

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.003

· 基础研究 ·

miR-192-5p 通过靶向 ZEB2 调控胰腺癌 PANC-1 细胞的恶性生物学行为

韩向阳^{1a}, 张荣花^{1a}, 李玉凤², 苏静慧^{1a}, 曹雨萌^{1a}, 黄金平^{1a}, 章广玲^{1b}, 李景武² (1. 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. 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 063210; 2. 唐山市人民医院 肿瘤研究所 河北省分子肿瘤学重点实验室, 河北 唐山 063001)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-192-5p 靶向 E 盒锌指结合同源框 2 (ZEB2) 对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化 (EMT) 的影响及其作用机制。 **方法:** 利用 TCGA 数据库数据分析 miR-192-5p 和 ZEB2 在胰腺癌组织中的表达及两者的相关性。采用 qPCR 法和 WB 法分别检测人正常胰腺上皮细胞 HPNE 和胰腺癌 PANC-1 细胞中 miR-192-5p 和 ZEB2 的表达水平。利用脂质体转染技术转染 PANC-1 细胞, 实验分为 miR-192-5p mimic 组、Mimic NC 组、miR-192-5p inhibitor 组、Inhibitor NC 组、Mimic NC+pcDNA3.1 组、miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组、miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组。CCK-8 法、克隆形成、划痕愈合、Transwell 实验分别检测转染 PANC-1 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力。qPCR 法、WB 法、双重免疫荧光实验检测 PANC-1 细胞中 ZEB2、E-cadherin、vimentin 的表达水平。通过生物信息学网站预测 miR-192-5p 的靶基因, 并利用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-192-5p 对靶基因的调控作用。 **结果:** 胰腺癌组织中 ZEB2 的表达显著高于正常胰腺组织 ($P<0.01$), 且胰腺癌组织中 miR-192-5p 和 ZEB2 表达呈负相关 ($r=-0.419, P<0.01$)。与 HPNE 细胞比较, PANC-1 细胞中 miR-192-5p 低表达、ZEB2 蛋白高表达 (均 $P<0.01$)。miR-192-5p 过表达后, PANC-1 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力均显著降低, E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达均上调、vimentin 和 ZEB2 mRNA 和蛋白表达均下调; 而抑制 miR-192-5p 后得到了相反的结果 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。miR-192-5p 靶向调控 ZEB2 的表达, 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程的抑制作用。 **结论:** miR-192-5p 通过靶向 ZEB2 调控胰腺癌 PANC-1 细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 胰腺癌; miR-192-5p; E 盒锌指结合同源框 2; PANC-1 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

[中图分类号] R735.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)10-0879-10

miR-192-5p regulates the malignant biological behaviors of pancreatic cancer PANC-1 cells by targeting ZEB2

HAN Xiangyang^{1a}, ZHANG Ronghua^{1a}, LI Yufeng², SU Jinghui^{1a}, CAO Yumeng^{1a}, HUANG Jinping^{1a}, ZHANG Guangling^{1b}, LI Jingwu² (1. a. Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences; b. Hebei Provincial Key Laboratory of Medical-Industrial Integration Precision Medicine, School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China; 2. Hebei Provincial Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Research Institute of Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of miR-192-5p targeting ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) on the proliferation, migration, invasion and EMT (epithelial-mesenchymal transition) of pancreatic cancer PANC-1 cells. **Methods:** The TCGA database was used to analyze the expression of miR-192-5p and ZEB2 as well as their correlation in pancreatic cancer tissue. The expression levels of miR-192-5p and ZEB2 were detected by qPCR and WB in human normal pancreatic epithelial HPNE cells and pancreatic cancer PANC-1 cells. PANC-1 cells were transfected with liposome, and divided into miR-192-5p mimic group, Mimic NC group, miR-192-5p inhibitor group, Inhibitor NC group, Mimic NC+pcDNA3.1 group, miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 group, and miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 group. The proliferation, colony formation, migration and invasion abilities of transfected PANC-1 cells were detected by CCK-8, colony formation, scratch healing and Transwell experiments, respectively. The expression of ZEB2, E-cadherin and vimentin was detected by qPCR, WB method and double immunofluorescence assay. Bioinformatics was used to predict the target gene of miR-192-5p, and the regulatory effect of miR-192-5p on the target gene was verified by dual luciferase report gene

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目 (No.H2021209026); 河北省省级科技计划资助项目 (No.213777115D); 河北省人力资源和社会保障厅科研资助项目 (No.C20210340)

[作者简介] 韩向阳 (1988—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤相关基础研究, E-mail: 693149466@qq.com

[通信作者] 章广玲, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn; 李景武, E-mail: tslijingwu@163.com

experiment. **Results:** The expression of ZEB2 in pancreatic cancer tissue was significantly higher than that in normal pancreatic tissue ($P<0.01$), and the expression of miR-192-5p and ZEB2 in pancreatic cancer tissue was inversely correlated ($r=-0.419$, $P<0.01$). Compared with normal pancreatic epithelial HPNE cells, the expression level of miR-192-5p was significantly lower while the expression level of ZEB2 protein was higher in pancreatic cancer PANC-1 cells (all $P<0.01$). Overexpression of miR-192-5p significantly reduced the proliferation, colony formation, migration and invasion ability of PANC-1 cells, upregulated the mRNA and protein expression of E-cadherin, and downregulated the mRNA and protein expression of vimentin and ZEB2, while inhibition of miR-192-5p achieved the opposite results ($P<0.05$ or $P<0.01$). miR-192-5p targetedly regulated the expression of ZEB2, and overexpression of ZEB2 could reverse the inhibitory effects of miR-192-5p overexpression on the proliferation, colony formation, migration, invasion and EMT of PANC-1 cells. **Conclusion:** miR-192-5p regulates the malignant biological behaviors of pancreatic cancer PANC-1 cells by targeting ZEB2.

[Key words] pancreatic cancer; miR-192-5p; zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2); PANC-1 cell; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(10): 879-888. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.10.003]

胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其恶性程度高、侵袭性强、发展迅速和预后极差^[1],大部分患者在确诊时已是癌症晚期,错过了手术治疗的最佳时间,因此亟须寻找胰腺癌诊断的特异性标志物以及临床治疗的新靶点。微小RNA(miRNA)是一类短链非编码RNA,与多种人类疾病的发生发展密切相关^[2]。研究结果^[3-8]表明,miR-192-5p与结肠癌、胃癌、肺癌、肝癌、膀胱癌和乳腺癌等的发病率密切相关。生物信息学网站预测结果显示,E盒锌指结合同源框2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2)可能是miR-192-5p的靶基因,但是miR-192-5p是否通过靶向调控ZEB2的表达影响胰腺癌细胞的生物学功能尚不明确。本研究旨在探讨miR-192-5p对胰腺癌PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程的影响,以期探寻胰腺癌的早期诊断和治疗的生物标志物提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人正常胰腺上皮细胞HPNE与胰腺癌细胞PANC-1购自上海富衡生物技术有限公司。胎牛血清购自以色列Biological Industries公司,DMEM细胞培养基购自美国GIBCO公司,RPMI 1640培养基购自美国Hyclone公司,Lipofectamine™ 2000试剂、TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover(逆转录试剂盒)和2×M5 Hiper SYBR Premix EsTaq(with Tli RNaseH)(qPCR试剂盒)购自北京聚合美生物技术公司,miRNA第一链cDNA合成(加尾法)试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,新快速SDS-PAGE凝胶制备试剂盒和CCK-8试剂盒购自北京庄盟生物基因有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司,兔源抗E-cadherin、vimentin和ZEB2单克隆抗体均购自

Affinity生物研究中心,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗、细胞裂解液、ECL显色试剂盒均购自普利莱基因技术有限公司,Alexa Fluor 555标记驴抗兔荧光二抗、DAPI、抗荧光衰减封片剂和双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,Triton-X-100购自北京索莱宝科技有限公司,miR-192-5p模拟物(mimic)及阴性对照(mimic NC)、miR-192-5p抑制物(inhibitor)及阴性对照(inhibitor NC)均购自天津中实同创有限公司。

1.2 数据库数据获取及分析

通过癌症基因组图谱(TCGA)数据库(<http://tcga-data.nci.nih.gov/taga/>)获得179例胰腺癌组织和171例癌旁组织中miR-192-5p和ZEB2的表达谱,在线分析胰腺癌组织的基因表达信息。登录Starbase数据库,借助在线工具获取ZEB2与miR-192-5p在胰腺癌组织中的表达相关性数据。

1.3 细胞培养、分组及转染

人正常胰腺上皮细胞HPNE和胰腺癌PANC-1细胞分别培养于含有10%胎牛血清(FBS)、100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的RPMI 1640和DMEM高糖培养基中,于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养。取对数生长期PANC-1细胞,利用Lipofectamine™ 2000进行转染实验。实验分为miR-192-5p mimic组、Mimic NC组、miR-192-5p inhibitor组、Inhibitor NC组、Mimic NC+pcDNA3.1组、miR-192-5p mimic+pcDNA3.1组、miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2组。转染24 h或48 h后收集各组细胞,qPCR法检测转染效率后进行后续实验。

1.4 qPCR法检测PANC-1细胞中miR-192-5p和ZEB2 mRNA的表达

使用TRIzol试剂提取转染后各组PANC-1细胞中总RNA,并按照逆转录试剂盒说明书合成cDNA。采用qPCR试剂进行qPCR检测实验,实验中所用的

上下游引物序列见表1。反应体系20 μL,包括cDNA模版2 μL、上下游引物各1.6 μL、2×M5 HiPer SYBR Es Taq(with Tli RNaseH) 10 μL、50×ROX Reference Dye II 0.4 μL、DEPC水6 μL。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s、60 °C退火34 s、72 °C延伸30 s,共循环40次。获取每个反应的Ct值(临界循环数),按照2^{-ΔΔCt}法处理实验数据。

1.5 CCK-8法检测PANC-1细胞的增殖能力

取转染后各组PANC-1细胞进行消化、计数,以2×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板中,在培养24、48、72和96 h时向各孔中加入10 μL CCK-8试剂和100 μL无双抗培养基,继续培养2 h后,上酶标仪在450 nm波长下检测各孔光密度(D)值,以D值表示细胞的增殖能力。

表1 PCR引物序列

基因名称	序列(5'→3')
miR-192-5p*	F: CGCTGACCTATGAATTGACAGCC
U6*	F: CTCGCTTCGGCAGCACATA
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT R: GAAGGCTGGGGCTCATT
E-cadherin	F: AGTCACTGACACCAACGATAAT R: ATCGTTGTTCCTGATTTGTG
Vimentin	F: TCGTGAATACCAAGACCTGCTCAATG R: AATCCTGCTCTCCTCGCCTTCC
ZEB2	F: GAAGACAGAGAGTGGCATGTAT R: GTGTGTTCGTATTTATGTCGCA

*试剂公司未提供“R”

1.6 克隆形成实验检测PANC-1细胞的克隆形成能力

将转染24 h后的各组PANC-1细胞进行消化、计数,将细胞悬液以1×10³个/孔的密度接种到6孔板中。常规培养10~15 d后,在光学显微镜(×40)下观察细胞克隆形成情况,以细胞数≥50个为1个克隆,计数克隆数。

1.7 划痕愈合实验检测PANC-1细胞的迁移能力

将转染后各组PANC-1细胞以2×10⁵个/孔的密度接种至6孔板,待细胞汇合度达80%时,用200 μL的枪头垂直于6孔板划痕。用PBS冲洗后,分别在培养0、24、48 h时在光学显微镜下(×40)观察、拍照,用ImageJ软件测量划痕面积,并计算划痕愈合率,划痕愈合率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积×100%,用划痕愈合率表示细胞的迁移能力。

1.8 Transwell实验检测PANC-1细胞的迁移和侵袭能力

细胞转染24 h后,将密度为2×10⁴个/孔的细胞接种至Transwell上室中,下室加入800 μL含20% FBS的完全培养基进行迁移实验。将各组密度为5×10⁴个/孔的细胞接种在预铺基质胶的Transwell小室的上室中,下室加入800 μL含20% FBS的完全培养基进行侵袭实

验。两种实验的Transwell小室分别培养24 h后,弃掉培养基,结晶紫染色10 min后,在光学显微镜(×100)下随机选取5个视野计数穿膜细胞数。

1.9 WB法检测PANC-1细胞中ZEB2、E-cadherin和vimentin的表达

提取各组细胞总蛋白后,以BCA检测试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后按照每孔15 μg上样,进行10%SDS-PAGE,将蛋白质条带转移至PVDF膜上,在5%脱脂奶粉中室温封闭2 h,加入一抗GAPDH(1:10 000)、E-cadherin(1:3 000)、vimentin(1:3 000)、ZEB2(1:2 000)后4 °C过夜。用TBST清洗后,加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000)后室温处理2 h,TBST清洗后,用ECL曝光、显色,通过ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.10 双荧光素酶报告基因实验验证miR-192-5p与ZEB2的靶向关系

将包含miR-192-5p野生型(WT)结合位点和突变型(MUT)结合位点的ZEB2的3'UTR序列克隆到psiCHECK2.0载体中,获得ZEB2的荧光报告载体ZEB2-WT和ZEB2-MUT。将PANC-1细胞接种于24孔板后,按照每孔ZEB2-MUT/WT质粒500 ng、miR-192-5p mimic(40 pmol/L)共转染到PANC-1细胞中,每组设置3个复孔,转染48 h后按照试剂盒说明书裂解细胞,测定荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光强度(RLU),计算二者比值。

1.11 双重免疫荧光实验检测PANC-1细胞中E-cadherin和vimentin的相对表达水平

将转染24 h后的PANC-1细胞接种到共聚焦小皿上继续培养。待细胞汇合度达50%时,按以下方法(均在摇床上)进行实验:每孔加入500 μL 4%多聚甲醛固定30 min,加入500 μL 0.2% Triton-X-100破坏细胞膜(室温10 min),在500 μL 5% BSA中封闭1 h;吸去封闭液,加入E-cadherin和vimentin一抗(1:250)室温结合30 min,4 °C过夜;加入荧光二抗(1:500)避光处理45 min,DAPI染核5 min,抗荧光衰减封片剂封片,于荧光显微镜下观察、拍照,用ImageJ软件分析红色荧光与蓝色荧光强度的比值。

1.12 统计学处理

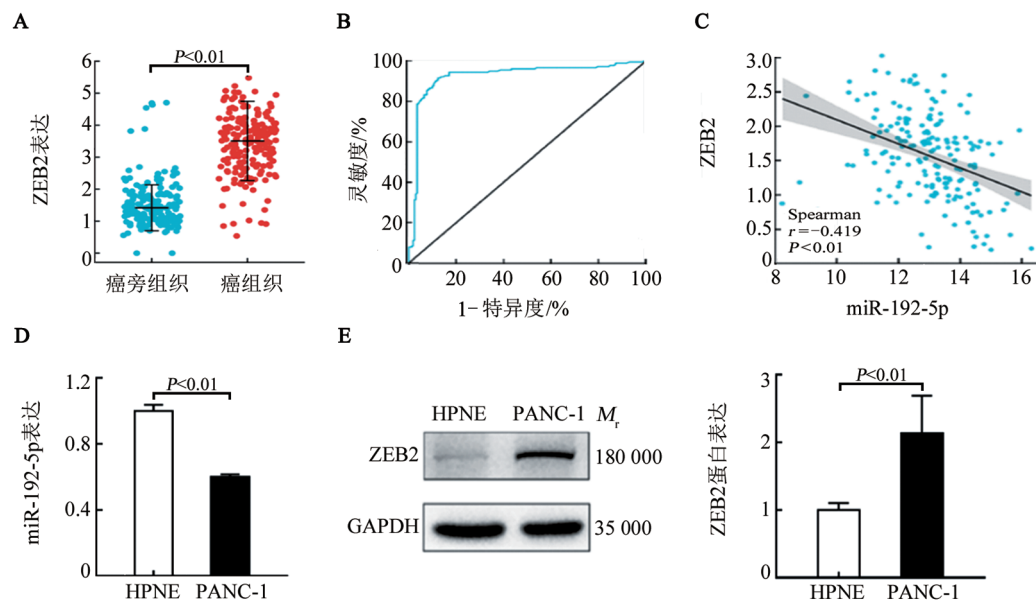
以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS 18.0软件对实验数据进行统计分析,用GraphPad Prism 8.0软件进行绘图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的差异比较采用双尾t检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,多组中的两两比较采用SNK-q检验;胰腺癌组织中miR-192-5p和ZEB2表达的相关性分析采用Pearson相关分析。以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织和 PANC-1 细胞中 miR-192-5p 低表达而 ZEB2 高表达

从TCGA数据库中获得179例胰腺癌组织和171例癌旁组织中miR-192-5p和ZEB2的表达谱,胰腺癌组织中ZEB2 mRNA表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$,图1A),ROC曲线下面积为0.924,其灵敏度为91.6%,

特异度为87.7%(图1B)。胰腺癌组织中miR-192-5p和ZEB2 mRNA的表达水平呈负相关($r=-0.419$, $P<0.01$;图1C)。qPCR法检测结果(图1D)显示,胰腺癌PANC-1细胞中miR-192-5p的表达水平显著低于HPNE细胞($P<0.01$)。WB法检测结果(图1E)显示,PANC-1细胞中ZEB2蛋白的表达水平显著高于HPNE细胞($P<0.01$)。结果表明,胰腺癌组织和PANC-1细胞中miR-192-5p低表达而ZEB2高表达。



A:TCGA 数据库中胰腺癌组织中 ZEB2 的表达;B:数据库中胰腺癌组织 ZEB2 检测数据的 ROC 曲线;C:miR-192-5p 与 ZEB2 相关性分析;D:qPCR 法检测 PANC-1 细胞中 miR-192-5p 表达水平;E:WB 法检测 PANC-1 细胞中 ZEB2 蛋白表达水平

图1 miR-192-5p 和 ZEB2 在胰腺癌组织和细胞中的表达

2.2 miR-192-5p 变化对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、克隆形成的影响

qPCR法检测结果(图2A)显示,miR-192-5p mimic组PANC-1细胞中miR-192-5p的相对表达水平显著高于Mimic NC组($P<0.01$);miR-192-5p inhibitor组PANC-1细胞中miR-192-5p的相对表达水平显著低于Inhibitor NC组($P<0.01$)。CCK-8实验结果(图2B、C)显示,转染第4天时,miR-192-5p mimic组PANC-1细胞的增殖水平显著低于Mimic NC组($P<0.01$),miR-192-5p inhibitor组显著高于Inhibitor NC组($P<0.01$)。克隆形成实验结果(图2D)显示,miR-192-5p mimic组PANC-1细胞的克隆形成数显著低于Mimic NC组($P<0.01$),miR-192-5p inhibitor组显著高于Inhibitor NC组($P<0.01$)。结果表明,过表达miR-192-5p可显著抑制PANC-1细胞的增殖和克隆形成能力,而抑制miR-192-5p的表达则可增强PANC-1的增殖和克隆形成能力。

2.3 miR-192-5p 变化对胰腺癌 PANC-1 细胞迁移和侵袭的影响

划痕愈合实验结果(图3A)显示,miR-192-5p

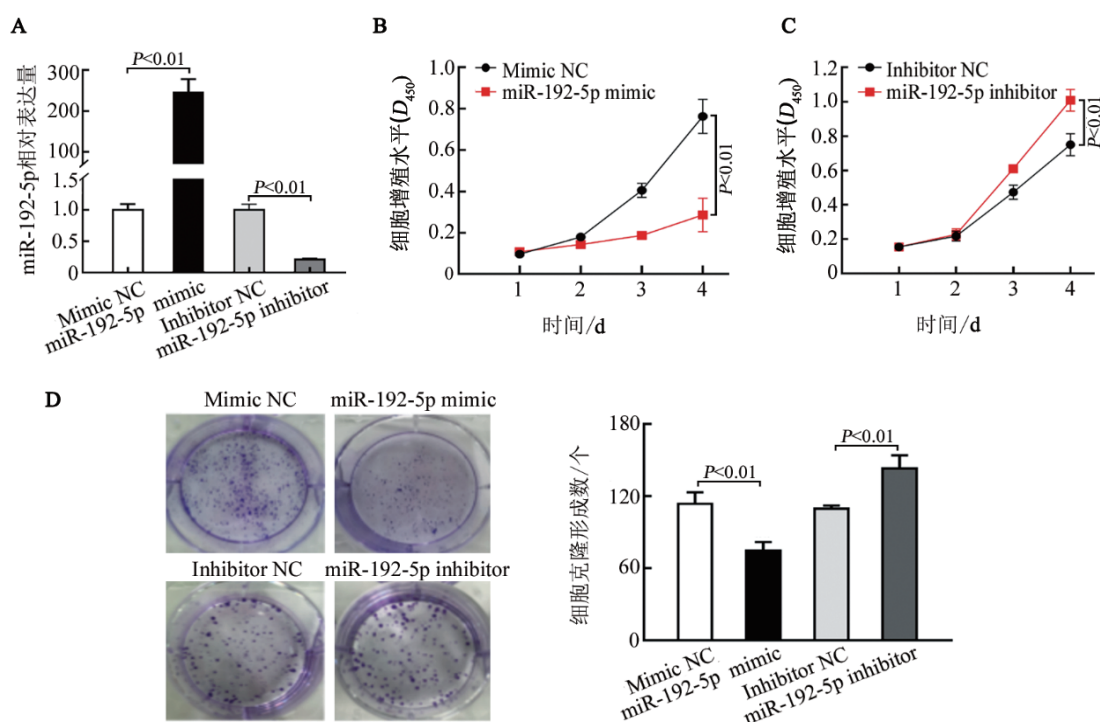
mimic组PANC-1细胞的划痕愈合率显著低于Mimic NC组,miR-192-5p inhibitor组显著高于Inhibitor NC组(均 $P<0.01$)。Transwell实验结果(图3B、C)显示,miR-192-5p mimic组PANC-1细胞迁移数和侵袭数显著低于Mimic NC组,miR-192-5p inhibitor组PANC-1细胞迁移数和侵袭数显著高于Inhibitor NC组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果表明,过表达miR-192-5p可显著抑制PANC-1细胞的迁移和侵袭能力,而抑制miR-192-5p的表达则可显著提高PANC-1细胞的迁移和侵袭能力。

2.4 miR-192-5p 变化对胰腺癌 PANC-1 细胞 EMT 进程的影响

qPCR法和WB法检测结果(图4A、B)显示,miR-192-5p mimic组PANC-1细胞中EMT信号通路上皮标志物E-cadherin的mRNA和蛋白表达水平均显著高于Mimic NC组,间质标志物vimentin的mRNA和蛋白表达水平均显著低于Mimic NC组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);miR-192-5p inhibitor组PANC-1细胞中E-cadherin的mRNA和蛋白的表达水平均显

著低于 Inhibitor NC 组, vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于 Inhibitor NC 组(均 $P < 0.05$)。结果表明, 过表达 miR-192-5p 可显著抑制 PANC-1 细胞

EMT 进程, 而抑制 miR-192-5p 的表达则可显著促进 PANC-1 细胞 EMT 进程。



A: qPCR法检测细胞转染效率; B、C: CCK-8法检测细胞增殖能力; D: 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

图2 过表达或敲减 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞增殖及克隆形成能力的影响

2.5 miR-192-5p 靶向 ZEB2 并抑制其表达

利用 Targetscan、MiRDB、Starbase 和 DIANA TOOLS 生物信息学网站预测 miR-192-5p 的候选靶基因, 4 个网站中共同的候选靶基因有 21 个(图 5A)。TargetScan 数据库预测 miR-192-5p 与 ZEB2 之间存在高度保守的互补序列的结合位点(图 5B)。因此, 选取具有较高评分结果的 ZEB2 作为 miR-192-5p 的可能靶基因。双荧光素酶报告基因实验结果(图 5C)显示, 与 Mimic NC 组相比, 共转染 miR-192-5p mimic 和 ZEB2-3'UTR WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$), 而共转染 miR-192-5p mimic 和 ZEB2-3'UTR MUT 组细胞的荧光素酶活性无显著变化($P > 0.05$)。qPCR 法和 WB 法检测结果(图 5D、E)显示, miR-192-5p mimic 组细胞中 ZEB2 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于 Mimic NC 组(均 $P < 0.05$); miR-192-5p inhibitor 组细胞中 ZEB2 mRNA 和蛋白水平均显著高于 Inhibitor NC 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明, miR-192-5p 靶向 ZEB2 并负调控其表达。

2.6 过表达 ZEB2 可逆转 miR-192-5p 对 ZEB2 表达的抑制作用

WB 法检测结果(图 6)显示, miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组 PANC-1 细胞 ZEB2 蛋白的表达水平显著低于 Mimic NC+pcDNA3.1 组($P < 0.01$), miR-192-5p

mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组显著高于 miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组($P < 0.05$)。结果表明, 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 ZEB2 表达的抑制作用。

2.7 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 检测结果(表 2)显示, 上调 miR-192-5p 抑制 PANC-1 细胞的增殖, 过表达 ZEB2 后可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用。

2.8 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的抑制作用

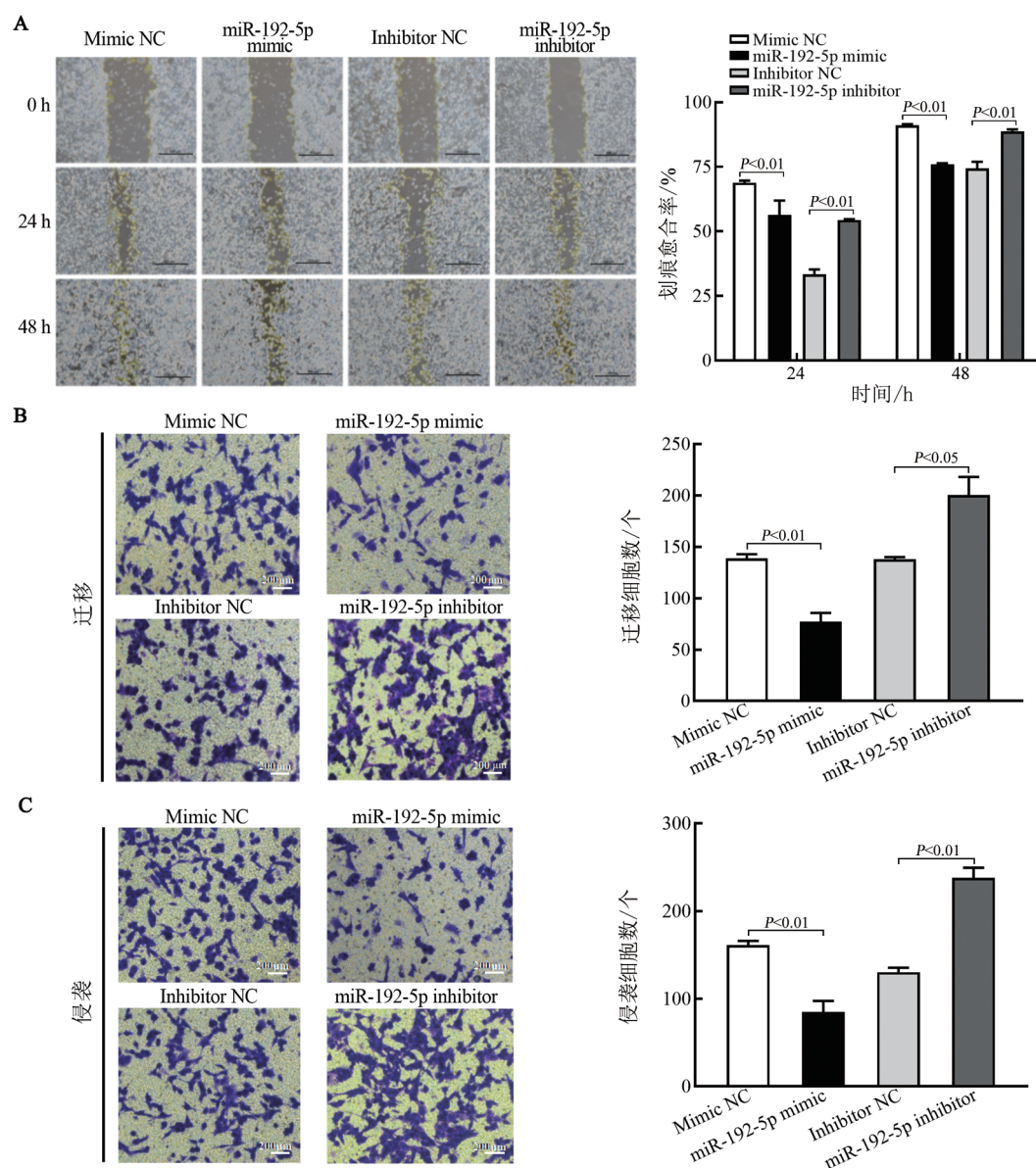
Transwell 实验结果(图 7)显示, miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组细胞迁移数($P < 0.01$)和侵袭数($P < 0.05$)均显著低于 Mimic NC+pcDNA3.1 组, miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组细胞迁移数($P < 0.01$)和侵袭数($P < 0.05$)均高于 miR-192-5p mimic pcDNA3.1 组。结果表明, 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的抑制作用。

2.9 过表达 ZEB2 可部分逆转上调 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞 EMT 进程的抑制作用

双重免疫荧光实验结果(图 8)显示, miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组 PANC-1 细胞 EMT 进程中

E-cadherin的表达水平显著高于Mimic NC+pcDNA3.1组($P<0.05$), miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2组显著低于miR-192-5p mimic+pcDNA3.1组($P<0.01$); miR-192-5p mimic+pcDNA3.1组vimentin的表达水平显著低于Mimic NC+pcDNA3.1组($P<0.01$), miR-192-5p

mimic+pcDNA3.1-ZEB2组显著高于miR-192-5p mimic+pcDNA3.1组($P<0.01$)。结果表明,过表达ZEB2可部分逆转上调miR-192-5p对PANC-1细胞EMT进程的抑制作用。



A: 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力($\times 40$); B, C: Transwell实验检测细胞的迁移(B)和侵袭(C)能力(结晶紫染色, $\times 100$)

图3 过表达或敲减 miR-192-5p 对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的影响

3 讨论

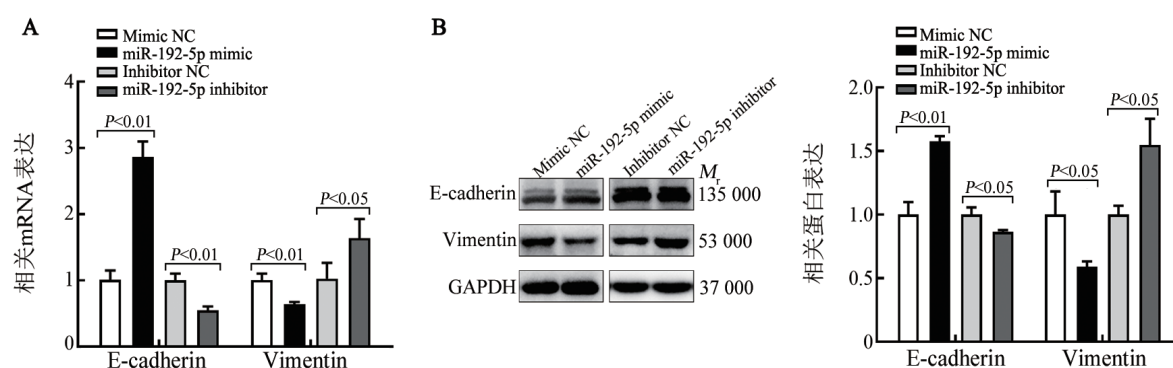
胰腺癌早期的临床症状不明显,大部分患者确诊时已处在疾病晚期,错过了手术治疗的最佳时间,只有少数患者可以进行根治性切除术,且对大多数患者可用的化疗方案具有耐药性^[9]。因此,迫切需要了解胰腺癌发病的潜在分子机制,探索肿瘤治疗的新靶点,为诊疗手段的开发提供更多的可能。

已有许多研究报道 miRNA 对胰腺癌的影响,

miR-382-3p 通过靶向 ATAT1 抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[10], miR-597-5p 在胰腺癌组织和细胞中表达下调,并且通过下调 ELK1 抑制胰腺癌细胞增殖并促进其凋亡^[11]。miR-32-5p 通过靶向调控 EZH2 的表达从而影响了胰腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭、EMT 进程,以及裸鼠体内移植瘤的生长^[12]。miR-192-5p 位于人 11 号染色体上,是 miR-192 家族的一员,人体中约有 80 种 miRNA 前体,产生两种成熟的 miRNA,即 miR-192-5p 和 miR-192-3p,具有不同的种子序列

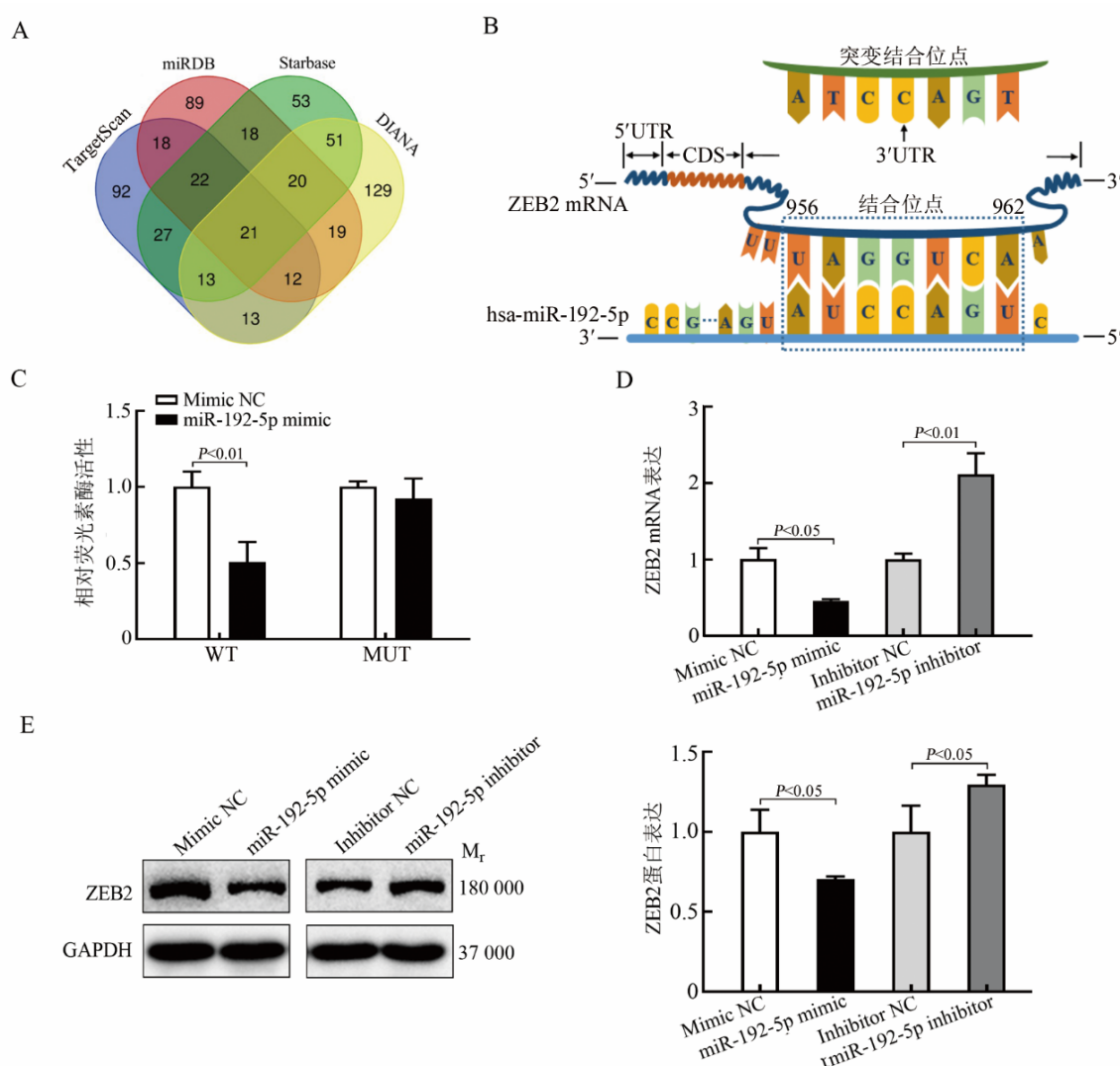
以及不同的靶基因^[13]。miR-192-5p在不同的生理和病理过程中发挥重要作用,并且与癌症的发病率密切相关。本研究结果显示,与正常胰腺上皮细胞HPNE相比,胰腺癌PANC-1细胞中miR-192-5p表达

下调,在胰腺癌PANC-1细胞中过表达或抑制其表达后,能够显著抑制或促进PANC-1细胞的增殖、迁移、侵袭能力以及EMT进程。



A: qPCR法检测E-cadherin和vimentin的表达; B: WB法检测E-cadherin和vimentin的表达

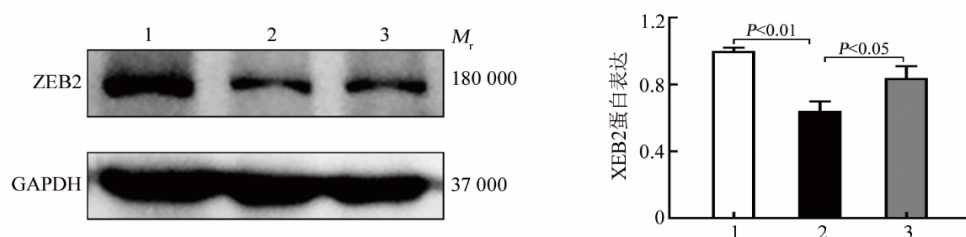
图4 miR-192-5p对胰腺癌PANC-1细胞EMT进程的影响



A: 生物信息学预测miR-192-5p的靶基因; B: miR-192-5p与ZEB2之间的结合位点; C: 双荧光素酶报告基因实验;

D: qPCR法检测ZEB2 mRNA的表达; E: WB法检测ZEB2蛋白的表达

图5 miR-192-5p靶向ZEB2并抑制其表达



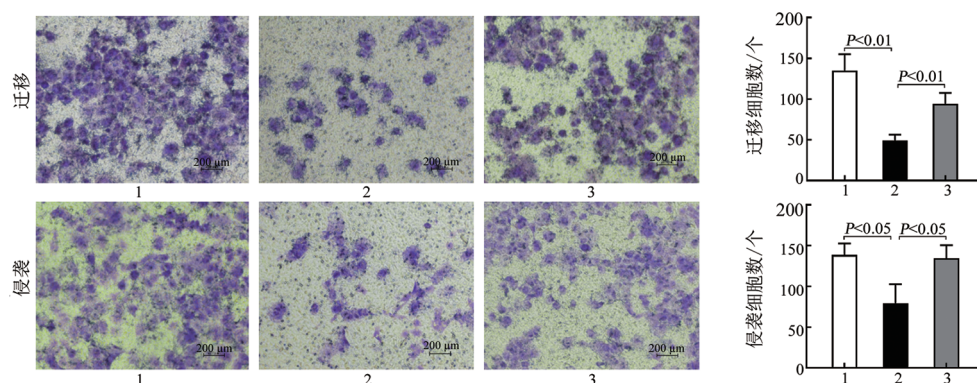
1: Mimic NC+pcDNA3.1 组; 2: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组; 3: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组

图6 WB法检测在PANC-1细胞中过表达ZEB2可部分逆转上调miR-192-5p对其的抑制作用

表2 过表达ZEB2可部分逆转上调miR-192-5p对PANC-1细胞增殖能力的影响(D_{450} , $n=3$)

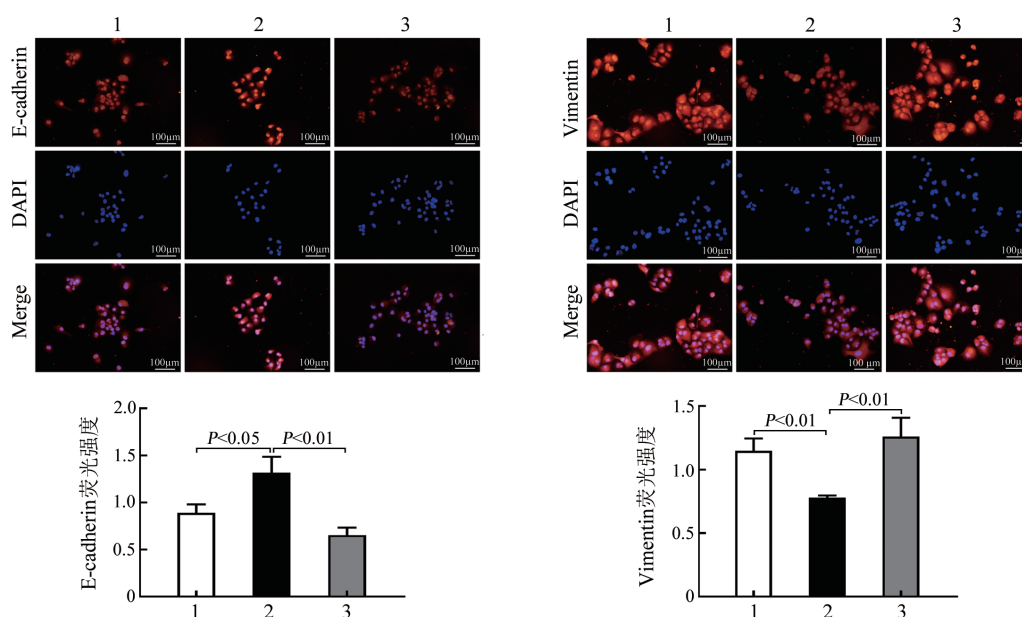
组别	24 h	48 h	72 h	96 h
Mimic NC+pcDNA3.1	0.535±0.010	0.594±0.007	0.732±0.006	1.017±0.011
miR-192-5p mimic+pcDNA3.1	0.495±0.004*	0.524±0.013*	0.650±0.027*	0.920±0.020*
miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2	0.515±0.012 [△]	0.602±0.004 [△]	0.868±0.014 [△]	0.999±0.015 [△]
<i>F</i>	9.060	47.46	73.79	21.99
<i>P</i>	$P<0.05$	$P<0.001$	$P<0.0001$	$P<0.01$

与Mimic NC+pcDNA3.1组比较, $P<0.05$; 与miR-192-5p mimic+pcDNA3.1组比较, $^{\Delta}P<0.05$



1: Mimic NC+pcDNA3.1 组; 2: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组; 3: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组

图7 过表达ZEB2可部分逆转上调miR-192-5p对PANC细胞迁移和侵袭的抑制作用(结晶紫染色, $\times 100$)



1: Mimic NC+pcDNA3.1 组; 2: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1 组; 3: miR-192-5p mimic+pcDNA3.1-ZEB2 组

图8 双重免疫荧光检测过表达ZEB2可部分逆转上调miR-192-5p对PANC-1细胞中EMT相关蛋白表达的影响($\times 200$)

上皮和间充质表型之间的转换是肿瘤细胞侵袭和转移的关键因素,在此过程中上皮细胞失去了其上皮起源的特征而获得间充质表型,这种现象称为EMT^[14]。肿瘤细胞的EMT可增强其侵袭性,这是由于E-cadherin表达缺失和N-cadherin表达增加导致的^[15-16]。ZEB2是EMT的有效诱导剂,通过抑制E-cadherin的表达来诱导细胞发生EMT,ZEB2能够促进结肠癌干细胞表型、EMT、迁移和侵袭^[17]。在肝癌的研究^[18-19]中也发现,ZEB2能够促进肝癌细胞的增殖和转移。本研究结果显示,在胰腺癌组织和PANC-1细胞中ZEB2表达上调,且在胰腺癌组织中miR-192-5p与ZEB2的表达呈负相关。miR-192-5p可靶向结合ZEB2并负向调控其表达。抑制ZEB2的表达后,胰腺癌PANC-1细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著降低并抑制EMT的进程;过表达ZEB2后,胰腺癌PANC-1细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著升高并促进EMT的进程。

miRNA发挥功能是通过与靶基因的3'UTR区结合,通过促进mRNA降解或抑制蛋白翻译实现调节靶基因的表达^[20]。例如miR-192-5p通过靶向SH3RF3抑制乳头状甲状腺癌发展^[21]。本研究结果提示,ZEB2是miR-192-5p的直接靶点,过表达miR-192-5p降低ZEB2的mRNA和蛋白水平,反之抑制miR-192-5p则上调ZEB2的表达水平。为了明确ZEB2是否作为miR-192-5p的下游功能因子,设计并进行挽救实验,实验结果显示:过表达ZEB2能够部分逆转miR-192-5p过表达导致细胞的增殖、迁移和侵袭能力的降低,以及EMT进程的阻滞,提示ZEB2可能通过挽救miR-192-5p对肿瘤的抑制作用,参与促进了胰腺癌的发生和发展。

综上所述,在胰腺癌组织中miR-192-5p和ZEB2的表达呈负相关,抑制或过表达miR-192-5p可通过靶向ZEB2促进或抑制胰腺癌PANC-1细胞的增殖、迁移和侵袭以及EMT进程。miR-192-5p和ZEB2可能在胰腺癌的早期诊断和治疗中具有重要的研究价值,为胰腺癌的临床诊断和治疗提供了新的数据支持。

[参 考 文 献]

- [1] MILLER K D, NOGUEIRA L, DEVASIA T, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(5): 409-436. DOI:10.3322/caac.21731.
- [2] SHAH V, SHAH J. Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(12): 1732-1749. DOI: 10.1111/jphp.13351.
- [3] HUANG Y L, LI X H, MA H, *et al.* Metabolites of intestinal microflora upregulate miR-192-5p to suppress proliferation of colon cancer cells via RhoA-ROCK-LIMK2 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 1794-1806. DOI: 10.26355/eurev_202002_20357.
- [4] TAVAKOLIAN S, GOUDARZI H, FAGHIHLOO E. Evaluating the expression level of miR-9-5p and miR-192-5p in gastrointestinal cancer: introducing novel screening biomarkers for patients[J/OL]. *BMC Res Notes*, 2020, 13(1): 226[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168809/>. DOI:10.1186/s13104-020-05071-9.
- [5] ZOU P, ZHU M H, LIAN C, *et al.* miR-192-5p suppresses the progression of lung cancer bone metastasis by targeting TRIM44 [J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19619[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31873114/>. DOI:10.1038/s41598-019-56018-5.
- [6] GU Y Z, WEI X Y, SUN Y L, *et al.* miR-192-5p silencing by genetic aberrations is a key event in hepatocellular carcinomas with cancer stem cell features[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(5): 941-953[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6397664/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-1675.
- [7] JI D C, JIANG L N, LI Y J. miR-192-5p suppresses the growth of bladder cancer cells via targeting Yin Yang 1[J]. *Hum Cell*, 2018, 31(3): 210-219. DOI:10.1007/s13577-018-0201-6.
- [8] ZHANG Y, HE Y, LU L L, *et al.* miRNA-192-5p impacts the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin via targeting peptidylprolyl isomerase A[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2019, 35(1): 17-23. DOI:10.1002/kjm2.12004.
- [9] DAOUD A Z, MULHOLLAND E J, COLE G, *et al.* microRNAs in pancreatic cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators[J/OL]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1130[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6868851/>. DOI: 10.1186/s12885-019-6284-y.
- [10] ZHANG H, ZHU C H, HE Z W, *et al.* LncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 179[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32891166/>. DOI: 10.1186/s13046-020-01687-8.
- [11] LI S Z, LI X L, XING X H, *et al.* miR-597-5p inhibits cell growth and promotes cell apoptosis by targeting ELK1 in pancreatic cancer [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(4): 1165-1175. DOI: 10.1007/s13577-020-00395-x.
- [12] 柳君君, 张燕燕, 雷衡阳. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(6): 557-566. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.007.
- [13] KRATTINGER R, BOSTRÖM A, SCHIÖTH H B, *et al.* MicroRNA-192 suppresses the expression of the farnesoid X receptor[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(11): G1044-G1051. DOI: 10.1152/ajpgi.00297.2015.
- [14] 韦敏, 卢艳. 外泌体与上皮-间质转化在宫颈癌发生发展中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(12): 1227-1231. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.012.
- [15] HU Y, ZHENG Y Y, DAI M R, *et al.* Snail2 induced E-cadherin suppression and metastasis in lung carcinoma facilitated by G9a and HDACs[J/OL]. *Cell Adh Migr*, 2019, 13(1): 285-292[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629185/>.

- DOI:10.1080/19336918.2019.1638689.
- [16] KASZAK I, WITKOWSKA-PILASZEWICZ O, NIEWIADOMSKA Z, *et al.* Role of cadherins in cancer-a review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7624[2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33076339/>. DOI: 10.3390/ijms21207624.
- [17] SHAYIMU P, YUSUFU A, REHEMUTULA A, *et al.* MicroRNA-377 counteracts with cancer stem cell phenotypes and epithelial mesenchymal transformation by targeting ZEB2 in colon cancer [J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820967475[2022-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7588759/>. DOI:10.1177/1533033820967475.
- [18] QIU G C, LIN Y J, ZHANG H G, *et al.* miR-139-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting ZEB1 and ZEB2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 315-321. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.062.
- [19] ZHANG X, XU X Y, GE G H, *et al.* miR-498 inhibits the growth and metastasis of liver cancer by targeting ZEB2[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1638-1648. DOI:10.3892/or.2018.6948.
- [20] JONAS S, IZAURRALDE E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing[J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(7): 421-433. DOI:10.1038/nrg3965.
- [21] FU S B, MA C X, TANG X L, *et al.* miR-192-5p inhibits proliferation, migration, and invasion in papillary thyroid carcinoma cells by regulation of SH3RF3[J/OL]. *Biosci Rep*, 2021, 41(9): BSR20210342 [2022-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34486645/>. DOI: 10.1042/BSR20210342.
- [收稿日期] 2022-06-30 [修回日期] 2022-08-21
- [本文编辑] 党瑞山