

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2022. 10. 016

论著 · 基础

lncRNA NRON 靶向 miR-185-5p 调节乳腺癌细胞化疗耐药性的机制研究

汪伶俐, 田武国, 赵健洁, 罗东林

基金项目: 重庆市科卫联合医学科研项目(2019QNXM027)

作者单位: 400042 重庆, 陆军军医大学大坪医院乳腺甲状腺外科

通信作者: 罗东林, E-mail: ldl1967@sina.com

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA 抑制因子活化 T 细胞(lncRNA NRON)对 miR-185-5p 的调控作用及其影响乳腺癌细胞增殖、凋亡及化疗耐药性的基因调控机制。方法 2020 年 8 月—2021 年 12 月于陆军军医大学大坪医院中心实验室进行实验。选取 2016 年 7 月—2020 年 7 月于医院乳腺甲状腺外科行手术切除的乳腺癌患者 26 例的癌组织及癌旁组织样本,体外培养正常乳腺上皮细胞系(MCF10A)及乳腺癌细胞系(MCF7、MDA-231、T47D、SKBR3、ZR7530、BT549、HCC1937、BT474)。qRT-PCR 法检测 lncRNA NRON、miR-185-5p 基因表达;双荧光素酶试验验证 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 的靶向关系。将 MCF7 乳腺癌细胞分为阴性对照(NC)组、plasmid NRON 组(转染 lncRNA NRON 过表达载体)、plasmid NRON + mimic NC 组(转染 plasmid NRON + mimic NC)、plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组(转染 plasmid NRON + miR-185-5p 模拟物),分别给予 5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂(DDP)、紫杉醇(PTX)培养,CCK-8 法检测细胞增殖情况(OD 值)、半数抑制浓度(IC₅₀)及耐药指数(R),流式细胞术检测细胞凋亡,Western-blot 法检测胸苷酸合成酶(TS)表达,裸鼠荷瘤实验验证化疗效果(瘤体体积、ki67 表达)。结果 乳腺癌组织中 lncRNA NRON 表达低于癌旁组织,miR-185-5p 表达高于癌旁组织($P < 0.05$);乳腺癌细胞系中 lncRNA NRON 表达低于正常乳腺上皮细胞系,miR-185-5p 表达高于正常乳腺上皮细胞系($P < 0.05$)。与 NC 组比较,plasmid NRON 组 MCF7 细胞对 5-FU、DDP、PTX 的 IC₅₀ 及 R 值降低($P < 0.01$);OD 值降低,凋亡率及 TS 表达升高($P < 0.01$);裸鼠瘤体体积、ki67 表达降低($P < 0.01$)。双荧光素酶试验显示,lncRNA NRON 与 miR-185-5p 之间有靶向结合关系,lncRNA NRON 可靶向下调 miR-185-5p 表达。与 plasmid NRON 组比较,plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组裸鼠瘤体体积升高($P < 0.05$),TS 蛋白降低($P < 0.05$);而 plasmid NRON 组与 plasmid NRON + mimic NC 组比较上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 lncRNA NRON 可通过靶向下调 miR-185-5p 降低乳腺癌细胞对化疗药物的耐药性。

【关键词】 乳腺癌;长链非编码 RNA 抑制因子活化 T 细胞;微小 RNA-185-5p;化疗耐药性**【中图分类号】** R737.9**【文献标识码】** A

Mechanism of lncRNA NRON targeting miR-185-5p regulating chemoresistance of breast cancer cells Wang Lingli, Tian Wuguo, Zhao Jianjie, Luo Donglin. Department of Breast and Thyroid Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Luo Donglin, E-mail: ldl1967@sina.com

Funding program: Chongqing Science and Health Joint Medical Research Project (2019QNXM027)

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of long chain non coding RNA inhibitor activated T cells (lncRNA NRON) on miR-185-5p and the gene regulatory mechanism of its effects on the proliferation, apoptosis and chemoresistance of breast cancer cells. **Methods** From August 2020 to December 2021, the experiment was conducted in the Central Laboratory of Daping Hospital, Army Medical University. The normal breast epithelial cell line (MCF10A) and breast cancer cell line (MCF7, MDA-231, T47D, SKBR3, ZR7530, BT549, HCC1937, BT474) were cultured in vitro from 26 patients with breast cancer who underwent surgical resection in the breast and thyroid surgery of the hospital from July 2016 to July 2020. The expression of lncRNA NRON and miR-185-5p gene was detected by qRT-PCR; The targeting relationship between lncRNA NRON and miR-185-5p was verified by double luciferase test. MCF7 breast cancer cells were divided into negative control (NC) group, plasmid NRON group (transfected with lncRNA NRON overexpression vector), plasmid NRON + mimic NC group (transfected with plasmid NRON + mimic NC), plasmid NRON + miR-185-5p mimic group (transfect-

ed with plasmid NRON + miR-185-5p simulant), respectively given 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin (DDP), paclitaxel (PTX) culture, and cell proliferation (OD value) was detected by CCK-8 method Half inhibitory concentration (IC_{50}) and drug resistance index (R), apoptosis was detected by flow cytometry, expression of thymidylate synthase (TS) was detected by Western blot, and chemotherapy effect (tumor volume, ki67 expression) was verified by tumor bearing experiment in nude mice.

Results The expression of lncRNA NRON in breast cancer was lower than that in adjacent tissues, and the expression of miR-185-5p was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of lncRNA NRON in breast cancer cell line was lower than that in normal breast epithelial cell line, and the expression of miR-185-5p was higher than that in normal breast epithelial cell line ($P < 0.05$). Compared with NC group, IC_{50} and R values of MCF7 cells to 5-FU, DDP, PTX in plasma NRON group decreased ($P < 0.01$). OD value decreased, apoptosis rate and TS expression increased ($P < 0.01$). The tumor volume and ki67 expression in nude mice decreased ($P < 0.01$). The double luciferase assay showed that there was a targeted binding relationship between lncRNA NRON and miR-185-5p, and lncRNA NRON could target down regulate the expression of miR-185-5p. Compared with the plasmid NRON group, the tumor volume of nude mice in the plasmid NRON + miR-185-5p mimic group increased ($P < 0.05$), and TS protein decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the plasma NRON group and the plasma NRON + mic NC group ($P > 0.05$). **Conclusion** LncRNA NRON can reduce the resistance of breast cancer cells to chemotherapy drugs by targeting down regulating miR-185-5p.

【Key words】 Breast cancer; Long chain non coding RNA inhibitor activated T cells; miR-185-5p; Chemotherapy resistance

乳腺癌是女性最主要的恶性肿瘤^[1]。乳腺癌和其他恶性肿瘤一样,由多种复杂的因素影响细胞增殖与凋亡的失衡、促癌与抑癌基因结构功能的改变、耐药蛋白及信号转导通路的异常,而最终影响细胞行为的进一步恶化^[2]。寻找新的抗癌靶点及探寻耐药机制一直是癌症研究的重点。长链非编码 RNA (lncRNAs) 可海绵化和隔离微小 RNA (miRNA) 以调节靶蛋白,影响细胞结构及功能机制的改变,因而受到研究者的关注^[3]。长链非编码 RNA 抑制因子活化 T 细胞 (lncRNA NRON) 是活化 T 细胞的非编码抑制物,近来研究发现其在乳腺癌组织中表达降低^[4],但 lncRNA NRON 是否影响乳腺癌化疗耐药性还不明确。miRNA 中的 miR-185-5p 在不同癌症中具有不同作用,已有研究发现,miR-185-5p 在乳腺癌中高表达具有促癌及促进耐药性产生的作用^[5],但 miR-185-5p 功能的异常是否受 lncRNA NRON 的调控,目前还未见研究。本研究用基因预测软件发现 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 之间有靶向结合关系,并体外培养乳腺癌细胞,探究干预 lncRNA NRON 表达后,对 miR-185-5p 调控及耐药性产生的影响,以期对乳腺癌的基因靶向治疗提供新的思路,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象:(1)收集 2016 年 7 月—2020 年 7 月陆军军医大学大坪医院乳腺甲状腺外科行乳腺癌切除患者 26 例的癌组织及距癌组织大于 2 cm 处的癌旁组织标本,于 -80°C 保存备用。患者均为女性,年龄

35 ~ 79 (56.50 ± 5.20) 岁;临床分期:T1 ~ 2 期 20 例, T3 ~ 4 期 6 例;组织学分级:I 级 5 例,II 级 13 例,III 级 8 例;ER 阳性 21 例,PR 阳性 20 例,HER-2 扩增 11 例;分化程度:高、中分化 12 例,低分化 14 例。(2)健康清洁级 Balb/c 雌性裸鼠,购自广州锐格生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2021-0059;本实验符合 3R 原则,经本院动物伦理委员会批准同意 [IACUC-01(2021110026)]。(3)正常乳腺上皮细胞系 (MCF10A) 及乳腺癌细胞系 (MCF7、MDA-231、T47D、SKBR3、ZR7530、BT549、HCC1937、BT474) 均购自上海淳麦生物科技有限公司。

1.1.2 试药与试剂:5-氟尿嘧啶 (5-FU)、顺铂 (DDP)、紫杉醇 (PTX) 等购自上海源叶公司;逆转录试剂盒购自上海研卉生物公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒购自上海恒斐生物公司;lncRNA NRON 过表达载体 (plasmid NRON) 及其阴性对照 (NC)、miR-185-5p 模拟物 (miR-185-5p mimic) 及阴性对照 (mimic NC) 等均由生工生物工程 (上海) 公司提供;胸苷酸合成酶 (TS) 抗体购自美国 abcam 公司。

1.1.3 仪器设备:紫外分光光度仪购自上海精密仪器仪表有限公司;FACSCalibur 购自美国 BD 公司;光学显微镜 (光镜) 购自上海豫光仪器有限公司。

1.2 实验方法 2020 年 8 月—2021 年 12 月于陆军军医大学大坪医院中心实验室进行实验。正常乳腺上皮细胞系及乳腺癌细胞系于 37°C 水浴复苏,取适量用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行传代培养及计数。取对数期 MCF7 细胞系,按 1×10^5 个/孔接种于 6

孔板内, Lipofectamine 3000 转染试剂转染 lncRNA-NRON 过表达载体 (plasmid NRON) 及其阴性对照 (NC), 设置为 plasmid NRON 组、NC 组, 每组设置 6 个复孔。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测 lncRNA NRON、miR-185-5p 基因表达: 乳腺癌及癌旁组织标本或细胞经粉碎、匀浆, 提取 RNA, 反转录得到 cDNA, 行 PCR 反应, 反应体系: 上下游引物各 1.0 μl , 2 \times SYBR mix 10 μl , H_2O 10 μl , 10 \times cDNA 模板 1 μl 。反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 35 min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 60 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 70 s, 75 $^\circ\text{C}$ 延伸 35 min, 55 个循环。lncRNA NRON 以三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 为内参, miR-185-5p 以 U6 为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各基因相对表达量。各引物序列由上海生工生物公司合成。

1.3.2 细胞计数 (CCK-8) 法检测细胞增殖及 IC_{50} 、R 值: 取转染后的 plasmid NRON 组及 NC 组细胞, 分别加入不同浓度的 5-FU (0、25、50、100、150、200 mg/L)、DDP (0、1、2.5、5、7.5 mg/L)、PTX (0、1、5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$), 培养 72 h 时, CCK-8 试剂 20 μl 干预培养 4 h, 紫外分光光度计 (450 nm) 上读取吸光度 (OD) 值, 根据 OD 值绘制生长曲线, 计算细胞对 5-FU、DDP、PTX 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值, 计算耐药指数 (R, 各组化疗药物 IC_{50} 值的比值)。plasmid NRON 组及 NC 组细胞在 5-FU (100 mg/L)、DDP (5 mg/L)、PTX (10 $\mu\text{g/L}$) 条件下分别培养 0 h、24 h、48 h、72 h, CCK-8 试剂 20 μl 干预培养 4 h, 紫外分光光度计 450 nm 处读取 OD 值, 根据 OD 值绘制生长曲线, 计算增殖活性。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡率: plasmid NRON 组及 NC 组细胞在 5-FU (100 mg/L)、DDP (5 mg/L)、PTX (10 $\mu\text{g/L}$) 条件分别培养 72 h, 收集细胞, 70% 乙醇固定, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和 FACSCalibur 系统进行细胞凋亡分析, ModFit LT 软件分析细胞凋亡率。

1.3.4 Western-blot 法检测各组 MCF7 细胞中胸苷酸合成酶 (TS) 蛋白表达: 细胞粉碎匀浆并提取蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法检测蛋白总浓度, 取蛋白 80 μg 行电泳及转膜操作, 滴加 1:600 的一抗 (TS) 及 1:900 的内参 β -actin 抗体孵育 24 h, 辣根过氧化物酶二抗孵育 30 min, 化学发光液浸膜曝光, Bio-Rad 图像扫描条带, Alpha Ease FC 软件计算条带灰度值。

1.3.5 裸鼠荷瘤实验检测过表达 lncRNA NRON 对

5-FU、DDP、PTX 化疗的敏感性: plasmid NRON 组及 NC 组细胞, 调整细胞浓度为 1.0×10^8 个/ml, 取 0.2 ml 接种于裸鼠腋下, 2 周后裸鼠右腋下可触及瘤块, 视为接种成功, 并分别腹腔注射 5-FU (20 mg/kg)^[6]、DDP (30 mg/kg)^[7]、PTX (15 mg/kg)^[8], 3 天 1 次, 连续干预 4 周。干预结束后游标卡尺检测瘤体体积 (瘤体体积 = 长径 \times 短径²/2), 处死裸鼠, 剥离瘤体, 精密称重, 瘤体组织经 4% 多聚甲醛固定制成 5 μm 石蜡切片, 脱蜡及透化处理, 加入 1:200 兔抗人 ki67 抗体孵育过夜, 生物素 IgG 二抗孵育 1.5 h, 苏木精复染并于光镜下观察拍照。

1.3.6 双荧光素酶实验验证 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 的靶向关系: Starbase 网站预测 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 存在互补配对的碱基序列。建立含有 miR-185-5p 结合位点的 NRON 野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 片段, 并分别克隆至荧光素酶报告质粒中, 以合成 NRON-3' UTR-WT 及 NRON-3' UTR-MUT 质粒, 用 Lipofectamine 3000 转染试剂在 293T 细胞中共转染 mimic NC 或 miR-185-5p mimic, 48 h 后, 用双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性。

1.3.7 过表达 miR-185-5p 对 lncRNA NRON 作用的逆转性研究: 设置 NC 组、plasmid NRON 组、plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组、plasmid NRON + mimic NC 组、NC 组、plasmid NRON 组细胞处理同前; plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组及 plasmid NRON + mimic NC 组, 在 plasmid NRON 组基础上, 分别转染 miR-185-5p mimic 及 mimic NC 试剂。转染后分别接种于裸鼠皮下, 给予 5-FU、DDP、PTX 化疗药物干预后, 检测瘤体体积及 TS 蛋白表达情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件分析数据。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 组内两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织、癌旁组织及细胞系中 lncRNA NRON 的表达比较 与癌旁组织比较, 乳腺癌组织中 lncRNA NRON 表达降低 ($P < 0.05$)。与正常乳腺上皮细胞系 (MCF10A) 比较, 乳腺癌细胞系 (MCF7、MDA-231、T47D、SKBR3、ZR7530、BT549、HCC1937、BT474) 中 lncRNA NRON 表达均降低 ($P < 0.05$), 其中 MCF7 细胞系中 lncRNA NRON 表达最低, 见表 1。

表 1 正常乳腺上皮细胞系及乳腺癌细胞系中 lncRNA NRON 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of lncRNA NRON expression in normal breast epithelial cell lines and breast cancer cell lines

细胞系	n	lncRNA NRON
MCF10A	6	1.00 ± 0.10
MCF7	6	0.47 ± 0.03 ^a
MDA-231	6	0.49 ± 0.04 ^a
T47D	6	0.60 ± 0.06 ^a
SKBR3	6	0.55 ± 0.05 ^a
ZR7530	6	0.62 ± 0.06 ^a
BT549	6	0.59 ± 0.04 ^a
HCC1937	6	0.60 ± 0.06 ^a
BT474	6	0.66 ± 0.04 ^a

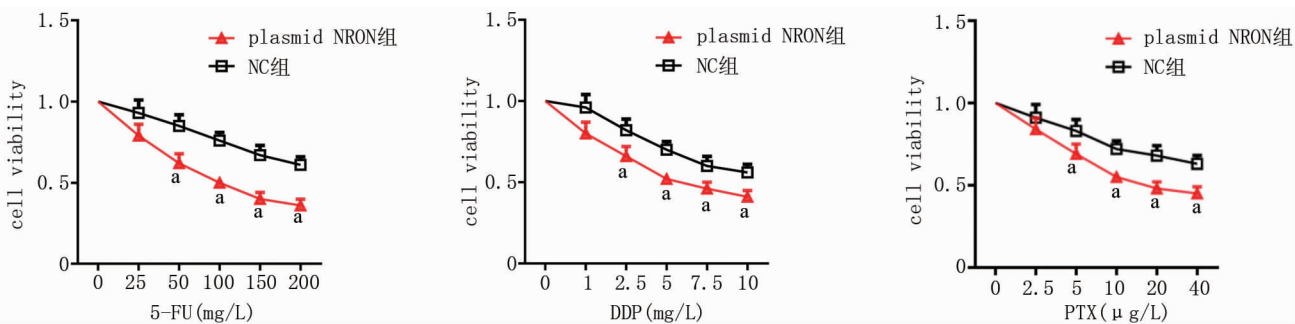
注:与 MCF10A 细胞系比较, ^a $P < 0.05$

2.2 上调 lncRNA NRON 对 MCF7 细胞化疗耐药性的影响 与 NC 组比较, plasmid NRON 组细胞 lncRNA NRON 表达升高(0.45 ± 0.01 vs. 1.33 ± 0.06 , $P < 0.05$)。

NC 组及 plasmid NRON 组细胞分别经不同浓度

5-FU、DDP、PTX 干预培养 72 h 后,与 NC 组比较, plasmid NRON 组细胞 IC₅₀ 值及 R 值降低 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。NC 组及 plasmid NRON 组细胞在 5-FU、DDP、PTX 干预培养条件下,与 NC 组比较, plasmid NRON 组细胞 OD 值降低,在 72 h 时差异最显著 ($P < 0.05$), 见图 2。plasmid NRON 组细胞凋亡率及 TS 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 见图 3、4、表 3。裸鼠荷瘤实验发现,接种 plasmid NRON 细胞的裸鼠,经 5-FU、DDP、PTX 治疗后,瘤体体积及 ki67 表达明显低于 NC 组 ($P < 0.05$), 见图 5、表 4。

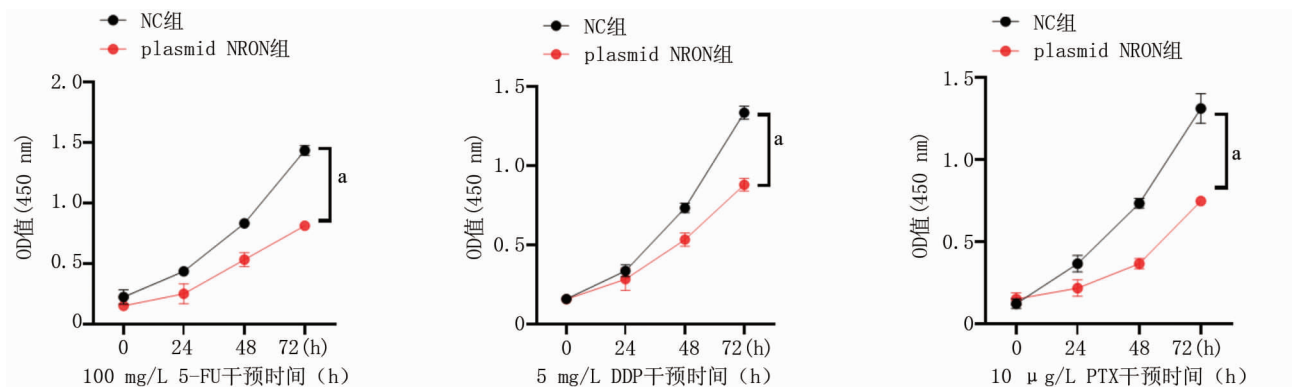
2.3 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 的靶向关系 乳腺癌组织中 miR-185-5p 表达显著高于癌旁组织 (3.22 ± 0.21 vs. 1.00 ± 0.13 , $t = 45.833$, $P < 0.001$), 在癌细胞系中表达高于正常乳腺上皮细胞系 ($P < 0.05$), 见表 5。与 NC 组比较, lncRNA NRON 组 MCF7 细胞中 miR-185-5p 表达下调 (0.33 ± 0.42 vs. 1.45 ± 1.45) ($t = 30.333$, $P < 0.05$)。



注:与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$

图 1 不同浓度 5-FU、DDP、PTX 干预培养 72 h 后 2 组 MCF7 细胞系生存曲线图

Fig. 1 Survival curve of two groups of MCF7 cell lines after 72 h of intervention culture with different concentrations of 5-FU, DDP and PTX



注:与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 不同时间 5-FU、DDP、PTX 干预培养后 2 组 MCF7 细胞增殖曲线图

Fig. 2 The proliferation curve of MCF7 cells in the two groups after the intervention of 5-FU, DDP and PTX

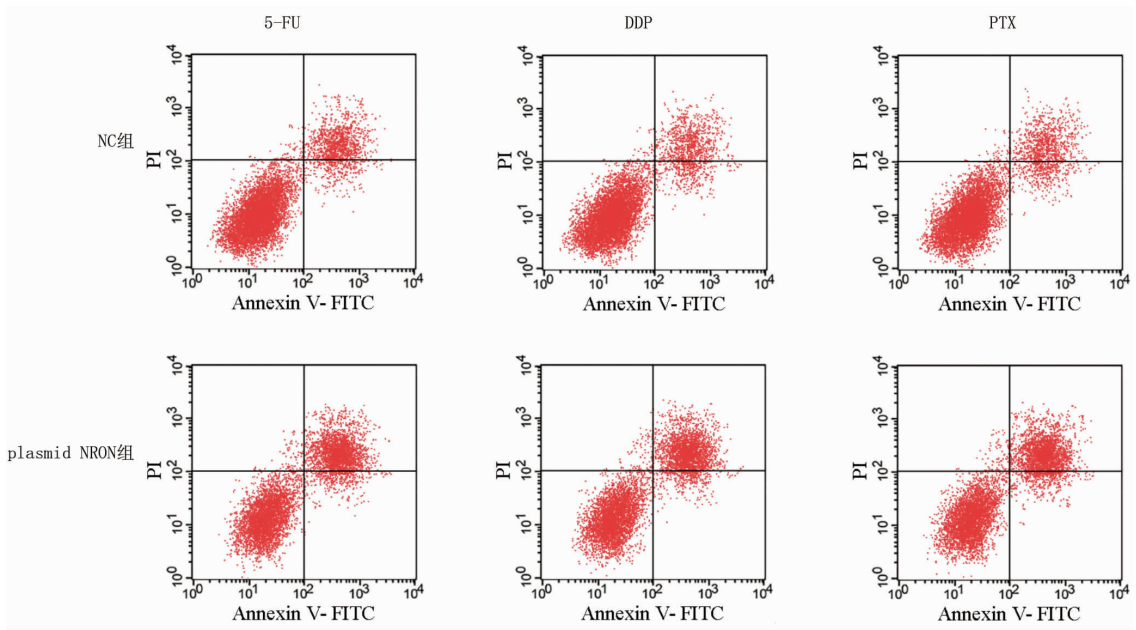


图 3 2 组流式凋亡检测图

Fig.3 Flow type apoptosis detection diagram in 2 groups

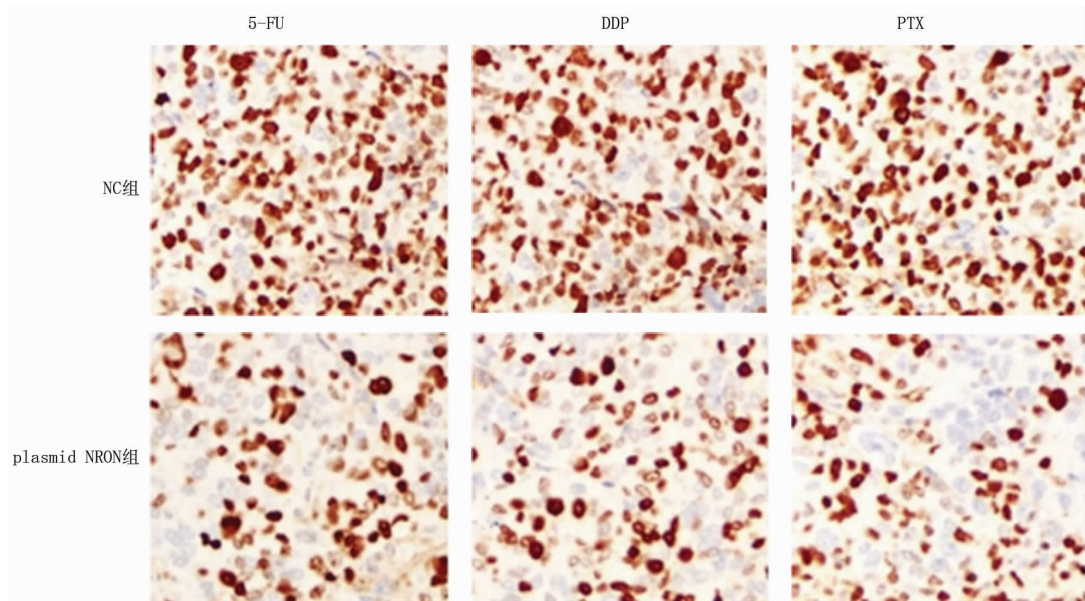
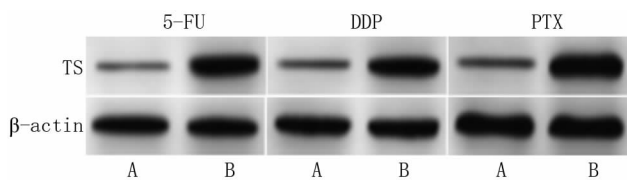


图 5 2 组瘤体组织 ki67 免疫组化染色图(×200)

Fig.5 Ki67 immunohistochemical staining of tumor tissues in 2 groups(× 200)



注: A. NC 组; B. plasmid NRON 组

图 4 2 组 TS 蛋白表达免疫印迹图

Fig.4 Immunoblot of TS protein expression in 2 groups



图 6 lncRNA NRON 与 miR-185-5p 靶向结合位点预测

Fig.6 Prediction of targeted binding sites of lncRNA NRON and miR-185-5p

表 2 2 组 MCF7 细胞对 5-FU、DDP、PTX 的 IC₅₀ 及 R 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 IC₅₀ and R value comparison of two groups of MCF7 cells to 5-FU, DDP and PTX

组别	n	5-FU		DDP		PTX	
		IC ₅₀ (mg/L)	R	IC ₅₀ (mg/L)	R	IC ₅₀ (μg/L)	R
NC 组	6	210.00 ± 10.13	1.00 ± 0.10	11.25 ± 1.06	1.00 ± 0.09	42.36 ± 4.68	1.00 ± 0.11
plasmid NRON 组	6	100.99 ± 3.79	0.48 ± 0.04	5.00 ± 0.50	0.40 ± 0.06	10.26 ± 1.06	0.24 ± 0.02
t 值		24.688	11.826	13.062	13.587	16.386	16.651
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 5-FU、DDP、PTX 干预培养后 2 组细胞凋亡率及 TS 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of apoptosis rate and TS protein expression between two groups after 5-FU, DDP and PTX intervention culture

组别	n	5-FU		DDP		PTX	
		凋亡率 (%)	TS 蛋白	凋亡率 (%)	TS 蛋白	凋亡率 (%)	TS 蛋白
NC 组	6	22.00 ± 2.13	0.29 ± 0.01	15.35 ± 1.06	0.27 ± 0.01	16.36 ± 1.68	0.20 ± 0.11
plasmid NRON 组	6	55.99 ± 5.79	1.18 ± 0.09	53.00 ± 0.54	1.07 ± 0.06	59.26 ± 5.06	1.04 ± 0.02
t 值		13.495	24.075	77.523	32.215	19.709	18.403
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 5-FU、DDP、PTX 干预培养后 2 组瘤体体积及 ki67 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of tumor volume and ki67 expression level between the two groups after 5-FU, DDP and PTX intervention culture

组别	n	5-FU		DDP		PTX	
		瘤体体积 (mm ³)	ki67 (MD/mm ²)	瘤体体积 (mm ³)	ki67 (MD/mm ²)	瘤体体积 (mm ³)	ki67 (MD/mm ²)
NC 组	6	889.57 ± 60.59	1.90 ± 0.19	890.66 ± 59.80	1.87 ± 0.18	892.57 ± 63.25	1.80 ± 0.16
plasmid NRON 组	6	250.52 ± 20.28	0.47 ± 0.05	266.83 ± 23.15	0.40 ± 0.04	269.63 ± 26.36	0.55 ± 0.03
t 值		24.499	17.829	23.830	19.528	22.268	18.809
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 5 正常乳腺上皮细胞系及乳腺癌细胞系中 miR-185-5p 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

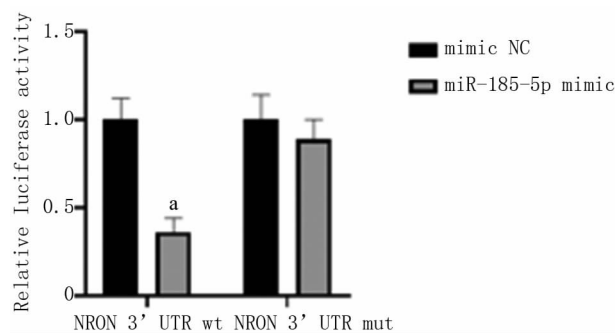
Tab. 5 Comparison of miR-185-5p expression in normal breast epithelial cell lines and breast cancer cell lines

细胞系	n	miR-185-5p
MCF10A	6	0.10 ± 0.10
MCF7	6	1.42 ± 0.03 ^a
MDA-231	6	1.41 ± 0.14 ^a
T47D	6	1.63 ± 0.16 ^a
SKBR3	6	1.59 ± 0.15 ^a
ZR7530	6	1.68 ± 0.16 ^a
BT549	6	1.67 ± 0.14 ^a
HCC1937	6	1.60 ± 0.16 ^a
BT474	6	1.56 ± 0.14 ^a

注:与 MCF10A 细胞系比较,^aP < 0.05

生物信息学 Starbase 数据库预测试验及双荧光素酶报告试验发现, lncRNA NRON 与 miR-185-5p 之间有靶向结合位点, 293T 细胞共转染 miR-185-5p mimic 和无突变的 lncRNA NRON-WT 载体, 可使 293T 细胞中荧光素酶活性显著下降 (P < 0.05), 而共转染 miR-185-5p mimic 和发生突变的 lncRNA NRON-MUT 载体对荧光素酶活性无显著作用 (P > 0.05), 见图 6、7。

2.4 miR-185-5p 过表达对上调 lncRNA NRON 后癌细胞化疗耐药性的影响 与 plasmid NRON 组比较,



注:与 mimic NC 比较,^aP < 0.05

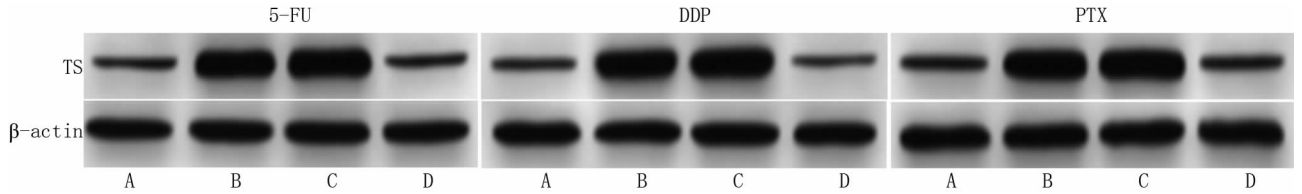
图 7 2 组荧光素酶活性比较图

Fig. 7 Comparison of luciferase activity in two groups

miR-185-5p mimic + plasmid NRON 组裸鼠瘤体体积升高, TS 蛋白降低 (P < 0.05), 而 plasmid NRON 组与 plasmid NRON + mimic NC 组比较上述指标差异无统计学意义 (P > 0.05), 见图 8、表 6。

3 讨论

乳腺癌是一个重大的公共卫生问题, 并在全球范围内造成重大的医疗负担^[9]。乳腺癌发生发展的潜在机制仍不明确。lncRNA 已在各种癌症中得到广泛研究, 且已成为乳腺癌干预的新靶点。lncRNA 可作为信号分子来调节下游基因的转录, 并与蛋白质 (通常



注: A. NC 组; B. plasmid NRON 组; C. plasmid NRON + mimic NC 组; D. plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组

图 8 各组瘤体中 TS 蛋白表达免疫印迹图

Fig. 8 Immunoblot of TS protein expression in tumor bodies of each group

表 6 经 5-FU、DDP、PTX 治疗后各组裸鼠瘤体体积及 TS 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Comparison of tumor volume and TS protein expression of nude mice in each group after 5-FU, DDP and PTX treatment

组别	n	5-FU		DDP		PTX	
		瘤体体积(mm ³)	TS 蛋白	瘤体体积(mm ³)	TS 蛋白	瘤体体积(mm ³)	TS 蛋白
NC 组	6	889.57 ± 60.59	0.50 ± 0.05	888.68 ± 58.78	0.39 ± 0.04	870.63 ± 60.00	0.50 ± 0.05
plasmid NRON 组	6	250.52 ± 20.28 ^a	1.47 ± 0.15 ^a	269.94 ± 24.63 ^a	1.36 ± 0.14 ^a	255.68 ± 24.39 ^a	1.47 ± 0.15 ^a
plasmid NRON + mimic NC 组	6	256.59 ± 21.36	1.49 ± 0.14	270.15 ± 23.39	1.35 ± 0.13	259.56 ± 23.57	1.49 ± 0.14
plasmid NRON + miR-185-5p mimic 组	6	700.73 ± 40.56 ^b	0.49 ± 0.04 ^b	709.75 ± 35.58 ^b	0.35 ± 0.03 ^b	716.34 ± 39.00 ^a	0.49 ± 0.04 ^b

注: 与 NC 组比较, ^aP < 0.05; 与 plasmid NRON 组比较, ^bP < 0.05

是转录因子)相互作用而抑制蛋白质的功能,且海绵化和隔离 miRNA 及调节靶蛋白表达参与细胞周期、抗药产生等生物学行为过程^[10]。lncRNA NRON 反向定位在 9q33.3,长 2 730 nt,是 T 细胞核因子 NFAT 的非编码 RNA 抑制物,是常见的影响细胞核运输的 RNA^[11]。已有研究发现,lncRNA NRON 在乳腺癌组织中表达降低,且与乳腺癌患者生存及预后关系密切^[12,4]。化疗药物耐药性产生,一直是影响乳腺癌患者生存的关键因素^[13]。5-FU、DDP、PTX 是目前癌症治疗较为常见的化疗药物^[14]。本研究发现,在乳腺癌组织中 lncRNA NRON 表达明显低于癌旁组织,与 Niu 等^[4]的研究一致,说明 lncRNA NRON 在乳腺癌中可能发挥抑癌作用。用不同浓度的 5-FU、DDP、PTX 与乳腺癌细胞系 MCF7 培养后,随着耐药性的产生,lncRNA NRON 表达也随之降低,反之上调 lncRNA NRON 表达后,MCF7 细胞系对 5-FU、DDP、PTX 的耐药性明显降低,乳腺癌细胞表现为较低的增殖及较高的凋亡水平,提示干预 lncRNA NRON 表达可能是提高乳腺癌细胞对化疗药物敏感性的潜在策略。但 lncRNA NRON 参与调控耐药性产生的下游调控机制还不甚明确。

lncRNA NRON 可通过海绵化和隔离 miRNA 来影响细胞功能变化。但 lncRNA NRON 通过哪种途径调控乳腺癌细胞耐药性产生还不明确。本研究通过基因预测软件发现,lncRNA NRON 与 miR-185-5p 之间有靶向结合关系,且 lncRNA NRON 可靶向下调 miR-185-5p,

推测 lncRNA NRON 很可能通过海绵化和隔离 miR-185-5p 来发挥增敏作用。查阅大量文献发现,miRNA 中的 miR-185-5p 与乳腺癌异常增殖、凋亡及化疗耐药性产生关系密切^[15-16],且 miR-185-5p 可通过破坏嘧啶核苷酸的合成酶(UMPS)、二氢嘧啶脱氢酶(DPD)、TS 等合成,阻碍 5-FU、DDP、PTX 在癌细胞内分解及代谢,进而减弱化疗药物对癌细胞的毒杀作用^[17,5]。本研究发现,miR-185-5p 在乳腺癌组织和细胞系中显著高表达,与既往研究一致^[5],与 lncRNA NRON 表达趋势刚好相反,提示 miR-185-5p 作为促癌因子在乳腺癌中起作用,且可能与 lncRNA NRON 存在靶向关系,双荧光素酶实验验证了这一推测。此外,过表达 lncRNA NRON 增加乳腺癌化疗药物敏感性的同时,miR-185-5p 表达显著降低,具有促进化疗效率的 TS 表达却显著升高^[18],乳腺癌表现出较低的增殖率和较高的凋亡率,证实 lncRNA NRON 提高化疗药物敏感性作用可能与调节 miR-185-5p 有关。为了进一步验证这一推测,本研究在过表达 lncRNA NRON 的同时上调 miR-185-5p 表达,并接种于裸鼠体内,经化疗药物干预后,发现裸鼠接种 lncRNA NRON 及 miR-185-5p 高表达细胞的瘤体体积增长明显高于单独接种 lncRNA NRON 高表达的裸鼠,提示 miR-185-5p 高表达可明显削弱 lncRNA NRON 发挥的降低化疗药物耐药性作用。说明 lncRNA NRON 通过靶向负调控 miR-185-5p 抑制乳腺癌细胞的化疗耐药。

综上所述,lncRNA NRON 可通过靶向下调 miR-

185-5p, 来降低乳腺癌对化疗药物的耐药性。这为乳腺癌的化疗治疗提供新的干预策略。但 miR-185-5p 高表达并不能完全逆转 lncRNA NRON 降低化疗药物耐药性的作用, 提示 lncRNA NRON 的下游干预机制可能涉及多个 miRNA, 这需要后续进行深入探究。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明:

汪伶俐: 设计研究方案, 实施研究过程, 论文撰写; 田武国: 提出研究思路, 分析试验数据, 论文审核; 赵健洁: 实施研究过程, 资料搜集整理, 论文修改; 罗东林: 进行统计学分析, 课题设计, 论文撰写

参考文献

[1] Brackstone M, Baldassarre FG, Perera FE, et al. Management of the Axilla in early-stage breast cancer: Ontario health (Cancer Care Ontario) and ASCO guideline[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(27): 3056-3082. DOI: 10.1200/JCO.21.00934.

[2] 邢德纯, 王霞, 孙锁柱, 等. 分子诊断技术在乳腺癌检测中的最新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(3): 224-232. DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0253.

Xing DC, Wang X, Sun SZ, et al. Recent advances in molecular diagnostic techniques for breast cancer detection[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2020, 47(3): 224-232. DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0253.

[3] Wang M, Liu H, Wu W, et al. Identification of differentially expressed plasma lncRNAs as potential biomarkers for breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2022, 22(2): 135-141. DOI: 10.1016/j.clbc.2021.05.003.

[4] Niu L, Fan Q, Yan M, et al. LncRNA NRON down-regulates lncRNA snaR and inhibits cancer cell proliferation in TNBC[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): 1946-1958. DOI: 10.1042/BSR20190468.

[5] Luo L, Zhang J, Tang H, et al. LncRNA SNORD3A specifically sensitizes breast cancer cells to 5-FU by sponging miR-185-5p to enhance UMP5 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 329-336. DOI: 10.1038/s41419-020-2557-2.

[6] 刘小梅, 张诚霖, 殷荣平, 等. 靶向 VEGF siRNA 联合 5-FU 对人乳腺癌 MCF-7 荷瘤裸鼠的作用[J]. *江苏医药*, 2017, 43(10): 681-684, 753. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2017.10.002.

Liu XM, Zhang CL, Yin RP, et al. Effects of targeting VEGF siRNA combined with 5-FU on human breast cancer cell line MCF-7 xenograft in nude mice[J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2017, 43(10): 681-684, 753. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2017.10.002.

[7] Cao Y, Xie X, Li M, et al. CircHIPK2 contributes to DDP resistance and malignant behaviors of DDP-resistant ovarian cancer cells both in vitro and in vivo through circHIPK2/miR-338-3p/CHTOP ceRNA pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14(1): 3151-3165. DOI: 10.2147/OTT.S291823.

[8] 孙丽, 曹苏生, 马晓燕, 等. 化疗药物对人乳腺癌荷瘤裸鼠 ER- α 表达和甲基化水平的影响[J]. *江苏医药*, 2020, 46(6): 593-596. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2020.06.015.

Sun L, Cao SS, Ma XY, et al. Effect of chemotherapy drugs on ER- α expression and methylation level in human breast cancer-bearing

nude mice[J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2020, 46(6): 593-596. DOI: 10.19460/j.cnki.0253-3685.2020.06.015.

[9] Zuo Q, Band S, Kesavadas M, et al. Obesity and postmenopausal hormone receptor-positive breast cancer: Epidemiology and mechanisms[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(12): 195-203. DOI: 10.1210/endo/bqab195.

[10] Zhu L, Cui K, Weng L, et al. A panel of 8-lncRNA predicts prognosis of breast cancer patients and migration of breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): 2491-2504. DOI: 10.1371/journal.pone.0249174.

[11] Zhang R, Li J, Li G, et al. LncRNA Nron regulates osteoclastogenesis during orthodontic bone resorption[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 14-25. DOI: 10.1038/s41368-020-0077-7.

[12] 袁南贵, 罗雪平, 胡玉萍, 等. QPRT、miR-26b-5p 在乳腺癌中表达及其与患者预后的关系[J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(5): 476-480, 487. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2021.05.009.

Yuan NG, Luo XP, Hu YP, et al. The expression of QPRT and miR-26b-5p in breast cancer and their relationship with the prognosis of patients[J]. *Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases*, 2021, 20(5): 476-480, 487. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2021.05.009.

[13] Hong S, Song JM. 3D bioprinted drug-resistant breast cancer spheroids for quantitative in situ evaluation of drug resistance[J]. *Acta Biomater*, 2022, 15(1): 228-239. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.10.031.

[14] 徐梅玉, 沈叶, 蒋叶平, 等. 四甲基偶氮唑盐比色法体外药敏试验对乳腺癌细胞药物敏感性的预测价值[J]. *中国综合临床*, 2019, 35(1): 6-11. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-6315.2019.01.002.

Xu MY, Shen Y, Jiang YP, et al. Predictive value of in vitro methyl thiazolyl tetrazolium assay chemosensitivity test of cytotoxic drug activity in breast cancer[J]. *Clinical Medicine of China*, 2019, 35(1): 6-11. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-6315.2019.01.002.

[15] Zhang C, Hua Y, Zhong X, et al. LncRNA UCA1 promotes tumorigenesis of breast cancer via targeting MiR-185-5p[J]. *Minerva Med*, 2020, 15(1): 97-104. DOI: 10.23736/S0026-4806.20.07097-4.

[16] Yin C, Zhang G, Sun R, et al. miR1855p inhibits F-actin polymerization and reverses epithelial mesenchymal transition of human breast cancer cells by modulating RAGE[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2621-2630. DOI: 10.3892/mmr.2018.9294.

[17] Su X, Li S, Zhang H, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts disease free survival in stage II-III rectal adenocarcinoma patients receiving adjuvant 5-FU-based chemotherapy[J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(3): 28-32. DOI: 10.21037/cco.2019.01.10.

[18] 黄志国, 胡孔旺. 胸苷酸合成酶与肿瘤[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2020, 47(10): 8-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20200318-00088.

Huang ZG, Hu KW. Thymidylate synthase and tumor[J]. *Journal of International Oncology*, 2020, 47(10): 8-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20200318-00088.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.10.017

罕见病病例

伴有亚临床甲状腺功能减退的脊髓亚急性联合变性 1 例并文献复习

冯潇潇, 齐倩倩, 刘卫刚, 董艳红, 吕佩源

基金项目: 2019, 2020 河北省高端人才资助项目(6833452, 83587216); 2019 河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(冀财社: 2019-139-5); 2020 年河北省引智项目(冀科专函: 2020-19-2)

作者单位: 063210 河北省唐山, 华北理工大学研究生院(冯潇潇); 050051 石家庄, 河北省人民医院神经内科(冯潇潇, 吕佩源), 神经内三科(齐倩倩, 刘卫刚, 董艳红)

通信作者: 吕佩源, E-mail: peiyuanlu@163.com

【关键词】 脊髓亚急性联合变性; 维生素 B₁₂; 亚临床甲状腺功能减退; 甲状腺激素; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R581.2⁺2; R745.4 【文献标识码】 B

患者, 女, 49 岁。主因双足麻木 1 个月、双手麻木 15 d、四肢麻木 2 d 于 2019 年 10 月 24 日入院。患者自觉低头时出现一过性过电感, 双手持续性麻木, 执行精细动作能力下降。四肢麻木呈持续性, 双下肢无力感, 可自行行走及站立。既往亚临床甲状腺功能减退症 4 年, 目前口服左甲状腺素钠片 25 μg 每早 1 次, 后未定期复查甲状腺功能。神经系统查体: 双下肢音叉振动觉减退, 双侧跟腱、膝腱反射稍减弱, 余查体未见明显异常。实验室检查: WBC 2.79 × 10¹²/L, Hcy 149.10 μmol/L, VitB₁₂ < 50 ng/L, TSH 9.9 IU/ml, 抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb) 313.8 IU/ml。水通道蛋白及副肿瘤综合征相关抗体未见异常, 内因子抗体阳性。胃镜检查示慢性非萎缩性胃炎征象。神经电图及肌电图示: (1) 右正中神经腕掌段运动传导速度减慢; (2) 右正中神经、右尺神经诱发感觉波幅较左侧降低明显; (3) 右腓总神经末端潜伏期延长; (4) 双腓肠神经诱发感觉波幅减低, 左腓肠神经感觉传导速度减慢。颈椎 MR 示: C₃₋₄、C₅₋₆、C₆₋₇ 椎间盘突出, 以 C₄₋₅ 水平最重; C₂₋₃ 椎体对应段脊髓后索带状长 T2 信号; C₃₋₇ 椎体骨质增生。头颅 CT 未见明显异常。头颅 MR: 双顶叶、左颞叶多发小缺血灶。甲状腺超声示: 甲状腺弥漫性病变。视诱发电位示双眼 P100 潜伏期、波幅正常范围, 体感诱发电位示双上、下肢未见异常改变。最终诊断为伴有亚临床甲状腺功能减退的脊髓亚急性联合变性。患者入院后给予叶酸、VitB₆ 降同型半胱氨酸, VitB₁₂、VitB₁、甲钴胺、痘苗病毒致炎皮提取物、赖氨酸等营养神经治疗。治疗 20 d 后患者四肢麻木、双下肢无力感、心慌、执行精细动作能力较前好转, 行走及站立不受限, 低头时双足仍有一过性过电感, 神经系统查体较入院时无变化。

讨论 脊髓亚急性联合变性(subacute combined degeneration of spinal cord, SCD)是一种与 VitB₁₂ 吸收和代谢障碍密切相关的进行性脊髓神经疾病。SCD 病变大多局限于颈、胸段脊髓后索或侧索, 主要以进行性感觉异常和痉挛性瘫痪症状为特征^[1]。SCD 起病隐匿, 早期缺乏特异性诊断方法, 而若延误诊断, 常会导致严重的不可逆的神经功能损伤。亚临床甲状腺功能减退症(subclinical hypothyroidism, SCH)是一种常见的无典

型临床表现的内分泌代谢性疾病, 实验室检测结果为血清 TSH 水平显著升高, 而游离甲状腺素(FT₄)和游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)水平在正常范围^[2-3]。在普通人群中甲状腺功能减退的发病率为 1%, 而 SCH 的发病率为 5% ~ 17%, 在临床工作中, SCH 容易被忽视。SCH 引起的甲状腺激素异常可以导致 VitB₁₂ 缺乏, 进而促进 SCD 的发生发展^[4]。SCH 的发病机制可能是甲状腺自身或以外的结构异常引起的机体甲状腺激素合成、分泌障碍, 虽然 SCH 早期无明显症状, 但能够诱发多种疾病, 具有一定的临床危害。

本例患者为中年女性, 慢性病程。表现为低头时自觉一过性过电感, 双手持续性麻木, 执行精细动作能力下降。本例患者的症状、体征、血清学结果、神经电图 + 肌电图结果及影像学特征, 符合脊髓亚急性联合变性的诊断。本例患者既往亚临床甲状腺功能减退症病史, 入院后查甲状腺彩色超声及甲状腺功能结果也是有力证据。查胃镜提示慢性非萎缩性胃炎, 而且内因子抗体阳性, 临床诊断为自身免疫性胃炎。补充甲状腺素、B 族维生素等治疗后患者症状好转, 考虑为甲状腺功能减退导致的功能性 VitB₁₂ 缺乏可能性大。患者血同型半胱氨酸水平升高, 也间接支持存在功能性 VitB₁₂ 缺乏。

SCD 是由于 VitB₁₂ 缺乏引起的神经系统变性疾病, 累及中枢及周围神经系统。引起 VitB₁₂ 缺乏的原因众多, 在摄入、吸收、结合、转运或代谢障碍整个过程的任一环节发生紊乱均有可能出现。VitB₁₂ 是中枢神经系统发育和髓鞘形成过程中重要的辅酶, 需要经过肠道吸收和消化, 与血清运钴胺素蛋白结合发挥作用, 若体内 VitB₁₂ 水平降低可能会导致严重的神经系统并发症^[5]。因为人体内的 VitB₁₂ 需要从食物中摄取, VitB₁₂ 的吸收需要胃底腺壁细胞分泌的内因子辅助, VitB₁₂ 的转运需要结合转钴胺蛋白, 所以节食、偏食、萎缩性胃炎、胃大部切除术、药物因素、质子泵抑制剂等因素会使体内的 VitB₁₂ 水平显著减少。有研究发现, 甲状腺激素可影响消化系统对 VitB₁₂ 的吸收, 二甲双胍也会导致血清 VitB₁₂ 浓度下降^[6-7]。

VitB₁₂ 的缺乏会影响甲基化过程, 造成髓鞘脱失、轴突变