**引用本文**:倪文,王曦,王奇胜,等.长链非编码RNA MIR4435-2HG靶向微小RNA-1-3p调控信号通路磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶B对胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的机制研究[J].安徽医药,2021,25(3):467-473.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.009.**

◇药学研究◇

# 长链非编码RNA MIR4435-2HG靶向微小RNA-1-3p调控信号通路磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶B对胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的机制研究

倪文,王曦,王奇胜,苏俊

作者单位:汉川市人民医院,湖北 孝感 431600

**摘要: 目的** 探讨长链非编码RNA MIR4435-2HG(LncRNA MIR4435-2HG)通过调控微小RNA-1-3p(miR-1-3p)的表达对胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响及其可能作用机制。**方法** 体外培养正常胰腺细胞系hTERT-HPNE与胰腺癌细胞系PANC-1、SW1990、PaTu8988、BxPC-3,将胰腺癌PaTu8988细胞按照随机数字表法分为si-MIR4435-2HG组(转染MIR4435-2HG siRNA)、si-con组(转染siRNA Control)、miR-1-3p组(转染miR-1-3p mimics)、miR-con组(转染miR-1-3p阴性对照)、si-MIR4435-2HG+anti-miR-1-3p组(共转染MIR4435-2HG siRNA与miR-1-3p抑制剂)、si-MIR4435-2HG+anti-miR-con组(共转染MIR4435-2HG siRNA与miR-1-3p抑制剂的阴性对照),同时将未经任何处理的细胞作为NC组。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中MIR4435-2HG与miR-1-3p的表达;双荧光素酶报告基因检测MIR4435-2HG与miR-1-3p的相互作用。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)分析敲低MIR4435-2HG及上调miR-1-3p表达对胰腺癌细胞增殖的影响;Transwell迁移及侵袭实验检测MIR4435-2HG及上调miR-1-3p表达对胰腺癌细胞迁移及侵袭能力的影响。蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)及磷脂酰肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路相关蛋白的表达。**结果** MIR4435-2HG在胰腺癌细胞中的表达水平明显高于正常胰腺细胞;MIR4435-2HG可特异性结合miR-1-3p并调控其表达活性;敲低MIR4435-2HG与上调miR-1-3p表达后,可抑制胰腺癌PaTu8988细胞增殖,明显减弱细胞迁移及侵袭能力[其中NC组、miR-con组、si-MIR4435-2HG组增殖活性分别为48 h:(1.21±0.10)、(1.18±0.12)、(0.86±0.09),细胞迁移数量分别为(90.56±9.16)、(88.56±8.91)、(26.49±2.10),细胞侵袭数量分别为(160.79±16.12)、(155.09±15.49)、(69.23±7.10),均$P<0.05$],下调PaTu8988细胞中cyclin D1、MMP2、MMP9、p-Akt、PI3Kp110α、PI3Kp110β的表达;抑制miR-1-3p表达可促进胰腺癌PaTu8988细胞增殖、迁移及侵袭。**结论** 敲低LncRNA MIR4435-2HG可通过靶向调控miR-1-3p表达并抑制PI3K/Akt信号通路活化而降低细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达,进而减弱胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。

**关键词:** 胰腺肿瘤; RNA,长链非编码; RNA MIR4435-2HG; 微小RNA-1-3p; 磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶B信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

# Mechanism of LncRNA MIR4435-2HG regulated signaling pathway PI3K/Akt on proliferation, invasion and migration of pancreatic cancer cells by regulating miR-1-3p expression

NI Wen,WANG Xi,WANG Qisheng,SU Jun

*Author Affiliation:Hanchuan People's Hospital, Xiaogan, Hubei* 431600, *China*

**Abstract: Objective** To investigate the effects of long-chain non-coding RNA MIR4435-2HG (LncRNA MIR4435-2HG) on the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells by regulating the expression of microRNA-1-3p (miR-1-3p) and its possible mechanism.**Methods** The normal pancreatic cell line hTERT-HPNE and pancreatic cancer cell lines PANC-1, SW1990, PaTu8988 and BxPC-3 were cultured *in vitro*, pancreatic cancer PaTu8988 cells were divided into si-MIR4435-2HG groups (transfection MIR4435-2HG siRNA), si-con group (transfection siRNA Control), miR-1-3p group (transfection miR-1-3p mimics), mir-con group (transfection negative control), si-MIR4435-2HG anti-miR-1-3p group (co-transfection MIR4435-2HG siRNA and miR-1-3), si-MIR4435-2HG anti-miR-con group (co-transfection MIR4435-2HG siRNA negative control with miR-1-3p inhibitors) according to random number table method p inhibitors, while cells without any treatment were taken as the NC group. The expression of MIR4435-2HG and miR-1-3p was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The dual luciferase reporter gene detected the interaction of MIR4435-2HG with miR-1-3p. MTT assay was used to analyze the effect of knockdown of MIR4435-2HG and up-regulation of miR-1-3p expression on proliferation of pancreatic cancer cells. Transwell migration and invasion assays were performed to detect the effects of MIR4435-2HG and up-regulation of miR-1-3p expression on migration and invasion of pancreatic cancer cells. Western blotting was

used to detect the expression of cyclin D1, MMP2, MMP9 and phosphatidylinositol kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) signaling pathway-associated proteins. **Results** The expression level of MIR4435-2HG in pancreatic cancer cells was significantly higher than that of normal pancreatic cells. MIR4435-2HG could bind specifically to miR-1-3p to modulate the expression of miR-1-3p. Knockdown of MIR4435-2HG and up-regulation of miR-1-3p expression inhibited the proliferation of pancreatic cancer PaTu8988 cells, significantly attenuated cell migration and invasion [The proliferative activity of NC group, miR-con group and si-MIR4435-2HG group were 48 h:(1.21±0.10), (1.18±0.12), (0.86±0.09), the number of cell migration was (90.56±9.16), (88.56±8.91), (26.49±2.10), the number of cell invasion was (160.79±16.12), (155.09±15.49), (69.23±7.10), all $P < 0.05$], and down-regulated the expression of cyclin D1, MMP2, MMP9, p-Akt, PI3Kp110α, and PI3Kp110β in PaTu8988 cells. Inhibition of miR-1-3p expression promoted proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer PaTu8988 cells. **Conclusion** Knockdown of LncRNA MIR4435-2HG can reduce the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells by targeting the regulation of miR-1-3p expression and inhibiting the activation of PI3K/Akt signaling pathway, thereby reducing cell proliferation, migration and invasion-related protein expression.

**Key words:** Pancreatic neoplasms; RNA, long noncoding; RNA MIR4435-2HG; MiR-1-3p; PI3K/Akt signaling pathway; Proliferation; Migration; Invasion

胰腺癌是一种恶性程度高的恶性肿瘤，胰腺癌早期即可发生局部浸润及转移[1-2]。目前手术、放疗等手段对胰腺癌的治疗效果较差且病人生存预后差[3]。因而从胰腺癌的发生机制方面探究有效治疗胰腺癌的方法具有十分重要的意义。既往研究发现长链非编码RNA（Long non-coding RNA，LncRNA）可参与基因转录激活、调节蛋白功能及转录后调控等多种生物学过程，并可调控恶性肿瘤转移及侵袭[4]。研究表明长链非编码RNA MIR4435-2HG（Long non-coding RNA MIR4435-2HG，LncRNA MIR4435-2HG）在肝细胞癌中的表达明显增高，并可通过调控微小RNA-487a（microRNA-487a，miR-487a）表达进而促进肝细胞癌细胞增殖[5]。但MIR4435-2HG在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌发生发展过程的影响尚未可知。相关报道指出微小RNA-1（microRNA-1，miR-1）在胰腺癌内皮细胞中呈低表达，上调miR-1表达可以抑制胰腺癌内皮细胞迁移及血管生成[6]。通过starBase在线网站预测到微小RNA-1-3p（microRNA-1-3p，miR-1-3p）可能是MIR4435-2HG的靶基因，然而MIR4435-2HG是否可通过调控miR-1-3p表达进而参与胰腺癌的发生发展过程尚未可知。已有报道指出磷脂酰肌醇激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路失活可明显抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭[7]。然而，MIR4435-2HG是否可调控PI3K/Akt信号通路进而影响胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭仍未可知。目前国内外对MIR4435-2HG在胰腺癌发生发展中的作用机制研究相对较少，本研究于2017年1月至2018年12月通过抑制胰腺癌细胞中MIR4435-2HG表达，以研究其对胰腺癌细胞的生物学行为及PI3K/Akt信号通路的影响，并首次探讨胰腺癌细胞中MIR4435-2HG与miR-1-3p的靶向调控关系及其内在作用机制，以期为揭示胰腺癌发病机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 正常胰腺细胞系hTERT-HPNE与胰腺癌细胞系PANC-1、SW1990、PaTu8988、BxPC-3均购自美国ATCC细胞库。DMEM培养基购自美国Hyclone公司；胰蛋白酶、胎牛血清均购自杭州四季青生物材料有限公司；Lipofectamine2000转染试剂购自美国Invitrogen公司；MIR4435-2HG干扰序列（siRNA MIR4435-2HG）与siRNA control均购自上海吉玛制药技术有限公司；miR-1-3p mimics、miR-1-3p抑制剂（anti-miR-1-3p）及其各自相应无意义序列均购自广州锐博生物科技有限公司；Trizol试剂、逆转录试剂盒与实时荧光定量PCR试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒及荧光素酶报告基因载体均购自上海碧云天生物技术有限公司；四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（MTT法）检测试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司；Transwell小室购自美国Corning公司；Matrigel基质胶购自美国Sigma公司；兔抗人基质金属蛋白酶2（MMP2）与基质金属蛋白酶9（MMP9）抗体均购自美国Novus Biologicals公司；兔抗人细胞周期蛋白D1（cyclin D1）、p-Akt、PI3Kp110α、PI3Kp110β抗体均购自美国Cell Signal Technology公司；蛋白裂解液与BCA蛋白检测试剂盒均购自南京凯基生物技术有限公司；HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自美国Santa Cruz公司。

**1.2 方法**

**1.2.1** *细胞转染及分组* 正常胰腺细胞系hTERT-HPNE与胰腺癌细胞系PANC-1、SW1990、PaTu8988、BxPC-3均接种至含有10%胎牛血清的DMEM培养基的培养瓶内，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱内培养，根据细胞生长状态及时更换培养基，待细胞汇合度达到80%左右时，加入0.25%胰蛋白酶消化细胞，收集细胞进行传代培养，当细胞稳定传代2~3代后进行后

续研究。选取生长状态良好的胰腺癌PaTu8988细胞，以每孔$2\times10^5$个细胞的密度接种于6孔板，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱内培养24 h，待细胞汇合度达到50%左右时进行转染，参照Lipofectamine™2000转染试剂盒说明书进行操作，将胰腺癌PaTu8988细胞按照随机数字表法分为si-MIR4435-2HG组（转染MIR4435-2HG siRNA）、si-con组（转染siRNA Control）、miR-1-3p组（转染miR-1-3p mimics）、miR-con组（转染miR-1-3p阴性对照）、si-MIR4435-2HG+anti-miR-1-3p组（共转染MIR4435-2HG siRNA与miR-1-3p抑制剂）、si-MIR4435-2HG+anti-miR-con组（共转染MIR4435-2HG siRNA与miR-1-3p抑制剂的阴性对照），同时将未经任何处理的细胞作为NC组。转染6 h后用含有10%胎牛血清的DMEM新鲜培养基更换不含血清的培养基，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱内继续培养48 h。

**1.2.2** *实时荧光定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）检测细胞中LncRNA MIR4435-2HG与miR-1-3p的表达水平* 分别收集各组细胞，用液氮低温研磨细胞，加入1 mL Trizol试剂，室温放置5 min后向每管酶加入200 μL氯仿，上下摇晃15 s后置于室温条件下静置2 min，4 ℃，1 2000 r/min，离心10 min，吸取上层水相置于另一新的1.5 mL EP管内，加入500 μL异丙醇，充分混匀后室温静置7 min，4 ℃，12 000 r/min，离心10 min，弃上清，加入1 mL 75%乙醇洗涤RNA，4 ℃，12 000 r/min，离心10 min，弃上清，超净工作台干燥7 min，加入30~40 μL DEPC水，置于60 ℃恒温水浴锅3 min，目的是促使RNA完全溶解，吸取2 μL RNA检其浓度。参照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为互补DNA（cDNA），采用qRT-PCR检测MIR4435-2HG与miR-1-3p的表达情况，按照实时荧光定量PCR试剂盒说明配置25 μL的反应体系：SYBR Premix Ex Taq Ⅱ（2×）12.5 μL，cDNA样本2 μL，正反向引物各1 μL，DEPC水补足体系至25 μL。反应条件为95 ℃ 2 min，95 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 20 s，循环35次，每孔均设置3个复孔，反应结束后按照$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算MIR4435-2HG与miR-1-3p的相对表达量。

**1.2.3** *蛋白质印迹法（Western blotting）检测cyclin D1、MMP2、MMP9及PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达* 收集各组细胞并加入细胞裂解液，12 000 r/min转速离心10 min收集上清液即细胞总蛋白，BCA试剂盒检测蛋白浓度，煮沸蛋白促使其变性，同时制备浓缩胶与分离胶，蛋白样本上样，用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）电泳分离蛋白，PVDF膜湿法将分离的蛋白凝胶转移至膜上，使用蛋白封闭液室温条件下封闭1 h，加入蛋白一抗，稀释比均为1∶100，4 ℃条件下孵育过夜，次日室温条件下分别加入二抗，孵育1 h后置于凝胶成像系统曝光，应用Quantity One软件分析蛋白条带灰度值。

**1.2.4** *细胞增殖实验* 收集对数生长期胰腺癌PaTu8988细胞，胰蛋白酶消化制备单细胞悬液，调整细胞密度为$3\times10^4$/mL，以每孔$4\times10^3$个细胞的密度接种于96孔板，转染24 h、48 h、72 h时分别检测各孔吸光度值，每组均设置3个复孔，检测时各孔分别加入20 μL MTT溶液，室温孵育4 h后弃培养基，各孔分别加入200 μL二甲基亚砜，振荡10 min后置于酶标仪检测490 nm处各孔吸光度值。

**1.2.5** *细胞迁移及侵袭实验* 转染48 h后收集各组胰腺癌PaTu8988细胞，加入0.25%胰蛋白酶消化细胞，预冷PBS洗涤细胞，加入200 μL不含血清的DMEM培养基重悬细胞，制备单细胞悬液，调整细胞密度为$2\times10^5$/mL，同时用不含血清的DMEM培养基稀释Matrigel基质胶（稀释比1∶8），取100 μL稀释液铺于Transwell小室底部的上室面，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱静置1 h。将单细胞悬液以每孔$5\times10^3$个细胞的密度平铺于Transwell小室的上室，取600 μL含有10%胎牛血清的DMEM培养基加入Transwell小室的下室，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱培养24 h，取出Transwell小室并用棉签擦去上室细胞，多聚甲醛固定20 min后使用结晶紫溶液染色15 min，预冷PBS洗涤后置于倒置显微镜下观察穿过滤膜的细胞，统计侵袭细胞数。Transwell迁移实验中Transwell小室的上室不涂Matrigel基质胶稀释液，其余步骤同Transwell侵袭实验。

**1.2.6** *双荧光素酶报告基因实验* 使用starbase对MIR4435-2HG和miR-1-3p结合进行预测，发现MIR4435-2HG的3'UTR上存在miR-1-3p的结合位点，提示MIR4435-2HG可能靶向结合miR-1-3p。构建含有miR-1-3p结合位点的MIR4435-2HG-3'野生型（WT-MIR4435-2HG）及突变型报告基因载体（MUT-MIR4435-2HG），同时将对数生长期的胰腺癌PaTu8988细胞以每孔$2\times10^4$个细胞的密度接种于24孔板，放入37 ℃、二氧化碳体积分数5%、相对湿度95%的培养箱内继续培养，转染前3 h将培养基更换为不含血清的培养基，将miR-1-3p mimics与WT-MIR4435-2HG共同转染胰腺癌PaTu8988细胞，以共转染miR-con为对照；将miR-1-3p mimics与MUT-MIR4435-2HG共同转染胰腺癌PaTu8988细胞，以共转染miR-con为对照，转染6 h后更换为含有10%胎牛血清的新鲜培养基，继续培养48 h后，参照双荧

光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶活性。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 21.0统计学软件对实验数据进行分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用$t$检验，采用单因素方差分析比较多组间差异，多组间两两比较采用SNK-$q$检验，以$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 qRT-PCR检测胰腺癌细胞和正常胰腺细胞系中lncRNA MIR4435-2HG和miR-1-3p表达量** 在胰腺癌细胞系中lncRNA MIR4435-2HG的表达水平较正常胰腺细胞系hTERT-HPNE明显升高（$P<0.05$），而miR-1-3p的表达水平显著降低（$P<0.05$），其中在胰腺癌PaTu8988细胞中miR-1-3p的表达水平降低最为明显，因此选取胰腺癌PaTu8988细胞进行后续研究，见表1。

**表1** 胰腺癌细胞系PANC-1、SW1990、PaTu8988、BxPC-3和正常胰腺细胞系hTERT-HPNE中lncRNA MIR4435-2HG和miR-1-3p表达量比较/$\bar{x}\pm s$

| 组别 | 重复次数 | lncRNA MIR4435-2HG | miR-1-3p |
|---|---|---|---|
| hTERT-HPNE | 3 | 0.79±0.28 | 1.79±0.18 |
| PANC-1 | 3 | 1.86±0.09① | 0.88±0.09① |
| SW1990 | 3 | 2.39±0.14① | 0.89±0.10① |
| PaTu8988 | 3 | 1.76±0.08① | 0.75±0.09① |
| BxPC-3 | 3 | 1.98±0.11① | 0.96±0.10① |
| $F$值 | | 42.018 | 38.272 |
| $P$值 | | <0.001 | <0.001 |

注：①与hTERT-HPNE细胞组比较，$P<0.05$。

**2.2 敲低MIR4435-2HG对PaTu8988增殖、迁移和侵袭的影响** 敲低MIR4435-2HG后，观察胰腺癌PaTu8988细胞增殖、迁移及侵袭能力改变，如图1、表2所示，与NC组、si-con组比较，si-MIR4435-2HG组PaTu8988细胞增殖活性显著降低（$P<0.05$），细胞迁移及侵袭数量均明显减少（$P<0.05$），进一步研究结果显示，si-MIR4435-2HG组PaTu8988细胞中cyclin D1、MMP2、MMP9蛋白表达水平较NC组、si-con组均显著降低（$P<0.05$），表明敲低MIR4435-2HG可通过降低cyclin D1、MMP2、MMP9蛋白表达进而抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭。

**2.3 MIR4435-2HG靶向miR-1-3p表达** 通过starbase对MIR4435-2HG和miR-1-3p结合进行预测示意图，见图2。构建含有miR-1-3p结合位点的MIR4435-2HG-3’野生型（WT-MIR4435-2HG）及突变型报告基因载体（MUT-MIR4435-2HG），在细胞中转染miR-1-3p mimics和MIR4435-2HG野生型及突变型报告基因载体，结果显示，与miR-con组相比，转染miR-1-3p mimics与WT-MIR4435-2HG后可明显降低细胞荧光素酶活性（$P<0.05$）；而转染miR-1-3p mimics与MUT-MIR4435-2HG对细胞荧光素酶活性无明显影响（$P>0.05$），见表3。表明MIR4435-2HG可靶向结合miR-1-3p。qRT-PCR实验检测MIR4435-2HG过表达或抑制其表达后，胰腺癌PaTu8988细胞中miR-1-3p的表达水平，结果显示，与si-con组（0.96±0.09）相比，si-MIR4435-2HG组胰腺癌PaTu8988细胞中miR-1-3p的表达水平（2.19±0.23）显著升高（$P<0.05$）；与pcDNA-con组（0.99±0.11）相比，pcDNA-MIR4435-2HG组胰腺癌PaTu8988细胞中miR-1-3p的表达水平（0.45±0.05）显著降低（$P<0.05$），$F=86.417$，$P<0.001$。表明MIR4435-2HG可负向调控靶基因miR-1-3p的表达。

**表2** 敲低MIR4435-2HG对PaTu8988胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响研究/$\bar{x}\pm s$

| 组别 | 重复次数 | cyclin D1 | 细胞增殖 | | | MMP2 | MMP9 | 细胞侵袭数量 | 细胞迁移数量 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 h | 48 h | 72 h | | | | |
| NC | 3 | 1.00±0.11 | 0.55±0.05 | 1.21±0.10 | 1.95±0.21 | 0.98±0.10 | 1.00±0.11 | 160.79±16.12 | 90.56±9.16 |
| si-con | 3 | 1.01±0.11 | 0.50±0.06 | 1.18±0.12 | 1.91±0.20 | 1.01±0.10 | 1.05±0.11 | 155.09±15.49 | 88.56±8.91 |
| si-MIR4435-2HG | 3 | 0.38±0.04① | 0.45±0.07 | 0.86±0.09① | 1.35±0.14① | 0.39±0.05① | 0.41±0.06① | 69.23±7.10① | 26.49±2.10① |
| $F$值 | | 45.430 | 2.046 | 10.422 | 9.767 | 48.893 | 41.018 | 43.041 | 71.212 |
| $P$值 | | <0.001 | 0.210 | 0.011 | 0.013 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注：cyclin D1为细胞周期蛋白D1，MMP2为基质金属蛋白酶2，MMP9为基质金属蛋白酶9。

①与NC组比较，$P<0.05$。

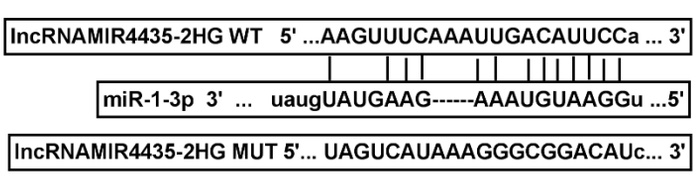
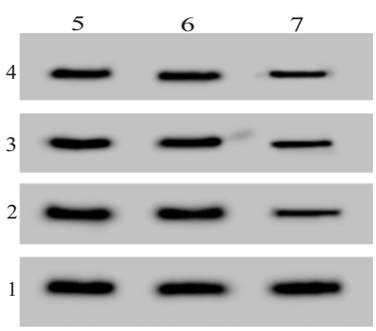



**图2** MIR4435-2HG靶向miR-1-3p表达，生物信息软件预测MIR4435-2HG与miR-1-3p靶向关系

**表3** miR-con或miR-1-3p与报告质粒共转染PaTu8988细胞后双荧光素酶活性检测结果比较/$\bar{x}\pm s$

| 组别 | 重复次数 | 荧光素酶活性 | |
|---|---|---|---|
| | | WT | MUT |
| miR-con | 3 | 1.00±0.11 | 1.02±0.12 |
| miR-1-3p | 3 | 0.42±0.05 | 0.99±0.10 |
| $t$值 | | 8.314 | 0.333 |
| $P$值 | | 0.001 | 0.756 |

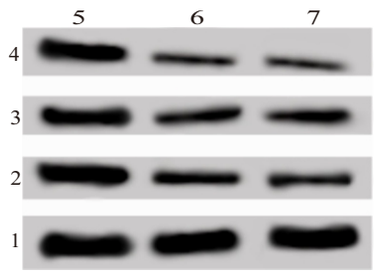
**2.4 高表达miR-1-3p对PaTu8988增殖、侵袭和迁移的影响研究** 胰腺癌PaTu8988细胞中上调miR-1-3p表达后，观察细胞增殖、迁移及侵袭能力，结果显示，相较于NC组、miR-con组，miR-1-3p组胰腺癌PaTu8988细胞增殖活性显著降低（$P$<0.05），迁移及侵袭细胞数均显著减少（$P$<0.05），能够明显抑制cyclin D1、MMP2、MMP9表达（$P$<0.05），见图3、表4。表明胰腺癌细胞中上调miR-1-3p表达可通过下调cyclin D1、MMP2、MMP9表达进而减弱胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力。




注：1—β-肌动蛋白（β-actin）；2—基质金属蛋白酶9（MMP9）；3—基质金属蛋白酶2（MMP2）；4—细胞周期蛋白D1（cyclin D1）；5—NC组；6—miR-con组；7—miR-1-3p组。

**图3** 高表达miR-1-3p蛋白质印迹法检测cyclin D1、MMP2、MMP9的蛋白表达

**2.5 PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达** Western blotting实验检测敲低MIR4435-2HG及上调miR-1-3p后胰腺癌PaTu8988细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达，如图4、表5所示，与si-con组相比，si-MIR4435-2HG组与miR-1-3p组p-Akt、PI3Kp110α、PI3Kp110β的蛋白表达水平均显著降低（$P$<0.05），表明敲低MIR4435-2HG或上调miR-1-3p表达均可抑制PI3K/Akt信号通路活化。




注：1—β-肌动蛋白（β-actin）；2—PI3Kp110β；3—PI3Kp110α；4—p-Akt；5—si-con组；6—si-MIR4435-2HG组；7—miR-1-3p组。

**图4** Western blotting检测敲低MIR4435-2HG及上调miR-1-3p后胰腺癌PaTu8988细胞中磷脂酰肌醇激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路相关蛋白表达

**表5** Western blotting检测敲低MIR4435-2HG及上调miR-1-3p后胰腺癌PaTu8988细胞中磷脂酰肌醇激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路相关蛋白表达比较/$\bar{x}\pm s$

| 组别 | p-Akt | PI3Kp110α | PI3Kp110β |
|---|---|---|---|
| si-con | 0.89±0.09 | 0.76±0.08 | 0.90±0.10 |
| si-MIR4435-2HG | 0.16±0.05① | 0.40±0.05① | 0.40±0.05① |
| miR-1-3p | 0.20±0.03① | 0.36±0.04① | 0.35±0.04① |
| $F$值 | 131.817 | 41.600 | 59.043 |
| $P$值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注：①与si-con组比较，$P$<0.05。

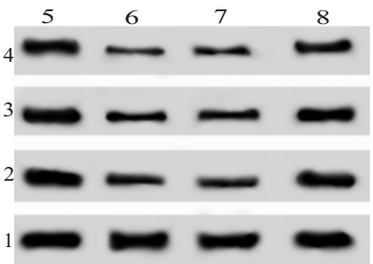
**2.6 miR-1-3p低表达可以部分逆转MIR4435-2HG低表达对PaTu8988增殖、侵袭和迁移的影响** 为了验证敲低MIR4435-2HG是否可通过调控miR-1-3p表达进而对胰腺癌PaTu8988细胞增殖、迁移及侵袭发挥抑制作用，将si-MIR4435-2HG与anti-miR-1-3p、anti-miR-con分别共转染入胰腺癌PaTu8988细胞，如图5、表6所示，与si-MIR4435-2HG+anti-miR-con组相比，si-MIR4435-2HG+anti-miR-1-3p组胰腺癌PaTu8988细胞增殖活性明显增强（$P$<0.05），迁移及侵袭细胞数均明显增加（$P$<0.05），明显促进cyclin D1、MMP2、MMP9表达（$P$<0.05）。表明抑制miR-1-3p表达可部分逆转敲低MIR4435-2HG表达对胰腺癌PaTu8988细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。

**表4** 高表达miR-1-3p对PaTu8988胰腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响研究/$\bar{x}\pm s$

| 组别 | 重复次数 | cyclin D1 | 细胞增殖 | | | MMP2 | MMP9 | 细胞侵袭数量 | 细胞迁移数量 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 h | 48 h | 72 h | | | | |
| NC | 3 | 1.01±0.11 | 0.57±0.05 | 1.15±0.10 | 1.90±0.21 | 1.01±0.10 | 1.03±0.11 | 157.83±15.89 | 88.42±8.96 |
| miR-con | 3 | 1.02±0.12 | 0.50±0.06 | 1.10±0.12 | 1.87±0.20 | 1.03±0.10 | 1.00±0.10 | 159.56±15.96 | 89.12±9.01 |
| miR-1-3p | 3 | 0.40±0.05① | 0.48±0.07 | 0.82±0.09① | 1.31±0.14① | 0.36±0.05① | 0.38±0.05① | 65.34±6.79① | 24.36±2.53① |
| $F$值 | | 39.135 | 1.827 | 8.760 | 9.584 | 58.120 | 49.256 | 47.264 | 74.150 |
| $P$值 | | <0.001 | 0.240 | 0.017 | 0.014 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注：cyclin D1为细胞周期蛋白D1，MMP2为基质金属蛋白酶2，MMP9为基质金属蛋白酶9。

①与NC组比较，$P$<0.05。




注：1—β-肌动蛋白（β-actin）；2—基质金属蛋白酶9（MMP9）；3—基质金属蛋白酶2（MMP2）；4—细胞周期蛋白D1（cyclin D1）；5—si-con组；6—si-MIR4435-2HG组；7—si-MIR4435-2HG+anti-miR-con组；8—si-MIR4435-2HG+anti-miR-1-3p组。

**图5** Western blotting检测cyclin D1、MMP2、MMP9蛋白表达

## 3 讨论

进展期或晚期胰腺癌病人对化疗药物具有一定耐药性而降低治疗效果，病人经治疗后生存率极低[8]。因而探究胰腺癌发病机制及其可能作用分子靶点对提高胰腺癌早期诊断及治疗均具有重要意义。目前LncRNA可通过调控细胞分化、发育等过程进而在多种肿瘤细胞中发挥重要作用，并可为肿瘤治疗提供新方向[9]。有研究表明LncRNA MALAT1可通过调控miR-204表达进而参与胰腺癌发生及发展过程，并可能作为胰腺癌靶向治疗的靶点[10]。但LncRNA与胰腺癌发展进程的相关研究尚未完全阐明，因此继续深入挖掘新型LncRNA分子并探讨其与胰腺癌细胞恶性生物学行为的相关性对提高治疗效果及改善病人预后均具有重要临床意义。

MIR4435-2HG在肺癌细胞中呈高表达，并可通过激活β-连环蛋白信号传导可促进肺癌进展[11]。胃癌病人血浆中MIR4435-2HG的表达水平升高并可作为早期胃癌诊断的分子标志物[12]。Ouyang等[13]研究表明MIR4435-2HG在结直肠癌病人中呈高表达，其高表达量与病人预后不良有关，并可作为预测病人预后的独立预测因子。以上研究表明MIR4435-2HG可能作为癌基因参与肿瘤细胞增殖、迁移等多种生物学过程，因此本研究探讨MIR4435-2HG在胰腺癌细胞中的具体作用，研究结果发现，胰腺癌细胞系中MIR4435-2HG的表达水平均显著升高，进一步通过敲低MIR4435-2HG表达，结果发现胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力均明显受到抑制，并可降低cyclin D1、MMP2、MMP9表达，说明MIR4435-2HG在胰腺癌生物学行为中发挥重要作用。既往研究表明肿瘤增殖、迁移及侵袭与胰腺癌转移早、进展快等有关，抑制cyclin D1、MMP2、MMP9表达可抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭[14-16]。提示抑制MIR4435-2HG表达可通过影响细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达进而影响胰腺癌恶性生物学行为。生物信息学检测发现MIR4435-2HG与miR-1-3p存在相互作用，但其具体作用机制尚未可知。既往研究报道指出miR-1-3p可通过调控BDNF-TrKB信号通路及其他相关蛋白表达进而抑制膀胱癌细胞增殖及侵袭[17-18]。Wang等[19]研究表明miR-1-3p通过靶向DKK1进而抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖及迁移。本研究发现miR-1-3p在胰腺癌细胞中的表达水平明显降低，提示miR-1-3p可能作为抑癌因子参与胰腺癌发生过程。双荧光素酶报告实验证明MIR4435-2HG可靶向结合miR-1-3p，上游MIR4435-2HG可负向调控miR-1-3p表达，同时miR-1-3p可通过逆向调控MIR4435-2HG的表达进而对胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭进行双向调控，说明敲低MIR4435-2HG表达可通过调控miR-1-3p表达进而抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭。提示MIR4435-2HG可通过与miR-1-3p相互作用进而参与胰腺癌发生及发展过程，其可作为胰腺癌早期诊断的分子标志物及治疗靶点。

PI3K/Akt信号通路可参与肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭等生物学过程，肿瘤细胞接受生长因子刺激后可活化受体酪氨酸酶并与PI3K结构中的p85亚基结合进而改变PI3K构象，同时可激活Akt等发生磷酸化进而促使其由细胞质转移至细胞核内最终促使靶基因MMP-2、cyclin D1等进行转录[20]。刘江波等研究表明阻断PI3K/Akt信号通路可通过抑制细胞迁移及侵袭相关蛋白表达进而抑制胰腺癌细胞迁移及侵袭[21]。相关研究报道指出激活PI3K/

**表6** MTT法检测细胞增殖、Transwell检测细胞侵袭和迁移及相关蛋白表达比较/$\bar{x} \pm s$

| 组别 | 细胞增殖 | | | 细胞侵袭数量 | 细胞迁移数量 | cyclin D1 | MMP2 | MMP9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 h | 48 h | 72 h | | | | | |
| si-con | 0.40±0.05 | 1.15±0.12 | 1.92±0.20 | 150.19±15.46 | 85.23±8.65 | 1.05±0.12 | 1.05±0.10 | 1.01±0.10 |
| si-MIR4435-2HG | 0.42±0.07 | 0.87±0.09① | 1.32±0.14① | 65.25±6.01① | 25.79±2.89① | 0.40±0.05① | 0.38±0.04① | 0.41±0.05① |
| si-MIR4435-2HG+anti-miR-con | 0.42±0.05 | 0.85±0.10① | 1.30±0.15① | 60.25±6.13① | 26.29±2.59① | 0.42±0.05① | 0.40±0.04① | 0.42±0.05① |
| si-MIR4435-2HG+anti-miR-1-3p | 0.40±0.06 | 1.09±0.11 | 1.79±0.18② | 121.36±12.10② | 67.56±7.01② | 0.85±0.09② | 0.90±0.10② | 0.87±0.09② |
| $F$值 | 0.119 | 6.242 | 10.679 | 50.190 | 77.451 | 45.353 | 60.978 | 49.433 |
| $P$值 | 0.947 | 0.017 | 0.004 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注：cyclin D1为细胞周期蛋白D1，MMP2为基质金属蛋白酶2，MMP9为基质金属蛋白酶9。

①与si-con组比较，$P$<0.05。②与si-MIR4435-2HG+anti-miR-con组比较，$P$<0.05。

Akt信号通路可促进胰腺癌细胞迁移及侵袭能力[22-23]。本研究结果发现胰腺癌细胞中抑制MIR4435-2HG表达及miR-1-3p过表达后能够明显降低p-Akt、PI3Kp110α、PI3Kp110β蛋白表达水平，与相关研究[24]报道相似。说明抑制MIR4435-2HG表达及miR-1-3p过表达均可抑制PI3K/Akt信号通路激活。提示当机体遭受外界因素干扰或自身微环境变化时MIR4435-2HG表达上调而抑制miR-1-3p表达进而促进机体处于病理状态，并可破坏细胞自身平衡状态进而促使胰腺癌细胞突变导致细胞生物学行为发生改变。

综上所述，MIR4435-2HG在胰腺癌细胞中呈高表达，而miR-1-3p呈低表达，MIR4435-2HG可通过与miR-1-3p相互作用进而促进胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭，推测其原因可能与PI3K/Akt信号通路活化状态有关，可为胰腺癌早期诊断及靶向治疗提供参考依据。但关于miR-1-3p是否通过调控下游靶基因表达进而构建MIR4435-2HG/miR-1-3p/靶基因网络均未可知，推测胰腺癌发生及发展过程中可能存在MIR4435-2HG/miR-1-3p/靶基因调控网络，但仍需进一步研究证实。

（本文图1见插图3-2）

## 参考文献


[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[2] HIJIYA N, TSUKAMOTO Y, NAKADA C, et al. Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma[J]. Cancer Res, 2016, 76(9):2612-2625.

[3] XU Y, CHANG R, PENG Z, et al. Loss of polarity protein AF6 promotes pancreatic cancer metastasis by inducing Snail expression[J]. Nat Commun, 2015, 6(1):7184-7191.

[4] HE Y, MENG XM, HUANG C, et al. Long noncoding RNAs: novel insights into hepatocelluar carcinoma [J]. Cancer Lett, 2014, 344(1):20-27.

[5] KONG Q, LIANG C, JIN Y, et al. The lncRNA MIR4435-2HG is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes cancer cell proliferation by upregulating miRNA-487a[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24(2):26-33.

[6] LI L, LI B, CHEN D, et al. miR-139 and miR-200c regulate pancreatic cancer endothelial cell migration and angiogenesis[J]. Oncol Rep, 2015, 34(1):51-58.

[7] 孙吉春，黄飞舟，聂晚频，等. MiR-21通过PTEN/PI3K/AKT信号通路抑制胰腺癌细胞系生长侵袭能力的体外研究[J]. 中国现代医学杂志，2015，25(12):39-44.

[8] 于琦，赵平，王成锋. 胰腺癌预后相关因素分析[J]. 中国临床医生，2014，42(3):23-26.

[9] YANG L, LIN C, JIN C, et al. LncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs[J]. Nature, 2013, 500(7464):598-602.

[10] 张小路，杜梅红. lncRNA MALAT1调控miR-204表达影响胰腺癌细胞的生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2018，25(1):79-84.

[11] QIAN H, CHEN L, HUANG J, et al. The lncRNA MIR4435-2HG promotes lung cancer progression by activating β-catenin signalling[J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(8):753-764.

[12] KE D, LI H, ZHANG Y, et al. The combination of circulating long noncoding RNAs AK001058, INHBA-AS1, MIR4435-2HG, and CEBPA-AS1 fragments in plasma serve as diagnostic markers for gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(13):21516-21525.

[13] OUYANG W, REN L, LIU G, et al. LncRNA MIR4435-2HG predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer[J/OL]. PeerJ, 2019,7:e6683. DOI: 10.7717/peerj.6683.

[14] 朱建伟，孔祥毓，孔凡扬，等. CYP3A5通过影响cyclin D1蛋白表达水平促进胰腺癌细胞增殖[J]. 中华胰腺病杂志，2018，18(3):175-179.

[15] 张晓娟，王慧娟，张米娜，等. HMGB1/TLR4通路参与Fibulin-5对肺癌细胞增殖和转移的抑制作用[J]. 中国癌症杂志，2017，27(10):761-769.

[16] 杨佳纯，张毅，曹佳，等. DDR1促进胰腺癌细胞AsPC-1的迁移及侵袭能力[J]. 海南医学，2016，27(2):173-176.

[17] ZHANG J, WANG L, MAO S, et al. miR-1-3p Contributes to cell proliferation and invasion by targeting glutaminase in bladder cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(2):513-527.

[18] GAO L, YAN P, GUO FF, et al. MiR-1-3p inhibits cell proliferation and invasion by regulating BDNF-TrkB signaling pathway in bladder cancer[J]. Neoplasma, 2018, 65(1):89-96.

[19] WANG Z, WANG J, CHEN Z, et al. MicroRNA-1-3p inhibits the proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells by targeting DKK1[J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(3):355-364.

[20] 刘益娟，张琳，郑建涛，等. miRNA-455-3p对HCT116结肠癌细胞迁移、侵袭的影响及机制研究[J]. 第三军医大学学报，2018，40(14):1286-1290.

[21] 刘江波，雷亮亮，杨延辉，等. 精氨酸脱亚胺酶阻断PI3K-AKT通路抑制胰腺癌细胞侵袭[J]. 世界华人消化杂志，2016，24(24):3570-3579.

[22] 叶会霖，叶良涛，周雨，等. 肿瘤相关巨噬细胞通过PI3K/Akt途径促进胰腺癌浸润迁移的研究[J/OL]. 中华普通外科学文献（电子版），2015(3):198-205. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2015.03.006.

[23] 付西峰，董秀山，高飞，等. 成纤维生长因子2在胰腺癌中的表达及对胰腺癌细胞侵袭与转移的作用和机制[J]. 山西医科大学学报，2017，48(5):426-431.

[24] 甘辉云，杜敬东，欧阳虹，等. 苯乙基异硫氰酸酯对喉癌Hep-2细胞增殖、凋亡、周期和侵袭转移能力的影响及机制[J]. 中国老年学杂志，2018，38(22):5529-5533.


（收稿日期：2019-09-03，修回日期：2019-09-29）