

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.11.001

❖ 基础研究 ❖

# ZNF139 通过抑制 miR-181a-5p 增加胃癌细胞耐药性的机制

朱海星, 何新阳

(中国科学技术大学附属第一医院·安徽省立医院肿瘤外科, 安徽 合肥 230031)

**【摘要】目的:** 探讨 ZNF139 通过抑制 miR-181a-5p 表达增加胃癌细胞耐药性的机制。**方法:** 检测 ZNF139 和 miR-181a-5p 在胃癌组织和细胞系中的表达情况, ZNF139-siRNA、miR-181a-5p 模拟物或 pcDNA-ZNF139 转染 MKN45、MKN45/ADR 细胞系。MTT 法测定细胞活性, Real-time PCR 和 Western blot 分别检测 ZNF139、miR-181a-5p 和 P-gp、GST- $\pi$ 、MRP-1、Bcl-2、TS 和 Bax 等耐药相关基因 mRNA 和蛋白表达水平。ChIP 和双荧光素酶活性试验验证 ZNF139、miR-181a-5p 之间的调控作用。**结果:** ZNF139 mRNA 和蛋白相对表达量在胃癌组织和细胞系较癌旁组织升高 ( $P < 0.05$ ), miR-181a-5p mRNA 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。转染 ZNF139-siRNA 后, MKN45/ADR 细胞中 miR-181a-5p mRNA 表达升高, 化疗药物阿霉素 (ADR)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、奥沙利铂 (L-OHP) 处理后, MKN45/ADR 细胞存活率降低 ( $P < 0.05$ )。MKN45 细胞系转染 pcDNA-ZNF139 后, ZNF139 mRNA 和蛋白表达水平升高, miR-181a-5p mRNA 表达水平下降, 同时细胞对 ADR、5-FU、L-OHP 的耐药性增强 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶活性试验表明, ZNF139 抑制了 miR-181a-5p 启动子的转录活性 ( $P < 0.05$ )。抑制 ZNF139 可降低 MKN45/ADR 细胞中 P-gp、MRP-1、Bcl-2 的表达 ( $P < 0.05$ ); miR-181a-5p 模拟物转染 MKN45/ADR 细胞后, P-gp、LRP 和 Bcl-2 的表达降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** ZNF139 通过抑制 miR-181a-5p 诱导胃癌中 P-gp、MRP-1 和 Bcl-2 的表达来增加细胞的耐药特性, 有望成为防治胃癌细胞耐药的新的策略。

**【关键词】** 胃癌; 癌旁组织; 耐药性; ZNF139; miR-181a-5p; 耐药基因

**【中图分类号】** R735.2 **【文献标志码】** A

## ZNF139 increased drug resistance in gastric cancer cells by inhibiting miR-181a-5p

ZHU Hai-xing, HE Xin-yang

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230031, Anhui, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the mechanism of ZNF139 increasing drug resistance in gastric cancer cells by inhibiting the expression of miR-181a-5p. **Methods:** The expression of ZNF139 and miR-181a-5p in gastric cancer tissues and cell lines was detected. MKN45 and MKN45/ADR cell lines were transfected with ZNF139-siRNA, miR-181a-5p mimic or pcDNA-ZNF139. The cell viability was determined by MTT assay, and the expression levels of drug-resistant genes such as ZNF139, miR-181a-5p and P-gp, GST- $\pi$ , MRP-1, Bcl-2, TS and Bax were detected by real-time PCR and Western blot. The regulatory effect between ZNF139 and miR-181a-5p was verified by ChIP and dual luciferase activity assay. **Results:** The relative expression levels of ZNF139 mRNA and protein were significantly higher in gastric cancer tissues and cell lines than in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-181a-5p mRNA was decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of miR-181a-5p mRNA in MKN45/ADR cells was significantly increased after transfection with ZNF139-siRNA, and the survival rate of MKN45/ADR cells was significantly decreased after treatment with chemotherapy drugs ADR, 5-FU and L-OHP ( $P < 0.05$ ). MKN45 cell line transfected with pcDNA-ZNF139, the expression level of ZNF139 mRNA and protein was increased, the expression level of miR-181a-5p mRNA was decreased, and the drug resistance to ADR, 5-FU and L-OHP was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Dual luciferase activity assay showed that ZNF139 inhibited the transcriptional activity of miR-181a-5p promoter ( $P < 0.05$ ). Inhibition of ZNF139 could decrease the expression of P-gp, MRP-1 and Bcl-2 in MKN45/ADR cells ( $P < 0.05$ ). MiR-181a-5p mimics were transfected into MKN45/ADR cells, and the expressions of P-gp, LRP and Bcl-2 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The ZNF139 can increase the drug resistance of gastric cancer cells by inducing the ex-

基金项目: 安徽省自然科学基金(1908085MH282)

作者简介: 朱海星(1991-), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: zhuhaxing666@163.com

通讯作者: 何新阳。E-mail: hxy2333@126.com

pression of P-gp, MRP-1 and Bcl-2 in gastric cancer cells by inhibiting miR-181a-5p, and this pathway may be a new strategy for the prevention and treatment of drug resistance of gastric cancer cells.

**[Key words]** Gastric cancer; Para-carcinoma tissue; Drug resistance; ZNF139; MiR-181a-5p; Resistance genes

胃癌(gastric cancer, GC)是世界范围内最常见的消化道恶性肿瘤之一,具有较高的发病率和死亡率<sup>[1]</sup>。目前,手术仍是治疗胃癌的主要方法,而大多数患者确诊时已属晚期,手术治疗的效果较为有限<sup>[2]</sup>。因此,化疗在根除恶性肿瘤细胞中起着关键作用,但其5年生存率低于30%,结果仍然不令人满意<sup>[3]</sup>,原因主要是胃癌细胞的耐药性,而多药耐药是胃癌化疗失败的主要原因,也是导致胃癌患者死亡率较高的原因之一<sup>[4]</sup>。因此,探索新的、潜在的治疗策略以解决胃癌患者的耐药性具有重要的意义。多项研究表明,一些关键分子和信号通路参与了胃癌细胞的耐药性。锌指蛋白139(ZNF139)是锌指蛋白家族成员之一,具有转录和调控下游基因的功能<sup>[5]</sup>。van Dekken等<sup>[6]</sup>研究发现,ZNF139的表达可能与肿瘤的生长和发展有关,ZNF139参与胃癌细胞分化的过程,促进胃癌细胞的侵袭和发育<sup>[7]</sup>。然而,ZNF139在胃癌耐药性中的主要下游靶点仍然未知。因此,要了解胃癌耐药性的机制,还需要进一步研究ZNF139的作用机制。在过去的几年里,miRNAs的作用一直是癌症研究的热点。有研究<sup>[8]</sup>表明,miR-181a-5p与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关。此外,另一项研究<sup>[9]</sup>发现,miR-181a-5p通过参与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路来调控结直肠癌的进展和化疗耐药。由此可见,miR-181a-5p可能参与了胃癌细胞的耐药性,但其具体的调控机制不完全清楚。本研究旨在探讨ZNF139与miR-181a-5p之间的关系及其在胃癌细胞耐药性中的作用和分子机制,为临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织样本和细胞 采集2019年1月至2020年1月中国科学技术大学附属第一医院经病理证实的35例胃癌患者(年龄42~75岁)的癌组织和癌旁组织(对照组)样本。对照组样本为来自同一患者的邻近正常胃组织;胃癌临床分期包括I期3例,II期9例,III期18例,IV期5例。所有参与者术前均未接受放疗和化疗。每个癌组织和癌旁组织(约1.0 cm × 0.5 cm × 0.5 cm)均取自参与者(距离切缘超过3 cm),样本浸泡于液氮中快速冷冻,后转移至-80℃低温冰箱保存。本研究获得医院伦理委员会批准同意。纳入标准:(1)均符合胃癌相关诊断标准<sup>[10]</sup>;(2)40岁≤年龄≤75岁;(3)患者及家属知

情同意。排除标准:(1)已发生肿瘤转移者;(2)合并其他脏器肿瘤、消化系统严重疾病者;(3)妊娠期及哺乳期妇女;(4)伴有其他系统疾病患者。

1.1.2 主要仪器及试剂 人胃细胞系MKN45(货号:ACC 409)、正常胃粘膜上皮细胞系GES-1(货号:21875091)和阿霉素耐药GC MDR细胞系MKN45/ADR(货号:21127022)均购自美国American Type Culture Collection(ATCC)细胞库。RPMI 1640培养基(货号:A10491)和胰蛋白酶(货号:31870-082)购自Gibco公司。TRIzol试剂和Lipofectamine™ 2000转染试剂购自Invitrogen公司。荧光定量RT-PCR试剂(货号:25030-024)和反转录试剂盒(货号:25-025)自Promega公司。蛋白提取试剂盒(货号:163-2084)购自中国Beyotime公司。兔ZNF139抗体ZNF139(货号:ab32124)由美国Sigma公司提供。兔P-gp(货号:13978)、GST- $\pi$ (货号:3498)、MRP-1(货号:14182)、Bcl-2(货号:2772)、TS(货号:3452)、Bax(货号:13598)和 $\beta$ -actin(货号:5174)抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology;MTT试剂盒(货号:M92050)购自美国Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 人GC细胞系MKN45、MKN45/ADR和GES-1,用含10%胎牛血清、100 mg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的RPMI 1640(Invitrogen)培养。将细胞分为MKN45、MKN45/ADR和GES-1组,其中MKN45/ADR在含有0.4 mg/L的ADR中培养,维持耐药表型。实验前1周停止此干预。于37℃、5% CO<sub>2</sub>湿化气氛孵育后,用0.25%胰蛋白酶溶液加0.02% EDTA消化,进行传代培养。采用BLOCK-iT™ RNAi设计器(序列:5'-ACC TCG GAA GAT TCA GCA T-3')设计ZNF139-siRNA序列,将其转染到ZNF139高表达的GC细胞株MKN45/ADR中,以转染非特异性siRNA序列(NS-siRNA:5'-GAC GAG TTG ACT GCG ATT G-3')的细胞作为阴性对照,构建ZNF139-siRNA和NS-siRNA组;构建人ZNF139过表达载体。利用KpnI和NotI酶切位点将人ZNF139编码序列(NM\_003439)亚克隆到pcDNA3.1载体中。转染前将GC细胞接种于六孔板24 h,密度为4 × 10<sup>5</sup>/mL。按照试剂转染手册Lipofectamine™ 2000,将质粒载体、siRNA或miR-181a-5p模拟物转染到GC细胞或耐药细胞中,构建pcDNA-ZNF139、miR-181a-5p和An-

ti-miR-181a-5p 组,其中细胞用 RPMI 1640 冲洗,使其无血清和无抗生素。24 h 后检测转染效率,并进行后续实验。

1.2.2 MTT 试验 将胃癌组织和正常癌旁组织切片后研磨,随后,制备单细胞悬液。用 0.02% EDTA-0.25% 胰蛋白酶消化后的 GC 细胞,以  $5 \times 10^4$  细胞/mL 的密度接种于 96 孔板,转染 ZNF139-siRNA,细胞生长至 80% 时加入化疗药物 [阿霉素 (ADR)、5-氟尿嘧啶 (5-Fu)、奥沙利铂 (L-OHP)]。实验结束前 4 h,在孔中加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 微升。每孔加入 DMSO 150 微升,室温摇板 15 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度值 (OD 值)。以上实验重复 3 次。

1.2.3 RT-qPCR 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 从转染细胞中分离总 RNA,先采用预冷的 PBS 清洗 2~3 遍,加入 1 mL Trizol 裂解细胞 15 min,待贴壁细胞完全脱落后,移至 2 mL EP 管,并使用紫外分光光度计测量 RNA 浓度。使用 MultiscribeRTkit (Applied Biosystems, USA) 和 oligo (dT),在 40 °C 反应 6 min,65 °C 反应 25 min,35 个循环条件下合成互补 DNA (cDNA),得到 cDNA 产物,保存于 -80 °C,用于进一步的实验。体系总量为 20  $\mu$ L:PCR 反应包含 2  $\mu$ L cDNA、0.4  $\mu$ L 正向引物、0.4  $\mu$ L 反向引物、7.2  $\mu$ L  $H_2O_2$  和 10  $\mu$ L SYBR;扩增条件为 25 °C,10 min,48 °C,30 min,95 °C,5 min。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算表达水平,GAPDH 作为实验内参。所用引物如下:ZNF139 (411 bp):(F) 5'-CTT CCT GAG TTC TTG GTT TCG-3',(R) 5'-CCT TTG ACC CAC TGG TTT ATG-3';MDR-1 (302 bp):(F) 5'-GAA TGT TCA GTG GCT CCG AG-3',(R) 5'-ACA ATC TCT TCC TGT GAC ACC -3';GST- $\pi$  (341 bp):(F) 5'-ATA CCA TCC TGC GTC ACC TG-3',(R) 5'-TCC TTG CCC GCC TCA TAG TT-3';P-gp (480 bp):(F) 5'-CAT CAG CAG GCA CCA CAA C-3',(R) 5'-TTC CAG GTC TCC TCC TTC TTG-3';Bcl-2 (459 bp):(F) 5'-TGT GTG GAG AGC GTC AAC C-3',(R) 5'-TGG ATC CAG GTG TGC AGG T-3';TS (397 bp):(F) 5'-TTT CTG ACG GCA ACT TCA AC-3',(R) 5'-AGT CCA ATG TCC AGC CCA T-3';Bax (452 bp) (F) 5'-TTT CTG ACG GCA ACT TCA AC-3',(R) 5'-AGT CCA ATG TCC AGC CCA T-3';GAPDH (580 bp):(F) 5'-GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC-3',(R) 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT-3'。

1.2.4 Western blot 采用 RIA 裂解缓冲液 (Beyotime Biotechnology, 中国) 和蛋白酶抑制剂 (Roche, 中国) 提取转染细胞的总蛋白,用 BCA 试剂盒

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 测定蛋白浓度。变性后,取相同量总蛋白上样,经 10% 聚丙烯酰胺 SDS 凝胶 (SDS/PAGE) 分离后,转移到 PVDF 膜上 (Amersham Pharmacia Biotech),在 37 °C 下用 5% 脱脂乳封闭 1 h,将膜与 ZNF139、P-gp、GST- $\pi$ 、MRP-1、Bcl-2、TS、Bax 和  $\beta$ -actin 的一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后用含 Tween 20 (TBST) 的 Tris 缓冲盐水洗涤膜,与二抗在室温下孵育 2 h,用 TBST 洗涤。最后,用增强化学发光 (ECL) western blot 检测试剂反应后,检测蛋白条带。使用 ImageJ 软件对条带的灰度值进行分析。

1.2.5 染色质免疫共沉淀 将细胞在 1% 甲醛中室温培养 15 min,使相关蛋白与 DNA 交联。随后,添加甘氨酸至最终浓度为 0.125 M,交联终止。用 300  $\mu$ L 的放射免疫沉淀缓冲液 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸盐和蛋白酶抑制剂) 启动细胞裂解。裂解产物经过超声处理,生成约 600 bp 的染色质片段,然后使用琼脂糖凝胶电泳进行评估。将上清液以 13 000 rpm 离心 10 min,然后与 30  $\mu$ L 蛋白 A-Sepharose beads (Sigma, 美国) 和剪切后的鲑鱼精子 DNA 一起孵育,在 4 °C 下预清除 15 min。在 13 000 rpm 离心 5 min 后,将收集的上清液平均分为三份:一份用于提取 DNA 作为输入,另一份用于免疫沉淀,加入或不加入 2  $\mu$ g ZNF139 抗体,在 4 °C 摇动过夜。然后,用蛋白 A-Sepharose beads 和剪切的鲑鱼精子 DNA 沉淀免疫复合物。离心后,收集小球,用放射免疫沉淀洗涤缓冲液冲洗。将 200 微升洗脱缓冲液 (1% SDS, 0.1 M  $NaHCO_3$ ) 加入到洗净的珠中,洗脱免疫沉淀,免疫沉淀在 65 °C 孵育过夜。12 000 rpm 离心 10 min,苯酚-氯仿提取,乙醇沉淀提取 DNA。PCR 扩增含有 ZNF139 结合位点的启动子片段,ZNF139 (411bp):(F) 5'-CTT CCT GAG TTC TTG GTT TCG-3',(R) 5'-CCT TTG ACC CAC TGG TTT ATG-3'。

1.2.6 荧光素酶活性检测 用 pGL3-miR-181a-5p-luc 将 miR-181a-5p (5'-AACAUCAACGCUGUCG-GUGAGU-3') 上游 1.5 kb 启动子区域亚克隆到 pGL3-Basic 载体中、pcDNA-ZNF139 或 pGL3-Basic,再加上 pRL-TK,一式三份转染生长至 70% 汇合的细胞中。转染 48 h 后,根据制造商的手册,使用 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) 测量荧光素酶活性,室温裂解细胞 15 min,加入 Renilla luciferase 的底物,终止 LAR II 反应,向 40  $\mu$ L 的 LAR II 中加入 10  $\mu$ L 细胞裂解液,混匀后,检测读数,即为 Firefly luciferase 的值,计算出每管

的 Firefly luciferase/Renillaluciferase 的比值,以 control 组的比值为单位 1,得到不同处理组的相对 luciferase 活性与 pRL-TK 的荧光素酶活性相比。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ZNF139 和 miR-181a-5p 在 GC 组织中的表达

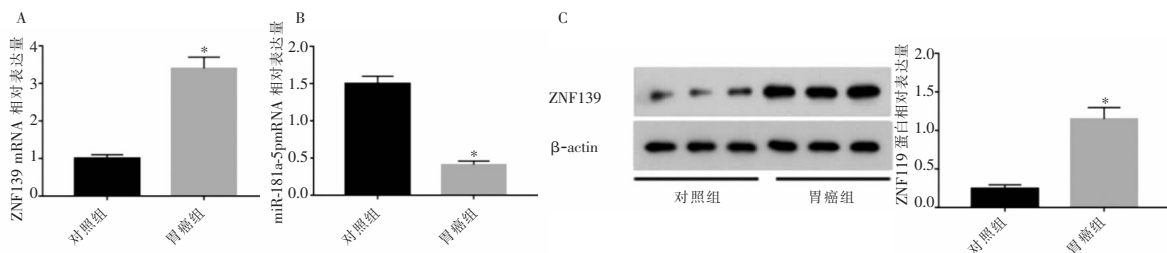


图 1 ZNF139 和 miR-181a-5p 在胃癌组织和癌旁组织中的表达

A. ZNF139 mRNA 相对表达量; B. miR-181a-5p mRNA 相对表达量; C. ZNF139 蛋白相对表达量。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

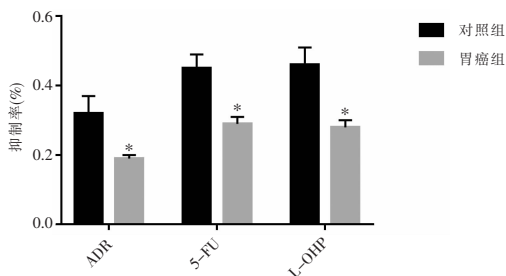


图 2 细胞化疗敏感性

\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

### 比较

与对照组相比, ZNF139 mRNA 和蛋白在胃癌组织中表达上调 ( $P < 0.05$ ), miR-181a-5p mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 细胞化疗敏感性比较

药物敏感性结果表明, 添加 ADR、5-FU 和 L-OHP 后, 胃癌组织中的细胞抑制率低于胃癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 ZNF139 和 miR-181a-5p 在不同胃细胞系中的表达比较

在 MKN45、MKN45/ADR 和 GES-1 三种细胞系中, ZNF139 mRNA 和蛋白在 MKN45/ADR 中表达水平最高, 其次是 MKN45, 在 GES-1 中表达水平最低 ( $P < 0.05$ )。而 miR-181a-5p mRNA 的表达趋势则相反, 在 MKN45/ADR 最低, 其次是 MKN45, 在 GES-1 表达水平最高 ( $P < 0.05$ )。添加 ADR、5-FU 和 L-OHP 后, MKN45/ADR 细胞抑制率最低, MKN45 次之, GES-1 细胞抑制率最高 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

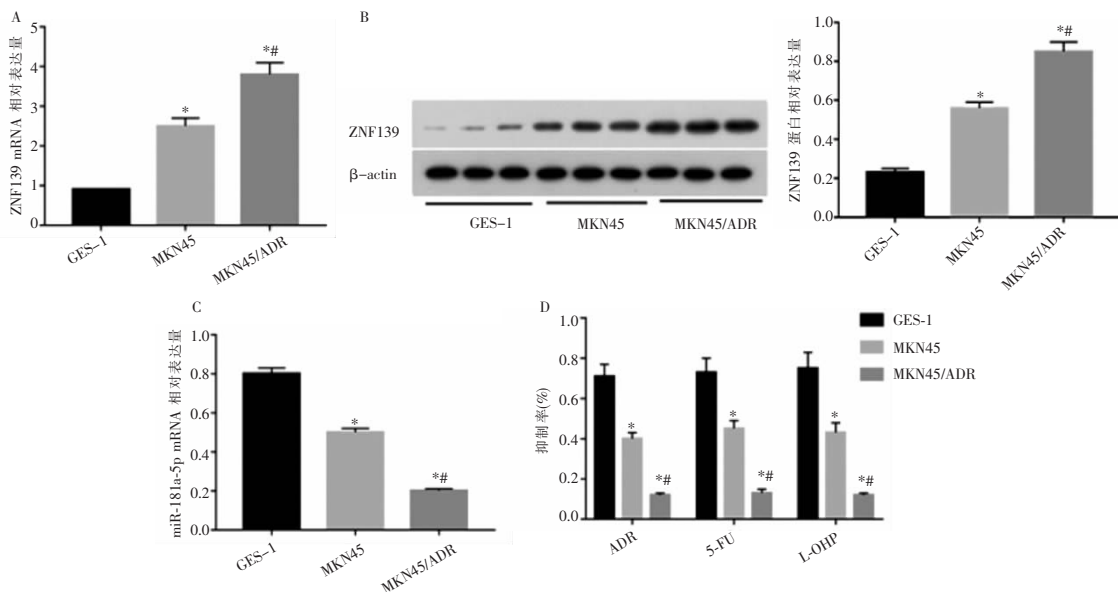


图 3 ZNF139 和 miR-181a-5p 在不同胃细胞系中的表达

A. ZNF139 mRNA 相对表达量; B. ZNF139 蛋白相对表达量; C. miR-181a-5p mRNA 相对表达量; D. MTT 法检测细胞活性。

\* $P < 0.05$ , 与 GES-1 相比; # $P < 0.05$ , 与 MKN45 相比较。

## 2.4 ZNF139 过表达对细胞耐药性的影响

转染对照 siRNA 后,ZNF139 蛋白在细胞内水平不变,而转染 ZNF139-siRNA 的 MKN45/ADR 细胞中,ZNF139 蛋白有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )。ZNF139 蛋白表达水平呈剂量依赖性降低,转染 48 h 后抑制作用最大 ( $P < 0.05$ )。转染 ZNF139-siRNA 的 MKN45/ADR 细胞中,ADR、5-FU 和 L-OHP 降低了细胞存活率 ( $P < 0.05$ )。pcDNA-ZNF139 转染 MKN45 48 h 后,ZNF139 蛋白的表达增加 ( $P <$

0.05)。pcDNA-ZNF139 转染后,ADR、5-FU 或 L-OHP 处理的细胞活性升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

## 2.5 miR-181a-5p 对 MKN45/ADR 耐药细胞的影响

miR-181a-5p 模拟物转染 MKN45/ADR 后,miR-181a-5p mRNA 表达上调 ( $P < 0.05$ )。转染 miR-181a-5p 模拟物后 MKN45/ADR 细胞存活率降低 ( $P < 0.05$ )。在 MKN45/ADR 细胞中转染 Anti-miR-181a-5p 抑制 miR-181a-5p mRNA 水平,转染后细胞存活率提高 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

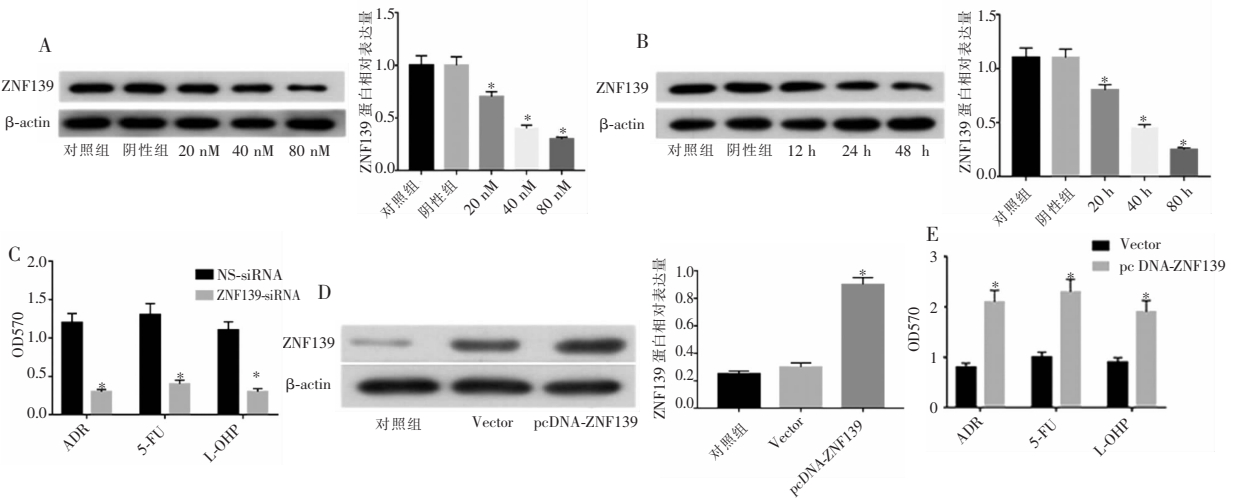


图 4 ZNF139 过表达对细胞耐药性的影响

A-B. ZNF139 蛋白相对表达量;C. MTT 法检测细胞活性;D. ZNF139 蛋白相对表达量;E. MTT 法检测细胞活性。\* $P < 0.05$ ,与对照组相比。

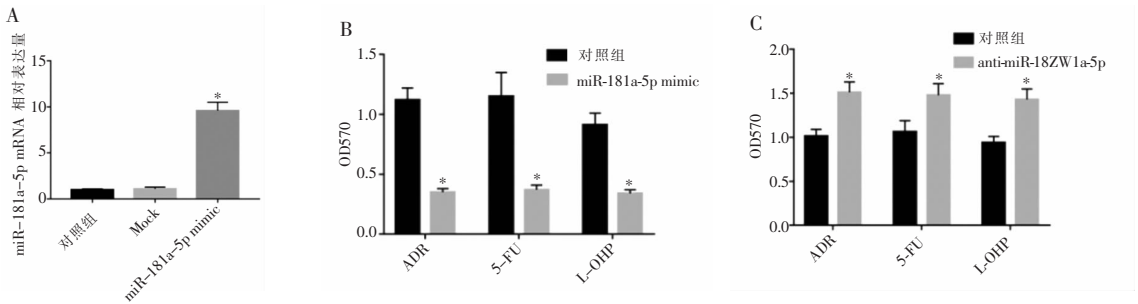


图 5 miR-181a-5p 对 MKN45/ADR 耐药细胞的影响

A. miR-181a-5p mRNA 相对表达量;B-C. MTT 法检测细胞活性。\* $P < 0.05$ ,与对照组相比。

## 2.6 ZNF139 抑制 MKN45 细胞中 miR-181a-5p 的转录

转染 ZNF139-siRNA 至 MKN45/ADR 细胞后,miR-181a-5p mRNA 的表达升高 ( $P < 0.05$ )。同时,转染 MKN45/ADR 后,ZNF139 mRNA 和蛋白的表达无明显变化 ( $P > 0.05$ )。转染 pcDNA-ZNF139 48 h 后,MKN45 细胞中 miR-181a-5p mRNA 下调 ( $P < 0.05$ )。建立 miR-181a-5p 的荧光素酶报告基因质粒,该质粒位于启动子区上游,序列为 2 kb,与 pcDNA-ZNF139 共转染细胞。基因分析结果显示,ZNF139 可能抑制 miR-181a-5p 的启动子活性。通过 ChIP 分析进一步证实 ZNF139 直接与 miR-181a-

5p 的启动子区结合。因此,ZNF139 作为转录因子,可以通过直接偶联到 miR-181a-5p 的启动子区域来抑制 MKN45 中 miR-181a-5p 的转录活性。见图 6。

## 2.7 ZNF139 表达对耐药基因水平的影响

抑制 ZNF139 可降低 MKN45/ADR 细胞中 P-gp、MRP-1、Bcl-2 的表达 ( $P < 0.05$ ),而 GST- $\pi$ 、TS 和 Bax 的表达无明显变化 ( $P > 0.05$ )。见图 7。

## 2.8 miR-181a-5p 表达对耐药基因水平的影响

miR-181a-5p 模拟物转染 MKN45/ADR 细胞后,P-gp、MRP 和 Bcl-2 的表达降低 ( $P < 0.05$ ),而 GST- $\pi$ 、TS 和 Bax 的表达未见改变 ( $P > 0.05$ )。见图 8。

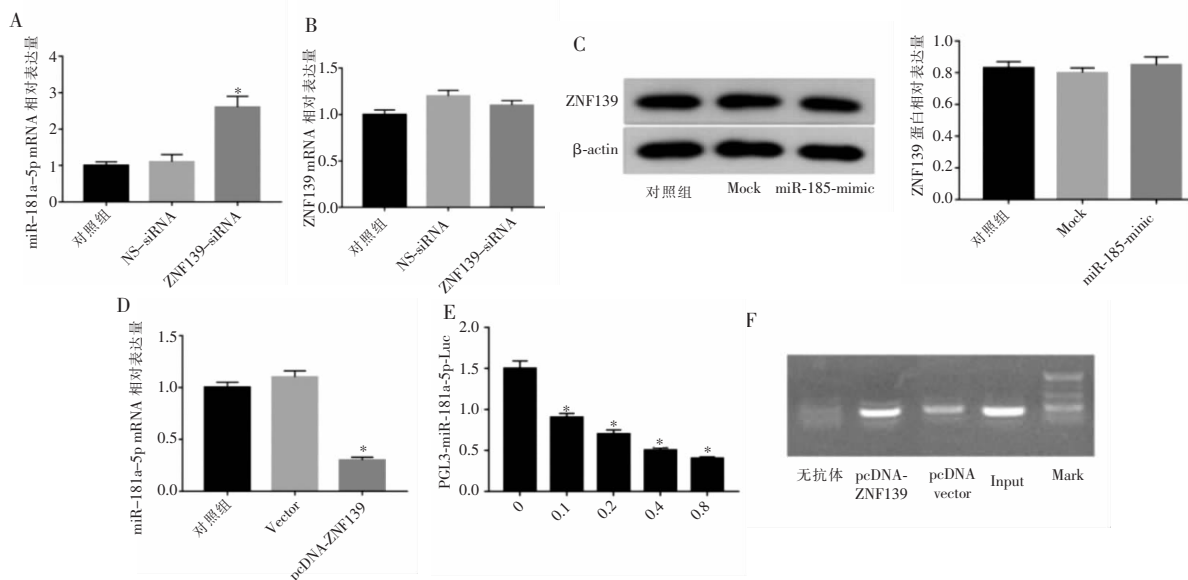


图 6 ZNF139 抑制 MKN45 细胞中 miR-181a-5p 的转录

A. miR-181a-5p mRNA 相对表达量; B. ZNF139 mRNA 相对表达量; C. ZNF139 蛋白相对表达量; D. miR-181a-5p mRNA 相对表达量; E. miR-181a-5p 的启动子活性; F. ChIP 分析 ZNF139 与 miR-181a-5p 的启动子区结合。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

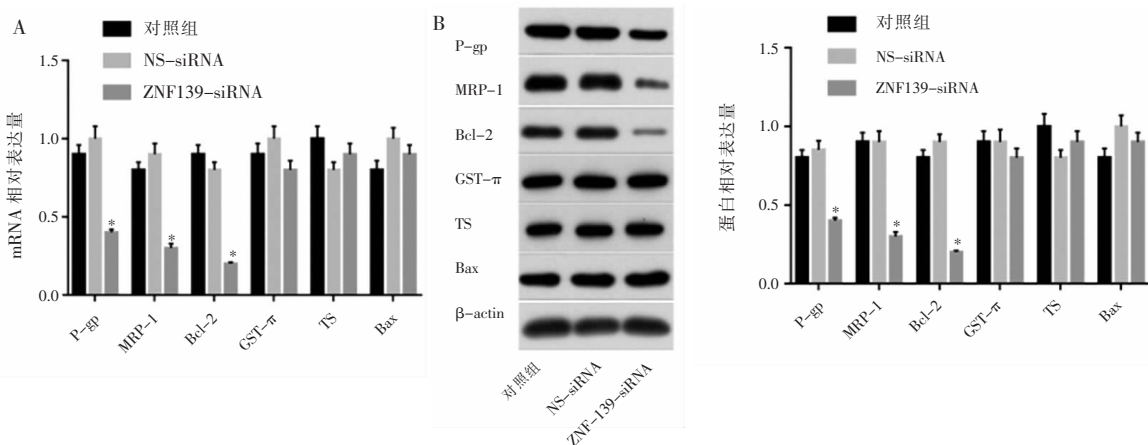


图 7 ZNF139 表达对抗药基因水平的影响

A. mRNA 相对表达量; B. 蛋白相对表达量。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

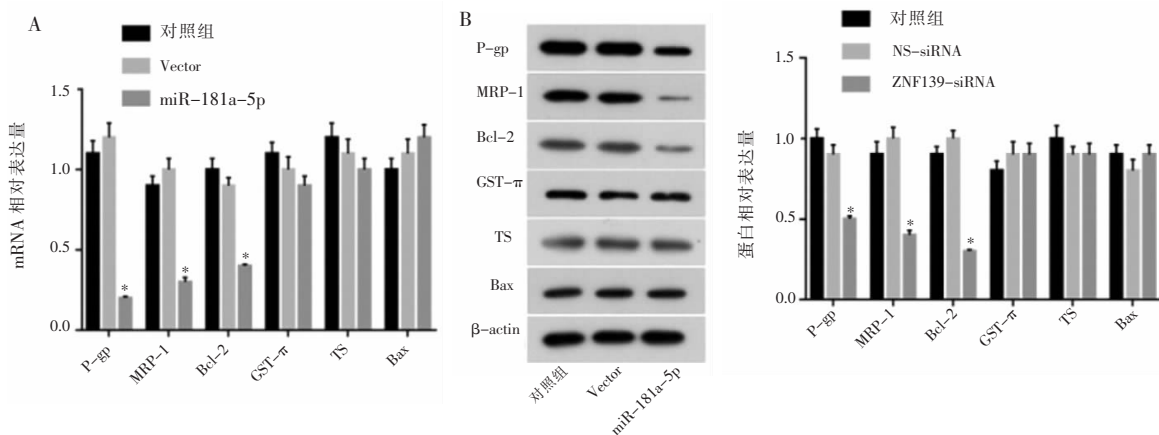


图 8 miR-181a-5p 表达对抗药基因水平的影响

A. mRNA 相对表达量; B. 蛋白相对表达量。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。

### 3 讨论

胃癌发病率居全国消化系统恶性肿瘤之首,且

预后极差<sup>[11]</sup>。而胃癌细胞的耐药性直接导致化疗的失败,是影响患者预后的重要原因。有研究数据<sup>[12]</sup>表明,ZNF139 参与了细胞耐药性的调控,能够

逆转 GC 细胞系 MKN28 的耐药性。本研究结果显示,在胃癌组织和细胞系中 ZNF139 mRNA 和蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),miR-181a-5p mRNA 表达降低( $P < 0.05$ )。转染 ZNF139-siRNA 后,MKN45/ADR 细胞中 miR-181a-5p mRNA 表达升高( $P < 0.05$ ),化疗药物 ADR、5-FU、L-OHP 处理后,MKN45/ADR 细胞存活率降低( $P < 0.05$ )。MKN45 细胞系转染 pcDNA-ZNF139 后,ZNF139 mRNA 和蛋白的表达水平升高( $P < 0.05$ ),miR-181a-5p mRNA 的表达水平下降( $P < 0.05$ ),同时细胞对 ADR、5-FU、L-OHP 的耐药性增强( $P < 0.05$ )。双荧光素酶活性试验表明,ZNF139 抑制了 miR-181a-5p 启动子的转录活性( $P < 0.05$ )。通过抑制 ZNF139 可降低 MKN45/ADR 细胞中 P-gp、MRP-1、Bcl-2 的表达( $P < 0.05$ );miR-181a-5p 模拟物转染 MKN45/ADR 细胞后,P-gp、LRP 和 Bcl-2 的表达降低( $P < 0.05$ )。因此,推断 ZNF139 可促进 GC 细胞的耐药性。

ZNF139 由 6 个  $C_2H_2$  锌指结构组成,包括 SCAN 和一个 KRAB 结构域。锌指结构属于 DNA 结合域,而 SCAN 和 KRAB 促进辅助因子之间的蛋白质相互作用<sup>[13]</sup>。关于 ZNF139 表达与肿瘤的关系已有少量报道。van Dekken 等<sup>[6]</sup>发现,ZNF139 在食管-胃交界处腺癌中表达增加;此外,ZNF139 还能促进 GC 细胞的侵袭和进展<sup>[14]</sup>。采用 RNAi 技术抑制 ZNF139 的表达后,发现胃细胞 MKN28 对化疗药物更加敏感,且相关耐药基因发生了变化<sup>[12]</sup>,表明 ZNF139 与 GC 密切相关。但 ZNF139 对 GC 细胞耐药的机制尚未完全明了。因此,本研究通过基因干扰和克隆技术进一步探讨了 ZNF139 对 GC 细胞耐药的影响,结果表明,抑制 ZNF139 的表达抑制了胃癌细胞的耐药性。将过表达 ZNF139 的合成基因序列转染非耐药 GC 细胞系后发现,其耐药能力明显增强。可见,ZNF139 在调节 GC 细胞的耐药性中起重要作用。

miRNAs 是指一类小而广泛的非编码 ssRNAs,大约包含 22 nts。最近有研究<sup>[15]</sup>表明,肿瘤细胞的耐药性与 miRNA 密切相关。其中 miR-181a-5p 在癌症的发生发展中的作用已被多项研究证实,但结果仍存在争议。如有研究<sup>[16]</sup>指出,miR-181a-5p 在胰腺癌和乳腺癌中表达上调。然而,也研究<sup>[17]</sup>表明,miR-181a 在胶质瘤和侵袭性慢性淋巴细胞白血病中表达下调。即使在结直肠癌的发展过程中,miR-181a 也可同时作为癌基因和肿瘤抑制因子,且与结直肠癌不良预后相关<sup>[18]</sup>。另外,miR-181a 的表达水平在炎症性肠病相关结直肠癌从非肿瘤性到非典型增生的过程中升高,而在非典型增生发展为癌

症时降低<sup>[19]</sup>。miR-181a-5p 在细胞增殖和化疗耐药性方面也起到抑癌的作用。研究表明,在 GC 组织和细胞系中,miR-181a-5p 受到 ZNF139 的负调控,通过抑制 ZNF139 的表达可使 miR-181a-5p mRNA 水平升高( $P < 0.05$ );相反,过表达 ZNF139 会降低 miR-181a-5p mRNA 的表达( $P < 0.05$ ),表明 ZNF139 可调控 miR-181a-5p 的表达。进一步研究发现,增加 miR-181a-5p 水平挽救了 ZNF139 下调细胞的耐药特性。此外,值得注意的是,ZNF139 直接结合并促进了 miR-181a-5p 的转录,表明 ZNF139 可通过 miR-181a-5p 调控 GC 细胞的耐药性。此外,观察干预胃癌细胞前后与耐药性相关基因 P-gp、MRP-1、GST- $\pi$ 、Bcl-2、TS 和 Bax 表达情况,以阐明 ZNF139-miR-181a-5p 通路在胃癌耐药性中的调控机制。结果表明,抑制 ZNF139 表达减弱了 P-gp、MRP-1 和 Bcl-2 的表达( $P < 0.05$ ),而转染 miR-181a-5p mimic 后 P-gp、MRP 和 Bcl-2 的表达水平升高( $P < 0.05$ )。由此可见,ZNF139 -miR-181a-5p 通路通过诱导 P-gp、MRP-1 和 Bcl-2 的表达水平在 GC 中引起细胞耐药特性。

综上所述,ZNF139 和 miR-181a-5p 在 GC 组织和细胞系中呈现异常表达。ZNF139 是 miR-181a-5p 的上游调控因子。ZNF139 -miR-181a-5p 通路可能通过诱导胃癌中 P-gp、MRP-1 和 Bcl-2 的表达来增加细胞的耐药特性,但其具体机制仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Ai L, Wang H. Effects of propofol and sevoflurane on tumor killing activity of peripheral blood natural killer cells in patients with gastric cancer[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(3):300060520904861.
- [2] Zhang WH, Song XH, Chen XZ, et al. Characteristics and survival outcomes related to the infra-pyloric lymph node status of gastric cancer patients[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1):116.
- [3] Rugge M, Genta RM, Di Mario F, et al. Gastric Cancer as Preventable Disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017, 15(12):1833 - 1843.
- [4] Zhu F, Wu Q, Ni Z, et al. miR-19a/b and MeCP2 repress reciprocally to regulate multidrug resistance in gastric cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1):228 - 236.
- [5] Yao J, Qian K, Chen C, et al. ZNF139/circZNF139 promotes cell proliferation, migration and invasion via activation of PI3K/AKT pathway in bladder cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10):9915 - 9934.
- [6] van Dekken H, Tilanus HW, Hop WC, et al. Array comparative genomic hybridization, expression array, and protein analysis of critical regions on chromosome arms 1q, 7q, and 8p in adenocarcinomas of the gastroesophageal junction[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009, 189(1):37 - 42.

(下转第 1414 页)