

[文章编号] 1007-7669(2024)11-0852-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.11.10

## miR-17-5p 通过调控 PTEN/Akt 通路介导乳腺癌细胞顺铂耐药

赵妍<sup>1</sup>, 吉柳<sup>1</sup>, 孙成鹏<sup>2a</sup>, 赵心宇<sup>2b</sup>, 武文慧<sup>1</sup>

(1. 大连市妇女儿童医疗中心(集团)春柳妇产院区药剂科, 辽宁大连 116000; 2. 大连医科大学 a. 药学院, b. 检验医学院, 辽宁大连 116000)

[关键词] 顺铂; 乳腺肿瘤; 药物敏感性; 细胞凋亡; PTEN/Akt 通路

[摘要] 目的 探讨 miR-17-5p 通过调控 PTEN/Akt 通路介导乳腺癌细胞顺铂(DDP)耐药的作用。方法 采用 DDP 浓度梯度递增培养 MCF-7/DDP 耐药细胞株, 通过 RT-qPCR 检测 MCF-7 及 MCF-7/DDP 耐药细胞中 miR-17-5p 含量。将 MCF-7 细胞分为 miR-NC 组和 miR-17-5p 组, 分别转染 miR-NC 及 miR-17-5p mimics 质粒; 将 MCF-7/DDP 耐药细胞分为 anti-miR-NC 组和 anti-miR-17-5p 组, 分别转染 anti-miR-NC 及 anti-miR-17-5p 质粒。通过 RT-qPCR 检测转染效率, MTT 法评估转染后各组细胞对 DDP 的敏感性, Transwell 法用于获取 miR-17-5p 对乳腺癌细胞侵袭能力的直接作用, 流式细胞术检测细胞凋亡率。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-17-5p 和 PTEN 的靶向关系, Western blot 法检测 miR-17-5p 调控下细胞凋亡和 PTEN/Akt 通路关键蛋白的变化。结果 相较 MCF-7 细胞, MCF-7/DDP 耐药细胞中 miR-17-5p 表达量异常升高, PTEN 表达量降低( $P<0.01$ ), PTEN 作为靶基因受 miR-17-5p 调控。与 miR-NC 组相比, miR-17-5p 组增殖抑制率显著降低, 侵袭细胞数增加, 凋亡率下降(均  $P<0.05$ ), PTEN/Akt 通路中抑癌蛋白 PTEN、p21、p27 表达降低, p-Akt308、p-Akt473、cyclin D1 表达升高( $P<0.01$ )。与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-17-5p 组增殖抑制率提高, 侵袭细胞数减少, 凋亡率上升(均  $P<0.05$ ), 抑癌蛋白 PTEN、p21、p27 表达升高, p-Akt308、p-Akt473、cyclin D1 表达降低( $P<0.01$ )。结论 敲低 miR-17-5p 可有效提高乳腺癌细胞的 DDP 敏感性, 减弱其侵袭能力, 诱导其凋亡, 这可能与 miR-17-5p 对 PTEN/Akt 通路的调控作用有关。

[中图分类号] R96

[文献标志码] A

## MiR-17-5p mediating cisplatin resistance in breast cancer cells by regulating PTEN/Akt pathway

ZHAO Yan<sup>1</sup>, JI Liu<sup>1</sup>, SUN Cheng-peng<sup>2a</sup>, ZHAO Xin-yu<sup>2b</sup>, WU Wen-hui<sup>1</sup>

(1. Pharmacy Department of Chunliu Obstetrics and Gynecology Hospital, Dalian Municipal Women and Children's Medical Center, Dalian LIAONING 116000, China; 2. a. College of Pharmacy, b. College of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Dalian LIAONING 116000, China)

[KEY WORDS] cisplatin; breast neoplasms; drug susceptibility; apoptosis; PTEN/Akt pathway

[ABSTRACT] AIM To investigate the role of miR-17-5p in mediating cisplatin(DDP) resistance in breast cancer cells by regulating the PTEN/Akt pathway. METHODS MCF-7/DDP-resistant cell line was cultured with a gradient of increasing

[收稿日期] 2022-07-19 [接受日期] 2024-08-19

[基金项目] 辽宁省科学技术基金(2020-MS-256)

[作者简介] 赵妍, 女, 主管药师, 学士, 主要从事肿瘤药理学研究, E-mail: 3346170062@qq.com。赵心宇, 女, 正高级实验师, 硕士, 主要从事医学检验基础研究, E-mail: 2706716587@qq.com。武文慧, 女, 主任药师, 硕士, 主要从事妇产科药学的研究, E-mail: 2740392700@qq.com

[责任作者] 武文慧, 赵心宇

DDP concentrations. The content of miR-17-5p was detected in MCF-7 and MCF-7/DDP cells by RT-qPCR. MCF-7 cells were divided into miR-NC and miR-17-5p groups, and transfected with miR-NC and miR-17-5p mimics plasmids, respectively. MCF-7/DDP-resistant cells were divided into anti-miR-NC and anti-miR-17-5p groups, and transfected with anti-miR-NC and anti-miR-17-5p plasmids, respectively. Transfection efficiency was defined by RT-qPCR. The drug sensitivity of DDP in each group of transfected cells was evaluated by MTT. The direct effect of miR-17-5p on the invasive ability was obtained by Transwell assay. DDP-induced apoptosis of MCF-7 and MCF-7/DDP cells after transfection was analyzed by flow cytometry. The targeting relationship between miR-17-5p and PTEN was verified by double luciferase reporter gene assay. The changes of apoptosis and key proteins of PTEN/Akt pathway under the regulation of miR-17-5p were detected by Western blot. RESULTS Compared with MCF-7 cells, the miR-17-5p expression in MCF-7/DDP-resistant cells was abnormally increased, while the PTEN expression was reduced ( $P < 0.01$ ). PTEN was regulated by miR-17-5p as a target gene. Compared with the miR-NC group, the proliferation inhibition rate in the miR-17-5p mimics group was significantly declined, the number of invaded cells was enhanced, and the apoptosis rate was also decreased ( $P < 0.05$ ), and the expressions of tumor suppressor proteins PTEN, p21 and p27 in the PTEN/Akt pathway were decreased, and the expressions of p-Akt308, p-Akt473 and cyclin D1 were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the anti-miR-NC group, the proliferation inhibition rate was increased in the anti-miR-17-5p group, the number of invaded cells was decreased, and the apoptosis rate was also increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of tumor suppressor proteins PTEN, p21 and p27 was increased, and the expression of p-Akt308, p-Akt473 and cyclin D1 was decreased ( $P < 0.01$ ). CONCLUSION Knockdown of miR-17-5p can effectively improve the DDP sensitivity of breast cancer cells, attenuate the invasive ability, and induce further apoptosis, which may be related to the regulatory effect of miR-17-5p on the PTEN/Akt pathway.

乳腺癌一直以来是女性高发的一种癌症, 其发病率在绝经前后和青壮年阶段都较高。顺铂 (cisplatin, DDP) 可用于治疗乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、睾丸癌、膀胱癌、结直肠癌和肺癌等多种恶性实体瘤<sup>[1]</sup>, 其可通过多种机制来发挥抗癌活性, 但目前广泛认可的机制是 DDP 可通过与 DNA 上的嘌呤相互作用, 从而激活多个信号通路, 最终导致细胞凋亡<sup>[2]</sup>。然而, 在 DDP 治疗过程中存在部分肿瘤细胞表现出耐药性, 极大地影响了后续治疗。微 RNAs (miRNA) 是一类小的调节性非编码 RNA, 尽管细胞中 miRNA 的含量较少, 但其在肿瘤发展和介导细胞耐药等方面发挥着关键作用<sup>[3]</sup>。研究表明, miRNA 可通过参与药物运转和代谢<sup>[4]</sup>、DNA 损伤修复<sup>[5]</sup>、DNA 甲基化和组蛋白修饰<sup>[6]</sup>、自噬和凋亡<sup>[7]</sup>、上皮-间充质转化<sup>[8]</sup>等过程调控乳腺癌细胞对 DDP 的耐药。miR-17-5p 是来源于 miR-17-92 基因簇的一个具有 23 个核苷酸的 miRNA。有研究证实 miR-17-5p 在卵巢癌细胞中参与介导 DDP 的耐药性<sup>[9]</sup>, 但其具体机制尚未可知。miR-17-92 基因簇已被发现可通过靶向多种抑癌基因促进癌症的发生发展<sup>[10, 11]</sup>。肿瘤抑制基因磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (PTEN) 可在磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/PTEN/蛋白激酶 B (Akt) 信号传导途径中发挥负向调节作用, 参与细胞分化、增殖及迁移等多种细胞功能<sup>[12, 13]</sup>。最新的研究表明, PTEN/Akt 通路的

异常激活参与调控肝癌细胞的 DDP 耐药<sup>[14]</sup>。本研究通过建立稳定 DDP 耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 尝试探讨 miR-17-5p 介导乳腺癌细胞 DDP 耐药的具体机制, 为乳腺癌的诊断和长期治疗寻找新的可行性方案。

## 材料与方法

**药物、试剂和仪器** DDP (纯度  $\geq 99.99\%$ ) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。DMEM 高糖培养基、特级胎牛血清、青-链霉素双抗 ( $5\ 000\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、胰酶消化液均购自美国 Gibco 公司; 总 RNA 小提试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; miR-17-5p 模拟物、抑制剂, PTEN 野生型、突变型质粒及对照质粒购自上海吉玛公司; MTT 试剂盒和瑞氏-吉姆萨染液购自上海碧云天生物技术有限公司; 胱天蛋白酶 3 (caspase-3)、cleaved caspase-3、多腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP)、cleaved PARP、PTEN、p27、p21、GAPDH 兔单克隆抗体, 细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; Akt、p-Akt308、p-Akt473 兔单克隆抗体, 山羊抗兔 IgG 均购自美国 CST 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自南京诺唯赞医疗科技有限公司; Lipofectamine 2000 转染试剂、RIPA 裂解液和 ECL 化学发光试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司。

IX71 型倒置荧光生物显微镜 (日本 Olympus 公司), NovoCyte 2040R 型流式细胞仪 (美国 Agilent 公司), Cytation5 型多功能酶标仪 (美国 Biotek 公司), MA-6000 实时荧光定量 PCR 仪 (苏州雅睿生物技术股份有限公司), 小型垂直电泳转印仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

**细胞培养及 MCF-7/DDP 耐药细胞株的构建** 人乳腺癌 MCF-7 细胞株和人胚肾 HEK-293T 细胞购自赛百慷生物技术股份有限公司, 用含 10% 特级灭活胎牛血清及 1% 青-链霉素双抗的 DMEM 培养基培养于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的恒温恒湿培养箱中。细胞状态良好时, 加入 DDP 终浓度为 200 ng · mL<sup>-1</sup> 的 DMEM 培养基, 待 3~4 d 细胞稳定生长后, 以 200 ng · mL<sup>-1</sup> 的梯度递增直至 DDP 终浓度为 5 μg · mL<sup>-1</sup>, 细胞仍长势良好, 即得 MCF-7/DDP 耐药细胞株。

**分组与转染** 将 MCF-7 及 MCF-7/DDP 耐药细胞提前 1 d 铺板, 使细胞汇合度达 90%, MCF-7 细胞分为 miR-NC 组和 miR-17-5p 组, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 miR-NC 和 miR-17-5p mimics 质粒。MCF-7/DDP 耐药细胞分为 anti-miR-NC 组和 anti-miR-17-5p 组, 分别转染 anti-miR-NC 和 anti-miR-17-5p 质粒, 通过 RT-qPCR 评估转染效率并进行后续实验。

**细胞 miR-17-5p 表达水平的检测** 采用 RT-qPCR 法进行检测。使用总 RNA 小提试剂盒从 MCF-7 细胞及 MCF-7/DDP 耐药细胞中提取总 RNA, 并用逆转录试剂盒处理得到 cDNA, 按照 RT-qPCR 试剂盒说明体系加样总反应体积为 20 μL, 反应体系包括 2 × QuantiTect SYBR Green 10 μL、0.5 μmol · L<sup>-1</sup> 上游引物、0.5 μmol · L<sup>-1</sup> 下游引物、1 μg cDNA 模板及适量无 RNA 酶水。miR-17-5p 的上游引物为 5'-GCCGCCAAAGTGCTTACA-3', 下游引物为 5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3', 产物长度为 64 bp; 内参 U6 的上游引物为 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3', 下游引物为 5'-TT CACGAATTTGCGTGTGTCATC-3', 产物长度为 87 bp。反应条件为 95 °C 15 min 预变性, 94 °C 15 s、60 °C 20 s 循环 45 次, 72 °C 30 s 延伸。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算表达量。

**细胞药物敏感度测定** 采用 MTT 法检测不同 DDP 浓度下各组转染后细胞的增殖情况以评估其对 DDP 的敏感度。取处于对数生长期的转染后各组细胞, 消化后以每孔 5 × 10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板中, 显微镜下观察 MCF-7 细胞贴壁生长的情况。加入 DDP, 使其终浓度为 0、20、40、80、120、160 μg · mL<sup>-1</sup>, 每组设置 6 个复孔, 培养 24 h 后重新加入含 20 μL MTT 的新培养基, 继续孵育 4 h 后加入 DMSO, 摇匀, 搅拌 10 min,

用酶标仪测量 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 以反映细胞活力。计算乳腺癌细胞的增殖抑制率, 增殖抑制率 = [(A<sub>阴性对照孔</sub> - A<sub>实验孔</sub>) / (A<sub>阴性对照孔</sub> - A<sub>空白孔</sub>)] × 100%, 以增殖抑制率为 50% 时的 DDP 质量浓度定义为半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

**细胞侵袭实验** 在通透性支撑物 (Transwell 小室) 上室添加基底胶并等待其脱水。将转染后的各组细胞放入不含血清的培养基中保存 1 d, 以消除血清对细胞侵袭实验的影响。将细胞悬液均匀放入 Transwell 小室的上室, 将含 10% 胎牛血清的培养基 600 μL 放入 Transwell 小室的下室, 根据药物敏感度测定中观察到的不同浓度 DDP 对 MCF-7 细胞的影响, 选择在所用培养基中添加 DDP 使浓度达到 20 μg · mL<sup>-1</sup>, 在 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中继续孵育 48 h, 取出小室, 用 75% 甲醇固定 5 min, 用棉签拭去 Transwell 小室中 8.0 μm 孔径聚碳酸酯膜上侧未穿过的细胞, 待瑞氏-吉姆萨染色完毕, 观察侵入膜下方的细胞数量并使用 cellSens Dimension 软件保存图像。

**细胞凋亡检测** 采用 NovoCyte 2040R 型流式细胞仪进行细胞凋亡检测。将形态正常的转染后细胞依次铺在 6 孔板中, 待细胞完全贴壁、形态良好时, 以 20 μg · mL<sup>-1</sup> DDP 处理细胞 48 h。用 100 μL 结合缓冲液重悬细胞, 加入 FITC 标记的 Annexin V 5 μL 和 PI 5 μL, 充分混匀后避光室温孵育 10 min, 补加上样缓冲液 400 μL 转移至 10 mL 塑料软试管, 样本上机前用 300 目滤膜过筛, 记录凋亡百分比。

**miR-17-5p 和 PTEN 靶向关系的预测和鉴定** 使用 TargetScanHuman 8.0 数据库 ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) 预测 miR-17-5p 和 PTEN 的结合位点, 采用双荧光素酶报告基因实验。在 96 孔板中接种一定数量的 HEK-293T 细胞, 待达到 70%~80% 的融合度时, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 Wt-PTEN、Mut-PTEN 与 miR-NC、miR-17-5p mimics 共同转染至 HEK-293T 细胞中。共转染 48 h 后, 加入报告基因专用裂解液轻缓晃动 15 min 彻底裂解细胞, 取 10 μL 裂解物上清液与萤火虫荧光素酶底物加入酶标板中混合 2 s, 测得萤火虫荧光素酶活性值, 随后加入海肾荧光素酶底物测得海肾荧光素酶活性值。每组实验重复 3 次。

**凋亡及 PTEN/Akt 通路相关蛋白的检测** 采用 Western blot 法进行检测。以 20 μg · mL<sup>-1</sup> DDP 处理乳腺癌细胞 48 h 后收集细胞, 使用细胞快速裂解液提取总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 取等量蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至聚偏二氟乙烯膜上, 以 5% 脱

脂牛奶室温封闭 2 h, 4 °C 孵育一抗过夜, 一抗包括 caspase-3 (1:1 000)、cleaved caspase-3 (1:500)、PARP (1:1 000)、cleaved PARP (1:1 000)、PTEN (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt308 (1:1 000)、p-Akt473 (1:1 000)、cyclin D1 (1:1 000)、p21 (1:1 000)、p27 (1:1 000)、GAPDH (1:10 000), 随后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 1.5 h, 用避光 EP 管配置 ECL 发光混合液在凝胶仪中曝光成像。

**统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 ± 标准差表示。每个实验至少重复 3 次。2 组间独立样本比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为有显著差异。

## 结 果

**miR-17-5p 在两种细胞中的表达量** RT-qPCR 结果显示, MCF-7/DDP 耐药细胞中 miR-17-5p 的相对表达量显著高于 MCF-7 细胞 ( $3.77 \pm 0.08$  vs.  $1.00 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ )。

**转染后 miR-17-5p 在两种细胞中的表达量** miR-17-5p 组细胞中 miR-17-5p 的相对表达量显著高于 miR-NC 组 ( $2.96 \pm 0.13$  vs.  $1.00 \pm 0.06$ ,  $P < 0.01$ )。anti-miR-17-5p 组细胞的 miR-17-5p 显著低于 anti-miR-NC 组 ( $0.34 \pm 0.04$  vs.  $1.00 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ )。

**miR-17-5p 对两种细胞 DDP 敏感性的影响** 随着 DDP 浓度的增加, MCF-7 细胞和 MCF-7/DDP 耐药细胞的增殖抑制率逐渐升高。在同一 DDP 浓度下, miR-17-5p 组细胞的增殖抑制率显著低于 miR-NC 组, miR-NC 组 DDP 的  $IC_{50}$  为  $33.21 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , miR-17-5p 组为  $102.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。anti-miR-17-5p 组细胞的增殖抑制率显著高于 anti-miR-NC 组, anti-miR-NC 组 DDP 的  $IC_{50}$  为  $90.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , anti-miR-17-5p 组为  $22.58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。见图 1。

**miR-17-5p 对两种细胞侵袭能力的影响** miR-17-5p 组的侵袭细胞数显著高于 miR-NC 组 ( $75.67 \pm 8.74$  vs.  $26.33 \pm 8.50$ ,  $P < 0.01$ )。anti-miR-17-5p 组的侵袭细胞数显著低于 anti-miR-NC 组 ( $18.00 \pm 5.57$  vs.  $69.75 \pm 10.78$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2。

**miR-17-5p 对两种细胞凋亡的影响** 相同浓度 DDP 处理下, miR-17-5p 组细胞凋亡率显著低于 miR-NC 组 ( $8.36 \pm 1.55$  vs.  $14.39 \pm 2.96$ ,  $P < 0.05$ )。anti-miR-17-5p 组细胞凋亡率 ( $16.79 \pm 3.26$ ) 显著高于 anti-miR-NC 组 ( $9.48 \pm 1.03$ ,  $P < 0.05$ )。见图 3。

**miR-17-5p 对两种细胞中凋亡相关蛋白的影响** 在 MCF-7 细胞 2 组间 caspase-3 和 PARP 蛋白水平无显

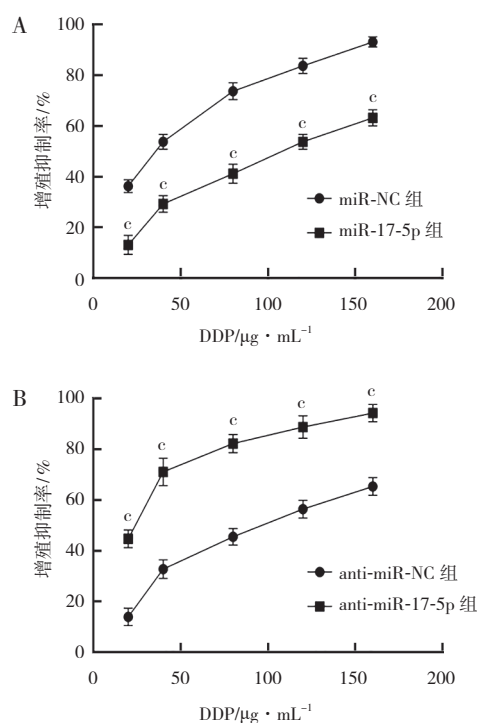


图 1 miR-17-5p 对两种细胞顺铂 (DDP) 敏感性的影响 ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) A: MCF-7 细胞, B: MCF-7/DDP 耐药细胞。经 *t* 检验: 与 miR-NC 组或 anti-miR-NC 组相比,  $P < 0.01$

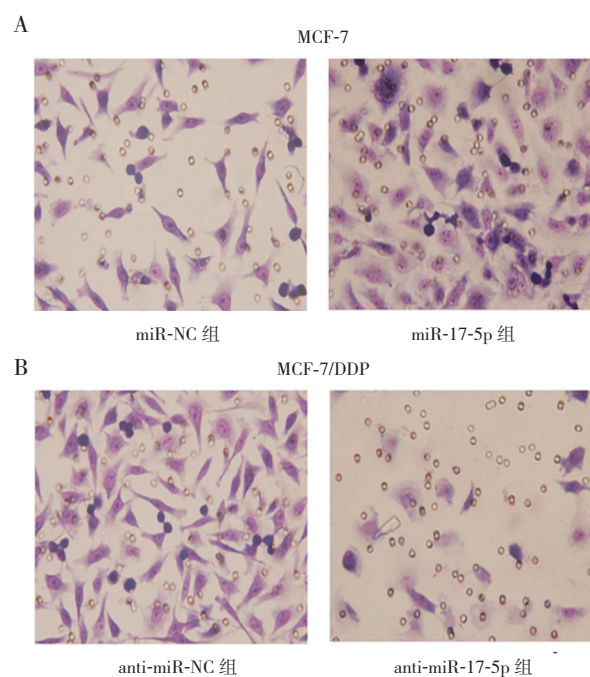


图 2 miR-17-5p 对两种细胞侵袭能力的影响 (瑞氏-吉姆萨染色,  $n=3$ ) A: MCF-7 细胞 (miR-NC 组、miR-17-5p 组), B: MCF-7/DDP 耐药细胞 (anti-miR-NC 组、anti-miR-17-5p 组)

著差异 ( $P > 0.05$ ), 而 miR-17-5p 组 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白水平显著低于 miR-NC 组 ( $P < 0.01$ )。在 MCF-7/DDP 耐药细胞 2 组间 caspase-3 和 PARP 蛋白水平无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而 anti-miR-

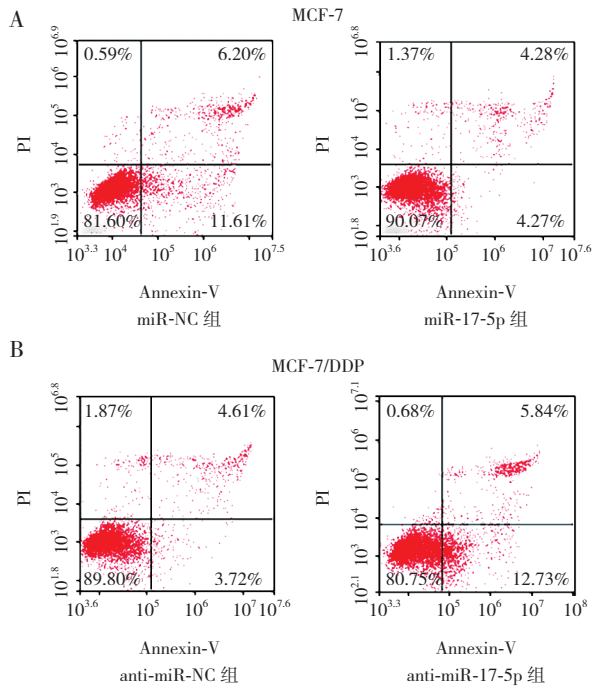


图 3 miR-17-5p 对两种细胞凋亡率的影响 (n=3) A : MCF-7 细胞 (miR-NC 组、miR-17-5p 组), B : MCF-7/DDP 耐药细胞 (anti-miR-NC 组、anti-miR-17-5p 组)

17-5p 组 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白水平显著高于 anti-miR-NC 组 (P<0.01)。见图 4。

**miR-17-5p 与 PTEN 的靶向关系** 经检索 TargetScan-

Human 8.0 数据库发现 PTEN 可能作为 miR-17-5p 的靶基因, 两者存在高度结合的可能性 (图 5A)。相较 MCF-7 细胞, MCF-7/DDP 耐药细胞 PTEN 的表达量显著降低 (P<0.05, 图 5B)。双荧光素酶实验证实, miR-17-5p 与 PTEN 存在直接靶向结合关系 (P<0.05, 图 5C)。miR-17-5p 组 PTEN 蛋白表达量显著低于 miR-NC 组 (P<0.01), anti-miR-17-5p 组 PTEN 蛋白表达量显著高于 anti-miR-NC 组 (P<0.01), 见图 6。

**miR-17-5p 对两种细胞 PTEN/Akt 信号通路的影响**

miR-17-5p 组 p-Akt308、p-Akt473、cyclin D1 的表达量显著高于 miR-NC 组, 而抑癌蛋白 PTEN、p21、p27 的表达量显著低于 miR-NC 组 (P<0.01)。anti-miR-17-5p 组 p-Akt308、p-Akt473、cyclin D1 的表达量显著低于 anti-miR-NC 组, 而 PTEN、p21、p27 的表达量显著高于 anti-miR-NC 组 (P<0.01)。见图 7。

讨 论

乳腺癌的具体发病原因尚不明确, 且存在一定的遗传风险, 虽然辅助化疗和激素治疗的广泛应用已大幅提高了乳腺癌患者的 5 年存活率, 且早期乳腺癌、局部晚期和局部复发的乳腺癌患者具有一定几率被彻底治愈, 但在治疗过程中产生的耐药性仍使患者承受

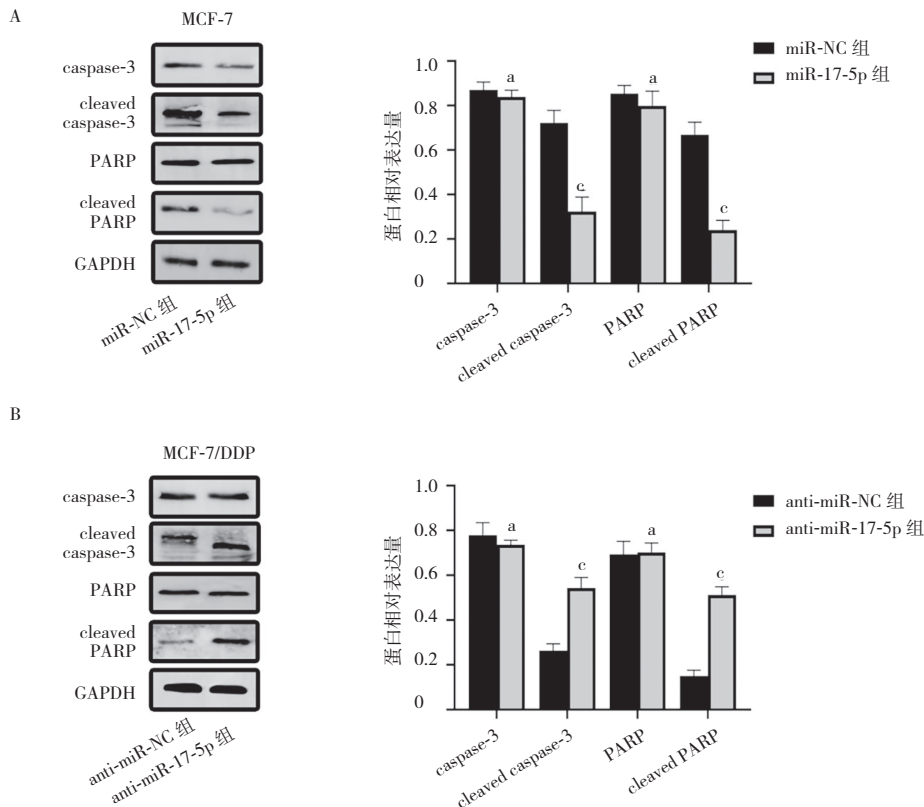
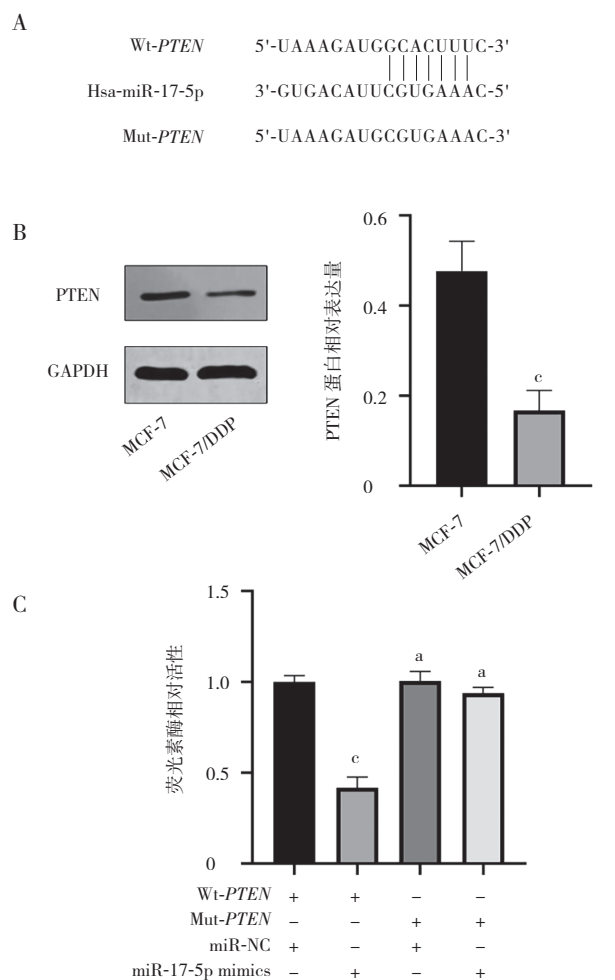


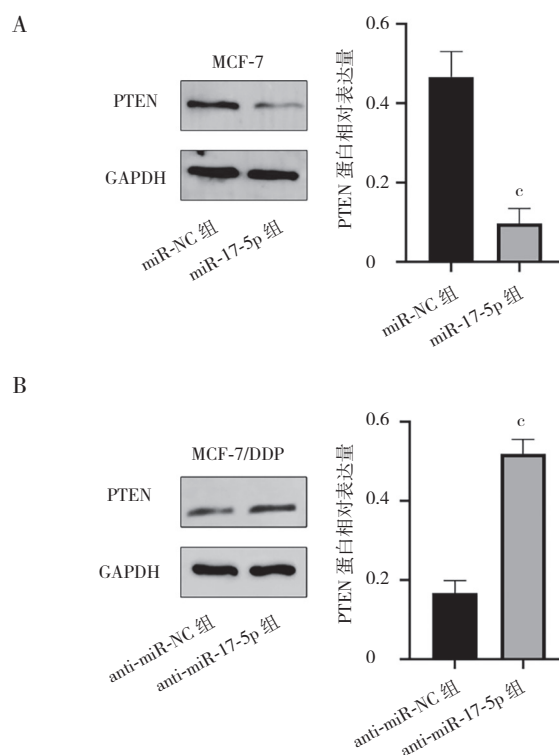
图 4 miR-17-5p 对两种细胞凋亡相关蛋白的影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ ) A : MCF-7 细胞, B : MCF-7/DDP 耐药细胞。经 t 检验 : 与 miR-NC 组或 anti-miR-NC 组相比, <sup>a</sup>P>0.05, <sup>c</sup>P<0.01

A : MCF-7 细胞, B : MCF-7/DDP 耐药细胞。经 t 检验 : 与 miR-NC



**图 5 miR-17-5p 与 PTEN 的靶向关系** ( $n=3, \bar{x} \pm s$ ) A: miR-17-5p 与 PTEN 结合位点的预测图, B: PTEN 在两种细胞中的蛋白表达量, C: 双荧光素酶报告基因实验结果 (以 “+” 代表加入, “-” 代表未加入)。经  $t$  检验: 与 MCF-7 组或 Wt-PTEN+miR-NC 组相比,  $^a P > 0.05, ^c P < 0.01$

较大的复发和转移风险<sup>[15, 16]</sup>。因此, 阐明乳腺癌药物治疗相关的各种生物学行为与分子作用机制, 有助于延长乳腺癌患者的存活期并提高治愈率。DDP 作为最有效的广谱抗癌药物之一, 在《2020 乳腺癌 NCCN 治疗指南》中列为三阴性乳腺癌的首选治疗方案之一<sup>[17]</sup>。同时, 与非铂类药物相比, 铂类药物能显著提高乳腺癌临床治疗有效指标, 包括总缓解率、病理完全缓解率、总生存期及无病生存期等<sup>[18]</sup>。DDP 联合其他化疗药物或结合纳米载体递送技术可有效延缓乳腺癌生长同时抑制乳腺癌的转移<sup>[19-21]</sup>。虽然 DDP 具有极好的乳腺癌治疗作用, 但部分乳腺癌患者因原发性耐药或继发性耐药导致治疗失败。因此, 解决乳腺癌细胞对 DDP 的耐药性是目前应对乳腺癌相关死亡的重要临床问题之一。DDP 耐药主要是由于细胞摄取药物的能力和外排能力的改变、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和金属硫蛋白表达的增高、非编码 RNA 在转



**图 6 miR-17-5p 对两种细胞 PTEN 表达的影响** ( $n=3, \bar{x} \pm s$ ) A: MCF-7 细胞, B: MCF-7/DDP 耐药细胞。经  $t$  检验: 与 miR-NC 组或 anti-miR-NC 组相比,  $^c P < 0.01$

录前后对下游基因和通路的调节作用导致的<sup>[22]</sup>。研究乳腺癌细胞的 DDP 耐药机制, 有助于解决乳腺癌患者的 DDP 耐药问题, 从而改善预后, 延长生存期。

据报道, miRNA 在调节肿瘤发展和介导细胞耐药性方面发挥着关键作用, 调节性 miRNA 可能作为实现乳腺癌患者治疗效果改善的新靶点<sup>[23]</sup>。有研究表明, miR-17-5p 可通过调控上皮-间充质转化介导三阴性乳腺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[24]</sup>; miR-17-5p 可在贲门癌细胞中与长链非编码 RNA H19 和 miR-130a-3p 相互作用影响放射抗性和化疗敏感性<sup>[25]</sup>; miR-17-5p 还可通过靶向 PTEN 促进非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药<sup>[26]</sup>。本研究发现, MCF-7/DDP 耐药细胞中的 miR-17-5p 表达水平显著高于 MCF-7 细胞, 且提高 MCF-7 细胞中 miR-17-5p 表达后, 其侵袭能力出现显著提升, 对 DDP 的敏感性明显降低, 同时凋亡率及凋亡相关蛋白含量也显著下降, 提示高水平的 miR-17-5p 能有效抑制 MCF-7 细胞的凋亡; 而敲低 MCF-7/DDP 耐药细胞中 miR-17-5p 的含量后, MCF-7/DDP 耐药细胞对 DDP 的敏感性和凋亡率显著提高, 侵袭能力显著下降。上述结果表明, miR-17-5p 在乳腺癌 DDP 耐药中发挥重要作用。

PTEN/Akt 信号通路可以调节多种生物活动过程 (例如营养代谢、细胞增殖、存活、移动和血管生成

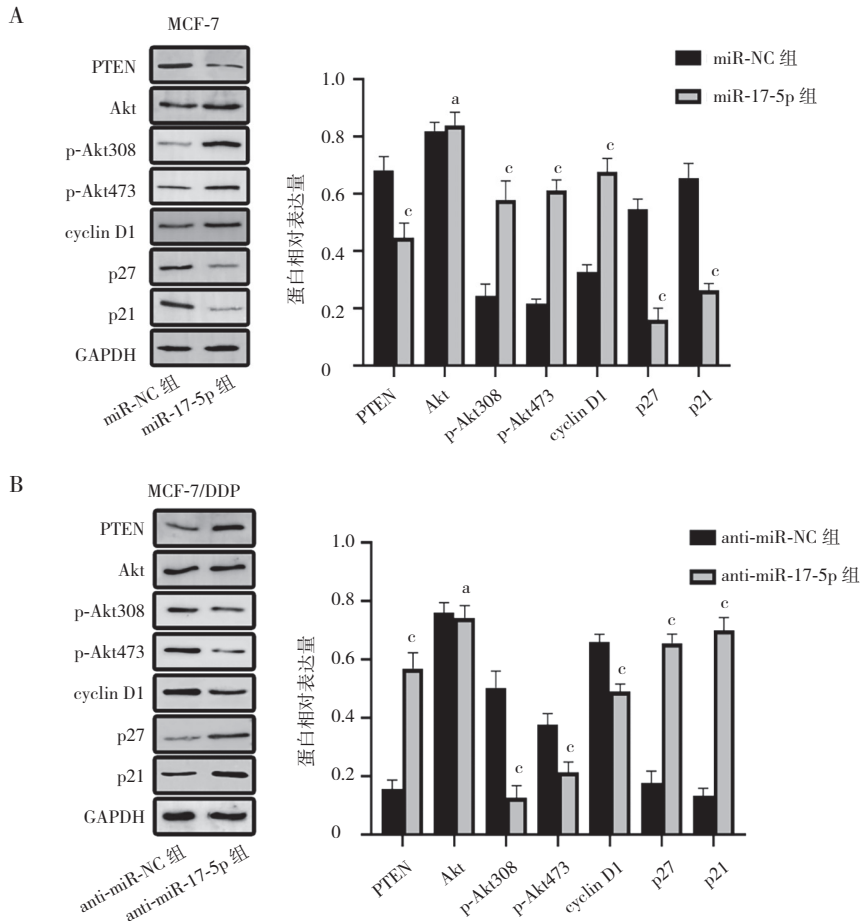


图 7 miR-17-5p 对两种细胞 PTEN/Akt 信号通路的影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ ) A: MCF-7 细胞, B: MCF-7/DDP 耐药细胞。经 t 检验: 与 miR-NC 组或 anti-miR-NC 组相比, \*P>0.05, †P<0.01

等)。在众多恶性肿瘤中, PTEN 的活性由于高频的变化、缺失或启动子沉默而不断降低, 导致 PI3K/Akt 信号通路的激活<sup>[27]</sup>。丁红光等<sup>[28]</sup>认为, miR-29a 可通过靶向 PTEN/Akt 信号通路增加结直肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶的耐药性。MA 等<sup>[29]</sup>报道, 在乳腺癌中, 阿托伐他汀可通过上调 Ras 同源物基因家族成员 B 的表达影响 PTEN/Akt 信号通路的激活进而发挥其抗癌作用。GAO 等<sup>[30]</sup>发现, 糖原合成激酶 3 $\beta$  和 PTEN 介导的 Akt 磷酸化与细胞活力、迁移和凋亡相关, PTEN/Akt 信号通路的异常激活促进了乳腺癌的化学耐药性。本研究显示, 提高 MCF-7 细胞中 miR-17-5p 的表达后, PTEN/Akt 信号通路中促癌蛋白 p-Akt308、p-Akt473 和 cyclin D1 的活性明显增强, 抑癌蛋白 PTEN、p21、p27 的含量显著下降, 敲低 MCF-7/DDP 耐药细胞中 miR-17-5p 的含量后 PTEN/Akt 通路促癌蛋白 p-Akt308、p-Akt473 和 cyclin D1 活性显著下降, 而抑癌蛋白 PTEN、p21、p27 含量显著提高, 这些都提示了 miR-17-5p 可能是通过 PTEN/Akt 通路介导乳腺癌的 DDP 耐药。

综上所述, miR-17-5p 在乳腺癌 DDP 耐药中发挥

的重要作用, 敲低 miR-17-5p 可有效提高乳腺癌细胞的 DDP 敏感性, 减弱其侵袭能力, 诱导其凋亡, 可能与 miR-17-5p 对 PTEN/Akt 通路的调控作用直接相关。

[ 参考文献 ]

[ 1 ] GALLUZZI L, SENOVILLA L, VITALE I, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance [ J ]. *Oncogene*, 2012, 31 ( 15 ): 1869–1883.

[ 2 ] GHOSH S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug [ J ]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925.

[ 3 ] TIAN JH, LIU SH, YU CY, *et al.* The role of non-coding RNAs in breast cancer drug resistance [ J ]. *Front Oncol*, 2021, 11: 702082.

[ 4 ] WANG B, ZHANG Y, YE M, *et al.* Cisplatin-resistant MDA-MB-231 cell-derived exosomes increase the resistance of recipient cells in an exosomal miR-423-5p-dependent manner [ J ]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20 ( 10 ): 804–814.

[ 5 ] CATALDO A, CHEUNG DG, BALSARI A, *et al.* miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response [ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7 ( 1 ): 786–97.

[ 6 ] CHEKHUN VF, BORIKUN TV, LUKIANOVA NY. Effect of 5-azacytidine on miRNA expression in human breast cancer cells

- with different sensitivity to cytostatics [J]. *Exp Oncol*, 2016, 38 (1): 26–30.
- [7] LIN J, CHEN X, SUN M, *et al.* Upregulation of microRNA-181a-5p increases the sensitivity of HS578T breast cancer cells to cisplatin by inducing vitamin D receptor-mediated cell autophagy [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21 (4): 247.
- [8] DU C, WANG Y, ZHANG Y, *et al.* LncRNA DLX6-AS1 Contributes to epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in triple-negative breast cancer via modulating Mir-199b-5p/paxillin axis [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29: 963689720929983.
- [9] 赵营, 赵光日, 吴蕴瑜, 等. LINC00536 靶向 miR-17-5p 对卵巢癌细胞顺铂药物耐药性的影响 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27 (11): 1964–1969. ZHAO Y, ZHAO GR, WU YY, *et al.* The effect of LINC00536 on cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting miR-17-5p [J]. *Lab Immun Clin Med*, 2020, 27 (11): 1964–1969.
- [10] SUN Y, LI S, YU W, *et al.* N(6)-methyladenosine-dependent pri-miR-17-92 maturation suppresses PTEN/TMEM127 and promotes sensitivity to everolimus in gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (10): 836.
- [11] LIU F, CHENG L, XU J, *et al.* miR-17-92 functions as an oncogene and modulates NF- $\kappa$ B signaling by targeting TRAF3 in MGC-803 human gastric cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53 (5): 2241–2257.
- [12] LI A, QIU M, ZHOU H, *et al.* PTEN, insulin resistance and cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23 (25): 3667–3676.
- [13] DAVIS NM, SOKOLOSKY M, STADELMAN K, *et al.* Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (13): 4603–4650.
- [14] FANG S, ZHENG L, SHEN L, *et al.* Inactivation of KDM5A suppresses growth and enhances chemosensitivity in liver cancer by modulating ROCK1/PTEN/AKT pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940: 175465.
- [15] WORMANN B. Breast cancer: basics, screening, diagnostics and treatment [J]. *Med Monatsschr Pharm*, 2017, 40 (2): 55–64.
- [16] M BRADEN A, V STANKOWSKI R, M ENGEL J, *et al.* Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (30): 4879–4898.
- [17] GRADISHAR WJ, ANDERSON BO, ABRAHAM J, *et al.* Breast cancer, version 3.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18 (4): 452–478.
- [18] LIN C, CUI J, PENG Z, *et al.* Efficacy of platinum-based and non-platinum-based drugs on triple-negative breast cancer: meta-analysis [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27 (1): 201.
- [19] WANG H, GUO S, KIM SJ, *et al.* Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (5): 2442–2459.
- [20] ALRAOUJI NN, AL-MOHANNA FH, GHEBEH H, *et al.* Tocilizumab potentiates cisplatin cytotoxicity and targets cancer stem cells in triple-negative breast cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59 (9): 1041–1051.
- [21] LI Y, XIONG J, GUO W, *et al.* Decomposable black phosphorus nano-assembly for controlled delivery of cisplatin and inhibition of breast cancer metastasis [J]. *J Control Release*, 2021, 335: 59–74.
- [22] 王悦璇, 刘秀均. 顺铂的作用靶点及耐药机制的研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15 (3): 316–319. WANG YX, LIU XJ. Research progress on the targets and resistance mechanisms of cisplatin [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2020, 15 (3): 316–319.
- [23] WANG S, LI MY, LIU Y, *et al.* The role of microRNA in cisplatin resistance or sensitivity [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24 (9): 885–897.
- [24] BAO C, LIU T, QIAN L, *et al.* Shikonin inhibits migration and invasion of triple-negative breast cancer cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition via miR-17-5p/PTEN/Akt pathway [J]. *J Cancer*, 2021, 12 (1): 76–88.
- [25] JIA J, ZHANG X, ZHAN D, *et al.* LncRNA H19 interacted with miR-130a-3p and miR-17-5p to modify radio-resistance and chemosensitivity of cardiac carcinoma cells [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (4): 1604–1618.
- [26] 罗凯, 黎谢梦丹, 郑国沛, 等. miR-17-5p 靶向 PTEN 促进非小细胞肺癌吉非替尼耐药 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35 (11): 1717–1721. LUO K, LI XMD, ZHENG GP, *et al.* Role of miR-17-5p in gefitinib resistance in non-small cell lung cancer by targeting PTEN [J]. *The J Pract Med*, 2019, 35 (11): 1717–1721.
- [27] CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O, *et al.* The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8 (3): 187–198.
- [28] 丁红光, 张星霖, 孙福生, 等. MicroRNA-29a 靶向 PTEN/AKT 信号通路调节结直肠癌耐药敏感性 [J]. *解剖科学进展*, 2020, 26 (6): 645–648. DING HG, ZHANG XL, SUN FS, *et al.* MicroRNA-29a regulate resistance to colorectal cancer via targeting on PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Prog Anat Sci*, 2020, 26 (6): 645–648.
- [29] MA Q, GAO Y, XU P, *et al.* Atorvastatin inhibits breast cancer cells by downregulating PTEN/AKT pathway via promoting ras homolog family member B (RhoB) [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3235021.
- [30] GAO C, YUAN X, JIANG Z, *et al.* Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 $\beta$  and PTEN to control chemoresistance in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 176 (2): 291–301.