分类号 **R963** 密 级 学校代码 **1 0 3 6 7**

U D C **615.1** 编 号 学 号 **20128631242**

**MiR-181c 对耐顺铂鼻咽癌细胞凋亡的作用**

**及其机制**

**Roles and mechanism of miR-181c on apoptosis of cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells**

**论文类别：学术研究型**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **作** 者 姓 名 | **孙小锦** |  | **指导教师姓名** | **蒋琛琛 刘浩** |
| **申请学位级别** | **硕** 士 |  | **学位授予单位** | **蚌埠医学院** |
| **学** 科 专 业 | **药理学** |  | **研** 究 方 向 | **生化药理** |
| **论文答辩时间** | **2015 年 5** | **月** | **学位授予日期** | **2015 年 6 月** |

**答辩委员会主席： 论 文 评 阅 人 ：**

**2015 年 5 月**



**硕 士 学 位 论 文**

**论 文 题 目：**

**MiR-181c 对耐顺铂鼻咽癌细胞凋亡的作用及其机制**

**Roles and mechanism of miR-181c on apoptosis of cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells**

**研 究 生 姓 名:** **孙小锦**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **指** | **导** | **教** | **师 :** | **蒋琛琛教授 刘浩教授** |
| **学** | **科** | **专** | **业 :** | **药理学** |
| **研** | **究** | **方** | **向 :** | **生化药理** |

**论文工作时间:** **2013年 3 月 至 2015年3 月**

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。本论文中除引文外，所有实验、数据和有关材料均是真实的。本论文中除引文和致谢的内容外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了声明并表示了谢意。

学位论文作者签名：日期：

学位论文使用授权声明

研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属蚌埠医学院。学校有权保存本学位论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本学位论文的部分或全部内容，可以采用影印、复印等手段保存、汇编本学位论文。学校可以向国家有关机关或机构送交论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅。（保密论文在解密后遵守此规定）

保密论文注释：本学位论文属于保密论文，密级： 保密期限为\_ 年。

学位论文作者签名：导师签名：

日 期：日 期：

目 录

[结论：](#_Toc686258708) 5

**[Abstract](#_Toc686258709)** 5

[引 言](#_Toc686258710) 6

[材料与方法](#_Toc686258711) 6

[1. 仪器与材料](#_Toc686258712) 6

[1.1 实验仪器](#_Toc686258713) 6

[1.2 试剂](#_Toc686258714) 6

[1.3 细胞系](#_Toc686258715) 6

[2. 实验方法](#_Toc686258716) 7

[2.1 细胞培养](#_Toc686258717) 7

[2.2 MTT法检测细胞存活率](#_Toc686258718) 7

[2.3 细胞转染](#_Toc686258719) 7

[2.4 溴化吡啶](#_Toc686258720)**[(propiodide, PI)](#_Toc686258720)**[染色检测细胞凋亡](#_Toc686258720) 8

[2.5](#_Toc686258721) **[Annexin V/PI](#_Toc686258721)**[双染法检测细胞凋亡](#_Toc686258721) 8

[2.6 集落克隆实验](#_Toc686258722) 8

[2.7 荧光定量RT-PCR检测mRNA表达](#_Toc686258723) 9

[2.8 荧光定量RT-PCR检测miRNA的含量](#_Toc686258724) 10

[2.9 免疫印迹法（western blot）检测蛋白的表达](#_Toc686258725) 10

[3. 统计学处理](#_Toc686258726) 14

[1.1 DDP对鼻咽癌细胞具有增殖抑制的作用](#_Toc686258727) 14

[1.2 鼻咽癌耐药株细胞具有抗凋亡特性](#_Toc686258728) 16

[3.1 调控miR-181c在HNE1和HNE1/DDP中的表达](#_Toc686258729) 17

[3.2 调控miR-181c的表达对鼻咽癌细胞凋亡的影响](#_Toc686258730) 17

[4. miR-181c通过介导Mcl-1对鼻咽癌细胞凋亡的调控作用](#_Toc686258731) 21

[4.1 Mcl-1在鼻咽癌细胞株中的表达](#_Toc686258732) 21

[4.2 调控miR-181c在鼻咽癌细胞中表达对Mcl-1蛋白的影响](#_Toc686258733) 21

[4.3 干扰Mcl-1蛋白表达后对鼻咽癌细胞凋亡的影响](#_Toc686258734) 21

[结 论](#_Toc686258735) 23

[参考文献](#_Toc686258736) 23

[附录 A](#_Toc686258737) 25

[附录 B](#_Toc686258738) 26

[附录 C](#_Toc686258739) 27

[附录 D 综述](#_Toc686258740) 28

[参考文献](#_Toc686258741) 29

MiR-181c对耐顺铂鼻咽癌细胞凋亡的作用及其机制摘 要

目的：

1. 验证耐药鼻咽癌细胞HNE1/DDP的耐药性。

2. 检测鼻咽癌细胞HNE1/DDP和HNE1中miR-181c表达的差异并且研究其对细胞凋亡的作用。

3. 探讨miRNA影响鼻咽癌细胞凋亡的机制。

方法：

1. MTT法检测不同浓度顺铂（DDP）对两株细胞HNE1和HNE1/DDP的增殖抑制的影响；根据24、48、72h的IC50值确定耐药株细胞的耐药指数；鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP中抗凋亡蛋白Mcl-1、Bcl-2和促凋亡蛋白Bax 和

Bim的蛋白表达水平则采用Western blot实验方法检测，进一步验证耐药株细胞的耐药性。

2. 根据课题组之前的MicroRNA（miRNA）芯片结果筛选出差异表达的miR-181c，并采用荧光定量RT-PCR 方法验证表达的差异。

3. 分别将类似物miR-181c mimics、抑制剂miR-181c inhibitors转染到表达量低的HNE1/DDP和表达量较高的HNE1细胞株中，RT-PCR方法检测转染后miR-181c在两株细胞中的表达情况；MTT法检测转染miR-181c mimics 和

inhibitors 后对两株细胞增殖抑制的影响；集落克隆、PI单染以及Annexin V/PI

双染法检测两株细胞凋亡的变化。

4. 采用Western blot方法检测miR-181c的调控对Mcl-1基因在两株细胞中的表达的影响；转染Mcl-1 siRNA, 集落克隆和Annexin V/PI双染法检测凋亡的变化。

结果：

1. 鼻咽癌细胞 HNE1/DDP 相对亲本细胞 HNE1 具有耐药的特性

(1) MTT法显示：在24、48、72h，不同浓度的DDP (2、4、8、16、32μmol·L-1)

作用于鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP能够抑制其增殖，且呈时间和浓度依赖性。

在24、48、72h，鼻咽癌细胞HNE1/DDP的半数抑制率(IC50)计算后得出分别为

32.15±0.37、21.88±0.49、14.76±0.56μmol·L-1，鼻咽癌细胞HNE1的IC50 为

7.87±0.33、5.25±0.15、3.45±0.35μmol·L-1. 鼻咽癌细胞HNE1/DDP耐药指数

（RI）计算后得出为4.08、4.16、4.27。从计算得出的IC50以及RI可以看出，耐药株细胞HNE1/DDP是符合耐药株的条件的，耐药株的耐药性得以验证。

(2) Western blot和荧光定量PCR结果同时显示：在耐药株HNE1/DDP细胞中，抗凋亡蛋白以及抗凋亡基因MRP、Bcl-2 表达升高，促凋亡蛋白和促凋亡基因

Bax、Bim表达下降。

2. miR-181c在HNE1和HNE1/DDP中的表达具有差异

课题组前期的miRNA芯片结果显示，miR-181c在两株细胞中的表达具有差异，我们采用荧光定量RT-PCR验证结果显示，在HNE1中，miR-181c具有3.5倍的上调。

3. miR-181c的调控对鼻咽癌细胞凋亡的影响

(1)在低表达miR-181c的HNE1/DDP细胞中，转染miR-181c的模拟物使其表达增加，相反地，在高表达miR-181c的HNE1细胞中，转染miR-181c抑制剂使其表达减少。转染之后，采用荧光定量RT-PCR再次检测两株细胞中的表达情况，结果证明，miR-181c类似物可以使细胞中miR-181c的表达增加，而miR-181c抑制剂则降低miR-181c的表达。

(2) MTT结果显示，miR-181c抑制剂能明显增强HNE1细胞耐顺铂能力，miR-181c模拟物降低HNE1/DDP细胞对顺铂的耐受力。此外，集落克隆、PI单染以及Annexin V/PI双染法结果均显示，miR-181c抑制剂能明显降低顺铂作用HNE1细胞的凋亡率，miR-181c模拟物增加了顺铂作用于HNE1/DDP细胞的凋亡率。

4. miR-181c通过作用于Mcl-1对鼻咽癌细胞的凋亡产Th影响

(1) Western blot结果显示，HNE1/DDP细胞中Mcl-1的表达明显高于HNE1细胞。

(2) Western blot结果显示，miR-181c抑制剂能使HNE1细胞中Mcl-1增加，

miR-181c模拟物能使HNE1/DDP细胞中Mcl-1降低。

(3)将Mcl-1 siRNA、阴性对照siRNA转染进鼻咽癌细胞HNE1/DDP中，western

blot和qRT-PCR检测Mcl-1表达减少，证明成功干扰了Mcl-1的表达。集落克隆结果可以看出，干扰了Mcl-1的表达后能减少HNE1/DDP细胞集落的形成。此外，PI单染和Annexin V/PI双染法结果表明，干扰Mcl-1的表达后能增加顺铂

诱导的HNE1/DDP细胞的凋亡率。

结论：

1. HNE1/DDP较亲本细胞HNE1具有耐药的特性。

2. HNE1和HNE1/DDP细胞中miR-181c的表达是不同的，降低miR-181c的表达以后可以降低HNE1细胞由顺铂诱导的凋亡。相反，过表达的miR-181c能够增加HNE1/DDP细胞的凋亡。

3. Mcl-1的表达受miR-181c的调控，降低miR-181c的表达，Mcl-1表达升高，相反地，增加miR-181c的表达，Mcl-1的表达下降；MiR-181c基因过表达增加顺铂诱导的HNE1/DDP细胞的凋亡。

关键词：鼻咽癌；耐药； microRNA； siRNA；细胞凋亡

**Roles and mechanism of miR-181c on apoptosis of cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells**

**Abstract**

**Aims:**

1. To confirm the drug resistance of HNE1/DDP.

2. To investigate the expression of miR-181c in cisplatin-sensitivity and cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells and explore the effect of miRNA onapoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells.

3. To investigate the effect on the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating of miR-181c.

**Methods:**

1. We used cisplatin (DDP) with different concentrations in HNE1 and HNE1/DDP cells, respectively, the OD number of 24、48、72h was detected to calculate the IC50 and resistance index (RI) by MTT assay; The expression of Anti-apoptotic protein

MDR、Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bax and Bim were detected by Western blot to verify the drug resistance of HNE1/DDP.

2. MiR-181c was selected because of the different expression in HNE1 and HNE1/DDP used the miRNA microarray assay and verify the selected miRNA used Quantitative real-time RT-PCR.

3. The miR-181c inhibitors were transfected into HNE1 with a high expression of miR-181c and the miR-181c mimics were transfected into HNE1/DDP with a low expression of miR-181c. The expression of miR-181c after transfection in the two cells was detected by RT-PCR; We used MTT assay to detect the effect on the proliferation of HNE1 transfected with miR-181c inhibitors and HNE1/DDP transfected with miR-181c mimics. The change of apoptosis of the two cells was

Detected by colony formation assay、PI and Annexin V/PI assay.

4. The expression of Mcl-1 in HNE1 and HNE1/DDP after regulation of miR-181c

Was deteced by Western blot; colony formation assay、PI and Annexin V/PI assay were used to detected the effect on apoptosis after transfected with Mcl-1 siRNA.

**Results:**

**1. Compared with HNE1 cell, HNE1/DDP cell exhibit chemoresistance to DDP**

(1) The proliferation of HNE1 and HNE1/DDP cells were inhibited by different concentrations of DDP (2, 4, 8, 16, 32μmol·L-1) for 24, 48, 72h by MTT array, in concentration-and-time-dependent manners. The IC50 values of HNE1/DDP and

HNE1 cells were 32.15±0.37、21.88±0.49、14.76±0.56μmol·L-1 and 7.87±0.33、

5.25±0.15、3.45±0.35μmol·L-1 for 24, 48, and 72 h, and RI were 4.08、4.16、4.27. From the above result, we can know that compared with HNE1 cells, HNE1/DDP cells were not sensitive to DDP.

(2) In HNE1/DDP, the expression of anti-apoptotic protein and anti-apoptotic mRNA

MDR、Bcl-2 increased, at the same time, the expression of pro-apoptotic protein and mRNA Bax、Bim decreased.

**2. The expression of miR-181c was different in HNE1 and HNE1/DDP**

The expression of miR-181c was different in the two cells by a miRNA microarray of our group. We verified the difference by RT-PCR and found that the expression of miR-181c was up-regulation in HNE1.

**3. The effect on apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by regulation of miR-181c**

(1) The miR-181c inhibitors were transfected into HNE1 with a high expression of miR-181c and the miR-181c mimics were transfected into HNE1/DDP with a low expression of miR-181c. We found that the miR-181c inhibitors could increase the expression of miR-181c in HNE1 and the miR-181c mimics could decrease the expression of miR-181c in HNE1/DDP by the RT-PCR assay.

(2) The miR-181c inhibiors could enhance the drug-resistance to DDP in HNE1, On the contrary, the miR-181c mimics reduced the drug-resistance to DDP in HNE1/DDP in MTT assay. In addition, in colony formation assay、PI and Annexin V/PI assay, the

Results suggested that miR-181c inhibitors could reduce the apoptosis rate of DDP-induced in HNE1 and the miR-181c mimics could increased the the apoptosis rate of DDP-induced in HNE1/DDP.

**4. The miR-181c has an effect on apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells through regulation of Mcl-1.**

(1) The expression of Mcl-1 in HNE1/DDP was higher than HNE1 by Western blot.

(2) The result of Western blot suggested that miR-181c inhibitors could increase the expression of Mcl-1 in HNE1 and miR-181c mimics could reduce the expression of Mcl-1 in HNE1/DDP.

(3) We found that the expression of Mcl-1 was reduced after transfecting with Mcl-1 siRNA in western blot and RT-PCR assay. The colony formation assay result showed that transfected with Mcl-1 siRNA could inhibit the colony formation. In addition, transfected with Mcl-1 siRNA were markedly increased the apoptosis rate of DDP-induced in HNE1/DDP by PI and Annexin V/PI assay.

**Conclusion:**

1. HNE1/DDP has drug-resistance to DDP compare to HNE1.

2. The expression of miR-181c was different in HNE1 and HNE1/DDP. Inhibition of miR-181c could inhibit the apoptosis in HNE1, On the contrary, overexpression of miR-181c could increase the apoptosis in HNE1/DDP.

3. The change of Mcl-1 was consistent with miR-181c and Mcl-1 siRNA were markedly increased the apoptosis rate of DDP-induced in HNE1/DDP

**Key words:** NPC; Drug resistance; MicroRNA; SiRNA; Cell apoptosis

引 言

目前恶性肿瘤已成为严重威胁人类健康的常见病和多发病，化学治疗是主要的治疗方法之一。鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种具有地域性特征的常见的恶性肿瘤，多发于东南亚以及我国广东地区，在头颈部恶性肿瘤中占首位。鼻咽癌发病人群相对年轻并且易发生转移，大约75%-95%的病人初诊时已进展为局部晚期并伴有轻度转移[1-3]。当前主要采用放射疗法治疗鼻咽癌，同时较多的采用放疗结合化疗的方法治疗对于放疗不敏感、放疗后复发以及中晚期鼻咽癌[4, 5]。尽管早期鼻咽癌治疗后的存活率是令人乐观的，但绝大部分的晚期病人，治疗之后常常发生局部治疗的失败和远端转移。长期治疗后对机体产生的毒性也是病人要面临的一大问题[6]。在中晚期鼻咽癌的治疗过程中，常常采用放疗联合化疗的方法来改善治疗效果，但在化疗过程中，与其他肿瘤一样，肿瘤细胞的耐药是治疗失败的一个重要原因[7]。所以，探究鼻咽癌细胞耐药性对鼻咽癌的治疗有着重要的意义。

在治疗过程中，肿瘤细胞产生的耐药现象已经成为各种肿瘤化学治疗中的难以规避的问题。当前更为严峻的是细胞的多药耐药性(MDR)，1970年，科学家首次发现MDR现象[8]，是指对一种抗癌药产生耐药，同时对非同类型的结构和功能机制不同的药物也产生耐药，这一现象广泛存在于多种肿瘤细胞中，这正是导致化学治疗失败的主要原因。已有的研究表明，多药耐药产生机制主要有蛋白相关的耐药，如P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)[9, 10]；调控基因介导的MDR，如抗凋亡基因Bcl-2家族、Puma等[11, 12]；酶介导的耐药，如拓扑异构酶Ⅱ、谷胱甘肽-s-转移酶等[13, 14]以及肿瘤微环境介导的肿瘤耐药[15]。发现MDR现象后，已有众多国内外学者参与探究其作用机制，也取得了一定的研究成果，但这些成果还远远不能解决肿瘤细胞耐药的难题。临床上耐药的产生常常是多种机制共同作用的，只根据其中一种机制进行干预治疗往往是不会成功的，目前还未找到一种药物能真正克服肿瘤细胞的耐药。因此，探索鼻咽癌治疗新靶点、合成新的治疗用药并且提高化疗药物的治疗效果是十分有必要的。

肿瘤细胞本身具有的对药物治疗的不敏感性及获得性的耐药严重困扰着肿瘤的治疗。由于抗肿瘤药物存在耐药性而不能完全消除肿瘤细胞，使得肿瘤获得

再生的机会，给复发转移带来隐患。通常情况下，与肿瘤细胞的失敏感及生存信号传导通路的不适当的激活直接相关[16]。最近的报道表明，顺铂联合放疗治疗鼻咽癌的过程中，鼻咽癌细胞对顺铂等药物治疗的敏感性降低与微小RNA

（miRNA）及相关的信号通路有一定的联系[17, 18]。miRNA是一类非编码的由18-25个核苷酸组成的小分子RNA，在动物和植物中广泛表达。miRNA通过和靶mRNA3'UTR不完全互补配对，在转录后水平，阻遏翻译或引导引导沉默复合体（RISC）降解mRNA[19]。据统计，超过60%的蛋白质编码基因的翻译受到

miRNA的调节，从而影响细胞的增殖、分化、凋亡和发育[20, 21]、，并且miRNA在许多疾病中出现异常表达，这其中就包括癌症[22]。miRNA可作为癌基因或肿瘤抑制基因，在肿瘤发生发展过程中起关键作用[23]。

通过对目标基因表达的调控，miRNA可以对肿瘤细胞增殖、凋亡及分化情况进行调节，且与肿瘤耐药具有密切的关系。miRNA的突变和表达的异常都会影响miRNA的正常功能，从而通过调控靶基因的表达导致蛋白表达的差异。分析耐药肿瘤细胞中miRNA的差异表达，并深入探讨其与耐药相关基因之间的调控关系，对阐明耐药机制具有重要意义。越来越多的研究表明，正常组织与癌细胞以及不同的肿瘤类型中miRNA的表达常常是具有差异的[24]。在不同的肿瘤发生途径中，miRNA起到致癌基因或者抑癌基因的作用[25]。这对肿瘤的诊断以及预后治疗都是有帮助的，这种表达的差异也可能成为新的治疗靶点。近来，有研究证实，miRNA的差异表达与肿瘤细胞多药耐药有关。有新的证据指出，miRNA在药物敏感性和MDR现象中起到重要的作用。在耐药肿瘤细胞中，miRNA的表达是异常的[26, 27]。最近的在耐阿霉素的乳腺癌细胞MCF-7/DOX的研究中发现，miRNA出现异常表达，并且miRNA形成过程中的两种重要的酶（Dicer 和

AGO2）的表达也发生了改变[28]。在肿瘤细胞的耐药过程中，miRNA的表达以及它们作用的靶点蛋白的表达都在发生变化，并且这两者之间存在着密切的联系。此外，在NCI-60肿瘤细胞中miRNA的表达类型与肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感类型也是密切相关的[29]。并且，很多研究发现大量的miRNAs调控耐药相关基因如ABCG2[30-32], BCL2 [33], DHFR [34], MDR1[35]和PTEN [36]。有趣的是，

调控miRNA的表达或者功能可以改变抗肿瘤药物的敏感性。这种改变可以通过上调miRNA的表达而抑制或者下调miRNA来恢复。总之，miRNA在肿瘤细胞

先天性或者获得性耐药中都具有重要的意义[37]。在鼻咽癌中miRNA水平的改变及意义引起了高度的关注[38]，其在鼻咽癌的诊断及治疗中将发挥重要的作用[39]。已有研究表明，miR-29c可以抑制鼻咽癌的侵袭和转移[40]，相反地，miR-10b可以促进鼻咽癌细胞的侵袭和转移[41]。因此，探究miRNA在鼻咽癌细胞中的表达差异是否与细胞的耐药及其凋亡存在关系，具有重要的意义。

细胞凋亡( Apoptosis)是一种程序性死亡，是一种自发行为，目的是维持内环境的稳定。与细胞坏死不同的是，细胞凋亡是主动发生的，是通过调节基因的一系列过程实现的。它不是一种自我损伤的方式，而是一种为了适应坏境发生的防御行为。细胞胞质浓缩，体积变小，DNA降解，核染色质固缩在核的边缘等等都是细胞凋亡的表现，最终形成凋亡小体由吞噬细胞吞噬。Kerr等在1972年首次提出细胞凋亡的概念，自此开始了对细胞凋亡的探究。目前公认的有下面几条通路与细胞凋亡有关：死亡受体通路、内质网通路、线粒体通路，线粒体通路在其中最为经典[42]。Mcl-1是Bcl-2家族中参与调控细胞凋亡过程的重要成员之一，美国达纳-法伯癌症研究所的研究人员通过研究发现，Mcl-1蛋白质在参与控制细胞凋亡中能帮助肿瘤细胞“躲”过药物攻击继续生长使细胞继续存活，导致癌症患者对化疗药物产生耐药性，使得化疗药物效力大打折扣[43]。已有文献报道，miR-106a可以通过调控Mcl-1的表达来抑制卵巢癌细胞对顺铂的耐药性

[44]. 因此，我们猜想，Mcl-1在肿瘤细胞的耐药以及凋亡中扮演着极其重要的角

色，并且与miRNA之间可能存在某种联系。

本研究中我们将探索miR-181c对鼻咽癌细胞HNE1和HNE1/DDP增殖、凋亡的影响及分子机制，进而为miRNA调控细胞多药耐药提供一定的理论和实验依据并为临床治疗鼻咽癌寻找新的治疗靶点。

我们以人鼻咽癌细胞敏感株HNE1和耐药株HNE1/DDP为研究对象，采用

MTT、流式细胞术、实时荧光定量PCR、基因转染以及蛋白质印迹等实验方法，旨在研究miR-181c是否能够通过调控Mcl-1影响人鼻咽癌细胞的增殖、凋亡、等生物学行为并揭示其分子机制。

本研究假设miR-181c为抑制鼻咽癌发生的癌基因，我们将研究上调鼻咽癌耐药株细胞HNE1/DDP中miR-181c表达，比较与下调HNE1细胞株miR-181c表达与细胞增殖、凋亡的相关性，探索miR-181c上调其各自的靶基因Mcl-1 的

表达进而促进鼻咽癌发展。此外，利用上述方法我们将探讨是否能够通过上调鼻咽癌细胞miR-181c的表达下调其的靶基蛋白Mcl-1的表达进而抑制鼻咽癌发展。

# 材料与方法

# 1. 仪器与材料

## 1.1 实验仪器

1）DG3022酶联免疫检测仪：国营华东电子管厂联合研制。

2）垂直电泳仪：DYC-Z4013；电转移槽：美国BIO-RAD公司。

3）倒置荧光显微镜、CK40倒置显微镜：日本OLYMPUS公司。

4）4239R高速低温离心机：意大利ALC公司。

5）自动电热压力蒸汽灭菌器：日本三洋公司。

6）TS-1脱色摇床：海门其林医用仪器厂。

7）Revco超低温冰箱：日本SANYO 公司。

## 1.2 试剂

1）十二烷基磺酸钠、TEMED、SDS-PAGE电泳试剂N、N-亚甲基丙烯酰胺：美国Sigma公司。

2）胎牛血清、细胞培养基：美国GIBCO公司。

3）miR-181c类似物和抑制剂、Mcl-1 siRNA：吉玛制药公司。

4）超敏ECL化学发光试剂盒：上海碧云天生物技术研究所。

5）无RNA酶相关耗材：美国AXYGEN公司。

6）Trizol试剂、Lipofectamine 2000: Invitrogen公司。

7）PVDF膜：美国Millipore公司产品。

8）鼠抗人β-actin、兔抗人Mcl-1、Bcl-2、Bax、Bim: Santa Cruz公司。

## 1.3 细胞系

人鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP均购于湘雅医学院，在蚌埠医学院实验室冻存培养。

# 2. 实验方法

## 2.1 细胞培养

2.1.1细胞复苏

（1）按照快速融化的原则，所要复苏的细胞于液氮罐中取出，置于准备好的37℃

的水中快速摇动1 min左右， 直到冻存液溶解停止；

（2）移至超净台中操作，冻存管在酒精灯上过火，用枪头将冻存管中的细胞悬液转移到10 ml事先消毒后的离心管中，根据比例加入培养液，吸管混匀；800 r·min-1，5 min离心，离心完毕后将上清液倒出；

（3）在弃去上清液后的离心管中加入5-7 ml RPMI1640培养液（含10%胎牛血清），缓慢地用移液枪吹打混匀，移入所用培养瓶内，置5％CO2、饱和湿度、37℃培养箱中培养。第二天观察细胞生长情况，换新鲜培养液。

2.1.2细胞换液

当培养瓶中细胞未长满，但培养基养分减少无法供应足够的营养给细胞时，需要将培养瓶中的变了颜色的培养液弃去，然后倒入一定量PBS清洗，清洗完毕弃去，再加足量新鲜培养液，放在原来的培养箱中培养。

2.1.3细胞传代

（1）当细胞快要或者已经长满整个培养瓶底部的时候，需要将培养瓶中旧培养液弃去。

（2）在培养瓶中加入一定量PBS清洗后，将PBS弃去。

（3）再倒入适量的0.25%的胰酶在培养瓶中，放在培养箱中消化细胞，直至显

微镜下观察细胞变圆，细胞之间间隙变宽，加入3 mL左右的RPMI1640（含10%

胎牛血清）培养液终止消化。

（4）巴氏吸管缓慢地吹打细胞一定次数，注意不要损伤细胞。把被消化过后的细胞转移到消毒后的离心管中，于离心机上800 r·min-1，离心5 min。

（6）离心完毕，弃去上清，在离心管中加入适量新鲜培养液，并按需要移至培养瓶中，放到培养箱中继续培养。

2.1.4细胞冻存

（1）把长满或者即将长满瓶底的细胞按照细胞传代的方法消化，通常在培养箱中消化细胞，消化完毕后，加入新鲜培养液终止消化。

（2）巴氏吸管轻柔吹打细胞，收集消化液至10 ml离心管，离心机上800 r·min-1，

5 min离心，离心后弃去上清，加入1-1.5 mL细胞冻存液。轻柔吹匀后移入事先备好冻存管中，用封口膜封口并且写上日期、细胞名称、冻存人姓名。然后放到液氮罐中冻存起来以备下次使用。

2.1.5细胞计数

将消化离心加入新鲜培养液吹打后的细胞液，用移液枪取出20µL，注入计数板小孔中，再将计数板放入CountStar智能细胞计数器中，选择细胞计数功能，重复计数三次，取平均值。

## 2.2 MTT法检测细胞存活率

将人鼻咽癌HNE1和HNE1/DDP细胞接种于96孔板细胞培养板中，每孔5~7

×103个细胞。于5% CO2饱和湿度37℃培养箱中培养24 h后，用不同浓度的顺铂（2、4、8、16、32μmol/L）处理，同时设阴性对照组和空自对照组。转染后的两株细胞检测细胞存活率时，是将转染6 h的细胞消化重悬并按照要求将细胞种于培养板中。并在培养48 h后加入20µL MTT （以PBS 配成5 mg/ml），放在37℃孵育箱中4 h左右，弃去每孔中的上清液，再增加150μl DMSO，再放到37℃孵育箱中30 min，酶标仪上振荡所需时间后使结晶充分溶解后，用酶标仪检测波长490 nm处吸光度（A）值，通过所得OD值计算细胞的存活率。以上实验重复3次。

## 2.3 细胞转染

2.3.1 **miRNA mimics/inhibitors**的重悬

在最大转速为4000 g的低速条件下离心EP管，让miRNA mimics/inhibitors

聚集在试管的底部。

1. 轻轻的打开管盖。

2. 1OD加入DEPC水125µL,配成20M 的储存液。

3. 柔和地用移液枪吹打储备液5-6次。

4. 根据具体用量情况分装，避免多次冻融。

5. 在重新储存的时候注意密封好EP管。

6. 贮存在-80℃，以备使用。

2.3.2转染程序

表1 .转染试剂的推荐剂量

Tab. 1 Recommended amount of the reagents for transfection

| 培养皿类型 | 96 wells | 24 wells | 12 wells | 6 wells |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 转染试剂(L) | 0.3–1.0 | 1–3 | 2–4 | 3–6 |
| MiRNA mimics/ inhibitors | 3 | 15 | 30 | 75 |
| 细胞密度 (cells/well\*103) | 6 | 40 | 80 | 200 |
| 培养基体积(mL) | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 2.5 |

2.3.3探索最佳的转染效率

取对数生长期的细胞按照以每孔1×105个细胞的密度接种于24孔板，培养24 h后，将板中培养液吸弃，再用用PBS洗涤1-2遍。按照Life Technologies说明书进行操作，将脂质体(Lipofectamine 2000)与opti-MEM按照1: 50比例混匀，同样，Negative control FAM与opti-MEM也按照1: 50混匀，各自静置5 min后，按照Lipofectamine 2000: Negative control FAM=1:1、2:1、1:4、1:2、4:1的比例混合均匀，静置30 min后，将混合液加入到每孔中，并按照每孔终体积为2 mL用opti-MEM补足。8 h后，在荧光显微镜下拍照，观察实验结果选择最佳比例进行后续实验部分。

2.3.4基因的转染

对生长情况较好的细胞按照每孔3-5×105个细胞接种于6孔板，培养24 h后按照说明书进行转染，放在37℃培养箱中6 h，将原液弃去，加入新的培养基，直到48 h后再将细胞消化下来进行后续实验。所使用的模拟物和抑制剂均从上海吉玛（GenePharma）公司购买，基因的序列：miR-181c mimics：有义链：AA

CAUUCAACCUGUCGGUGAGU, 反义链：UCACCGACAGGUUGAAUGUUUU. miR-181c inhibitor: ACUCACCGACAGGUUGAAUGUU.

## 2.4 溴化吡啶**(propiodide, PI)**染色检测细胞凋亡

将分别转染miR-181c抑制剂和miR-181c模拟物的HNE1和HNE1/DDP细胞制成单细胞悬液以后，按照每孔1×105个细胞接种于12孔细胞培养板**，**经过24 h的培养后，分为空白组（不加DDP），DDP（20μM）组，NC+DDP(20μM)，miR-181c/anti-miR-181c+DDP（20μM）组。继续培养24 h后，收集细胞至适量体积的离心管，按照2500 r·min-1，离心5 min，去掉上清液，加入75%的乙醇 4

℃固定过夜。将细胞转移至1.5 ml离心管1500 r·min-1离心5~10 min，去掉上清，继续用PBS洗涤离心2500 r·min-1，5 min，去上清，每管加入600 - 800 mL PI缓冲液，避光孵育3~4 h，流式细胞仪检测可以检测出细胞凋亡率。以上实验重复3次。

## 2.5 **Annexin V/PI**双染法检测细胞凋亡

将转染后的细胞接种至12孔细胞培养板，每孔1×105个细胞。分为空白组（不加DDP），DDP（20μM）组，NC+DDP(20μM)，miR-181c/anti-miR-181c+DDP

（20μM）组继续培养24 h后做如下处理。

1）把细胞培养液吸至10ml消毒后的离心管中，倒入一定量PBS清洗细胞，再增加适量0.25%胰蛋白酶放到培养箱中孵育消化细胞。缓缓地吹打细胞使其从瓶底脱落下来，注意不要损伤细胞。

2）将消化后的细胞液转移到事先准备好的离心管中，2500 r·min-1离心8-10

min，离心完毕后把上清液倒掉，再转移到1.5 ml离心管中加入1 ml PBS重悬5 min.

3）重悬后的细胞将上清液倒掉，滤纸吸干液体后，每个样品加入500μL Binding-Buffer液体。

4）实验中根据调节补偿的需要，Annexin V组只加5μL Annexin V，PI组只加5μL PI，其他组分别加入5μL Annexin V和5μL PI。在室温避光的条件下放置10-20

min。放置结束使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

## 2.6 集落克隆实验

将转染后的细胞分别以每孔5×103个细胞接种于12孔板中，分为空白组，NC组，

miR-181c/anti-miR-181c 组。24 h 后NC组，miR-181c/anti-miR-181c 组加入DDP

（2μM）处理鼻咽癌细胞，置CO2培养中培养7-9 d，观察到细胞集落形成后，去除培养基，PBS洗涤2遍,75%乙醇-20℃固定10 min，结晶紫染色10-20

min，统计集落形成率。以上实验重复3次。

## 2.7 荧光定量RT-PCR检测mRNA表达

2.7.1总RNA的提取

1）将细胞消化离心后，用PBS缓冲液洗涤1-2次，再次离心弃上清，每管按照

1×107个细胞加300~600 L 的比例加入Trizol试剂（Invitrogen），缓缓吹打若干次使其混匀，用枪头转移到无RNA酶的1.5 ml EP管中，手动摇晃1 min, 室温放置5-8 min；

2）在上述EP管中加入200μL预冷的氯仿，将EP管盖盖上，立即强烈摇晃15 s使混匀，在冰上放置3 min，置于离心机上4℃，12000 r·min-1离心15 min。离心后取出EP管可以观察到EP管中液体分成为三相：上层为无色水相，中间相为蛋白相，底层为红色酚-氯仿相；

3）将含有总RNA的上层水相缓慢加入到另外的EP管中，增加等体积异丙醇（预冷）混合均匀，在冰上放置20 min, 12000 r·min-1, 4℃，离心10 min后，可见EP管底部有白色凝乳状沉淀；

4）弃去上述EP管中上清液（勿将底部白色凝乳状沉淀倒出），然后加入预冷的

75%乙醇混匀，4℃，7500 r·min-1离心5 min，洗涤2次以上；

5）弃去上清，使总RNA室温自然风干，加入20μL无RNA酶水溶解，冰上放置准备RNA纯度测定或者-80℃保存。

2.7.2 RNA纯度测定

Zkq 20151125

将RNA样品用DEPC水稀释后，紫外分光光度仪检测得到A260和A280吸光度值，当A260/ A280比值在1.8~2.1之间时说明总RNA的纯度较高，可以用来继续后续实验。如若纯度达不到要求，则应重新提取RNA并在各个操作步骤中防止RNA的降解。

2.7.3逆转录合成cDNA

1）根据cDNA合成试剂盒(BeyoRT)说明书进行操作：总RNA 1 ng - 5g

Poly(A) RNA/mRNA 1-500 ng DEPC-treated Water -

12μL

70℃孵育5分钟，随后立即放置到冰浴冷却，4℃微离心，随后加入下述试剂 ：

Reaction Buffer (5X) 4μL

RNase Inhibitor (20U/μl) 1μL

DNTP Mix (10 mM each) 2μL

BeyoRT M-MuLV反转录酶1μL

总体积20μL

2）42℃，PCR扩增仪上孵育60分钟。孵育完成后进行下一步实验。

3）设计合成荧光定量RT-PCR引物：

所检测基因的mRNA序列在GenBank网站查询，引物序列由Primer 5.0引物设计软件设计，引物序列包括GAPDH引物内参均由上海生工合成。引物序列

如下: GAPDH: F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG, R: AGGGGCCATCCACA GTCTTC. MRP: F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG, R: AGGGGCCATCCACA GTCTTC.

2.7.4 Real-time PCR反应

所使用的Real-time PCR为StepOnePlusTMReal-Time PCR System，根据仪器说明书进行操作。

对照试剂盒(Vazyme)说明书在冰上配制PCR 反应液：

AceQTMqPCRSYBR® GREzEkNqM a2st0e1r 5M1i1x2510 μL Primer 1(10 μM) 0.4 μL

Primer 2(10μM) 0.4μL

ROX Reference Dye 1 0.4 μL

模板 DNA 2 μL

灭菌蒸馏水 Up to 20μL

两步法标准程序：Stage1预变性Reps: 1 95℃5 min

Stage2循环反应: Reps: 40

Step1: 95℃10 sec. Step2: 60℃ 30 sec.

Stage3融解曲线: Reps: 1

Step1: 95℃15 sec. Step2: 60℃60 sec. Step3: 95℃ 15 sec.

在PCR仪上进行扩增，得到每孔Ct值后按照2-△△ct相对定量计算公式计算出各目的基因的相对定量结果。

## 2.8 荧光定量RT-PCR检测miRNA的含量

2.8.1提取miRNA

按照miRNeasy®Mini Kit(Qiagen)说明书进行操作： 1)将按照需要进行处理后的细胞消化收集，加入PBS洗涤2-3次，离心并且将

上清液倒去，再加入500-700μL QIAzol Lysis裂解核蛋白复合体，剧烈震荡摇晃至混匀后，用枪头转移至1.5 mL无酶的EP管里，室温放置5-7 min使裂解完全.

2）140μL氯仿加入裂解后的液体中，轻轻盖上EP管盖，剧烈震荡手动混匀15 s左右，在室温中放置3 min，12000×g，4℃，离心15 min. 离心得到的溶液分为三相：上层为无色水相，底层为红色酚-氯仿相，还有一层中间相。

3）我们所要提取的miRNA是分布在上层水相中，所以要将上层水相小心地转移到另外的无酶EP管中（勿接触到中间相， 有点剩余也可）。再加入1.5 倍

体积的无水乙醇与之混合均zk；q 20151125

4）取出miRNeasy®Mini Kit(Qiagen)中备有的RNeasy Mini column的2 mL收集管，取出700μL上述混合液加入其中，10000×g离心15 s，将上清液弃去。

5）重复上述步骤4，直到混合液收集完毕；

6）收集完毕后，在吸附柱中加入700μL RWT缓冲液，10000×g，室温离心15 s，液体小心倒掉；

7）再在吸附柱中加入500μL RPE缓冲液，10000×g，室温离心15 s，液体小心倒掉；

8）最后在吸附柱中加入500μL RPE缓冲液，10000×g，室温离心15 s，液体小心倒掉；

9）在通风厨中使RNeasy Mini column干燥10 min, 将RNeasy Mini column移入新的无酶1.5 mL收集管，并且加30μL RNase-free water溶解，收集到的溶液置于冰上备测浓度和纯度。

2.8.2 miRNA纯度测定

在RNA纯度测量仪上测量，若A260/ A280比值在1.9~2.1之间说明纯度较高，可以进行后续实验。若纯度不合格，应重新提取miRNA。

2.8.3反转录反应Th成cDNA（RT反应）

按照All-in One miRNA qRT-PCR Detection kit说明书进行操作：Total RNA 2μg

2.5U/μL Poly A polymerase 1μL

RTase Mix 1μL

5Reaction Buffer 5μL

补水至25μL

PCR扩增仪上运行：反应：37℃反应60 min，灭活：95℃反应5 min，在冰上保存待进行下一步荧光定量PCR。

2.8.4荧光定量RT-PCR

根据All-in One miRNA qRT-PCR Detection kit说明书在冰上进行配制PCR

反应液：

Zkq 20151125

2×All in-one qPCR Mix 10.0μL

All-in-oneTM miRNA qPCR Primer 2.0μL

50Rox Reference Dye 0.4μL

Universal Adaptor PCR Primer 2.0μL

无 RNase 的水 3.6 μL

cDNA 模板 2.0 μL

总体积 20 μL

两步法标准程序： Stage1 预变性 Reps: 1 95℃ 10 min

Stage2循环反应: Reps: 40

Step1: 95℃10 sec. 变性Step2: 60℃20 sec. 退火Step3: 72℃10 sec. 延 伸

在PCR仪上进行扩增，得到每孔Ct值后，计算3个复孔的平均值，取平均值按照2-△△ct相对定量计算公式计算出各目的基因的相对定量结果。

## 2.9 免疫印迹法（western blot）检测蛋白的表达

2.9.1细胞总蛋白的提取

1）使RIPA裂解液溶解并且混匀。按照1: 100的比例加入PMSF。配好的裂解液置于冰上备用。

2）按照实验要求处理细胞完毕后，PBS缓冲液冲洗并收集至50 ml离心管中，再用0.25%胰酶消化液消化收集细胞，2500 r·min-1离心5-10 min。弃去上清液，并用滤纸将管中液体吸干。

3）加入适量配置好的裂解液，并移入新的EP管中，冰上裂解30 min；

4）12000 r·min-1, 4℃，离心30 min，取出上清，分装-80°C保存备用。

2.9.2蛋白定量1）绘制标准曲线：

将两种试剂A（1%BCA）和B（4%CuSO4）按50: 1混合制备成工作液，

将标准蛋白（BSA）用生理盐水（NS）稀释浓度为500µg/mL。按照表2将各溶液加入96孔板中，每组设置三个复孔。选择570 nm波长在酶标仪上检测各

Zkq 20151125

孔的吸光度（OD）值，结果如表2所示，绘制标准曲线（图1）。

表2 . BSA各标准孔的配置方法

Tab. 2 Preparation of the various standards BSA solutions

| 管号 | BSA (µL) | NS(µL) | 工作液(µL) |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0 | 20 | 200 |
| 2 | 1 | 19 | 200 |
| 3 | 2 | 18 | 200 |
| 4 | 4 | 16 | 200 |
| 5 | 8 | 12 | 200 |
| 6 | 12 | 8 | 200 |
| 7 | 16 | 4 | 200 |
| 8 | 20 | 0 | 200 |

2）蛋白质浓度的测定

在96孔板中，加入2µL样品，18µL PBS，以及配置好的200µL工作

液。然后将96孔板放入37℃烘箱孵育30 min后，于酶标仪上获得570 nm处的OD值。根据标准曲线，计算待测样本的蛋白质浓度。根据配平公式计算出所要加入的裂解液和上扬缓冲液进行稀释，水浴煮沸5 min使蛋白变性，

-20℃保存备用。

y = 0.0523x + 0.1271 R2 = 0.9987

0.7

0.6

0.5

OD value

0.4

0.3

0.2

0.1

0

0 2 4 6 8 10

Standard protein (μg)

图1 . 蛋白标准曲线

Zkq 20151125

Fig. 1 The standard curve of protein

2.9.3电泳（SDS-PAGE）1）SDS-PAGE凝胶的配制

. 根据目的蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度（表3），再按照下面的表格配制SDS-PAGE的分离胶（即下层胶）（表4）和浓缩胶（表4）：

表3.不同浓度的SDS-PAGE分离胶的最佳分离范围Tab.3 Effective separation range of the SDS-PAGE gel

SDS-PAGE分离胶浓度最佳分离范围

6%胶 50-150kD

8%胶30-90kD

10%胶 20-80kD

12%胶 12-60kD

15%胶 10-40kD

表4. SDS-PAGE的浓缩胶的配置

Tab. 4 SDS-PAGE gel preparation

|  | 8% | 分离胶（10 mL） | 10%分离胶(10 mL) | 5% | 浓缩胶(6 ml) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蒸馏水 |  | 3.3 | 2.7 |  | 4.1 |
| 30%Acr-Bis(29:1) |  | 2.7 | 3.3 |  | 1.0 |
| 1M Tris, pH8.8 |  | 3.8 | 3.8 |  | - |
| 1M Tris, pH6.8 |  | - | - |  | 0.75 |
| 10%SDS |  | 0.1 | 0.1 |  | 0.06 |
| 10%过硫酸铵 |  | 0.1 | 0.1 |  | 0.06 |
| TEMED |  | 0.006 | 0.004 |  | 0.006 |

2）蛋白质SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按照上述表格配置所需凝胶，将配好的凝胶按照操作规范置于电泳槽中，加入事先配置好的电泳缓冲液至电泳槽指定位置。拔出梳子，将气泡排空，根据需要加入适量蛋白Mark和样品在各孔中。设置电泳仪70 V, 400 mA，50 W电泳30 min后，再将电泳仪设置为90 V, 400 mA，50 W跑至分离胶的底部。

2.9.4凝胶电转移

1）将玻璃板从电泳槽中取出，小心揭开玻璃板后，并将凝胶从玻璃板中取出，然后放入转移缓冲液中5-10 min。

2）裁剪8×6 cm大小的PVDF膜和数张滤纸，裁剪好的滤纸直接放入缓冲液中，并将PVDF膜放置于甲醇溶液中数秒激活。

3）将转移夹打开，白面水平向下，依次铺海绵垫、滤纸垫、PVDF膜、凝胶、滤纸垫、海绵垫，操作过程中避免气泡。将转移夹安装至转移槽内，倒入转移缓冲液并加适宜大小冰袋等待转膜。

4）取一盆冰将转移槽置于其中，恒压50 V, 250 mA，转移2.5-3 h。

2.9.5蛋白质免疫印迹

1）在室温条件下，转膜后的PVDF膜置于摇床上，需要浸在封闭液中封闭2 h。

2）一抗孵育：将印迹PVDF膜与一抗或鼠抗β-actin抗体4℃孵育过夜或者孵育

6 h。孵育完毕后要用TPBS洗涤3次。

3）二抗孵育：将PVDF膜与二抗室温下孵育1-2 h，孵育完毕后要用TPBS每次

10 min, 洗涤3次。

2.9.6化学反光及图像采集

1）取1 ml化学发光增强液A和1ml B混匀后，把混匀液倒进玻璃皿中，将PVDF

膜平铺在上，反应1 min左右可以成像。

2）PVDF膜均匀涂上发光增强液以后，将其置于BIO-RAD凝胶成像系统中，曝光获取图像，曝光过程中设置曝光时间和照片数量。

# 3. 统计学处理

所有的实验至少重复三次，实验数据以*x*±s表示，采用SPSS13.0统计软件进行方差分析及Dunnette-*t*检验，以*P* <0.05为有统计学意义。

### 结果

1.鼻咽癌耐药株细胞HNE1/DDP具有耐药特性

## 1.1 DDP对鼻咽癌细胞具有增殖抑制的作用

DDP是否对鼻咽癌细胞具有增殖抑制作用，耐药株细胞HNE1/DDP相对于亲本细胞HNE1对DDP的耐受情况如何？为了探究这一问题，我们采用MTT法观察DDP对两株细胞的增殖能力的影响。用不同浓度的DDP (2、4、8、16、32μmol·L-1)分别作用于鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP 24、48、72h，得到在490 nm处的

OD值。根据所得OD值计算出细胞存活率，并作出剂量-效应曲线见图2。从量效曲线中，我们可以看出，DDP能够抑制两株细胞的增殖，并且呈时间和浓度依赖性。在24、48、72h，鼻咽癌细胞HNE1/DDP的半数抑制率(IC50)计算后得出分别为32.15±0.37、21.88±0.49、14.76±0.56μmol·L-1，鼻咽癌细胞HNE1的IC50为7.87±0.33、5.25±0.15、3.45±0.35μmol·L-1。鼻咽癌细胞HNE1/DDP

耐药指数(RI)计算后为4.08、4.16、4.27（表5），从结果中可以看出，与HNE1细胞相比，HNE1/DDP细胞对DDP不敏感。也证明了我们所选用的耐药株是具有耐药性的。

**120**

**120**

**100 24H**

**80 48H**

**72H**

**60**

**40**

**20**

**0**

**0 2 4 8 16 32**

**120**

**100 24H**

**80 48H**

**72H**

**60**

**40**

**20**

**0**

**0 2 4 8 16 32**

**120**

**100**

**80**

**24H**

**60 48H**

**40 72H**

**20**

**0**

**0 2 4 8 16 32**

**120**

**100**

**80**

**24H**

**60 48H**

**40 72H**

**20**

**0**

**0 2 4 8 16 32**



**120**

**100**

**80**

**24H**

**48H**

**72H**

**60**

**40**

**20**

**0**

**0**

**2**

**4**

**8**

**16 32**



**100**

**Cell viability (%)**

**Cell viability (%)**

**80**

**60**

**40**

**20**

**24H**

**48H**

**72H**

**DDP(uM )**

**HNE1**

**DDP(uM** )

**0**

**0** 2 4 8 16 32

**HNE1/DDP**

图2 DDP作用24、48、72h后对鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP增殖抑制作用

Fig.2 The inhibitive effect of DDP in HNE1 and HNE1/DDP cells for 24, 48, 72h.( *x* ±s, n=3)

表 5 DDP 处理鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP 24、48、72h 后的半数抑制率和耐药指数Tab.5 The IC50 and RI of HNE1, HNE1/DDP induced by DDP for 24, 48, 72h ( *x* ±s, n=3)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | IC50(uM) |  | |
| Time(h) | HNE1 |  | HNE1/DDP | RI |
| 24 | 7.87±0.33 |  | 32.15±0.37 | 4.08 |
| 48 | 5.25±0.15 |  | 21.88±0.49 | 4.16 |
| 72 | 3.45±0.35 |  | 14.76±0.56 | 4.27 |

## 1.2 鼻咽癌耐药株细胞具有抗凋亡特性

在24、48、72h为了进一步验证鼻咽癌细胞株HNE1/DDP相对亲本细胞HNE1是否具有耐药性，我们采用Western blot和qRT-PCR法检测了两株细胞中耐药以及凋亡相关的蛋白和基因的表达。结果显示：HNE1/DDP细胞相较于亲本细胞

HNE1，抗凋亡蛋白MRP、Bcl-2表达升高，促凋亡蛋白Bax、Bim表达下降（图

3），在基因水平也观察到了同样的变化（图4）。

**Anti-apoptotic** **Pro-apoptotic**

**HNE1** HNE1/DDP







**Bcl-2**

**MRP**

**β-actin**

**HNE1** HNE1/DDP

**Bax**

**Bim**



**β-actin**

图 3.鼻咽癌细胞 HNE1、HNE1/DDP 中Bcl-2、MRP、Bax、Bim 的蛋白表达。Fig.3 The expression of Bcl-2, MRP, Bax and Bim by western blot.

HNE1

**9** ﹡ HNE1/DDP

**8**

**7**

**6** ﹡

**5**

**4**

**3**

**2**

**1** ﹡ ﹡

**0**

**MRP Bcl-2 Bax Bim**

HNE1

**9** ﹡ HNE1/DDP

**8**

**7**

**6** ﹡

**5**

**4**

**3**

**2**

**1** ﹡ ﹡

**0**

**MRP Bcl-2 Bax Bim**

Relative expression of miRNA

**9**

**8**

**7**

**6**

**5**

**4**

**3**

**2**

**1**

**0**

﹡

HNE1

HNE1/DDP

﹡

**MRP Bcl-2**

﹡

**Bax**

﹡

**Bim**

图4。鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP中Bcl-2、MRP、Bax、Bim的mRNA基因表达情况。Fig.4 The relative mRNA expression levels of Bcl-2, MRP, Bax and Bim in HNE1 and

HNE1/DDP cells. ( *x*±s, n=3, \**p* <0.05 vs HNE1 cells)

2. miR-181c在HNE1和HNE1/DDP中的表达具有差异

根据课题组前期的实验结果，我们筛选出在两株细胞中具有表达差异的

miR-181c进行验证。验证实验结果符合预期，在耐药株细胞中miR-181c的相对表达量较敏感株细胞低（图5）。

4

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0 HNE1/DDP HNE1

4

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0 HNE1/DDP HNE1

4

3.5

3

2.5

2

1.5

1

0.5

0

HNE1/DDP

HNE1

Relative expression level of miR-181c

图5。鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP中miR-181c相对表达。

Fig. 5 The relative miR-181c expression levels of in HNE1 and HNE1/DDP cells. (*x*±s, n=3, \**p*

<0.05)

3. 调控两株细胞HNE1和HNE1/DDP中miR-181c的表达及其调控对细胞凋亡的影响

## 3.1 调控miR-181c在HNE1和HNE1/DDP中的表达

利用实验方法转染的方法，在低表达miR-181c的HNE1/DDP细胞中，转染

miR-181c的模拟物使其表达增加，相反地，在高表达miR-181c的HNE1细胞中，转染miR-181c抑制剂使其表达减少。转染之后48 h收集细胞，采用RT-PCR检测两株细胞中miR-181c的相对表达量，实验结果显示：转染之后，HNE1/DDP细胞株中miR-181c表达量增加，而HNE1细胞株中miR-181c表达量降低（图6）。

A

Relative expression level of miR-181c

**10**

﹡

**8**

**6**

**4**

**2**

**0**

**blank NC miR-181c**

HNE1/DDP

B

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2** ﹡

**0**

**blank anti -NC an ti-miR- 181c**

HNE1

Relative expression level of miR-181c

**10**

**8**

**6**

**4**

**2**

**0**

**blank**

**NC**

**miR-181c**

﹡

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2**

**0**

**blank**

**anti -NC an ti-miR-**

**181c**

﹡

图6。转染之后，鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP中miR-181c相对表达。(A) HNE1/DDP细胞转染了miR-181c 模拟物。(B) HNE1细胞转染了miR-181c抑制剂。

Fig. 6 The relative expression levels of miR-181c after transfection. (A) HNE1/DDP cells were transfected with miR-181c mimics. (B) HNE1 cells were transfected with miR-181c inhibitors.

( \**p* <0.05 vs blank or NC, \**p* <0.05 vs blank or anti-NC, n=3)

## 3.2 调控miR-181c的表达对鼻咽癌细胞凋亡的影响

3.2.1调控miR-181c的表达对鼻咽癌细胞增殖能力的影响

将转染后的细胞消化成悬浮细胞种到96孔板中，48 h后MTT实验数据可以看出，转染了miR-181c模拟物的HNE1/DDP细胞的耐DDP对DDP的存活率呈下降趋势，相反地，转染了miR-181c抑制剂的HNE1细胞对其增殖抑制的能力降低（图7）。

A HNE1/DDP

﹡

﹡

**80**

﹡

**60** ﹡

**40**

**20**

**0**

**blank NC mi R- 181 c**

**Cell viability (%)**

**Cell viability (%)**

B HNE1

**80**

**60**

**40**

**20**

**0**

**blank**

**NC**

**mi R- 181 c**

﹡

**80**

**60**

**40**

**20**

**0**

﹡

**blank anti- NC anti-**

**mi R- 181 c**

**DDP（8 uM ）** **DDP（8 uM ）**

**80**

﹡﹡

**60**

**40**

**20**

**0**

**blank anti- NC anti-**

**mi R- 181 c**

图7 . 转染之后，DDP（8M）对鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP增殖能力的影响（A）

HNE1/DDP细胞转染了miR-181c 模拟物。(B) HNE1细胞转染了miR-181c抑制剂。

Fig.7 MTT assay after treated with DDP in HNE1 and HNE1/DDP cells for 48 h after transfection.

(A) HNE1/DDP cells were transfected with miR-181c mimics. (B) HNE1 cells were transfected with miR-181c inhibitors. ( \**p* <0.05 vs blank or NC, \**p* <0.05 vs blank or anti-NC, n=3)

3.2.2调控miR-181c的表达对鼻咽癌细胞凋亡的影响

将转染后的细胞消化成悬浮细胞之后种到12孔板中，按照实验要求对细胞进行后处理。我们采用转染之后的细胞完成集落克隆实验、PI单染实验以及Annexin

V/PI双染实验。7-9天后观察集落克隆实验结果，我们可以看出：转染了miR-181c模拟物的HNE1/DDP细胞形成的集落较空白组和对照组明显减少了，而转染了miR-181c抑制剂的HNE1细胞形成的集落反倒增加了（图8）。在PI 单染实验所得到的结果也可以看出：转染了miR-181c模拟物的HNE1/DDP细胞因DDP诱导的凋亡增加了，而转染了miR-181c抑制剂的HNE1细胞因DDP诱导的凋亡是降低的（图9）。同样地，在Annexin V/PI双染实验我们也得到了类似的结果

（图10）。

A HNE1/DDP

﹡



B HNE1

blank NC miR-181c



blank anti-NC anti-miR-181c

﹡

**2 0 0**

**1 6 0**

﹡

**1 2 0**

**8 0** ﹡

**4 0**

**0**

**bl a nk a nt i - NC an t i- m i R- 1 81 c**

**2 4 0**

**2 0 0** ﹡

**1 6 0**

**1 2 0** ﹡

**8 0**

**4 0**

**0**

**b l a n k N C m i R - 1 8 1 c**

**2 0 0**

**1 6 0**

﹡

**1 2 0**

**8 0** ﹡

**4 0**

**0**

**bl a nk a nt i - NC an t i- m i R- 1 81 c**

**2 4 0**

**2 0 0** ﹡

**1 6 0**

**1 2 0** ﹡

**8 0**

**4 0**

**0**

**b l a n k N C m i R - 1 8 1 c**

**2 0 0**

**1 6 0**

﹡

**1 2 0**

**8 0**

**4 0**

**0**

**bl a nk a nt i - NC an t i- m i R- 1 81 c**

**2 4 0**

**2 0 0**

**1 6 0**

**1 2 0**

**8 0**

**4 0**

**0**

﹡

**b l a n k**

**N C**

**m i R - 1 8 1 c**

Cell colony number

Cell colony number



图8 . 转染之后，DDP（2M）对鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP集落克隆形成的影响（A）

HNE1/DDP细胞转染了miR-181c 模拟物。(B) HNE1细胞转染了miR-181c抑制剂。

Fig.8 Colony formation assay after transfection. (A) HNE1/DDP cells were transfected with miR-181c mimics. (B) HNE1 cells were transfected with miR-181c inhibitors. ( \**p* <0.05 vs blank or NC, \**p* <0.05 vs blank or anti-NC, n=3)

**A**

**Relative cell number**



**HNE1/DDP**

**25**

﹡

**Apoptotic cells%**

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**DDP NC**

**miR-181c**

**B**



**HNE1**

**50**

**40**

**30**

**20**

**10**

**0**

﹡

**Relative cell number**

**Cells apoptotic %**



**DDP**

**Anti-NC anti- miR-181c**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| - + | + | + |
| - - | + | - |
| - - | - | + |

- + + +

﹡

﹡

- - + -

- - - +

图9。转染之后，DDP（25M）对鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP凋亡的影响（A）HNE1/DDP细胞转染了miR-181c 模拟物。(B) HNE1细胞转染了miR-181c抑制剂。

Fig. 9 PI assay after transfection. (A) HNE1/DDP cells were transfected with miR-181c mimics. (B) HNE1cells were transfected with miR-181c inhibitors. （\**p* <0.05 vs NC, \**p* <0.05 vs anti-NC, n=3）

**A**

**HNE1/DDP**

**DDP NC**

**25**

**20** ﹡

**15**

**10**

**5**

**0**

**25**

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**25**

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**25**

**20**

﹡

**15**

**10**

**5**

**0**

**The early apoptosis%**

**miR-181c**

- + + +

- - + -

- - - +

**B**

**HNE1**

**25**

**20**

**15**

﹡

**10**

**5**

**0**

**DDP**

**s 25**

**tosi 20**

﹡

**o 15**

**a 10**

**y l 5**

**a e 0**

**he**

**s 25**

**tosi 20**

**15**

**o**

**a 10 p**

**y l 5 r**

**a e 0**

**he**

**T The erarlypappoptosis%**

**Anti-NC anti-miR-181c**

- + + +

- - + -

- - - +

图10。 转染之后，DDP（25M）对鼻咽癌细胞HNE1、HNE1/DDP凋亡的影响（A）HNE1/DDP细胞转染了miR-181c 模拟物。(B) HNE1细胞转染了miR-181c抑制剂。

Fig. 10 Annexin V/PI assay after transfection. (A) HNE1/DDP cells were transfected with

MiR-181c mimics. (B) HNE1cells were transfected with miR-181c inhibitors. ( \**p* <0.05 vs NC,

\**p* <0.05 vs anti-NC, n=3）

# 4. miR-181c通过介导Mcl-1对鼻咽癌细胞凋亡的调控作用

## 4.1 Mcl-1在鼻咽癌细胞株中的表达

从上述实验结果中，我们观察到调控miR-181c在两株细胞中的表达，可以影响顺铂诱导的凋亡。那么，到底是什么原因造成这种结果的呢？为了深入探讨其中可能的机制，我们检测了Bcl-2家族中的一个重要成员Mcl-1两株细胞中的表达，不出意料，在耐药株中，Mcl-1的表达是升高的（图11）。

HNE1 HNE1/DDP



Mcl-1

β-actin



图11。Mcl-1蛋白在鼻咽癌敏感株细胞HNE1和耐药株细胞HNE1/DDP的表达。

Fig. 11 Western blot detects the expression of Mcl-1 in HNE1 and HNE1/DDP cells.

## 4.2 调控miR-181c在鼻咽癌细胞中表达对Mcl-1蛋白的影响

转染后的HNE1/DDP细胞分为空白组，DDP组，NC+DDP组，miR-181c+DDP组。HNE1分为空白组，DDP组，NC+DDP组，anti-miR-181c+DDP组。处理完毕后Western blot检测各组Mcl-1蛋白表达含量。结果显示：转染了miR-181抑制剂的HNE1细胞Mcl-1的表达增加了，而转染了miR-181c模拟物的HNE1/DDP细胞Mcl-1的表达是降低的（图12）。

HNE1 HNE1/DDP

DDP



anti-NC

Mcl-1

β-actin

- + + +

- - + -

- - - +

- + + +

- - + -

- - - +

DDP NC

miR-181c

42kD

43kD



图12。转染后Mcl-1蛋白在鼻咽癌敏感株细胞HNE1和耐药株细胞HNE1/DDP的表达。

Fig.12 Western blot detects the expression of Mcl-1 in HNE1 and HNE1/DDP cells after transfection..

## 4.3 干扰Mcl-1蛋白表达后对鼻咽癌细胞凋亡的影响

为了探究Mcl-1在鼻咽癌细胞凋亡的调控中所起到的作用，我们进一步采用小干扰技术，抑制耐药株细胞中的Mcl-1基因的表达。从Western blot实验观察Mcl-1蛋白的表达变化以及RT-PCR实验Mcl-1 mRNA的表达可以证明（图13），干扰是成功的。干扰成功以后，我们利用干扰后的HNE1/DDP细胞来再次进行集落克隆实验和Annexin V/PI双染实验。实验结果显示：干扰后的HNE1/DDP细胞较空白组7-9 d 后形成的集落是减少的（图14）。同样，在Annexin V/PI双染实验结果中，我们也可以看出由顺铂诱导的凋亡是增加的（图15）。

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2**

**0**

**Control siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

﹡

﹡

﹡

HNE1/DDP

Relative expresion of Mcl-1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| siControl | - + | - | - | - |
| siMcl-1-991 | - - | + | - | - |
| siMcl-1-1114 | - - | - | + | - |
| siMcl-1-1235 | - - | - | - | + |

Mcl-1



β-actin

42kD



43kD

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4** ﹡

﹡ ﹡

**0.2**

**0**

**Control siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2**

**0**

**Control siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

**1.2**

**1**

**0.8**

**0.6**

**0.4**

**0.2**

**0**

**Control siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

图12。采用小干扰技术干扰Mcl-1在耐药株细胞HNE1/DDP的表达。

Fig. 12 Effects of Mcl-1 siRNA after transfection on Mcl-1 of HNE1/DDP cells by western blot and qRT-PCR. （\**p* <0.05, # *p* <0.05, Δ*p* <0.05 vs blank or siControl, n=3）



**400**

**320**

**240**

**160**

**80**

**0**

**blank siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

﹡

﹡

﹡

blank siControl siMcl-1-991 siMcl-1-1114 siMcl-1-1235

**400**

**320**

**240** ﹡

**160** ﹡ ﹡

**80**

**0**

**blank siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

图13 .采用小干扰技术干扰Mcl-1在耐药株细胞HNE1/DDP的表达后，集落克隆实验观察对其集落形成的影响。

**400**

**320**

**240**

**160**

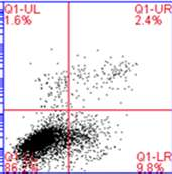
**80**

**0**

**blank siControl siMcl-1- siMcl-1- siMcl-1-**

**991 1114 1235**

Fig. 13 Colony formation assay transfected with Mcl-1 siRNA.（\**p* <0.05 vs blank or siControl, n=3）



**30**

**25**

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**bla nk**

**si C ont rol si Mcl - 1 - 99 1 si M cl- 1 - 1 11 4 s i M cl- 1 - 1 235**

﹡

﹡

﹡

图14。采用小干扰技术干扰Mcl-1在耐药株细胞HNE1/DDP的表达后，Annexin V/PI双染检测对其凋亡情况的影响。

**30**

**25** ﹡ ﹡

﹡

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**bla nk si C ont rol si Mcl - 1 - 99 1 si M cl- 1 - 1 11 4 s i M cl- 1 - 1 235**

**30**

**25**

**20**

**15**

**10**

**5**

**0**

**bla nk si C ont rol si Mcl - 1 - 99 1 si M cl- 1 - 1 11 4 s i M cl- 1 - 1 235**

**The early apoptosis%**

Fig. 14 Annexin V/PI assay transfected with Mcl-1 siRNA. （\**p* <0.05 vs blank or siControl, n=3）

### 讨 论

肿瘤细胞具有“不死性”并能发生发展为抗药瘤，这无疑是制约肿瘤治疗的两大难题。现在肿瘤学认为在肿瘤的发生发展中，恶性肿瘤细胞对死亡诱导（或对治疗）的失敏感是构成这两大难题的根本条件，并且这种失敏感与肿瘤细胞生存信号传导通路的不适当的激活直接相关。鼻咽癌是我国好发的恶性肿瘤之一。临床上对鼻咽癌的首选疗法是放疗，但放疗仅对早期的原位癌有效。而多数鼻咽癌患者在发现患癌时，已处于中晚期并伴有远端转移。放疗结合化疗对中晚期癌症患者有效，但在化疗过程出现的耐药，常常导致治疗失败[45-47]。因此，克服在化疗过程中肿瘤细胞对化疗药物的耐药，是当前亟待解决的问题。

肿瘤细胞的多药耐药（MDR）给癌症患者应用化学疗法治疗癌症造成了极大的障碍。在许多案例中，化学治疗常常因为在治疗之后，先天的或者后天获得的

MDR导致治疗失败[48]。已有许多研究证明细胞的耐药通常有三种机制：一，减少水溶性药物的摄入；二；细胞中发生多种改变，这些改变会影响毒性药物杀细胞的能力，包括改变细胞周期，增强DNA修复能力，改变药物的代谢等[49-51]；三，增加疏水性药物的外排，通常表现为能量依赖转运蛋白的过表达，如P-glyco-protein(P-gp)和乳腺癌耐药蛋白的表达增多等等[52]。最后一种机制是通过增加药物的外排使得进入细胞的药物变少而导致药效降低，这种作用是通过ATP依赖的外排泵也就是ATP结合盒家族（ABC）实现[53]。每一个ABC转录因子包含1-2个ATP结合域，根据同源性和结合域的组成将其分为7个亚区（ABCA-G）。

ABC家族的蛋白通常在正常的组织中也能够表达，并且发挥药物外排作用以保护脑组织或者睾丸组织不受药物的伤害。有研究表明，在耐药的肿瘤细胞和组织中，P-gp、MRP-1、BCRP这几种蛋白会发生变化。其中，P-gp在包括乳腺癌、肺癌、胃癌的许多肿瘤细胞中已经被广泛研究[54, 55]。（MDR-1/P-gp）是研究的最广泛的MDR转运蛋白，早在30多年前已被发现并开始研究[38]。由于MDR-1/P-gp的过表达导致肿瘤细胞对一系列结构和功能不同的抗肿瘤药物产生耐药性。超过

50%的耐药人肿瘤细胞中MDR-1/P-gp的表达是升高的。在有研究指出miRNA可以调控ABCG2后不久，一些miRNAs（miR-27a, miR-451, miR-296, miR-298, miR-338, miR-1253）就被发现可以与ABCB1 3'端非编码区结合直接进行调控[56,

57]. 下调这些miRNAs的表达就会导致细胞的耐药。miRNA是一类非编码的小分子RNA, miRNA在转录后水平调控基因的表达，并且生物增殖，分化，凋亡和代谢等各种进程中有着重要的调控作用[58-61]. Si等人发现miR-21可能与抗凋亡作用有关，无论是在体外或者恶移植瘤小鼠模型[62]。

目前，广泛的研究证实，肿瘤细胞的获得性细胞耐药可以通过调节miRNA的表达水平来改变[63-67]，例如，在一组耐紫杉醇和顺铂的卵巢癌细胞中，6种miRNA(let-7e, miR-30c, miR-125b, miR-130a和miR-335)都有不同的表达[63]，这一现象表明，这6种miRNA和细胞的耐药有关，并且改变与耐药相关的miRNA的表达可能是改变肿瘤细胞耐药性的有效途径。与此同时，有文献报道，MCF-7细胞对阿霉素的耐药性可以通过上调miRNA-451的表达来下调其靶基因P-gp的表达来改变[64]。此外，在多药耐药胃癌细胞株SGC7901/VCR中，相较于亲本细胞株SGC7901, miR-15b和miR-16的表达是降低的。上调miR-15b和miR-16的表达可以增加SGC7901/VCR细胞由长春新碱诱导凋亡的敏感性，这种改变是通过作用于靶基因Bcl-2来实现的[66]。近来，有研究发现let-7a在耐阿霉素的鳞癌细胞中的表达是增加的，并且通过作用于caspase-3来下调let-7a的表达可以增加由阿霉素诱导的凋亡[67]。除了以上的研究，越来越多的证据表明，miRNAs在细胞耐药中起着重要作用[68]，而通过调节与耐药相关的miRNA的表达可以增加由化疗药物诱导凋亡的敏感性。

Mcl-1是Bcl-2家族的一个重要成员，在凋亡的调控中，Mcl-1s是处于顶端的调控分子，通过干扰级联反应的初级阶段导致线粒体中细胞色素C的释放从而促进细胞存活[69]。Mcl-1的存活期很短，可以被许多细胞存活信号通路调控，并且在凋亡过程中表达会快速下降。在凋亡过程中，Mcl-1也可以被Caspase剪切以产生促进细胞凋亡的分子。Mcl-1这种可以多重的复杂的调控表明，在应激环境变化中，Mcl-1在调控凋亡的过程中有着非常重要的作用。此外，在胚胎的发育和免疫系统功能中，Mcl-1也是不可或缺的。在许多肿瘤的诊断中，Mcl-1也可以作为一个重要的检测指标，通过抑制Mcl-1的功能也可以作为一种治疗策略。在恶性肿瘤，炎症状态以及传染性疾病中，Mcl-1都起着非常重要的作用[69]。我们的研究结果显示，敏感株细胞HNE1与耐药株细胞HNE1/DDP相比，抗凋亡蛋白Mcl-1的表达是升高的，与此同时，miR-181c的表达是降低的。为了研

究miR-181c的表达与Mcl-1之间的关系，我们利用转染实验将外源性的miR-181c的模拟物/抑制剂转染进入两株细胞调控miR-181c的表达，小干扰技术干扰Mcl-1在耐药株细胞中的表达，结果都证明miR-181c与Mcl-1之间存在相互调控的关系，也就是说，Mcl-1可能是miR-181c的一个靶基因。

对于miR-181s的研究是始于小鼠造血干细胞的分化，与造血干细胞分化的胚胎期和早期相比，成年期造血干细胞中miR-181c的表达具有显著的升高[70]。近来Fanini和Shi等人的研究表明，在人急性单核细胞白血病（AML）和人神经胶质瘤细胞中，miR-181a和miR-181b表现为抑癌基因的作用。通过外源性过表达miR-181a可以诱导AML细胞的凋亡，同样地，过表达miR-181a和miR-181b也可以诱导人神经胶质瘤细胞的凋亡[71, 72]。然而，Ji等人的研究却发现，EpCAM阳性的肝癌干细胞与alpha-fetoprotein阳性的的肝癌细胞相比，miR-181s的表达是较高的。抑制miR-181的表达可以使EpCAM阳性的肝癌干细胞的数量减少，并且减弱其启动肿瘤的能力。更有趣的是，在肝脏胚胎期和分离的肝脏干细胞中，miR-181s的表达也是升高的[73]。以上的实验研究都表明，miR-181s在不同类型的肿瘤中起着完全不同的作用。我们的研究结果与Fanini和Shi等人的研究结果相一致[71, 72]，我们也证实了在耐药株细胞HNE1/DDP中外源性过表达miR-181c可以增加由DDP诱导的凋亡。

我们的研究结果证明在耐药株细胞中，miR-181c的表达是降低的。我们在实验过程中，miR-181c的过表达是通过瞬时转染成熟的miR-181c模拟物来实现的。有报道指出，转染小分子RNA（比如siRNA和miRNAs）进入细胞时，存在浓度和时间依赖性[74]。因此，我们在转染24，48，72 h后检测Mcl-1在细胞中的表达；结果发现，最好的转染效果在转染后48 h，这与Xia L等人的转染后

72 h效率最高的研究结果不相一致[66]，说明不同的细胞和环境对转染效率都存在影响。在转染浓度方面，我们也是选取了不同的配比进行预实验，后续实验中选取了转染效率最高的1: 1的比例进行试验。

综上所述，我们的实验结果首次探究了miR-181c参与鼻咽癌细胞株耐药的现象及其可能机制。我们的研究结果发现在耐药株细胞中miR-181c的表达是下调的，并且miR-181c可能是通过作用于靶基因Mcl-1来实现对鼻咽癌细胞MDR现象的调控。在未来鼻咽癌的治疗过程中，针对MDR相关miRNAs的调控可能

是一种具有重要意义的增强治疗效果的方法。但是，我们的实验结果只局限于细胞实验，在动物实验中还未得到验证，因此，将这种方法应用于临床还需要更深入和大量的研究。

结 论

1.实验中所选用的鼻咽癌细胞株HNE1/DDP与亲本细胞HNE1相比具有耐药性。

2.鼻咽癌细胞株HNE1/DDP和HNE1中miR-181c的表达具有差异性，这种差异可能是细胞对化疗药物耐药程度不同的原因。

3.通过调控两株细胞中miR-181c的表达可以影响由顺铂诱导的细胞凋亡，从改变细胞对化疗药物的耐药性。

4.预测并验证了Mcl-1可能是miR-181c作用的其中一个靶点。

参考文献

[1] McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci. 2001. 26(2): 82-92.

[2] Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum RR. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet. 1997. 350(9084): 1087-91.

[3] Hsu MM, Tu SM. Nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. Clinical manifestations and results of therapy[J]. Cancer. 1983. 52(2): 362-8.

[4] Lee N, Xia P, Quivey JM, et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002. 53(1): 12-22.

[5] Lee N, Xia P, Quivey JM, et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002. 53(1): 12-22.

[6] Hui EP, Leung SF, Au JS, et al. Lung metastasis alone in nasopharyngeal carcinoma: a relatively favorable prognostic group[J]. Cancer. 2004. 101(2): 300-6.

[7] Chen QY, Wen YF, Guo L, et al. Concurrent chemoradiotherapy vs radiotherapy alone in stage II nasopharyngeal carcinoma: phase III randomized trial[J]. J Natl Cancer Inst. 2011. 103(23): 1761-70.

[8] Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies[J]. Cancer Res. 1970. 30(4): 1174-84.

[9] Yan F, Jiang Y, Li YM, Zhen X, Cen J, Fang WR. Reversal of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 mediated multidrug resistance in cancer cells by HZ08 Isomers, tetrataisohydroquinolin derivatives[J]. Biol Pharm Bull. 2008. 31(6): 1258-64.

[10] Klepsch F, Jabeen I, Chiba P, Ecker GF. Pharmacoinformatic approaches to design natural product type ligands of ABC-transporters[J]. Curr Pharm Des.

2010. 16(15): 1742-52.

[11] Park SE, Park C, Kim SH, et al. Korean red ginseng extract induces ap optosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells[J]. J Ethnopharmacol. 2009. 121(2): 304-12.

[12] Gallenne T, Gautier F, Oliver L, et al. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members[J]. J Cell Biol. 2009. 185(2): 279-90.

[13] Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, et al. Topoisomerase IIalpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol. 2010. 136(7): 1029-37.

[14] Chhabra A, Verma A, Mehta K. Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context[J]. Anticancer Res. 2009. 29(6): 1909-19.

[15] Choi MJ, Park EJ, Min KJ, Park JW, Kwon TK. Endoplasmic reticulum stress mediates withaferin A-induced apoptosis in human renal carcinoma cells[J]. Toxicol In Vitro. 2011. 25(3): 692-8.

[16] Chen KG, Sikic BI. Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance[J]. Clin Cancer Res. 2012. 18(7): 1863-9.

[17] Deng M, Tang H, Zhou Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Sci. 2011. 124(Pt 17): 2997-3005.

[18] Chow SE, Chen YW, Liang CA, Huang YK, Wang JS. Wogonin induces cross-regulation between autophagy and apoptosis via a variety of Akt pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. J Cell Biochem. 2012. 113(11): 3476-85.

[19] Acha-Orbea H, Scarpellino L, Hertig S, Dupuis M, Tschopp J. Inhibition of lymphocyte mediated cytotoxicity by perforin antisense oligonucleotides[J]. EMBO J. 1990. 9(12): 3815-9.

[20] Baffa R, Fassan M, Volinia S, et al. MicroRNA expression profiling of human

Metastatic cancers identifies cancer gene targets[J]. J Pathol. 2009. 219(2): 214-21.

[21] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell. 2003. 113(6): 673-6.

[22] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature. 2005. 435(7043): 834-8.

[23] Di LG, Croce CM. miRNA profiling of cancer. Curr Opin Genet Dev[J]. 2013. 23(1): 3-11.

[24] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature. 2005. 435(7043): 834-8.

[25] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer. 2006. 6(4): 259-69.

[26] Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy[J]. Hum Mol Genet. 2007. 16 Spec No 1: R106-13.

[27] Blower PE, Chung JH, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells[J]. Mol Cancer Ther. 2008. 7(1): 1-9.

[28] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. Mol Cancer Ther. 2008. 7(7): 2152-9.

[29] Kobayashi E, Satow R, Ono M, et al. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma[J]. Oncology. 2014. 86(2): 94-103.

[30] To KK, Zhan Z, Litman T, et al. Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(17): 5147-5161.

[31] To KK, Robey RW, Knutsen T, et al. Escape from hsa-miR-519c enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(10): 2959-2968.

[32] Pan YZ, Morris ME, Yu AM. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human

Cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2009,75(6):1374-1379.

[33] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 372-379.

[34] Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, et al. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(33): 13513-13518.

[35] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2152-2159.

[36] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425-433.

[37] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. Blood, 2006, 108(9): 3068-3071.

[38] Zhang JX, Qian D, Wang FW, et al. MicroRNA-29c enhances the sensitivities of human nasopharyngeal carcinoma to cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy[J]. Cancer Lett. 2013. 329(1): 91-8.

[39] Yang S, Li Y. MicroRNAs: novel factors in clinical diagnosis and prognosis for nasopharyngeal carcinoma[J]. Acta Pharmacol Sin. 2012. 33(8): 981-2.

[40] Liu N, Tang LL, Sun Y, et al. MiR-29c suppresses invasion and metastasis by targeting TIAM1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett. 2013. 329(2): 181-8.

[41] Sun XJ, Liu H, Zhang P, Zhang XD, Jiang ZW, Jiang CC. miR-10b promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2013. 14(9): 5533-7.

[42] Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells[J]. Circ Res. 2004. 94(3): 370-6.

[43] Choudhary GS, Al-Harbi S, Mazumder S, et al. MCL-1 and BCL-xL-de

Pendent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies[J]. Ce ll Death Dis. 2015. 6: e1593.

[44] Rao YM, Shi HR, Ji M, Chen CH. MiR-106a targets Mcl-1 to suppress cisplatin resistance of ovarian cancer A2780 cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2013. 33(4): 567-72.

[45] Bensouda Y, Kaikani W, Ahbeddou N, et al. Treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2011. 128(2): 79-85.

[46] Chen C, Wang FH, An X, et al. Triplet combination with paclitaxel, cisplatin and 5-FU is effective in metastatic and/or recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol. 2013. 71(2): 371-8.

[47] Jamshed A, Hussain R, Iqbal H. Gemcitabine and Cisplatin followed by chemo-radiation for advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev. 2014. 15(2): 899-904.

[48] Fan D, Zhang X, Chen X, et al. Bird's-eye view on gastric cancer research of the past 25 years[J]. J Gastroenterol Hepatol. 2005. 20(3): 360-5.

[49] Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents[J]. Cancer Treat Rev. 2007. 33(1): 9-23.

[50] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. Cell. 2002. 108(2): 153-64.

[51] Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs[J]. Int J Oncol. 1998. 12(4): 871-82.

[52] Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov. 2006. 5(3): 219-34.

[53] Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov. 2006. 5(3): 219-34.

[54] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman

MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999. 39: 361-98.

[55] Deuchars KL, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. Semin Oncol. 1989. 16(2): 156-65.

[56] Goldman B. Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer[J]. J Natl Cancer Inst. 2003. 95(4): 255-7.

[57] Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298[J]. Am J Pathol. 2012. 180(6): 2490-503.

[58] Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis[J]. Carcinogenesis. 2007. 28(1): 2-12.

[59] Rosa A, Brivanlou AH. MicroRNAs in early vertebrate development[J]. Cell Cycle. 2009. 8(21): 3513-20.

[60] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. Br J Cancer. 2006. 94(6): 776-80.

[61] Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science. 2004. 303(5654): 83-6.

[62] Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth[J]. Oncogene. 2007. 26(19): 2799-803.

[63] Blower PE, Verducci JS, Lin S, et al. MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel[J]. Mol Cancer Ther. 2007. 6(5): 1483-91.

[64] Sorrentino A, Liu CG, Addario A, Peschle C, Scambia G, Ferlini C. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol. 2008. 111(3): 478-86.

[65] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. Mol Cancer Ther. 2008. 7(7): 2152-9.

[66] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. Int J Cancer. 2008. 123(2): 372-9.

[67] Tsang WP, Kwok TT. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3[J]. Apoptosis. 2008. 13(10): 1215-22.

[68] Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance[J]. Int J Cancer. 2010. 126(1): 2-10.

[69] Tian K, Wang L, Di R, Xu J, Li G, Li Z. Effect and mechanism of miRNA to osteosarcoma cell[J]. Pak J Pharm Sci. 2014. 27(5 Suppl): 1657-60.

[70] Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science. 2004. 303(5654): 83-6.

[71] Soon P, Kiaris H. MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players[J]. Endocr Relat Cancer. 2013. 20(5): R257-67.

[72] Shi L, Cheng Z, Zhang J, et al. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells[J]. Brain Res. 2008. 1236: 185-93.

[73] Ji J, Yamashita T, Budhu A, et al. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells[J]. Hepatology. 2009. 50(2): 472-80.

[74] Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transf ection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs[J]. Nat Biotechnol. 2009. 27(6): 549-55.

致 谢

时光飞逝，三年的硕士研究生的学习即将结束。在这三年中，有困难，有挫折，有失败，但更多的是收获。收获了对自己专业更深刻的理解，收获了老师们的照顾和关心，收获了同学之间的友谊。三年中，正是有了身边的所有人的支持和帮助，才能使我能够放松心态，专心科研，顺利毕业。三年中，有太多需要感谢的人。

首先，我要深深感谢我的导师刘浩教授和蒋琛琛教授。在论文的选题、搜集资料和写作阶段，他们都倾注了极大的关怀和鼓励。在论文的写作过程中，每当我有所疑问，他们总会放下繁忙的工作，不厌其烦地指点我；提出许多中肯的指导意见，使我在研究和写作过程中不致迷失方向。

其次，我还要感谢霍强老师、陈超老师、赵素荣老师。他们在实验过程中给我提供了太多帮助，即使是节假日，只要我们有需要，他们也会牺牲自己的休息时间为我们的实验提供方便。

我还要感谢我的师兄师姐，他们是张配、张媛媛、张倩雯、晁正华、赵晴。是他们，教会了我最基本的实验方法；是他们，用自己的经验使我在实验过程中少走了很多弯路；是他们，在我的前进道路中有了依靠，不会在困难面前显得手足无措。

同时也要感谢我们课题组的每一个成员，研二研一的师弟师妹们，是他们，分担了实验室的很多事情，使我们能够在研究生生涯的最后阶段，安心备考找工作。

感谢陈刚书记，感谢董淑英教授，感谢童旭辉副教授。

感谢与我朝夕相处的同学，是他们，给我帮助和鼓励，使我收获了甘苦与共的友谊。

我还要感谢我的家人，朋友，同学，是他们，给予我最大的支持和理解！最后，我要感谢参与我论文评审和答辩的各位老师，他们给了我一个审视几

年来学习成果的机会，让我能够明确今后的发展方向，他们对我的帮助是一笔无价的财富。我将在今后的工作、学习中加倍努力，以期能够取得更多成果回报他们、回报社会。

附录 A

### 英中文术语缩略语表

BSA Bovine serum albumin 牛血清白蛋白

cDNA Complementary DNA 互补脱氧核糖核酸

DDP cisplatin 顺铂

DEPC Diethypyrocarbonate 焦碳酸二乙酯

DMSO dimethyl sulfoxide 二甲基亚砜

FBS Fetal bovine serum 胎牛血清

MDR multi-drug resistance 多药耐药

miRNA microRNA 微小 RNA MTT methyl thiazolyl tetrazolium 噻唑蓝

PBS Phosphate Buffered Saline 磷酸盐缓冲液 PCR Polymerase chain reaction 聚合酶链反应 PMSF phenylmethanesulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟化物 PVDF polyvinylidene difluoride 聚偏二氟乙烯

RI Resistance index 耐药指数

siRNA small-interference RNA 小干扰 RNA

SDS sodium dodecyl sulfate 十二万基磺酸钠

TEMED Tetramethylethylenediamine N，N，N，N-四甲基乙二胺

附录 B

### 常用试剂配制方法

（1）10×磷酸盐缓冲溶液（0.1 mol•L-1 PBS）配制：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| NaCl | 137 mmol·L-1 | 80.06 g |
| KCl | 2.7 mmol·L-1 | 2.010 g |
| Na2HPO4 | 10 mmol·L-1 | 14.40 g |
| KH2PO4 | 2 mmol·L-1 | 2.40 g |

加双蒸水搅拌溶解定容至1 L，调pH至7.2, 4°C存放。

（2）1×磷酸盐缓冲溶液（0.01 mol·L-1 PBS）配制：取10×PBS 100 mL加双蒸水定容至1 L。

培养细胞的以0.22μm微孔过滤器过滤除菌分装，置4°C保存。

（3）RPMI1640培养液配制：

RPMI1640粉1 袋

Hepes 2 g

NaHCO3 2 g

青霉素100 U·mL-1

链霉素100μg·mL-1

加双蒸水搅拌溶解定容至1L，调节pH至7.2，以0.22μm微孔过滤器过滤除菌分装后4°C保存备用。

（4）0.25%胰酶的配制：

胰酶粉剂2.5 g

0.01 mol·L-1 PBS 1000 mL

调节pH至7.2，以0.22μm微孔过滤器过滤除菌分装，常用的置 4

℃保存，其余置-20°C保存备用。

（5）MTT溶液的配制：MTT 0.5 g

溶于100 mL pH7.2的0.01 mol·L-1 PBS，为黄色液体，以0.22μm

微孔过滤器过滤除菌分装，常用的置4°C避光保存，其余置-20°C避光保存备用。

（6）青-链霉素双抗的配制：

青霉素每支160万U+4 mL双蒸水

链霉素每支100万U+5 mL双蒸水

分装置-20°C保存备用。

（7）30%Acr/Bis配制：

丙烯酰胺29.2 g

甲叉双丙烯酰胺0.8 g

加双蒸水搅拌溶解定容至100 mL，调pH至7.0, 4°C棕色瓶暗处存放，使用时恢复至室温且无沉淀。

（8）1.5 mol·L-1 Tris-HCl（pH 8.8）配制：Tris base(MW121.14) 18.17 g

加双蒸水搅拌溶解定容至100 mL，调pH至8.8，室温保存。

（9）0.5 mol·L-1 Tris-HCl（pH 6.8）配制：Tris base(MW121.14) 6.057 g

加双蒸水搅拌溶解定容至100 mL，调pH至6.8，室温保存。

（10）10% SDS配制：

SDS 10 g

加双蒸水搅拌溶解定容至100 mL，室温保存。

（11）10%AP（ammonium persufate）配制：AP 0.1 g

加双蒸水至1mL，现配现用。

（12）10×电泳缓冲液配制：

Tris base(MW121.14) 30.3 g Glycine(MW75.07) 187.7 g

SDS 10 g

加双蒸水至1 L，溶解后4°C存放。

（13）1×电泳缓冲液配制：

取100 mL 10×电泳缓冲液加双蒸水至1L。

（14）转移缓冲液配制：

Tris base(MW121.14) 3 g

Glycine(MW75.07) 14.4 g

甲醇200 mL

加双蒸水搅拌溶解定容至1L，现配现用。

（15）封闭缓冲液：

脱脂奶粉5 g

TPBS 100 mL

溶解后4°C保存，使用时恢复至室温，用量以盖过膜即可，一次性使用。

（16）洗脱抗体缓冲液（TPBS）：Tween-20 1 mL 0.01M mol·L-1 PBS 1 L

（17）10×丽春红染液

丽春红S 2 g

三氯乙酸30 g

磺基水杨酸30 g

加蒸馏水定容至100 mL，使用时将其稀释10倍。

（18）2×SDS凝胶上样缓冲液配制：

0.5 M Tris-HCl pH 6.8 2 mL

丙三醇 2 mL

10% SDS 4 mL

0.1%溴酚兰0.5 mL

2-巯基乙醇 1 mL

加双蒸水至10 mL，搅拌溶解分装于1.5 mL离心管，-80°C保存备用。

（19）4%多聚甲醛配制：

称取4 g多聚甲醛粉末，溶于0.01 mol·L-1 PBS溶液，搅拌定容至

100 mL，-4°C保存备用。

。

（20）药物的配制：

DDP，以无菌PBS配制成250g/ml -80°C保存，使用时用培养液稀释成所需浓度

附录 C

### 个人简历及发表论文

一、个人简历：

2008.9-2012.7杭州师范大学本科

2012.9-2015.7蚌埠医学院药理学专业硕士二、参与科研项目：

1. 参与完成青年科技基金课题“Smad4 siRNA调控MMP-9及TGF-β蛋白表达的机制及其对OXA抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞体外侵袭转移活性的影响。

三、发表论文：

1. **Sun XJ**, Liu H, Zhang P, et al. miR-10b promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells. ***Asian Pac J Cancer Prev*** 2013, 14(9):5533-7. (**IF: 1.271**)

**2. Sun XJ**, Zhang P, Li HH, et al: Cisplatin combined with metformin inhibits migration and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating E-cadherin and MMP-9. Asian Pac J Cancer Prev 15:4019-23, 2014((**IF: 1.5)**

3. Zhang P, **Sun XJ**, et al: MicroRNA-10b regulates epithelial-mesenchymal transition through modulating Notch1 in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. PLos one( **Under Review**);共同第一作者

4. 王秀, 张竞竞, 张配, **孙小锦**等, 雷公藤甲素诱导鼻咽癌细胞凋亡作用. 中国

药理学通报. 2014. (08): 1147-1150.

5. 刘哲，张媛媛，张倩文，**孙小锦**等，3-溴丙酮酸联合阿霉素对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响. 蚌埠医学院学报. 2014. 39(1)：22-25,29.

附录 D 综述

MicroRNA:肿瘤化学治疗中多药耐药的可能治疗靶点和预后

Th物标志物

**摘要：**多药耐药（MDR）常常导致肿瘤化学治疗的失败。这与细胞膜上转运蛋白（如P-gp, ABCG2和MRP1）表达的增多有关。miRNAs是一类由18-25个核苷酸组成的内源性非编码的小分子RNA。它的组要功能是在3’端非编码区与靶基因完全互补配对将其降解或者不完全互补配对影响其翻译过程。越来越多的证据表明，调控miRNA的表达可以影响肿瘤细胞对抗肿瘤药物的耐药性。众所周知，在肿瘤细胞和组织中，某些miRNA的表达是异常的。近来有文献报道，生物样品中miRNA的水平与化疗效果是息息相关的。本文旨在将miRNA与其所调控的MDR转运蛋白之间的相互关联做一总结。我们将讨论miRNA作为预后生物标记物对于预测化疗效果的意义。miRNA也可能在将来的临床治疗中作为克服化疗耐药的新的治疗靶点。

**关键词：**转运蛋白； ATP 结合盒； miRNA； MDR；预后生物标记物

抗肿瘤药物的耐药是化疗过程中的一直未能解决的一大障碍。据估计，绝大多数癌症患的死亡者都是由于使用化学药物治疗后产生耐药导致化疗失败造成的[1]。为了寻找新的创新的克服肿瘤细胞耐药的方法和提高癌症病人的存活率，我们必须深入彻底地了解肿瘤耐药的机制。肿瘤耐药的原因有很多，包括减少肿瘤药物的摄入和增加对其的排出，药物作用靶点的突变，增强DNA修复功能和改变细胞死亡途径等等。然而，最主要的机制是能量依赖的转运蛋白ATP结合盒家族药物转运蛋白（如MDR-1/P-gp/ABCB1），多药耐药相关蛋白（MRP-1/ABCC1），乳腺癌耐药蛋白（BCRP/MXR/ABCP/ABCG2）的表达增加[2]。细胞毒性药物外排的增加是导致MDR的原因，这是因为不同化学结构的药物也会影响药物的排出。越来越多的研究表明，正常组织与癌细胞以及不同的肿瘤类型中miRNA的表达常常是具有差异的[3]。在不同的肿瘤发生途径中，miRNA起到致癌基因或者抑癌基因的作用[4, 5]。这对肿瘤的诊断以及预后治疗都是有帮助的，这种表达的差异也可能成为新的治疗靶点[6, 7]。近来，有研究证实，miRNA的差异表达与肿瘤细胞多药耐药有关。本文就当前关于miRNAs在调控肿瘤细胞耐药中的作

用的机制做一综述。

**1. miRNA的异常表达与肿瘤耐药**

有新的证据指出，miRNA在药物敏感性和MDR现象中起到重要的作用。在耐药肿瘤细胞中，miRNA的表达是异常的[8, 9]。最近的在耐阿霉素的乳腺癌细胞MCF-7/DOX的研究中发现，miRNA出现异常表达，并且miRNA形成过程中的两种重要的酶（Dicer和AGO2）的表达也发生了改变[10]。在肿瘤细胞的耐药过程中，miRNA的表达以及它们作用的靶点蛋白的表达都在发生变化，并且这两者之间存在着密切的联系。此外，在NCI-60肿瘤细胞中miRNA的表达类型与肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感类型也是密切相关的[11]。并且，很多研究发现大量的miRNAs调控耐药相关基因如ABCG2[12-14], BCL2 [15], DHFR [16], MDR1[10]和

PTEN [17]。有趣的是，调控miRNA的表达或者功能可以改变抗肿瘤药物的敏感性。这种改变可以通过上调miRNA的表达而抑制或者下调miRNA来恢复。总之，miRNA在肿瘤细胞先天性或者获得性耐药中都具有重要的意义[18]。

**2. miRNA调控转运蛋白ATP结合盒家族调控的MDR**

**2.1 miRNA直接调控ABCG2**

ABCG2是最先被发现的miRNA调控的MDR转运蛋白。对于MDR现象，它是

ATP结合盒家族5中最重要的一员。使用化疗药物后的肿瘤细胞株中，常常可以检测到ABCG2的表达是上升的[2, 19]。迄今为止，大多数对于ABCG2的研究还关注在转运功能方面。基因扩增，染色体异位等都在ABCG2表达的增加中发挥作用[20, 21]。相比较而言，对于ABCG2转录后的调控的研究才刚刚开始。到目前为止，不同研究小组已经证实很多miRNA如miR-520 h [22, 23], miR-519c[12, 13, 24], miR-328 [14], miR-181a [25], 和miR-487a[26]是直接作用于ABCG2的3’端非编码区来决定肿瘤细胞对抗肿瘤药物敏感性的。对于miRNA的异常表达可以引起耐药性改变的假设从未间断过，miR-328的低表达被证实与乳腺癌耐药细胞株MCF-7/MX100中ABCG2的高表达有关[14]。在人成视网膜细胞瘤模型中，ABCG2的高表达与三种miRNAs(miR-328, miR-519c, miR-520 h)的低表达相关，同时也伴随着其他干细胞标记物CD133和ALDH1A1的表达[27]。此外，有文献报道miR-520 h通过抑制ABCG2的表达来促进造血干细胞的分化[22]。ABCG2也曾被认为是干细胞或者癌症干细胞的一个存活因子[28]。以上这些研究成果证明在干

细胞中高表达的ABCG2是受miRNAs调控的，并且在肿瘤细胞耐药过程中起到了重要的作用。在之后的研究中，验证在化疗不敏感的癌症病人中所取得的肿瘤样本是否也出现同样的现象是具有重要意义的。

**2.2 miRNA间接调控ABCG2**

除了上述现象，一种更复杂的miR-519c调控ABCG2的情况被提出，ABCG2信使RNA 3’端非编码区的剪切或者聚腺苷酸化也可以促进细胞耐药[13]。ABCG2高表达的耐药株细胞与亲本细胞相比，ABCG2 mRNA更加稳定[12, 13]。假定miR-519c在耐药株和亲本细胞中的表达差异不大，那么，由于剪切和聚腺苷酸化使得miR-519c的结合位点丢失, miR-519c不能与ABCG2 mRNA完全互补配对结合。因此，ABCG2降解和蛋白质翻译的阻碍减少，从而导致ABCG2的高表达[13]。在真核细胞中，聚腺苷酸化是为翻译过程提供成熟的mRNA的重要环节。在转录的最后，poly（A）尾巴加到mRNA的3’末端以保护mRNA分子不被细胞质中的酶降解[29]。更重要的是，在编码蛋白的基因中，当几个poly（A）信号位于最后一个外显子上时，聚腺苷酸化机会发生。尽管剪切和聚腺苷酸化已经研究了数十年，但它们的价值知道最近才被重视[30]。大多数的人类基因都包含了至少两个以上poly（A）位点[31]，剪切和聚腺苷酸化在多种生物机体内已经非常普遍。一般而言，增生细胞，比如诱导的多功能干细胞和肿瘤细胞，与非增生细胞相比，通常都会出现3’端非编码区的缩短[32-35]。由于在3’端非编码区的大多数调节机制都会受到限制，那么我们可以设想缩短的3’端非编码区将会使mRNA和蛋白水平升高[30]。有报道指出，肿瘤细胞中致癌基因3’端非编码区的缩短也会导致蛋白的增加[34, 36]。有趣的是，ABCG2 3’端非编码区的缩短也发生在人未分化的胚胎干细胞中，这些细胞中的ABCG2表达增加也与ABCG2 3’端非编码区的缩短相关[37]。不同的是，已分化的胚胎干细胞ABCG2的表达是减少的，同时还伴随着3’端非编码区的扩增[37]。Sandberg等人也发现，迅速增生的细胞ABCG2 mRNA 3’端非编码区是缩短的，应该是为了逃避miRNA的调控[32]。

**2.3 ABCB1 (MDR-1/P-gp)**

ABCB1 (MDR-1/P-gp)是研究的最广泛的MDR转运蛋白，早在30多年前已被发现并开始研究[38]。由于MDR-1/P-gp的过表达导致肿瘤细胞对一系列结构和功能不同的抗肿瘤药物产生耐药性[39]。超过50%的耐药人肿瘤细胞中MDR-1/P-gp 的

表达是升高的。在有研究指出miRNA可以调控ABCG2后不久，一些miRNAs

（miR-27a, miR-451, miR-296, miR-298, miR-338, miR-1253）就被发现可以与ABCB1 3'端非编码区结合直接进行调控[1, 10, 40]。下调这些miRNAs的表达就会导致细胞的耐药。

**2.4 ABCC1 (MRP-1)**

多药耐药蛋白ABCC1/MRP-1可以转运大范围的不同种类的药物，也在肿瘤细胞MDR 的进程中发挥重要作用。在最重要的MDR 转运蛋白中，MRP-1 被

miRNAs调控的研究是比较少的。到面前为止，仅有miR-326[41]和miR-1291[42]可以直接作用其3’UTR来调控MRP-1的表达。在过表达MRP-1的MCF-7耐药细胞株中，miR-326是下调的从而导致MRP-1的上调。最近的报道证实MiR-1291通过调控ABCC1的表达导致胰腺癌细胞对阿霉素的耐药[42]。

**2.5 ABCC2 (MRP-2)**

MRP-2是ABC家族转运蛋白中非常特殊的一种蛋白，它可以调控铂类药物的耐药[43]。铂类抗肿瘤药，包括顺铂，奥沙利铂是治疗实体瘤类肿瘤的主要药物。

ABCC2可以识别铂类药物的GSH-共轭结构，从而有效地将药物泵出细胞产生耐药性。目前，只有miR-297被报道在耐奥沙利铂的结肠癌细胞中表达是下调的[44]。在ABCC2 3'UTR存在着与miR-297互补结合的靶点可以抑制这种基因的表达。

**2.6 miRNA的间接调控**

**2.6.1 MDR-1/P-gp**

除了上述提到的各种miRNAs可以直接作用于3’UTR来调控MDR-1/P-gp的表达外，间接调控MDR转运蛋白也有报道。Let-7 g可以调控卵巢癌细胞对紫杉烷类药物的获得性耐药，而这种调控是通过耐药基因IMP-1调节MDR-1的稳定性实现的[45]。IMP-1是一种RNA结合蛋白，可以维持多种靶基因mRNA的稳定，包括MDR-1. IMP-1已经证实是let-7 g的一个靶点[46]。接下来有发现在各种癌症中常常检测到let-7 g的丢失[45]，从而使IMP-1高表达以维持MDR-1/P-gp的稳定，最后导致肿瘤细胞的耐药。此外，一条比较新颖的miR-27a/HIPK2/MDR1

/P-gp通路被研究者提出，这可能是导致卵巢癌细胞耐紫杉醇的原因[47]。HIPK2有研究表明可以抑制HIF-1α，从而抑制MDR1基因的转录，使肿瘤细胞对阿霉素诱导的凋亡更加敏感[48]。因此，在耐药细胞中过表达miR-27a导致HIPK2 的

下调，HIPK2的下调可以使HIF-1α表达增加，最终MDR-1/P-gp高表达导致耐药产生[47]。另外一种值得注意的间接调控机制是表观遗传的改变（也就是低甲基化）。耐药细胞株MCF-7/DOX中MDR-1启动子低甲基化的发生，可以导致MDR-1/P-gp的上调[49]。MDR-1启动子的失甲基化，可以导致P-gp表达升高和耐药产生，miR-22, miR-29a, miR-132, and miR194表达的升高可以促发这一过程。这些miRNAs是作用于可以调控MDR-1启动子甲基化的DNA甲基化转移酶3A，3B和甲基CpG结合蛋白2[49-51]。尽管还缺乏确凿的证据，但是在MDR的病因学中这一机制已被深入研究。许多其他关于MDR的重要调控者（包括A BCG2, BCL-2, PTEN等）也被证实会被DNA甲基化所抑制，因此，前面提到的在肿瘤细胞中miRNAs 的异常增加也可以导致这些调控者的失抑制从而导致

MDR。

**2.6.2 ABCC3/ABCC6**

和在头颈部正常组织中是高表达的大多数ABC家族转运蛋白不一样，在正常脑部组织中，ABCC3和ABCC6是检测不到的[52]。出人意料的是，最近的报道中指出，这两种转运蛋白在胶质瘤干细胞的耐药中有着重要作用[53]。一个新的调节通路(ID4) -miR-9\*-SOX2-ABCC3/ABCC6被提出，这可以导致胶质瘤干细胞的多能性和耐药性。然而，ABCC3和ABCC6却不是miR-9\*的直接靶点。但是，这两种转运蛋白都被SOX2所调控，在胶质瘤干细胞中SOX2由于ID4抑制mi R-9的表达而升高[53]。

**3. miRNA非转运蛋白途径调控MDR**

致癌基因（如Bcl2, Ras, Src）和抑癌基因（p53, RB, p16）和耐药息息相关。然而，miRNA在其中的作用才刚开始被解开。我们下面将miRNA非转运蛋白途径调控MDR做一总结。

**3.1抗凋亡基因**

大多数抗肿瘤药物通过诱导凋亡发挥作用。对凋亡敏感性的改变常常导致常规化疗药物的耐药。BCL2是在肿瘤中高表达的一种最重要的抗凋亡因子，在各种肿瘤中都与化疗耐药息息相关。大量的miRNAs（包括miR-15b, miR-16, miR-34a, miR-296, miR-1915）已被证实通过作用于BCL2来调控MDR[15, 54-56]。其中，miR-34a较为特别，既可以直接调控也可以间接调控[56]。miR-34a可以直接抑制

CDK6的表达来抑制耐紫杉醇细胞PC3PR的增殖。另一方面，也可以间接作用B CL-2促使凋亡。

**3.2药物代谢**

二氢叶酸还原酶（DHFR）是在细胞叶酸代谢中一种重要的酶，也是多数抗肿瘤药物的作用靶点。DHFR发生的单核苷酸变异是在其3’UTR与miR-24结合位点的附近[57]。这会干扰miR-24与其结合，而使得DHFR的表达增加和甲氨喋林耐药。

**3.3肿瘤抑制**

越来越多的miRNA被发现可以调控一个重要的肿瘤抑制因子PTEN。例如，mi R-214可以与PTEN 3'UTR完全互补配对以抑制PTEN的翻译过程，从而激活 A

kt通路和顺铂耐药[58]。这个研究成果的重要意义在于，一旦miRNA调控通路被研究透彻，不仅可以人为地改变miRNA的表达，还可以调控上下游的蛋白来改变细胞的耐药[58]。

**3.4 Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)**

EMT是一个上皮细胞向间质细胞转化的过程。一旦发生EMT，上皮细胞将获得更强的侵袭和迁移的能力，最终导致癌细胞的转移。耐多西紫杉醇的肿瘤细胞存在EMT并且E-cadherin蛋白表达减少，由化疗药物诱导的凋亡也降低[59]。深入的研究表明，这些耐药细胞中抑制ZEB1/ZEB2表达的miR-200c和miR-205, miR-200c 和miR-205 的表达降低，因此，E-cadherin下调，EMT发生[59]。最近，

Liu等人的研究表明，在转移的黑色素瘤细胞中，miR-200c表达降低，其作用靶点Bim-1的表达因而升高[60]。进一步上调Bmi-1发现，MDR转运基因（ABCG2,

MDR1和ABCG5）增加，从而使E-cadherin下调，EMT发生。**展望**

miRNAs可以作为基因的调控因子，它们的异常调节为临床上肿瘤的预防，诊断，治疗和预后提供更多的治疗靶点和更多的可能性。有选择地调节一些mi

RNAs可能增强化疗药物敏感性，在未来临床肿瘤的治疗中也会有针对特定类型肿瘤耐药的更多应用。然而，到目前为止，对miRNA与肿瘤耐药之间的联系的研究还不够深入和透彻。我们在今后的科研中，应该继续探究这其中复杂的关系，为克服临床化疗药物耐药提供更多的理论基础。

参考文献

[1] Goldman B. Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer[J]. JNatlCancerInst, 2003, 95(4): 255-257.

[2] Xiao F, Chen Z, Zeng X, et al. Role of homeobox gene A5 in multidrug resistance of human small cell lung cancer cells[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013, 33(11): 1665-1668.

[3] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.

[4] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.

[5] Voorhoeve PM. MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity[J]. BiochimBiophysActa, 2010, 1805(1): 72-86.

[6] Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4553-4555.

[7] Fojo T. Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or promoter regions, epigenetic changes and microRNAs[J]. Drug Resist Updat, 2007, 10(1-2): 59-67.

[8] Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16 Spec No 1: R106-113.

[9] Blower PE, Chung JH, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(1): 1-9.

[10] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2152-2159.

[11] Kobayashi E, Satow R, Ono M, et al. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma[J]. Oncology, 2014, 86(2): 94-103.

[12] To KK, Zhan Z, Litman T, et al. Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(17): 5147-5161.

[13] To KK, Robey RW, Knutsen T, et al. Escape from hsa-miR-519c enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(10): 2959-2968.

[14] Pan YZ, Morris ME, Yu AM. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(6): 1374-1379.

[15] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 372-379.

[16] Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, et al. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(33): 13513-13518.

[17] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425-433.

[18] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. Blood, 2006, 108(9): 3068-3071.

[19] Robey RW, Polgar O, Deeken J, et al. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(1): 39-57.

[20] Knutsen T, Rao VK, Ried T, et al. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2000, 27(1): 110-116.

[21] Liu H, Chen GX, Liang MY, et al. Atrial fibrillation alters the microRNA expression profiles of the left atria of patients with mitral stenosis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2014, 14: 10.

[22] Liao R, Sun J, Zhang L, et al. MicroRNAs play a role in the development of

Human hematopoietic stem cells[J]. J Cell Biochem, 2008,104(3):805-817.

[23] Wang F, Xue X, Wei J, et al. hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations[J]. Br J Cancer, 2010, 103(4): 567-574.

[24] To KK, Zhan Z, Litman T, et al. Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(17): 5147-5161.

[25] Li H, Hui L, Xu W. miR-181a sensitizes a multidrug-resistant leukemia cell line K562/A02 to daunorubicin by targeting BCL-2[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(3): 269-277.

[26] Ma MT, He M, Wang Y, et al. MiR-487a resensitizes mitoxantrone (MX) -resistant breast cancer cells (MCF-7/MX) to MX by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)[J]. Cancer Lett, 2013, 339(1): 107-115.

[27] Li X, Pan YZ, Seigel GM, et al. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(6): 783-792.

[28] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme[J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24218-24225.

[29] Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells[J]. Gene, 2001, 265(1-2): 11-23.

[30] Di GDC, Nishida K, Manley JL. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation[J]. Mol Cell, 2011, 43(6): 853-866.

[31] Tian B, Hu J, Zhang H, et al. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(1): 201-212.

[32] Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, et al. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites[J].

Science, 2008,320(5883):1643-1647.

[33] Ji Z, Tian B. Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8419.

[34] Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells[J]. Cell, 2009, 138(4): 673-684.

[35] Shepard PJ, Choi EA, Lu J, et al. Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq[J]. RNA, 2011, 17(4): 761-772.

[36] Legendre M, Ritchie W, Lopez F, et al. Differential repression of alternative transcripts: a screen for miRNA targets[J]. PLoS Comput Biol, 2006, 2(5): e43.

[37] Apati A, Orban TI, Varga N, et al. High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(12): 2700-2709.

[38] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants[J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 455(1): 152-162.

[39] Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7468-7485.

[40] Bao L, Hazari S, Mehra S, et al. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298[J]. Am J Pathol, 2012, 180(6): 2490-2503.

[41] Liang Z, Wu H, Xia J, et al. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6): 817-824.

[42] Pan YZ, Zhou A, Hu Z, et al. Small nucleolar RNA-derived microRNA hsa-miR-1291 modulates cellular drug disposition through direct targeting of ABC transporter ABCC1[J]. Drug Metab Dispos, 2013, 41(10): 1744-1751.

[43] Zhou SF, Wang LL, Di YM, et al. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug

Development[J]. Curr Med Chem, 2008,15(20):1981-2039.

[44] Xu K, Liang X, Shen K, et al. miR-297 modulates multidrug resistance in human colorectal carcinoma by down-regulating MRP-2[J]. Biochem J, 2012, 446(2): 291-300.

[45] Sauna ZE, Kim IW, Ambudkar SV. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1)[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(5-6): 481-487.

[46] Boyerinas B, Park SM, Shomron N, et al. Identification of let-7-regulated oncofetal genes[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2587-2591.

[47] Li Z, Hu S, Wang J, et al. MiR-27a modulates MDR1/P-glycoprotein expression by targeting HIPK2 in human ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(1): 125-130.

[48] Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, et al. Inhibition of HIF-1alpha activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis[J]. Mol Cancer, 2009, 8: 1.

[49] Chekhun VF, Lukyanova NY, Kovalchuk O, et al. Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(3): 1089-1098.

[50] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(40): 15805-15810.

[51] Klein ME, Lioy DT, Ma L, et al. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(12): 1513-1514.

[52] Nies AT, Jedlitschky G, Konig J, et al. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain[J]. Neuroscience, 2004, 129(2): 349-360.

[53] Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, et al. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9\*-mediated suppression of SOX2[J]. Cancer Res, 2011, 71(9): 3410-3421.

[54] Hong L, Han Y, Zhang H, et al. The prognostic and chemotherapeutic value of miR-296 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg,

2010,251(6):1056-1063.

[55] Xu K, Liang X, Cui D, et al. miR-1915 inhibits Bcl-2 to modulate multidrug resistance by increasing drug-sensitivity in human colorectal carcinoma cells[J]. Mol Carcinog, 2013, 52(1): 70-78.

[56] Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, et al. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms[J]. Prostate, 2010, 70(14): 1501-1512.

[57] Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, et al. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(33): 13513-13518.

[58] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425-433.

[59] Puhr M, Hoefer J, Schafer G, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205[J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 2188-2201.

[60] Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, et al. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1[J]. Am J Pathol, 2012, 181(5): 1823-1835.