

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202525149

· 鼻咽癌专栏 ·

与 GRP78 相关的 miR-15a-5p 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用

莫妍¹, 冯雪萍¹, 吕武武²

(1. 中南大学湘雅医院 国家老年疾病临床研究中心 肿瘤科/医学科学研究中心, 湖南 长沙 410008; 2. 浙江大学医学院附属第四医院 肿瘤科, 浙江 义乌 321000)

摘要: **目的** 探究与葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 相关的非编码微小 RNA-15a-5p (miR-15a-5p) 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用并初步探索二者之间的调控机制。**方法** 应用 shRNA 技术干扰鼻咽癌细胞 GRP78 表达, 通过 miRNA 芯片筛选与 GRP78 相关 miRNA, 并结合 RT-PCR 实验验证敲低后 miR-15a-5p 表达水平; 在鼻咽癌细胞系中瞬转 miR-15a-5p 相应的模拟物和抑制剂后验证 miR-15a-5p 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用; 通过生物信息学初步分析 GRP78 调控 miR-15a-5p 的可能分子机制。**结果** 建立的鼻咽癌放射抵抗细胞系 C666-IR 对放射的抵抗性强于母本细胞 C666-1, 且 GRP78 蛋白的表达更高, 分布更广; C666-IR 细胞中 miR-15a-5p 的表达高于 C666-1 细胞, 且 GRP78 高表达的鼻咽癌细胞经射线照射后 miR-15a-5p 仍维持较高水平, 而敲低 GRP78 可以降低鼻咽癌细胞的 miR-15a-5p 水平; 瞬转 miR-15a-5p 模拟物增强 C666-1 细胞的迁移能力和放射抵抗性, 瞬转 miR-15a-5p 抑制剂降低 C666-IR 细胞的迁移能力和放射抵抗性; 生物信息学分析预测 miR-15a-5p 基因启动子 460 位点左右区域与转录因子结合可能性最大, 且预测到 13 个可能的转录因子, 其中 STAT4 和 FOXP3 可能性最大。**结论** GRP78 介导 miR-15a-5p 表达上调促进鼻咽癌放疗抵抗, 其调控机制可能为 GRP78 通过驱动转录因子 STAT4/FOXP3 提高 miR-15a-5p 表达, 靶向 miR-15a-5p 可能为放疗抵抗的鼻咽癌提供新的治疗策略。

关键词: 鼻咽癌; 葡萄糖调节蛋白 78; 微小 RNA-15a-5p; 放疗抵抗
中图分类号: R739.63

The role of miR-15a-5p associated with GRP78 in radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma

MO Yan¹, FENG Xueping¹, LYU Wuwu²

(1. Department of Oncology/Medical Science Research Center, National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Oncology, the Fourth Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 321000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of non-coding microRNA-15a-5p (miR-15a-5p) associated with glucose-regulated protein 78 (GRP78) in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma and to preliminarily explore the regulatory mechanism between them. **Methods** The expression of GRP78 in nasopharyngeal carcinoma cells was interfered by shRNA technology. The miRNA related to GRP78 was screened by miRNA chip, and the expression level of miR-15a-5p after knockdown was verified by reverse transcription-polymerase chain reaction. The role of miR-15a-5p in nasopharyngeal carcinoma radiotherapy resistance was verified by transient transfection of miR-15a-5p corresponding mimics and inhibitors in nasopharyngeal carcinoma cell lines. The possible molecular mechanism of GRP78 regulating miR-15a-5p was preliminarily analyzed by bioinformatics. **Results** The established radioresistant nasopharyngeal carcinoma cell line C666-IR showed stronger resistance to radiation than its parental cell C666-1, and had higher expression and wider distribution of GRP78 protein. The expression of miR-15a-5p in C666-IR cells was higher than that in C666-1 cells. After irradiation, the level of miR-15a-5p remained high in nasopharyngeal carcinoma cells with high expression of GRP78, while knockdown of GRP78 could reduce the level of miR-15a-5p in nasopharyngeal carcinoma cells. Transient transfection of miR-15a-5p mimics enhanced the migration ability and radioresistance of C666-1 cells, while transient transfection of miR-15a-5p inhibitors reduced the migration ability and radioresistance of C666-IR cells. Bioinformatics analysis predicted that the region

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82273486)。

第一作者简介: 莫妍, 女, 在读博士研究生。

通信作者简介: 冯雪萍, 女, 博士, 主任技师; 吕武武, 男, 硕士, 主治医师。

around the 460 site of the miR-15a-5p gene promoter was most likely to bind to transcription factors, and 13 possible transcription factors were predicted, of which STAT4 and FOXP3 had the greatest possibility. **Conclusions** GRP78 mediates the up-regulation of miR-15a-5p expression to promote radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma. The regulatory mechanism may be that GRP78 increases the expression of miR-15a-5p by driving the transcription factor STAT4/FOXP3. Targeting miR-15a-5p may provide a new therapeutic strategy for radiotherapy-resistant nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; GRP78; miR-15a-5p; Radiotherapy resistance

鼻咽癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率均居头颈部恶性肿瘤之首,死亡率约为(15~50)/10万。鼻咽癌的发生具有特殊的地理分布,约70%的新诊断患者集中在亚洲东南部地区^[1]。鼻咽癌病理类型以鳞状细胞癌多见,临床上这类鼻咽癌对放疗中度敏感,因此放疗是鼻咽癌的首选和主要治疗方法^[2]。据文献报道 I~IVB 期的鼻咽癌患者放疗后 5 年无病生存率为 83.3%,其中有 20% 的鼻咽癌患者出现局部复发及远处转移^[3]。统计结果显示,鼻咽癌放疗抵抗患者约为 35%,表现为放疗后病变残存及残存癌细胞重新克隆导致鼻咽癌复发,且复发鼻咽癌对再次放疗更不敏感^[4]。课题组前期应用蛋白质组学等技术筛选出葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 为鼻咽癌放疗抵抗相关蛋白^[5],后续报道进一步证实 GRP78 在鼻咽癌放疗抵抗中发挥重要作用^[6-8]。miRNA 作为一种内源性非编码 RNA,通过降解其靶向的 mRNA 控制翻译过程,调控多种基因及蛋白质表达。miRNA 也被证实与鼻咽癌的发生发展及转移密切相关。因此,在鼻咽癌中研究与 GRP78 相关的 miRNAs 可能揭示鼻咽癌放疗抵抗机制具有重要的意义,利用 shRNA 技术干扰 GRP78 表达,再经过 miRNA 芯片分析,从差异表达倍数(FC)值 ≥ 2 的 miRNA 中筛选,获得了可能受 GRP78 调控的 miR-15a-5p,推测 GRP78 与 miR-15a-5p 的表达调控相关,而两者在鼻咽癌放疗抵抗中的作用机制值得深入研究。

1 资料与方法

1.1 细胞系

稳定表达 EB 病毒基因的鼻咽癌细胞株 C666-1 来自中南大学湘雅医院分子医学研究中心细胞库。C666-1-IR 为课题组建立的放疗抵抗鼻咽癌细胞模型。稳定敲低 GRP78 (shGRP78) 细胞系是课题组应用 shRNA 技术干扰 C666-IR 细胞系后建立的,并通过 Western blot 实验验证。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞增殖实验 将对数生长期细胞接种到

96 孔板(1 000/孔),设置 24、48、72、96 h 共 4 组,每组每种细胞设置 3 个复孔,选取 3 个不含细胞的孔作为空白对照组。依次在 24、48、72、96 h 这 4 个时间点每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值,根据测得的 OD 值换算成细胞数目,作出细胞的增殖曲线。

1.2.2 划痕实验 将对数生长期细胞接种于 6 孔板中,使其贴壁后细胞融合度为 80%~90%,吸去培养基,用无菌的 100 μ L 的 tip 头靠着直尺在 6 孔板底部平行划痕迹,划的力度适中,使宽度合适且痕迹内无细胞残留。用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍后,加入不含血清的培养基继续培养。分别在划痕后 0、24、48 h 进行拍照观察。

1.2.3 瞬转实验 处于对数生长期细胞计数后按 5×10^5 /孔种到 24 孔板中;第 2 天待细胞融合度达 30%~50%时,PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,加入无血清培养基饥饿处理适当时间;根据种板细胞数取适量 20 μ M 的 miR-15a-5p 相应的模拟物与抑制剂和阴性对照(negative control, NC),加入 25 μ L 的 Opti-MEM 无血清培养基混匀静置 5 min;取适量 Invitrogen Lipofectamine 2 000 加入 25 μ L 的 Opti-MEM 无血清培养基中混匀静置 5 min;将上述混匀的模拟物或抑制剂与转染试剂混合,轻轻混匀后放入培养箱中孵育 20 min;孵育后的混合液加入到培养板中,使最终转染体系模拟物浓度为 50 μ M,抑制剂浓度为 100 μ M,空白对照组加等体积的 Opti-MEM 无血清培养基;培养板继续放入培养箱中培养 4~6 h 后,用含血清培养基替换含有复合物的培养基,再继续培养。

1.2.4 细胞免疫荧光实验 将对数生长期细胞种到铺有无菌盖玻片的 6 孔板中,待细胞在盖玻片上融合度达到 95%~100%时,从培养箱中取出,用预温的 PBS 缓冲液洗涤细胞 10 min $\times$ 3 次;加入适量 4%多聚甲醛室温固定细胞 20~30 min,PBS 缓冲液洗 10 min/次,共 3 次;加入 0.5% Triton 透化细胞 10 min,PBS 缓冲液洗 10 min/次,共 3 次;5% BSA 室温封闭 30 min,吸水纸吸去封闭液;滴入适量用 5% BSA 稀释的一抗后放入湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日取出湿盒复温 30 min 后 PBS 缓冲液洗 10 min/次,共 3 次,吸水纸吸干水

分;滴加适量 5% BSA 稀释的二抗避光孵育 30 min, PBS 缓冲液洗 10 min/次,共 3 次,吸干水分;DAPI 避光染色 5 min, PBS 缓冲液洗 5 min/次,共 3 次;滴 3~5 μ L 封片剂(甘油:PBS = 1:1)进行封片,片子周围用指甲油固定后,放于湿盒中 4℃ 避光保存。

1.2.5 克隆存活实验 取对数生长期的细胞,胰酶消化离心后吹打成单细胞悬液;进行细胞计数,将细胞以 1 000 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,补加完全培养基至 2 mL,十字形晃动使细胞分散均匀;放入培养箱常规培养,待细胞状态稳定后根据实验计划加入试剂处理,待细胞出现肉眼可见的克隆时终止培养;培养结束后将培养基吸去,用 PBS 清洗 2 次,用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 次;结晶紫染色 15 min 后,用 PBS 清洗干净后,自然干燥;将 6 孔板置于白色纸张上拍照,肉眼直接计数克隆数,并计算克隆形成率,克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。

1.2.6 Western blot 实验 当处于对数生长期的细胞生长至 80%~90% 融合度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,收集到离心管中,用 PBS 洗涤 2 次,离心后加入 RIPA 裂解液(biosharp, BL504A)提取总蛋白。使用 BCA 法(碧云天, P0009)测定蛋白浓度。根据测定的浓度加入 SDS 上样缓冲液,以确保最终蛋白浓度为 2 mg/mL,然后在 95℃ 下加热 10 min 进行变性。使用 SDS-PAGE 分离蛋白样品,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,然后在 4℃ 下孵

育过夜,用 TBST 洗涤。将一抗用 TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,然后在 37℃ 下与二抗孵育 1 h。用 TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,然后使用化学发光凝胶成像系统观察蛋白条带。所用抗体如下: GAPDH (全式金, HC301-01), GRP78 (Proteintech, 11587-1-AP), 山羊抗兔 IgG (全式金, HS101-01)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,独立样本 *t* 检验和配对样本 *t* 检验比较两组均值,随机样本数据通过 χ^2 检验比较,运用 GraphPad Prism 6 软件作图及分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 建立的 C666-IR 细胞生物学特性及 GRP78 表达水平探究

实验证实 C666-IR 细胞的增殖能力、迁移能力和放疗抵抗性均强于 C666-1 细胞(图 1)。通过 Western blot 实验检测了 EB 病毒阳性的鼻咽癌细胞 C666-1 及配对放疗抵抗细胞 C666-IR 中的 GRP78 蛋白表达(图 2A、B),结果表明在 C666-IR 中 GRP78 的表达量高于 C666-1 细胞。细胞免疫荧光的结果显示,在 C666-IR 细胞中 GRP78 的表达强度大于 C666-1 细胞,且 GRP78 的分布范围也比 C666-1 细胞更广(图 2 C)。

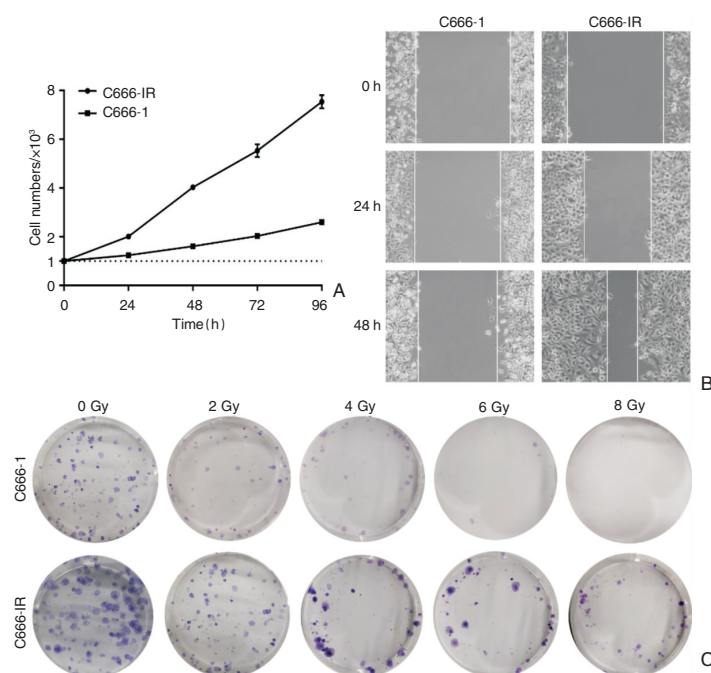


图 1 C666-IR 和 C666-1 细胞生物学特性 A:增殖曲线;B:划痕实验;C:肉眼所见不同剂量照射之后培养 15 d 的克隆存活结果(结晶紫染色)

2.2 敲低 GRP78 表达后鼻咽癌细胞的 miR-15a-5p 水平下调

课题组在之前的研究中在 C666-1R 细胞系中运用 shRNA 干扰 GRP78 建立了稳定低表达 GRP78 细胞系 shGRP78 (简称 sh78)。随后通过对比 sh78 细胞与对照的 NC-C666-1R (简称 NC) 的 miRNA 芯片结果 (表 1), 筛选出一批具有显著差异表达的 miRNAs, 本研究选择了在鼻咽癌中与 GRP78 密切相关的 miR-15a-5p 进行后续的研究。通过 RT-PCR 进一步验证, 发现敲低 GRP78 后鼻咽癌细胞的 miR-15a-5p 表达水平下调 (图 3)。

2.3 miR-15a-5p 在鼻咽癌细胞中表达及照射后动态水平变化分析

RT-PCR 检测 C666-IR 细胞和 C666-1 细胞中 miR-15a-5p 表达水平提示在放疗抵抗细胞 C666-IR 中 miR-15a-5p 相对表达量更高, 说明 miR-15a-5p 可能参与调节鼻咽癌放疗抵抗性 (图 4A)。2Gy 照射细胞后, C666-1 细胞的 miR-15a-5p 水平先下降再回

升, 而在 C666-IR 细胞照射后 miR-15a-5p 的水平下降并不明显 (图 4B)。

2.4 miR-15a-5p 在鼻咽癌放疗抵抗中的功能研究

为了研究 miR-15a-5p 在鼻咽癌中的功能, 将 miR-15a-5p 模拟物和抑制剂分别转染 C666-1 和 C666-IR 细胞。结果表明 C666-1 细胞瞬转模拟物后, 细胞变得更具有侵袭性, 划痕实验结果显示细胞的迁移能力也增强, 放射克隆存活实验结果证实 miR-15a-5p 模拟物可以增强细胞的放疗抵抗性 (图 5)。而 C666-IR 细胞瞬转抑制剂之后, 细胞的侵略性降低, 迁移能力也下降, 放射克隆存活实验结果证实 miR-15a-5p 抑制剂降低了细胞的放疗抵抗性 (图 6)。

2.5 GRP78 调控 miR-15a-5p 的分子机制

目前公认的可以直接调节 miRNA 的分子有长链非编码 RNA 和转录因子。转录因子是一类与基因启动子区域结合从而调控基因表达的蛋白质分子。GRP78 是内质网中蛋白质组装和折叠的主要

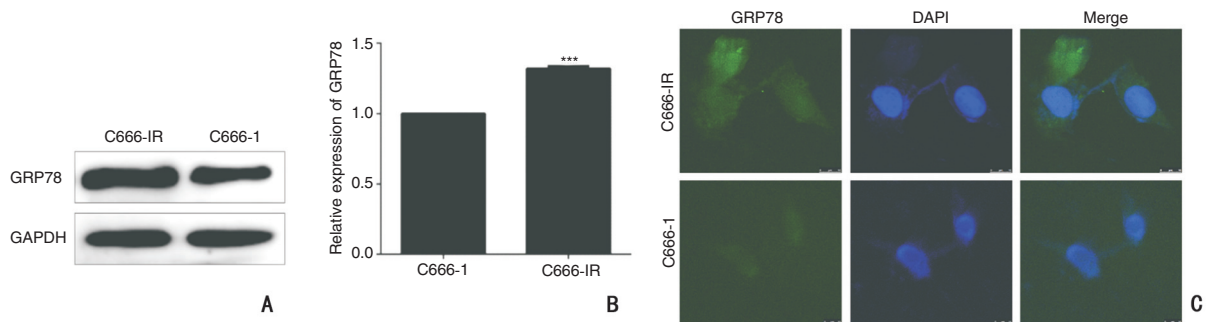


图 2 C666-IR 和 C666-1 细胞中 GRP78 表达水平 A: Western blot 条带; B: 蛋白相对表达量分析; C: GRP78 免疫荧光染色 注: *** $P < 0.001$; 标尺为 10 μm 。

表 1 sh78 与 NC miR-15a-5p 的芯片结果

转录本 ID	登录号	FC 值	生物信息学	碱基序列
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	-6.10	chr13:50623303-50623324 (-)	UAGCAGCACAAUUGGUUUGUG

注: sh78 (shGRP78); NC (对照的 NC-C666-1R); FC (差异表达倍数)。下同。

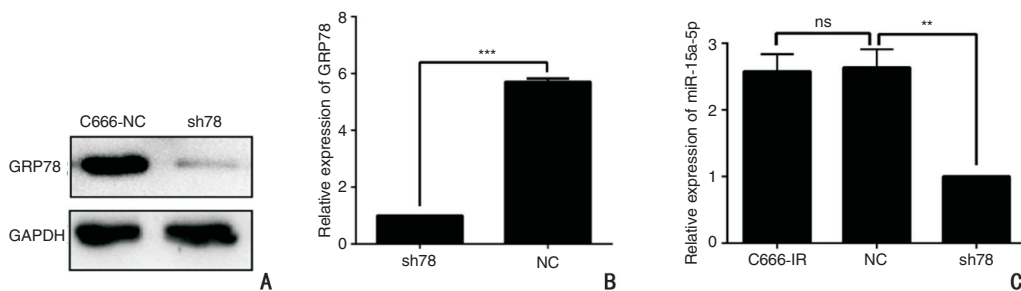


图 3 敲低 GRP78 对鼻咽癌细胞中 miR-15a-5p 表达的影响 A、B: sh78 和 NC 细胞的 GRP78 相对表达量; C: C666-IR、sh78 和 NC 细胞中 miR-15a-5p 的相对表达量 注: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns 表示无统计学意义。下同。

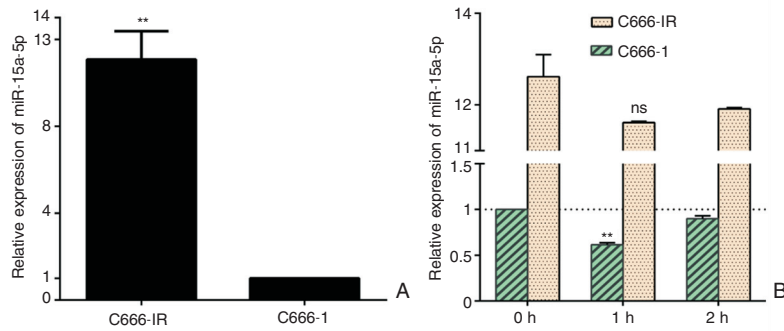


图 4 miR-15a-5p 在鼻咽癌细胞中表达及照射后动态变化 A: C666-IR 和 C666-1 细胞中 miR-15a-5p 相对表达量; B: 2Gy 照射后不同时间下 C666-IR 和 C666-1 细胞中 miR-15a-5p 相对表达量

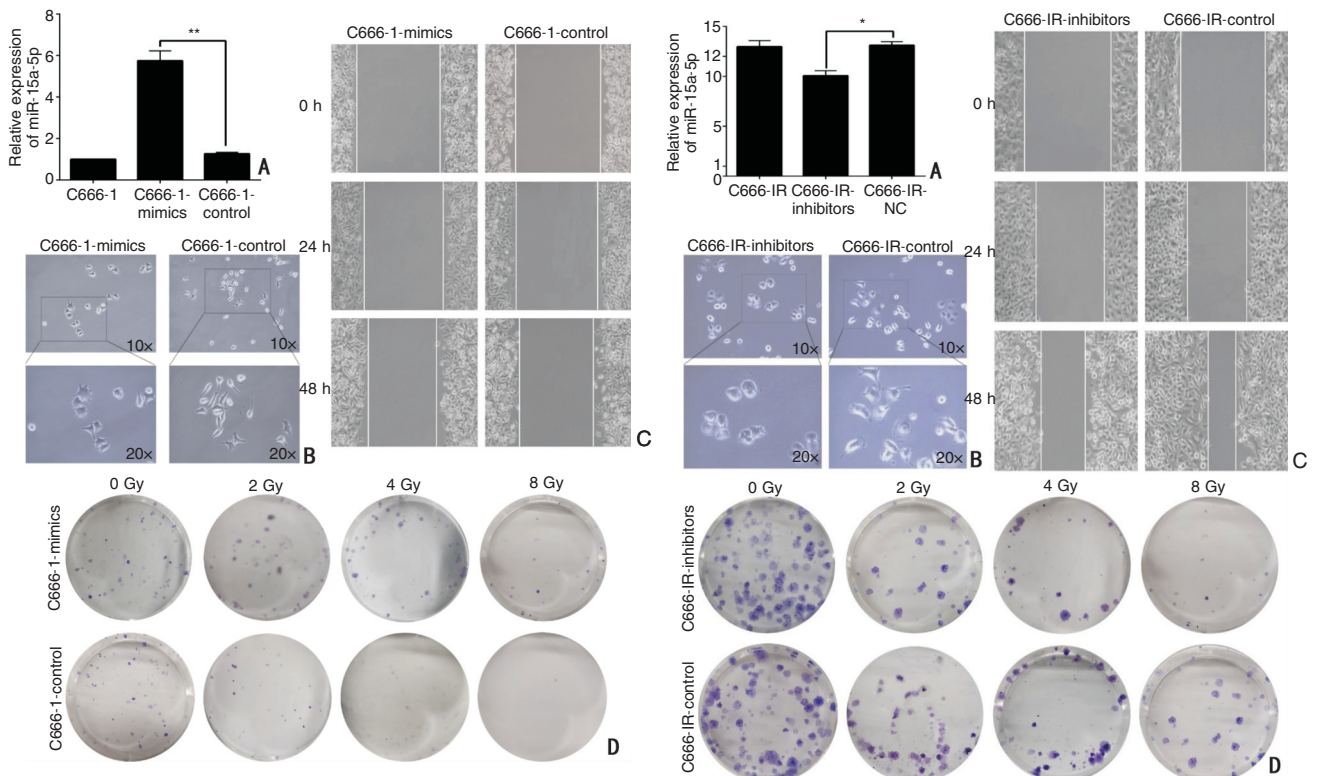


图 5 过表达 miR-15a-5p 对 C666-1 细胞生物学特征的影响 A: 转染后 miR-15a-5p 相对表达量; B: 转染后细胞的形态变化; C: 转染后划痕实验结果; D: 肉眼可见转染后的放射克隆存活实验结果 (结晶紫染色) 注: mimics(模拟物)。

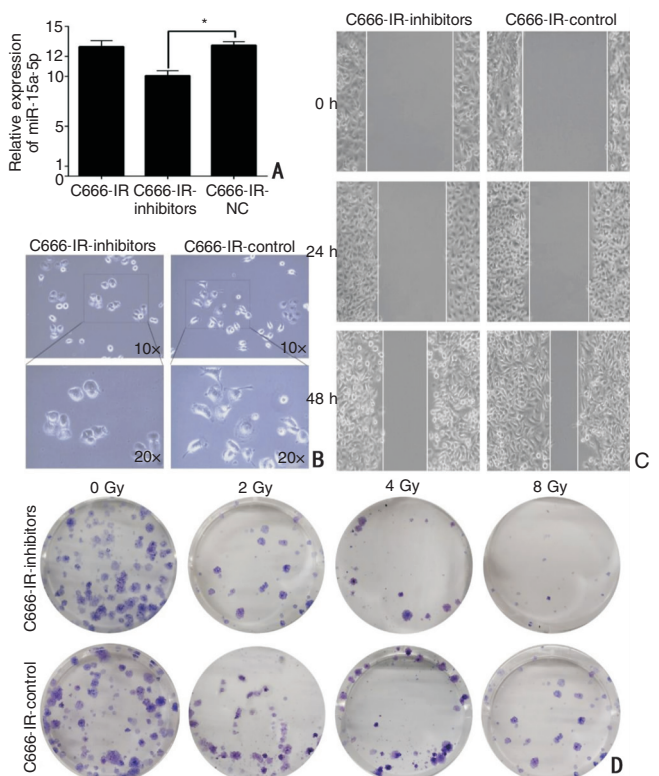


图 6 抑制 miR-15a-5p 对 C666-1R 细胞学特征的影响 A: 转染后 miR-15a-5p 相对表达量; B: 转染后细胞的形态变化; C: 转染后划痕实验结果; D: 肉眼可见转染后的放射克隆存活实验结果 (结晶紫染色) 注: * $P < 0.05$; inhibitors(抑制剂)。

分子伴侣,因此 GRP78 可能调节转录因子的合成过程。许多转录因子的激活与抑制受信号转导途径的控制,而 GRP78 发挥着重要的信号转导功能。因此,我们推测 GRP78 的信号转导可能激活或抑制某些转录因子的功能。

转录因子与 miRNA 基因的启动子区域结合从而调控 miRNA 的表达已有较多文献报道,有学者发现缺氧心肌细胞中转录因子 pSTAT3 通过与 miR-199a-5p 的启动子区域结合从而影响 miR-199a-5p

的表达,再通过 miR-199a-5p 的靶向基因内质网应激相关的激活转录因子 6 和 GRP78 调控缺氧心肌细胞的自身保护机制^[6]。为了寻找可以与 miR-15a-5p 基因 (*MIMAT0000068*) 启动子区域结合的转录因子,课题组首先从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 网站上根据 miR-15a-5p 基因的染色体定位获得了它的基因启动子序列,之后通过 PROMO 在线程序 (http://algen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_

8.3),预测了与该启动子区域存在结合的转录因子及对应的结合位点,结果提示 miR-15a-5p 基因启动子区域 460 位点附近是最有可能与转录因子有结合的序列,且预测到的转录因子种类最多(共 13 个)。本研究设定相异性低于 15% 为筛选标准。根据这个标准,STAT4 和 FOXP3 是预测的最有可能与 miR-15a-5p 基因启动子区域存在结合的转录因子(图 7、表 2)。

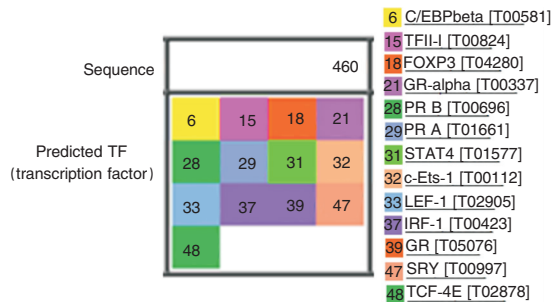


图 7 预测到的最有可能与转录因子结合的位点以及相应的转录因子图

表 2 预测到的转录因子的相异性和容错率

转录因子	启动子序列(位置)	相异性 (%)	RE 等权值	RE 查询值
STAT4	TTTTCC(452-457)	1.47	1.953 12	2.171 97
FOXP3	GTTTTC(451-456)	4.76	2.929 69	3.897 21
PR B	CTTTGTT(458-464)	11.15	2.197 27	3.331 75
PR A	CTTTGTT(458-464)	11.15	2.197 27	3.331 75
GR	CCCTTTG(456-462)	11.29	1.464 84	1.738 46
TCF-4E	CTTTGTT(458-464)	6.30	0.610 35	0.694 48
LEF-1	CTTTGTTT(458-465)	2.00	0.183 11	0.285 89
SRY	CTTTGTTTT(458-466)	1.00	0.061 04	0.103 76
TFII-I	TTTTCC(452-457)	9.51	7.324 22	5.908 20
IRF-1	TTTCCCTTT(453-461)	0.00	0.007 63	0.013 01
C/EBPβ	TTGT(460-463)	0.00	15.625 00	18.188 38

3 讨论

GRP78 蛋白在本课题组的前期研究中已证实与鼻咽癌的放疗抵抗相关^[5,9-10],且可能是放疗抵抗鼻咽癌的潜在治疗靶点^[5]。GRP78 在头颈部肿瘤转移细胞中明显增高,这些过表达 GRP78 细胞具有自我更新、分化、放疗抗拒的肿瘤干细胞特性^[9]。因此,研究 GRP78 在鼻咽癌中的调控网络可能对揭示鼻咽癌放疗抵抗机制有重要意义。同时,GRP78 作为一种重要的应激反应生存蛋白,在内质网应激和维持细胞稳态中发挥重要作用^[9]。它通过促进

蛋白折叠和未折叠蛋白降解以及内质网钙结合以拮抗内质网应激诱导的细胞凋亡,促进细胞生存^[10]。GRP78 参与内质网中蛋白质的折叠和组装,在内质网应激中起重要作用。在多种癌症中由于酸中毒、葡萄糖缺乏或严重缺氧引起的内质网应激可以导致 GRP78 高表达。也有研究显示化疗药物和放疗也可以诱导肿瘤细胞 GRP78 表达,进而使肿瘤细胞产生抗性^[11]。此外,GRP78 的表达改变在恶性肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。本研究也发现 GRP78 在放疗抵抗存活的鼻咽癌亚克隆细胞中表达显著上调。根据生物信息学的结果,说明 miR-15a-5p 与鼻咽癌放疗抵抗相关蛋白 GRP78 之间存在密切联系。通过瞬转 miR-15a-5p 的模拟物和抑制剂,本研究对 miR-15a-5p 在鼻咽癌放疗抵抗中的功能作了进一步的研究,miR-15a-5p 可能在鼻咽癌的放疗抵抗中发挥重要作用。

有研究通过 siRNA 技术敲低前列腺癌和多发性骨髓瘤中 GRP78 的表达发现,在两种肿瘤中敲低 GRP78 均导致神经黏钙素的下调。在前列腺癌细胞中,敲低 GRP78 显著减少上皮黏钙素表达可能与诱导转化生长因子-β1 表达相关。此外,敲低 GRP78 可以引起前列腺癌细胞形态显著改变,从而降低前列腺癌细胞粘附到相应的成骨细胞的能力,某种程度上是由于降低了黏钙素的表达^[12]。在中国仓鼠卵巢细胞中,研究者应用二代测序技术鉴定出激活转录因子 6β 是 miR-1287 的靶基因^[13]。为了筛选鼻咽癌中与 GRP78 相关的 miRNAs,本研究应用 shRNA 技术干扰 GRP78 表达构建了稳定低表达 GRP78 的细胞系,并命名为 sh78。之后分析 miRNA 芯片的结果时,发现 miR-15a-5p 在敲低 GRP78 后表达显著降低,且细胞的 RT-PCR 结果与芯片结果一致。应用 shRNA 技术发现敲低 GRP78 可以降低 miR-15a-5p 的表达。有研究发现 GRP58 与 STAT 家族成员在细胞质膜室中相互关联,很有可能通过隔绝未激活和已激活的 STAT3 来调控信号的传递^[7]。GRP78 与转录因子 STAT4、FOXP3 之间具体的分子途径暂无文献报道。通过总结文献及生物信息学分析,推测在鼻咽癌细胞中 GRP78 可能通过激活转录因子 STAT4 或者 FOXP3 与 miR-15a-5p 的基因启动子区域结合,从而上调 miR-15a-5p 的基因表达。对 miR-15a-5p 和 GRP78 之间调控分子途径的探究,使我们进一步认识了鼻咽癌放疗抵抗形成的机制,为 miR-15a-5p 的功能及其相关的信号通路研究打下了基础。

综上所述,筛选出与 GRP78 相关的 miRNA 对揭示 GRP78 在鼻咽癌放疗抵抗中的具体分子机制有重要意义,这个结果可能为探索逆转鼻咽癌放疗抵抗的新靶点和新策略提供思路,也推进了 miRNA 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用研究。本课题组前期研究发现 GRP78 是鼻咽癌的放射增敏的有效靶点,与鼻咽癌自噬和放疗抵抗相关^[14]。但本研究并未深入验证 GRP78 调控 miR-15a-5p 的具体分子途径,有待后续的研究进一步证实。

参考文献:

- [1] Chang ET, Ye W, Zeng Y, et al. The evolving epidemiology of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021,30(6):1035-1047.
- [2] Su ZY, Siak PY, Lwin YY, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: Current insights and future outlook [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024,43(3):919-939.
- [3] Faisal HH, Kubo N, Nuryadi E, et al. Patterns of care and outcome analysis of nasopharyngeal carcinoma: An Indonesian single institution study [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020,21(5):1481-1485.
- [4] Ng WT, Soong YL, Ahn YC, et al. International recommendations on reirradiation by intensity modulated radiation therapy for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021,110(3):682-695.
- [5] Feng XP, Yi H, Li MY, et al. Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics [J]. *Cancer Res*, 2010,70(9):3450-3462.
- [6] Zhou Y, Pang B, Xiao Y, et al. The protective microRNA-199a-5p-mediated unfolded protein response in hypoxic cardiomyocytes is regulated by STAT3 pathway [J]. *J Physiol Biochem*, 2019,75(1):73-81.
- [7] Guo GG, Patel K, Kumar V, et al. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes [J]. *J Interferon Cyto-*
- kine Res*, 2002,22(5):555-563.
- [8] Jiang J, Tang Q, Gong J, et al. Radiosensitizer EXO-miR-197-3p inhibits nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance by regulating the AKT/mTOR axis and HSPA5-mediated autophagy [J]. *Int J Biol Sci*, 2022,18(5):1878-1895.
- [9] Liu Z, Liu G, Ha DP, et al. ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023,120(31):e2303448120.
- [10] Samanta S, Yang S, Debnath B, et al. The hydroxyquinoline analogue YUM70 inhibits GRP78 to induce ER stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2021,81(7):1883-1895.
- [11] Zhao T, Jiang T, Li X, et al. Nuclear GRP78 promotes metabolic reprogramming and therapeutic resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2023,29(24):5183-5195.
- [12] Cultrara CN, Kozuch SD, Ramasundaram P, et al. GRP78 modulates cell adhesion markers in prostate Cancer and multiple myeloma cell lines [J]. *BMC Cancer*, 2018,18(1):1263.
- [13] Pieper LA, Strotbek M, Wenger T, et al. ATF6 β -based fine-tuning of the unfolded protein response enhances therapeutic antibody productivity of Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017,114(6):1310-1318.
- [14] Du T, Jiang J, Chen Y, et al. MiR-138-1-3p alters the stemness and radiosensitivity of tumor cells by targeting CRIPTO and the JAK2/STAT3 pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Ann Transl Med*, 2021,9(6):485.

(收稿日期:2025-03-26;网络首发:2025-09-10)

本文引用格式:莫妍,冯雪萍,吕武武. 与 GRP78 相关的 miR-15a-5p 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2026,32(2):26-32. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202525149

Cite this article as:MO Yan, FENG Xueping, LYU Wuwu. The role of miR-15a-5p associated with GRP78 in radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026,32(2):26-32. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202525149