

· 论 著 ·

胃癌细胞 miR-30a 的表达对紫杉醇联合卡铂新辅助化疗敏感性的影响

苏卓彬， 王国强， 杨永江， 赵轶峰， 黄迪， 王晓元， 任慧敏， 籍阳阳， 李曙光
河北北方学院附属第一医院胃肠肿瘤外科，河北 张家口 075000

摘要：目的 探讨上调胃癌细胞微小核糖核酸(microRNA, miR)-30a 的表达对紫杉醇联合卡铂新辅助化疗敏感性的影响以及可能的作用机制。方法 经细胞活力测定(MTT)法检测紫杉醇联合卡铂对人胃腺癌细胞(AGS)增殖活性的抑制作用,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测 miR-30a 表达的变化。将 miR-30a mimics 转染至 AGS 细胞,分为空白对照组(CTL 组)、空质粒转染组(NC 组)和转染组,采用 Annexin V/PE 双染法检测紫杉醇联合卡铂对各组 AGS 细胞凋亡的影响。采用绿色荧光蛋白法观察自噬泡形成。采用 Western blot 检测 Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3-β(LC3-Ⅱ)蛋白的表达量。并采用双荧光素酶基因报告分析 miR-30a 与 Beclin-1 的靶向关系。**结果** 分别将不同浓度紫杉醇和卡铂单独作用于 AGS 细胞 48 h 后,测得 IC₅₀ 分别为 1.56 μM 和 48.74 mg/L。经 IC₅₀ 紫杉醇和 IC₅₀ 卡铂联合处理后,AGS 细胞 miR-30a 表达量显著低于处理前[(0.37 ± 0.14) vs (1.26 ± 0.22), *P* < 0.05];转染组 AGS 细胞自噬泡形成率低于 CTL 组和 NC 组(*P* < 0.05);转染组 AGS 细胞凋亡率高于 CTL 组和 NC 组(*P* < 0.05);转染组 AGS 细胞 Beclin-1、LC3-Ⅱ蛋白表达量虽然高于处理前,但仍低于 CTL 组和 NC 组细胞(*P* < 0.05)。经双荧光素酶基因报告分析,Beclin-1 可能是 miR-30a 的下游靶基因。**结论** 上调 miR-30a 的表达,可能抑制紫杉醇联合卡铂诱导的 AGS 细胞自噬的发生,从而提高 AGS 细胞对新辅助化疗药物的敏感性。

关键词：微小核糖核酸-30a；胃癌；紫杉醇；卡铂；化疗敏感性；自噬

中图分类号：R-33 R 735.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1674 - 8182(2019)11 - 1466 - 06

Effect of expression of miR-30a in gastric cancer cells on the sensitivity of paclitaxel plus carboplatin neoadjuvant chemotherapy

SU Zhuo-bin, WANG Guo-qiang, YANG Yong-jiang, ZHAO Yi-feng, HUANG Di,
WANG Xiao-yuan, REN Hui-min, JI Yang-yang, LI Shu-guang
*Department of Gastrointestinal Oncology Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University,
Zhangjiakou, Hebei 075000, China*

Abstract: Objective To investigate the effect of up-regulation of microRNA(miR)-30a expression in gastric cancer cells on the sensitivity of paclitaxel plus carboplatin neoadjuvant chemotherapy and its possible mechanism. **Methods** The inhibitory effect of paclitaxel combined with carboplatin on the proliferation of AGS cells was detected by MTT assay. The expression of miR-30a was detected by qRT-PCR. MiR-30a mimics was transfected into AGS cells and divided into blank control group (CTL group), empty plasmid transfection group (NC group) and transfection group. The effect of paclitaxel combined with carboplatin on apoptosis of AGS cells was detected by Annexin V/PE double staining. Autophagic vacuole formation was observed by GFP fluorescence. The expression levels of Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3β (LC3-Ⅱ) protein were detected by Western blot. The dual luciferase reporter gene was used to analyze the targeting relationship between miR-30a and Beclin-1. **Results** After the different concentrations of paclitaxel and carboplatin were applied to AGS cells for 48 h, the IC₅₀ was 1.56 μM and 48.74 mg/L, respectively. After IC₅₀ paclitaxel combined with IC₅₀ carboplatin treatment, the expression of miR-30a in AGS cells was significantly lower than that before treatment [(0.37 ± 0.14) vs (1.26 ± 0.22), *P* < 0.05]. The autophagic formation rate of AGS cells in transfection group was lower than that in CTL group and NC group (*P* < 0.05). The apoptotic rate of AGS cells in transfection group was

higher than that in CTL group and NC group ($P < 0.05$). The expression levels of Beclin-1 and LC3-II in AGS cells of transfection group after treatment were higher than those before treatment, but still lower than those of CTL group and NC group ($P < 0.05$). By dual luciferase gene reporter analysis, Beclin-1 may be a downstream target gene of miR-30a.

Conclusions Up-regulating miR-30a expression may inhibit the autophagy of AGS cells induced by paclitaxel combined with carboplatin, so as to improve the sensitivity of AGS cells to neoadjuvant chemotherapy drugs.

Key words: MicroRNA-30a; Gastric cancer; Paclitaxel; Carboplatin; Chemosensitivity; Autophagy

Fund program: Hebei Provincial Medical Science Research Key Program in 2018 (20180820); Science and Technology Plan Project in Zhangjiakou City in 2018 (1821040D)

术前新辅助化疗是进展期胃癌综合治疗的重要组成部分,其临床优势在于提高根治性切除率,降低淋巴结和血管转移风险,以延长患者的生存时间^[1]。近几年,逐渐有临床试验证实紫杉醇联合卡铂(TP 方案)单周方案可使胃癌病灶得到显著的病理学缓解^[2]。但临床实践证实,部分患者可能会对术前新辅助化疗产生耐药性,从而导致治疗失败。自噬被认为是肿瘤细胞化疗耐药性的重要机制之一^[3]。而微小核糖核酸(microRNAs, miR)是参与自噬调控的重要调控因子^[4]。miR-30a 是研究相对较少的一类非编码信使 RNA(mRNA),在胃癌组织中呈低表达,且与化疗耐药性密切相关^[5]。有学者通过生物信息学预测软件发现转录因子 Beclin-1 很可能是 miR-30a 下游靶基因,而 Beclin-1 是自噬泡形成的关键蛋白之一^[6]。本研究拟探讨 miR-30a 在人胃腺癌细胞(AGS)中的表达对紫杉醇联合卡铂化疗敏感性的影响,为提高胃癌新辅助化疗敏感性的研究提供新的突破口。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂 人胃癌细胞株 AGS 购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)。注射用紫杉醇(Paclitaxel)和卡铂(Carboplatin)购自山东齐鲁制药,用前用生理盐水倍比稀释至实验浓度;RPMI1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;TRI-Reagent、RIPA 试剂、Lipofectamine™ 2000 脂质体试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;M-MLV 逆转录酶、质粒 DNA 提取试剂盒、Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自美国 Promega 公司;mirPremier® microRNA Isolation Kit 购自日本 Takara 公司;SYBR Green PCR master Mix 购自美国 Applied Biosystems 公司;Beclin-1 兔多克隆抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3β(MAP1LC3-II, LC3-II)兔多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;实验用水为超纯水,其他试剂均为国产分析纯。本研究所用质粒均由上海捷瑞基因公司构建并完成 DNA 测序工作。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染及分组 取对数期生长的 AGS 细胞,单层接种至 6 孔板中,待细胞贴壁后,采用无血清无抗生素的 RPMI1640 培养基饥饿培养 24 h 后,将稀释后的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂和转染 miR-30a mimics 质粒或空质粒混合,并将复合物加入至 6 孔板的 AGS 细胞中,6 h 后更换含血清和双抗的 RPMI1640 完全培养基培养,置于荧光倒置显微镜下观察荧光染色判断感染率。提取细胞 RNA,验证 miR-30a 表达情况及转染效率。若转染率 $\geq 80\%$ 可用于后续实验。实验分组:空白对照(CTL)组、转染组和空质粒转染(NC)组。

1.2.2 最佳药物浓度筛选 将对数期生长的 AGS 细胞(1×10^4 个/孔)单层接种至 96 孔板中,每组设置 8 个平行孔,临床上Ⅲ期胃癌患者采用 TP 单周方案的剂量分别为紫杉醇 80 mg/m^2 和卡铂 75 mg/m^2 ,按照同样比例混合两种药物,将紫杉醇浓度设置为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 μM (终浓度),将卡铂浓度设置为 6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 mg/L (终浓度),分别加入不同处理的细胞中,培养 48 h 后,加入 MTT,孵育 4 h 后,检测波长为 492 nm 处的吸光光度值(OD),计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%) = $(1 - \text{OD 值}_{\text{受试组}} / \text{OD 值}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 细胞活力测定(MTT)法 将对数期生长的 AGS 细胞(1×10^4 个/孔)单层接种至 96 孔板中,每组设置 8 个平行孔,取半数抑制浓度(IC_{50})紫杉醇和 IC_{50} 卡铂,加入细胞中,继续培养 24、48、72 h 后,加入 MTT,孵育 4 h 后,置于 450 酶标仪上,检测波长为 570 nm 处的 OD 值,计算细胞增殖抑制率计算 IC_{50} 。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 Annexin V/PI 双染法 收集对数期生长的 AGS 细胞,用 PBS 反复洗涤,加入 500 μl Binding Buffer 重悬,加入 Annexin V-FITC 5 μl ,避光孵育 15 min;上机前加入稀释后的 PI-PE (100 $\mu\text{g/ml}$) 5 μl ,避光孵育 15 min;上机检测。采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 绿色荧光蛋白(GFP)法观察自噬泡形成 取对数生长期的 AGS 细胞单层接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁后,更换为无血清无抗生素的 RPMI1640 培养基饥饿培养 24 h。将预先稀释的 pEGFP-LC3 质粒和 Lipofectamin™ 2000 脂质体混合,加入 AGS 细胞中。并采用含有 10% 胎牛血清和青-链双抗的 RPMI1640 完全培养基继续培养 48 h 后,弃掉培养液,反复洗涤,4 ℃ 加入预冷丙酮固定 5 min。置于荧光显微镜下观察自噬泡形成情况,若出现三个以上 LC3 针点状的细胞被称为自噬细胞。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 委托第三方设计合成 Beclin-1 3'-UTR 序列及突变序列,并插入 pGL3 荧光素酶报告载体的 XbaI 和 FseI 位点以构建荧光素酶报告质粒,制备感受态细胞。取对数期生长的人上皮细胞 HEK293T 细胞,提前 1 d 接种于 6 孔板中,用 Beclin-1 野生质粒或突变质粒与 miR-30a mimics 对 HEK293Ta 细胞进行共转染,检测荧光素酶活性。

1.2.7 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。配制逆转录反应体系,采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录呈 cDNA,按照 SYBR Green PCR master Mix 说明书进行 qRT-PCR。冰浴中配制 20 μ l PCR 反应体系,引物序列如下:miR-30a(F:5'-GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC GAC C-3',R:5'-TGC GCT AAC AGT CTA CAG CCA-3');Beclin-1 (F:5'-CAG CAA ACC AAC AAT GCC GA-3';R:5'-GAT CTG CGA CCA CAC CAT GA-3')。PCR 仪参数设定如下:95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次,60 ℃ 采集荧光信号。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因相对表达量。

1.2.8 Western blot 检测 AGS 细胞 LC3-II、Beclin-1 蛋白表达 收集 AGS 细胞,重复清洗;加入预冷的 RIPA 细胞裂解液冰浴裂解 10 min;收集上清;BCA 法定量蛋白浓度。加入 SDS 上样缓冲液充分混匀,使蛋白变性。采用 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,封闭。TBST 反复洗涤,分别加入含有 LC3-II 抗体(1:1 000 稀释)或 Beclin-1 抗体(1:1 000 稀释)的脱脂牛奶封闭液,4 ℃ 摇床孵育过夜。TBST 反复洗净一抗后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释);ECL 试剂显影,暗室曝光,扫描并定量蛋白条带亮度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量资料的方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳药物作用浓度筛选 分别将不同浓度的紫杉醇(0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 μ M)和卡铂(6.25、12.5、25、50、100、200 和 400 mg/L)单独作用于 AGS 细胞 48 h 后,测得 IC₅₀ 分别为 1.56 μ M 和 48.74 mg/L。见图 1。

2.2 紫杉醇联合卡铂对 AGS 细胞增殖的影响 经 MTT 法检测,取 IC₅₀ 紫杉醇(IC₅₀:1.56 μ M)和卡铂(IC₅₀:48.74 mg/L)联合作用于 AGS 细胞后,随着作用时间的延长,对细胞增殖的抑制率逐渐增加,呈时间依赖性($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 qRT-PCR 法检测紫杉醇联合顺铂对 AGS 细胞 miR-30a 表达量的影响 qRT-PCR 检测结果显示,经 IC₅₀ 紫杉醇(IC₅₀:1.56 μ M)和卡铂(IC₅₀:48.74 mg/L)联合处理后,AGS 细胞 miR-30a 表达量为 (0.37 ± 0.14) ,明显低于处理前的 (1.26 ± 0.22) ($P < 0.05$)。

2.4 mi-30a mimics 细胞转染 选择经 IC₅₀ 紫杉醇(IC₅₀:1.56 μ M)和卡铂(IC₅₀:48.74 mg/L)联合处理后的 AGS 细胞进行慢病毒转染,细胞若出现绿色荧光,则表示转染成功。miR-30a mimics 慢病毒滴度为 1×10^8 PFU/ml 时,细胞转染效率可达 80% 以上。见图 3。

2.5 紫杉醇联合卡铂可诱发 AGS 细胞自噬 采用 IC₅₀ 紫杉醇(IC₅₀:1.56 μ M)和卡铂(IC₅₀:48.74 mg/L)联合处理后,AGS 细胞自噬泡形成率明显高于处理前($P < 0.05$)。而 miR-30a mimics 转染组 AGS 细胞经紫杉醇联合卡铂处理后,自噬泡形成率较 CTL 组和 NC 组 AGS 细胞分别明显降低($P < 0.05$)。见图 4、表 1。

2.6 紫杉醇联合卡铂对各组 AGS 细胞凋亡活性的影响 经流式细胞术检测,加入 IC₅₀ 紫杉醇(IC₅₀:1.56 μ M)和卡铂(IC₅₀:48.74 mg/L)分别作用于 CTL 组、NC 组和转染组 AGS 细胞 24 h 后,细胞凋亡率分别为 $(6.38 \pm 1.55)\%$ 、 $(5.89 \pm 1.26)\%$ 、 $(23.14 \pm 2.23)\%$,紫杉醇联合卡铂对转染组 AGS 细胞凋亡的促进作用分别高于 CTL 组和 NC 组($P < 0.05$)。

2.7 双荧光素酶基因报告分析 miR-30a mimics 可明显减少野生型 Beclin-1 3'-UTR 荧光酶活性,与突变型 Beclin-1 3'-UTR 荧光酶活性相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),而将突变型 Beclin-1 3'-UTR 的基因报告质粒与 miR-30a mimics 共转染之后,其并未对荧光素酶活性产生明确影响。见图 5。

2.8 Western blot 法检测 Beclin-1、LC3-II 蛋白的表达量 Western blot 法检测,经紫杉醇联合卡铂干预

前,转染组 AGS 细胞 Beclin-1、LC3-Ⅱ蛋白的表达量分别低于 CTL 组和 NC 组($P < 0.05$)。而经紫杉醇联合卡铂处理后,CTL 组和 NC 组 AGS 细胞 Beclin-1 蛋白和 LC3-Ⅱ蛋白的表达量分别高于处理前($P <$

0.05)。同时,转染组 AGS 细胞经紫杉醇联合卡铂处理后 Beclin-1、LC3-Ⅱ蛋白的表达量分别低于 CTL 组和 NC 组细胞($P < 0.05$)。见表 1。

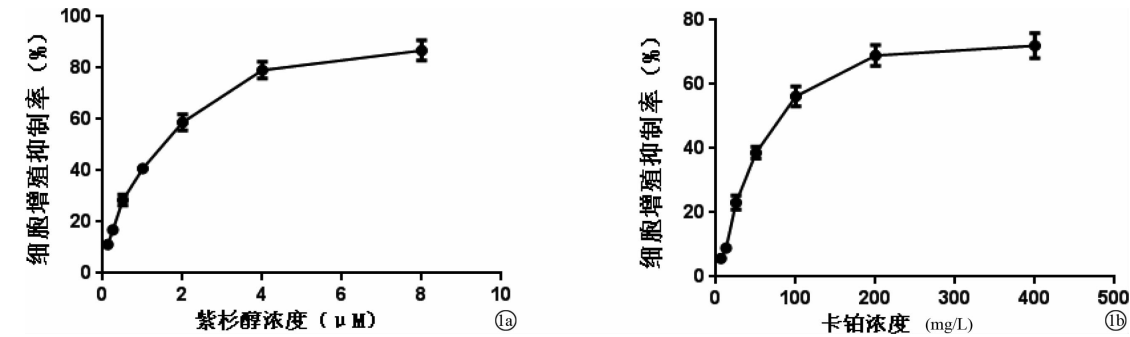


图 1 MTT 法检测紫杉醇或卡铂单独作用对 AGS 细胞增殖活性的影响

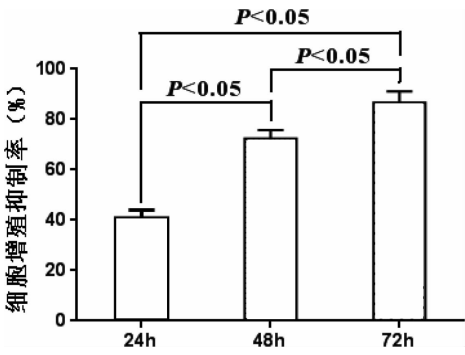
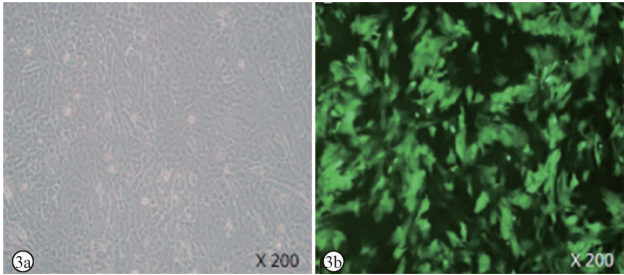


图 2 MTT 法检测紫杉醇联合卡铂对 AGS 细胞增殖的影响



注:3a:光学视野;3b:荧光视野。

图 3 AGS 细胞 miR-30a mimics 转染情况观察(×200)

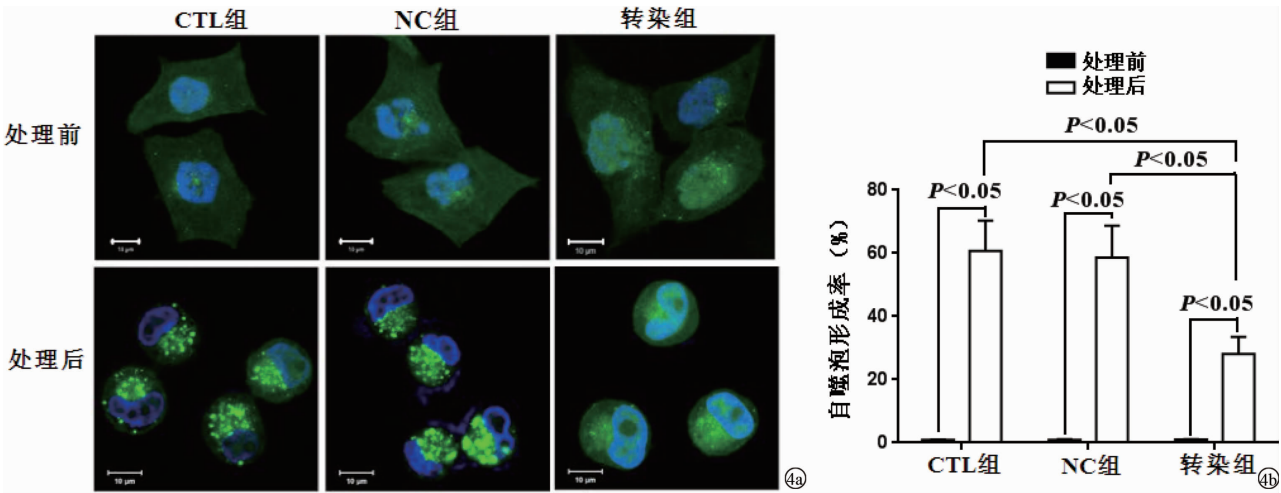
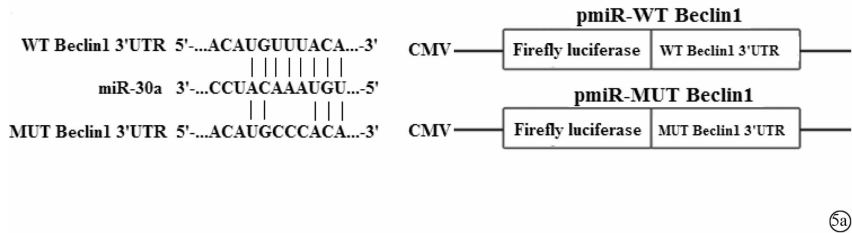


图 4 紫杉醇联合卡铂诱发 AGS 细胞发生自噬



注:5a:生物信息学预测 Beclin-1 与 miR-30a 具有互补序列;5b:Beclin-1 3'-UTR 与 miR-30a mimics 双荧光素酶报告基因实验结果;WT 为野生型;MUT 为突变型。

图 5 双荧光素酶报告基因实验结果

表 1 紫杉醇联合卡铂对 AGS 细胞自噬泡形成率及 Beclin-1 和 LC3-Ⅱ蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	自噬泡形成率(%)		Beclin-1		LC3-Ⅱ	
		处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
CTL 组	8	2.16 ± 0.73	59.35 ± 9.82	1.17 ± 0.43	2.05 ± 0.29	1.38 ± 0.42	2.87 ± 0.79
NC 组	8	2.35 ± 0.54	57.12 ± 11.56	1.25 ± 0.54	2.09 ± 0.36	1.43 ± 0.49	2.64 ± 0.82
转染组	8	2.62 ± 0.79	28.65 ± 5.43 ^{ab}	0.46 ± 0.11 ^a	0.65 ± 0.20 ^{ab}	0.29 ± 0.10 ^a	0.40 ± 0.10 ^{ab}

注:紫杉醇浓度为 1.56 μM,卡铂浓度为 48.74 mg/L;与 CTL 组相比,^a*P* < 0.05;与处理前相比,^b*P* < 0.05。

3 讨 论

自噬是真核生物维持内环境稳态的重要生理过程,不仅可水解消化细胞内部受损的细胞器、错误折叠的蛋白质或入侵物,而且也参与细胞死亡过程^[7]。肿瘤细胞属于异常自主性增生细胞,因此诱导细胞凋亡是具有细胞毒作用的化疗药物的主要目的。但是自噬在抗肿瘤过程中可能发挥着双重作用,如张香芝等^[8]证实在胃癌发生早期自噬相关基因 LC3、Raptor、Rictor 表达上调,并且协同促进胃癌的发生;而另一方面自噬又可以促使肿瘤细胞凋亡,有研究证实地塞米松通过诱导自噬促进急性淋巴细胞白血病细胞凋亡^[9]。肿瘤细胞受到放化疗损伤后,细胞内质网、线粒体、细胞核等细胞器都可以形成自噬体,清除受损的蛋白或细胞器,并在这个过程中重新蓄积能量以抵抗放化疗损伤^[10]。当停止放化疗后,残留的癌细胞则再度恢复增殖活性,导致肿瘤复发。有研究证实选择自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤、氯喹等可使原本耐药的肿瘤细胞重新获得化疗敏感性^[11]。也有学者通过敲除 LC3 基因,使得耐受细胞恢复对曲妥珠单抗的敏感性^[12]。因此抑制自噬对于增加化疗药物的敏感性、防止肿瘤复发具有重要的临床价值。

紫杉醇联合卡铂单周化疗是进展期胃癌患者术前最常使用的新辅助化疗方案,虽然大多数患者能够获得病理性缓解,但仍有部分患者出现耐药性,直接影响患者的治疗和预后^[13]。本研究通过对比治疗前后 AGS 细胞自噬泡的形成,发现自噬泡显著增加,自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-Ⅱ表达量也明显增加,因此证实紫杉醇和卡铂联合治疗可能诱导肿瘤细胞发生自噬,是导致新辅助化疗失败的原因之一。

既往有学者曾发现,miR-30a 与细胞自噬有关^[14]。本研究通过靶基因预测数据库 TargetScan、microrna 和 miRanda 筛选,发现 Beclin-1 基因结合位点与 miR-30a 互补,可能是 miR-30a 下游的靶基因。通过双荧光素酶基因报告分析也证实 Beclin-1 是 miR-30a 的下游靶基因。因此,我们通过转染 miR-30a mimics 至 AGS 细胞,发现紫杉醇联合卡铂对 AGS 细胞增殖的抑制活性大大增加,且 AGS 细胞的凋亡活性也明显受到紫杉醇和卡铂的抑制。紫杉醇

和卡铂都属于临床上最常使用的抗癌药物,卡铂可通过与核酸交联,致使 DNA 缩聚,从而影响 DNA 的复制、转录和翻译过程,并且对 mTOR 信号通路有明显的抑制作用,最终启动自噬。而紫杉醇可以通过与微管 β-Tublin 结合,抑制微管解聚和纺锤体的形成,将细胞阻滞在 G2/M 期,促使肿瘤细胞凋亡。而 DNA 缩聚,细胞内 miR-30a 的转录生成也相对减少,miR-30a 表达量降低。由于 miR-30a 可与 Beclin-1 基因的 3'-UTR 端结构域结合,抑制 Beclin-1 的翻译,而 Beclin-1 一方面作为自噬体起始的第一步,可与 hVps34、ATG14 及 p150 形成复合物启动自噬;另一方面又是 caspase 蛋白的全新底物,可被多种 Caspase 剪切失去自噬调控活性,转而启动自噬性凋亡程序^[15]。而经紫杉醇和卡铂干预后,miR-30a 表达量降低,则减少了对 Beclin-1 靶基因的抑制作用,Beclin-1 表达量升高,利于自噬的启动,延长肿瘤细胞的生存时间,导致耐药性的发生。在本研究中,通过转染 miR-30a mimics,使对 AGS 细胞 miR-30a 表达量升高,增加的 miR-30a 则抑制 Beclin-1 的表达,从而抑制紫杉醇联合卡铂诱导的自噬的激活。此外,LC3 作为自噬膜特异性标志物通过与不同的底物受体结合在整个自噬过程中也发挥着重要作用^[15]。在转染组 AGS 细胞中,miR-30a 表达量升高,则 Beclin-1 和 LC3-Ⅱ表达受到抑制,经紫杉醇联合卡铂处理后,虽然转染组 AGS 细胞数量有所升高,但仍然远远低于 CTL 组和 NC 组细胞数量,进一步证实上调 AGS 细胞 miR-30a 的表达量,可降低细胞自噬的发生。

综上所述,顺铂和紫杉醇联合干预,可导致 AGS 细胞 miR-30a 表达量降低,解除了对自噬特异性相关蛋白 Beclin-1 的抑制,从而促使自噬泡形成,启动自噬过程;而上调 miR-30a 的表达,则使转染的 miR-30a 与 Beclin-1 基因 3'-UTR 端结合,抑制其翻译,从而阻止自噬的发生,使 AGS 细胞持续受到紫杉醇和卡铂的损伤,直至死亡;最终增加胃癌细胞对紫杉醇联合卡铂治疗的敏感性,提高新辅助化疗的抗癌疗效。同时可考虑 miR-30a 作为逆转新辅助化疗耐药靶点的潜力,为临床个体化治疗提供新的思路。

- [3] Akpınar H, Cetiner M, Keshav S, et al. Diagnosis and treatment of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease and gastrointestinal bleeding: iron deficiency anemia working group consensus report[J]. Turk J Gastroenterol, 2017, 28(2): 81–87.
- [4] Abu Hashim H, Foda O, Ghayaty E. Lactoferrin or ferrous salts for iron deficiency anemia in pregnancy: a meta-analysis of randomized trials [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017, 219: 45–52.
- [5] Darwish AM, Khalifa EE, Rashad E, et al. Total dose iron dextran infusion versus oral iron for treating iron deficiency anemia in pregnant women: a randomized controlled trial [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2019, 32(3): 398–403.
- [6] You LH, Yan CZ, Zheng BJ, et al. Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2676.
- [7] Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the iron homeostatic hormone hepcidin[J]. Adv Nutr, 2017, 8(1): 126–136.
- [8] Petrušienė K, Žiginskienė E, Kuzminskis V, et al. Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients [J]. Medicina (Kaunas), 2017, 53(2): 90–100.
- [9] Peeling P, McKay AKA, Pyne DB, et al. Factors influencing the post-exercise hepcidin-25 response in elite athletes[J]. Eur J Appl Physiol, 2017, 117(6): 1233–1239.
- [10] 韩俊. 孕期营养保健对妊娠期缺铁性贫血及母婴结局的改善作用[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(3): 487–488.
- [11] Delaby C, Bros P, Vialaret J, et al. Quantification of hepcidin-25 in human cerebrospinal fluid using LC-MS/MS[J]. Bioanalysis, 2017, 9(4): 337–347.
- [12] Sadr V, Saffar B, Emamzadeh R. Functional expression and purification of recombinant hepcidin-25 production in Escherichia coli using SUMO fusion technology[J]. Gene, 2017, 610: 112–117.
- [13] Ueda N, Takasawa K. Role of hepcidin-25 in chronic kidney disease: anemia and beyond[J]. Curr Med Chem, 2017, 24(14): 1417–1452.
- [14] Vialaret J, Picas A, Delaby C, et al. Nano-flow vs standard-flow: which is the more suitable LC/MS method for quantifying hepcidin-25 in human serum in routine clinical settings? [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1086: 110–117.
- [15] Abbas IM, Hoffmann H, Montes-Bayón M, et al. Improved LC-MS/MS method for the quantification of hepcidin-25 in clinical samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(16): 3835–3846.
- [16] Choi N, Rigatto C, Zappitelli M, et al. Urinary hepcidin-25 is elevated in patients that avoid acute kidney injury following cardiac surgery [J]. Can J Kidney Health Dis, 2018, 5: 2054358117744224.
- [17] Yayar Ö, Eser B, Kılıç H. Relation between high serum hepcidin-25 level and subclinical atherosclerosis and cardiovascular mortality in hemodialysis patients[J]. Anatol J Cardiol, 2018, 19(2): 117–122.
- [18] Cho K, Cho B, Jung JW, et al. SRM-MS method development for hepcidin-25 peptide[J]. J Anal Methods Chem, 2018, 2018: 1–7.

收稿日期: 2019-03-06 修回日期: 2019-05-01 编辑: 王娜娜

(上接第 1470 页)

参考文献

- [1] 胡芑, 张红雁. 进展期胃癌的术前新辅助治疗进展[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(7): 544–549.
- [2] 王国强, 苏卓彬, 胡瑞霞, 等. 紫杉醇联合卡铂单周方案与 SOX 方案用于胃癌新辅助化疗的比较[J]. 山东医药, 2017, 57(33): 84–86.
- [3] 陈亦龙, 李维, 苏雪萍, 等. 抑制自噬通过促进 Caspase 依赖性细胞凋亡逆转鼻咽癌紫杉醇耐药性的研究[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(8): 626–633.
- [4] Ni J, Bucci J, Chang L, et al. Targeting microRNAs in prostate cancer radiotherapy[J]. Theranostics, 2017, 7(13): 3243–3259.
- [5] Zhu H, Wu H, Liu XP, et al. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells[J]. Autophagy, 2009, 5(6): 816–823.
- [6] Xu J, Huang H, Peng RJ, et al. MicroRNA-30a increases the chemosensitivity of U251 glioblastoma cells to temozolomide by directly targeting beclin 1 and inhibiting autophagy[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 4798–4804.
- [7] 刘虹, 邵荣光. 自噬在肿瘤发生与发展过程中的调节作用[J]. 药理学学报, 2016, 51(1): 23–28.
- [8] 张香芝, 吴淑华, 李扬扬, 等. 早期胃癌组织自噬相关基因 LC3、Raptor、Rictor 表达及意义[J]. 山东医药, 2018, 58(24): 5–9.
- [9] Laane E, Tamm KP, Buentke E, et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(7): 1018–1029.
- [10] 李长键, 邹小明. 自噬在胃癌中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(15): 2480–2484.
- [11] Chen SN, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(2): 220–229.
- [12] Ning L, Guo-Chun Z, Sheng-Li A, et al. Inhibition of autophagy induced by PTEN loss promotes intrinsic breast cancer resistance to trastuzumab therapy[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 5445–5454.
- [13] 李思瑾, 张丙忠. 紫杉醇联合铂类化疗在上皮性卵巢癌的耐药研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(22): 10231–10234.
- [14] Chen JL, Yu Y, Li S, et al. MicroRNA-30a ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting Beclin 1-mediated autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3679–3692.
- [15] Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. FASEB J, 2016, 30(12): 3961–3978.

收稿日期: 2019-04-01 修回日期: 2019-04-24 编辑: 王国品