

下调 Hsa-circ-0101216 表达对胰腺癌吉西他滨化疗耐药的影响及其机制

刘海潮, 刘少朋, 闫宏宪^{*}, 白明辉, 张继翔, 李迎博, 王闯, 邹凯

洛阳市中心医院肝胆胰外科, 河南洛阳 471000

[中图分类号] R735.9 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1634.2025.0519

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘海潮, 刘少朋, 闫宏宪, 等. 下调 Hsa-circ-0101216 表达对胰腺癌吉西他滨化疗耐药的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(6): 656-664.

[收稿日期] 2024-10-20 [录用日期] 2024-12-16 [上线日期] 2025-05-19

[摘要] **目的** 分析 Hsa-circ-0101216 对胰腺癌吉西他滨(GEM)化疗耐药的影响及其机制。**方法** 采用 GEO 数据库分析筛选胰腺癌 GEM 耐药细胞与亲本细胞间差异表达的 circRNAs。采用间歇浓度梯度递增法构建胰腺癌 GEM 耐药细胞株(BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM)。采用 qRT-PCR 检测细胞中 Hsa-circ-0101216 的表达情况。取胰腺癌 GEM 耐药细胞, 设置 sh-circ-0101216 组(敲低 circ-0101216)、sh-NC 组(转染 sh-NC)、空白对照组(不做任何处理), 采用 CCK-8 法、EdU 增殖实验检测各组细胞的 GEM 半数抑制浓度(IC₅₀)及增殖能力, Western blotting 检测多药耐药相关蛋白 1(MRP1)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)、人类平衡型核苷转运体-1(hENT-1)的表达情况。构建人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型, 并设置 sh-NC+GEM 组与 sh-circ-0101216+GEM 组(n=6), 比较两组裸鼠移植瘤体积及重量变化, 采用 Western blotting 及免疫组化法检测移植瘤组织中 MRP1、BCRP、hENT-1 蛋白的表达, EdU 增殖实验检测肿瘤细胞增殖能力。**结果** GEO 数据库筛选出的胰腺癌 GEM 耐药细胞株中存在 Hsa-circ-0101216 表达上调。成功构建胰腺癌 GEM 耐药细胞株, 且胰腺癌 GEM 耐药细胞 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 中 Hsa-circ-0101216 表达水平及 IC₅₀ 值明显高于亲本细胞(P<0.05)。sh-circ-0101216 组胰腺癌 GEM 耐药细胞 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 中 GEM IC₅₀ 值、细胞活力、EdU 阳性率及 MRP1、BCRP 蛋白表达水平均明显低于空白对照组及 sh-NC 组, hENT-1 蛋白表达水平明显高于空白对照组及 sh-NC 组(P<0.05 或 P<0.001)。sh-circ-0101216+GEM 组裸鼠皮下移植瘤重量、体积, 瘤体内 MRP1、BCRP 蛋白表达水平和阳性表达率, 以及 EdU 阳性率均明显低于 sh-NC+GEM 组, hENT-1 蛋白表达水平及阳性表达率明显高于 sh-NC+GEM 组(P<0.05)。**结论** Hsa-circ-0101216 在 GEM 耐药的胰腺癌细胞中高表达, 敲低后可抑制胰腺癌细胞增殖, 并增强胰腺癌细胞对 GEM 的化疗敏感性, 其机制可能与调节跨膜转运蛋白的表达有关。

[关键词] Hsa-circ-0101216; 胰腺癌; 吉西他滨; 增殖

Effect of downregulating Hsa-circ-0101216 expression on gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer and its mechanism

Liu Hai-Chao, Liu Shao-Peng, Yan Hong-Xian^{*}, Bai Ming-Hui, Zhang Ji-Xiang, Li Ying-Bo, Wang Chuang, Zou Kai

Hepatobiliary Pancreatic Surgery Department of Luoyang Central Hospital, Luoyang, Henan 471000, China

^{*}Corresponding author, E-mail: yanhongxian@126.com

This work was supported by the Henan Province Medical Science and Technology Joint Construction Project (LHGJ20240736), the Guiding Science and Technology Plan Project of Luoyang Science and Technology Bureau (2302039Y), and the Henan Province Medical Science and Technology Key Project (SBGJ202102216)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of Hsa-circ-0101216 on gemcitabine (GEM) chemotherapy resistance in pancreatic cancer and its mechanism. **Methods** Differentially expressed circRNAs between GEM-resistant pancreatic cancer cells

[基金项目] 河南省医学科技攻关联合共建项目(LHGJ20240736); 洛阳市科技局指导性科技计划项目(2302039Y); 河南省医学科技攻关省部共建重点项目(SBGJ202102216)

[作者简介] 刘海潮, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事肝胆胰腺疾病的基础与临床研究

[通信作者] 闫宏宪, E-mail: yanhongxian@126.com

and parent cells were screened using the GEO database. Pancreatic cancer GEM resistant cell lines (BxPC-3-GEM and Capan-1-GEM) were constructed by intermittent concentration gradient method. qRT-PCR was used to detect the expression of Hsa-circ-0101216 in cells. GEM resistant pancreatic cancer cell lines were taken and divided into sh-circ-0101216 group (knockdown of circ-0101216), sh-NC group (transfected with sh-NC), and blank control group (untreated). CCK-8 assay and EdU proliferation assay were used to detect the half inhibitory concentration (IC_{50}) of GEM and proliferation ability of cells in each group. Western blotting was performed to detect the expression of multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), breast cancer resistance protein (BCRP), and human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT-1). A subcutaneous xenograft tumor model of human pancreatic cancer in nude mice was constructed, and sh-NC+GEM group and sh-circ-0101216+GEM group ($n=6$) were set up. The volume and weight of xenograft tumor in nude mice were compared between the two groups. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression of MRP1, BCRP, and hENT-1 proteins in xenograft tumor tissues, and EDU proliferation assay was used to detect the proliferation ability of tumor cells. **Results** The GEO database screening showed that Hsa-circ-0101216 was up-regulated in GEM-resistant pancreatic cancer cell lines. Pancreatic cancer GEM-resistant cell lines were successfully constructed, and the expression levels of Hsa-circ-0101216 and the IC_{50} value in GEM-resistant pancreatic cancer cells BxPC-3-GEM and Capan-1-GEM were significantly higher than those in parental cells ($P<0.05$). In sh-circ-0101216 group, the IC_{50} values of GEM, cell viability, EdU positivity rate, and the expression levels of MRP1 and BCRP proteins in GEM-resistant pancreatic cancer cells BxPC-3-GEM and Capan-1-GEM were significantly lower than those in blank control group and sh-NC group, while the expression level of hENT-1 protein was significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.001$). In sh-circ-0101216+GEM group, the weight and volume of subcutaneous xenograft tumors in nude mice, the expression levels and positive expression rates of MRP1 and BCRP proteins in tumor tissues, and the EdU positive rate were significantly lower than those in sh-NC+GEM group, while the expression level and positive expression rate of hENT-1 protein were significantly higher ($P<0.05$). **Conclusions** Hsa-circ-0101216 is highly expressed in GEM-resistant pancreatic cancer cell lines. Its knockdown can inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells and enhance the chemosensitivity of pancreatic cancer cells to GEM. The mechanism may be related to the regulation of transmembrane transporter protein expression.

[Key words] Hsa-circ-0101216; pancreatic cancer; gemcitabine; proliferation

胰腺癌多数起病隐匿,且病程进展快、预后差,5年生存率目前仍不足10%^[1]。化疗是晚期不可手术切除胰腺癌患者的主要治疗手段,对于交界性可切除胰腺癌^[2]及早期胰腺癌术后患者,指南推荐将(新辅助)化疗作为提高R0切除率或预防术后复发的重要方法^[3-4]。FOLFIRINOX方案(5-氟尿嘧啶+亚叶酸钙+伊立替康+奥沙利铂)、AG方案[白蛋白结合型紫杉醇联合吉西他滨(gemcitabine, GEM)]等是常见的化疗方案,多数研究已证实这些方案有助于改善胰腺癌患者的无瘤生存率及总生存率,进而提高治疗效果^[5-7]。但FOLFIRINOX方案的药物不良反应大^[8],因此,目前临床上以AG方案或GEM单药应用较为广泛。然而相关研究显示,GEM治疗胰腺癌的总反应率却不足20%^[9],化疗耐药是导致其反应率低下的主要因素^[10],而这也是临床治疗中亟待解决的关键问题。因此,进一步探索胰腺癌对GEM化疗耐药的作用机制,将有助于提高化疗反应率,改善患者预后。环状RNA(circular RNA, circRNA)首次由Sanger等发现,呈环状封闭结构,属内源性非编码RNA^[11-12]。circRNA结构特殊,具有高度保守性、稳定性、疾病特异性和组织特异性的特点,在人类常见肿瘤中均存在差异表达^[13],且部分与肿瘤化疗耐药有关^[14-15]。笔者前期研究发现,Hsa-circ-0101216在胰腺癌中高表达,且与患者预后相关^[16],但其与GEM化疗耐药

是否存在相关性目前仍不明确。为此,本研究探讨Hsa-circ-0101216表达胰腺癌GEM化疗耐药的影响及其机制,以期改善药物化疗效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物及主要试剂 胰腺癌细胞株BxPC-3、Capan-1以及Iscove改良(Iscove's modified Dulbecco's medium, IMDM)培养基[®]、RPMI-1640培养基、胰酶、胎牛血清、CCK-8试剂盒、Trizol裂解液、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测试剂盒、肿瘤解离试剂盒、肿瘤细胞分离试剂盒购自洛阳拉斯克生物科技有限公司;兔抗人多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)抗体、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)抗体、人类平衡型核苷转运体-1(human equilibrative nucleoside transporter 1, hENT-1)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗购自上海酶联生物科技有限公司;盐酸GEM购自上海科拉曼试剂有限公司。circ-0101216引物、sh-circ-0101216-1、sh-circ-0101216-2、sh-NC由广州吉赛生物科技股份有限公司构建合成。人胰腺癌免疫缺陷裸鼠BALB/c nude购自赛业(广州)生物科技有限公司[实验动物生产许可

证号: SCXK(粤)2020-0056]。

1.2 生物信息学分析 以“Gemcitabine resistant cells”“circRNA”“Pancreatic cancer”为检索词,检索美国国立生物中心(NCBI)的GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),选取GSE232549(ID: 200232549)、GSE186960(ID: 200186960)、GSE110580(ID: 200110580)、GSE172303(ID: 200172303)4个数据集,使用R 3.3.3软件中的limma包筛选胰腺癌GEM化疗耐药细胞中差异表达的circRNAs。筛选标准: $|\log_2$ 差异倍数(fold change, FC)| > 1且 $P < 0.05$ 。使用R软件中的VennDiagram包绘制韦恩图,筛选出感兴趣的差异表达circRNAs用于后续研究。

1.3 细胞培养、传代 将亲本胰腺癌细胞株BxPC-3、Capan-1用含20%胎牛血清的IMDM培养基于相对湿度95%、5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养,每3d更换一次培养液,待细胞融合度达80%时进行传代。

1.4 胰腺癌GEM耐药细胞株的构建 采用间歇浓度梯度递增法构建胰腺癌GEM耐药细胞株。(1)将传代后的胰腺癌细胞用PBS洗涤2次,于含GEM浓度为0.5 μmol/L的培养基中,并置于含5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养48h。(2)更换为普通培养基,待存活细胞融合度为80%时,传代2次,再使用上述含相同浓度的GEM培养基继续培养48h。(3)待存活细胞稳定生长后更换为GEM浓度为1.0 μmol/L的培养基继续培养。(4)重复上述步骤,并每次将GEM浓度提高2 μmol/L,直至当GEM浓度达10.0 μmol/L时仍有稳定生长的细胞,且在普通培养基中仍具有稳定的耐药性,至此获得胰腺癌GEM耐药细胞株(BxPC-3-GEM及Capan-1-GEM)。

1.4.1 CCK-8法检测不同浓度梯度GEM干预后胰腺癌GEM耐药细胞活力变化 将经不同浓度(0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0和10.0 μmol/L)GEM处理的两种胰腺癌耐药细胞和亲本细胞分别进行细胞重悬,并接种至96孔板(1×10⁴个/孔),37℃条件下培养至细胞贴壁后去除上清液,添加CCK-8液(10 μl/孔),继续培养48h,采用自动酶标仪检测450 nm处的吸光度值(A₄₅₀),设5个复孔。

1.4.2 qRT-PCR检测胰腺癌GEM耐药细胞中Hsa-circ-0101216的表达情况 采用Trizol裂解液裂解GEM耐药细胞和亲本细胞后提取总RNA,使用反转录试剂盒将miRNA反转录为cDNA,以cDNA为模板,采用PCR检测试剂盒测定Hsa-circ-0101216的表达情况。Hsa-circ-0101216引物:上游5'-CAGGATGGTAGACCAGAGC-3',下游5'-TACCCACGGATCTACTGC-3'; U6引物:上游5'-CTCGCTTCCGGGTGCTACA-3',下游5'-AACGAGGGTTCGAATTTGCGT-3'。反应条件:95℃预变性30s;95℃变性5s,60℃延

火30s,72℃延伸30s,共45个循环。设5个复孔,以U6为内参照,采用2^{-ΔΔCT}法计算目的基因相对表达量。

1.5 胰腺癌GEM耐药细胞株转染与分组 细胞转染由广州吉赛生物科技股份有限公司按照短干扰RNA(short interfering RNA, shRNA)技术构建,分别构建circ-0101216的3种shRNA序列(sh1、sh2、sh3)。采用qRT-PCR法检测敲低效率,并选取敲低效率最高的片段用于后续研究。

取胰腺癌GEM耐药细胞,设置sh-circ-0101216组(敲低circ-0101216,转染circ-0101216短干扰RNA)、sh-NC组(转染sh-NC)、空白对照组(不做任何处理)。

1.5.1 CCK-8法检测细胞的半数抑制浓度(IC₅₀) 取各组对数生长期细胞,用胰酶消化制作单细胞悬液,并接种至96孔板上(1×10⁵个/孔)。恒温培养箱培养24h,弃去原培养基,更换为含不同浓度GEM的培养基,并于每孔分别加入100 μl,每组设5个复孔。培养48h后加入CCK-8溶液(10 μl/孔),继续培养1.5h,使用自动酶标仪检测450 nm处的A₄₅₀值,计算细胞存活率及IC₅₀值,并绘制药物剂量-存活率曲线。

1.5.2 CCK-8法检测细胞活力 将各组细胞接种至96孔板(1×10⁴个/孔),37℃下培养24h,去除培养基;PBS洗涤,每孔加入10 μl CCK-8液,继续培养至72h。采用自动酶标仪于24、48、72h分别检测各组细胞的A₄₅₀值。每组设5个复孔。

1.5.3 5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)实验检测细胞增殖能力 将各组细胞接种至24孔板(1×10⁴个/孔),添加EdU工作液,培养2h;PBS洗涤3次,使用4%多聚甲醛溶液固定20min;PBS再次洗涤,每孔加入250 μl Triton X-100通透液,室温孵育20min;每孔加入200 μl 1×Apollo染色反应液,同等条件再次孵育20min;PBS洗涤去除残留液体,使用4',6-二甲基-2-苯基吡啶(DAPI)染色25min,封片,于荧光显微镜下随机选取6个视野,观察、计数阳性染色细胞。

1.5.4 Western blotting检测相关蛋白的表达 提取各组细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。添加上样缓冲液,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,并电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭1.5h;PBS洗涤,加入一抗MRP1(1:500)、hENT-1(1:1000)、BCRP(1:500)及GAPDH(1:500),于4℃下孵育过夜;TBST缓冲液洗膜3次,加入IgG二抗(1:5000),室温下孵育2h;使用电化学发光液(ECL)显影、荧光显微镜拍照,采用GraphPad Prism 9.0软件对凝胶图像灰度进行半定量分析。

1.6 人胰腺癌免疫缺陷裸鼠皮下移植瘤模型的构

建 12 只 6~8 周龄免疫缺陷裸鼠饲养于本院 SPF 级动物房中, 温度(21±2) °C, 相对湿度 5%±10%。(1)将构建好的 circ-0101216 敲低及 sh-NC 组稳转胰腺癌 BxPC-3 细胞进行扩大培养, 调整生长状态, 培养至细胞密度达 90%, 选取对数生长期细胞进行接种。(2)于每只裸鼠左侧腋窝皮下注射 200 μl 相应的细胞悬液, 接种密度 5×10⁶ 个细胞/200 μl。设置 sh-NC+GEM 组(接种 BxPC-3-GEM 空载体转染细胞)与 sh-circ-0101216+GEM 组(接种 BxPC-3-GEM sh-circ-0101216 稳转细胞), 每组 6 只。(3)接种后在同等条件下饲养 1 周, 观察接种部位皮下成瘤情况。(4)当可触及皮下约 3 mm 大小肿瘤时, 按 GEM 既定剂量(5 mg/kg, 3 d/次, 共 8 次)分别向腹腔内注射。(5)定期测量并记录各组裸鼠肿瘤宽度(W)和长度(L), 计算肿瘤体积($V=L \times W^2/2$)。(6)接种 28 d 后使用颈椎脱臼法处死各组裸鼠, 手术切除皮下瘤体, 称重并拍照记录。本研究获洛阳市中心医院医学伦理委员会批准(YXLLSC-LY20240507), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.6.1 Western blotting 检测相关蛋白的表达 提取各组瘤组织总蛋白, 采用 Western blotting 检测 MRP1、hENT-1、BCRP 蛋白的表达, 具体检测过程详见 1.5.4。

1.6.2 免疫组化法检测裸鼠皮下移植瘤中相关蛋白的表达 将各组裸鼠皮下移植瘤标本处理后, 10% 甲醛溶液固定并石蜡包埋、切片(4 μm 厚), 二甲苯脱蜡水化后, 乙二胺四乙酸(EDTA)修复液修复 2 min; PBS 洗 5 次, 加入 H₂O₂ 室温下作用 10 min; 加入 30 ml/L 阻断内源性过氧化物酶室温下孵育 20 min; PBS 洗涤后用羊血清封闭抗原 30 min, 去除周围渗液后, 加入兔抗人多克隆一抗 MRP1、BCRP 及 hENT-1, PBS 代替一抗作为对照组, 4 °C 孵育过夜, 室温下复温 20 min; PBS 洗涤, 加入辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 二抗, 37 °C 下作用 30 min; PBS 洗 3 次, 室温下二氨基联苯胺(DAB)显色 8 min, 清水冲洗后使用苏木精复染 3 min, 乙醇脱水后封片处理。

结果判定: 每张切片均由洛阳市中心医院病理科两位经验丰富且具有高级职称的医师采用双盲法进行镜下观察阅片。在光镜下(×200)每张切片随机选取 5 个视野, 每个视野计数约 200 个细胞, 观察染色强度及阳性细胞所占百分比。按照参考文献[17]的方法对染色结果进行评分, 染色强度评分: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 黄褐色为 3 分。阳性细胞所占百分比评分: 0~10% 为 0 分, 11%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 76%~100% 为 4 分。将两项相加作为最后评分, 0~3 分

为阴性表达(-), ≥4 分为阳性表达(+)

1.6.3 裸鼠皮下移植瘤组织中肿瘤细胞提取、制备及增殖能力检测 取各组裸鼠皮下移植瘤组织, 剪成 1 mm³ 左右的小块, 用 1% 胰酶及透明质酸酶在 37 °C 下消化 1 h。加入含 10% 胎牛血清的培养基终止消化, 用移液管反复吹打, 1000 r/min 离心 5 min, 待沉淀重悬后使用 70 μm 滤筛过滤, 去除红细胞。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用无血清培养基进行细胞重悬。使用磁珠分选法筛选肿瘤细胞, 流式细胞仪检测细胞纯度。参照 1.5.3 检测细胞增殖能力。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 9.0 软件制图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料以例(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GEO 分析筛选胰腺癌 GEM 耐药细胞株中差异表达的 circRNAs GEO 数据库分析显示, 与胰腺癌亲本细胞株相比, 在 4 个数据集(GSE232549、GSE186960、GSE110580、GSE172303)的 GEM 耐药细胞株中分别筛选出 86 个(47 个上调、39 个下调), 133 个(72 个上调、61 个下调), 139 个(87 个上调、52 个下调)及 161 个(91 个上调、70 个下调)差异表达的 circRNAs。进一步交叉分析显示, 4 个数据集中共有 9 个差异表达的 circRNAs 重叠, 排除表达不一致的 circRNAs 后, 得到 3 个差异显著的 circRNAs: Hsa-circ-0007919、Hsa-circ-0074398、Hsa-circ-0101216(附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1634.2025.0519EJ>)。结合笔者团队前期研究, 选取 Hsa-circ-0101216 作为后续研究对象。

2.2 胰腺癌 GEM 耐药细胞株的建立 CCK-8 法检测结果显示, 随着 GEM 浓度的增加, 耐药细胞活力无明显变化, 但亲本细胞活力逐渐降低, 组间差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.001, 图 1), 表明 GEM 耐药细胞对 GEM 具有明显的抵抗力, 提示耐药细胞株构建成功。

2.3 胰腺癌 GEM 耐药细胞株中 Hsa-circ-0101216 的表达及 GEM 的半数抑制浓度(IC₅₀) qRT-PCR 检测结果显示, 胰腺癌 GEM 耐药细胞株 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 中 Hsa-circ-0101216 表达量分别为(10.22±0.44)、(9.16±0.23), 均明显高于亲本 BxPC-3 细胞(3.70±0.15)、Capan-1 细胞(4.01±0.38), 差异有统计学意义(P<0.05); 此外, CCK-8 法检测结果显示, 胰腺癌 GEM 耐药细胞株 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 的 IC₅₀ 分别为(9.35±3.21) μmol/L 及(8.12±2.09) μmol/L,

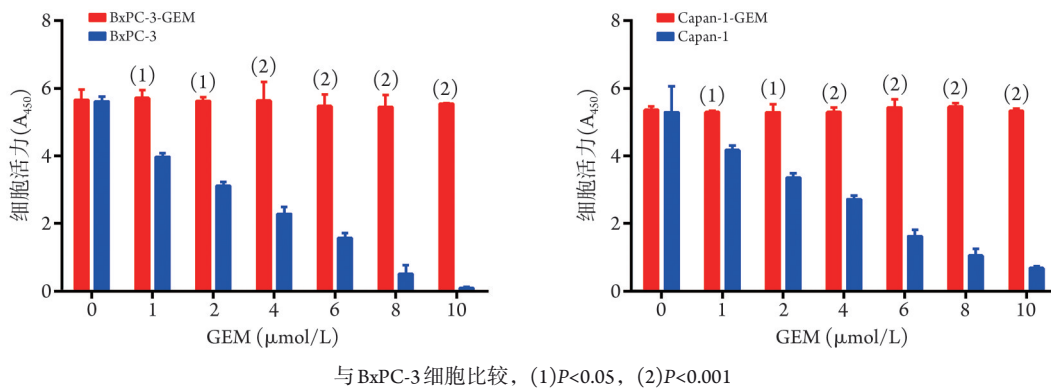


图1 CCK-8法检测不同浓度梯度吉西他滨(GEM)干预后胰腺癌GEM耐药细胞和亲本细胞活力变化

Fig. 1 Activity of gemcitabine (GEM) resistant cells and parent cells in pancreatic cancer after GEM intervention at different concentration gradients detected by CCK-8 method

均明显高于亲本细胞的 $(2.01 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$ 、 $(1.78 \pm 0.22) \mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 敲低 Hsa-circ-0101216 对胰腺癌 GEM 耐药细胞株 GEM IC_{50} 及细胞增殖的影响 通过 3 种 shRNA 片段敲低 Hsa-circ-0101216, qRT-PCR 检测结果显示, sh2 敲低效率相对更高(图 2A), 据此选择 sh2 进行后续敲低实验。进一步检测发现, sh-circ-0101216 组 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 细胞的 GEM IC_{50} 值、不同时间点(24、48、72 h)的细胞活力、EdU 阳性率均明显低于空白对照组及 sh-NC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$, 图 2B—D)。

2.5 敲低 Hsa-circ-0101216 对胰腺癌 GEM 耐药细胞中相关蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, sh-circ-0101216 组 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 细胞中 MRP1、BCRP 蛋白表达水平均明显低于空白对照组及 sh-NC 组($P < 0.001$), hENT-1 蛋白表达水平均明显高于空白对照组及 sh-NC 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$, 图 3)。

2.6 敲低 Hsa-circ-0101216 对裸鼠皮下移植瘤 GEM 敏感性的影响 为了验证上述结果, 通过向裸鼠腋下注射 BxPC-3-GEM 空载体转染细胞和 BxPC-3-GEM sh-circ-0101216 稳转细胞分别构建异种移植瘤模型, 结果显示, 向腹腔内注射 GEM 后, 不同时间点(12、16、20、24、28 d) sh-circ-0101216+GEM 组裸鼠皮下移植瘤体积及移植后 28 d 的移植瘤重量均明显低于 sh-NC+GEM 组($P < 0.05$, 图 4A、B)。Western blotting 检测结果显示, 与 sh-NC+GEM 组比较, sh-circ-0101216+GEM 组裸鼠瘤体内 MRP1、BCRP 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$), hENT-1 蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$, 图 4C)。免疫组化检测结果显示, MRP1、BCRP 及 hENT-1 蛋白主要表达于细胞膜, 呈棕黄色或棕褐色, 且 sh-circ-0101216+GEM 组裸鼠瘤体内 MRP1、BCRP 阳性表达率明显低于 sh-NC+GEM

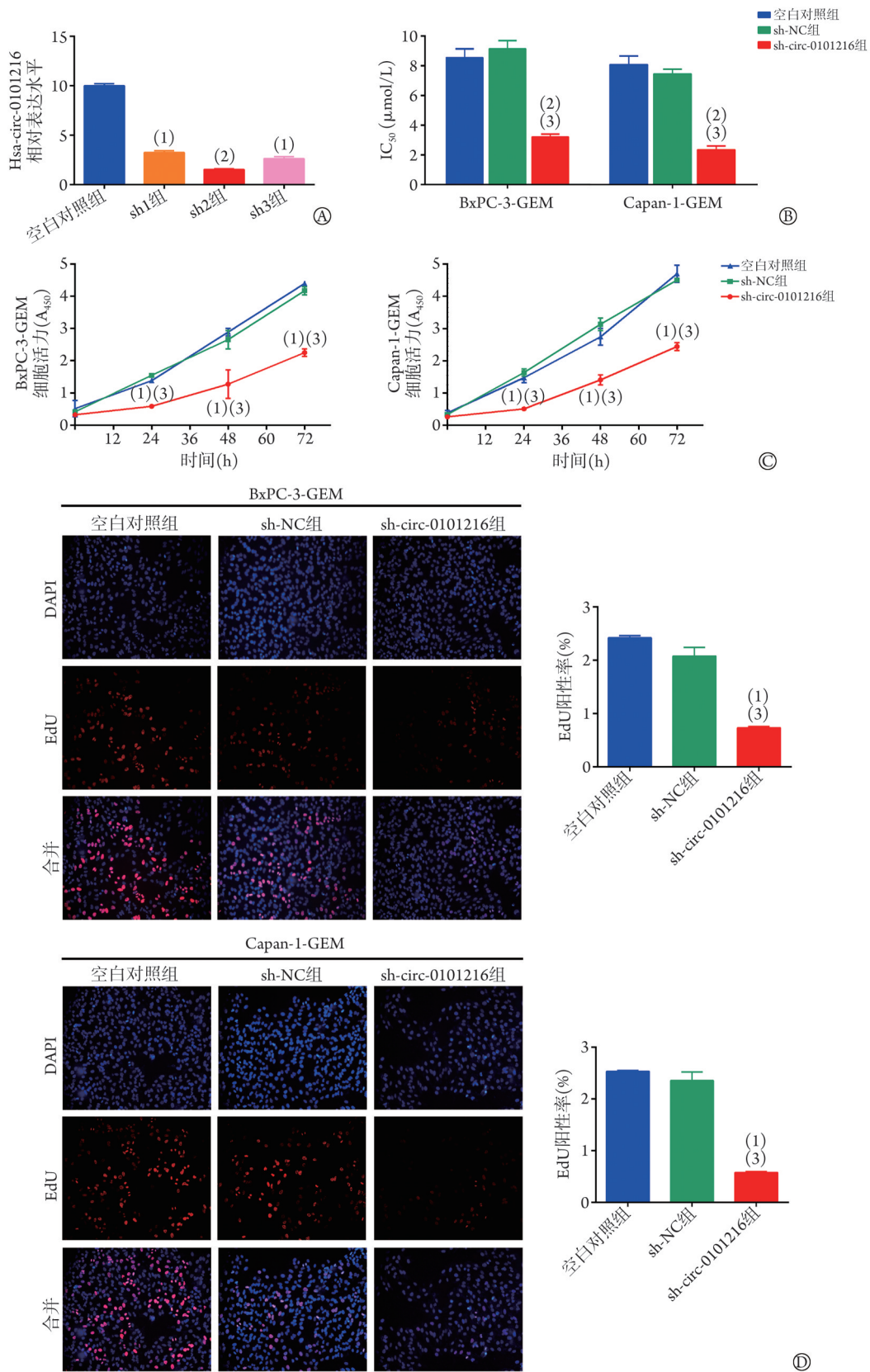
组($\chi^2 = 9.643$ 、 10.481 , $P < 0.05$), 而 hENT-1 阳性表达率明显高于 sh-NC+GEM 组($\chi^2 = 5.455$, $P < 0.001$, 图 4D)。

2.7 敲低 Hsa-circ-0101216 对裸鼠皮下移植瘤细胞增殖的影响 EdU 增殖实验检测结果显示, sh-circ-0101216+GEM 组裸鼠皮下移植瘤细胞 EdU 阳性率明显低于 sh-NC+GEM 组($0.88\% \pm 0.10\%$ vs. $2.15\% \pm 0.40\%$, $P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

化疗耐药是影响胰腺癌患者预后的关键因素^[18]。研究发现, circRNA 可通过参与自噬、肿瘤干细胞分化等多种途径调控胰腺癌化疗耐药^[19]。陈弘^[20]发现, Hsa-circ-0074298 可通过 miR-519d/SPARC 相关模块化钙结合蛋白 2(SPARC-related modular calcium-binding protein 2, SMOC2)轴影响胰腺癌细胞对 GEM 的化疗抵抗力。孙根^[21]发现, Hsa-circ-0046523 不仅可促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭, 还可降低胰腺癌对 GEM 的化疗敏感性。但目前多数 circRNAs 在胰腺癌 GEM 化疗耐药中的具体作用尚不清楚。本研究在既往研究基础上, 进一步探索 Hsa-circ-0101216 对胰腺癌 GEM 化疗耐药的影响, 以期为临床治疗提供参考。

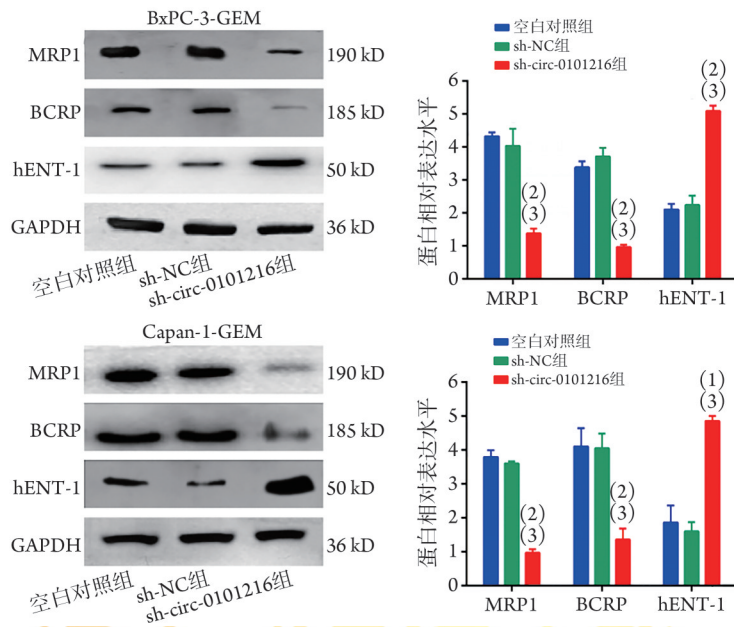
本研究通过挖掘 GEO 数据库并进行生物信息学分析, 筛选出胰腺癌 GEM 耐药细胞中高表达的 Hsa-circ-0101216, 进一步成功构建 GEM 耐药的胰腺癌细胞, 通过 qRT-PCR 检测发现, 胰腺癌耐药细胞株 BxPC-3-GEM、Capan-1-GEM 中 Hsa-circ-0101216 的表达均明显高于亲本胰腺癌细胞, 与 GEO 分析结果一致, 初步证实 Hsa-circ-0101216 在胰腺癌 GEM 耐药细胞中表达上调。在进一步的实验中, 本研究敲低耐药细胞中 Hsa-circ-0101216 的表达后发现 sh-circ-0101216 组细胞的 GEM IC_{50} 值、细胞活力及增殖能力均明显低于空白对照组及 sh-NC 组, 提示敲低 Hsa-circ-0101216 可抑制胰腺癌 GEM 耐药细胞的增殖, 同



A. 不同RNA干扰片段敲低效率对比; B. CCK-8法检测各组细胞对GEM的半数抑制浓度(IC₅₀); C. 敲低Hsa-circ-0101216对胰腺癌GEM耐药细胞活力的影响; D. 敲低Hsa-circ-0101216对胰腺癌GEM耐药细胞增殖能力的影响; 与空白对照组相比, (1)*P*<0.05, (2)*P*<0.01; 与sh-NC组相比, (3)*P*<0.05

图2 敲低Hsa-circ-0101216对胰腺癌吉西他滨(GEM)耐药细胞的影响

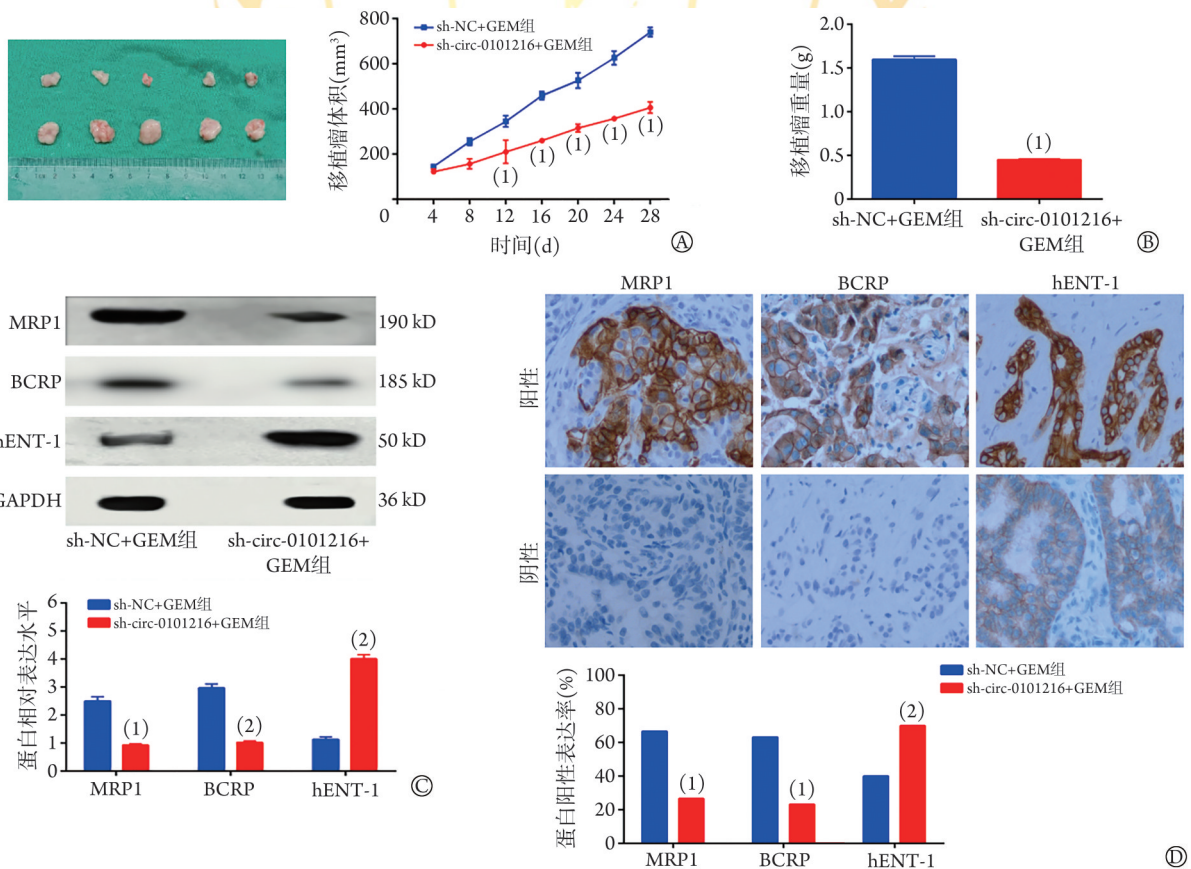
Fig.2 Effect of knockdown Hsa-circ-0101216 on gemcitabine (GEM) resistant cells of pancreatic cancer



MRP1.多药耐药相关蛋白1; BCRP.乳腺癌耐药蛋白; hENT-1.人类平衡型核苷转运体-1; 与空白对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$; 与sh-NC组比较, (3) $P < 0.001$

图3 敲低Hsa-circ-0101216对胰腺癌吉西他滨(GEM)耐药细胞中相关蛋白表达的影响(Western blotting)

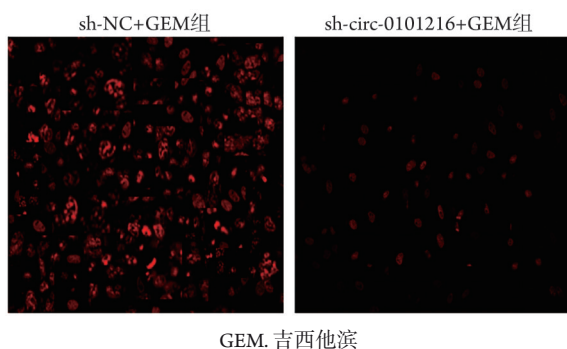
Fig. 3 Effect of knockdown Hsa-circ-0101216 on expression of related proteins in gemcitabine (GEM) resistant cells of pancreatic cancer (Western blotting)



MRP1.多药耐药相关蛋白1; BCRP.乳腺癌耐药蛋白; hENT-1.人类平衡型核苷转运体-1; GEM.吉西他滨; A、B.不同时间点两组裸鼠皮下移植瘤体积及重量变化; C. Western blotting 检测敲低Hsa-circ-0101216对裸鼠皮下移植瘤内相关蛋白表达的影响; D. 免疫组化检测敲低Hsa-circ-0101216对裸鼠皮下移植瘤内相关蛋白表达的影响($\times 200$); 与sh-NC+GEM组相比, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$

图4 敲低Hsa-circ-0101216对裸鼠皮下移植瘤的影响

Fig. 4 Effect of knockdown Hsa-circ-0101216 on subcutaneous transplanted tumors in nude mice



GEM. 吉西他滨

图5 敲低Hsa-circ-0101216对裸鼠皮下移植瘤肿瘤细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of knockdown Hsa-circ-0101216 on the proliferation of subcutaneous transplanted tumor cells in nude mice

时提高胰腺癌细胞对GEM的敏感性。多耐药相关蛋白家族广泛存在于细胞中,可通过参与药物跨膜转运,进而调节细胞对多种药物的治疗敏感性,此蛋白家族主要包括ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白家族、主要协同(major facilitator superfamily, MFS)转运蛋白超家族、抗性-结节-分裂(resistance-nodulation-division, RND)家族转运蛋白等^[22]。其中,MRP1及BCRP^[23-24]均属于ABC转运蛋白家族成员,其本质属于跨膜转运蛋白,在肿瘤耐药、炎性疾病、免疫性疾病等的发生发展中发挥重要的生物学功能^[25-27]。MRP1及BCRP可将化疗药物及其代谢产物转运至细胞外,降低肿瘤细胞内的化疗药物浓度,进而降低药物的化疗效果^[28]。此外,hENT-1^[29]也是细胞内重要的跨膜转运蛋白,但其作用与上述两种蛋白相反,可通过易化扩散的方式将化疗药物转运至细胞内,进而有效增加细胞内的化疗药物浓度,提高治疗效果。陈焱宇等^[30]发现,hENT-1高表达可提高胰腺癌GEM化疗敏感性。本研究发现,敲低Hsa-circ-0101216后,裸鼠皮下移植瘤重量及体积均明显减小,肿瘤组织中胰腺癌细胞增殖能力明显下降,且肿瘤组织中MRP1、BCRP蛋白表达水平及阳性表达率均明显降低,而hENT-1蛋白表达水平及阳性表达率则明显增高。由此推测,敲低Hsa-circ-0101216不仅可抑制肿瘤细胞增殖,还可引起上述3种跨膜转运蛋白的表达发生相应变化,增加胰腺癌细胞内GEM药物浓度,提高胰腺癌细胞对GEM化疗的反应性,进而抑制裸鼠皮下移植瘤的形成。

综上所述,本研究结果表明,Hsa-circ-0101216在胰腺癌GEM耐药细胞中高表达,敲低后可抑制胰腺癌细胞增殖,并通过调控跨膜转运蛋白的方式提高胰腺癌细胞对GEM化疗的敏感性,有望为胰腺癌的化疗研究提供一定的参考价值。但本研究中动物

实验样本量较小,存在一定局限性;此外,本研究尚未阐明具体的分子信号通路,这也是后续研究将重点关注和解决的问题。

【参考文献】

- [1] Hu ZI, O'Reilly EM. Therapeutic developments in pancreatic cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2024, 21(1): 7-24.
- [2] 易波, 杨召铭, 唐才喜, 等. 可切除或交界可切除胰腺癌新辅助治疗+手术与直接手术治疗的临床对比[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2023, 35(2): 96-100.
- [3] 张灿, 孙备. 美国国立综合癌症网络临床实践指南: 胰腺癌(2022.V1)更新解读[J]. *临床外科杂志*, 2023, 31(1): 7-10.
- [4] 张太平, 翁桂湖, 刘悦泽. 可切除胰腺癌新辅助治疗的研究及指南解读, 肯定还是否定?[J]. *外科理论与实践*, 2024, 29(1): 1-4.
- [5] Qiang L, Hoffman MT, Ali LR, et al. Transforming growth factor- β blockade in pancreatic cancer enhances sensitivity to combination chemotherapy[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 874-890. e10.
- [6] O'Reilly EM, Ko AH, Friedberg JW. Flashback foreword: gemcitabine for advanced pancreatic cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(36): 5479-5480.
- [7] Garajová I, Peroni M, Gelsomino F, et al. A simple overview of pancreatic cancer treatment for clinical oncologists[J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(11): 9587-9601.
- [8] 李剑昂, 刘亮, 楼文晖. 从ESMO指南更新分析胰腺癌诊疗进展与发展趋势[J]. *中国实用外科杂志*, 2024, 44(1): 79-84.
- [9] Oyama K, Iwagami Y, Kobayashi S, et al. Removal of gemcitabine-induced senescent cancer cells by targeting glutaminase1 improves the therapeutic effect in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2024, 154(5): 912-925.
- [10] Wilbur HC, Durham JN, Lim SJ, et al. Gemcitabine, docetaxel, capecitabine, cisplatin, irinotecan as first-line treatment for metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Res Commun*, 2023, 3(8): 1672-1677.
- [11] Yang L, Wilusz JE, Chen LL. Biogenesis and regulatory roles of circular RNAs[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2022, 38: 263-289.
- [12] 杨灵璟, 吕叶辉, 林润. 外泌体携带的非编码RNA作为竞争性内源性RNA参与创面修复的研究进展[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2024, 40(6): 594-599.
- [13] Gao Y, Gao J, Lin F, et al. CircRNAs in tumor radioresistance[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1586.
- [14] Zhang F, Jiang J, Qian H, et al. Exosomal circRNA: emerging insights into cancer progression and clinical application potential [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 67.
- [15] 史艳伟, 米彩锋, 牛丽林, 等. circ_100284通过miR-217/MAPK1调控食管鳞状细胞癌侵袭及其对5-FU化疗敏感性的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(10): 1184-1195.
- [16] 闫宏宪, 刘海潮, 刘少朋, 等. 环状RNA chr14: 101402109-101464448C在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌细胞增殖和侵袭转移的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(10): 1947-1951.
- [17] 张伟, 蔡振花, 郭明海, 等. 胃癌组织SDF-1、MRP1表达与临床病理参数的相关性分析[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2021, 26(3): 340-343.
- [18] 陈光宇. IBTK调控胰腺癌吉西他滨化疗耐药的机制研究与自噬相关lncRNA的胰腺癌预后模型构建[D]. 北京: 北京协

- 和医学院, 2022.
- [19] Tian Y, Han W, Fu L, *et al.* Silencing of IGHG1 reverses the resistance of pancreatic cancer to multidrug chemotherapy by modulating autophagy[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(8): 1835-1845.
- [20] 陈弘. hsa-circ-0074298 在人胰腺癌发生发展及吉西他滨耐药中的作用[D]. 南京: 东南大学, 2021.
- [21] 孙根. hsa-circ-0046523/miR-148a-3p/CSF1 调控轴介导肿瘤微环境中 TAMs M2 型极化促进胰腺癌的增殖及侵袭[D]. 南昌: 南昌大学医学部, 2023.
- [22] Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 452-464.
- [23] Ichihara G, Katsumata Y, Sugiura Y, *et al.* MRP1-dependent extracellular release of glutathione induces cardiomyocyte ferroptosis after ischemia-reperfusion[J]. *Circ Res*, 2023, 133(10): 861-876.
- [24] Zattoni IF, Delabio LC, Dutra JP, *et al.* Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): functional inhibitors and expression modulators[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 237: 114346.
- [25] 张正艳, 马文学, 齐静静, 等. 长链非编码 RNA 膀胱癌相关转录因子 1 通过微小 RNA-142/自噬相关蛋白 7 调节自噬对喉癌化疗耐药的影响[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2022, 29(8): 483-488.
- [26] Stevens LE, Peluffo G, Qiu X, *et al.* JAK-STAT signaling in inflammatory breast cancer enables chemotherapy-resistant cell states[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(2): 264-284.
- [27] Zhou J, Qi C, Fang X, *et al.* DJ-1 modulates Nrf2-mediated MRP1 expression by activating Wnt3a/ β -catenin signalling in A549 cells exposed to cigarette smoke extract and LPS[J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119089.
- [28] 亢春彦, 张秀芝, 周慧聪, 等. 下调富含脯氨酸蛋白 11 表达对食管癌耐药细胞 EC9706/DDP 耐药性的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(1): 113-119.
- [29] 张海洋, 谢宇, 杨巍, 等. 吉西他滨对膀胱癌干细胞样细胞的抑制作用[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2022, 42(3): 448-452.
- [30] 陈垚宇, 王喆, 王昭, 等. hENT-1 表达水平对胰腺癌吉西他滨辅助化疗的影响[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2021, 43(6): 580-583, 594.

(责任编辑: 纪方方)



解放军医学杂志®