

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.21.007  
文章编号: 1005-8982 (2021) 21-0038-09

实验研究·论著

## MicroRNA-219a-5p和AFAP1L2对 胰腺癌细胞的作用研究\*

刘博<sup>1</sup>, 戚诚<sup>1</sup>, 赵爽<sup>2</sup>, 常晓静<sup>3</sup>, 赵晓东<sup>1</sup>, 张立超<sup>4</sup>, 刘学臣<sup>5</sup>, 刘斌<sup>6</sup>

(1.河北医科大学第二医院 普外四科,河北 石家庄 050052; 2.河北医科大学第三医院 麻醉科,河北 石家庄 050051; 3.河北医科大学第二医院 放疗科,河北 石家庄 050052; 4.河北医科大学第二医院 普外九科,河北 石家庄 050052; 5.河北医科大学第二医院 消化内科,河北 石家庄 050052; 6.河北大学附属医院 科研处,河北 保定 071030)

**摘要:目的** 探讨microRNA-219a-5p(miR-219a-5p)和肌动蛋白丝相关蛋白1相似蛋白2(AFAP1L2)对胰腺癌细胞的作用。**方法** 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting法检测胰腺癌细胞株(PANC-1、BXPC-3、SW1990、Capan-1)及正常胰腺导管上皮细胞(HPDE)miR-219a-5p、AFAP1L2的表达,采用siRNA及过表达质粒下调或上调AFAP1L2表达,CCK-8法观察胰腺癌细胞株增殖变化。采用mimics或inhibitor上调或下调miR-219a-5p表达,CCK-8法观察胰腺癌细胞株增殖变化。流式细胞术检测不同干预条件下细胞凋亡和细胞周期。生物信息学预测两者可能具有靶向调控关系。qRT-PCR和Western blotting法检测AFAP1L2 mRNA及蛋白表达,荧光素酶实验观察二者碱基配对关系,进一步验证miR-219a-5p对AFAP1L2具有靶向调控作用。**结果** 与HPDE细胞比较,胰腺癌细胞株中miR-219a-5p表达较低( $P < 0.05$ )。AFAP1L2 mRNA及蛋白在胰腺癌细胞株中的表达高于在HPDE细胞中的表达( $P < 0.05$ )。Capan-1或SW1990细胞培养48 h后,与空白对照组(NC组)比较,pCMV-EGFP-AFAP1L2组光密度(OD)值升高( $P < 0.05$ ),siAFAP1L2组OD值下降( $P < 0.05$ ),AFAP1L2对胰腺癌细胞增殖具有正向调控作用。Capan-1及SW1990细胞培养48 h后,与miR-NC组比较,miR-219a-5p mimics组OD值下降( $P < 0.05$ ),miR-219a-5p inhibitor组OD值升高( $P < 0.05$ ),miR-219a-5p表达对胰腺癌细胞增殖具有负向调控作用;上调miR-219a-5p表达,可诱导细胞S期阻滞,导致细胞凋亡增加。miR-219a-5p负向调控AFAP1L2表达;荧光素酶实验显示,miR-219a-5p与AFAP1L2的3'-UTR互补结合,miR-219a-5p与AFAP1L2存在靶向调控关系。**结论** miR-219a-5p通过靶向调控AFAP1L2表达负向介导胰腺癌细胞增殖及凋亡。

**关键词:** 胰腺癌;肌动蛋白丝相关蛋白1相似蛋白2;microRNA-219a-5p;增殖

**中图分类号:** R735.3

**文献标识码:** A

## MicroRNA-219a-5p targeted-regulates AFAP1L2 expression to modulate pancreatic cells proliferation\*

Bo Liu<sup>1</sup>, Cheng Qi<sup>1</sup>, Shuang Zhao<sup>2</sup>, Xiao-jing Chang<sup>3</sup>, Xiao-dong Zhao<sup>1</sup>,  
Li-chao Zhang<sup>4</sup>, Xue-chen Liu<sup>5</sup>, Bin Liu<sup>6</sup>

(1. The Fourth Department of General Surgery, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050052, China; 2. Department of Anesthesiology, The Third Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 3. Department of Radiotherapy, The Second Hospital,

收稿日期: 2021-04-11

\*基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划(No.20160540); 2018年河北省自然科学基金资助面上项目(No:H2018206180)

[通信作者] 戚诚, E-mail: larrygh@aliyun.com; Tel: 15831180924

Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050052, China; 4. The Ninth Department of General Surgery, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050052, China; 5. Department of Digestive, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050052, China; 6. Department of Academic Research, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071030, China)

**Abstract: Objective** To observe microRNA-219a-5p(miR-219a-5p) target-modulates AFAP-1L2 expression to influence pancreatic cancer cell proliferation, and to discuss the mechanism. **Methods** Expression of miR-219a-5p and AFAP1L2 in pancreatic cancer cell lines (PANC-1, BXPC-3, SW1990, Capan-1) and normal pancreatic ductal epithelial cells (HPDE) were detected by qRT-PCR and Western blot assay. AFAP1L2 was down-regulated or up-regulated by siRNA or over-expressed plasmid, and pancreatic cancer cell proliferation was observed by CCK assay. MiR-219a-5p was down-regulated or up-regulated by inhibitor or mimics, and pancreatic cancer cell proliferation was observed by CCK assay. Flow cytometry assay was used to detect cell cycle and apoptosis. Bioinformatic analysis predicted they were target-related, AFAP1L2 mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blotting assay. Luciferase assay was used to observe the base pairing relation and to prove the target effect. **Results** Compared with HPDE, miR-219a-5p in pancreatic cancer cells expression was lower ( $P < 0.05$ ). AFAP1L2 mRNA and protein in pancreatic cancer cells were higher than in HPDE cells ( $P < 0.05$ ). Capan-1 and SW1990 were cultured for 48 h. Compared with NC group, OD value was higher in pCMV-EGFP-AFAP1L2 group ( $P < 0.05$ ), and was lower in siAFAP1L2 group ( $P < 0.05$ ), which means AFAP1L2 positively controlled pancreatic cancer cell proliferation. In addition, compared with miR-NC group, OD value was lower ( $P < 0.05$ ) in miR-219a-5p mimics group, and was higher in miR-219a-5p inhibitor group ( $P < 0.05$ ), which showed miR-219a-5p negatively controlled pancreatic cancer cell proliferation; Up-regulating miR-219a-5p expression induce S phase stagnated and increased cell apoptosis. MiR-219a-5p negatively controlled AFAP1L2 expression; Luciferase assay showed that miR-219a-5p and AFAP1L2 have targeted relation as the result of that miR-219a-5p was combined with AFAP1L2 3'-URT complementarily. **Conclusions** MiR-219a-5p targeted-regulates AFAP1L2 expression to negatively modulate pancreatic cancer cell proliferation and apoptosis.

**Keywords:** pancreatic neoplasms; AFAP1L2 protein, human; microRNA-219a-5p; proliferation

胰腺癌在消化系统恶性肿瘤中预后是最差的, 生存期短, 5 年生存率  $< 5\%$ <sup>[1]</sup>。尽管放疗、化疗、靶向、手术等多模式治疗有所进展, 近 10 年胰腺癌的 5 年生存率仍无明显提高, 胰腺癌细胞的恶性增殖、过早发生转移及浸润是其生存期不能提高的主要原因之一<sup>[2-3]</sup>。转移性结直肠癌、肺癌、食管癌等伴随着靶向治疗的发展, 5 年生存率均得到一定程度的提高, 而胰腺癌生存期却没有明显改善<sup>[4]</sup>。对胰腺癌早期筛查指标的探索, 对进展期胰腺癌治疗靶点的发现, 仍然是提高胰腺癌存活率的主要研究方向<sup>[5]</sup>。肌动蛋白丝相关蛋白 1 相似蛋白 2 (AFAP1L2) 是接头蛋白的一种, 在恶性肿瘤 (胃癌、食管癌、肺癌等) 中高表达。本研究前期实验发现, AFAP1L2 与胰腺癌的转移、侵袭等恶性行为具有相关性, 在胰腺癌中是促癌基因<sup>[6]</sup>, 对胰腺癌细胞侵袭及转移具有促进作用<sup>[7]</sup>。miRNA 是一种内源性小非编码 RNA, 在转录后参与细胞增殖、

分化、生长等生物学行为, 大部分负向调控下游基因<sup>[8]</sup>。胰腺癌 miR-219 对胰腺癌细胞的恶性行为具有负向调控作用, 但其机制并不清楚。本研究前期通过生物信息学预测显示, microRNA-219a-5p (miR-219a-5p) 与 AFAP1L2 3'-UTR 具有碱基互补配对, 两者可能具有靶向调控关系。本研究检测 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 3'-UTR 在胰腺癌细胞株中的表达, 并观察两者对胰腺癌细胞增殖的作用, 对两者可能具有的靶向调控关系进行验证, 为胰腺癌预测基因的发现及治疗靶点的预测提供离体实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

正常胰腺导管上皮细胞 (HPDE) 及人胰腺癌细胞株 (PANC-1、BXPC-3、SW1990、Capan-1) 由中国

科学院上海细胞库提供,由河北医科大学第二医院中心实验室培养及传代。AFAP1L2山羊多克隆抗体及流式细胞周期和凋亡检测试剂盒购自美国Santa Cruz公司。BCA定量试剂盒、ECL发光试剂盒、DAB显色试剂盒、CCK-8检测试剂盒购自大连宝生生物技术有限公司。miR-219a-5p mimics(拟似剂)及miR-219a-5p inhibitor(抑制剂)购自日本TakaRa公司。逆转录及扩增试剂盒、miRNA提取分离试剂盒、Lipofectamine 2000及RPIM 1640购自美国Sigma公司。AFAP1L2过表达质粒(pCMV-EGFP-AFAP1L2质粒)、空载EGFP-质粒、引物、野生型引物(wt)及突变型(mut)萤光素酶报告载体由北京生工生物工程有限公司设计合成。AFAP1L2正向引物:5'-CCGGACGTAACGACGCATCCG-3',反向引物:5'-GCCCAGTTCGUUGUGCCACG-3';miR-219a-5p正向引物:5'-GTTCTTGACAATTAAGACCC-3',反向引物:5'-CATGATAAGTTCTGCGCTC-3'; $\beta$ -actin正向引物:5'-GCCGATCCGTAACGCTACGGCGC-3',反向引物:5'-CCGGACGTTTCGACGGCTCCG-3'。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测mRNA表达** 对各组细胞进行裂解,收集后依照Trizol操作说明书提取RNA,合成cDNA,对RNA纯度和完整性进行检测。进行microRNA逆转录,在70℃温浴10 min后立即给予冰浴,对逆转录引物及模板退火;PCR反应体系的配置如下:qRT-PCR Master Mix 7.5 ml,2份SYBR Green,引物混合物0.6 ml, $H_2O$  15 ml,cDNA模板2 ml。进行循环,延伸反应条件如下:95℃温浴2 min,94℃温浴10 s,55℃温浴15 s,72℃温浴10 s,循环45次;再次95℃温浴1 min,60℃温浴30 s,95℃温浴30 s。扩增曲线以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析,实验3次取平均值进行统计分析。

**1.2.2 Western blotting法检测蛋白表达** 各组细胞用PBS洗涤3次,收集后离心,弃去上清液,对裂解后的各细胞株总蛋白进行抽提,常规BCA法对蛋白浓度进行定量,然后对蛋白样本上样,120 V条件下以12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺进行电泳分离,20 min后改为90 V分离90 min,转于PVDF膜,TBST缓冲液(含5%脱脂奶粉)封闭1.5 h。加I抗室温孵育过夜,TBST 3次洗膜加II抗,37℃孵育1 h,凝胶显像仪显像(化学发光法)。 $\beta$ -actin为内

参,Quantity One 计量灰度值。

**1.2.3 转染胰腺癌细胞步骤** 收集对数生长期胰腺癌细胞进行消化,使其成为单细胞悬液,24孔板内按 $20 \times 10^4$ 个细胞/孔进行接种,对融合度>70%胰腺癌细胞株以Lipofectamine 2000操作说明书要求进行转染,用含10%胎牛血清细胞培养基对转染完成的细胞进行培养,48 h后评价转染效率,继续完成下一步实验。

**1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖** 收集空白对照组(NC组)、pCMV-EGFP-AFAP1L2组、siAFAP1L2组对数生长期细胞,将浓度调至 $1 \times 10^5$ 个/ml,100  $\mu$ l细胞悬液/孔加入96孔板,12 h培养于孵育箱(条件:湿度5%,温度37℃)。48 h温浴后加10  $\mu$ l的CCK-8液,继续培养4 h,在酶标仪490 nm波长处检测光密度(OD)值,每孔进行3次试验,取平均值进行统计分析。

**1.2.5 流式细胞术检测胰腺癌细胞周期** 取胰腺癌细胞,转至EP管,PBS 1 ml进行洗涤,然后加1 ml 70%的乙醇,以上均需预冷条件操作,于4℃进行24 h固定,1 200 r/min离心4 min。弃上清,PBS洗涤。然后用PBS对各样本进行重悬,加入30  $\mu$ l 0.5% PI、15  $\mu$ l Rnase A(10 mg/ml),4℃下避光温浴40 min。流式细胞仪在波长488 nm处行细胞周期检测。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 取各组胰腺癌细胞,按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书进行细胞凋亡检测,流式细胞仪设定条件:Alexa FITC的最大发射波长509 nm,最大激发波长488 nm,PI-DNA复合物的最大激发波长535 nm,最大发射波长615 nm,采集细胞数10 000个/样本,以Cell Quest软件进行凋亡率分析。

**1.2.7 萤光素酶法检测碱基互补配对** miR-219a-5p与AFAP1L2可能具有靶向调控关系,并确定核苷酸47~53为3'-UTR的结合位点,构建商业化wt-AFAP1L2-Pmir-REPORT及mut-AFAP1L2-Pmir-REPORT萤光素酶报告载体,将构建的载体报告以X-treme Gene与miR-219a-5p mimics共转染到胰腺癌细胞,miR-219a-5p negative control(NC)组为对照。共转染后在培养箱内以37℃、5%  $CO_2$ 条件下孵育培养48 h,以双萤光素酶检测试剂盒对萤光素酶活性进行检测。以wt/mut-AFAP1L2-Pmir-REPORT与海肾萤光素酶表达载体活性比例为相对

荧光素酶活性。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 PASW Statistics 20.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析或  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-219a-5p、AFAP1L2 在胰腺癌细胞株及 HPDE 中 R 表达

qRT-PCR 结果显示, 在胰腺癌细胞株 PANC-1、BXPC-3、SW1990、Capan-1 及 HPDE 中 miR-219a-5p mRNA 的相对表达量分别为  $(0.26 \pm 0.07)$ 、 $(0.28 \pm 0.08)$ 、 $(0.58 \pm 0.28)$ 、 $(0.46 \pm 0.25)$  和  $(1.32 \pm 0.57)$ , 差异有统计学意义 ( $F = 11.462, P = 0.000$ ), 在胰腺癌细胞株中表达较低。BXPC-3、SW1990 及 Capan-1 分别与 PANC-1 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); SW1990 及 Capan-1 分别与 BXPC-3 比较, 差异无统

计学意义 ( $P > 0.05$ ); SW1990 与 Capan-1 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1A。

qRT-PCR 及 Western blotting 结果显示, 在胰腺癌细胞株 PANC-1、BXPC-3、SW1990、Capan-1 及 HPDE 中 AFAP1L2 mRNA 相对表达量为  $(1.19 \pm 0.24)$ 、 $(0.92 \pm 0.29)$ 、 $(0.97 \pm 0.07)$ 、 $(0.99 \pm 0.45)$ 、 $(0.57 \pm 0.16)$ , 差异有统计学意义 ( $F = 10.931, P = 0.000$ ); AFAP1L2 蛋白相对表达量为  $(14.01 \pm 0.92)$ 、 $(13.86 \pm 1.32)$ 、 $(14.59 \pm 1.02)$ 、 $(12.97 \pm 0.78)$ 、 $(8.42 \pm 0.91)$ , 差异有统计学意义 ( $F = 9.401, P = 0.000$ )。AFAP1L2 蛋白及 mRNA 在胰腺癌细胞株和 HPDE 细胞中表达比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 胰腺癌细胞株中表达较高 ( $P < 0.05$ ); BXPC-3、SW1990 及 Capan-1 分别与 PANC-1 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); SW1990 及 Capan-1 分别与 BXPC-3 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); SW1990 与 Capan-1 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1B、C。

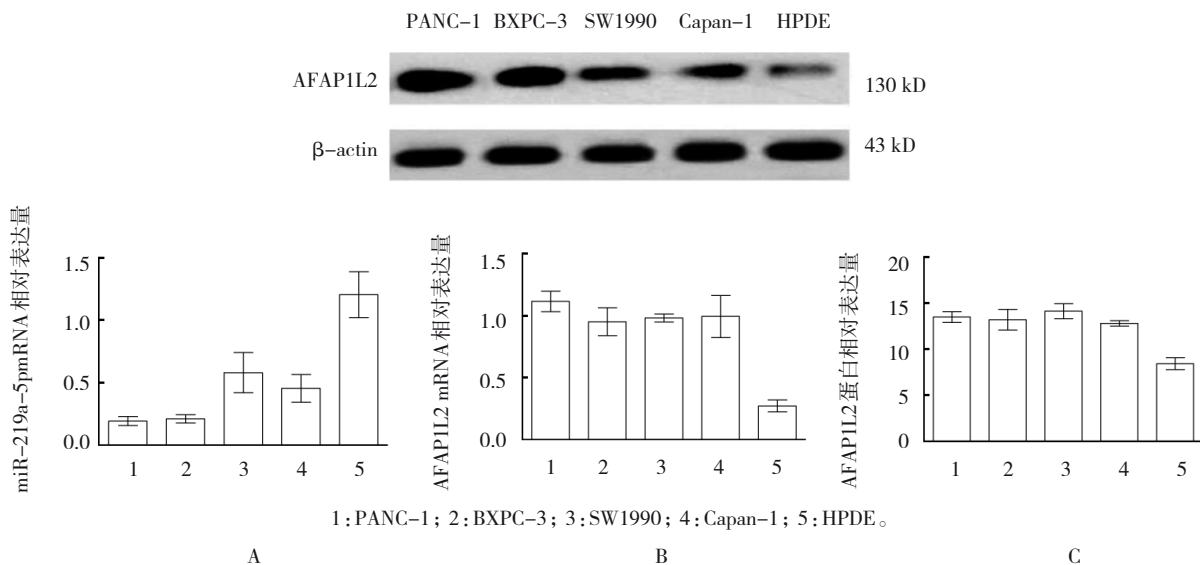


图 1 胰腺癌细胞株及 HPDE 中 miR-219a-5p mRNA 相对表达量; B: 胰腺癌细胞株及 HPDE 中 AFAP1L2 mRNA 相对表达量; C: 胰腺癌细胞株及 HPDE 中 AFAP1L2 蛋白相对表达量。

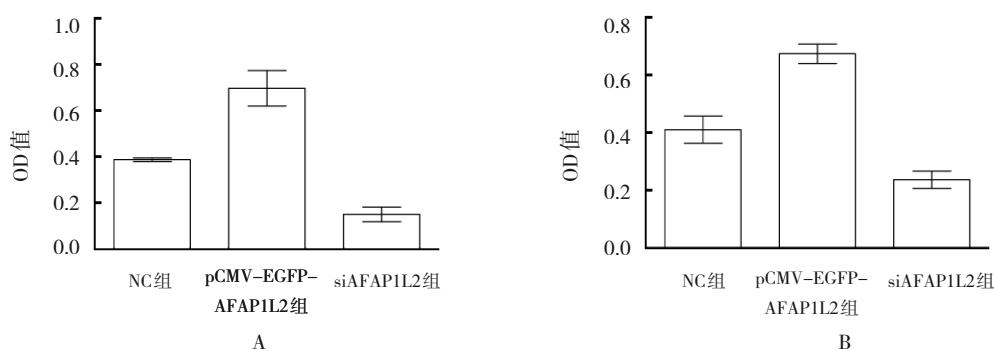
图 1 miR-219a-5p、AFAP1L2 在胰腺癌细胞株与 HPDE 中的表达

### 2.2 AFAP1L2 表达影响胰腺癌细胞增殖

CCK-8 法结果显示, Capan-1 细胞培养 48 h, 空白对照组 (NC 组)、pCMV-EGFP-AFAP1L2 组、siAFAP1L2 组 OD 值分别为  $(0.387 \pm 0.007)$ 、 $(0.749 \pm 0.302)$  和  $(0.146 \pm 0.081)$ , 差异有统计学意义 ( $F = 4.724, P = 0.007$ )。pCMV-EGFP-AFAP1L2 组 OD 值高于 NC 组和 siAFAP1L2 组 ( $P < 0.05$ ), NC 组 OD 值高于

siAFAP1L2 组 ( $P < 0.05$ )。见图 2A。

SW1990 细胞培养 48 h, NC 组、pCMV-EGFP-AFAP1L2 组、siAFAP1L2 组 OD 值分别为  $(0.410 \pm 0.082)$ 、 $(0.673 \pm 0.128)$  和  $(0.213 \pm 0.103)$ , 差异有统计学意义 ( $F = 7.159, P = 0.000$ )。pCMV-EGFP-AFAP1L2 组 OD 值高于 NC 组和 siAFAP1L2 组 ( $P < 0.05$ ), NC 组 OD 值高于 siAFAP1L2 组 ( $P < 0.05$ )。见图 2B。



A:上调AFAP1L2表达促进Capan-1细胞增殖,下调AFAP1L2表达抑制Capan-1细胞增殖; B:上调AFAP1L2表达促进SW1990细胞增殖,下调AFAP1L2表达抑制SW1990细胞增殖。

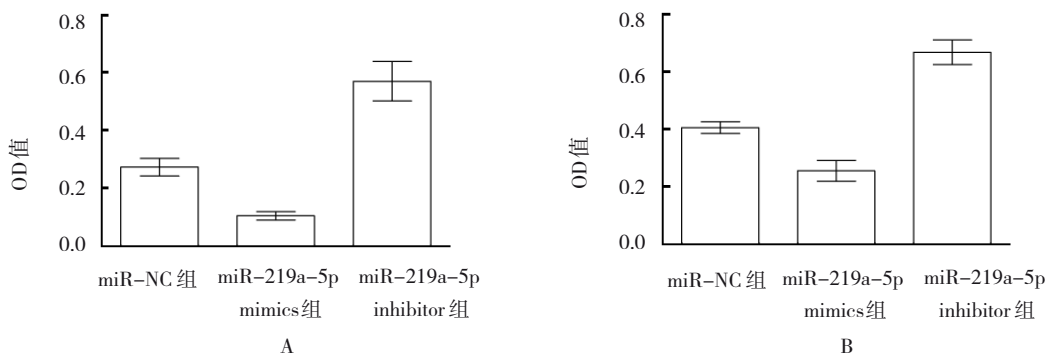
图2 AFAP1L2对Capan-1及SW1990细胞增殖的影响

### 2.3 miR-219a-5p影响胰腺癌细胞增殖

CCK-8法结果显示,Capan-1细胞培养48h,miR-NC组、miR-219a-5p mimics组、miR-219a-5p inhibitor组OD值分别为(0.272 ± 0.031)、(0.105 ± 0.022)和(0.569 ± 0.068),差异有统计学意义( $F = 4.017, P = 0.009$ )。miR-219a-5p mimics组OD值低于miR-NC组,miR-219a-5p inhibitor组高于miR-NC组

( $P < 0.05$ )。见图3A。

SW1990细胞培养48h,miR-NC组、miR-219a-5p mimics组、miR-219a-5p inhibitor组OD值分别为(0.405 ± 0.035)、(0.255 ± 0.062)和(0.667 ± 0.074),差异有统计学意义( $F = 3.363, P = 0.012$ )。miR-219a-5p mimics组OD值低于miR-NC组,miR-219a-5p inhibitor组OD值高于miR-NC组。见图3B。



A:上调miR-219a-5p表达抑制Capan-1细胞增殖,下调miR-219a-5p表达促进Capan-1细胞增殖; B:上调miR-219a-5p表达抑制SW1990细胞增殖,下调miR-219a-5p表达促进SW1990细胞增殖。

图3 miR-219a-5p对Capan-1及SW1990细胞增殖的影响

### 2.4 各组细胞周期比较

流式细胞术检测细胞周期结果显示,miR-NC组、miR-219a-5p mimics组、miR-219a-5p inhibitor组在G1期、G2期及S期的比例比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。miR-219a-5p mimics组在G1期、G2期及S期的比例分别与miR-NC组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),miR-219a-5p mimics组G1期、G2期比例较miR-NC组减少,S期比例较miR-NC组升高。miR-219a-5p inhibitor组在G1期及G2期比例较miR-219a-5p mimics组升高,在S期比例降低。见表1。

表1 各组细胞周期比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	G1期	G2期	S期
miR-NC组	80.15 ± 0.94	9.57 ± 1.29	11.52 ± 1.76
miR-219a-5p mimics组	68.75 ± 1.35 <sup>①②</sup>	4.93 ± 1.48 <sup>①②</sup>	29.28 ± 1.79 <sup>①②</sup>
miR-219a-5p inhibitor组	83.29 ± 0.82	8.58 ± 0.97	9.47 ± 0.89
F值	3.340	2.920	11.530
P值	0.005	0.007	0.001

注:①与miR-NC组比较, $P < 0.05$ ;②与miR-219a-5p inhibitor组, $P < 0.05$ 。

### 2.5 各组细胞凋亡率比较

细胞凋亡结果显示, miR-NC 组、miR-219a-5p mimics 组、miR-219a-5p inhibitor 组凋亡率分别为  $(31.02 \pm 4.87)\%$ 、 $(16.52 \pm 3.19)\%$ 、 $(52.75 \pm 6.92)\%$ , 3 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=3.972, P=0.016$ )。miR-219a-5p mimics 组凋亡率低于 miR-NC 组 ( $P < 0.05$ ), miR-219a-5p inhibitor 组凋亡率高于 miR-NC 组 ( $P < 0.05$ )。miR-219a-5p mimics 组凋亡率低于

miR-219a-5p inhibitor 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.6 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 3'-UTR 具有碱基互补配对

通过生物信息学软件进行预测分析, 确定 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 可能具有靶向调控关系, 并确定核苷酸 47~53 为 3'-UTR 的结合位点。见图 4。

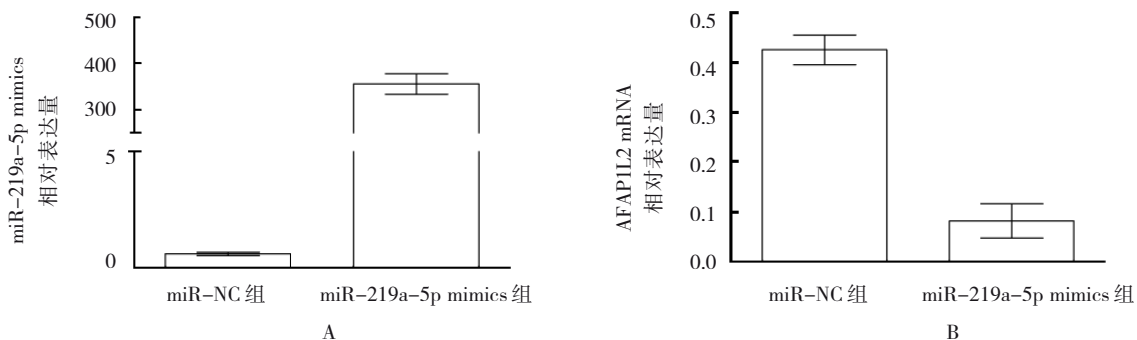


图 4 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 3'-UTR 碱基互补配对

### 2.7 miR-219a-5p 对 AFAP1L2 具有调控作用

miR-219a-5p mimics 转染 Capan-1 细胞, 与 miR-NC 组比较, miR-219a-5p mimics 组 AFAP1L2 mRNA 及蛋白表达均下降 ( $P < 0.05$ ) (见图 5B、图 6)。

给予 miR-219a-5p inhibitor 转染 Capan-1 细胞, 与 miR-NC 组比较, miR-219a-5p inhibitor 组 AFAP1L2 mRNA 及蛋白表达均上升 ( $P < 0.05$ ) (见图 7B、图 8)。表明 miR-219a-5p 负向调控 AFAP1L2 表达。



A: 两组 miR-219a-5p mimics 相对表达量比较; B: miR-219a-5p mimics 转染 Capan-1 细胞, AFAP1L2 mRNA 表达下降。

图 5 miR-219a-5p mimics 转染对 AFAP1L2 mRNA 表达的影响

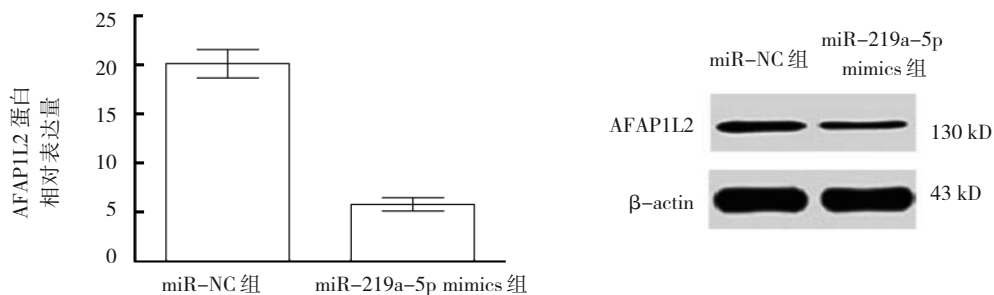
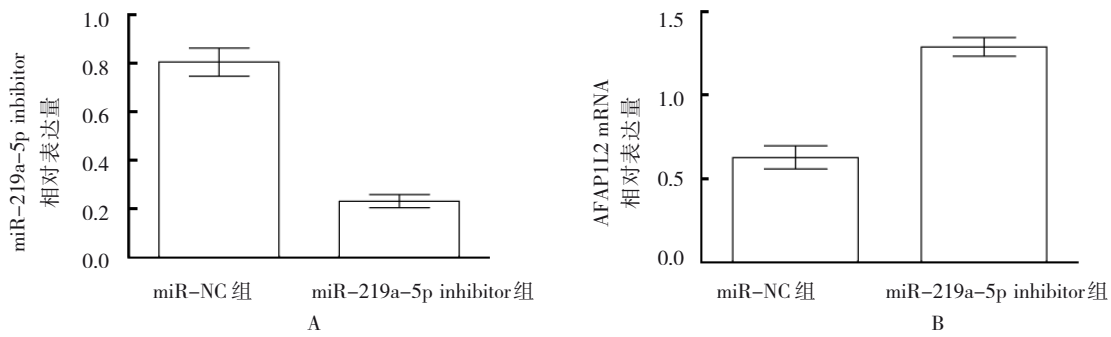


图 6 miR-219a-5p mimics 转染 Capan-1 细胞对 AFAP1L2 蛋白的影响

### 2.8 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 碱基互补配对

构建 wt-AFAP1L2-pMIR-REPORT 及 mut-AFAP1L2-pMIR-REPORT 荧光报告载体, 将野生型与突变型 AFAP1L2 荧光报告载体与 miR-219a-5p

mimics 共转染到 Capan-1 细胞, 萤光素酶活性检测结果显示, AFAP1L2 野生组 miR-NC 及 miR-219a-5p mimics 萤光素酶活性分别为  $(0.69 \pm 0.09)$  和  $(0.24 \pm 0.03)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 转染 wt-



A: 两组的 miR-219a-5p inhibitor 相对表达量比较; B: miR-219a-5p inhibitor 转染 Capan-1 细胞, AFAP1L2 mRNA 表达升高。

图 7 miR-219a-5p inhibitor 与 AFAP1L2 mRNA 相对表达量比较

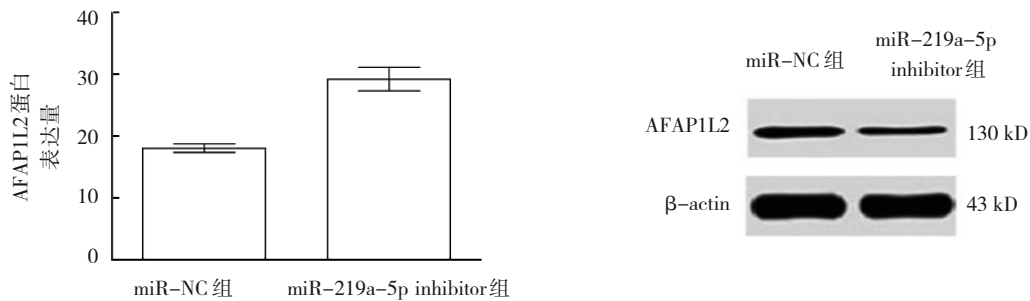


图 8 miR-219a-5p inhibitor 转染 Capan-1 细胞对 AFAP1L2 蛋白表达的影响

AFAP1L2-pMIR-REPORT 的 3'-UTR 端荧光素酶活性下降; AFAP1L2 突变组 miR-NC 及 miR-219a-5p mimics 荧光素酶活性分别为  $(0.64 \pm 0.11)$  和  $(0.61 \pm 0.16)$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 转染 mut-AFAP1L2-pMIR-REPORT 的 3'-UTR 端荧光素酶活性无变化。见图 9。

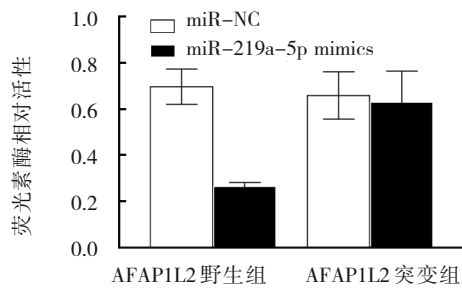


图 9 荧光素酶活性比较

### 3 讨论

细胞增殖被一系列的检查点蛋白和细胞调控蛋白包括细胞周期蛋白和细胞周期依赖激酶 (CDKs) 保护和调控, 细胞增殖调控通路的失衡会导致癌变及癌症的发展<sup>[9-12]</sup>。miRNA 失调会通过靶向作用于细胞周期调节因子影响细胞周期, 调控细胞生长速度, 导致细胞周期停滞, 并调控

Caspase 水平, 凋亡细胞增加, 抑制细胞生长<sup>[12-13]</sup>。有研究显示, miR-219a-5p 通过靶向作用于 MRTFa 提控乳腺癌细胞的迁移和表皮间质化, 在肝癌中, miR-219a-5p 通过靶向作用于 GPC3 抑制肝癌细胞增殖<sup>[14-15]</sup>。肌动蛋白丝相关蛋白 (AFAP) 家族是包括 AFAP 1、AFAP1L1 和 AFAP1L2/XB 130 在内的适配器蛋白重要成员, AFAP1L2 肌动蛋白结合蛋白和 CSRC 激活蛋白, AFAP1L2 可以促进肿瘤的发展。有研究表明, AFAP1L2 可以调节细胞的生长、迁移和侵袭, 可能通过 cAMP-CSRC-磷酸肌醇 3 激酶/Akt 途径发挥作用<sup>[16-18]</sup>。在恶性肿瘤中, miRNA 可以对下游信号通路进行调控, 从而介导恶性肿瘤细胞的增殖、细胞周期、凋亡及侵袭等恶性行为<sup>[19-21]</sup>。本研究在前期工作基础上通过生物信息学软件进行预测分析, miR-219a-5p 与 AFAP1L2 可能具有靶向调控关系, 并确定 3'-UTR 的结合位点。

本研究首先检测胰腺癌细胞及 HPDE 细胞中 miR-219a-5p 和 AFAP1L2 的表达, 发现 miR-219a-5p 在胰腺癌细胞株中的表达低于 HPDE 细胞, AFAP1L2 mRNA 及蛋白在胰腺癌细胞株中的表达高于 HPDE 细胞。细胞增殖试验显示, AFAP1L2 对胰腺癌细胞增殖具有正向调控作用。miR-219a-5p 表

达对胰腺癌细胞增殖具有负向调控作用, 对 AFAP1L2 及 miR-219a-5p 表达水平的调控间接验证两者对胰腺癌细胞增殖具有相反作用。另有研究显示, miR-219a-5p 与肿瘤直径、组织学分化程度及肝癌患者总生存时间具有相关性, miR-219a-5p 抑制肝癌细胞增殖, 并促进其从 G1 期向 S 期转化<sup>[15]</sup>。本研究也显示, 在胰腺癌细胞中上调 miR-219a-5p 表达, 可诱导细胞 S 期阻滞, 导致细胞凋亡增加。本研究为进一步研究 miR-219a-5p 及 AFAP1L2 在胰腺癌细胞增殖调控中的机制, 检测了 miR-219a-5p 表达上调或下调后 AFAP1L2 mRNA 及蛋白水平的变化, 结果显示, miR-219a-5p 负向调控 AFAP1L2 表达, 为进一步验证两者是否具有直接的调控关系, 进行荧光素酶活性检测试验, 结果显示 miR-219a-5p 与 AFAP1L2 的 3'-URT 互补结合, miR-219a-5p 与 AFAP1L2 存在直接的靶向调控关系。本研究对 miR-219a-5p 及 AFAP1L2 在胰腺癌细胞增殖调控中机制的研究结果显示, miR-219a-5p 通过调控 AFAP1L2 表达负向介导胰腺癌细胞增殖。HUANG 等<sup>[15]</sup>对 83 例肝癌组织中 miR-219a-5p 表达进行检测, 结果显示, miR-219a-5p 高表达的患者肿瘤体积小, 组织分化程度高, 患者总生存率长, 并通过负向调控 GPC3 表达抑制肝癌细胞增殖。LAHDAOUI 等<sup>[22]</sup>研究显示, miR-219 的 3'-UTR 与 MUC4 互补结合, 具有靶向调控关系, 通过对 MUC4 的直接调控, 激活 Akt 及 Erk 信号通路, 影响胰腺癌细胞迁移及增殖, 是抑癌基因。ZHAO 等<sup>[23]</sup>观察 AFAP1 RNA 对胃癌的预测价值, 结果显示, AFAP-RNA 与胃癌生存期呈负相关, 对胃癌细胞增殖具有促进作用。WANG 等<sup>[24]</sup>认为, 在肺癌中, AFAP1L1 下调会激活 Caspase-3 和 P38 表达, 抑制 PRAS 40 表达, 对肺癌细胞增殖具有促进作用, 加速细胞周期的进程, 阻止细胞凋亡。目前在肿瘤研究中没有 miR-219a-5p 对 AFAP1L2 的调控作用研究。MÜLLER 等<sup>[25]</sup>对胰腺癌中多个 miRNA 进行筛查, 并对靶点进行观察及预测, 进一步评价 miRNA 对胰腺癌诊断、预后预测及治疗靶点选择的意义。本研究结论为 miR-219a-5p 通过靶向调控 AFAP1L2 表达负向介导胰腺癌细胞增殖及凋亡。随着研究的深入, miR-219a-5p 及 AFAP1L2 可能成为未来胰腺癌诊断的肿瘤标志物及预测预后的靶基因。

#### 参 考 文 献 :

- [1] ZHANG Y, LIANG M M, SUN C Y, et al. Statin use and risk of pancreatic cancer: an updated meta-analysis of 26 studies[J]. *Pancreas*, 2019, 48(2): 142-150.
- [2] ZHANG K, HUA Y Q, WANG D, et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients with advanced pancreatic cancer[J]. *J Transl Med*, 2019, DOI: org/10.1186/s12967-019-1782-x.
- [3] ZHANG K, GAO H F, MO M, et al. A novel scoring system based on hemostatic parameters predicts the prognosis of patients with advanced pancreatic cancer[J]. *Pancreatol*, 2019(10): 12-18.
- [4] LEE D H, JANG J Y, KANG J S, et al. Recent treatment patterns and survival outcomes in pancreatic cancer according to clinical stage based on single-center large-cohort data[J]. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2018, 22(4): 386-396.
- [5] TAKAHASHI C, SHRIDHAR R, HUSTON J, et al. Correlation of tumor size and survival in pancreatic cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2018, 9(5): 910-921.
- [6] 刘博, 戚诚, 赵晓东. AFAP-1L2 在胰腺导管腺癌组织中的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(34): 45-47.
- [7] 刘博, 戚诚, 刘学臣, 等. AFAP-1L2 对胰腺癌细胞侵袭及转移的影响及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9): 1257-1262.
- [8] SUN Y P, ZHU Q D, ZHOU M T, et al. Restoration of miRNA-148a in pancreatic cancer reduces invasion and metastasis by inhibiting the Wnt/beta-catenin signaling pathway via downregulating maternally expressed gene-3[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 639-648.
- [9] ZHENG R Z, LIU Y H, ZHANG X L, et al. miRNA-200c enhances radiosensitivity of esophageal cancer by cell cycle arrest and targeting P21[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(21): 90517-90523.
- [10] HOBALLA M H, SOLTANI B M, MOWLA S J, et al. Identification of a novel intergenic miRNA located between the human DDC and COBL genes with a potential function in cell cycle arrest[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 11(3): 27-31.
- [11] TAJIMA K, YAE T, JAVAID S, et al. SETD1A modulates cell cycle progression through a miRNA network that regulates p53 target genes[J]. *Nat Commun*, 2015, 13(6): 257-269.
- [12] COSTA L A, da SILVA I C B, MARIZ B, et al. Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of KRT14, KRT19, miR-9-3 and miR-137 genes of oral mucosa[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 13(6): 7256-7265.
- [13] HENSON B J, BHATTACHARJEE S, O'DEE D M, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(7): 569-582.
- [14] ZHUANG C Y, YUAN Y, SONG T, et al. miR-219a-5p inhibits breast cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition by targeting myocardin-related transcription factor A[J].



- Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(12): 1112-1121.
- [15] HUANG N, LIN J, RUAN J, et al. MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3[J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 884-891.
- [16] ZHANG R Y, ZHANG J Y, WU Q F, et al. XB130: a novel adaptor protein in cancer signal transduction[J]. Biomed Rep, 2016, 4(3): 300-306.
- [17] BROSSARD M, FANG S, VAYSSE A, et al. Integrated pathway and epistasis analysis reveals interactive effect of genetic variants at TERF1 and AFAP1L2 loci on melanoma risk[J]. Int J Cancer, 2015, 137(8): 1901-1909.
- [18] 孙树鹏, 王琼, 王修玉, 等. 微丝相关蛋白 1L2 对胶质瘤细胞株 LN229 侵袭和迁移能力的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(4): 770-774.
- [19] LAHDAOUI F, DELPU Y, VINCENT A, et al. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(6): 780-788.
- [20] NICOLAS J, FATIMA L, ISABELLE V S. Targeting MUC4 in pancreatic cancer: miRNAs[J]. Oncoscience, 2015, 2(10): 799-800.
- [21] WANG Y, CHEN F Q, ZHAO M, et al. miR-107 suppresses proliferation of hepatoma cells through targeting HMGA2 mRNA 3'-UTR[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 480(3): 455-460.
- [22] LAHDAOUI F, DELPU Y, VINCENT A, et al. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(6): 780-788.
- [23] ZHAO H Z, ZHANG K C, WANG T, et al. Long non-coding RNA AFAP1-antisense RNA 1 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells and is associated with poor patient survival[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 153-189.
- [24] WANG M, HAN X P, SUN W, et al. Actin filament-associated protein 1-like 1 mediates proliferation and survival in non-small cell lung cancer cells[J]. Med Sci Monit, 2018, 9(7): 24215-24224.
- [25] MÜLLER S, RAULEFS S, BRUNS P, et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer[J]. Mol Cancer, 2015, DOI: 10.1186/s12943-015-0401-6.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 刘博, 戚诚, 赵爽, 等. MicroRNA-219a-5p 和 AFAP1L2 对胰腺癌细胞的作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(21): 38-46.

Cite this article as: LIU B, QI C, ZHAO S, et al. MicroRNA-219a-5p targeted-regulates AFAP1L2 expression to modulate pancreatic cells proliferation[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(21): 38-46.