

微小 RNA-125a-5p 对胰腺癌细胞吉西他滨耐药的影响

邹艳丽 朱庆曦 田霞 占婷 陈小丽

武汉市第三医院(武汉大学附属同仁医院)消化内科,湖北武汉 430060

摘要 目的:检测胰腺癌(PC)组织及 PC 细胞系中微小 RNA(miRNA,miR)-125a-5p 的表达及其对 PC 细胞吉西他滨(Gem)耐药性的影响。方法:收集 13 对 PC 及对应癌旁组织标本;构建 PC Gem 耐药细胞系;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证所有样本 miR-125a-5p 的表达;通过癌症基因组图谱(TCGA)数据库对 PC 患者的生存预后进行差异分析;转染 miR-125a-5p 模拟物(mimic)及抑制剂,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 PC 细胞 Gem 的半数抑制浓度(IC50),探讨 miR-125a-5p 对细胞耐药的影响。数据库预测 miR-125a-5p 的靶基因,蛋白印迹法检测 miR-125a-5p 对信号转导和转录激活因子 3(STAT3)蛋白表达的影响。结果:PC 组织 miR-125a-5p 的表达显著低于癌旁组织,PC 细胞系 miR-125a-5p 的表达较正常胰腺细胞明显降低。miR-125a-5p 与 PC 患者的生存预后密切相关。miR-125a-5p 在 Gem 处理的 PC 细胞表达下调。与非耐药细胞比较,耐药细胞 miR-125a-5p 的表达明显减低。CCK-8 结果显示转染 miR-125a-5p 模拟物后细胞的 IC50 值显著降低,转染 miR-125a-5p 抑制剂后细胞的 IC50 值显著升高。过表达 miR-125a-5p 抑制 STAT3 蛋白的表达。结论:miR-125a-5p 在 PC 中表达降低,并与 PC 患者生存预后相关,miR-125a-5p 可能通过抑制 STAT3 介导 PC Gem 耐药。

关键词 胰腺癌;微小 RNA-125a-5p;吉西他滨;耐药

中图分类号 R735.9 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20250417

Effect of microRNA-125a-5p on gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells ZOU Yan-li, ZHU Qing-xi, TIAN Xia, ZHAN Ting, CHEN Xiaoli. Department of Gastroenterology, Wuhan Third Hospital, Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan Hubei 430060, China

Corresponding author: CHEN Xiao-li, E-mail: 962493086@qq.com

Abstract Objective: To detect the expression of microRNA (miRNA, miR)-125a-5p in pancreatic cancer (PC) tissues and cell lines and its effect on gemcitabine (Gem) resistance of PC cells. Methods: A total of 13 pairs of PC and adjacent non-cancer tissue samples were collected. Gem resistant PC cell lines were constructed. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the expression level of miR-125a-5p in all samples. The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to analyze the differential prognosis of PC patients. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the half inhibitory concentration (IC50) of Gem in PC cells after transfection with miR-125a-5p mimic or inhibitor, to investigate the effect of miR-125a-5p on drug resistance of cells. The database was used to predict the target genes of miR-125a-5p, and Western blotting was employed to examine the effect of miR-125a-5p on the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. Results: The expression of miR-125a-5p in the PC tissue was significantly lower than that in the adjacent cancerous tissue. The expression of miR-125a-5p in PC cell lines was significantly lower than that in the normal control cells. Expression of miR-125a-5p was closely related to the prognosis of PC patients. Expression of miR-125a-5p was down-regulated in PC cells treated with Gem. Compared with non-drug resistant cells, the expression of miR-125a-5p was significantly reduced in drug resistant cells. CCK-8 data showed that the IC50 value of cells was significantly decreased after transfection with miR-125a-5p mimic, while the IC50 value was significantly increased after transfection with miR-125a-5p inhibitor. Overexpression of miR-125a-5p inhibited the expression of STAT3 protein. Conclusions: The miR-125a-5p is low expression in PC cells and correlated with the survival prognosis of PC patients. The miR-125a-5p may mediate the Gem resistance of PC cells by inhibiting STAT3.

Key words Pancreatic cancer; miR-125a-5p; Gemcitabine; Drug resistance

胰腺癌(pancreatic cancer,PC)是一种预后极差的消化系统恶性肿瘤^[1,2],早期症状隐匿,大多数患者确诊时已属晚期,仅有 20%~25% 的患者可进行根治性手术切除^[3]。PC 极具侵袭性的肿瘤生物学

特性,对化疗、放疗、靶向药物和免疫治疗的耐药性使其治疗复杂化^[4]。吉西他滨(gemcitabine, Gem)用于 PC 的一线化疗方案,在一定程度上可提高患者生存率,但总体有效率低于 20%^[5]。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种小的非编码 RNA 分子,通过阻碍 mRNA 的翻译或稳定性来调节基因转录后的表达^[6],可作为疾病诊断和预后评估的标志物^[7~10]。研究报道,miR-125a-5p 在胃癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌等多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[11~14]。本研究检测 miR-125a-5p 在 PC 中的表达并分析其与 PC 患者预后的关系,探讨 miR-125a-5p 对 PC 细胞 Gem 耐药性的影响及可能的作用机制。

材料与方法

1. 临床标本:选取武汉大学附属同仁医院病理检查确诊的 PC 组织标本 13 对,每对包含 PC 及对对应癌旁组织(距离癌组织边界 ≤ 3 cm)。本研究经医院伦理委员会批准(KY2019-012),所有受试者均知情并签署同意书。

2. miR-125a-5p 的预后分析:收集癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中 178 例胰腺癌样本 miR-125a-5p 的表达和预后数据,其中 miR-125a-5p 高表达和低表达组各 89 例,采用 Kaplan-Meier 方法对 miR-125a-5p 进行生存分析,以 miR-125a-5p 为自变量,生存时间为因变量,采用 Log-Rank 检验,比较不同 miR-125a-5p 表达水平患者的总生存期(overall survival, OS),确定 miR-125a-5p 是否是 PC 有效预后生物标志物。

3. 主要试剂和材料:胎牛血清、RPMI-1640 及 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;人胰腺导管正常细胞 H6C7 及 4 种人 PC 细胞系 PANC1、MIA-PaCa2、AsPC1、BxPC3 购自中国科学院细胞库, Gem 耐药 PC 细胞系 PANC1/Gem 和 MIA-PaCa2/Gem 源自医院中心实验室;Gem 购于美国 Sigma 公司;miR-125a-5p 模拟物(mimic)以及阴性对照(mimic nc)、miR-125a-5p 抑制剂以及阴性对照购于上海吉玛公司;Trizol 试剂购自日本 TAKARA 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Promega 公司;miR-125a-5p 逆转录检测试剂盒购自广州锐博公司;荧光定量 PCR 检测试剂盒购自北京康为世纪公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海碧云天公司;信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体购

自美国 CST 公司。

4. 细胞培养:PANC1 和 MIA-PaCa2 培养于 DMEM 培养基, H6C7、AsPC1 和 BxPC3 培养于 RP-MI-1640 培养基,上述培养基均含有 1% 青-链霉素及 10% 胎牛血清,在 5% CO₂ 条件下 37℃ 恒温培养。

5. RNA 的提取及实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR):Trizol 试剂用于组织及细胞总 RNA 的提取,按照试剂盒说明书要求合成 cDNA。取 2 μ L 稀释的 cDNA 为模板,进行扩增反应,qRT-PCR 检测 miR-324-5p 的表达。U6 作为内对照,组织样本 miR-324-5p 的相对表达量用 2^{- Δ CT} 计算,细胞系 miR-324-5p 的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算。

6. 细胞转染:将细胞接种于 6 孔板,待细胞融合率达 60%,将 miR-125a-5p mimic 及 mimic nc 转染细胞,作为 miR-125a-5p mimic 组及 mimic nc 组;将 miR-125a-5p 抑制剂及抑制剂阴性对照转染细胞,作为 miR-125a-5p 抑制剂组及抑制剂阴性对照组。转染步骤严格按照 Lipofectamine 2000 说明书进行。

7. CCK-8 测定细胞活性和 Gem 半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀):将细胞接种于 96 孔板,培养 1 d 后用不同浓度(0、0.2、1、5、25 及 125 μ mol/L) Gem 处理细胞,继续培养 3 d,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,测定细胞在 450 nm 处吸光度值,计算细胞 IC₅₀ 值。

8. 蛋白免疫印迹实验:细胞裂解液裂解待测细胞,提取总蛋白后测定其浓度。取等量蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,然后与相应一抗 4℃ 孵育过夜,再用二抗室温孵育 1 h, ECL 试剂盒进行显色、显影,成像仪扫描分析结果。

9. 统计学分析:应用 SPSS 22.0 统计软件。应用 GraphPad Prism 软件制图。正态分布计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1. miR-125a-5p 在 PC 的表达及预后意义:qRT-PCR 结果显示,PC 组织 miR-125a-5p 的表达水平明显低于对应癌旁组织,见图 1A。与正常胰腺细胞相比,PC 细胞系 miR-125a-5p 的表达水平均显著降

低,见图 1B。通过 TCGA 数据库对 PC 患者的生存预后进行差异分析,得到高表达和低表达 miR-125a-5p 的 PC 患者生存曲线,发现 miR-125a-5p 对 PC 具有显著的预后意义,见图 1C。

2. miR-125a-5p 在经 Gem 处理的 PC 细胞中低

表达:用不同浓度(0、10、20 $\mu\text{mol/L}$) Gem 处理 PC 细胞,qRT-PCR 结果表明,经 Gem 处理后 PC 细胞的 miR-125a-5p 表达明显减低,见图 2A、2B。与非耐药细胞相比,耐药细胞 miR-125a-5p 的表达明显降低,见图 2C、2D。

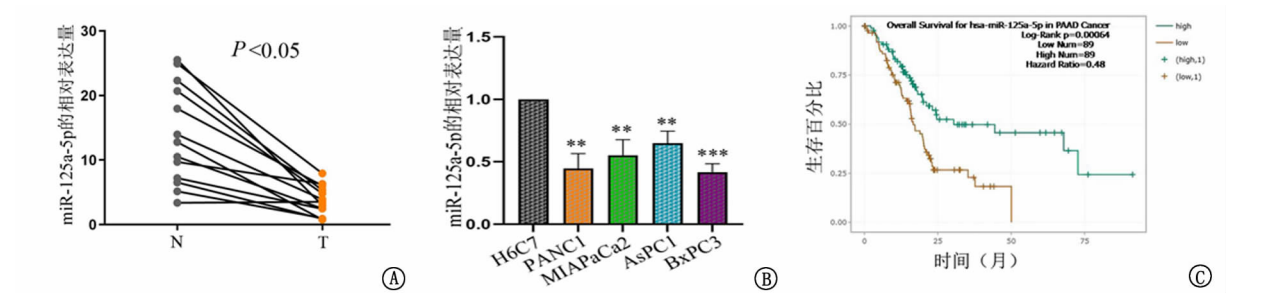


图 1 miR-125a-5p 在 PC 的表达及预后意义(A 中 T 为癌组织;N 为癌旁组织, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

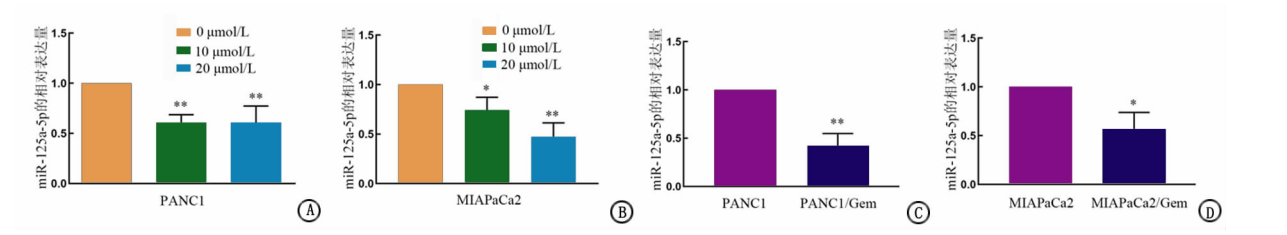


图 2 miR-125a-5p 在经 Gem 处理的 PC 细胞中低表达 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3. miR-125a-5p 对 PC 细胞 Gem 耐药性的影响:将 miR-125a-5p mimic、mimic nc、miR-125a-5p 抑制剂以及阴性对照转染细胞,次日每孔加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Gem,2 d 后进行检测。CCK-8 结果表明,相比于 mimic nc 组,miR-125a-5p mimic 组细胞的 IC50 值明显降低。反之,相比于抑制剂阴性对照组,miR-125a-5p 抑制剂组细胞的 IC50 值明显升高,见图 3A、3B。以上结果表明 miR-125a-5p 可抑制 PC 细胞 Gem 的耐药性。

于 mimic nc 组,miR-125a-5p mimic 组 STAT3 的蛋白表达水平明显降低,见图 4。

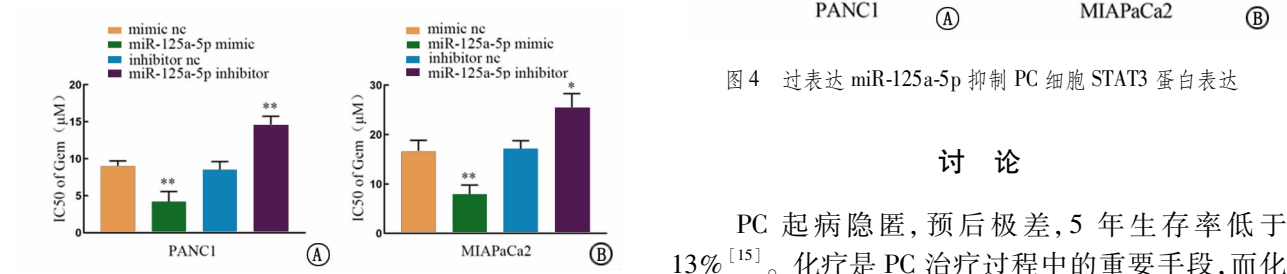


图 3 miR-125a-5p 减弱 PC 细胞对 Gem 的耐药性 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4. 过表达 miR-125a-5p 靶向抑制 PC 细胞 STAT3 蛋白表达:蛋白免疫印记实验结果表明,相比

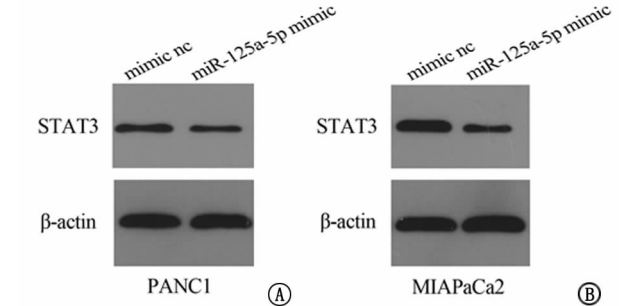


图 4 过表达 miR-125a-5p 抑制 PC 细胞 STAT3 蛋白表达

讨论

PC 起病隐匿,预后极差,5 年生存率低于 13%^[15]。化疗是 PC 治疗过程中的重要手段,而化疗耐药常常导致治疗失败和复发^[16]。近年来,miRNA 在肿瘤发生发展及耐药中的作用得到了充分认识^[17]。研究表明 miR-455-3p 在 PC 中低表达,并可靶向作用于 PDZ 结合基序的转录共激活子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif,TAZ),

调节细胞增殖、凋亡及对 Gem 化疗的敏感性^[18]。miR-331-3p 通过肿瘤抑制基因 7L (suppression of tumorigenicity 7 like, ST7L) 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 PC 细胞耐药^[19]。研究报道 miR-125a-5p 通过靶向 STAT3 在 PC 中发挥抑癌作用,从而诱导自噬和细胞凋亡^[20]。miR-125a-5p 在多种肿瘤中表达下调,可发挥抑癌作用并调控化疗药物敏感性^[21,22],与本研究一致。

本研究发现,miR-125a-5p 在 PC 组织中的表达明显低于癌旁组织,miR-125a-5p 在 PC 细胞系中的表达低于正常胰腺细胞。本研究结果提示 miR-125a-5p 是 PC 有效预后生物标志物。本研究中 miR-125a-5p 在经 Gem 处理的 PC 细胞中低表达。相比于非耐药细胞,miR-125a-5p 在耐药细胞中表达明显降低。这些结果提示 miR-125a-5p 可能在 PC 中发挥肿瘤抑制作用,且与 Gem 耐药有关。本研究中过表达 miR-125a-5p 可增强细胞对 Gem 化疗敏感性,抑制 miR-125a-5p 可减弱细胞对 Gem 化疗敏感性。靶基因预测数据库筛选出 STAT3 是 miR-125a-5p 的靶基因,本研究发现过表达 miR-125a-5p 可抑制 STAT3 的蛋白表达水平。STAT3 是一种关键的转录因子,在肿瘤发生和耐药过程中起着至关重要的作用^[23]。Chen 等^[24]报道 STAT3 调控肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (tumor necrosis factor α -induced protein 3, TNFAIP3) 的表达,该基因与 PC 细胞 Gem 耐药有关,提出 STAT3 有望成为治疗 PC 化疗耐药的靶点。Zhao 等^[25]发现 miR-125a-5p 通过调节 STAT3 的表达,使食管鳞状细胞癌细胞对顺铂治疗表现出更高的敏感性。本文提示 miR-125a-5p 可能通过 STAT3 介导胰腺癌细胞耐药。

参考文献

- 1 Hu JX,Zhao CF,Chen WB,et al. Pancreatic cancer: a review of epidemiology, trend, and risk factors[J]. World J Gastroenterol,2021,27(27):4298-4321.
- 2 蔡会龙,原伟光,安静,等.1990 年和 2019 年中国 PC 疾病负担及危险因素研究[J]. 中华全科医学,2023,21(2):337-340.
- 3 杨尹默,刘光年,田孝东. PC 外科治疗若干热点问题[J]. 中国实用外科杂志,2023,43(7):729-734.
- 4 Beutel AK,Halbrook CJ. Barriers and opportunities for gemcitabine in pancreatic cancer therapy[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2023,324(2):C540-C552.
- 5 Siegel RL,Miller KD,Jemal A. Cancer statistics,2020[J]. CA Cancer J Clin,2020,70(1):7-30.
- 6 Chen H. microRNA-Based cancer diagnosis and therapy[J]. Int J Mol Sci,2023,25(1).
- 7 杨仕良. 血清微小 RNA-92a、微小 RNA-34a、微小 RNA-181c 水平

对急性脑梗死诊断及预后评估有重要价值[J]. 内科急危重症杂志,2023,29(1):41-45.

- 8 胡氏亮. 外周血 miR-10a 和 miR-29a 水平对早期脓毒症急诊患者预后预测作用[J]. 内科急危重症杂志,2022,28(3):211-214.
- 9 胡丽芳,李岚,严倩. miR-2467、miR-96-5p 在妊娠期糖尿病中的临床意义[J]. 内科急危重症杂志,2024,30(2):134-137.
- 10 谷履冰,胥明,陶光明. 血浆 miR-181a-5p 可评估急性脑梗死的病情及预后[J]. 内科急危重症杂志,2023,29(3):218-221.
- 11 Dos SM,Pereira JN,De Labio RW,et al. Decrease of miR-125a-5p in gastritis and gastric cancer and its possible association with H. pylori[J]. J Gastrointest Cancer,2021,52(2):569-574.
- 12 Yang X, Qiu J, Kang H, et al. miR-125a-5p suppresses colorectal cancer progression by targeting VEGFA [J]. Cancer Manag Res, 2018,10:5839-5853.
- 13 Lv A,Tu Z,Huang Y,et al. Circulating exosomal miR-125a-5p as a novel biomarker for cervical cancer[J]. Oncol Lett,2021,21(1):54.
- 14 Minini M,Senni A,He X,et al. miR-125a-5p impairs the metastatic potential in breast cancer via IP (6) K1 targeting[J]. Cancer Lett, 2021,520:48-56.
- 15 Siegel RL,Giaquinto AN,Jemal A. Cancer statistics,2024 [J]. CA Cancer J Clin,2024,74(1):12-49.
- 16 Zeng S,Pottler M,Lan B,et al. Chemoresistance in pancreatic cancer [J]. Int J Mol Sci,2019,20(1):18.
- 17 He B,Zhao Z,Cai Q,et al. miRNA-based biomarkers therapies and resistance in Cancer[J]. Int J Biol Sci,2020,16(14):2628-2647.
- 18 Zhan T,Huang X,Tian X,et al. Downregulation of MicroRNA-455-3p links to proliferation and drug resistance of pancreatic cancer cells via targeting TAZ[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2018,10(2):215-226.
- 19 Zhan T,Chen X,Tian X,et al. MiR-331-3p links to drug resistance of pancreatic cancer cells by activating WNT/ β -catenin signal via ST7L[J]. Technol Cancer Res Treat,2020,19(1):1-8.
- 20 Pan L,Qin Z,Zhou Q,et al. Unlocking the therapeutic potential:harnessing miR-125a-5p to enhance autophagy and apoptosis in pancreatic cancer through targeting STAT3[J]. J Cancer,2024,15(15):4955-4968.
- 21 Cao Y,Shen T,Zhang C,et al. MiR-125a-5p inhibits EMT of ovarian cancer cells by regulating TAZ/EGFR signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(19):8249-8256.
- 22 Li D,Chen L,Zhang X,et al. miR-125a-5p reverses epithelial? mesenchymal transition and restores drug sensitivity by negatively regulating TAFAZZIN signaling in breast cancer[J]. Mol Med Rep,2021,24(5):1-11
- 23 El-Tanani M,Al KA,Aladwan SM,et al. Importance of STAT3 signaling in cancer,metastasis and therapeutic interventions[J]. Cell Signal,2022,92:110275.
- 24 Chen H,Zhou W,Bian A,et al. Selectively targeting STAT3 using a small molecule inhibitor is a potential therapeutic strategy for pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res,2023,29(4):815-830.
- 25 Zhao Y,Ma K,Yang S,et al. MicroRNA-125a-5p enhances the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin by suppressing the activation of the STAT3 signaling pathway[J]. Int J Oncol,2018,53(2):644-658.