

高糖通过调控 miR-429/ZEB1 轴对胰腺癌细胞免疫逃逸的影响

张志超¹ 李光辉¹ 朱学河¹ 魏强¹ 王飞² 赵海平²

摘要 目的 探究高糖干预对胰腺癌细胞免疫逃逸的影响及作用分子机制。方法 采用不同浓度葡萄糖(0、7.5、15、30 mmol/L)处理 PANC-1 细胞 24 h 构建高糖干预的 PANC-1 细胞。将 miR-429 mimics 及其阴性对照(mimics NC)转染至 PANC-1 细胞,分为对照组、HG 组、HG + mimics NC 组、HG + mimics 组、HG + mimics + oe-NC 组和 HG + mimics + oe-ZEB1 组。流式细胞术检测细胞表面分子细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)表达水平; qRT-PCR 检测细胞 miR-429 和锌指 E-盒结合同源盒蛋白 1(ZEB1) mRNA 表达水平; Western blot 检测细胞 ZEB1 蛋白表达水平。将以上各组 PANC-1 细胞与 CD8⁺T 细胞建立共培养体系, CCK-8 检测细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞凋亡水平; 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测 CD8⁺T 细胞对 PANC-1 细胞的杀伤作用; 采用双荧光素酶报告系统验证 miR-429 和 ZEB1 的靶向调控关系。结果 HG 可促进 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 及 ZEB1 表达($P < 0.05$) 抑制 miR-429 表达,且呈浓度依赖性。miR-429 过表达可显著抑制 HG 诱导的 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达,而过表达 ZEB1 可逆转 miR-429 过表达对 HG 诱导 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达的抑制作用。建立与 CD8⁺T 细胞共培养体系后,与对照组比较, HG 组 PANC-1 细胞增殖活性明显增加,细胞凋亡率和杀伤活性明显降低($P < 0.05$); 与 HG + mimics NC 组比较, HG + mimics 组 PANC-1 细胞增殖活性明显降低,细胞凋亡水平和杀伤活性明显升高($P < 0.05$)。与 HG + mimics + oe-NC 组比较, HG + mimics + oe-ZEB1 组 PANC-1 细胞增殖活性明显增加,细胞凋亡率和杀伤活性明显降低($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验证实, miR-429 靶向负调控 ZEB1。结论 高糖通过下调 miR-429 表达水平,靶向负调控 ZEB1 mRNA 的表达,提高 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达水平,进而促进 PANC-1 细胞免疫逃逸。

关键词 miR-429; 胰腺癌; 锌指 E-盒结合同源盒蛋白 1; 高糖; 免疫逃逸

2024-02-25 接收

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(编号: 2020MS08195); 内蒙古自治区教育厅高等学校科学技术研究项目(编号: NJZZ22651)

作者单位: 内蒙古医科大学附属医院¹ 急诊科、² 肝胆外科, 呼和浩特 010010

作者简介: 张志超, 男, 主治医师;

李光辉, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: ayfycyp@163.com

中图分类号

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1166-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.009

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是胰腺癌中侵袭性最强、难治性最高的实体恶性肿瘤之一^[1]。由于 PDAC 患者无明显的早期临床症状,而晚期患者对当前放化疗的敏感性有限,PDAC 患者的 5 年生存率低于 8%^[2]。胰腺癌的发生发展与高血糖密切相关,研究^[3]显示,与非糖尿病人群比较,糖尿病患者胰腺癌发病率明显增加。胰腺癌合并糖尿病患者的肿瘤较大,中位生存期较低^[4]。高糖可促使细胞程序性死亡-配体 1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)高表达进而有助于肿瘤免疫逃逸^[5]。因此,寻找新的胰腺癌合并糖尿病免疫逃逸相关的潜在诊断生物指标具有重要临床价值。研究^[6]显示, miR-429 在 PDAC 患者胰腺组织中表达下调,且其表达降低与 PDAC 患者生存期缩短显著相关。然而, miR-429 在糖尿病相关的胰腺癌中的作用尚不清楚。通过在线靶点预测网站 TargetScan7.2 结果显示, 锌指 E-盒结合同源盒蛋白 1(zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) 是的靶基因之一。而根据 Peng et al^[7] 研究显示, miR-429 可靶向调控 ZEB1 的表达,抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化,促进肝癌细胞凋亡。提示 miR-429 可能通过靶向调控 ZEB1 影响 PD-L1 的转录活性,进而参与调节肿瘤细胞免疫逃逸。因此,该研究通过高糖干预人胰腺癌细胞,探究 miR-429/ZEB1 轴参与调控高糖诱导的胰腺癌免疫逃逸的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与细胞培养 人胰腺癌细胞系 PANC-1 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。PANC-1 在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 100 U/ml 青霉素和链霉素的低糖(5 mmol/L 葡萄糖) DMEM 培养基中培养。

1.2 主要试剂与仪器 葡萄糖和 PD-L1 抑制剂

Atezolizumab(AT,美国 Selleck 公司)、FBS(美国 Gibco 公司)、无糖 DMEM 培养基以及 100 U/ml 青霉素和链霉素(武汉普诺赛生命科技有限公司); Trizol 试剂(美国 Fermentas 公司)、逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒(赛默飞科技中国有限公司); Lipofectamine™ 2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); NC mimics、miR-429 mimics、过表达空载质粒(oe-NC)和 ZEB1 过表达质粒(oe-ZEB1)构建以及引物序列合成(上海生工生物工程股份有限公司); 双荧光素酶报告系统检测试剂盒和 Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司); 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒和 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); FITC-PD-L1 抗体(英国 Abcam 公司); GAPDH 和 ZEB1 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 蛋白电泳仪和转膜仪(北京六一生物技术有限公司)、凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司); ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); 恒温培养箱(上海冠森生物科技股份有限公司)。

1.3 实验分组 ① 将 PANC-1 细胞分为对照组(Control 组)、HG 组、HG + PD-L1 抑制剂组(HG + AT 组),其中 HG 干预浓度为 30 mmol/L 葡萄糖,PD-L1 抑制剂 AT 干预浓度为 5 μg/ml,作用时间均为 24 h; ② 将 PANC-1 细胞分为对照组(blank 组): PANC-1 细胞不经任何处理; HG 组: 采用 30 mmol/L 葡萄糖处理 PANC-1 细胞 24 h; HG + mimics NC 组: 将 mimics NC 转染至 PANC-1 细胞中,再采用 30 mmol/L 葡萄糖处理 24 h; HG + mimics 组: 将 miR-429 mimics 转染至 PANC-1 细胞中,再采用 30 mmol/L 葡萄糖处理 24 h; HG + mimics + oe-NC 组: 将 miR-429 mimics 及 oe-NC 共转染至 PANC-1 细胞中,再采用 30 mmol/L 葡萄糖处理 24 h; HG + mimics + oe-ZEB1 组: 将 miR-429 mimics 及 oe-ZEB1 共转染至 PANC-1 细胞中,再采用 30 mmol/L 葡萄糖处理 24 h。

1.4 细胞转染 取对数生长期 PANC-1 细胞,按照 2.0×10^5 个/孔接种至 6 孔板中,待细胞生长至约 80% 融合度时,利用质粒转染试剂 Lipofectamine 2000 将 miR-429 mimics 或 NC mimics 以及 oe-NC 或 oe-ZEB1 质粒单独转染或共转染至各组 PANC-1 细胞中,分为 blank 组、mimics NC 组、mimics 组、mimics + oe-NC 组和 mimics + oe-ZEB1 组。转染 48 h 后,利用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测转染效率。

1.5 建立 PANC-1 细胞与 CD8⁺T 细胞的共培养

体系 参考文献^[8]建立 PANC-1 细胞与 CD8⁺T 细胞共培养体系。即利用嵌入式共培养法,将 PANC-1 细胞和 CD8⁺T 细胞按 1:5 的比例植入 Transwell 小室的细胞共培养系统中。下层植入 PANC-1 细胞,上层植入 CD8⁺T 细胞,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内孵育 24 h 后取出共培养体系的下层 PANC-1 细胞,以备后续检测。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖活性 分组处理后的各组 PANC-1 细胞分别与 CD8⁺T 细胞共培养 24 h,取 Transwell 共培养体系下层 PANC-1 细胞,以每孔 5×10^4 个/ml 的细胞浓度接种于 96 孔细胞板中,常规培养 24 h 后进行 CCK-8 检测。根据 CCK-8 试剂盒操作说明,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内继续孵育 1 h,酶标仪检测每孔混合液在波长 450 nm 处的光密度(optical density, OD)。

1.7 流式细胞术检测细胞表面分子 PD-L1 表达水平 取各组对数生长期 PANC-1 细胞或转染后的各组 PANC-1 细胞,按照 5×10^4 个/ml 的细胞浓度接种至 6 孔板中,待细胞生长至约 70% 融合度时,添加不同浓度(0、7.5、15、30 mmol/L)葡萄糖置于 37 °C、5% CO₂ 常规培养 24 h。弃培养基,胰酶消化细胞,200 r/min 离心 10 min,收集细胞后,加入 PD-L1 抗体以及同型对照,室温避光孵育 30 min,立刻上流式细胞仪进行检测。

1.8 Annexin V FITC/PI 法检测细胞凋亡水平 分组处理后的各组 PANC-1 细胞分别与 CD8⁺T 细胞共培养 24 h 后,取 Transwell 共培养体系下层 PANC-1 细胞,加入胰蛋白酶消化,再用 PBS 洗涤 2 次后,加入 200 ml 结合缓冲液重悬细胞。分别加入 10 μl Annexin V FITC 和 PI 染液,4 °C 染色 30 min。立刻上流式细胞仪对染色细胞进行分析,采用 FlowJo 软件进行细胞凋亡数据分析。

1.9 LDH 释放法检测 CD8⁺T 细胞杀伤活性 分组处理后的各组 PANC-1 细胞分别与 CD8⁺T 细胞共培养 24 h 后,取上清液。室温 1900 r/min 离心 5 min,取上清液置新的 96 孔板中,加入 100 μl LDH 基质液,3 min 后,采用酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处的 OD 值。杀伤活性(%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{自然释放}}) / (OD_{\text{最大释放}} - OD_{\text{自然释放}}) \times 100\%$ 。

1.10 双荧光素酶报告系统检测 取对数生长期的 PANC-1 细胞,利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 miR-429 mimics 和 NC mimics 分别与含 ZEB1 野生型(ZEB1-WT)或突变型(ZEB1-MUT)的荧光素酶报

告载体共转染转染至 PANC-1 细胞中,置于 37 ℃, 5% CO₂ 孵育 48 h 后,收集细胞并加入裂解液, 12 000 r/min 常温离心 15 min 后取上清液,利用双荧光素酶报告系统检测试剂盒,通过双荧光素酶测定法连续测定 Firefly/Renilla 的相对荧光素酶活性。

1.11 qRT-PCR 法检测细胞中 miR-429 和 ZEB1 mRNA 表达水平 收集细胞,利用 Trizol 试剂提取细胞中总 RNA,定量测定其浓度。利用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。根据荧光定量试剂盒操作说明进行加样处理,利用 7500 荧光定量 PCR 仪进行 qPCR。反应程序:95 ℃、10 min 95 ℃、15 s 60 ℃、55 s 72 ℃、20 s 循环 40 次。引物序列信息见表 1。与 GAPDH 比较,根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算目的基因 ZEB1 的相对表达量。另外,以 U6 为内参,计算 miR-429 的相对表达量。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
miR-429	F: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC
	R: GAGTATTTCGACTGGATACGACACGGTT
ZEB1	F: CAGCTTGATACCTGTGAATGGG
	R: TATCTGTGGTCTGTGGGACT
U6	F: GCTCGCTTCGGCAGCACA
	R: GAGTATTTCGACCCAGAGGA
GAPDH	F: TGAAGTCAACAGCGACACCCA
	R: CACCCTGTGTCTGTAGCCAAA

1.12 Western blot 法检测细胞中 ZEB1 蛋白表达

水平 收集细胞,加入预冷的 RIPA 缓冲液裂解细胞。取少量蛋白样本,利用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样本置于沸水浴 5 min 后,经 12% SDS-PAGE 分离蛋白,随后将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上。加入 5% 奶粉中室温封闭 1 h,再使用含 0.1% Tween-20 的 Tris 盐缓冲液(tris buffered saline with Tween 20, TBST) 洗涤 3 次,分别加入一抗 ZEB1 (1:1 000) 和内参 GAPDH (1:5 000) 于 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后,加入对应二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。TBST 冲洗 3 次后,将膜浸泡在增强化学发光剂中显影。使用凝胶成像系统获得图像,并使用 ImageJ 软件对目的蛋白条带结果进行分析。

1.13 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。本研究所获数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用双尾 *t* 检验进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用 LSD-*t* 检验进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HG 干预对 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达的影响 与 0 mmol/L HG 组 (38.93 ± 1.40) % 比较, 7.5、15、30 mmol/L HG 组 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达水平 [(45.87 ± 2.62) %、(60.07 ± 2.02) %、(77.27 ± 1.76) %] 均明显升高 (配对 *t* = -7.930、-10.070、-19.980 均 *P* < 0.05) 且呈浓度依赖性 (*F* = 143.569 *P* < 0.01)。见图 1。

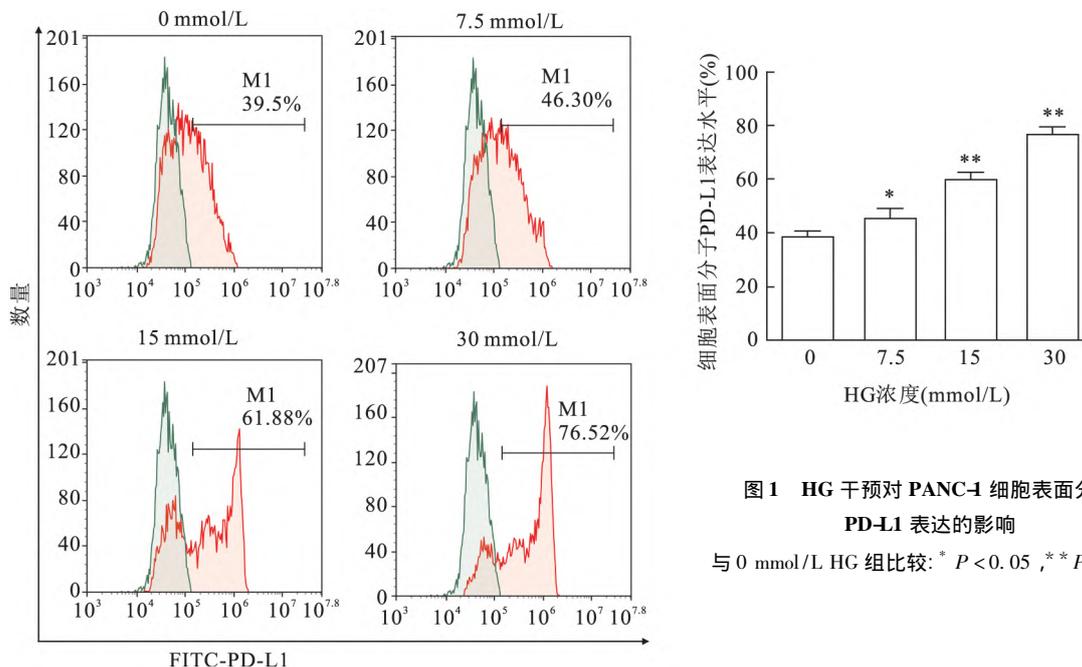


图 1 HG 干预对 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达的影响
与 0 mmol/L HG 组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 HG 干预对 PANC-1 细胞免疫逃逸的影响

不同处理的各组 PANC-1 细胞增殖活性、细胞凋亡水平和杀伤活性差异有统计学意义 ($F = 116.100, 156.451, 31.403, P < 0.01$)。各组 PANC-1 细胞分别与 CD8⁺T 细胞共培养后,与 Control 组比较,HG 组 PANC-1 细胞增殖活性明显增加 [(0.85 ± 0.03) vs (0.55 ± 0.03), 配对 $t = -23.857, P < 0.01$],细胞凋亡水平明显降低 [(5.81 ± 0.37)% vs (16.18 ± 0.43)% 配对 $t = 18.412, P < 0.01$],杀伤活性明显降低 [(7.33 ± 0.62)% vs (14.23 ± 0.95)% 配对 $t = 6.55, P = 0.023$];与 HG 组比较,HG + AT 组 PANC-1 细胞增殖活性明显降低 [(0.71 ± 0.04) vs (0.85 ± 0.03), 配对 $t = 6.65, P < 0.01$],细胞凋亡水平明显升高 [(12.41 ± 0.86)% vs (5.81 ± 0.37)% 配对 $t = -7.68, P = 0.02$],细胞杀伤活性明显升高 [(9.77 ± 1.02)% vs (7.33 ± 0.62)% 配对 $t = -8.21, P = 0.015$]。见图 2。

2.3 HG 干预对 PANC-1 细胞 miR-429 和 ZEB1 表达水平的影响

与 0 mmol/L HG 组比较,7.5、15、30 mmol/L HG 组 PANC-1 细胞中 miR-429 表达水平均明显降低(配对 $t = 4.583, 13.026, 14.478$, 均 $P < 0.05$),而 ZEB1 mRNA (配对 $t = -4.864,$

$-11.963, -15.124$, 均 $P < 0.05$)和蛋白(配对 $t = -6.495, -14.125, -19.868$, 均 $P < 0.01$)表达水平明显升高,且均呈浓度依赖性($F_{miR-429} = 116.659, F_{ZEB1 mRNA} = 133.209, F_{ZEB1 蛋白} = 186.639$, 均 $P < 0.01$)。见图 3。

2.4 miR-429 与 ZEB1 之间的调控关系

各组 PANC-1 细胞中 miR-429、ZEB1 mRNA 和蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F = 229.116, 235.034, 415.999$, 均 $P < 0.01$)。与 blank 组、mimics NC 组比较,mimics 组 PANC-1 细胞中 miR-429 的表达水平明显升高(配对 $t = -14.735, -14.777$, 均 $P < 0.01$)而 ZEB1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低(配对 $t = 14.332, 12.871, 29.480, 77.143$, 均 $P < 0.01$)。通过在线靶点预测网站 TargetScan7.2 预测发现,miR-429 与 ZEB1 之间存在特异性结合的位点。在 ZEB1 WT 细胞中,与 NC mimics 比较,miR-429 mimics 的相对荧光素酶活性明显降低(独立 $t = 19.701, P < 0.01$);而在 ZEB1 MUT 细胞中,与 NC mimics 比较,miR-429 mimics 的相对荧光素酶活性差异无统计学意义(独立 $t = 0.275, P = 0.801$)。见图 4。

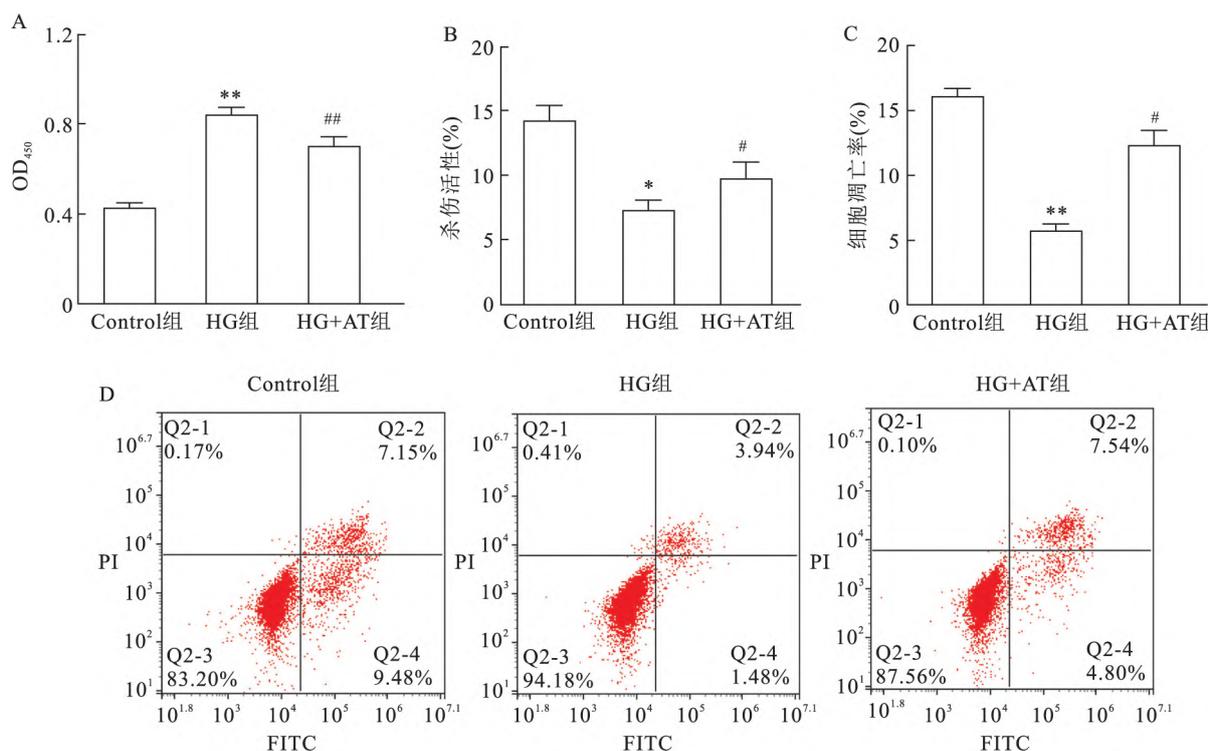


图 2 HG 干预对 PANC-1 细胞免疫逃逸的影响

A: CCK-8 法检测细胞增殖; B: LDH 释放法检测细胞活性; C: 细胞凋亡率统计图; D: Annexin V FITC/PI 法检测细胞凋亡图;与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

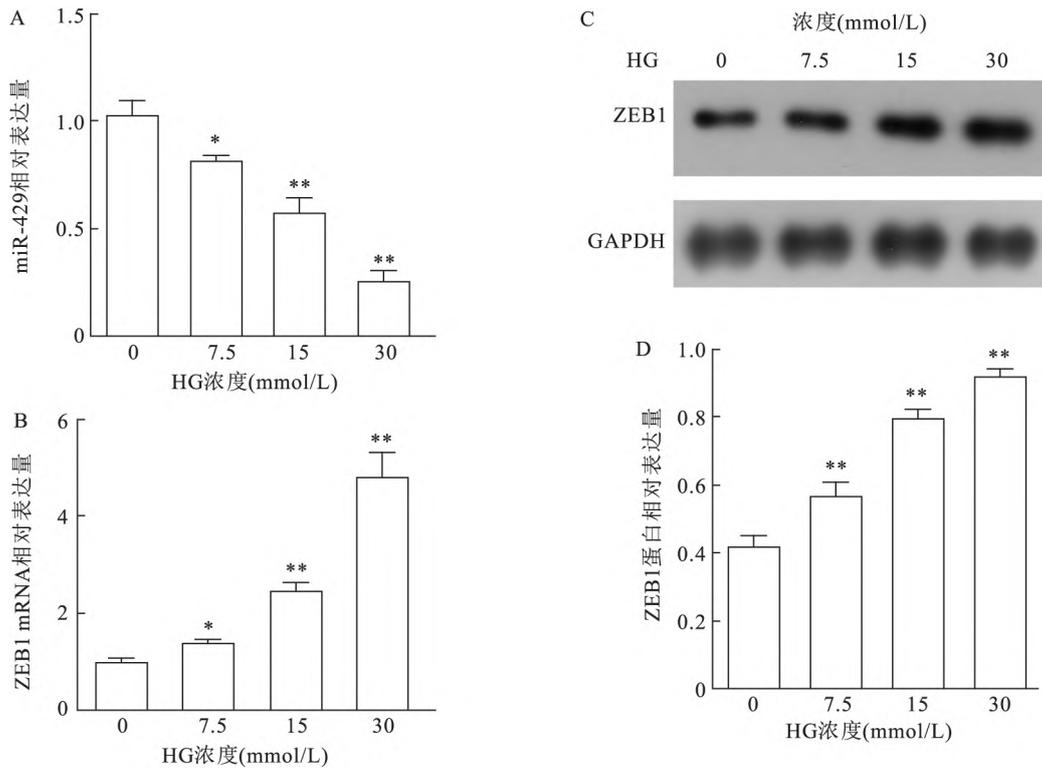


图3 HG 干预对 PANC-1 细胞中 miR-429 和 ZEB1 表达水平的影响

A: qRT-PCR 法检测 miR-429 表达水平; B: qRT-PCR 法检测 ZEB1 mRNA 表达水平; C: Western blot 法检测 ZEB1 蛋白表达水平; D: ZEB1 蛋白表达统计图; 与 0 mmol/L HG 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 转染后各组 PANC-1 细胞中 ZEB1 蛋白表达水平 与 mimics NC 组比较, mimics 组 PANC-1 细胞中 ZEB1 蛋白表达水平 [(0.115 ± 0.010) vs (0.795 ± 0.019)] 明显降低 (独立 $t = 55.372$, $P < 0.01$); 与 mimics + oe-NC 组比较, mimics + oe-ZEB1 组 PANC-1 细胞中 ZEB1 蛋白表达水平 [(0.580 ± 0.050) vs (0.129 ± 0.015)] 明显升高 (独立 $t = 15.049$, $P < 0.01$)。见图 5。

2.6 共转染对 HG 干预的 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达的影响 共转染的各组 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达差异有统计学意义 ($F = 194.499$, $P < 0.01$)。与 blank 组比较, HG 组 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达水平明显升高 (配对 $t = -17.241$, $P < 0.01$); 与 HG + mimics NC 组比较, HG + mimics 组 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达水平明显降低 (配对 $t = 34.141$, $P < 0.01$); 与 HG + mimics + oe-NC 组比较, HG + mimics + oe-ZEB1 组 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达水平明显升高 (配对 $t = -13.044$, $P < 0.01$)。见图 6。

2.7 共转染对 HG 干预的 PANC-1 细胞免疫逃逸的影响 共转染的各组 PANC-1 细胞增殖活性、细

胞凋亡水平和杀伤活性差异有统计学意义 ($F = 65.195, 99.831, 38.617$, $P < 0.01$)。各组 PANC-1 细胞分别与 CD8⁺ T 细胞共培养后, 与 blank 组比较, HG 组细胞增殖活性明显增加 (配对 $t = -21.357$, $P < 0.01$), 细胞凋亡水平明显降低 (配对 $t = 13.556$, $P < 0.01$), 杀伤活性明显降低 (配对 $t = 109.000$, $P < 0.01$); 与 HG + mimics NC 组比较, HG + mimics 组细胞增殖活性明显降低 (配对 $t = 6.136$, $P < 0.01$), 细胞凋亡水平明显升高 (配对 $t = -9.078$, $P < 0.01$), 杀伤活性明显升高 (配对 $t = -4.927$, $P = 0.039$); 与 HG + mimics + oe-NC 组比较, HG + mimics + oe-ZEB1 组细胞增殖活性明显增加 (配对 $t = -5.264$, $P < 0.01$), 细胞凋亡水平明显降低 (配对 $t = 10.357$, $P < 0.01$), 杀伤活性明显降低 (配对 $t = 6.041$, $P = 0.026$)。见图 7。

3 讨论

胰腺癌拥有独特的肿瘤微环境, 包括细胞外基质丰富和结缔组织增生等, 这些特性赋予胰腺癌细胞高度恶性, 促进了疾病的进展^[9]。高血糖是胰腺癌患者中常见的并发症, 与较高的病死率和较低的

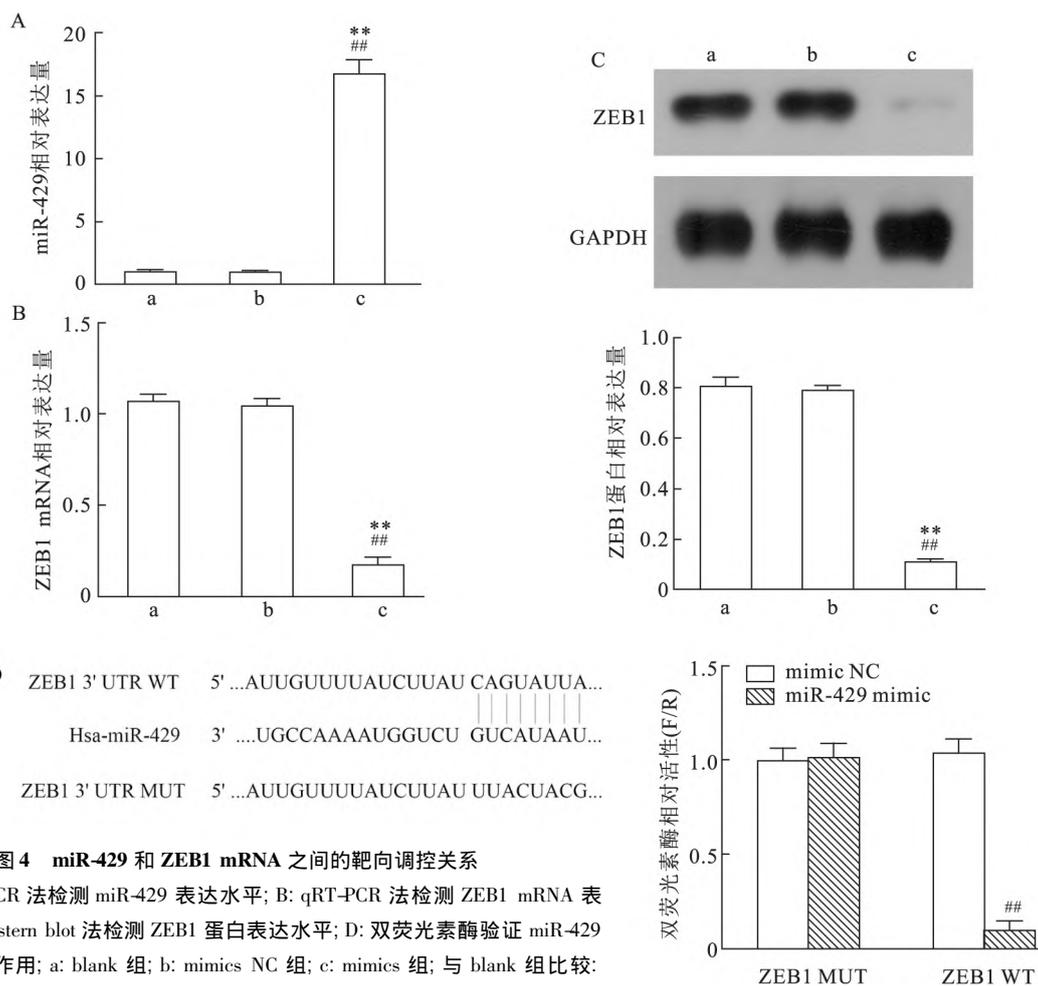
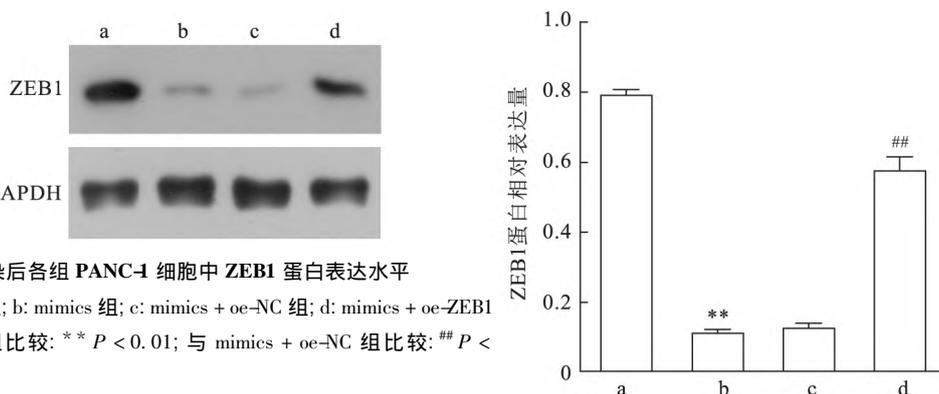


图4 miR-429和ZEB1 mRNA之间的靶向调控关系

A: qRT-PCR法检测miR-429表达水平; B: qRT-PCR法检测ZEB1 mRNA表达水平; C: Western blot法检测ZEB1蛋白表达水平; D: 双荧光素酶验证miR-429和ZEB1靶向作用; a: blank组; b: mimics NC组; c: mimics组; 与blank组比较: ** $P < 0.01$; 与mimics NC组比较: ## $P < 0.01$

图5 转染后各组PANC-1细胞中ZEB1蛋白表达水平

a: mimics NC组; b: mimics组; c: mimics + oe-NC组; d: mimics + oe-ZEB1组; 与mimics NC组比较: ** $P < 0.01$; 与mimics + oe-NC组比较: ## $P < 0.01$



生存率相关。在与糖尿病相关的肿瘤中,胰腺癌与高糖密切相关^[10]。过量的葡萄糖可能有助于癌细胞维持高代谢和不受控制的增殖^[11]。此外,研究^[12]显示,高血糖促进了胰腺癌细胞的增殖和转移。高血糖与肿瘤之间的生物学关联涉及多种机制,包括增殖失控、高胰岛素血症和炎症反应等^[13]。然而,有关高血糖与胰腺癌免疫学机制的相关文献较少。本研究中,高糖能够通过提高胰腺癌PANC-1细胞表面分子PD-L1的表达,降低CD8⁺T细胞对

PANC-1细胞的杀伤作用,从而促进PANC-1细胞的免疫逃逸。这种促免疫逃逸的作用与胰腺癌细胞PANC-1中miR-429表达的降低有关。研究^[14]报道称,miR-205和miR-200家族成员(miR-200、miR-141和miR-429)仅在PDAC细胞中表达。Song et al^[15]的研究表明,miR-429在PDAC组织和细胞系中显著降低,miR-429的低表达预示着PDAC患者的生存期较短。本研究还验证了miR-429在PDAC细胞系中的表达降低,miR-429的过表达能够

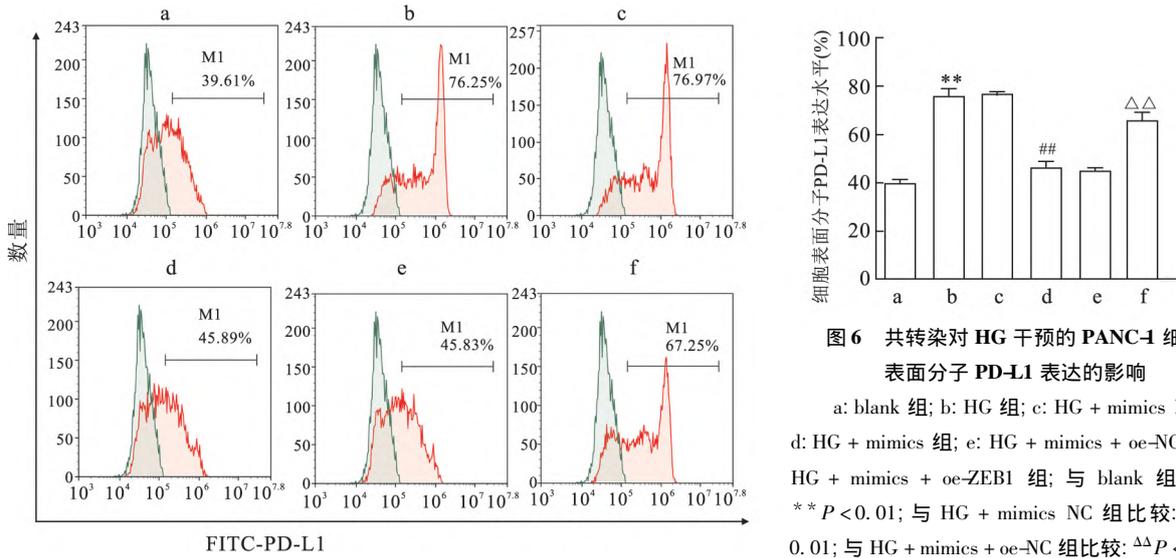


图6 共转染对 HG 干预的 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 表达的影响

a: blank 组; b: HG 组; c: HG + mimics NC 组; d: HG + mimics 组; e: HG + mimics + oe-NC 组; f: HG + mimics + oe-ZEB1 组; 与 blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HG + mimics NC 组比较: ## $P < 0.01$; 与 HG + mimics + oe-NC 组比较: △△ $P < 0.01$

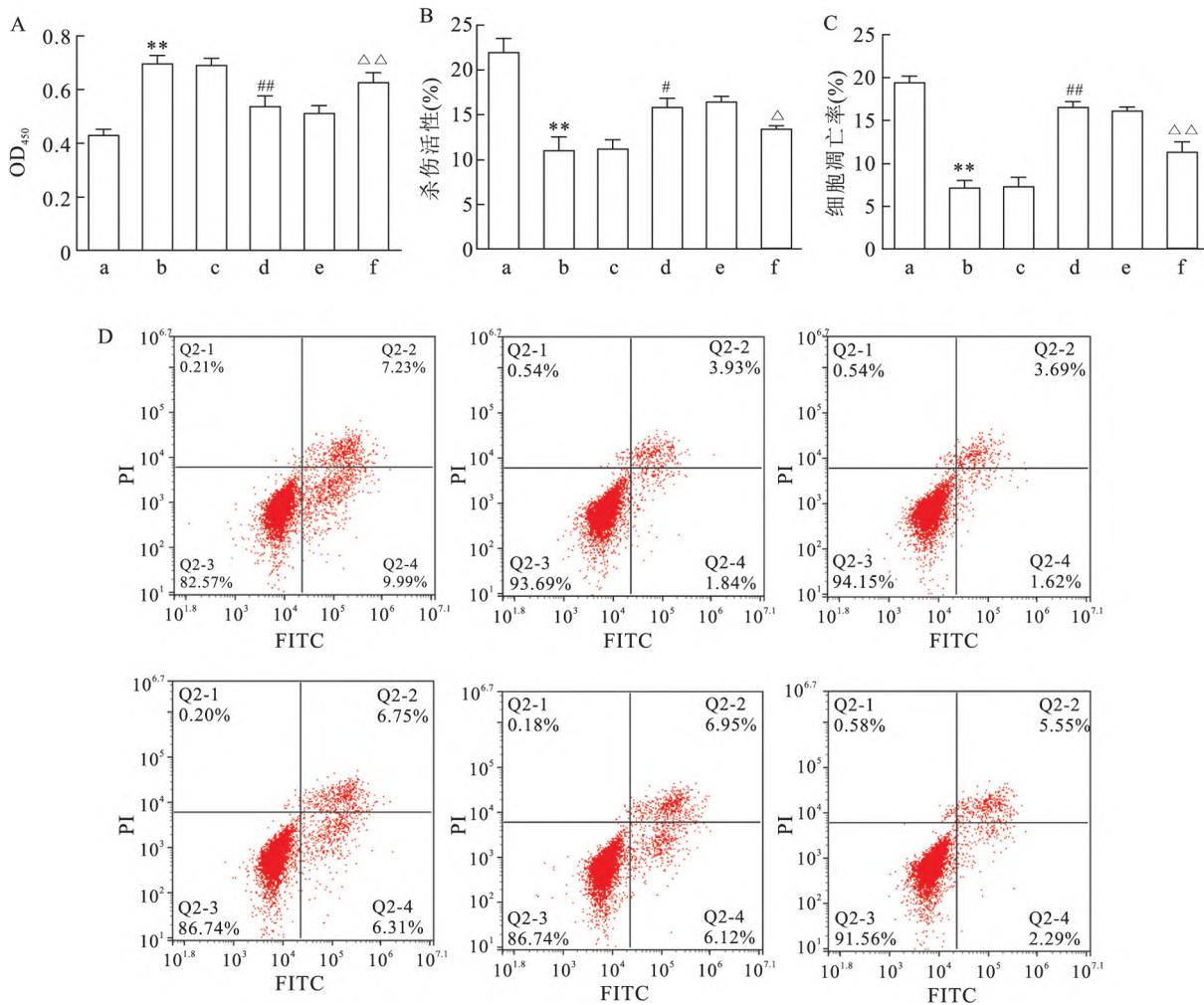


图7 共转染对 HG 干预的 PANC-1 细胞免疫逃逸的影响

A: CCK-8 法检测细胞增殖; B: LDH 释放法检测细胞活性; C、D: Annexin V FITC/PI 法检测细胞凋亡; a: blank 组; b: HG 组; c: HG + mimics NC 组; d: HG + mimics 组; e: HG + mimics + oe-NC 组; f: HG + mimics + oe-ZEB1 组; 与 blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HG + mimics NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 HG + mimics + oe-NC 组比较: △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

抑制 PANC-1 细胞表面分子 PD-L1 的表达水平,而细胞表面分子 PD-L1 的高表达是胰腺癌细胞发生免疫逃逸的基础条件。本研究阐明了高糖可以降低胰腺癌细胞 miR-429 的表达水平,提高癌细胞表面分子 PD-L1 表达水平,从而促进胰腺癌细胞发生免疫逃逸。这种机制可能是胰腺癌逃避免疫杀伤的一种途径。

TargetScan7.2 分析显示,miR-429 和 ZEB1 mRNA 之间存在靶向互补结合位点,且双荧光素酶报告实验、qRT-PCR 和 Western blot 实验证实了 miR-429 可以靶向 ZEB1 mRNA,这与先前的研究结果一致^[7]。本研究结果进一步表明,过表达 miR-429 能够降低 ZEB1 mRNA 和蛋白的表达水平,这提示 miR-429 对 ZEB1 具有靶向负调控作用。ZEB1 是人类 ZEB 家族的转录因子,对肿瘤侵袭和转移过程具有重要作用^[16]。研究^[17]表明,ZEB1 与上皮间充质转化相关,其异常高表达与肿瘤的不良预后有关,并且 ZEB1 能与 PD-L1 基因启动子区域靶向结合^[18]。PD-L1 在多种癌细胞中过度表达,从而抑制 T 细胞活性。研究^[19]发现,PD-L1 在癌细胞中高表达,从而导致肿瘤患者预后不良。PD-L1/PD-1 信号通路作为肿瘤免疫抑制的重要组成部分,能够抑制 T 淋巴细胞的活化,增强肿瘤细胞的免疫耐受,从而实现肿瘤免疫逃逸^[20]。本研究结果显示,ZEB1 在高糖处理的胰腺癌细胞 PANC-1 中异常高表达,而过表达 ZEB1 可逆转 miR-429 过表达,对高糖诱导的 PANC-1 细胞免疫逃逸具有抑制作用。提示,高糖可能通过抑制 miR-429 的表达来促进 PANC-1 细胞的免疫逃逸。此外,过表达 ZEB1 可以逆转 miR-429 对 PANC-1 细胞免疫逃逸的抑制作用。这进一步表明高糖通过抑制 miR-429 的表达,靶向上调 ZEB1 的表达水平,减少 CD8⁺T 细胞对 PANC-1 细胞的杀伤,提高 PANC-1 表面分子 PD-L1 的表达水平,进而抑制胰腺癌的抗癌免疫,促进免疫逃逸。因此,miR-429/ZEB1 轴可能在高糖诱导的胰腺癌 PANC-1 细胞免疫逃逸中发挥重要作用。

综上所述,高糖处理的胰腺癌 PANC-1 细胞中 miR-429 表达低,ZEB1 表达高。过表达 miR-429 可以促进 CD8⁺T 细胞对高糖诱导的 PANC-1 细胞的杀伤作用,并抑制肿瘤细胞的免疫逃逸,而过表达 ZEB1 可以逆转 miR-429 对肿瘤细胞免疫逃逸的抑制作用,同时 miR-429 可靶向抑制 ZEB1 的表达。本研究从体外细胞水平上初步探讨了高糖处理通过 miR-429/ZEB1 轴对胰腺癌 PANC-1 细胞免疫逃逸

的作用。然而,本研究仍存在不足之处。首先,本研究并未在细胞试验基础上进行体内动物实验。另一方面,本研究未呈现 ZEB1 对细胞表面分子 PD-L1 水平产生直接影响的相关数据,后续研究将进一步验证本研究的结论。

参考文献

- [1] Ge W, Goga A, He Y, et al. miR-802 suppresses acinar-to-ductal reprogramming during early pancreatitis and pancreatic carcinogenesis [J]. *Gastroenterology* 2022, 162(1): 269–84.
- [2] Amrutkar M, Gladhaug I P. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine [J]. *Cancers (Basel)* 2017, 9(11): 157.
- [3] 杨金收, 蔡洁, 由磊, 等. 胰腺癌与糖尿病的双向因果机制研究进展 [J]. *肿瘤学杂志* 2021, 27(2): 87–94.
- [4] Chovsepian A, Prokopchuk O, Petrova G, et al. Diabetes increases mortality in patients with pancreatic and colorectal cancer by promoting cachexia and its associated inflammatory status [J]. *Mol Metab* 2023, 73: 101729.
- [5] Guo D, Tong Y, Jiang X, et al. Aerobic glycolysis promotes tumor immune evasion by hexokinase2-mediated phosphorylation of IκBα [J]. *Cell Metab* 2022, 34(9): 1312–24.
- [6] Li D, Wang H, Song H, et al. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells [J]. *Oncotarget* 2017, 8(49): 85276–89.
- [7] Peng Z, Ouyang X, Wang Y, et al. MAPKAPK5-AS1 drives the progression of hepatocellular carcinoma via regulating miR-429/ZEB1 axis [J]. *BMC Mol Cell Biol* 2022, 23(1): 21.
- [8] 秦燕勤, 陈玉龙, 李建生. 细胞共培养方法的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学* 2016, 28(8): 765–8.
- [9] Takahashi K, Ehata S, Koinuma D, et al. Pancreatic tumor microenvironment confers highly malignant properties on pancreatic cancer cells [J]. *Oncogene* 2018, 37(21): 2757–72.
- [10] Kim D S, Scherer P E. Obesity, diabetes, and increased cancer progression [J]. *Diabetes Metab J* 2021, 45(6): 799–812.
- [11] Ghanavat M, Shahrouzian M, Deris Zayeri Z, et al. Digging deeper through glucose metabolism and its regulators in cancer and metastasis [J]. *Life Sci* 2021, 264: 118603.
- [12] George S, Jean-Baptiste W, Ali A Y, et al. The role of type 2 diabetes in pancreatic cancer [J]. *Cureus* 2022, 14(6): e26288.
- [13] Garg S K, Maurer H, Reed K, et al. Diabetes and cancer: Two diseases with obesity as a common risk factor [J]. *Diabetes Obes Metab* 2014, 16(2): 97–110.
- [14] Yin J, Xu W Q, Ye M X, et al. Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med* 2017, 21(12): 3467–80.
- [15] Song B, Zheng K, Ma H, et al. miR-429 determines poor outcome and inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma growth by targeting TBK1 [J]. *Cell Physiol Biochem* 2015, 35(5): 1846–56.
- [16] Liu M, Zhang Y, Yang J, et al. Zinc-dependent regulation of Zeb1 and Yap1 coactivation promotes epithelial-mesenchymal transition

- plasticity and metastasis in pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology* 2021 ,160(5) : 1771 – 83.
- [17] Budimir N ,Thomas G D ,Dolina J S et al. Reversing T-cell exhaustion in cancer: Lessons learned from PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade[J]. *Cancer Immunol Res* 2022 ,10(2) : 146 – 53.
- [18] Tsutsumi S ,Saeki H ,Nakashima Y et al. Programmed death-ligand 1 expression at tumor invasive front is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci* 2017 ,108(6) : 1119 – 27.
- [19] Xu Y ,Song G ,Xie S et al. The roles of PD-1/PD-L1 in the prognosis and immunotherapy of prostate cancer[J]. *Mol Ther* 2021 ,29(6) : 1958 – 69.
- [20] Tang Q ,Chen Y ,Li X et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers[J]. *Front Immunol* 2022 ,13:964442.

Effect of high glucose on immune escape of pancreatic cancer cells by regulating miR-429/ZEB1 axis

Zhang Zhichao¹ ,Li Guanghui¹ ,Zhu Xuehe¹ ,Wei Qiang¹ ,Wang Fei² ,Zhao Haiping²

(¹Dept of Emergency ,²Dept of Hepatobiliary Surgery ,

Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University Hohhot 010010)

Abstract *Objective* To explore the impact of high glucose (HG) intervention on immune escape of pancreatic cancer cells and its molecular mechanisms. *Methods* PANC-1 cells were treated with different concentrations of glucose (0, 7.5, 15, 30 mmol/L) for 24 h to establish high glucose intervention PANC-1 cells. miR-429 mimics and its negative control (mimics NC) were transfected into PANC-1 cells, which were divided into control group, HG group, HG + mimics NC group, HG + mimics group, HG + mimics + oe-NC group, and HG + mimics + oe-ZEB1 group. Flow cytometry was utilized to measure the expression level of cell surface molecule PD-L1; qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-429 and ZEB1 mRNA in cells; Western blot was used to detect the expression level of ZEB1 protein in cells. The above-mentioned PANC-1 cells from each group were co-cultured with CD8⁺ T cells to establish a co-culture system, and CCK-8 was used to assess cell proliferation activity; apoptosis levels of cells were measured using flow cytometry; lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to detect the killing effect of CD8⁺ T cells on PANC-1 cells; dual-luciferase reporter system was used to validate the target-regulatory relationship between miR-429 and ZEB1. *Results* HG could promote the expression of cell surface molecules PD-L1 and ZEB1 in PANC-1 cells ($P < 0.05$), inhibit the expression of miR-429, and exhibit concentration dependence. Overexpression of miR-429 could significantly suppress the expression of cell surface molecule PD-L1 induced by HG in PANC-1 cells, while overexpression of ZEB1 could reverse the inhibitory effect of miR-429 overexpression on the expression of cell surface molecule PD-L1 induced by HG. After establishing a co-culture system with CD8⁺ T cells, compared with the control group, the proliferation activity of PANC-1 cells in the HG group significantly increased, and the apoptosis rate and cytotoxicity significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the HG + mimics NC group, the proliferation activity of PANC-1 cells in the HG + mimics group significantly decreased, and the apoptosis level and cytotoxicity significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the HG + mimics group, the proliferation activity of PANC-1 cells in the HG + mimics + oe-ZEB1 group significantly increased, and the apoptosis rate and cytotoxicity significantly decreased ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-429 negatively regulated ZEB1. *Conclusion* High glucose promotes immune escape of PANC-1 cells by down-regulating the expression level of miR-429, negatively regulating the expression of ZEB1 mRNA, and increasing the expression level of cell surface molecule PD-L1 in PANC-1 cells.

Key words miR-429; pancreatic cancer; zinc finger E-box binding homeobox protein 1; high glucose; immune escape