

Hsa-miR-125b 在人胃癌耐药细胞株中的表达及其靶基因的功能分析

程燕^{1,2}, 陈琳³, 曹忻², 哈斯其美格², 谢小冬¹

1. 兰州大学基础医学院遗传学研究所, 兰州 730000;
2. 西北民族大学实验中心, 兰州 730030;
3. 兰州大学第一医院感染科, 兰州 730000

摘要: 研究表明, Hsa-miR-125b 在人胃癌耐氟尿嘧啶细胞株 BGC823/Fu 中表达下降。为进一步探讨 hsa-miR-125b 在获得性耐药中所起的作用, 文章应用 miRbase、靶基因预测软件、Gene Ontology 数据库及 KEGG 数据库对 hsa-miR-125b 的序列特征、进化保守性、靶基因及功能以及靶基因所参与的信号通路等进行了深入的生物信息学分析。结果显示: hsa-miR-125b 在多个物种之间具有高度序列保守性; 通过软件预测获得 hsa-miR-125b 靶基因 79 个, 其分子功能包括转录调节、蛋白质结合和肽酶类活性等($P < 0.001$), 其所参与的生物学过程主要有细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡的正性或负性调控以及细胞因子刺激反应性、药物反应性、DNA 损伤反应性等($P < 0.001$), 调控包括 MAPK、Wnt、p53 等多条信号转导通路($P < 0.01$)。上述结果表明 hsa-miR-125b 可能参与调控多个生物学过程和信号转导通路, 而其中细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期等生物学过程以及 MAPK、Wnt、p53 等信号通路已被证实与肿瘤耐药的发生有关。因此, hsa-miR-125b 可能通过调控上述环节中的靶基因来影响肿瘤细胞对药物的敏感性, 从而为 hsa-miR-125b 在肿瘤耐药中的作用机制提供新的研究线索。

关键词: hsa-miR-125b; 生物信息学; 靶基因; 肿瘤化疗耐药; 胃癌

Expression profiling and functional analysis of hsa-miR-125b and its target genes in drug-resistant cell line of human gastric cancer

Yan Cheng^{1,2}, Lin Chen³, Xin Cao², Siqimeige Ha², Xiaodong Xie¹

1. Institute of Genetics, School of Basic Medical Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;
2. Experimental Center, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;
3. Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: The expression of hsa-miR-125b is significantly downregulated in the fluorouracil-resistant cell line of human gastric cancer (BGC823/Fu). In order to investigate the role of hsa-miR-125b in the drug-resistance acquisition process of human gastric cancer, we performed a series of analysis on the sequence characteristics, species conservation, target genes,

收稿日期: 2013-07-17; 修回日期: 2013-10-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81272454, 81071701)和西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(编号: ZYZ2011105)资助

作者简介: 程燕, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤药物基因组学。E-mail: chengyanchina@qq.com

通讯作者: 谢小冬, 教授, 博士生导师, 研究方向: 少数民族的群体遗传和医学遗传。E-mail: xdxie@lzu.edu.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.0119

网络出版时间: 2013-12-24 16:57:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20131224.1657.002.html>

function annotation and signal transduction pathway enrichment of hsa-miR-125b using a combined bioinformatic approach such as miRbase, TargetScan6.2, PicTar, miRanda, Gene Ontology(GO) and KEGG. The results showed that the sequence of miR-125b is highly conserved in multiple species. A total of 79 target genes related to transcription regulation, protein binding, enzyme activity ($P < 0.001$) were predicted by bioinformatics software. These genes involved in many biological processes including cell cycle, cell proliferation, cell apoptosis and cell responses to cytokine, drug responses and DNA damage ($P < 0.001$). And these target genes mainly belong to MAPK, Wnt and p53 signal transduction pathways ($P < 0.01$). The results revealed that hsa-miR-125b may regulate multiple biological processes and signal transduction pathways, and drug-resistant occurrence is associated with cell proliferation, cell apoptosis, cell cycle and signaling pathways including MAPK, Wnt and p53. We suggest that hsa-miR-125b may affect chemosensitivity by regulating target genes involved in the above processes and these target genes might be reliable candidates for exploring the role of hsa-miR-125b in tumor chemoresistance.

Keywords: hsa-miR-125b; bioinformatics; target gene; chemotherapy resistance; human gastric cancer

化学治疗是临床治疗胃癌及多种恶性肿瘤的重要手段。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)作为临床上应用最广泛的嘧啶类抗代谢药物,对胃癌及其他消化道癌具有良好的疗效。但在临床治疗过程中发现,长期应用氟尿嘧啶会使肿瘤细胞对药物由最初的敏感到敏感性下降,直到不敏感而产生获得性耐药^[1]。肿瘤的耐药机制比较复杂,最近的研究报道证实 microRNA(miRNA)与肿瘤细胞的药物敏感性存在一定相关性。

miRNA 是一类约 22 个核苷酸大小的单链非编码 RNA,它们通过剪切靶基因的转录产物或者抑制转录产物的翻译从而起到转录后负性调控靶基因表达的作用^[2]。研究发现 miRNA 除了在个体发育、肿瘤的发生发展、细胞增殖、分化与凋亡以及疾病发生等方面起重要作用外,还与多种肿瘤多药耐药的发生显著相关^[3]。调控肿瘤化疗相关基因的 miRNA 如果发生了突变、异常表达和异常加工,均会影响到肿瘤细胞的药物敏感度^[4,5]。本研究应用基因芯片筛选获得在胃癌氟尿嘧啶耐药细胞株中异常表达的 hsa-miR-125b,通过对 hsa-miR-125b 的靶基因预测、基因注释、功能分析以及信号转导通路富集等一系列生物信息学分析,为进一步研究 hsa-miR-125b 在胃癌氟尿嘧啶获得性耐药过程中的作用机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 耐药细胞的诱导培养以及 miRNA 的检测

人低分化胃腺癌细胞株 BGC823 应用氟尿嘧啶

进行诱导耐药,药物浓度由 10 mg/L 培养液终浓度开始递增,通过多次诱导培养,氟尿嘧啶培养液药物终浓度达 50 mg/L,通过 MTT 检测两种细胞的 IC₅₀,耐药指数大于 18.75,获得耐药细胞株 BGC823/Fu。分别提取细胞的总 RNA,紫外分光光度仪测定 A_{260/280},确定 RNA 纯度合格后,送上海伯豪生物技术有限公司进行 miRNA 表达谱芯片检测。本研究采用 Agilent human miRNA V18.0 芯片检测两种细胞的 miRNA 表达谱,该芯片覆盖 1 908 个人类相关 miRNA。芯片结果应用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描,采用 Feature Extraction software 10.7 读取数据,最后应用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理。

将 BGC823 作为对照组,以 BGC823/Fu 细胞中 miRNA 表达差异 > 2.0 或 < 0.5 作为筛选条件,进行芯片结果筛选,确定 hsa-miR-125b-5p(引物 hsa-mir-125b-5p: HmiRQP0096; U6: HmiRQ9001; FulenGen)为本次研究对象,并进一步应用实时荧光定量 PCR 验证芯片结果。荧光定量 PCR 扩增条件为:95℃预变性 10 min;95℃变性 10 s,55℃复性 20 s,72℃延伸 10 s,共进行 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miRNA 的表达水平, $\Delta Ct = Ct$ 样本 miRNA - Ct 参照 U6,每个样本重复 3 次实验。

1.2 hsa-miR-125b 的基本生物学信息

通过 miRbase^[6](<http://www.mirbase.org>) 查找 hsa-miR-125b 序列,应用 NCBI Mapviewer、UCSC Genome Browser 等在线工具,获取 hsa-miR-125b 染

染色体定位、物种保守性等基本信息。

1.3 hsa-miR-125b 靶基因的预测

应用 TargetScan6.2(<http://www.targetscan.org/>)、PicTar (<http://www.pictar.org/>)及 miRanda(<http://www.microrna.org/>)三大靶基因预测软件^[7,8]对 hsa-miR-125b 进行靶基因预测,取三者预测数据的交集再结合 miTarbase^[9] (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)中已经证实的靶基因形成靶基因集合用于后续分析。

1.4 靶基因的 Gene Ontology(GO)分析

应用 DAVID 数据库(<http://abcc.ncifcrf.gov/>)对 hsa-miR-125b 的靶基因集合进行 GO 注释描述,应用 BiNGO 对靶基因的生物学过程(Biological process, BP)和分子功能(Molecular function, MF)进行 GO 注释层次分类及富集分析以及显著性分析,以 $P < 0.001$ 为显著性阈值,分别得到具有统计意义的高频率注释。

1.5 靶基因的信号转导通路分析

利用 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)中 Pathway 子数据库对 hsa-miR-125b 的靶基因进行信号转导通路富集分析,通过 Fisher Exact Test 计算 P 值,以 $P < 0.01$ 代表靶基因集合相对于背景具有统计学意义的信号转导及疾病通路。

2 结果与分析

2.1 miRNA 表达谱芯片结果

芯片结果显示:与 BGC823 相比,BGC823/Fu 有 29 个 miRNA 表达差异大于 2 倍或小于 0.5 倍,其中上调表达的 miRNA 有 17 个,主要包括 hsa-miR-192-5p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-210-3p、hsa-let-7c、hsa-miR-331-3p 等;下调表达的 miRNA 有 12 个,主要包括 hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-221-3p、hsa-miR-130a-3p、hsa-miR-100-5p 等。

选取芯片结果中差异最为显著的 10 个 miRNA,应用 RT-qPCR 进行芯片结果验证,证实有 7 个 miRNA 与芯片结果一致,其中 hsa-miR-125b-5p 的芯片结果显示 Foldchange 下调了 24.7 倍,而 RT-qPCR 结果显示也下调 3.5 倍,差异具有显著性($P < 0.05$),故本文选择 hsa-miR-125b-5p 作为对象进行重

点分析,其他 miRNA 因差异没有 hsa-miR-125b-5p 显著,故作为次要结果另行分析,不在本文中讨论。Hsa-miR-125b-5p 的 RT-qPCR 验证结果见图 1。

2.2 hsa-miR-125b 的基因定位及保守性分析

由 miRbase 数据库获得的序列信息可知 hsa-miR-125b 定位于人染色体 11q24.1,包括人在内的 9 个物种(人、大鼠、小鼠、短尾负鼠、中国仓鼠、鸡、猕猴、马、真涡虫)间的序列“ucccugagaccuuaacuuguga”具有高度的保守性,提示其在生物体内可能具有重要的生物学功能。各物种中 miR-125b 的成熟体序列号、名称、前体的染色体定位以及保守序列详细信息见表 1。

2.3 hsa-miR-125b 靶基因预测

应用 TargetScan6.2、PicTar 及 MiRanda 分别预测了 hsa-miR-125b 靶基因数量,分别为 814、562、2 592 个,对 3 种预测方法的结果数据取交集共获得 62 个靶基因。另外,miTarbase 数据库中记录的经其他研究应用双荧光素酶报告基因实验和/或 Northern blotting 方法证实的 hsa-miR-125b 靶基因共有 34 个,其中有 17 个靶基因与上述预测集合中的数据结果一致,占预测靶基因总数的 27%,说明预测结果具有一定可靠性。合计预测靶基因与已验证靶基因,共计获得 79 个靶基因的数据集合用于后续的基因注释和通路富集分析。部分预测的靶基因见表 2。

2.4 靶基因功能富集分析

应用 DAVID 数据库和 GO 数据库对靶基因功能进行富集分析,结果显示:从分子功能看,hsa-miR-125b 的靶基因主要调节转录、转录酶和转录因子的激活,以及调节蛋白质 N 末端、C 末端、蛋白

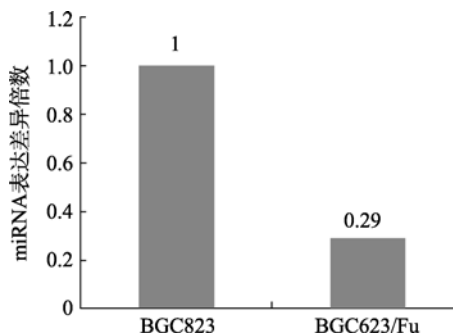


图 1 hsa-miR-125b-5p 在胃癌细胞株中的表达

表 1 不同物种 miR-125b 的序列同源性分析

序列号	名称	物种	前体的染色体定位	保守序列及在前体中的位置
MIMAT0000423	hsa-miR-125b-5p	<i>Homo sapiens</i>	chr11:121970465-121970552 [-]	15-ucccugagaccuuaacuuguga-36
MIMAT0000830	rno-miR-125b-5p	<i>Rattus norvegicus</i>	chr8:44570155-44570241 [+]	15-ucccugagaccuuaacuuguga-36
MIMAT0000136	mmu-miR-125b-5p	<i>Mus musculus</i>	chr16:77646273-77646343 [+]	7-ucccugagaccuuaacuuguga-28
MIMAT0004103	mdo-miR-125b-5p	<i>Monodelphis domestica</i>	chr4: 1003541-1003622 [+]	12-ucccugagaccuuaacuuguga-33
MIMAT0023743	cgr-miR-125b-5p	<i>Cricetulus griseus</i>	supercont3.4: 280955-281049 [+]	11-ucccugagaccuuaacuuguga-32
MIMAT0001105	gga-miR-125b-5p	<i>Gallus gallus</i>	chr1: 98380668-98380757 [+]	17-ucccugagaccuuaacuuguga-38
MIMAT0002225	mml-miR-125b-5p	<i>Macaca mulatta</i>	chr14: 120507558-120507645 [-]	15-ucccugagaccuuaacuuguga-36
MIMAT0012981	eca-miR-125b-5p	<i>Equus caballus</i>	chr7: 29499965-29500052 [-]	15-ucccugagaccuuaacuuguga-36
MIMAT0003998	sme-miR-125b-5p	<i>Schmidtea mediterranea</i>	contig2:0519: 5873-5963 [+]	16-ucccugagaccuuaacuuguga-37

注: [+]代表 DNA 双链中的正义链; [-]代表 DNA 双链中的反义链。

表 2 部分预测的 hsa-miR-125b 的靶基因

Entrez 基因序号	基因名	Entrez 基因序号	基因名	Entrez 基因序号	基因名	Entrez 基因序号	基因名	Entrez 基因序号	基因名
54676	<i>GTPBP2</i>	29946	<i>SERTAD3</i>	578	<i>BAK1</i>	11313	<i>LYPLA2</i>	1605	<i>DAG1</i>
575	<i>BAI1</i>	9796	<i>PHYHIP</i>	596	<i>BCL2</i>	4074	<i>M6PR</i>	6603	<i>SMARCD2</i>
10057	<i>ABCC5</i>	1432	<i>MAPK14</i>	602	<i>BCL3</i>	64837	<i>KLC2</i>	2064	<i>ERBB2</i>
57695	<i>USP37</i>	55300	<i>PI4K2B</i>	865	<i>CBFB</i>	2239	<i>GPC4</i>	57161	<i>PELI2</i>
3603	<i>IL16</i>	6901	<i>TAZ</i>	8694	<i>DGAT1</i>	2319	<i>FLOT2</i>	8929	<i>PHOX2B</i>
28951	<i>TRIB2</i>	57538	<i>ALPK3</i>	1871	<i>E2F3</i>	8897	<i>MTMR3</i>	51124	<i>IER3IP1</i>
57509	<i>MTUS1</i>	26507	<i>CNNM1</i>	2113	<i>ETS1</i>	55671	<i>KIAA2010</i>	80019	<i>UBTD1</i>
2686	<i>GGTL3</i>	9525	<i>VPS4B</i>	79727	<i>LIN28A</i>	2263	<i>FGFR2</i>	2065	<i>ERBB3</i>

质二聚体等蛋白质的结合;此外,还可调节肽酶、肽类转移酶的活性以及调节微管、锰离子、铜离子的结合等($P<0.001$),见表 3。

从生物学过程看, hsa-miR-125b 的靶基因主要参与蛋白质氨基酸的磷酸化与去磷酸化、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正负性调控以及 DNA 依赖的转录调节;参与发育过程、细胞周期、细胞生长增殖的负性调控和细胞凋亡的正负性调控;此外,还参与了 Wnt 信号通路、细胞因子刺激反应性、药物反应性和 DNA 损伤反应性等生物学过程($P<0.001$),见表 4。

2.5 信号转导通路富集分析

信号转导通路富集分析结果显示: hsa-miR-125b 靶基因集合的信号转导通路显著富集于 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、p53 信号通路;另外还涉及到细胞周期过程、细胞凋亡过程、细胞粘附以及前列腺、胰腺、膀胱、肺等多种组织的肿瘤通路中($P<0.01$),

见表 5。

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明 miRNA 表达水平的改变能影响其对靶基因的转录后调控,从而改变靶蛋白的表达水平,最终影响肿瘤细胞的药物敏感性^[10]。本研究发现 hsa-miR-125b 在胃癌氟尿嘧啶耐药细胞株中表达水平显著下调,提示 hsa-miR-125b 与胃癌细胞的氟尿嘧啶耐药性之间有一定的相关性。

miR-125 家族成员有 hsa-miR-125a、hsa-miR-125b-1 和 hsa-miR-125b-2。miR-125a 定位于染色体 19q13, miR-125b 定位于染色体 11q24.1(hsa-miR-125b-1) 和 21q21(hsa-miR-125b-2), 分别由这两个位点的 5'端剪切形成同一成熟体。miR-125b 在多个物种中呈序列高度保守性^[11]且并具有双重的生物学功能,既可以作为抑癌基因,抑制肿瘤的发生;也可以作为促癌基因,在肿瘤组织中高表达。

表 3 hsa-miR-125b 预测靶基因的 GO 分子功能分类

GO 号	分子功能	P 值	基因数及百分比[n(%)]	所含基因
GO:0003700	Transcription factor activity	3.04E-10	8(9.3)	<i>PHOX2B;MYT1;TAF5L;BCL3;CBFB;E2F3;ETS1;TP53</i>
GO:0004653	Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase activity	2.01E-08	3(3.5)	<i>GALNT14;GALNT7;GALNT7</i>
GO:0030145	Manganese ion binding	1.10E-07	4(4.7)	<i>GALNT14;GALNT7;GALNT7;PPP1CA</i>
GO:0047485	Protein N-terminus binding	4.04E-07	3(3.5)	<i>CSNK2A1;CSNK2A1;TP53</i>
GO:0008266	Poly(U) binding	7.65E-07	2(2.3)	<i>MSI1;ATXN1</i>
GO:0042803	Protein homodimerization activity	8.45E-07	4(4.7)	<i>MAP3K11;TAZ;PAFAH1B1;BCL2</i>
GO:0046982	Protein heterodimerization activity	1.11E-05	3(3.5)	<i>BAK1;BCL2;TP53</i>
GO:0005529	Sugar binding	1.89E-05	3(3.5)	<i>GALNT14;GALNT7;GALNT7</i>
GO:0003713	Transcription coactivator activity	1.95E-05	3(3.5)	<i>SMARCD2;TAZ;CBFB</i>
GO:0008415	Acytransferase activity	2.05E-05	3(3.5)	<i>GGTL3;TAZ;DGATI</i>
GO:0016757	Transferase activity, transferring glycosyl groups	5.72E-05	3(3.5)	<i>GALNT14;GALNT7;GALNT7</i>
GO:0004722	Protein serine/threonine phosphatase activity	7.18E-05	2(2.3)	<i>MTMR3;PPP1CA</i>
GO:0008017	Microtubule binding	9.67E-05	2(2.3)	<i>KLC2;PAFAH1B1</i>
GO:0005507	Copper ion binding	1.72E-04	2(2.3)	<i>LOXLI;TP53</i>
GO:0003777	Microtubule motor activity	2.21E-04	2(2.3)	<i>KLC2;KLC2</i>
GO:0008134	Transcription factor binding	2.64E-04	3(3.5)	<i>BCL2;BCL3;ETS1</i>
GO:0008201	Heparin binding	2.69E-04	2(2.3)	<i>FGFR2;PAFAH1B1</i>
GO:0030674	Protein binding, bridging	2.75E-04	2(2.3)	<i>TTL3;BCL3</i>
GO:0008022	Protein C-terminus binding	4.02E-04	2(2.3)	<i>VPS4B;ATXN1</i>
GO:0003714	Transcription corepressor activity	5.53E-04	2(2.3)	<i>MXD4;TAZ</i>
GO:0008233	Peptidase activity	5.73E-04	3(3.5)	<i>USP37;PCSK7;TNFAIP3</i>
GO:0008234	Cysteine-type peptidase activity	7.16E-04	2(2.3)	<i>USP37;TNFAIP3</i>

已报道的研究发现^[12-13], hsa-miR-125b 与多种肿瘤的化疗敏感性有关, 但 miR-125b 的表达差异与组织或细胞对药物的敏感性并不一致。miR-125b 表达下调可以引起肿瘤耐药的发生。例如: miR-125b-1 在乳腺癌 SKBR-3 细胞中表达下调, 当转染外源性的 miR-125b-1 使其在乳腺癌细胞中高度表达后, 它所负性调节的靶基因 *Her2* 表达下调, 进而抑制了细胞的分裂、增殖和转化, 并通过调控细胞周期相关分子的表达使细胞阻滞于 G₂M 期, 从而增强了细胞对紫杉醇的药物敏感性^[14]; 智慧等^[15]研究发现胃癌耐药细胞株 SGC7901/VCR 中 miR-125b 表达下调, 抑制靶基因 *BCL2*、*MCL1* 的作用减弱, 促进了细胞对长春新碱的耐药性。这些研究表明在细胞耐药过程中, miR-125b 主要起到了抑癌基因的作用, 当 miR-125b 表达下调时, 它的抑癌作用和促细胞凋亡

作用减弱, 从而引起耐药的发生。然而, 另外一些研究发现 miR-125b 表达上调又可以引起肿瘤耐药的发生。Kong 等^[16]研究发现卵巢癌细胞株中 miR-125b 表达上调, 通过进一步靶向调节 *BAK1* 从而抑制化疗药物顺铂的细胞毒性和细胞凋亡, 继而增加细胞对药物的耐药性, 说明 miR-125b 主要起到了原癌基因的作用, 当 miR-125b 表达上调时, 它的促癌作用进一步加强进而引发耐药。

从上述结果看, 虽然 miR-125b 在细胞中的表达变化情况并不一致, 但都显示出 miR-125b 主要是通过抑制肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤细胞的增殖来影响肿瘤化疗敏感性, 这可能与 miR-125b 具有的双重生物学作用有关。此外, Shi 等^[17]研究发现 miR-125b 的正常表达有助于使细胞分裂正常停止在 G₁/S 转变点, 而人 U251 胶质瘤干细胞中 miR-125b 的低表达

表 4 hsa-miR-125b 预测靶基因的 GO 生物学过程分类

GO 号	生物学过程	P 值	基因数及百分比[n(%)]	所含基因
GO:0006468	Protein amino acid phosphorylation	5.02E-13	9(10.5)	TRIB2;CSNK2A1;CSNK2A1;FGFR2;MYT1;ALPK3;TLK2;PRKRA;RPS6KAI
GO:0006355	Regulation of transcription, DNA-dependent	3.58E-12	12(14)	PHOX2B;MXD4;MYT1;DPF2;SERTAD3;TAZ;ZNF281;TAF5L;BCL3;E2F3;LIN28A;TP53
GO:0000122	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.72E-07	4(4.7)	MXD4;TAZ;ZNF281;TP53
GO:0007275	Development	4.60E-07	8(9.3)	CELSR2;PHOX2B;MYT1;ALPK3;DLL4;PAFAH1B1;SEMA4C;TP53
GO:0045944	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7.55E-07	4(4.7)	TAZ;ATXN1;BCL3;CBFB
GO:0030308	Negative regulation of cell growth	8.57E-07	3(3.5)	SERTAD3;BCL2;TP53
GO:0008285	Negative regulation of cell proliferation	1.34E-06	4(4.7)	BAI1;MXD4;ETS1;PRKRA
GO:0042771	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	4.20E-06	2(2.3)	BCL3;TP53
GO:0007049	Cell cycle	5.01E-06	5(5.8)	MYT1;TLK2;PAFAH1B1;E2F3;PPP1CA
GO:0006470	Protein amino acid dephosphorylation	7.26E-06	3(3.5)	MTMR3;BCL2;PPP1CA
GO:0016055	Wnt receptor signaling pathway	8.13E-06	3(3.5)	CELSR2;CSNK2A1;CSNK2A1
GO:0006350	Transcription	8.69E-06	7(8.1)	SMARCD2;MYT1;DPF2;TAZ;ZNF281;E2F3;ETS1
GO:0034097	Response to cytokine stimulus	1.93E-05	2(2.3)	LIFR;BCL2
GO:0010552	Positive regulation of specific transcription from RNA polymerase II promoter	1.93E-05	2(2.3)	ETS1;TP53
GO:0006916	Anti-apoptosis	2.15E-05	3(3.5)	SYVN1;BCL2;TNFAIP3
GO:0006917	Induction of apoptosis	3.68E-05	3(3.5)	BAK1;BAK1;PRKRA
GO:0030154	Cell differentiation	3.80E-05	5(5.8)	MYT1;DLL4;PAFAH1B1;SEMA4C;TP53
GO:0006915	Apoptosis	1.11E-04	4(4.7)	DPF2;SGPL1;TNFAIP3;TP53INP1
GO:0006974	Response to DNA damage stimulus	1.17E-04	3(3.5)	TLK2;BCL3;TP53
GO:0016481	Negative regulation of transcription	1.45E-04	3(3.5)	MXD4;ATXN1;BCL3
GO:0042493	Response to drug	2.27E-04	2(2.3)	BCL2;TP53
GO:0045786	Negative regulation of progression through cell cycle	9.34E-04	2(2.3)	MTUS1;TP53

表 5 hsa-miR-125b 预测靶基因的信号通路富集分析

KEGG 信号通路	基因数及百分比[n(%)]	P 值	所含基因
Prostate cancer	4(5.1)	1.32E-05	FGFR2;BCL2;E2F3;TP53
O-Glycan biosynthesis	3(3.8)	1.76E-05	GALNT14;GALNT7;GALNT7
MAPK signaling pathway	5(6.3)	8.64E-05	FGFR2;MAPK14;ERBB2;ERBB3;TP53
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	3(3.8)	1.05E-04	NEF3;BCL2;TP53
Cell cycle	3(3.8)	9.69E-04	MYT1;E2F3;TP53
Wnt signaling pathway	2(2.5)	0.001954234	CSNK2A1;TP53
Bladder cancer	2(2.5)	0.002125931	E2F3;TP53
Non-small cell lung cancer	2(2.5)	0.003489396	E2F3;TP53
Glioma	2(2.5)	0.005014159	E2F3;TP53
p53 signaling pathway	3(3.8)	0.005631901	BCL3;BAI1;TP53
Melanoma	2(2.5)	0.005953191	E2F3;TP53
Pancreatic cancer	2(2.5)	0.006282687	E2F3;TP53
Chronic myeloid leukemia	2(2.5)	0.006620334	E2F3;TP53
Adherens junction	1(1.3)	0.007319863	CSNK2A1
Colorectal cancer	2(2.5)	0.008239157	BCL2;TP53
Apoptosis	4(5.1)	0.009207538	BCL2;BCL3;BAK1;TP53

使细胞增殖绕过了 G₁/S 检查点而大量增殖进而发生化疗耐药,说明 miR-125b 还可以通过作用细胞周期环节来影响肿瘤化疗耐药性。它所调控的靶基因在细胞周期、细胞增殖和细胞凋亡等过程中具有重要的生物学功能。

目前,已有大量的实验证据表明信号转导通路与多种肿瘤的耐药性密切相关。本文通过对 hsa-miR-125b 的靶基因进行功能富集分析和信号转导通路富集分析,发现 hsa-miR-125b 的靶基因主要富集于 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、p53 信号通路、细胞周期、细胞凋亡等信号通路,并参与细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡的正负性调控以及细胞因子刺激反应性、药物反应性、DNA 损伤反应性等生物学过程中。在 MAPK 信号转导通路中,细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、JNK 氨基末端激酶(JNK/SAPK)和 P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)都参与了细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化过程,miR-125b 通过调控这些通路中靶基因的表达,进而影响到细胞的增殖和凋亡,改变了肿瘤对化疗药物的敏感性^[18-21]。Wnt 信号通路是调控细胞生长、发育和分化的关键通路之一,其中经典的 Wnt/ β -catenin 通路主要参与调控细胞的增殖、分化、极化、凋亡与抗凋亡过程。周秀怀^[22]研究发现抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路能够增加食管癌顺铂化疗敏感性;此外,还有报道发现 Wnt 信号通路与肝癌细胞对 5-FU 的耐药性、与胰腺癌对吉西他滨耐药性、与乳腺癌的多药耐药性、与结肠癌干细胞的耐药性密切相关^[23-26];p53 作为抑癌基因与细胞周期调控和细胞凋亡有关,p53 突变或表达异常可导致化疗耐受,它通过精细的调控机制引起一系列基因包括其它肿瘤抑制基因表达的改变,从而诱导细胞周期阻滞、激活 DNA 修复和凋亡机制。p53 通路下游靶基因的活化及 p53 与其他分子/基因间的相互作用都会影响肿瘤的耐药性^[27-30]。除了上述信号转导通路的作用,化疗药物的抗肿瘤效应还会通过直接引起细胞周期停滞、细胞凋亡等过程来实现。有研究报道 miRNA 通过与细胞凋亡抑制因子的靶向调控、与细胞周期调控因子的负性调节来影响药物作用的发挥,最终导致耐药的产生^[31-34]。

基于本文生物信息学分析和已有的研究结果,BGC823/Fu 细胞株中 hsa-miR-125b 表达显著下调,有可能通过上调 MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、

p53 信号通路,以及细胞周期、细胞凋亡等信号通路和生物学过程中的靶基因,进而增加了胃癌的细胞增殖能力和抗凋亡的能力,降低了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,最终改变了胃癌对氟尿嘧啶的药物反应性。这一结果为研究 hsa-miR-125b 在肿瘤耐药过程中的调控机制和作用机理,提供了可靠的研究线索和可行的研究策略,也为 miRNA 作为靶点恢复肿瘤对药物的敏感性提供了研究基础^[35]。

参考文献

- [1] Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung*, 2008, 58(6): 261-264. [\[DOI\]](#)
- [2] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 2005, 435(7043): 839-843. [\[DOI\]](#)
- [3] Blower PE, Chung JH, Verducci JS, Lin S, Park JK, Dai Z, Liu CG, Schmittgen TD, Reinhold WC, Croce CM, Weinstein JN, Sadee W. MiRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1): 1-9. [\[DOI\]](#)
- [4] Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anti-cancer drug resistance. *Int J Cancer*, 2010, 126(1): 2-10. [\[DOI\]](#)
- [5] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5848-5856. [\[DOI\]](#)
- [6] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 152-157. [\[DOI\]](#)
- [7] Lewis B P, Burge C B, Bartel V. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are MicroRNA targets. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20. [\[DOI\]](#)
- [8] Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA. org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 149-153. [\[DOI\]](#)
- [9] Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: 163-169. [\[DOI\]](#)
- [10] Fojo T. Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or promoterregions, epigenetic changes and microRNAs. *Drug Resist Updat*, 2007, 10(1-2): 59-67. [\[DOI\]](#)
- [11] Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 6.

- [12] Xia HF, He TZ, Liu CM, Cui Y, Song PP, Jin XH, Ma X. miR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 23(4–6): 347–358. [\[DOI\]](#)
- [13] Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(2): 267–272. [\[DOI\]](#)
- [14] 胡斌, 吴爱国, 李学孝, 纪术峰, 王梦川, 吴凯, 邵国利. miR-125b-1 增强乳腺癌 SKBR-3 细胞对紫杉醇的药物敏感性. *热带医学杂志*, 2012, 12(7): 789–792. [\[DOI\]](#)
- [15] 智慧, 朱伟, 王同杉, 王建, 束永前, 刘平. miR-125b 靶向抑制 BCL2、MCL1 表达对胃癌 SGC7901/VCR 细胞多药耐药性的影响. *南京医科大学学报*, 2011, 6: 777–781. [\[DOI\]](#)
- [16] Kong F, Sun C, Wang Z, Han L, Weng D, Lu Y, Chen G. miR-125b confers resistance of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1(BAK1) expression. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(4): 543–549. [\[DOI\]](#)
- [17] Shi L, Zhang J, Pan T, Zhou J, Gong W, Liu N, Fu Z, You Y. MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation. *Brain Res*, 2010, 1312: 120–126. [\[DOI\]](#)
- [18] Duman BB, Sahin B, Acikalin A, Ergin M, Zorludemir S. PTEN, Akt, MAPK, p53 and p95 expression to predict trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer. *J BUON*, 2013, 18(1): 44–50. [\[DOI\]](#)
- [19] Pritchard AL, Hayward NK. Molecular pathways: mitogen-activated protein kinase pathway mutations and drug resistance. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(9): 2301–2309. [\[DOI\]](#)
- [20] Paunovic V, Harnett MM. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*, 2013, 73(2): 101–115. [\[DOI\]](#)
- [21] 邢凤娟, 王岩, 孟令杰. 肿瘤多药耐药机制及其相关信号通路的研究进展. *中国实验诊断学*, 2013, 17(2): 379–382. [\[DOI\]](#)
- [22] 周秀怀. 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路增加食管癌顺铂化疗敏感性的研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(12): 1354–1355. [\[DOI\]](#)
- [23] Yang Y, Mallampati S, Sun B, Zhang J, Kim SB, Lee JS, Gong Y, Cai Z, Sun X. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett*, 2013, 333(1): 9–17. [\[DOI\]](#)
- [24] Deng Y, Su Q, Mo J, Fu X, Zhang Y, Lin EH. Celecoxib downregulates CD133 expression through inhibition of the Wnt signaling pathway in colon cancer cells. *Cancer Invest*, 2013, 31(2): 97–102. [\[DOI\]](#)
- [25] Harati R, Benech H, Villégier AS, Mabondzo A. P-glycoprotein, breast cancer resistance protein, Organic Anion Transporter 3, and Transporting Peptide 1a4 during blood-brain barrier maturation: involvement of Wnt/β-catenin and endothelin-1 signaling. *Mol Pharm*, 2013, 10(5): 1566–1580. [\[DOI\]](#)
- [26] Xu N, Shen C, Luo Y, Xia L, Xue F, Xia Q, Zhang J. Upregulated miR-130a increases drug resistance by regulating RUNX3 and Wnt signaling in cisplatin-treated HCC cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 468–472. [\[DOI\]](#)
- [27] Höpker K, Reinhardt HC. p53-regulating pathways as targets for personalized cancer therapy. *Dtsch Med Wochenschr*, 2013, 138(3): 82–86. [\[DOI\]](#)
- [28] Gottschalk B, Klein A. Restoration of wild-type p53 in drug-resistant mouse breast cancer cells leads to differential gene expression, but is not sufficient to overcome the malignant phenotype. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1–2): 213–227. [\[DOI\]](#)
- [29] Atsumi Y, Inase A, Osawa T, Sugihara E, Sakasai R, Fujimori H, Teraoka H, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Nakagama H, Masutani M, Yoshioka K. The Arf/p53 protein module, which induces apoptosis, down-regulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs. *J Biol Chem*, 2013, 288(19): 13269–13277. [\[DOI\]](#)
- [30] Kapoor NR, Ahuja R, Shukla SK, Kumar V. The HBx protein of hepatitis B virus confers resistance against nucleolar stress and anti-cancer drug-induced p53 expression. *FEBS Lett*, 2013, 587(9): 1287–1292. [\[DOI\]](#)
- [31] Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A, Vasques Ldos R. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Am J Cancer Res*, 2012, 2(4): 414–433. [\[DOI\]](#)
- [32] Zhang J, Wang Y, Zhen P, Luo X, Zhang C, Zhou L, Lu Y, Yang Y, Zhang W, Wan J. Genome-wide analysis of miRNA signature differentially expressed in doxorubicin-resistant and parental human hepatocellular carcinoma cell lines. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54111. [\[DOI\]](#)
- [33] Haenisch S, Cascorbi I. miRNAs as mediators of drug resistance. *Epigenomics*, 2012, 4(4): 369–381. [\[DOI\]](#)
- [34] Maftouh M, Avan A, Galvani E, Peters GJ, Giovannetti E. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs in resistance to epidermal growth factor receptor-targeted agents and novel therapeutic strategies for treatment of non-small-cell lung cancer. *Crit Rev Oncog*, 2013, 18(4): 317–326. [\[DOI\]](#)
- [35] Allen KE, Weiss GJ. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(12): 3126–3136. [\[DOI\]](#)