

- Res, 2015, 100:266 – 270.
- [21] TAN C, HU W, HE Y, et al. Cytokine – mediated therapeutic resistance in breast cancer [J]. *Cytokine*, 2018, 108:151 – 159.
- [22] CHUNG CW, COOKE RM, PROUDFOOT AE, et al. The three – dimensional solution structure of RANTES [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(29):9307 – 9314.
- [23] WANG X, WATSON C, SHARP JS, et al. Oligomeric structure of the chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS data [J]. *Structure*, 2011, 19(8):1138 – 1148.
- [24] HUANG B, WANG H, ZHENG Y, et al. Structure – based design and development of chemical probes targeting putative MOR – CCR5 heterodimers to inhibit opioid exacerbated HIV – 1 infectivity [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(11):7702 – 7723.
- [25] TAMAMIS P, FLOUDAS CA. Elucidating a key anti – HIV – 1 and cancer – associated axis; the structure of CCL5 (Rantes) in complex with CCR5 [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:5447.

(编校: 简玥)

lncRNA MEG3 调控 NLRP3/caspase – 1/GSDMD 通路影响三阴性乳腺癌对紫杉醇的敏感性

于冰¹, 杨旭², 陈之梦², 雷萌²

lncRNA MEG3 regulates the NLRP3/caspase – 1/GSDMD pathway to affect the sensitivity of triple – negative breast cancer to paclitaxel

YU Bing¹, YANG Xu², CHEN Zhimeng², LEI Meng²¹Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China; ²College of Science, Nanjing Forestry University, Jiangsu Nanjing 210037, China.

【Abstract】 Objective: To explore the effect of long non – coding RNA (lncRNA) maternally expressed gene 3 (MEG3) on the sensitivity of triple – negative breast cancer (TNBC) to paclitaxel (PTX) by regulating the NLR family, Pyrin domain containing protein 3 (NLRP3)/cysteine specific proteinase 1 (caspase – 1)/gasdermin D (GSDMD) pathway. **Methods:** TNBC drug – resistant cells MDA – MB – 231/R were induced by gradually increasing the dose of PTX intermittent action method, and qRT – PCR was used to detect the expression of lncRNA MEG3. MDA – MB – 231 cells were divided into control group (untransfected + PTX), Vector group (empty vector + PTX), pcDNA3.1 – MEG3 group (pcDNA3.1 – MEG3 expression vector + PTX), pcDNA3.1 – MEG3 + BAY11 – 7082 group (pcDNA3.1 – MEG3 expression vector + PTX + 5 μmol/L NLRP3 inhibitor BAY11 – 7082). qRT – PCR was used to detect the expression of lncRNA MEG3 after transfection. CCK – 8 method was used to detect the proliferation of MDA – MB – 231 cells. The pyroptosis of MDA – MB – 231 cells was observed by immunofluorescence staining and scanning electron microscope (SEM). Western blot was used to detect the protein expression of NLRP3/caspase – 1/GSDMD pathway in MDA – MB – 231 cells. In vivo tumorigenic assay was used to detect tumor mass. **Results:** Compared with MDA – MB – 231 cells, the expression level of lncRNA MEG3 in MDA – MB – 231/R cells was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cell proliferation inhibition rate, number of GSDMD – N⁺ cells, cell pyroptosis, cell apoptosis rate and the expression level of NLRP3, cleaved – caspase 1/caspase – 1, GSDMD – N/GSDMD proteins in the pcDNA3.1 – MEG3 group increased significantly, and IC₅₀, tumor mass reduced significantly ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA3.1 – MEG3 group, the cell proliferation inhibition rate, number of GSDMD – N⁺ cells, cell pyroptosis, cell apoptosis rate and the expression level of NLRP3, cleaved – caspase 1/caspase – 1, GSDMD – N/GSDMD proteins in the pcDNA3.1 – MEG3 + BAY11 – 7082 group reduced significantly,

【收稿日期】 2022 – 04 – 20 【修回日期】 2022 – 05 – 30

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (编号:21877061)

【作者单位】 ¹国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022²南京林业大学理学院, 江苏 南京 210037

【作者简介】 于冰 (1973—), 男, 北京人, 副研究员, 博士, 主要从事药理毒理研究及药品技术审评工作。E – mail: yu32422021@126.com

【通讯作者】 雷萌 (1978—), 女, 河南郑州人, 教授, 博士, 主要从事靶向药物设计、合成、生物活性及体内递送系统研究。E – mail: hk – lm@163.com

and IC_{50} , tumor mass increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Up-regulating the expression of lncRNA MEG3 can promote the pyroptosis of MDA-MB-231 cells by activating the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway, thereby increasing the sensitivity of TNBC to PTX.

【Key words】 maternally expressed gene 3, NLR family, Pyrin domain containing protein 3/cysteinyl aspartate specific proteinase 1/gasdermin D, triple-negative breast cancer, paclitaxel, sensitivity

Modern Oncology 2023, 31(04):0597-0602

【摘要】 目的:探究长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)母系表达基因 3(maternally expressed gene 3, MEG3)调控含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLR family, Pyrin domain containing protein 3, NLRP3)/含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase 1, caspase-1)/消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)通路对三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)对紫杉醇(paclitaxel, PTX)敏感性的影响。方法:通过逐渐增加 PTX 剂量间歇作用的方法诱导 TNBC 耐药细胞 MDA-MB-231/R, qRT-PCR 检测 lncRNA MEG3 表达;将 MDA-MB-231 细胞分为对照组(未转染+PTX)、Vector 组(空载体+PTX)、pcDNA3.1-MEG3 组(pcDNA3.1-MEG3 表达载体+PTX)、pcDNA3.1-MEG3+BAY11-7082 组(pcDNA3.1-MEG3 表达载体+PTX+5 $\mu\text{mol/L}$ NLRP3 抑制剂 BAY11-7082), qRT-PCR 检测转染后 lncRNA MEG3 表达;CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖情况;通过免疫荧光染色和扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察 MDA-MB-231 细胞焦亡情况;Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞中 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路蛋白表达;体内成瘤实验检测肿瘤质量。结果:与 MDA-MB-231 细胞相比,MDA-MB-231/R 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平显著降低($P < 0.05$);与对照组相比,pcDNA3.1-MEG3 组细胞增殖抑制率、GSDMD-N⁺细胞数量、细胞焦亡、细胞凋亡率及 NLRP3、cleaved-caspase 1/caspase-1、GSDMD-N/GSDMD 表达水平显著增加, IC_{50} 、肿瘤质量显著降低($P < 0.05$);与 pcDNA3.1-MEG3 组相比,pcDNA3.1-MEG3+BAY11-7082 组细胞增殖抑制率、GSDMD-N⁺细胞数量、细胞焦亡、细胞凋亡率及 NLRP3、cleaved-caspase 1/caspase-1、GSDMD-N/GSDMD 表达水平显著降低, IC_{50} 、肿瘤质量显著增加($P < 0.05$)。结论:上调 lncRNA MEG3 表达可通过激活 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路,促进 MDA-MB-231 细胞焦亡,以此增加 TNBC 对 PTX 的敏感性。

【关键词】 母系表达基因 3;含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3/含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶/消皮素 D;三阴性乳腺癌;紫杉醇;敏感性

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.04.002

【文章编号】 1672-4992-(2023)04-0597-06

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)作为一种具有高度侵袭性的恶性肿瘤,表现为雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体-2(human epithelial growth factor receptor-2, HER-2)的表达缺失,由于 TNBC 特殊的分子表达类型,造成其对分子靶向治疗及激素治疗无效^[1-3]。化疗至今仍是 TNBC 治疗的主要手段,但长期使用紫杉醇(paclitaxel, PTX)等化疗药物会使肿瘤细胞产生耐药性,致使治疗失败,严重影响 TNBC 患者的生存^[2,4],因此有必要寻找增加化疗药物敏感性的方法。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)被定义为无编码能力且长度大于 200 nt 的 RNA 转录本,其参与细胞多种生物学过程,而近几年,多项研究证明其在肿瘤化疗耐药性中具有重要作用^[4-5]。母系表达基因 3(maternally expressed gene 3, MEG3)作为一种 lncRNA 已被发现在 TNBC 细胞(MDA-MB-231)中低表达,而激活其表达可通过促进含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLR family, Pyrin domain containing protein 3, NLRP3)/含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase 1, caspase-1)/消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)通路来诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡,从而发挥抗癌作用^[6],但关于其调控该通路在 TNBC PTX 耐药性中的研究鲜有报道,因此本研究以期通过对其探究,为 TNBC PTX 耐药性的克服提供新的潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 动物

本实验动物为从昆明医科大学购买的 20 只 SPF 级 Balb/c 裸鼠,体重 18~22 g[许可证:SCXK(滇)K2020-0004],动物实验获得本院动物伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器

TNBC 细胞系(MDA-MB-231)、RPMI-1640 培养基(CL-0150,PM150110B,武汉普诺赛生命科技有限公司);紫杉醇(国药准字 H20067535,福建南方制药股份有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海锐赛生物技术有限公司);LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent(上海玉博生物科技有限公司);蛋白提取试剂盒(北京康瑞纳生物科技有限公司);BCA 蛋白检测试剂盒(北京雅安达生物技术有限公司);Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP)、兔抗 NLRP3/GSDMD、GSDMD-N 抗体、荧光二抗(Abcam);CCK-8 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗 caspase-1、 β -actin 抗体(Cell Signaling Technology);实时荧光定量 PCR 检测系统 Gentier 48E/48R(西安天隆科技有限公司);流式细胞仪(上海然哲仪器设备有限公司);QuickGel6200 凝胶成像系统[莫纳(苏州)生物科技有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 MDA-MB-231 细胞培养 将 MDA-MB-231 细胞接种到 RPMI-1640 培养基(含有 10% 的胎牛血清)中后

置于细胞培养箱(37 ℃、5% CO₂)中培养至融合度约80%。

1.3.2 TNBC 耐药细胞系建立 将对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于培养瓶中培养24 h后,加入0.1 μg/mL PTX培养48 h后弃培养液,用不含PTX的培养液培养细胞至稳定生长后进行传代,继续使用含0.1 μg/mL PTX的培养液培养,如此反复三次后更换成含0.2 μg/mL PTX的培养液,依次递增浓度,直至细胞可于含3 μg/mL PTX的培养液中稳定生长及传代,即得TNBC耐药细胞MDA-MB-231/R^[2]。

1.3.3 qRT-PCR 检测 MDA-MB-231/R 及 各 组 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA MEG3 表达 Trizol 法提取 MDA-MB-231/R 及 各 组 MDA-MB-231 细胞总 RNA,经 浓度 及 纯 度 鉴 定 后 反 转 录 为 cDNA,以 其 为 模 板,进 行 qRT-PCR 检测(设5个复孔),以 GAPDH 为内参(引物序列如表1所示), $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 lncRNA MEG3 表达。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

Gene	Upstream primer (5'-3')	Downstream primer (5'-3')
lncRNA MEG3	GAGAAATGCAGCCGAGAG	CCCATTACTGTCCCAAGT
GAPDH	TGTTTCTCGTCCCCTAGA	GATGCCAACATCTCCACTTTC

1.3.4 分组及 MDA-MB-231 细胞转染 将 MDA-MB-231 细胞(5×10^5 个/孔)接种至6孔板(设5个复孔)中培养,待贴壁后使用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒将终浓度为5 nmol/L 的空载体及 pcDNA3.1-MEG3 分别转至 MDA-MB-231 细胞中,作为 Vector 组和 pcDNA3.1-MEG3 组,培养48 h,检测 lncRNA MEG3 表达。

1.3.5 CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖 将各组转染后的 MDA-MB-231 细胞接种到96孔板(8×10^3 个/孔,设5个复孔)中培养24 h后,分为对照组(未转染+PTX)、Vector 组(空载体+PTX)、pcDNA3.1-MEG3 组(pcDNA3.1-MEG3 表达载体+PTX)、pcDNA3.1-MEG3+BAY11-7082 组(pcDNA3.1-MEG3 表达载体+PTX+5 μmol/L NLRP3 抑制剂 BAY11-7082^[7]),各组分别添加200 μL 含1、3、6、12、24 μg/mL PTX 的培养基,培养48 h后添加10 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养2 h,使用酶标仪在450 nm 波长处测定其光密度(optical density, OD)值,计算 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率。细胞的增殖抑制率(%) = [(对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] × 100%。

1.3.6 细胞焦亡情况检测 以对照组 IC₅₀ 的 PTX 浓度处理各组细胞,待各组细胞爬片后 PBS 清洗,经20 min 多聚甲醛(4%)固定及25 min 山羊血清封闭后,GSDMD-N-抗(1:200)孵育过夜,避光孵育 Cy3 标记的荧光二抗(1:500)45 min;封片(含抗荧光猝灭剂的封片液),荧光显微镜下分析。将 PBS 清洗后的玻片依次进行戊二醛(3%、2 h)、锇酸(1%/1 h)固定、脱水、干燥,置入真空镀膜仪中喷镀,扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)下观察。

1.3.7 Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞中 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路蛋白表达 收集各组细胞于EP管中,添加 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白,并使用 BCA 法进行定量分析;取40 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋

白分离后转至0.22 μm PVDF 膜,1 h 脱脂奶粉(5%)封闭,4 ℃ 冰箱中过夜孵育兔抗 NLRP3、caspase-1、β-actin、GSDMD、GSDMD-N、cleaved-caspase 1 抗体(1:1 000),孵育2 h HRP 所标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),ECL 显色,凝胶成像仪观察,Quantity One 软件系统分析各条带的灰度值,计算 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白含量(重复5次)。

1.3.8 体内成瘤实验 将 Balb/c 裸鼠随机分为(5只/组)对照组、Vector 组、pcDNA3.1-MEG3 组、pcDNA3.1-MEG3+BAY11-7082 组;将 Vector 及 pcDNA3.1-MEG3 重组质粒转入 MDA-MB-231 细胞后进行扩大培养,嘌呤霉素筛选出高纯度转染细胞后进行稳定传代,通过 RT-PCR 法扩增 MEG3 全长序列,18S rRNA 为内参,鉴定阳性克隆,将所得到的稳定转染细胞进行相应 PTX 及 BAY11-7082 48 h 处理后,注射(0.1 mL, 1×10^7 个/mL)至裸鼠左侧腋窝外侧皮下,28 d 后处死,取肿瘤组织并称质量(每组重复5个)。

1.4 统计学方法

SPSS 20.0 软件统计分析数据,并表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间比较行 one-way ANOVA,进一步两两比较行 SNK-q, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA MEG3 在 MDA-MB-231 细胞及 MDA-MB-231/R 细胞中表达水平比较

与 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平(1.01 ± 0.02)相比,MDA-MB-231/R 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平(0.36 ± 0.05)显著降低($t = 26.990, P < 0.05$),见图1。

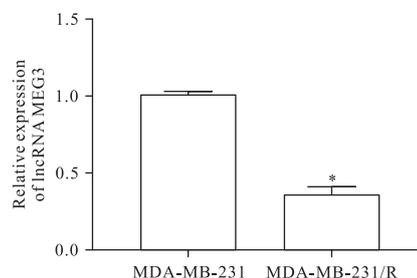


图1 lncRNA MEG3 在 MDA-MB-231 细胞及 MDA-MB-231/R 细胞中表达水平比较

与 MDA-MB-231 细胞相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.1 Comparison of expression levels of lncRNA MEG3 in MDA-MB-231 cells and MDA-MB-231/R cells

Compared with MDA-MB-231 cells, * $P < 0.05$.

2.2 各组 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平比较

与对照组中 lncRNA MEG3 表达水平(1.01 ± 0.02)相比,Vector 组 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平(1.00 ± 0.04)无显著变化($q = 0.113, P = 0.997$),pcDNA3.1-MEG3 组中 lncRNA MEG3 表达水平(2.31 ± 0.34)显著增加($q = 14.682, P < 0.05$),见图2。

2.3 各组 MDA-MB-231 细胞增殖情况比较

与对照组相比,Vector 组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率无显著变化($P > 0.05$),pcDNA3.1-MEG3 组细胞增殖抑制率显著增加($P < 0.05$);与 pcDNA3.1-MEG3 组相比,

pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组细胞增殖抑制率显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3。与对照组相比, Vector 组 IC_{50} 无显著变化 [$(14.32 \pm 1.50) \mu\text{g/mL}$ vs $(14.05 \pm 1.37) \mu\text{g/mL}$] ($P > 0.05$), pcDNA3.1 - MEG3 组 IC_{50} 显著降低 [$(14.32 \pm 1.50) \mu\text{g/mL}$ vs $(7.65 \pm 1.18) \mu\text{g/mL}$] ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1 - MEG3 组相比, pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组 IC_{50} 显著增加 [$(7.65 \pm 1.18) \mu\text{g/mL}$ vs $(11.57 \pm 1.68) \mu\text{g/mL}$] ($P < 0.05$)。

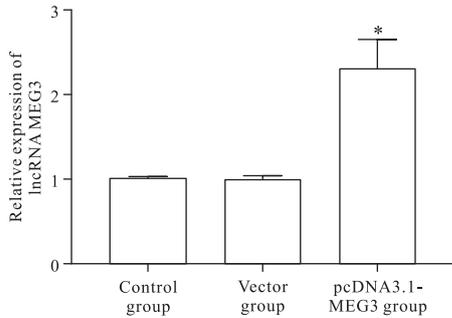


图2 各组 MDA - MB - 231 细胞中 lncRNA MEG3 表达水平比较
与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.2 Comparison of lncRNA MEG3 expression levels in MDA - MB - 231 cells in each group
Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.4 各组 MDA - MB - 231 细胞焦亡情况比较

与对照组相比, Vector 组 GSDMD - N⁺ 细胞数量无显著变化 ($P > 0.05$), pcDNA3.1 - MEG3 组 GSDMD - N⁺ 细胞数量显著增加 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1 - MEG3 组比较, pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组 GSDMD - N⁺ 细胞数量显著减少 ($P < 0.05$)。SEM 结果显示, 对照组及 Vector 组 MDA - MB - 231 细胞呈边界规则的圆球形, pcDNA3.1 - MEG3 组 MDA - MB - 231 细胞出现肿胀, 边界呈现不规则; 与 pcDNA3.1 - MEG3 组比较, pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组肿胀减轻 (图 4 - 5)。

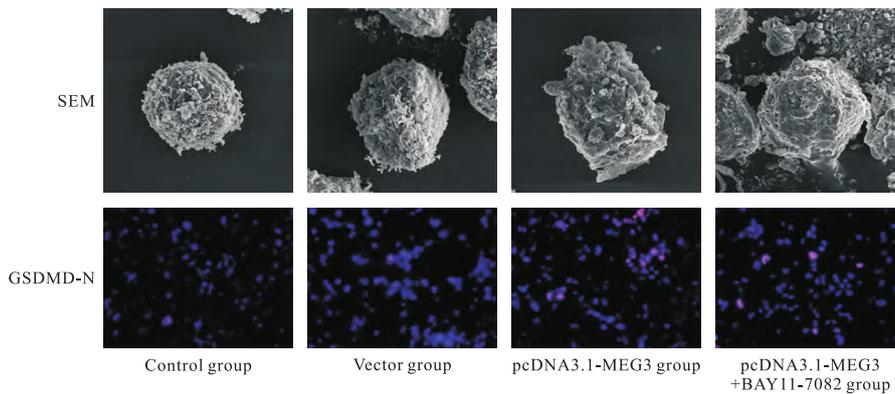


图4 免疫荧光及 SEM 观察细胞焦亡 (GSDMD - N: $\times 200$, SEM: $\times 5000$)

Fig.4 Immunofluorescence and SEM observation of cell pyroptosis (GSDMD - N: $\times 200$, SEM: $\times 5000$)

3 讨论

TNBC 约占乳腺癌的 20%, 其与其他乳腺癌亚型相比, 具有更高的组织学分级, 更强的侵袭性, 内脏转移及局部复发的风险更大^[8]。PTX 是治疗 TNBC 过程中常见的化疗药

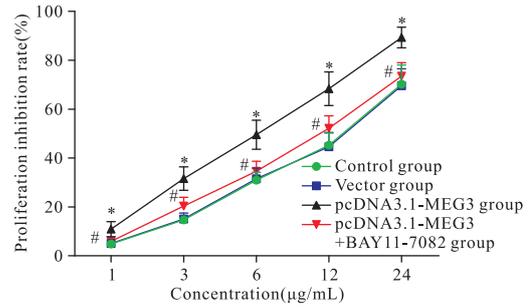


图3 各组 MDA - MB - 231 细胞增殖抑制率比较

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 pcDNA3.1 - MEG3 组相比, # $P < 0.05$ 。

Fig.3 Comparison of proliferation inhibition rate of MDA - MB - 231 cells in each group

Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with pcDNA3.1 - MEG3 group, # $P < 0.05$.

2.5 各组 MDA - MB - 231 细胞中 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 通路蛋白表达水平比较

与对照组相比, Vector 组 MDA - MB - 231 细胞中 NLRP3、cleaved - caspase 1/caspase - 1、GSDMD - N/GSDMD 表达无显著变化 ($P > 0.05$), pcDNA3.1 - MEG3 组中 NLRP3、cleaved - caspase 1/caspase - 1、GSDMD - N/GSDMD 表达显著增加 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1 - MEG3 组相比, pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组中 NLRP3、cleaved - caspase 1/caspase - 1、GSDMD - N/GSDMD 表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 6 - 7。

2.6 各组裸鼠体内肿瘤质量比较

与对照组裸鼠体内肿瘤质量 [$(0.82 \pm 0.06) \text{g}$] 相比, Vector 组肿瘤质量 [$(0.84 \pm 0.08) \text{g}$] 无显著变化 ($P > 0.05$), pcDNA3.1 - MEG3 组肿瘤质量 [$(0.35 \pm 0.04) \text{g}$] 显著减小 ($P < 0.05$); 与 pcDNA3.1 - MEG3 组相比, pcDNA3.1 - MEG3 + BAY11 - 7082 组肿瘤质量 [$(0.54 \pm 0.07) \text{g}$] 显著增加 ($P < 0.05$), 见图 8。

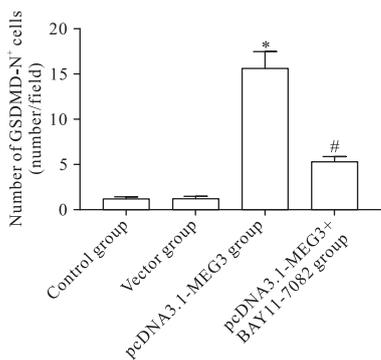


图5 各组MDA-MB-231细胞焦亡情况比较

与对照组相比, *P<0.05;与pcDNA3.1-MEG3组相比,#P<0.05。

Fig. 5 Comparison of pyroptosis of MDA-MB-231 cells in each group Compared with the control group, *P<0.05. Compared with pcDNA3.1-MEG3 group, #P<0.05.

lncRNA是细胞多种生物学功能的重要参与者,其已被发现参与癌症的发生^[12]。lncRNA MEG3是表达于人体正常组织中的一种肿瘤抑制因子,可通过调控多种信号通路在癌细胞中发挥抗增殖作用。研究发现,lncRNA MEG3在宫颈

癌、乳腺癌等多种类型肿瘤中表达缺失,并且其缺失与癌症患者预后不良有关,可作为癌症进程及患者预后的潜在预测生物标志物^[13]。lncRNA MEG3可通过抑制TNBC细胞(MCF-7)核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)通路激活来诱导细胞凋亡^[14]。lncRNA-MEG3过表达可通过抑制信号传导及转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)信号通路来降低胃癌细胞(BGC823)活力,诱导其凋亡,并增加BGC823细胞对顺铂的敏感性^[15]。lncRNA MEG3高表达可阻碍MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和转移,抑制其甲基化可提高细胞对药物治疗的敏感性^[16]。lncRNA MEG3过表达可通过抑制miR-4513/PBLD轴促进MDA-MB-231细胞凋亡,抑制细胞增殖及侵袭,降低PTX的IC₅₀^[17]。本研究发现,lncRNA MEG3在TNBC耐药细胞系MDA-MB-231/R细胞中表达显著降低,其过表达可显著增加MDA-MB-231细胞增殖抑制率,降低PTX的IC₅₀及肿瘤质量,与前人研究结果相似^[17],该结果表明,lncRNA MEG3过表达可有效抑制MDA-MB-231细胞对PTX的耐药性,增加敏感性,具有作为克服TNBC耐药性潜在靶点的可能。

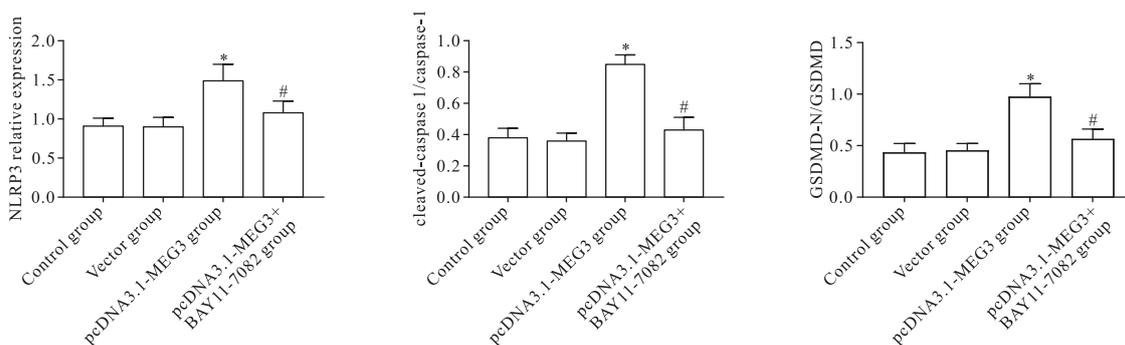


图6 各组MDA-MB-231细胞中NLRP3/caspase-1/GSDMD通路蛋白表达水平比较

与对照组相比, *P<0.05;与pcDNA3.1-MEG3组相比,#P<0.05。

Fig. 6 Comparison of NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway protein expression levels of MDA-MB-231 cells in each group Compared with the control group, *P<0.05. Compared with pcDNA3.1-MEG3 group, #P<0.05.

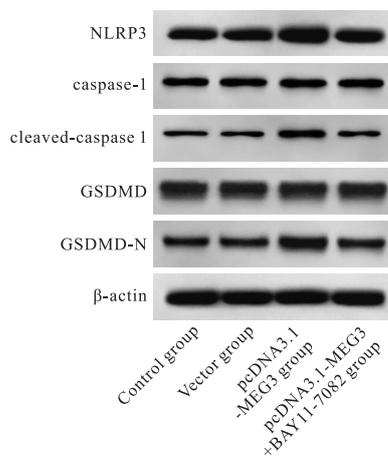


图7 Western blot检测各组MDA-MB-231细胞中NLRP3/caspase-1/GSDMD通路蛋白表达

Fig. 7 NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway protein expression of MDA-MB-231 cells in each group by Western blot

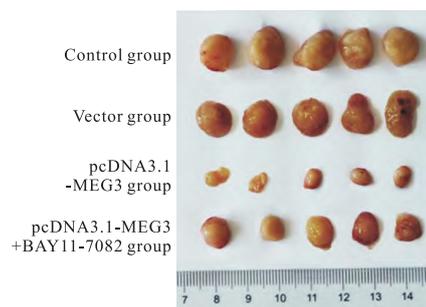


图8 各组裸鼠体内肿瘤大小比较

Fig. 8 Comparison of tumor size in nude mice of each group

NLRP3/caspase-1/GSDMD通路是一个焦亡相关通路,NLRP3可与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)相结合,募集caspase-1形成NLRP3炎症小体,剪切caspase-1并将其活化,然后切开GSDMD释放其N-末端片段,进而在胞膜上打孔,使细胞破裂^[18-19]。GSDMD作为gasdermin基因家族成

员,是细胞焦亡的[18]。化疗药物通过诱导细胞程序性死亡及抑制细胞增殖来起到抗癌功效。近几年的研究显示,顺铂、PTX 等化疗药物可通过诱导癌细胞焦亡来发挥其抗肿瘤作用[6,20-21]。食管鳞癌细胞中包含 DEP 域的与哺乳类动物雷帕霉素靶蛋白相互作用的蛋白(DEP-domain containing mTOR-interacting protein, DEPTOR)过表达可通过激活 caspase-1 所介导的细胞焦亡来增加细胞对顺铂的敏感性[20]。顺铂可通过激活 MDA-MB-231 细胞中 MEG3/NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路来促进细胞焦亡,以此发挥抗肿瘤作用[6]。本研究发现,lncRNA MEG3 过表达可显著增加 GSDMD-N⁺ 细胞数量、细胞焦亡及 NLRP3、cleaved-caspase 1/caspase-1、GSDMD-N/GSDMD 表达水平,该结果表明,lncRNA MEG3 过表达可有效激活 MDA-MB-231 细胞中 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路,促进细胞焦亡。本研究还发现,NLRP3 抑制剂可逆转 lncRNA MEG3 过表达对 MDA-MB-231 细胞 PTX 敏感性的促进作用,该结果表明,lncRNA MEG3 对 MDA-MB-231 细胞 PTX 敏感性的促进可能与其激活 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路有关。

综上所述,上调 lncRNA MEG3 表达可通过激活 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路来促进 MDA-MB-231 细胞焦亡,以此增加 TNBC 对 PTX 的敏感性,其有作为提高 TNBC 化疗药物敏感性作用靶点的潜能。本研究不仅对提高 TNBC 化疗药物敏感性的作用机制研究具有重要意义,还为潜在靶点的寻找提供参考,但在未来还需对其进行更加深入的探讨。

【参考文献】

- [1] TANG L, CHEN Y, CHEN H, et al. DCST1-AS1 promotes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and enhances chemoresistance in triple-negative breast cancer cells via ANXA1 [J]. *Front Oncol*, 2020, 10(1): 280-293.
- [2] 陆向东, 张汀荣, 赵韬. lncRNA 178030.2 通过 TRPS1 对三阴性乳腺癌细胞紫杉醇耐药的影响与机制研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(20): 3500-3505.
LU XD, ZHANG TR, ZHAO T. Effect of lncRNA 178030.2 on paclitaxel resistance in triple negative breast cancer cells through TRPS1 and its molecular mechanism [J]. *Modern Oncology*, 2020, 28(20): 3500-3505.
- [3] WANG Q, LI C, TANG P, et al. A minimal lncRNA-mRNA signature predicts sensitivity to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(6): 2539-2548.
- [4] HAN J, HAN B, WU X, et al. Knockdown of lncRNA H19 restores chemo-sensitivity in paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer through triggering apoptosis and regulating Akt signaling pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 359(1): 55-61.
- [5] ZHENG BH, HE ZX, ZHANG J, et al. The biological function of TUSC7/miR-1224-3p axis in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13(1): 5763-5774.
- [6] YAN H, LUO B, WU X, et al. Cisplatin induces pyroptosis via activation of MEG3/NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway in triple-negative breast cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(10): 2606-2621.
- [7] XIAO YD, HUANG YY, HUANG T, et al. Role of NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway in high glucose and hypoxia/reoxygenation induced injury in human renal proximal tubular cells [J]. *Journal of Medical Research*, 2019, 48(3): 49-53.
- [8] YU KD, YE FG, HE M, et al. Effect of adjuvant paclitaxel and carboplatin on survival in women with triple-negative breast cancer: a phase 3 randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(9): 1390-1396.
- [9] 路璐, 王云凤, 吕以东, 等. miR-129-5p 通过 HMGB1 调控乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇的敏感性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 62-67.
LU L, WANG YF, LYU YD, et al. MiR-129-5p influences the sensitivity of breast cancer MCF-7 cells to paclitaxel by regulating HMGB1 [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2018, 25(1): 62-67.
- [10] ZHANG NN, HU CS, CHEN ZD. PIB5PA enhance the sensitivity of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 to paclitaxel through up-regulation of bim [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2016, 27(1): 255-258.
- [11] WANG Y, SUI Y, TAO Y. Gambogic acid increases the sensitivity to paclitaxel in drug-resistant triple-negative breast cancer via the SHH signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4515-4522.
- [12] PENG WX, KOIRALA P, MO YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667.
- [13] CUI X, YI Q, JING X, et al. Mining prognostic significance of MEG3 in human breast cancer using bioinformatics analysis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 41-51.
- [14] LUO-YANG JT. Long non-coding RNAMEG3 induces apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by regulating NF- κ B signaling pathway [D]. Hengyang: Nanhua University, 2016.
- [15] 郭萃, 程鹏, 王鹏飞, 等. lncRNA-MEG3 对胃癌生物学特性及铂类化疗敏感性的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(06): 16-21.
GUO P, CHENG P, WANG PF, et al. Effect of lncRNA-MEG3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer and chemosensitivity of cisplatin [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2019, 29(6): 16-21.
- [16] LI H, WANG P, LIU J, et al. Hypermethylation of lncRNA MEG3 impairs chemosensitivity of breast cancer cells [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(9): e23369-23379.
- [17] ZHU M, WANG F, MI H, et al. Long noncoding RNA MEG3 suppresses cell proliferation, migration and invasion, induces apoptosis and paclitaxel-resistance via miR-4513/PBLD axis in breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(23): 3277-3288.
- [18] YANG Y, LIU PY, BAO W, et al. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 28-46.
- [19] 石瑛, 任静静, 梁晨, 等. GSDME 通过调控细胞焦亡影响乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇的敏感性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(2): 146-151.
SHI Y, REN JJ, LIANG C, et al. GSDME influences sensitivity of breast cancer MCF-7 cells to paclitaxel by regulating cell pyroptosis [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2019, 26(2): 146-151.
- [20] DUAN JJ, XU HX, LUO P, et al. DEPTOR improves cisplatin chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma cells by inducing Caspase-1-mediated pyroptosis [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(10): 1845-1850.
- [21] 田风, 乔静, 陈雪阳, 等. 细胞焦亡的分子机制及其与恶性肿瘤的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(13): 682-688.
TIAN F, QIAO J, CHEN XY, et al. Molecular mechanism of pyroptosis and its relationship with malignant tumors [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2020, 47(13): 682-688.

(编校: 蔺玥)