干扰LncRNA表达减轻非小细胞肺癌细胞对紫杉醇耐药的机制研究Δ

靳　义*,康　聪,贺　平,王丁丁,杨海龙,陈晓伟#(衡水市人民医院胸外科,河北 衡水　053000)

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2023)12-1460-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.10

摘　要　目的　研究干扰长链非编码RNA烟酰胺核苷酸转氢酶反义RNA1(LncRNA NNT-AS1)表达减轻非小细胞肺癌(NSCLC)细胞对紫杉醇(TAX)耐药的机制。**方法**　构建NSCLC TAX耐药细胞系(A549/TAX),检测正常、亲本、耐药细胞中LncRNA NNT-AS1的表达情况,并验证miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、HMGB2的靶向关系;体外培养A549/TAX细胞,观察单独干扰LncRNA NNT-AS1或同时干扰LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p对细胞中LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p、HMGB2 mRNA及其蛋白表达以及细胞活力、克隆形成、凋亡的影响;通过裸鼠成瘤实验观察干扰LncRNA NNT-AS1对肿瘤生长及肿瘤组织中miR-582-5p、HMGB2 mRNA及其蛋白表达的影响。**结果**　与正常细胞比较,LncRNA NNT-AS1在亲本、耐药细胞中均呈高表达($P<0.05$),且有递增趋势。经验证,miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、HMGB2均存在靶向关系。干扰LncRNA NNT-AS1表达后,A549/TAX细胞中LncRNA NNT-AS1、HMGB2 mRNA及其蛋白的表达水平以及细胞活力、克隆形成数均显著降低,而miR-582-5p的表达水平、细胞凋亡率均显著升高($P<0.05$);同时干扰miR-582-5p表达可使上述改变得以逆转($P<0.05$)。干扰肿瘤细胞中LncRNA NNT-AS1的表达后,荷瘤裸鼠的肿瘤体积和肿瘤质量均显著降低,miR-582-5p的表达水平显著升高,HMGB2 mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$)。**结论**　干扰LncRNA NNT-AS1的表达可靶向上调miR-582-5p的表达并下调HMGB2的表达,进而减轻NSCLC TAX化疗耐药。

关键词　长链非编码RNA烟酰胺核苷酸转氢酶反义RNA1;微RNA-582-5p;高迁移率族蛋白2;化疗耐药;紫杉醇;非小细胞肺癌

Study on mechanism of interfering with LncRNA expressing to reduce paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer cells

JIN Yi, KANG Cong, HE Ping, WANG Dingding, YANG Hailong, CHEN Xiaowei (Dept. of Thoracic Surgery, Hengshui People's Hospital, Hebei Hengshui 053000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the mechanism of interfering with long non-coding RNA nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1 (LncRNA NNT-AS1) expressing to reduce paclitaxel (TAX) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **METHODS** NSCLC TAX-resistant cell line (A549/TAX) was constructed, and the expressions of LncRNA NNT-AS1 in normal, parental, and drug-resistant cells were observed. The targeting relationship of microRNA-582-5p (miR-582-5p) with LncRNA NNT-AS1 and high mobility group box2 (HMGB2) was verified. A549/TAX cells were cultured *in vitro* to observe the effects of interfering with LncRNA NNT-AS1 alone or interfering with LncRNA NNT-AS1 and miR-582-5p on the expressions of LncRNA NNT-AS1 and miR-582-5p, the mRNA and protein expressions of HMGB2, cell viability, clone formation and apoptosis. The effects of interfering with LncRNA NNT-AS1 on tumor growth and the expression of miR-582-5p and the mRNA and protein expressions of HMGB2 in tumor tissue were observed in nude mice. **RESULTS** Compared with normal cells, LncRNA NNT-AS1 was highly expressed in parental and drug-resistant cells ($P<0.05$), showing an increasing trend. It was validated that miR-582-5p had a targeting relationship with LncRNA NNT-AS1 and HMGB2. After interfering with the expression of LncRNA NNT-AS1, the expression of LncRNA NNT-AS1 and the mRNA and protein expressions of HMGB2, cell viability and the number of cloned cells in A549/TAX cell, decreased significantly, while the expression of miR-582-5p and the apoptotic rate increased significantly ($P<0.05$); simultaneously interfering with the expression of miR-582-5p could reverse above changes ($P<0.05$). Interfering with the expression of LncRNA NNT-AS1 in tumor cell could significantly reduce tumor volume and tumor weight of nude mice bearing tumors; at the same time, the expression of miR-582-5p was up-regulated significantly and the mRNA and protein expressions of HMGB2 were down-

Δ**基金项目** 衡水市市级科技计划项目(No.2020014054Z)

＊**第一作者** 主治医师,硕士。研究方向:进展期非小细胞肺癌化疗获益相关标志物。电话:0318-2181128。E-mail:122161932@qq.com

#**通信作者** 副主任医师。研究方向:进展期非小细胞肺癌化疗获益相关标志物。电话:0318-2181128。E-mail:wcliangzi@163.com

regulated significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Interfering with the expression of LncRNA NNT-AS1 may alleviate TAX chemotherapy resistance in NSCLC through targeted up-regulation of miR-582-5p and down-regulation of HMGB2.

KEYWORDS LncRNA NNT-AS1; mRNA-582-5p; high mobility group box 2; chemotherapy resistance; paclitaxel; non-small cell lung cancer

肺癌是全球癌症患者相关死亡的主要原因。据估计，全世界每年新发肺癌病例约200万例，死亡病例约176万例，其中非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）是主要的肺癌类型，占肺癌总病例的80%以上[1]。尽管近年来以手术切除、放化疗等为主的治疗手段取得了显著进步，但NSCLC患者的5年生存率仍较低（20%～30%），其中肿瘤化疗耐药致治疗失败是患者复发率和病死率升高的主要原因之一，也是严重影响晚期肺癌患者预后的主要因素[2]。紫杉醇（taxol，TAX）作为一种天然抗癌药物，可通过多种分子途径调控肿瘤细胞增殖、凋亡等生物学行为，虽为部分NSCLC患者带来希望，但化疗耐药严重限制了该药的临床应用[3]。因此，积极阐明TAX的耐药分子机制并挖掘新的治疗靶点，对于NSCLC患者的临床治疗及预后具有重要意义。

研究表明，TAX化疗耐药涉及多种机制，以长链非编码RNA（long non-coding RNA，LncRNA）/微RNA（microRNA，miRNA）/信使RNA（messenger RNA，mRNA）相互作用较为常见[4－5]。LncRNA是一类本身不编码蛋白、长度超过200个碱基的非编码RNA分子，可从多个层面调控基因的表达，与肿瘤的发生、进展和化疗耐药密切相关，可作为人类肿瘤发生的关键调节因子和患者预后的生物标志物[6]。其中，LncRNA烟酰胺核苷酸转氢酶反义RNA1（LncRNA nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1，LncRNA NNT-AS1）作为癌因子，可在包括NSCLC在内的多种恶性肿瘤中发挥作用，不仅可通过调控下游miRNA/mRNA信号转导来影响肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭等恶性生物学行为，还可参与调控NSCLC的化疗耐药[7－9]。本课题组前期利用Starbase在线生物信息学工具（http://starbase.sysu.edu.cn）预测了与LncRNA NNT-AS1相关的下游miRNA或mRNA，发现miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、高迁移率族蛋白2（high mobility group box 2，HMGB2）均存在潜在的结合位点。有研究指出，miR-582-5p在NSCLC细胞系和患者临床标本中均呈显著下调，且其表达降低与患者总生存期缩短显著相关[10]。此外，LncRNA NNT-AS1可调节miR-582-5p/F框蛋白11（F-box protein 11，FBXO11）的信号转导，从而可促进吸烟诱导的慢性阻塞性肺疾病的发展[11]；受LncRNA RP11-301G19.1调控的miR-582-5p/HMGB2轴可通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路来调节多发性骨髓瘤细胞的增殖和凋亡[12]。有研究指出，HMGB2在恶性肿瘤细胞中表达上调，可通过影响肿瘤细胞活力等途径来促进肿瘤的发生发展和化疗耐药的发生[13]。但是，LncRNA NNT-AS1是否可通过miR-582-5p/HMGB2轴来调节NSCLC对TAX的化疗耐药尚无研究支持。为此，本研究拟基于miR-582-5p/HMGB2轴，初步探讨LncRNA NNT-AS1与TAX化疗耐药的关系及潜在机制，为临床克服TAX耐药提供新的干预靶点。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、LightCycler480 Ⅱ型定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）仪（瑞士Roche公司）、BX53型显微镜（日本Olympus公司）、Tanon 3500型凝胶成像分析系统（上海天能科技有限公司）、FACS-Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国BD公司）等。

1.2 主要药品与试剂

紫杉醇注射液（国药准字H20053001，批号18070211，规格5 mL∶30 mg）购自扬子江药业集团有限公司；LncRNA NNT-AS1小分子干扰RNA（si-LncRNA NNT-AS1）、LncRNA NNT-AS1短发卡RNA慢病毒载体（sh-LncRNA NNT-AS1）、miR-582-5p模拟物（miR-582-5p mimic）、miR-582-5p抑制物（anti-miR-582-5p）及其对应的阴性对照si-NC、sh-NC、miR-NC、anti-NC，生物素标记的miR-582-5p（Bio-miR-582-5p）及其阴性对照Bio-miR-NC，以及相关引物均由上海吉玛制药技术有限公司提供或合成；脂质体2000转染试剂（批号11668-019）、TRIzol试剂（批号15596018）、逆转录试剂盒（批号11755050）均购自美国Invitrogen公司；QuantiNova SYBR Green RT-PCR试剂盒（批号208152）购自德国Qiagen公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒（批号CDLG-4997）购自武汉纯度生物科技有限公司；RNA pull-down试剂盒（含相应裂解液、亲和磁珠等，批号20164）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；CCK-8试剂（批号CK04）购自日本Dojindo公司；RNA结合蛋白免疫沉淀（RNA binding protein immunoprecipitation，RIP）

试剂盒（含相应裂解液、磁珠等，批号17-700）购自美国Millipore公司；Annexin Ⅴ-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒（批号MA0220）购自大连美仑生物技术有限公司；兔抗人HMGB2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为ab124670、ab181602、ab6721）均购自英国Abcam公司；RPMI-1640培养液（批号31800-022）、Opti-MEM Ⅰ培养基（批号11058021）均购自美国Gibco公司。

1.3 细胞与动物

人正常肺上皮细胞系BEAS-2B、人NSCLC细胞系A549均由美国ATCC公司提供。所有细胞均接种于含1%青-链霉素双抗和10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，用0.5%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸（EDTA）消化传代（2～3 d传代1次），取对数生长期细胞进行后续实验。

12只SPF级雄性BALB/c裸鼠，7周龄，体质量20～22 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0009。本动物实验程序符合《实验动物护理和使用指南》的相关要求，并经衡水市人民医院伦理委员会批准（批准号为2020-2-026）。

2 方法

2.1 TAX耐药细胞系的建立

采用逐步增加剂量、间歇给药的方法诱导TAX耐药细胞系（A549/TAX），具体操作如下：取对数生长期的亲本A549细胞，以每孔3×10^4个、每孔1 mL接种于24孔板中，在含0.1 μg/mL TAX的培养液中培养48 h，接着更换不含TAX的培养液，待细胞稳定生长、传代后，逐步增加培养液中TAX的质量浓度（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0……5.0 μg/mL），继续培养。经过约6个月的诱导，细胞能在含5.0 μg/mL TAX的培养液中稳定生长和传代，此细胞即A549/TAX细胞[14]。

2.2 亲本细胞、耐药细胞对TAX敏感性的检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的A549和A549/TAX细胞，以每孔2×10^3个、每孔100 μL接种于96孔板中，待细胞贴壁后，加入适量TAX（最终质量浓度分别为0、1、2、4、8、16、32、64 μg/mL，质量浓度参考相关文献[15]并加以调整，每质量浓度设置3个复孔），在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养48 h；随后，每孔添加CCK-8试剂10 μL，继续培养2 h；使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度（OD）值并计算细胞存活率、TAX抑制细胞增殖的半数抑制浓度（IC_{50}）和耐药倍数。细胞存活率（%）＝经某质量浓度TAX处理细胞的OD值/经0 μg/mL TAX处理细胞的OD值×100%；耐药倍数＝耐药细胞的IC_{50}/亲本细胞的IC_{50}。

2.3 正常细胞、亲本细胞、耐药细胞中LncRNA NNT-AS1表达水平的检测

采用qRT-PCR法进行检测。取对数生长期的BEAS-2B、A549和A549/TAX细胞，以每孔2.5×10^4个、每孔1 mL接种于24孔板中，常规培养48 h。收集细胞，采用TRIzol试剂提取3种细胞的总RNA，待测定其纯度和浓度后，将其逆转录为cDNA。以上述cDNA为模板，进行PCR扩增。反应体系包括cDNA模板2 μL，上、下游引物（引物序列及产物长度见表1）各1 μL，SYBR Green Mix 10 μL，无菌ddH_2O_2 6 μL。反应条件为95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，60 ℃退火60 s，72 ℃延伸30 s，共38个循环。以GAPDH为内参，使用Roche LightCycler 480软件以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算LncRNA NNT-AS1的表达水平，结果以正常细胞为对照进行归一化处理。

表1 qRT-PCR实验的引物序列及产物长度

基因	上游引物（5′→3′）	下游引物（5′→3′）	产物长度/bp
LncRNA NNT-AS1	ACGTGCAGACAACATCTACCT	TACAACACCTTCCCGCAT	279
GAPDH	CCTGCCGTCTAGAAAAACCTG	AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT	118
HMGB2	GCCAACAGGCTCAAAGAA	CACACATTCCACACGCA	119
miR-582-5p	GCACACATTGAAGAGGACAGAC	TATTGAAGGGGGTTCTGGTG	104
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	ACGCTTCACGAATTTGCGT	125

2.4 miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、HMGB2靶向关系的验证

2.4.1 双荧光素酶报告基因实验 使用Starbase在线生物信息学工具预测miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、HMGB2的潜在结合位点。将预测的LncRNA NNT-AS1、HMGB2序列片段和突变片段分别插入到荧光素酶报告基因载体中，构建野生型载体（LncRNA NNT-AS1-WT、HMGB2-WT）和突变型载体（LncRNA NNT-AS1-MUT、HMGB2-MUT）。将所构建的野生型载体和突变型载体分别和miR-582-5p mimic或miR-NC共转染至A549/TAX细胞，48 h后，收集细胞，参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书方法使用酶标仪检测荧光素酶的活性。

2.4.2 RNA pull-down实验 将Bio-miR-582-5p和Bio-miR-NC转染至A549/TAX细胞，48 h后，收集细胞，加入RNA pull-down裂解液裂解，将裂解产物与经酵母tRNA提前包被的M280链霉素亲和磁珠于4 ℃下共孵育4 h；磁珠经洗涤后，使用TRIzol试剂提取其结合的RNA，采用qRT-PCR法检测细胞中LncRNA NNT-AS1的表达水平。具体操作参照“2.3”项，结果以Bio-miR-NC转染细胞为对照进行归一化处理。

2.4.3 RIP实验 采用RIP裂解液裂解A549/TAX细胞，将裂解产物与含有Argonaute2（Ago2）抗体或IgG抗体的磁珠于4 ℃下共孵育过夜；磁珠经洗涤后，使用

TRIzol试剂提取其结合的RNA，采用qRT-PCR法检测细胞中LncRNA NNT-AS1和miR-582-5p的表达水平。具体操作参照“2.3”项，结果以含IgG抗体的细胞为对照进行归一化处理。

2.5 体外细胞验证实验

2.5.1 细胞分组、转染及下游基因表达的检测 取对数生长期的A549/TAX细胞，将其分为si-NC组（转染si-NC）、si-LncRNA NNT-AS1组（转染si-LncRNA NNT-AS1）、si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组（共转染si-LncRNA NNT-AS1和anti-NC）、si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组（共转染si-LncRNA NNT-AS1和anti-miR-582-5p），每组设3个复孔。采用脂质体2000转染试剂（每1 μL转染试剂用Opti-MEM Ⅰ培养基50 μL稀释）分别将相应质粒（每5 μg质粒用Opti-MEM Ⅰ培养基50 μL稀释）转染至各组细胞，48 h后，收集细胞，采用qRT-PCR法检测各组细胞中LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p和HMGB2 mRNA的表达水平，以验证转染效果及LncRNA NNT-AS1对下游基因表达的影响。具体操作同“2.3”项，其中LncRNA NNT-AS1、HMGB2 mRNA以GAPDH为内参，miR-582-5p以U6为内参，结果均以si-NC组为对照进行归一化处理。

2.5.2 细胞中HMGB2蛋白表达的检测 采用Western blot法进行检测。转染48 h后，收集各组细胞，于冰上裂解后离心以提取总蛋白，采用BCA法对蛋白浓度进行定量，再对蛋白进行变性处理。取变性蛋白20 μg，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，随后转至聚偏氟乙烯膜上，以5%牛血清白蛋白室温封闭1 h；加入HMGB2、GAPDH一抗（稀释度1∶10 000），于4 ℃孵育过夜；以PBST洗涤后，加入相应二抗（稀释度1∶5 000），室温孵育30 min；以PBST洗涤后，用ECL显色，使用凝胶成像分析系统成像并使用Image J软件分析，以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）的条带灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.5.3 细胞活力的检测 采用CCK-8法进行检测。转染48 h后，收集各组细胞并以每孔2×10^3个、每孔100 μL接种至96孔板中，于37 ℃、5%CO_2下分别培养24、48、72 h后，每孔加入CCK-8试剂10 μL，孵育2 h；使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔细胞的OD值以判断其活力（OD值与细胞活力成正比）。

2.5.4 细胞克隆形成能力的检测 采用克隆形成实验进行检测。转染48 h后，收集各组细胞并以每孔800个、每孔2 mL接种至6孔板中，于37 ℃、5%CO_2下培养2周（2～3 d换液1次并观察细胞状态），当出现肉眼可见的克隆菌落时终止培养，用甲醇固定、结晶紫染色后，使用显微镜观察并记录细胞个数≥50的单克隆菌落数，即克隆形成数。

2.5.5 细胞凋亡率的检测 采用流式细胞术进行检测。转染48 h后，收集各组细胞，用PBS洗涤后以binding buffer 195 μL重悬，随后加入Annexin Ⅴ-FITC试剂5 μL和PI染色液10 μL，避光孵育15 min后，使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

2.6 裸鼠成瘤验证实验

将裸鼠适应性饲养2周后，分为sh-NC组、sh-LncRNA NNT-AS1组，每组6只。各组裸鼠分别皮下注射A549/TAX细胞悬液（已稳定转染sh-NC或sh-LncRNA NNT-AS1，细胞密度为2×10^7个/mL）200 μL[16]。注射后，于每周检测其肿瘤体积：肿瘤体积=（长×宽×宽）/2。皮下注射5周后，裸鼠经麻醉后脱臼处死，取出肿瘤组织，称定质量后，提取其总RNA和蛋白，分别采用qRT-PCR法和Western blot法检测LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p、HMGB2 mRNA及蛋白的表达水平。具体操作同“2.3”“2.5.2”项，LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p、HMGB2 mRNA的表达水平以sh-NC组为对照进行归一化处理。

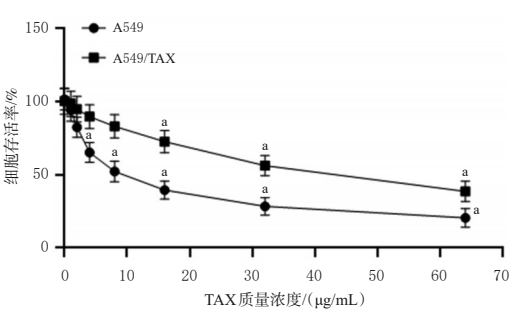
2.7 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用独立样本t检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间有差异者进一步采用SNK-q检验进行两两比较。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 亲本细胞、耐药细胞对TAX的敏感性

与0 μg/mL的TAX比较，4、8、16、32、64 μg/mL的TAX均可显著降低A549细胞的存活率（$P<0.05$），16、32、64 μg/mL的TAX均可显著降低A549/TAX细胞的存活率（$P<0.05$），详见图1。经计算，TAX对A549细胞、A549/TAX细胞的IC_{50}分别为8.75、57.63 μg/mL，耐药倍数为6.59。



a：与0 μg/mL TAX比较，$P<0.05$

图1 不同质量浓度TAX干预后A549和A549/TAX细胞的存活率（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.2 正常细胞、亲本细胞、耐药细胞中LncRNA NNT-AS1的表达水平

与正常细胞（1.01±0.12）比较，亲本A549细胞中LncRNA NNT-AS1的表达水平（1.87±0.14）显著升高（$P<0.05$）；与亲本A549细胞比较，耐药细胞A549/TAX中LncRNA NNT-AS1的表达水平（2.54±0.15）亦显著升高（$P<0.05$），提示该指标在耐药细胞中呈高表达。

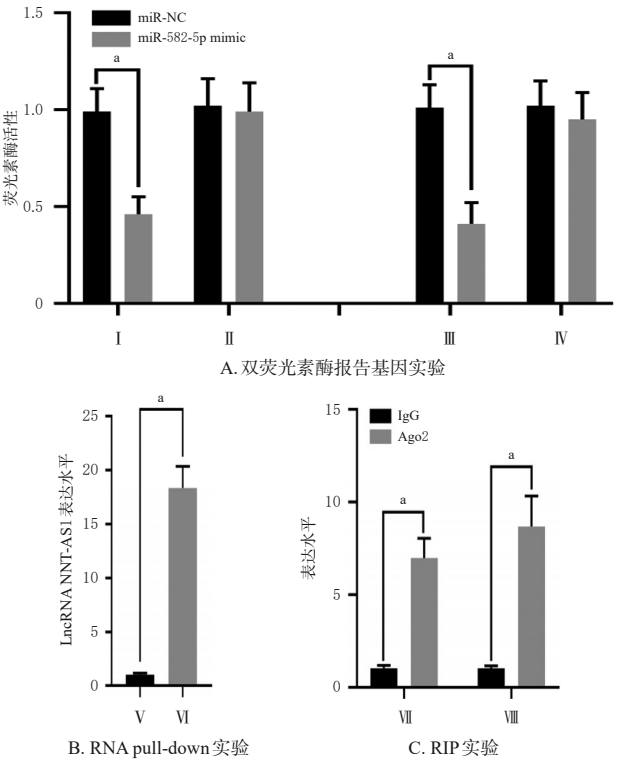
3.3 LncRNA NNT-AS1与miR-582-5p、miR-582-5p与HMGB2的靶向关系

Starbase在线生物信息学工具预测显示，miR-582-5p与LncRNA NNT-AS1、HMGB2存在靶向结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果（图2A）显示，转染LncRNA NNT-AS1-WT或HMGB2-WT后，共转染miR-582-5p mimic细胞的荧光素酶活性显著均低于共转染miR-NC细胞（$P<0.05$）；而转染LncRNA NNT-AS1-MUT或HMGB2-MUT后，共转染miR-582-5p mimic细胞的荧光素酶活性与共转染miR-NC细胞比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。RNA pull-down和RIP实验结果（图2B、2C）显示，转染Bio-miR-582-5p后，细胞中LncRNA NNT-AS1显著高于转染Bio-miR-NC细胞（$P<0.05$）；与IgG抗体富集结果比较，Ago2抗体富集所得的LncRNA NNT-AS1和miR-582-5p均显著增多（$P<0.05$），进一步验证了LncRNA NNT-AS1与miR-582-5p、miR-582-5p与HMGB2的靶向关系。

3.4 体外细胞验证实验结果

3.4.1 A549/TAX细胞转染效果及下游基因、蛋白的表达情况 与si-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1组细胞中LncRNA NNT-AS1、HMGB2 mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），miR-582-5p的表达水平显著升高（$P<0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组细胞中上述指标的差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组细胞中LncRNA NNT-AS1表达水平的差异无统计学意义（$P>0.05$），而miR-582-5p的表达水平显著降低（$P<0.05$），HMGB2 mRNA及其蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图3。

3.4.2 各组A549/TAX细胞的活力 与si-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1组细胞培养48、72 h时的活力均显著降低（$P<0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组细胞各时间点活力的差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组细胞培养48、72 h时的活力均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。



Ⅰ：LncRNA NNT-AS1-WT组；Ⅱ：LncRNA NNT-AS1-MUT组；Ⅲ：HMGB2-WT组；Ⅳ：HMGB2-MUT组；Ⅴ：Bio-miR-NC组；Ⅵ：Bio-miR-582-5p组；Ⅶ：LncRNA NNT-AS1；Ⅷ：miR-582-5p；a：组间比较，$P<0.05$

图2 LncRNA NNT-AS1与miR-582-5p、miR-582-5p与HMGB2的靶向关系

表2 各组A549/TAX细胞中LncRNA NNT-AS1、miR-582-5p、HMGB2 mRNA及蛋白的表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	LncRNA NNT-AS1	miR-582-5p	HMGB2 mRNA	HMGB2蛋白
si-NC组	1.02±0.11	1.00±0.13	1.02±0.10	0.87±0.08
si-LncRNA NNT-AS1组	0.43±0.09[a]	1.98±0.15[a]	0.45±0.07[a]	0.39±0.04[a]
si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组	0.45±0.08	1.95±0.14	0.47±0.06	0.43±0.05
si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组	0.47±0.10	1.36±0.12[b]	0.71±0.08[b]	0.74±0.07[b]

a：与si-NC组比较，$P<0.05$；b：与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，$P<0.05$

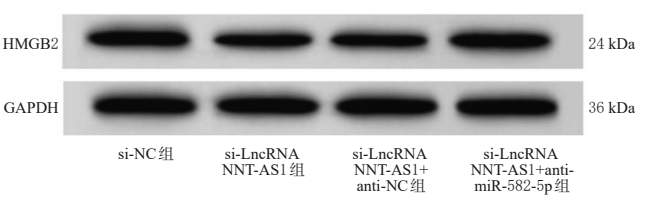


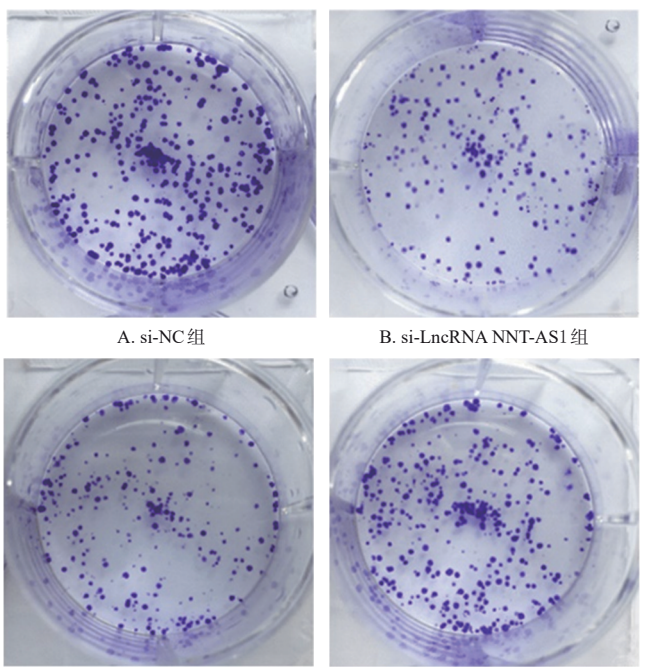
图3 各组A549/TAX细胞中HMGB2蛋白表达的电泳图

3.4.3 各组A549/TAX细胞的克隆形成能力 与si-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1组的克隆形成数显著降低（$P<0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组克隆形成数的差异无统计学意义（$P>0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组的克隆形成数显著升高（$P<0.05$）。结果见表3、图4。

表3　各组A549/TAX细胞活力、克隆形成能力和凋亡情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	细胞活力（OD值）			克隆形成数	凋亡率/%
	24 h	48 h	72 h		
si-NC组	0.29±0.04	0.54±0.05	0.78±0.06	250.23±19.56	5.16±0.92
si-LncRNA NNT-AS1组	0.26±0.04	0.34±0.04[a]	0.50±0.06[a]	116.65±14.28[a]	36.08±6.34[a]
si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组	0.27±0.05	0.36±0.05	0.52±0.05	121.87±15.24	34.27±5.89
si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组	0.28±0.06	0.51±0.06[b]	0.73±0.07[b]	238.84±18.25[b]	21.45±3.46[b]

a：与si-NC组比较，$P<0.05$；b：与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，$P<0.05$



A. si-NC组　B. si-LncRNA NNT-AS1组　C. si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组　D. si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组

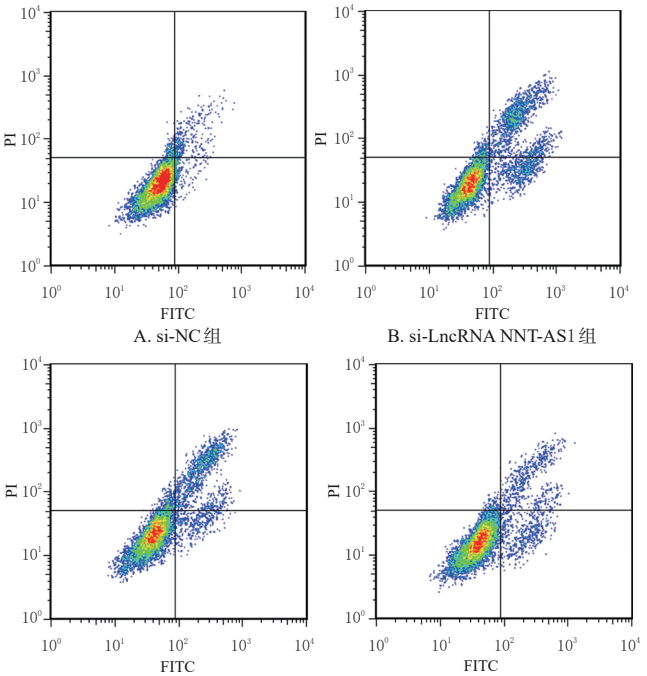
图4　各组A549/TAX细胞的克隆形成能力

3.4.4　各组A549/TAX细胞的凋亡率　与si-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1组细胞的凋亡率显著升高（$P<0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组细胞凋亡率的差异无统计学意义（$P>0.05$）；与si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组比较，si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组细胞的凋亡率显著降低（$P<0.05$）。结果见表3、图5。

3.5　裸鼠成瘤验证实验结果

3.5.1　裸鼠肿瘤生长情况　sh-LncRNA NNT-AS1组裸鼠皮下注射4、5周后的肿瘤体积和皮下注射5周后的肿瘤质量均显著低于sh-NC组（$P<0.05$）。结果见表4。

3.5.2　裸鼠肿瘤组织中miR-582-5p、HMGB2的表达情况　与sh-NC组比较，sh-LncRNA NNT-AS1组裸鼠肿瘤组织中LncRNA NNT-AS1、HMGB2 mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），而miR-582-5p的表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表5、图6。



A. si-NC组　B. si-LncRNA NNT-AS1组　C. si-LncRNA NNT-AS1+anti-NC组　D. si-LncRNA NNT-AS1+anti-miR-582-5p组

图5　各组A549/TAX细胞的凋亡情况

表4　各组裸鼠的肿瘤生长情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	肿瘤体积/mm³					肿瘤质量/g
	1周	2周	3周	4周	5周	
sh-NC组	96.42±15.60	131.18±18.34	246.28±30.15	359.35±35.08	568.45±38.60	0.89±0.16
sh-LncRNA NNT-AS1组	92.38±14.16	123.54±16.26	219.73±28.04	254.83±29.46[a]	403.35±35.97[a]	0.37±0.12[a]

a：与sh-NC组比较，$P<0.05$

表5　各组裸鼠肿瘤组织中miR-582-5p、HMGB2 mRNA及蛋白的表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	LncRNA NNT-AS1	miR-582-5p	HMGB2 mRNA	HMGB2蛋白
sh-NC组	1.01±0.13	0.99±0.12	1.02±0.10	0.97±0.07
sh-LncRNA NNT-AS1组	0.46±0.08[a]	1.78±0.14[a]	0.51±0.07[a]	0.56±0.06[a]

a：与sh-NC组比较，$P<0.05$

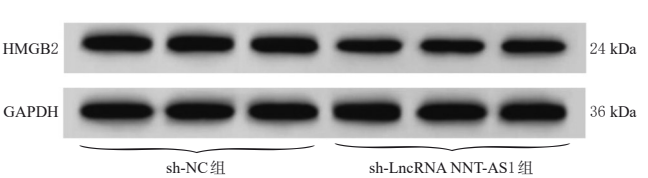


图6　裸鼠肿瘤组织中HMGB2蛋白表达的电泳图

4　讨论

目前，NSCLC在全球范围内的发病率和病死率居高不下[1]，且患者在确诊时多为晚期，需要进行全身治疗。尽管研究者近年在手术、化疗和靶向分子治疗方面取得了进展，但NSCLC患者的治疗效果仍然欠佳，改进传统的治疗方案并探究新的治疗方式势在必行[17]。以TAX为基础的组合化疗被广泛用作NSCLC的一线治疗，但患者易发生TAX化疗耐药，最终导致其肿瘤复发和不良预后[16,18]。可见，减轻TAX化疗耐药是广大临床和科研工作者面临的巨大挑战，深入探究TAX化疗耐药

的分子机制和发现新的治疗靶点是目前NSCLC相关研究的重点。

TAX化疗耐药机制复杂，涉及多因素、多途径。已有研究表明，LncRNA可通过调节多个下游信号通路来介导肿瘤细胞的TAX化疗耐药：LncRNA-PRLB可通过调节Rsf-1/核因子κB信号通路来赋予卵巢癌细胞TAX抗性[19]；LncRNA MALAT1可通过miR-497-5p/Shoc2轴来促进乳腺癌细胞TAX耐药[5]。作为LncRNA中一员，LncRNA NNT-AS1在肿瘤发生发展和化疗耐药中的作用受到越来越多的关注。有研究指出，LncRNA NNT-AS1在NSCLC组织和细胞中表达上调，其高表达与患者肿瘤分期和晚期淋巴结转移有关，并可参与调控NSCLC细胞的增殖和侵袭[20]；此外，LncRNA NNT-AS1在耐药NSCLC组织和细胞中亦呈高表达，并可促进NSCLC细胞对顺铂的耐药[9]。基于此，本研究通过构建NSCLC TAX耐药细胞，初步探讨了LncRNA NNT-AS1在TAX化疗耐药中的作用。结果显示，LncRNA NNT-AS1在BEAS-2B细胞、A549细胞、A549/TAX细胞中的表达有递增趋势，提示LncRNA NNT-AS1可能参与了NSCLC的发生和TAX化疗耐药。进一步分析发现，干扰A549/TAX细胞中LncRNA NNT-AS1的表达可降低细胞活力，减少克隆形成数，并增加细胞凋亡率，提示高表达的LncRNA NNT-AS1可促进A549/TAX细胞的增殖、凋亡，进而增强NSCLC TAX化疗耐药，但确切的分子机制尚未可知。

miRNA已被证实与肿瘤的生物学过程相关，其中miR-582-5p作为抑制肿瘤的miRNA，可通过改变转录后基因的表达来参与NSCLC细胞增殖、凋亡和侵袭等过程的调控[21]；同时，miR-582-5p能够在LncRNA的靶向调控下参与肿瘤细胞化疗耐药的发生[22]。有研究指出，HMGB2可通过影响肿瘤细胞增殖、凋亡等在肿瘤发生发展和化疗耐药中扮演重要角色[13,23]；此外，LncRNA CASC15可与miR-582-5p结合，从而调节HMGB2的表达，最终影响结直肠癌的进展[24]。但miR-582-5p/HMGB2轴在NSCLC TAX化疗耐药中的作用尚未见报道。本研究结果显示，miR-582-5p与HMGB2存在靶向结合位点，且双荧光素酶报告基因实验验证了二者在A549/TAX细胞中存在靶向关系；与此同时，A549/TAX细胞中miR-582-5p表达水平的变化趋势与HMGB2 mRNA及其蛋白表达水平的变化趋势相反，提示miR-582-5p可能通过负靶向调控HMGB2的表达来参与TAX化疗耐药，但具体分子机制尚不清楚。

有研究表明，LncRNA-NNT-AS1可通过靶向miR-582-5p/*zeste*基因增强子同源物2轴来促进胶质瘤的进展[25]，亦可通过靶向miR-582-5p/FBXO11轴来调控慢性阻塞性肺疾病的细胞增殖、凋亡、炎症和气道重塑[11]。但LncRNA-NNT-AS1是否能通过靶向miR-582-5p/HMGB2轴来影响NSCLC TAX化疗耐药有待进一步验证。本研究结果显示，A549/TAX细胞中LncRNA NNT-AS1与miR-582-5p存在直接靶向作用关系；干扰A549/TAX细胞中LncRNA NNT-AS1的表达可上调miR-582-5p的表达并下调HMGB2 mRNA及其蛋白的表达；同时干扰miR-582-5p和LncRNA NNT-AS1的表达后，A549/TAX细胞中HMGB2表达、细胞活力、克隆形成数、细胞凋亡率因LncRNA NNT-AS1表达受阻而受到的抑制作用得以逆转。上述研究结果表明，LncRNA NNT-AS1可能通过靶向miR-582-5p/HMGB2轴来参与调控A549/TAX细胞的增殖、凋亡。另外，裸鼠成瘤实验显示，干扰裸鼠肿瘤组织中LncRNA NNT-AS1的表达可缩小其肿瘤体积并减轻肿瘤质量，同时上调miR-582-5p的表达并下调HMGB2 mRNA及其蛋白的表达，进一步证实了LncRNA NNT-AS1对肿瘤生长和miR-582-5p/HMGB2轴的调控作用。

综上所述，干扰LncRNA NNT-AS1的表达可靶向上调miR-582-5p的表达并下调HMGB2的表达，进而减轻NSCLC TAX化疗耐药，为临床克服TAX化疗耐药提供了新的干预靶点。但本研究存在如下局限性：(1)仅初步观察了NSCLC TAX耐药细胞的增殖、凋亡能力，其迁移和侵袭等生物学行为的变化还有待进一步研究；(2)miR-582-5p/HMGB2轴在NSCLC TAX耐药中的作用还有待补充体外细胞实验进一步验证；(3)仅使用了1种耐药细胞系；(4)动物实验部分相对薄弱，且并未加入TAX进行比对。针对以上不足，本课题组将在后续研究中逐一完善。

参考文献

[1] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.

[2] MIN H Y, LEE H Y. Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. Arch Pharm Res, 2021, 44(2): 146-164.

[3] KANG W B, JI Y H, CHENG Y. Van der Waals force-driven indomethacin-ss-paclitaxel nanodrugs for reversing multidrug resistance and enhancing NSCLC therapy[J]. Int J Pharm, 2021, 603: 120691.

[4] LI P P, LI R G, HUANG Y Q, et al. LncRNA OTUD6B-AS1 promotes paclitaxel resistance in triple negative breast cancer by regulation of miR-26a-5p/MTDH pathway-mediated autophagy and genomic instability[J].

Aging，2021，13(21)：24171-24191.
[5] SHI C，REN S J，ZHAO X D，et al. lncRNA MALAT1 regulates the resistance of breast cancer cells to paclitaxel via the miR-497-5p/SHOC2 axis[J]. Pharmacogenomics，2022，23(18)：973-985.
[6] TANIUE K，AKIMITSU N. The functions and unique features of LncRNAs in cancer development and tumorigenesis[J]. Int J Mol Sci，2021，22(2)：632.
[7] HE W L，ZHANG Y Y，XIA S L. LncRNA NNT-AS1 promotes non-small cell lung cancer progression through regulating miR-22-3p/YAP1 axis[J]. Thorac Cancer，2020，11(3)：549-560.
[8] 张欣萍，史天云，徐方方，等. LncRNA NNT-AS1通过靶向miR-496调控卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭的分子机制[J]. 中国老年学杂志，2021，41(5)：1071-1075.
[9] CAI Y，DONG Z Y，WANG J Y. LncRNA NNT-AS1 is a major mediator of cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer through MAPK/Slug pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22(15)：4879-4887.
[10] WANG L L，ZHANG M. miR-582-5p is a potential prognostic marker in human non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting MAP3K2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22(22)：7760-7767.
[11] MEI J J，ZHANG Y，LU S S，et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 regulates proliferation，apoptosis，inflammation and airway remodeling of chronic obstructive pulmonary disease via targeting miR-582-5p/FBXO11 axis[J]. Biomedecine Pharmacother，2020，129：110326.
[12] WANG F M，LUO Y，ZHANG L，et al. The LncRNA RP11-301G19.1/miR-582-5p/HMGB2 axis modulates the proliferation and apoptosis of multiple myeloma cancer cells via the PI3K/AKT signalling pathway[J]. Cancer Gene Ther，2022，29(3/4)：292-303.
[13] CÁMARA-QUÍLEZ M，BARREIRO-ALONSO A，VIZOSO-VÁZQUEZ Á，et al. The HMGB1-2 ovarian cancer interactome：the role of HMGB proteins and their interacting partners MIEN1 and NOP53 in ovary cancer and drug-response[J]. Cancers，2020，12(9)：2435.
[14] 张汀荣，陆向东，张瑶，等. CTEN通过TGF-β1促进非小细胞肺癌细胞紫杉醇耐药的作用及机制研究[J]. 现代肿瘤医学，2021，29(12)：2035-2040.
[15] YANG T，LI H，CHEN T J，et al. LncRNA MALAT1 depressed chemo-sensitivity of NSCLC cells through directly functioning on miR-197-3p/p120 catenin axis[J]. Mol Cells，2019，42(3)：270-283.
[16] NI L W，XU J H，ZHAO F L，et al. miR-221-3p-mediated downregulation of MDM2 reverses the paclitaxel resistance of non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Eur J Pharmacol，2021，899：174054.
[17] SINGH T，FATEHI HASSANABAD M，FATEHI HASSANABAD A. Non-small cell lung cancer：emerging molecular targeted and immunotherapeutic agents[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2021，1876(2)：188636.
[18] LIU Z J，LIN H M，GAN Y，et al. P16 methylation leads to paclitaxel resistance of advanced non-small cell lung cancer[J]. J Cancer，2019，10(7)：1726-1733.
[19] ZHAO Y，HONG L. lncRNA-PRLB confers paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating RSF1/NF-κB signaling pathway[J]. Cancer Biother Radiopharm，2021，36(2)：202-210.
[20] SHEN Q，JIANG Y. LncRNA NNT-AS1 promotes the proliferation，and invasion of lung cancer cells via regulating miR-129-5p expression[J]. Biomed Pharmacother，2018，105：176-181.
[21] ZHU B W，MITHEERA V，FINCH-EDMONDSON M，et al. miR-582-5p is a tumor suppressor microRNA targeting the hippo-YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. Cancers，2021，13(4)：756.
[22] HU Y F，SU Y N，LEI X，et al. LINC00641/miR-582-5p mediate oxaliplatin resistance by activating autophagy in gastric adenocarcinoma[J]. Sci Rep，2020，10(1)：14981.
[23] WANG W M，LI L，ZHAO L. LINC00184 plays an oncogenic role in non-small cell lung cancer via regulation of the miR-524-5p/HMGB2 axis[J]. J Cell Mol Med，2021，25(21)：9927-9938.
[24] LIANG C，WANG J，LIU A H，et al. Tumor promoting long non-coding RNA CASC15 affects HMGB2 expression by sponging miR-582-5p in colorectal cancer[J]. J Gene Med，2022，24(6)：e3308.
[25] PAN T，XUE M. LncRNA-NNT-AS1 contributes to the progression of glioma by miR-582-5p/EZH2 axis[J]. Cytotechnology，2021，73(3)：473-482.

（收稿日期：2022-11-12　修回日期：2023-04-03）
（编辑：张元媛）