

## miR-145 通过 IGF1R 与 IRS1 逆转胃癌 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的耐药性

朱明霞,周鑫,黄泽波,王同杉,朱伟,束永前,刘平\*

(南京医科大学第一附属医院肿瘤科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究 miR-145 对胃癌耐顺铂细胞株 SGC7901/DDP 顺铂耐药的影响。方法:应用 QRT-PCR 检测 miR-145 在胃癌组织、细胞中的表达水平;MTT 法和细胞克隆形成实验检测细胞活性与增殖能力;荧光素酶实验验证 miR-145 的靶基因;Western blot、免疫组化和免疫荧光实验检测相关蛋白表达;流式细胞术检测耐药细胞对顺铂诱导凋亡的影响。结果:miR-145 在胃癌组织、各种胃癌细胞株中呈低表达;在胃癌耐顺铂细胞株 SGC7901/DDP 中,miR-145 呈低表达,IGF1R 与 IRS1 呈高表达;上调 miR-145 增强 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的敏感性;荧光素酶报告实验证实 IGF1R 与 IRS1 为 miR-145 的靶基因;上调 miR-145 显著降低靶蛋白表达,抑制 SGC7901/DDP 细胞增殖,促进顺铂诱导的凋亡。结论:上调 miR-145 通过靶向 IGF1R 与 IRS1 逆转胃癌细胞对顺铂的耐药性。

**[关键词]** miR-145;顺铂耐药;IGF1R;IRS1

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)02-144-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160204

## miR-145 regulates cisplatin resistance of human gastric cancer cell line via targeting IGF1R and IRS1

Zhu Mingxia, Zhou Xin, Huang Zebo, Wang Tongshan, Zhu Wei, Shu Yongqian, Liu Ping\*

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the possible role of miR-145 in the formation of cisplatin resistance in human gastric cancer cell line. **Methods:** Expression of miR-145 was assayed by quantitative real-time PCR. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and clonogenic assays were used to detect cell viability and the drug-resistance phenotype changes of cancer cells associated with up-regulation or down-regulation of miR-145. Dual-luciferase activity assay was used to testify the target genes of miR-145. Protein expressions were measured by western blot, immunohistochemistry or Immunofluorescence staining. Flow cytometry was used to detect CDDP induced apoptosis. **Results:** We found that miR-145 was significantly down-regulated in both gastric cancer tissues and various gastric cancer cell lines. In addition, it was down-regulated in cisplatin-resistant gastric cancer cell line SGC7901/cisplatin (DDP) and the down-regulation of miR-145 was concurrent with the up-regulation of IGF1R and IRS1, compared with the parental SGC7901 cell line, respectively. In vitro drug sensitivity assay demonstrated that over-expression of miR-145 sensitized SGC7901/DDP cells to cisplatin. The luciferase activity of the above proteins 3'-untranslated region-based reporters constructed respectively in SGC7901/DDP cells suggested that IGF1R and IRS1 were the direct target genes of miR-145. Enforced miR-145 expression reduced its target proteins level, inhibited SGC7901/DDP cells proliferation and enhanced SGC7901/DDP cells to DDP-induced apoptosis. **Conclusion:** Our findings suggested that hsa-miR-145 could modulate cisplatin resistance of human gastric cancer cell line at least in part by targeting IGF1R and IRS1.

**[Key words]** miR-145; cisplatin resistance; IGF1R; IRS1

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 144-150]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81171908, 81201705)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liuping28@163.com

胃癌是世界范围内第 4 位的常见恶性肿瘤。由于我国早期胃癌的诊断率不足 10%,因此化疗仍然是目前胃癌综合治疗中不可或缺的重要组成部分。尽管胃癌的化疗方案不断改进,但依然存在有效率较低、缓解期较短、延长生存期有限等问题,人们普遍认为胃癌化疗耐药的存在是其中的重要原因<sup>[1]</sup>。肿瘤耐药(包括胃癌)的调控机制异常复杂,传统认为与多种相关基因表达或功能异常有关,包括调控药物转运和代谢的分子、细胞周期蛋白、凋亡调节蛋白、核苷酸切除修复蛋白、某些基因突变以及各种药物的靶蛋白等,这些效应蛋白的多样性使得逆转耐药治疗异常复杂且难以实现<sup>[2]</sup>。

microRNA (miRNA)是一类非编码小分子 RNA,可与靶基因 3'非翻译区 (3'untranslated region,3'-UTR)互补结合,导致 mRNA 降解或抑制其转录,在转录和转录后水平调节基因表达<sup>[3]</sup>。miRNA 在细胞生长、分化、增殖、凋亡等病理生理过程中发挥广泛而重要的调节作用。新近研究表明 miRNA 也从多个层面参与了肿瘤耐药的调控,如 miR-181b、miR200c 等通过靶向调控 Bcl-2、Mcl-1、XIAP 等抗凋亡蛋白介导胃癌、肺癌细胞的耐药<sup>[4-5]</sup>;miR-21 通过抑制 PTEN 激活 PI3K/AKT 通路来介导膀胱癌细胞耐药等<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明 miR-145 在胃癌组织、胃癌细胞系与顺铂耐药细胞系 SGC7901/DDP 中呈低表达。上调 miR-145 通过靶向抑制 IGF1R 与 IRS1 逆转胃癌细胞系对顺铂的耐药性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

24 例胃癌活检组织和 30 例正常胃组织来源于南京医科大学第一附属医院。所有组织经病理确诊并置于液氮中保存。人胃上皮细胞系 GES-1,胃腺癌细胞系 MKN45,MGC803,BGC823 和 SGC7901(中国科学院上海细胞库);顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP(南京凯基生物科技公司);RPMI1640 培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国);TRIzol、Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国);四甲基偶氮唑盐(MTT)、DMSO(Sigma 公司,美国);顺铂(南京先声药业);miR-145 模拟物及抑制物(上海吉玛制药技术有限公司);miR-145 引物(广州锐博生物科技有限公司);SYBR Green(TaKaRa 公司;日本);7900HT 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,英国);反转录酶、荧光素酶报告试剂盒(Promega 公司,美国);IGF1R -3'

UTR、IRS1-3 UTR 荧光素酶报告质粒(上海艾博思生物技术有限公司);IGF1R $\alpha$  抗体、IRS1 抗体(Santa Cruz 公司,美国);IGF1R 抗体、GAPDH 抗体(Bioworld 公司,美国);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(Millipore 公司,美国);流式细胞仪(BD 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养细胞。耐药细胞株 SGC7901/DDP 培养液中加入终质量浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 CDDP 以保持其耐药性。

#### 1.2.2 RNA 提取与实时荧光定量 PCR

用 TRIzol 试剂提取组织、细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。cDNA 合成过程中采用 miR-145 RT 特异性引物构建反转录体系,反应程序为:70℃ 10 min,冰育 2 min;42℃ 60 min,70℃ 10 min。PCR 扩增采用 SYBR Green 荧光染料法,以 cDNA 为模板,利用 miR-145 特异性引物进行扩增。PCR 反应程序为:95℃ 20 s 预变性,95℃ 10 s,60℃ 20 s,70℃ 10 s 共 40 个循环。采用  $\Delta$ Ct 法计算组织中 miR-145 相对表达: $\Delta$ Ct = Ct (miR-145) - Ct (U6)。细胞中 miR-145 的相对定量采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法: $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ CtMKN45,MGC803,BGC823,SGC7901 -  $\Delta$ CtGES-1 或者  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ CtSGC7901/DDP -  $\Delta$ CtSGC7901。

#### 1.2.3 MTT 体外药物敏感性实验

SGC7901 细胞和 SGC7901/DDP 细胞接种于 6 孔板。按脂质体 Lipofectamine 2000 说明书,将 100 nmol/L miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中,同样地,将 100 nmol/L miR-145 抑制物及阴性对照分别转染到 SGC7901 细胞中。转染 24 h 后将细胞种于 96 孔板(5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔)。待细胞贴壁后,加入 100  $\mu$ L 终浓度分别为 0.02、0.20、2.00、20.00  $\mu$ g/mL 的 CDDP,以加细胞不加药物干预作为阴性对照组,以不加细胞仅加培养液作为调零组,每个药物浓度设 3 个复孔。48 h 后,加新鲜配制的 MTT 溶液(5 g/L)20  $\mu$ L/孔。继续培养 4 h 后终止培养,吸弃上清每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min。酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度值,实验重复 3 次。细胞生长抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/对照组吸光度 $\times$ 100%,通过 SPSS 软件计算 CDDP 对细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

#### 1.2.4 荧光素酶实验

SGC7901/DDP 细胞接种于 24 孔板 ( $1.5 \times 10^5$  个/孔)。24 h 后,将 200 ng pGL3-IGF1R-3'-UTR 或 pGL3-IRS1-3'-UTR 荧光素酶报告质粒,80 ng 海肾内参质粒,60 pmol miR-145 模拟物或其阴性对照共转染入 SGC7901/DDP 细胞,24 h 后检测荧光素酶活性差异。

#### 1.2.5 免疫荧光

SGC7901 和 SGC7901/DDP 在洁净的玻璃片上生长 24 h 后,用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 15 min, PBS 冲洗干净。用 0.5% Triton X-100 作用 10 min, 5% 牛血清室温封闭 30 min, 一抗 4℃ 孵育过夜, 37℃ 室温避光孵育荧光二抗 1 h。PBS 洗涤后,用 DAPI 染核 5 min。避光条件下, Olympus IX70 荧光显微镜拍照并分析结果。

#### 1.2.6 Western blot 检测转染前后细胞中相关蛋白的表达

SGC7901/DDP 细胞接种于 6 孔板 ( $6 \times 10^5$  个/孔), 将 miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中。72 h 后,用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解溶液提总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。运用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜进行转膜, 5% 脱脂奶粉封闭。用含一抗 IGF1R $\alpha$ 、IRS1、IGF1R、GAPDH 抗体 (1:1 000) 稀释液于 4℃ 孵育过夜; 用 TBST 洗涤膜 5 次, 用含羊抗兔二抗 (1:5 000) 稀释液常温孵育 1 h。应用 ECL 化学发光显色, Image J 进行灰度值分析, 以 GAPDH 为内参照进行灰度分析。

#### 1.2.7 MTT 细胞增殖实验

将 miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中, 转染后 6 h 将细胞接种于 96 孔板 ( $5 \times 10^3$  个/孔), 以加细胞为阴性对照组, 以不加细胞仅加培养液作为调零组, 每组设 3 个复孔。分别于 24、48 和 72 h 后加入 MTT, 酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度值。计算转染细胞的存活率; 细胞存活率 = (实验组吸光度 - 空白对照组吸光度) / (阴性对照组吸光度 - 空白对照组吸光度)  $\times 100\%$ 。

#### 1.2.8 细胞克隆形成实验

将 miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中, 接种于 6 孔板 (300 个/孔)。37℃ 孵育 2 周。经常观察, 当培养板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。加 4% 多聚甲醛固定 15 min。然后去固定液, 加

适量结晶紫染色 10~30 min, 然后用流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。在显微镜 (低倍镜) 下计数克隆数 (参与计数的克隆含有超过 50 个细胞)。最后计算克隆形成率, 克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数)  $\times 100\%$ 。

#### 1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡

SGC7901/DDP 细胞接种于 6 孔板 ( $6 \times 10^5$  个/孔), 将 miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中。转染 24 h 后, 每孔加入终质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CDDP。常规培养 48 h 后, 细胞重悬于 100  $\mu\text{L}$  含 Annexin V-FITC 和 0.5  $\mu\text{g}$  PI 的结合缓冲液 (10 mmol/L HEPES, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ) 中。避光室温孵育 15 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  结合缓冲液, 流式细胞仪检测 AnnexinV-FITC-positive-PI-negative 细胞凋亡率。

#### 1.3 统计学方法

所有实验重复至少 3 次, 应用 SPSS15.0 进行统计分析。计量数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 miR-145 在胃癌组织与细胞系中呈低表达

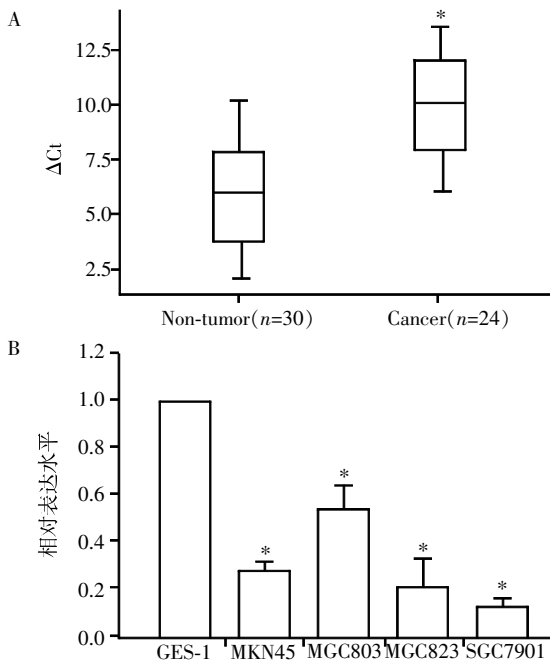
采用 qRT-PCR 检测 miR-145 在 24 例胃癌组织和 30 例正常胃组织中的表达情况, 结果显示与正常胃组织相比, miR-145 在胃癌组织中显著低表达, 平均下调倍数为 11.31 ( $P < 0.05$ , 图 1A)。同时, 也发现与正常胃上皮细胞系 GES-1 相比, miR-145 在胃癌细胞系 MKN45、MGC803、BGC823 和 SGC7901 中显著低表达, 平均下调倍数分别为 3.71、1.81、4.76、9.09 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

#### 2.2 miR-145 在胃癌顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中呈低表达

qRT-PCR 结果显示与母代细胞株 SGC7901 相比, miR-145 在顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中的表达量降低, 平均下调倍数为 4.76 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

#### 2.3 miR-145 调节 SGC7901/DDP 细胞株对顺铂的耐药性

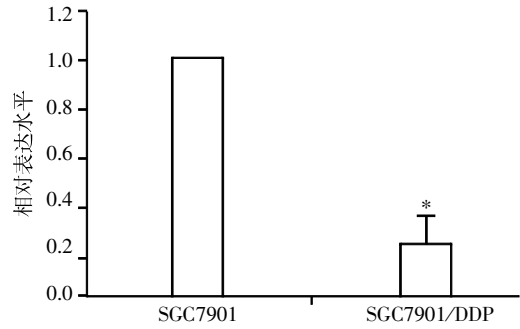
在转染前, 耐药株对顺铂的耐药性已经验证 ( $P < 0.05$ , 图 3A)。MTT 实验显示, 与转染阴性对照组相比, 转染 miR-145 模拟物组显著增加了 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的药物敏感性 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。相反, 较转染阴性对照组而言, 在 SGC7901 细胞中转入 miR-145 抑制物显著增加了细胞对顺



A: miR-145 在胃癌组织呈低表达,与正常胃组织比较, \* $P < 0.05$ ; B: miR-145 在胃癌细胞系中呈低表达,与 GES-1 细胞比较, \* $P < 0.05$ 。

图 1 miR-145 在胃癌组织与细胞系中呈低表达

Figure 1 miR-145 was significantly down-regulated in gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines



与 SGC7901 细胞比较, \* $P < 0.05$ 。

图 2 miR-145 在胃癌顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中呈低表达

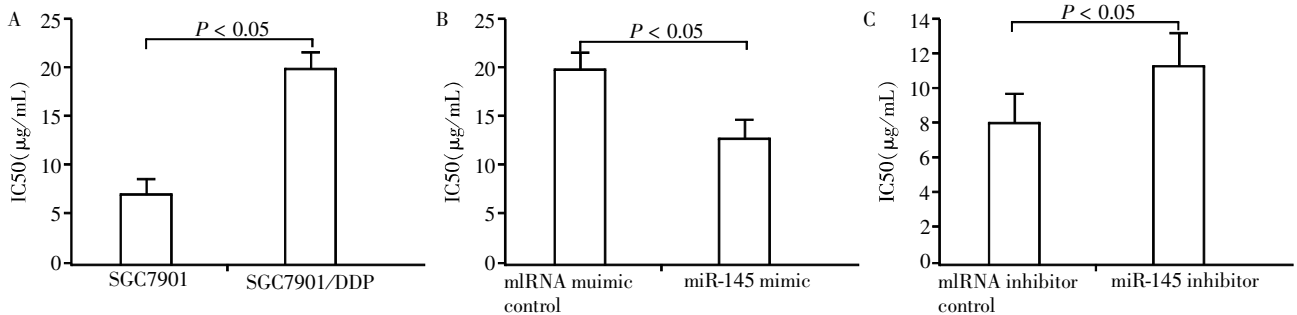
Figure 2 miR-145 was significantly down-regulated in cisplatin-resistant gastric cancer cell line SGC7901/DDP

铂的耐药性 ( $P < 0.05$ , 图 3C)。

#### 2.4 IGF1R 与 IRS1 为 miR-145 的靶基因

TargetScan 预测 IGF1R 与 IRS1 均为 miR-145 的靶基因。荧光素酶实验结果表明较转染阴性对照片段而言, 实验组 IGF1R-3'-UTR、IRS1-3'-UTR 荧光素酶报告质粒活性明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 4)。

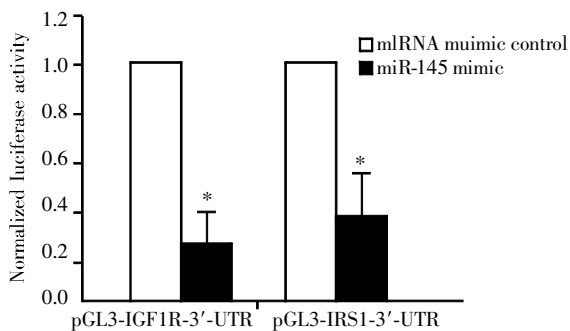
#### 2.5 miR-145 通过靶向 IGF1R 与 IRS1 调控耐药



A: 耐药株对顺铂的耐药性明显增加; B: 转染 miR-145 模拟物显著增加 SGC7901/DDP 细胞对顺铂的药物敏感性; C: 转染 miR-145 抑制物显著增加 SGC7901 细胞对顺铂的耐药性。

图 3 miR-145 调节 SGC7901/DDP 细胞株对顺铂的耐药性

Figure 3 miR-145 modulated cisplatin resistance of SGC7901/DDP cell line



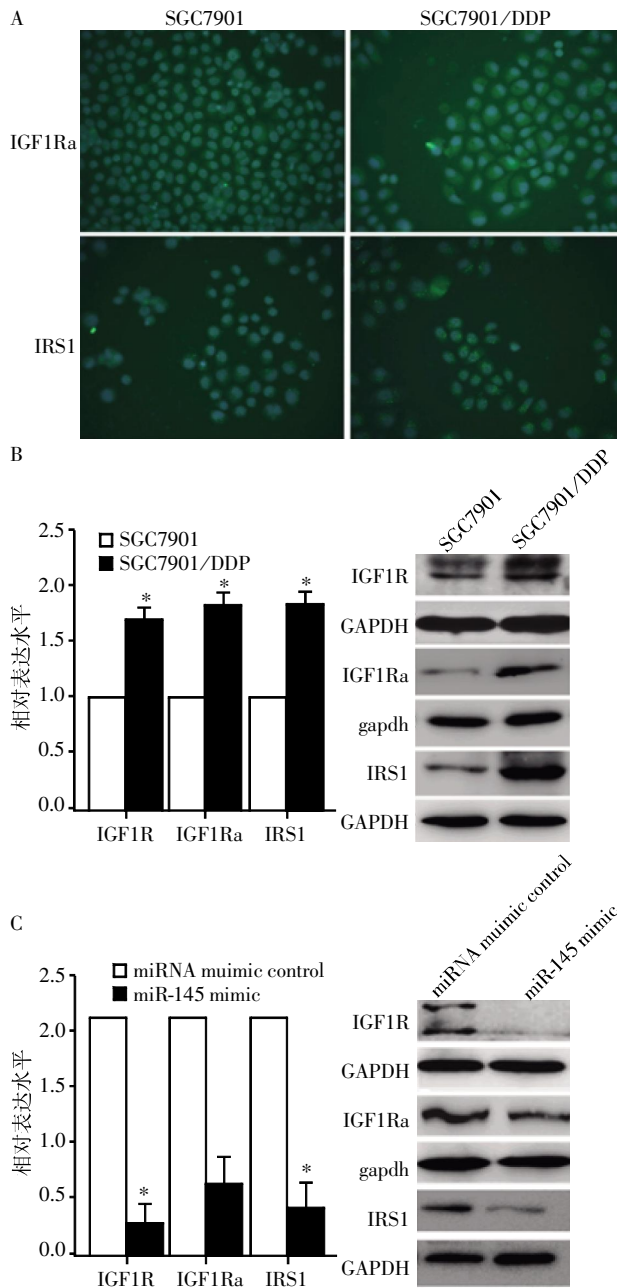
与转染阴性对照比较, \* $P < 0.05$ 。

图 4 IGF1R 与 IRS1 为 miR-145 的靶基因

Figure 4 IGF1R and IRS1 were the target genes of miR-145

与母代细胞 SGC7901 相比, miR-145 在 SGC7901/DDP 细胞中呈低表达, 而 IGF1R、IGF1R $\alpha$  和 IRS1 呈高表达 (图 5A、B)。已证实 IGF1R 与 IRS1 为 miR-145 的靶基因, 从而推测 miR-145 可能通过靶向抑制 IGF1R 和 IRS1 表达调节胃癌细胞耐药。为验证此假设, 将 miR-145 模拟物及阴性对照分别转染到 SGC7901/DDP 细胞中用 Western blot 检测以上蛋白表达。在 SGC7901/DDP 细胞中, 转染后 72 h, Western blot 结果表明实验组 IGF1R 和 IRS1 蛋白表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ , 图 5C)。

#### 2.6 miR-145 抑制 SGC7901/DDP 细胞增殖



A: 免疫荧光结果显示 IGF1R $\alpha$  和 IRS1 蛋白在 SGC7901/DDP 细胞中高表达; B: Western blot 结果显示 IGF1R、IGF1R $\alpha$  和 IRS1 蛋白在 SGC7901/DDP 细胞中高表达, 与 SGC7901 细胞比较, \* $P < 0.05$ ; C: 在 SGC7901/DDP 细胞转染 miR-145 模拟物 72 h 后, SGC7901/DDP 细胞中 IGF1R 和 IRS1 蛋白表达量比对照组下降, \* $P < 0.05$ 。

**图 5 miR-145 通过靶向 IGF1R 与 IRS1 调控耐药**  
**Figure 5 miR-145 modulated cisplatin resistance by targeting IGF1R and IRS1**

IGF1R/IRS1 的激活与 PI3K-AKT/PKB、Ras-MAPK 两条信号通路相关。MAPK 通路激活可促进细胞增殖, 而 PI3K 通路激活抑制细胞凋亡。而 miR-145 通过靶向抑制 IGF1R 与 IRS1 调控耐药, 因此推测 miR-145 可能通过部分调节细胞增殖来调节胃癌细胞耐药性。在 SGC7901/DDP 细胞中, 细胞增

殖实验和细胞克隆形成实验表明上调 miR-145 可抑制细胞增殖 ( $P < 0.05$ , 图 6)。

### 2.7 miR-145 增强顺铂诱导的凋亡

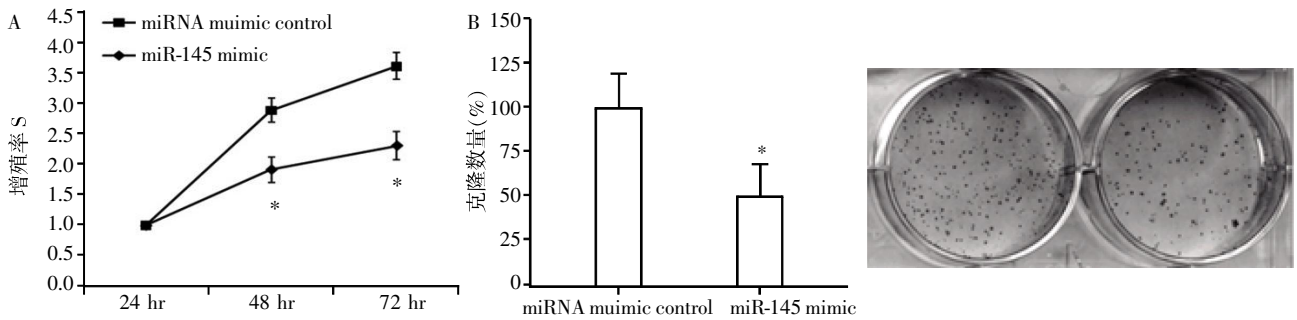
如上所述, IGF1R/IRS1 通路激活与细胞凋亡相关, 因而推测 miR-145 可能通过部分调节细胞凋亡来调节胃癌细胞耐药性。流式细胞仪检测显示, 转染 miR-145 模拟物的实验组对 CDDP 诱导的凋亡程度显著高于转染阴性对照片段的对照组 ( $P < 0.05$ , 图 7)。

## 3 讨论

顺铂是临床上胃癌的主要化疗药物, 尽管胃癌的化疗方案不断改进, 顺铂耐药依然存在, 因此迫切需要继续探索胃癌顺铂耐药的调控机制以寻求有效逆转途径。顺铂耐药的机制包括细胞内解毒作用增强、转运蛋白的异常表达、DNA 损伤修复能力增加和细胞凋亡受阻等<sup>[7]</sup>。目前研究表明 IGF1R/IRS1 通路相关蛋白过表达与胃癌化疗效果、预后呈负相关<sup>[8-11]</sup>。而且卵巢癌在顺铂治疗周期中 IGF1R 呈高表达, 并与顺铂耐药相关<sup>[12]</sup>。综合以上研究表明, IGF1R/IRS1 信号转导途径的激活, 在肿瘤细胞的顺铂耐药发生中发挥重要的作用。

miR-145 近来因为其在多种肿瘤中的独特作用而获得广泛关注。相关研究发现 miR-145 在多种肿瘤中低表达并靶向多种癌基因, 如 N-RAS, SOX9 和 adducin 3, 表明 miR-145 具有抑癌基因功能<sup>[13-21]</sup>。然而目前 miR-145 的研究刚刚起步, 在各种肿瘤耐药形成中的作用和地位仍然需要更多的研究予以评估。尽管以往的研究已从多层次、多角度对胃癌的耐药机制进行了剖析, 然而由于耐药机制的复杂性, 目前仍然不能完全阐明胃癌耐药产生的全部机制, 正是在这样的背景下, 考虑到 miRNA 特别是 miR-145 在恶性肿瘤中的潜在价值, 开展了本研究。通过分子水平、细胞水平、组织水平的多层次研究来评估 miR-145 在胃癌生物学行为和耐药表型中的作用。

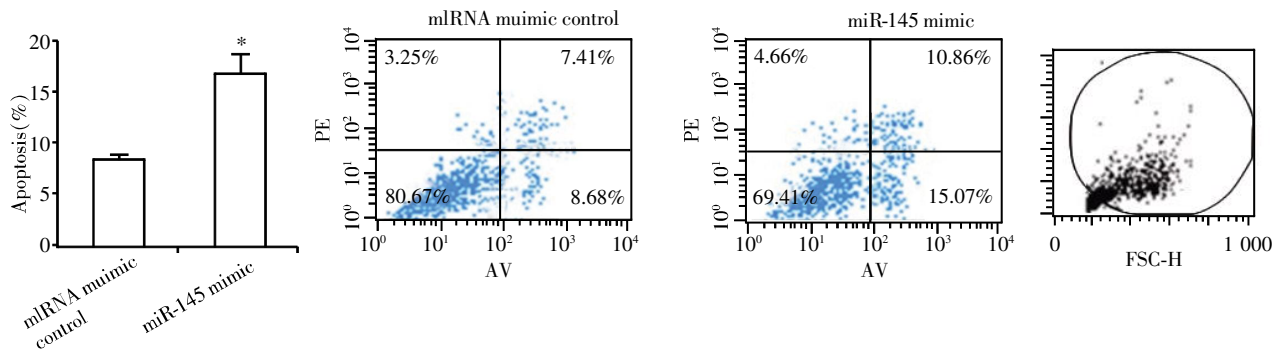
本研究发现胃癌顺铂耐药细胞株 SGC7901/DDP 中, miR-145 表达降低, 而 IGF1R/IRS1 通路相关蛋白 IGF1R、IRS1 表达升高。进一步研究证实了 IGF1R 与 IRS1 为 miR-145 的靶基因。上调 miR-145 后, 胃癌耐药细胞对顺铂的敏感性提高, 细胞增殖能力下降, 凋亡程度增强, 部分逆转了胃癌 SGC7901/DDP 细胞的耐药性。本研究结果与 Yin 和 Law 等相一致, 他们分别发现 miR-145 在肠癌和肝癌细胞中靶向抑制 IGF1R 与 IRS1<sup>[14,19]</sup>。然而, miR-



A: MTT 实验显示,转染 miR-145 模拟物与对照组相比,能够显著抑制顺铂耐药胃癌细胞株 SGC7901/DDP 的增殖能力, \* $P < 0.05$ ; B: 克隆形成实验显示,转染 miR-145 模拟物与对照组相比,能够显著抑制顺铂耐药胃癌细胞株 SGC7901/DDP 的克隆形成能力, \* $P < 0.05$ 。

图 6 miR-145 抑制 SGC7901/DDP 细胞增殖

Figure 6 miR-145 significantly inhibited SGC7901/DDP cells proliferation



流式细胞仪检测显示,转染 miR-145 模拟物的实验组对 CDDP 诱导的凋亡程度显著高于转染阴性对照片段的对照组, \* $P < 0.05$ 。

图 7 miR-145 增强顺铂诱导的凋亡

Figure 7 miR-145 sensitized SGC7901/DDP cells to DDP-induced apoptosis

145 的下调机制尚不清楚。Suh 等<sup>[15]</sup>的研究表明前列腺癌中 miR-145 启动子区域 DNA 甲基化是其低表达的重要原因,这也可能是顺铂耐药胃癌细胞中 miR-145 低表达的机制。通过生物信息学(UCSC 数据库)查询,发现 miR-145 启动子区域 CpG 岛甲基化可能是顺铂耐药胃癌细胞中其低表达的原因。确切机制有待进一步研究。

综上所述,本文证明了 miR-145 在胃癌顺铂耐药细胞中呈低表达,上调其表达可部分逆转细胞顺铂耐药性。miR-145 可能通过作用于靶蛋白 IGF1R 与 IRS1 参与胃癌细胞顺铂耐药的发生和发展。这拓展了对胃癌耐药机制的认识,并为逆转胃癌耐药治疗提供新的可能途径。然而需要指出的是本研究基于体外细胞系试验,与体内实体肿瘤环境有一定差异。因此,在今后的实验中仍需要进一步验证 miR-145 在体内及临床中的作用。

[参考文献]

[1] Chen KG, Sikic BI. Molecular pathways; regulation and therapeutic implications of multidrug resistance[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(7):1863-1869

[2] Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure[J]. Arzneimittel-Forschung, 2008, 58(6):261-264

[3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5):843-854

[4] Zhu W, Shan X, Wang T et al. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines[J]. Int J Cancer, 2010, 127(11):2520-2529

[5] Zhu W, Xu H, Zhu D et al. miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69(3):723-731

[6] Tao J, Lu Q, Wu D, et al. microRNA-21 modulates cell proliferation and sensitivity to doxorubicin in bladder cancer cells[J]. Oncol Rep, 2011, 25(6):1721-1729

[7] Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, et al. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment[J]. Int J Surg Oncol, 2012, 2012:862879

[8] Ge J, Chen Z, Wu S, et al. Expression levels of insulin-like



- growth factor-1 and multidrug resistance-associated protein-1 indicate poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *Digestion*, 2009, 80(3):148-158
- [9] Hopkins A, Crowe PJ, Yang JL. Effect of type 1 insulin-like growth factor receptor targeted therapy on chemotherapy in human cancer and the mechanisms involved[J]. *J Cancer Res and Clin Oncol*, 2010, 136(5):639-650
- [10] Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(5):782-788
- [11] Yu G, Wang J, Chen Y, et al. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(5):1821-1829
- [12] Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, et al. Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7):2996-3003
- [13] Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, et al. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers[J]. *Oncology*, 2009, 77(1):12-21
- [14] Law PT, Ching AK, Chan AW, et al. MiR-145 modulates multiple components of the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6):1134-1141
- [15] Suh SO, Chen Y, Zaman MS, et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(5):772-778
- [16] Wu BL, Xu LY, Du ZP, et al. MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(1):79-88
- [17] Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma[J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(4):847-855
- [18] Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance[J]. *Pancreas*, 2013, 42(1):67-71
- [19] Yin Y, Yan ZP, Lu NN, et al. Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1829(2):239-247
- [20] Rani SB, Rathod SS, Karthik S, et al. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells[J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(10):1302-1316
- [21] 范磊, 袁同洲, 陈琦, 等. microRNA-145 抑制骨肉瘤生长以及血管形成的动物实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(2):163-168
- [收稿日期] 2015-10-23

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆  
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。