

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.005

· 基础研究 ·

miR-203a-3p 在胰腺癌组织与细胞中的表达及其对 BxPC-3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

卢鸿健^a, 张荣花^a, 霍小菊^b, 韩向阳^a, 王源^a, 杨晨^c, 马瑞雪^c, 章广玲^c (华北理工大学 a. 基础医学院 河北省慢性疾病重点实验室; b. 附属医院; c. 临床医学院 河北省医工融合精准医疗重点实验室, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-203a-3p 对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:** 运用癌症基因组图谱(TCGA)数据库筛选胰腺癌组织和癌旁组织中差异表达的 miRNA, 分析 miRNA 高表达与低表达时胰腺癌患者的生存率和临床分期; 利用 TarBase 数据库分析 miRNA 与癌症相关的 GO 功能与 KEGG 通路, 利用 DIANA Tools、miRDB 和 TargetScan 网站预测 miR-203a-3p 的靶基因。将 miR-203a-3p mimic 及 NC mimic、miR-203a-3p inhibitor 及 NC inhibitor 转染至 BxPC-3 细胞, 用 qPCR 法检测胰腺癌细胞和胰腺正常上皮细胞 HPNE 中 miR-203a-3p、miR-192-5p 和 miR-451a 表达水平, 以 CCK-8 法、Transwell 小室法和克隆形成实验分别检测 BxPC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭和集落形成能力。**结果:** 通过 TCGA 数据库筛选出 18 个胰腺癌组织中差异表达的 miRNA, 其中 miR-203a-3p、miR-192-5p、miR-451a 具有物种保守性, 且其与胰腺癌临床癌症分期、细胞周期和患者生存率相关(均 $P < 0.05$); 生物信息学网站预测显示 miR-203a-3p 的候选靶基因是 PPM1A, PPM1A 与多基因存在相互作用。miR-203a-3p、miR-192-5p 和 miR-451a 在 BxPC-3 和 Aspc-1 细胞中均高表达(均 $P < 0.01$)。miR-203a-3p mimic 组 BxPC-3 细胞中 miR-203a-3p 表达水平以及细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著提高(均 $P < 0.01$); miR-203a-3p inhibitor 组细胞中 miR-203a-3p 表达水平以及细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著降低(均 $P < 0.01$)。**结论:** miR-203a-3p 在胰腺癌组织及细胞中均高表达, 其表达与患者生存和临床分期相关, 可调控 BxPC-3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

[关键词] miR-203a-3p; 胰腺癌; BxPC-3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)07-0680-09

Expression of miR-203a-3p in pancreatic cancer tissues and cells and its effect on proliferation, migration and invasion of BxPC-3 cells

LU Hongjian^a, ZHANG Ronghua^a, HUO Xiaojun^b, HAN Xiangyang^a, WANG Yuan^a, YANG Chen^c, MA Ruixue^c, ZHANG Guangling^c (a. Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences; b. Affiliated Hospital; c. Hebei Provincial Key Laboratory of Medical-Industrial Integration Precision Medicine, School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-203a-3p on the proliferation, migration and invasion ability of pancreatic cancer BxPC-3 cells. **Methods:** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to screen the differentially expressed miRNAs between pancreatic cancer tissues and paracancerous tissues, and to analyze the survival rate and clinical stage of pancreatic cancer patients with high or low miRNA expression; TarBase was used for the cancer related GO function and KEGG pathway analysis of the miRNAs, DIANA Tools, miRDB and TargetScan websites were used to predict the target genes of miR-203a-3p. miR-203a-3p mimic and NC mimic, miR-203a-3p inhibitor and NC inhibitor were transfected into BxPC-3 cells. The expression levels of miR-203a-3p, miR-192-5p and miR-451a in normal pancreatic epithelial HPNE cells and pancreatic cancer cells were detected by qPCR. The proliferation, migration, invasion and colony formation abilities of BxPC-3 cells were detected by CCK-8, Transwell chamber assay and Colony formation assay, respectively. **Results:**

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No.81201281);2020 年政府资助临床医学优秀人才培养项目(No.冀财预复[2020]397 号);河北省唐山市科学技术研究与发展计划(No.19130204C);河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目(No. JQN2020005);河北省重点研发计划项目(No.213777115D);华北理工大学大学生创新创业训练计划(No.X2020083)。Project supported by the Youth Fund of National Natural Science Foundation of China (No. 81201281), the Government-Funded Clinical Medicine Talents Training Project of Hebei Province (2020) (No. [2020]397), the Science and Technology Research and Development Program from Tangshan of Hebei Province (No.19130204C), the Basic Scientific Research Business Expenses of Universities in Hebei Province (No. jqn2020005), the Key Research and Development Project in Hebei Province (No. 213777115D), and the Innovation Project for College Students of North China University of Science and Technology (No. X2020083)

[作者简介] 卢鸿健(1999—),男,硕士生,主要从事胰腺癌发病机制的研究, E-mail: luhongjian487@163.com

[通信作者] 章广玲(ZHANG Guangling, corresponding author),博士,教授,硕士生导师,主要从事病毒相关肿瘤学的研究, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn

A total of 18 differentially expressed miRNAs in pancreatic cancer tissues were screened out by TCGA database, among which miR-203a-3p, miR-192-5p and miR-451a were species-conservative and significantly correlated with clinical cancer stage, cell cycle and survival rate of pancreatic cancer patients (all $P < 0.05$); Bioinformatics tool predicted that PPM1A might be the candidate target gene of miR-203a-3p and could interact with multiple genes. miR-203a-3p, miR-192-5p and miR-451a were highly expressed in BxPC-3 and Aspc-1 cells (all $P < 0.001$). In miR-203a-3p mimic group, the expression level of miR-203a-3p and the proliferation, migration and invasion ability of BxPC-3 cells were significantly increased (all $P < 0.01$); however, in miR-203a-3p inhibitor group, the expression level of miR-203a-3p and the ability of cell proliferation, migration and invasion were significantly decreased (all $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-203a-3p is highly expressed in pancreatic cancer tissues and cells, and its expression is related to the survival and clinical stage of patients. miR-203a-3p may regulate the proliferation, migration and invasion of BxPC-3 cells.

[Key words] miR-203a-3p; pancreatic cancer; BxPC-3 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(7): 680-688. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.005]

胰腺癌全球肿瘤病死率居第8位,患者5年生存(OS)率不到8%。对中国48个地区肿瘤数据统计分析发现,胰腺癌发病率为第6位,病死率居第7位^[1]。胰腺癌的诊断和治疗较为困难,表现为起病隐匿、病程进展快、手术切除不全、放化疗效果不佳等,被称为“癌中之王”^[2],是预后最差的恶性肿瘤之一。研究^[3-4]发现,miRNA调控很多病理过程,包括细胞的代谢、分化、增殖与凋亡,且与基因组的稳定性、肿瘤侵袭和血管生成密切相关。有学者^[5-6]利用高通量基因芯片技术和大数据分析,揭示了一些在胰腺癌患者中高表达的miRNAs(如miR-186、miR-203、miR-1266、miR-1293和miR-224)和低表达的miRNAs(如miR-326、miR-424、miR-4722和miR-125b)。目前虽然确定了胰腺癌相关的部分miRNA及其靶基因,但仍有大量miRNA的功能有待证实。miR-203a-3p在肺腺癌^[7]、肾细胞癌^[8]等肿瘤中高表达,但其对胰腺癌影响的研究尚未见报道。据此,本研究应用肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库资料,分析胰腺癌组织中差异表达的miRNA,通过检测miR-203a-3p在胰腺癌细胞中的表达,观察其对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并探讨其作用机制,旨在为胰腺癌临床靶向治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 数据库中胰腺癌组织中差异表达miRNA的筛选及物种保守性分析

从TCGA数据库中下载胰腺癌相关的数据包;应用Pheatmap程序包进行分析,利用R语言EdgeR提取差异表达miRNA,绘制miRNA差异表达热图;以 $\log FC > 2$ 且 $P < 0.05$ 作为筛选标准,挑选胰腺癌组织与癌旁组织中差异表达的miRNA。使用miRBase和TargetScan网站查询,分析差异表达miRNA的物种保守性,对具有物种保守性的miRNA进行进一步分析。

1.2 数据库中差异表达miRNA患者的生存曲线、临床分期及GO功能和KEGG通路分析

采用Kaplan-Meier分析miRNA与胰腺癌患者OS率的关系,利用GraphPad Prism 8.0绘制生存曲线。应用TCGA差异表达数据与临床数据相结合,按照肿瘤阶段进行分期,制作箱式散点图(Stage 1~4)。分析生存曲线和临床分期具有统计学意义($P < 0.05$) miRNA的GO基因功能和KEGG信号通路。

1.3 miR-203a-3p靶基因的筛选及分析

运用miRDB、DIANA Tools和TargetScan三个网站共同预测miR-203a-3p的靶基因。首先使用DIANA Tools v5.0按与靶基因结合程度评分,筛选具有较高评分的靶基因(miTG score > 0.9);然后通过miRDB、TargetScan和NCBI查找两者结合序列;RNAhybird网站预测PPM1A基因的自由能;利用STRING数据库分析PPM1A与其他基因相互作用的关系,绘制基因互作网络图,球体越大且颜色越深,表示与PPM1A关系越紧密、作用越强。

1.4 细胞系及主要试剂

人胰腺癌细胞系BxPC-3和Aspc-1以及人正常胰腺上皮细胞HPNE均购自上海富衡生物技术有限公司。

胎牛血清购自天津康源生物技术公司,Opti-MEM细胞培养基、Lipofectamine™ 2000试剂、TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,SYBR Premix EX Taq试剂盒、qPCR试剂盒购自北京聚合美生物技术公司,RPMI 1640细胞培养基购自美国Hyclone公司,青链霉素混合液、胰酶(含0.02%EDTA)购自美国GIBCO公司,DMSO溶液购自日本住友化工有限公司,CCK-8试剂盒购自北京庄盟生物基因有限公司,结晶紫染料购自天津化工有限公司,miRNA逆转录试剂盒、miR-203a-3p mimic、NC mimic、miR-203a-3p inhibitor和NC inhibitor均购自上海吉玛生物技术有限公司。miR-203a-3p mimic正义链为5'-GUGAAAUGU UUAGGACCACUAG-3',反义链为5'-AGUGGU CCUAAACAUUUCACUU-3';NC mimic正义链为5'-UUGUACUACACAAAAGUACUG-3',反义链为5'-GUACUUUUGUGUAGUACAAUU-3'; miR-203a-3p

inhibitor 正义链为 5'-CUAGUGGUCCUAAACAUUUCAC-3'; NC inhibitor 正义链为 5'-CUAGUGGUCCUAAACAUUUCAC-3'。

1.5 细胞培养、转染与分组

将 BxPC-3、Aspc-1 细胞和 HPNE 细胞接种于含有 10%FBS、100 μ g/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。实验分为 miR-203a-3p mimic 组、NC mimic 组、miR-203a-3p inhibitor 组和 NC inhibitor 组。当细胞培养汇合度至 70% 左右时,用 LipofectamineTM 2000 试剂将 miR-203a-3p mimic、NC mimic 和 miR-203a-3p inhibitor 及 NC inhibitor 分别转染到 BxPC-3 细胞中,转染 48 h 后进行后续实验。

1.6 qPCR 法检测胰腺癌细胞中 miR-203a-3p、miR-192-5p 和 miR-451a 的表达水平

将对数生长期的 HPNE 细胞和胰腺癌 BxPC-3、Aspc-1 细胞接种于 6 孔板 (5×10^4 个/孔) 中,常规培养 48 h 后按照 TRIzol 试剂盒说明提取各种细胞中总 RNA。用超微量分光光度计检测提取总 RNA 在 260~280 nm 波长处的光密度 (D) 值, D_{260}/D_{280} 结果在 1.8~2.0 之间方可使用。以提取的总 RNA 为模板,利用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒(染料法)进行逆转录。用 qPCR 法测定 miRNA 的表达水平。引物序列:miR-203a-3p 上游为 5'-CCGCTCGTGAAATGTTTAGG-3', 下游为 5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3'; miR-192-5p 上游为 5'-CTGCTGCTGCTGACCTATGAAT-3', 下游为 5'-CAGTTCCTCAGCAGATGTTGGTAT-3'; miR-451a 上游为 5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3', 下游为 5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3'; U6 上游为 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3', 下游为 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCATC-3'。qPCR 反应体系 20 μ l, 包括 cDNA 模版、上游引物(10 nmol/L)和下游引物(10 nmol/L)各 1 μ l、SYBR Premix EX Taq 10 μ l 和 DEPC 水 7 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 40 次。以 U6 作为阳性对照基因校正 PCR 模板的拷贝数,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。计算公式: $\Delta Ct = \text{目的基因 } Ct - \text{对照基因 } Ct$, 基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.7 CCK-8 法检测 BxPC-3 细胞的增殖能力

将转染后各组胰腺癌 BxPC-3 细胞接种于 96 孔培养板 (3×10^3 个/孔), 分别在 0、24、48 和 72 h 时向各孔中加入 10 μ l CCK-8 试剂和 100 μ l 完全培养液,轻轻摇晃 96 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱继续培养 5 h 后,使用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的 D 值,利用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制细胞增殖曲线图。

1.8 集落形成实验检测 BxPC-3 细胞的集落形成能力

将转染 48 h 后的各组细胞按 1×10^3 个/孔接种至 6 孔板中,每组设 3 个复孔,置于培养箱中连续培养,从第 14 天开始计数细胞集落,在光学显微镜下观察细胞克隆形成情况。选取细胞数 ≥ 50 个的集落作为计数对象,用 0.2% 结晶紫溶液对细胞进行染色后观察;用 ImageJ 软件计算实验组和对照组细胞集落形成数,并绘制相关数据图。

1.9 Transwell 小室法检测 BxPC-3 细胞的迁移和侵袭能力

细胞转染 48 h 后,将密度为 2×10^4 个/孔的各组细胞接种至 Transwell 小室上室中,下室中加入 800 μ l 含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行迁移试验。将各组密度为 3×10^4 个/孔细胞接种至预先铺好基质胶的 Transwell 小室上室中,下室中加入 800 μ l 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行侵袭试验。24 h 后,弃掉上室培养基,用棉签擦掉上室的剩余残液,0.2% 结晶紫染色 5 min 后,在光学显微镜下计数迁移与侵袭细胞数。

1.10 统计学处理

qPCR 法、CCK-8 法、集落形成实验、Transwell 小室法等实验均重复 3 次。应用 SPSS16.0 统计学软件对实验数据进行统计分析,用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的差异比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA 数据库筛选出胰腺癌相关的 18 个差异表达 miRNA

TCGA 数据库中查询到 223 例胰腺癌组织标本和与其对应的癌旁组织标本,用 Pheatmap R 语言程序包 (<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/>) 分析筛选出差异表达的 miRNA 共 18 个:高表达 miRNAs 有 9 个(包括 miR-192-5p、miR-194-5p、miR-196a-1、miR-196a-2、miR-203a-3p、miR-215-3p、miR-4724、miR-592 和 miR-6514, 图 1),低表达 miRNAs 有 9 个(包括 miR-142-5p、miR-150-5p、miR-1537、miR-206、miR-3191、miR-451a、miR-4665、miR-4722 和 miR-6502, 图 2),高表达和低表达 miRNA 的表达水平差异比较均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 物种保守性差异表达 miRNA 的生存曲线

应用 miRBase 和 TargetScan 网站查询高表达组与低表达组 miRNA 的物种保守性,结果显示高表达 miRNAs 中的 miR-203a-3p、miR-192-5p、miR-194-5p、miR-592 和 miR-215-3p 基因序列具有广泛的物种保守性,可作为分析胰腺癌组织差异表达的研究对象,

而 miR-196a-1、miR-19a-2、miR-4724 和 miR-6514 没有广泛的物种保守性, 且 miR-196a-1 在 TCGA 数据库中无原始临床样本数据, 故不宜作为研究对象; 低表达组 miRNAs 中 miR-451a、miR-206、miR-142-5p 和 miR-150-5p 基因序列具有广泛的物种保守性, 可作为分析胰腺癌组织差异表达的研究对象。

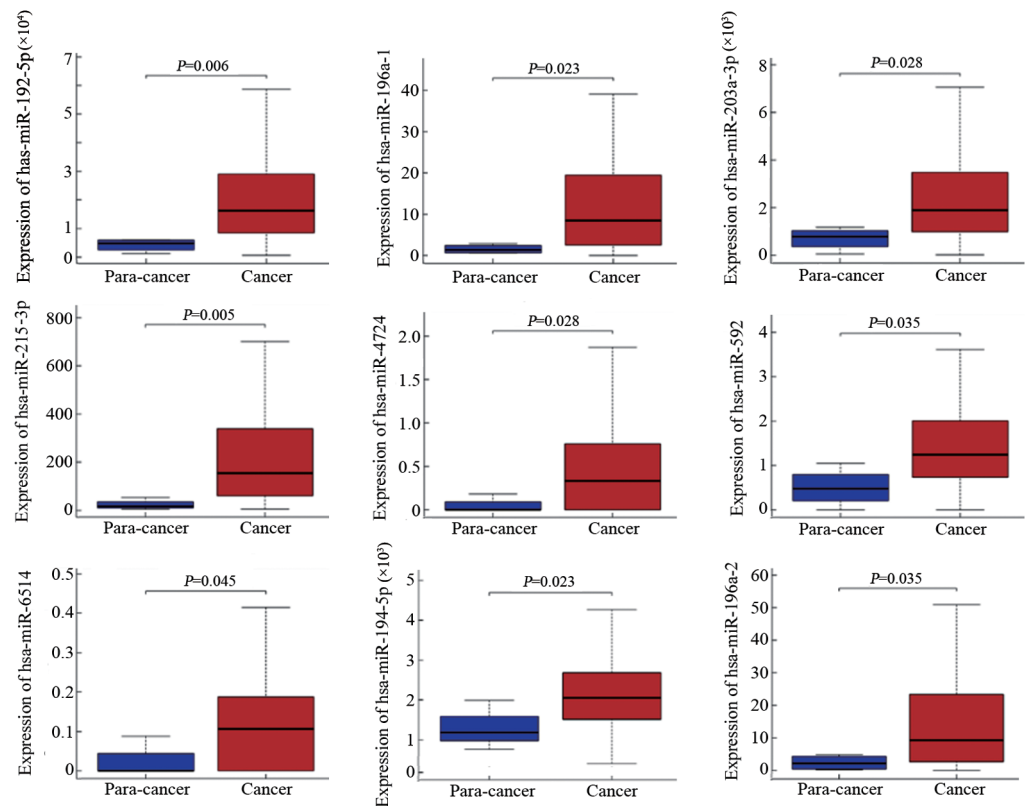


图1 胰腺癌组织中9个高表达 miRNAs 的表达水平分析
Fig.1 Expression analysis of 9 upregulated miRNAs in pancreatic cancer tissues

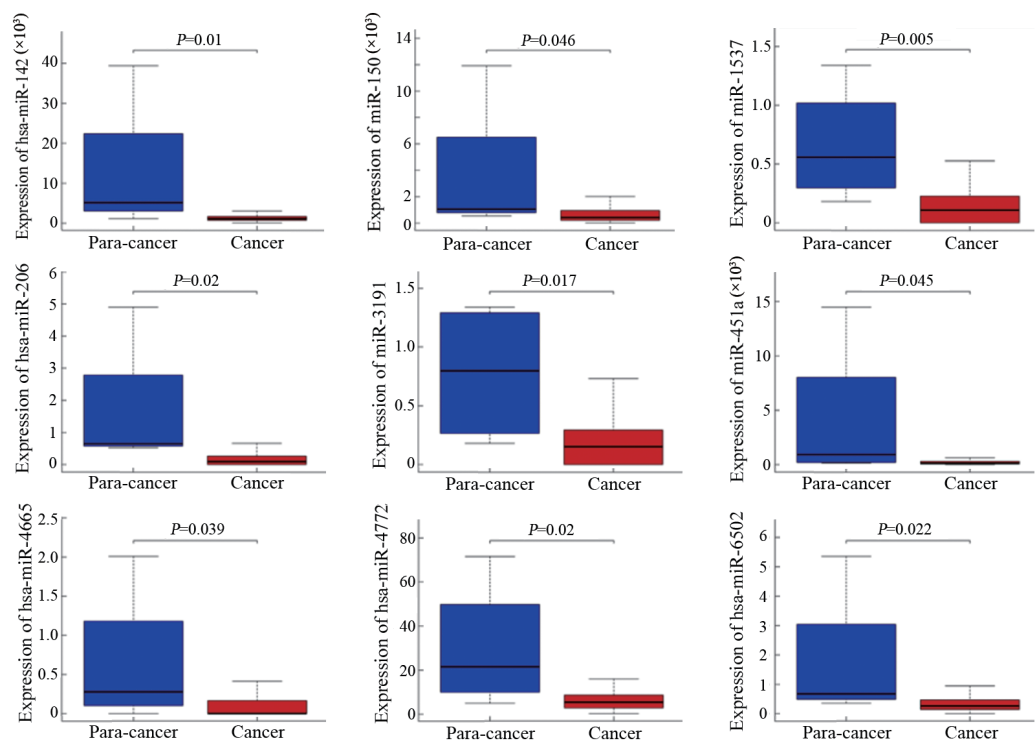


图2 胰腺癌组织中9个低表达 miRNAs 的表达水平分析
Fig.2 Expression analysis of 9 downregulated miRNAs in pancreatic cancer tissues

对具有广泛物种保守性 miRNAs 的患者进一步分析其生存曲线。高表达组中 miR-192-5p 与患者 OS 呈正相关, 当其高表达时患者 OS 较长; miR-203a-3p 与

患者 OS 呈负相关, 当其高表达时患者 OS 较短 ($P < 0.05$)。低表达组中 miR-451a 与患者 OS 呈正相关, 其高表达时患者预后 OS 较长 ($P < 0.05$), 见图 3。

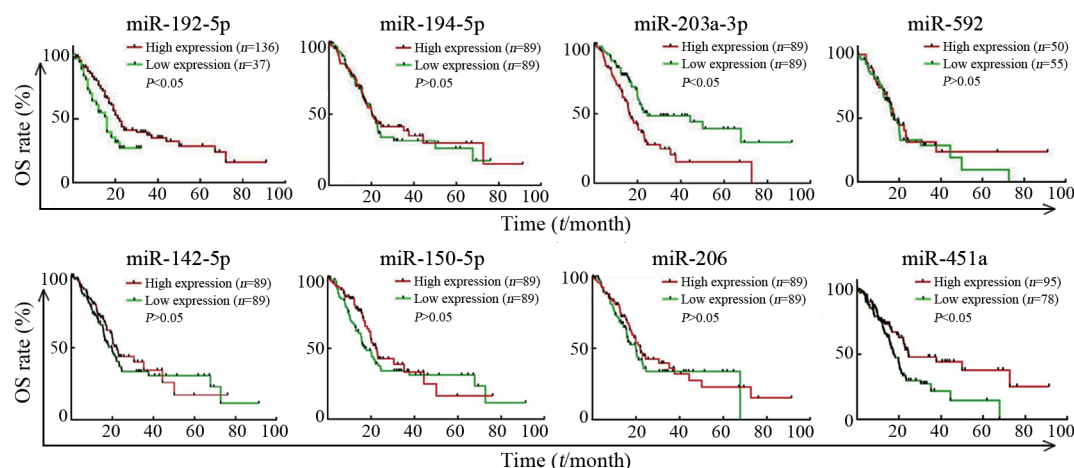


图3 胰腺癌组织中 miRNA 表达水平与患者 OS 率的相关性分析 (Kaplan-Meier)

Fig.3 Correlation analysis of miRNA expression level in pancreatic cancer tissues and OS rate of pancreatic cancer patients (Kaplan-Meier)

2.3 物种保守性差异表达的 miRNAs 与肿瘤的临床分期、细胞周期和某些信号通路相关

临床分期分析表明, miR-192-5p、miR-203a-3p 高表达患者和 miR-451a 低表达患者的临床分期主要位于第 1、2 阶段。GO 功能分析结果 (图 4) 显示, 上述

3 个 miRNAs 在 DNA 代谢过程、生物合成、细胞器功能以及细胞周期中发挥主要功能。KEGG 通路分析结果 (图 5) 显示, 上述 3 个 miRNAs 对肿瘤、帕金森病、朊病毒感染等疾病的信号通路中具有调控作用。

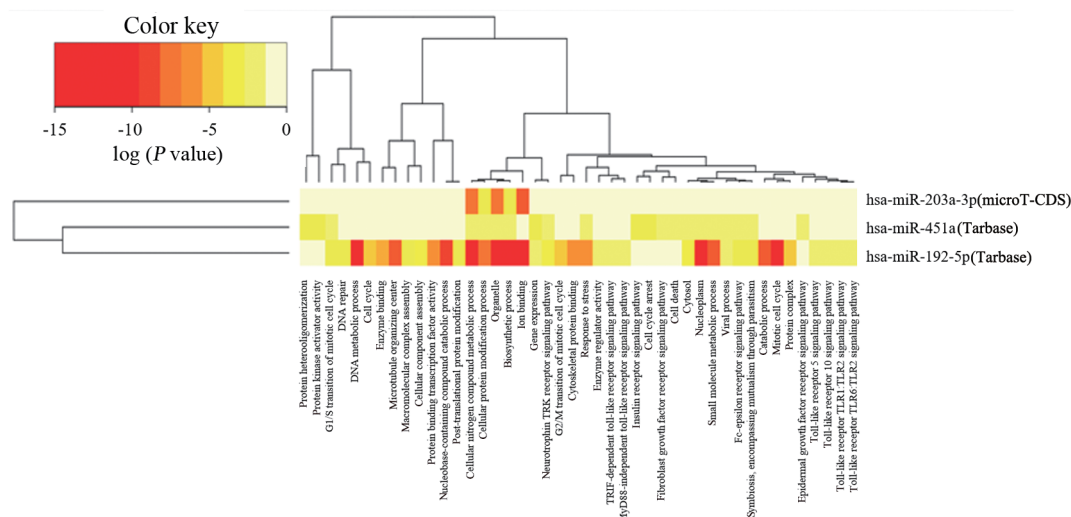


图4 miR-192-5p、miR-203a-3p 及 miR-451a 的 GO 功能分析结果

Fig.4 Go functional analysis of miR-192-5p, miR-203a-3p and miR-451a

2.4 miR-203a-3p 是 PPM1A 的靶基因

miRDB、TargetScan 和 DIANA Tools v5.0 生物信息学预测网站预测 PPM1A 可能是 miR-203a-3p 的候选靶基因, 其与 miR-203a-3p 的最小配对自由能值为 -16.2 kcal/mol, 小于 miR-203a-3p 最小结合自由

能的 1/3 (-14.13 kcal/mol), 表明靶基因预测结果较为可靠。STRING 数据库分析 PPM1A 与其他基因相互作用的关系, 提示 PPM1A 与 SMAD3、SMAD2、PRKAA1 以及 SMAD4 等基因存在较强的相互作用 (图 6)。

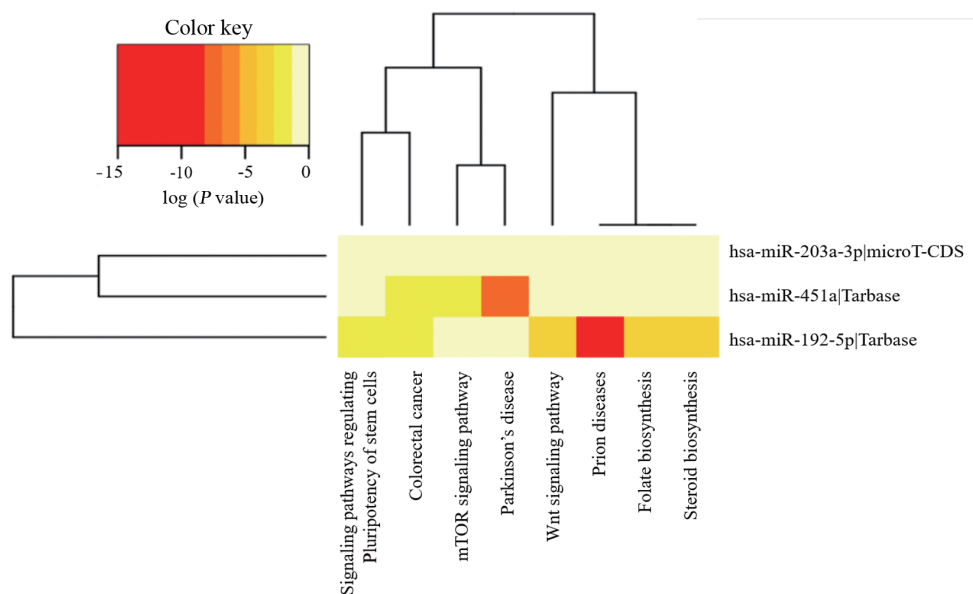


图5 miR-192-5p、miR-203a-3p 及 miR-451a 的 KEGG 信号通路分析结果
Fig.5 KEGG signaling pathway analysis of miR-192-5p, miR-203a-3p and miR-451a

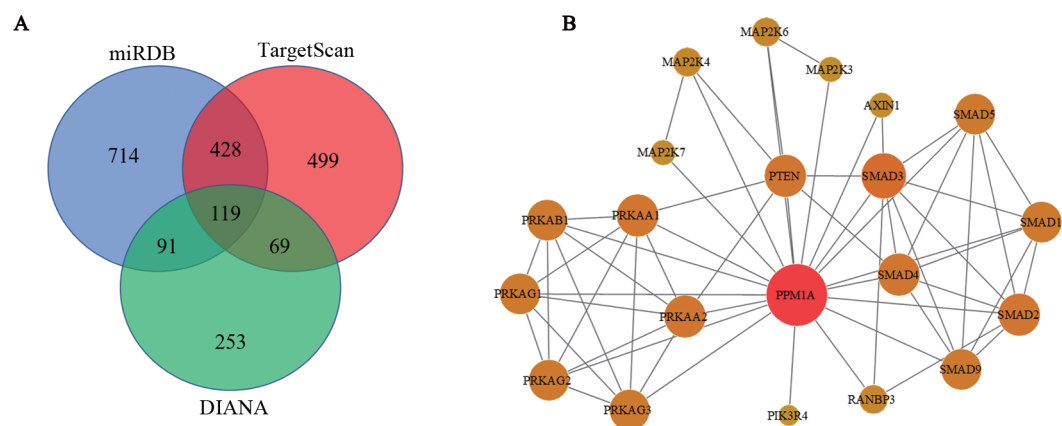


图6 PPM1A 是 miR-203a-3p 的候选靶基因(A)及 PPM1A 的基因-基因相互作用网络分析(B)
Fig.6 PPM1A is a candidate target gene of miR-203A-3p (A), and the gene-gene interaction network of PPM1A (B) is plotted

2.5 胰腺癌 BxPC-3 和 Aspc-1 细胞中 miR-192-5p、miR-203a-3p 和 miR-451a 均高表达

qPCR 法检测结果(图 7)显示,胰腺癌 BxPC-3 和 Aspc-1 细胞中 miR-192-5p($t=37.74, 26.29$, 均 $P<0.01$)、miR-203a-3p($t=34.83, 90.27$, 均 $P<0.01$)、miR-451a ($t=12.29, 5.96$, 均 $P<0.01$) 表达水平均显著高于 HPNE 细胞。其中 miR-192-5p、miR-203a-3p 在胰腺癌细胞中高表达的检测结果与 TCGA 数据库分析一致,但 miR-451a 在胰腺癌细胞中高表达的检测结果与 TCGA 数据库分析显示的低表达相反。

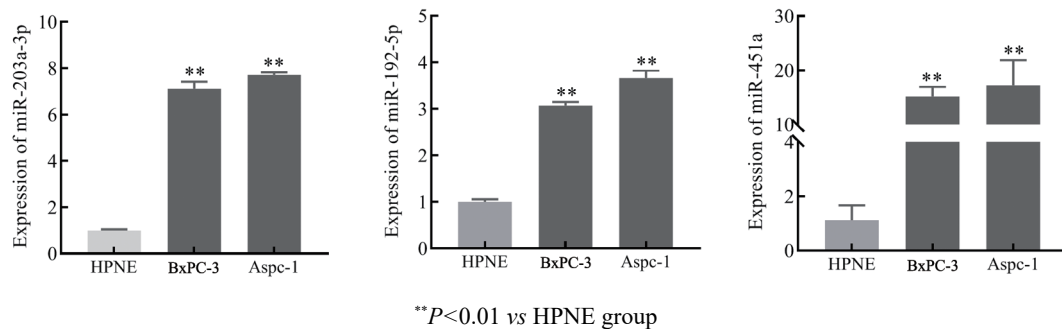
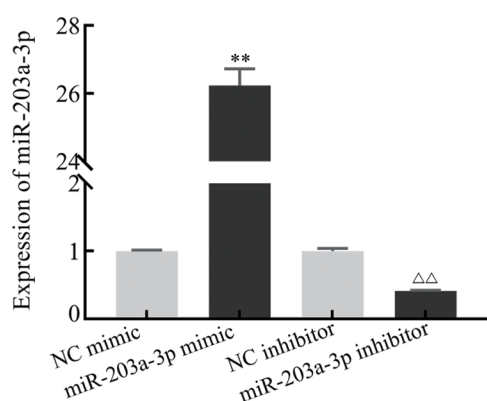


图7 miR-203a-3p、miR-192-5p 和 miR-451a 在胰腺癌细胞中的表达
Fig.7 The expression levels of miR-203a-3p, miR-192-5p and miR-451a in pancreatic cancer cells

2.6 转染miR-203a-3p mimic/inhibitor可显著上调/下调BxPC-3细胞中miR-203a-3p表达水平

qPCR法检测结果(图8)显示,与对照组相比,转染miR-203a-3p mimic的BxPC-3细胞中miR-203a-3p表达水平显著升高($t=89.40, P<0.01$);转染miR-203a-3p inhibitor的BxPC-3细胞中miR-203a-3p表达水平显著降低($t=25.24, P<0.01$)。结果表明,转染miR-203a-3p mimic/inhibitor可显著上调/下调BxPC-3细胞中miR-203a-3p表达水平。



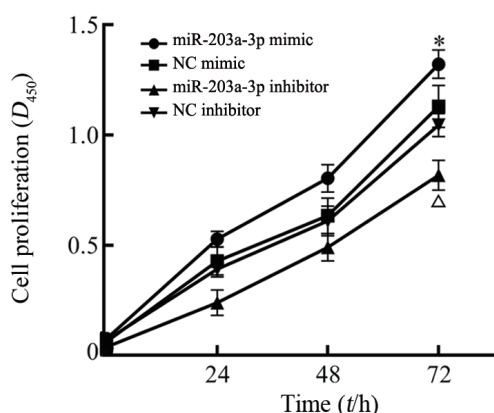
** $P<0.001$ vs NC mimic group; $\Delta\Delta P<0.001$ vs NC inhibitor group

图8 转染后miR-203a-3p在BxPC-3细胞中的表达水平

Fig.8 The expression of miR-203a-3p in BxPC-3 cells after transfection

2.7 miR-203a-3p可正向影响BxPC-3细胞的增殖能力

CKK-8法实验结果(图9)显示,与对照组相比,miR-203a-3p mimic组BxPC-3细胞的增殖能力显著增强($t=2.90, P<0.05$);miR-203a-3p inhibitor组BxPC-3细胞的增殖能力显著减弱($t=4.59, P<0.05$)。结果表明,过表达miR-203a-3p可增强BxPC-3细胞的增殖能力,而抑制miR-203a-3p表达则可减弱BxPC-3细胞的增殖能力。



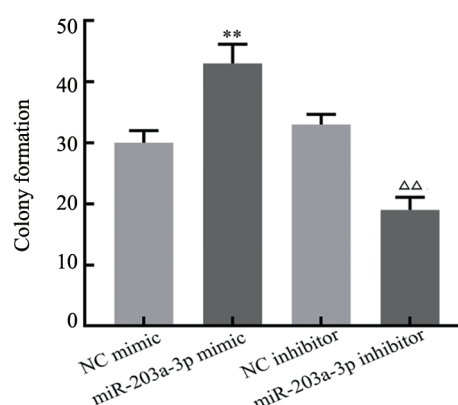
* $P<0.05$ vs NC mimic group; $\Delta P<0.05$ vs NC inhibitor group

图9 miR-203a-3p对BxPC-3细胞增殖的影响

Fig.9 Effect of miR-203a-3p on proliferation of BxPC-3 cells

2.8 miR-203a-3p可正向影响BxPC-3细胞的集落形成能力

克隆形成实验结果(图10)显示,与对照组相比,miR-203a-3p mimic组BxPC-3细胞的集落形成数明显增多($t=5.43, P<0.01$);miR-203a-3p inhibitor组细胞的集落形成数明显减少($t=8.63, P<0.01$)。结果表明,过表达miR-203a-3p可提高BxPC-3细胞的集落形成能力,而抑制miR-203a-3p表达则可降低BxPC-3细胞的集落形成能力。



** $P<0.01$ vs NC mimic group; $\Delta\Delta P<0.001$ vs NC inhibitor group

图10 miR-203a-3p对BxPC-3细胞集落形成能力的影响

Fig.10 Effect of miR-203a-3p on colony formation ability of BxPC-3 cells

2.9 miR-203a-3p可正向影响BxPC-3细胞的迁移和侵袭能力

Transwell小室法检测结果(图11)显示,与对照组相比,miR-203a-3p mimic组中BxPC-3细胞的迁移和侵袭数目明显增多($t=3.92, 3.19$, 均 $P<0.05$);miR-203a-3p inhibitor组BxPC-3细胞的迁移和侵袭数目明显减少($t=4.270, 2.90$, 均 $P<0.05$)。结果表明,过表达miR-203a-3p可提高BxPC-3细胞的迁移和侵袭能力,而抑制miR-203a-3p表达可降低BxPC-3细胞的迁移和侵袭能力。

3 讨论

TCGA由美国癌症研究所和美国人类基因研究所于2005年联合启动的项目,该基因组平台至少可提供30种癌症的基因组图谱^[9];它的诞生为科学研究提供原始临床数据,覆盖了半数癌症临床病例的基因突变,其包含11 000个临床癌症样本蛋白质组学、遗传基因以及对表观遗传测序结果^[10]。本课题利用TCGA数据分析胰腺癌组织中差异表达的miRNAs,得到胰腺癌组织中高表达和低表达miRNAs各9个,分析这些差异表达miRNAs的物种保守性及其与胰腺癌患者OS的相关性,结果发现高表达组中miR-192-5p、

miR-203a-3p 和低表达组中 miR-451a 具有物种保守性, 且与患者的 OS 相关。miR-203a-3p 表达水平与患者 OS 呈负相关, miR-192-5p、miR-451a 的表达水平与患者 OS 呈正相关。通过 qPCR 法检测胰腺癌 BxPC-3 和 Aspc-1 细胞中 miRNA 的表达水平, miR-192-5p、miR-203a-3p 和 miR-451a 在 BxPC-3 和

Aspc-1 细胞中均高表达。经分析, miR-192-5p 与胰腺癌患者 OS 的关系以及其在胰腺癌组织和细胞中的表达水平, 不作为继续研究对象; miR-451a 表达水平与 TCGA 数据库分析结果相反, 也不作为继续研究对象; 因此确定 miR-203a-3p 为研究对象。

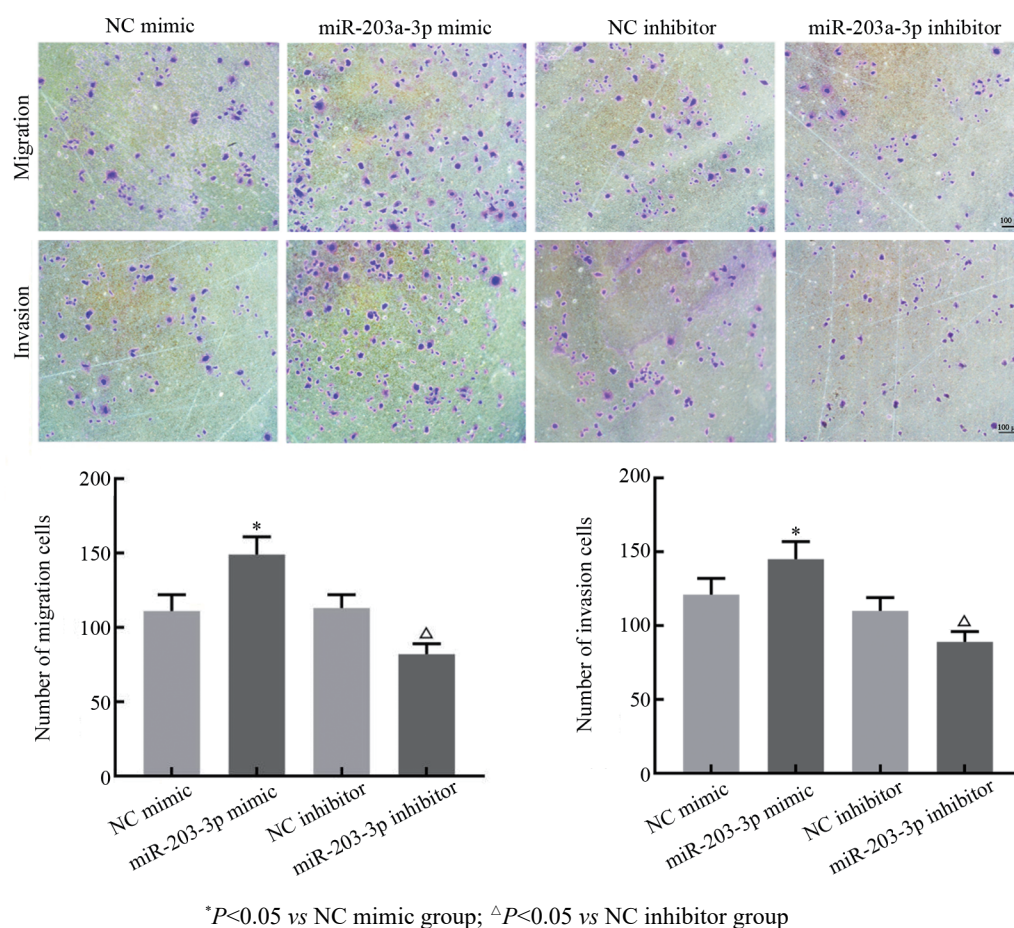


图 11 miR-203a-3p 对 BxPC-3 细胞迁移及侵袭的影响(结晶紫染色, ×40)

Fig.11 Effects of miR-203a-3p on migration and invasion of BxPC-3 cells (crystal violet staining, ×40)

miRNA 涉及肿瘤的发生过程, 例如癌细胞分化、增殖、凋亡和转移; 某些 miRNA 可以编码单核苷酸多态性, 与急性淋巴细胞白血病^[11]、口腔鳞状细胞癌^[12]、胰腺癌^[13-14]的发生具有相关性。miR-203a-3p 可促进胰腺癌和乳腺癌细胞增殖和侵袭^[7], 也能够激活 PI3K/Akt 信号通路而促进癌细胞增殖^[15]。本研究将 miR-203a-3p mimic 或 miR-203a-3p inhibitor 转染胰腺癌 BxPC-3 细胞后进行一系列细胞表型实验, 结果提示 miR-203a-3p 能够促进 BxPC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭和集落形成能力, 与预测结果一致。通过 DIANA Tools v5.0、miRDB 和 TargetScan 预测 miRNA-203a-3p 的靶基因, 并通过 RNAhybrid 2.2 数据库查询 miR-203a-3p 最小结合自由能, 最后确定 PPM1A 可能为 miR-203a-3p 的功能靶基因。

PPM1A, 又称 Mg²⁺/Mn²⁺ 依赖性蛋白磷酸酶 1A,

属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶家族成员, 该家族可作为真核细胞通路中负向调控因子^[16]。PPM1A 可通过 TGF-β/Smad 信号通路发挥调控作用, TGF-β/Smad 信号通路在肿瘤的生长与分化、转移、细胞凋亡和血管生成等病理过程普遍存在^[17]。Smad2 和 Smad3 在调控 TGF-β1 介导的胰腺导管腺癌细胞转移中具有促进作用^[18]。利用 STRING 数据库挖掘基因与基因相互作用关系, 并绘制基因互作网络图发现, 与 PPM1A 富集度较高的基因有 Smad2、Smad3、Smad4, PPM1A 作为一种具有抑癌功能的蛋白磷酸酶, 它们的上调可降低 Smad2、Smad3 磷酸化水平, 继而切断 TGF-β 信号转导, 抑制肿瘤细胞恶性增殖、降低化疗抗性、阻遏上皮间质转化进程^[19]。因此, PPM1A 基因在 TGF-β/Smad 通路中扮演着重要角色, 其对于 Smad2、Smad3 去磷酸化具有重要意义^[20-21]。故可通过 PPM1A 抑制

TGF- β /Smad 信号通路转导, 从而抑制胰腺癌细胞的分化、增殖、迁移和侵袭。

综上所述, 本研究结果发现 miR-203a-3p 能够促进胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖、迁移与侵袭。后续实验将通过荧光素酶报告基因实验验证 PPM1A 是 miR-203a-3p 的直接靶基因, 并通过脂质体转染技术将 miR-203a-3p mimic 或 miR-203a-3p inhibitor 转染胰腺癌细胞后, 检测细胞内 PPM1A mRNA 和蛋白的表达水平, 以探明 miR-203a-3p 调控 PPM1A 表达的具体机制。

【参 考 文 献】

- [1] 张峻烽, 赵志平, 秦欢, 等. copine 8 在胰腺癌增殖、侵袭转移和凋亡中的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(6): 601-610. DOI:10.16016/j.1000-5404.201911042.
- [2] 刘梦奇, 吉顺荣, 徐晓武, 等. 2019 年胰腺癌研究及诊疗新进展[J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(1): 1-10. DOI:10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.01.001.
- [3] LIN S B, GREGORY R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J/OL]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6): 321-333[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859809/>. DOI: 10.1038/nrc3932.
- [4] 张小路, 杜梅红. lncRNA MALAT1 调控 miR-204 表达影响胰腺癌细胞的生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(1): 79-84. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.014.
- [5] ZHANG Z L, BAI Z H, WANG X B, et al. miR-186 and 326 predict the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and affect the proliferation and migration of cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118814[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351009/>. DOI:10.1371/journal.pone.0118814.
- [6] SHI X H, LI X, ZHANG H, et al. A five-microRNA signature for survival prognosis in pancreatic adenocarcinoma based on TCGA data[J/OL]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7638[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955976/>. DOI:10.1038/s41598-018-22493-5.
- [7] WANG Y, XU Y M, ZOU Y Q, et al. Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions[J/OL]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(44): e8361[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5682784/>. DOI:10.1097/MD.00000000000008361.
- [8] HU G H, LAI P, LIU M, et al. miR-203a regulates proliferation, migration, and apoptosis by targeting glycogen synthase kinase-3 β in human renal cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(11): 11443-11453. DOI:10.1007/s13277-014-2476-x.
- [9] COSTA-SILVA J, DOMINGUES D, LOPES F M. RNA-Seq differential expression analysis: an extended review and a software tool[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(12): e0190152[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5739479/>. DOI:10.1371/journal.pone.0190152.
- [10] WEE Y, LIU Y N, LU J C, et al. Identification of novel prognosis-related genes associated with cancer using integrative network analysis[J/OL]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3233[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818516/>. DOI: 10.1038/s41598-018-21691-5.
- [11] ULTIMO S, MARTELLI A M, ZAULI G, et al. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(8): 5642-5654. DOI:10.1002/jcp.26290.
- [12] WILLIAMS A E. Functional aspects of animal microRNAs[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(4): 545-562. DOI: 10.1007/s00018-007-7355-9.
- [13] RUAN K, FANG X G, OUYANG G L. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer[J]. Cancer Lett, 2009, 285(2): 116-126. DOI:10.1016/j.canlet.2009.04.031.
- [14] 陈璐彦, 孙耀, 许朱谔, 等. Notch4 通过调控活化转录因子 2 影响胰腺癌细胞的迁移和侵袭及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(2): 156-160. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.009.
- [15] ZHANG Y Z, ZHENG Y P, ZHU G M. MiR-203a-3p targets PTEN to promote hepatocyte proliferation by regulating PI3K/Akt pathway in BRL-3A cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(4): 725-733. DOI:10.1080/09168451.2019.1694860.
- [16] 周亚莉, 胡文君, 高尧颖, 等. 蛋白磷酸酶 PPM1A 的研究进展[J]. 生理科学进展, 2018, 49(5): 363-366. DOI:10.3969/j.issn.0559-7765.2018.05.010.
- [17] 敖碧凤, 罗兰, 苏胜发. TGF- β /smads 信号通路在放射性心肌纤维化中的作用[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(1): 171-173. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2019.01.049.
- [18] WANG C Y, LIU P, WU H S, et al. MicroRNA-323-3p inhibits cell invasion and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via direct suppression of SMAD2 and SMAD3[J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(12): 14912-14924[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924761/>. DOI:10.18632/oncotarget.7482.
- [19] LU X, AN H, JIN R, et al. PPM1A is a RelA phosphatase with tumor suppressor-like activity[J/OL]. Oncogene, 2014, 33(22): 2918-2927[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897569/>. DOI:10.1038/nc.2013.246.
- [20] LIN X, DUAN X Y, LIANG Y Y, et al. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF β signaling[J/OL]. Cell, 2006, 125(5): 915-928[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6309366/>. DOI:10.1016/j.cell.2006.03.044.
- [21] ZHANG J Q, HAN C, SONG K, et al. The long-noncoding RNA MALAT1 regulates TGF- β /Smad signaling through formation of a lncRNA-protein complex with Smads, SETD2 and PPM1A in hepatic cells[J/OL]. PLoS One, 2020, 15(1): e0228160[2021-01-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988980/>. DOI:10.1371/journal.pone.0228160.

[收稿日期] 2021-01-04

[修回日期] 2021-05-26

[本文编辑] 党瑞山