DOI:10.16016/j.1000-5404.202011207

LncRNA CASC2 通过 ABCG2 提高胶质瘤细胞对替莫唑胺的敏感性

刘彦廷,罗 然,朱岳峰,王壮壮,龚 伟,田春雷 443000 湖北宜昌,三峡大学第一临床医学院(宜昌市中心人民医院)神经外科

[**摘要**] **目的** 探索 lncRNA CASC2(cancer susceptibility 2)对胶质瘤细胞替莫唑胺(temazolamide,TMZ)敏感性的影响,并探讨其作用机制。**方法** 收集 2018 年 7 月至 2020 年 3 月在我院神经外科手术治疗的胶质瘤患者病例,比较异柠檬酸脱氢酶 1/2(IDH 1/2)突变型胶质瘤组织(17 例)与 IDH 1/2 野生型(9 例)组织中 lncRNA CASC2 表达量,并分析其与胶质瘤病理分级的相关性。培养胶质瘤细胞 U251,在转染 lncRNA-CASC2 过表达质粒、多药耐药蛋白(ABCG2)干扰 RNA 后,CCK-8 及流式细胞仪检测 TMZ30 μg/mL 作用下,U251 细胞活力及凋亡比例变化。构建小鼠颅内胶质瘤模型,高效液相色谱测定肿瘤细胞内 TMZ 活性产物浓度变化。免疫荧光染色及 RNA 免疫共沉淀检测 lncRNA CASC2 与 ABCG2 相关性。**结果** lncRNA CASC2 在 IDH 1/2 野生型胶质瘤组织中表达量降低,与胶质瘤病理分级存在负相关性。U251 细胞过表达 lncRNA-CASC2 后,TMZ 的 IC_{50} 值为(36.7±4.2)μg/mL,低于 pc-Null 组($t=4.41$,$P<0.05$)。TMZ 30 μg/mL 刺激下,过表达 lncRNA-CASC2 后细胞活力降低,凋亡比例升高。小鼠胶质瘤模型中,过表达 lncRNA-CASC2 后细胞内 TMZ 活性产物浓度升高。LncRNA CASC2 与 ABCG2 均分布于细胞质,RNA 免疫共沉淀显示:ABCG2 抗体组 lncRNA CASC2 含量高于 IgG 对照组。此外,通过 siRNA 下调细胞内 ABCG2 后,可减弱 lncRNA CASC2 对 U251 细胞 TMZ 敏感性的增强作用。**结论** lncRNA CASC2 可提高胶质瘤细胞 U251 对 TMZ 的敏感性;siRNA 抑制细胞内 ABCG2 后,lncRNA CASC2 的上述作用减弱。

[**关键词**] 胶质瘤;替莫唑胺;长链非编码 RNA;多药耐药蛋白
[**中图法分类号**] R394.3; R730.264; R915 [**文献标志码**] A

LncRNA CASC2 enhances sensitivity of glioma cells to temozolomide by ABCG2

LIU Yanting, LUO Ran, ZHU Yuefeng, WANG Zhuangzhuang, GONG Wei, TIAN Chunlei Department of Neurosurgery, the First College of Clinical Medical Science (Yichang Central People's Hospital), China Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of long noncoding RNA cancer susceptibility 2 (lncRNA CASC2) on the sensitivity of glioma cells to temazolamide (TMZ) and investigate the underling mechanism. **Methods** Forty glioma tissue samples derived from the 40 patients undergoing surgical treatment in our department from July 2018 to March 2020 were enrolled in this study. The expression of lncRNA CASC2 in the glioma tissues was detected with RT-PCR, and the results were analyzed with pathological grades and compared between the patients with isocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2 mutant ($n=17$) and IDH 1/2 wild type ($n=9$). Glioma cells U251 were cultured and transfected with plasmid pc-CASC2 to overexpress lncRNA CASC2 and/or interfering RNA of multi-drug resistance protein ABCG2. CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect the cell viability and apoptotic rate in above cell groups after 30 μg/mL TMZ treatment. After mouse intracranial glioma model was established, high performance liquid chromatography was adopted to

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81701278);湖北省卫健委项目(WJ2019M063);宜昌市卫生医疗科技项目(A18-301-03)
[**通信作者**] 田春雷,E-mail:cltianyc@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

determine the concentration of TMZ. The correlation between lncRNA CASC2 and ABCG2 was detected by immunofluorescence staining and RNA immunoprecipitation. **Results** LncRNA CASC2 level was decreased in the glioma tissues with IDH 1/2 wild type, and had a negative correlation with pathological grade of glioma. LncRNA CASC2 overexpression resulted in significantly lower IC_{50} to TMZ (36.7±4.2 μg/mL) than the U251 cells after pc-Null transfection ($t=4.41$, $P<0.05$). Under 30 μg/mL TMZ stimulation, the cell viability was reduced and the proportion of apoptotic cells was increased after lncRNA-CASC2 overexpression. In the mouse intracranial glioma model, the concentration of intracellular TMZ active product was increased after lncRNA-CASC2 overexpression. LncRNA CASC2 and ABCG2 were evenly distributed in the cytoplasm, and RNA immunoprecipitation showed that the content of lncRNA CASC2 in ABCG2 antibody group was higher than that in IgG control group. In addition, down-regulation of intracellular ABCG2 by siRNA decreased the TMZ sensitivity of U251 cells that could enhanced by lncRNA CASC2. **Conclusion** LncRNA CASC2 improves the sensitivity of glioma U251 cells to TMZ. However, ABCG2 inhibition by siRNA attenuates the above effects of lncRNA CASC2.

[**Key words**] glioma; temozolomide; long non-coding RNA; multi-drug resistance protein

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholar of China (81701278), the Project of Health Commission of Hubei Province (WJ2019M063) and the Project of Health and Medical Sci & Tech of Yichang (A18-301-03). Corresponding author: TIAN Chunlei, E-mail: cltianyc@163.com

胶质瘤是中枢神经系统常见恶性肿瘤,中位生存期仅为14.6个月,5年生存率不足10%[1]。在术后化疗阶段,肿瘤细胞对替莫唑胺(temozolomide,TMZ)敏感性降低,是导致患者预后不良的重要原因[1-2]。目前认为,除O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)等经典耐药蛋白外,多药耐药蛋白(ABCG2)的活性状态,可直接影响细胞内TMZ浓度[3],对改善胶质瘤化疗耐药具有重要价值。

目前发现,多个长链非编码RNAs(long noncoding RNAs,lncRNAs)在胶质瘤中差异性表达,并通过不同靶点调控胶质瘤化疗耐药。如lncRNAs HOTAIR、MALAT1、CANDER等,分别通过调控细胞周期变化,或增殖凋亡比例,或干预耐药性蛋白合成,在TMZ化疗耐药中发挥重要作用[4-5]。既往研究显示,lncRNA CASC2(cancer susceptibility 2)在胶质瘤中的表达量降低,在胶质瘤早期诊断及其预后分析中,具有重要参考价值。此外,lncRNA CASC2可通过调控mTOR、Wnt/beta-catenin信号通路活性,或竞争性结合miR-181a、miR-193a、miR-21等,调控对胶质瘤化疗耐药[6]。然而,lncRNA CASC2能否通过ABCG2蛋白,影响胶质瘤对TMZ的敏感性,尚不明确。基于IDH 1/2表型对判断胶质瘤细胞的TMZ敏感性有重要参考价值,本研究拟分析IDH 1/2突变型胶质瘤组织与野生型组织中lncRNA CASC2含量,并在胶质瘤U251细胞中过表达lncRNA-CASC2后,检测细胞对TMZ敏感性的变化,验证lncRNA CASC2与ABCG2相关性,为TMZ化疗耐药提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

收集2018年7月至2020年3月在本院神经外科接受手术治疗、病理诊断为胶质瘤的脑肿瘤组织样本40例,其中26例患者在泛生子生物公司行肿瘤组织样本二代测序,IDH 1/2突变型17例,IDH 1/2野生型9例。本研究获得本院伦理委员会批准(HEC-KYJJ2018-006-01)。胶质瘤U251细胞购于南方医科大学神经病学研究实验室细胞库。Balb/c-nu/nu雌性裸鼠(10只)购自北京维通利华生物科技有限公司(检验合格证编号:110011201108576372),SPF级,4~5周龄,体质量16~18 g。CCK-8试剂盒购于美国Sigma公司;RT-PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司,RIP试剂盒购自广州益龙科技有限公司;ABCG2、IgG单克隆抗体均购于国CST公司,HPLC由三峡大学分子生物学实验室提供,胎牛血清、培养基购自美国Gibco公司;TRIzol LS试剂购自Invitrogen供应商,Annexin-V/Propidium Iodide流式细胞试剂盒购自广州益龙科技有限公司,RPMI1640和胎牛血清购自广州康众生物有限公司。共聚焦显微镜(德国莱卡公司),H-7600电子显微镜(日本日立公司)。TMZ药物购自美国Sigma公司。

1.2 细胞培养

人源性胶质瘤细胞U251置于RPMI1640培养基(含5%胎牛血清)中常规培养,添加青霉素100 U/mL及链霉素100 μg/mL降低细胞污染,设定培养箱参数为37 ℃、95%饱和湿度、5% CO_2,视细胞生长状态更换培养基。

1.3 RT-PCR 检测 lncRNA CASC2 含量

参照 TRIzol 试剂说明书操作提取组织或细胞总 RNA,鉴定 RNA 浓度及纯度。采用 RT-PCR 试剂盒,按照上面反应体系进行 cDNA 的合成反转录反应体系。ABI Prism7500 型荧光定量 PCR 仪中扩增,以内参 GAPDH 进行标准化,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达量。设计 CASC2 上游引物序列:5′-GAGGAGCCATCCGCACATCACAAT-3′,下游引物序列:5′-AGCTTAGACTGTAAGCTGGTCTCA-3′;GAPDH 内参上游引物序列:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′,下游引物序列:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′。

1.4 lncRNA CASC2 过表达质粒、ABCG2 小干扰 RNA

实验按转染质粒不同分组:过表达 lncRNA CASC2 组:pcDNA3.1(+)-CASC2(pc-CASC2),阴性对照组 pcDNA3.1(+)-Null(pc-Null)。pc-CASC2 及 pc-Null 质粒由上海康众生物制药有限公司构建,过程简述如下:参考 lncRNA CASC2 基因序列,根据 pcDNA3.1(+)载体克隆位点,加入 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅤ于上下游位点,扩增 lncRNA CASC2 序列。提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA 后,取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,纯化回收后与模板序列对比。将 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅤ酶切 PCR 产物后,T_4DNA 连接酶接入 pcDNA3.1(+)载体,连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞,在固体琼脂糖培养基上行阳性单克隆挑选,将构建正确的 pcDNA3.1(+)CASC2 基因质粒扩大培养,采用 RT-PCR 验证转染效果。ABCG2 小干扰 RNA(si-RNA ABCG2,si-ABCG2)及阴性对照(siRNA negative control,si-NC)由上海康众生物制药有限公司构建,序列:5′-GACCAAGTGCATTACGCC-3′。

1.5 CCK-8 检测细胞增殖活力

取对数生长期 U251 细胞,配置 1×10^5/mL 细胞悬液,分别将不同浓度 TMZ(0、15、30、60、120 μg/mL)作用于 U251 细胞后,绘制药物浓度曲线,计算 IC_{50}。根据 IC_{50} 结果及文献[7],为避免细胞过度凋亡,故选择 TMZ 30 μg/mL 为药物作用浓度,于 96 孔板中每孔加入单细胞悬液 100 μL(含 TMZ 30 μg/mL),空白孔加等量培养基(含 TMZ 30 μg/mL),置于 37 ℃、95%饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养 48 h,加入 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 3~4 h 后,酶标仪检测 450 nm 波长处吸光密度值 $D(450)$,细胞活力(%)=$[D(450)_{实验组}-D(450)_{空白组}]/[D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}]\times100\%$。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期 U251 细胞,以 2×10^5/孔接种在 6 孔板上。按实验设计分组转染质粒后,TMZ 30 μg/mL 处理细胞 24 h,胰酶消化收集处理,PBS 清洗后,70%冷乙醇固定,离心洗涤后采用 Annexin-V/ Propidium Iodide 试剂盒检测细胞凋亡比例。

1.7 高效液相色谱(HPLC)测定小鼠颅内胶质瘤细胞内 TMZ 水平

分别将 pc-CASC2 及 pc-Null 质粒转染 U251 细胞后,配制细胞悬液。SPF 条件下饲养 Balb/c-nu/nu 雌性裸鼠,麻醉成功后,头部剃毛,在脑立体定位仪辅助下,取前囟为原点,为右侧旁开 2 mm、前 0.8 mm 处钻开颅骨,微量注射器吸取 10 μL 细胞悬液缓慢推入,观察无明显漏液后缝合皮肤,术后常规监测小鼠活动,3 周后尾静脉注射 TMZ 1 mL(30 μg/mL),24 h 后麻醉小鼠并提取脑组织样本。胰酶消化组织样本后收集细胞,300×*g* 离心后超声处理,450×*g* 再次离心后上清液为细胞内液。使用 Phenomenex Kinetex NB-C18 柱色谱柱,流动相乙腈-0.1%甲酸水 1∶9,30 ℃下流量设置为 1 mL/min;设定 329 nm 为检测波长。依次从专属性考察、精密度实验、回收率实验进行方法学考察。即:取 TMZ 活性产物[5-(3-甲基三氮烯-1-)咪唑-4-酰胺,MTIC]对照品储备液,配制不同质量浓度溶液(1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL),在设定色谱条件下检测不同质量浓度溶液,统计峰面积验证精密度。吸取待检测样品 5 μL,使用双蒸水低、中、高 3 个质量浓度,在同等色谱条件下完成检测。取 MTIC 对照品溶液,使用 Hank's 液配制低、中、高质量浓度溶液,进样 5 μL 后,测定峰面积,并计算回收率及 RSD 值。结果 MTIC 低、中、高浓度对应回收率分别为 83.6%、86.2%、85.7%,RSD 值分别为 2.24%、4.33%、4.15%。回收率良好。

1.8 采用 RNA 免疫共沉淀(RIP)检测 lncRNA CASC2 与 ABCG2 蛋白结合程度

4%多聚甲醛固定 U251 细胞后,胰蛋白酶收集细胞,所有试剂及仪器去 RNA 酶。选择 2 000×*g* 离心 10 min 后,RIP 缓冲液重悬细胞沉淀。匀浆器机械破坏染色质 15~18 次。18 894×*g* 离心 15 min 后重悬沉淀,取 100 μL 作为 INPUT 阳性对照。分别加入 ABCB1 抗体及 IgG 抗体,4 ℃下孵育 3 h。加入 A/G 磁珠 40 μL 后孵育 3 h。700×*g* 离心 30 s,沉淀磁珠用 500 μL RIP 缓冲液重悬,重复清洗 3 次。使用 Western blot 分析检测通过磁珠分离的蛋白质。在 TRIzol RNA 提取试剂分离共沉淀的 RNA。RT-PCR 检测 lncRNA CASC2 含量。

1.9 Western blot 检测 pc-Null 组与 pc-CASC2 组细胞 ABCG2 蛋白变化

提取样本总蛋白提取后,SDS-PAGE 将蛋白分离电泳,转聚偏二氟乙烯膜后 5%脱脂牛奶封闭膜 3 h,

依次加入 ABCG2 蛋白抗体(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h。滴加适量化学发光试剂(ECL)后 Chemi DocMP 显现观察。

1.10 免疫荧光染色检测 lncRNA CASC2 与 ABCG2 蛋白的细胞定位

U251 细胞多聚甲醛溶液固定后,0.1% Tirton X-100 通透细胞,BSA 溶液封闭。lncRNA CASC2 荧光探针由上海康众生物制药有限公司合成。按设定时间间隔加入 lncRNA CASC2 荧光标记(红色,1∶100 稀释),ABCG2 抗体(绿色,1∶100 稀释),避光条件下孵育 2 h,DAPI 染核 2 min,PBS 冲洗后封片,荧光显微镜下采集图像。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

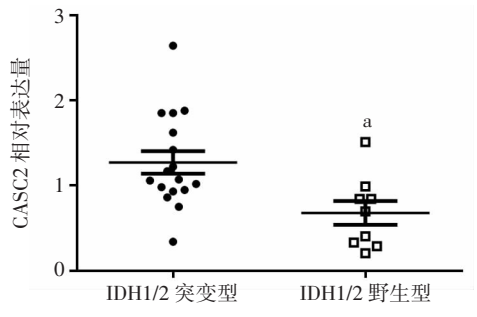
2 结果

2.1 lncRNA CASC2 在胶质瘤患者组织中的表达

在 40 例胶质瘤患者组织中,lncRNA CASC2 表达量与患者年龄、性别无相关性,与胶质瘤的病理分级存在负相关性(表 1)。RT-PCR 结果显示:IDH 1/2 野生型组织中 lncRNA CASC2 表达量低于 IDH 1/2 突变型($P<0.05$,图 1)。

表 1 lncRNA CASC2 表达量与胶质瘤患者临床特征关系 ($\bar{x}\pm s$)

临床特征	例数	CASC2 相对表达量	P
年龄/岁			0.76
≥50	28	1.05±0.13	
<50	12	0.94±0.17	
性别			0.65
男性	17	0.91±0.15	
女性	23	1.18±0.23	
病理分级			<0.01
Ⅰ+Ⅱ	11	1.47±0.26	
Ⅲ+Ⅳ	29	0.42±0.09[a]	



a:$P<0.05$,与 IDH 1/2 突变型比较

图 1 lncRNA CASC2 在不同胶质瘤组织中的表达

2.2 过表达 lncRNA CASC2 后 U251 细胞对 TMZ 敏感性的变化

分别将 pc-CASC2 及阴性对照 pc-Null 质粒转染 U251 细胞,RT-PCR 结果显示:pc-CASC2 组细胞内 lncRNA CASC2 含量高于 pc-Null 组,提示转染成功(图 2A)。分别将不同浓度 TMZ(0、15、30、60、120 μg/mL)作用于 U251 细胞后发现,pc-CASC2 组细胞药物浓度曲线左移,pc-CASC2 组细胞 TMZ 药物 IC_{50}[(36.7±4.2)μg/mL]低于 pc-Null 组[(53.1±4.6)μg/mL,$P<0.05$,图 2B]。设 TMZ 30μg/mL 为检测浓度,CCK-8 结果显示:pc-CASC2 组细胞活力低于 pc-Null 组($P<0.05$,图 2C)。流式细胞仪结果显示:pc-CASC2 组细胞凋亡比例为(19.37±3.06)%,高于 pc-Null 组[(9.02±1.14)%,$P<0.05$,图 2D]。

2.3 过表达 lncRNA CASC2 后 U251 细胞内中 TMZ 浓度变化

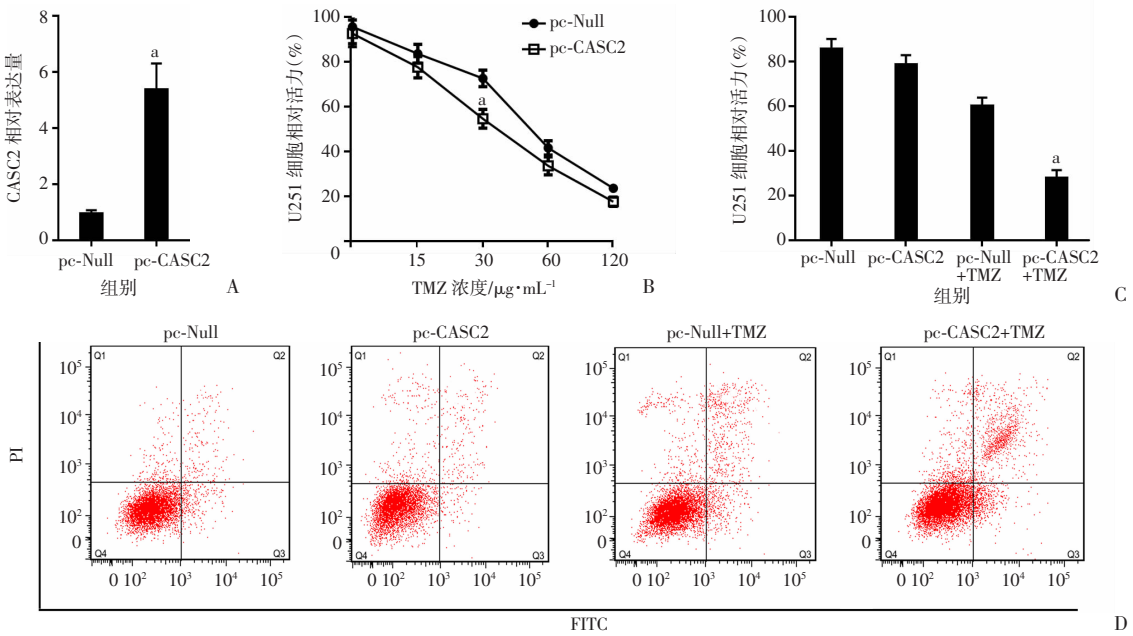
分别将 pc-CASC2 及 pc-Null 质粒转染的 U251 细胞,立体定向下注射入小鼠颅内构建胶质瘤模型,TMZ 30 μg/mL 静脉注射 24 h 后,HPLC 结果显示:pc-CASC2 组细胞内 TMZ 活性产物浓度(11.03±3.12)μg/mL 高于 pc-Null 组[(7.15±1.44)μg/mL,$P<0.05$]。

2.4 lncRNA CASC2 与 ABCG2 的关系

为检测 lncRNA CASC2 与 ABCG2 的相互关系,将 pc-CASC2 及 pc-Null 质粒转染 U251 细胞,Western blot 检测两组细胞 ABCG2 蛋白变化。结果显示:pc-Null 组与 pc-CASC2 组间 ABCG2 蛋白变化差异无统计学意义($P>0.05$,图 3A)。采用荧光染色验证 lncRNA CASC2 是否可通过 ABCG2 形成复合物发挥作用,结果显示:lncRNA-CASC2 与 ABCG2 蛋白均分布于细胞质(图 3B)。RIP 结果显示:ABCG2 抗体组复合物中,lncRNA-CASC2 含量高于 IgG 组($P<0.05$,图 3C、D)。

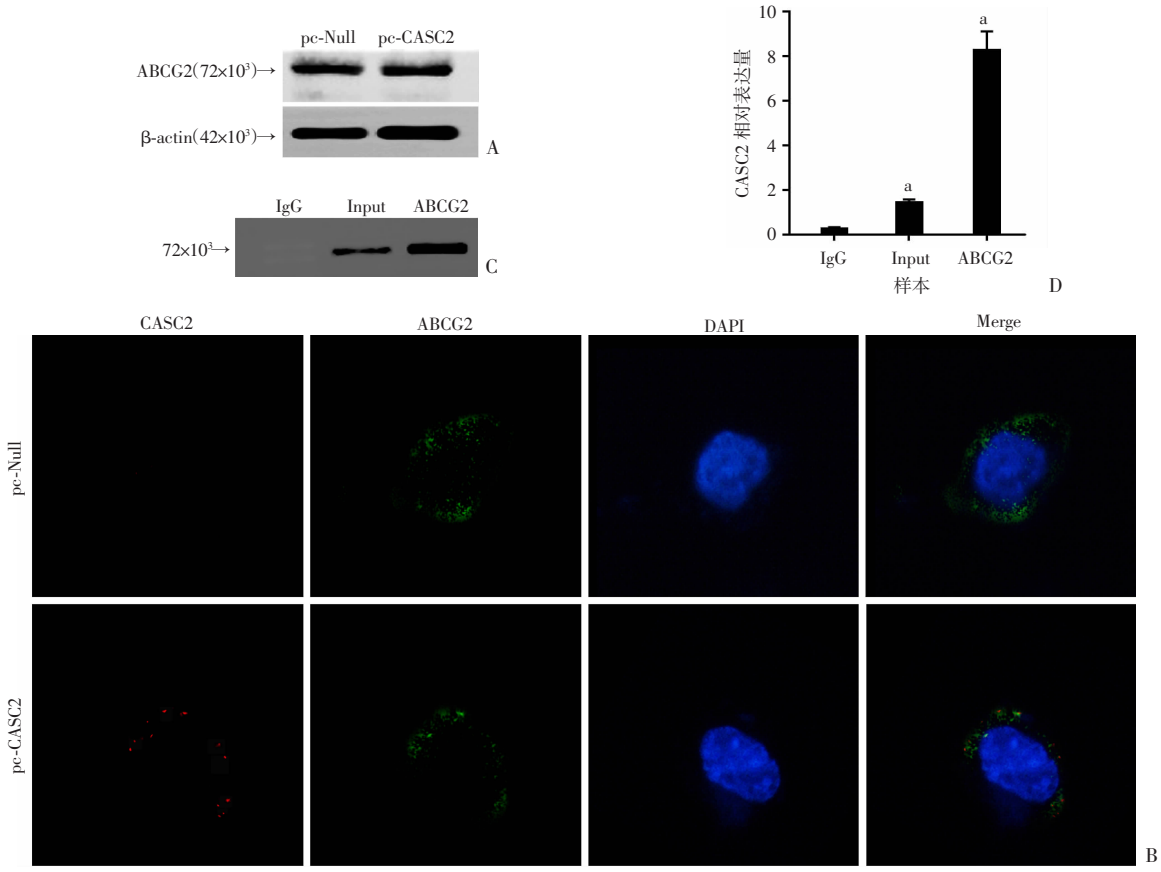
2.5 si-ABCG2 后 lncRNA CASC2 对 U251 细胞 TMZ 敏感性的影响

为验证 lncRNA CASC2 对 U251 细胞 TMZ 敏感性的影响是否依赖 ABCG2 蛋白,将 si-ABCG2 与 lncRNA CASC2 过表达质粒共转染 U251 细胞,TMZ 30 μg/mL 作用 24 h 后,流式细胞仪与 CCK-8 检测结果显示:与 si-ABCG2+pc-CASC2+TMZ 组比较,si-ABCG2+pc-Null +TMZ 组细胞凋亡比例及细胞活性均未见明显差异($P>0.05$,图 4)。



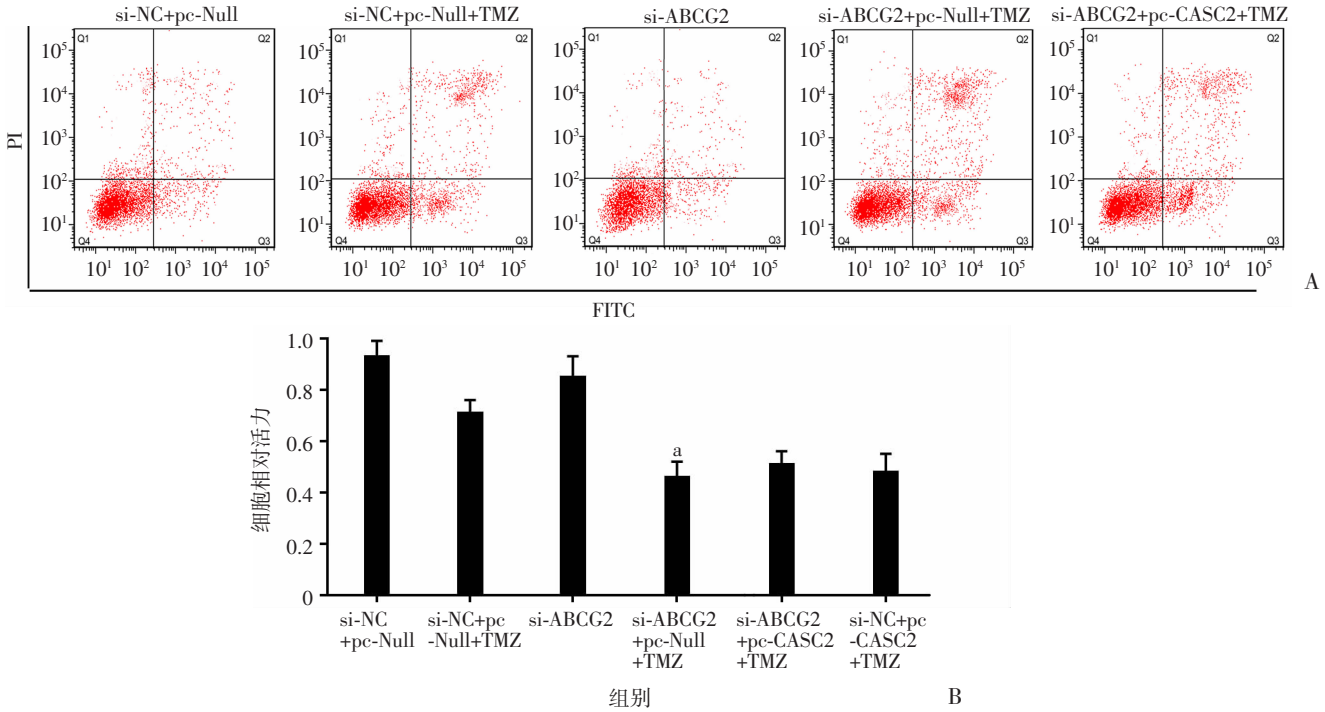
A: RT-PCR 检测两组 lncRNA CASC2 表达量($n=3$,$\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 pc-Null 比较;B:CCK-8 检测两组不同 TMZ 浓度下 U251 细胞活力变化($n=6$,$\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 pc-Null 比较;C: CCK-8 检测检测 TMZ 30 μg/mL 作用下各组细胞活力变化($n=6$,$\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 pc-Null+TMZ 组比较;D:流式细胞仪检测 TMZ 30 μg/mL 作用下各组 U251 细胞凋亡比例(Q2+Q3)

图 2 过表达 lncRNA CASC2 后 U251 细胞对 TMZ 敏感性的变化



A:Western blot 检测 pc-CASC2、pc-Null 组细胞 ABCG2 蛋白表达;B:荧光染色显示 U251 细胞内 lncRNA-CASC2(红色荧光探针)与 ABCG2 蛋白(绿色荧光)空间位点(×400),DAPI:细胞核,Merge:合图;C:Western blot 检测复合物中 ABCG2 蛋白含量 Input 为阳性对照;D:RT-PCR 检测复合物中 lncRNA-CASC2 含量($n=3$,$\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 IgG 组比较

图 3 lncRNA CASC2 与 ABCG2 的相互关系



A:流式细胞仪检测 TMZ 30 μg/mL 作用下各组 U251 细胞凋亡比例(Q2+Q3);B:CCK-8 检测各组 U251 细胞活力变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 si-NC+pc-CASA2+TMZ 组比较

图 4 Si-ABCG2 后 lncRNA CASC2 对 U251 细胞 TMZ 敏感性的影响

3 讨论

目前研究发现,胶质瘤细胞对 TMZ 敏感性下降是临床化疗失败、患者预后不佳的重要原因。TMZ 化疗耐药的相关因素包括:DNA 损伤修复、胶质瘤干细胞激活、肿瘤免疫逃逸、肿瘤细胞自噬活性增强、lncRNAs 或 miRNAs 调控 TMZ 耐药蛋白等[8]。与 MGMT、DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)、碱基切除修复(base excision repair,BER)等经典化疗耐药蛋白不同,ABCC2 通过外泵化疗药物,直接降低细胞内药物浓度,成为调控胶质瘤 TMZ 化疗耐药重要因子[8-9]。本研究发现,在小鼠胶质瘤模型中,过表达 lncRNA CASC2 可增加肿瘤组织内 TMZ 药物浓度;RIP 结果证实,lncRNA CASC2 与 ABCG2 蛋白可形成复合物,推测 lncRNA CASC2 可能通过干扰 ABCG2 蛋白活性,增加胶质瘤内药物浓度。

目前 lncRNAs 已成为调控胶质瘤 TMZ 化疗耐药的重要因子,如 lncRNA FOXD2-AS1 通过 microRNA-98-5p/CPEB4 促进胶质瘤细胞凋亡,抑制 TMZ 化疗耐药[10]。LncRNA-H19 沉默后,可通过 Wnt/β-catenin 通路抑制细胞上皮-间质转化,增强脑胶质瘤细胞的 TMZ 敏感性[11]。已有学者证实,lncRNA CASC2 参与多个肿瘤细胞的化疗耐药。如 lncRNA CASC2 通过降低 miR-31-5p 对 KN 基序和锚蛋白重复结构域 1(KN motif and ankyrin-repeat domains 1, Kank1)的抑制作用,增强口腔鳞状细胞癌细胞对顺铂的敏感性[12]。lncRNA CASC2 通过竞争性结合 miR-21,增强 PTEN 活性,提高宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性[13]。在本研究中,复发性胶质瘤患者对 TMZ 的敏感性明显低于原发性患者,伴随 lncRNA CASC2 含量降低。此外,lncRNA CASC2 与胶质瘤病理分级呈现负相关性,此外,CCK-8 及流式细胞术提示,胶质瘤细胞过表达 CASC2,细胞活性降低,凋亡比例增加,提示 lncRNA CASC2 在胶质瘤的病理生理过程中,可能发挥抑癌因子作用,过表达 CASC2 可增强细胞对 TMZ 的敏感性。

LncRNAs 可通过多种方式调控耐药相关蛋白的活性。如作为顺式或反式作用元件,调控耐药蛋白 mRNA 的转录或翻译,或通过 ceRNA 机制,吸附 miRNAs 发挥作用,或通过与 RNA、蛋白形成复合物,干扰蛋白活性[14]。如 lncRNA SNHG15 以反式作用元件方式,调控 CDK6 蛋白活性,增强细胞对 TMZ 的敏感性[15]。lncRNA ADAMTS9-AS2 通过上调 FUS/MDM2 泛素化,

促进胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药性的形成[16]。LncRNA SOX2OT 通过 alkbh5 介导的表观遗传调控,上调 SOX2 表达,降低细胞对 TMZ 的敏感性[17]。本研究中,免疫荧光染色提示,lncRNA CASC2 与 ABCG2 均位于细胞质,其相互结合存在空间可能性。RIP 结果提示,通过 ABCG2 抗体分离结合物中的 RNA 发现,lncRNA CASC2 明显高于 IgG 对照组,提示 lncRNA CASC2 对 ABCG2 在空间上存在作用关系。即 lncRNA CASC2 与 ABCG2 可形成免疫沉淀复合体,存在 RNA-蛋白质直接或间接相互作用。通过分析 ABCG2 结构发现,该蛋白的核苷酸结合区域(Nucleotide Binding Domains,NBDs)位于细胞质中,约由 200 个氨基酸残基构成,包含 Walker A 和 B 序列、ABC 特征基序、H/Q 环以及 Mg-ATP 结合和水解位点,是天然的核苷酸结合区域。LncRNA CASC2 可能与该蛋白的 NBDs 区域结合,阻止其形成同源二聚体,进而无法利用 ATP 能量完成跨膜区域构型变化,最终导致细胞内药物浓度升高。

ABCG2 蛋白可将多种化疗药物由细胞内泵至细胞外,是调节细胞内化疗药物浓度的重要膜转运蛋白[18]。如:在胶质瘤 SF767、U373 和 LN229 细胞中,CK2-STAT3 信号通路抑制剂可改变 ABCG2 蛋白活性,提高胶质瘤细胞内 TMZ 活性产物浓度[19]。EGFR 抑制剂可通过 ABCB1 和 ABCG2 逆转胶质瘤细胞的多药耐药表型[20]。在本研究中,特异性抑制 ABCG2 后发现,lncRNA CASC2 表达量变化与胶质瘤 TMZ 敏感性无相关性。结合上述结果,lncRNA CASC2 可能主要通过结合 ABCG2 蛋白,干扰蛋白活性,改变胶质瘤细胞内 TMZ 浓度,进而增强胶质瘤细胞的化疗敏感性。

本研究不足之处在于未在多个胶质瘤细胞系及不同动物模型中加以验证。此外,lncRNA CASC2 与 ABCC2 复合物的形成受哪些因素干扰,lncRNA CASC2 与胶质瘤细胞周期、侵袭迁移、干细胞分化是否存在相关性,仍有待进一步证实。

参考文献:

[1] 顾润环, 朱尔春. 替莫唑胺联合放疗治疗恶性脑胶质瘤患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020,36(10): 1202-1204,1227.
GU R H, ZHU E C. Clinical trial of temozolomide combined with radiotherapy in the treatment of patients with malignant glioma[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(10): 1202-1204,1227.

[2] BAHADUR S,SAHU A K, BAGHEL P,*et al*. Current promising treatment strategy for glioblastoma multiform: a review [J]. Oncol Rev, 2019, 13(2): 417. DOI: 10.4081/oncol.2019.417.

[3] DEGOOIJER M C, DE VRIES N A, BUCKLE T, *et al*. Improved brain penetration and antitumor efficacy of temozolomide by inhibition of $ABCB_1$ and ABCG2[J]. Neoplasia, 2018, 20(7): 710-720. DOI: 10.1016/j.neo.2018.05.001.

[4] KIM S S, HARFORD J B, MOGHE M,*et al*. Targeted nanocomplex carrying siRNA against MALAT1 sensitizes glioblastoma to temozolomide[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(3): 1424-1440. DOI: 10.1093/nar/gkx1221.

[5] ZHANG J, CHEN G, GAO Y,*et al*. HOTAIR/miR-125 axis-mediated Hexokinase 2 expression promotes chemoresistance in human glioblastoma[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(10): 5707-5717. DOI: 10.1111/jcmm.15233.

[6] YU L, CHEN S, BAO H, *et al*. The role of lncRNA $CASC_2$ on prognosis of malignant tumors: a meta-analysis and bioinformatics[J]. OncoTargets Ther, 2018, 11: 4355-4365. DOI: 10.2147/ott.s166132.

[7] LEE S Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme [J]. Genes Dis, 2016, 3(3): 198-210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.

[8] JIAPAER S, FURUTA T, TANAKA S,*et al*. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2018, 58(10): 405-421. DOI: 10.2176/nmc.ra.2018-0141.

[9] DANIEL P, SABRI S, CHADDAD A, *et al*. Temozolomide induced hypermutation in glioma: evolutionary mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Front Oncol, 2019, 9: 41. DOI: 10.3389/fonc.2019.00041.

[10] NI W, XIA Y X, BI Y X,*et al*. FoxD2-AS1 promotes glioma progression by regulating miR-185-5P/HMGA2 axis and PI3K/AKT signaling pathway[J]. Aging, 2019, 11(5): 1427-1439. DOI: 10.18632/aging.101843.

[11] JIA L, TIAN Y, CHEN Y,*et al*. The silencing of LncRNA-H19 decreases chemoresistance of human glioma cells to temozolomide by suppressing epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/β-Catenin pathway[J]. OncoTargets Ther, 2018, 11: 313-321. DOI: 10.2147/ott.s154339.

[12] WANG J, JIA J, ZHOU L. Long non-coding $RNACASC_2$ enhances cisplatin sensitivity in oral squamous cell cancer cells by the miR-31-5p/$KANK_1$ axis[J]. Neoplasma, 2020, 67(6): 1279-1292. DOI: 10.4149/neo_2020_191029N1102.

[13] FENG Y, ZOU W, HU C,*et al*. Modulation of $CASC_2$/miR-21/PTEN pathway sensitizes cervical cancer to cisplatin[J].

Arch Biochem Biophys, 2017, 623/624: 20-30. DOI: 10.1016/j.abb.2017.05.001.

[14] FANG Y, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer[J]. Genom Proteom Bioinf, 2016, 14(1): 42-54. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.09.006.

[15] LI Z Z, ZHANG J X, ZHENG H S, *et al*. Modulating lncRNA SNHG15/CDK6/miR-627 circuit by palbociclib, overcomes temozolomide resistance and reduces M2-polarization of glioma associated microglia in glioblastoma multiforme[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 380. DOI: 10.1186/s13046-019-1371-0.

[16] YAN Y, XU Z, CHEN X, *et al*. Novel function of lncRNA ADAMTS9-AS2 in promoting temozolomide resistance in glioblastoma via upregulating the FUS/MDM2 ubiquitination axis[J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 2(7): 217-226. DOI: 10.3389/fcell.2019.00217.

[17] LIU B, ZHOU J, WANG C, *et al*. LncRNA SOX2OT promotes temozolomide resistance by elevating SOX2 expression via $ALKBH_5$-mediated epigenetic regulation in glioblastoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 384. DOI: 10.1038/s41419-020-2540-y.

[18] LIN F, DEGOOIJER M C, ROIG E M, *et al*. ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(10): 2703-2713. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-14-0084.

[19] LIU X, CHEN J, LI W, *et al*. Inhibition of casein kinase II by CX-4945, but not yes-associated protein (YAP) by verteporfin, enhances the antitumor efficacy of temozolomide in glioblastoma[J]. Transl Oncol, 2020, 13(1): 70-78. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.09.006.

[20] LIU B, GUO Z, DONG H, *et al*. LRIG1, human EGFR inhibitor, reverses multidrug resistance through modulation of ABCB1 and ABCG2[J]. Brain Res. 2015, 1611: 93-100. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.03.023. Epub 2015 Mar 20.

(**收稿**:2020-11-21;**修回**:2021-01-12)

(编辑 吴培红)