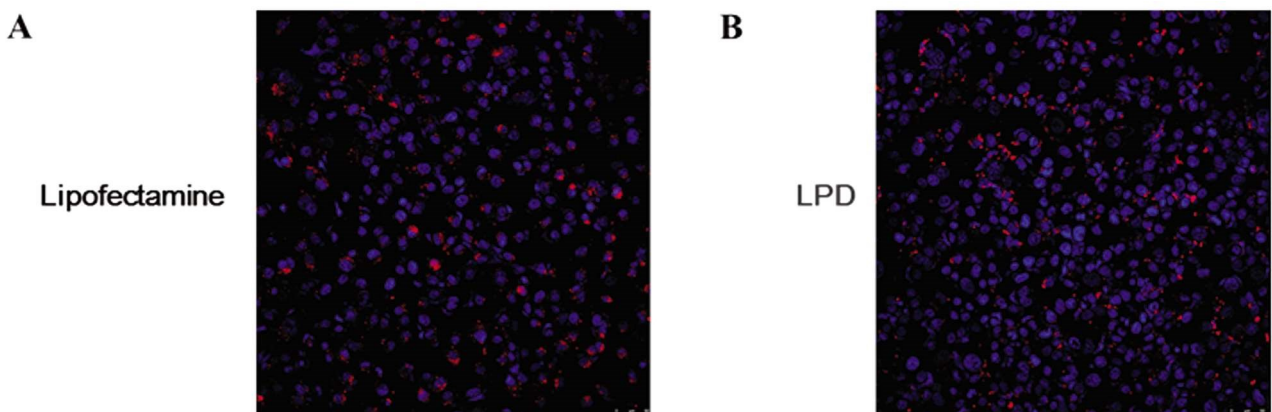


图 8 LPD-miRNA-DSPE-PEG 与 Lipofectamine 转染效率比较

Fig.8 Comparison of transfection efficiency between LPD-miRNA-DSPE-PEG and Lipofectamine.

Note: Blue : nucleus, Red : Cy5-labeled miR-483-3p.

CD44, 一种多结构和多功能的跨膜糖蛋白, 是透明质酸 (HA) 的受体, 能够感知环境变化并介导信号转导^[24]。例如, CD44 与 HA 和其他 ECM 分子的结合已被证明可激活 Nanog-Stat3, Oct4-Sox2-Nanog 或 c-Src 激酶信号通路, 从而导致上调 miR-21 或下调 miR-203。因此, CD44 能调节肿瘤细胞的存活, 自我更新, 维持化学治疗抗性^[25,26]。而 CD44 作为

miR-483-3p 的靶蛋白, 二者如何调节 NSCLC 细胞对 EGFR-TKI 的耐药仍需要进一步研究。

瘤内注射虽然能够确保药物到达肿瘤组织避免血管屏障, 但是无法同时达到局部和转移性病灶, 无法运用到临床, 在大多数肿瘤类型中可行性治疗需要全身递送。由于核酸相对分子质量大, 水溶性高以及带有很强的负电荷, 故不能通过细胞膜,

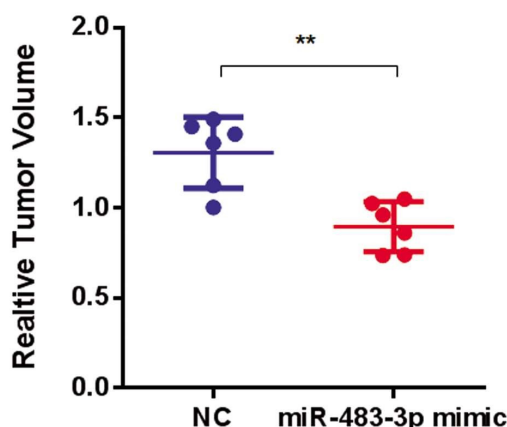


图9 LPD-miRNA-DSPE-PEG 疗效分析

Fig.9 Efficacy analysis of LPD-miRNA-DSPE-PEG

Note: ** $P < 0.01$.

因此必须要有合适的载体^[27]。脂质体在药物递送中具有许多优点,例如高生物相容性,生物降解性和尺寸和表面操作能力^[28]。为了进行静脉注射的系统给药方式,我们用脂质体作为载体递送 miR-483-3p,脂质体核心是由电荷-电荷相互作用驱动的自组装过程,使用鱼精蛋白在分子量小牛胸腺 DNA 的帮助下将 miRNA 浓缩成固体核心^[29],呈负电荷,允许带正电荷的 DOTAP / 胆固醇阳离子脂质体进一步包被,再通过插入 DSPE-PEG 进行表面保护^[19]。形成的纳米粒将 miRNA 包裹在脂质体内部,而不是以正电吸附的方式结合在脂质体表面,这种脂质体形式可以保护 miRNA 免受血液中核酸酶的降解,极大提高了在血液中的稳定性,表面对脂质体进行 PEG 化,延长了血液循环时间,降低网状内皮系统吸收^[30]。本研究中制得的 LPD-miRNA-DSPE-PEG,Size 为 66.93 ± 21 nm,Zeta potential 为 8.7 ± 2 mV,PDI 为 0.1 左右,与商品化的 Lipofectamine 转染相当。在移植瘤模型中,静脉给药 LPD-miR483-3p-DSPE-PEG 抑制了肿瘤的生长。但与瘤内注射 miR483-3p 相比,对肿瘤的抑制作用较弱,可能与脂质体的低靶向性、内涵体逃逸等原因有关。研究表明 CD44 与透明质酸(HA)结合与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移、细胞凋亡抗性、耐药性有关^[31]。Neha N.等^[32]在基因工程非小细胞肺癌模型中,腹腔注射透明质酸包裹 miRNA-125b 纳米微粒,使巨噬细胞的极化增加,那么透明质酸是否可以作为 LPD-miR483-3p-DSPE-PEG 治疗耐药 NSCLC 时提高靶向性的切入点需要进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 CD44 作为 miR-483-3p 的一个靶蛋白,在 EGFR-TKI 耐药的 NSCLC 中异常高表达,采用脂质体载药系统递送 miR-483-3p 后克服了瘤内注射的局限性,抑制了肿瘤的生长,为 miR-483-3p 的临床应用提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Giovanni R, Enrico Z, Giuseppe Z. Overcoming resistance in non-small-cell lung cancer: A practical lesson for the medicinal chemist [J]. *Archiv der Pharmazie*, 2018: 1800037
- [2] Wu S G, Shih J Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17(1): 38
- [3] Thress K S, Pawelcz C P, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(6): 560-562
- [4] Satoshi Y, Ibiy D J, Hata A N. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2018: S0163725818301451
- [5] Cabanero M, Sangha R, Sheffield B S, et al. Management of EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: practical implications from a clinical and pathology perspective[J]. *Current Oncology*, 2017, 24(2): 111
- [6] Rotow J, Bivona T G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(11): 637-658
- [7] Paez J G, Pasi A, Jänne, Lee J C, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-500
- [8] Arnatchai M, Wipa C, Pithi C. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds [J]. *Anticancer Research*, 2018, 38(7): 3797-3809
- [9] Hirsch F R, Suda K, Wiens J, et al. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *The Lancet*, 2016, 388(10048): 1012-1024
- [10] Loong H H, Kwan S C S, Mok S K, et al. Therapeutic Strategies in EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Current Treatment Options in Oncology*, 2018, 19(11): 58-65
- [11] Min Ding, Jiang Li, Yong Yu, et al. Integrated analysis of miRNA, gene, and pathway regulatory networks in hepatic cancer stem cells [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13(1): 259
- [12] Abba M L, Patil N, Leupold J H, et al. MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition[J]. *J Clin Med*, 2016, 5 (1): 1-20
- [13] Zhen Q, Liu J, Gao L, et al. MicroRNA-200a Targets EGFR and c-Met to Inhibit Migration, Invasion, and Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2015, 146 (1): 1-8
- [14] Wang C, Ding M, Xia M, et al. A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case-control Study Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients[J]. *E Bio Medicine*, 2015, 2 (10): 1377-1385
- [15] Zhao Z G, Jin J Y, Zhang A M, et al. MicroRNA profile of tumorigenic cells during carcinogenesis of lung adenocarcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116 (3): 458-466
- [16] Wang C, Sun Y, Wu H, et al. Elevated miR-483-3p expression is an early event and indicates poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36 (12): 9447-9456
- [17] Yue J, Lv D, Wang C, et al. Epigenetic silencing of miR-483-3p promotes acquired gefitinib resistance and EMT in EGFR-mutant NSCLC by targeting integrin $\beta 3$ [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (31): 4300-4312
- [18] Li S D, Huang L. Targeted Delivery of Antisense Oligodeoxynucleotide and Small Interference RNA into Lung Cancer Cells [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2006, 3(5): 579-588
- [19] Tseng Y C, Huang L. Self-assembled lipid nanomedicines for siRNA tumor targeting [J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2009, 5 (4): 351-363
- [20] Tokarz P. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment[J]. *Acta Biochimica*

- Polonica, 2012, 59(4): 467-474
- [21] Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 Expressed on Cancer-Associated Fibroblasts Is a Functional Molecule Supporting the Stemness and Drug Resistance of Malignant Cancer Cells in the Tumor Microenvironment[J]. STEM CELLS, 2014, 32(1): 145-156
- [22] Morath I, TN. Hartmann, V Orian-Rousseau. CD44: More than a mere stem cell marker. Int J Biochem Cell Biol [J]. 2016, 81 (Pt A): 166-173
- [23] Kinugasa Y T, Matsui N, Takakura. CD44 Expressed on Cancer-Associated Fibroblasts Is a Functional Molecule Supporting the Stemness and Drug Resistance of Malignant Cancer Cells in the Tumor Microenvironment[J]. STEM CELLS, 2014, 32(1): 145-156
- [24] Buchheit C L, Weigel K J, Schafer Z T. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumor progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2014, 14(9): 632-641
- [25] Fu Y, Feng M X, Yu J, et al. DNA methylation-mediated silencing of matricellular protein dermatopontin promotes hepatocellular carcinoma metastasis by $\alpha 3\beta 1$ integrin-Rho GTPase signaling [J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 6701-6715
- [26] Tieche CC. Tumor Initiation Capacity and Therapy Resistance Are Differential Features of EMT-Related Subpopulations in the NSCLC Cell Line A549[J]. Neoplasia, 2019, 21(2): 185-196
- [27] Liu X Q, Song W J, Sun T M, et al. Targeted Delivery of Antisense Inhibitor of miRNA for Antiangiogenesis Therapy Using cRGD-Functionalized Nanoparticles [J]. Molecular Pharmaceutics, 2011, 8(1): 250-259
- [28] Ngo K X, Umakoshi H, Shimanouchi T, et al. Chitosanase displayed on liposome can increase its activity and stability [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 146(3): 105-113
- [29] Li S D, Huang L. Surface-modified LPD nanoparticles for tumor targeting[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1082(1): 1-8
- [30] Pasut G, FM. Veronese. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61(13): 1177-1188
- [31] Kokko L L, Hurme S, Maula S M, et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma[J]. Oral Oncology, 2011, 47(6): 510-516
- [32] Parayath N N, Parikh A, Amiji M M. Repolarization of Tumor-Associated Macrophages in a Genetically Engineered Nonsmall Cell Lung Cancer Model by Intraperitoneal Administration of Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles Encapsulating MicroRNA-125b [J]. Nano Letters, 2018, 18(6): 3571-3579

(上接第 2651 页)

- [8] Wei Y, He R, Wu Y, et al. Comprehensive investigation of aberrant microRNA profiling in bladder cancer tissues[J]. Tumour Biol, 2016, 37(9): 12555-12569
- [9] Ma G, Li Q, Dai W, et al. Prognostic Implications of miR-302a/b/c/d in Human Gastric Cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(4): 899-905
- [10] Chen L, Min L, Wang X, et al. Loss of RACK1 Promotes Metastasis of Gastric Cancer by Inducing a miR-302c/IL8 Signaling Loop [J]. Cancer Res, 2015, 75(18): 3832-3841
- [11] Li Y, Huo J, Pan X, et al. MicroRNA 302b-3p/302c-3p/302d-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition and promotes apoptosis in human endometrial carcinoma cells[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 1275-1284
- [12] Yan GJ, Yu F, Wang B, et al. MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of endometrial cancer cells by suppression of Cyclin D1 and CDK1[J]. Cancer Lett, 2014, 345(1): 39-47
- [13] Maadi H, Moshtaghian A, Taha MF, et al. Multimodal tumor suppression by miR-302 cluster in melanoma and colon cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 81(Pt A): 121-132
- [14] Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers[J]. Urol Oncol, 2007, 25(5): 387-392
- [15] Khodayari N, Mohammed KA, Lee H, et al. MicroRNA-302b targets Mcl-1 and inhibits cell proliferation and induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(9): 1996-2009
- [16] Wang Y, Zhao L, Xiao Q, et al. miR-302a/b/c/d cooperatively inhibit BCRP expression to increase drug sensitivity in breast cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2016, 141(3): 592-601
- [17] Zhou Y, Wu B, Li JH, et al. Rab22a enhances CD147 recycling and is required for lung cancer cell migration and invasion[J]. Exp Cell Res, 2017, 357(1): 9-16
- [18] Su F, Chen Y, Zhu S, et al. RAB22A overexpression promotes the tumor growth of melanoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71744-71753
- [19] Yu H, Yang W. MiR-211 is epigenetically regulated by DNMT1 mediated methylation and inhibits EMT of melanoma cells by targeting RAB22A[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4): 400-405
- [20] Xiong F, Liu K, Zhang F, et al. MiR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 3000-3008