

·基础研究·

CircOMA1 调控多巴胺受体促进泌乳素瘤耐药性

张译尹¹, 吴娜¹, 李雪莉¹, 胡斌², 吴欣仪², 朱永红¹

(1. 中山大学中山医学院, 广东广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院神经外科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探究环状RNA hsa_circ_0002316(circOMA1)是否参与泌乳素瘤耐药调控及其作用机制是什么。【方法】通过RT-qPCR检测临床泌乳素瘤标本中circOMA1表达情况(5例敏感泌乳素瘤标本和12例耐药泌乳素瘤标本)。通过慢病毒载体构建稳定表达外源性circOMA1 MMQ细胞系模型进行体外实验,分为MMQ NC组及MMQ OMA1组。通过构建裸鼠皮下肿瘤模型进行体内实验,分为MMQ NC+卡麦角林(CAB)组、MMQ NC+溴隐亭(BRC)组、MMQ OMA1+CAB组、MMQ OMA1+BRC组。通过CCK8、Western blot、ELISA等表型实验检测circOMA1对耐药机制中的细胞增殖和泌乳素(PRL)分泌两个方面的影响。通过Western blot、ELISA、免疫组化等实验检测circOMA1对多巴胺受体表达的影响。通过TargetScan、CircInteractome等软件分析预测、microRNA-145-5p(miR-145-5p) mimic 补救实验探究circOMA1调控多巴胺受体机制。【结果】RT-qPCR结果显示多巴胺受体激动剂(DAs)耐药泌乳素瘤中circOMA1表达升高($P<0.01$)。在细胞实验及裸鼠皮下肿瘤实验中,与MMQ NC组相比,MMQ OMA1组DAs敏感性降低,细胞增殖水平和泌乳素分泌水平升高($P<0.05$)。Western blot和免疫组化结果显示,MMQ OMA1组多巴胺2型受体(DRD2)表达下调,多巴胺5型受体(DRD5)表达上调,环3',5'-单磷酸腺苷(cAMP)水平上调($P<0.05$)。此外,在MMQ OMA1组中miR-145-5p表达下调, kelch 重复序列和 BTB 结构域蛋白7(KBTBD7)mRNA及蛋白表达水平上调($P<0.05$),然而MMQ OMA1组转染miR-145-5p mimic后,KBTBD7表达下调,DRD2表达上调($P<0.05$),表明过表达miR-145-5p逆转了circOMA1对KBTBD7的促进作用。【结论】circOMA1通过miR-145-5p/KBTBD7轴下调DRD2表达,降低泌乳素瘤对DAs敏感性,并且调控多巴胺受体表达激活cAMP通路促进泌乳素合成释放,从而促进泌乳素瘤耐药性。

关键词: circOMA1; 泌乳素瘤; 耐药; miR-145-5p

中图分类号: R363.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)03-0381-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0306

CircOMA1 Promotes Resistance in Prolactinoma by Regulating Dopamine Receptors

ZHANG Yi-yin¹, WU Na¹, LI Xue-li¹, HU Bin², WU Xin-yi², ZHU Yong-hong¹

(1. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHU Yong-hong; E-mail: zhuyongh@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate whether hsa_circ_0002316 (circOMA1) is involved in drug resistance in prolactinoma and its mechanism.【Methods】RT-qPCR was used to detect the expression of circOMA1 in clinical prolactinoma specimens including 5 dopamine receptor agonists (DAs)-sensitive prolactinomas and 12 DAs-resistant prolactinomas. MMQ cell lines with stable expression of exogenous circOMA1 were constructed by lentivirus vector infection for in vitro experiment, and were divided into MMQ NC group and MMQ OMA1 group. Xenograft tumor models in nude mice were established for in vivo experiment, and were divided into MMQ NC+cabergoline (CAB) group, MMQ NC+bromocriptine

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 广东省自然科学基金(2022A1515011265, 2020A1515010297); 中山大学临床医学研究5010计划项目(2016008)

作者简介: 张译尹, 硕士生, 研究方向: 垂体腺瘤发生机制, E-mail: 958069148@qq.com; 吴娜, 共同第一作者; 朱永红, 通信作者, 教授, E-mail: zhuyongh@mail.sysu.edu.cn

(BRC) group, MMQ OMA1+CAB group and MMQ OMA1+BRC group. CCK8, Western blot and ELISA were performed to detect the effects of circOMA1 on cell proliferation and secretion of prolactin (PRL) in drug resistance mechanism. Western blot, ELISA and immunohistochemistry were used to examine the effect of circOMA1 on dopamine receptor expression. The mechanism of circOMA1 regulating dopamine receptor was explored by TargetScan, CircInteractome and microRNA-145-5p (miR-145-5p) mimic remediation experiment. [Results] RT-qPCR showed that circOMA1 expression was increased in DAs-resistant prolactinomas ($P < 0.01$). Compared with MMQ NC group, MMQ OMA1 group had lower DAs sensitivity and increased cell proliferation and prolactin secretion ($P < 0.05$) in vivo and in vitro. Western blot and immunohistochemical analysis showed that in MMQ OMA1 group, the expression of dopamine receptor type 2 (DRD2) was down-regulated, and the expression of dopamine receptor type 5 (DRD5), the cyclic 3' and 5' -adenosine monophosphate (cAMP) was up-regulated ($P < 0.05$). In MMQ OMA1 group, miR-145-5p expression was down-regulated, kelch repeat sequence and BTB domain-containing protein 7 (KBTBD7) mRNA and protein expression was up-regulated ($P < 0.05$). After transfected with miR-145-5p mimic, MMQ OMA1 group exhibited down-regulated KBTBD7 expression and up-regulated DRD2 expression ($P < 0.05$), which indicated that overexpression of miR-145-5p reversed the promoting effect of circOMA1 on KBTBD7. [Conclusion] CircOMA1 down-regulated DRD2 expression through miR-145-5p/KBTBD7 pathway to reduce the sensitivity of prolactinoma to DAs, and regulated the expression of dopamine receptors to activate the cAMP pathway and promote the synthesis and release of prolactin, thus promoting the drug resistance in prolactinoma.

Key words: circOMA1; prolactinoma; drug resistance; miR-145-5p

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(3): 381-391]

垂体腺瘤是最常见的颅内肿瘤之一,发病率约占颅内肿瘤17%^[1],虽然多为良性肿瘤,但由于垂体腺瘤具有分泌功能,可导致激素分泌过多引起机体代谢异常^[2-3]。垂体腺瘤按是否分泌过量激素可分为无功能型垂体腺瘤和功能型垂体腺瘤。泌乳素瘤是最常见的功能型垂体腺瘤,约占垂体腺瘤的32%~66%,患者出现泌乳素(prolactin, PRL)水平升高,主要表现为女性不孕和男性不育等^[1,4]。目前大部分患者通过多巴胺受体激动剂(dopamine receptor agonists, DAs)治疗,能有效降低泌乳素水平和缩小肿瘤体积,但部分患者仍存在DAs治疗效果不佳等问题。DAs主要包括溴隐亭(bromocriptine, BRC)和卡麦角林(cabergoline, CAB),约有25%~33%的泌乳素瘤患者对BRC耐药,约10%~15%的患者对CAB耐药^[5]。泌乳素瘤耐药机制尚未完全探明,目前广泛认为耐药的原因可能由于多巴胺2型受体(dopamine type 2 receptor, DRD2)是主要药物靶点,而患者存在DRD2表达下调或功能失调,DRD2亚型DRD2L/DRD2S表达比率降低等导致DAs耐药^[6-9]。此外也有大量研究揭示了非编码RNA在泌乳素瘤耐药机制中的作用。如miR-93-5p可以通过调节TGF- β 1/Smad3依赖性纤维化来增强泌乳素瘤细胞的耐药性^[10],miR-1299可抑制

FOXO1基因促进合成和分泌泌乳素^[11]。非编码RNA在泌乳素瘤耐药机制中的作用已被部分揭露,但其与广泛认同的DRD2相关的耐药机制之间的是否有关联尚未可知。目前尚无环状RNA(circular RNA, circRNAs)在泌乳素瘤中作用的研究报道。在无功能型垂体腺瘤中,我们已证实circOMA1通过竞争性结合miR-145-5p,上调肿瘤蛋白翻译控制蛋白1(tumor protein translationally-controlled 1, TPT1),促进细胞增殖与侵袭^[12]。而在我们前期研究中发现DAs耐药泌乳素瘤患者中也存在circOMA1升高现象。本研究旨在探究circOMA1对泌乳素瘤耐药调控作用及其具体调控机制,为耐药泌乳素瘤靶向治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本

从中山大学附属第一医院神经外科及垂体肿瘤中心收集2014年12月至2021年12月共采集17例人泌乳素瘤组织标本,包含5例敏感病例,12例耐药病例。肿瘤标本类型由病理学家进行病理学评估和诊断。多巴胺激动剂耐药标准:最大耐受量用药3个月后患者泌乳素水平未下降至正常及肿

瘤未缩小50%以上。纳入标准:①肿瘤标本病理类型为泌乳素瘤;②患者接受过连续三个月以上多巴胺受体激动剂治疗。排除标准:①患者多巴胺受体激动剂治疗不耐受;②患者头颅接受过放射治疗。肿瘤组织标本经患者同意采集,中山大学附属第一医院(中国广州)医学伦理委员会批准该实验用于研究目的,批准号为[2020]091号。

1.2 实验动物

SPF级4周龄雌性BALB/c裸鼠,由中山大学的实验动物中心进行繁育与提供,BALB/c裸鼠的生产许可证号为SYXK(粤)2017-0081。动物实验方案经过中山大学实验动物伦理委员会审核批准,批准编号为NO.SYSU-IACUC-2021-B1210,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.3 细胞培养

大鼠泌乳素瘤细胞系(MMQ)细胞由北京协和医学院细胞资源中心提供。MMQ细胞在F12/DMEM培养基中培养,添加10 g/L胎牛血清和100 U/mL青霉素,0.1 mg/mL链霉素,在37℃,5%二氧化碳培养箱中培养。

1.4 主要试剂

F12/DMEM培养基(Gibco);Prime Script RT Master Mix Kit(Takara);SYBR Green Premix Pro TaqHS qPCR Kit(艾科瑞生物);Mir-X™ miRNA第一链合成试剂盒(Takara);卡麦角林(MCE);溴隐亭(MCE);CCK8细胞计数试剂盒(Dojindo Laboratories);BCA试剂盒(CWBio);1×RIPA缓冲液(CW-Bio);PRL ELISA试剂盒(FineTest);cAMP ELISA试剂盒(Abnova);MG132(APExBIO);miR-145-5p mimic(锐博);miR-NC(锐博);Lipofectamine 3000(Invitrogen);Opti-MEM培养基(Invitrogen);GAPDH抗体(Affinity);DRD2抗体(Affinity);多巴胺5型受体(dopamine type 5 receptor, DRD5)抗体(Affinity);TPT1抗体(Abcam);PRL抗体(Bioss);kelch重复序列和BTB结构域蛋白7(identified kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7, KBTBD7)抗体(SAB)。

1.5 实验方法

1.5.1 慢病毒感染及稳定细胞系的构建 circOMA1慢病毒载体由吉凯公司(上海,中国)合成。根据制造商的说明书,用circOMA1过表达慢病毒载体感染MMQ细胞系构建稳定表达细胞系。六孔板

铺板每孔 2×10^5 个MMQ细胞,分为MMQ NC组和MMQ OMA1组,分别用空白病毒载体和circOMA1慢病毒载体感染。感染12 h后,更换细胞培养基。感染72 h后,在荧光显微镜下观察GFP标签蛋白荧光表达。当感染效率大于80%后,用4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素进行筛选。筛选后,采用逆转录实时荧光定量PCR法(RT-qPCR)检测其表达效率。

1.5.2 细胞增殖实验 使用细胞计数试剂盒CCK8法进行细胞增殖实验,检测细胞耐药性和增殖速度。96孔板铺板,每孔培养3 000个细胞,分别加入10 μL PBS、卡麦角林(80 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、溴隐亭(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)及相应药物浓度的DMSO。设置培养基组为空白对照组,以相应DMSO组为阴性对照组。分别培养0、24、48、72 h。每孔中加入10 μL 的CCK8试剂。37℃孵育2 h。使用酶标仪(Tecan, sunrise)在450 nm处测定吸光度。细胞活力按以下算式计算:细胞活力(%)=(药物组OD值-空白对照组OD值)/(阴性对照组OD值-空白对照组OD值)。相对细胞增殖速度按以下算式计算:相对细胞增殖速度=(某时间段PBS组OD值-空白对照组OD值)/(0 h PBS组OD值-空白对照组OD值)。

1.5.3 RT-qPCR 用TRIzol法提取肿瘤标本及细胞的RNA。对mRNA和circRNA,使用Prime Script RT Master Mix Kit对500 ng总RNA进行逆转录获得cDNA;对miRNA,使用Mir-X™ miRNA第一链合成试剂盒对1 μg 总RNA进行逆转录获得cDNA。使用SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit在实时荧光定量PCR系统(Bio-Rad CFX96)进行检测,miRNA以U6小核RNA作为内源性参照,mRNA和circRNA以GAPDH作为内源性参照。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法检测RNA的表达水平。引物通过NCBI在线网页工具设计,交由广州擎科合成。引物序列见表1。

1.5.4 Western blot 按1×RIPA缓冲液:100 mmol/L PMSF=100:1比例配制细胞裂解液,加入细胞裂解液裂解细胞,涡旋,冰上静置10 min,超声破碎仪裂解细胞,涡旋,静置20 min,4℃离心12 000 r/min,10 min(离心机半径 $r=10$ cm)。吸取上清于新的EP管,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,将蛋白样品调成同一浓度。5×SDS上样缓冲液按比例与蛋白样品混合,涡旋混匀,100℃煮沸10 min,使蛋白样品变性。蛋白样品在恒压条件下进行SDS-PAGE凝胶电泳,恒压80 V,电泳30 min,恒压120 V,电泳80 min。在300 mA恒流条件下进行转膜60 min。

表1 引物序列
Table 1 The primer sequence

Gene	5'-3' sequence
<i>rno-TPT1-F</i>	CTTGTGTGCCATGTGGTTCAG
<i>rno-TPT1-R</i>	GTCACACAGCAGCATTGTTGGTT
<i>rno-DRD2-F</i>	AGTTTCCCAGTGAACAGGCCG
<i>rno-DRD2-R</i>	TTGCTATGTAGGCCGTGGTG
<i>rno-DRD5-F</i>	CTCCTTCATCCCGGTCCAAC
<i>rno-DRD5-R</i>	TCCGTCCTCCCTTCTAGCTC
<i>rno-KBTBD7-F</i>	TGTCGAGAGGGCATGGATGT
<i>rno-KBTBD7-R</i>	AGGAATGCCGTACAGGAGC
<i>rno-GAPDH-F</i>	GAAGGTCGGTGTGAACGGAT
<i>rno-GAPDH-R</i>	CCCATTTGATGTTAGCGGGAT
<i>rno-miR-145-5p-F</i>	GTCCAGTTTTCCAGGAATC
<i>miRNA 3'Primer</i>	Provided by the Mir-X™ miRNA First Strand synthesis Kit
<i>U6-F</i>	Provided by the Mir-X™ miRNA First Strand synthesis Kit
<i>U6-R</i>	Provided by the Mir-X™ miRNA First Strand synthesis Kit
<i>hsa-circOMA1-F</i>	AACCCAAGATGCCAGAATGGT
<i>hsa-circOMA1-R</i>	TTGATGACAGCCCCGTGAG
<i>hsa-GAPDH-F</i>	CTGGGCTACACTGAGCACC
<i>hsa-GAPDH-R</i>	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

室温下用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1.5 h。按GAPDH(1:5 000), TPT1(1:1 000), PRL(1:1 000), DRD2(1:1 000), DRD5(1:1 000), KBTBD7(1:1 000)比例稀释一抗,将PVDF膜按marker剪切成所需不同蛋白条带,蛋白条带用相应稀释后的一抗孵育,于摇床4℃孵育过夜。TBST洗涤3次,每次10 min。按羊抗兔(1:10 000),羊抗小鼠(1:10 000)比例稀释二抗,蛋白条带用相应二抗室温孵育1.5 h;按羊抗兔(1:10 000),羊抗小鼠(1:10 000)比例稀释二抗。TBST洗涤3次,每次10 min。按说明书以A液:B液=1:1比例配制发光液,混匀。使用化学发光成像系统(Bio-Rad)进行曝光显影。使用Image J软件对条带灰度值做分析处理。

1.5.5 ELISA 用PRL ELISA试剂盒检测细胞上清PRL水平和裸鼠血浆PRL水平。MMQ NC组和MMQ OMA1组用96孔板铺板,每孔约2 000个细胞以检测细胞上清,每组增设复孔用以检测相应细胞活力。铺板72 h后CCK8法检测不同组细胞活力,同时收集不同组上清4℃,1 000×g,离心20 min,

根据制造商的说明书,用PRL ELISA试剂盒检测不同组细胞上清PRL含量,使用酶标仪(Tecan, sunrise)在450 nm处测定吸光度,用上清PRL含量/细胞活力比值检测细胞分泌PRL能力。用cAMP ELISA试剂盒检测细胞胞内cAMP水平,分别收集MMQ NC组和MMQ OMA1组细胞4×10⁶个,PBS洗涤后4℃,1 500×g离心15 min,每组加入160 μL样品稀释液,根据制造商的说明书,用cAMP ELISA试剂盒检测不同组细胞胞内cAMP含量,使用酶标仪(Tecan, sunrise)在450 nm处测定吸光度。

1.5.6 miR-145-5p mimic 转染 将MMQ NC细胞和MMQ OMA1细胞接种于六孔板,每孔铺板4×10⁵个细胞。配制A、B管,A管:125 μL Opti-MEM培养基+5 μL miR-145-5p mimic/miR-NC; B管:125 μL Opti-MEM培养基+6 μL lipofectamine 3000。A管和B管充分混合,静置5 min,加入六孔板中,转染72 h后,收集细胞。

1.5.7 裸鼠皮下成瘤实验 将20只4周龄雌性BALB/c裸鼠分为两组MMQ NC组和MMQ OMA1

组,右侧腋下分别接种0.1 mL 3×10^7 个/mL的MMQ NC细胞或MMQ OMA1细胞。从第7天开始每三天测量移植瘤体积大小。用游标卡尺测量肿瘤,体积计算算式为移植瘤体积=长度 \times 宽度² \times 1/2。第14天时将MMQ NC组和MMQ OMA1组裸鼠,分为4组MMQ NC+CAB组、MMQ NC+BRC组、MMQ OMA1+CAB组、MMQ OMA1+BRC组,分别腹腔注射CAB(0.5 mg/kg)或BRC(2 mg/kg)。CAB每4天给药一次,共计给药2次;BRC每两天给药一次,共计给药3次。在第22天处死裸鼠,心尖取血以检测血浆PRL水平,取出皮下移植瘤,称量移植瘤肿瘤重量。

1.5.8 苏木精-伊红染色及免疫组化 苏木精-伊红(HE)染色和免疫组化(IHC)具体方法如文献^[12]所述。提取小鼠肿瘤,按DRD2(1:100)和DRD5(1:100)比例稀释抗体进行免疫染色分析。使用光学显微镜(Olympus, Japan)拍摄,使用Image J软件计算图像密度。

1.6 统计分析

本研究中所有的统计分析均使用Graphpad Prism 8.0.2进行。数据以平均数 \pm 标准误表示。两组均值比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药泌乳素瘤患者的circOMA1表达水平升高

我们收集17名泌乳素瘤患者肿瘤组织检测其circOMA1表达水平,包括5名敏感病例,12例耐药病例。RT-qPCR结果显示耐药泌乳素瘤患者肿瘤组织中circOMA1表达水平升高($P < 0.01$;图1A),猜测circOMA1可能与DAs耐药相关。为了验证猜测,我们进一步探究circOMA1在泌乳素瘤中的作用,由于垂体腺瘤没有人源永生生化肿瘤细胞系并且大鼠中不存在鼠源circOMA1表达,所以通过慢病毒载体构建外源性circOMA1 MMQ细胞系模型对circOMA1作用进行探究。荧光成像及RT-qPCR结果显示,与空白病毒载体组(MMQ NC)相比,circOMA1病毒载体组(MMQ OMA1)细胞成功转染circOMA1,circOMA1水平上升($P < 0.001$;图1B,C)。同时我们也检测了已知的circOMA1的下游分子表达,RT-qPCR及Western blot结果显示过表达circOMA1后,MMQ细胞也出现了miR-145-5p表达下调($P < 0.0001$;图1D),TPT1表达上调($P < 0.01$;

图1E,F),证明我们成功构建了稳定表达外源性circOMA1的MMQ细胞系。

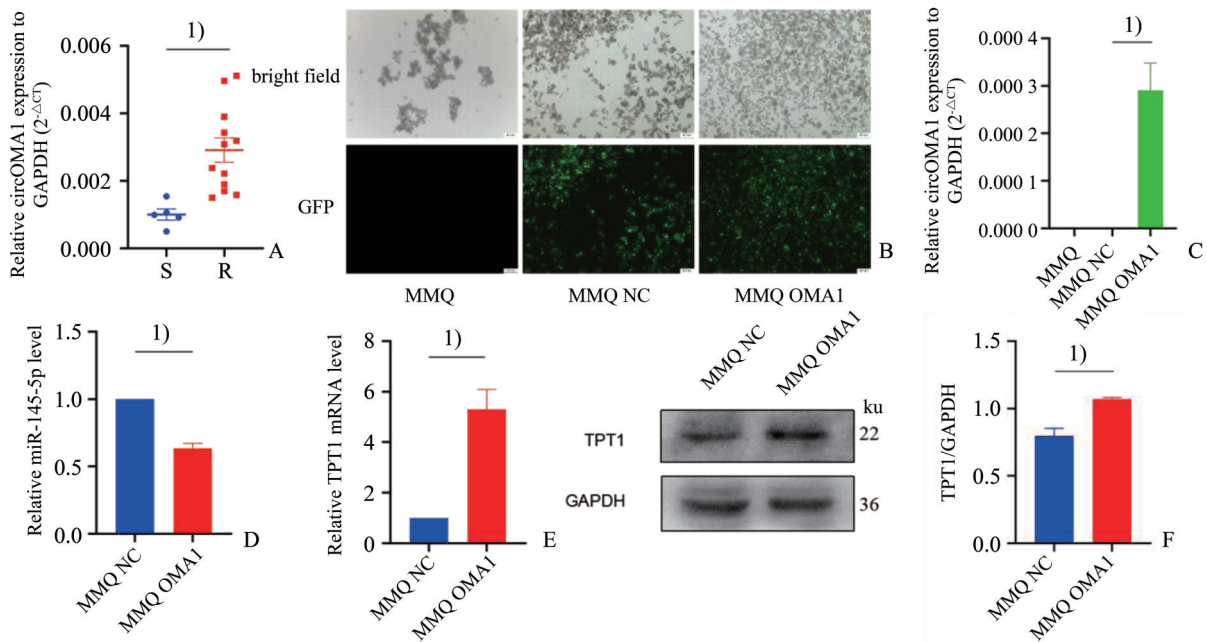
2.2 CircOMA1促进泌乳素瘤耐药

为了检测circOMA1与DAs耐药性关系,我们分别设置未处理组,BRC(10 μ mol/L)处理组,CAB(80 μ mol/L)处理组以及相应DMSO对照处理组,进行CCK8药物敏感实验,发现MMQ OMA1组细胞对BRC($P < 0.05$;图2A)和CAB($P < 0.01$;图2B)药物敏感性降低以及增殖能力升高($P < 0.05$;图2C),验证了我们的猜测circOMA1可能促进DAs耐药。临床上,当患者出现泌乳素瘤时会伴随泌乳素分泌增加,因此我们也探究了circOMA1是否能调节MMQ细胞PRL分泌水平,我们用ELISA检测了MMQ NC组和MMQ OMA1组细胞上清PRL水平,用细胞上清总体PRL分泌水平/细胞活力的比值来表示单个细胞PRL分泌能力,结果发现MMQ OMA1组细胞PRL分泌水平上升($P < 0.05$;图2D),同时我们也检测了不同组细胞胞内PRL表达以检测其PRL合成能力,结果发现MMQ OMA1组细胞PRL合成能力上升($P < 0.05$;图2E)。

2.3 CircOMA1通过调控多巴胺受体促进泌乳素瘤耐药

目前广泛认为,DAs耐药机制主要与DRD2有关,大部分垂体瘤患者存在DRD2和DRD5高表达^[13],为了探究circOMA1是否通过调节多巴胺受体影响泌乳素瘤耐药性及泌乳素分泌,我们检测了MMQ OMA1组DRD2、DRD5表达水平。RT-qPCR及Western blot结果显示,MMQ OMA1组DRD2 mRNA水平及蛋白水平表达下降,DRD5 mRNA水平及蛋白水平表达上升($P < 0.05$;图3A-C)。随后,我们检测了下游cAMP通路表达情况,ELISA结果显示,MMQ OMA1组细胞胞内cAMP水平上升($P < 0.05$;图3D)。

我们进一步探究circOMA1调控多巴胺受体内在分子机制。由于DRD2是主要药物靶点,后续我们主要探究circOMA1是如何调控DRD2。研究发现在垂体腺瘤中DRD2表达受KBTBD7调控^[14]。通过RT-qPCR及Western blot检测发现,MMQ OMA1组细胞KBTBD7 mRNA和蛋白表达升高($P < 0.05$;图3E,F)。通过TargetScan、CircInteractome和circBank等软件分析预测筛选circOMA1下游调控miRNAs及KBTBD7上游调控miRNAs,结果显示KBTBD7 3'UTR序列354-361位置存在miR-145-



A: Level of circOMA1 in drug-sensitive prolactinomas and drug-resistant prolactinoma tissues was determined by qRT-PCR. $t = 3.275$, $1) P = 0.005$ 1 compared with drug-sensitive prolactinomas; B: Expression of GFP after transfection with lentivirus. The images in MMQ, MMQ-NC, and MMQ OMA1 were captured by fluorescence microscopy. Scale bar: 200 μm ; C: Expression of circOMA1 after transfection with lentivirus was determined by qRT-PCR. $t = 5.105$, $1) P = 0.000$ 2 compared with MMQ NC group; D: Expression of miR-145-5p after transfection with lentivirus was determined by qRT-PCR. $t = 10.030$, $1) P < 0.000$ 1 compared with MMQ NC group; E: Expression of TPT1 mRNA after transfection with lentivirus was determined by qRT-PCR. $t = 5.555$, $1) P = 0.005$ 1 compared with MMQ NC group; F: Expression of TPT1 protein after transfection with lentivirus was determined by Western blot. $t = 4.649$, $1) P = 0.009$ 7 compared with MMQ NC group; Data are shown as Mean \pm SEM. $n=5$, 12 in A, $n=3$ in C-F.

图1 耐药泌乳素瘤患者的circOMA1表达水平升高

Fig. 1 CircOMA1 expression was increased in DAs drug-resistant prolactinoma

5p 结合位点, circOMA1 的序列与 miR-145-5p 也存在多个结合位点, 即可能存在 circOMA1/miR-145-5p/KBTBD7 调控网络(图 3G)。我们课题组既往研究中已验证 circOMA1 可以竞争性结合 miR-145-5p^[12]。在本研究中也已发现 circOMA1 可以下调 miR-145-5p 表达($P < 0.000$ 1; 图 1D)。为了探究 circOMA1、miR-145-5p、KBTBD7 三者的调节关系, 分别向 MMQ NC 细胞和 MMQ OMA1 细胞中转染 miR-145-5p mimic, 同时转染 miR-NC 作为对照。结果发现转染 miR-145-5p mimic 后, MMQ OMA1 细胞 KBTBD7 表达下调, DRD2 表达上调($P < 0.05$; 图 3H)。以上结果表明 CircOMA1 通过调控多巴胺受体促进泌乳素瘤耐药(图 4)。

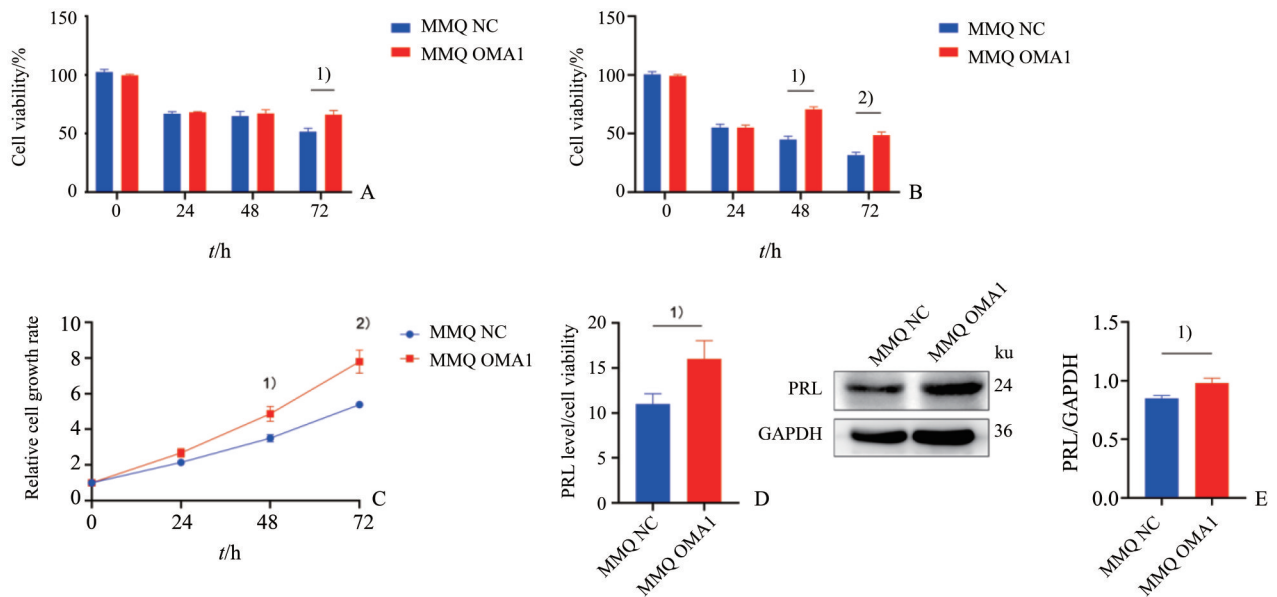
2.4 circOMA1 在体内促进泌乳素瘤耐药

为了在体内进一步探究 circOMA1 对泌乳素瘤 DAs 耐药性及激素分泌的影响及其作用机制, 我们构建了裸鼠皮下肿瘤模型, 发现与 MMQ NC 组相比, MMQ OMA1 组肿瘤增殖速率大于 MMQ NC 组($P < 0.05$; 图 5A)。在第 14 天, 对裸鼠腹腔分别注

射 CAB 和 BRC, 观察不同组移植瘤耐药性。CAB 用药后, 与 MMQ NC 组相比, MMQ OMA1 组裸鼠肿瘤体积和体重都大于 MMQ NC 组($P < 0.05$; 图 5B-D), 而 BRC 用药后, 两组裸鼠肿瘤体积和体重差异无统计学意义。此外, ELISA 法检测不同组裸鼠血浆 PRL 含量, 发现 CAB 或 BRC 用药后, MMQ OMA1 组裸鼠血浆 PRL 水平都高于 MMQ NC 组($P < 0.05$; 图 5F)。体内实验也验证了 circOMA1 可促进泌乳素瘤增殖、激素分泌及 DAs 耐药。为了检测裸鼠皮下肿瘤内多巴胺受体表达, 采用免疫组化检测各组肿瘤中 DRD2 和 DRD5 表达水平, 发现与 MMQ NC 组相比, MMQ OMA1 组 DRD2 表达下降, DRD5 表达上升($P < 0.05$; 图 5G), 体内实验结果与细胞实验结果相符。

3 讨论

因为垂体腺瘤大多为良性肿瘤, 基因突变导致肿瘤发生发展的报道较少, 因此研究转录后调控机



A: The cell viability of MMQ NC and MMQ OMA1 cells co-cultured with BRC (10 μmol/L) for 0, 24, 48, and 72 h was determined by CCK8 assay. $t = 3.059$, 1) $P = 0.0136$ compared with MMQ NC group; B: The cell viability of MMQ NC and MMQ OMA1 cells co-cultured with CAB (80 μmol/L) for 0, 24, 48, and 72 h was determined by CCK8 assay. $t = 7.330$, 1) $P = 0.000$ 2) compared with MMQ NC group; $t = 4.448$, 2) $P = 0.0030$ compared with MMQ NC group; C: The relative cell growth rate of MMQ NC and MMQ OMA1 cells for 0, 24, 48, and 72 h was determined by CCK8 assay. $t = 2.687$, 1) $P = 0.031$ 2) compared with MMQ NC group; $t = 3.196$, 2) $P = 0.015$ 2) compared with MMQ NC group; D: The PRL level/cell viability of MMQ NC and MMQ OMA1 cells was determined by ELISA and CCK8 assay. $t = 3.750$, 1) $P = 0.019$ 9 compared with MMQ NC group; E: Expression of PRL protein was determined by Western blot. $t = 2.784$, 1) $P = 0.031$ 8 compared with MMQ NC group; Data are shown as Mean±SEM. $n=3$.

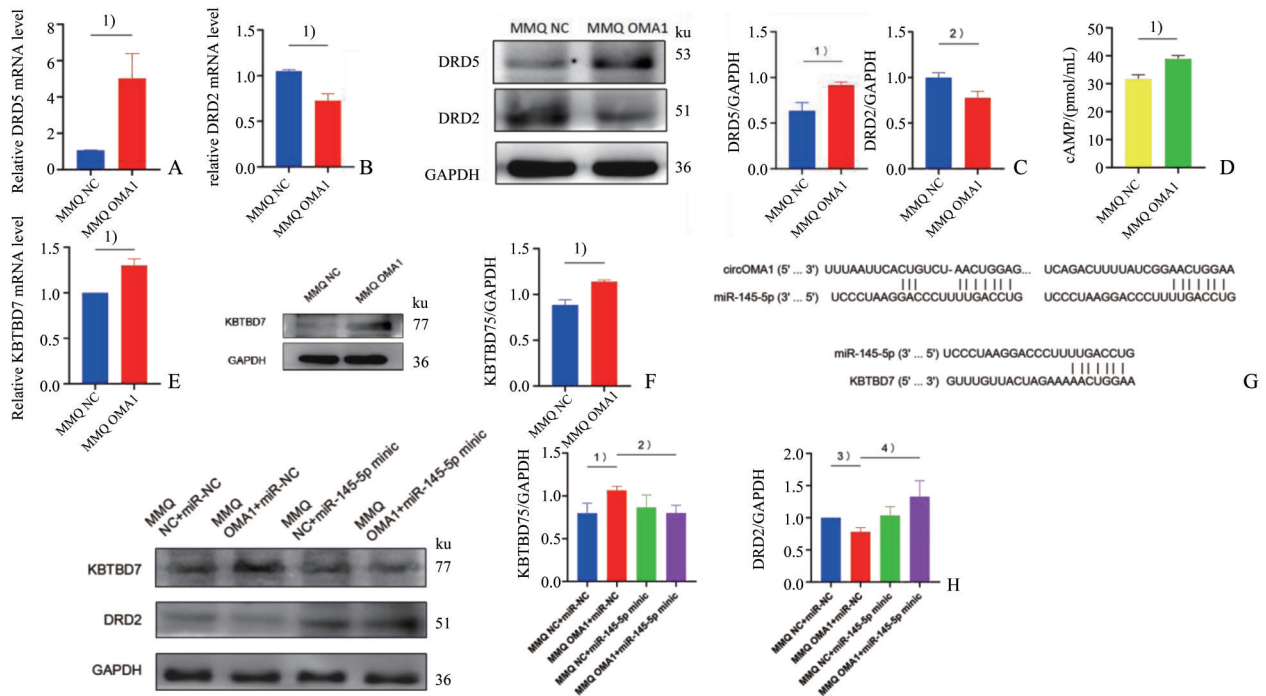
图2 CircOMA1促进泌乳素瘤耐药

Fig. 2 CircOMA1 promoted the drug resistance of prolactinoma

制的改变对泌乳素瘤耐药作用更有意义。circRNAs是一种新兴的有着重要生物学作用的保守单链非编码RNA,通过前体mRNA的反向剪接而成,具有共价封闭、连续稳定的环状结构^[15]。circRNAs介导肿瘤耐药的机制多种多样,但最常作为miRNAs“海绵”竞争性结合miRNAs阻断其对靶基因的抑制作用^[15-16]。在非小细胞肺癌细胞和癌组织中,Hong等^[17]研究发现circ-CPA4表达升高,其可作为let-7 miRNA的“海绵”作用于程序性死亡受体-配体1(PD-L1),促进癌细胞的生长、迁移、上皮间充质转化以及增加其对顺铂的耐药性。在肝细胞癌(HCC)中,研究发现在索拉非尼耐药的肝癌细胞中circRNA-SORE通过竞争性结合miR-103a-2-5p和miR-660-3p,激活Wnt/β-catenin信号通路,促进索拉非尼耐药^[18],还发现circFOXM1通过竞争性结合miR-1324调节MECP2,促进肝癌细胞的索拉非尼耐药^[19]。此外,circRNAs也可以与RNA相关蛋白结合形成RNA-蛋白复合物调节基因转录,例如circRNA-SORE在细胞质中与促癌蛋白YBX1结合,阻止YBX1与E3泛素连接酶PRP19

相互作用,从而阻断PRP19介导的YBX1降解,促进索拉非尼耐药性^[20]。近年来,在泌乳素瘤中越来越多的研究揭示了非编码RNA通过靶向调控信号通路调控肿瘤耐药性,但circRNAs在泌乳素瘤中的作用尚无报道,并且非编码RNA与广泛认同的DRD2相关的耐药机制之间的是否有关联尚未可知。

我们发现在临床耐药泌乳素瘤标本中存在circOMA1表达水平升高现象。以此现象为问题导向,探究circOMA1在泌乳素瘤中的作用及调控机制。以往对于泌乳素瘤耐药性研究主要聚焦于细胞增殖调控^[21],对于激素分泌改变探讨较少,但在临床中泌乳素瘤患者耐药性表现为泌乳素水平无法下降到正常以及肿瘤直径没有缩小50%以上。为了更好地探索circOMA1在临床耐药泌乳素瘤中的实际作用,本研究同时探讨了circOMA1对耐药机制中细胞增殖和激素分泌两个方面的影响,通过CCK8检测细胞活力以反映细胞增殖水平,并通过ELISA及western blot检测细胞上清及胞内PRL以反映细胞激素分泌水平。我们发现circOMA1在体



A: Expression of DRD5 mRNA was determined by qRT-PCR. $t = 2.942$, 1) $P = 0.0087$ compared with MMQ NC group; B: Expression of DRD2 mRNA was determined by qRT-PCR. $t = 4.176$, 1) $P = 0.0007$ compared with MMQ NC group; C: Expression of DRD5 protein and DRD2 protein was determined by Western blot. $t = 2.875$, 1) $P = 0.0283$ compared with MMQ NC group; $t = 2.514$, 2) $P = 0.0456$ compared with MMQ NC group; D: The cAMP level of MMQ NC and MMQ OMA1 cells was determined by ELISA. $t = 3.761$, 1) $P = 0.0198$ compared with MMQ NC group; E: Expression of KBTBD7 mRNA was determined by qRT-PCR. $t = 4.235$, 1) $P = 0.0133$ compared with MMQ NC group; F: Expression of KBTBD7 protein was determined by Western blot. $t = 4.262$, 1) $P = 0.0130$ compared with MMQ NC group; G: Bioinformatics prediction showed the potential binding sites of miRNAs in circOMA1 and KBTBD7; H: Expression of KBTBD7 protein and DRD2 protein after transfection with miR-145-5p mimic was determined by Western blot. $t = 2.553$, 1) $P = 0.0433$ compared with MMQ NC+miR-NC group; $t = 2.616$, 2) $P = 0.0308$ compared with MMQ OMA1+miR-NC group; $t = 3.351$, 3) $P = 0.0101$ compared with MMQ NC+miR-NC group; $t = 2.395$, 4) $P = 0.0478$ compared with MMQ OMA1+miR-NC group; Data are shown as Mean \pm SEM. $n=3$.

图3 CircOMA1通过调控多巴胺受体促进泌乳素瘤耐药

Fig. 3 CircOMA1 promoted prolactinoma resistance by regulating dopamine receptors

内外都能促进泌乳素瘤增殖、泌乳素分泌及DAs耐药性。DRD2为主要药物靶点,垂体腺瘤中存在DRD2、DRD5高表达,DRD2和DRD5都参与泌乳素分泌调控,DRD5与G α s蛋白偶联,激活腺苷酸环化酶(ADCY),导致细胞内cAMP水平的增加;DRD2与G α i蛋白结合,抑制ADCY活性和cAMP的产生。我们发现circOMA1主要通过下调DRD2表达降低对DAs敏感性,而且在下调DRD2的同时上调了DRD5表达,从而激活了cAMP通路,促进泌乳素合成释放。该研究结果也表明了泌乳素瘤中非编码RNA的改变与广泛认同的DRD2有关的耐药机制可能存在关联。

由于DRD2表达改变不符合circRNAs-miRNAs-靶基因的改变趋势,并且通过catRAPID软件预测分析发现,DRD2与circRNAs结合形成RNA-

蛋白复合物得分小于0.5,认为其不具备结合circRNA的能力。因此我们认为DRD2更可能受到circOMA1间接调控。既往研究发现在垂体腺瘤中KBTBD6/7-泛素连接酶复合物能够通过泛素化DRD2,调控垂体肿瘤对DAs的敏感性^[14],提示我们circOMA1可能通过影响泛素化间接调控DRD2。泛素化反应是泛素附着在底物蛋白质上的反应,调节底物的稳定性、功能和蛋白质之间的相互作用^[22-23]。KBTBD7是BTB-kelch家族成员,在N端包含一个BTB结构域,在C端包含五个kelch重复序列。在BTB家族中,BTB结构域作为一个蛋白相互作用模块,能够与自身结合并与非BTB蛋白相互作用^[24]。例如KBTBD6/7能够通过Cullin 3(CUL3)结合形成由CUL3复合物组成的cullin-ring连接酶,介导T细胞淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋

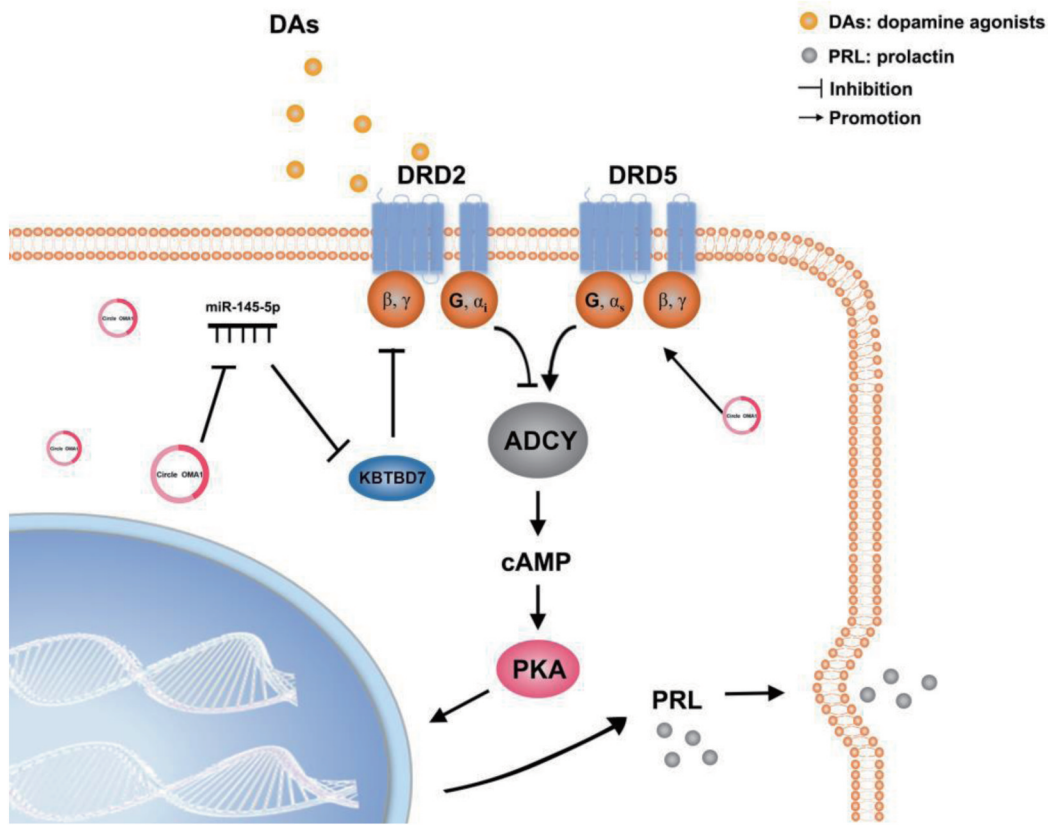


图4 CircOMA1促进泌乳素瘤耐药机制

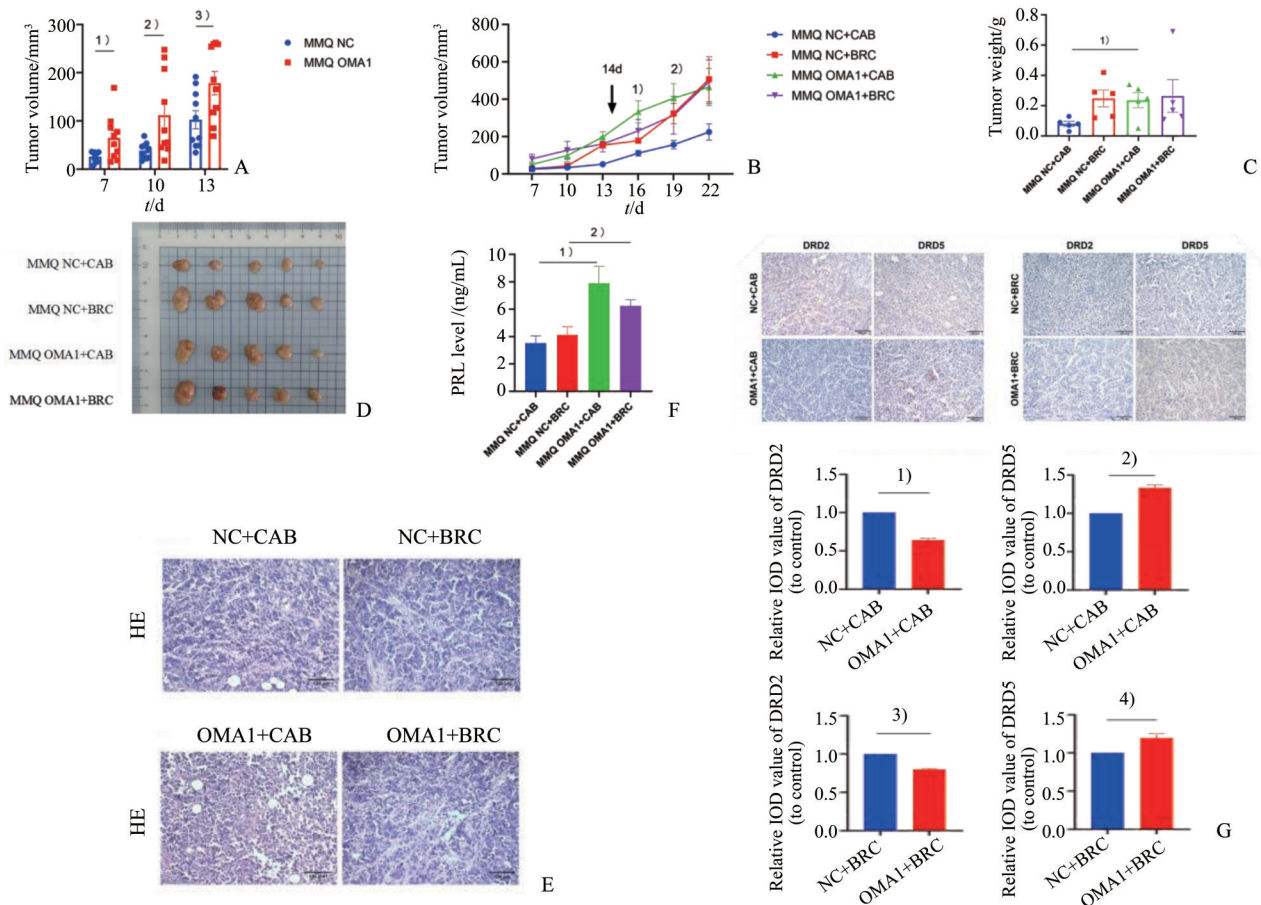
Fig. 4 A model of circOMA1 mediated-DAs resistance in prolactinoma

白1(TIAM1)的泛素化及随后的蛋白酶体降解^[25]。我们通过TargetScan等软件分析预测,发现存在circOMA1/miR-145-5p/KBTBD7调控网络,并且miR-145-5p mimic补救实验表明miR-145-5p抑制KBTBD7表达,从而抑制了DRD2泛素化降解,且逆转了circOMA1促进KBTBD7表达的作用,验证circOMA1可能通过miR-145-5p/KBTBD7轴调控多巴胺受体从而促进泌乳素瘤耐药性。以上结果表明circOMA1可能通过miR-145-5p/KBTBD7轴,下调DRD2表达降低药物敏感性,下调DRD2的同时上调DRD5表达,激活cAMP通路,促进PRL合成释放,从而促进泌乳素瘤DAs耐药(图4)。

本研究不足之处在于,由于垂体腺瘤没有人源永生生化肿瘤细胞系并且大鼠中不存在鼠源circOMA1表达,所以只能通过构建外源性circOMA1 MMQ细胞系模型对circOMA1作用机制进行探究。由于hsa-miR-145-5p与rno-miR-145-5p序列完

全相同,在MMQ细胞中circOMA1通过竞争性结合rno-miR-145-5p对下游靶基因进行调控可能可以模拟在人源垂体腺瘤细胞中circOMA1通过竞争性结合hsa-miR-145-5p进行调控,但人和大鼠之间存在其他miRNAs及蛋白差异,导致该研究结果可能仅能体现circOMA1调控rno-miR-145-5p引起下游蛋白改变,不能模拟人体内circOMA1表达水平升高引起多种miRNAs及蛋白的调控网络的改变。同时,也需要更进一步的实验验证circOMA1对hsa-miR-145-5p与rno-miR-145-5p发挥相似调控作用。对此,应构建原代垂体腺瘤模型对circOMA1作用机制进行探究可能更具有临床意义。

综上,本研究明确了circOMA1可以通过调控多巴胺受体表达引起泌乳素瘤药物敏感性降低和泌乳素分泌水平增加,从而增强了泌乳素瘤耐药性。本研究也预示着circOMA1可能成为耐药泌乳素瘤靶向治疗的新靶点。



A: Tumor volume in MMQ NC and MMQ OMA1 groups before DAs treatment. $t = 2.585$, 1) $P = 0.0184$ compared with MMQ NC group; $t = 2.639$, 2) $P = 0.0167$ compared with MMQ NC group; $t = 2.484$, 3) $P = 0.0232$ compared with MMQ NC group; B: Tumor volume in four groups after DAs treatment. $t = 3.641$, 1) $P = 0.0066$ compared with MMQ NC+CAB group; $t = 3.020$, 2) $P = 0.0232$ compared with MMQ NC+CAB group; C: Tumor weight in four groups after DAs treatment. $t = 3.641$, 1) $P = 0.0066$ compared with MMQ NC+CAB group; D: The image of tumors derived from MMQ xenografts in four groups; E: HE staining of the tumors. Scale bar: 100 μm ; F: The plasma PRL level of four groups after DAs treatment was determined by ELISA. $t = 3.261$, 1) $P = 0.0172$ compared with MMQ NC+CAB group; $t = 2.831$, 2) $P = 0.0299$ compared with MMQ NC+BRC group; G: Expression of DRD2 protein and DRD5 protein of four groups after DAs treatment was determined by IHC. Scale bar: 100 μm . $t = 15.99$, 1) $P < 0.0001$ compared with MMQ NC+CAB group; $t = 8.379$, 2) $P = 0.0011$ compared with MMQ NC+CAB group; $t = 21.19$, 3) $P < 0.0001$ compared with MMQ NC+BRC group; $t = 3.651$, 4) $P = 0.0217$ compared with MMQ NC+BRC group; Data are shown as Mean \pm SEM. $n = 10$ in A, $n = 5$ in B, C, F, G.

图5 CircOMA1在体内促进泌乳素瘤耐药

Fig. 5 CircOMA1 promoted the drug resistance of prolactinoma in vivo

参考文献

- [1] Mehta GU, Lonser RR. Management of hormone-secreting pituitary adenomas[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(6): 762-773.
- [2] 陈文立, 姚顺, 王梦琦, 等. 垂体腺瘤与认知功能相关研究进展[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2019, 45(9): 569-572.
Chen WL, Yao S, Wang MQ, et al. Research progress on pituitary adenoma and cognitive function[J]. *Chin J Nervous Mental Dis*, 2019, 45(9): 569-572.
- [3] 谭奕珩, 罗美, 朱永红, 等. 免疫检查点抑制剂在垂体腺瘤中的研究进展[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2021, 47(8): 497-501.
Tan YH, Luo M, Zhu YH, et al. Research progress of immune checkpoint inhibitors in pituitary adenomas[J]. *Chin J Nervous Mental Dis*, 2021, 47(8): 497-501.
- [4] Molitch ME. Diagnosis and treatment of pituitary adenomas[J]. *JAMA*, 2017, 317(5): 516.

- [5] Molitch ME. Pharmacologic resistance in prolactinoma patients[J]. *Pituitary*, 2005, 8(1): 43-52.
- [6] Bueno C, Trarbach EB, Bronstein MD, et al. Cabergoline and prolactinomas: lack of association between DRD2 polymorphisms and response to treatment[J]. *Pituitary*, 2017, 20(3): 295-300.
- [7] Wu ZB, Zheng WM, Su ZP, et al. Expression of D2RmRNA isoforms and ERmRNA isoforms in prolactinomas: correlation with the response to bromocriptine and with tumor biological behavior[J]. *J Neurooncol*, 2010, 99(1): 25-32.
- [8] Li Q, Su Z, Liu J, et al. Dopamine receptor D2S gene transfer improves the sensitivity of GH3 rat pituitary adenoma cells to bromocriptine[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 377-384.
- [9] Shimazu S, Shimatsu A, Yamada S, et al. Resistance to dopamine agonists in prolactinoma is correlated with reduction of dopamine D2 receptor long isoform mRNA levels[J]. *Eur J Endocrinol*, 2012, 166(3): 383-390.
- [10] Hu B, Mao Z, Du Q, et al. miR-93-5p targets Smad7 to regulate the transforming growth factor- β 1/Smad3 pathway and mediate fibrosis in drug-resistant prolactinoma [J]. *Brain Research Bulletin*, 2019, 149: 21-31.
- [11] Xiao Z, Wang Z, Hu B, et al. MiR-1299 promotes the synthesis and secretion of prolactin by inhibiting FOXO1 expression in drug-resistant prolactinomas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 79-85.
- [12] Du Q, Hu B, Feng Y, et al. circOMA1-mediated miR-145-5p suppresses tumor growth of nonfunctioning pituitary adenomas by targeting TPT1 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(6): 2419-2434.
- [13] 刘衍挺,张勇,王宇,等.多巴胺受体亚型DRD2、DRD5在垂体瘤药物治疗中的作用[J]. *中华医学杂志*, 2019(22): 1703-1706.
- Liu YT, Zhang Y, Wang Y, et al. Role of dopamine receptor subtypes DRD2 and DRD5 in drug therapy of pituitary tumors [J]. *Natl Med J Chin*, 2019 (22): 1703-1706.
- [14] Liu YT, Liu F, Cao L, et al. The KBTBD6/7-DRD2 axis regulates pituitary adenoma sensitivity to dopamine agonist treatment[J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(3): 377-396.
- [15] Tang X, Ren H, Guo M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 910-928.
- [16] Zhang M, Bai X, Zeng X, et al. circRNA-miRNA-mRNA in breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 120-130.
- [17] Hong W, Xue M, Jiang J, et al. Circular RNA circ-CPA4/let-7 miRNA/PD-L1 axis regulates cell growth, stemness, drug resistance and immune evasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 149.
- [18] Xu J, Wan Z, Tang M, et al. N(6)-methyladenosine-modified CircRNA-SORE sustains sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by regulating β -catenin signaling[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 163.
- [19] Weng H, Zeng L, Cao L, et al. circFOXM1 contributes to sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by regulating MECP2 via miR-1324 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 811-820.
- [20] Xu J, Ji L, Liang Y, et al. CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 298.
- [21] Liu X, Tang C, Wen G, et al. The mechanism and pathways of dopamine and dopamine agonists in prolactinomas [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 768.
- [22] Dang F, Nie L, Wei W. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2): 427-438.
- [23] Pérez-Benavente B, Nasresfahani AF, Farràs R. Ubiquitin-regulated cell proliferation and cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1233: 3-28.
- [24] Hu J, Yuan W, Tang M, et al. KBTBD7, a novel human BTB-kelch protein, activates transcriptional activities of SRE and AP-1 [J]. *BMB Rep*, 2010, 43(1): 17-22.
- [25] Genau HM, Huber J, Baschieri F, et al. CUL3-KBTBD6/KBTBD7 ubiquitin ligase cooperates with GABARAP proteins to spatially restrict TIAM1-RAC1 signaling [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(6): 995-1010.