

· 论 著 ·

MiR-26b 通过抑制 p53 基因表达增强胰腺癌细胞对吉西他滨抗药性*

王艳丽¹, 杨磊², 常艳敏^{1△}

(1. 天津市中西医结合医院南开医院检验科, 天津 300100; 2. 天津市第一中心医院检验科, 天津 300192)

摘要: 目的 通过对 miR-26b 靶定 p53 促进胰腺癌细胞系 PANC-1 抗药性的研究, 揭示胰腺癌细胞抗药机制, 为临床治疗提供依据。方法 (1) 构建 p53 的过表达和敲降质粒, 以及含 3' 端非编码序列区(3'UTR)的荧光报告载体; (2) 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)实验研究在吉西他滨存在的条件下 p53 和 miR-26b 对 PANC-1 生长增殖的影响; (3) 采用生物信息学、实时定量聚合酶链反应(PCR)试验、荧光报告载体和 Western 印迹试验确定 miR-26b 与 p53 的靶定关系; (4) 采用挽救试验研究过表达 p53 对 miR-26b 促进细胞生长作用的影响。结果 (1) MTT 试验证实, 在吉西他滨存在的条件下, 过表达 p53 抑制胰腺癌细胞系 PANC-1 生长增殖, 而敲降 p53 可以促进 PANC-1 生长和增殖; (2) 生物信息学预测显示 miR-26b 靶定 p53, 实时定量 PCR、荧光报告载体试验和 Western 印迹试验证实 p53 是 miR-26b 的靶基因, miR-26b 通过靶定 3'UTR 抑制 p53 的转录和翻译; (3) MTT 试验证实, 在吉西他滨存在的条件下, 过表达 miR-26b 促进 PANC-1 细胞系生长增殖, 增强 PANC-1 细胞系对吉西他滨的抗药性; (4) 挽救试验证实, 同时过表达 p53 挽救 miR-26b 对 PANC-1 抗药的促进作用。结论 miR-26b 通过靶定 p53 基因 3'UTR 抑制其表达, 增强胰腺癌细胞系 PANC-1 对吉西他滨的抗药性。

关键词: 胰腺癌; p53; 吉西他滨; 抗药性; miR-26b

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.001

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)22-3073-04

MiR-26b enhances drug resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibiting p53 gene expression*

WANG Yanli¹, YANG Lei², CHANG Yanmin^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nankai Hospital, Tianjin Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Tianjin 300100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract: Objective To reveal the pancreatic cancer cell drug resistance mechanism to provide a basis for clinical treatment by studying miR-26b targeting p53 for promoting the drug resistance of pancreatic cancer cell line PANC-1. **Methods** (1) The over-expression and knockdown plasmid of p53 and the fluorescent reporter vector containing 3'Untranslated region(3'UTR) were constructed respectively. (2) The effect of p53 and miR-26b on the growth and proliferation of PANC-1 was investigated by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) in the presence of gemcitabine. (3) The target relationship between miR-26b and p53 was determined by bioinformatics, real-time polymerase chain reaction(PCR), fluorescent reporter vector and Western blot experiment. (4) The effect of p53 on the growth of miR-26b was investigated by salvage experiments. **Results** (1) The MTT experiment confirmed that, in the presence of gemcitabine, over-expression of p53 could inhibit the proliferation of pancreatic cancer cell line PANC-1, and knock-down of p53 could promote the growth and proliferation of PANC-1; (2) the bioinformatics prediction showed that miR-26b targeted p53, real-time PCR, Western blot and fluorescent reporter vector experiment confirmed that p53 is the target gene of miR-26b, and miR-26b inhibits transcription and translation of p53 by targeting the 3'UTR of p53 gene; (3) the MTT experiment confirmed that in the presence of gemcitabine, over-expression of miR-26b could promote the growth and proliferation of PANC-1 cells, and enhanced its resistance to gemcitabine; (4) the rescue experiment confirmed that the simultaneous over-expression of p53 rescued the drug resistance promoting effect of miR-26b on PANC-1. **Conclusion** miR-26b inhibits the expression of p53 by targeting 3' UTR of the p53 gene and enhances the drug resistance of pancreatic cancer cell line PANC-1 to gemcitabine.

Key words: pancreatic cancer; p53; gemcitabine; drug resistance; miR-26b

胰腺癌早期确诊率低, 手术难度大, 治愈率极低, 是预后最差的恶性肿瘤之一^[1]; 而且目前癌细胞对化疗药物产生抗性, 降低了化学治疗方法的有效性。揭示癌细胞抗药机制、改进治疗手段是解决上述难题的关键。p53 基因是细胞中重要的抑癌基因, 胰腺癌细胞可以通过降低胞内 p53 蛋白表达水平而增强自身对化疗药物吉西他滨的抗性^[2]。miRNA 是一类长约 20 nt 的非编码 RNA, 这些 RNA 分子可通过种子序列(miRNA 的第 2 至 8 位核苷酸)与靶基因的 3' 端非编码序列区(3'

UTR)结合, 通过加快靶基因 mRNA 降解或抑制蛋白翻译实现基因沉默, 从而影响细胞表型。多种肿瘤的发生发展过程均有 miR-26b 基因表达的参与^[3-4]。有报道显示, miR-26b 在胰腺癌患者血清与组织中呈现高表达状态, 参与了胰腺癌的生长增殖^[5-6]。同时, 胰腺癌细胞系 P2、PANC-1 及 BxPC-3 中的 miR-26b 也呈现出高表达状态^[7]。本研究拟通过过表达和封闭 p53 及 miR-26b 基因的表型试验来探讨二者在胰腺癌细胞中发挥的作用。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81602403)。

作者简介: 王艳丽, 女, 硕士, 主要从事检验学、分子生物学研究。 △ 通信作者, E-mail: changyanminnk@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株 PANC-1 购自中国科学院上海细胞生物研究所, 脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司, 合成的小片段双链 miR-26b (miR-26b mimics)、miR-26b 的反义寡核苷酸 (ASO-miR-26b) 购自苏州吉玛基因公司, 所用引物由北京奥科公司合成, p53 抗体、GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 抗体和二抗购自天津赛尔生物公司, 内切酶购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 PANC-1 细胞接种于含 10% 胎牛血清、

100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2.2 质粒构建及转染 本试验需要构建 p53 3'UTR、过表达质粒 pcDNA3/HA-p53、敲降质粒 pSilencer/shRNA-p53, pcDNA3/HA-p53 对照质粒为 pcDNA3/HA-NC, pSilencer/shRNA-p53 对照质粒为 pSilencer-NC。质粒构建所用引物见表 1。转染前 1 d, 将所有质粒以合适的细胞密度接种于 48 孔板; 转染时, 细胞状态良好, 细胞密度约为 85%, 用 lipo2000 将质粒和对照载体转入 PANC-1 细胞中, 转染后于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h。

表 1 质粒构建所用引物

名称	序列
过表达 p53 第一轮扩增引物	5'-CGC CAC GAT GGA GGA GCC GCA G-3' 5'-GGA GCC GTG CGC ATG ATC TCT TTA ACA AT-3'
过表达 p53 第二轮扩增引物	5'-GGA ATT CGC CGC CAC GAT GGA GG-3' 5'-CCG CTC GAG GAG CCG TGC GC-3'
pcDNA3/EGFP-p53-3'UTR	5'-CGG ATC CCC CAG CCA AAG AAG AAA CC-3' 5'-CCG GAA TTC CTC ACG CCC ACG GAT AAT-3'
pcDNA3/EGFP-p53-3'UTR 突变	5'-GCC TGA TAC AGA TGC TTC AGC ACT TAC GAT GGT G-3' 5'-CAC CAT CGT AAG TGC TGA AGC TAC TGT ATC AGG C-3'
shRNA-p53-正向链	5'-GAT CCG ACC TGC CCT GTG CAA GCT GTT CAA GAG ACA GCT GCA CAG GGC AGG TCT TTT TTG GAA A-3'
shRNA-p53-反向链	5'-AGC TTT TCC AAA AAA GAC CTG CCC TGT GCA GCT GTC TCT TGA ACA GCT GCA CAG GGC AGG TCG-3'

表 2 实时定量 PCR 试验相关引物

名称	序列
miR-26b 定量上游引物	5'-CAG GGT CCG AGG TAT TCT GC-3'
miR-26b 定量下游引物	5'-TCA AGT AAT TCA GGA TAG GTG TCG T-3'
p53 定量上游引物	5'-CTT TGA GGT GCG TGT TTG TGC-3'
p53 定量下游引物	5'-CCC CTT TCT TGC GGA GAT TC-3'

1.2.3 荧光报告载体试验 用野生型和突变型的 p53 3' UTR-EGFP 报告质粒分别转染 PANC-1, 同时分别转染 20 pmol 的 miR-26b mimics 和 ASO-miR-26b 及各自对照质粒 (mimic-NC 和 ASO-NC), 试验以 0.05 μg 的红色荧光质粒 pDsRed2-N1(美国 Clontech 公司) 进行标准化。转染 48 h 后, 用 RIPA 裂解液 (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris/HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) 裂解细胞, 用 F-4500 Fluorescence Spectrophotometer(日本日立公司) 荧光分析仪进行荧光分析。

1.2.4 Western 印迹试验 以 GAPDH 为内参, 用 LabWorks-STM 凝胶成像分析系统对胶片进行摄像, 分析各组蛋白条带的亮度值, 比较各组间校正后的条带亮度值。转染 p53 过表达质粒 pcDNA3/HA-p53 为试验组, 其对照组为 pcDNA3/HA-NC; 转染 p53 敲降质粒 pSilencer/shRNA-p53 为试验组, 其对照组为 pSilencer-NC; 转染 miR-26b mimics 为试验组, 其对照组为 mimic-NC; 转染 ASO-miR-26b 为试验组, 其对照组为 ASO-NC。

1.2.5 实时定量聚合酶链反应(PCR)试验 试验所需引物见表 2, 按照以下方法进行数据分析: $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_1 - Ct_2) - (Ct_3 - Ct_4)$, 其中 Ct₁ 为处理样品中待测基因 (miR-26b 和 p53) 的临界循环数, Ct₂ 为处理样品中待测基因对应的内参基因的临界循环数, Ct₃ 为对照样品中待测基因的临界循环数, Ct₄ 为对照样品中待测基因对应的内参基因的临界循环数。

1.2.6 细胞生存能力分析 转染后于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h 后收获细胞进行计数, 以每孔 6 000 个细胞接种于 96 孔板, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定 48、72、96 h 的细胞活性。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数呈正比。

1.2.7 抗药性研究 进行抗药性研究的表型试验时, 在 1 μmol/L 吉西他滨条件下培养, 将 miR-26b mimics 和对照双链 RNA mimic-NC 及 ASO-miR-26b 和对照 ASO-NC, 分别转染 PANC-1 细胞, 提取 RNA 进行实时定量 PCR 试验。向转染有 miR-26b mimics 的 PANC-1 细胞中分别共转染 pcDNA3/HA-p53(不含 3'UTR 区) 和 pcDNA3/HA, 进行 MTT 试验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计学处理, 计数资料以频数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 p53 抑制 PANC-1 对吉西他滨的抗药性分析 与转染对照质粒 pcDNA3/HA 相比, 转染 pcDNA3/HA-p53 质粒的 PANC-1 细胞中 p53 mRNA 表达水平上升了约 2.6 倍, p53 蛋白含量上升约 2.2 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与转染对照质粒 pSilencer 相比, 转染敲降质粒 pSilencer/shRNA-p53 的细胞中 p53 mRNA 表达水平下降约 54%, p53 蛋白含量下降约 56%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对以上两组质粒转

染的细胞进行 MTT 试验,过表达 p53 的 PANC-1 细胞活性于转染后 48、72、96 h 分别下降约 21%、27%、32% ($P < 0.05$),而敲降 p53 的 PANC-1 细胞活性于转染后 48、72、96 h 分别上升约 29%、48%、57%,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、2。

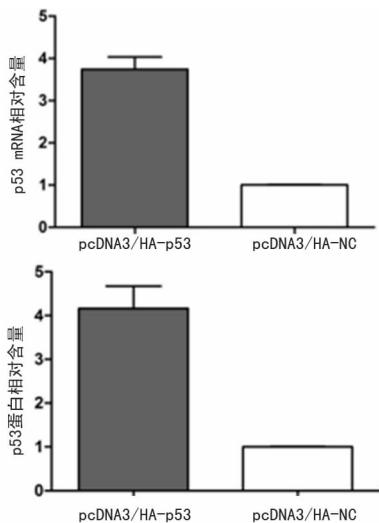


图 1 转染 pcDNA3/HA-p53 对 PANC-1 细胞内 p53 mRNA 及蛋白表达的影响

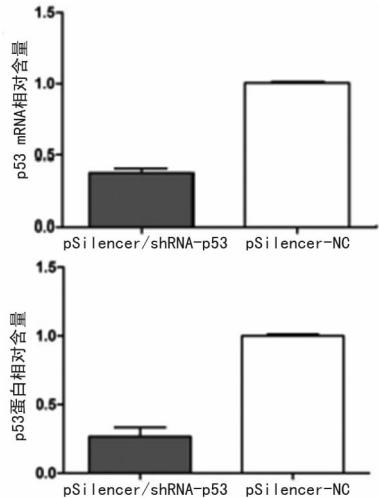


图 2 转染 pSilencer/shRNA-p53 对 PANC-1 细胞内 p53 mRNA 及蛋白表达的影响

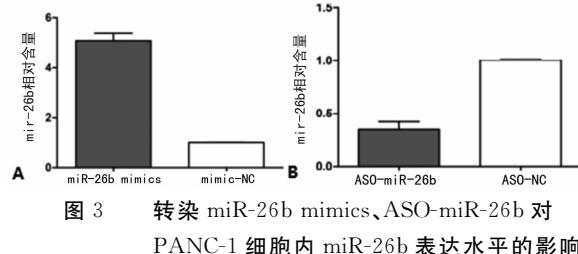


图 3 转染 miR-26b mimics、ASO-miR-26b 对 PANC-1 细胞内 miR-26b 表达水平的影响

2.2 miR-26b 增强 PANC-1 对吉西他滨的抗药性分析 转染 miR-26b mimics 后,PANC-1 细胞内 miR-26b 表达水平上升了约 4 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而转染 ASO-miR-26b 后,PANC-1 细胞内 miR-26b 表达水平下降约 54%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。后续 MTT 试验表明,PANC-1 细胞活性于转染 miR-26b mimics 后 48、72、96 h 分别增强约 29%、72%、86%,而 PANC-1 细胞活性于转染 ASO-miR-26b 封闭内

源性 miR-26b 后 48、72、96 h 分别降低约 22%、29%、34%,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

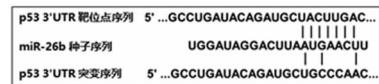


图 4 p53 3'UTR 中 miR-26b 靶位点及设计的突变位点

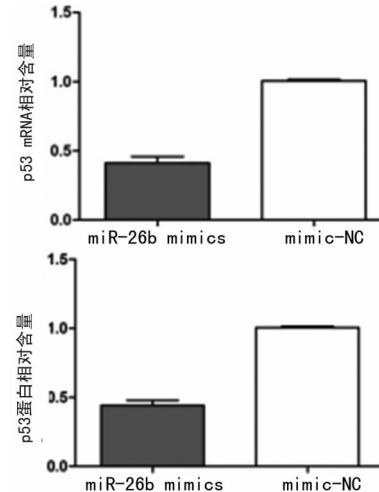


图 5 转染 miR-26b mimics 对 PANC-1 细胞中 p53 基因表达水平的影响

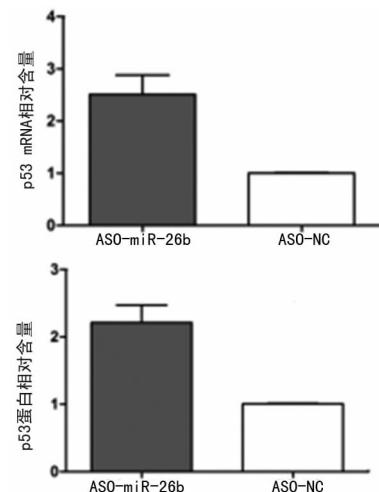


图 6 转染 ASO-miR-26b 对 PANC-1 细胞中 p53 基因表达水平的影响

2.3 miR-26b mimics、ASO-miR-26b 对 PANC-1 细胞中 p53 基因表达水平影响 通过生物信息学软件预测得知,p53 的 3' UTR 存在 miR-26b 的靶定位点。荧光报告载体试验结果显示:与转染 mimic-NC 的 PANC-1 细胞相比,转染 miR-26b mimics 使含有 p53 3'UTR 的绿色荧光蛋白(p53 3'UTR-EGFP 野生型)表达强度下降 48%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而含有突变型 p53 3'UTR 的绿色荧光蛋白(p53 3'UTR-EGFP 突变型)表达强度没有明显变化;与转染 ASO-NC 的 PANC-1 细胞相比,转染 ASO-miR-26b 使含有 p53 3'UTR 的绿色荧光蛋白表达强度上升约 47%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而含有突变型 p53 3'UTR 的绿色荧光蛋白表达强度没有明显变化。实时定量 PCR 和 Western 印迹试验结果显示:与转染 mimic-NC 的细胞相比,转染 miR-26b mimics 使 p53 mRNA 表达水平下降约 49%,p53 蛋白表达水平下降约 52%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与转染 ASO-NC 的 PANC-1 细胞相比,转染 ASO-miR-26b 使 p53 mRNA 表达水平下降约 54%,p53 蛋白表达水平下降约 54%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

胞相比,转染 ASO-miR-26b 使 p53 mRNA 表达水平上升约 1.5 倍,p53 蛋白表达水平上升约 1.4 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4~6。

2.4 p53 挽救 miR-26b 对 PANC-1 抗药的促进作用分析 同时过表达 miR-26b 和 p53 后 PANC-1 的细胞活性比仅过表达 miR-26b 有所下降,分别于 48、72、96 h 下降约 19%、25%、31%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

吉西他滨是治疗胰腺癌非常重要的一种化疗药物,但是胰腺癌对吉西他滨化疗产生的耐药性是其患者治疗过程中的难题^[8~9]。在癌症中异常表达的 miRNA 有时被称为原癌基因 miRNA 或肿瘤抑制 miRNA,是肿瘤进展的重要标志^[10,11],研究发现 miR-26b 可以促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移,还可以作为有助于诊断和判断预后的生物标志物^[4]。但是目前关于 miR-26b 参与肿瘤耐药的相关性研究比较少。MTT 试验通过检测细胞内琥珀脱氢酶活性来确定细胞的活性,是检测药物细胞毒性的常用技术。本研究发现:转染 miR-26b 的外源核酸模拟物 miR-26b mimics 后,培养于含有吉西他滨培养液中的 PANC-1 癌细胞的细胞活性出现升高;反之,转染 miR-26b 的外源性抑制物 ASO-miR-26b 封闭内源性 miR-26b 抑制该微小 RNA 功能后,培养于吉西他滨培养液中的癌细胞的细胞活性出现降低。这提示 miR-26b 在癌细胞抵抗吉西他滨毒性作用的过程中起正面作用。

p53 基因是重要的抑癌基因,作为核转录因子的 p53 蛋白可通过激活多种靶基因的表达,诱导细胞 DNA 损伤,进而导致细胞衰老及死亡^[12],它不仅在肿瘤的发生中起重要作用,也参与多种化疗药物耐药作用的产生^[13]。基因组丢失、表观遗传沉默、转录抑制等多种机制可以下调 p53 的表达,一些促癌 miRNA 在转录后水平负调控 p53 的表达。p53 与耐药性的关系非常复杂,不同的研究往往得出截然相反的结果,导致这些差异的原因可能包括 p53 效果评价的非标准化、患者选择的差异、化疗方案的不同、持续时间的不同等。因此 p53 在肿瘤治疗中的作用在一定程度上仍然存在争议。本研究发现:转染 pcDNA3/HA-p53 实现 p53 mRNA 及蛋白在 PANC-1 细胞中过表达后,培养在含吉西他滨培养液中的癌细胞的细胞活性明显降低;相反,转染 pSilencer/shRNA-p53 敲降质粒抑制 p53 基因表达后,癌细胞的细胞活性则明显增加。这表明 p53 的表达在癌细胞抵抗吉西他滨毒性作用的过程中起负面作用。

通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合抑制靶基因表达是 miRNA 调控靶基因表达的常见机制。本研究结果显示:miR-26b 可以与 p53 mRNA 3'UTR 中特定靶位点的结合抑制报告基因的表达;同时,转染 miR-26b mimics 可以降低癌细胞内 p53 mRNA 和蛋白水平,而转染 ASO-miR-26b 封闭内源性 miR-26 则增加细胞内 p53 mRNA 和蛋白水平。这表明 miR-26b 可以负向调控 p53 基因的表达。为了进一步证实 miR-26b 可以通过降低 p53 基因表达水平增强 PANC-1 癌细胞对吉西他滨的耐药作用,本研究将 miR-26b mimics 与 pcDNA3/HA-p53 共转染至癌细胞,结果显示细胞中 p53 基因的过表达能够抑制 miR-26b mimics 对癌细胞耐药的增强作用。这表明在复杂的细胞信号通路中存在一条 miR-26b 对 p53 基因表达进行调控的通路,并且癌细胞可以通过这条通路增强自身对吉西他滨的耐药性。

综上所述,miR-26b 基因表达可以作为解决胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性的一个靶点,为临床解决胰腺癌耐药问题提供新思路。本研究仅初步显示了 p53 与 miR-26b 的相关性,且 p53 发挥作用的上游和下游因子众多,相关研究还有待进一步深入。

参 考 文 献

- [1] Hariharan D, Saied A, Kocher HM. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world[J]. HPB(Oxford), 2008, 10(1): 58~62.
- [2] Sugimoto H, Nakamura M, Yoda H, et al. Silencing of RUNX2 enhance gemcitabine sensitivity of p53-Deficient human pancreatic cancer AsPC-1 cells through the stimulation of TAp63-Mediated cell death[J]. Cell Death Dis, 2015, 1(10): 15010.
- [3] Gilam A, Shai A, Ashkenazi I, et al. MicroRNA regulation of progesterone receptor in breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 25963~25976.
- [4] Suárez-Arriaga MC, Torres J, Camorlinga-Ponce M, et al. A proposed method for the relative quantification of levels of circulating microRNAs in the plasma of gastric cancer patients[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3109~3117.
- [5] Namkung J, Kwon W, Choi Y, et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer based on miRNA expression profiles have Independent prognostic value[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(6): 1160~1167.
- [6] Cao Z, Liu C, Xu J, et al. Plasma microRNA panels to diagnose pancreatic cancer: results from a multicenter study [J]. Oncotarget, 2016, 7(27): 41575~41583.
- [7] Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis[J]. World J Surg, 2009, 33(4): 698~709.
- [8] Sheikh R, Walsh N, Clynes M, et al. Challenges of drug resistance in the management of pancreatic cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(10): 1647~1661.
- [9] Veltkamp SA, Beijnen JH, Schellens JH. Prolonged versus standard gemcitabine infusion: translation of molecular pharmacology to new treatment strategy[J]. Oncologist, 2008, 13(3): 261~276.
- [10] Mardin WA, Mees ST. MicroRNAs: novel diagnostic and therapeutic tools for pancreatic ductal adenocarcinoma? [J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(11): 3183~3189.
- [11] Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications[J]. Cancer Lett, 2010, 292(1): 8~16.
- [12] Vousgen KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 594~604.
- [13] Bargoni J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1): 86~91.