

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003189

炭疽毒素受体 2 表达受 miR-145-5p 调控在胰腺癌的作用机制研究

马 林, 邓大炜, 兰 川, 刘 胜, 唐豪佑, 黄孝彬, 李建水
(川北医学院肝胆胰肠研究所/川北医学院肝胆外二科, 南充 637000)

【摘要】目的:探讨炭疽毒素受体 2 (anthrax toxin receptor 2, ANT XR2) 在胰腺癌组织和细胞中的表达、临床意义和细胞功能, 验证 miR-145-5p 在胰腺癌细胞中调控 ANT XR2 的作用机制。**方法:**分析 GEO 和 TCGA 数据库中胰腺癌的转录数据和临床数据。通过 CCK-8 实验、流式细胞术、划痕实验和 Transwell 实验进行细胞功能验证。采用 miRNA 靶点预测数据库反向预测可能通过 ceRNA 机制抑制 ANT XR2 表达的 miRNA, 并使用双荧光素酶报告实验进行验证。**结果:**ANT XR2 在胰腺癌组织和细胞中的表达均上调 (均 $P < 0.05$), ANT XR2 上调预示着原发肿瘤等级 ($P < 0.05$)、肿瘤细胞分化等级 ($P < 0.05$) 和总体生存期 ($P < 0.05$, HR=1.72) 均较差。ANT XR2 可以促进胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭 (均 $P < 0.05$)。ANT XR2 是 miR-145-5p 下游的靶标 ($P < 0.01$), miR-145-5p 可以通过抑制 ANT XR2 的表达抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。**结论:**ANT XR2 在胰腺癌组织和细胞中过表达, 促进胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 且与患者预后有关。miR-145-5p 通过调控 ANT XR2 的表达抑制其促癌作用。

【关键词】炭疽毒素受体 2; miR-145-5p; 增殖; 迁移和侵袭; 胰腺癌

【中图分类号】R736.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-04-12

Mechanism of anthrax toxin receptor 2 expression regulated by miR-145-5p in pancreatic cancer

Ma Lin, Deng Dawei, Lan Chuan, Liu Sheng, Tang Haoyou, Huang Xiaobin, Li Jianshui
(Second Department of Hepatobiliary Surgery, Institute of Hepatobiliary, Pancreatic and Intestine,
North Sichuan Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the expression, clinical significance and cellular functions of anthrax toxin receptor 2 (ANT XR2) in pancreatic cancer tissues and cells and to validate the mechanism of miR-145-5p in regulating ANT XR2 in pancreatic cancer cells. **Methods:** Analysis of transcriptional and clinical data from the GEO and TCGA databases for pancreatic cancer was made. Cellular function was validated by CCK-8 assay, flow cytometry, wound healing experiment and Transwell assay. The miRNA target prediction database was used to reversely predict miRNAs that might inhibit ANT XR2 expression through the ceRNA mechanism, and it was validated using dual luciferase reporter assays. **Results:** ANT XR2 expression was upregulated in both pancreatic cancer tissues and cells (all $P < 0.05$), and ANT XR2 upregulation predicted poorer primary tumor grade ($P < 0.05$), tumor cell differentiation grade ($P < 0.05$) and overall survival ($P < 0.05$, HR=1.72). ANT XR2 inhibited the cell proliferation, migration and invasion (all $P < 0.05$). ANT XR2 was a target of miR-145-5p ($P < 0.01$), and miR-145-5p could inhibit the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells by suppressing the expression of ANT XR2. **Conclusion:** ANT XR2 is overexpressed in pancreatic cancer tissues and cells, can promote proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells and is associated with patient prognosis. miR-145-5p can inhibit the pro-cancerous effects of ANT XR2 by regulating its expression.

【Key words】anthrax toxin receptor 2; miR-145-5p; proliferation; migration and invasion; pancreatic cancer

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是一种预后极差的消化道肿瘤, 5 年生存率仅为 8%^[1]。在 PC 中, 最

常见的突变基因包括鼠类肉瘤病毒癌基因 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)、细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A)、TP53 和 SMAD 家族成员 4 (SMAD family member 4, SMAD4), 但目前还没有针对这些突变基因的有效靶向药^[2]。因此, 寻找新的治疗靶点和探索 PC 的分子机制可能有助于制定更有效的治疗策略。

作者介绍: 马 林, Email: malinymx@163.com,

研究方向: 胰腺疾病基础与临床。

通信作者: 李建水, Email: calendresmall@gmail.com。

基金项目: 四川省科技厅资助项目 (编号: 2018JY0489)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230321.1134.002.html>

(2023-03-22)

ANTXR2 已经被证明与多种癌症的发生发展密切相关,最初被认为参与肿瘤血管生成,包括内皮细胞增殖和血管形成^[3]。随后发现 ANTXR2 上调促进了胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭,并与低生存率相关^[4]。有趣的是,过表达 ANTXR2 也被证实可以抑制肿瘤细胞的生长,减缓乳腺癌和前列腺癌的进展^[5-6]。但关于 ANTXR2 在 PC 中的功能及其相关机制研究仍鲜有报道。

本研究旨在阐述 ANTXR2 在胰腺癌中的临床意义,研究其对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,以及 miR-145-5p 在胰腺癌细胞中调控 ANTXR2 的作用机制,为寻找新的胰腺癌治疗靶点提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰酶、100 U/mL 青霉素-链霉素(Biological Industries);过表达质粒 pcDNA 3.1-ANTXR2 (ANTXR2-OE) 及其对照 pcDNA 3.1 (vector)、shRNA-ANTXR2 (shANTXR2-1、shANTXR2-2、shANTXR2-3) 及其对照 (sh-NC; 艾博思生物科技有限公司);miRNA 模拟物 (miR-mimics) 及其对照 (miR-NC; 北京擎科生物科技有限公司);Lipofectamine 3000 和 TRIzol RNA 提取试剂 (Invitrogen); All-in-One miRNA qPCR 试剂盒 (GeneCopoeia); RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific); SuperReal PreMix Plus 试剂盒 (天根生物科技公司);细胞周期检测试剂盒(凯基);Transwell 小室、Matrigel 基质胶(康宁);LightCycler 96(Roche);RIPA 蛋白裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂混合物和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝);ANTXR2 兔一抗(Abcam)、GAPDH 兔一抗(ProteinTech)、辣根过氧化物酶(HRP)偶联羊抗兔二抗(Aspen);ECL 化学发光检测试剂盒(ASPEN);CCK-8 检测试剂(ZETA);倒置显微镜(Leica);流式细胞术检测系统(NovoCytel);Mastercycler(Eppendorf);聚变电化学发光系统(Vilber);多功能酶标仪(Bio-Rad);Infinite M200 酶读数仪(Tecan)。

1.2 生物信息学分析

ANTXR2 基因表达数据和临床数据从基因表达总库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 和癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和基因型-组织表达 (Genotype-Tissue Expression, GTEx) 数据库下载,包括 GSE41368 (6 个肿瘤和 6 个正常组织)、GSE15471 (39 个肿瘤和 39 个正常组织)、GSE16515 (36 个肿瘤和 16 个正常组织)、GSE62452 (69 个肿瘤和 61 个癌旁组织) 和 TCGA-GTEx (179 个肿瘤和 171 个正常组织) 等 5 个数据集。对于 GEO 中的 RNAseq 数据,通过基因 ID 找到 ANTXR2 的表达数据,进行组间表达差异比较。在提取了 TCGA 中的 PC 数据和 GTEx 中对应的正常组织数据后,RNAseq 数据经 Toil 流程统一处理^[7],将 TPM 格式的数据进行 log2 转化后进行样本间的表达比较,并使用中位数将 PC 患者分为高表达组和低表达组,进行生存差异

分析。

1.3 细胞培养和转染

人 PC 细胞系 BXPC-3、PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 和 SW 1990 以及正常人胰腺上皮细胞 HPNE 均通过了细胞品系鉴定 (STR)。所有细胞系均接种在补充有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的基础培养基中,在 37℃ 含有 5% CO₂ 的孵箱中培养。将细胞接种到 6 孔板中,培养至约 70% 汇合,过表达质粒 pcDNA 3.1-ANTXR2 及其对照 pcDNA 3.1、shRNA-ANTXR2 及其对照 (sh-NC)、miRNA 模拟物及其对照均按照 Lipofectamine 3000 制造商提供的说明书转染至 AsPC-1 和 PANC-1 细胞中,在转染后 48 h,通过 RT-qPCR 验证转染效率。ANTXR2 的靶向敲除序列为: shANTXR2-1: 5'-GCTCAGTCATGTACTGAAATC-3'; shANTXR2-2: 5'-GCAGTGTCTCTGCACTTACA-3'; shANTXR2-3: 5'-GCTGCAAAGTGTTATTAAGG-3'。

1.4 实时荧光逆转录链式聚合酶反应

使用 TRIzol 法提取总 RNA,然后分别将 miRNA 和 mRNA 逆转录为 cDNA。使用 All-in-One miRNA qPCR 试剂盒对 miR-145-5p 和 U6 进行逆转录,然后根据制造商的建议进行 qPCR,热循环条件:95℃,10 min;95℃,10 s;55℃,20 s;72℃,10 s,循环 40 次。使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒逆转录 mRNA,通过 SuperReal PreMix Plus 试剂盒进行 qPCR 检测,热循环条件:95℃,15 min;95℃,10 s;55℃,30 s;72℃,32 s,循环 40 次。miRNA 和 mRNA 的逆转录使用 Mastercycler 逆转录仪进行,qPCR 使用 LightCycler 96 实时荧光定量分析仪进行分析。引物序列如下:GAPDH 上游:5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3',下游:5'-GTCATGAGTCTTCCACGATACC-3';ANTXR2 上游:5'-TG-GGGATCGTTTGTGG-3',下游:5'-ACCCCAACGAACCTCC-ATTC-3';miR-145-5p 上游:5'-GTCCAGTTTTCCAGGAATC-3';U6 上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 ANTXR2 和 miR-145-5p 与内参基因 (GAPDH, U6) 的相对表达^[8]。miR-145-5p 和 U6 的下游引物使用的是 All-in-One miRNA qPCR 试剂盒中的通用下游引物,该序列已被确认。由于涉及商业利益,无法提供具体序列。

1.5 Western blot

将细胞重悬在 RIPA 蛋白裂解液中,并加入蛋白酶抑制剂混合物,然后使用 BCA 蛋白测定试剂盒对提取的蛋白质进行定量,用 10% SDS-PAGE 分离等量的蛋白质 (40 μg) 并转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,用 ANTXR2 的兔一抗 (1:2 000),GAPDH 兔一抗 (1:10 000),在 4℃ 下孵育过夜。然后根据制造商的说明与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联羊抗兔二抗 (1:10 000) 一起孵育。将 ECL 混合溶液 (A:B=1:1) 滴到膜的蛋白面侧,使用聚变电化学发光系统曝光目的条带。使用 AlphaEaseFC 软件对条带进行灰度值分析,并根据内参蛋白 GAPDH 的灰度值计算相对表达量。

1.6 CCK-8 实验

将 AsPC-1 和 PANC-1 细胞以约 2 000 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中,在指定的时间点 (0 d、1 d、2 d 和 3 d) 检测。检测之前加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37℃ 下孵育 2 h,使用多

功能酶标仪测量 450 nm 处的光密度(optical density, OD)值并进行分析。

1.7 流式细胞术

使用细胞周期检测试剂盒进行细胞周期检测。搜集处理过的细胞,用 70% 冷乙醇溶液重悬,在 4℃ 下固定过夜。PBS 洗涤固定液后,用 RnaseA 和碘化丙啶(PI)混合工作液(9:1)避光孵育 30 min。NovoCyte 流式细胞术系统计数染色的细胞,NovoExpress 软件进行细胞周期分析。

1.8 划痕实验

将细胞(约每孔 4×10^4 个)接种到 6 孔板中,培养至汇合成单层细胞。用 200 μ L 无菌移液枪头垂直于孔画线,去掉培养基并用 PBS 冲洗 3 次后,每孔加入 2 mL 无血清培养基,在显微镜下进行拍照,然后继续培养 24 h,再次在显微镜下进行拍照,使用 Image J 软件测量后计算划痕前后的相对的距离变化。

1.9 Transwell 实验

接种细胞之前,在 Transwell 上层小室膜上预涂上等量的 Matrigel 基质胶,并在 37℃ 下静置 2 h。将含有大约 5×10^4 个细胞的 100 μ L 无血清 DMEM 细胞悬液加入上腔室中,并在底部腔室中加入 500 μ L 补充有 20% FBS 的培养基作为诱导剂。然后在 37℃ 和 5% CO₂ 条件下继续孵育 24 h。24 h 后,用湿润的棉签擦去未穿过膜的细胞和基质胶,用 4% 多聚甲醛固定穿透膜的细胞 30 min,然后用 1% 结晶紫染色 15 min。使用 PBS 溶液冲洗晾干后,在显微镜下随机拍摄 5 个区域的图像,并计算穿透细胞的相对数量。

1.10 双荧光素酶报告实验

将 ANT XR2 的野生型和突变型 3'UTR (ANT XR2-3'UTR-WT 和 ANT XR2-3'UTR-MUT) 置入 GV272 荧光素酶报告载体,使用 Lipofectamine 3000 将 2 组荧光素酶报告载体分别与 miR-mimics 和 miR-NC 两两共转染到 293T 细胞,并使用 Renilla 质粒进行归一化。转染 48 h 后,使用 Infinite M200 酶读数仪测量并通过双荧光素酶报告系统分析数据。

1.11 统计学处理

所有统计分析均使用 Graph-Pad Prism 7.0 进行。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间数据通过独立样本 *t* 检验进行分析,多组间的比较使用单因素方差分析。使用 Kaplan-Kmeier 法计算患者的生存率。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

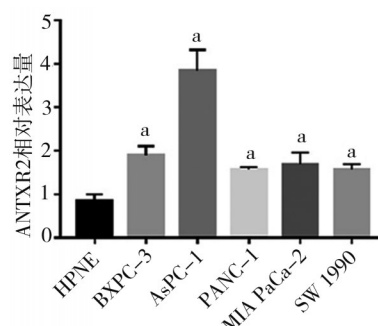
2.1 ANT XR2 在 PC 中表达情况并与患者预后的关系

为了研究 ANT XR2 在 PC 中的表达,本研究分析了 5 个 PC 数据集。结果显示,相比于正常或癌旁组织,ANT XR2 mRNA 在肿瘤组织中的表达水平明显上调 ($P<0.05$, 表 1)。同时,采用 RT-qPCR 检测了 5 株 PC 细胞系和 1 株正常胰腺上皮细胞系中 ANT XR2 的表达。结果显示 ANT XR2 在 PC 细胞中明显上调 ($F=48.700$, 均 $P<0.05$, 图 1)。此外,在 TCGA 数据集中,相比于原发肿瘤为 T1 和 T2 的组织, T3 和 T4 的组织中 ANT XR 的表达水平明显升高 ($t=2.926$, $P=0.013$, 图 2A)。在分化等级为 G3/G4 与 G2 的组织中,ANT XR2 表达的

表达水平也高于 G1 ($F=10.751$, $P<0.05$, 图 2B), 但 G3/G4 和 G2 的 ANT XR2 表达水平无统计学差异 ($P>0.05$)。另外,低表达 ANT XR2 的患者总体生存期 (overall survival, OS) 优于高表达 ANT XR2 的患者 [HR=1.72 (1.13, 2.61), $P=0.011$, 图 2C]。以上结果表明,ANT XR2 在 PC 中表达上调并与患者预后有关。

表 1 5 个胰腺癌数据集中 ANT XR2 的表达 ($n; \bar{x} \pm s$)

数据集	组织类型	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	数量	表达量
GSE41368	正常组织	11.910	0.000	6	2.572 \pm 0.518
	肿瘤组织			6	8.845 \pm 1.183
GSE15471	正常组织	8.092	0.000	39	7.383 \pm 1.349
	肿瘤组织			39	9.311 \pm 0.628
GSE16515	正常组织	3.554	0.000	16	3.278 \pm 2.790
	肿瘤组织			36	5.297 \pm 2.522
GSE62452	正常组织	7.537	0.000	61	5.991 \pm 0.928
	肿瘤组织			69	7.019 \pm 0.612
TGGA-GTEx	正常组织	25.430	0.000	171	2.331 \pm 1.107
	肿瘤组织			179	5.340 \pm 1.106

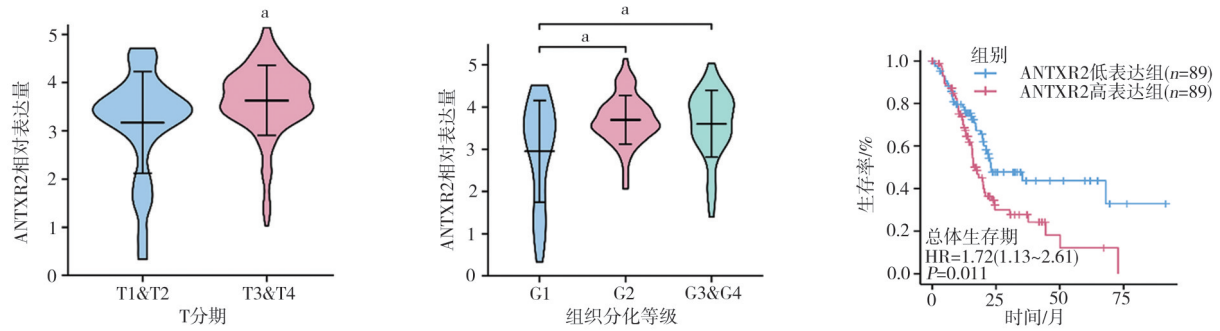


注: a, 与正常细胞组相比, $P<0.05$

图 1 各细胞系中 ANT XR2 的相对表达

2.2 ANT XR2 促进 PC 细胞增殖、迁移和侵袭

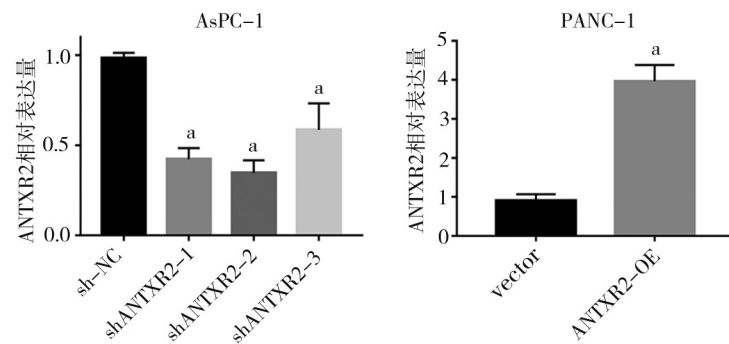
为了探究 ANT XR2 在胰腺癌细胞中的功能, 首先选择 AsPC-1 和 PANC-1 用于敲减和过表达。由于 shANT XR2-2 表现出更为有效且稳定的敲低效率 ($F=31.45$, 均 $P<0.01$, 图 3A), 所以被用于后续实验。如 CCK-8 实验曲线所示, 敲低 ANT XR2 明显抑制了 AsPC-1 的增殖活性 ($t=3.895$, $P=0.018$, 图 3B), 而在 PANC-1 细胞中转染过表达质粒则出现相反的结果 ($t=8.021$, $P=0.001$, 图 3B)。此外, 采用流式细胞术分析细胞周期的分布变化, 结果显示敲低 ANT XR2 后, 细胞的 G₀/G₁ 期细胞比例明显低于 sh-NC 组细胞 ($t=21.470$, $P=0.000$, 图 3C), 而过表达 ANT XR2 使 G₀/G₁ 期细胞比例明显降低 ($t=14.590$, $P=0.001$, 图 3C)。另外, 通过划痕实验和 Transwell 实验检测了 ANT XR2 对 PC 细胞的迁移和侵袭能力的影响。结果显示, 在 AsPC-1 细胞系中, 敲低 ANT XR2 明显抑制了 AsPC-1 细胞的迁移和侵袭能力 ($t=16.63$, $P=0.000$, $t=6.63$, $P=0.003$, 图 4A 和 4B), 而过表达 ANT XR2 则增强了 PANC-1 细胞的迁移和侵袭能力 ($t=9.142$, $P=0.000$, $t=13.46$, $P=0.000$, 图 4A、B)。这些结果表明, ANT XR2 可以促进 PC 细胞增殖、迁移和侵袭。



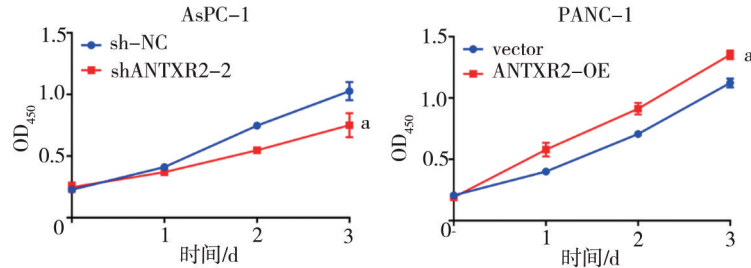
A. ANT XR2 表达与原发肿瘤大小的关系 B. ANT XR2 表达与胰腺癌细胞分化等级的关系 C. ANT XR2 的表达与总体生存期的关系

注:a,与正常组织或低表达组相比, $P<0.05$

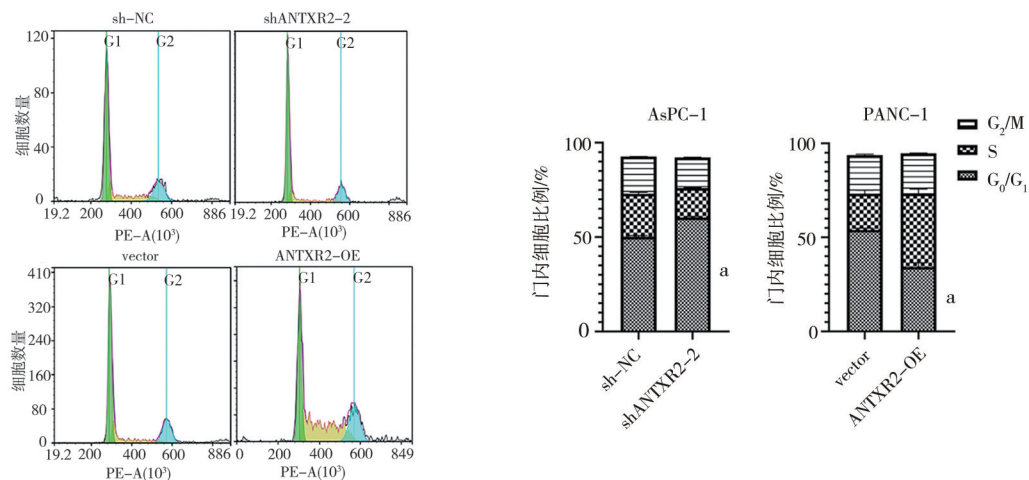
图2 ANT XR2 表达量与患者预后的分析



A. 验证 3 条 shRNA-ANT XR2 和 ANT XR2 过表达质粒的转染效率



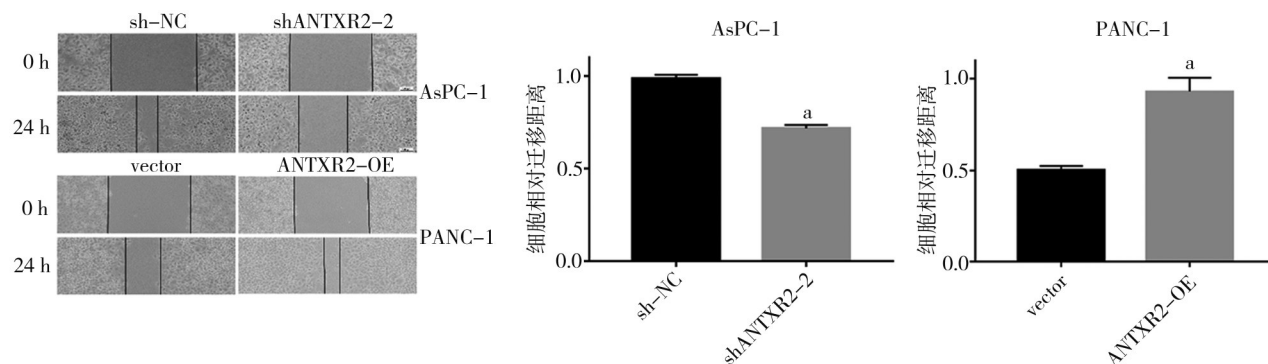
B. CCK-8 检测 ANT XR2 对胰腺癌细胞增殖活性的影响



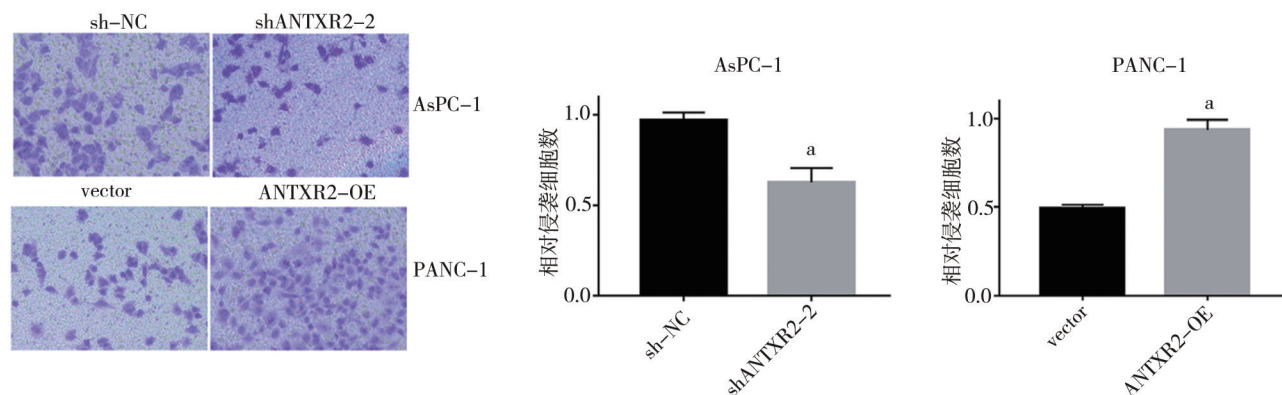
C. 流式细胞术检测 ANT XR2 对胰腺癌细胞周期分布的影响

注:a,与阴性对照组相比, $P<0.05$

图3 ANT XR2 对胰腺癌细胞增殖能力的影响



A. 划痕试验检测 ANT XR2 对胰腺癌细胞迁移能力的影响 (100 ×)



B. Transwell 试验检测 ANT XR2 对胰腺癌细胞侵袭能力的影响 (结晶紫, 400 ×)

注: a, 与 NC 组相比, $P < 0.05$

图 4 ANT XR2 对胰腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

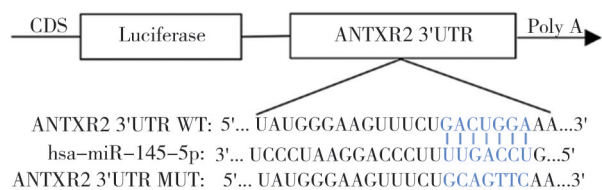
2.3 miR-145-5p 是 ANT XR2 潜在的抑制剂

miRNA 能够调节肿瘤细胞不同的生物过程^[9], 尝试通过 miRNA 靶点预测数据库反向预测可能通过靶向结合 ANT XR2 mRNA 3'UTR 抑制 ANT XR2 表达的 miRNA。4 个 miRNA 靶点预测工具均预测到 miR-145-5p 可能在转录后调节 ANT XR2 的表达 (图 5A、B), 既往研究也证实 miR-145-5p 在多种肿瘤中扮演抑癌因子的作用^[10], 因此选择 miR-145-5p 作为进一步研究目标。通过 RT-qPCR 检测发现 2 株 PC 细胞中 miR-145-5p 表达水平明显低于正常胰腺上皮细胞 ($F=10.100$, $P=0.012$, 图 5C)。将置入野生型 (WT) 与突变型 (MUT) ANT XR2 3'UTR 的荧光素酶报告载体与 miR-NC 和 miR-mimics 分别共转染到 293T 细胞中。结果显示过表达 miR-145-5p 抑制了含有野生型 ANT XR2 3'UTR 报告载体的荧光素酶活性 ($t=6.729$, $P=0.003$, 图 5D), 但含有突变型 ANT XR2 3'UTR 报告载体的细胞荧光素酶活性却没有明显改变 ($P>0.05$)。另外, 将 miR-145-5p 模拟物 (miR-mimics) 及其阴性对照 (miR-NC) 转染到 AsPC-1 和 PANC-1 细胞后, Western blot 检测结果显示过表达 miR-145-5p 可以明显抑

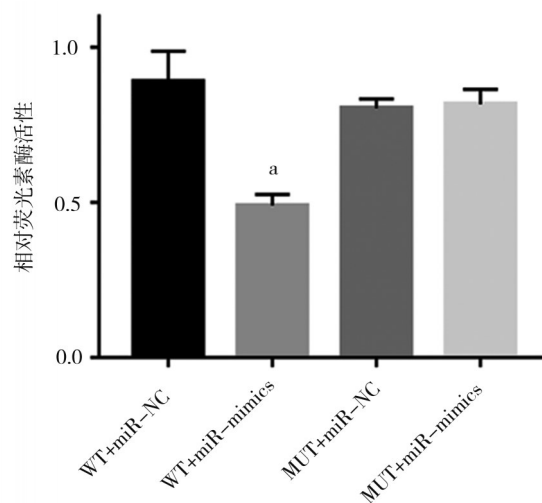
制 ANT XR2 的表达 ($t=17.72$, $t=11.24$, 均 $P<0.05$, 图 5E)。基于以上结果, 本研究认为 miR-145-5p 在 PC 细胞中低表达, 可以通过与 ANT XR2 mRNA 3'UTR 结合抑制 ANT XR2 表达。

2.4 miR-145-5p 在胰腺癌细胞中调控 ANT XR2 的作用机制

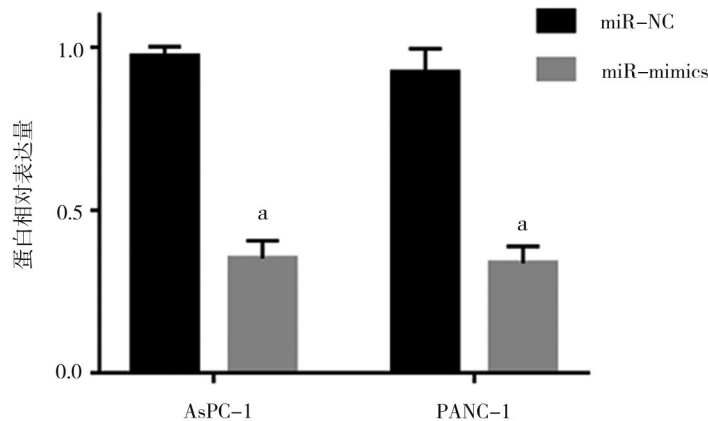
为证明 miR-145-5p 可以调控 ANT XR2 在 PC 细胞中的促癌作用, 将 PANC-1 细胞分为 3 组: vector+miR-NC 组、ANT XR2-OE+miR-NC 组和 ANT XR2-OE+miR-mimics 组。Western blot 实验结果显示, 与 ANT XR2-OE+miR-NC 组相比, ANT XR2-OE+miR-mimics 组 PANC-1 细胞中 ANT XR2 的表达量明显减少 ($t=8.06$, $t=8.00$, 均 $P<0.01$, 图 6A)。细胞功能实验表明, 过表达 miR-145-5p 可以部分抵消过表达 ANT XR2 对 PANC-1 细胞增殖活性促进作用 ($t=5.954$, $P=0.004$, 图 6B), 而过表达 miR-145-5p 也同样增加了 G_0/G_1 期细胞的比例 ($t=8.080$, $P=0.001$, 图 6C)。另外, 过表达 miR-145-5p 也部分抵消了过表达 ANT XR2 对 PANC-1 细胞迁移 ($t=4.701$, 均 $P=0.009$, 图 7A) 和侵袭能力 ($t=4.908$, 均 $P=0.008$, 图 7B) 的促进作用。以上实验结果证明, miR-145-5p 通过靶向 ANT XR2 抑制 PANC-1 细胞的增殖、迁移和侵袭。



B. miR-145-5p 与 ANT XR2 mRNA 3'UTR 结合示意图



D. 双荧光素酶报告实验验证 miR-145-5p 与 ANTXR2 mRNA 3'UTR 的结合



注:a,与NC组相比, $P<0.05$

图5 ANT XR2可能是miR-145-5p的靶标

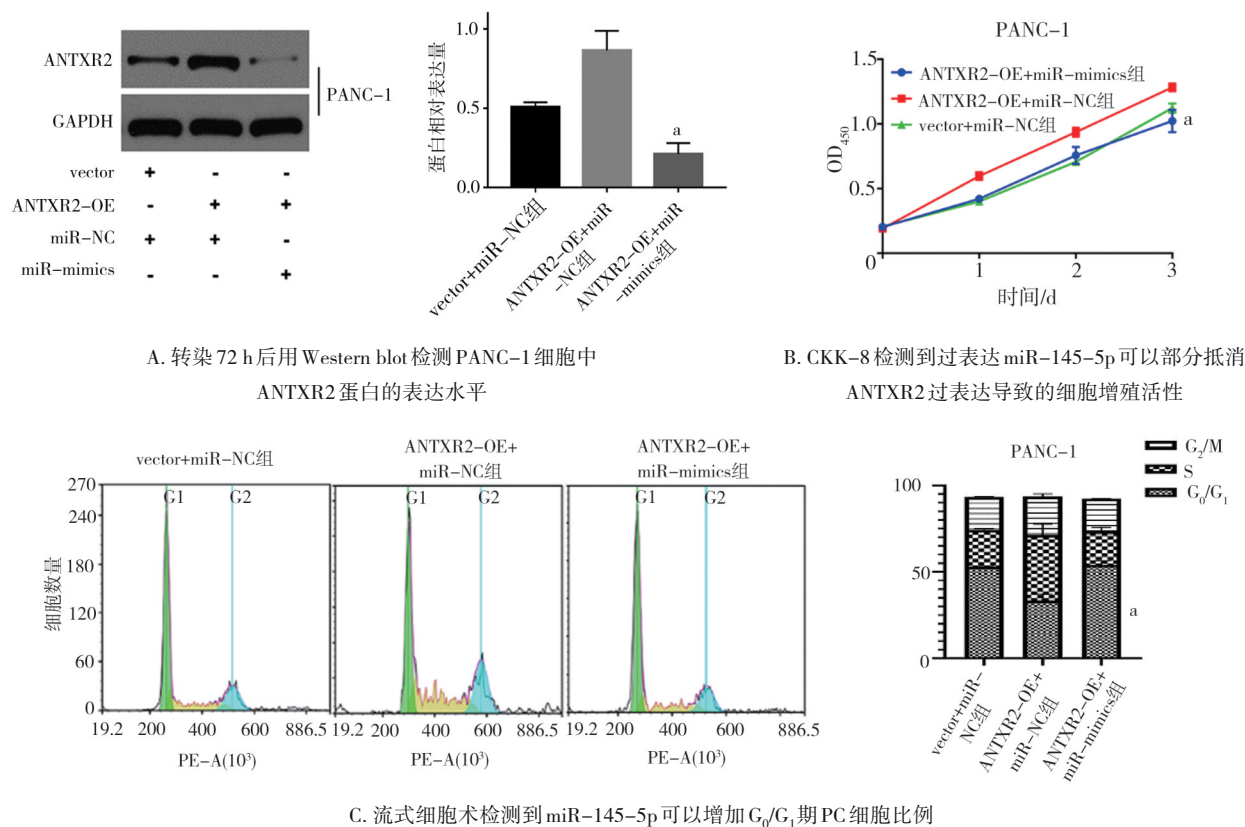


图 6 miR-145-5p 通过靶向 ANT XR2 抑制胰腺癌细胞增殖能力

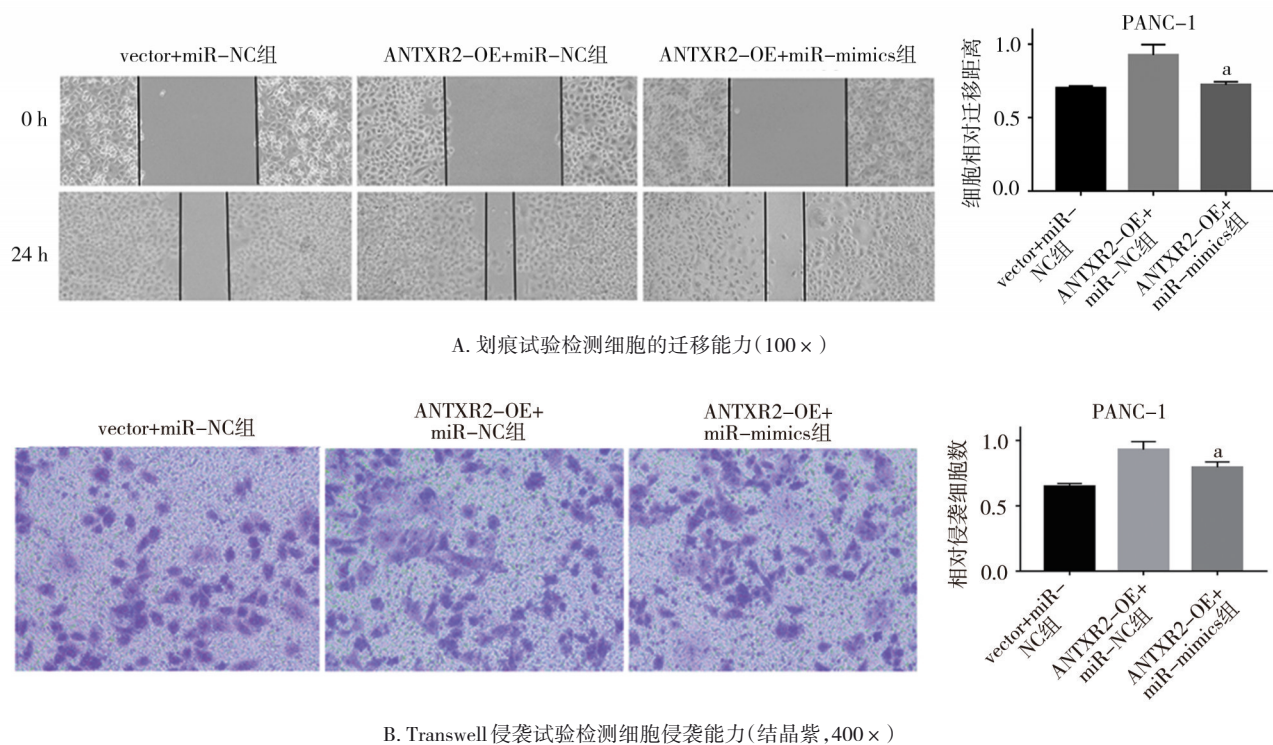


图 7 miR-145-5p 通过靶向 ANT XR2 抑制 PC 细胞的迁移和侵袭能力

3 讨论

本研究证实了 ANTXR2 在 PC 组织和细胞中的高表达,与 PC 的原发肿瘤大小、分化等级以及预后有关,体外实验也证明 ANTXR2 可以促进 PC 细胞增殖、迁移和侵袭。双荧光素酶报告实验结果表明,miR-145-5p 可以靶向抑制 ANTXR2 表达。这是第一项探索 ANTXR2 在 PC 中的临床意义和作为治疗靶点的潜力研究。

既往研究中, Ji CD 等^[11]发现 ANTXR2 在胃癌组织中高表达,其表达水平与胃癌的浸润深度和淋巴结转移呈正相关,与患者的生存时间呈负相关。在胶质母细胞瘤中,过表达 ANTXR2 同样被证明与肿瘤分化等级和预后不良相关^[4]。但在乳腺癌和前列腺癌中, ANTXR2 却发挥了不同的作用,推测是细胞类型的差异导致的。本研究发现, ANTXR2 在胰腺癌组织和细胞中均表达上调,并与患者总生存期呈负相关。另外,通过细胞功能实验,证明 ANTXR2 可以促进 PC 细胞增殖、迁移和侵袭。既往研究表明, ANTXR2 在胃癌细胞中可以与 Wnt 共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6) 产生物理相互作用,促进 Wnt 蛋白到 β -catenin 的信号转导^[12],使 Wnt/ β -catenin 信号通路持续激活促进癌细胞侵袭和转移^[11]。相关报道指出,过表达 ANTXR2 也可以增强 Hippo 通路下游关键转录因子 Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 活性,促进胶质瘤细胞向 G₂/M 期转换,增强肿瘤细胞增殖活性^[4,13]。基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 作为 MMP 家族中主要的胶原水解酶,是肿瘤细胞侵袭和转移的主要动力^[14]。Zou JW 等^[15]报道, ANTXR2 在胶质瘤细胞中可以通过促进细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 磷酸化激活 MMP2,参与肿瘤细胞的侵袭。这些研究不仅支持本研究的结果,而且可能解释了 ANTXR2 促进 PC 细胞增殖、迁移和侵袭的机制。因此, ANTXR2 是 PC 中一个潜在的治疗靶点。

miRNA 是抗癌治疗有前途的工具,因为它能同时抑制多个靶基因而发挥协同作用^[16]。miR-145 曾被报道可以调节多个癌基因的表达,例如 SMAD4、KRAS、MMP-9 和 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 等^[17-18]。本研究采用细胞实验证明, miR-145-5p 可以与 ANTXR2 3'UTR 结合并抑制其表达,为 miR-145-5p 找到一个新的潜在靶点。此外, RT-qPCR 实验证实了 miR-145-5p 在 PC 细胞中低表达。KRAS 基因的激活突变发生在多数 PC 病例中, di Magliano MP 等^[19]发现 KRAS 突变可以抑制 miR-145 表达,而 miR-145 也可以抑制 KRAS 表达,这可能是 miR-145 在胰腺癌中低表达的部分原因。本研究证实 miR-145-5p 可以通过抑制 ANTXR2 的表达从而抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,

为胰腺癌的治疗提供新的研究思路。

综上所述,本研究证实 ANTXR2 在 PC 组织和细胞中高表达,促进了 PC 细胞增殖、迁移和侵袭,且与患者预后密切相关。而 miR-145-5p 可以通过抑制 ANTXR2 表达抑制 PC 细胞增殖、迁移和侵袭,为寻找新的胰腺癌治疗靶点提供参考依据。

参考文献

- [1] Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2020, 395(10242): 2008–2020.
- [2] Qian ZR, Robinson DA, Nowak JA, et al. Association of alterations in main driver genes with outcomes of patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(3): e173420.
- [3] Finnell JG, Tsang TM, Cryan L, et al. A canstatin-derived peptide provides insight into the role of capillary morphogenesis gene 2 in angiogenic regulation and matrix uptake[J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 587–596.
- [4] Tan J, Liu M, Zhang JY, et al. Capillary morphogenesis protein 2 is a novel prognostic biomarker and plays oncogenic roles in glioma[J]. *J Pathol*, 2018, 245(2): 160–171.
- [5] Ye L, Sun PH, Malik MFA, et al. Capillary morphogenesis gene 2 inhibits growth of breast cancer cells and is inversely correlated with the disease progression and prognosis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(6): 957–967.
- [6] Ye L, Sanders AJ, Sun PH, et al. Capillary morphogenesis gene 2 regulates adhesion and invasiveness of prostate cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(6): 2149–2153.
- [7] Vivian J, Rao AA, Nothaft FA, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 314–316.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [9] Kim VN. microRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 376–385.
- [10] Xu WX, Hua YT, Deng F, et al. miR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: a comprehensive review[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3122–3131.
- [11] Ji CD, Yang L, Yi WJ, et al. Capillary morphogenesis gene 2 maintains gastric cancer stem-like cell phenotype by activating a Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncogene*, 2018, 37(29): 3953–3966.
- [12] Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice[J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 535–538.
- [13] Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(2): 73–79.
- [14] Reeves CV, Wang X, Charles-Horvath PC, et al. Anthrax toxin receptor 2 functions in ECM homeostasis of the murine reproductive tract and promotes MMP activity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34862.
- [15] Zou JW, Xu L, Ju Y, et al. Cholesterol depletion induces ANTXR2-dependent activation of MMP-2 via ERK1/2 phosphorylation in neuroglioma U251 cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(1): 186–190.
- [16] Taucher V, Mangge H, Haybaeck J. Non-coding RNAs in pancreatic cancer: challenges and opportunities for clinical application[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(4): 295–318.
- [17] Zeinali T, Karimi L, Hosseini N, et al. Overexpression of miRNA-145 induces apoptosis and prevents proliferation and migration of MKN-45 gastric cancer cells[J]. *EXCLI J*, 2020, 19: 1446–1458.
- [18] Zhou J, Zhang XY, Li WL, et al. microRNA-145-5p regulates the proliferation of epithelial ovarian cancer cells via targeting SMAD4[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 54.
- [19] di Magliano MP, Logsdon CD. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1220–1229.

(责任编辑:周一青)