

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.15.007
文章编号: 1005-8982 (2024) 15-0041-11

实验研究·论著

MicroRNA-105-5p/PPM1A对胰腺癌PANC-1 细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究*

赵丹¹, 黄金平¹, 张亚楠¹, 张荣花¹, 熊亚南¹, 王梅梅¹, 刘志勇², 章广玲³

[1. 华北理工大学基础医学院(河北省慢性疾病重点实验室), 河北 唐山 063210;
2. 华北理工大学附属医院 医学部, 河北 唐山 063000; 3. 华北理工大学附属医院
(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microRNA-105-5p(miR-105-5p)/PPM1A对胰腺癌PANC-1细胞增殖、迁移、侵袭及上皮细胞向间质转化(EMT)进程的影响及其潜在作用机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-105-5p在人胰腺导管上皮细胞hTRET-HPNE和胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、Bxpc-3中的表达。利用Kaplan-Meier Plotter在线工具探讨miR-105-5p与胰腺癌患者预后的关系。在PANC-1细胞中分别转染mimic NC、miR-105-5p mimic、inhibitor NC、miR-105-5p inhibitor。CCK-8法、划痕实验、Transwell实验分别检测各组细胞的增殖、迁移及侵袭能力;qRT-PCR检测miR-105-5p对E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、ZEB1表达的影响。生物信息学方法预测miR-105-5p的候选靶基因,并对候选靶基因进行GO和KEGG富集分析。双荧光素酶实验检测miR-105-5p与PPM1A的靶向关系。qRT-PCR检测在PANC-1细胞中分别转染mimic NC、miR-105-5p mimic、inhibitor NC、miR-105-5p inhibitor后PPM1A的表达。免疫荧光实验检测PPM1A在人胰腺导管上皮细胞hTRET-HPNE和胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、Bxpc-3中的表达。在PANC-1细胞中分别转染mimic NC+ pcDNA3.1、mimic NC+ pcDNA3.1-PPM1A、miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A后,通过挽救实验进一步研究miR-105-5p inhibitor与PPM1A在胰腺癌细胞中的相互作用关系。**结果** 胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、Bxpc-3中miR-105-5p mRNA相对表达量高于hTRET-HPNE细胞中miR-105-5p mRNA相对表达量($P < 0.05$),以PANC-1细胞中的相对表达量最高。miR-105-5p高表达与胰腺癌患者的不良预后有关($P < 0.05$)。miR-105-5p mimic组细胞增殖、迁移及侵袭能力均高于mimic NC组($P < 0.05$)。与mimic NC比较,miR-105-5p mimic下调E-cadherin mRNA表达,上调N-cadherin、Vimentin、ZEB1 mRNA表达($P < 0.05$)。转染miR-105-5p inhibitor后得到相反的结果。双荧光素酶实验证实miR-105-5p与PPM1A存在靶向关系。免疫荧光实验显示在胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、Bxpc-3中PPM1A的荧光强度低于人胰腺导管上皮细胞hTRET-HPNE($P < 0.05$)。挽救实验表明miR-105-5p可部分挽救PPM1A对PANC-1细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用($P < 0.05$)。**结论** miR-105-5p靶向PPM1A促进胰腺癌PANC-1细胞的增殖、迁移及侵袭。

关键词: 胰腺癌; microRNA-105-5p; PANC-1细胞; PPM1A; 迁移; 侵袭
中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A

Mechanistic study on the role of microRNA-105-5p/PPM1A in the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer PANC-1 cells*

收稿日期: 2023-11-15

* 基金项目: 河北省自然科学基金(No: H2021209026, H202309047); 河北省人力资源和社会保障厅项目(No: C20210340); 河北省重点研发计划项目(No: 213777115D); 河北省财政厅政府资助临床医学优秀人才培养项目(No: 冀财预复[2020]397号)

[通信作者] 章广玲, E-mail: zhanggl@ncst.edu.cn; Tel: 15100526789

Zhao Dan¹, Huang Jin-ping¹, Zhang Ya-nan¹, Zhang Rong-hua¹, Xiong Ya-nan¹,
Wang Mei-mei¹, Liu Zhi-yong², Zhang Guang-ling³

[1. North China University of Science and Technology School of Basic Medicine (Hebei Provincial Key Laboratory of Chronic Diseases), Tangshan, Hebei 063210, China; 2. North China University of Science and Technology Affiliated Hospital Health Science Center, Tangshan 063000, China; 3. North China University of Science and Technology Affiliated Hospital (Hebei Provincial Key Laboratory of Medical-Industrial Integration Precision Medicine), Tangshan, Hebei 063000, China]

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA-105-5p (miR-105-5p) on the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of pancreatic cancer PANC-1 cells, focusing on the potential mechanism involving PPM1A. **Methods** The expression levels of miR-105-5p in human pancreatic duct epithelial cells (hTRET-HPNE) and pancreatic cancer cells (PANC-1, AsPC-1, Bxpc-3) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The relationship between miR-105-5p expression and pancreatic cancer patient prognosis was analyzed using the Kaplan-Meier Plotter online tool. PANC-1 cells were transfected with mimic NC, miR-105-5p mimic, inhibitor NC, and miR-105-5p inhibitor, respectively. Cell proliferation, migration, and invasion were assessed using CCK-8, scratch wound healing, and Transwell assays. The effects of miR-105-5p on the expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, and ZEB1 were evaluated by qRT-PCR. Bioinformatics analysis predicted candidate target genes of miR-105-5p, followed by GO and KEGG enrichment analysis. Dual-luciferase reporter assays verified the targeting relationship between miR-105-5p and PPM1A. The expression of PPM1A in PANC-1 cells was detected after transfection with mimic NC, miR-105-5p mimic, inhibitor NC, and miR-105-5p inhibitor. Immunofluorescence experiments were conducted to measure PPM1A expression in hTRET-HPNE and pancreatic cancer cells. Finally, rescue experiments were performed by transfecting PANC-1 cells with mimic NC + pcDNA3.1, mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A, miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A to explore the interaction between miR-105-5p and PPM1A in pancreatic cancer cells. **Results** The relative expression levels of miR-105-5p mRNA were higher in PANC-1, AsPC-1, and Bxpc-3 cells compared to hTRET-HPNE cells ($P < 0.05$), with the highest levels in PANC-1 cells. High expression of miR-105-5p was associated with poor prognosis in pancreatic cancer patients ($P < 0.05$). PANC-1 cells transfected with miR-105-5p mimic showed increased proliferation, migration, and invasion compared to the mimic NC group ($P < 0.05$). MiR-105-5p mimic decreased E-cadherin mRNA expression and increased N-cadherin, Vimentin, and ZEB1 mRNA expression ($P < 0.05$), while miR-105-5p inhibitor produced the opposite effects. Dual-luciferase reporter assays confirmed the targeting relationship between miR-105-5p and PPM1A. Immunofluorescence experiments demonstrated lower PPM1A fluorescence intensity in PANC-1, AsPC-1, and Bxpc-3 cells compared to hTRET-HPNE cells ($P < 0.05$). Rescue experiments indicated that miR-105-5p could partially reverse the inhibitory effects of PPM1A on the proliferation, migration, and invasion of PANC-1 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-105-5p targets PPM1A to promote the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer PANC-1 cells.

Keywords: pancreatic cancer; microRNA-105-5p; PANC-1 cells; protein phosphatase magnesium-dependent 1A; migration; invasion

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一类高度恶性的消化系统肿瘤,5年生存率<10%,且近年来发病率呈上升趋势^[1]。作为难发现、易转移、预后较差的恶性肿瘤^[2],及早地诊断胰腺癌可能为患者的治疗带来极大的帮助,可提高患者的生存质量并延长生存期。目前,有关胰腺癌的发生、发展具体机制尚不明确^[3],因此,笔者对胰腺癌发生、发展的分子机制进行探究,为胰腺癌的诊断和治疗提供新

的研究思路。

LEE 等^[4]于 1993 年首次描述 micorRNA (miRNA)是小的非编码 RNA(约 22 个核苷酸),其在引导代谢稳态的转录调控机制中具有调节作用,且能够在很多种疾病的发生、发展中起关键调控因子作用,包括癌症^[5]。miRNA 与靶 mRNA 的 3'UTR 结合,导致 mRNA 降解和翻译抑制^[6]。miRNA 与其靶基因的相互作用是复杂的,取决于多种因

素,如 miRNA 的亚细胞位置、丰度及 miRNA-mRNA 相互作用的亲和力等^[7]。实验研究证明,大量 miRNA 在胰腺癌中呈升高或降低的异常表达^[8]。因此,从分子肿瘤学角度研究异常表达的 miRNA 与胰腺癌之间的密切关联具有重要意义。相关研究表明,高表达的 microRNA-105-5p (miR-105-5p) 与胃癌^[9]、直肠癌^[10]、三阴性乳腺癌^[11]等多种癌症相关。但目前关于 miR-105-5p 在胰腺癌中的表达水平及其生物学作用仍有待深入研究。笔者通过预测网站发现 miR-105-5p 与镁依赖性蛋白磷酸酶 1A (protein phosphatase magnesium-dependent 1A, PPM1A) 存在结合位点。PPM1A 作为一种常见的蛋白磷酸酶,是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2C 家族中最具特征性的一员^[12]。PPM1A 底物在体内非常广泛,可与多种蛋白结合使其去磷酸化,并广泛调控如细胞生长、细胞应激、免疫反应、肿瘤形成等众多生命活动^[13]。本研究旨在检测 miR-105-5p/PPM1A 在胰腺癌细胞中的表达水平及其对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移、侵袭及上皮细胞向间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 进程的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂

人正常胰腺上皮细胞 (hTRET-HPNE) 与胰腺癌细胞系 (PANC-1、AsPC-1、BxPC-3)、人胚肾细胞 (HEK293T) 均购自上海富衡生物技术有限公司,胎牛血清购自以色列 BI 公司,青链霉素混合液、胰酶、DMEM 细胞培养基均购自美国 GIBCO 公司,RPMI-1640 细胞培养基购自北京中生奥邦生物科技公司,Lipofectamine 2000 试剂、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,2×M5 Hiper SYBR Premix EsTaq (qPCR 试剂盒) 购自北京聚合美生物技术公司,miRNAs 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,CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Transwell 小室购自广州 Biofil 公司,miR-105-5p mimic、mimic NC、miR-105-5p inhibitor 和 inhibitor NC、pcDNA3.1、pcDNA3.1-PPM1A 及 PPM1A-3'-UTR-wt 和 PPM1A-3'-UTR-mut 报告载体均由安徽通用生物公司设计并合成,双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物

技术有限公司。

1.2 细胞分组及转染

人胰腺导管上皮细胞 hTRET-HPNE 与胰腺癌细胞系 PANC-1 分别培养于含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 或 DMEM 高糖培养基中,培养条件为 37 °C、5% 二氧化碳。实验分组:①hTRET-HPNE 组、PANC-1 组、AsPC-1 组、BxPC-3 组;②mimic NC 组、miR-105-5p mimic 组、inhibitor NC 组、miR-105-5p inhibitor 组;③PPM1A-3'-UTR-wt + mimic NC、PPM1A-3'-UTR-wt + miR-105-5p mimic、PPM1A-3'-UTR-mut+mimic NC、PPM1A-3'-UTR-mut + miR-105-5p mimic 组;④mimic NC+pcDNA3.1、mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A、miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A 组。细胞转染:将生长状态良好的细胞按照每孔约 1×10^6 个铺在 6 孔板中,根据分组分别转染,A 液为 247 μ L 无血清培养基 + 3 μ L Lipofectamine 2000 试剂;B 液为 245 μ L 无血清培养基 + 5 μ L 转染物;两者静置 5 min 后混合,再次静置 15 min,随后将 AB 混合液转圈滴加至孔内,放入温箱,4 ~ 6 h 换液。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测基因表达 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,根据逆转录试剂盒的说明书获得 cDNA。qRT-PCR 检测基因相对表达量,以 GAPDH 和 U6 为内参。GAPDH 正向引物:5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',反向引物:5'-GAGGCCTGGGGCTCATTT-3',引物长度均为 20 bp。U6 正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3',引物长度为 20 bp;miR-105-5p 正向引物:5'-TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT-3',引物长度为 23 bp[U6 和 miR-105-5p 的反向引物均由配套生工 miRNAs 第一链 cDNA 合成试剂盒 (加尾法) (B532451) 提供]。PPM1A 正向引物:5'-GCAGTGAAGAAGGAGGCAGAGTTG-3',反向引物:5'-CTGCTGGGAGGCTGGGGATG-3',引物长度分别为 24 bp 和 20 bp。E-cadherin 正向引物:5'-AGTCACTGACACCAACGATAAT-3',反向引物:5'-ATCGTTGTTCACTGGATTTGTG-3',引物长度均为 22 bp。N-cadherin 正向引物:5'-CGATAAGGATCAACCCCATACA-3',反向引物:5'-TTCAAAGTCGATGGTTTGACC-3',引物长度均为 22 bp;Vimentin 正向引物:5'-TCGTGAATACCAAGACCTGCTCAATG-3',

反向引物: 5'-AATCCTGCTCTCCTCGCCTTCC-3', 引物长度分别为 26 bp 和 22 bp。ZEB1 正向引物: 5'-CAGGCAAAGTAAATATCCCTGC-3', 反向引物: 5'-GGTAAACTGGGGAGTTAGTCA-3', 引物长度均为 22 bp。qRT-PCR 扩增反应采用 2 × M5 HiPer SYBR Ex Taq 试剂盒。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, 循环 40 次。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达量。

1.3.2 miR-105-5p 在胰腺癌患者中的预后分析 利用 Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) 在线分析工具探讨 miR-105-5p 与胰腺癌患者总生存期的关系。

1.3.3 CCK-8 法检测 PANC-1 细胞增殖 将各组细胞按 4×10^3 个/孔的密度接种至 96 孔板中, 置于 37 °C、5% 二氧化碳细胞培养箱中培养, 接种后分别在 24、48、72 和 96 h 加入 10 μ L CCK-8 试剂和 100 μ L 无双抗培养基的混合液, 继续孵育 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。

1.3.4 划痕实验检测 PANC-1 细胞迁移 将各组细胞按 2×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板中, 温箱培养 24 h, 待细胞汇合度达 60% ~ 80% 时进行转染。转染后用 200 μ L 的无酶枪头垂直于孔内划线, 划线后用生理盐水清洗 2 次, 加入 2 mL 含 2% FBS 的低血清培养基, 分别在 0、24 和 48 h 用光学显微镜拍照, 并用 Image J 软件测量划痕面积并分析。

1.3.5 Transwell 实验检测 PANC-1 细胞的迁移和侵袭 将 Matrigel 基质胶与无血清培养基按 1:50 稀释 (浓度约为 200 μ g/mL), 并向每个小室的上室垂直加入 100 μ L 凝胶, 置于 37 °C 孵箱, 至少孵育 30 min, 等待基质胶凝固后进行侵袭实验, 将转染 24 h 后的细胞消化, 计数, 在 Transwell 小室下室中加入 800 μ L 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。在不含基质胶的 Transwell 小室的上室接种 2×10^4 个细胞以进行迁移实验, 培养 24 h; 在含基质胶的 Transwell 小室的上室接种 5×10^4 个细胞进行侵袭实验, 培养 48 h。培养后擦去小室膜上方的细胞, 甲醇固定液 600 μ L 固定 3 min, 结晶紫染色 3 min, 生理盐水漂洗小室 2 次, 显微镜下计数穿膜细胞。

1.3.6 miR-105-5p 候选靶基因的预测及 GO 和 KEGG 通路富集分析 利用 TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)、miRDB (<http://www.mirdb.org/>)、DIANA (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>

<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>)、miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) 和 ENCORI (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) 数据库获取 miR-105-5p 的候选靶基因, 为进一步提高预测结果可靠性, 将各预测结果取交集并制作韦恩图, 并利用 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对靶基因集合进行功能富集分析和信号转导通路富集分析。借助数据库软件附带的 Fisher Exact Test 计算 P 值, 以 $P < 0.05$ 为显著性阈值得到差异具有统计学意义的生物学过程和信号转导通路。

1.3.7 双荧光素酶报告基因分析 Target Scan 预测 PPM1A 3'-非翻译区 (3'-UTR) 中的 miR-105-5p 结合位点。构建含 PPM1A 野生型或突变型的荧光素酶质粒, 按照如下分组在 HEK293T 细胞中进行双荧光素酶实验: PPM1A-3'-UTR + mimic NC、PPM1A-3'-UTR + miR-105-5p mimic、PPM1A-3'-UTR-mut + mimic NC、PPM1A-3'-UTR-mut + miR-105-5p mimic。按照使用说明书进行双荧光素酶基因检测。

1.3.8 免疫荧光实验检测 PPM1A 的表达 收集各组转染 24 h 的细胞, 适量接种至共聚焦小皿中继续培养, 细胞生长至 50% 后弃培养液, 用 PBS 在摇床上清洗 2 次, 5 min/次。4% 多聚甲醛固定 30 min, 清洗后 0.2% Triton X-100 对细胞打孔, 每孔加入 5% BSA 进行免疫封闭 1 h, 在对应一抗中室温结合 30 min, 置于 4 °C 孵育过夜。次日在室温条件下摇床避光孵育二抗 45 min, 清洗后每孔避光加入 DAPI 室温孵育, 用荧光显微镜观察拍照。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验。绘制生存曲线, 比较用 Log rank χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

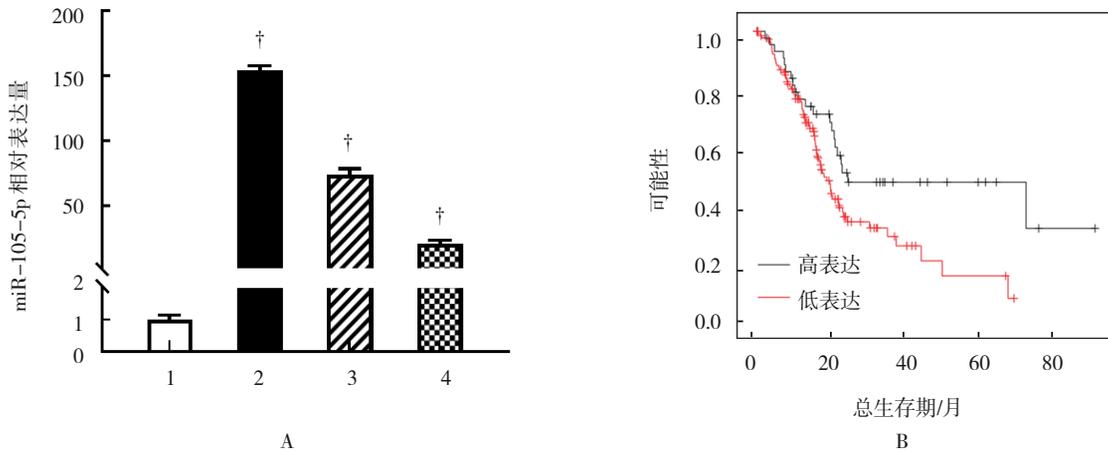
2 结果

2.1 miR-105-5p 在 hTRET-HPNE、PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 细胞中相对表达量比较及与胰腺癌预后关系

hTRET-HPNE、PANC-1、AsPC-1、BxPC-3 细胞中 miR-105-5p 的相对表达量分别为 (1.01 ± 0.14)、

(154.00 ± 3.76)、(74.11 ± 4.41)、(20.35 ± 3.01), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=1\ 319.373$, $P=0.000$)。相比 hTRET-HPNE 细胞, miR-105-5p 相对表达量在胰腺癌 PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 细胞中升高 ($P<0.05$), 以 PANC-1 细胞中 miR-105-5p 相对表达量最高, 因此选择 PANC-1 细胞进行后续实

验 (见图 1A)。Kaplan-Meier Plotter 分析结果显示, 经 Log rank χ^2 检验, miR-105-5p 高表达与胰腺癌患者的不良预后有关, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.241$, $P=0.022$)。miR-105-5p 高表达的胰腺癌患者较低表达的患者增加 79% 的风险比率 [$\hat{HR}=1.79$ (95% CI: 1.08, 2.95)] (见图 1B)。



1: hTRET-HPNE 组; 2: PANC-1 组; 3: AsPC-1 组; 4: BxPC-3 组; † 与 hTRET-HPNE 组比较, $P<0.05$ 。

图 1 各细胞 miR-105-5p 相对表达量及 miR-105-5p 与胰腺癌患者预后的关系分析

2.2 各组 miR-105-5p 相对表达量比较

mimic NC 组、miR-105-5p mimic 组、inhibitor NC 组、miR-105-5p inhibitor 组 miR-105-5p 相对表达量分别为 (1.01 ± 0.16)、(25.44 ± 2.73)、(1.01 ± 0.16)、(0.10 ± 0.02), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=245.802$, $P=0.000$), miR-105-5p mimic 组较 mimic NC 组升高 ($P<0.05$), miR-105-5p inhibitor 组较 inhibitor NC 组降低 ($P<0.05$), 提示转染成功。

2.3 miR-105-5p 对 PANC-1 细胞增殖、迁移及侵袭的影响

mimic NC 组与 miR-105-5p mimic 组在 24、48、72 和 96 h 细胞增殖比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞增殖比较, 差异有统计学意义 ($F=46\ 593.254$, $P=0.000$); ②两组细胞增殖比较, 差异有统计学意义 ($F=2\ 683.507$, $P=0.000$), miR-105-5p mimic 组细胞增殖能力较 mimic NC 组增强; ③两组细胞增殖变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=227.542$, $P=0.000$) (见表 1)。inhibitor NC 组与 miR-105-5p inhibitor 组在 24、48、72 和 96 h 细胞增殖比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞增殖比较, 差异有统计学意义 ($F=935.675$, $P=0.000$); ②两组细胞增殖比较, 差异有统计学意义 ($F=$

322.844 , $P=0.000$), miR-105-5p inhibitor 组细胞增殖能力较 miR-105-5p inhibitor 组被抑制; ③两组细胞增殖变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=14.114$, $P=0.000$) (见表 2)。见图 2。

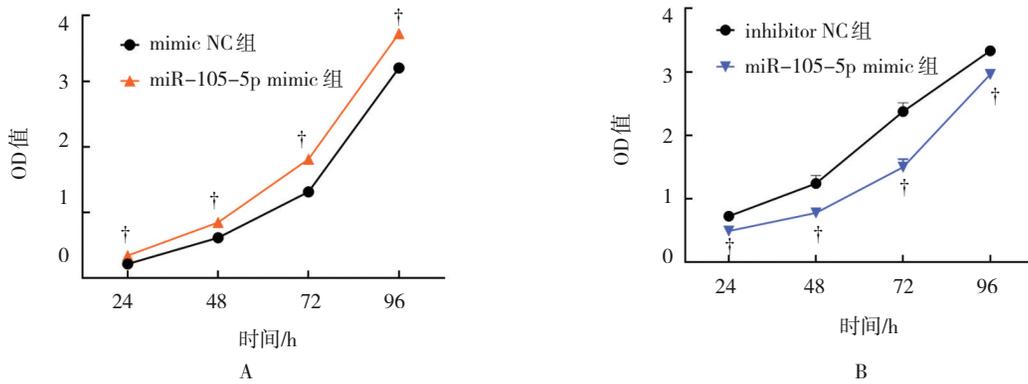
表 1 mimic NC 组与 miR-105-5p mimic 组不同时间点 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mimic NC 组 | 0.22 ± 0.01 | 0.61 ± 0.0 | 1.32 ± 0.01 | 3.2 ± 0.01 |
| miR-105-5p mimic 组 | 0.34 ± 0.02 | 0.85 ± 0.01 | 1.81 ± 0.03 | 3.73 ± 0.01 |

表 2 inhibitor NC 组与 miR-105-5p mimic 组不同时间点 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| inhibitor NC 组 | 0.73 ± 0.02 | 1.24 ± 0.13 | 2.38 ± 0.14 | 3.33 ± 0.01 |
| miR-105-5p inhibitor 组 | 0.49 ± 0.01 | 0.78 ± 0.05 | 1.5 ± 0.12 | 2.96 ± 0.07 |

划痕实验结果显示, miR-105-5p mimic 组 PANC-1 细胞 24 和 48 h 后迁移率分别为 (27.31 ± 0.65)% 和 (63.59 ± 4.3)%, mimic NC 组分别为 (19.29 ± 4.05)% 和 (46.21 ± 3.47)%, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 (24 h: $t=3.388$, $P=0.028$; 48 h: $t=5.455$, $P=0.006$)。miR-105-5p inhibitor 组 PANC-1 细胞 24 和 48 h 后迁移率分别为 (17.77 ± 0.09)% 和



A: mimic 组增殖能力; † 与 mimic NC 组比较, $P < 0.05$ 。B: inhibitor 组增殖能力; † 与 inhibitor NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 miR-105-5p 对 PANC-1 细胞增殖能力的影响

(29.68 ± 2.14)%, inhibitor NC 组分别为 (25.2 ± 0.43)% 和 (49.28 ± 2.52)%, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 (24 h: $t = 29.057, P = 0.000$; 48 h: $t = 10.263, P = 0.001$)。见图 3。

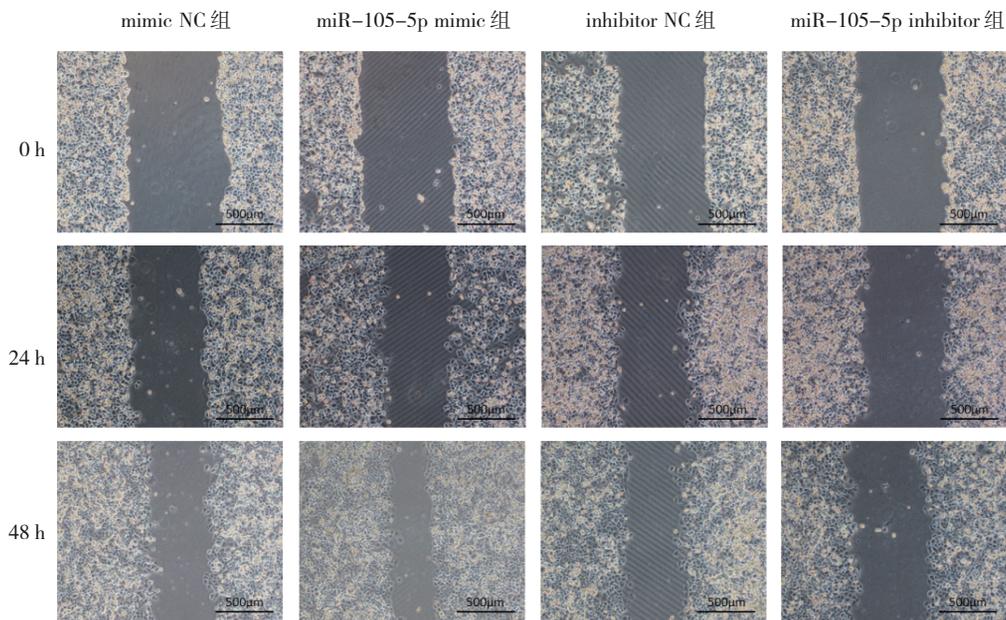


图 3 划痕实验检测细胞迁移能力 ($\times 40$)

Transwell 实验结果显示, 各组细胞相对迁移和侵袭细胞数, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-105-5p mimic 组较 mimic NC 组迁移和侵袭细胞数增多 ($P < 0.05$), miR-105-5p inhibitor 组较 inhibitor NC 组迁移和侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 4。

2.4 miR-105-5p 对 PANC-1 细胞 EMT 进程的影响

qRT-PCR 结果显示, 各组 EMT 进程中的标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、ZEB1 mRNA 的相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计

表 3 各组 PANC-1 细胞相对迁移和侵袭细胞数的比较 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 迁移 | 侵袭 |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| mimic NC 组 | 100 ± 3 | 100 ± 8 |
| miR-105-5p mimic 组 | 144 ± 18 ^① | 188 ± 38 ^① |
| inhibitor NC 组 | 100 ± 3 | 100 ± 9 |
| miR-105-5p inhibitor 组 | 45 ± 9 ^② | 55 ± 8 ^② |
| F 值 | 47.320 | 22.358 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

注: ①与 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 inhibitor NC 组, $P < 0.05$ 。

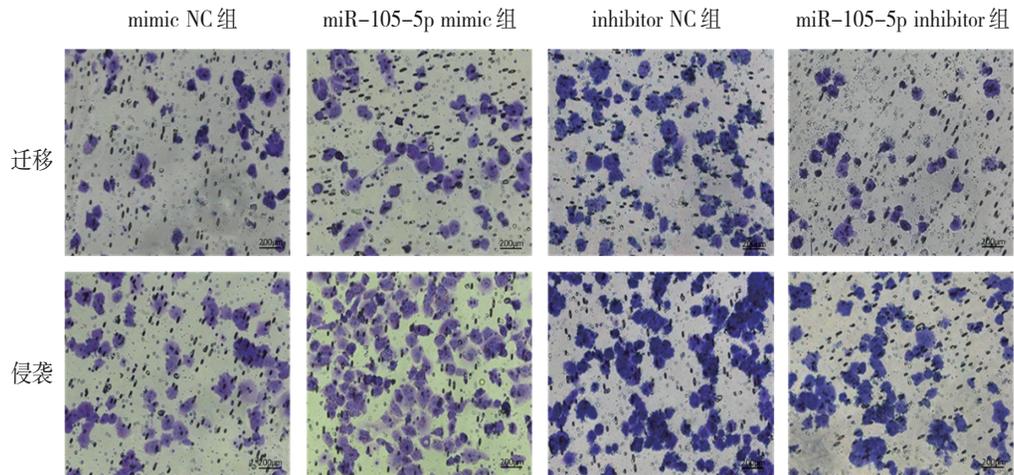


图4 Transwell 实验检测miR-105-5p对PANC-1细胞迁移、侵袭能力的影响 (×100)

学意义 ($P < 0.05$), miR-105-5p mimic 组 E-cadherin mRNA 的相对表达量较 mimic NC 组降低 ($P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin、ZEB1 mRNA 的相对表达量较 mimic NC 组升高 ($P < 0.05$)。miR-105-5p inhibitor 组

E-cadherin mRNA 的相对表达量较 inhibitor NC 组升高 ($P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin、ZEB1 mRNA 的相对表达量较 inhibitor NC 组降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组 PANC-1 细胞 EMT 进程标志物相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | E-cadherin mRNA | N-cadherin mRNA | Vimentin mRNA | ZEB1 mRNA |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| mimic NC组 | 1.02 ± 0.21 | 1.00 ± 0.08 | 1.00 ± 0.05 | 1.00 ± 0.02 |
| miR-105-5p mimic | 0.34 ± 0.08 ^① | 1.50 ± 0.25 ^① | 1.17 ± 0.01 ^① | 1.15 ± 0.03 ^① |
| inhibitor NC组 | 1.04 ± 0.35 | 1.01 ± 0.21 | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.06 |
| miR-105-5p inhibitor组 | 1.78 ± 0.28 ^② | 0.54 ± 0.08 ^② | 0.55 ± 0.13 ^② | 0.06 ± 0.05 ^② |
| F 值 | 16.417 | 15.768 | 34.618 | 366.396 |
| P 值 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.000 |

注:①与mimic NC组比较, $P < 0.05$; ②与inhibitor NC组, $P < 0.05$ 。

2.5 miR-105-5p 候选靶基因预测结果及 GO 和 KEGG 通路富集分析

采用 TargetScan、miRDB、miRWalk、DIANA 和 ENCORI 数据库预测并取交集, 共发现靶基因 256 个 (见图 5)。GO 和 KEGG 通路富集分析显示, GO 富集中最显著 Top10 的条目在生物学过程 (BP) 上主要集中在转录、蛋白磷酸化、树突形态发生、凋亡过程负调控及基因表达负调控等; 细胞组分 (CC) 上主要集中在核浆、胞质、大分子复合物、泛素连接酶复合物、内膜等; 分子功能 (MF) 主要集中在蛋白结合、泛素蛋白转移酶活性、转录辅阻遏物活性等方面 (见图 6A)。KEGG 通路分析显示, miR-105-5p 候选靶基因主要富集在各种信号通路及代谢上 (见图 6B)。

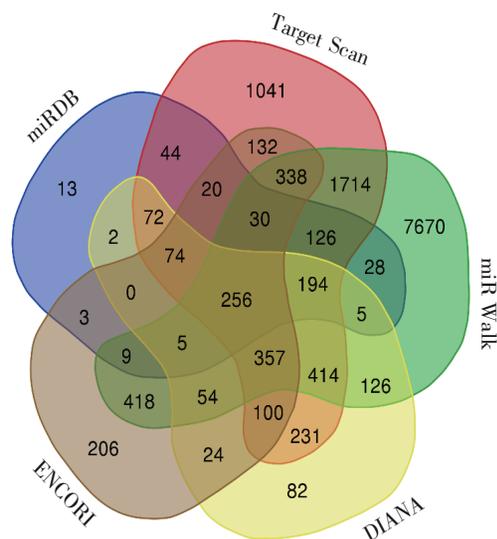


图5 miR-105-5p靶基因的预测结果

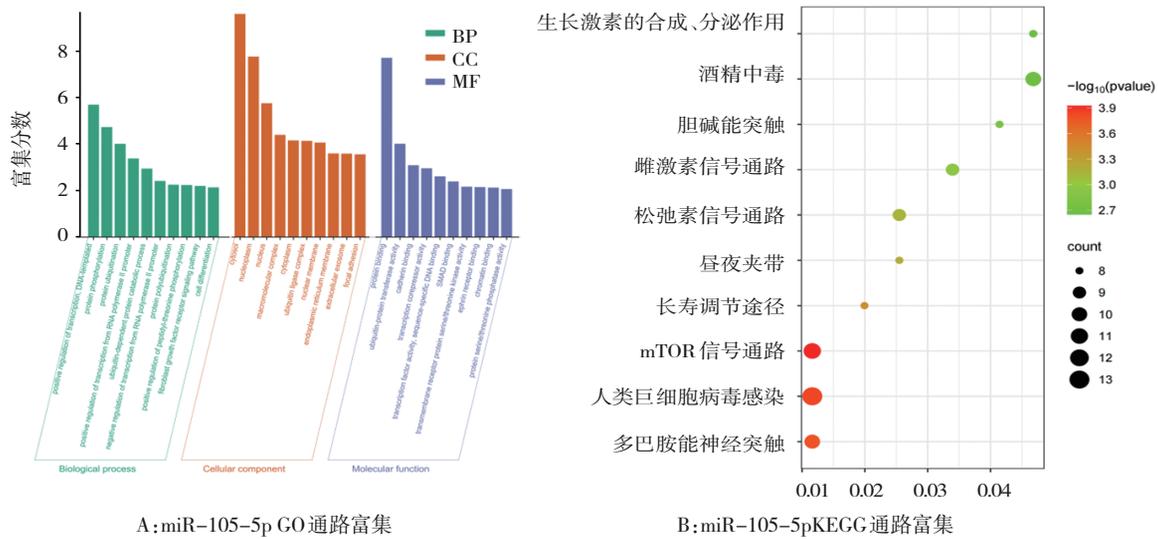


图6 miR-105-5p GO和miR-105-5p KEGG通路富集分析结果

2.6 miR-105-5p 与 PPM1A 靶向关系的预测及验证

采用 TargetScan 预测 miR-105-5p 与 PPM1A 3'-UTR 的结合位点 (见图 7)。双荧光素酶实验结果显示, mimic NC 组与 miR-105-5p mimic 组野生型萤

光素酶相对活性比较 [(1.00 ± 0.01) VS (0.74 ± 0.03)], 差异有统计学意义 ($t=13.305, P=0.000$); 而 mimic NC 组与 miR-105-5p mimic 组突变型萤光素酶相对活性比较 [(1.00 ± 0.01) VS (0.98 ± 0.04)], 差异无统计学意义 ($t=1.226, P=0.445$)。

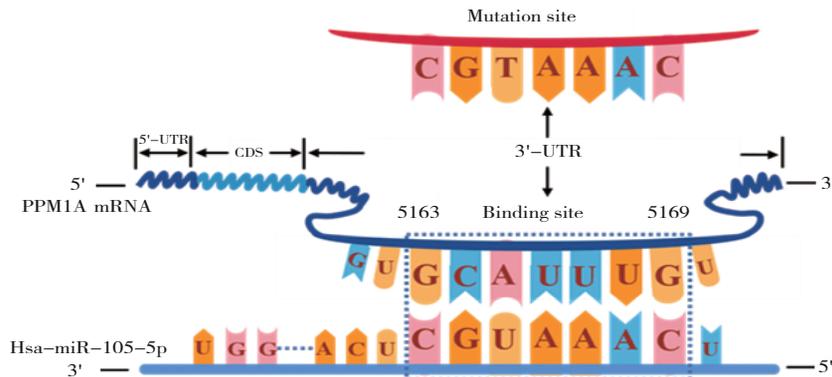


图7 生物信息学预测miR-105-5p与PPM1A 3'-UTR结合位点预测

mimic NC 组、miR-105-5p mimic 组、inhibitor NC 组、miR-105-5p inhibitor 组 PPM1A mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.10)、(0.71 ± 0.09)、(1.01 ± 0.19)、(1.98 ± 0.11), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=53.165, P=0.000$), miR-105-5p mimic 组较 mimic NC 组降低 ($P<0.05$), miR-105-5p inhibitor 组较 inhibitor NC 组升高 ($P<0.05$)。

2.7 hTRET-HPNE、PANC-1、AsPC-1和BxPC-3细胞中 PPM1A 表达比较

免疫荧光实验结果显示, PPM1A 在胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 中的荧光强度较

PPM1A 在 hTRET-HPNE 细胞中的荧光强度显著降低 (见图 8)。PPM1A 在胰腺癌细胞 hTRET-HPNE、PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 中的相对表达量分别为: (0.97 ± 0.10)、(0.63 ± 0.04)、(0.56 ± 0.04)、(0.51 ± 0.06), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=20.034, P=0.000$)。

2.8 miR-105-5p 部分挽救 PPM1A 对 PANC-1 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 实验结果表明, mimic NC + pcDNA3.1 组、mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A 组、miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A 组分别在

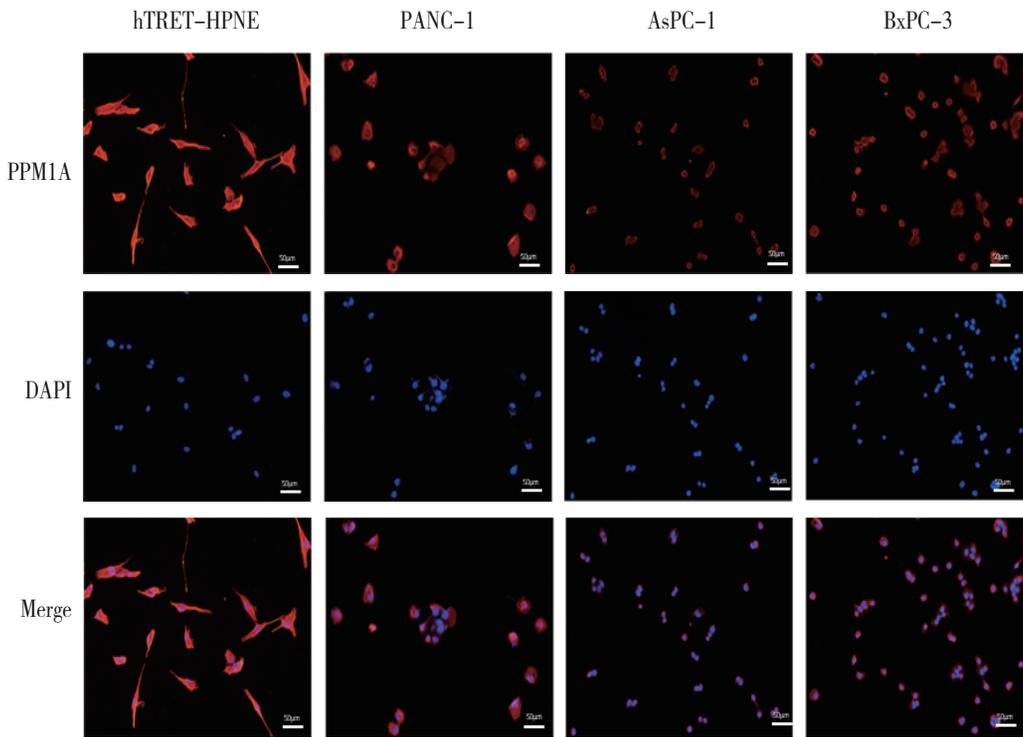


图8 PPM1A在人正常胰腺导管上皮细胞和胰腺癌细胞中的表达 (×200)

24、48、72 和 96 h 的吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果显示:①不同时间点的细胞吸光度值比较,差异有统计学意义 ($F = 338.342, P = 0.000$);②各组细胞吸光度值

比较,差异有统计学意义 ($F = 97.916, P = 0.001$);③各组细胞吸光度值的变化趋势比较,差异有统计学意义 ($F = 4.689, P = 0.005$)。见表 5。

表 5 各组不同时间点的吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| mimic NC + pcDNA3.1 组 | 0.78 ± 0.09 | 1.55 ± 0.17 | 2.00 ± 0.09 | 2.15 ± 0.02 |
| mimicNC+pcDNA3.1-PPM1A组 | 0.54 ± 0.04 | 1.11 ± 0.08 | 1.25 ± 0.07 | 1.62 ± 0.03 |
| miR-105-5pmimic+pcDNA3.1-PPM1A组 | 0.82 ± 0.09 | 1.56 ± 0.14 | 1.91 ± 0.08 | 2.06 ± 0.02 |

2.9 miR-105-5p 部分挽救 PPM1A 对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的抑制作用

Transwell 实验结果表明,各组细胞相对迁移和侵袭细胞数比较,经单因素方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A 组较 mimic NC + pcDNA3.1 组相对迁移和侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$),miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A 组较 mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A 组相对迁移和侵袭细胞数增多 ($P < 0.05$)。见表 6 和图 9。

表 6 各组 PANC-1 细胞相对迁移和侵袭细胞数的比较 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 迁移 | 侵袭 |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| mimic NC + pcDNA3.1 组 | 100 ± 19 | 100 ± 10 |
| mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A 组 | 41 ± 10 ^① | 47 ± 7 ^① |
| miR-105-5p mimic + pcDNA3.1-PPM1A 组 | 71 ± 10 ^② | 80 ± 15 ^② |
| F 值 | 13.800 | 16.642 |
| P 值 | 0.006 | 0.004 |

注:①与 mimic NC + pcDNA3.1 组比较, $P < 0.05$;②与 mimic NC + pcDNA3.1-PPM1A 组比较, $P < 0.05$ 。

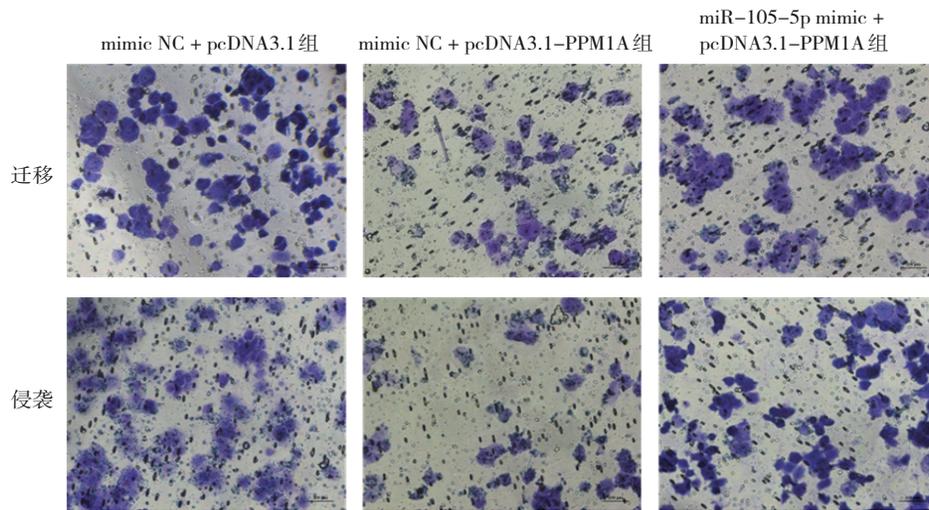


图9 各组PANC-1细胞迁移和侵袭的代表性图像 (×100)

3 讨论

miR-105-5p是miR-105家族中的一员,其作为促癌因子在疾病的发生、发展中起关键性作用。细胞外囊泡来源的血清miR-105-5p可以通过靶向SPARC样蛋白1和调节FAK/Akt信号通路转移到食管鳞状细胞癌细胞,并促进食管鳞状细胞癌的进展^[14]。GAO等^[15]研究结果表明,miR-105-5p水平越高,食管癌患者的预后越差,其可以促进食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭。也有部分研究结果表明,miR-105-5p在某些疾病中发挥抑制作用,miR-105可能在卵巢上皮性癌的发展过程中作为一种有效的肿瘤抑制因子发挥作用,可能影响细胞的增殖、侵袭及对紫杉醇的化疗敏感性,至少部分地通过抑制锌和环指2信号发挥作用^[16]。在宫颈癌中,抑制miR-105-5p表达可通过上调XIAP相关因子1抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭^[17]。本研究结果表明,miR-105-5p促进胰腺癌细胞PANC-1的增殖、迁移、侵袭能力及EMT进程。

miRNA与靶mRNA的3'UTR结合,导致mRNA降解和翻译抑制,从而调控细胞的生命活动^[18],许多miRNA在胰腺癌的发生、发展中起至关重要的促进或抑制作用。ZHAO等^[19]证明了胰腺癌细胞中miR-21的表达是由表皮生长因子诱导的。miR-21促进表皮生长因子诱导的细胞增殖,抑制细胞凋亡,加速细胞周期进程。FANG等^[20]发现并阐明了放疗后胰腺癌再生和转移的潜在机制,研究证实,受照射死亡的胰腺癌细胞中miR-193a的表达上调可

能通过调节TGF- β_2 /TGF- β RIII信号而促进存活癌细胞的再增殖和转移。HE等^[21]研究发现,miR-137调控 β -catenin的表达和核转位,Krüppel样转录因子12(Krüppel-like factors 12, KLF12)可以部分抑制这种作用。由此认为,miR-137通过调控 β -catenin的核转位和激活Wnt信号来靶定KLF12,从而对胰腺癌的干细胞特性和致瘤性产生影响。

有研究报道,种子区是miRNA上进化最为保守的片段,通常与mRNA 3'UTR上的靶位点完全互补^[22-23]。基于是否存在与种子区配对的这一原理,通过TargetScan、miRDB、miRWalk、DIANA和ENCORI数据库对miR-105-5p的靶基因进行预测,5个数据库取交集得到的共同靶基因最终有256个。进一步对共同靶基因进行GO注释和KEGG信号通路分析,PPM1A作为一种常见的蛋白磷酸酶具有多种底物,通常作为应激反应途径的负调节因子发挥作用^[24]。PPM1A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^[25]。人类的PPM1A基因位于14号染色体,位置在14q23.1^[24],PPM1A具有底物催化功能,多种蛋白与之结合后使其去磷酸化。PPM1A在细胞生长、免疫合成、机体应激反应、肿瘤进展等方面发挥重要调控作用。本研究通过数据库预测显示,PPM1A是miR-105-5p的靶基因。双萤光素酶实验验证了miR-105-5p能够靶向结合PPM1A。免疫荧光实验结果表明,PPM1A在胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、BxPC-3低表达,这与miR-105-5p在胰腺癌细胞PANC-1、AsPC-1、BxPC-3中的表达相反,以上结果进一步提示miR-105-5p与

PPM1A 之间存在靶向关系。

综上所述, miR-105-5p 通过靶向 PPM1A 促进胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖, 迁移和侵袭, 且 miR-105-5p 可部分挽救 PPM1A 对 PANC-1 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。本研究为胰腺癌患者治疗及预后的可行性提供了一定的临床依据。

参 考 文 献 :

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] CONNOR A A, GALLINGER S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(3): 131-142.
- [3] SHERMAN M H, BEATTY G L. Tumor microenvironment in pancreatic cancer pathogenesis and therapeutic resistance[J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18: 123-148.
- [4] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J/OL]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [5] AZIZ F, CHAKRABORTY A, KHAN I, et al. Relevance of miR-223 as potential diagnostic and prognostic markers in cancer[J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(2): 249.
- [6] RANI V, SENGAR R S. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(3): 685-692.
- [7] KUMAR L, KUMAR S, SANDEEP K, et al. Therapeutic approaches in pancreatic cancer: recent updates[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(6): 1611.
- [8] HALBROOK C J, LYSSIOTIS C A, PASCA di MAGLIANO M, et al. Pancreatic cancer: advances and challenges[J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1729-1754.
- [9] MILIOTIS C, SLACK F J. miR-105-5p regulates PD-L1 expression and tumor immunogenicity in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 518: 115-126.
- [10] KONG W C, LI H, XIE L S, et al. LncRNA MCF2L-AS1 aggravates the malignant development of colorectal cancer via targeting miR-105-5p/RAB22A axis[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1069.
- [11] MAZUMDAR A, TAHANEY W M, REDDY BOLLU L, et al. The phosphatase PPM1A inhibits triple negative breast cancer growth by blocking cell cycle progression[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2019, 5: 22.
- [12] KAMADA R, KUDOH F, ITO S, et al. Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: evolution, structures, diseases and inhibitors[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 215: 107622.
- [13] HONG Y J, GONG L L, YU B Y, et al. PPM1A suppresses the proliferation and invasiveness of RCC cells via Smad2/3 signaling inhibition[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(3): 245-254.
- [14] HE B J, ZHANG K, HAN X L, et al. Extracellular vesicle-derived miR-105-5p promotes malignant phenotypes of esophageal squamous cell carcinoma by targeting SPARCL1 via FAK/AKT signaling pathway[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 819699.
- [15] GAO R X, WANG Z, LIU Q, et al. MicroRNA-105 plays an independent prognostic role in esophageal cancer and acts as an oncogene[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(2): 173-180.
- [16] LI M, ZHANG S, MA Y, et al. Role of hsa-miR-105 during the pathogenesis of paclitaxel resistance and its clinical implication in ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(5): 84.
- [17] 艾恒玲, 苗慧, 赵欢, 等. miR-105-5p 靶向 XAF1 抑制宫颈癌细胞迁移和侵袭的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(8): 1723-1727.
- [18] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662.
- [19] ZHAO Q Y, CHEN S M, ZHU Z L, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting spry2[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1157.
- [20] FANG C, DAI C Y, MEI Z, et al. microRNA-193a stimulates pancreatic cancer cell repopulation and metastasis through modulating TGF- β_2 /TGF- β RIII signalings[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 25.
- [21] HE Z W, GUO X J, TIAN S, et al. MicroRNA-137 reduces stemness features of pancreatic cancer cells by targeting KLF12[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 126.
- [22] GREGOROVA J, VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA P, SEVCIKOVA S. Epigenetic regulation of MicroRNA clusters and families during tumor development[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1333.
- [23] WNUK J, STRZELCZYK J K, GISTEREK I. Clinical value of circulating miRNA in diagnosis, prognosis, screening and monitoring therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma-a review of the literature[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5113.
- [24] LI M, XU X F, SU Y, et al. A comprehensive overview of PPM1A: from structure to disease[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(6): 453-461.
- [25] 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]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(44): e8361.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 赵丹, 黄金平, 张亚楠, 等. MicroRNA-105-5p/PPM1A 对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(15): 41-51.

Cite this article as: ZHAO D, HUANG J P, ZHANG Y N, et al. Mechanistic study on the role of microRNA-105-5p/PPM1A in the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer PANC-1 cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(15): 41-51.