

长链非编码 RNA RP11-770J1.3 和跨膜蛋白 25 对紫杉醇耐药人乳腺癌细胞株耐药性的影响

李 钰¹, 王月月¹, 王海凤¹, 张凌宇¹, 丁勇兴², 陈素莲³, 杨清玲³, 陈昌杰³

1. 蚌埠医学院临床检验诊断学实验中心, 安徽 蚌埠 233000

2. 蚌埠市第三人民医院普外肿瘤科, 安徽 蚌埠 233000

3. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233000

[摘要] **目的:**探讨长链非编码 RNA (lncRNA) RP11-770J1.3 和跨膜蛋白 25 (TMEM25) 对紫杉醇耐药人乳腺癌细胞株耐药性的影响。**方法:**利用实时定量 PCR 检测 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 在人乳腺癌细胞 MCF-7 和紫杉醇耐药细胞株 (MCF-7/PR) 中的表达。在 MCF-7/PR 中转染 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的干扰片段, 磺酰罗丹明 B 法检测 MCF-7/PR 对紫杉醇药物敏感性的变化, 并运用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测多药耐药相关蛋白 (MRP)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP)、多药耐药基因 1 (MDR1) 及其编码产物 P-gp mRNA 和蛋白水平的改变。**结果:**lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 在 MCF-7/PR 中表达上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与空白对照组和紫杉醇阴性对照组比较, 干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达可以提高 MCF-7/PR 对紫杉醇的药物敏感性, 并下调耐药相关基因 *MRP*、*BCRP*、*MDR1* 及其编码产物 P-gp 的表达 (均 $P < 0.05$); 与单独干扰 lncRNA RP11-770J1.3 或 TMEM25 比较, 同时干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的作用更加明显 ($P < 0.05$)。**结论:**MCF-7/PR 中 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达上调, 联合干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达可以提高 MCF-7/PR 对紫杉醇的敏感性。



[关键词] RNA; 膜蛋白质类/代谢; 乳腺肿瘤/病理生理; 聚合酶链反应; 紫杉醇/药理学; 细胞系, 肿瘤/病理学; 肿瘤细胞, 培养的; 抗药性, 肿瘤

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A

Effects of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 expression on paclitaxel resistance in human breast cancer cells

LI Yu¹, WANG Yueyue¹, WANG Haifeng¹, ZHANG Lingyu¹, DING Yongxing²,

收稿日期: 2017-05-05 接受日期: 2017-06-29

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重大项目 (KJ2015ZD29, KJ2016SD37); 安徽省自然科学基金 (1508085MH159); 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目 (gxbjZD2016069); 安徽省蚌埠市科技计划项目 (20150309); 蚌埠医学院研究生创新项目 (Byyexz1607, Byyex1607, Byyex1615)

第一作者: 李 钰 (1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事感染性疾病分子生物学机制研究; E-mail: liyu1234july@163.com; <http://orcid.org/0000-0002-8465-6183>

通讯作者: 陈昌杰 (1968—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤分子生物学研究; E-mail: tochenchangjie@163.com; <http://orcid.org/0000-0001-9646-320X>

CHEN Sulian³, YANG Qingling³, CHEN Changjie³ (1. *Clinical Testing and Diagnose Experimental Center, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China*; 2. *Department of Oncology, the Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu 233000, China*; 3. *Department of Biochemistry & Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China*)

Corresponding author: CHEN Changjie, E-mail: tochenchangjie@163.com, <http://orcid.org/0000-0001-9646-320X>

[Abstract] Objective: To investigate the effects of long non-coding RNA (lncRNA) RP11-770J1.3 and transmembrane protein 25 (TMEM25) on paclitaxel resistance in human breast cancer MCF-7/PR cell line. **Methods:** The expression of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 in human breast cancer MCF-7 (paclitaxel sensitive) and MCF-7/PR (paclitaxel resistant) cells were detected by quantitative RT-PCR. The synthetic interfering fragments of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 were transfected into MCF-7/PR cells. Sulforhodamine B assay was used to detect the sensitivity of MCF-7/PR cells to paclitaxel after interference of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25. The expression of multidrug-resistance genes and proteins were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results:** lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 were highly expressed in MCF-7/PR cells, and were significantly down-regulated after transfection of synthetic interfering fragments. Down-regulation of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 enhanced the sensitivity of MCF-7/PR cells to paclitaxel, and inhibited the expression of MRP, BCRP and MDR1/P-gp (all $P < 0.05$). Such effects were more significant when lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 were both down-regulated (all $P < 0.05$). **Conclusion:** lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 are highly expressed in MCF-7/PR cells, and the down-regulation of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 can enhance paclitaxel sensitivity in MCF-7/PR cells.

[Key words] RNA; Membrane proteins/metabolism; Breast neoplasms/physiopathology; Polymerase chain reaction; Paclitaxel/pharmacology; Cell line, tumor/pathology; Tumor cells, cultured; Drug resistance, neoplasm

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2017, 46(4):364-370.]

乳腺癌是全球女性因癌症死亡的主要原因^[1]。紫杉醇通过抑制有丝分裂,诱导细胞死亡,在乳腺癌的治疗中起着至关重要的作用^[2]。肿瘤细胞对紫杉醇耐药性的产生是限制紫杉醇临床应用的主要原因之一^[3],其中机制目前尚未阐明。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度超过 200 nt 但不编码蛋白质的 RNA 分子,主要在转录等水平发挥多种生物学功能。大量证据表明,lncRNA 在乳腺癌细胞的耐药中发挥重要作用,如 H19 的表达下调可以降低乳腺癌雌激素受体 α 过表达产生的耐药影响,提高对紫杉醇的敏感性^[4]。lncRNA RP11 超家族在乳

腺癌中表达水平的改变可以影响乳腺癌细胞的侵袭迁移和增殖^[5]。本研究前期通过生物信息学软件发现 lncRNA RP11 超家族成员 lncRNA RP11-770J1.3 与乳腺癌密切相关,其与跨膜蛋白 25 (transmembrane protein 25, TMEM25) 也具有相关性。有研究发现, TMEM25 与肿瘤的发生发展密切相关,其在乳腺癌中的表达与 CMF (环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶) 辅助阿霉素化疗有关^[6-7]。本研究主要探讨 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 对紫杉醇耐药的人乳腺癌细胞株耐药生物学活性的影响和相关分子生物学机制,为临床逆转耐药研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;紫杉醇耐药株 MCF-7/PR 由本实验室构建保存^[8], ABI 7500/7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司。FBS 购自美国 Hyclone 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;焦炭酸二乙酯购自美国 Sigma 公司;紫杉醇、TRIzol 试剂和 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒、SYBR[®] GreenI 购自宝生物工程(大连)有限公司;lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 干扰片段购自上海吉玛制药技术有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、电化学发光(ECL)试剂盒购自美国 Millipore 公司;一抗 TMEM25、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、多药耐药基因 1(multidrug resistance, MDR1)及其编码产物 P-gp(P-glycoprotein)、β-actin 购自美国 Proteintech 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;所有引物合成和 DNA 序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 细胞培养

复苏细胞,使其能在含有 10 μg/mL 浓度的紫杉醇培养液中稳定生长。MCF-7 及 MCF-7/PR 细胞株均在含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,37 ℃、5% 二氧化碳饱和湿度条件下培养,每 3~4 d 传代一次。所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 干扰片段转染及筛选

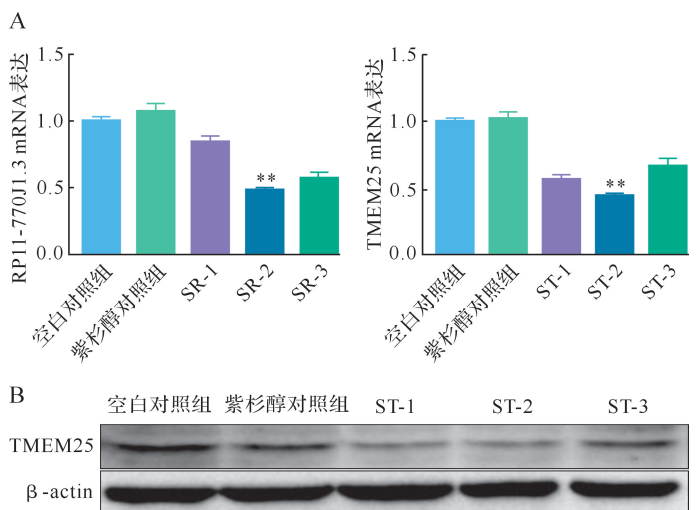
取 MCF-7/PR 对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后离心计数并调整细胞密度为 4 × 10⁵/mL,接种于六孔板中,每孔加细胞悬液 2 mL,第 2 天细胞贴壁达 70%~80%。分别将浓度为 20 μmol/L 各三个 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 干扰片段(表 1)5 μL 稀释于 250 μL 无血清培养基中,用 5 μL

Lipofectamine 2000 进行同样稀释,室温静置 5 min,将稀释好的干扰片段与 Lipofectamine 2000 混匀后再静置 20 min,轻柔地加入六孔板中,筛选 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的特异性干扰片段(lncRNA RP11 siRNA 和 TMEM25 siRNA)。相对于非特异性 siRNA 的空白对照组,lncRNA RP11 siRNA-2 和 TMEM25 siRNA-2 的干扰效率均达到 50% (均 P < 0.01),见图 1。因此,采用 lncRNA RP11 siRNA-2 和 TMEM25 siRNA-2 进行后续试验。

表 1 干扰片段序列

Table 1 Interference sequences

干扰片段名称	序列(5'→3')	片段长度(bp)
lncRNA RP11-770J1.3-1	正义:GCAUGGUCCUACAGAAAUGTT	21
	反义:CAUUCUGUAGGACCAUGCT	
lncRNA RP11-770J1.3-2	正义:CAGGGUGAAUUAUAGUACATT	21
	反义:UGUACUAUAAUUCACCCUATT	
lncRNA RP11-770J1.3-3	正义:GAGCGCAGUUAACAGGAAATT	21
	反义:UUUCCUGUUGACUGCGCUCTT	
TMEM25-1	正义:GCACCCAUCUCUGAUUUCATT	21
	反义:UGAUUUCUGUGUUGGGUGCTT	
TMEM25-2	正义:GGCUAAUUCUAUCGAGUGUTT	21
	反义:ACACUCGAUAGAUUAGCCTT	
TMEM25-3	正义:GCAUUCACUGGGCUGUAATT	21
	反义:UUCACGCCAGUGAAAUGCTT	



A:lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的 mRNA 水平;B: TMEM25 的蛋白表达。SR: RP11 siRNA; ST: TMEM25 siRNA. 与紫杉醇对照组比较, ** P < 0.01。

图 1 三种 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 干扰片段的筛选

Figure 1 Screening of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 synthetic interferences

1.4 磺酰罗丹明 B (SRB) 染色检测细胞的增殖活性

用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,调整细胞密度为 5×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔加细胞悬液 100 μ L,24 h 后加入不同浓度的紫杉醇(0、3、6、9、12、15、18 μ g/mL),72 h 后终止培养,吸出培养基,每孔加入 200 μ L 10% 三氯乙酸,4 $^{\circ}$ C 固定 50 min,双蒸水洗涤五次,室温下干燥;加入 100 μ L 0.4% 磺酰罗丹明 B (SRB) 染液染色 30 min,1% 乙酸溶液洗涤五次后干燥;每孔加入 150 μ L 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris-base) 溶液,摇床上剧烈振荡 15 min,待 SRB 染液充分溶解,酶标仪检测波长 515 nm 处的吸光度值。

1.5 实时定量 PCR 检测耐药相关基因的 mRNA 表达

取 MCF-7/PR 对数生长期细胞进行实验,实验分为五组:空白对照组、紫杉醇对照组(10 μ g/mL 紫杉醇)、紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA 组、紫杉醇 + TMEM25 siRNA 组、联合转染组(紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA + TMEM25 siRNA 组)。利用培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 4×10^5 /mL,取 2 mL 细胞悬液接种于六孔板中,按照实验设计分组进行加药处理。TRIzol 法提取总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行逆转录。按照 SYBR 荧光定量试剂盒说明书进行 mRNA 表达的定量检测,PCR 反应体系的反应体积为 20 μ L:Premix 10 μ L,ROX II 0.4 μ L,上游引物 0.6 μ L,下游引物 0.6 μ L,cDNA 3 μ L,双蒸水(ddH₂O) 6.4 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,共进行 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 34 s。每组设三个平行孔,以 GAPDH 作为内参,引物序列见表 2。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析,相关基因表达的 $\Delta\Delta CT = CT$ 值(实验组目的基因 - 实验组 GAPDH) - CT 值(对照组目的基因 - 对照组 GAPDH)。结果数据利用 GraphPad Prism 5 作图和分析。

1.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达

实验分组同上,48 h 后用胰蛋白酶消化细胞,用预冷 PBS 洗涤,每组加入 80 μ L 蛋白裂解液充分混匀,冰上裂解 30 min 后,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,吸取上清液,二喹啉甲酸法进行蛋白质定量分析,蛋白样品总量为 25 μ g;加入 SDS 上样缓冲液,于 95 $^{\circ}$ C 煮 15 min,100 V、10% 十二烷基硫

表 2 实时定量 PCR 引物序列

Table 2 Sequences of real time quantitative RT-PCR primers

引物名称	序列(5'→3')	片段长度(bp)
RP11-770J1.3	上游:CAACAGGAACAGCATGCTCG 下游:TGGCTATCTGATGCTAAATTCG	226
TMEM25	上游:CTGCCACGGGAGAACATGTGA 下游:ATCTGCCGGTCTGCTGCTT	201
MDR1	上游:GTACCCATCATTGCAATACG 下游:CAAACCTCTGCTGACTCGAC	157
BCRP	上游:CTGACTTTATCGCTGCTGT 下游:GATTGTTCTGCCCTGCTTAGAC	176
MRP	上游:ACTTCCTTATGTCTGCCGACA 下游:AAGACTGAACTCCTTCGCTCT	246
GAPDH	上游:GCATGGGTCAGAAGGATTTCCT 下游:TCGTCACAGTTGGTGACCAT	106

酸钠聚丙烯酰胺电泳 1.5 h,电泳结束后将蛋白转置甲醇活化后的 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉溶于 TBS-T 中,封闭 2 h;孵育一抗,分别加入鼠抗人 β -actin 抗体,兔抗人 TMEM25、MRP、BCRP、P-gp 抗体(工作浓度 1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS-T 缓冲液洗涤 PVDF 膜四次,每次 8 min,HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(1:5000)37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后洗膜,进行 Bio-Rad 成像系统拍照,Image J 软件分析实验结果,每组实验重复三次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异用 t 检验,多组样本均数之间差异采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

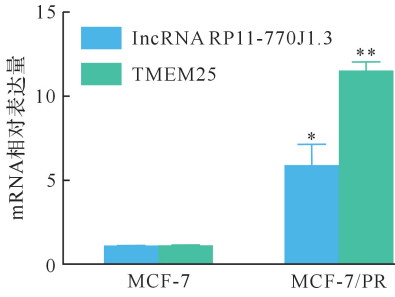
2 结果

2.1 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 在 MCF-7/PR 中的表达

如图 2 所示,相对于 MCF-7,lncRNA RP11-770J1.3 在 MCF-7/PR 中的表达量升高了约 5.8 倍($P < 0.05$),TMEM25 在 MCF-7/PR 中的表达量升高了约 11.4 倍($P < 0.01$)。

2.2 干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 后 MCF-7/PR 对紫杉醇的敏感性变化

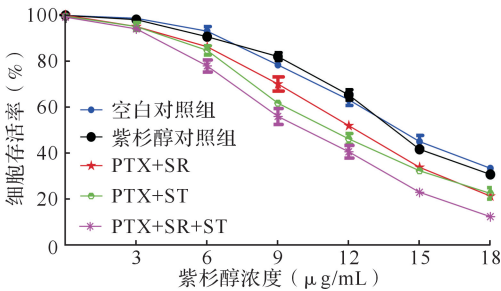
利用 SRB 实验检测干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达后 MCF-7/PR 对紫杉醇敏感性的影响。如图 3 所示,相对于 MCF-7/PR 空白对照组,紫杉醇对照组的细胞无明显抑制现象;



与 MCF-7 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 2 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 mRNA 在 MCF-7 和 MCF-7/PR 中的表达

Figure 2 mRNA expression of lncRNA RP11-770J1.3 and TMEM25 in MCF-7 and MCF-7/PR cells



PTX + SR: 紫杉醇 + RP11 siRNA 组; PTX + ST: 紫杉醇 + TMEM25 siRNA 组; PTX + SR + ST: 紫杉醇 + RP11 siRNA + TMEM25 siRNA 组.

图 3 不同浓度紫杉醇作用下 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 对 MCF-7/PR 生长抑制的影响

Figure 3 The sensitivity to paclitaxel of MCF-7/PR after transfected with lncRNA RP11 siRNA and TMEM25 siRNA

与空白对照组和紫杉醇对照组比较,紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA 转染组和紫杉醇 + TMEM25 siRNA 转染组在不同紫杉醇浓度作用下 MCF-7/PR 的增殖出现了抑制现象(均 $P < 0.05$),表明干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达可以提高 MCF-7/PR 对紫杉醇的敏感性,且以紫杉醇 + RP11-770J1.3 siRNA + TMEM25 siRNA 联合转染组作用明显。

2.3 干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 对 MCF-7/PR 耐药相关基因表达的影响

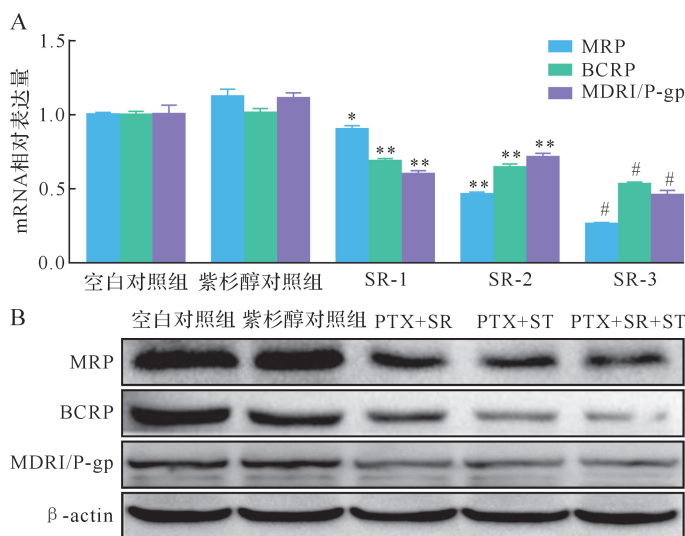
如图 4 所示,与空白对照组和紫杉醇对照组比较,RP11 siRNA 转染组和 TMEM25 siRNA 转染组耐药相关基因 MRP、BCRP 和 MDR1/P-gp 基因表达下调(均 $P < 0.05$),且以紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA + TMEM25 siRNA 联合转染组耐药相关基因表达下调最为明显(均 $P < 0.05$)。提示干

扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达可通过调控多种耐药相关基因的表达进而影响 MCF-7/PR 对紫杉醇的药物敏感性。

3 讨论

紫杉醇是当今肿瘤治疗的一线药物,肿瘤细胞对紫杉醇耐药性的产生是化疗失败的常见原因^[9]。多药耐药的机制十分复杂,lncRNA 在调控多种肿瘤细胞耐药方面的作用受到越来越多的关注。如 Tsang 等^[10]发现 lncRNA H19 可以诱导 MDR1 的表达,并且通过调控 MDR1 启动子甲基化影响肝细胞癌的耐药性。多项研究结果显示,lncRNA 在乳腺癌细胞的耐药中同样发挥着重要作用,如 lncRNA UCA1 通过下调肿瘤抑制因子 P27 的表达促进乳腺癌生长,沉默 UCA1 可以增强乳腺癌对三苯氧胺的药物敏感性^[11];lncRNA HIF1A-AS2、lncRNA AK124454 与乳腺癌细胞对紫杉醇耐药有关^[12];Liu 等^[13]发现 lncRNA RP11 超家族通过调控 miR-10a 的表达影响脑胶质瘤细胞对替莫唑胺的耐药性。lncRNA RP11-770J1.3 是 lncRNA RP11 超家族的成员,本研究通过 ChIPBase v2.0 软件(<http://rna.sysu.edu.cn/chipbase/>)发现 lncRNA RP11-770J1.3 与 TMEM25 存在相关性。TMEM25 是免疫球蛋白超家族的成员,在神经母细胞瘤、胃癌和结直肠癌等组织中表达^[6],与乳腺癌耐药密切相关^[7]。本研究通过荧光定量检测 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 在乳腺癌细胞株 MCF-7/PR 中的表达水平,初步探讨两者在 MCF-7/PR 中异常表达对紫杉醇敏感性的影响。

本研究结果显示,紫杉醇耐药 MCF-7/PR 中 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 表达水平明显高于紫杉醇敏感的 MCF-7 细胞。通过干扰技术下调 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 的表达后发现,lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 表达水平的下降可增加 MCF-7/PR 对紫杉醇的敏感性,并且联合干扰两者表达的耐药细胞株对紫杉醇的敏感性更高。为进一步研究 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 调控乳腺癌细胞对紫杉醇耐药的相关分子生物学机制,本研究对 MCF-7/PR 中耐药基因 MRP、BCRP、MDR1/P-gp 的相对表达量进行了检测。MRP、BCRP、MDR1 是研究较多的 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白,它们通过药物泵作用将抗癌药物转运出细胞^[14]。研究发现,许多发生耐药的肿瘤



A: MCF-7/PR 中紫杉醇耐药相关基因的 mRNA 表达; **B:** MCF-7/PR 中紫杉醇耐药相关基因的蛋白表达. SR: lncRNA RP11 siRNA; ST: TMEM25 siRNA; PTX+SR: 紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA 组; PTX+ST: 紫杉醇 + TMEM25 siRNA 组; PTX+SR+ST: 紫杉醇 + lncRNA RP11 siRNA + TMEM25 siRNA 组. 与空白对照组和紫杉醇对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 PTX+SR 组、PTX+ST 组比较, # $P < 0.05$.

图 4 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 对 MCF-7/PR 耐药相关基因表达的影响

Figure 4 Expression of genes related to paclitaxel resistance in MCF-7/PR after transfected with lncRNA RP11 siRNA and TMEM25 siRNA

组织均高表达 BCRP, 如乳腺癌^[15]、肺癌^[16]、急性髓性白血病^[17]等。我们前期研究已证实, 相对于 MCF-7 细胞, MCF-7/PR 中耐药基因 MRP、BCRP、MDR1/P-gp 表达量增加, 而调控 MDR1 及其编码产物 P-gp 的表达可能会逆转乳腺癌细胞对紫杉醇耐药^[18]。本研究发现, 干扰 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 导致 MRP、BCRP 和 MDR1/P-gp 表达水平降低, 说明 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 可以通过调控耐药相关基因的表达, 从而影响乳腺癌细胞对紫杉醇的药物敏感性。

综上所述, lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 在对紫杉醇耐药的人乳腺癌细胞株中表达异常升高, 下调两者可以调控耐药相关基因 MRP、BCRP、MDR1/P-gp 的表达, 进而增强耐药细胞对紫杉醇的敏感性, 提示高表达 lncRNA RP11-770J1.3 和 TMEM25 可能与乳腺癌患者紫杉醇治疗失败有关, 两者有望成为逆转人乳腺癌细胞对紫杉醇耐药的研究靶点, 为临床乳腺癌治疗提供新的思路。

参考文献

[1] DESANTIS C, MA J, BRYAN L, et al. Breast cancer

statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):52-62.

[2] SAKAMOTO J, MATSUI T, KODERA Y. Paclitaxel chemotherapy for the treatment of gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2009, 12(2):69-78.

[3] FOJO T, MENEFFEE M. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18 Suppl 5: v3-8.

[4] SI X, ZANG R, ZHANG E, et al. LncRNA H19 confers chemoresistance in ER α -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49):81452-81462.

[5] LIU W, MA J, CHENG Y, et al. HMMR antisense RNA1, a novel long noncoding RNA, regulates the progression of basal-like breast cancer cells [J]. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2016, 8(1):223-229.

[6] HRAŠOVEC S, HAUPTMAN N, GLAVAČ D, et al. TMEM25 is a candidate biomarker methylated and down-regulated in colorectal cancer [J]. *Dis Markers*, 2013, 34(2):93-104.

[7] DOOLAN P, CLYNES M, KENNEDY S, et al. TMEM25, REPS2 and Meis 1: favourable prognostic and predictive biomarkers for breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2009, 30(4):200-209.

[8] YANG Q L, HUANG J, WU Q, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(8):1958-1967.

[9] DINIC J, PODOLSKI-RENIC A, STANKOVIC T, et al. New approaches with natural product drugs for overcoming multidrug resistance in cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(38):5589-5604.

[10] TSANG W P, KWOK T T. Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26(33):4877-4881.

[11] LIU H, WANG G, YANG L, et al. Knockdown of long non-coding RNA UCA1 increases the tamoxifen sensitivity of breast cancer cells through inhibition of Wnt/ β -Catenin pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(12):e0168406.

[12] YANG Y, JIANG Y, WAN Y, et al. UCA1 functions as a competing endogenous RNA to suppress epithelial ovarian cancer metastasis [J]. **Tumour Biol**, 2016, 37(8):10633-10641.

[13] LIU Y, XU N, LIU B, et al. Long noncoding RNA RP11-838N2. 4 enhances the cytotoxic effects of temozolomide by inhibiting the functions of miR-10a in glioblastoma cell lines [J]. **Oncotarget**, 2016, 7(28):43835-43851.

[14] DE VRIES N A, ZHAO J, KROON E, et al. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan [J]. **Clin Cancer Res**, 2007, 13(21):6440-6449.

[15] DIAH S K, SMITHERMAN P K, ALDRIDGE J, et al. Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins [J]. **Cancer Res**, 2001, 61(14):5461-5467.

[16] NAGASHIMA S, SODA H, OKA M, et al. BCRP/ABCG2 levels account for the resistance to

topoisomerase I inhibitors and reversal effects by gefitinib in non-small cell lung cancer [J]. **Cancer Chemother Pharmacol**, 2006, 58(5):594-600.

[17] 易娟, 陈静, 孙静, 等. 白血病 K562/ADM 细胞耐药性与白血病干细胞及耐药蛋白表达的关系 [J]. **中华医学杂志**, 2009, 89(25):1741-1744.

YI Juan, CHEN Jing, SUN Jing, et al. The relationship between multi-drug resistance and proportion of leukemia stem cells and expression of drug transporters in drug-resistant leukemia K562/ADM cells [J]. **National Medical Journal of China**, 2009, 89(25):1741-1744. (in Chinese)

[18] 赵遵兰, 蔡颖, 王洋洋, 等. 微小 RNA-21 对人乳腺癌细胞株紫杉醇耐药性的影响及其机制 [J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2015, 44(4):400-405.

ZHAO Zunlan, CAI Yin, WANG Yangyang, et al. Effect of miRNA-21 on paclitaxel-resistance in human breast cancer cells [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences**, 2015, 44(4):400-405. (in Chinese)

[本文编辑 余方黎仕娟]

· 学术动态 ·

陈忠教授团队解析缺血性卒中患者神经细胞线粒体自噬的分子生物学机制

2017年8月18日,浙江大学药学院陈忠教授团队在《自噬》(*Autophagy*)杂志发表了线粒体自噬研究方面的最新成果论文“BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2”(http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2017.1357792),首次明确了缺血性卒中患者神经细胞线粒体外膜蛋白 Nix 在脑缺血复灌过程中介导线粒体自噬的重要作用,为今后脑缺血损伤干预提供潜在靶点。

陈忠教授团队前期工作发现,缺血后脑血流复灌过程可以通过线粒体自噬,即激活神经元损伤线粒体的自噬性清除,而减少神经元损伤。有学者认为, E3 泛素化连接酶 Parkin 是介导线粒体自噬的主要蛋白。但是陈忠教授团队发现 Nix 可能在线粒体自噬过程中发挥了重要作用,而并非 Parkin。Nix 可介导红细胞发育过程中的线粒体清除,学术界普遍认为 Nix 的作用是生理而非病理性的。该研究发现在脑缺血复灌过程中, Nix 可以通过一种 Parkin 非依赖的途径介导线粒体自噬,在此基础上首次发现 Nix 的第 81 位丝氨酸是一个新的磷酸化位点,其磷酸化激活了 Nix 介导线粒体自噬,并发挥神经保护作用。Nix 在病理过程中介导线粒体自噬的作用可加深对 Nix 生物学功能的认识。

论文第一作者为博士研究生袁扬和郑艳榕,共同通讯作者兼共同第一作者为张翔南副教授。该研究获得了国家自然科学基金以及浙江省自然科学基金的资助。