

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.007

· 临床研究 ·

miR-32-5p 通过靶向下调 EZH2 的表达抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的恶性生物学行为与裸鼠移植瘤生长

柳君君¹, 张燕燕², 雷衡阳¹ (1. 甘肃医学院附属医院 普外科, 甘肃 平凉 744000; 2. 甘肃省平凉市第二人民医院 妇产科, 甘肃 平凉 744099)

[摘要] **目的:** 探究 miR-32-5p 通过靶向 zeste 基因增强子人类同源物 2 (EZH2) 对胰腺癌 PANC-1 细胞恶性生物学行为的影响及其分子机制。 **方法:** 利用 GEPIA 数据库分析胰腺癌组织中 EZH2 的表达水平及其与患者的预后生存期的关系, 并分析 miR-32-5p 表达与患者临床病理因素的关系。 qPCR 法检测正常胰腺 HPDE6-C7 细胞和胰腺癌 PANC-1、AsPC-1、SW1990 细胞中 miR-32-5p 和 EZH2 mRNA 的表达, 通过 Lipofectamine™ 2000 将 miR-NC、miR-32-5p mimic、miR-32-5p inhibitor、pcDNA-NC、pcDNA EZH2 质粒分别转染 PANC-1 细胞, 其分为对照组 (不转染)、miR-NC 组 (转染 miR-NC)、miR-32-5p mimic 组 (转染 miR-32-5p mimic)、Anti-miR-32-5p 组 (转染 miR-32-5p inhibitor)、miR-NC+pcDNA-NC 组 (转染 miR-NC+pcDNA-NC)、miR-NC+pcDNA EZH2 组 (转染 miR-NC+pcDNA EZH2)、miR-32-5p mimic+pcDNA-NC 组 (转染 miR-32-5p mimic+pcDNA-NC)、miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2 组 (转染 miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2)。 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-32-5p 与 EZH2 的靶向关系; MTT 法及克隆形成实验检测各组细胞的增殖能力, 划痕愈合实验检测各组细胞的迁移能力; Transwell 小室实验检测各组细胞的侵袭能力, WB 法检测各组细胞 EZH2、E-cadherin、N-cadherin 的表达; 裸鼠成瘤实验检测转染后各组 PANC-1 细胞移植瘤的生长情况, 免疫组化染色法观察移植瘤组织中 Ki67 和 MMP-2 的表达。 **结果:** GEPIA 数据库显示胰腺癌组织中 EZH2 的表达水平高于癌旁组织, 患者预后生存期与 EZH2 的表达水平呈负相关 (均 $P < 0.05$); miR-32-5p 表达水平与胰腺癌神经浸润、肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移有明显的关联 (均 $P < 0.05$); 与 HPDE6-C7 细胞相比, PANC-1、AsPC-1、SW1990 细胞中 miR-32-5p 呈高表达, EZH2 mRNA 呈低表达, miR-32-5p 表达水平与 EZH2 表达水平呈负相关 (均 $P < 0.05$)。 miR-32-5p 靶向 EZH2 且抑制其表达 (均 $P < 0.05$); 过表达 miR-32-5p 能够下调 Ki67、MMP-2、N-cadherin 表达水平、上调 E-cadherin 表达水平, 抑制 PANC-1 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 抑制移植瘤质量增加 (均 $P < 0.05$)。 **结论:** miR-32-5p 能够靶向调控 EZH2 从而影响胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、迁移、侵袭、EMT 进程及裸鼠体内移植瘤的生长。

[关键词] miR-32-5p; zeste 基因增强子人类同源物 2; 胰腺癌; PANC-1 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

[中图分类号] R736.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)06-0557-10

miR-32-5p inhibits the malignant biological behaviors and the growth of nude mice xenograft of pancreatic cancer PANC-1 cells by targeted down-regulation of EZH2 expression

LIU Junjun¹, ZHANG Yanyan², LEI Hengyang¹ (1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Gansu Medical College, Pingliang 744000, Gansu, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second People's Hospital of Pingliang City, Pingliang 744099, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miR-32-5p on the malignant biological behaviors of pancreatic cancer PANC-1 cells via targeting zeste gene enhancer human homolog 2 (EZH2) and its molecular mechanism. **Methods:** The GEPIA database was used to analyze the expression level of EZH2 in pancreatic cancer tissues and its relationship with the prognostic survival of patients. The association between miR-32-5p expression and clinicopathological features of patients was also analyzed. qPCR was used to detect the expression of miR-32-5p and EZH2 mRNA in pancreatic cancer cells (PANC-1, AsPC-1, SW1990) and normal pancreatic HPDE6-C7 cells. With Lipofectamine™ 2000, miR-NC, miR-32-5p mimic, miR-32-5p inhibitor, pcDNA-NC and pcDNA EZH2 plasmids were separately or jointly transfected into pancreatic cancer PANC-1 cells, namely control group (untransfected), miR-NC group (transfected with miR-NC), miR-32-5p mimic group (transfected with miR-32-5p mimic), anti-miR-32-5p group (transfected with miR-32-5p inhibitor); miR-NC+pcDNA-NC group (transfected with miR-NC+pcDNA-NC), miR-NC+pcDNA EZH2 group (transfected with miR-NC+pcDNA EZH2), miR-32-5p mimic+pcDNA-NC group (transfected with miR-32-5p mimic+pcDNA-NC), and miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2 group (transfected with miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2). Dual-luciferase reporter gene assay was used to

[作者简介] 柳君君 (1984—), 男, 主治医师, 主要从事肿瘤临床与基础研究, E-mail: pinnengs7539@163.com

verify the targeting relationship between miR-32-5p and EZH2. MTT method and the clone formation assay were used to detect proliferation ability of the cells in each group; scratch healing test was used to detect cell migration ability; Transwell chamber test was used to detect cell invasion; Western blotting method was adopted to detect the expression of EZH2, epithelial cadherin (E-cadherin) and neural cadherin (N-cadherin) in cells. The tumorigenicity experiment in nude mice was used to detect the development of transplanted tumors; and the expression of Ki67 and metal matrix protease-2 (MMP-2) in tumor tissues was observed by immunohistochemical staining. **Results:** The GEPIA database showed that the expression level of EZH2 in pancreatic cancer tissues was higher than that in para-cancerous tissues, and the prognostic survival was negatively correlated with the expression level of EZH2 (all $P < 0.05$). The miR-32-5p expression was significantly correlated with the nerve infiltration, tumor differentiation, TNM staging, lymph node metastasis of pancreatic cancer (all $P < 0.05$). Compared with HPDE6-C7 cells, miR-32-5p was up-regulated and EZH2 mRNA was down-regulated in pancreatic cancer cells (PANC-1, AsPC-1, SW1990), and the level of miR-32-5p was negatively correlated with the level of EZH2. miR-32-5p targeted and down-regulated the expression of EZH2 (all $P < 0.05$). Over-expression of miR-32-5p could down-regulate the expression levels of Ki67, MMP-2 and N-cadherin, up-regulate the level of E-cadherin, inhibit proliferation, migration and invasion of PANC-1 cells as well as the volume and weight of transplanted tumors (all $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-32-5p can inhibit the proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT) of pancreatic cancer PANC-1 cells as well as the development of nude mice transplanted tumors *in vivo* through targeting EZH2.

[Key words] miR-32-5p; zeste gene enhancer human homolog 2 (EZH2); pancreatic cancer; PANC-1 cell; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(6): 557-566. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.007]

胰腺癌是一种常见的胃肠道恶性肿瘤,胰腺导管腺癌占有胰腺肿瘤的80%~90%^[1]。其病死率较高,全球每年有超过22.7万患者死亡^[2]。因胰腺癌早期缺乏特异性症状,部分患者就诊时已进入中晚期,肿瘤出现转移,手术及放化疗等治疗手段只能取得微弱的疗效,使得胰腺癌患者的预后较差,1年生存率不足10%^[3]。因此,开发靶向治疗药物是阻止胰腺癌病情恶化的关键。微小RNA(microRNA, miRNA)是长度为19~25个核苷酸的内源性非编码RNA,能够结合靶分子的3' UTR来降解或抑制mRNA的翻译^[4]。miRNA是各类肿瘤的关键调控因子,作为致癌基因或抑癌基因,调控癌细胞的增殖、分化、转移和凋亡^[5]。miR-32-5p是miR-32家族成员,位于染色体Xq26.2上,参与多种癌症的发生发展过程。YE等^[6]发现,miR-32-5p抑制结直肠癌细胞的迁移、侵袭和增殖;WANG等^[7]研究发现,miR-32-5p抑制肾透明细胞癌细胞的迁移和侵袭,其表达与良好的预后呈正相关;LIU等^[8]研究显示,miR-32-5p在宫颈癌组织中下调,其可抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭;YUAN等^[9]发现,miR-32-5p在胰腺癌组织中呈低表达,其能够抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,从而起到抑癌基因的作用。zeste基因增强子人类同源物2(en enhancer of zeste homolog 2, EZH2)是多梳家族(polycomb group, PcG)蛋白复合体成员,参与调控细胞分化、增殖及维持稳态。近年来发现EZH2与胰腺癌的发生发展密切相关。AGRAWAL等^[10]在研究EZH2对胰腺癌PANC-1、MIA PaCa-2细胞的增殖和凋亡的影响时发现,下调EZH2能增强胰腺癌对放射治疗的敏感性。ZHOU等^[11]研究发现,长链非编

码RNA膀胱癌相关转录因子1通过上调EZH2抑制细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子1C的表达,从而抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和有氧糖酵解。目前,miR-32-5p和EZH2在胰腺癌中的关系尚不明确。因此,本研究拟探讨miR-32-5p与EZH2之间的靶向关系,及其对胰腺癌PANC-1细胞增殖、侵袭转移和EMT进程的影响,以为胰腺癌的临床靶向治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 病例资料与标本

收集2019年1月到2019年10月在甘肃医学院附属医院手术切除的90例胰腺癌组织及相应癌旁组织,采集的标本保存于液氮。患者一般临床资料包括年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、TNM分期、神经浸润、淋巴结转移、分化程度等(表1)。其中年龄为35~78岁。根据TNM分期分为I期18例,II期23例,III期30例,IV期19例。排除标准:(1)心、肝、肾功能障碍者;(2)免疫系统疾病者;(3)其他恶性肿瘤者;(4)妊娠或哺乳女性。所有患者均签署知情同意书,本研究方案已获得甘肃医学院附属医院伦理委员会批准(批准号为No.K2019027)。

1.2 实验用细胞和试剂

人正常胰腺导管上皮细胞(HPDE6-C7)、胰腺癌细胞(PANC-1、AsPC-1、SW1990)均购自美国ATCC细胞库。BALB/c裸鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物合格许可证号:[SYXK(京)2019-0030]。RPMI 1640培养液、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;胎牛血清购自中国四季青生物公司,

mimic NC、miR-32-5p mimic、anti-miR-32-5p、pcDNA-EZH2、pcDNA-control均购自上海生物工程有限公司,Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,miR-32-5p、EZH2、U6、GAPDH引物均购自上海华大基因科技有限公司,BCA试剂盒、ECL显影剂购自中国碧云天生物技术有限公司,兔抗人EZH2、鼠抗人Ki67、兔抗人MMP-2、鼠抗人E-cadherin、鼠抗人N-cadherin单克隆抗体均购自美国CST公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京博尔西科技有限公司。

1.3 细胞培养与转染

细胞培养:HPDE6-C7、PANC-1、AsPC-1、SW1990细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,在37℃、5%CO₂条件下常规培养。每2d更换新鲜培养基,当细胞汇合度达约80%时,用胰蛋白酶消化并传代。

细胞分组与转染:将PANC-1细胞分为对照组(未经转染)、miR-NC组(转染mimic NC)、miR-32-5p mimic组(转染miR-32-5p mimic)、Anti-miR-32-5p组(转染miR-32-5p inhibitor);miR-NC+pcDNA-NC组(转染mimic NC和pcDNA-control)、miR-NC+pcDNA-EZH2组(转染mimic-NC和pcDNA-EZH2)、miR-32-5p mimic+pcDNA-NC组(转染miR-32-5p mimic和pcDNA-control)、miR-32-5p mimic+pcDNA-EZH2组(转染miR-32-5p mimic和pcDNA-EZH2)。根据Lipofectamine™2000说明书,将100 μL终浓度为100 nmol/L的质粒与Lipofectamine™2000混合溶液加入各组PANC-1细胞。对照组仅加入Lipofectamine™2000溶液。转染4h后更换培养基,24h后用qPCR及WB法检测转染是否成功。

1.4 在线生物数据库分析EZH2在胰腺癌组织中的表达及其与患者预后生存期(OS)的关系

使用GEPIA数据库分析EZH2在胰腺癌组织和癌旁组织中的表达水平及其对患者预后(OS)的影响。

1.5 双荧光素酶报告基因实验验证miR-32-5p与EZH2之间的靶向关系

生物信息学数据库TargetScanHuman预测发现,miR-32-5p与EZH2 mRNA的3' UTR存在互补结合序列。将EZH2 mRNA的3' UTR序列克隆到双荧光素报告基因载体,分别构建野生型(EZH2 3' UTR-WT)和突变型(EZH2 3' UTR-MUT)质粒。将两种质粒分别与mimic NC、miR-32-5p mimic混合,通过Lipofectamine™2000分别共转染至各组细胞,转染48h后,收集各组细胞制备细胞裂解物后检测其荧光素酶活性。

1.6 qPCR法检测胰腺癌组织及细胞中miR-32-5p和EZH2的表达

用TRIzol试剂从胰腺癌组织和转染后各组PANC-1

细胞中提取总RNA,用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,用SYBR Green法进行PCR实验。反应条件:95℃预变性30s,95℃10s、60℃30s,共40个循环。U6和GAPDH作内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算miR-32-5p、EZH2的相对表达水平。引物序列:miR-32-5p上游引物为5'-TATTGCACATTACTAAGCCTT-3',下游引物为5'-GAATACCTCGGACCCTGC-3';U6上游引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';EZH2上游引物为5'-GCCAGACTGGGAAGAAATCTG-3',下游引物为5'-TGTGCTGGAAAATCCAAGTCA-3';GAPDH上游引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',下游引物为5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。

1.7 MTT法和克隆形成实验检测转染后各组细胞的增殖能力

细胞转染24h后,消化细胞并按 1×10^3 /孔接种于96孔板,每组设3个复孔,分别培养至24、48、72和96h时,加入20 μL MTT溶液,37℃处理4h,离心去上清液,加入150 μL DMSO,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(D)值。将转染细胞按 1×10^3 /孔接种于6孔板培养,每组设3个复孔。培养10d后,用4%多聚甲醛溶液固定,用结晶紫染色,倒置显微镜($\times 40$)观察克隆形成情况并拍照。

1.8 划痕愈合实验检测转染后各组细胞的迁移能力

将 5×10^4 个转染后的PANC-1细胞接种于6孔板,分组同1.3,每组设3个复孔。当细胞呈现贴壁生长时,使用200 μL移液器吸头划痕,PBS洗去脱落的细胞,加入无血清培养液,显微镜下观察并记录划痕宽度。继续培养24h后,显微镜下再次观察记录划痕宽度。细胞划痕愈合率=(0h划痕宽度-24h划痕宽度)/0h划痕宽度 $\times 100\%$,用细胞划痕愈合率表示细胞的迁移能力。

1.9 Transwell小室实验检测转染后各组细胞的侵袭能力

在Transwell小室平板平铺一层人工基膜(matrigel)(约50 μL),用无血清培养基调整转染后细胞密度至 3×10^5 个/mL,取50 μL各组单细胞悬液加至上室,在下室是含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养24h,PBS清洗后,甲醛固定,结晶紫染色后,显微镜下观察并对穿过膜的细胞进行统计计数。

1.10 WB法检测转染后各组细胞中EZH2、E-cadherin、N-cadherin的表达

各组转染PANC-1细胞加入细胞裂解液,离心所得的上清液即为蛋白样品。用BCA蛋白检测试剂盒测定各组蛋白浓度,蛋白定量变性后进行SDS-PAGE分离蛋

白,电泳后迅速转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶TBST溶液中室温封闭2 h,加入对应一抗EZH2、E-cadherin、N-cadherin(稀释度均为1:2 000)4℃处理过夜,TBST洗涤3次后,加入二抗(稀释度为1:10 000)室温处理2 h,加入DAB显色剂显色,Bio-Rad凝胶成像仪记录蛋白条带灰度并拍照,以GAPDH作为内参照,对各组蛋白进行相对定量分析。

1.11 PANC-1 细胞移植瘤裸鼠模型的建立与观察

按随机数字表法,将BALB/c裸鼠随机分为4组,每组8只,雌雄各半。4组分别为对照组(未经转染细胞)、miR-NC组(转染mimic NC细胞)、miR-32-5p mimic组(转染miR-32-5p mimic细胞)、Anti-miR-32-5p组(转染miR-32-5p inhibitor细胞)。在各组裸鼠右肩背部皮下分别注射0.2 mL(1×10^7 个细胞/mL)已转染的PANC-1细胞悬液。正常饲养,观察裸鼠皮下成瘤情况。第30天处死裸鼠,完整取出皮下肿瘤后称其质量。

1.12 免疫组化染色法观察移植瘤组织中Ki67、MMP-2的表达

移植瘤组织经10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,过氧化氢阻断内源性过氧化酶活性后,分别加入鼠抗人Ki67(1:1 000)、MMP-2单抗(1:1 000),4℃处理过夜。滴加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(1:1 000),室温处理1 h,DAB显色,苏木精复染,乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性胶封片。

最后,显微镜($\times 200$)下镜检拍照。细胞核有棕色颗粒沉着的为阳性染色,随机选取5个视野,阳性率=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

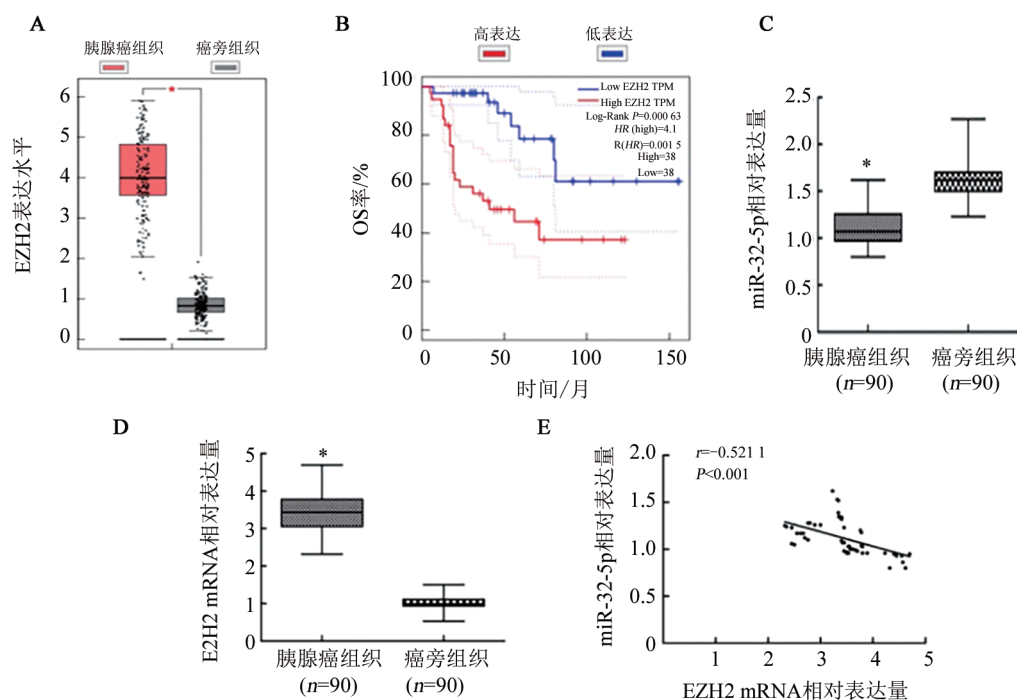
1.13 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。数据分析应用软件SPSS22.0,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立 t 检验;计数资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验;采用单因素和多因素分析影响miR-32-5p表达的独立危险因素。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在胰腺癌组织中EZH2呈高表达、miR-32-5p呈低表达且EZH2高表达患者OS短

通过分析GEPIA数据库、TCGA数据库和GTEx项目胰腺癌组织中的EZH2表达水平,显示胰腺癌组织(163例)的EZH2表达水平明显高于癌旁组织(图1A, $P < 0.05$),且分析38例患者的EZH2的表达水平越高,其OS越短(图1B, $P < 0.05$)。qPCR法检测本院收集的90例胰腺癌组织和90例癌旁组织中miR-32-5p和EZH2 mRNA表达水平时发现,与癌旁组织相比,胰腺癌组织中miR-32-5p呈低表达而EZH2 mRNA明显呈高表达,且胰腺癌组织中miR-32-5p与EZH2 mRNA表达水平呈负相关(图1C、D、E,均 $P < 0.05$)。



与癌旁组织相比,* $P < 0.05$

A:TCGA数据库中EZH2在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达;B:EZH2高表达患者的OS率低;C、D:分别是miR-32-5p、EZH2 mRNA在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达;E:miR-32-5p和EZH2 mRNA在胰腺癌组织和癌旁组织中表达的相关性分析

图1 EZH2在胰腺癌组织中的表达及其与患者OS率的关系及EZH2和miR-32-5p在胰腺癌/癌旁组织中的表达情况

2.2 胰腺癌组织中 miR-32-5p 的表达水平与临床病理特征的关系

为了验证 miR-32-5p 在胰腺癌发生、发展过程中的作用,将 90 例胰腺癌组织中 miR-32-5p 相对表达水平以平均值为划分线分为高表达组(32 例)、低表达组(58 例)。结果(表 1)显示,miR-32-5p 的表达水平与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小等无明显关联

(均 $P>0.05$),与神经浸润、肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移有明显的关联(均 $P<0.05$)。将单因素分析中有统计学意义的因素进行多因素 Logistic 回归分析,结果(表 2)显示,TNM III~IV 期、有神经浸润和淋巴结转移、中低分化程度是影响 miR-32-5p 低表达的独立危险因素($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 miR-32-5p 表达水平与胰腺癌临床病理特征的关系[n(%)]

因素	N	miR-32-5p		χ^2	P
		高表达(32 例)	低表达(58 例)		
年龄/岁				0.525	0.469
≤60	44	14(31.82)	30(68.18)		
>60	46	18(39.13)	28(60.87)		
性别				1.231	0.267
男性	52	16(30.77)	36(69.23)		
女性	38	16(42.11)	22(57.89)		
肿瘤部位				1.515	0.218
头颈部	50	15(30.00)	35(70.00)		
尾体部	40	17(42.50)	23(57.50)		
肿瘤直径/cm				0.063	0.802
≤5	35	13(37.14)	22(62.86)		
>5	55	19(34.55)	36(65.45)		
神经浸润				6.037	0.014
有	38	8(21.05)	30(78.95)		
无	52	24(46.15)	28(53.85)		
分化程度				8.753	0.003
低分化	47	10(21.28)	37(78.72)		
中、高分化	43	22(51.16)	21(48.84)		
TNM 分期				13.868	<0.001
I~II 期	41	23(56.10)	18(43.90)		
III~IV 期	49	9(18.37)	40(81.63)		
淋巴结转移				9.366	0.002
有	42	8(19.05)	34(80.95)		
无	48	24(50.00)	24(50.00)		

表 2 miR-32-5p 表达水平影响因素的多因素 Logistic 回归分析

因素	β	S.E.	Wald χ^2	P	OR	95% CI
神经浸润	1.862	0.452	8.815	0.001	6.438	2.052~14.932
分化程度	1.511	0.481	2.399	<0.001	4.532	2.145~8.882
TNM 分期	1.294	0.242	7.711	0.011	3.648	1.142~5.964
淋巴结转移	1.755	0.781	4.234	<0.001	5.785	1.327~10.148

2.3 在胰腺癌细胞中 miR-32-5p 呈低表达而 EZH2 呈高表达

qPCR 法检测结果(图 2)显示,与正常胰腺 HPDE6-C7 细胞相比,PANC-1、AsPC-1、SW1990 细胞中 miR-32-5p 明显呈低表达,EZH2 mRNA 呈明显高表达(均 $P<0.05$)。

2.4 过表达或抑制 miR-32-5p 能抑制或促进 PANC-1

细胞的增殖、迁移、侵袭能力和 EMT 进程

克隆形成实验(图 3A)、MTT 实验(图 3B)、划痕愈合实验(图 3C)、Transwell 小室实验(图 5D)和 WB 实验(图 3E)检测结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-32-5p mimic 组细胞克隆形成数目减少、增殖能力降低、迁移能力降低、侵袭能力降低、E-cadherin 表达上调、N-cadherin 表达下调(均

$P<0.05$), Anti-miR-32-5p 组细胞克隆形成数目增加、细胞增殖能力升高、划痕愈合率增加、细胞侵袭能力增强、E-cadherin 表达下调、N-cadherin 表达上调 (均 $P<0.05$)。实验结果表明, 过表达 miR-32-5p 可抑

制 PANC-1 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程, 而抑制 miR-32-5p 则能促进 PANC-1 细胞的这些恶性生物学行为。

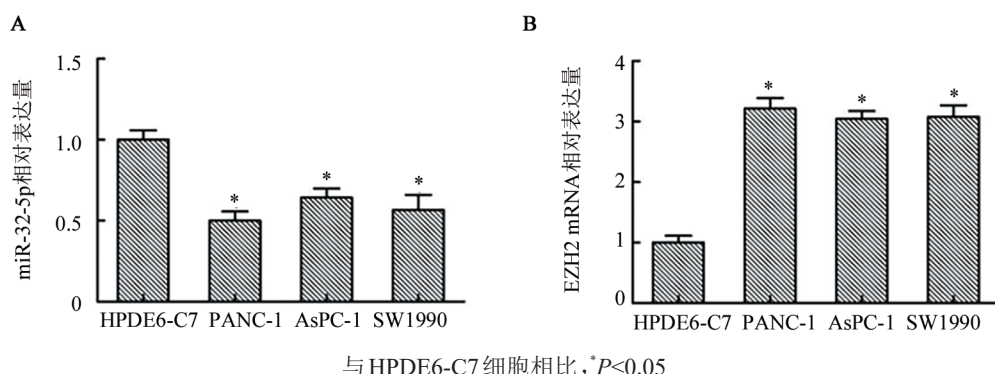
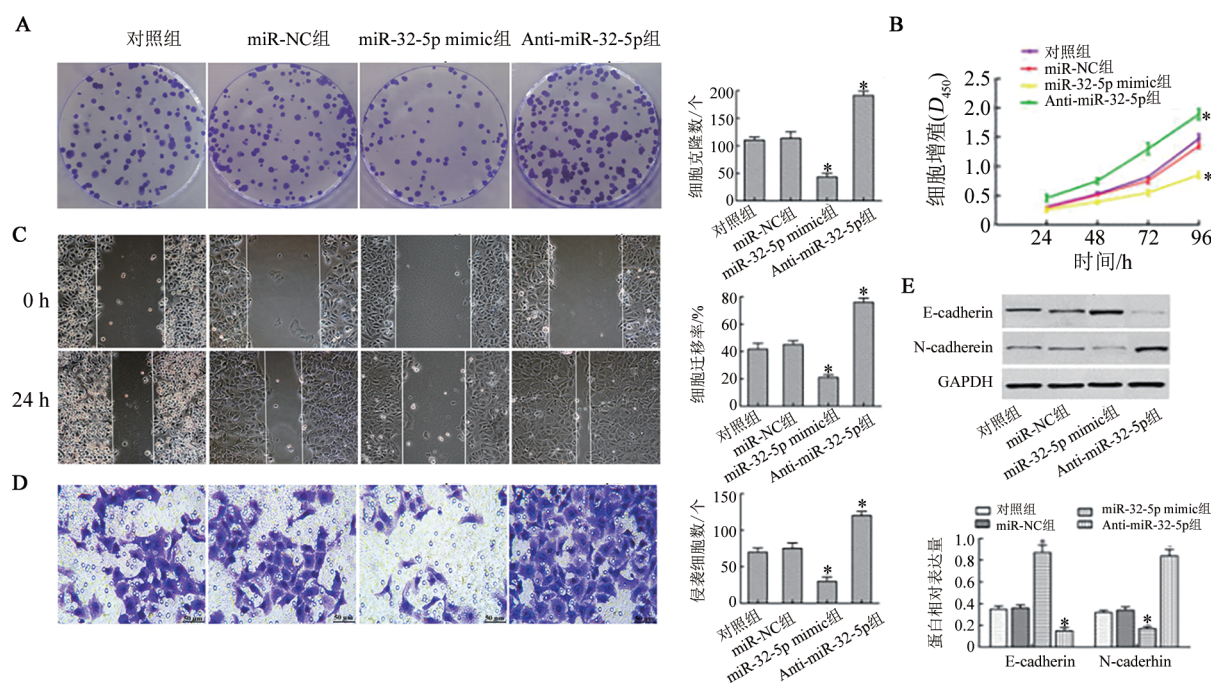


图2 miR-32-5p(A)及 EZH2(B)在正常胰腺细胞和胰腺癌细胞中的表达



A: 克隆形成实验; B: MTT 实验; C: 划痕愈合实验 ($\times 100$); D: Transwell 小室实验 ($\times 200$);

E: WB 法检测转染后各组细胞 E-cadherin、N-cadherin 的表达

图3 过表达或抑制 miR-32-5p 对 PANC-1 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程的影响

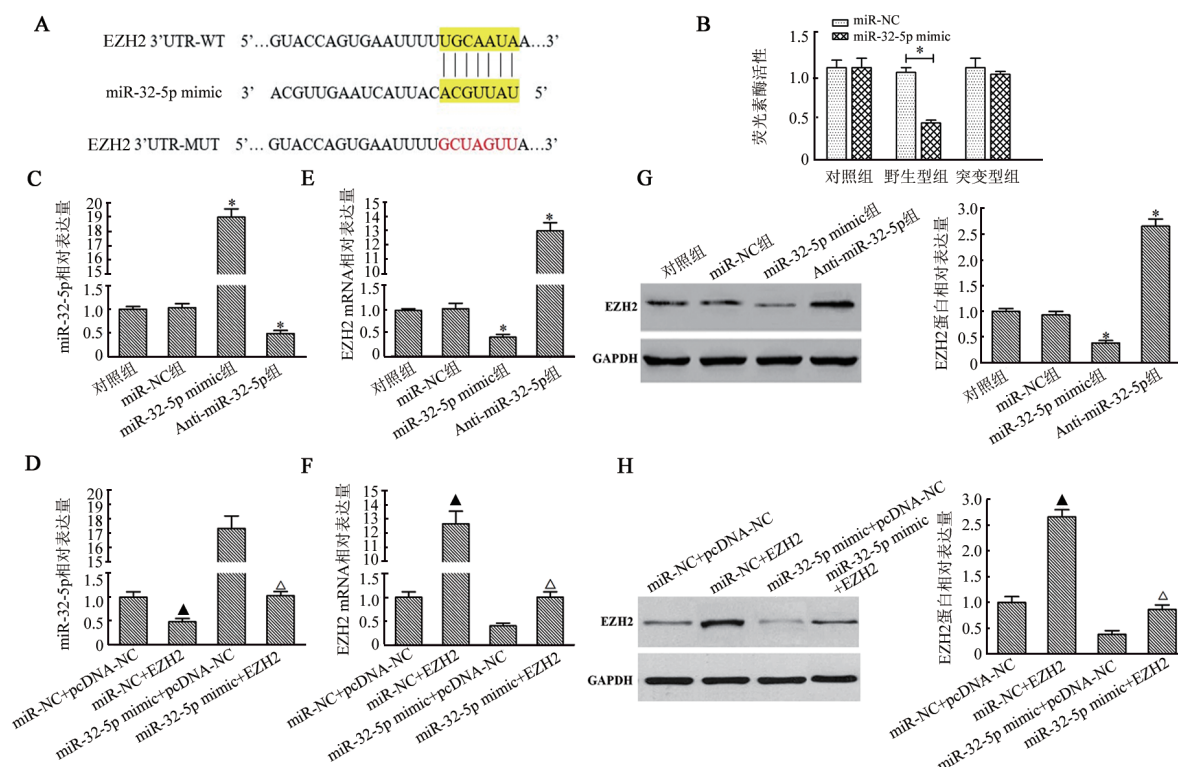
2.5 miR-32-5p 靶向负调控 EZH2 的表达

TargetScanHuman 在线数据库预测 EZH2 为 miR-32-5p 的靶基因, miR-32-5p 与 EZH2 mRNA 3' UTR 区存在结合位点 (图 4A)。荧光素酶报告基因实验结果 (图 4B) 显示, 与 miR-NC+EZH2 3' UTR-WT 组比较, miR-32-5p+EZH2 3' UTR-WT 组细胞的荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$), 而 miR-32-5p mimic+EZH2 3' UTR-MUT 组细胞的荧光素酶活性无明显变化, 证实 miR-32-5p 靶向结合 EZH2 mRNA 的

3' UTR。qPCR 法 (图 4C、D、E、F) 和 WB 法 (图 4G、H) 检测结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-32-5p mimic 组 miR-32-5p 表达上调、EZH2 mRNA 和其蛋白表达量下调 (均 $P<0.05$), Anti-miR-32-5p 组 miR-32-5p 表达下调、EZH2 mRNA 和其蛋白表达量上调 (均 $P<0.05$), 表明胰腺癌细胞转染实验成功, 同时提示, 细胞中 miR-32-5p 对 EZH2 表达具有明显的抑制作用。与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比, miR-NC+pcDNA-EZH2 组 miR-32-5p 表达下调、EZH2 mRNA

和其蛋白表达量上调($P<0.05$);与miR-32-5p mimic+pcDNA-NC组相比,miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2组miR-32-5p表达下调、EZH2 mRNA和其蛋白水平

上调(均 $P<0.05$)。上述结果表明,过表达miR-32-5p靶向抑制EZH2的表达。



与miR-NC组比较,* $P<0.05$;与miR-32-5p mimic+pcDNA-NC组相比,Δ $P<0.05$;与miR-NC+pcDNA-NC组相比,▲ $P<0.05$

A:miR-32-5p与EZH2间存在互补结合位点;B:荧光素酶报告基因实验;C、D:各组细胞miR-32-5p表达;

E、F:转染后各组细胞EZH2 mRNA的表达;G、H:转染各组细胞EZH2蛋白的表达

图4 胰腺癌细胞中miR-32-5p靶向负调控EZH2的表达

2.6 过表达EZH2逆转上调miR-32-5p对PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和EMT进程的抑制作用

单克隆形成实验、MTT法、划痕愈合实验、Transwell实验和WB法检测结果显示,与miR-NC+pcDNA-NC组相比,miR-NC+pcDNA EZH2组细胞克隆形成数目增加(图5A, $P<0.05$)、增殖能力升高(图5B, $P<0.05$)、迁移(图5C, $P<0.05$)和侵袭能力增强(图5D, $P<0.05$),E-cadherin表达下调、N-cadherin表达上调(图5E,均 $P<0.05$);与miR-32-5p mimic+pcDNA-NC组相比,miR-32-5p mimic+pcDNA EZH2组细胞克隆形成数目增加、增殖能力升高、迁移能力增加和侵袭能力增强、E-cadherin表达下调、N-cadherin表达上调(均 $P<0.05$)。上述结果表明,过表达EZH2能够逆转上调miR-32-5p对PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和EMT进程的抑制作用。

2.7 过表达miR-32-5p抑制体内PANC-1细胞移植瘤的生长

移植瘤实验结果显示,与miR-NC组相比,miR-32-5p mimic组移植瘤质量明显减小,Anti-miR-32-5p组

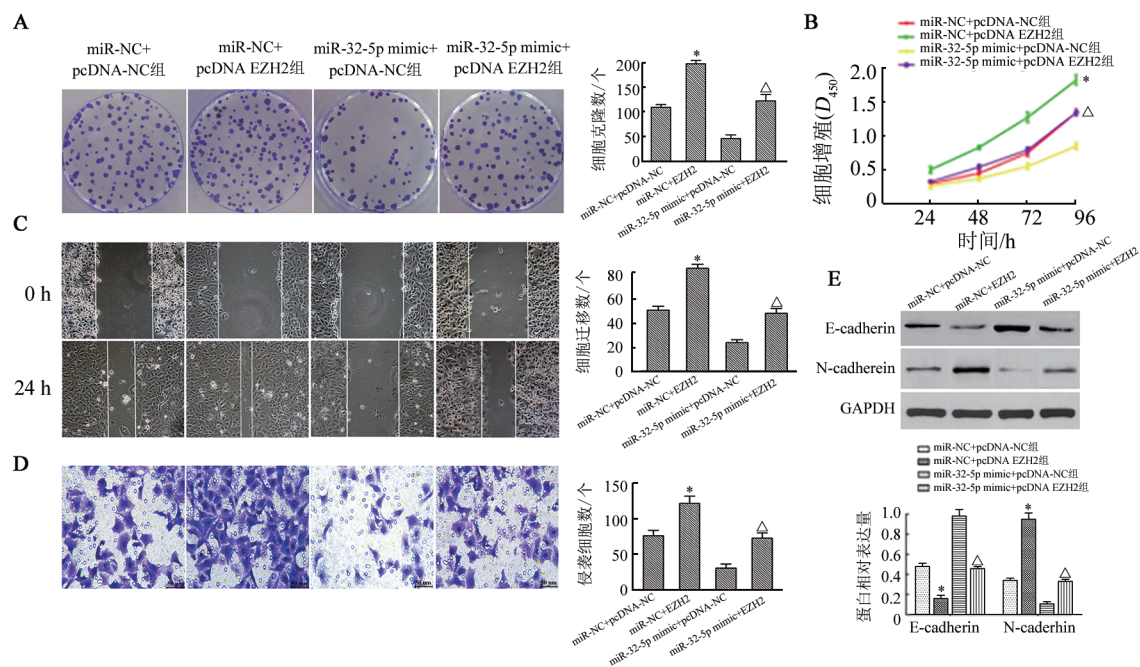
移植瘤质量明显增加(图6A,均 $P<0.05$),说明过表达miR-32-5p抑制体内PANC-1细胞移植瘤的生长。免疫组化染色法检测结果(图6B、C)显示,与miR-NC组相比,miR-32-5p mimic组移植瘤组织中Ki67和MMP-2阳性细胞率减少($P<0.05$),Anti-miR-32-5p组移植瘤组织中Ki67和MMP-2阳性细胞率增加($P<0.05$)。实验结果表明,过表达miR-32-5p抑制体内PANC-1细胞增殖和侵袭转移,与体外实验结果一致。

3 讨论

miRNA作为致癌基因或抑癌基因,能够调控胰腺癌的发生、转移和凋亡等进程。以往研究已确定miR-32-5p可通过调节各种靶基因的表达来影响癌症的发生发展进程。吴瑞平等^[12]报道,敲低lncRNAX染色体失活特异转录本(X chromosome inactivation specific transcript,XIST)可上调miR-32-5p的表达水平、下调EZH2表达水平,从而抑制结直肠癌HCT-8细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡。DANIEL等^[13]发现,miR-32-5p在前列腺癌组织中下调;WANG

等^[14]报道miR-32-5p在三阴性乳腺癌中低表达。本研究发现,miR-32-5p在胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、SW1990中低表达;miR-32-5p表达水平与神经浸润、肿瘤分化程度、TNM分期、淋巴结转移等临床病理特征明显关联,且TNM分期为III~IV期、有神经浸润和

淋巴结转移、分化程度为中低分化的胰腺癌患者miR-32-5p表达更低($P<0.05$)。细胞实验显示,过表达miR-32-5p可抑制PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和EMT,抑制体内移植瘤的生长,说明miR-32-5p在胰腺癌细胞中发挥抑癌作用。

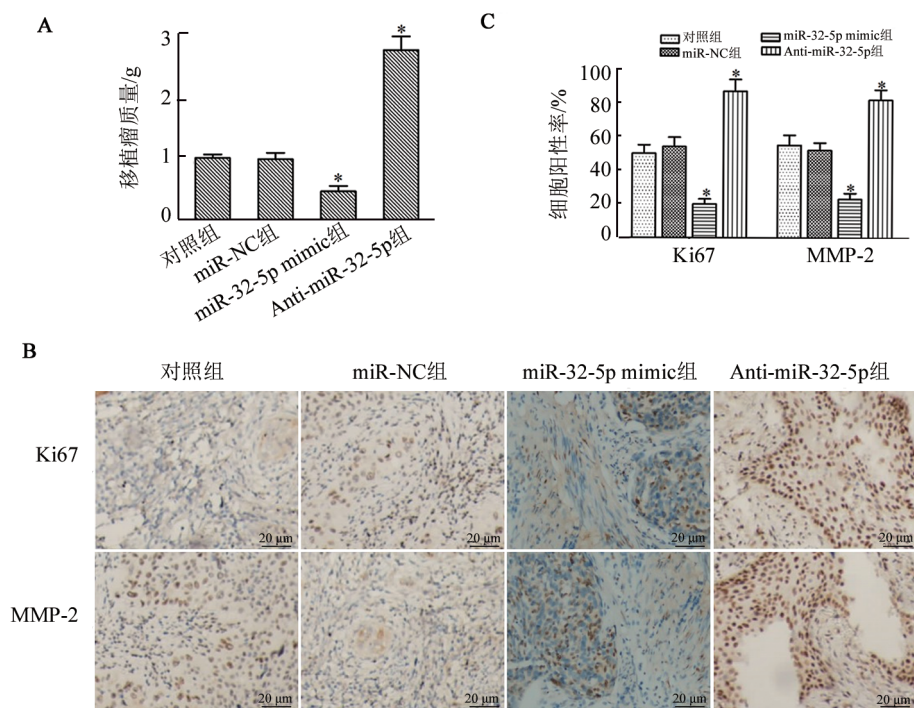


与miR-NC+pcDNA-NC组相比,* $P<0.05$;与miR-32-5p mimic+pcDNA-NC组相比,[△] $P<0.05$

A:克隆形成实验;B:MTT实验;C:划痕愈合实验(×100);D:Transwell小室实验(×200);

E:转染各组细胞EMT相关蛋白E-cadherin、N-cadherin的表达

图5 过表达EZH2逆转上调miR-32-5p对PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和EMT进程的抑制作用



与miR-NC组比较,* $P<0.05$

A:各组移植瘤质量;B:免疫组化染色法观察肿瘤组织Ki67、MMP-2表达;C:各组裸鼠Ki67、MMP-2蛋白阳性率

图6 过表达miR-32-5p对PANC-1细胞移植瘤生长的影响

miRNA通常与目标mRNA的3' UTR结合,筛查并鉴定miR-32-5p的靶基因将进一步阐明miR-32-5p在胰腺癌发生发展中的分子机制。EZH2是多梳抑制性复合物2的核心催化亚基,能诱导组蛋白H3第27位点赖氨酸甲基化,从而起到沉默靶基因转录表达的作用,其在许多肿瘤组织中呈高表达,参与肿瘤恶性进展^[15]。盛泳佳等^[16]发现,miR-124-3p靶向抑制EZH2的表达,下调细胞外因子1(Wnt-1)和 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平,迟缓肝癌细胞的转移和侵袭。闵捷等^[17]发现lncRNA XIST通过靶向miR-101下调其表达水平、上调EZH2表达水平,从而促进PANC-1细胞的增殖和迁移能力。MA等^[18]发现,miR-139-5P和EZH2具有靶向调控关系,过表达miR-139-5P或敲低EZH2能显著抑制胰腺癌细胞的侵袭、EMT和肿瘤形成。本研究通过GEPIA数据库发现,胰腺癌组织中EZH2呈高表达,且与预后较差相关;同时发现EZH2在胰腺癌组织和PANC-1、AsPC-1、SW1990细胞中呈高表达,miR-32-5p可靶向结合EZH2并抑制其表达,过表达EZH2可部分逆转上调miR-32-5p对PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和EMT的抑制作用,说明miR-32-5p和EZH2在胰腺癌细胞中存在调控关系(图7)。

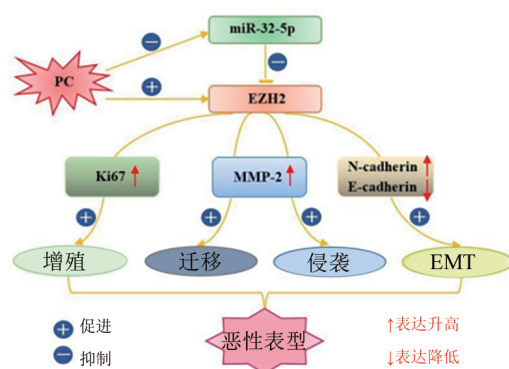


图7 miR-32-5p靶向EZH2影响PANC-1细胞恶性表型的作用机制

由于胰腺与许多器官毗邻,胰腺癌细胞常常侵袭相邻器官组织^[19]。因此,确定胰腺癌增殖和转移的潜在机制至关重要。Ki67是一种与增殖相关的核抗原,可以反映细胞增殖活性,在正常胰腺组织中低表达。CHAUDHARY等^[20]的研究发现,miR-205-5p在胰腺癌组织和细胞中表达下调,通过降低Ki67的表达,抑制肿瘤干细胞的增殖和肿瘤生长。本研究发现,过表达miR-32-5p后肿瘤组织Ki67表达降低,肿瘤生长受到抑制。而异常的迁移和侵袭是肿瘤不良预后和复发的主要原因,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力对肿瘤的治疗十分重要。基质金属蛋白酶是

一类能够降解细胞外基质和基底膜的蛋白水解酶,在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润转移中起重要作用,在许多肿瘤组织中,都发现MMP-2高表达。WANG等^[21]报道,载脂蛋白E2(apolipoprotein E2, ApoE2)在胰腺癌组织中过表达, ApoE2增强了胰腺癌细胞中MMP-2/9的表达,从而促进了细胞迁移和侵袭。本研究发现,过表达miR-32-5p后移植瘤组织MMP-2表达降低,肿瘤细胞侵袭转移受到抑制,降低N-cadherin水平、升高E-cadherin水平抑制细胞的EMT;而过表达EZH2能挽救上述影响。由此可推断过表达miR-32-5p通过靶向EZH2而抑制PANC-1细胞的恶性生物学行为。

综上所述,miR-32-5p通过靶向调控EZH2抑制PANC-1细胞的增殖、迁移、侵袭和EMT进程,以及体内移植瘤的生长。本实验结果为胰腺癌的防治提供了新的潜在靶点。但miR-32-5p和EZH2能否作为临床有效的预测和治疗靶标应用于胰腺癌患者的诊疗还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] WANG C C, HUANG Y K, ZHANG J Y, *et al.* miRNA-339-5p suppresses the malignant development of gastric cancer via targeting ALKBH1[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104449. DOI: 10.1016/j.yexmp.2020.104449.
- [2] DU W Y, LEI C B, WANG Y Z, *et al.* LINC01232 sponges multiple miRNAs and its clinical significance in pancreatic adenocarcinoma diagnosis and prognosis[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20: 1533033820988525[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33506742/>. DOI:10.1177/1533033820988525.
- [3] YU Z Q, ZHAO S S, WANG L S, *et al.* miRNA-339-5p plays an important role in invasion and migration of pancreatic cancer cells[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7509-7517. DOI:10.12659/MSM.917038.
- [4] LIANG H, TANG Y M, ZHANG H, *et al.* miR-32-5p regulates radiosensitization, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting TOB1 gene[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9651-9661. DOI: 10.2147/OTT.S228995.
- [5] TONG R, ZHANG J R, WANG C Y, *et al.* Inhibition of miR-574-5p suppresses cell growth and metastasis and enhances chemosensitivity by targeting RNA binding protein QKI in cervical cancer cells[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2020, 393(6): 951-966. DOI: 10.1007/s00210-019-01772-6.
- [6] YE T, ZHANG N, WU W Y, *et al.* SNHG14 promotes the tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer through miR-32-5p/SKIL axis[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(10): 812-820. DOI:10.1007/s11626-019-00398-5.
- [7] WANG M C, SUN Y, XU J J, *et al.* Preclinical studies using miR-32-5p to suppress clear cell renal cell carcinoma metastasis via altering the miR-32-5p/TR4/HGF/Met signaling[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(1): 100-112. DOI:10.1002/ijc.31289.
- [8] LIU Y J, ZHOU H G, CHEN L H, *et al.* miR-32-5p regulates the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by targeting

- HOXB8[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1): 87-95. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16752.
- [9] YUAN P, TANG C F, CHEN B D, *et al.* miR-32-5p suppresses the proliferation and migration of pancreatic adenocarcinoma cells by targeting TLDC1[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 752[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34468015/>. DOI: 10.3892/mmr.2021.12392.
- [10] AGRAWAL R, CHEN M, BUKHARI Z, *et al.* EZH2 downregulation augments the effect of irradiation in reducing pancreatic cancer cell proliferation *in vitro*[J/OL]. *Ann Clin Lab Sci*, 2020, 50(1): 45-56[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32161011/>.
- [11] ZHOU X, GAO W, HUA H H, *et al.* lncRNA-BLACAT1 facilitates proliferation, migration and aerobic glycolysis of pancreatic cancer cells by repressing CDKN1C *via* EZH2-induced H3K27me3[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 539805[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33072570/>. DOI:10.3389/fonc.2020.539805.
- [12] 吴瑞平, 陈冠阳, 陈志康. lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/EZH2 分子轴调控结直肠癌 HCT-8 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(12): 1363-1370. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.011.
- [13] DANIEL R, WU Q N, WILLIAMS V, *et al.* A panel of microRNAs as diagnostic biomarkers for the identification of prostate cancer [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1281 [2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621736/>. DOI:10.3390/ijms18061281.
- [14] WANG R, HUANG Z M, QIAN C W, *et al.* lncRNA WEE2-AS1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in triple negative breast cancer cells *via* regulating miR-32-5p/TOB1 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1005-1012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.01.170.
- [15] 冷雪媛, 范恒. EZH2 在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2021, 29(5): 242-247. DOI:10.11569/wcjd.v29.i5.242.
- [16] 盛泳佳, 韩晨阳, 杨毅, 等. miRNA-124-3p 靶向 EZH2 调控肝癌细胞转移和侵袭能力的机制研究[J]. *浙江医学*, 2021, 43(13): 1381-1385. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.13.2020-4586.
- [17] 闵捷, 曹丽莉, 沈彬彬, 等. 长链非编码 RNA XIST 靶向 miR-101/EZH2 对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响[J]. *中华胰腺病杂志*, 2020, 20(3): 200-206. DOI: 10.3760/ema.j.cn115667-20191022-00094.
- [18] MA J, ZHANG J, WENG Y C, *et al.* EZH2-mediated microRNA-139-5p regulates epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis of pancreatic cancer[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(9): 868-880. DOI:10.14348/molcells.2018.0109.
- [19] QIAN B L, WEI L P, YANG Z Q, *et al.* Hic-5 in pancreatic stellate cells affects proliferation, apoptosis, migration, invasion of pancreatic cancer cells and postoperative survival time of pancreatic cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109355 [2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31683179/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109355.
- [20] CHAUDHARY AK, MONDAL G, KUMAR V, *et al.* Chemosensitization and inhibition of pancreatic cancer stem cell proliferation by overexpression of microRNA-205[J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 1-8. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.05.007.
- [21] WANG H, DU S X, CAI J, *et al.* Apolipoprotein E2 promotes the migration and invasion of pancreatic cancer cells *via* activation of the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 13161-13171. DOI:10.2147/CMAR.S284115.

[收稿日期] 2022-01-16

[修回日期] 2022-05-03

[本文编辑] 向正华, 沈志超