

miR-124-3p.1 靶向 PRDM2 调节 JAK/STAT 通路对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响

肖艳景, 薛金慧, 白慧丽

(郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007)

摘要: [目的] 研究 miR-124-3p.1 对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨其作用机制。[方法] 运用 qRT-PCR 法检测组织和细胞中 miR-124-3p.1、PR 结构域蛋白 2 (PRDM2) 的表达; 将 miR-124-3p.1 mimics、miR-NC、anti-miR-124-3p.1 mimics、anti-miR-NC 用脂质体法转染 PANC-1 细胞; Western blot 检测细胞中 PRDM2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达; MTT 法检测细胞增殖。[结果] 与人正常胰腺组织细胞相比, 胰腺癌组织细胞中 PRDM2 表达显著性升高, miR-124-3p.1 表达显著性降低 ($P < 0.05$); PRDM2 为 miR-124-3p.1 的靶标。过表达 miR-124-3p.1 可抑制胰腺癌细胞增殖、促进凋亡、抑制 JAK/STAT 通路。[结论] miR-124-3p.1 可抑制胰腺癌细胞增殖和促进凋亡, 可能与靶向 PRDM2 和抑制 JAK/STAT 通路有关。

关键词: miR-124-3p.1; PRDM2; PANC-1; 胰腺癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2019) 09-0803-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B008

Effect of miR-124-3p.1 Targeting PRDM2 on Cell Proliferation and Apoptosis in PANC-1 via JAK/STAT Pathway

XIAO Yan-jing, XUE Jin-hui, BAI Hui-li

(Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of miR-124-3p.1 on cell proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells, and to explore its mechanism. [Methods] qRT-PCR was used to detect the expression of miR-124-3p.1 and PRDM2 in tissues and cells. miR-124-3p.1 mimics, miR-NC, anti-miR-124-3p.1 mimics, anti-miR-NC was transfected into PANC-1 cells by liposome method. The protein expression of PRDM2, p-JAK2 and p-STAT3 was detected by Western blot, cell proliferation was detected by MTT assay. [Results] Compared with normal pancreatic tissue and cells, the expression of PRDM2 was significantly increased, and the expression of miR-124-3p.1 was significantly decreased in pancreatic cancer tissues and cells ($P < 0.05$). PRDM2 was a target of miR-124-3p.1. Overexpression of miR-124-3p.1 inhibited pancreatic cancer cell proliferation, promotes apoptosis, and inhibited JAK/STAT pathway. [Conclusion] miR-124-3p.1 could inhibit the proliferation and promote apoptosis of pancreatic cancer cells, which may be related to targeting PRDM2 and inhibiting JAK/STAT pathway.

Subject words: miR-124-3p.1; PRDM2; PANC-1; pancreatic cancer; proliferation; apoptosis

miRNA 为 19~25 个核苷酸组成的内源单链非编码小分子 RNA, 约占人类基因组的 1%, 在种群间具有高度的保守性^[1]。miR-124 在人体多种组织器官的癌症中均具有异常表达, Liang 等^[2] 研究报道, miR-124 在胰腺癌中表达下调, 但 miR-124 在胰腺

癌中的作用机制尚未完全阐明。PR 结构域蛋白 (PR domain-containing, PRDM) 家族蛋白为一类具有一个 PR 结构域和数量不等的锌指结构 (除 PRDM11), 广泛存在于灵长类、啮齿类、鸟类和两栖类动物具调控表观遗传功能的蛋白^[3], 其可在癌症发生、造血、血管发育、神将系统发育和胚胎发育中发挥重要作用^[4]。PR 结构域蛋白 2 (PR domain-containing 2, PRDM2) 具有 HMT 活性, 可调控基因的转录和表达, 影响多种癌症的发生^[5]。PRDM2 在膀胱癌^[6]、肺癌^[7]、结直

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (142102310461)

通信作者: 肖艳景, 副主任医师, 本科; 郑州大学附属郑州中心医院病理科, 河南省郑州市桐柏北路 16 号 (450007); E-mail: xiaoyanjingok@163.com

收稿日期: 2019-03-22; 修回日期: 2019-06-26

肠癌^[8]发生中均具有重要作用。本研究检测胰腺癌组织中 PRDM2 和 miR-124-3p.1 表达及 PRDM2 在胰腺癌细胞中的表达,观察过表达 miR-124-3p.1 对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 材料

组织标本收集于本院 2017 年 10 月至 2018 年 6 月期间外科手术切除的胰腺癌标本 39 例。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者及家属均签署知情同意书。

人正常胰腺细胞 HPDE6-C7、胰腺癌细胞 PANC-1 和 AsPC-1 购自美国 ATCC;BCA 蛋白定量试剂盒、脂质体 LipofectamineTM2000、逆转录试剂盒购自北京普利莱基因技术公司;PVDF 膜购自迈博瑞生物膜技术有限公司;SDS-PAGE 试剂盒、MTT、ECL 发光液和 RIPA 蛋白裂解液购自南京森贝伽生物科技公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自苏州宇恒生物科技公司;Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;凝胶成像分析仪购自德国耶拿分析仪器公司;半干转膜仪购自美国伯乐公司;流式细胞仪购自德国 Partec 公司;ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统购自德国耶拿分析仪器公司;紫外分光光度计购自德国耐驰 Netzsch 公司;细胞培养箱购自德国安捷伦科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清的培养基培养人正常胰腺细胞 HPDE6-C7、胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1,于 37℃,5%CO₂ 培养箱中常规培养。

1.2.2 细胞转染

将 miR-124-3p.1mimics 转染 PANC-1 标记为 miR-124-3p.1 组,未转染的细胞标记为 miR-NC 组,转染 anti-miR-124-3p.1mimics 标记为 anti-miR-124-3p.1,转染 anti-miR-NC 的细胞标记为 anti-miR-NC,转染成功后用于 qRT-PCR 实验、双荧光素酶基因实验、MTT 实验、流式细胞法实验和 Western blot 实验。

1.2.3 qRT-PCR 实验

取适量 1.2.2 各组细胞并行裂解操作,采取 RNA 抽提试剂盒对 RNA 行定量抽提,采取逆转录

试剂盒进行 cDNA 生成,其后采取 qRT-PCR 试剂盒对 PRDM2 及 miR-124-3p.1 进行定量评估,以得出其表达能力的数值。

1.2.4 双荧光素酶基因实验

取适量 1.2.2 各组细胞并行裂解操作,先后加入萤火虫荧光素酶缓冲液及海肾荧光素酶缓冲液,依次检验萤火虫荧光素酶及海肾荧光素酶的活性,作为表达产物的参照,检测 miR-124-3p.1 对 PRDM2 表达水平的干预程度。

1.2.5 MTT 实验

取适量 1.2.2 各组细胞,与 MTT 溶液混匀后沉淀,联合 DMSO 继续混匀,待沉淀完全消失后检验波长为 480nm 时细胞吸光度(A);检验完毕后进行再次检验,直至完成全部孔位。

1.2.6 流式细胞法实验

取适量 1.2.2 各组细胞,洗涤、沉淀后混入 10μl Annexin V- / FITC 和 10μl 10mg/ml 的 PI,遮光保存 20min。采取流式细胞仪对细胞凋亡率进行检验。以早期凋亡率 (Annexin V+/PI-) 和晚期凋亡率 (Annexin V+/PI+) 的总数计算细胞总凋亡率。

1.2.7 Western blot 实验

取适量 1.2.2 各组细胞并行裂解操作,采取 BCA 法对细胞内全部蛋白进行精确分析并水解,采用 PVDV 转膜固定,混入 I 型抗体和蛋白粉剂,低温保存 12h 以上。其后去除膜并混入 II 型抗体,室温保存 2h。显影后采取靶条带和 GAPDH 灰度值之比值代表靶蛋白水平。

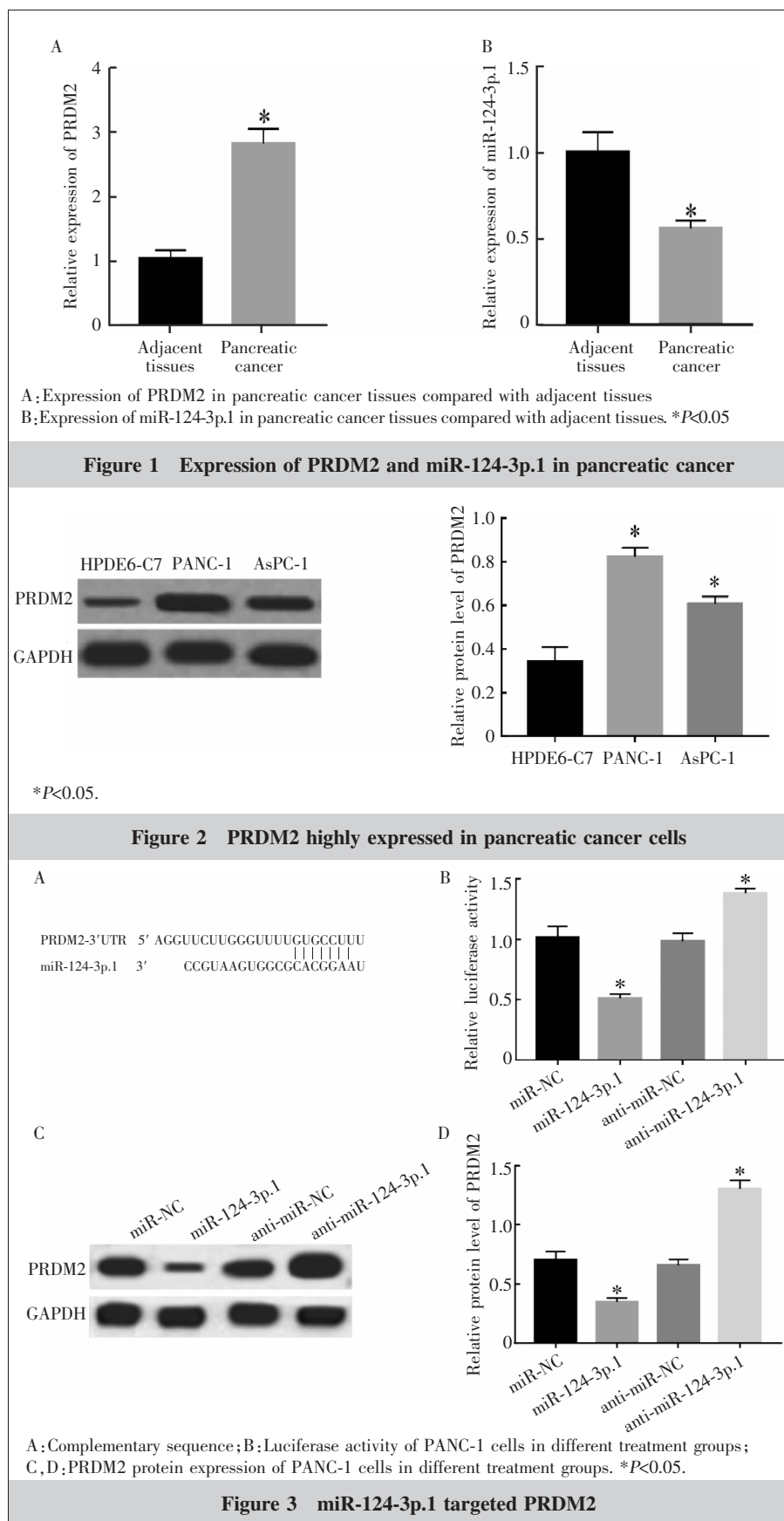
1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 *t* 检验比较;多组间数据采用方差分析进行比较。*P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织中 PRDM2 和 miR-124-3p.1 表达

运用 qRT-PCR 对胰腺癌组织和癌旁健康组织中的 PRDM2 和 miR-124-3p.1 进行检测,与癌旁健康组织相比,PRDM2 表达显著性升高 (Figure 1A), miR-124-3p.1 表达显著性降低 (Figure 1B),差异均具有统计学意义 (*P* < 0.05)。



2.2 PRDM2 在胰腺癌细胞中高表达

与人正常胰腺细胞 HPDE6-C7 相比,胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 中 PRDM2 表达显著性升高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 2)。在 AsPC-1 细胞, PANC-1 细胞中 PRDM2 的表达差异更明显,故选取选取 PANC-1 细胞用于后续实验。

2.3 miR-124-3p.1 靶向 PRDM2

运用 miRcode 数据库预测到 miR-124-3p.1 与 PRDM2 3' UTR 存在结合位点 (Figure 3A); 双荧光素酶活性检测结果显示,与 miR-NC 组相比, miR-124-3p.1 组 WT-PRDM2 细胞中荧光活性显著性降低, MUT-PRDM2 细胞中荧光活性不受影响 (Figure 3B); 与 miR-NC 组相比, miR-124-3p.1 组细胞中 PRDM2 表达显著性降低,与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-124-3p.1 组细胞中 PRDM2 表达显著性升高 (Figure 3C, 3D) ($P < 0.05$)。

2.4 过表达 miR-124-3p.1 抑制胰腺癌细胞增殖

与 miR-NC 组相比, miR-124-3p.1 组细胞 miR-124-3p.1 的表达显著性升高 (Figure 4A)。用 MTT 法检测细胞增殖率, miR-124-3p.1 在 24、48、72h 细胞增殖水平均明显下降 (Figure 4B)。因此, miR-124-3p.1 表达过量可对胰腺癌细胞增殖存在抑制作用。

2.5 过表达 miR-124-3p.1 促进胰腺癌细胞凋亡

运用流式细胞术检测细胞凋亡,与 miR-NC 组相比,

miR-124-3p.1 组细胞的凋亡率显著性升高(Figure 5)($P<0.05$)。过表达 miR-124-3p.1 促进胰腺癌细胞凋亡。

2.6 过表达 miR-124-3p.1 抑制 JAK/STAT 信号通路

Western blot 检测细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达,与 miR-NC 组相比,miR-124-3p.1 组细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达均显著性降低(Figure 6),差异均有统计学意义($P<0.05$)。过表达 miR-124-3p.1 抑制 JAK/STAT 信号通路。

3 讨论

miRNA 是一种小的非编码 RNA,长度约为 20~25 个核苷酸,可作为抑癌基因或癌基因在肿瘤发生过程中起着至关重要的作用。miRNAs 是一种表达明显的肿瘤标志物,精确定位并处理 miRNAs 有利于肿瘤的早期诊断与防治。Liu 等^[9]发现,miR-124-3p 在胃癌中可通过靶向 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Rac1)和特异性蛋白 1(SPI)抑制胃癌的发生发展。

近期 Liang 等^[2]研究证实,lncRNA-XIST 在胰腺癌和 PC 细胞中高表达,在 PC 细胞中其表达与 miR-140/ miR-124 呈反向调节,且对 p53、CDK1、p21 和 p27 蛋白发挥相反的作用,提示 XIST 可通过抑制 miR-140/miR-124 的表达促进 PC 细胞增殖、细胞周期相关因子表达。本研究运用 qRT-PCR 检测 miR-124-3p.1 表达发现,miR-124-3p.1 在胰腺癌组织中低表达,这与前人研究结果相吻合。运用荧光素酶报告基因检测实验验证 miR-124-3p.1 靶向 PRDM2,且过表达 miR-124-3p.1 抑制 PANC-1 细胞增殖、促进凋亡。

PRDM2 长约 150kb,有 13 个外显子,位于 1p36 号染色体,蛋白产物为 RIZ1 和 RIZ2^[10]。关婷等^[11]在肺鳞癌的研究中阐明,PRDM2 在肺鳞癌低表达,过表达 PRDM2 可抑制裸鼠移植瘤的生长速度。刘晶晶等^[12]在肺癌细胞系的研究中验证,PRDM2 在肺癌中低表达,且 PRDM2 mRNA 和蛋白表达与去甲基化的程度呈正相关。李冠军等在膀胱癌的研究中发现 PRDM2 高表达。2012 年 Abbondanza 等^[13]在乳腺癌中的研究中阐明,PRDM2 甲基化活性与细胞增殖呈负相关。本研究检测了 PRDM2 在胰腺癌组织和细

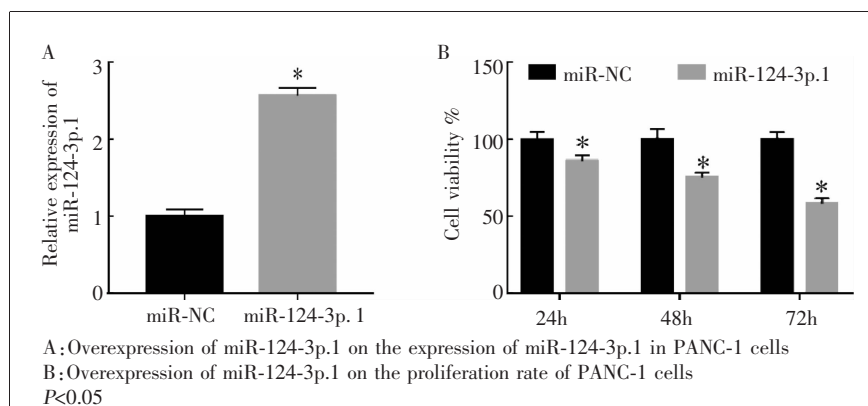


Figure 4 Overexpression of miR-124-3p.1 inhibited proliferation of pancreatic cancer cells

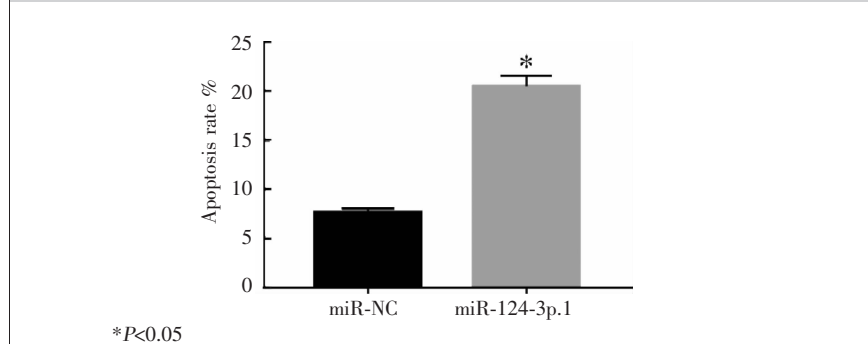


Figure 5 Overexpression of miR-124-3p.1 promoted apoptosis in pancreatic cancer cells

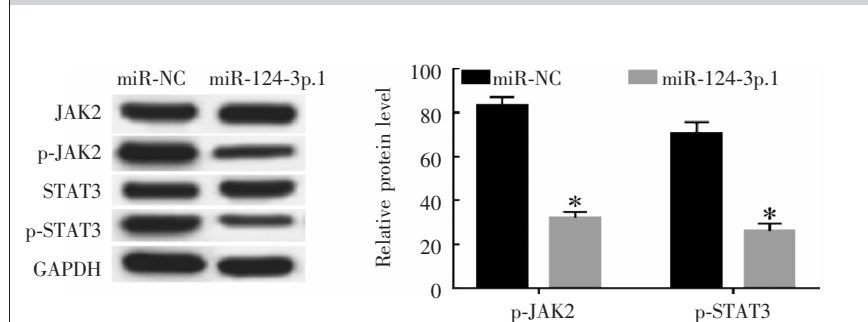


Figure 6 Overexpression of miR-124-3p.1 inhibited JAK/STAT signaling pathway

胞中均为高表达,且 miR-124-3p.1 可抑制 PRDM2 在胰腺癌细胞中的表达,提示在胰腺癌中高表达因子 PRDM2 与低表达因子 miR-124-3p.1 呈负向调控。

Janus 激酶信号传导 (JAK) 及转录激活蛋白 (STAT) 信号通路近些年在肿瘤中的研究颇多。STAT 在正常组织中几乎不出现,其主要在肿瘤组织和肿瘤细胞中大量存在,参与肿瘤的系列生物学功能,发挥促癌作用。JAK 为非受体型酪氨酸激酶,是参与 STAT 活化的主要成员^[14]。李冠军等^[6]在膀胱癌的研究中发现,过表达 miR-153 可通过抑制 JAK/STAT 信号通路而抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移。Abikhair 等^[15]发现环孢菌素 A 通过 IL-22/JAK/STAT 途径促进 OCC 细胞增殖、肿瘤生长,酪氨酸蛋白激酶抑制剂可靶向 IL-22/JAK/STAT 通路逆转 OCC 细胞增殖和肿瘤生长,提示酪氨酸蛋白激酶抑制剂可通过靶向 IL-22/JAK/STAT 通路治疗皮肤鳞状细胞癌。本研究通过检测过表达 miR-124-3p.1 的 PANC-1 细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的表达发现,过表达 miR-124-3p.1 抑制 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的表达,揭示过表达 miR-124-3p.1 抑制 JAK/STAT 信号通路。

综上所述,miR-124-3p.1 可抑制胰腺癌细胞增殖,促进凋亡,其机制可能与靶向 PRDM2 和抑制 JAK/STAT 信号通路有关,为 miR-124-3p.1 靶向治疗胰腺癌提供实验依据。

参考文献:

- [1] Wang MY, Wang GL, Chen XL, et al. The biological function of microRNA and its research progress in tumor diagnosis and treatment[J]. *Advances in Animal Medicine*, 2018, 39(1):95-98.[王明阳,王光磊,陈新亮,等. MicroRNA 的生物学功能及其与肿瘤诊断和治疗的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39(1):95-98.]
- [2] Liang S, Gong X, Zhang G, et al. The lncRNA XIST interacts with miR-140/miR-124/iASPP axis to promote pancreatic carcinoma growth [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 113701-113718.
- [3] Sorrentino A, Rienzo M, Ciccodicola A, et al. Human PRDM2: structure, function and pathophysiology[J]. *BBA*, 2018, 1861(7):657-671.
- [4] Xiao B, Wilson JR, Gamblin SJ. SET domains and histone methylation[J]. *Current Opinion in Bio*, 2003, 13(6):699-705.
- [5] Veerappan CS, Avramova Z, Moriyama EN. Evolution of SET-domain protein families in the unicellular and multicellular ascomycota fung[J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8:190.
- [6] Li GJ, Ya GW, Tang ZY, et al. miR-153 targets PRDM2 gene and affects invasion and migration of bladder cancer through JAK/STAT signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2018, 34(1):58-63.[李冠军, 亚国伟, 唐正严, 等. miR-153 靶向 PRDM2 基因并通过 JAK/STAT 信号通路影响膀胱癌的侵袭和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1):58-63.]
- [7] Tan SX, Hu RC, Xia Q, et al. The methylation profiles of PRDM promoters in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotargets & Therapy*, 2018, 11:2991-3002.
- [8] Pandzic T, Rendo V, Lim J, et al. Somatic PRDM2 c.4467delA mutations in colorectal cancers control histone methylation and tumor growth[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(58): 98646-98659.
- [9] Kwok G, Zhao J, Weiss J, et al. Translational applications of microRNAs in cancer, and therapeutic implications[J]. *Noncoding RNA Res*, 2017, 2(3-4): 143-150.
- [10] Liu F, Hu H, Zhao J, et al. miR-124-3p acts as a potential marker and suppresses tumor growth in gastric cancer[J]. *Biomed Rep*, 2018, 9(2):147-155.
- [11] Guan T. The methylation of PRDM2 gene promoter is involved in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma[D]. Hengyang: Nanhua University, 2014.[关婷. PRDM2 基因启动子甲基化参与肺鳞癌发病机制[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.]
- [12] Liu JJ. Methylation of lung cancer cell lines PRDM2, PRDM5 and PRDM16 genes and their effects on expression [D]. Hengyang: University of South China, 2012.[刘晶晶. 肺癌细胞系 PRDM2、PRDM5、PRDM16 基因甲基化及对表达的影响研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2012.]
- [13] Abbondanza C, De RC, D'Arcangelo A, et al. Identification of a functional estrogen-responsive enhancer element in the promoter 2 of PRDM2 gene in breast cancer cell lines [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(3):964-975.
- [14] Beatty G, Shahda S, Beck T, et al. A phase I b/II study of the Jak1 inhibitor, itacitinib, plus paclitaxel and gemcitabine in advanced solid tumors[J]. *Oncologist*, 2018, 23(8):1-12.
- [15] Abikhair BM, Roudiani N, Chen J, et al. Ruxolitinib inhibits cyclosporine-induced proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(17):e120750.